

口服疫苗微球研究进展

项 琪 宁黎丽¹ 常承爱(东莞 523908 广东东莞市太平人民医院药剂科;¹ 沈阳 110015 沈阳药科大学药分研究室)

近二十年来,生物技术药物(biotech drugs)的发展突飞猛进,已日益受世人瞩目。其中生物技术疫苗迅速增加,用于癌症、艾滋病、类风湿性关节炎、镰刀形贫血、骨质疏松症、乙型肝炎及其它感染性疾病^[1]。但这类药物在口服时存在生物利用度低、物理化学稳定性差、体内半衰期短等缺点,致使它们常常只能采用频繁地注射给药,其使用与保存十分不便。口服疫苗微球则是一种有效的新制剂,它能满足人们对给药次数最少的需要,并可实现在膜表面的诱导免疫。国内对口服疫苗微球研究较少,本文从口服疫苗微球的特点、制备与体外释放、胃肠道的吸收和免疫反应四个方面综述了国外对它的研究进展。

1 口服疫苗微球的特点

口服疫苗微球可避免胃酸和酶对疫苗的降解作用,实现

疫苗的单剂量给药,这对人们抵御病菌入侵,尤其是最初在黏膜部位的病原体感染具有重要意义,同时对儿童免疫、地区病的防治表现出特别的优势。目前,已有流感、支原体肺炎、破伤风、乙肝和百日咳杆菌等多种疫苗采用微球作为口服剂型的载体。来自肠毒性大肠杆菌的移生因子抗原(CFA/II)微球的口服免疫已进入临床前试验^[2]。微球作为口服疫苗的载体具有以下突出的特点:①对人类给药是安全、可接受的;②抗体被转运到 Peyer's patches 中;③可实现疫苗的靶向给药;④保护抗体不被降解;⑤同时诱导 T 和 B 细胞免疫;⑥可转运抗体复合物;⑦抗体可偶联免疫佐剂;⑧可实现单剂量疫苗的控制释放;⑨可实现工业化大生产;⑩制备微球所用的聚酯是非免疫原性的。

2 口服疫苗微球的制备与体外药物释放

2.1 制备

口服疫苗微球多采用可生物降解、具生物相容性的聚酯类为材料,通过溶剂挥发法制备。

2.1.1 材料 聚氰基丙烯酸烷酯是最早用于口服疫苗转运系统的载体,但它体内反应可能生成甲醛,酯解则生成水溶性的聚氰基丙烯酸,产物均有毒。此后, Eldridge^[3] 和 Challacombe^[4] 等相继采用乳酸-羟基乙酸共聚体 (PLGA) 制备了靶向给药的控释制剂。由于 PLGA 是一种生物降解和生物相容的聚酯类化合物,已作为手术缝合材料使用多年并广泛用于人类 DDS 给药系统,许多研究者都采用乳酸 (lactic acid) 和羟基乙酸 (glycolic acid) 其中一种或二者缩合后的共聚物作为口服疫苗微球的制备材料。调整聚乳酸 (PLA) 和聚羟基乙酸 (PGA) 的聚合度及其共聚组成比,可获得不同释放度的载体。此外,不同比例的 PLGA 和 Pluronic [聚乙氧基-聚丙氧基氧化物的共聚物 poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers] 混合物可改善微粒体系对有治疗作用蛋白和多肽类药物的转运^[5]。1997 年 Chiba 等人^[6] 采用了一种新的脱水聚酯类化合物作为载体材料,即包含有多聚(酸酐-酰亚胺)的酪氨酸 [tyrosine-containing poly(anhydride-co-imides)], 如聚[三苯六羧酸酐-L-酪氨酸]癸二酸-1,3-二(羧基苯氧基)丙烷的脱水物 [poly(TMA-Tyr:SA:CPP)]。用这类材料制备的微球由于其骨架中含有免疫佐剂 L-酪氨酸可实现疫苗的控制释放。为避免胃酸的作用, Lin-SY 等^[7] 以邻苯二甲酸醋酸纤维素 (CAP) 为材料制备了支原体肺炎疫苗 (MHV) 的肠溶微球,与 MHV 相比热稳定性提高,4℃ 下 3 周内有超过 90% 的 MHV 仍具有抗原性;在 pH1.2 和 pH3.0 的介质中相对稳定,显示 CAP 有效地阻止了与 pH 有关的疫苗失活。

2.1.2 制备工艺 口服疫苗微球的制备多采用水/油/水 (W/O/W) 型复乳工艺的溶剂挥发法。其工艺流程如下:载体材料(如 PLGA)的油溶液(含亲油性乳化剂)与含抗原的水溶液(含增稠剂)混合作成 W/O 型初乳→冷却以增大水相黏度→加入亲水性乳化剂的水作连续相制备 W/O/W 型复乳→蒸发除去材料的溶剂→分离,干燥得微球。这种工艺中内水相的体积分数(ϕ)对微球的多孔性影响很大,而微球的多孔性是决定药物的包封率及释放动力学的关键因素。以 PLGA 空白微球为例,随 ϕ 的增大,冻干所得微球平均粒径增大,微球表面微孔数增大。此外分散介质对微球的粒径亦有较大的影响。李雄伟等人^[8] 比较研究了不同浓度的聚乙烯酸、聚丙烯酸和十二烷基磺酸钠用作水相分散介质时微球的粒径,发现用水解度 88% 的聚乙烯酸可获得期望的粒径(1~20 μ m),而聚丙烯酸酸性较强,在制备过程中引起乳液体系凝结,不适宜包裹具生物活性的抗原蛋白。另外,载体材料及其浓度和相对分子量、成球温度、表面活性剂浓度、W/O 初乳加到外相中的速度、方式和搅拌速度、抗原含量等因素与微球粒径分布、形态、表面结构、抗原包封率有关。

2.2 体外释放的研究

微球的体外释放受到许多因素的影响,涉及到药物、材料、制备工艺等各个方面。

2.2.1 聚酯分子量对体外释放的影响^[9,10] 不同分子量的 PLG 释放特性不同,提示疫苗从微球中的释放主要依赖于聚酯的降解,最初释放的蛋白有 15%~35% 是来自水填充孔隙的扩散。以破伤风类毒素 (TT) 为例,用相同工艺制备的 PLA-TT 微球与 PLGA-TT 微球比较,二者的蛋白载有量均高达 80% 以上,但它们的粒径和蛋白释放方式由于 PLA 和 PLGA 分子量 (M_w) 的不同表现出较大差异。PLA 微球释放低于 PLGA 微球。PLGA 中疫苗的释放来自于聚酯的溶蚀。低 M_w (3000) 的 PLGA 微球在最初的突破后可观察到释放速率的持续快速增长,而 M_w 大的聚酯 (PLA:PGA 50:50) 微球经过 10 天的诱导后可达恒速释放。可能原因是 M_w 不同会改变聚合物的结晶性,从而影响释药特性。另外,聚乳酸的释药主要是蚀解释药,M_w 增大,蚀解变慢,释药也变慢。

2.2.2 表面活性剂和稳定剂的影响 Alonso MI 等人^[10] 研究表明较高浓度的表面活性剂 (L- α -卵磷脂或司盘 80^[7]) 可导致微球粒径减小,孔隙结构增多,而粒径越小,其表面积越大,药物释放得越快。表面活性剂还可改善蛋白与 PLA-PEG 之间的界面张力^[8],增加其相容性,从而可增加 PLA-PEG 对蛋白的包裹效率。聚酯包裹的蛋白量越多,体外释放越快。

除表面活性剂外,稳定剂对疫苗从微球中的释放也有影响^[11]。明胶和血清蛋白可提高破伤风类毒素从 PLGA 微球中的释放。研究表明明胶浓度从 0.08% 增加到 2.2% 时,破伤风类毒素的释放也随之增加。0.2% 的明胶效果最佳,在 4 周内破伤风类毒素的释放可达 40%。

2.2.3 理论模型 Chiba M^[6] 观察到蛋白释放与聚酯质量减少之间有良好的相关性,提示生物可降解微球的控释机理是由于聚酯的溶蚀。为进一步阐明其释药机理, Richard P 等人^[12] 建立了一个数学模型来预测球形微球溶蚀中总体质量、平均分子量和药物释放随时间发展的过程。此模型适用于以复乳法制备的蛋白或多肽类亲水性物质微球。它将微孔 (micropore) 和空间上逐渐形成的中孔 (mesopore) 二者结合在一起作为前提,成功地预测了 50:50 PLGA-glycoprotein 120 (gp 120, 一种抗艾滋病疫苗) 释放的经时过程。同时,对破伤风疫苗-PLA-PLGA 微球的释药也进行了预测,理论推测和实验数据吻合良好。但此模型较为理想化,它只考虑了两个控制速率的孔,对单体(或低聚体)同孔壁之间的相互作用、pH 值及与 pH 值有关的酸性单体的溶解性、包封在微球内的微分子药物与聚酯孔壁间的相互作用、蛋白在孔壁的吸附、蛋白构型改变及蛋白间的相互作用等都没有包括在内。这些都限制了此模型的应用。

3 微球在胃肠道的摄取和转运

胃肠道可摄取一定量的微粒作为一种生物学现象已被广泛接受,这也是疫苗微球可以口服的一个重要原因,但它的机理和摄取途径仍有待进一步研究。

迄今为止认为微粒的摄取位点主要有四个^[13]: ①小肠绒毛顶端; ②小肠内的巨噬细胞; ③肠上皮细胞; ④Peyer's patches 上皮。当前的研究大都认为微球主要进入 Peyer's patches (PP)。PP 分布于胃肠道,是最大的黏膜相关淋巴组

织,它与肠腔仅隔一层上皮细胞。肠黏膜诱导部位的特异性吸收上皮细胞(M细胞)可摄取肠腔里的抗原物质,经PP传递后产生免疫应答。粒径大小是影响胃肠道淋巴组织对微球摄取的关键因素。PP对微球的摄取在粒径到11.0 μm 时随粒径增加而增加,然后下降,至21.0 μm 或以上时摄取量降为0。摄取到PP的微球(粒径<5 μm)可被转运到脾^[14]。

Ermak等^[15]确证了PLGA微球摄取和转运过程中M细胞的作用。在电子显微镜下观察,兔小肠M细胞通过其顶端膜表面伪足似的扩张而摄取PLGA微球粒子并将它转运到含有单核白细胞的区域,提示PLGA微球可直接进入M细胞顶端并被转运到与肠相连的淋巴组织中的免疫活性细胞。1996年,Jepson等^[16]则发现尽管PLGA微球对M细胞的选择靶向性不是很强,但与M细胞相结合微球绝大部分都被转运,这是聚酯微球作为口服疫苗转运载体的有利支持。实验表明微球与M细胞的结合与二者的表面特性有关,如果对微球表面加以修饰可提高微球作为转运载体的有效性^[17];对于M细胞,它在配糖体的表达上有显著的局部性和种属差异。乳糖可选择性的与鼠小肠内的Peyer's patches和(或)盲肠的M细胞相结合,而与兔盲肠的M细胞则表现出强烈的选择性。目前有关人的M细胞的知识有限,还未鉴定出能与它特异性结合的乳糖,但至少已有一种能与人的回肠囊泡相连上皮中M细胞特异性结合。可以预见随着科学的发展,乳糖将能用作靶向选择性抗原物质来对人用疫苗微球进行有效的修饰。

4 口服疫苗微球后的免疫反应

口服疫苗后可刺激肠黏膜表面的免疫细胞,并可刺激传递到其它黏膜表面,同时产生分泌性免疫球蛋白sIgA,它是抵抗病原微生物入侵的首要物质。这对治疗和预防各种黏膜感染具有重要意义。

对微球在动物体内的靶向分布研究表明^[18],口服微球后主要分布在肝、脾和肠系膜淋巴结等部位,在唾液、胃肠道、阴道和鼻内均可检测到sIgA和IgG抗体。而且口服疫苗微球后可显著提高肺中IgG水平。Eldridge^[19]的研究发现疫苗P(DL)LG微球口服给药后,可在唾液、胃肠道和支气管囊泡内诱导产生循环性的特异性毒性抗体和sIgA抗毒素反应,其中粒径<10 μm 的被摄取到PP,5~10 μm 的停留在PP内导致sIgA分泌,<5 μm 的弥散性分布于肠系膜淋巴结、血液循环系统和脾的巨噬细胞内产生IgG。可见粒径的大小与免疫反应的强弱有关。小鼠经口给予不同粒径的OVA-PLGA微球后^[20],免疫反应的强度如下:4.0 μm >1.3 μm =7.5 μm >14.0 μm 微球,与皮下接种完全弗氏佐剂(阳性对照)比较,平均粒径为4.0 μm 的微球免疫反应最佳。1997年,贾文祥等人^[21]采用霍乱弧菌经腹腔攻击免疫小鼠后,发现口服OMP(外膜蛋白)-PLA-PEG微球疫苗组保护率为50%~70%,皮下注射微球疫苗组保护率80%~100%,而口服OMP组保护率仅为10%。这些结果表明口服聚酯微球具有强的免疫佐剂活性。

尽管目前的研究表明口服疫苗微球后机体摄取微粒的

数量和程度,它所诱导的免疫强度不尽如人意,但它的确能诱导产生全身性和分泌性的抗体,且效应持久^[22],这使得生物可降解微球在一次性长效口服疫苗的研究上具有特殊的优势,它所展现出来的美好前景更激励着人们对它的发展和完善,口服疫苗微球用于人类免疫是可以实现的。

参考文献

- 1 吴梧桐.下一个10年的生物技术与生物制药.中国药学杂志,1999,34(1):3.
- 2 Reid RH,Boedeker EC,McQueen CE,et al. Preclinical evaluation of microencapsulated CFA/II oral vaccine against enterotoxigenic E. coli. Vaccine,1993,11(2):159.
- 3 Eldridge JH,Hammond CJ,Meulbroek JA,et al. Controlled release in the gut associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. Journal of Controlled Release,1990,11(3):205.
- 4 Challacombe SJ,Rahman D,Jeffery H,et al. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. Immunology,1992,76(2):164.
- 5 Yeh MK,Davis SS,Coombes AG. Improving protein delivery from microparticles using blends for poly(DL lactide-co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. Pharm Res,1996,13(11):1693.
- 6 Chiba M,Hanes J,Langer R. Controlled protein delivery from biodegradable tyrosine-containing poly(anhydride-co-imide) microspheres. Biomaterials,1997,18(13):893.
- 7 Lin SY,Tzan YL,Weng CN,et al. Preparation of enteric-coated microspheres of Mycoplasma hyopneumoniae vaccine with cellulose acetate phthalate:(II). Effect of temperature and pH on the stability and release behavior of microspheres. J Microencapsul,1991,8(4):537.
- 8 李雄伟,贾文祥,肖锦,等.口服高分子微球疫苗的制备研究.中国药学杂志,1996,31(11):661.
- 9 Alonso MJ,Gupta RK,Min C,et al. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. Vaccine,1994,12(4):299.
- 10 Alonso MJ,Cohen S,Park TG,et al. Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. Pharm Res,1993,10(7):945.
- 11 Chang AC,Gupta RK. Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactide-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. J Pharm Sci,1996,85(2):129.
- 12 Richard P,Batycky,Justin H,Robert L,et al. A theoretical model of Erosion and Macromolecular drug release from biodegrading microspheres. J Pharm Sci,1997,86(12):1464.
- 13 Ó Hagan. The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. J Anat,1996,189(Pt 3):477.
- 14 Tabata Y,Inoue Y,Ikeda Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. Vaccine,1996,14(17-18):1677.
- 15 Ermak TH,Dougherty EP,Bhagat HR,et al. Uptake and transport of copolymer biodegrading microspheres by rabbit Peyer's patch M cells.

Cell Tissue Res ,1995 ,279(2): 433 .

16 Jepson MA, Clark MA, Fosyer N, *et al* . Targeting to intestinal M cells . J Anat ,1996 ,189(Pt 3): 507 .

17 Florence AT, Hillery AM, Hussain N, *et al* . Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles : histological and analytical evidence . J Drug Target ,1995 ,3(1): 65 .

18 Challacombe SJ, Rahman D, Ó Hagan DT . Salivary , gut , vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles . Vaccine ,1997 ,15(2): 169 .

19 Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, *et al* . Biodegradable delivery system for a birth control vaccine : immunogenicity studies in Rats and

Monkeys . Pharm Res ,1995 ,12(1): 1796 .

20 Uchida T, Goto S . Oral delivery of poly (lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin as vaccine formulation : particle size study . Biol Pharm Bhl ,1994 ,17(9): 1272 .

21 贾文祥 , 张文彬 , 李雄伟 , 等 . 接种缓释霍乱微球疫苗的试验研究 . 中华微生物学和免疫学杂志 ,1997 ,17(5): 342 .

22 Jones DH, McBride BW, Farrar GH . Poly (lactide-co-glycolide) microencapsulation of vaccine antigens . J Biotechnol ,1996 ,44(1 - 3): 29 .

收稿日期 :1999 - 06 - 09