

聚乙二醇修饰的脂质体四价流感疫苗稳定性

刘晓琳,杨艾,张茜,李漂,鲁卫东

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室,昆明 650500)

[摘要] **目的:**通过影响因素实验、加速实验考察聚乙二醇(PEG)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉的物理和生物稳定性,并预测其有效期。**方法:**(40±2)℃下进行高温影响因素实验,4℃,(25±2)℃下进行加速实验。以外观性状、粒径、包封率、稳定系数作为物理稳定性评价指标;采用脾淋巴细胞增殖实验和血凝抑制实验以刺激指数(SI)和免后与免前抗体滴度比(HI)作为指标考察生物稳定性。采用经典恒温法,利用Arrhenius公式计算有效期。**结果:**影响因素实验:PEG2000(3000/6000)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉于(40±2)℃下放置20d,粒径和稳定系数逐渐增大,包封率逐渐下降;放置10d时,各PEG组SI值比原液组大,与原液组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);各PEG组免后与免前抗体滴度比均 > 4 ;放置20d时,各PEG组SI值比原液组小,与原液组比较有显著性差异($P < 0.05$);且各PEG组免后与免前抗体滴度比均 < 4 。加速实验:3批PEG6000修饰的脂质体流感疫苗冻干粉在4℃和(25±2)℃下放置3个月,4℃下粒径、包封率、稳定系数基本不变,(25±2)℃下粒径和稳定系数增大,包封率下降;4℃下PEG6000组SI值与原液组比较有显著性差异($P < 0.05$);(25±2)℃下PEG6000组SI值与原液组比较均无显著性差异;4℃和(25±2)℃PEG6000组免后与免前抗体滴度比均 ≥ 4 。有效期预测:25℃,30℃,35℃,40℃的降解速率常数(K)分别为 1.039×10^{-3} , 2.649×10^{-3} , 3.574×10^{-3} , $4.868 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$,lnK对1/T进行线性回归,回归方程为: $\ln K = 20.195 - 8148.5/T$ ($r = 0.9179$)。**结论:**PEG修饰的脂质体流感疫苗冻干粉在(40±2)℃下放置10d,PEG6000修饰的脂质体流感疫苗冻干粉在4℃和(25±2)℃下放置3个月都具有良好稳定性;通过推算PEG6000修饰的脂质体流感疫苗在4℃,25℃,37℃下分别大约能储存2.2年、3.3月、24d。

[关键词] 流感疫苗;脂质体;聚乙二醇;稳定性

[中图分类号] R943.42;R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)08-0793-06

Study on stability of lyophilized preparation of PEG-modified influenza vaccine liposomes

LIU Xiao-lin, YANG Ai, ZHANG Qian, LI Piao, LU Wei-dong

(School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the physical and biological stability of PEG-modified liposome influenza vaccine lyophilized powder by influencing factor experiment and accelerated experiment and predict the validity period. **Methods:**High temperature influencing factor test was carried out at (40±2)℃, and accelerated test was carried out at 4℃ and (25±2)℃. Physical stability was evaluated by appearance, particle size, encapsulation rate and stability coefficient. Spleen lymphocyte proliferation test and hemagglutination inhibition test were used to evaluate the biological stability, in which the stimulation index (SI) and antibody titer ratio (HI) were used as indexes. The validity period was calculated by using the classical constant temperature method and Arrhenius formula. **Results:**In the influencing factor experiment, the particle size and stability coefficient increased and the encapsulation rate decreased gradually after placing PEG2000 (3000/6000)-modified liposome influenza vaccine

[基金项目] 云南省生物医药重大科研专项基金资助项目(2018ZF006)

[作者简介] 刘晓琳,女,硕士研究生,主要从事颗粒型疫苗佐剂研究。E-mail:1418961283@qq.com。

[通讯作者] 鲁卫东,女,硕士,教授,主要从事颗粒型疫苗佐剂研究。E-mail:13064244163@163.com。

freeze-dried powder at $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 20 days. On the 10th day, the SI value of each PEG group was significantly bigger than that of the original solution group ($P < 0.05$). The titer ratio of antibody before and after immunization was >4 for all PEG groups; on the 20th day, the SI value of each PEG group was significantly smaller than that of the original solution group ($P < 0.05$); the antibody titer ratio of each PEG group after and before immunization was less than 4. In the accelerated experiment, three batches of PEG6000-modified liposome influenza vaccine lyophilized powder were placed at 4°C and $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 3 months, the sample was stable at 4°C with minor changing in particle size, encapsulation rate and stability coefficient, while at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ the particle size and stability coefficient gradually increased, the encapsulation rate gradually decreased. There was significant difference in SI value between PEG6000 group and stock solution group under 4°C storage condition ($P < 0.05$), and no significant difference under $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ storage condition. For PEG6000 group, the ratio of antibody titer after and before immunization were ≥ 4 under both storage condition of 4°C and $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. For the validity period prediction, the values of decomposition velocity constants K at 25°C , 30°C , 35°C and 40°C were 1.039×10^{-3} , 2.649×10^{-3} , 3.574×10^{-3} , and $4.868 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectively. The regression equation of $\ln K$ to $1/T$ was as following: $\ln K = 20.195 - 8148.5/T$ ($r = 0.9179$). **Conclusion:** PEG-modified liposome influenza vaccine freeze-dried powder has good stability at $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 10 days, PEG6000-modified liposome influenza vaccine freeze-dried powder has good stability at 4°C and $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 3 months. It is estimated that PEG6000-modified liposome influenza vaccine can be stored for 2.2 years, 3.3 months and 24 days at 4°C , 25°C and 37°C respectively.

[Key words] influenza vaccine; liposomes; PEG; stability

流感疫苗液体制剂在储存、运输、分发过程中需要维持 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 的温度范围,以保持稳定^[1]。通过冻干或喷雾干燥的粉末制剂,可改善流感疫苗的热稳定性^[2-3]。研究表明,通过脂质体包载流感疫苗冻干后,流感疫苗的免疫效应和稳定性都有一定的提高^[4]。脂质体作为疫苗佐剂,具有克服生物屏障和控制抗原缓慢释放的能力,且能提高抗原的稳定性^[5]。但普通脂质体在储存时存在易氧化、分层和泄漏等问题,导致药物进入机体血液循环时被细胞吞噬^[6]。研究表明,通过聚乙二醇(PEG)对脂质体进行表面修饰,可改善脂质体的稳定性和提高包载药物稳定性,延长药物在机体作用时间^[7-8]。PEG是由多个氧乙烯亚基组成的亲水聚合物,无毒且具有良好的水溶性^[9]。PEG可在脂质体表面形成一层水化膜,为脂质体提供较大的空间位阻并掩盖其表面疏水性结合位点,使脂质体的理化稳定性得到一定的改善^[10-11]。研究表明,PEG修饰的脂质体流感疫苗冻干粉有良好免疫原性,初步的稳定性结果显示,PEG修饰的脂质体流感疫苗冻干粉和混悬液在 4°C , 25°C 和 37°C 条件下贮存 6 个月,冻干粉的包封率均高于混悬液^[12]。

流感疫苗是生物制品,对温度、光照等环境因素影响更为敏感,为保证其安全有效,避免失活或降解,必须根据产品的特点开展相应的稳定性实验。通过影响因素实验和加速实验能够了解药物的固有

稳定性、影响其稳定性的因素及可能的降解途径与降解产物,为制剂生产工艺、包装、贮存条件提供科学依据^[13]。本研究对 PEG 修饰的脂质体流感疫苗冻干粉进行高温影响因素实验,对 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗冻干粉进行加速实验并预测有效期。

材料与方法

1 试剂

研究用流感疫苗原液由江苏沃森生物技术有限公司提供: H_1N_1 (批号:202107003B, 血凝素含量: $181.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); H_3N_2 (批号:202108002B, 血凝素含量: $220.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); B(V) (批号:202104004B, 血凝素含量: $134.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); B(Y) (批号:202103007B, 血凝素含量: $205.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

大豆卵磷脂(北京美亚斯磷脂技术公司);胆固醇(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);PEG(上海麦克林生化科技有限公司);MTT(北京博奥拓达科技有限公司);RDE(II)受体破坏酶(Denka, 日本生研株式会社)。

2 仪器

RE52CS-2 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司);SCP85H 低温超高速离心机(日本日立公司);YP-TSD 型三箱式药品稳定性试验箱(上海迈捷实验设备有限公司);BeNano 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(丹东百

特仪器有限公司);BIO-RAD iMark™ 酶标仪(美国伯乐公司)。

3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,18~22 g,由昆明医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2015-0002。本实验均以科研为目的对昆明种小鼠进行养殖和使用,且通过昆明医科大学实验伦理审查委员会的伦理审查。

4 稳定性实验

采用冻融-冻干法分别制备 PEG2000(3000/6000)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉^[11]。依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部生物制品稳定性试验指导原则^[14]和四部微粒粉指导原则^[15]及脂质体相关文献,确定考察温度及取样时间。

4.1 样品存放温度与取样时间 将一批 PEG2000(3000/6000)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉放置于(40±2)℃ 下进行高温影响因素实验,分别于 d 0, d 5, d 10, d 20, d 30 取样检测。将 3 批 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗冻干粉放置于 4℃ 和(25±2)℃ 下进行加速实验,分别于第 0,1,2,3 个月取样检测;其中一批样品采用经典恒温法预测有效期。

4.2 检测项目 物理稳定性考察项目:外观性状、粒径、包封率、稳定系数(Ke)。其中外观性状是对样品外观颜色、疏松状态、皱缩情况、复溶后的脂质体混悬液是否存在絮凝分层、有无沉淀进行观察。取样后加入冻干前同体积的 PBS 复溶后按 1:30 的比例用矿泉水稀释,粒径分析仪测量粒径。包封率采用低温超速离心法分离游离蛋白和沉淀脂质体,通过 Lowry 法^[12]测定总蛋白和游离蛋白含量,计算包封率。Ke^[16]采用离心-分光光度法测定,Ke 是离心前后光密度变化百分率,Ke 值越小,脂质体越稳定,根据公式 $Ke = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$ 计算(A₀ 为脂质体离心前 500 nm 处的吸光度,A 为脂质体离心后 500 nm 处的吸光度),具体操作:取样后加入冻干前同体积的 PBS 复溶,精密移取 0.5 mL 的样品至 25 mL 容量瓶用蒸馏水稀释,以蒸馏水为空白,于 500 nm 处测定其 A₀;另精密移取适量的样品于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心后取 0.5 mL 上清液至 25 mL 容量瓶,用蒸馏水稀释,以蒸馏水为空白,于 500 nm 处测定 A。

生物稳定性考察:高温影响因素实验小鼠随机分为 PBS 阴性对照组、疫苗原液组、PEG2000 修饰的脂质体流感疫苗组、PEG3000 修饰的脂质体流感

疫苗组和 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗组;加速实验小鼠随机分为 PBS 阴性对照组、疫苗原液组、4℃ PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗组、25℃ PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗组。小鼠均腹腔免疫 14 d,在无菌条件下进行脾淋巴细胞增殖实验^[12],向 96 孔板中加入各组脾淋巴细胞悬液,每孔 100 μL,把 96 孔板分为空白对照孔和实验孔,空白对照孔加入 1640 培养液,实验孔加入 20 μg·mL⁻¹ ConA 溶液,置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h 后取出,避光每孔加入 20 μL MTT(5 mg·mL⁻¹),继续培养 4 h,加入三联液溶解紫色结晶。8~12 h 后于酶标仪 570 nm 实验波长和 630 nm 参考波长测定各孔吸光度(OD)值,以每只小鼠 ConA 孔平均 OD 值与空白对照孔平均 OD 值的比值为刺激指数(SI)判断小鼠脾淋巴细胞的增殖水平。微量血凝抑制法^[12]以免疫后与免疫前抗体滴度比(HI)评价其生物稳定性。在血凝实验板标明测定血清样本进行微量。自加样稀释的起点孔开始,每孔加 M/100 PBS pH 7.2 缓冲液 50 μL。取血清 50 μL(1:5)加入第 1 孔,从第 1 孔起作一系列倍比稀释(1:10,1:20,1:40,1:80,1:160 等),注意每孔吹打均匀,再进行下一孔稀释,至最后一孔,弃掉 50 μL。每孔中加入 4 单位的血凝素抗原 50 μL,轻轻摇匀后,置室温 60 min,加入 50 μL 的 1% 红细胞悬液,再摇匀于室温静置 30~60 min,检测血清中血凝抑制抗体效价。

4.3 有效期预测 采用经典恒温法^[17],在 25℃,30℃,35℃,40℃ 进行有效期预测。在不同温度下不同时间点取样后腹腔免疫小鼠,免疫 14 d,血凝抑制实验测定抗体滴度比。分别对 25℃,30℃,35℃,40℃ 温度下抗体滴度比的对数对时间进行直线回归分析,反应速度常数(K)=2.303×斜率(k),求出各温度下的反应速度常数(K_i)。不同温度的 K 与温度的动力学关系符合 Arrhenius 方程^[18]:lnK = -Ea/RT + lnA;再将 4 个不同温度(绝对温度)下的 K 按 lnK - 1/T 拟合线性回归方程 lnK = b(1/T) + a。根据回归方程,可计算 37℃,4℃ 下的 K 值,根据 K 值,按有效期计算公式:t_{0.9} = 0.1054/K,可求出样品活性下降 10% 所需时间(t_{0.9})^[19-20],即 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗冻干粉在 37℃,4℃ 的有效期。

5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组间比较选择单因素方差分析,以 P < 0.05 认为差异有统计学意义,统计结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1 高温影响因素实验

1.1 物理稳定性考察结果 PEG2000(3000/6000)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉置于(40±2)℃条件下储存,从0 d储存至20 d,外观为白色伴有淡黄色,复溶后有肉眼可见的沉淀;PEG2000修饰的脂质体粒径从381.51 nm增至567.33 nm,包封率从86.06%降至73.37%,稳定系数从5.29%增至20.22%;PEG3000修饰的脂质体粒径从402.23 nm增至574.51 nm,包封率从84.07%降至71.77%,稳定系数从5.36%增至18.19%;PEG6000修饰的脂质体粒径从452.15 nm增至607.36 nm,包封率从80.84%降至70.83%,稳定系数从4.73%增至14.67%;结果表明高温对PEG脂质体流感疫苗外观性状、粒径、包封率有一定的影响。

1.2 生物稳定性考察结果 PEG2000(3000/6000)修饰的脂质体流感疫苗冻干粉置于(40±2)℃条件下储存,生物稳定性结果见表1和表2。脾淋巴细胞增殖实验结果显示:d 0,d 5,d 10,d 20时,各组SI值与PBS组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);放置0 d时,各PEG组SI值比原液组大且与原液组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);放置5和10 d时,各PEG组SI值与原液组比较无显著性差异;放置20 d时,各PEG组SI值比原液组小且与原液组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。血凝抑制实验结果显示:在(40±2)℃放置d 0,d 5,d 10,各PEG组免后与免前抗体滴度比均 ≥ 4 ,放置0和5 d时,PEG6000组抗体滴度比与PEG3000组、PEG2000组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),放置20 d,各PEG组抗体滴度比均 < 4 。表明样品在(40±2)℃下能至少储存10 d,样品具有良好的稳定性。

表1 不同时间点PEG修饰的脂质体流感疫苗SI值

$\bar{x} \pm s, n = 6$

分组	SI			
	d 0	d 5	d 10	d 20
PBS	1.009 0 ± 0.046 6 ^d	1.025 2 ± 0.018 7 ^d	0.997 6 ± 0.035 3 ^d	1.054 8 ± 0.015 4 ^d
原液(4℃保存)	1.137 7 ± 0.001 8 ^b	1.169 9 ± 0.015 4 ^b	1.257 9 ± 0.036 1 ^b	1.320 3 ± 0.037 9 ^b
PEG2000	1.206 1 ± 0.007 4 ^{bc}	1.186 7 ± 0.020 8 ^b	1.284 4 ± 0.049 2 ^b	1.193 2 ± 0.023 5 ^{bc}
PEG3000	1.212 2 ± 0.008 3 ^{bc}	1.179 9 ± 0.031 1 ^b	1.249 8 ± 0.031 1 ^b	1.186 2 ± 0.022 5 ^{bc}
PEG6000	1.271 0 ± 0.005 1 ^{bc}	1.247 5 ± 0.037 9 ^{bc}	1.333 6 ± 0.052 0 ^b	1.224 1 ± 0.021 1 ^{bc}

与PBS组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与原液组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

表2 各组不同时间抗体滴度比

$\bar{x} \pm s, n = 6$

分组	HI			
	d 0	d 5	d 10	d 20
PBS	—	—	—	—
原液(4℃保存)	7.333 3 ± 1.686 5	7.858 8 ± 2.074 8	8.571 4 ± 1.866 3	7.023 2 ± 1.185 2
PEG2000	7.733 3 ± 0.266 7	5.929 4 ± 0.654 6	4.190 5 ± 0.233 3	3.185 2 ± 0.222 2
PEG3000	8.933 4 ± 1.950 4	6.070 6 ± 0.615 4	4.380 9 ± 0.284 7	3.703 7 ± 0.331 3
PEG6000	9.600 0 ± 1.808 6	7.058 8 ± 0.631 4	4.761 9 ± 0.301 2	3.851 8 ± 0.148 1

2 加速实验结果

2.1 物理稳定性考察结果 3批PEG6000修饰的脂质体流感疫苗冻干粉置于4℃和(25±2)℃储存3个月,外观均为白色疏松均匀粉末,复溶后分散均匀;3批样品在储存3个月,4℃下粒径范围在423.15~491.26 nm之间,包封率均在80%以上,稳定系数范围在4.35%~5.74%之间,三者变化不大;(25±2)℃下随着储存时间的延长,粒径、稳定系数逐渐增大,包封率逐渐下降,粒径从423.15 nm增至635.80 nm,包封率均在76%以上,稳定系数从

4.35%增至27.24%。

2.2 生物稳定性考察结果 PEG6000修饰的脂质体流感疫苗冻干粉置于4℃和(25±2)℃下储存,生物稳定性结果见表3和表4。脾淋巴细胞增殖实验结果显示:放置1,2,3个月,4℃和(25±2)℃条件下的PEG6000组与PBS组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),4℃下PEG6000组与原液组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);放置1,2个月,(25±2)℃下PEG6000组的SI值大于原液组,放置3个月,(25±2)℃下PEG6000组的SI值略小于原液组,但与原

液组比较均无显著性差异。血凝抑制实验结果显示:4℃和(25±2)℃放置0,1,2,3个月,小鼠免后与免前的抗体滴度比均≥4,且3批样品间无显著性差

异;放置3个月,4℃下PEG6000组免后与免前的血凝抑制抗体之比变化不大,(25±2)℃下PEG6000组免后与免前的抗体滴度比随放置时间的延长而减小。

表3 不同时间点 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗 SI 值

$\bar{x} \pm s, n = 6$

分组	时间/个月			
	0	1	2	3
PBS	1.033 1 ± 0.028 3 ^d	0.910 6 ± 0.033 9 ^d	0.962 2 ± 0.030 7 ^d	1.064 0 ± 0.032 5 ^d
原液(始终4℃保存)	1.183 3 ± 0.005 7 ^b	1.106 3 ± 0.029 6 ^b	1.183 5 ± 0.008 3 ^b	1.262 3 ± 0.052 9 ^b
4℃PEG6000	1.252 6 ± 0.020 4 ^{bc}	1.210 0 ± 0.018 7 ^{bc}	1.283 7 ± 0.046 2 ^{bc}	1.396 9 ± 0.034 5 ^{bc}
(25±2)℃PEG6000	1.252 6 ± 0.020 4 ^{bc}	1.134 1 ± 0.011 4 ^b	1.220 2 ± 0.031 7 ^b	1.261 5 ± 0.023 2 ^b

与PBS组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与原液组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$

表4 PEG6000 不同时间抗体滴度比

$\bar{x} \pm s, n = 6$

分组	时间/个月			
	0	1	2	3
PBS	—	—	—	—
原液(始终4℃保存)	7.666 7 ± 1.088 7	7.571 4 ± 1.367 8	7.965 5 ± 1.379 3	7.666 7 ± 1.333 3
4℃PEG6000(001)	8.000 0 ± 0.942 8	7.500 0 ± 0.357 1	7.241 4 ± 0.689 7	6.897 5 ± 1.088 6
4℃PEG6000(002)	8.266 7 ± 0.333 3	7.785 7 ± 0.683 9	7.551 7 ± 1.320 5	7.532 4 ± 0.769 8
4℃PEG6000(003)	8.666 7 ± 0.666 7	8.642 9 ± 0.914 3	7.931 0 ± 0.689 7	7.333 3 ± 0.384 2
(25±2)℃PEG6000(001)	8.000 0 ± 0.942 8	4.642 9 ± 0.206 2	4.482 8 ± 0.398 2	4.000 0 ± 0.544 3
(25±2)℃PEG6000(002)	8.266 7 ± 0.333 3	4.464 3 ± 0.178 6	4.137 9 ± 0.372 8	4.083 3 ± 0.166 7
(25±2)℃PEG6000(002)	8.666 7 ± 0.666 7	5.071 4 ± 0.171 4	4.310 3 ± 0.344 8	4.166 6 ± 0.333 3

3 有效期预测

3.1 经典恒温法中抗体滴度比的变化 PEG6000 修饰的脂质体流感疫苗冻干粉置于25℃,30℃,35℃,40℃温度下,在不同时间间隔取样腹腔免疫小鼠,测

定抗体滴度比(HI),以抗体滴度比的对数对时间作直线回归,由相关系数看出抗体滴度比下降速率基本符合一级速度方程即一级反应或假一级反应,并根据斜率计算出各温度下速率反应常数,结果见表5。

表5 不同温度不同时间间隔实验结果

$n = 5$

温度/℃	时间/d	HI	lnHI	回归方程	$K \times 10^{-3}/d^{-1}$
25	0	10.610 5	2.361 8	$\ln HI = -4.512 \times 10^{-4}t + 2.344 0$ $r = 0.996 8$	1.039
	5	8.193 9	2.103 4		
	10	6.815 5	1.919 2		
	20	5.305 3	1.668 7		
	30	4.187 5	1.432 1		
30	0	10.610 5	2.361 8	$\ln HI = -7.160 \times 10^{-4}t + 2.341 6$ $r = 0.995 3$	2.649
	5	8.806 6	2.175 5		
	10	6.905 4	1.932 3		
	20	6.063 2	1.792 2		
	25	4.007 6	1.388 2		
35	0	10.610 5	2.361 8	$\ln HI = -1.106 \times 10^{-3}t + 2.333 4$ $r = 0.994 6$	3.547
	3	8.141 8	2.179 5		
	7	7.242 7	1.980 0		
	10	5.505 3	1.668 7		
	19	4.590 6	1.542 0		
40	0	10.610 5	2.361 8	$\ln HI = -1.680 \times 10^{-3}t + 2.333 9$ $r = 0.994 2$	4.868
	2	8.739 9	2.167 9		
	4	7.831 6	2.058 2		
	7	5.940 5	1.781 8		
	9	4.457 6	1.494 6		

3.2 计算降解速度常数 以表 5 中 K 的对数 $\ln K$ 对绝对温度 T 的倒数 $1/T$ 进行线性回归, 回归方程为: $\ln K = 20.195 - 8148.5/T$ ($r = 0.9179$)。根据回归方程中计算得 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的降解速度常数分别为 1.298×10^{-4} , $4.251 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, 并推算得样品在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下能储存 811.76 d (约 2.2 年); $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下能储存 101.44 d (约 3.3 个月); $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下约能储存 24 d。

讨 论

安全、有效、稳定是合格药物制剂最基本的质量要求。制剂在生产、贮存、使用过程中, 会因各种因素的影响发生分解变质, 导致药物疗效降低或不良反应增加^[21-22]。通过稳定性的研究, 考察影响疫苗稳定性因素, 保证产品的质量, 减少由于制剂不稳定而导致的经济损失, 且能评价该疫苗质量和免疫效果, 制定储存条件、有效期等重要参数^[23]。

目前, 全球上市的流感疫苗主要是液体剂型, 液体疫苗保存时间较短、稳定性较差^[24], 限制了流感疫苗在偏远农村地区和资源贫乏地区的应用。本研究以 PEG 修饰的脂质体为载体与四价流感疫苗结合, 采用冻融冻干法将其制备成冻干剂型, 进行稳定性考察。在考察项目中高温对脂质体的包封率、粒径和稳定系数影响较大。结果表明, PEG 修饰的脂质体四价流感疫苗冻干粉于 $(40 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 10 d, 依然能产生有效免疫, PEG6000 修饰的脂质体四价流感疫苗冻干粉产生的细胞免疫和体液免疫最强, 且在 $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月, 依然能产生良好的免疫原性, 且 $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的免疫原性与 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的原液相当, 经过推算样品在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下大约分别能存储 2.2 年、3.3 个月、24 d, 表明冻干的 PEG 修饰的脂质体流感疫苗具有良好的热稳定性。经典恒温法是以化学动力学为理论依据, 由高温加速实验的数据推算出低温储存情况下的保存期, 观察时间较短, 可在短时间内找出制品降解变性的规律, 初步确定有效期。

[参 考 文 献]

- [1] DUMPA N, GOEL K, GUO YH, *et al.* Stability of vaccines [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, 20(2): 42.
- [2] AMORI J, HUCKRIEDE A, WILSCHUT J, *et al.* Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges

- and possibilities[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(6): 1256 - 1273.
- [3] WANG W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals[J]. *Int J Pharm*, 2000, 203(1-2): 1 - 60.
- [4] 鲁卫东, 林意菊, 马波, 等. 流感疫苗脂质体干粉的稳定性[J]. *中国药科大学学报*, 2010, 41(4): 360 - 362.
- [5] SCHWENDENER RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances[J]. *Ther Adv Vaccines*, 2014, 2(6): 159 - 182.
- [6] 黄梓源, 孙玉琦, 胡海洋, 等. 脂质体制剂学稳定性的研究技术与方法[J]. *药学学报*, 2016, 51(3): 356 - 361.
- [7] VERONESE FM, PASUT G. PEGylation, successful approach to drug delivery[J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(21): 1451 - 1458.
- [8] BAILON P, PALLERONI A, SCHAFFER CA, *et al.* Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C[J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12(2): 195 - 202.
- [9] ZHANG Z, ZHANG YY, SONG SW, *et al.* Recent advances in the bioanalytical methods of polyethylene glycols and PEGylated pharmaceuticals[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(9-10): 1978 - 1997.
- [10] DADASHZADEH S, VALI AM, REZAIE M. The effect of PEG coating on *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* disposition of topotecan loaded liposomes in rats[J]. *Int J Pharm*, 2008, 353(1-2): 251 - 259.
- [11] DOS SANTOS N, ALLEN C, DOPPEN AM, *et al.* Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes; relating plasma circulation lifetimes to protein binding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(6): 1367 - 1377.
- [12] 普梦笛. PEG3000, PEG6000 修饰的脂质体作为流感疫苗佐剂的制备及免疫原性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020.
- [13] 刘艳红. 电荷修饰的脂质体流感疫苗的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [16] 赵菊香. 依托泊昔长循环脂质体的稳定性及体内药理学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [17] 庞贻慧鲁纯素. 药物稳定性预测方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [18] 天津大学物理化学教研室. 物理化学. 上册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [19] 刘燕, 李振平, 周耀东, 等. 人免疫球蛋白稳定性的两种试验方法结果比较[J]. *微生物学免疫学进展*, 2003, 31(4): 50 - 53.
- [20] 朱征宇, 汪恩浩, 王媛. 应用统计分析和化学动力学参数评价生物制品的稳定性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(2): 126 - 130.
- [21] 马骏威, 任连杰. 长效注射剂的质量控制[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(9): 845 - 849.
- [22] 董晓旭, 蔡梦如, 张志勤, 等. 论中药制剂工艺参数与质量参数的关联性与协调性[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(13): 1248 - 1253.
- [23] 张丽君, 刘晓凡. 疫苗的稳定性的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2018, 46(6): 76 - 79.
- [24] PRESTON KB, RANDOLPH TW. Stability of lyophilized and spray dried vaccine formulations[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 171: 50 - 61.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-09-08