

影响蛋白质药物在聚乳酸-羟基乙酸微球制备过程中稳定性与增加累积释放的方法

孙晓译¹, 郑彩虹^{1, 2}, 梁文权^{1*} (1. 浙江大学药学院药物制剂研究所, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要:目的 介绍增加乳酸-羟基乙酸聚合物 (PLGA) 蛋白微球中药物稳定性与蛋白累积释放量的方法。方法 根据国内外文献, 较全面地总结了 PLGA 微球中稳定蛋白, 解决不完全释放的策略。结果与结论 虽然 PLGA 微球制备与药物释放过程中存在不利于蛋白稳定的因素, 但通过选用不同添加剂、优化体外释放介质及装置、改进制备工艺、开发复合材料及复合微球等方法可以有效保存其活性, 增加累积释放量。

关键词: PLGA; 微球; 蛋白质; 不完全释放; 稳定性

中图分类号: R977.6; R943.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)02-0099-04

Formulation Aspects of Protein Stability and Complete Release in Poly (Lactic-co-glycolic acid) Microspheres

SUN Xiao-yi¹, ZHENG Cai-hong^{1, 2}, LIANG Wen-quan^{1*} (1. Department of Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University; Hangzhou 310058, China; 2. Obstetric and Gynecology Hospital Affiliated College of Medical Sciences, Zhejiang University; Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To give a brief introduction of methods which can stabilize encapsulated protein and increase the cumulative release of protein from PLGA microspheres. **METHODS** On the base of literatures at home and abroad, strategies to improve the stability of protein and facilitate its complete release were generally summarized here. **RESULTS AND CONCLUSION** Although proteins are unstable in PLGA, by choosing proper additives, optimizing release device and medium in vitro, improving the technique of microspheres fabrication, employing composite polymers, we can preserve their activities and solve the problem of incomplete release.

KEY WORDS: PLGA; microspheres; protein; incomplete release; stability

近年来蛋白及多肽类药物在诊断、治疗或作为疫苗预防各种疾病方面发挥着越来越重要的作用。但这类药物本身稳定性差、半衰期短、分配系数小的缺点限制了其应用。所以, 如何将这些生物物质有效地送达靶部位, 一直是制剂研究的重大课题。现在人们越来越多地将目光投向生物可降解材料上, 特别是乳酸-羟基乙酸聚合物 (PLGA)。以它们为载体制备的微粒不仅可以包载蛋白, 避免体内酶和其他多种因素对蛋白造成的破坏, 还能缓慢降解释出药物。微球是微粒给药系统中的重要组成部分, 有较多研究。但这类微粒也存在一些弱点, 包括蛋白稳定性差、突释大、包封率小、不完全释放等问题。针对如何减小突释、增加包封率已见较多文献报道, 而对于解决不完全释放的研究较少。笔者将着重对近年来增加微球中蛋白稳定性及累积释放量的研究作一简要综述。

影响蛋白稳定性的因素主要存在于微球制备和药物释

放过程之中。蛋白结构变化、聚集、非特异性吸附等又会引起不完全释放现象的产生。W/O/W 复乳法是目前最常用的制备蛋白类 PLGA 微球的方法。简单来说即以含有 PLGA 的有机相与溶有蛋白的内水相超声成初乳, 再与外水相成复乳, 挥干有机溶剂, 洗涤获得微球。由于蛋白质天然地具备一定的表面活性, 制乳过程中, 特别是在制备初乳的过程中会自动迁移到两相界面上, 接触不利于蛋白活性维持的有机溶剂。另一方面, 乳化步骤施加的剪切力也会造成蛋白在油水表面的非共价聚集沉淀。在药物长期释放的过程中, PLGA 逐步降解, 水解产物乳酸和羟基乙酸最终形成二氧化碳和水被排出体外。降解过程中产生的大量氢离子, 降低了微环境的 pH 值, 可造成酸不稳定蛋白的聚集、降解。

现从选择添加剂、优化体外释放介质及装置、改进制备工艺、开发复合材料及制备复合微球等方面对如何稳定蛋白、促进微球完全释放的方法进行详细介绍。

1 优选添加剂

添加剂的种类包括蛋白质、表面活性剂、渗透压调节剂、无机盐类等。添加剂的作用机制各不相同,主要是能防止蛋白结构变化,减少失活,进而提高活性药物的累积释放量。在微球制备过程中可根据添加剂的溶解性能将其加入到油、水两相中,也可预先用添加剂处理蛋白,保护活性。由于不同蛋白间的物理化学性质差异较大,需进行处方筛选确定具较好保护作用的添加剂。

1.1 表面活性物质

表面活性物质可降低油水界面张力,自发地分配在乳剂的两相界面之上。在制备初乳的过程中,适当的表面活性物质能与同样具备表面活性的蛋白类药物相互竞争,从而降低后者在油水界面的聚集,促进较完全的释放。

早期作为保护剂应用的是同为蛋白的人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)。但蛋白在释放过程中会较快地溶出,因此可能保护能力不佳。

与血清蛋白保护机制相区别的是表面活性剂除了能减少界面蛋白质折叠和聚集外,还能防止部分已失活的蛋白不可逆聚集。但在使用上,应尽可能地减少表面活性剂用量以避免毒性及过敏反应。目前研究较多的是非离子表面活性剂,Igepal CA-630和Triton X-100^[1], poloxamer 188^[1-2], Tween20^[3]对提高活性蛋白回收率,增加PLGA微球药物累积释放量都有不同程度的作用。聚乙烯醇(PVA)的乳化能力较弱,是一类最常用的水相保护剂,主要作用是防止微粒间碰撞、粘连。值得注意的是低分子量PVA的吸附作用能有效防止溶菌酶的表面吸附,减少蛋白沉淀、失活以及由此引起的免疫反应^[4],增加蛋白回收率。 γ -聚蛋白情况则有所不同,以PEG替代PVA在水相中做乳化剂时,能减少蛋白吸附^[5],这可能和PEG的分子长链阻碍了蛋白间的相互吸附有关。

并非所有的表面活性剂都有保护蛋白的作用,即使是同一种表面活性剂由于添加方式的差异也会造成不同的结果。Sandoz等^[6]在水相、有机相或两相中添加卵磷脂时,发现含有卵磷脂的水相更有利于保持碳酸酐酶结构的完整性和生物活性。由HPLC检测蛋白单体、聚合体和水解片段的结果可知,无论是蛋白回收率还是体外释放样品各成分比例,添加有卵磷脂的水相制备得到的微球蛋白活性单体含量最高,两相中均含卵磷脂的微球其次,有机相添有卵磷脂的微球中活性成分碳酸酐酶单体最低。这可能是因为水相中高于临界胶团浓度的卵磷脂形成了脂质体,包裹了蛋白;或者形成了碳酸酐酶-卵磷脂复合物,从而起到了保护蛋白的作用。

1.2 糖类及多元醇类

糖类及多元醇类多作为微球的冻干保护剂使用,它们是通过优先水合蛋白、直接控制聚合机制^[3,7]来消除有害因素,以达到将蛋白维持在微球冻干初始状态的目的。Pérez等^[8]对一些内水相添加剂对于以PLGA为载体的溶菌酶微球释放行为的影响进行了研究。结果发现乳果糖可防止两相界面上的蛋白结构变化,增加微球蛋白的释放量,在160 h内溶

菌酶释放完毕,约占总量的80%。相比于对照的60%而言,乳果糖的增释效果比较明显。在后续的研究中^[9]作者还发现,添加适量的聚乙二醇(PEG M_w 5000)、麦芽糖或乳糖等多元醇及糖类可减少在 α -糜蛋白酶PLGA微球制备过程中油水界面上引起的蛋白非共价聚集,发挥冻干保护作用,从而增加累积释放量。其中以在内水相与有机相中同时添加PEG效果为佳,于第40天测得的蛋白累积释放量90%较不含附加剂的微球中累积释放小于70%有较大的提高。PEG改善释放行为的效果在rhCu, Zn-SOD^[3]或 γ -糜蛋白酶^[10]的PLGA微球中亦能观察到。海藻糖促完全释放的效果则能在破伤风类毒素PLGA微球中观察到,与对照组的5%相比,第35天可释放80%左右的蛋白总量^[7]。

1.3 无机盐

PLGA在降解过程中释放的氢离子改变了蛋白释放时微环境的pH值,影响其稳定性,是导致蛋白变性、失活的潜在因素。针对这一情况,研究人员在微球中添加适量的Mg(OH)₂^[7], ZnCO₃, Ca(OH)₂等无机盐,以调节介质的酸碱度。MgCO₃^[6]粉末可通过中和酸性来进一步增加PLGA中碳酸酐酶的释放量。碳酸锌^[11]则能显著促进人类胰岛素样释放因子-1在PLGA微球中的释放。

2 优化体外释放介质及装置

体外释放多采用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)为介质,恒温摇瓶。此法虽简单易行,但由于聚合物PLGA的降解使介质酸度超出了缓冲溶液的可调节范围,释放介质的强酸性增加了聚合物对蛋白质的吸附,甚至引起蛋白质的水解,对一些不耐酸蛋白的生物活性和结构造成了破坏。因此有人提出调节pH值恒温摇瓶法^[3],取样时用NaOH调pH值至7.4,基本排除了过酸的释放介质对蛋白质造成的破坏,但聚合物对蛋白质的非特异性吸附仍然存在。

也有研究提出了不同的看法^[12],认为PLGA降解所造成的酸性环境有助于微球中对酸稳定蛋白的释放,蛋白分子可通过孔径和通道进行扩散。Jiang等^[12]制备的溶菌酶PLGA微球在pH 4.0醋酸缓冲液(acetate buffer, AB)和pH 2.5甘氨酸缓冲液(glycine-HCl buffer, GB)中的释放行为较在pH 7.4的PBS中有很大改善,可观察到三段释放。重要的是,以微量BCA试剂盒测定蛋白总量时发现AB或GB中第70天有超过90%的累积释放量(PBS仅25%),这给了研究人员很大的信心。虽然目前体外试验普遍采用pH 7.4的释放介质,但在体内,位于微球内部的蛋白释放很大程度上受聚合物降解所致的酸性微环境的影响。所以在GB中蛋白释放曲线和体内释放行为表现出良好的相关性。

除了对释放介质pH值的调整外,早先的研究主要把注意力放在模拟体内环境上。因此,提出在释放液中添加牛血清白蛋白(BSA)或血清来保护蛋白和促进释放。另外,在释放液中加入少量的如十二烷基磺酸钠(SDS)等表面活性剂的做法可减少蛋白的表面吸附。

Aubert-Pouësse等^[13]等在对包有胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的PLGA微球的研究中优化出一个能有效

增加 GDNF 的释放介质。此外,他们也找到了一种优良的体外释放方法及装置,可比摇瓶法更为接近漏槽条件。以玻璃微球自行填充的 Omega HPLC 柱作为释放室,水浴恒温 37℃。将选定的释放液作为流动相以一定的速度泵入 HPLC 柱,出口处搜集已释放的 GDNF,并在收集液中加入抗蛋白吸附剂防止 GDNF 吸附损失。同时将收集液低温保存以防止蛋白在测定前降解。

3 改进制备工艺

使用复乳法制备微球一个最大的缺点就是引入了油水界面,形成的疏水界面通常会引起蛋白质的吸附,接着导致其聚集、失活。采取非水相制备 PLGA 蛋白微球可避免水溶液中蛋白的迁移,包括低温喷雾提取法^[11]和 S/O/O 法。S/O/W 是界于 S/O/O 和 W/O/W 法之间的折中方法。制备时蛋白以固态形式分散在有机溶剂中,混悬液在含乳化剂的聚合物有机溶液中乳化,制成 S/O/W 复乳。由于蛋白处于固态而具有较大能量壁垒,从而达到稳定的目的。运用这个工艺制备的 γ 糜蛋白酶^[5,10],人类免疫球蛋白 G^[14]微球都观察到良好稳定效果和较理想的累积释放量。另有一种名为 A/O/W 的制备方法^[15]。制备过程中先将蛋白加入到用水饱和的有机相当中,待蛋白质发生可逆性聚集后,制复乳,溶剂挥干即得 PLGA 微粒。此法制备的重组人类生长激素微粒 (rhGH) 的释放特性比复乳法有所提高, rhGH 释放总量相差近 55%。

均质方法、均质时间及搅拌速度对于微球大小和蛋白稳定均有影响。相同频率下,超声强度越强,活性破坏越多。间歇超声比连续超声温和^[3]。采用超声混合低速搅拌的方法既可得到满意的粒径又能较好地保存蛋白活性^[16]。粒径大小对微球释药量也有影响。温度选择方面, Yang 等^[17]比较了在不同温度下所得的 BSA-PLGA 微球的粒径大小、表面特征、包封率及体外释放曲线。发现在低温下制备的微球突释后的释放缓慢、稳定。

4 复合材料及复合微球

除了对一些生产工艺、药用添加剂、释放条件的改进和控制,采用一些复合骨架或对聚合材料进行适当修饰,会对蛋白类药物的释放产生影响。例如,应用聚酯类和乳酸羟乙酸聚合物 (POE / PLGA) 为微球物理复合骨架^[18],对改善亲水性蛋白和亲脂性蛋白的释放都有较大的意义。将亲水性蛋白 BSA 和亲脂性的环孢素 A 分别包裹于 POE / PLGA 中,均能观察到完全释放 (近 100%)。相应的,在单独的 POE 或 PLGA 中,二者的累积释放量均没有超过 60%。对于亲水性 BSA 来说,复合材料虽然解决了其不完全释放的问题,但未能克服突释大的缺点。

聚乳酸 (PLA) 也是一种生物可降解聚合材料,它的降解速度较 PLGA 慢。研究发现^[19],载有重组人生长激素 (rhGH) 的 PLA 微球体外释放量 1 个月近 100%,而 PLGA 微球相同期间内只达到约 50% 的释放量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示第 22 天时, PLA 微球内未释放的 rhGH 结构完整性优于 PLGA 微球,后者 hGH 水解条带明显。

PLA 是一种半结晶聚合物,而 PLGA 为无定型聚合物。复乳法制备得到的两种微球虽然都有大的内部空腔,但 PLA 微球空腔内壁上存在众多交错的纳米小孔,这有利于微球内外的缓冲液交换,维持微球内部的 pH 环境,进一步减少了蛋白的聚集、降解与吸附。而 PLGA 微球空腔内壁结构致密,聚合物降解后 H^+ 不易扩散,导致微环境酸化。因此, Kim 等^[19]联合使用以上两种材料,其特性介于两者之间,达到了调节药物释放速度、保护蛋白、较完全释放的目的。

近年的一种新型 PLGA 复合微球,可避免蛋白与有机溶剂的直接接触。就是先通过较温和的条件把蛋白包裹在亲水性材料里,再用 PLGA 包裹蛋白。Zheng 等^[20]在包裹 PLGA 前先制备 BSA 海藻酸-壳聚糖微囊,然后再通过乳化法包裹上 PLGA。这种复合微球采用较温和的修饰乳化及离子交联法将水溶性多肽、蛋白类疫苗包裹入较稳定的水凝胶微环境,从而很好地保护蛋白类药物,使其免受或少受有机溶剂对活性的影响,减少包裹及释放过程中引起蛋白的不溶性聚集所导致的蛋白不完全释放。较传统 PLGA 微球,复合微球蛋白释放更为完全。

5 其他

在对有机溶剂的选择研究中发现,乙酸乙酯对 PLGA 纳米粒中 Crystatin 蛋白^[16]的破坏作用要小于二氯甲烷、丙酮 (1:1) 混合溶剂。Aubert-Pouësse 等^[13]则针对实验器皿做了研究。他们发现硅烷化的玻璃器皿会导致严重的蛋白吸附,在聚丙烯容器中可显著减少这一现象的发生,有利于蛋白的释放。蛋白质的聚乙二醇化^[21]是将单甲氧聚乙二醇 (mPEG) 耦合到蛋白质药物上。mPEG 溶菌酶对于有机溶剂和均质过程都显示出强的抗破坏能力,而且能减少自身对空白微球的吸附和不溶性沉淀产生,对于不完全释放问题的解决也有很大帮助。相对于对照近 50% 的突释和 10% 的后续释放来说, mPEG 溶菌酶的 PLGA 微球在 85 d 达到完全释放,而且克服了突释大的缺点。

6 结语

由于 PLGA 微球在输送蛋白质、多肽类药物时拥有其独特的优势,现在越来越受到人们的重视,但仍存在的一些问题,特别是如何稳定蛋白,减少不完全释放的研究还不够深刻。以上所述方法尚处于研究考察阶段。因此在制备蛋白质及多肽类药物微球时,应根据药物不同特征选择合适的添加剂和制备方法,以获得理想的实验结果。第一个蛋白质药物的 PLGA 微球 Nutropin DepotTM 的上市,为其他蛋白类药物微球的开发提供了典范。随着研究的深入相信这类制剂必定会有广阔的前景。

REFERENCES

- [1] BOUISSOU C, POTTER U, ALTROFF H, *et al.* Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres [J]. J Controlled Release, 2004, 95 (3): 557-66.
- [2] SNCHEZ A, TOB O M, GONZ LEZ L, *et al.* Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon- α [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 18 (3-4): 221-229.

- [3] LIU L, GE Y, GAO J J, *et al.* Stability of mCu, Zn-SOD encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide acid) microspheres[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2003, 38(3): 190-193.
- [4] WEERT M, HOECHSTETTER J, HENNINK W E, *et al.* The effect of a water/ organic solvent interface on the structural stability of lysozyme[J]. *J Controlled Release*, 2000, 68(3): 351-9.
- [5] CASTELLANOS I J, CRESPO R, GRIEBENOW K. Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in biodegradable polyester microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2003, 88(1): 135-145.
- [6] SANDOR M, RIECHEL A, KAPLAN I, *et al.* Effect of lecithin and $MgCO_3$ as additives on the enzymatic activity of carbonic anhydrase encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1570(1): 63-74.
- [7] JAGANATHAN K S, RAO YUB, SINGH P, *et al.* Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2005, 294(1-2): 23-32.
- [8] PÉREZ C, JES S P D, GRIEBENOW K. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method[J]. *Int J Pharm*, 2002, 248(1-2): 193-206.
- [9] P REZ-RODRIGUEZ C, MONTANO N, GONZALEZ K, *et al.* Stabilization of α -chymotrypsin at the CH_2Cl_2 / water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2003, 89(1): 71-85.
- [10] CASTELLANOS I J, CRUZ G, CRESPO R, *et al.* Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of γ -chymotrypsin and their prevention[J]. *J Controlled Release*, 2002, 81(3): 307-319.
- [11] LAM X M, DUENAS E T, DAUGHERTY A L, *et al.* Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes[J]. *J Controlled Release*, 2000, 67(2-3): 281.
- [12] JIANG G, WOO B H, KANG F, *et al.* Assessment of protein release kinetics, stability and protein-polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2002, 79(1-3): 137-145.
- [13] AUBERT-POUËSSEL A, VENIER-JULIENNE M C, CLAVREU A, *et al.* In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2004, 95(3): 463-475.
- [14] WANG J, CHUA K M, WANG C H. Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 271(1): 92-101.
- [15] KIM H K, PARK T G. Microencapsulation of dissociable human growth hormone aggregates within poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for sustained release[J]. *Int J Pharm*, 2001, 229(1-2): 107-116.
- [16] CEGNAR M, KOS J, KRISTL J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 22(5): 357-364.
- [17] YANG Y Y, CHIA H H, CHUNG T S. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method[J]. *J Controlled Release*, 2000, 69(1): 81-96.
- [18] SHIM, YANG Y Y, CHAW C S, *et al.* Double walled POE/PLGA microspheres: encapsulation of water-soluble and water-insoluble proteins and their release properties[J]. *J Controlled Release*, 2003, 89(2): 167-177.
- [19] KIM H K, PARK T G. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release[J]. *J Controlled Release*, 2004, 98(1): 115-125.
- [20] ZHENG C H, GAO J Q, ZHANG Y P. A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(4): 1321-1327.
- [21] DIWAN M, PARK T G. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2001, 73(2-3): 233-244.