

·基础研究·

干扰素 α 缓释微球的制备及体外释放研究*

孟乐乐¹ 洪晓芸¹ 张奇昕¹ 吴造展¹ 张丽君¹ 廖美玲¹ 张向荣² 袁伟恩^{1,Δ}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240 ; 2 深圳赛保尔生物药业有限公司 广东 深圳 518129)

摘要 目的 开发一种有效地长效缓释干扰素 α 微球制剂。方法 利用 S/O/W 乳剂 - 挥发法制备了包裹干扰素 α 多糖颗粒的 PLGA 微球,对其外观形态进行了考察,并用 ELISA 方法考察了微球体外释放效果。结果 制备的干扰素 α 微球圆整光滑,粒径均匀 经 24 天体外释放,累计释放率达到 80%以上。结论 通过包封包裹干扰素 α 的多糖颗粒进 PLGA 微球,有效地保护了干扰素 α 在微球中的活性,实现了长效缓释,是一种可行的缓释方案。

关键词 干扰素 α ; 长效缓释; 体外释放

中图分类号 R944.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)27-5201-03

The Preparation and Research of Vitro-release of Interferon-loaded Microspheres*

MENG Le-le¹, HONG Xiao-yun¹, ZHANG Qi-xin¹, WU Zao-zhan¹, ZHANG Li-jun¹, LIAO Mei-ling¹, ZHANG Xiang-rong², YUAN Wei-en^{1,Δ}

(1 Pharmacy college of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240;

2 Shenzhen Sciprogen Bio-Pharmaceutical CO.,LTD. Shenzhen, Guangdong, 518129, China)

ABSTRACT Objective: To develop an effective sustained-release preparation of interferon α . **Methods:** Interferon α (IFN α)-loaded dextran nanoparticles were prepared by the method of freezing-induced phase separation, then the IFN α -loaded dextran nanoparticles were microencapsulated in PLGA microspheres by the method of solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion-evaporation technique. The microsphere samples were analyzed by using SEM. In vitro release profiles of the samples were detected by Elisa Kit. **Results:** The IFN-loaded microspheres had spherical shape and smooth surface. They possessed a normal size distribution. The accumulated release in vitro was over 80% after 24 days. **Conclusion:** The preparation of PLGA microspheres of IFN α through the encapsulation of IFN α -loaded Dextran nanoparticles protected the bioactivity of the IFN α in the microspheres effectively and got an ideal sustained release profile. This method is an effective technique for IFN α sustained release.

Key words: Interferon α ; Sustained-release; In vitro release

Chinese Library Classification: R944.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5201-03

前言

干扰素 α 是一种多功能的细胞因子,能抑制肿瘤细胞的增殖,具有免疫调节功能。重组干扰素 α 在抗乙肝病毒和治疗各种癌症方面均有应用。如头发细胞白血病和淋巴瘤等^[1]。然而,由于在体内半衰期短,需要长时期的频繁注射,从而导致血药浓度波动较大以及大量的不良反应^[2]。因此开发一种长效缓释干扰素 α 微球具有很急迫的临床意义。为了达到一种有效地缓释效果,需要建立一个平稳的释放体系。生物可降解的聚合物材料聚乳酸-聚羟基乙酸(PLGA)等用来制备成微球包裹蛋白药物达到长效缓释的效果^[14-16]。PLGA 由于降解产物最后是二氧化碳和水,在体内完全无毒降解,是一种生物相容性很好的材料。很多文献报道,PLGA 微球包封的多肽、病毒、蛋白和其它大分子药物的载药系统,能够延长动物内的免疫响应,因而

避免多次给药的需要^[3]。目前,这类载药系统上市的产品有奥曲肽微球,亮丙瑞林微球等^[18-19]。干扰素 α 的微球的研究也有不少报道的,一般是利用 W/O/W 或者 S/O/W 等乳化-溶剂挥发法制备干扰素 α 的微球^[4]。利用这些传统的乳化-溶剂挥发法包裹干扰素 α 时,有机溶剂很容易对干扰素 α 造成活性破坏,同时油水界面也容易造成干扰素 α 的聚集,而导致变性^[5-9]。本研究通过制备多糖包裹的干扰素 α 颗粒,然后再将颗粒包封进 PLGA 微球^[17],能有效地保护干扰素 α 在微球中的活性,从而达到长效缓释的效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Sartorius-BS110S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); XW-80A 涡旋混合器(上海其特分析仪器有限公司);

* 基金项目 国家重大专项—"重大新药创制"科技重大专项—创新药物研究开发技术平台(2009ZX09310-007);

国家自然科学基金(81173001); 上海科委纳米专项(No11nm0503300 和 No.1052nm03900)

作者简介 孟乐乐(1986),男,硕士,研究方向 缓释制剂

Δ 通讯作者 袁伟恩, E-mail: yuanweien@126.com

(收稿日期 2012-02-23 接受日期 2012-03-20)

JJ-1 增力电动搅拌器 (金坛市新航仪器厂) ; 冻干机 (Anker TGL-16C) 聚乙二醇 (PEG 8000) , 磷酸二氢钠, 氯化钠, 乙二醇 (EG) ; 甘油 (G) , 聚乙烯醇 (PVA) , 二氯甲烷 (DCM) , 均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司 ; 葡聚糖 64,000-70,000 购自 Sigma ; Elisa 蛋白试剂盒购自 Pierce 公司 ; 聚乳酸 - 聚羟基乙酸 (PLGA 50/50 3A) , 聚乳酸 (PLA, 2.5A) 购自 Lakeshare 公司 ; 干扰素 α (IFN) 有日本林原公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 干扰素 α - 葡聚糖纳米颗粒的制备 精密称取一定量的干扰素 α , 按照 1:5 的比例加入 5% 的 Dextran 溶液中, 混合均匀后再加入 5% 的 PEG 8000 溶液 (Dextran 溶液和 PEG 溶液的比例为 1:10) , 磁子 2000 rpm 搅拌 10min, 静置, 待溶液表面气泡基本消失后, 置于 -20℃ 的冰箱预冻 8-12 h。将预冻好的样品放到真空冷冻干燥机中冻干 24 h。用二氯甲烷洗涤冻干的粉末, 并用漩涡混合器使 PEG 充分溶解, 然后用 12000 rpm 转速离心 5 min, 待多糖纳米粒全部沉淀, 除去上清液, 加入新的二氯甲烷, 重复 3-5 次。除去 PEG 的样品在通风橱自然挥干, 之后放入真空干燥箱过夜, 干燥的干扰素 α - 葡聚糖纳米颗粒密封待用^[10]。

1.2.2 担载干扰素 α - 葡聚糖纳米颗粒的 PLGA 微球的制备 称取 140 mg 的 PLGA-PLA 混合物 (PLGA3A : PLA=1 : 1) , 加入 790 mg 的二氯甲烷使之溶解, 形成 15% 的 PLGA 二氯甲烷溶液。精密称取 15.5 mg 干扰素 α - 葡聚糖纳米颗粒加到 PLGA 的二氯甲烷溶液中, 加入磁子涡旋使之混合均匀, 之后迅速转移至 5 mL 1%PVA+5%NaCl 的混合溶液中, 磁子搅拌形成半固化的微球, 再转移至 1L 5% 的 NaCl 溶液中固化 3 h。沉降法收集微球, 用超纯水洗涤 4-5 次, 冷冻干燥后密封保存于冰箱中。

1.2.3 干扰素 α 微球的体外形态考察 取适量的干扰素 α 微球置于导电胶上, 均匀涂布, 用离子镀膜仪镀金后采用扫描电镜观察颗粒大小和表面形态, 仪器型号为 JSM-7401F。

1.2.4 干扰素 α 微球包封率的测定 精密称取 5 mg 干扰素 α 微球, 加入一定量的二氯甲烷涡旋振荡以溶解 PLGA, 12000 rpm, 5 min 离心后除去上层溶有 PLGA 的二氯甲烷溶液, 之后加入新鲜的二氯甲烷。重复操作三次, 除去 PLGA 得到担载干扰素 α 的葡聚糖纳米颗粒。通风橱中放置使得残留的二氯甲烷自然挥发, 之后加入超纯水溶解葡聚糖纳米颗粒, 用 ELISA 试剂盒检测干扰素 α 的浓度。

计算公式为 : 包封率 = (实际含量 / 理论计算的含量) × 100%

1.2.5 干扰素 α 微球体外释放方法 称取 20.8 mg 的干扰素 α 微球放入释放瓶中, 加入 1 mL pH=7.4 的 PBS 缓冲液, 置于 37℃ 摇床, 转速为 110 rpm, 每日定时取样, 将所有液体取出, 并补充新鲜的 pH=7.4 的 PBS 缓冲液。

1.2.6 干扰素 α 浓度检测方法 释放液中干扰素 α 的浓度用 ELISA 试剂盒测定。

2 结果

2.1 形态

干扰素微球的粒径比较均匀, 呈圆形, 并且表面比较光滑, 无孔洞 (图 1)。

2.2 干扰素 α 微球的包封率

干扰素 α 微球的包封率还有待改善, 因为在制备的过程中干扰素 α 会有物理损失, 实际包封率会有所提高。如果进行放大生产, 在制备过程中的物理损失就会降低很多 (表 1)。

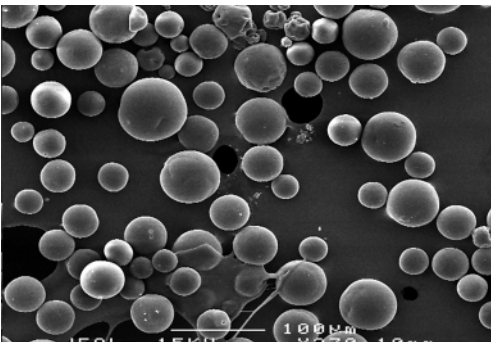


图 1 干扰素 α 微球的电镜扫描图
Fig.1 SEM photograph of IFN α loaded microspheres

表 1 干扰素 α 微球的包封率	
Table 1 Encapsulation efficiency for microspheres	
Formulations	Encapsulation efficiency
I	65.02%
II	65.34%

2.3 体外释放研究

按照 Elisa Kit 提供的干扰素测定方法, 制备干扰素 α 标准品的标准曲线, 以干扰素 α 浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 干扰素 α 在 12.5-250 pg/ml 的浓度范围内呈现良好的线性关系, 如图 2 示。

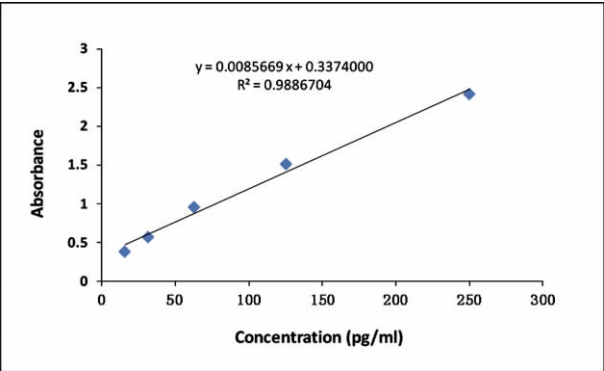


图 2 林原公司提供的干扰素 α 标准品 Elisa 标准曲线
Fig.2 Absorbance of the standard HBL-IFN α

玻璃体颗粒葡聚糖是一种很好的蛋白稳定剂, 能够防止由温度和湿度引发的蛋白变性。当其处在玻璃体状态时, 其内部的水分甚至能够使得蛋白保持其原始的结构^[8-9]。在持续释放阶段, 均匀分在 PLGA 微球中的干扰素 α - 葡聚糖颗粒吸收水分发生溶胀, 而不像其他的小分子量的蛋白保护剂那样直接溶解掉。溶胀后的干扰素 α - 葡聚糖颗粒能够很好的控制干扰素 α 的缓慢均匀释放, 缓控释效果可达几周甚至更长时间^[10]。同时, 葡聚糖颗粒的玻璃体状态就像是高聚物中的一个亲水性小环境, 使得干扰素 α 分子之间相互隔离, 避免的干扰素 α 的聚

集和吸附^[20]。

图3显示了用本方法制备的干扰素 α -PLGA微球的体外累积释放曲线。由图3可以看出,第一天的释放小于10%,无突释现象,并且每天释放均匀,24天累积释放达80%以上。结果证明葡聚糖颗粒分散相在改善干扰素 α 释放动力学方面发挥了重要的作用。

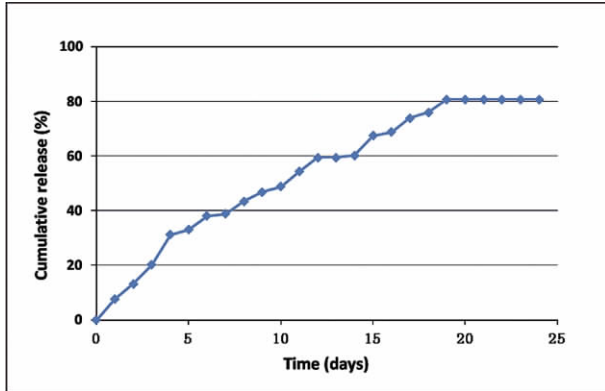


图3 干扰素 α 微球的体外累积释放曲线

Fig.3 Cumulative HBL-IFN α release from PLGA/PLA microspheres for 24 days

3 讨论

用W/O/W复乳法制备的蛋白缓释微球,因其存在油-水界面而容易引起干扰素 α 聚集而失活、包封率低和严重的突释等问题^[11-13]。尽管把干扰素与无机盐锌盐和PEG沉淀法制备干扰素 α 的颗粒。然后用S/O/W复乳法制备的微球能够减少干扰素 α 分子和水相直接接触的机会,但是在制备过程中,少量的干扰素 α 固体颗粒还是不能避免的溶解在水相中并与油-水界面接触,从而导致干扰素 α 的聚集和失活,同时大量的无机盐容易造成微球内部渗透压过高而导致严重的突释等缺点。并且上述两种方法均存在干扰素 α 无法完全释放的问题。本方法中所应用的葡聚糖纳米颗粒能够在制备过程中很好的保持干扰素 α 的稳定性,改善干扰素 α 的释放行为,主要是因为是在制备过程中干扰素 α 被葡聚糖纳米颗粒包裹,呈现固体状态,即减少了与油-水界面的接触从而减小了结构改变,又避免了与疏水性的高分子材料接触而造成干扰素 α 的聚集。在释放的时候,干扰素 α -葡聚糖颗粒能够很好的均匀分布在微球之中,避免了突释;同时在吸水溶胀后,干扰素 α -葡聚糖颗粒处于玻璃体状态,能够使得干扰素 α 不断的溶解于水相中,而且由于渗透压的作用,能够很好的使得干扰素 α 的缓慢均匀释放,即使在后期也能保持很好的缓释效果,可达几周甚至更长时间。这样更好解决了蛋白缓释微球存在的一系列问题,而不是文献报道只解决部分问题的新方法。

4 结论

我们开发了一种新的制备干扰素 α 缓释微球的方法,这种方法能够抑制蛋白聚集和改善蛋白释放行为,无突释现象,24天累积释放达80%以上。

参考文献(References)

[1] Anthony M. Biological assays for interferons[J]. Journal of Immunolo-

gical Methods,2002,261:21-36

- [2] Diwan M, Park TG. Stabilization of recombinant interferon alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres [J]. International Journal of Pharmaceutics,2003,252(1):111-122
- [3] Zhou S, Deng X, He S, et al. Study on biodegradable microspheres containing recombinant interferon alpha -2a[J]. J Pharm Pharmacol,2002,54(9):1287-1292
- [4] Liu A, Wu WT. Application of novel preparation techniques to drug delivery systems of polypeptides [J]. Chin JMAP, 2003, 20(2): 110-114(In Chinese)
- [5] Weert MV, Hennink WE, Jiskoot W. Protein stability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles [J]. Pharmaceutics Research,2000,17:1159-1167
- [6] Muller R, Keck C. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles [J]. Journal of biotechnology,2004,113 (1-3):151-170
- [7] Perez C, Castellanos I, Costantino H, et al. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers [J]. The Journal of pharmacy and pharmacology,2002,54(3):301-305
- [8] Breen ED, Curley JG, Overcashier DE, et al. Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation [J]. Pharmaceutics Research,2001,18:1345-1353
- [9] Jin T, Zhu J, Wu F, et al. Preparing polymer-based sustained-release systems without exposing protein to water-oil or water-air interface [J]. Pharmaceutics Research,2008,128:50-59
- [10] Chen JL, Miao JH, Yuan WE, et al. Study on glassy polysaccharide particles stabilizing Interferon- α -2b[J]. Progress in Modern Biomedicine,2008,8:842-844
- [11] Morlok M, Koll H, Winter G, et al. Microencapsulation of rherythropoietin, using biodegradable poly (D,L-Lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients[J]. Eur. J. Pharm. Biopharm,1997,43:29-36
- [12] Zhao H, Ren TT, Chen WJ, et al. Microencapsulated protein-loaded dextran nanoparticles in PLGA microspheres for protein-controlled release[J]. Progress in Modern Biomedicine,2010,10:130-132
- [13] Fan Y, Feng LS, Xu FP, et al. Preparation and characteristics of interferon-alpha poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres [J]. Journal of Microencapsulation,2010,27 (2):133-141
- [14] Ming GP, Jeong HK, Jong OK. Enhanced Oral Bioavailability of Piroxicam in Rats by Hyaluronate Microspheres [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy,2007,33(4):485-491
- [15] Janet Y, Jeffrey L. Cleland. Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon γ (rhIFN γ) from PLGA microspheres [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences,1997,86 (8):908-914
- [16] Zheng CH, Yu HY, Gao JQ. Hydrophilic biodegradable microspheres of interferon alpha and its pharmacokinetics in mice [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials,2008, 85B (1):225-230
- [17] Vivian J. Microencapsulation of recombinant interferon alpha-2 b into poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres [J]. Biotechnology Aplicada,2008,25:31-41
- [18] Dzyublyk TY, Moroz L. Controlled release recombinant human interferon alpha for treating patients with chronic hepatitis C genotype: a phase clinical trial [J]. Journal of Viral Hepatitis,2011,18 (4):271-279

(下转第 5254 页)

了脑缺血再灌注 7d 的细胞凋亡, 结果发现脑缺血能诱导细胞发生凋亡, 与其他人的研究结论基本一致^[19], 提示细胞凋亡是评价缺血性脑损伤较为敏感、可靠的指标。采用 VEGF 抗体阻断内源性 VEGF 作用和注入外源 VEGF 因子的方法, 从两方面观察 VEGF 与细胞凋亡的关系, 发现 VEGF 能抑制因缺血诱导的细胞凋亡, 体外实验也发现 VEGF 能预防因缺氧所致的神经元凋亡^[20], 据此推测 VEGF 通过抑制神经元凋亡而参与保护缺血性脑损伤。另外实验观察到 HSP70 在缺血再灌注一周内表达上调, 阻断内源性 VEGF 后, HSP70 表达增加, 而外源性 VEGF 在相同再灌注时程使 HSP70 免疫反应性下降, 也提示 VEGF 可能对缺血再灌注脑组织起保护作用, 从而使反映神经元损伤程度的 HSP70 含量下降。综上所述, 我们认为内外源 VEGF 可通过抑制缺血脑组织细胞凋亡及 HSP70 表达, 而参与保护缺血性再灌注脑损伤。

参考文献(References)

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84
- [2] 王春霞, 刘春风, 包士尧. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型改良后的实验研究[J]. *苏州医学院学报*, 1999, 19: 124
Wang Chun-xia, Liu Chun-feng, Bao Shi-yao. The study of focal cerebral ischemia reperfusion model after improved [J]. *Journal of Suzhou Medical College*, 1999, 19: 124
- [3] Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11946-11950
- [4] Nagy Z, Simon L, Bori Z. Regulatory mechanisms in focal cerebral ischemia. New Possibilities in neuroprotective therapy [J]. *Ideggyogy Sz*, 2002, 55(3-4): 73-85
- [5] Zhang Z G, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(2): 62-66
- [6] 张荣, 周范民. 热休克蛋白与缺血性脑损伤[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 1996, 23: 57
Zhang Rong, Zhou Fan-min. Ischemic brain injury and heat shock protein [J]. *Foreign Medical Sciences Section on Neurology & Neurosurgery*, 1996, 23: 57
- [7] Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, et al. Heat shock proteins as markers of neural injury [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989, 6(1): 93-100
- [8] Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 249-262
- [9] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects [J]. *Circ Res*, 2000, 86(12): 1198-1202
- [10] Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, et al. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor [J]. *Ann Intern Med*, 2000, 132(11): 880-884
- [11] 栗世方, 王任直, 李桂林. 血管内皮生长因子治疗脑缺血实验研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(1): 115-119
Li Shi-fang, Wang Ren-zhi, Li Gui-lin. Recent Advance in Experimental Study of Cerebral Ischemia Treated by Vascular Endothelial Growth Factor [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2005, 27(1): 115-119
- [12] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829-838
- [13] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10242-10247
- [14] Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 298(1-2): 151-159
- [15] Leberer C, von Degenfeld G, Karl A, et al. Therapeutic angiogenesis arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion [J]. *Endothelium*, 2003, 10(4-5): 257-265
- [16] Marti HJ, Bemaudin M, Bellall A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia [J]. *Am J Pathol*, 2000, 56(3): 965-976
- [17] Shen F, Fan Y, Su H, et al. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-regulated VEGF gene transfer promotes angiogenesis following focal cerebral ischemia in mice [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(1): 30-39
- [18] Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, et al. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2003, 145(1): 49-53
- [19] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(7): 1252-1257; discussion 1257-1258
- [20] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10242-10247

(上接第 5203 页)

- [19] Leo GJ, De Leede JE, Humphries AC. Novel Controlled-Release Lemna-Derived IFN- α 2b (Locteron): Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Tolerability in a Phase I Clinical Trial [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2008, 28(2): 2-6
- [20] Wei GB, Glenda JP, Laurie KM, et al. The release profiles and bioactivity of parathyroid hormone from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(2): 345-352