

文章编号: (2006) 01-0020-07

免疫(疫苗)微球稳定性的研究进展

刘淑平, 王东凯, 张 蓓

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 免疫(疫苗)微球可以通过提高抗原的浓度、加入多种抗原或非抗原蛋白质、加入表面活性剂和等渗剂等方法来提高在微囊化过程中抗原的稳定性; 形成不溶性金属复合物、使用pH 调节剂和添加剂以及进行化学修饰等可以保持抗原在体外释放试验中的稳定性; 另外, 采用更适宜的制备微球的技术和适当的聚合物也可提高抗原的稳定性, 对提高免疫(疫苗)微球稳定性的方法进行综述。

关键词: 药剂学; 微球; 综述; 抗原; 稳定性; 生物可降解聚合物

中图分类号: R944 **文献标识码:** A

接种疫苗是人类抵御和控制传染性疾病的有效手段之一, 传统疫苗直接来源于细菌和病毒, 存在较大的安全性问题。亚单位疫苗和核酸疫苗虽较安全, 但往往免疫原性较弱, 需采用较强的免疫佐剂或合适的疫苗传递系统才能有效地诱导免疫应答, 而且需多次给药^[1]。为了改变这种状况, 科研人员对生物可降解微球应用于单次注射疫苗进行了研究。这种微球可以用各种乳酸/羟基乙酸共聚物PLGA poly(lactic-co-glycolic acid)制成, 例如, 聚合物已经用于蛋白多肽药物的传递。PLGA微球可以在数周甚至数月内以连续的或脉冲的方式释放药物^[2]。以微球为载体的疫苗用于人体的主要问题是在制备、储存和释放过程中的稳定性问题。通常, 在制备、储存、应用过程中, 抗原的稳定性和免疫活性会降低, 了解使抗原不稳定的因素和开发出使抗原最大限度地保持稳定性的方法是非常重要的。不稳定主要是由抗原的理化性质及所使用的聚合物和赋形剂的理化性质引起的, 此外, 处理过程和制备时的环境、条件也能影响抗原的稳定性。当聚合物性质和处理过程不能改变时, 能够保护抗原或调节局部环境的赋形剂在维持抗原稳定性方面是非常有用的。另一方面, 修饰的聚合物和改良的制备方法同样也能提高抗原的稳定性。因此, 本文对提高免疫(疫苗)微球中抗原稳定性的方法加以综述。

1 影响抗原稳定性的因素

抗原从微球中释放主要是通过扩散和聚合物溶蚀来实现的。微球表面的抗原很快地溶解并扩散到释放介质中(此现象称为突释), 突释后, 抗原的释放依赖于微球的孔隙、亲水性和聚合物与抗原分子间的作用力。在多孔亲水的微球中或聚合物与抗原之间不存在作用力时, 水分可渗透进入微球中, 抗原易从骨架中扩散出来; 当微球有致密的结构或聚合物与抗原间存在很大的作用力时, 抗原的释放很少, 并且滞后。滞后相的长短依赖于聚合物的降解情况。在微球溶蚀的最后阶段, 抗原通

收稿日期: 2005-09-02

作者简介: 刘淑平(1979-), 女(汉族), 吉林蛟河人, 硕士研究生, 从事靶向制剂的研究, **E-mail** liushuping0228@163.com; 王东凯(1962-), 男(汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 主要从事药物新剂型与新技术的研究, **Tel.** (024) 23986310, **Fax.**(024)23904171, **E-mail** wangdkxy@163.com。

过溶胀的孔道从溶蚀的骨架中扩散出来。因此通过选用不同的聚合物，可以实现抗原的定时脉冲式释放^[3]。

抗原的不稳定性是妨碍微球疫苗应用的一个主要因素。在疫苗的生产环节及应用过程中都会影响抗原的稳定性^[4]。构象改变导致抗原变性、表面吸附、直接聚集和沉淀，产生了物理不稳定性，这种物理不稳定性主要产生在制备阶段^[5]，将直接影响抗原的免疫活性。如：在制备 W/O 乳剂时，冷冻干燥过程会影响抗原的稳定性。被包裹的抗原其稳定性要比流动抗原的稳定性高，这是因为抗原在干燥状态下比在溶液状态下稳定。而且，微球中的剩余溶剂和微球吸湿也会影响抗原和 PLGA 的性质。微球的再水合作用也会导致抗原稳定性的降低。

2 微囊化过程中提高抗原的稳定性

抗原稳定性问题主要可以通过加入稳定剂、提高包封条件和使用高的质量聚合物材料等方法来解决。目的是尽量减少可逆性的延伸和防止不可逆的聚合以及化学降解。在微囊化过程中提高抗原稳定性的方法归纳如下。

2.1 提高抗原浓度

在W/O乳剂中，乳剂表面的抗原吸附和变性是固有的现象。研究表明：抗原界面变性依赖于抗原的浓度，当核糖核酸酶的质量浓度从 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，核糖核酸酶的产率从78%增加到93%^[6]。同样地，当人生长激素的质量浓度从 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，用二氯甲烷乳化的人生长激素的回收率可从53%增加到86%^[7]。这些数据表明有限的蛋白质被吸附在抗原的界面上，在高浓度时，他们是自身的保护剂，能够提高抗原的稳定性。

2.2 应用多种抗原或非抗原蛋白质

蛋白质通过抑制抗原在界面上伸展和聚集来减少抗原的损失。有明显表面活性的蛋白质赋形剂（如血清白蛋白）已经作为多种蛋白质的稳定剂广泛应用。研究表明：人生长激素的回收率在添加了人血清白蛋白后得到了极大的提高。这是因为人血清白蛋白很快地转移到W/O乳剂的界面上，从而限制了人生长激素在界面的吸附和聚集^[6]。研究显示：使用蛋白质赋形剂可显著提高抗原的稳定性，其对血红素流行感冒B抗原、破伤风类毒素、白喉类毒素和百日咳类毒素的包封率均达到60%~75%，这几种抗原的包封率均比单一微球的包封率高^[8,9]。

2.3 加入表面活性剂

表面活性剂能够防止部分变性抗原的不可逆聚集，但它的用量应该限制在最低水平，以避免产生可能的毒性和变态反应。研究表明当表面活性剂泊洛沙姆 407 的质量分数为 10% 时，在PLGA微球中聚集的促红细胞生长素会显著降低；在使用含泊洛沙姆 407 的 PLGA微球中，尿素酶的活性从 63% 提高到 83%^[10]。

2.4 加入等渗剂

等渗剂（例如多羟基化合物、碳水化合物和氨基酸等）经常在静脉注射用药中作为蛋白质稳定剂。等渗剂能够加固水的结构，从而发挥稳定作用，它们能够使蛋白质保持原形，抑制蛋白质伸展。

在用二氯甲烷乳化时,等渗的(质量浓度为 $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)海藻糖和甘露醇均能够保持人生长激素的稳定性不变,甘露醇只能略微提高 rhIFN 的稳定性,海藻糖能更有效地保持 rhIFN 的稳定性^[7]。

2.5 应用抗原粉末

可以通过使用干燥的抗原粉末等非水过程避免抗原暴露在水溶液中或W/O乳剂的界面上,从而使乳剂的稳定性提高。干燥状态能够提高抗原的稳定性,因为干燥状态时能够减少结构的弹性,降低结构改变的可能性。非水处理已经成功地应用于多种蛋白质和多肽微球中。研究表明:使用 S/O/W 法制备的牛血清蛋白微球的二级结构的稳定性高于使用W/O/W法制备的牛血清蛋白微球的二级结构的稳定性^[11]。

2.6 应用疏水离子对试剂

使用蛋白多肽的反离子复合物也可以避免抗原接触水溶液。反离子对的作用是能够降低蛋白多肽的水溶性,从而提高在非水介质中的分散性。用O/W 法制备的油酸溶解酵素 PLGA 微球,在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化 60 h,未保护的溶解酵素有近30%的 α 螺旋结构发生了改变,而加入疏水反离子复合物制得的微球溶解在二甲基亚砜中,95%的 α 螺旋结构未发生改变^[12]。

3 在体外释放试验中保持抗原稳定性

3.1 应用添加剂

可以将添加剂和抗原一起包入微球中来提高孵化和释放过程中抗原的完整性和免疫活性。文献报道:将海藻糖和牛血清蛋白包入微球中,破伤风类毒素在体外 60 d 内能保持脉冲式释放^[13]。

3.2 使用 pH 调节剂

聚合物的降解使微球内呈微酸性,抗原接触微酸环境诱导抗原降解和聚集,从而降低抗原的活性。在聚合物骨架中加入 pH 缓冲盐能够维持较为适宜的酸碱环境。在微球中加入易溶的碳酸镁后,牛血清蛋白的释放在 51d 后从原来未加碳酸镁时的 16%增加到68%,非共价键聚集从原来的24%降低到1.5%^[14]。

3.3 加入不溶性金属复合物

与金属离子形成可逆的复合物也是保持蛋白质稳定性的一种比较温和的办法。将不溶性复合物与蛋白质一起包入微球中,在抗原从复合物中分离出来或从微球中溶出释放出来以前,能够提高抗原的物理化学性质的完整性,锌离子已经成功地用于与胰岛素形成稳定的不溶性复合物^[15]。研究表明:形成不溶性复合物主要是延缓抗原的溶出速度。

3.4 采取化学修饰法

研究表明:当微球暴露于水中时,抗原的不稳定性增加主要是因为氨基酸侧链发生了反应^[16]。通过对抗原进行化学修饰(例如,在分子内或分子间交联、衍生化或共价键结合)生成具有免疫活性的、更稳定的化合物也是保持抗原稳定性的方法之一。牛血清蛋白在含水微球中容易聚集,主要是硫醇、二硫化物发生交换的缘故。形成羧肽酶牛血清蛋白后,微球在孵化 28 d 后未见共价键聚集增加,释放 56 d 后,蛋白质单体释放率为 40%,而形成羧肽酶牛血清蛋白后释放率增加到80%^[17]。

4 制备微球新技术

4.1 改良方法的应用

尽管 W/O/W 溶剂挥发-萃取法是制备蛋白多肽微球最广泛的方法之一，但因其存在很多缺点，因此需对这些方法进行改良。使用改良的W/O/W法，将蛋白质溶液的 pH 从4.5 提高到 5.5~6.0，将重组人胰岛素生长因子 I (rhIGF- I)包入PLGA微球中，可以提高有生物活性蛋白质的包封率，而且有活性的 rhIGF- I 在体外释放 21 d 后释放度可达到 92%~100%^[18]。在 pH 5.5~6.0 的溶液中，rhIGF- I 的溶解度降低能够限制它在聚合物溶液中的构象改变，如果不使用 pH 调节剂，大约有10%~32%的 rhIGF- I 因降解和聚集而失活。

4.2 超临界状态下的雾化

用气体(如CO₂)在超临界或接近超临界状态下将 PLA 或 PLGA 溶液雾化来制备微球已经成为微球制备的方法之一。将含聚合物的有机溶液喷雾到超临界 CO₂ 中，有机溶剂被萃取到超临界气体中就会引起聚合物沉淀，从而形成微球。在此过程中，抗原以粉末状分散或与聚合物一起共溶在适宜的溶剂中，这样可以避免接触水溶液。通过制备组氨酸、二十四肽促皮质素微球，比较雾化溶剂萃取法和喷雾干燥法对其稳定性的影响，喷雾干燥法制备的 PLA 微粒中无法收集到完整无缺的组氨酸，而用雾化溶剂萃取法能够防止二十四肽促皮质素被氧化，大约 94%的组氨酸结构没有发生改变^[19]。

4.3 半固体微球的制备

目前所用的技术都是制备固体微球，文献[20]报道了一种能够使抗原稳定的半固体 PLGA 微球的制备方法。将溶解在 PEG400 中的抗原加到 PLGA的乙酸甘油酯或三乙基柠檬酸溶液中，吐温-80 作为稳定剂，然后在搅拌下将混合物逐滴加入到含有司盘-80 的大豆油中，这样就可以形成抗原稳定的半固体 PLGA 微球。

4.4 荷电微球表面吸附抗原的制备

利用具有表面吸附作用的生物活性材料制得能够载有蛋白质的抗原和 DNA的PLGA微球，这种方法能够有效地将带负电的DNA载到荷正电的微粒上，相似地，可以充分地利用蛋白质的表面电性(其电性取决于蛋白质的等电点和溶液的pH值)来制备所需要的电荷性质的微球,只要外水相中含有阴离子乳剂稳定剂或阳离子乳剂稳定剂，就可以用简单的W/O/W法制备荷正电或负电的微球。Singh 等^[21]研究显示：将抗原和 DNA 吸附在带正电的 PLGA 微球表面上，能够很快地显示出强的免疫反应。

4.5 适当聚合物的应用

PLA/PLGA 微球具有较低的玻璃化温度和疏水界面(相对抗原而言)，而且存在易产生酸性降解产物的问题。在相对温暖的环境下(30~35℃)，较低的玻璃化温度可能使微球变软和黏连。疏水界面和易产生酸性降解产物不利于稳定抗原的有效包封和释放。因此，需要有改进的、新的生物可降解传递系统。

文献报道的聚合物主要有两种,一种是PLA/PLGA混合聚合物,通过混合不同类型的聚合物能够得到具有特殊理化性质和降解速率的聚合物。将疏水性结晶聚合物与亲水性的无定形聚合物混合,能够提高抗原在基质中的包封率或达到特定的释放速度^[22]。混合聚合物也能提高抗原的稳定性和释放。例如,混合PLGA和泊洛沙姆包裹破伤风类毒素,混合泊洛沙姆188(质量分数为10%~50%)和PLGA能够抑制破伤风类毒素与PLGA之间不利的相互作用。PLGA微球的突释速度很快,而PLGA/泊洛沙姆微球则能显著地提高破伤风类毒素的脉冲传递,脉冲发生时间在22~50 d,突释效应的大小、脉冲的程度和持续的时间取决于泊洛沙姆在混合物中的用量^[23]。混合PEG和PLA也能提高牛血清蛋白从微球中的传递。当PEG的质量分数低于20%时,在微球中形成水不溶的非共价聚集物,当质量分数高于20%时,牛血清蛋白保持原有的结构和水溶性^[24]。另一种是PLA/PLGA的修饰物,在聚合物上添加疏水性或亲水性的片段能够改变聚合物的水溶性,从而影响抗原的包封、吸附、稳定性和聚合物的降解速度。例如,通过引入PEG形成PLA-PEG-PLA聚合体,能够使抗原的吸附和变性最小化^[25]。另外,葡萄糖氧化酶在PLA-PEG-PLA微球中的活性也比在PLA或PLGA微球中高^[26]。

参考文献:

- [1] LU Li-fang, PAN Jun, LU Wei-yue. The progress of study on microspheres of polypeptide and protein[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals(中国医药工业杂志), 2004, 35(2): 113-117.
- [2] GAO Xiao-ling, JIANG Xin-guo. The application of biodegradable polyester and chitosan in preparation of vaccine[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals(中国医药工业杂志), 2005, 36(1): 46-50.
- [3] CHEN Qing-hua, QU Wen. The progress of study on sustained release dosage form of polypeptide and protein [J]. Chinese Pharmaceutical Science (中国药学杂志), 2000, 35(3): 147-150.
- [4] Cohen S, Bernstein H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines[M]. New York: Marcel Dekker, 1996: 51- 87.
- [5] LI Hong-cheng, HE Ying, WEI Shu-li. The progress of study on controled release dosage form of vaccine [J]. Chinese Pharmaceutical Science(中国药学杂志), 1999, 34(5): 210-213.
- [6] Sah HK. Protein behaviour at the water/methylene chloride interface[J]. J Pharm Sci, 1999, 88: 1320- 1325.
- [7] Cleland JL, Jones AJS. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon for microencapsulation in biodegradable microspheres[J]. Pharm Res, 1996, 13: 1464- 1475.
- [8] Boehm G, Peyre M, Sesardic D, et al. On technological and immunological benefits of multivalent single-injection microsphere vaccines[J]. Pharm Res, 2002, 19: 1330- 1336.
- [9] Peyre M, Sesardic D, Merkle HP, et al. An experimental divalent vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against tetanus and diphtheria[J]. J Pharm Sci, 2003, 92: 957- 966.
- [10] Stureson C, Digling WL. Comparison of poly(acryl starch) and poly(lactide-co- glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine[J]. J Control Release, 2000, 68 : 441- 450.

- [11] Castellanos IJ, Carasquillo KG, Jesus Lopez JD, *et al.* Encapsulation of bovine serum albumin in poly (lactide-co-glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53: 167–178.
- [12] Yoo HS, Choi HK, Park TG. Protein–fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles[J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90: 194–201.
- [13] Johansen P, Men Y, Audran R, *et al.* Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives[J]. *Pharm Res*, 1998, 15: 1103–1110.
- [14] Zhu G, Schwendeman SP. Stabilisation of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanisms of stabilisation by basic additives[J]. *Pharm Res*, 2000, 17: 351–357.
- [15] Hallas-Mfhler K, Petersen K, Schlichtkrull J. Crystalline and amorphous insulin–zinc compounds with prolonged action[J]. *Science*, 1992, 116: 394–398.
- [16] Fa'ga'in CO. Understanding and increasing protein stability[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1252: 1–14.
- [17] Crotts G, Park TG. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly (*d,l*-lactide-co-glycolide) microparticles[J]. *J Controlled Release*, 1997,44: 123–134.
- [18] Singh M, Shirley B, Bajwa K, *et al.* Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles[J]. *J Controlled Release*, 2001, 70: 21–28.
- [19] Witschi C, Doelker E. Peptide degradation during preparation and *in vitro* release testing of poly(*l*-lactic acid) and poly(*dl*-lactic-co-glycolic acid) microparticles[J]. *Int J Pharm*, 1998, 171: 1–18.
- [20] Jain RA, Rhodes CT, Railkar AM, *et al.* Controlled release of drugs from injectable *in situ* formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50: 257–262.
- [21] Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, *et al.* Charged poly (lactide-co-glycolide) microparticles as novel antigen delivery systems[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4: 483–491.
- [22] Huatan H, Collet JH, Attwood D, *et al.* Preparation and characterisation of poly(ϵ -caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins[J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 1297–1303.
- [23] HE Ying, WEI Shu-li. The *in vitro* release of PLGA microspheres of catarrhal rhinitis and the effect of supplemental agent on the release of drugs [J]. *Journal of Beijing University(medicine edition)(北京大学学报)*, 2001, 33(3): 228–232.
- [24] Jiang W, Schwendeman SP. Stabilisation and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly (*dl*-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends[J]. *Pharm Res*, 2001, 18: 878–885.
- [25] Bouillot P, Ubrich N, Sommer F, *et al.* Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres[J]. *Int J Pharm*, 1999, 81: 159–172.
- [26] LI X, ZHANG Y, Yan R, *et al.* Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-*dl*-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2000, 68: 41–52.

The progress of study on the stability of vaccine microspheres

LIU Shu-ping, WANG Dong-kai, ZHANG Bei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The progress of study on the stability of vaccine microspheres was reviewed and the factors affecting the stability of antigen were introduced. The stability of antigen during microencapsulation could be improved by the increase of antigen concentration, addition of several other antigens, nonantigenic proteins, surfactants or isotonicizing agent. And its stability *in vitro* release test could be maintained through formation of insoluble metal complexes, addition of pH modifiers and additives or chemical modification.

Key words: pharmaceutics; microspheres; review; antigen; stability; biodegradable polymers

(本篇责任编辑: 秦 昕)