

流感疫苗脂质体冻干粉的制备及其免疫原性

鲁卫东¹, 林意菊¹, 代云波², 阳选祥², 马波^{2*}

(¹昆明医学院药学院, 昆明 650031; ²云南沃森生物技术有限公司, 昆明 650106)

摘要 目的: 制备流感疫苗脂质体冻干粉, 并考察其粒径分布、封装率及免疫原性。方法: 以大豆卵磷脂、胆固醇为原料, 采用薄膜蒸发法, 加入纯化流感病毒裂解疫苗制备脂质体, 加入冻干保护剂冻干。在光学显微镜下观察其形态, 并在透射电镜下测定其平均粒径和粒径分布, 以 Lowry 法测定其封装率。小鼠肺部给药后血凝抑制法测定抗体滴度以考察其免疫原性。结果: 所制备的流感疫苗脂质体冻干粉复溶后呈圆形和椭圆形, 粒度分布均匀, 平均粒径约为 2.14 μm, 封装率大于 80%。肺部免疫后抗体滴度较腹腔免疫高。结论: 所制备的流感疫苗脂质体封装率高, 粒度分布均匀, 小鼠肺部免疫效果好。流感疫苗脂质体肺部免疫是一种很有潜力的免疫途径, 有待进一步研究。

关键词 流感疫苗脂质体; 封装率; 肺部给药; 免疫原性

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2009)03-0218-04

Preparation and immunogenicity of influenza vaccine lyophilized liposomes

LU Wei-dong¹, LIN Yi-ju¹, DAI Yun-bo², YANG Xuan-xiang², MA Bo^{2*}

¹School of Pharmacy, Kunming Medical College, Kunming 650031; ²Walvax BioTech Co., Ltd., Kunming 650106, China

Abstract Aim: To prepare the influenza vaccine lyophilized liposomes and to characterize its particle distribution, encapsulation efficiency and immunogenicity. **Methods:** Flu vaccine liposome based on the method of thin-film evaporation was prepared using phospholipids, cholesterol and the purified influenza virus split vaccine, and was further subjected to frozen-drying. The polymorph was observed by microscope; the particle distribution and the average size were analysed by transmission electron microscope; its encapsulation efficiency was determined by Lowry method and the antibody titers were assessed by hemagglutination-inhibition after pulmonary delivery to mice. **Results:** The reconstituted influenza vaccine liposome under electronic microscope were round or elliptic particles evenly distributed at a mean size of 2.14 μm, with the encapsulation efficiency of more than 80%. The antibody titer through pulmonary delivery was higher than that through intraperitoneal injection. **Conclusion:** The prepared influenza vaccine lyophilized liposomes possess high encapsulation efficiency, better particle distribution and marked immunogenicity through pulmonary delivery to mice. Pulmonary delivery of influenza vaccine liposomes is a potential immunization approach worthy of further exploitation.

Key words influenza vaccine liposome; encapsulation rate; pulmonary delivery; immunogenicity

This study was supported by the Research Foundation of Educational Department of Yunnan Province (No. 07Y10521)

开发流感疫苗佐剂和新的免疫途径是提高流感疫苗免疫效果的有效手段。脂质体是一种理想的免疫佐剂。载药脂质体进入体内后, 绝大部分被吞噬细胞摄取, 较易集中于主要免疫器官, 有利于将抗原传递给抗原递呈细胞或其他免疫活性细胞, 激活和增强免疫应答。脂质体疫苗肺部给药

不仅具有明显的佐剂功能, 增强免疫应答, 还能诱导黏膜免疫、细胞免疫和体液免疫^[1-3]。

本研究以薄膜蒸发冻干法分别制备流感全病毒裂解联合疫苗脂质体和亚单位 (H₁N₁) 疫苗脂质体冻干粉, 并通过肺部免疫 ICR 小鼠来考察其免疫原性。

* 收稿日期 2009-05-30 通讯作者 Tel: 0871-8351255 E-mail: bma@21cn.com

基金项目 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (No. 07Y10521)

材 料

1.1 试 剂

大豆卵磷脂(北京美亚斯磷脂技术有限公司);胆固醇(上海新兴化工试剂研究所); H_1N_1 、 H_3N_2 、B 三联流感病毒裂解疫苗(批号:200807003)、清洁级豚鼠血球(云南沃森生物技术有限公司);标准流感抗原 [H_1N_1 (MR-116, 02/36)、 H_3N_2 (Resvir-17, 02/100)、B (02/108) 国家生物制品检定所];霍乱滤液(批号:087K4073)、Folin 酚试剂(美国 Sigma 公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);EL204 电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);UV7501 紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);JEM-1011 透射电镜(日本电子公司);SCP85H 型冷冻超速离心机(日本日立公司);冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);PB-10pH 酸度计(德国 Sartorius 公司)。

1.3 动 物

ICR 小鼠,雌性,18~22 g,清洁级,由昆明医学院动物科提供,合格证号:SCXK(滇)2005~0008。

方 法

2.1 流感疫苗脂质体的制备

采用薄膜蒸发冻干法制备流感疫苗脂质体。精密称取大豆卵磷脂 300 mg 和胆固醇 100 mg 溶于无水乙醇 15 mL 中,50 °C 水浴加热,搅拌使其溶解,将该溶液置于磨口圆底烧瓶中,于 37 °C 恒温水浴旋转蒸发器上减压蒸发 20 min,除去乙醇,加入三联流感病毒裂解疫苗 11 mL(血凝素总含量 90 μ g/mL),再加 PBS 缓冲液(pH 7.0)至 30 mL,常压下旋转蒸发器上水化约 45 min,制得乳白色脂质体混悬液 30 mL,常温静置 2 h。按与磷脂质量比加入适量冻干保护剂,分装于冻干瓶内,放入 -40 °C 低温冰箱预冻 4 h 后,在真空度为 6 Pa,于 -52 °C 的冻干机中干燥 28 h,得白色粉末,放入 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 冻干保护剂的筛选

取制备好的脂质体混悬液,按与磷脂质量比

别加入不同种类的冻干保护剂(蔗糖和甘露醇),按“2.1 项方法冻干,用 PBS 缓冲液复溶,按冻干前混悬液 4 倍体积稀释后于显微镜下观察粒径形态及分布,并用 Lowry 法测蛋白质含量,计算包封率,以确定最佳冻干保护剂的种类及用量。

2.3 流感疫苗脂质体包封率的测定

2.3.1 标准曲线的绘制 精确称量牛血清白蛋白(BSA)10 mg,以注射用水定容至 100 mL,即为 100 μ g/mL 的标准蛋白溶液。精确量取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 于试管中,按 Lowry 法测定 A_{750} ,绘制标准曲线,得直线回归方程 $y = 0.0068x + 0.0023$, $r = 0.9978$ 。结果表明在 10~60 μ g/mL 范围内浓度和 A_{750} 呈良好线性关系。

2.3.2 包封率测定 分别取冻干的空白脂质体和疫苗脂质体冻干粉,用 PBS 缓冲液复溶后按冻干前体积 4 倍稀释,于 4 °C, 50 000 r/min 超速离心 30 min,取上清液 1 mL,用 Lowry 法测定其蛋白质含量,以 $EE(\%) = (1 - \frac{C_{清}}{C_{总}}) \times 100$ 计算包封率。

2.4 粒度观察和粒径分析

分别在低倍显微镜下和高倍透射电镜下观察脂质体冻干粉复溶后的粒度分布和形态结构。取优化后处方工艺制备的脂质体冻干粉用缓冲液复溶,按冻干前混悬液体积 4 倍稀释后,取少量于光学显微镜($\times 1000$)下观察。取少量脂质体冻干粉复溶溶液,负染法于透射电镜下观察并测定脂质体粒径、形态。

2.5 流感疫苗脂质体的免疫

2.5.1 动物分组 联合疫苗给药:将 ICR 小鼠分为阴性对照组、疫苗脂质体冻干粉组、非脂质体流感疫苗原液组和阳性对照组($n = 5$)。疫苗脂质体冻干粉组和非脂质体流感疫苗原液组分别以每只 6 μ g 血凝素(以 H_1N_1 计)肺部灌注免疫,同时以每只 6 μ g 非脂质体联合流感疫苗原液组腹腔给药作为阳性对照。单价疫苗给药:将 ICR 小鼠分为阴性对照组,单价流感疫苗脂质体冻干粉肺部给药组和非脂质体单价流感疫苗原液腹腔给药组。给药剂量同联合疫苗给药。

2.5.2 肺部免疫 给药前每只小鼠腹腔注射 7.5% 乌拉坦 0.15 mL 麻醉,待小鼠行动迟缓后,仰卧固定,切开颈部皮肤,暴露气管,用 1 mL 微量注射器针头从气管环之间插入,使动物与水平成 80

~90 °缓慢给药 (0.3 mL/100 g),并维持 30 s,使药液能够导入肺部深处,再与水平成 30 角左右,快速缝合切口,并用酒精消毒伤口后让小鼠自由活动,给药后 3 d内控制动物观察室温度 18~26。

2.5.3 小鼠血清抗体滴度测定 联合疫苗给药小鼠免疫后分别于 d7、d14、d28摘眼球采血,全血于常温放置 1 h,4 °低温放置 2 h后,以 2 500 r/min离心 20 min,分离血清,取血清 100 μ L, -20 °冰冻保存备用,以微量血凝抑制 (HI)法测定血清抗体滴度。单价疫苗给药小鼠免后 28 d采血,其余处理同联合疫苗给药小鼠。取小鼠血清 100 μ L于

试管中,加入霍乱滤液 400 μ L,轻轻摇匀,于 37 °放置 16~18 h后,56 °水浴 45 min,室温冷却,再加入豚鼠处理血球原液 50 μ L,置于 4 °约 24 h,用标准抗原作对照,于 96孔板上用微量血凝抑制法^[4]测定抗体滴度。

结果

3.1 保护剂筛选

以流感疫苗脂质体包封率、外观和显微观察为指标,筛选蔗糖,甘露醇对脂质体疫苗的保护效果,结果见表 1。

Table 1 Effect of various cryoprotectant on the character of the influenza vaccine lyophilized liposomes

Cryoprotectant	Ratio	Appearance	Microstructure	EE/%	
				Pre-drying	Post-drying
Mannitol-Phospholipid	1 1	white, good, smooth	even, round, no crystal	87.2	70.2
	2 1	slightly yellow, good, smooth	larger, round, no crystal	87.2	72.2
	3 1	yellow, rather rugged, large pore	bad, little crystal	87.2	58.7
Surcose-Phospholipid	3 1	white, good, smooth	larger, round, no crystal	87.2	75.0
	2 1	white, good, smooth	larger, round, no crystal	87.2	79.7
	1 1	white, good, smooth	little larger, uniform size, no crystal	87.2	85.3
	1 2	white, smooth	ununiform size, larger, no crystal	84.3	92.3
No cryoprotectant		yellow, smooth	ununiform size, larger, no crystal	84.3	92.7

从表中可看出,在相同的真空条件下,随着甘露醇量加大,冻干过程中样品越易塌陷,还会变黄,并且包封率降低。从显微结构和包封率测定结果来看,在用量相同情况下,蔗糖组比甘露醇组更均匀、规则,包封率也较高,这可能与甘露醇塌陷温度较蔗糖低有关。在不同比例的蔗糖用量中,与磷脂质量比为 1 时冻干前后包封率变化不大(冻干前 87.18%,冻干后 85.3%),且粒度相对规则、均匀,故选用该比例。

3.2 流感疫苗脂质体包封率

用 Lowry法测定流感疫苗脂质体离心后上清液中蛋白质含量,测得最优条件下冻干粉的包封率为 85.3% ($n=3$)。

3.3 形态观察和粒径

脂质体冻干粉复溶后油镜下呈圆形或椭圆形,粒度分布均匀且规则。透射电镜 ($\times 20\ 000$)下观察脂质体结构可见,多属于多室脂质体,个别为单室,粒度基本规则,为圆形或椭圆形(见图 1)。电镜下测定流感疫苗脂质体冻干粉复溶后平均粒径为 2.14 μ m,其中小于 0.5 μ m 的占 8.5%, 0.5~

3.0 μ m 粒径占 85.6%,其余均小于 5 μ m。通过粒径跨度分布可知,制得的脂质体多属于大多室脂质体。

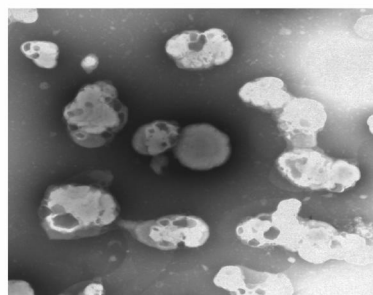


Figure 1 Reconstituted influenza vaccine liposomes observed by transmission electron microscope ($\times 20\ 000$)

3.4 小鼠血清抗体测定结果

通过采用微量血凝抑制 (HI)法测定免疫后小鼠的血清,以 H₁N₁、H₃N₂、B 型流感疫苗标准抗原测定相应的抗体,以 H₁N₁ 抗原为准,比较脂质体组和非脂质体流感疫苗原液组血凝抗体,结果见表 2和表 3。

Table 2 Antibody titers of influenza H₁N₁, H₃N₂ and B combined vaccine with different dosage forms and delivery strategies

Group	Dose/ (μ g/mouse)	A	7			14			28 d		
			H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B	H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B	H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B
Liposome	6	pd	640	66	40	853	60	80	1 280	80	66
Non-liposome	6	pd	320	47	35	640	55	54	896	76	73
	6	ip	320	15	60	576	22	56	780	73	53
Control			146	15	33	146	15	33	146	15	33

A: Immunization approach; pd: pulmonary delivery; H₁N₁, H₃N₂, B: different types of influenza vaccine antigen

Table 3 Antibody titers ratio of post-immunization to pre-immunization of influenza H₁N₁, H₃N₂ and B combined vaccine with different dosage forms and delivery strategies

Group	Dose/ (μ g/mouse)	A	7			14			28 d		
			H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B	H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B	H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	B
Liposome	6	pd	4.3	4.4	1.2	5.8	4.0	2.4	8.7	5.3	2.0
Non-liposome	6	pd	2.2	3.1	1.1	4.4	3	1.6	6.1	5.0	2.2
		ip	2.2	1	1.8	3.9	1.5	1.7	5.3	4.9	1.6

从表 2、表 3 中结果可知,小鼠对 H₃N₂、B 型抗原的免疫应答不敏感,对 H₁N₁ 敏感。在流感联合疫苗免疫实验中,免疫后只要有一种抗原产生抗体,且免疫后与免疫前滴度比值大于或等于 4,免疫就判定为成功。本实验中所用联合疫苗以 H₁N₁ 为标准,从各时段取样看来,结果显示在给药剂量(每只 6 μ g)相同的情况下疫苗脂质体与非脂质体抗原相比,脂质体疫苗肺部给药组提早产生免疫应答,且滴度较高。

此外,单价疫苗脂质体肺部给药和原液腹腔注射结果表明,脂质体肺部免疫前后抗体滴度比为 5.6,而疫苗原液腹腔给药为 5.0,表明单价 H₁N₁ 疫苗脂质体的肺部免疫滴度不低于腹腔注射给药,因此,从给药途径上看,肺部给药也认为是成功的。

讨 论

4.1 流感疫苗脂质体制备方法选择

用薄膜蒸发被动载药法制备流感疫苗脂质体,它避免了疫苗与有机溶剂的直接接触,同时与冻干法相结合,有效地改善了脂质体的储存稳定性。

4.2 保护剂筛选

在没有冻干保护剂和保护剂用量达不到一定浓度的时候,对脂质体不起保护作用。疫苗脂质体中的游离蛋白质在冻干过程中遭破坏,测得上清液中蛋白质的量低于实际量,因此计算的包封率反而升高,另外也不排除在冻干过程中脂质体重构,包裹了更多药物,从而使包封率偏高。从一般脂质体

保护剂的选择来说,选用冻干前后对包封率改变不大的保护剂较为合适,因此本实验选用磷脂与蔗糖比为 1:1(冻干前 87.1%,冻干后 85.3%)的蔗糖做保护剂。

4.3 免疫效果考察

本研究采用流感疫苗常用动物模型,探讨了通过对免疫小鼠肺部灌注和腹腔注射流感疫苗来比较免疫效果,结果显示在同等剂量(每只 6 μ g)下,肺部免疫途径较早产生抗体,抗体水平较高,免疫应答较强,脂质体肺部免疫效果更佳。因此,脂质体是一种很好的免疫佐剂,其肺部免疫是一种很有潜力的免疫途径。下一步研究将确定流感疫苗脂质体肺部免疫的适宜剂量、探讨免疫产生机理以及筛选肺部免疫的最佳流感疫苗脂质体粒径。

参 考 文 献

- [1] De Haan A, Groen G, Prop J, et al. Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: role of alveolar macrophages [J]. *Immunology*, 1996, **89** (4): 488 - 493.
- [2] Lu D, Hickey AJ. Pulmonary vaccine delivery [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2007, **6** (2): 213 - 226.
- [3] Amorij JP, Saluja V, Petersen AH, et al. Pulmonary delivery of an inulin-stabilized influenza subunit vaccine prepared by spray-freeze drying induces systemic, mucosal humoral as well as cell-mediated immune responses in BALB/c mice [J]. *Vaccine*, 2007, **25** (52): 8 707 - 8 717.
- [4] 司传平 (Si CP). 医学免疫学实验技术 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 2.