

脂质体多肽疫苗的处方工艺优化及免疫效果评价

石浩源^{1,2}, 黄转青^{1,2}, 夏志发^{1,2}, 孙琦^{1,2}, 史振伟^{1,2}, 黄松涛^{1,2}, 张莹¹, 姚树森¹, 徐风华^{1*} (1. 解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100853; 2. 解放军医学院, 北京 100853)

摘要:目的 优化脂质体的处方工艺, 构建复合佐剂脂质体多肽疫苗, 并评价其在小鼠体内的免疫效果。方法 以粒径分布和分散系数为评价指标, 通过单因素实验优化处方工艺, 使用激光粒度分析仪考察其物理特性, 使用透射电镜观察其微观形态, 利用二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定法计算其包封率, 置于4和25℃条件下储存0、90和180d考察其稳定性。将其与角鲨烯、单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A, MPLA)和QS-21配伍构建3种复合佐剂多肽疫苗, 随后将BALB/c小鼠随机分为空白对照组和实验组, 实验组分别皮下注射游离多肽疫苗和3种脂质体多肽疫苗, 第2次免疫后14d取材。酶联免疫吸附实验(ELISA)检测小鼠血清中特异性免疫球蛋白G(IgG)抗体及其亚型滴度, 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞分型, 评价不同多肽疫苗处方的免疫效果。结果 单因素实验得到的最优制备条件为: 膜材比5:1、超声功率30W、超声次数40次、高压均质时间6min。使脂质体的平均粒径从329.7nm减小至132.0nm, 多分散指数为17.8%, 包封率为76.9%, 透射电镜下形态规整近似球形, 4℃条件下储存180d稳定性良好。小鼠体内免疫实验结果表明, 脂质体多肽疫苗能产生高滴度的IgG和IgG2a抗体, 最高可达 6.4×10^4 和 3.2×10^4 ; 上调淋巴细胞中CD4⁺T和CD8⁺T细胞的比例($P < 0.05$), 增强小鼠细胞免疫。结论 处方工艺优化后制备的脂质体理化性质较好且稳定, 将其与佐剂配伍构建的多肽疫苗能增强小鼠体液免疫和细胞免疫, 是具有应用潜力的多肽抗原免疫递送载体。

关键词: 多肽疫苗; 纳米脂质体; 处方工艺优化; 疫苗佐剂

doi: 10.11669/cpj.2024.11.010 中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)11-1032-09

Optimization of Formulation Process and Evaluation of Immune Effect of Liposomal Peptide Vaccine

SHI Haoyuan^{1,2}, HUANG Zhuanqing^{1,2}, XIA Zhifa^{1,2}, SUN Qi^{1,2}, SHI Zhenwei^{1,2}, HUANG Songtao^{1,2}, ZHANG Ying¹, YAO Shusen¹, XU Fenghua^{1*} (1. Department of Pharmacy, Medical Supplies Centre of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the formulation process of liposomes, construct a complex adjuvant liposome peptide vaccine, and evaluate its immune effect in mice. **METHODS** Taking particle size distribution and polydispersity index as evaluation indicators, the formulation process was optimized through single factor experiments. The physical properties were investigated using a laser particle size analyzer, and the microstructure was observed using transmission electron microscopy. The encapsulation efficiency was calculated using BCA protein concentration assay, and the stability was investigated by storing at 4 and 25℃ for 0, 90, and 180 d. Three composite adjuvant peptide vaccines were constructed by combining it with squalene, monophosphoryl lipid A (MPLA), and QS-21. Then, BALB/c mice were randomly divided into a blank control group and an experimental group. The experimental group was subcutaneously injected with free peptide vaccine and three kinds of liposomal peptide vaccine, respectively. The samples were taken 14 d after the second immunization. ELISA was used to detect the specific IgG antibody and its subtype titer in mouse serum, and flow cytometry was used to detect the spleen lymphocyte typing, to evaluate the immune effects of different peptide vaccine formulations.

RESULTS The optimal preparation conditions obtained from single factor experiments were as follows: membrane material ratio of 5:1, ultrasonic power of 30 W, ultrasonic frequency of 40 times, and high-pressure homogenization time of 6 min. The average particle size of the liposomes was reduced from 329.7 nm to 132.0 nm, with a polydispersity index of 17.8% and an encapsulation efficiency of 76.9%. The morphology under transmission electron microscopy was regular and approximately spherical, and the stability was good after storage at 4℃ for 180 d. The results of the *in vivo* immune experiment in mice showed that the liposomal peptide vaccine could produce high titer IgG and IgG2a antibodies, up to 6.4×10^4 and 3.2×10^4 , respectively; upregulate the proportion of CD4⁺T and CD8⁺T cells in lymphocytes ($P < 0.05$), and enhance cellular immunity in mice. **CONCLUSION** The physicochemical properties of the optimized formulation process are stable and good, and the polypeptide vaccine formulated with adjuvant can enhance humoral and cellular immunity in mice. It is a potential carrier for the delivery of polypeptide antigen immunization.

KEY WORDS: peptide vaccine; nanoliposomes; optimization of prescription process; vaccine adjuvant

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助(82171814)

作者简介: 石浩源, 男, 硕士研究生 研究方向: 免疫纳米递送系统 * 通讯作者: 徐风华, 女, 博士, 研究员, 主任 研究方向: 免疫纳米递送系统、新药和药物新剂型研发 Tel: (010)66937349

多肽疫苗是按照病原体抗原基因中已知或预测的某段抗原表位的氨基酸序列,通过化学合成技术制备的疫苗^[1]。其克服了传统疫苗的许多缺点,可大规模化学合成,易于纯化,在人体应用中较为安全。但多肽必须与适当的佐剂配合,以提高抗原的靶向性并延长抗原存在时间,诱导有效而持久的免疫效应和记忆抗体^[2]。因此,选择适当的佐剂是构建多肽疫苗的关键。

基于脂质的递送系统已被确立为诱导体液和细胞免疫反应的强大递送系统^[3],目前应用最为广泛的是脂质体和脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LNP), LNP是一种广泛用于将核酸物质递送至细胞的纳米载体,由可电离阳离子脂质、中性辅助磷脂、胆固醇和聚乙二醇化脂质组成^[4]。脂质体和LNP的最大区别在于形态,脂质体是脂质有序排列的双分子层形成封闭囊泡,有亲水的内部空腔结构;LNP则没有亲水空腔,相反,LNP因为阳离子磷脂和带负电的核酸物质静电络合作用存在于内部,形成的多层核心分散于脂质层间。脂质体可以包裹水溶性和脂溶性药物,增强抗原蛋白的稳定性,并通过储存效应促进疫苗成分的逐渐释放^[5-7],更适合递送亲水性多肽分子,但仍存在稳定性较差,包封率较低的问题。阳离子脂质体在诱导抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)反应和抗体产生方面优于中性和阴离子脂质体^[8-9],不仅和抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面的负电荷之间有强静电相互作用^[10],而且可以静电吸附阴离子抗原,即亚基蛋白和核酸编码抗原,从而保护它们不被降解,并促进专业APC的摄取^[11]。壳聚糖是带正电荷的多糖,具有良好的生物相容性和黏附性^[12-13]。利用壳聚糖修饰脂质体,壳聚糖会黏附在脂质体双分子层上,可以提高脂质体的稳定性并减小泄漏率^[14-15]。AS01是经典的颗粒佐剂系统,它是一种脂质体佐剂,含有免疫刺激剂单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A, MPLA)和QS-21^[16-17]。MPLA是一种从脂多糖中分离出来的低毒性衍生物,可以特异性激活APC上的Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4),促进抗原呈递和T细胞活化^[18],导致核因子 κ B(NK- κ B)的激活和促炎细胞因子的表达,从而产生更强的Th1细胞反应^[19]。QS-21是南美洲皂树(*Quillaja-saponaria* Molina)树皮提取物的第21个组分,能激活APC中的NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3),随后激

活半胱氨酸蛋白酶-1(caspase 1),促进细胞因子白细胞介素 1β (IL 1β)、IL18和IL33活性形式的产生^[20]。这两种免疫刺激成分协同作用,使AS01诱导Th1为主的免疫反应并促进CTL的生成^[21]。角鲨烯是由6个异戊二烯单位组成的三萜胆固醇前体^[22-23],具有增强药效和增强生物相容性的作用,已被用作疫苗佐剂和给药乳剂,是水包油乳剂型佐剂MF59和AS03的主要成分^[24]。

本研究以基于新冠病毒S蛋白的S1亚基受体结合结构域区段上S₄₅₀₋₄₇₁(NYLYRLFRKSNLKPFDISTE)构建的分支多肽作为模型抗原,选择脂质体作为免疫递送系统构建多肽疫苗,设计构建了脂质体的处方工艺,并通过单因素实验对脂质体制备的处方工艺进行优化,以优化的脂质体处方工艺为基础,将脂质体与角鲨烯、MPLA和QS-21佐剂配伍组合,评价脂质体多肽疫苗在小鼠体内体液免疫和细胞免疫效果,以获得较优的脂质体/佐剂免疫递送系统。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大豆卵磷脂(北京索莱宝科技有限公司);合成多肽S₄₅₀₋₄₇₁(成都圣诺生物制药有限公司);胆固醇、角鲨烯和壳聚糖(上海源叶生物科技有限公司);无水乙醇(天津福晨化学试剂有限公司);PBS干粉(北京百瑞极生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);QS-21和MPLA(法国InvivoGen公司);HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(亚科因生物技术有限公司);CD3-FITC、CD4-APC、CD8a-PE抗体(美国Biolegend公司)。

旋转蒸发器(日本YAMATO公司);循环水式多用真空泵(郑州长城科工有限公司);超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技有限公司);高压均质仪(美国PhD科技有限公司);激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);共聚焦显微镜(Leica公司);酶标仪(Molecular Devices公司);酶联免疫斑点分析仪(美国Cellular Technology公司);流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);透射电子显微镜HT7800(日本日立公司)。

1.2 脂质体表征

1.2.1 光学显微镜观察 用PBS将脂质体稀释100倍,使用漩涡震荡仪混合均匀,将稀释后的液体滴于载玻片中央,盖上盖玻片,在显微镜下观察。

1.2.2 粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)

和 Zeta 电位测定 本实验采用动态散射光技术测定脂质体的粒径及分布。取稀释 10 倍后的脂质体样品将进样槽填满,确保没有气泡产生,使电极片能与液面充分接触。在机器上运行测量程序,运行结束后导出结果,分析脂质体的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

表 1 脂质体制备单因素实验表的设计和分组

Tab. 1 Design and grouping of single factor experiments for liposome preparation

Factor	Group				
Membrane material ratio	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1
Ultrasonic power/W	20	30	40	50	60
Ultrasonic frequency/time	20	30	40	50	60
High-pressure homogenization time/min	4	5	6	7	8

1.3.1 膜材比的选择 精密称取大豆卵磷脂 60 mg、胆固醇 30 mg,置于圆底烧瓶中,加入 10 mL 无水乙醇,常温下搅拌使其溶解形成澄清溶液,将圆底烧瓶连接到旋转蒸发仪,在 45 °C 水浴条件下去除乙醇形成透明薄膜。加入含有多肽抗原(2 mg · mL⁻¹)的 PBS 溶液 5 mL 和 1% 壳聚糖溶液 5 mL 震荡使薄膜充分水化,形成乳白色半透明溶液。然后置于超声波破碎仪中,超声 20 次(20 W,工作 4 s,间歇 4 s,冰水浴),再将得到的半透明溶液置于高压均质机中(100 000 kPa)循环 4 min 得到脂质体。取 1 mL 稀释 100 倍,测定其粒径分布和多分散系数。

保持胆固醇的用量不变,依次改变大豆卵磷脂的用量(90、120、150、180 mg),在其他条件均不变的情况下进行其余 4 组实验,分别测定各组脂质体的粒径分布。

1.3.2 超声功率的选择 以优化后的膜材比制备脂质体,在保持其他因素不改变的情况下,考虑到超声功率过大会导致大量发热,依次改变超声功率(30、40、50、60 W),继续进行其余 4 组实验,分别测定各组脂质体粒径分布和多分散系数。

1.3.3 超声次数/时间的选择 以优化后的膜材比、超声功率制备脂质体,在控制其他因素不改变的情况下,依次改变超声次数(30、40、50、60),继续进行其他 4 组实验,分别测定各组脂质体粒径分布和多分散系数。

1.3.4 高压均质时间的选择 以优化后的膜材比、超声功率、超声次数制备脂质体,在保持其他因素不改变的情况下,依次改变高压均质时间(5、6、7、8 min),继续进行其余 4 组实验,分别测定各组脂质体粒径分布和多分散系数。

1.3.5 最优制备流程验证 根据单因素实验筛选

1.3 脂质体的处方工艺优化

利用单因素考察法对制备流程中可能对脂质体粒径影响较大的 4 个因素,制备方法选择薄膜分散法,以粒径分布和多分散系数为评价指标进行实验,考察因素和分组见表 1。

出的最佳条件,使用薄膜分散法以最优方案分别平行制备 3 批脂质体,测定其平均粒径、多分散系数和 Zeta 电位。

1.4 脂质体的形貌结构观察

将采用优化制备过程得到的脂质体用蒸馏水进行 100 倍稀释。将已稀释的溶液放置于专用铜网上,保持 3 min。利用无尘纸轻轻吸除表面多余的溶液,并在溶液上滴加 2% 的磷钨酸(pH 值为 7.0),负染 1 min。最后,在透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)下进行样品观察并记录影像。

1.5 脂质体对抗原的包封率测定

1.5.1 BCA 蛋白浓度测定法操作过程 ①将 25 μL 的标准品和待测样品分别置于微孔板中;②向每个孔中加入 200 μL 的工作液,并振荡 30 s 以确保混合均匀,在 37 °C 下覆盖并孵育微孔板 30 min;③将孔板冷却至室温后,使用酶标仪在 595 nm 波长下测量光密度(OD)值;④以 BSA 标准品的 OD 值为基准(扣除空白对照孔的 OD 值得到准确读数),制作标准曲线,曲线的 X 轴表示蛋白质质量浓度(μg · mL⁻¹),Y 轴表示相应的 OD_{595 nm} 读数。根据此曲线及样品的稀释倍数,计算出样品中的蛋白质质量浓度。

1.5.2 包封率的测定 将制备完成的脂质体于 4 °C、6 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,取上清液体积 V(mL),加入的抗原总量为 A(mg);测得的上清多肽抗原质量浓度为 ρ(mg · mL⁻¹),按公式 1 计算样品中脂质体对多肽抗原包封率(encapsulation efficiency, EE):

$$EE(\%) = (1 - \rho V/A) \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

1.6 脂质体的稳定性考察

为了考察脂质体溶液在不同温度下储存的稳定性,将同一批制备完成的脂质体分别置于 4 和 25 °C

条件下储存 0、90 和 180 d, 分别通过其外观性状和纳米激光粒度仪分析结果进行比较分析。

1.7 动物免疫

取大豆卵磷脂 25 mg、胆固醇 5 mg 和角鲨烯 25 mg(另 2 种疫苗分别添加 QS-21 及同时添加 QS-21 和 MPLA, 100 μg)溶于 5 mL 无水乙醇中, 常温下搅拌使其溶解形成澄清溶液, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下使用旋转蒸发器除去乙醇形成透明薄膜。加入含有多肽抗原 2 mg 的 PBS 1 mL 和 1 mL 配制好的 1% 壳聚糖溶液震荡使薄膜充分水化, 形成乳白色半透明溶液。置于超声波破碎仪中, 冰水浴下超声 40 次(30 W, 工作 4 s, 间歇 4 s), 再将得到的半透明溶液置于高压均质机(100 000 kPa)均质循环 6 min 得到脂质体 $S_{450-471} + S@LIPO$ (添加 QS-21 的脂质体 $S_{450-471} + S + Q@LIPO$, 添加 QS-21 和 MPLA 的脂质体 $S_{450-471} + S + M + Q@LIPO$)。

取 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多肽溶液 2 mL, 加入 100 μg QS-21 即得到游离新冠多肽疫苗($S_{450-471} + QS-21$)。

将健康的雌性 BALB/c 小鼠随机分成 5 组, 每组 5 只, 其中 1 组为空白对照组, 其他 4 组为接种新冠多肽疫苗的实验组(表 2)。实验组小鼠分别在第 0 天(首次免疫)和第 14 天(加强免疫, 剂量减半)分别在背部皮下多点注射接种新冠多肽疫苗, 免疫剂量为每只 200 μL 。在第 2 次加强免疫后 14 d 将小鼠处死, 采集小鼠血液和脾脏样本, 使用 ELISA 和流式细胞术对样本进行检测。本实验通过解放军总医院动物实验伦理委员会的审批。

表 2 脂质体多肽疫苗免疫效果评价实验的设计和分组

Tab. 2 Design and grouping of experiments for evaluating the immune effect of liposome peptide vaccine

Group	Formula
B Blank	Blank control
Q $S_{450-471} + Q$	Peptide + QS-21
S $S_{450-471} + S@LIPO$	Peptide + liposome + squalene
SQ $S_{450-471} + S + Q@LIPO$	Peptide + liposome + squalene + QS-21
SMQ $S_{450-471} + S + M + Q@LIPO$	Peptide + liposome + squalene + MPLA + QS-21

1.8 血清抗体滴度测定

多肽抗原的血清特异性结合抗体 IgG 及其亚型滴度的测定采用 ELISA 法来检测, 具体的实验步骤如下: ①包被: 用包被缓冲液将抗原稀释至 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。向每个 ELISA 板孔中加入 0.1 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液

洗 3 次, 每次 3 min(简称洗涤, 下同); ②封闭: 分别向各板孔中加入 0.1 mL 的封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次; ③加样: 分别加一定稀释倍数的待检样品 0.1 mL 和梯度稀释后的抗体标准品 0.1 mL 于上述已包被好的反应孔中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔)。④加酶标抗体: 于各反应孔中, 加入 0.1 mL 新鲜稀释的酶标抗体(1:10 000)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次; ⑤加底物液显色: 于各反应孔中加入 0.1 mL 新鲜配制的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10~30 min; ⑥终止反应: 于各反应孔中加入 50 μL 的 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸; ⑦结果判定: 将 ELISA 板置于酶标仪上, 于 450 nm 处读取各孔的 OD 值。当待测血清样品 OD 值大于未处理的正常小鼠血清 OD 值的 2 倍时定义为阳性, 最小阳性 OD 值对应的血清稀释度即为血清抗体滴度。

1.9 脾脏淋巴细胞中 T 细胞亚群分析

将脾脏细胞悬液离心后收集沉淀。用 100 μL 无菌 PBS 重悬细胞, 分别加入流式荧光标记抗体 CD3-FITC、CD4-APC、CD8a-PE 染色, 避光静置 30 min。而后于 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL PBS 清洗 2 次, 最后用 200~300 μL 无菌 PBS 重悬装入流式管中, 使用流式细胞仪进行检测, 检测前混匀细胞。

1.10 统计分析方法

使用 GraphPad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计学分析, 实验数据计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 优化前的脂质体制备及表征

制备流程优化前制备的脂质体外观见图 1, 溶液均一无杂质, 呈半透明溶液状, 在倒置显微镜下放大 200 倍观察, 脂质体成粒径均匀的球状小颗粒。

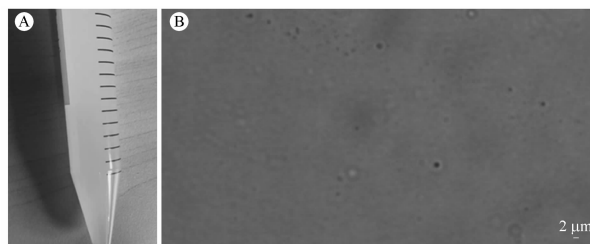


图 1 脂质体外观(A)及其在显微镜下的图片(B)

Fig. 1 Liposome (A) and its picture under the microscope (B)

经纳米激光粒度仪检测,制备的脂质体平均粒径为 329.7 nm, PDI 为 15.0% (图 2)。说明所得脂质体虽然性状均一, 比较稳定, 但是平均粒径仍较大, 有必要通过优化制备流程得到理化性质更好的脂质体。

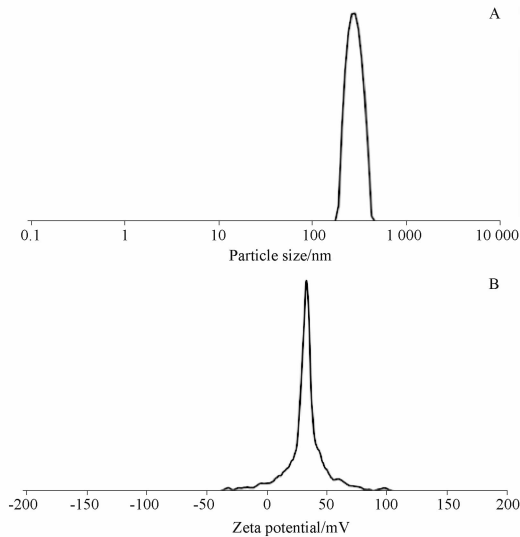


图 2 脂质体的粒径分布(A)和 Zeta 电位分布(B)
Fig. 2 Particle size distribution(A) and Zeta potential distribution(B) of liposomes

2.2 脂质体的处方工艺优化

2.2.1 膜材比筛选结果 实验结果见表 3, 随着膜材比的增加, 脂质体的粒径变小, 当膜材比为 5:1, 脂质体的平均粒径在理想范围内且最小, 当膜材比

为 6:1 时, 脂质体的平均粒径又有所增加, 结合对多分散系数的分析得出, SPC 与 Chol 的比例为 5:1 时, 制备的脂质体最优。

2.2.2 超声功率的筛选结果 由表 4 可知, 当超声功率为 30 W、平均粒径为 162.2 nm、PDI 为 18.3% 时, 所制备的脂质体最好; 当超声功率为 60 W 时, 功率较大导致溶液温度明显升高, 脂质体的粒径偏大, PDI 为 0.351, 分散程度也明显变大, 不适合作为制备条件。

2.2.3 超声次数的筛选结果 由表 5 可知, 当超声次数为 40 次时, 所得脂质体物理性质最优。实验过程中发现, 当超声次数为 60 次时, 置于超声破碎机内的样品溶液温度较高, 从表 5 结果也可以看出, 过高的温度导致所制备的脂质体平均粒径和 PDI 升高, 提示在脂质体制备过程中要考虑温度的影响。

2.2.4 高压均质时间的筛选结果 由表 6 可知, 不同条件下制备的脂质体均符合要求, 当高压均质时间为 6 min 时, 所制备的脂质体平均粒径最小, PDI 最小, 粒径分布比较均匀, 因此最佳的高压均质时间为 6 min。

2.2.5 最优处方工艺验证结果 薄膜分散法 3 个批次制备的脂质体平均粒径为 132.0 nm、PDI 值为 17.8%、Zeta 电位为 35.6 mV, 符合实验设计的要求, 说明该最优处方可靠, 见表 7。

2.3 脂质体的形貌结构结果

透射电镜下观察脂质体的结构见图 3, 分散性良好, 形态规整, 近似圆形, 粒径大小在 100 nm 左右。

表 3 不同膜材比条件下制备脂质体的粒径分布

Tab. 3 Particle size distribution of liposomes prepared under different membrane material ratios

Membrane material ratio	Ultrasonic power /W	Ultrasonic frequency/times	High-pressure homogenization time/min	Mean particle size/nm	Polydispersity index(PDI)
2:1	20	20	4	325.8	0.153
3:1	20	20	4	263.7	0.181
4:1	20	20	4	226.3	0.193
5:1	20	20	4	183.2	0.186
6:1	20	20	4	195.1	0.181

表 4 不同超声功率条件下制备脂质体的粒径分布

Tab. 4 Particle size distribution of liposomes prepared under different ultrasonic powers

Membrane material ratio	Ultrasonic power /W	Ultrasonic frequency/times	High-pressure homogenization time/min	Mean particle size /nm	PDI
5:1	20	20	4	181.7	0.186
5:1	30	20	4	162.2	0.183
5:1	40	20	4	171.4	0.183
5:1	50	20	4	185.9	0.216
5:1	60	20	4	244.4	0.351

表5 不同超声次数条件下制备脂质体的粒径分布

Tab. 5 The experimental data records under different number of ultrasound times

Membrane material ratio	Ultrasonic power /W	Ultrasonic frequency/times	High-pressure homogenization time/min	Mean particle size/nm	PDI
5:1	30	20	4	162.2	0.183
5:1	30	30	4	154.3	0.192
5:1	30	40	4	143.1	0.177
5:1	30	50	4	147.5	0.194
5:1	30	60	4	183.8	0.220

表6 不同高压均质时间条件下制备脂质体的粒径分布

Tab. 6 The experimental data records under different high pressure homogenization time

Membrane material ratio	Ultrasonic power /W	Ultrasonic frequency/times	High-pressure homogenization time/min	Mean particle size/nm	PDI
5:1	30	40	4	143.1	0.183
5:1	30	40	5	138.3	0.177
5:1	30	40	6	133.1	0.170
5:1	30	40	7	136.5	0.186
5:1	30	40	8	153.8	0.185

表7 最优处方工艺制备3批次脂质体的验证结果

Tab. 7 Validation results of 3 batches of liposomes prepared by optimal formulation process

Preparation method	Mean particle size/nm	PDI	Zeta potential/mV
Thin film dispersion method	132.4	0.180	35.3
Thin film dispersion method	130.5	0.174	36.0
Thin film dispersion method	133.2	0.181	35.6

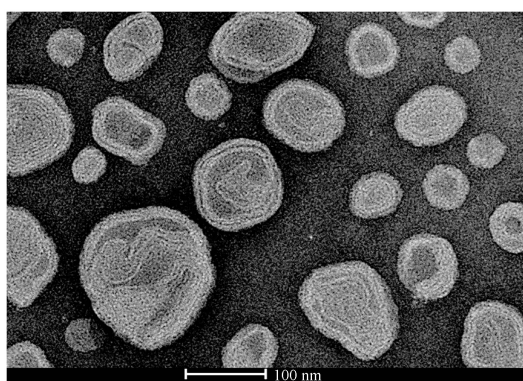


图3 脂质体透射电镜(TEM)检测结果(×100 000)

Fig. 3 TEM detection results of liposomes (×100 000)

2.4 脂质体对抗原的包封率测定结果

通过BCA蛋白浓度法建立的已知浓度多肽抗原标准曲线方程为: $Y = 0.000\ 352\ 5X + 0.073\ 32$ ($r^2 = 0.997\ 3$), 其方程的标准曲线见图4。

脂质体中多肽抗原质量浓度为 $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取1 mL脂质体溶液多次离心累计取上清液共0.6 mL,

在酶标仪595 nm条件下检测到上清液的OD值为0.209(已减去空白孔OD值)。将该值代入多肽抗原标准曲线可得此时上清液中蛋白质量浓度为 $384.9\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此时 $V = 0.6\ \text{mL}$, $\rho = 384.9\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $A = 1\ 000\ \mu\text{g}$, 代入公式1计算得包封率为76.9%。脂质体对抗原的包封率较高, 具有作为疫苗免疫载体的潜力。

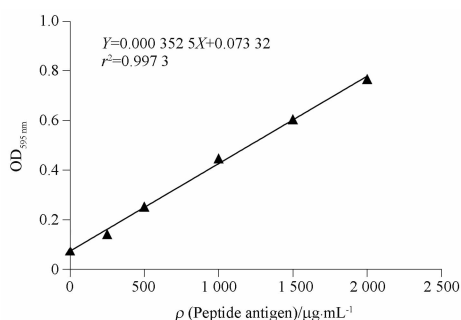


图4 多肽抗原S₄₅₀₋₄₇₁的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of peptide antigen S₄₅₀₋₄₇₁

2.5 脂质体的稳定性考察结果

将同批次制备好的脂质体分别置于4和25℃条件下储存0、90和180 d后观察, 发现置于4℃储存的脂质体外观性状无明显差异, 平均粒径也无明显变化, 而置于25℃下储存的脂质体随着时间的增长, 液体颜色加深, 提示可能出现聚集现象, 且粒径随着储存时间增加明显变大(图5)。说明脂质体在4℃的条件下长期储存比较稳定。

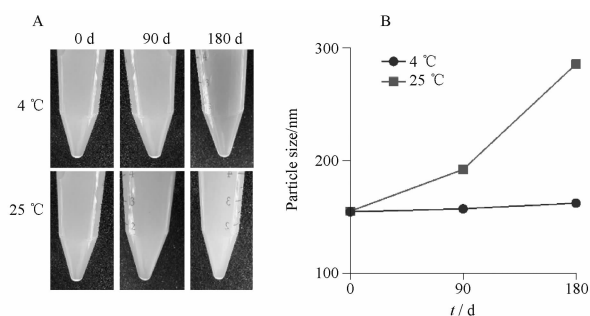


图5 脂质体在4和25℃条件下储存0、90、180 d后的外观(A)和粒径(B)

Fig. 5 Appearance(A) and particle size(B) of liposomes after 0, 90, and 180 d of storage at 4 and 25 °C

2.6 血清特异性抗体滴度

机体接收到外来抗原的刺激信号后,免疫系统的部分B淋巴细胞成熟分化为效应B细胞,产生特异性结合抗体,其中IgG是血清中特异性结合抗体的主要成分,具有抗病毒、中和病毒、抗菌及免疫调节的功能。在小鼠第2次免疫后14 d,收集其外周血离心取血清,检测血清中多肽抗原 $S_{450-471}$ 特异性结合抗体IgG的滴度水平。结果显示,Q组抗体滴度约为4 000,S组抗体滴度约为 1.6×10^4 ,SQ组中抗体滴度达到 3.2×10^4 以上,SMQ组的抗体滴度最高为 6.4×10^4 (图6)。

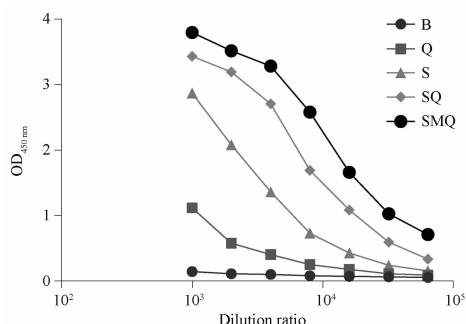


图6 小鼠血清中 $S_{450-471}$ 特异性结合抗体IgG的滴度水平

Fig. 6 Titer levels of $S_{450-471}$ specific binding antibody IgG in mouse serum

辅助性T淋巴细胞(helper T lymphocytes, Th)介导的抗原应答可分为两种,Th1细胞通过释放Th1型细胞因子 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\beta$ 等诱导倾向细胞免疫应答,诱导产生IgG2a抗体;而Th2型细胞通过释放Th2型细胞因子IL-4、IL-10等诱导倾向体液免疫应答,产生IgG1抗体。对于由病毒引起的传染病,需要通过Th1来活化巨噬细胞、B细胞和 $CD8^+$ 细胞毒性T细胞的功能来直接杀死已经被感染和病变

的细胞^[25]。接下来检测了 $S_{450-471}$ 特异性结合抗体IgG2a的滴度水平,其中Q与对照组B无明显差异,仅略有升高,S达到8 000以上,SQ达到 1.6×10^4 以上,SMQ为 3.2×10^4 以上(图7),其结果基本与 $S_{450-471}$ 特异性结合抗体IgG的趋势相符。

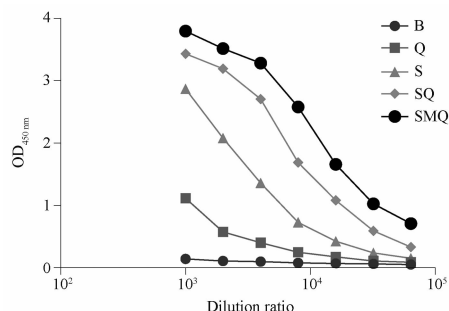


图7 小鼠血清中 $S_{450-471}$ 特异性结合抗体IgG2a的滴度水平

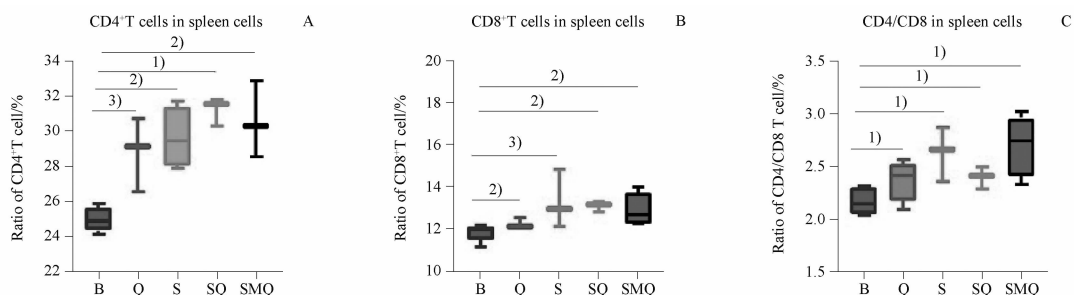
Fig. 7 Titer level of $S_{450-471}$ specific binding antibody IgG2a in mouse serum

2.7 脾脏细胞T淋巴细胞亚型检测

在第2次免疫后14 d收集小鼠脾脏细胞进行T淋巴细胞亚型检测。相对于空白对照组B(24.9%),疫苗实验各组脾脏淋巴细胞中 $CD4^+$ T淋巴细胞比例明显升高(图8A);而在 $CD8^+$ T淋巴细胞比例的结果中,相对于B(11.84%),实验组Q(12.21%)、S(13.27%)、SQ(13.06%)和SMQ(12.86%)均有不同程度的升高(图8B);与此同时,经计算发现各实验组 $CD4/CD8$ 比值较对照组明显升高(图8C)。以上各组数据均具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

脂质体的理化性质是决定脂质体发挥作用效果的重要影响因素,粒径及其分布是判断脂质体是否合格的重要指标。研究表明,纳米颗粒(< 200 nm)更容易通过淋巴引流进入淋巴结^[26],并促进抗原提呈细胞的吸收,使其更适合传递分子佐剂和抗原^[27-29]。单因素实验得到的最优的制备条件为:膜材比5:1、超声功率30 W、超声次数40次、高压均质时间6 min,使脂质体的平均粒径从329.7 nm减小至132.0 nm,对此制备流程进行了验证,其结果与预期相符,且PDI均在30%以下,说明脂质体粒径分布比较均匀^[30];利用BCA蛋白浓度法测定脂质体对多肽抗原 $S_{450-471}$ 的包封率为76.9%;在透射电镜下观察其形态规整,近似圆形,其大小与动态



与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, vs blank group.

图 8 小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺T 细胞(A)、CD8⁺T 细胞(B)和 CD4/CD8(C) 比例。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Proportion of CD4⁺T cell(A), CD8⁺T cell(B) and CD4/CD8(C) in spleen lymphocytes of mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

散射光测定的粒径分布基本相符;随后对稳定性进行了评价,发现在 4 °C 储存的稳定性较好,180 d 后其外观和粒径无明显变化,明显优于在 25 °C 条件下储存。在优化后脂质体处方工艺的基础上,以负载角鲨烯的脂质体为研究对象,并将其与 MPLA 和 QS-21 佐剂联用构建复合佐剂免疫递送系统,通过小鼠体内免疫实验评价其免疫效果。SMQ 在免疫后的血清抗体效价较高,有效激活小鼠体液免疫,并且通过促进 Th1 反应诱导 IgG2a 产生,其中效果 SMQ 明显最好。流式分析结果显示,脂质体多肽疫苗的脾脏 T 淋巴细胞中的 CD4⁺T 细胞比例显著升高($P < 0.05$),这与 Peng 等^[31]在新型冠状病毒感染康复的患者中发现针对病毒刺突蛋白的 CD4⁺T 细胞反应的比例较高的结果相似。机体被新型冠状病毒感染的主要特征是 CD4⁺T 淋巴细胞数量的减少和 CD4/CD8 比值的下降。CD4⁺T 淋巴细胞数量越少,新型冠状病毒感染的程度越严重^[32-33]。因此,在本研究中,免疫小鼠血清和脾细胞中 T 细胞 CD4/CD8 比值的升高,提示机体免疫功能增强。有研究表明,随着 CD4⁺T 淋巴细胞的含量增多,机体接触外来病原体时启动免疫反应的速度更快,能更迅速地对抗病原体,提示机体的免疫功能得到了提高^[34]。CD4⁺T 细胞比例的增加会辅助 B 细胞产生抗体为主的体液免疫反应,同时促进以 CD8⁺T 细胞为主的 Th1 方向的细胞免疫反应^[35-36]。结果发现,各疫苗组 CD4⁺T 和 CD8⁺T 比例以及 CD4/CD8 的比值均明显高于对照组,说明多肽疫苗有效促进了小鼠的细胞免疫,机体的免疫功能增强,其中疫苗 SMQ 的效果最好。所以,综合效果最优的复合佐剂免疫递送系统组合为:脂质体 + 角鲨烯 + MPLA + QS-21,不但能高效激活小鼠体液免疫,而且能促进 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞免疫,增强小鼠的

细胞免疫功能。

综上所述,本研究优化了脂质体处方和制备工艺条件,并通过实验筛选得到了能有效递送新型冠状病毒多肽抗原并增强机体免疫效果的新型复合佐剂脂质体免疫递送系统,由于基于脂质的配方技术已经广泛应用,这种纳米疫苗可能具有良好的临床应用潜力。为基于脂质体的新冠多肽疫苗研发提供了良好的研究基础。

REFERENCES

- [1] HOS B J, TONDINI E, VAN KASTEREN S I, *et al.* Approaches to improve chemically defined synthetic peptide vaccines [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 884. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00884.
- [2] NELDE A, RAMMENSEE H G, WALZ J S. The peptide vaccine of the future [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100022. DOI: 10.1074/mcp.R120.002309.
- [3] HENRIKSEN-LACEY M, KORSHOLM K S, ANDERSEN P, *et al.* Liposomal vaccine delivery systems [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8(4):505-519.
- [4] XU L, WANG X, LIU Y, *et al.* Lipid nanoparticles for drug delivery [J]. *Adv NanoBiomed Res*, 2021, 2(2):2100109. DOI: 10.1002/anbr.2100109.
- [5] CHAUHAN G, MADOU M J, KALRA S, *et al.* Nanotechnology for COVID-19: therapeutics and vaccine research [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(7):7760-7782.
- [6] DU J J, ZOU S Y, CHEN X Z, *et al.* Liposomal antitumor vaccines targeting mucin 1 elicit a lipid-dependent immunodominant response [J]. *Chem Asian J*, 2019, 14(12):2116-2121.
- [7] ANTIMISIARIS S G, MARAZIOTI A, KANNAVOU M, *et al.* Overcoming barriers by local drug delivery with liposomes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 174: 53-86.
- [8] NAKANISHI T, KUNISAWA J, HAYASHI A, *et al.* Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins [J]. *J Controlled Release*, 1999, 61(1-2):233-240.
- [9] CHIKH G G, KONG S, BALLY M B, *et al.* Efficient delivery of antennapedia homeodomain fused to CTL epitope with liposomes into dendritic cells results in the activation of CD8⁺T cells [J]. *J Immunol*, 2001, 167(11):6462-6470.
- [10] FOGED C, ARIGITA C, SUNDBLAD A, *et al.* Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition [J]. *Vaccine*, 2004, 22(15-16):1903-1913.

- [11] PÉREZ-BETANCOURT Y, TÁVORA B, COLOMBINI M, *et al.* Simple nanoparticles from the assembly of cationic polymer and antigen as immunoadjuvants [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(1):105.
- [12] ALAVI S, HAERI A, DADASHZADEH S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 157: 991-1012.
- [13] KUMAR S, DUTTA J, DUTTA P K, *et al.* A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 160: 470-481.
- [14] TAN C, FENG B, ZHANG X, *et al.* Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 774-784.
- [15] BIAN Y H, GAO D W, LIU Y P, *et al.* Preparation and study on anti-tumor effect of chitosan-coated oleanolic acid liposomes [J]. *Rsc Adv*, 2015, 5(24):18725-18732.
- [16] KENSIL C R, SOLTYSIK S, WHEELER D A, *et al.* Structure/function studies on QS-21, a unique immunological adjuvant from *Quillaja saponaria* [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 404: 165-172.
- [17] LIU J D, ZHANG J Z, XU Y F, *et al.* Progress in research on licensed adjuvant for prophylactic vaccine for human use [J]. *Chin J Biol (中国生物制品学杂志)*, 2020, 33(4):455-460.
- [18] GAO J, GUO Z. Progress in the synthesis and biological evaluation of lipid A and its derivatives [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(2):556-601.
- [19] REED S G, CARTER D, CASPER C, *et al.* Correlates of GLA family adjuvants' activities [J]. *Semin Immunol*, 2018, 39: 22-29.
- [20] ZHU D, TUO W. QS-21: a potent vaccine adjuvant [J]. *Nat Prod Chem Res*, 2016, 3(4):e113.
- [21] DIDIERLAURENT A M, LAUPÈZE B, DI PASQUALE A, *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines [J]. *Exp Rev Vaccines*, 2017, 16(1):55-63.
- [22] SHIMIZU N, ITO J, KATO S, *et al.* Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):9116.
- [23] GÓRNAS P, RUDZIŃSKA M, RACZYK M, *et al.* Impact of cultivar on profile and concentration of lipophilic bioactive compounds in kernel oils recovered from sweet cherry (*Prunus avium* L.) by-products [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2016, 71(2): 158-164.
- [24] GUPTA T, GUPTA S K. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106717.
- [25] LIEW F Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(1):55-60.
- [26] CHEN Y, de KOKER S, de GEEST B G. Engineering strategies for lymph node targeted immune activation [J]. *Acc Chem Res*, 2020, 53(10):2055-2067.
- [27] JIANG H, WANG Q, SUN X. Lymph node targeting strategies to improve vaccination efficacy [J]. *J Controlled Release*, 2017, 267: 47-56.
- [28] TREVASKIS N L, KAMINSKAS L M, PORTER C J. From sewer to saviour-targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(11): 781-803.
- [29] WU X, LI Y, CHEN X, *et al.* A surface charge dependent enhanced Th1 antigen-specific immune response in lymph nodes by transfersome-based nanovaccine-loaded dissolving microneedle-assisted transdermal immunization [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(31):4854-4866.
- [30] DANAEI M, DEGHANKHOLD M, ATAIEI S, *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2):57. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [31] PENG Y, MENTZER A J, LIU G, *et al.* Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11):1336-1345.
- [32] SUN H B, ZHANG Y M, HUANG L G, *et al.* The changes of the peripheral CD4⁺ lymphocytes and inflammatory cytokines in patients with COVID-19 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0239532.
- [33] SATTTLER A, ANGERMAIR S, STOCKMANN H, *et al.* SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(12):6477-6489.
- [34] KENT S J, KHOURY D S, REYNALDI A, *et al.* Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19: leading actors or supporting cast? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(6):387-397.
- [35] MECKIFF B J, RAMÍREZ-SUÁSTEGUI C, FAJARDO V, *et al.* Imbalance of regulatory and cytotoxic SARS-CoV-2-reactive CD4⁺ T cells in COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, 183(5):1340-1353. e16.
- [36] TAY M Z, POH C M, RÉNIA L, *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(6):363-374.

(收稿日期:2024-04-02)