

破伤风类毒素阳离子葡聚糖微球的制备及载药机制研究

郑春丽, 刘晓庆, 朱家璧*, 赵玉娜

(中国药科大学药剂研究所, 江苏 南京 210009)

摘要: 制备破伤风类毒素阳离子葡聚糖微球, 并对微球的载药机制进行考察。采用乳化交联法在双水相中制备了荷正电的甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球, 并基于静电作用原理后载破伤风类毒素疫苗。微球的 zeta 电位随甲基丙烯酸二甲氨基乙酯加入量的增加而增大, 激光共聚焦显微实验表明, 异硫氰酸荧光素牛血清可以渗透进入阳离子葡聚糖微球的内部, 而不能进入中性葡聚糖微球。采用后载法制备的破伤风类毒素阳离子葡聚糖微球的包封率显著高于前载法。改变甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖的取代度可以调控阳离子葡聚糖微球的体外释放行为。

关键词: 破伤风类毒素; 阳离子微球; 静电作用; 葡聚糖微球; 包封率

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1183-05

Preparation of cationic dextran microspheres loaded with tetanus toxoid and study on the mechanism of protein loading

ZHENG Chun-li, LIU Xiao-qing, ZHU Jia-bi*, ZHAO Yu-na

(Pharmaceutical Research Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The aim of this study is to prepare cationic biodegradable dextran microspheres loaded with tetanus toxoid (TT) and to investigate the mechanism of protein loading. Positively charged microspheres were prepared by polymerization of hydroxyethyl methacrylate derivatized dextran (dex-HEMA) and dimethyl aminoethyl methacrylate (DMAEMA) in an aqueous two-phase system. The loading of the microspheres with TT was based on electrostatic attraction. The net positive surface charge increased with increasing amounts of DMAEMA. Confocal images showed fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) could penetrate into cationic dextran microspheres but not natural dextran microspheres. TT loading efficiency by post-loading was higher compared with by pre-loading. Even though TT is incorporated in the hydrogel network based on electrostatic interaction, still a controlled release can be achieved by varying the initial network density of the microspheres.

Key words: tetanus toxoid; cationic microsphere; electrostatic interaction; dex-HEMA microsphere; entrapment efficiency

由世界卫生组织等 5 个国际组织倡议的全球儿童疫苗计划 (The children's vaccine initiative, CVI) 主要宗旨是促进开发及引入、改进现有疫苗及新创制

的疫苗, 以加强保护全球儿童免遭传染病的侵害。研究改进破伤风类毒素的释放系统是 CVI 的主要目标之一^[1]。破伤风能否被控制和消除有赖于成功率高的接种, 但目前破伤风的基础免疫需要 3 个月内连续 3 次注射疫苗, 接种次数多和接种周期长使辍种率高达 70%, 免疫效果差。因此为了减少破伤风疫苗注射次数, 提高接种覆盖率, 降低辍种率, 有效地预防破伤风, 需提供具有长效作用的单剂破伤风类毒素控

收稿日期: 2010-05-20.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09310-004); 国家自然科学基金资助项目 (30772663); 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (JKQ2009024).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271316, Fax: 86-25-2-83271293,

E-mail: zjbbox02@yahoo.cn

释疫苗制剂, 实现一次注射全程免疫。

微球技术已广泛用于药物、多肽和蛋白疫苗的研究与开发。目前, 国内外较常应用的微球材料为多聚乳酸-聚乙醇酸共聚物, 分别采用这些载体复乳法制备了破伤风类毒素微球, 并具有较高的包封率, 通过控制丙交酯和乙交酯的分子量调节降解时间达到缓释目的, 体内免疫的初步实验证明了单剂量免疫微球的可行性^[2-4]。但聚乳酸及其共聚物制备的微球主要存在以下不足: ① 作为药物载体的聚乳酸及其共聚物是疏水性材料, 对亲水性的疫苗或药物亲和性不强, 导致包裹量和包封效率低; ② 制备中常采用复乳法所用有机溶剂易引起蛋白凝聚及沉淀, 使疫苗活性丧失; ③ 释药初期突释量较大, 可达 30%~40%; ④ 聚乳酸及其共聚物在降解过程中产生酸性环境致蛋白或疫苗的天然构象发生变化, 抗原性降低。

利用水凝胶作为药物载体系统具有载药量大、释药与降解可控、生物相容性好等特点, 是目前控释药领域的研究热点。近年来, 引入功能基的葡聚糖水凝胶被广泛作为蛋白疫苗类药物载体进行研究。本实验室合成了生物降解葡聚糖衍生物——甲基丙烯酸羟乙基酯葡聚糖 (dextran-hydroxyethyl methacrylate, dex-HEMA)。近期研究资料显示, 由这种化合物聚合而来的水凝胶在生理条件下的降解是通过存在于交联处可变形的碳酸酯团水解产生的。而且这些水凝胶具有很好的生物相容性, 因为它的降解产物是葡聚糖 (血浆增容药) 以及 2-聚羟乙基甲基丙烯酸 (一种广泛用于生化产品药用的聚合物)。dex-HEMA 凝胶的降解进程可以通过改变交联密度进行调整, 降解所需时间可从几天到几个月^[5-7]。

本研究选择 dex-HEMA 作为微球材料, 通过引入甲基丙烯酸二甲氨基乙酯制备阳离子葡聚糖微球, 并采用后载法包封破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT)。研究载药机制及载药方法对包封率的影响, 考察体外释药行为, 为长效蛋白微球制剂提供新的研究思路和可行性依据。

材料与方法

仪器 高效液相色谱仪 (岛津), S-3000 型扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); HELOS 激光衍射粒度分析仪 (德国新帕泰克有限公司); Zetasizer 3000HS 纳米粒度电位仪。

药品与试剂 葡聚糖 (相对分子质量 20 000, 国药集团化学试剂有限公司); 甲基丙烯酸二甲氨基乙

酯 (DMAEMA, Sigma-Aldrich); 异硫氰酸荧光素牛血清白蛋白 (FITC-BSA, Sigma-Aldrich); 过硫酸钾 (KPS); 聚乙二醇 (PEG, 相对分子质量 20 000, 国药集团化学试剂有限公司); 四甲基乙二胺 (TEMED, 国药集团化学试剂有限公司); 破伤风类毒素 (TT, 上海生物制品研究所, 425 Lf/mL)。

甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖的合成 dex-HEMA 根据文献的方法合成并定性^[8]。所使用的葡聚糖分子质量为 20 kDa, 取代度 (DS, 葡聚糖中每个吡喃葡萄糖残基中 HEMA 的数目) 采用核磁共振法 (¹H NMR) 测定。

甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球的制备 采用乳化学交联法在双水相中制备了 dex-HEMA 微球^[9]。dex-HEMA 71 mg 溶于 1.58 mL 水中, 加入 24% (w/w) PEG 水溶液 3.35 mL, 涡旋乳化。水性 dex-HEMA 乳滴的聚合由加入 TEMED 100 μL (用 4 mol·L⁻¹ 盐酸调至中性) 和 KPS (50 mg·mL⁻¹) 180 μL 所触发, 反应在 37 °C 下持续 1 h。将所得微球用重蒸水洗 3 遍, 以除去 PEG、KPS 和 TEMED。最后把微球混悬于 5 mL 水中, 冻干, 在 -20 °C 下保存。为了制备阳离子微球, 可在 dex-HEMA 和 PEG 两相涡旋混合前加入不同质量比 (DMAEMA:dex-HEMA) 的 DMAEMA。

含破伤风类毒素葡聚糖微球的制备 前载法: “甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球的制备”中, 在 dex-HEMA 和 PEG 两相涡旋混合前加入适量破伤风类毒素, 收集微球的洗液, 用凝胶柱色谱测定 TT 的包封率。

后载法: 取在 “甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球的制备”中所得的空白微球, 分散于一定浓度的 TT 溶液 5 mL 中, 4 °C 下孵育 5 h, 收集洗液, 用凝胶柱色谱测定 TT 的包封率。

TT 的包封率 (entrapment efficiency, EE) 采用以下公式进行求算:

$$EE\% = \frac{W_T - W_F}{W_T} \times 100\%$$

式中, W_T , W_F 分别表示加入的 TT 总量和未被包封的游离 TT 量。

阳离子葡聚糖微球的体外释放实验 精密称取含药微球 50 mg, 加入磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 10 mmol·L⁻¹, 含 0.02% 叠氮化钠) 8 mL, 37 °C 下恒温振荡。分别在不同时间间隔取样 0.1 mL, 离心 (4 000 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液, 用凝胶柱色谱测定 TT 的浓度。

凝胶柱色谱法 色谱柱: TSKgel G3000SWXL

(7.8 mm × 300 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液 (20 mmol·L⁻¹, pH 7.0); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 保留时间: 7.5 min。

葡聚糖微球的理化性质和形态表征 取微球冻干样品, 经喷金处理后, 于扫描电镜下观察其形态和粒度。用激光衍射粒度分析仪测定微球的粒径, 用纳米粒度电位仪测定微球的 zeta 电位。

结果

1 中性和带电甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球的制备

为了制备葡聚糖微球, 首先将甲基丙烯酸酯以碳酸酯链接到葡聚糖的骨架上 (图 1a), 甲基丙烯酸酯的自由基聚合使得葡聚糖交联, 根据葡聚糖和 PEG 溶液互不相容的原理采用乳化交联法在双水相中制备了甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖微球。

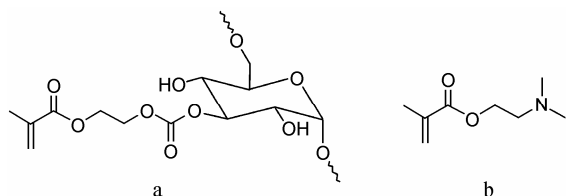


Figure 1 Chemical structures of dextran hydroxyethyl methacrylate (dex-HEMA, a) and dimethyl aminoethyl methacrylate (DMAEMA, b)

dex-HEMA 的乳滴自由基聚合可得到葡聚糖微球, 所得微球的粒径在 16.9 μm 左右 (图 2), 扫描电镜照片显示微球粒径均匀, 表面光滑, 圆整度好 (图 3)。

为了获得阳离子葡聚糖微球, 在制备中加入了 DMAEMA (pKa 8.4) (图 1b), 并与 dex-HEMA 共聚合。由图 4 可见, 不加 DMAEMA 的葡聚糖微球的 ζ 电位为 +0.4 mV, 几乎为中性。而加入 DMAEMA 微

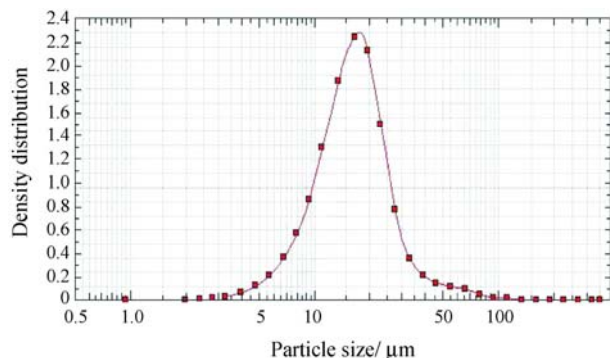


Figure 2 Size distribution of the dex-HEMA microspheres as measured by laser diffraction

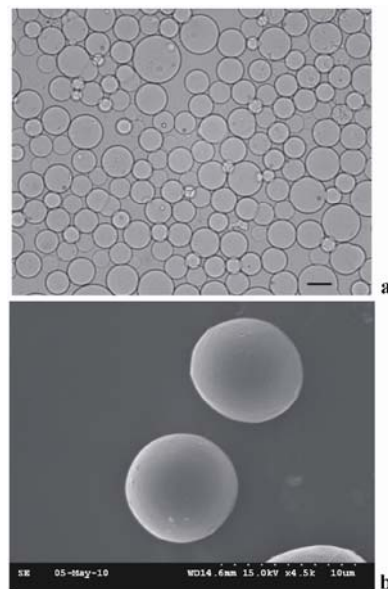


Figure 3 Microscopy image of dex-HEMA microspheres (a). Scale bar = 20 μm. Scanning electron microscopy image of dex-HEMA microspheres (b)

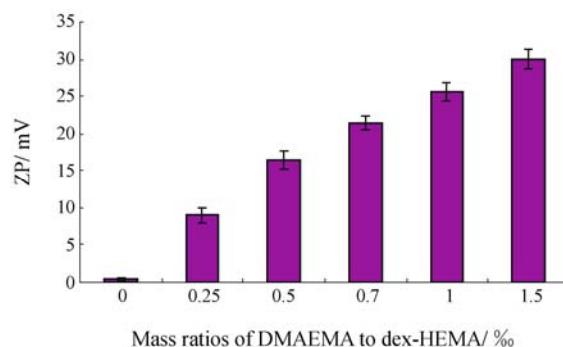


Figure 4 ζ-Potentials (ZP) of dex-HEMA-DMAEMA microspheres at different mass ratios of DMAEMA to dex-HEMA. Values are given as means ± SD (n = 3)

球的 ζ 电位为正电, 并随着 DMAEMA 加入量的增大, ζ 电位从 +0.4 mV 增至 +30.1 mV。

2 FITC-BSA 对中性阳离子微球的渗透性

破伤风类毒素的等电点为 4.7, 在生理条件下一般带负电。本研究以异硫氰酸荧光素牛血清白蛋白 (FITC-BSA) 为模型负电性蛋白 (pI ≈ 4.8), 研究中性和阳离子微球的载药能力。微球在绿色荧光的 FITC-BSA 溶液中孵化 24 h (4 °C), 激光共聚焦显微镜下观察。FITC-BSA 不能渗透进入中性的葡聚糖微球中, 但可渗透进入阳性葡聚糖微球的内部 (图 5)。

上述结果表明, 中性葡聚糖微球对 FITC-BSA 没有亲和性, FITC-BSA 由于大分子的空间位阻而不能进入微球内部。但是, 当微球结构中阳离子的引入有利于荷负电 FITC-BSA 的渗透, 因此静电作用应是微

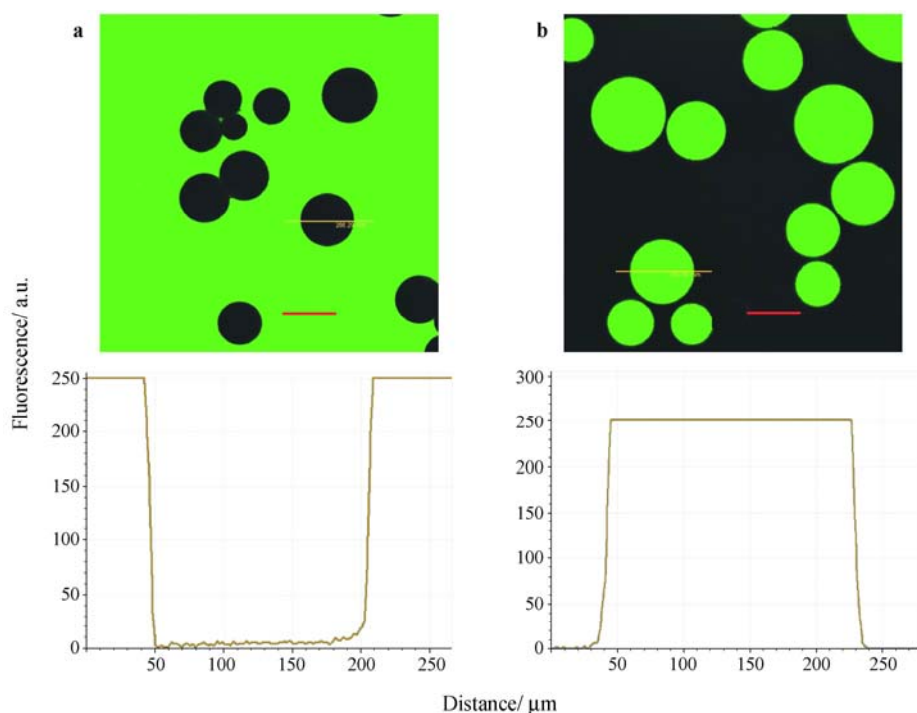


Figure 5 Confocal images and fluorescence profiles along the yellow lines indicated on the confocal images of dex-HEMA microspheres (DS 3.6, a) and dex-HEMA-DMAEMA microspheres (DS 3.6, b) immersed in a FITC-BSA solution. Scale bar=20 μm

球的载 FITC-BSA 的主要作用力^[10, 11]。载药具体机制还不清楚,可能凝胶网络中正电氨基的引入而存在静电排斥,使得网络的孔胀大。由此可以预测带正电的葡聚糖微球的载 TT 可以采用后载法。

3 TT 阳离子葡聚糖微球的包封率

采用前载和后载法制备载药阳离子葡聚糖微球,考察两种载药方式 TT 的包封率。图 6 表明,随 TT 浓度的增加,前载法的包封率从 75.9% 降到了 50.6%。而当孵化 TT 浓度低于 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,后载法的包封率相当高 (约 100%),带正电的微球和负电的蛋白药物之间的静电作用在后载药物吸收的过程中起到了

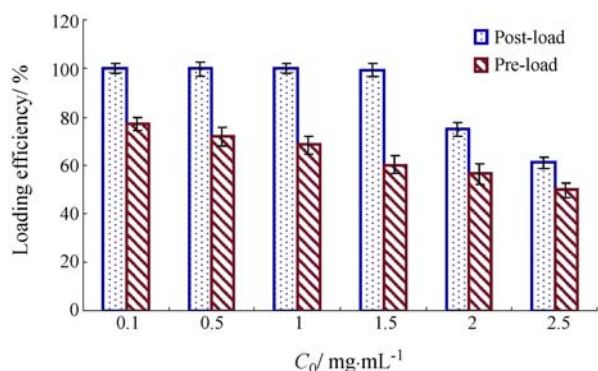


Figure 6 Loading efficiency of dex-HEMA/DMAEMA microspheres for tetanus toxin (TT) by the pre-loading and post-loading procedure. Error bars indicate the standard deviation ($n = 3$)

重要的作用。当孵化蛋白浓度高于 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,包封率下降到 75.2%,这可能是微球表面所吸收的蛋白达到了饱和^[12]。

4 TT 从阳离子葡聚糖微球中的释放

不同取代度的阳离子葡聚糖微球在生理条件下 TT 的释放情况见图 7。由图可见,不同交联程度的微球的释放曲线不同。低交联的阳离子葡聚糖微球在开始少量的突释后 (<10%),持续释药直至 5 天左右微球完全降解。对于交联密度高的微球在两天左右的时滞开始缓慢释放。低交联阳离子微球 3 天后已释放了 50% 的 TT,而中度交联和高交联的微球的释药半衰期分别为 5.5 天和 9.1 天。

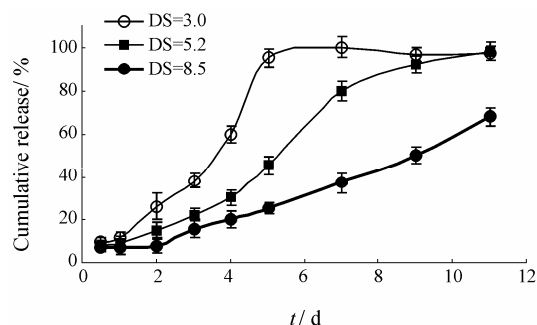


Figure 7 Cumulative release of TT from dex-HEMA-DMAEMA microspheres with different crosslink densities (DS). Error bars indicate the standard deviation ($n = 3$)

讨论

由于交联键的水解, 网络中的孔变大, 最终蛋白质释放, 因此甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖凝胶适合于蛋白的调控释放。改变甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖凝胶的初始交联密度 (取代度或凝胶含水量), 影响蛋白的释放。在更高网络密度的凝胶中, 网络孔大小要超过所包封蛋白的动力学直径则需要更多的交联键降解^[13, 14]。本研究中阳离子微球的 TT 的包封是主要基于负电蛋白 TT 和正电凝胶网络之间的静电吸引力。释放实验表明, 即使 TT 的包封是基于静电吸引力, TT 的释放仍由葡聚糖网络的降解动力学所控制, 即释放行为与甲基丙烯酸羟乙酯-葡聚糖的取代度大小有关。

通过乳化聚合法能够制备阳离子生物可降解葡聚糖微球, 并通过静电作用后载 TT。这种方法的优点: ① 凝胶化过程中避免自由基聚合反应中蛋白药物活性的损失; ② 与前载法相比, 后载法 TT 的包封率更高; ③ 尽管 TT 在微球网络中包封是基于静电作用, TT 的释放仍受凝胶网络降解的控制。本文中 TT 阳离子葡聚糖微球的释放半衰期约 10 天左右, 初步实现了长效蛋白微球的预期目的。为实现单次免疫疫苗制剂的目标, 进一步延长释放周期的处方工艺学工作还在进一步研究中。

本文制备了含有破伤风类毒素疫苗的阳离子葡聚糖微球, 并对微球的载药机制、载药方式和释放行为进行了研究, 为长效蛋白微球制剂载体选择和载药方式等提供新的研究思路。

References

- [1] Aguado MT, Lambert PH. Controlled release vaccines—biodegradable polylactide: polyglycolide (PL:PG) microspheres as antigen vehicles [J]. *Immunobiology*, 1992, 184: 113–125.
- [2] Johansen P, Estevez F, Zurbriggen R, et al. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccine based on PLA:PLGA microspheres [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 1047–1054.
- [3] 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.
- [4] Eyles JE, Williamson ED, Alpar HO. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume [J]. *Int J Pharm*, 1999, 189: 75–79.
- [5] De Jong WH, Dormans JA, Van Steenberghe MJ, et al. Tissue response in the rat and the mouse to degradable dextran hydrogels [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83: 538–545.
- [6] Vlugt-Wensink KD, Jiang X, Schotman G, et al. *In vitro* degradation behavior of microspheres based on cross-linked dextran [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2983–2990.
- [7] Van Dijk-Wolthuis WN, Van Steenberghe MJ, Hoogeboom JA, et al. Degradation and release behavior of dextran-based hydrogels [J]. *Macromolecules*, 1997, 30: 4639–4645.
- [8] Van Dijk-Wolthuis WN, Tsang SKY, Kettenes-van den Bosch JJ, et al. A new class of polymerizable dextrans with hydrolysable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer [J]. *Polymer*, 1997, 38: 6235–6242.
- [9] Stenekes RJ, Franssen O, van Bommel EM, et al. The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics [J]. *Pharm Res*, 1998, 15: 557–561.
- [10] Haupt B, Neumann T, Wittemann A, et al. Activity of enzymes immobilized in colloidal spherical polyelectrolyte brushes [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 948–955.
- [11] Wittemann A, Ballauff M. Secondary structure analysis of proteins embedded in spherical polyelectrolyte brushes by FT-IR spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 2813–2819.
- [12] Cai CF, Bakowsky U, Rytting E, et al. Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69: 31–42.
- [13] Vlugt-Wensink KD, Vlugt TJ, Jiskoot W, et al. Modeling the release of proteins from degrading crosslinked dextran microspheres using kinetic Monte Carlo simulations [J]. *J Control Release*, 2006, 111: 117–127.
- [14] Stenekes RJ, De Smedt SC, Demeester J, et al. Pore sizes in hydrated dextran microspheres [J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1: 696–703.