

計畫編號：DOH90-DC-1008

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

口服卡介苗製劑之開發

委託研究成果報告

執行機構：國防醫學院

研究主持人：江樵熹

研究人員：葉明功、陳錦龍

執行期間：90年2月12日至90年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

中文摘要

本計畫是進行口服卡介苗疫苗之製劑研發，預定進行三年，第一年進行固體微粒之製備，評估微粒之物化性質；並製備疫苗之口服劑型，經由體外溶出試驗評估製劑之釋出特性。第二年進行各種載體由腸道攝入之機制探討，並評估配方因子對於疫苗製劑之影響，以建立最佳化疫苗製劑之配方。第三年主要進行工作是建立疫苗體外安定性的評估法，並開發疫苗療效評估的動物模式及探討口服疫苗製劑其製程之影響因子。在本年度所進行工作，利用生物可降解材質 polylactic acid, (PLA)及 poly (lactide-co-glycolide) (PLG)等聚合物製成之 PLA 微平板或 PLG 微球，作為疫苗載體，經由吸附法將 BCG 吸附於聚合物之載體上。此含疫苗之載體再製備成膠囊或顆粒劑等製劑以方便口服使用。在製劑配方中，利用腸溶衣材質包覆含有疫苗之膠囊劑以保護疫苗在口服時免受胃酸的破壞。經由溶離試驗評估腸溶衣之保護功能，疫苗製劑先於酸液中兩小時，再置於中性磷酸鈉溶液試驗。此試驗結果顯示腸溶衣製劑隨包覆時間之增加，可確保製劑在酸性之擬胃液中能夠維持製劑之完整性，但在中性磷酸鈉溶液中，則能很快地崩散，釋放疫苗製劑。

研製的製程，也加以評估，中間產物或半成品，依力價試驗之方法，進行 BCG 菌之測定。所得的初步實驗結果，顯示本實驗方法、所製備之半成品，仍可維持 8~22 % 的 BCG 活菌數。

總結本實驗第一年之結果，利用生物可降解聚合物可製備出吸附疫苗之微球及微平板載體。BCG 疫苗在製劑中仍能存活，顯示口服卡介苗製劑具有很好的開發潛能，而應用此研究技術亦能在其他口服疫苗製劑之開發。

中文關鍵詞(至少三個)：口服卡介苗、生物降解聚合物、腸溶製劑

Abstract

The project attempts to develop an oral delivery system of BCG vaccine. The project will be proceeded in three years. In the first year, solid dosage forms have been investigated to evaluate the physicochemical properties of developed preparations. Oral vaccine delivery systems are prepared, the release characteristics are determined by *in vitro* dissolution method. In the second year, the uptake mechanism of intestinal tract for prepared vaccine carrier will be investigated. In addition, formulation factors potentially affecting vaccine delivery systems will be assessed for the establishment of an optimal formulation of oral vaccine preparation. In the third year, the major work is to establish the evaluation method for assessing vaccine stability. Additionally, we intend to develop an animal model to evaluate the therapeutic effect of vaccine preparations. The in-process factors related to the manufacturing procedure will also be evaluated.

In this year, we use biodegradable polymers polylactic acid,(PLA) and poly(lactide-co-glycolide) (PLG) to prepare PLA microspheres and PLG microlamella as carriers for adsorbing BCG vaccine. Carriers with vaccine can be further prepared as granules and capsules for convenience in oral administration. Capsules with enteric coating are prepared to prevent the digest of active vaccine in gastric fluid. Preparations are conducted by *in vitro* dissolution test to evaluate the protecting capability of enteric coating, vaccine preparations are tested in acidic fluid (pH 1.2) for 2 hrs, following in neutral phosphate buffer solution. Our results indicated that the protecting capability of enteric coating is enhanced as

increasing the coating time. The capsule is still maintained intact after 2 hr test in simulated gastric fluid, however, the capsule is rapidly disintegrated to release BCG vaccine in neutral phosphate solution.

Intermediate and semi-final preparations related to preparing vaccine delivery systems are also evaluated by determining BCG potency. In our preliminary test, the prepared semi-final preparation could maintain 8~22 % of the activity of BCG.

Overall the results of the first year, we can use biodegradable polymers in the preparation of vaccine carrier for adsorbing BCG. The prepared delivery systems can maintain suitable activity in potency test. BCG vaccine is potentially developed as oral delivery system in the study. Another, the established technique can be applied to other vaccines for the development of oral vaccine preparations.

Keyword: BCG Vaccine, Oral Vaccine, Biodegradable polymers

前言

結核病是目前全球各種傳染病中引起最多死亡的疾病。根據世界衛生組織的統計：1990 年全世界約有 750 萬的發病結核病人（每十萬人口 143 人），約有 50 萬人死於結核病。以發生率而言，男性比女性高，老年人比年輕人高，社會階層低的比社會階層高的高。台灣地區結核病死亡率由民國 36 年約每十萬人口 294.44 人逐年降低，並於民國 74 年結核病首度排除於十大死因之外，而於民國 86 年降為 7.48 人。台灣地區 20 歲以上成年人，在民國 77 年的 X 光診斷肺結核盛行率為 1.29%，民國 82 年所作 20 歲以上成人胸部 X 光診斷之肺結核盛行率為 0.65%，而世界衛生組織所訂結核病之控制標準為 0.14%。目前結核病的死亡率，大都維持在每十萬人口，7 人左右（1999 年為 6.88 人），仍然偏高，因而國人在肺結核之防治仍需努力。

一般而言，在盛行率低的已開發國家，如歐美各國，其結核病的發生大部分是內因性的 (endogenous)，即由舊的纖維化或鈣化病灶再活化而來，反之，在盛行率高的地區則由外在的感染而來。結核病之傳染媒介為空氣中的飛沫，當一個傳染性肺結核病人講話、唱歌、咳嗽、或打噴嚏時，含有結核菌的痰液，可在空氣中漂浮很久，經由呼吸道進入正常人的肺內造成感染。根據研究報告顯示，和一個開放性肺結核病人，親密接觸的家人，大約有 30% 的機率會受到感染，但

只有約 1.5% 會發病；對於一個受到感染的嬰幼兒而言，其一生當中會發生結核病的機率大約是 10%。通氣良好的環境可減少結核病的散佈，通氣不好的場所如監獄、安養院、避難所或 MTV、KTV 等容易造成結核菌的傳播。台灣人口密度高，都會區大樓林立，學校及辦公場所皆往立體空間發展，環境空氣品質不佳，容易造成交互感染。此外，近年來由於台灣國際化的發展，國人經常因商務或觀光出入國境，根據出入境管理局的統計資料，最近三年本國人出境之人數各為六百四十八萬(民國 86 年)、六百二十六萬(民國 87 年)及六百九十六萬(民國 88 年)，此數目若加上同時期之外人來台，每年大都兩百萬左右。此數目字合計每年台灣進出的人口在一千六百萬(上述數目和之兩倍)到一千八百萬，數目也相當驚人。在旅遊交通工具上，如空氣循環不佳的飛機，也常導致肺結核等流行病的傳染。這些因素或許能說明近幾年來台灣結核病死亡率無法再下降的原因。

目前肺結核的預防措施主要是施打卡介苗，其優點是沒有施打時間的限制，在出生時或以後的任何時間施打皆可以，且便宜、副作用小，並相當的穩定。但其缺點是留下疤痕。而一些研究，如美國疾病管制中心 (Centers for Disease Control)，世界衛生組織 (WHO) 及印度醫療研究機構 (The Indian Council for Medical Research) 等的合作計劃，於 1979 年發表經歷十年(1968-1978) 在印度所作大規模臨床試

驗之首次報告，顯示卡介苗之施疫於印度效果不顯著。雖然卡介苗的效果目前仍有爭論，但它對小孩子結核性腦膜炎及原發性病灶散播之預防效果卻是大家所公認。因而若能在製劑上之研究以改進目前卡介苗製劑缺點增進療效，不需注射給藥，避免在接種處留下疤痕，將能獲得大家之接受，得到更佳之結核病防治效果，這也是我們計畫研究之重點。

口服疫苗製劑已是目前疫苗發展的主要趨勢。然而疫苗通常為滅毒的活菌如 BCG 疫苗，或死菌如霍亂疫苗其性質類似蛋白質藥物，在腸胃道中容易受腸胃道之酵素或酸分解而失效，且因受腸胃道排空之影響，停留在腸胃道時間也短，不易產生免疫效果，而限制了口服疫苗製劑的發展。

疫苗經口服後，主要是在腸道區域產生免疫作用^{1,2}，特別是在 Gut-associated Lymphoid Tissues³⁻⁵，這是在腸道的大片淋巴組織，稱作皮耶氏板(Peyer's Patches, PP)，具有獨特的表皮組織，主要由 M-cells 所構成，一些抗原可經由表皮細胞所攝取。經由 M-cells 吞食的粒子，可能不被消化，而將完整的粒子被送到下面的淋巴組織，即黏液淋巴系統細胞，最後可促使腸道分泌 IgA 等產生免疫⁶。

卡介苗經注射給藥除了造成結痂留下不可磨滅之註記，且注射給藥方式僅能誘發 IgG 抗體，不能像口服直接給藥產生有效對抗感染之

免疫力⁷。此外，口服疫苗具有使用方便且可在 Peyer's patches 誘發黏膜免疫系統之優點，經由黏膜免疫系統同時誘發 IgG, IgM 及 IgA⁸⁻¹⁰，因而卡介苗疫苗很適合於開發為口服製劑。然而口服卡介苗，因是為活菌抗原易被胃酸及消化酵素破壞、疫苗抗原性差且不易存活，而無法產生預期的作用，因而如何增加口服效率、保護抗原、增強腸道黏膜局部免疫反應為重要發展方向。

一種理想的疫苗製劑通常包括下列七點¹¹：一、能口服，僅需一次用藥；二、好的耐受性；三、具有高度的免疫作用，刺激產生抗菌珠及抗毒素之抗體；四、良好的效果(>85% 保護效果)；五、很快產生保護作用(施藥後四週)；六、不昂貴；七、能製成一實用製劑。本研究乃參照上述原則進行疫苗製劑之研發。

口服疫苗要能產生其效果，須能夠達到下列三項目標¹²：(1) 疫苗在腸胃道能夠維持完整性，不受胃酸或腸液的破壞；(2) 疫苗能夠到達作用或吸收位置；(3) 疫苗能夠滯留而有持續作用之特性。

本計畫將進行口服卡介苗疫苗之製劑研發以新穎製劑技術開發卡介苗之新劑型¹³⁻¹⁶，增加療效降低副作用並增加施疫之方便性^{17,18}。由文獻資料證實，在埃及使用碳酸氫鈉緩衝溶液的疫苗製劑在傷寒預防保護可達 90%，而在智利使用腸溶衣膠囊製劑其效果是較一般膠囊製劑為佳，對學童傷寒保護可達 66%¹⁹。在體外 CaCo-2 細胞

吸收試驗中發現 dipotassium glycyrrhizinate, N-trimethyl chitosan chloride, pectin, chitosan glutamate, Pluronic P85 等材質可降低 transepithelial electrical resistance (TEER), 增加 transcellular 或 paracellular absorption, 可具有增加藥物口服效率之作用²⁰⁻²³。本計畫將製備腸溶衣微膠囊製劑, 內含 BCG 疫苗及上述佐劑。其目的是消極保護疫苗不受胃酸的破壞及積極增進疫苗於 Peyer's patches 誘發黏膜免疫系統之作用。

最近幾年由於生解性高分子(Biodegradable Polymers), 如: Polyesters, Polyamides, Polyorthoester and Polyanhydrides 的普遍使用, 也應用在藥物製劑之製備。其中最常用是 Polyesters, 包括 Polyglycolides 及 Polylactide。此類高分子聚合物具有良好的組織相容性, 無毒性, 由生物可降解材質 poly(lactic acid) (PLA)或 poly(lactide-co-glycolide) (PLG)等聚合物製成的微粒, 已廣泛應用於長效蛋白質或疫苗類藥物的輸藥系統設計²⁴⁻³⁸。PLG 及 PLA 化合物在 1970 年代即經過美國 FDA 核准作為吸收性縫合線。1980 年代被用作載體聚合物製備 LHRH 長效輸藥系統上市。在目前市面上以 PLG 微粒上市的產品有 Decapeptyl (Ipsen, Biotec), Lupron Depot (內含 LHRH)及 Parlodel(Sandoz,內含 bromocriptine)均為一個月的長效釋出劑型。此類可降解聚合物材料製成的 PLG 或 PLA 微粒, 具有良好的

生物相容性，在臨床上使用³⁹。這些聚合物材質可經由各種技術，如溶媒抽提或揮發法、相分離法、及噴霧乾燥法等來加以製備成微球。微球的物化性質，如：粒徑、孔隙度、表面特性等皆可能影響其產生抗體的作用。在此計劃中將製備生解性微球等疫苗載體。這些疫苗載體也將進一步在本計劃中研製成製劑作深入的研究。

研究中將採用 W/O/W 溶媒萃取揮發法^{35,36}，製備卡介苗口服疫苗微粒，在各處方中選用之 dipotassium glycyrrhizinate, N-trimethyl chitosan chloride, polysine, chitosan glutamate, Pluronic P85, Quillaja saponin, fatty acid 等作為表面修飾劑，以期增進卡介苗口服疫苗之口服效率。

在研究中將利用腸溶衣材質來保護疫苗製劑免受胃酸的破壞，劑型製備成膠囊或顆粒劑等製劑¹。而為減少腸液對疫苗的破壞，可考慮加入蛋白質分解酵素抑制劑。如使用表面活性劑，EDTA, Sodium deoxycholate, Sodium taurodeoxycholate, Sodium laurylsulfate 增加疫苗穿透性或療效^{1,40}。此外，由於食物及藥物在腸胃道停留時間一般少於 8 小時，而須延長其滯留時間，可在製劑中加入具黏膜附著性之材質，如：Carbopol, Hyaluronic acid, Hydroxyethylcellulose, Xanthan gum 等²；或是 Cholera toxin B 及 Ganglioside GM1 等，讓疫苗集中在腸

黏膜細胞⁴¹,使不至於受腸胃道蠕動排空的影響,乃能長時間滯留在腸道,以產生較佳的免疫作用。

製成之疫苗微粒、微平板採用介面電位儀、雷射粒徑分析儀、600倍光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡以測定表面電荷性質、粒徑、形態等物化性質。並依藥典試驗法,進行擬腸胃道安定性試驗,以測試製劑對酸鹼度及消化酵素破壞之對抗作用。

本研究之目的為探討影響卡介苗口服疫苗免疫效能之各種因子,經由製劑之研究增進卡介苗之口服效率、抗原保護作用、及增強免疫反應。建立卡介苗疫苗口服製劑之製備技術,不只可直接提供疫苗使用。此外,此項技術亦可應用在其他口服疫苗之製劑開發。

本實驗已進行第一年之實驗,所進行之實驗如下:1. 各式固體微粒之製備。2. 微粒佐劑之篩選及基本物化性質探討。3. 利用腸溶衣材質將疫苗製備成膠囊或顆粒劑等製劑。4. 進行體外溶出試驗,評估腸溶衣製劑的溶離特性。

材料與方法

建立無菌製劑實驗室

在此區域視為 class10000。設備有烘箱；高壓蒸氣滅菌鍋 (TM-321D, Tomin); 水平式層流罩 (class100 ; 炬安儀器有限公司); 垂直式層流罩 (class100 ; 炬安儀器有限公司), 並有自動包覆機 (Hicoater, Freund, 日本), 凍晶乾燥機 (Heto, DW 6-55.1, 丹麥), 作為本計畫之研究試驗場所。

目前已進行了四種卡介苗疫苗之製劑, 包括: 卡介苗顆粒製劑, 卡介苗 PLG 微球疫苗製劑, 卡介苗 PLA 微平板疫苗製劑及腸溶衣膠囊劑, 發展出實驗室小量疫苗製劑之製備方法。分別敘述如下:

卡介苗顆粒製劑

I. 配方

- a. 凍晶卡介苗 (BCG) (由血清疫苗中心供應)
- b. Lactose
- c. PVP K-30

本實驗工作於無菌室之層流罩下操作。操作員穿著無菌服、無菌手套, 按照無菌操作過程製備。(無菌室及層流罩在操作前二個小時開 UV 燈及送風)

II. 造粒過程：

先將 Lactose 和 BCG 卡介苗凍晶製品分別稱重。將 Lactose、12-Mesh 篩子與玻璃研鉢、研棒、培養皿、滴管及藥匙等器具洗淨擦乾後，全部置於烘箱中於 130 ± 2 滅菌，乾燥至少 2 小時。取新鮮已過濾之 Milli-Q 水，與 PVP K-30 製備成 5 % ~15% 水溶液，並經高壓滅菌。將 a. , b. 準備品置於無菌容器中。於無菌操作罩中，採幾何稀釋法混合，並經濕法製粒。再經乾燥得到顆粒劑。

卡介苗 PLG 微球疫苗製劑

I. 配方：

- a. 雞卵蛋白(OVA)適量加 Milli-Q 水 1 ml 混勻
- b. Poly(lactide-co-glycolide) (PLG)加二氯甲烷(DCM)
5 ml 溶解，製成 3~8 %
- c. PVP K-30 5 % ~15 % 之水溶液經高壓滅菌後放冷

將“a.”與“b.”混合，以均質機（先經高溫滅菌）均質 1.5 分鐘。將上述溶液加入“c.”中，以均質機再一次均質 2.5 分鐘。再經電磁攪拌過濾。經離心洗滌直到上清液澄清為止。收集微球再加入 BCG 之溶液，於低溫下放置，再經凍晶乾燥。

II. 造粒過程：

如同前面“卡介苗顆粒製劑”的製程，將 PLG 微球疫苗與 Lactose 經幾何稀釋法混合後，造粒。

卡介苗 PLA 微平板疫苗製劑

I. 配方：

- a. poly(lactic acid) (PLA)加入 Acetone 溶解
- b. 注射用水

在無菌罩下，將“a.”倒入燒杯中，以均質機均質，並將水加入。並以電磁攪拌，過夜揮發丙酮。再以”b.”水洗 PLA 微平板 3 次。將 BCG 溶液加入 PLA 平板中，於低溫下放置，溶液再經凍晶乾燥機乾燥。

II. 造粒過程：

如同前面之方法將 PLA 微平板疫苗與 Lactose 經幾何稀釋法混合後，造粒。

腸溶衣膠囊劑製備

將製備好之各種含卡介苗之顆粒與螢光素鈉混合(作為溶離之指標物)填充於 3 號膠囊，膠囊劑經腸溶衣包覆，製備法如下：腸溶衣之包覆是在 Freund Mini Hi-Coater 進行。腸溶衣材質 HPMCP 溶於

Methylene Chloride 及 Ethanol 混合液在包覆之過程於不同時間取樣。不同包覆之膠囊劑也進行溶離試驗。

溶離試驗

製備 0.1 N HCl 溶液(pH=1.20)及 2 M Na₃PO₄ 溶離液(pH=8.90)

試驗方法：籃網法，100 rpm，37℃，於 0.1N HCl 750 ml 經兩小時後，再加入 2 M Na₃PO₄ 250ml，調整 pH=6.80 試驗 45min。

檢品分析：於適當的時間取樣 1 ml，並加入同體積之溶媒液到溶離容器中。檢品加入 7 ml 硼酸緩衝液（由 0.2M H₃BO₃ 及 0.2 M KCl 混合液 125ml 及 0.2 M NaOH: 67 ml，加 Milli-Q 水至 500 ml 製備得到），混均。以螢光光度計在激發光 493 nm 及發射光 511 nm 測定螢光之強度，再由螢光強度推算出體外釋出之特性。

BCG 力價試驗

新鮮 PBS 溶液經用 PBS 錠劑（Phosphate Buffered Saline Tablets Sigma, St. Louis, MO）加以製備，再經高壓蒸汽滅菌器滅菌。取相當於含 BCG 1 mg 的各種檢品，置於試管內，加入 PBS 溶液 10 ml 混勻（vortex 10 sec，3 次），依等量稀釋，製備成濃度 2×10^{-5} 、 5×10^{-6}

mg/ml，取 0.1 ml BCG 之稀釋溶液，滴在 BBL 培養基（BBL™ Lowenstein-Jensen Medium Slant，Becton Dickinson Microbiology Cockeysville, MD）之斜面上端，每一檢品製備四支試管。經旋轉試管充分潤濕整個斜面，固定於試管架上（內具有彈簧），並將其斜面向上，調整水平。

將試管架放入塑膠袋中，並放入一杯水。將塑膠袋置於細菌培養箱中培養，設定溫度範圍為 36.8~37.2 。（二氧化碳培養箱。廠商：造鑫企業有限公司）於 24 小時將試管架反轉，斜面朝下，呈水平，開始作菌落培養，並於適當時間記錄菌落數。

結果

無菌製劑實驗室

利用原有的實驗室加以整修，裝置紫外線殺菌燈，及空氣過濾裝置，在此實驗室之區域內，可以達到一萬級之標準。同時裝置水平式層流罩及垂直式層流罩，在此設備操作範圍內，可以達到一百級之無菌製劑製造區域。此無菌操作區域，也利用落菌試驗評估後，確定可以達到無菌之要求。圖一是為無菌製劑實驗室，於垂直層流罩區域內，可以裝置各項研製設備，包括了自動包覆機及凍晶乾燥機，作為製劑之製備。

製劑之製備

使用了生物降解性聚合物,PLG 採用溶媒抽取揮發方法製備成微球，此微球之粒徑分佈 2~5 μm ，如圖二。微球之產率在 75 % ~90 %。此製得之微球利用吸附法，可將 BCG 吸附在微球之表面上，而得到以微球作為載體之疫苗製劑。

另外，使用了生物降解性聚合物 PLA，利用沉降方法，製備成微平板。此微平板長及寬。分別 10~15 μm 及 3~6 μm 之間（如圖三），經吸附法，可得到了微平板載體之疫苗製劑。

腸溶衣膠囊劑

利用了自動包覆機，將所得到的膠囊劑包覆腸溶衣材質。包覆時間也影響到腸溶衣的量。隨時間的增加，其包覆量亦增加，經 5、8、10、12 及 15 min 之包覆，其包覆量分別為 6.9、11.2、13.9、16.8 及 17.5 mg。經溶離試驗評估，前兩個小時於 pH 1.2 之 0.1 N HCl 溶液中，若包覆腸溶衣時間短於 10 min 將會在酸液中崩散，但在經 12 min 及 15 min 之包覆，則在酸液中不會崩散，但在中性溶液中則可迅速的釋出。如圖四所示的結果。

BCG 之力價

於製程期間取樣，所得半成品，經過 BCG 力價的測定。在測定中，並沒有發現其他雜菌的生長。其結果如表一所示。純的 BCG 在濃度 2×10^{-5} mg/ml 所得平均菌落數為 12.5，經換算成原來力價是每 mg 為 6.2×10^6 CFU，較原來所標示力價 (3×10^7 CFU/mg) 僅為其 20 % 之值。而在濃度 5×10^{-6} mg/ml 平均菌落數為 2.75，經換算成原來力價是每 mg 為 5.5×10^6 CFU，為原力價的 18 %。而在各種半成品於濃度 2×10^{-5} mg/ml 測定時，乾粉、濕粒和不同乾燥時間 20 和 60 min 之平均菌落數分別為 2.75、1、1.75、及 2。相當於加入力價的 22 %、8 %、14 % 及 16 %。

討論

本計畫是進行口服卡介苗製劑之開發，第一年已得到初步的結果。卡介苗是減毒之活菌，製劑的困難度相當高。在製程中必須考量相關的問題，如無菌製備技術、BCG 菌之存活率，和增進腸道產生免疫的功效。在一般口服製劑，並不須考量無菌的問題。然而 BCG 疫苗分析，力價之測定須考量受其他雜菌之影響。因而研製時，須在無菌製造區以無菌技術來製備，以確保不會有雜菌干擾力價分析之結果。故在本計畫中首要工作是建立無菌製劑實驗室。在 10000 級之清潔區藉由二座層流罩，提供了 100 級的無菌的操作區，經由落菌實驗，確定了操作區可以達到了無菌之要求。因而在開發製劑製程，經由力價之測定，並沒有雜菌干擾問題之產生。

BCG 疫苗是相當脆弱的活菌，在中華藥典的記載，需於 2 ~ 4 避光貯存，有效期限為 1 年。故在製備時必須考量此方面的特性。在最近的研究常採用微球作為口服疫苗的載體，疫苗通常是直接被包覆在微球裡面，然而此製備方法並不能應用在 BCG 疫苗。由於在包覆過程中，疫苗受到有機溶媒及惡劣環境等的摧殘導致死亡，而無法採用。故在研究中使用吸附法，讓 BCG 疫苗分佈在製備好的微球及微平板的表面，此項技術之採用，使得所研製口服疫苗的製劑能夠有較佳的存活率，在尚未製成顆粒時，可以具有 22 % 的存活率。而進一

步的製成腸溶衣包覆的膠囊劑，更能確保製劑在胃中不受到任何的傷害。

腸道免疫之產生，由於受到很多因素之影響，如腸道蠕動之排除，造成疫苗在腸道停留時間短；腸液含有各種分解酵素，對疫苗的破壞。這些可以經由選用適當的添加劑，在製劑中發揮效用，但尚需進一步的研究。

由於肺結核仍是目前死亡最多的傳染疾病，很多機構也積極進行此方面的研究。雖然受感染時病人大都可經由抗生素治療，但由於肺結核菌進入潛伏期後，症狀消失，病人不再用藥，造成疾病可能再後發及抗藥性菌種之產生⁴²。因而口服疫苗的開發將方便使用，只要能確立口服時能得到其功效，其發展的潛力是無限的。特別是 BCG 疫苗也是提供很好的模式疫苗，若能研製成功，也將能應用到其他的疫苗的開發。

結論

由本計畫第一年研究結果，採用生物降解聚合物可製備出 BCG 疫苗之微球及微平板載體。利用腸溶衣技術使疫苗製劑在胃液中不崩散。初步實驗結果顯示所研製製劑具有 8~22% 之活性，具有很好的發展潛能開發成口服疫苗製劑。

參考文獻

1. Lee VHL, Dodda-Kashi S, Grass GM, and Rubas W: Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery, *Peptide and Protein Drug Delivery* (VHL Lee ed.), Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 691~738.
2. Jordan D and Keynes GB: Gastroadhesives in Controlled Drug Delivery, *Bioadhesion-Possibilities and Future Trends* (R Gurny and HE Junginger, editors), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1990, pp. 165~176.
3. Johansen P, Gander B, Merkle H and Sesardic D: Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. *Trends in Biotechnology*. 18:203-211, 2000.
4. O'Hagan DT: The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *Journal of Anatomy*. 189:477-482, 1996.
5. Lebens M, and Holmgren J: Mucosal vaccine based on the use of cholera toxin B subunit as immunogen and antigen carrier. *Recomb. Vectors in Vaccine Development*. 82:215-227, 1994.

6. Bhagat HR, Dalal PS, and Nellore R: Oral Vaccination by Microspheres, *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines* (S Cohen and H Bernstein, editors), Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 381~399.
7. Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, and Marchal G: Immunogenicity and protective capacity of Mycobacterium bovis BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine*. 18:1186-95, 2000.
8. De SN and Chattejee DN: An experimental study of the mechanism of action of vibrio cholerae on the Intestinal mucosal membrane. *J Pathol Bact*, 66:559~562, 1953.
9. Dasgupta U, Guhathakurta I, and Das J: Excretion of cholera toxin from *Escherichia coli*: a potential oral vaccine for cholera. *Biochem Biophysical Res Communi*, 153: 967~972, 1988.
10. Chattaraj SC, Rathinavelu A, and Das SK: Biodegradable microparticles of influenza viral vaccine: comparison of the effects of routes of administration on the in vivo immune response in mice. *J Contl Rel*, 58: 223-32, 1999.
11. Khan MZI, Opdebeeck JP and Tucker IG: Immunopotential and delivery systems for antigens for single- step immunization: recent trends and progress. *Pharm Res*, 11: 2-11, 1994.

12. Levine MM and Kaper J B: Live Oral Vaccines Against Cholera: an Update. *Vaccine*, 11: 207~212, 1992.
13. Yeh MK, Coombes AGA, Jenkins PG, and Davis SS: A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J Contl Rel*, 33: 437-445, 1995.
14. Yeh MK, Jenkins PG, Davis SS, and Coombes AGA: Improving the delivery capacity of microparticle systems using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene glycol). *J Contl Rel*, 37: 1-9, 1995.
15. Yeh MK, Davis SS, and Coombes AGA: Improving delivery of proteins from microparticles using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. *Pharm Res*, 13: 1693-1698, 1996.
16. Coombes AGA, Yeh MK, Eavelle EC, and Davis SS: The control of protein release from poly(DL lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method. *J Contl Rel*, 52: 311-320 , 1998.
17. Jenkins PG, Coombes AGA, Yeh MK, Thomas NW, and Davis SS: Aspects of the design and delivery of microparticles for vaccine application. *J Drug Targeting*, 3: 79-81, 1995.

18. Coombes AG, Lavelle EC, Jenkins PG, and Davis SS: Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen. *Vaccine* 14: 1429-38, 1996.
19. Holmgren J, and Svennerholm AM: Bacterial enteric infections and vaccine development. *Gastroenterol. Clin North Am*, 21: 283-302, 1992.
20. Liu P, and Krishnan TR: Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. *J Pharm Pharmacol*, 51: 141-149, 1999.
21. Kotze AF, Thanou MM, Luebetaen HL, Verhoef JC, and Junginger HE: Chitosan for enhancer intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci*, 7: 145-151, 1999.
22. McClean S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z, and Brayden D: Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*, 6: 153-163, 1998.
23. Batrakova EV, Han HY, Miller DW, and Kabanov AV: Effect of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm Res*, 15: 1525-1532, 1998.

24. Baras B, Benoit M, Poulain-Godefroy O, Schacht A, Capron A, Gillard J, and Riveau G: Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine* 18: 1495-505, 2000.
25. Pecquet S, Leo E, Fritsche R, Pfeifer A, Couvreur P, and Fattal E: Oral tolerance elicited in mice by beta-lactoglobulin entrapped in biodegradable microspheres. *Vaccine* 18:1196-202, 2000.
26. Morris, W, Steinhoff MC and Russell PK: Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation", *Vaccine*, 12: 5-11, 1994.
27. Khang G, Cho JC, Lee JW, Rhee JM, and Lee HB: Preparation and characterization of Japanese encephalitis virus vaccine loaded poly(L-lactide-co-glycolide) microspheres for oral immunization. *Bio-Medical Materials & Engineering*. 9: 49-59, 1999.
28. Mi FL, Shyu SS, Chen CT, Schoung JY: Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials*. 20: 1603-12, 1999.
29. Schwendeman SP, Tobio M, Joworowicz M, Alonso MJ, and Langer R: New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. *Journal of Microencapsulation*. 15: 299-318, 1998.

30. Coombes AG, Tasker S, Lindblad M, Holmgren J, Hoste K, Toncheva V, Schacht E, Davies MC, Illum L, and Davis SS: Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surface attachment of hydrophilic species using the concept of poly(ethylene glycol) anchoring segments. *Biomaterials*. 18: 1153-61, 1997.
31. Khang G, Cho JC, Lee JW, Rhee JM, and Lee HB: Preparation and characterization of Japanese encephalitis virus vaccine loaded poly(L-lactide-co-glycolide) microspheres for oral immunization. *Bio-Medical Materials & Engineering*. 9: 49-59, 1999.
32. Venkataprasad N, Coombes AG, Singh M, Rohde M, Wilkinson K, Hudecz F, Davis SS, and Vordermeier HM: Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers. *Vaccine*. 17: 1814-1819, 1999.
33. Williams RO, and Liu J: Influence of processing and curing conditions on beads coated with an aqueous dispersion of cellulose acetate phthalate. *European J of Pharm. & Biopharm*. 49: 243-52, 2000.
34. Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, and Nastruzzi C: Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharmaceutical Development & Technology*. 5: 267-78, 2000.

35. Delgado A, Lavelle EC, Hartshorne M, and Davis SS: PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems. *Vaccine*. 17: 2927-2938, 1999.
36. Kim SY, Doh HJ, Jang MH, Ha YJ, Chung SI, and Park HJ: Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*. 4: 33-9, 1999.
37. Sanchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J, and Alonso MJ: Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Intl J of Pharm*. 185: 255-66, 1999.
38. Eavelle EC, Yeh MK, Coombes AGA, Davis SS: The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. *Vaccine*, 17: 512-29, 1999.
39. Tice TR and Tabibi SE: Parenteral Drug Delivery: Injectables, *Treatise on Controlled Drug Delivery* (A. Kyodenieus, ed.), Marcel Dekker, New York, 1992, p. 315.
40. Chiang CH, Shao CH, and Chen JL: Effects of pH, Electric Current, and Enzyme Inhibitors on Iontophoresis of Delta Sleep-Inducing Peptide. *Drug Dev Ind Pharm*, 24: 431-438, 1998.

41. Lian T and Ho JY: Cholera toxin B-mediated targeting of lipid vesicles containing ganglioside GM1 to mucosal epithelial cells. *Pharm. Res*, 1997 14: 1309-1315.

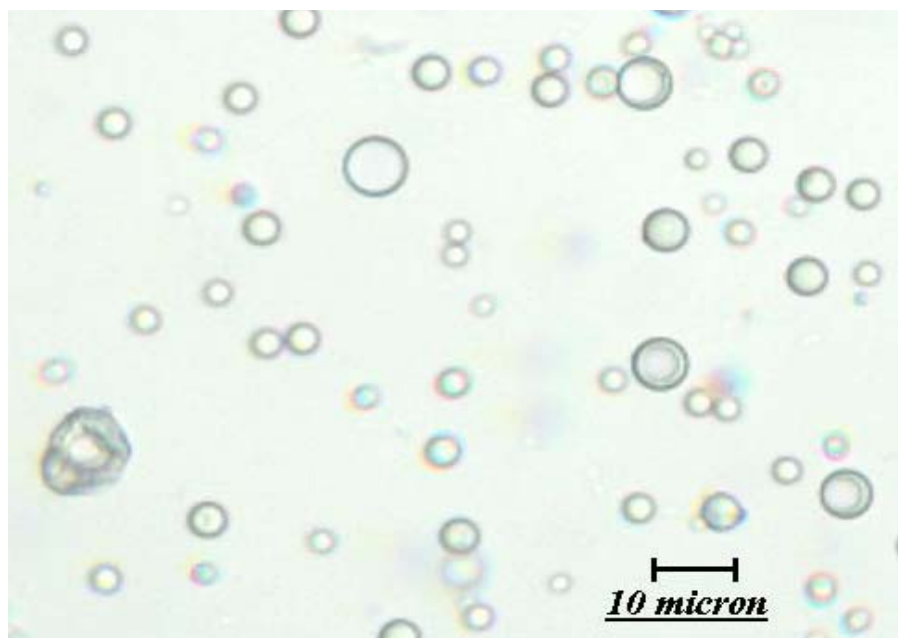
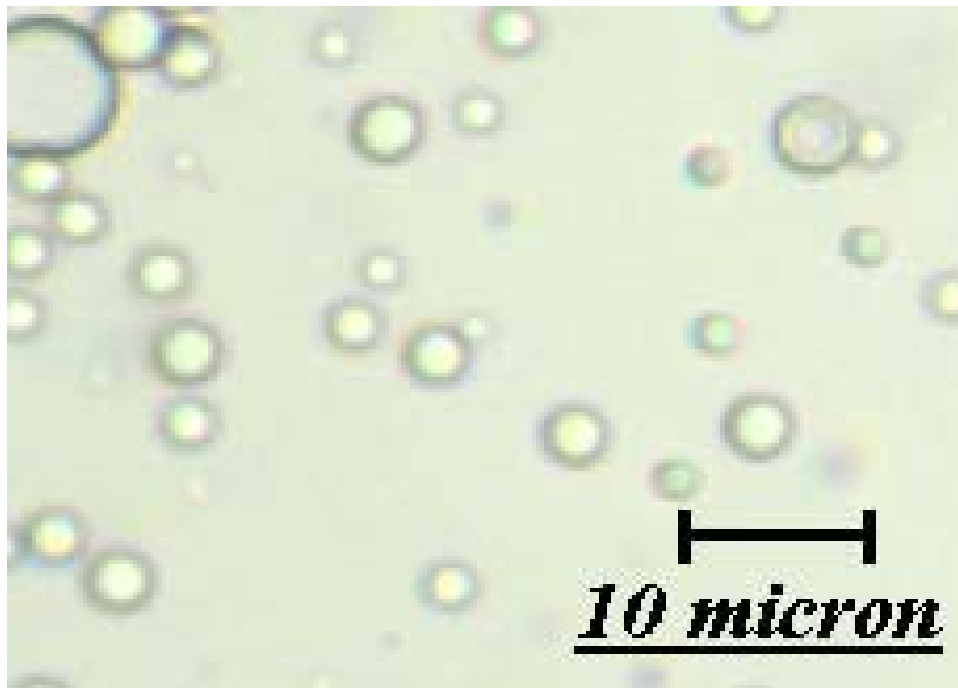
42. Enserink M: Driving a stake into resurgent TB. *Science* 2001; 293:234-235.

表一 BCG 疫苗製劑製程中半成品製劑之力價

濃度	試管	純 BCG	乾粉	濕粒	乾燥 20 min	乾燥 60 min
2×10^{-5} mg/ml	1	15	3	1	2	3
	2	13	1	1	1	1
	3	5	3	0	2	2
	4	17	4	2	2	2
5×10^{-6} mg/ml	1	1	1	0	0	0
	2	3	0	0	0	0
	3	5	2	1	0	0
	4	2	0	1	1	0



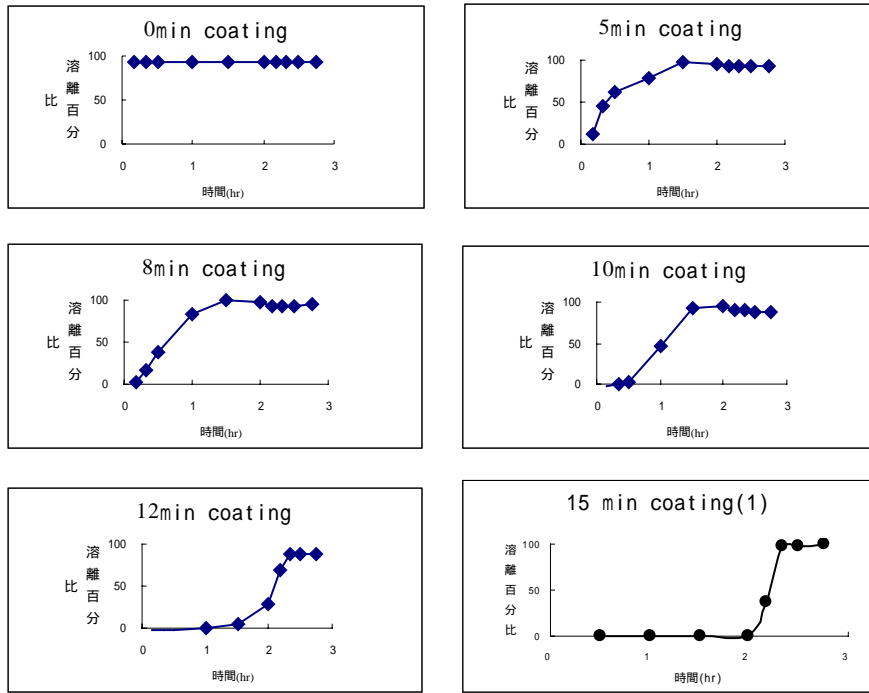
圖一 無菌操作區(Freund Hi-Coater 及凍晶乾燥機設備)



圖二 BCG PLG 微球



圖三 BCG PLA 微平板



圖四 由不同包覆時間製得之腸溶衣膠囊劑之釋出特性。前 2 個小時在 pH 1.2 之溶離液，其後以磷酸鈉調整 pH 為 6.8。

年度計畫著作一覽表

計畫名稱：口服卡介苗製劑之開發

主持人：江樵熹 計畫編號：DOH90-DC-1008

列出貴計畫於本年度中所有計畫產出於下表，包含已發表或已被接受發表之文獻、已取得或被接受之專利、擬投稿之手稿 (manuscript) 以及專著等。「計畫產出名稱」欄位請依「臺灣醫誌」參考文獻方式撰寫；「產出形式」欄位則填寫該產出為期刊、專利、手稿或專著等，舉例如下：

序號	計畫產出名稱	產出形式	SCI*
1	Chiao CH, Yeh MK, Chen JL:Product Development of Oral BCG Vaccine.	報告	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

* SCI: Science Citation Index，若發表之期刊為 SCI 所包含者，請打「√」。

年度計畫重要研究成果

計畫名稱：口服卡介苗製劑之開發

主持人：江樵熹 計畫編號：DOH90-DC-1008

1.計畫之新發現或新發明

研製出具有活性的 BCG 疫苗製劑經由口服使用，以開發出口
福疫苗製劑

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

未來口服疫苗製劑，使用方便，能夠在廣大的民眾使用，不需
要醫護人員打針施疫，降低疾病的發生。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

口服疫苗製劑是順應時代潮流的製劑，能夠節省醫療費用，因
而在醫藥衛生執行亦能增加經費在此方面的研究及開發。

年度科技計畫重要研究成果產出統計表

計畫名稱：口服卡介苗製劑之開發

主持人：江樵熹

計畫編號：DOH90-DC-1008

(係指執行當年度計畫之所有研究產出成果)

科技論文篇數			技術移轉			技術報告 1 篇		
發表地點 類 型	國內	國外	類 型	經 費	項數	技術創新 項		
期 刊 論 文	篇	篇	技 術 輸 入	千元	項	技術服務 項		
研 討 會 論 文	篇	篇	技 術 輸 出	千元	項	專 利 權 (核 准)	國 內	項
							國 外	項
專 著	篇	篇	技 術 擴 散	千元	項	著 作 權 (核 准)	國 內	項
							國 外	項

[註]：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部分一般包括引言、方法、結果及討論，並且一定有參考文獻部分，未在學術性期刊上刊登之文章（研究報告等）與博士或碩士論文，則不包括在內。

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者。

專著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品。

技術報告：指因從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告並未公開發表者。

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術移轉包括下列三類：
一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散。

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者。

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力的應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方式包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種。

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉（政府移轉民間）。

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者。

參與九十年度計畫研究人力之職級分析表

計畫名稱： _____ 口服卡介苗製劑之開發 _____

主持人： _____ 江樵熹 _____ 計畫編號： DOH90-DC-1008

職級	所含職級類別	參與人次
第一級	研究員、教授、主治醫師	1 人
第二級	副研究員、副教授、總醫師	1 人
第三級	助理研究員、講師、住院醫師	1 人
第四級	研究助理、助教、實習醫師	1 人
第五級	技術人員	人
第六級	支援人員	人
合 計		4 人

(註)

第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。

第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者。

第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士或學士滿三年以上之研究經驗者。

第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初（國）中、高中（職）、大專以上畢業者或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、祕書、事務人員及維修、電機人員等。

參與九十年度計畫研究人力之學歷分析表

計畫名稱：_____ 口服卡介苗製劑之開發 _____

主持人：_____ 江樵熹 _____ 計畫編號：DOH90-DC-1008 _____

類別	學歷別	參與人次
1	博 士	2 人
2	碩 士	1 人
3	學 士	1 人
4	專 科	人
5	博士班研究生	人
6	碩士班研究生	人
7	其 他	人
合 計		4 人