院士述评 文章编号:0253-3626(2010)02-0161-04

生物大分子药物和纳米药物研究开发中的生物医学评价



刘昌孝，院士，我国药代动力学专家。曾任国家新药研究开发专家委员会委员、国家科技经济专家委员会委员、国家GLP专家委员会委员，国家新药评审委员、中国药理学会常务理事及其所属药物代谢专业委员会主任、数学药理和医药工业专业会委员，现任天津药理学会理事长、天津药学会理事长、亚洲药物代学与药物动力学杂志(英文版)学术主编，以及药学学报等10家国家级学术刊物的编委。承担过25项国家科技攻关、国家新药基金、863、973等重大研究课题。在国内外发表论文240多篇，出版中英文专著15本。获得27项(次)国家部省级和国际学术成果奖励。2000年获得首次香港紫荆花医学成就奖和医学创新奖。1992年获得国务院政府津贴，曾被评为省市先进工作者、劳动模范和全国劳动模范。2003年当选中国工程院院士。

【摘 要】生物大分子药物及其载体给药系统和纳米给药系统研究是前沿学科多学科的渗透性，是21世纪的关键技术的发展的研究方向，具有推广应用的实用性，关键技术的前沿性，载体给药系统技术与生物医药学交叉性，具有学科聚集和含盖的特性。纳米技术将带给医药学前所未有的技术革命，它将大幅度地提高人类健康和保健水平。本文将用已经发表的一些观点和其他信息讨论生物大分子药物和及其以大分子为载体的纳米药物研究开发中的研究开发策略和原则、生物医学评价的研究及其的关键问题。

【关键词】生物大分子药物，纳米给药系统，研究开发策略，研究开发原则，生物医学评价，成药性。

1 前 言

生物大分子药物及其载体给药系统和纳米给药系统研究是前沿学科多学科相互渗透(Infiltration)的结果，是21世纪关键技术的发展研究方向，具有推广应用的实用性(Practice)，关键技术的前沿性(Future-orientation)，载体给药系统技术与生物医药学交叉性，具有学科聚集和含盖的特性(Cross、convergence、cover)。纳米技术将带给医药学前所未有的技术革命，它将大幅度地提高人类健康和保健水平。2003年以来，《Science》和《Nature》杂志先后4次讨论纳米生物效应问题。英国皇家学会和皇家工程院于2004年7月29日发布报告，建议英国政府成立“纳米物质生物环境效应”研究中心。2004年12月5日，欧共体在布鲁塞尔公布了“欧洲纳米战略”，把研究纳米生物环境健康效应问题的重要性，列在欧洲纳米发展战略的第3位。为了抢占这个新兴科学领域的先机，2003年4月《Science》发表文章讨论纳米生物效应以后，10月美国政府就增拨专款启动了该领域的研究工作。2005年美国多个部门同时支持此领域，欧共体也在2004年12月迅速启动了“纳米安全综合研究计划”。

纳米医药研究起步于2000年左右。由于纳米医药在肿瘤、心血管病、传染病等重大疾病的诊治方面所显示出来的广阔的应用前景，近年来各国政府都相继加大了对纳米医药研究的资助力度，美国、德国、瑞士、日本等国家都已将纳米生物技术和纳米医药作为这些国家发展战略一个主要内容，我国也将纳米科学和技术列为重大科学研究计划，其中包括纳米医药。药物纳米载体具有高度靶向、药物控制释放、提高难溶药物的溶解度和吸收率、提高药物疗效和降低毒副作用等优点。纳米颗粒能包裹、浓缩、保护核苷酸，使其免遭核酸酶的降解；比表面积大，具有生物亲和性，易于在其表面耦联特异性的靶向分子，实现基因治疗的特异性；在循环系统中的循环时间较普通颗粒明显延长；让核苷酸缓慢释放，有效地延长作用时间，提高转染效率和转染产物的生物利用度；代谢产物副作用小，无免疫排斥反应等。

大分子为释药载体的纳米药物如能有适宜的半衰期和药物适应给药的环境因素对载体的影响，以控制给药浓度和给药时间可能成为一种理想的给药体系。纳米药物载体研究的难点就是高分子生物降解性药物载体或基因载体，通过降解，载体与药物－基因片段定向进入靶细胞之后，表层的载体被生物降解，药物释放出来发挥疗效，避免了药物在其他组织中释放。目前恶性肿瘤诊断与治疗研究和发明中，超过60%的药物或基因片段采用可降解性高分子生物材料作载体，如聚丙交脂(PLA)、聚已交脂(PGA)、聚已内脂(PCL)、PMMA、聚苯乙烯(PS)、纤维素、纤维素－聚乙烯、聚羟基丙酸脂、明胶以及他们之间的共聚物和生物性高分子物质，如蛋白质、磷脂、糖蛋白、脂质体、胶原蛋白等，利用它们的亲和力与基因片段和药物结合形成生物性高分子纳米颗粒，再结合定向识别器，靶向性与目标细胞表面的整合子结合后将药物送进肿瘤细胞，达到杀死肿瘤细胞或使肿瘤细胞发生基因转染的目的。

理想的生物大分子药物及其载体给药系统和纳米给药系统应具备以下性质：具有较高的载药量、具有较高的包封率、有适宜的制备及提纯方法、载体材料可生物降解和毒性较低或没有毒性；以及具有较长的体内循还时间。这些都是

作者地址：天津药物研究院天津药代动力学与药效动力学国家重点实验室，天津 300193

其成药性研究的关键问题,也是其临床前生物医学评价所关注的科学问题和技术问题。本文将我们已经发表的一些观点[1-4]和其他信息[5-11]讨论生物大分子药物和纳米药物研究开发中的临床前生物医学评价问题。

2 研究开发策略和原则

2.1 研究开发策略

创新性新药大体上有三类:其一是全新化合物分子作用于新发现的药物靶点;其二是全新化合物分子作用于已知的药物靶点;其三是已知的药物分子作用于新发现的药物靶点。第一种创新性新药通常需要开发时间长、投资巨大、成功率低;第二种创新性新药,是一种"me-better"开发战略,这种新药开发周期较短、成本较低、成功率较高,比较适合我国目前的实际,也是国外许多著名的大制药企业最成功的新药市场开发策略。应该指出,"me-better"的开发战略是一种新药创新性开发战略,它与"仿制策略"如"me-too"的开发策略完全不同。从技术的角度讲,给药体系(Drug delivery system, DDS)的研究是"me-better"开发战略的经典范例之一,它是当今国际上的热点课题,涉及各类药物,尤其是生物技术新药包括重组蛋白、DNA、RNA 分子,这类新药在进入体内后如何穿过各种屏障抵达药物作用的靶点,一直是新药开发中的热点和难点。

2.2 研究开发原则

药物研究开发是一个系统工程,有 3 个基本要素来衡量成药性,即体现在药物的安全性(Safety)、有效性(Effectiveness)和产业化(Industrialization)3 个方面。但从医药产业的发展来看,其研究开发原则需要在 7 方面予以重视:(1)重点开发已知药靶的新药,形成自身独立知识产权;(2)不断地集成平台技术,最大限度地开发系列产品,以高速开发出新药;(3)以中国临床治疗的实际为依据,重点开发涉及重大的致死性疾病的创新性新药;(4)建立符合 GMP 要求的可同时生产多种新药的生产线,以大大提高生产效率,降低成本;并确保每种新药制备工艺的先进性,实现质量与成本的竞争优势;(5)保持新药上市速度的领先,是保证新药市场独占性的前提;(6)确保新药在技术上明确的创新性、疗效的卓越性和相当的难度;(7)注重学科交叉所带来的潜在而重大的技术突破。

3 生物医学评价的研究与成药性

生物大分子药物,从广义的定义上来看,可以分为三大类:第一类是生物大分子本身具有生物活性和治疗学价值的药物(蛋白、多肽、酶、基因药物、抗体药物、内源性激素、细胞因子、疫苗等),第二类是以非生物大分子为载体与具有活性和治疗价值的生物大分子结合形成具有一定特点的药物(如 PEG 化的干扰素),第三类是具有活性和治疗价值的小分子与大分子为载体或结合形成具有一定特点的药物(如力达霉素)。

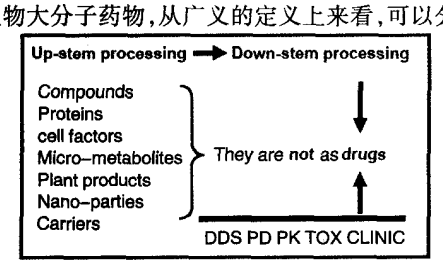


Figure 1 Up-stem processing and down-stem processing for drug evaluation

就大分子生物医药而言,前期的基础研究需要有坚实的基础,提供成药性的理论和技术支持。近年来,功能药物载体医疗技术研究已成为生物医学研究领域重要的研究方向之一,特别是肿瘤治疗的纳米给药系统的研究更为关注。由于生物功能化的纳米粒子易与多种功能药物分子和单克隆抗体或多肽分子组装,用于靶向药物输运和缓释,提高药物生物利用度,增加药物靶向性,可更有效地富集药物于肿瘤部位,从而提高抗肿瘤药物的疗效和减少治疗中非特异性不良反应的许多优点。通过在分子层面上的操作,帮助上述具备光动力治疗能力的纳米粒子在体内自动寻找治疗标靶。如近年提出的对肿瘤新生血管进行抑制的"饥饿疗法"[12-15],可以研发出以肿瘤血管为靶体的新型药物。又如通过高通量方法筛选出的多肽,能特异结合于肿瘤新生血管内皮细胞表面的血管生长因子受体 2,且有分子量小,抗原性低,作用迅速,较易体外及生物合成的优势。因此成为当今靶向分子研究的新方向[16]。近年 Russell 研究组用金纳米颗粒作为光敏药物的疏水载体与光敏剂分子进行组装,以解决光敏剂亲水性差的难题[17]。

建立相关的药学研究技术平台十分必要。这类平台主要由 3 方面组成:(1)高通量工艺筛选技术和微量生物过程优化(Microscale bioprocess optimisation)高通量工艺筛选技术开发包括:自动化微体积发酵工艺参数的筛选技术,自动化微体积细胞培养条件的筛选,自动化、微体积、高通量蛋白复性条件的筛选、高速蛋白纯化方法等技术等,其目的是加速重组蛋白新药生产工艺的开发和优化速度,建立具质量和成本竞争优势生产工艺。(2)聚乙二醇化重组蛋白药物技术平台(Pegylated recombinant protein, PEG-Protein)。PEG 化重组蛋白药物技术是长效重组蛋白新药开发的核心技术,是重组蛋白新药开发的主流研发方向,也是为临床提供 PEG 化重组蛋白药物安全、有效的新药开发平台。(3)靶向性纳米药物载体系统(Targeting drug delivery system, TDDS)技术平台。研发主动靶向性隐性脂质体(Active targeting PEG-liposome)新药,如开发新的肿瘤治疗给药系统,它可以使之具备肿瘤细胞靶向性和细胞内药物释放等特性的肿瘤靶向给药系统,为其有效性和安全性评价研究奠定基础。

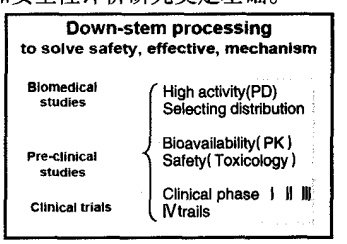


Figure 2 Down-stem processing to solve safety, effective and mechanism

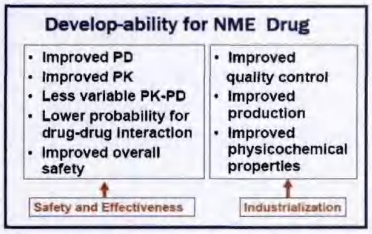


Figure 3 Develop-ability for NMN drug

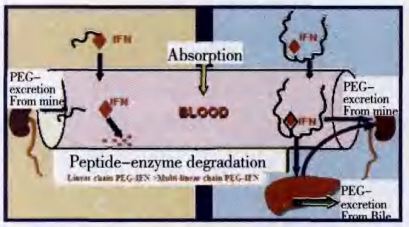


Figure 4 PEG-Interferon degradation by peptide enzyme

Table 1 The biomedical evaluation of nanomedicines[4]

Evaluation terms	Evaluation contents
Biodistribution	Whole organism, cellular level
Metabolic fate	Absorption, distribution, metabolism and excretion
Immunogenicity	IgG/IgM production, cytokine induction
Persistance of non-degradable systems	Possibility of lysosomal storage disease
Biocompatibility	Biological environment and toxicology and adverse effect to patients
Specific therapeutic issues	Therapeutic index of nanomedicines and its delivery systems in drug delivery relates to toxicity pf drug payload

新药研究开发成药性的评价包括药学评价和生物医药学评价，如图 1 所示，其中前者为上游过程（Up-stem processing），后者为下游过程（Down-stem processing）。而下游过程又分为临床前研究和临床研究（图 2）是整个研究开发的关键过程，它决定新分子实体药物（NME）的命运，而且与新药研究开发的 3 个要素息息相关（图 3）。也就是说在生物医学评价过程中所获得的信息，如药效学、药代动力学、毒理学、安全性、质量可控性、产业化的可行性以及临床的安全有效性等市构成新药可开发性的基本科学依据。

4 评价的研究的关键问题

4.1 给药系统的疗效评价

在药效学评价中，临床前研究应该根据需要选择适宜的疾病模型开展药效评价，并且要求按规范开展对比研究。在比较体外试验和体内试验结果是应注意量效关系的解释。如 PEG 化干扰素的量效关系体内体外结果的差别是与 PEG 化产物的酶水解相关。在评价中需要注意新方法新技术的应用。如利用小动物活体成像系统观察不同给药时间小鼠各重要脏器的肿瘤浸润情况，检测各靶分子在蛋白水平的表达变化，从而在整体水平揭示复合纳米微粒在肿瘤病理过程中的作用。又如通过激光共聚焦显微镜观察药物在肿瘤细胞表面以及内部的分布，观察药物靶向识别肿瘤细胞的效果。药物处理细胞不同时间处理后观察细胞形态学变化，细胞分化、细胞凋亡情况，流式细胞仪检测细胞分化指标、凋亡指标以及细胞周期变化。

4.2 提高生物相容性和靶向性

生物大分子表面的羧基和氨基官能团即可增加其在水溶液中的分散性，也可进一步用来链接抗癌药物、荧光染料、磁性纳米颗粒、量子点和蛋白质等功能化基团，以实现载药、示踪、成像、靶向、治疗等功能，或提高其生物相容性。提高生物相容性的方法可以从两类途径来实现：（1）通过表面的氨基或羧基链接生物相容较好的蛋白质；（2）通过非共价键方式和水溶性高分子相互结合以提高分散性。在提高生物相容性的研究方向是对癌细胞的靶向性研究的重要组成部分。如近年来发现维生素受体在很多类型的肿瘤细胞表面过度表达，从而为其作为一种广谱识别肿瘤的靶向分子探针提供了可能性。由于毛细管作用和管壁与抗癌药物的相互作用，药物可以缓慢释放，与传统的抗癌药物直接注射方式相比，可以显著提高药物生物利用度。以共价键方式负载药物的体系则需要在体内发生化学反应以选择性断开链接药物的化学键。

4.3 给药系统的安全性评价

生物大分子药物和以其为载体的药物的安全性评价，除遵循一般药物安全性评价的技术要求外，还需要考虑其特殊性。如表 1 所示的纳米药物的安全性评价，在于安全性有关的药代动力学方面，生物分布、代谢命运、载体的可降解性等研究就有别于一般小分子药物的药代动力学研究。药物的毒性和副作用还与生物相容性有关，需要设计一些特定的试验来评价。还有特殊的给药系统在评价药效时也需要考虑与安全性有关的技术问题。

4.4 给药系统的代谢评价

在比较药代动力学和代谢研究中，获得新产品的动力学和代谢特征关键。根据不同构建方法获得的药物可能出现不同的动力学和代谢结果。在大、小鼠体内研究药物的吸收（血药浓度、消除半衰期和体内平均滞留时间）、组织分布（在各脏器组织中的分布体积和浓度以及生物利用度）、代谢特征、药物毒性以及安全性等指标评价。选择不同参数的纳米材料和介质，制备载药系统，如具荧光作用的复合纳米粒子，利用活体成像系统和荧光示踪作用观察纳米粒子能否穿越血脑屏障，分布于小动物的中枢神经系统，寻找药物突破血脑屏障的最佳参数，并评价其安全性和可行性。

通过构建突变体延长蛋白药物半衰期，常用方法有（1）增加蛋白药物的糖基化程度，通过糖基化一方面在蛋白药物

表面增加了侧链,增加蛋白质稳定性,阻碍了蛋白酶对蛋白药物的降解作用,减少了肾小球滤过;(2)通过形成缓释的微沉淀物,使释放游离型药物的时间延长,从而改变其动力学特征。如 Lantus 是从大肠杆菌 K12 株表达的重组人胰岛素的突变体,在人胰岛素 A 链第 21 个位点将 Asp 突变成 Gly;在 B 链碳端最后第 30 个位点加两个 Arg,使胰岛素等电点 PI 由原来的 pH4.0 变为 pH6.7。这种突变使其在酸性环境下为完全澄清溶液,一旦注入皮下组织则因为等电点特性,变成不溶的微沉淀物[18],可持续释放,最终进入血液,形成一平稳、长时间、无突释的药物浓度曲线,趋近于生理胰岛素的基础分泌水平。其体内浓度相对恒定 24 h 以上[19],因此只需每天注射一次胰岛素。

又如聚乙二醇(Polyethylene, PEG)化修饰蛋白质,即共价修饰 PEG 化(PEGylation),是 PEG 化蛋白药物主要通过增加蛋白质的分子量,减少药物排泄,并且 PEG 可以作为屏障挡住蛋白质分子表面的抗原决定簇[20],减少免疫原性,减少体内清除率,还可以保护蛋白质不易被蛋白酶水解[21],PEG 化的这些特点均有利于延长蛋白药物的半衰期。PEG 化学修饰方法可分为两代,第一代 PEG 化使用分子量≤12 kDa 的 PEG,第二代 PEG 化采用支链 PEG 代替直链 PEG[22],增加偶联的 PEG 分子量,使偶联的 PEG 分子量达到 60 kDa,使每个 PEG 化位点可以偶联两个 PEG 分子[23]。第二代 PEG 化和第一代 PEG 化修饰相比,由于使用支链的 PEG 代替可以减少蛋白酶和蛋白接触,而减弱其水解作用。同时支链 PEG 对蛋白质屏蔽效应显著,从而降低蛋白药物抗原性和免疫原性,随着偶联的 PEG 分子量的增大,体内清除率下降,使血清半衰期得到了进一步的提高。

图 4 显示 PEG 化的 IFN α 2a (Roche 公司的 Pegasys)的体内过程的特点。经 PEG 修饰后的特征。直链 PEG 化干扰素在血液中易被酶降解为干扰素和直链 PEG,而直链 PEG 经肾从尿排泄。支链 PEG 化干扰素在血液中不易被酶降解为干扰素和支链 PEG,能够使支链 PEG 化干扰素达到肝脏后降解,有利于达到治疗肝炎病毒(HCV 或 HBV),支链 PEG 主要从胆汁消除由粪便排泄,而经肾从尿排泄较少。

参 考 文 献

[1] Sun Y D, Chen Z M, Wei H, et al. Nanotechnology challenge: safety of nanomaterials and nanomedicines[J]. Asian J Pharmacodyn Pharmacokinet, 2007, 7(1): 17-31.

[2] Si D Y, Liang W, Sun Y D, *et al. Biomedical evaluation of nanomedicines*[J]. Asian J Pharmacodyn Pharmacokinet, 2007, 7(2): 83-96.

[3] Cheng T F, Sun Y D, Si D Y, et al. Attention on research of pharmacology and toxicology of nanomedicines[J]. Asian J Pharmacodyn Pharmacokinet, 2009, 9(1): 25-27.

[4] Liu C X. Research and Development of Nanopharmaceuticals in China[J]. Nano Biotech Eengin, 2009, 1(1): 1-18.

[5] Holsapple M P, Farland W H, Landry T D, et al. Research strategiefor safety evaluation of nanmotyerials, Part Ⅱ: Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, Current challenges and data needs[J]. Toxicol Sci, 2005, 88(1): 12-17.

[6] Balshaw D M, Philbert M, Suk W A. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part Ⅲ: Nanoscale technologies for assessing risk and improving public health[J]. Toxicol Sci, 2005, 88(2): 298-306.

[7] Tsuji J S, Maynard A D, Howard P C, et al. Reaserch strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV: risk assessment of nanoparticles[J]. Toxicol Sci, 2006, 89(1): 42-50.

[8] Borm P, Klaessig F C, Landry T D, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles[J]. Toxicol Sci, 2006, 90(1): 23-32.

[9] Powers K W, Brown S C, Krishna V B, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation[J]. Toxicol Sci, 2006, 90(2): 296-303.

[10] Thomas T, Thomas K, Sadrich N, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part Ⅶ: Evaluating consumer exposure to nanoscale materials [J]. Toxicol Sci, 2006, 91(1): 14-19.

[11] Thomas K, Aguar P, Kawasaki H, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part Ⅷ: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials[J]. Toxicol Sci, 2006, 92(1): 23-32.

[12] Muneoka K, Han M, Gardiner DM. Regrowing human limbs[J]. Scientific American, 2008, 298(4): 56-63.

[13] Jones R C, Capen D E, Cohen K S, et al. A protocol for phenotypic detection and characterization of vascular cells of different origins in a lung neovascularization *model in rodents*[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(3): 388-397.

[14] Wang Z, Au P, Fukumura D, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(3): 317-318.

[15] Gerstner E R. Expert Opin. Investig[J]. Drugs, 2007, 16: 1897.

[16] Mattern R H, Read S B, Pierschbacher M D, et al. Glioma cell integrin expression and their interactions with integrin antagonists: Research Article[J]. Cancer Ther, 2005, 3A: 325-340.

[17] Wieder M E, Hone D C, Cook M J, et al. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse' [J]. Photochem Photobiol Sci, 2006, 5(8): 727-734.

[18] Dunn C J, Plosker G L, Keating G M, et al. Insulin glargine: an updated review of its use in the management of diabetes mellitus[J]. Drugs, 2003, 63 (16): 1743-1778.

[19] Scholtz H E, Pretorius S G, Wessels D H. *Pharmacokinetic and glucodynamic* variability: assessment of insulin glargine, NPH insulin and insulin ultralente in healthy volunteers using a euglycaemic clamp technique[J]. Diabetologia, 2005, 48 (10): 1988-1995.

[20] Lee G K. PEG conjugation moderately protects adeno associated viral vectors against antibody neutralization[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 92(1): 24-34.

[21] Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery[J]. Drug Discov Today, 2005, 10(21): 1451-1458.

[22] Talpaz M. Phase I evaluation of a 40 kDa branched chain long acting pegylated IFN alpha 2a with and without cytarabine in patients with chronic myelogenous leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17): 6247-6455.

[23] Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Chemistry for peptide and protein PEGylation[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54 (4): 459-476.

(责任编辑:关蕴良)