

口服聚酯聚醚疫苗蛋白微球的制备研究*

李孝红 袁明龙 熊成东 邓先模

(中国科学院成都有机化学研究所 成都 610041)

贾文祥 张燕华

(华西医科大学基础医学院 成都 610041)

摘 要 采用本体聚合法合成不同聚醚含量的聚酯聚醚嵌段共聚物聚-DL-乳酸-聚乙二醇(Poly-DL-lactide-*b*-polyethylene glycol, PELA). PELA 及 PLA 包裹人血清白蛋白(HSA)微球采用溶剂挥发法双乳液体系($W_1/O/W_2$)制备. 微球球形规整, 粒径集中在 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$. 用 CBB 法检测微球中蛋白含量, 蛋白包裹量达 2.5%, 包裹效率近 80%. 从双乳液体系中界面张力角度考察了聚合物囊材的性质、稳定剂的种类及 W_1/O 的稳定性等对微球粒径及蛋白包裹量的影响. 微球体外释放结果表明 PELA 蛋白微球的突释现象不明显, 释放速度较为恒定.

关键词 聚乳酸聚乙二醇嵌段共聚物, 人血清白蛋白, 微球, 口服

口服可生物降解聚合物疫苗微球因其安全、简便, 疫苗蛋白可通过聚合物的降解来实现长效缓释, 是较为理想的载体和免疫佐剂^[1]. Eldridge 等^[2]证实口服具有特定粒径及分布和表面性质的微球, 可通过消化道进入人体, 对网状内皮系统达到良好的靶向性. 同时具有缓释抗原和佐剂效应, 能在较长时间内刺激机体产生较强的免疫效应. 因此疫苗蛋白微球的粒径及分布对到达免疫器官和组织起决定作用, 而微球中蛋白含量显著地影响免疫效果. 目前国外多采用已商品化的乙交酯丙交酯共聚物(PLGA)作载体材料, 蛋白包裹量在 1% 左右, 口服后持续作用时间短, 且免疫增强效果不明显^[3~5]. 将亲水性的 PEG 引入 PLA 中可调节聚合物的降解性能, 改善微球制备工艺及提高对药物、蛋白等的包裹效率^[6,7]. 本研究以不同 PEG 含量的 PELA 为囊材, HSA 为模型蛋白, 采用溶剂挥发法双乳液体系制备蛋白微球, 着重考察了囊材和双乳液体系中稳定剂的性质、制备工艺条件等对微球粒径及分布、蛋白包裹量及体外释放特征的影响.

1 实验部分

1.1 实验材料

DL-乳酸(85%), 分析纯, 湖北大学化工厂. PEG($M_w = 6000$), 广州化学试剂部进口分装. 人血清白蛋白(HSA), 中国医学科学院输血研究所生产. 其余试剂均为国产分析纯级. 实验用水经二次重蒸.

1.2 材料制备

DL-丙交酯(DL-LA)制备方法参照文献[8]. PEG 用乙醇精制, 乙醚洗涤烘干. PELA

* 1997-12-16 收稿, 1998-03-16 修稿; 国家自然科学基金资助(基金号 29774034)

的合成参见文献[9].将 DL-LA、PEG 及催化剂置于反应瓶中,抽真空,用氮气置换三次,密封后 140~160℃ 反应 4~6h.产物用氯仿-石油醚纯化,真空干燥.用核磁共振仪(NMR,美国 VARIAN)测定结构,以氘代氯仿作溶剂.

1.3 疫苗蛋白微球的制备

微球采用溶剂挥发法双乳液体系($W_1/O/W_2$)制备^[10].以 5% HSA 水溶液作为内水相 W_1 , PELA 的二氯甲烷溶液作油相 O,稳定剂水溶液为外水相 W_2 .用溶剂抽提法(5% 异丙醇水溶液)或减压抽提法(真空度 0.09MPa)除去溶剂.离心分离(8000rpm × 8min),重蒸水洗涤四次,室温下真空干燥得到微球.研究中考察了聚合物囊材及稳定剂的性质、 W_1/O 的稳定性等对微球特征的影响.

1.4 微球表征

1.4.1 微球形态及成球效率的表征 扫描电子显微镜(SEM,美国 AMRAY)观察微球形态.检测至少 200 个微粒中具有规整球形的微球数目,计算成球效率(Efficiency of microspheres forming, EMF),即为具有规整球形的微球占检测微粒中的百分率.

1.4.2 微球粒径及分布的测试 通过扫描电子显微镜测试至少 500 个微球粒径,计算其平均粒径(D)及粒径分布系数 $D.P. = \delta/D$,其中 $\delta = [\sum(D_i - D)^2/n - 1]^{1/2}$.

1.4.3 微球中蛋白包裹量的测定 100mg 微球用二氯甲烷溶解后,重蒸水萃取三次,收集萃取液稀释至 5.0mL,萃取液中蛋白含量采用 CBB 法测定^[11].100 μ L 萃取液与 5.0mL CBB 试剂在 23 $\pm$ 1℃ 反应 8min 后,紫外分光光度计(UV-120,日本岛津)595nm 处测定吸光度 A 值.测定已知浓度的 HSA 作为标准曲线, $A = 0.450 + 0.002C$,其中 C 范围为 0~1000 μ g/mL.微球中蛋白的萃取效率为 63.0%.

1.4.4 微球中聚合物结构分析 差示量热扫描仪(DSC,美国 PERKIN-ELMER)测定聚合物熔融峰及结晶热.样品 10mg,升温速率 10℃/min,升温范围 15~80℃.

1.4.5 微球中残留二氯甲烷含量检测 微球用乙酸乙酯抽提,气相色谱仪(GC,上海第二分析仪器厂)测定抽提液中二氯甲烷含量.

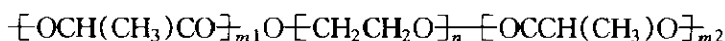
1.5 微球体外释放

体外释放在水浴恒温振荡器(SHZ-82,江苏太仓医疗器械厂)中进行,恒温 37.0 $\pm$ 0.5℃,振荡速率 100 次/min.500mg 微球置于 0.1mol/L HCL 水溶液中,振荡 2h,离心分离微球,转移入 10.0mL pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS)中,隔一段时间离心分离取上清液,CBB 法检测其中蛋白含量,同时补充新鲜 PBS.分离出微球,用四氢呋喃溶解配制成浓度为 4g/L 左右的溶液,在恒温 37.0 $\pm$ 0.5℃ 水浴中用乌氏粘度计测定、一点法计算聚合物的特性粘度 $[\eta]$.

2 结果与讨论

2.1 材料合成

PELA 的合成采用比较成熟的技术路线,即先制备丙交酯,纯化乙二醇,再在高真空气氛下本体聚合合成目标产物 PELA,其结构通式为:



通过共聚物的¹H-NMR 谱中 CH_3 ($\delta = 1.6$)、 CH_2 ($\delta = 3.6$)、 CH ($\delta = 5.1$) 三种氢的积

分曲线可计算得到共聚物中 PEG 的实际含量(cal, wt%), 与加入理论值(add, wt%) 比较, 除含量为 50.0% 外, 其余共聚物中 PEG 含量与加入量相近. 同时根据 PEG 的重均分子量可得到共聚物 PELA 的分子量(如表 1 所示).

Table 1 The characteristics of PELA

Sample	PELA-5	PELA-10	PELA-13	PELA-20	PELA-30	PELA-50
PEG(add, wt%)	5.0	10.0	13.5	20.0	30.0	50.0
PEG(cal, wt%)	6.1	11.5	13.0	23.3	32.9	59.7
M_w (K Da)	98.4	52.2	46.2	25.8	18.2	10.1

2.2 微球制备

图 1 为 SEM 测定的微球形态图, 表明微球成球规整, 粒径全部集中在 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 范围内. Eldridge^[2]证实粒径小于 $5 \mu\text{m}$ 的微球在小肠集合淋巴结吸收后可到达肠系膜淋巴结和脾脏, 因此除可进行粘膜免疫外, 可进入血液进行体液免疫; 粒径大于 $5 \mu\text{m}$ 的微球只能滞留在肠道进行粘膜免疫, 而粒径大于 $10 \mu\text{m}$ 的微球不能被肠道粘膜表皮细胞吞噬吸收, 不能产生有效免疫. 因此本研究制备的微球能较好地满足口服靶向的要求. 通过对共聚物囊材 PELA 的生物学评价, 表明具有良好的生物相容性^[12]. 微球制备过程中使用二氯甲烷, 用溶剂抽提或减压抽提除去溶剂, 气相色谱检测微球中残留二氯甲烷量均小于 $\delta = 20$, 可满足制剂要求.

采用相同工艺条件制备空白微球及 HSA 含量不同的蛋白微球, DSC 分析的热变温度曲线如图 2 所示. 空白微球的聚合物具有较高的结晶热, $\Delta H = 21.71 \text{ J/g}$, 而蛋白微球中聚合物的结晶热下降了 80% 左右, 这是由于蛋白包裹进入微球后, 聚合物规则性降低, 结晶程度被削弱.

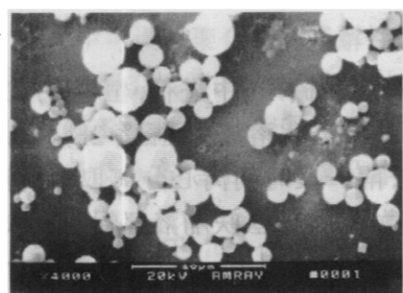


Fig. 1 The scanning electronic micrograph of PELA/HSA microspheres

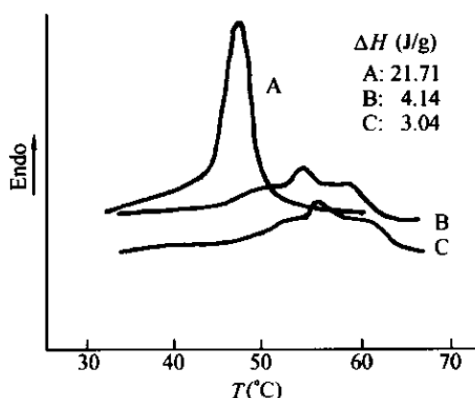


Fig. 2 DSC thermograms of (A) non-protein-carrying PELA microspheres (B) PELA/HSA microspheres (HSA content: 1.20%) and (C) PELA/HSA microspheres (HSA: 2.05%)

2.3 聚合物囊材对微球特征的影响

用不同 PEG 含量的 PELA 制备蛋白微球, 测定其平均粒径(D)、粒径分布系数

(*D.P.*)、微球中蛋白包裹量(*A.E.*)及包裹效率(*E.E.*)。将聚合物的二氯甲烷溶液挥发成膜,用接触角测定仪测定聚合物的表面张力 γ 及与 W_1 、 W_2 相的接触角 θ_{w_1} 、 θ_{w_2} ,结果列于表2中。可以看出微球粒径与 θ_{w_2} 密切相关, θ_{w_2} 越小,微球粒径越大,但粒径分布稍变窄。微球的蛋白包裹量及包裹效率同 θ_{w_1} 及微球粒径有关。当微球粒径较小时,如PLA、PELA-5、10,接触角因素影响显著,接触角越小,包裹量越大;但当粒径较大时,如PELA-13、20、30、50,粒径因素影响显著,粒径越大,包裹量越小。当囊材为PELA-10时,微球*A.E.*及*E.E.*均最大,分别为2.46%和78.7%,比使用PLA及文献中使用PLGA^[2~5]要高,因此选择适当的囊材聚合物可增强囊材与蛋白的亲合力,能有效提高微球的蛋白包裹效率。从表中还可看出,在相同工艺条件下,PELA蛋白微球比PLA粒径分布更窄,因此更易控制微球粒径。

Table 2 Effect of PELA on the properties of microspheres

Polymer	γ (dyn/cm)	θ_{w_1}	θ_{w_2}	$D(\mu\text{m})$	<i>D.P.</i>	<i>A.E.</i> (%)	<i>E.E.</i> (%)
PLA	35.34	81.9	86.8	1.39	1.50	1.30	41.6
PELA-5	36.35	81.3	83.7	1.47	0.79	1.50	48.0
PELA-10	40.36	70.4	76.0	2.75	0.93	2.46	78.7
PELA-13	44.95	62.5	61.0	4.04	0.90	1.77	56.6
PELA-20	49.52	52.2	50.7	5.73	0.69	1.62	51.8
PELA-30	49.61	49.7	60.2	6.62	0.64	1.55	49.6
PELA-50	51.35	48.0	55.4	8.95	0.58	1.20	38.4

2.4 外水相稳定剂的影响

大量研究表明,用聚乙烯醇PVA-1788(水解度88%)及其降解产物PVA-25K(分子量25000)作稳定剂,当聚合物为PLA和PLGA时,均可获得球形规整的微球^[2~5],但当囊材为PELA时,即出现大量条状物,不能有效成球。因此改用其他聚合物作稳定剂,如羟乙基纤维素(HEC)、明胶(Gelatin)、聚乙二醇PEG(分子量分别为6000及2000),以PELA作囊材,采用相同工艺条件制备蛋白微球。通过SEM测定微球平均粒径(*D*)并观察至少200个微球,检测其成球效率(*EMF*)。用接触角测定仪测定稳定剂水溶液的表面张力 γ ,结果列于表3中。可以看出,将PEG引入PLA后,因聚合物亲水性变强,只有用表面张力较大的聚合物水溶液作外水相,才能使PELA有效成球。因此PELA成球效率及质量同囊材聚合物与稳定剂水溶液的界面张力有关。

Table 3 Effect of stabilizer system on microspheres

Stabilizer	PVA-1788	PVA-25K	HEC	Gelatin	PEG-6K	PEG-20K
conc.(%)	5.0	5.0	1.0	1.5	30.0	30.0
γ (dyn/cm)	36.2	3.6	54.0	54.0	59.5	67.3
<i>EMF</i> (%)	<10	<10	65	80	80	>95
$D(\mu\text{m})$	/	/	4.32	2.87	5.42	3.75

2.5 微球蛋白包裹量的影响因素

影响微球蛋白包裹量的主要因素是形成双乳液体系($W_1/O/W_2$)后囊材聚合物的沉

积速率及从内水相扩散到外水相的蛋白量.因此考察了油相中溶剂组成、溶剂去除方式及 W_1/O 的稳定性对微球蛋白包裹量的影响.选择具有不同挥发速率、对囊材聚合物有不同的溶度参数的溶剂与二氯甲烷(DCM)组成混合溶剂,对微球蛋白包裹量的影响结果见表 4.当溶剂选用 DCM 和丙酮(体积比为 1:1)时,所得微球外观不很规整,而改用其他溶剂体系时均可得到球形规整的微球,这可能是由于丙酮与外水相交换太快的缘故.

Table 4 Effect of solvent on the amount of protein in microspheres

Solvent (V/V)	Dichloromethane	Dichloromethane + Acetone 1:1	Dichloromethane + Heptane 1:1	Dichloromethane + Ethyl acetate 1:1
A. E. (%)	2.13	1.97	1.74	2.46

除去溶剂方式分别采用溶剂抽提和减压抽提,其他条件相同下制备微球,蛋白包裹量分别为 2.46% 和 2.31%,可见这两种溶剂去除方式对蛋白包裹量影响不大.在油相中添加表面活性剂司盘-80(S-80),添加量为油相重量的 0%、1.0%、2.0%,所得微球蛋白包裹量分别为 1.69%、2.18% 和 2.46%.由于添加表面活性剂可增强 W_1/O 的稳定性,能有效提高微球的蛋白包裹量.

2.6 微球体外释放

PLA 及 PELA 蛋白微球的蛋白累积释放曲线如图 3 所示.

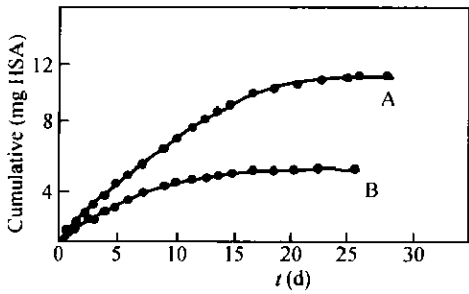


Fig. 3 Cumulative release of HSA from(A)PELA-10 and (B) PLA microspheres *in vitro*

Table 5 The degradation of PLA and PELA

Polymer	[η](dL/g)			
	0day	15day	30day	90day
PLA	0.317	0.301	0.269	0.206
PELA	0.357	0.323	0.262	0.126

PLA 蛋白微球 2 天释放了 25%, 5 天释放了 50%, 15 天释放近完毕;而 PELA 蛋白微球 5 天释放了 35%, 15 天释放了近 80%. 因此与 PLA 相比,PELA 共聚物蛋白微球突释现象不明显,释放速度较为恒定,这是由于

PEG 引入 PLA 后,一方面微球规整、表面缺陷少,二是增加了蛋白与囊材聚合物的亲合性.分别在 15、30、90 天离心分离得到微球,聚合物的特性粘度变化如表 5 所示.PELA 的降解速度明显快于 PLA.用 SEM 观察微球表面形态的变化,发现 PLA 蛋白微球 90 天后仍保持其规整外形,而 PELA 蛋白微球表面出现明显缺陷,部分微球间发生粘连.

REFERENCES

1 Singh M, Singh O, Talwar G P. Pharm Res, 1995, 12(11):1796~1800
2 Eldridge J H, Hammond C J, Meulbroek J A. J Control Release, 1990, 11:205~214
3 Yan C H, Resau J H, Hewetson J. J Control Release, 1994, 32:231~234
4 O'Hagan D T, Jeffery H, Davis S S. Vaccine, 1991, 9(10):768~771
5 Uchida T, Goto S. Biol Pharm Bull, 1994, 17(9):1272~1276

- 6 Li Xiongwei(李雄伟), Xiao Jing(肖 锦), Deng Xianmo(邓先模). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 1997, (5): 543~548
- 7 Li Xiaohong(李孝红), Yuan Minglong(袁明龙), Deng Xianmo(邓先模). *Preprints of 1997 Symposium on Polymers of China*(全国高分子学术论文报告会论文集). 1997. e51~52
- 8 Gilding D K, Reed A M. *Polymer*, 1979, 20:1459~1465
- 9 Deng X M, Xiong C D. *J Polym Sci, Polym Lett*, 1990, 28:411~416
- 10 Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36:1095~1103
- 11 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72:248~254
- 12 Wang Dingguo(王定国), Zheng Hua(郑 华), Hu Yingjia(胡颖嘉). *Beijing Biomedical Engineering*(北京生物医学工程), 1995, 14(3):173~177

PREPARATION OF POLY-DL-LACTIDE-b-POLYETHYLENE GLYCOL MICROSPHERES ENCAPSULATING HUMAN SERUM ALBUMIN

LI Xiaohong, YUAN Minglong, XIONG Chengdong, DENG Xianmo

(*Chengdu Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Chengdu 610041*)

JIA Wenxiang, ZHANG Yanhua

(*West China University of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Chengdu 610041*)

Abstract The purpose of this article is to explore the methods preparing biodegradable microspheres delivery system of vaccines by oral targeting administration. A series of polymers of DL-lactide and polyethylene glycol(PEG) with different contents of PEG were synthesized and the microspheres containing human serum albumin(HSA) were prepared by a solvent evaporation method using a W/O/W emulsion. The scanning electron micrograph of microspheres showed a smooth and spheric surface. The size of microspheres could be controlled between 0.5~10 μ m, which is essential for microspheres to reach the target sites. The amount of protein in microspheres was 2.5% determined by CBB method and the entrapment ratio achieved approximately 80%. It was concluded that the properties of polymers, stabilizer system and solvent in oil phase had great effect on the formation of microspheres, particle size and the protein entrapment ratio. In *vitro* studies indicated that protein-carrying microspheres of PLA had a larger burst-effect than that of PELA-10.

Key words Poly-DL-lactide-polyethylene glycol (PELA), Human serum albumin, Microspheres, Oral administration