

干扰素 α -2b 长效注射微球的处方和制备工艺的研究

吴 诚,尹东锋,鲁 莹,钟延强*

(第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**制备载干扰素 α -2b(IFN- α -2b)可注射微球,开发其长效注射剂型。**方法:**以乳酸-羟乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,用复乳法(w/o/w)和固体/油/油(s/o/o)法制备载 IFN- α -2b 长效注射微球;考察粒径大小、外观、包封率等理化性质;用微量二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)法考察微球的体外释药特性及影响因素;用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳初步评价了微球制备工艺和体外释放过程对 IFN- α -2b 稳定性的影响。**结果:**用两种方法制备的微球球形圆整,分散性好,包封率在 80%以上;用 w/o/w 法制备微球时,IFN- α -2b 原液超滤处理可显著影响微球的平均粒径和体外释放特性,使用特性黏度较低的 PLGA 时,两种方法制备的微球在 1 个月内的累积释放均显著提高;使用 s/o/o 法制备的微球中 IFN- α -2b 部分聚集,而 w/o/w 法制备的微球中的 IFN- α -2b 的电泳行为和原液相同。**结论:**w/o/w 和 s/o/o 法制备的载 IFN- α -2b 注射微球均可在体外缓释 1 个月。

[关键词] 干扰素 α ;微球体;聚乳酸-羟基乙酸共聚物

[中图分类号] R 944 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0076-05

Formulation and preparation method of long-acting interferon α -2b loaded injectable microspheres

WU Cheng, YIN Dong-feng, LU Ying, ZHONG Yan-qiang* (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:**To prepare injectable interferon α -2b(IFN- α -2b) loaded microsphere and develop a long-acting dosage form. **Methods:** IFN- α -2b loaded microspheres were prepared with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as carrier material by double emulsion(w/o/w) method and solid in oil in oil(s/o/o) method separately. Physical and chemical characteristics of microspheres(mean diameter, morphology and drug entrapment efficiency) were evaluated; the *in vitro* release behavior and influencing factors of the microspheres were determined by micro-BCA(bicinchoninic acid) method; and IFN- α -2b stability during encapsulation and *in vitro* release was evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Results:** The 2 types of microspheres produced had good shape and dispersive quality and a drug entrapment efficiency of more than 80%. IFN- α -2b bulk ultrafiltration can significantly influence the mean diameter and *in vitro* release behavior of microspheres prepared by w/o/w method. The accumulated release(within 1 month) of the microspheres prepared by both methods was significantly improved when using PLGA with lower inherent viscosity. SDS-PAGE test showed aggregation of IFN- α -2b with s/o/o method, while there was no difference between the electrophoretic behavior of bulk IFN- α -2b and IFN- α -2b in microspheres prepared by w/o/w method. **Conclusion:** IFN- α -2b can be encapsulated into injectable microspheres to yield a one-month continuous release by both w/o/w method and s/o/o method.

[KEY WORDS] interferon- α ; microspheres; poly(lactic-co-glycolic acid)

[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27(1):76-80]

近年来,由于基因工程重组技术的发展,核酸、蛋白质、多肽等生物技术药物在临床上应用越来越多,而此类药物分子量大,结构稳定性差,口服生物利用度低,理化性质与小分子化学药物差别较大,因而其剂型研究相对滞后。临床上这类药物大多使用其粉针剂,需要频繁注射给药,给患者用药带来了较大的不便。制备该类药物的长效注射微球一直是研究的热点领域之一。

干扰素 α -2b(IFN- α -2b)属于蛋白质类药物,在临床上广泛用于治疗多种病毒性疾病和恶性肿瘤^[1],长期用药对慢性乙肝、丙肝、巨细胞病毒感染、血源性恶性肿瘤疗效确切,但其需频繁注射给药,患

者用药顺应性较差^[2]。因此本课题选择 IFN- α -2b 作为模型药物,制备了 IFN- α -2b 长效注射微球。制备微球的方法较多,有复乳溶剂挥发法^[3~5]、相凝聚法^[6]、油/油法^[7,8]、喷雾干燥法^[6]等。制备工艺的选择主要考虑到工艺过程要有利于蛋白质类药物稳定性的维持、工艺简便、成本低、易于放大等方面。在

[基金项目] 国家高技术研究发展计划/863 计划(2004AA2Z3390). Supported by National High-tech R&D Program/863 Program (2004AA2Z3390).

[作者简介] 吴 诚,硕士。

* Corresponding author. Tel/Fax: (021)25074591

进行 IFN- α -2b 微球处方和制备工艺研究时,要特别考虑成本问题,因为该药价格昂贵,进行处方研究时投药量不宜过大。经过综合考虑,本课题采用了复乳(w/o/w)溶剂挥发法和固体/油/油(s/o/o)法制备微球,并对两种方法制备的微球的理化性质、体外释药特性以及初步的稳定性进行了考察。

1 材料和方法

1.1 仪器 超声乳化仪(美国 BRANSON 公司);GS12-2 电子恒速搅拌器(上海医械专机厂);SHZ-88 台式水浴恒温摇床(江苏太仓市实验设备厂);日立 S-6000 型扫描电镜(日本 Hitachi 公司);LS 230 激光粒度分析仪(美国 Coulters 仪器公司);CARY 100 紫外分光光度计(美国 varian 公司);冷冻干燥机(美国 Virtis 公司)。

1.2 材料 干扰素 α -2b 原液(IFN- α -2b,未加保护剂白蛋白,上海万兴生物制药有限公司,批号 20030401,0.47mg/ml, 1.01×10^8 IU/ml);甘露醇(注射用规格,青岛明月海藻有限公司);PLGA(LA:GA=50:50,商品名 Resomer RG503H,特性黏度为 0.04 L/g,德国 Boehringer Ingelheim 公司);PLGA(LA:GA=50:50,特性黏度为 0.019 L/g,美国 Birmingham Polymers 公司);聚乙烯醇 1788(PVA1788,北京有机化工厂);离心超滤浓缩管(Vivaspin500,截留相对分子质量 10 000,德国赛多利斯公司);BCA 含量测定试剂盒(美国 Pierce 公司);叠氮钠(纯度>99.9%,AMERSON 分装);精制棉子油(自制);卵磷脂(注射用,上海太伟药业有限公司);石油醚、伯洛沙姆 188(F-68)、二氯甲烷、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯

1.3 复乳(w/o/w)溶剂挥发法制备 IFN- α -2b 微球 根据文献^[3~5],对复乳溶剂挥发法进行了改进,制备工艺如下:取一定体积的 IFN- α -2b 原液(1~2 ml),加入 10%甘露醇等保护剂,冷冻干燥 24 h,得 IFN- α -2b 冻干粉。用 10 mmol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液将冻干粉重新溶解(体积为 20~100 μ l)作为内水相,与一定浓度 PLGA 的二氯甲烷溶液混合,冰浴条件下超声乳化(400 ms/次,10 次)制成初乳,将初乳滴加到一定浓度(2%~4%,W/V)聚乙烯醇(PVA)水溶液中,高速搅拌 2 min 得复乳,并将其立即用约 150 ml 蒸馏水稀释,低速搅拌 4 h,离心收集微球,蒸馏水洗涤 3 次,冷冻干燥 24 h。空白微球内水相用蒸馏水代替。

1.4 固体/油/油(s/o/o)法制备 IFN- α -2b 微球

1.4.1 Zn^{2+} 和 IFN- α -2b 复合物微粉的制备^[9,10] IFN- α -2b 原液经脱盐后换为 10 mmol/L pH 7.2 的 $NaHCO_3$ 缓冲系统,加 2 mmol/L 的醋酸锌溶液,调节 Zn^{2+} 和 IFN- α -2b 摩尔比为 1:1,加 1%醋酸溶液调上述溶液 pH 为 7.1,即形成 Zn^{2+} 和 IFN- α -2b 复合物沉淀。再加入一定量的 PEG6000,溶解后冷冻干燥,经乙腈或二氯甲烷洗涤,去除 PEG6000 即得 IFN- α -2b 微粉。

1.4.2 微球的制备^[7,8] 将 IFN- α -2b 与 Zn^{2+} 复合物的微粉加入 PLGA 的乙腈溶液中水浴超声混悬,得均匀混悬液,将混悬液缓慢滴加到 20~30 ml 棉子油(含 0.05%卵磷脂作为乳化剂)中,搅拌 2 h,然后加入轻质石油醚(沸点 60~90℃)继续搅拌 15 min,离心收集微球,石油醚洗涤 3 次,冷冻干燥 24 h。

1.5 微球包封率的测定^[11] 精密称取含药微球约 10 mg,加入 5.0 ml 0.1 mol/L NaOH/0.5%SDS,37℃水浴振荡 24 h,使微球完全溶解,加 2 mol/L HCl 调 pH 约为 7.0,进行 BCA 法蛋白含量测定。包封率(%)=微球中 IFN- α -2b 的测得含量(mg)/投药量(mg) $\times$ 100%。

1.6 微球的形态、粒径大小和分布 取 IFN- α -2b 微球冻干粉适量,采用日立 S-6000 电子扫描显微镜观察微球的形状和表面形态。取微球混悬液 3 ml,加入适量蒸馏水稀释,调整透光度,采用 LS 230 激光粒径测定仪测定粒径大小和分布。

1.7 体外释放试验 精密称取含药微球 10~30 mg 置于 10 ml 玻璃离心管中,加入 1.5 ml 10 mmol/L pH 7.4 缓冲液(含 0.02%叠氮钠作为抑菌剂,0.02%F-68 作为润湿剂),置于恒温水浴摇床中,在 100 r/min 振荡速度、(37 $\pm$ 0.5)℃温度条件下进行微球的体外释放度测定。分别在 2 h、1 d、2 d 取出离心管,于 2 000 r/min 离心 10 min,将全部释放介质取出并更换新的释放介质,以后每隔 3~4 d 同以上操作方法取样一次,并用 BCA 法测定释放液中 IFN- α -2b 的含量。

1.8 微球中 IFN- α -2b 纯度的测定

1.8.1 微球中 IFN- α -2b 的提取 根据文献^[12],取微球 3~5 mg,加 1 ml 丙酮和二氯甲烷混合溶剂(1:1,V/V)涡旋,12 000 r/min 高速离心 5 min,去上清,重复 3 次,完全去除 PLGA 后真空干燥 2 h,蛋白残渣用适量 pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,并用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,对滤液进行检测。若微球在释放介质中,则先离心去除释放介质,冷冻干燥 24 h,再进行以上操作。

1.8.2 SDS-PAGE 测定 IFN- α -2b 的纯度^[13] 取样品溶液和 marker 溶液各 15 μ l,加等体积的 1 $\times$

SDS 凝胶加样缓冲液,混匀,100℃水浴加热 5 min 使蛋白质变性,样品和 marker 各上样 15 μ l。分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,采用银染法对蛋白质进行染色。

2 结 果

2.1 微球的理化性质 由图 1 可知,用 w/o/w 法和 s/o/o 法制备得到的微球均圆整,不粘连;局部放大的电镜照片显示用复乳法制备的微球表面有微

孔,而用 s/o/o 法制备的微球表面较光滑。主要原因可能是复乳法使用二氯甲烷溶解 PLGA,由于快速挥发易在表面形成孔洞,而 s/o/o 法使用乙腈溶解 PLGA,沸点较高,较难挥发,微球固化主要依靠乙腈在棉子油中被缓慢萃取。2 种方法制备微球的粒径分布结果见图 2,用复乳法制备的微球平均粒径为 $(50.32\pm27.73)\mu\text{m}$,油/油法制备的微球平均粒径为 $(41.68\pm20.97)\mu\text{m}$ 。

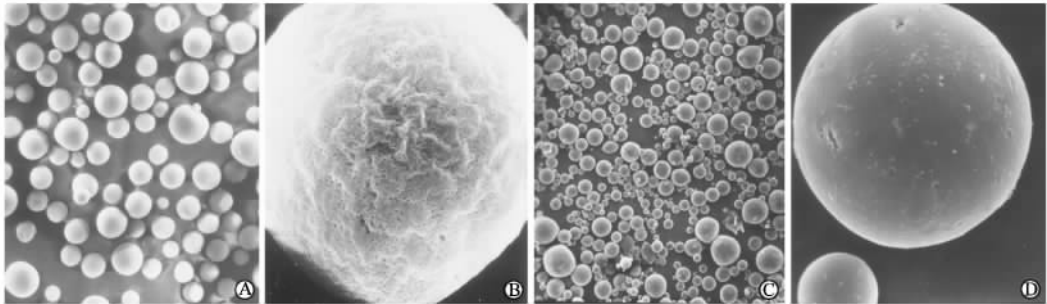


图 1 两种方法制备 IFN- α -2b 微球的电镜照片

Fig 1 Morphology of IFN- α -2b loaded microspheres prepared by w/o/w method (A,B) and s/o/o method (C,D)

A: $\times 100$; B: $\times 1\,000$; C: $\times 150$; D: $\times 2\,000$

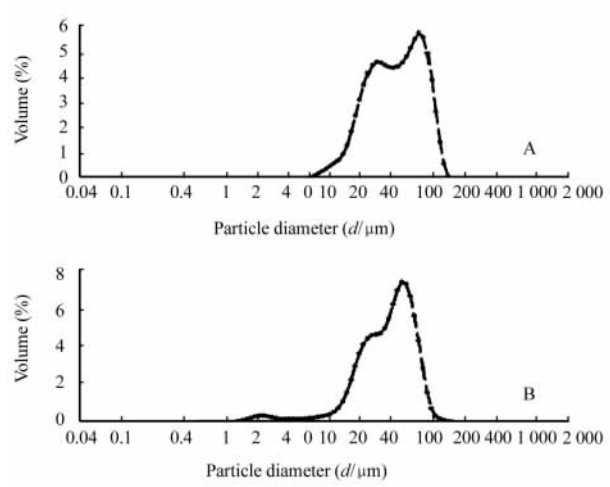


图 2 两种方法制备的 IFN- α -2b 微球的粒径大小和分布

Fig 2 Size distribution of IFN- α -2b

loaded microspheres prepared by w/o/w method (A) and s/o/o method (B)

2.2 包封率及体外释放特性 复乳法和油/油法两种方法制备得到的微球包封率均较高,优选处方的包封率分别为 88%和 91%。用复乳法制备微球时,需要将 IFN- α -2b 原液浓缩以提高内水相中 IFN- α -2b 的浓度,从而有效地提高微球的载药量。但是,原液中含氯化钠和缓冲系统,IFN- α -2b 浓度提高的

同时也提高了原液中盐浓度,从而导致内水相渗透压较高。因此实验中对原液进行了超滤处理,并比较了超滤处理对于微球体外释放特性的影响(图 3)。原液经超滤除盐后制备的微球突释效应显著减小,且用油相浓度为 160 mg/ml PLGA 制备的微球释放也显著加快。

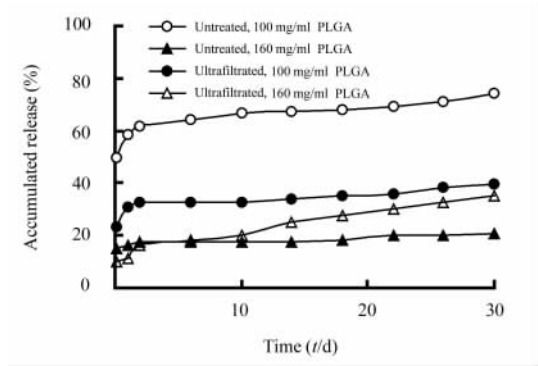


图 3 超滤处理对 w/o/w 制备 IFN- α -2b 微球体外释放特性的影响

Fig 3 Effect of interferon bulk ultrafiltration on release behavior of microspheres prepared by w/o/w

两种方法采用不同平均相对分子质量的 PLGA (低平均相对分子质量,黏度 0.019 L/g;高平均相对分子质量,黏度 0.04 L/g)制备的微球的体外释放曲线见图 4。实验表明 PLGA 的平均相对分子质

量对微球的突释效应影响较小,但可显著影响微球 IFN- α -2b 的释放速度。用低平均相对分子质量的 PLGA 制备的微球其释放速度显著加快。并且复乳法制备的微球突释量较油/油法制备的微球突释量小。

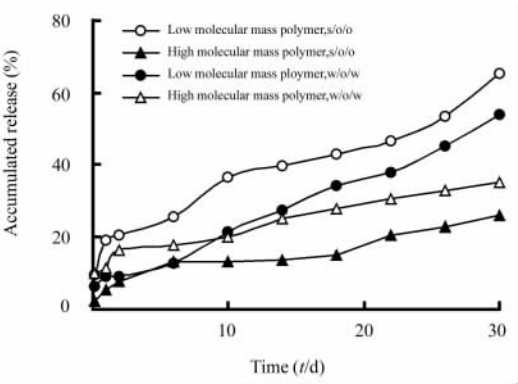


图 4 不同平均相对分子质量 PLGA 对制备的 IFN- α -2b 微球的体外释放特性的影响

Fig 4 Effect of molecular weight of PLGA on release behavior of IFN- α -2b microspheres

2.3 稳定性研究 在实验中用 SDS-PAGE 检测了微球中 IFN- α -2b 的纯度,初步评价了制备工艺和体外释放过程中 IFN- α -2b 的稳定性。根据文献报道, Zn^{2+} 和 IFN- α -2b 可形成复合物,这种复合物稳定性较高,并可重新溶解并保持原来的结构。在实验中我们考察了复合物重新用 EDTA 溶解后其电泳行为,并且考察了在体外释放 10 d 和 20 d 后从微球中提取的 IFN- α -2b 的电泳行为,结果见图 5。图 5 中可以清楚地看到样品 5~7 在相对分子质量 40 000 左右即 IFN- α -2b 两倍相对分子质量(38 000)处有杂质条带,应为 IFN- α -2b 的二聚体;样品 3 和 4 主条带颜色很浅,其他样品条带与 IFN- α -2b 原液(样品 1)条带无明显差异。

在制备样品中发现从体外释放 10 d 后的微球中提取的 IFN- α -2b 样品有部分沉淀不溶解,而其他样品均较澄清或仅有少量不溶性杂质。而图 5 中样品 3 和 4 主条带颜色很浅也说明,在体外释放过程中从复乳法制备的微球中提取的 IFN- α -2b 样品浓度变低,但从复乳法制备微球的体外释放曲线可以看出第 10 天和第 20 天累积释放分别为 21% 和 35% 左右,仍有超过一半的 IFN- α -2b 未从微球中释放,所以在体外释放过程中有部分 IFN- α -2b 产生了聚集和沉淀。

从非还原性 SDS-PAGE 可以得到以下结论:复乳法制备的微球中的 IFN- α 纯度较高,未见明显聚

集与降解,而 s/o/o 法制备的微球中的 IFN- α 有少量二聚体产生,未见降解产物。在体外释放过程中复乳法制备的微球中的 IFN- α 出现了明显的聚集和沉淀。



图 5 不同 IFN- α -2b 样品的电泳谱图(银染法)

Fig 5 Electrophoresis of different IFN- α -2b samples by silver staining

M: Marker; 1: IFN- α -2b bulk solution; 2: Zn^{2+} -IFN- α -2b complex dissolved by 5 mmol/L EDTA solution; 3: IFN- α -2b extracted from microspheres prepared by w/o/w method after *in vitro* release for 10 d; 4: IFN- α -2b extracted from microspheres prepared by w/o/w method after *in vitro* release for 20 d; 5-7: IFN- α -2b extracted from microspheres of different batch numbers prepared by s/o/o method; 8-10: IFN- α -2b extracted from microspheres of different batch numbers prepared by w/o/w method

3 讨论

在使用复乳法制备载 IFN- α -2b 微球的过程中,通过将 IFN- α -2b 原液经超滤处理,选用不同相对分子质量的 PLGA 等方法研究了处方及工艺因素对微球粒径及体外释放特性的影响。原液经超滤处理后制备的微球突释效应显著减小,可能是由于超滤减小了内外水相的渗透压差,从而减少了外水相向内水相的渗透,使制得的微球更加致密,因而有效降低了微球的突释效应。实验中用显微镜也观察到原液未经超滤处理制备的微球显色淡,易透光,而超滤处理后制备的微球显色深,透光性明显下降。此外,研究表明处方中 PLGA 浓度增大也可减小微球的突释效应。

文献报道复乳法的主要缺点是在制备初乳时形成了油水界面,再加上需要超声、搅拌等剧烈条件,蛋白质在这一阶段很容易失活,因而近年来用固体/油/油法制备载蛋白类药物微球报道越来越多。固体/油/油法与复乳法的主要区别是在制备微球时蛋白质以固体微粉的形式混悬在 PLGA 溶液中。蛋白质以固体的形式存在时,由于分子活动性大大减弱,即使与有机溶剂接触仍可维持原有的结构。文

献报道锌离子和蛋白质形成难溶性复合物后可提高蛋白质的稳定性,因此实验中参考文献方法制备了锌离子和 IFN- α -2b 的复合物微粉,并采用 s/o/o 法成功地将其包被得到 PLGA 微球。用该方法制备微球时,未加入白蛋白或甘露醇等常用的蛋白质冻干保护剂,主要是由于复合物是以固体的形式存在,无需冻干,另一方面,锌离子可以通过和 IFN- α -2b 形成复合物限制其活性而对其起到较好的稳定作用。并且该复合物可以用 EDTA 溶液进行复溶,复溶后的蛋白质溶液在 SDS-PAGE 电泳上的行为与 IFN- α -2b 原液一致。但实验中却发现从微球中提取的 IFN- α -2b 含少量二聚体,有关 s/o/o 法制备的微球中 IFN- α -2b 稳定性问题还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 任国喜,袁茵,郭启玲,等. 国内外干扰素临床应用研究进展[J]. 医药导报,1995,14:155-156.
[2] 刘诗通. 国外生物药品研究开发近况[J]. 国外医药·抗生药分册,1995, 16:137-144.
[3] Cleland JL, Jones AJS. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon- γ for microencapsulation in biodegradable microspheres[J]. Pharm Res, 1996,13:1464-1475.
[4] Cleland JL. Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines[J]. Biotechnol Prog, 1998, 14: 102-107.

[5] Cleland JL, Duenas ET, Daugherty A, et al. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) provide a long lasting effect[J]. J Control Rel, 1997, 49:193-205.
[6] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998. 171-173.
[7] Schwendeman SP, Tobio M, Joworowicz M, et al. New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine[J]. J Microencapsul, 1998, 15:299-318.
[8] Sanchez A, Tobio M, Gonzalez L, et al. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha[J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 18:221-229.
[9] Tracy MA, Bernstein H, Khan MA. Controlled release of metal cation-stabilized interferon: US,6379701[P]. 2002-04-30.
[10] Morita T, Horikiri Y, Yamahara H, et al. Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture[J]. Pharm Res, 2000, 17:1367-1373.
[11] Singh M, Shirley B, Bajwa K, et al. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles[J]. J Control Rel, 2001, 70:21-28.
[12] Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland JL, et al. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres[J]. Pharm Res, 1997, 14:730-735.
[13] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫译. 北京:科学出版社,1992. 881-885.

[收稿日期] 2005-06-09 [修回日期] 2005-10-18
[本文编辑] 尹茶

Supercritical fluid extraction of aurentiamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed counter-current chromatography

Peng J, Fan G, Wu Y (Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Supercritical fluid extraction (SFE) of aurentiamide acetate from *Patrinia villosa* Juss was performed. The optimization of parameters was carried out using an analytical-scale supercritical fluid extraction (SFE) system. Then the extraction was scaled up by 100 times using a preparative SFE system under the optimized conditions of 55℃, 35 MPa and modified CO₂ with 10% methanol. Then, the crude extract I obtained by SFE was chromatographed on silica gel and the solvent system composed of petroleum ether-ethyl acetate (5 : 1, v/v) was used to produce the crude extract II, which was further isolated and purified by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) with a two-phase solvent system composed of n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (1 : 1.2 : 1.2 : 1, v/v/v/v). One hundred fifty-five milligrams of aurentiamide acetate was obtained from 400 mg crude extract II (contained 42% target) with a purity of 99.3% determined by HPLC and 92.3% recovery in one-step elution, and identification was performed by UV, MS, ¹HNMR and ¹³CNMR. As far as we know, this is the first report of discovering aurentiamide acetate from the plant of *Patrinia genus*.

[J Chromatogr A, 2005,1083: 52-57]