

計畫編號：DOH91-DC-1042

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

口服卡介苗製劑之開發

計畫名稱

研究報告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：江樵熹

研究人員：葉明功、陳錦龍、游嘉佳

執行期間：91年1月1日至91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 *

正文目錄

頁碼

摘要

1. 中文摘要

-----1

2. 英文摘要

-----3

主文

1. 前言

-----5

2. 材料與方法

-----12

3. 結果

-----16

4. 討論

-----18

5. 結論

-----21

6. 參考文獻

-----22

圖目錄

圖一、吸附 BCG

疫苗之 PLG 微粒。-----30

圖二、兩種溫度下含或不含 10% sodium dodecyl sulfate
及 0.1N NaOH 對 BCA 反應之影響。-----31

圖三、不同溫度下時間對 BCA 反應之影響。-----31

圖四、兩種溫度下 BCG 膠囊劑力價之經時變化。-----32

表目錄

表一、BCG 疫苗製劑配方中賦型劑及佐劑組成物。-----33

表二、不同配方之 BCG 疫苗之效價
(與純 BCG 菌結果之比較)。-----33

表三、膠囊殼經不同濃度 Glutaraldehyde 預處理後，
填充乳糖後再經腸衣材質彌縫膠囊體及帽之接縫處
之崩散試驗結果。-----34

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所含成分之影響，並評估配方因子對於疫苗製劑效價之改變，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，並開發評估疫苗療效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 poly (lactide-co-glycolide) (PLG) 聚合物製成 PLG 微粒，作為疫苗載體。並建立 BCA (bicinchonic acid) 分析蛋白質方法應用於卡介苗疫苗濃度之測定，顯示所建立之分析方法能用於測定 BCG 之濃度，於 150~1000 $\mu\text{g/ml}$ 具有良好的線性關係。製備好之含疫苗載體再製成膠囊劑等製劑以方便口服使用。在製劑配方中，其中所用之成分如碳酸化合物、鎂化合物、鋁化合物等，作為賦型劑皆會影響到 BCG 菌之效價，故選擇適當成分也相當重要。在研究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。在初步的動物實驗結果顯

示，製劑在 3~4 小時左右會在兔子的胃中崩散，但在 2 小時內，則可防止崩散。而在製備環境考量溫度之影響，顯示在較低溫的溫度，BCG 疫苗有較佳之力價。

總結本實驗第二年之結果，利用適當的賦型劑將 BCG 疫苗製成具實用之腸溶衣膠囊劑，在低溫下製備及儲存，則 BCG 疫苗在製劑中儲存 1 個月仍能存活，可維持 18% 的 BCG 活菌數，顯示口服卡介苗製劑具有很好的開發潛能，而此研究技術亦能應用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、腸溶衣製劑

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 had been investigated to evaluate the physicochemical properties of developed preparations. Oral vaccine delivery systems were prepared, and the release characteristics were determined by *in vitro* dissolution method. In the second year, formulation factors potentially affecting vaccine delivery systems were 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 used a biodegradable copolymer, poly(lactide-co-glycolide) (PLG), to prepare PLG microparticles as carriers for adsorbing BCG vaccine. In addition, we established a BCA (bicinchonnic acid) analytical method for determining the concentration of BCG vaccine. A calibration curve was constructed with good linearity ranged from 150 to 1000 µg/ml. Carriers with vaccine could be further prepared as granules and capsules for convenience in oral administration. Excipients and adjuvants including: carbonates, magnesium and aluminum compounds were incorporated in the preparation to assess their effects on the potency of BCG vaccine. Capsules with enteric coating were prepared to prevent the digest of active vaccine in gastric fluid. Preparations were 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. In the preliminary study, we found that the prepared enteric capsules disintegrate about 3~4 hrs in the stomach of rabbit, but remain intact at 2 hrs. Furthermore, we also investigated the temperature effect of preparing environment; the preparations of BCG vaccine had better potencies at lower temperature.

Overall the results of 2 years, we used suitable excipients to prepare BCG vaccine as a suitable enteric capsule, which were prepared and stored under low temperature. The prepared enteric capsules could maintain their activity at 18% for 1 month storage. Thus, BCG vaccine is potentially developed as an oral delivery system in the study. Another, the established preparing method 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%，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）。而在民國 89 年國人男性結核病死亡率更列入十大死亡原因，每十萬人男生人口，10.7 人，而世界衛生組織所訂結核病之控制標準為 0.14%，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，如以 86~88 年為例，這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 Polyamides 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

微粒上市的产品有 Decapeptyl (Ipsen, Biotec), Lupron Depot (内含 LHRH)及 Parlodel(Sandoz,内含 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，在各處方中選用修飾劑，如 Ovalbumin，以製備具有表面皺縮之微粒，以增加微粒之表面積能夠吸附較多量之 BCG 疫苗，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，製備成膠囊等製劑方便口服¹。而為減少腸液對疫苗的破壞，可考慮適當之賦型劑或佐劑。如使用表面活性劑、鋁化合物、鎂化合物、碳酸化合物等增加疫苗療效^{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。

本研究已進行第二年之實驗,所進行之實驗如下:1.進行具有良好吸附疫苗微粒之製備。2.評估製劑中佐劑成分對BCG力價之影響。3.腸溶衣製劑在腸胃道之特性。4.建立BCA蛋白質測定法分析BCG疫苗濃度。5.建立溫度對BCG力價之影響。

材料與方法

無菌製劑室

為了確保研製之 BCG 疫苗製劑免受其他微生物之污染，所作之實驗，皆盡可能在無菌區進行，在此區域視為 class 10000。設備有烘箱；高壓蒸氣滅菌鍋 (TM-321D, Tomin)；水平式層流罩 (class 100；炬安儀器有限公司)；垂直式層流罩 (class 100；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)，作為研究試驗場所。

卡介苗疫苗之製劑研製

目前已進行了三種卡介苗疫苗之製劑，包括：卡介苗顆粒製劑、卡介苗 PLG 微粒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。這些製備法在第一年之報告中已有敘述，不再介紹。本年度我們對 PLG 微粒製備法有更加深入的研究，希望獲得更佳的製劑。

、卡介苗 PLG 微粒疫苗製劑

1. 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% 含鹽類及滲壓物質

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。收集微粒再加入 BCG 之溶液，於低溫下放置，再經凍晶乾燥。

、造粒過程：

在無菌室中，依無菌操作過程，將 PLG 微粒疫苗與 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各種佐劑包括了：鋁化合物、鎂化合物及碳酸化合物混合填充於 4 號膠囊，此膠囊可先經腸溶衣處理，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依藥典方法進行崩散試驗，以確定在酸液中不會崩散。另外，膠囊殼可先經 Glutaraldehyde 處理成為具腸溶衣特性之材質，再經填充作為膠囊劑。

崩散試驗

製備擬胃液 (pH=1.20) : 1000 ml 0.1 N HCl 溶液及擬腸液 (pH=6.80±0.05) : 750 ml 0.1 N HCl 溶液加入 250 ml 0.2 M Na₃PO₄ 溶液 , 調整 pH=6.80±0.05。

試驗方法 :

以崩散試驗機(Disintegration tester, SK-30201,新光精機工業股份有限公司)做崩散試驗於 37 °C , 1000 ml 擬胃液試驗兩小時後 , 再經 1000 ml 擬腸液試驗 45min。

腸溶衣製劑在動物之初步試驗

紐西蘭大白兔 , 經以 Ketamine 和 Xylazine 肌肉注射 , 輕微麻醉後餵食膠囊劑 , 再於預定時間 2、3、4 小時用過量的 Pentobarbital 經耳邊緣靜脈注射 , 犧牲兔子。再經解剖 , 取下胃、腸 , 觀察所餵食膠囊之外觀。

BCA 蛋白質分析法測定 BCG 疫苗濃度

應用 BCA 蛋白質分析法⁴³ , 並加以調整 , 將 BCG 疫苗濃度配製成 150~1000 µg/ml , 加入 (或不加) sodium dodecyl sulfate 及 0.1N NaOH , 並改變反應時的溫度等因子 , 經由測定吸光度 , 並由吸光度校正空白之值 , 與 BCG 疫苗濃度做線性回歸 , 以得到校正曲線。

溫度及儲存時間對 BCG 力價之影響

BCG 疫苗製劑於三種不同溫度 30、22、5 °C 下操作，混合乳糖，再裝填於腸溶衣膠囊，經放置於 5 °C 及 -20 °C 下儲存，於不同時間取膠囊測定 BCG 之力價，評估溫度及時間對力價之影響。

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} 、 1×10^{-5} 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，每一檢品製備三支試管。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 °C。(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

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粒,我們利用鹽類及滲壓劑等不同濃度等,也可以得到表面具有空洞及皺縮特性之微粒。此微粒之粒徑分佈 1~20 μm ,如圖一。微粒之產率在 75% 以上。此製得之微粒,因具有較大之表面積,可將 BCG 吸附在微粒之表面上,而得到高載量之疫苗製劑。

腸溶衣膠囊劑

利用自動包覆機,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。這在我們第一年的報告中已有所介紹。

BCA 蛋白質分析法測定 BCG 疫苗濃度

在不同溫度及時間測定，所測定結果如圖二及圖三所示。圖二之結果顯示在濃度範圍 150~1000 $\mu\text{g/ml}$ ，具有良好的線性關係。在較高溫度（45 $^{\circ}\text{C}$ ）及含有 SDS 時有較佳之反應。分析的變異係數為 0~3.37%，準確度為-2.4~2.6%。圖三則顯示在不同溫度時，較高之溫度反應在較短之時間即能達到穩定之吸光度，但通常在 30 分鐘後各種溫度皆能達到一致之吸光度值。

BCG 之力價

BCG 之製劑中含賦型劑或佐劑會影響 BCG 之力價，其結果如表一及表二所示。顯示鋁化合物存在對 BCG 之力價影響最小。另外，在我們實驗發現，膠囊劑若先裝了 BCG 疫苗後，再進行腸溶衣包覆，此過程也影響到 BCG 之力價。故膠囊劑之腸溶衣特性要在填充 BCG 疫苗之前就要完成。表三是膠囊殼使用不同濃度 Glutaraldehyde 處理後應用於製備膠囊劑之腸溶衣性質。BCG 力價試驗中，皆用純的 BCG 在濃度 2×10^{-5} mg/ml 或 1×10^{-5} mg/ml 時作為對照實驗。各種製劑檢品將由培養出的菌落數除以純的 BCG 之值，換算成百分率。圖四是兩種儲存溫度下，5 $^{\circ}\text{C}$ 及 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，BCG 膠囊劑力價之經時變化。顯示在 1 個月後之儲存仍有 18% 之 BCG 疫苗存活。

討論

本計畫是進行口服卡介苗製劑之開發，在第二年之研究已得到一些結果。溫度及儲存時間對於 BCG 力價有顯著影響。在製備時操作溫度愈低，其結果愈佳。而儲存時間於 -20℃，在目前的結果顯示在 1 個月後，仍然可維持具實用價值之效價。

腸溶衣製劑在動物之初步試驗：紐西蘭大白兔經餵食腸溶衣之膠囊後，於 2、3、4 小時犧牲兔子，觀察之結果顯示 2 小時在胃中大致維持原來的形狀，但在 3、4 小時則膠囊已經破裂。這和體外所進行之實驗也相當吻合。此實驗使用 4 號膠囊，可能一直滯留在胃中，無法排空到腸道，同時受到胃之蠕動，而導致膠囊破裂。

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，並不需考量無菌的問題。然而 BCG 疫苗分析，力價之測定須防止其他雜菌之影響。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。故在本計畫之第一年中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。在我們的研究過程中，發現製備環境之溫度，對於 BCG 疫苗之力價有很大的影響。於水平或垂直層流罩中，由於機器之運轉溫度較週遭環境高，約在 30 ，故需額外之空調機降低溫度，但溫度只能到 22 ，故要更低的溫度，則需於冷房中進行。在最近的研究常採用微粒作為口服疫苗的載體，疫苗通常是直接被包覆在微粒裡面⁴⁴，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 疫苗分佈在製備好具有相當大表面積的微粒的表面，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。

在加入賦型劑或佐劑於 BCG 疫苗中，顯示適當的佐劑如鋁化合物具有很好的保護效果，因而如何選用這類材質也相當的重要。

BCA 蛋白質分析法測定 BCG 疫苗濃度，在我們所做實驗結果顯示分析方法簡便，可用於 BCG 疫苗製劑開發之快速篩檢，如此可有效節省力價方法需耗時 3 週以上之測定時間。

在初步的安定性測定結果，所製備之膠囊劑在適當的溫度儲存下，具有適當的安定性，如 - 20 之環境溫度下，其力價在 1 個月之

後仍然具有實用之價值。

由於肺結核仍是目前死亡最多的傳染疾病，全球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，造成疾病可能再復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

由本計畫二年來研究結果，採用生物降解聚合物可製備出 BCG 疫苗之微粒製劑。利用腸溶衣技術使疫苗製劑在模擬胃液中能保有其適當力價。而初步安定性試驗結果顯示儲存之溫度相當重要，若能考量這些因子也將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. Vactor`s 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.

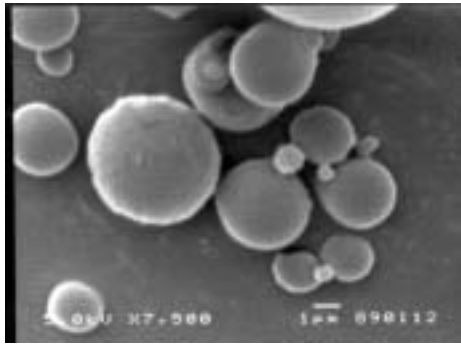
24. Baras B, Benoit M, Poulain-Godefroy O, Schacht A, Capron A, Gillard J, and Riveau G: Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine* 18: 1495-505, 2000.
25. Pecquet S, Leo E, Fritsche R, Pfeifer A, Couvreur 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. Jung T, Koneberg R, Hungerer K-D, and Kissel T: Tetanus toxoid microspheres consisting of biodegradable poly(lactide-co-glycolide)- and ABA-tirblock-copolymers: immune response in mice. *Int. J. Pharm.* 234: 75-90, 2002.
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.

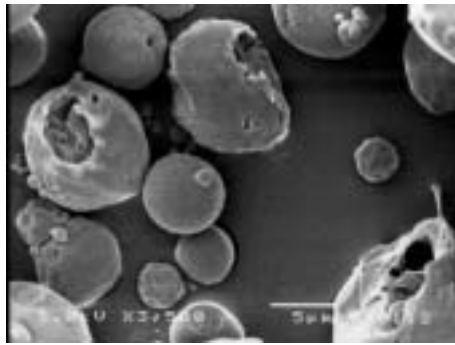
35. Delgado A, Lavelle EC, Hartshorne M, and Davis SS: PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems. *Vaccine*. 17: 2927-2938, 1999.
36. Kim SY, Doh HJ, Jang MH, Ha YJ, Chung SI, and Park HJ: Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D, 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, and 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.
43. Chen JL, Chiang CH, and Yeh MK: The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*, 19: 333-346, 2002.
44. Yeh MK, Liu YT, Chen JL, and Chiang CH: Oral immunogenicity of the inactivated *Vibrio cholerae* whole-cell vaccine encapsulated in biodegradable microparticles. *J. Controlled Release*, 82: 237-247, 2002.

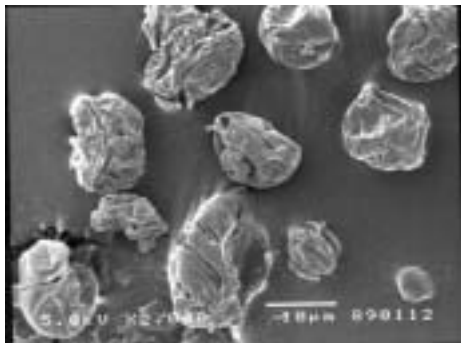
(A)



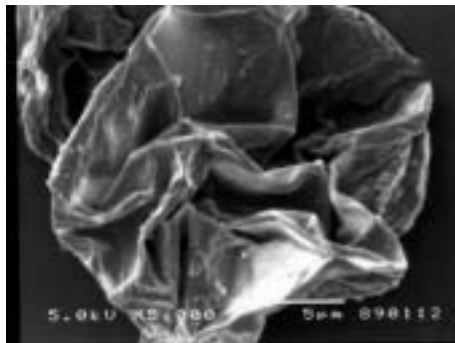
(B)



(C)

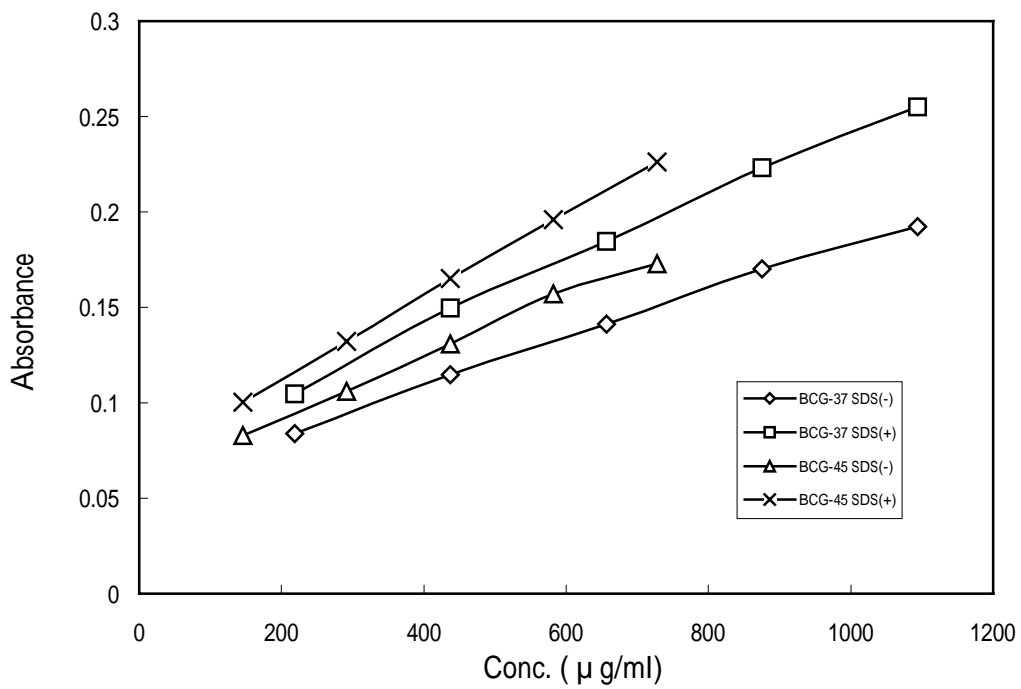


(D)

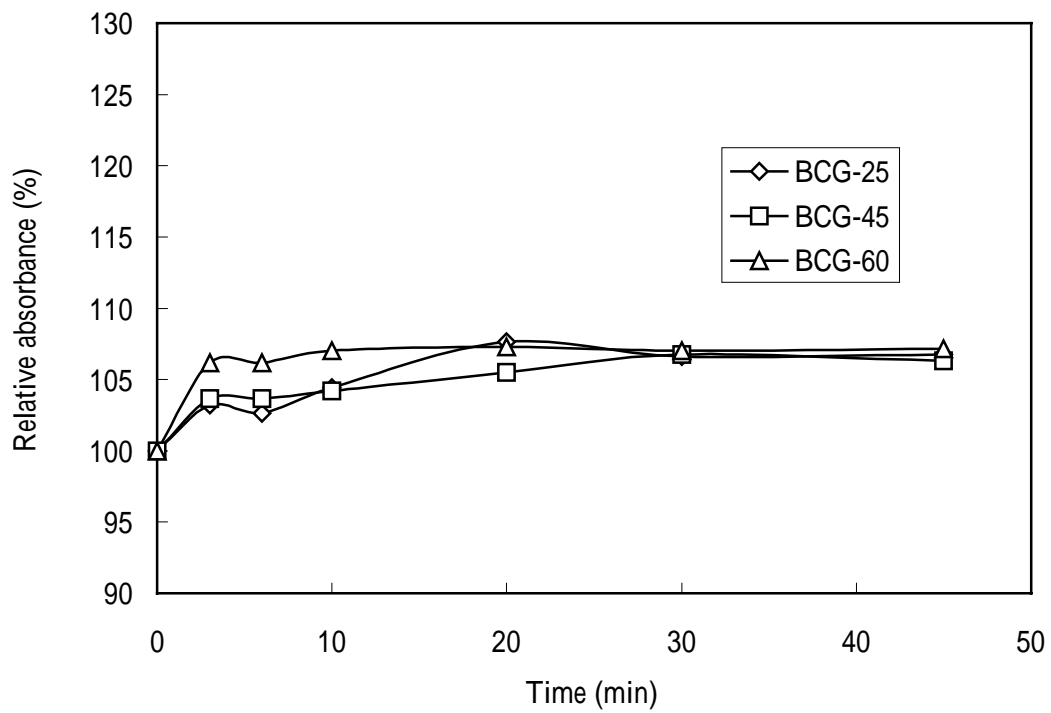


圖一、吸附 BCG 疫苗之 PLG 微粒。

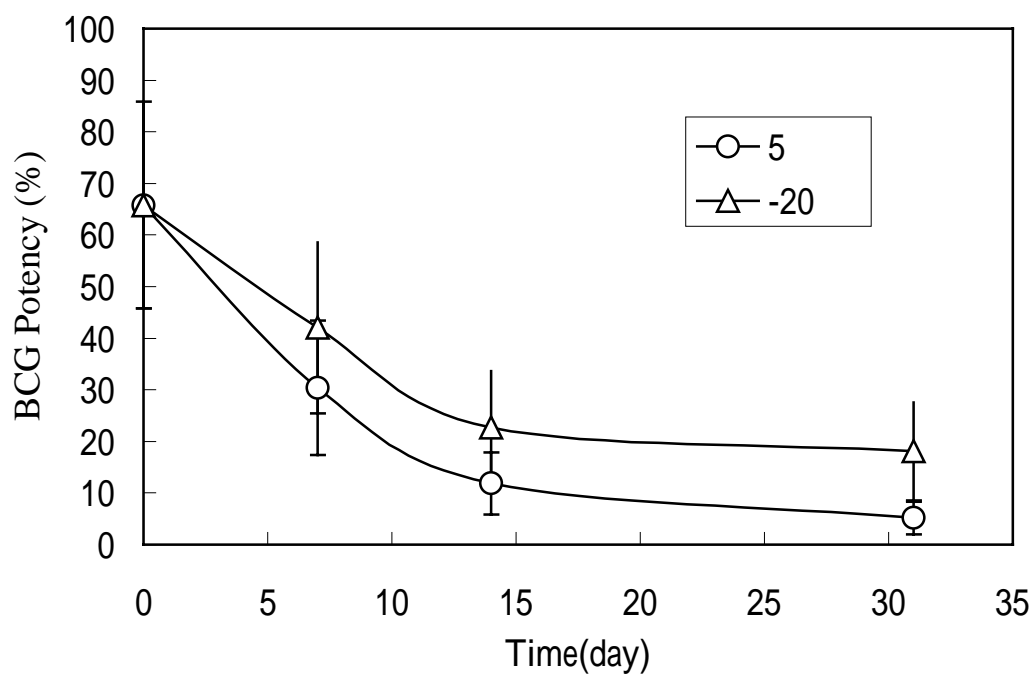
(A) 不含鹽類及滲壓物質；(B)、(C) 及 (D) 分別含 0%、3%、5% 鹽類，並以滲壓物質調整滲透壓至 1240 mOsm/kg。



圖二、兩種溫度下含或不含 10% sodium dodecyl sulfate 及 0.1N NaOH 對 BCA 反應之影響。



圖三、不同溫度下時間對 BCA 反應之影響。



圖四、兩種溫度下 BCG 膠囊劑力價之經時變化。

表一、BCG 疫苗製劑配方中賦型劑及佐劑組成物

配方	乳糖 (%)	鋁化合物 (%)	鎂化合物 (%)	碳酸化合物 (%)
	100	0	0	0
a	50	50	0	0
b	75	25	0	0
a	50	0	50	0
b	75	0	25	0
a	50	0	0	50
b	75	0	0	25

表二、不同配方之 BCG 疫苗之效價 (與純 BCG 菌結果之比較)
BCG 疫苗製劑製備時環境溫度為 22 。

BCG 濃度 (mg/ml)	pure BCG (%)	配方 a (%)	配方 b (%)	配方 a (%)	配方 b (%)	配方 a (%)	配方 b (%)
2×10^{-5}	100± 19.42	54.77± 5.29	93.97± 5.29	9.05± 2.61	10.55± 1.51	18.09± 6.57	87.44± 3.99
1×10^{-5}	100± 30.70	103.49± 24.50	123.26± 2.01	12.79± 2.01	9.30± 8.78	24.42± 13.95	110.47± 16.49

表三、膠囊殼經不同濃度 Glutaraldehyde 預處理後，填充乳糖後再經腸衣材質彌縫膠囊體及帽之接縫處之崩散試驗結果。

Glutaraldehyde %(w/w)		處理時間 /溫度 35 (hrs)	崩散試驗 /0.1N HCl 2hrs	崩散試驗 /擬腸液 pH 6.8±0.05 45mins
A*	1%	24	10min 破裂	-
		48	10min 破裂	-
		120	些微破裂，粉末成糊狀	-
	2.5%	24	10min 破裂	-
		48	10min 破裂	-
		120	些微破裂，粉末成糊狀	-
	5%	7	些微破裂，粉末成糊狀	-
		15	些微破裂，粉末成糊狀	-
		24	些微破裂，粉末成糊狀	-
	10%	7	些微破裂，粉末成糊狀	-
		15	些微破裂，粉末成糊狀	-
		24	些微破裂，粉末成糊狀	-
B*	5%	7	未破裂(完整)	35min 破裂
	10%	7	未破裂(完整)	些微破裂，粉末成糊狀

* A 是經 Glutaraldehyde 處理後，未經腸衣材質之包覆，而 B 則經 Glutaraldehyde 處理後，再經腸衣材質之包覆。