

利用纳米材料制作多肽疫苗佐剂的思考*

吕凤林** 何凤慈

(第三军医大学野战外科研究所, 重庆 400042)

摘要 纳米粒子与生物体有着密切的关系, DNA/蛋白质复合体就在 15~20 nm 之间, 多种病毒颗粒也是纳米级的超微粒子。多肽抗原需要与适当载体形成复合物才能诱导有效的免疫应答, 但载体效应难以避免。纳米佐剂可以避免载体效应的发生, 而且还是巨噬细胞 (M Φ)、树突状细胞 (DC) 的首选吞噬目标。纳米化的有机药物可提高其生物利用度、制剂的均匀性、分散性和吸收性; 脂质体可使药物更快地到达靶向部位, 而且特异性更强。目前主要用理化的方法制作纳米材料, 几乎所有的生化药品, 特别是 DNA 药物的研究开发都可引入纳米材料, 多肽疫苗的分子佐剂更是如此。

关键词 纳米生物学, 多肽疫苗, 表位

学科分类号 R392.1, R318.08

Kreuter 等^[1]发现流感病毒抗原与多聚甲基丙烯酸酯 (poly methyl methacrylate, PMMA) 纳米颗粒聚合制作的流感病毒疫苗可保护小鼠免受鼠流感病毒侵袭, 而且, 该疫苗比氢氧化铝佐剂和未使用佐剂的疫苗对温度变化更为稳定。由于当时生产工艺和相关研究的限制, 没有引起人们的足够重视。后来他们又以纳米颗粒和微米颗粒作药物载体, 发现分散体形式的药物更有利于小肠吸收, 甚至发现 Tween-80 包被的纳米颗粒可使小分子多肽和一些药物跨越血-脑屏障^[2]。现在, 纳米科技已广泛应用于材料科学领域。在生物学、医学等领域也将产生积极影响, 因此研制纳米疫苗及其纳米佐剂在抗病毒感染、肿瘤治疗、疫苗开发等方面具有重要的理论和实际意义。

1 多肽疫苗及其佐剂的优势与局限

由于病原微生物的多样性和菌/毒株的多变性, 制作全价的通用疫苗愈来愈困难了, 由此提出了“表位生物学”的概念, 许多蛋白质抗原, 特别是肿瘤相关抗原的表位相继得到鉴定, 设计、开发治疗性抗肿瘤药物已成现实, 多肽疫苗也开始受到人们的广泛重视并呈现极大的发展空间, 取得了一些成果, 究其原因是因为肽苗具有安全性好、容易获得、纯度高等优点。但所存在的缺点是不可避免的, 一是合成多肽的直链结构, 在整个功能上可能与天然分子不完全相同; 二是合成多肽的半衰期短, 在体内一般只有数分钟, 蛋白酶可将其迅速降解; 更为关键的还是表位多肽分子小, 免疫原性较弱, 难以刺激甚至根本不能刺激产生有效的免疫应答; 再者, 合成多肽在 APC 细胞膜表面与 MHC-II 或 MHC-I 类

分子的结合效率比在溶酶体中要低得多。于是试图使用佐剂来解决这些问题, 将多肽抗原与 BSA、KLH、HSP 等蛋白质偶联; MAP 连接方式提高多肽的拷贝数和分子质量; 与一些毒素偶联; 与树突状细胞共孵育; 以 QS-21 或 Quil A 为佐剂; 与其他多肽或 MHC 分子偶联形成复合物; 含 CpG 基序的寡核苷酸为佐剂; 以 HIV-1 M 型的 Tat (53~68)、O 型的 Tat (9~20) 和功能结构域 Tat (21~40) 等多肽为佐剂; 以 LT (R192G) 制作的粘膜免疫佐剂等, 此外还在构建脂肽、免疫刺激复合物 (ISCOM) 等方面做了大量的探索^[3~6], 取得了一些成果, 但效果却各说不一, 特别是人用佐剂还有不少问题, 制作 T 细胞疫苗或 CTL 疫苗佐剂还需要做更多的工作^[3]。铝盐用于人类疫苗佐剂已有近 80 年的历史, 但减毒活疫苗或多价疫苗不能与铝盐佐剂混用, 也不能诱导产生 Th1 细胞和 CTL 免疫反应, 它使疫苗的免疫保护不全面、不持久。CpG ODN 佐剂在一定程度上解决了该问题, 也能诱导更强的免疫反应, 但 CpG ODN 佐剂仍需要与铝盐混用才有更好的效果, 而且其免疫激活机制尚不明了, 动物实验结果与人体不一致的情况常常发生^[3]。

2 多肽药物/抗原与超微粒载体偶联可提高其生物利用率/抗原性

2.1 药物与超微粒载体偶联后的特性变化

2.1.1 改变蛋白质分子的多晶型可以提高其生物

* 国家自然科学基金资助项目 (30170884)。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68804699, E-mail: Lufenglin@hotmail.com

收稿日期: 2001-02-14, 接受日期: 2001-04-05

利用率: 多晶型概念强调同一种分子在不同固态晶格中的不同填充、排列方式. 同一种元素或化合物存在多晶现象. 蛋白质、核酸等生物大分子存在多晶现象, 多晶型已广泛应用在有机药物领域中.

2.1.2 粉体对多肽药物的影响: 粉体就是固体细小粒子的集合体, 粉粒的理化特性对药物质量有明显影响. 将药物溶解制成囊状物或包在聚合物基质中的超微球, 使其大小在 50 nm 到数微米的范围内, 可以解决药物的均匀性分布问题. 将胰岛素置于 PMMA 纳米囊中, 降糖效果可持续 6~8 d, 这是胰岛素非注射途径最具实用价值的给药剂型.

2.1.3 纳米药物制剂: 纳米材料是晶粒尺寸小于 100 nm 的单晶体或多晶体, 具有独特的小尺寸效应和界面效应, 在药学领域已经显示出广泛的应用前景. 有机药物经超微粉碎后可提高其生物利用度、制剂的均匀性、分散性和吸收性, 几乎所有的生化药品, 如抗癌药、抗心血管病药、抗艾滋病和糖尿病药, 特别是 DNA 药物的研究开发都可引入纳米材料. 粒径小于 50 nm 的微粒, 能穿过肝脏内皮或通过淋巴传递到达脾和骨髓, 也可能到达肿瘤部位. Castignolles 等^[7]用纳米聚多糖 (polymerized polysaccharides) 代替磷酸盐作为蛋白质药物载体, 并与脂质体分子共价偶联, 制作狂犬病毒抗原佐剂, 发现狂犬病毒糖蛋白抗原和核糖核蛋白均可增强抗体的产生, 而且还可增强机体对狂犬病毒的保护能力, 使用纳米佐剂可达最佳的体液免疫效应, 体外还可刺激 B 细胞的增殖.

2.1.4 脂质体: 磷脂双分子层膜的脂质体, 粒径 0.02~5 μm , 易与生物膜融合, 可以协助药物进入生物膜, 携带单克隆抗体的脂质体能将药物高效、特异地转到靶向部位. 利用氨基酸与磷脂酰乙胺或胆固醇共价结合后制成带正电荷的脂质体, 与中性或带负电荷脂质体相比, 前者能明显增加药物的滞留时间. Plum 等^[8]发现 FGF-2 (basic fibroblast growth factor-2) 的肝素结合域多肽与脂质体偶联后免疫小鼠, 能诱导特异性抗体产生, 在 B16BL6 黑色素瘤和 Lewis 肺癌的小鼠模型中, 抑瘤率 90% 以上. Vitiello 等^[9]发现治疗慢性 HBV 感染的表位多肽疫苗的免疫原性很弱, 使用 HBV 核心抗原第 18~27 位氨基酸序列作为 CTL 表位多肽、以破伤风类毒素第 830~843 位氨基酸序列作为 Th 表位多肽、以棕榈酸 (palmitic acid) 作为脂质佐剂分子, 将它们共价结合后就显著提高了 CTL 多肽的免疫原性, 接种 26 位正常人后发现此疫苗安全性好、能诱导初次

HBV 特异的 CTL 反应.

2.2 多肽抗原与纳米载体偶联的可行性

多肽抗原大多是一种半抗原, 需要与适当载体形成复合物才能诱导有效的免疫应答, 但载体效应又难以避免. 使用无机物超微粒载体可以避免载体效应的发生. 另外, 超微粒载体的均匀性好, 包裹的抗原颗粒正是巨噬细胞 ($M\Phi$) 和树突状细胞 (DC) 的首选吞噬目标, 为实现机体有效的免疫反应完成了重要的一步; 在这些专职 APC 内分布性好, 能与相应蛋白酶类充分反应, 最后呈现在细胞表面, 实现对这些抗原的提呈; 天然的 20~30 nm 的 HBsAg 颗粒对 CTL 前体细胞具有高度的免疫原性, 而凝集的 1 μm 的变性的 HBsAg 颗粒对 CTL 前体细胞只有很低的免疫原性. 纳米粒子与生物体有着密切的关系, DNA/蛋白质复合体就在 15~20 nm 之间, 多种病毒颗粒也是纳米级的超微粒子. 此外, 用纳米 SiO_2 微粒可进行细胞分离; 胶体金已使检测速度大大提高, 但采用纳米金制作 DNA 芯片, 使芯片集成度提高, 其检测速度还将提高数十倍甚至更高. 研究纳米生物学可以在纳米尺度上了解生物大分子的精细结构及其与功能的关系, 获取生命信息, 特别是细胞内的各种信息; 利用纳米粒子研制成机器人, 注入人体血管内, 对人体进行全身健康检查, 疏通脑血管中的血栓, 清除心脏动脉脂肪沉积物, 甚至还能吞噬病毒、杀死癌细胞等. Ludewig 等^[10]将脂质体与 LCV 外壳蛋白多肽抗原偶联后再活化 DC 细胞, 使多肽抗原的免疫原性和抗原性大大提高, 若将活化的 DC 细胞再与寡核苷酸一起还可进一步提高脂质体多肽疫苗的抗原性, 并诱导抗肿瘤的 CTL 反应. Scholer 等^[11]发现: 固相纳米脂质体 (solid lipid nanoparticles, SLN) 对小鼠腹腔巨噬细胞有免疫调节作用和细胞毒性, 低浓度的脂质体与巨噬细胞共孵育不能增加 IL-6、IL-12 和 TNF- α 的产生; 高浓度的脂质体会减少 IL-6 的分泌, 且呈浓度依赖关系; 各种浓度的脂质体均不能刺激产生 IL-12 和 TNF- α , 对照组也一样, SLN 的细胞毒性与 IL-6 分泌减少相一致, 也呈浓度依赖关系, 相反, 用聚苯乙烯 (polystyrene) 则不能导致 IL-6 的减少, 也不能降低细胞活性. 尽管 SLN 诱导的细胞毒性与使用浓度呈剂量依赖关系, 但是用过山梨糖 (Parr sorbin) 刺激受 SLN 处理过的巨噬细胞则可上调细胞因子的产生, 没有发现对 IL-10 的下调作用. Frey 等^[12]将 HIV-1gp120 第 4 恒定区多肽 (C4) 首尾相连, 形成多肽同聚体 (peptide

homopolymers), 与纳米氧化铝共价偶联, 以亲水性胞壁酰二肽 (muramyl dipeptide, MDP) 佐剂为对照, 结果发现: C4 加纳米佐剂可诱导最强的抗体反应, 并对 HIV-1 gp120 重组蛋白转染细胞和 HIV-1 病毒感染的 T-细胞都有最强的反应性, 因此, 纳米佐剂对构象性表位多肽疫苗可起到很好的辅佐效果. Kim 等^[13] 发现: 幽门螺杆菌裂解产物与纳米级的 PLG (poly-D, L-lactide-co-glycolide) 偶联制作口服疫苗免疫小鼠, 能诱导粘膜产生 IgA, 血清抗体亚类为 IgG1 和 IgG2b, 说明纳米佐剂能辅助抗原诱导机体特异的粘膜免疫和全身免疫反应, 还可增强 Th2 细胞参与的免疫反应. Stieneker 等^[14] 用 HIV-2 全病毒作为疫苗, 与纳米 PMMA 偶联后免疫小鼠, 又以氢氧化铝佐剂和水溶性抗原为对照, 发现前者诱导的抗体滴度较对照组高 10~100 倍, 接种后可在体内持续 10~20 周, 对照组接种 10 周后便大幅下降.

3 多肽抗原与纳米载体偶联的一般方法

3.1 物理方法

主要包括真空冷凝法、物理粉碎法、机械球磨法等. 用真空蒸发、加热、高频感应等方法使原料气化或形成等粒子体, 然后骤冷, 可以获得纯度高、结晶组织好的纳米材料, 而且可以控制粒度, 但技术设备要求高. 采用机械方法使有机药物纳米化的不多见. 物理粉碎法是通过机械粉碎、电火花爆炸等手段得到纳米粒子, 操作简单、成本低, 只是产品纯度偏低, 颗粒分布不均匀, Kreuter^[15] 用理化方法生产 PMMA 纳米材料, 而且可人为控制颗粒大小, 抗原吸附或偶联在纳米颗粒上. 无论何种抗原, 特别是一些病毒性抗原和亚单位疫苗, 如 BSA、HIV-1 和 HIV-2 等, 只要与纳米 PMMA 颗粒偶联后, 均可显著提高其抗体反应, 而且持续时间更长. 此外, 流感病毒或其亚单位抗原吸附纳米 PMMA 后, 其稳定性更好, 但是, 不同的抗原需要不同的佐剂或载体, 有时为了对抗原复合体产生有效的免疫应答, 有必要同时使用两种或两种以上的佐剂或载体, PMMA 是较为安全的佐剂材料, 其生物降解率很低, 在外科领域已有 40 多年的使用历史, 有理由相信, 可将其作为新型的疫苗佐剂. 以超声速度喷射固体粉末的喷气对撞式粉碎机, 可产生 2 倍于音速的撞击力, 使粉末粒度达到纳米级. 采用机械球磨方法, 控制适当的条件可以得到纯元素、合金或复合材料的纳米粒子, 具有操作简单、成本低等优点, 但产品纯度偏低, 颗粒分布不均匀.

3.2 化学方法

主要采用气相沉积法、沉淀法、水热合成法、溶胶凝胶法、微乳液法等. 气相沉积法的产品纯度高, 粒度的变异系数小, 主要利用金属化合物蒸气的化学反应合成纳米材料. 沉淀法操作简单, 把沉淀剂加入到盐溶液中后, 再将沉淀热处理就可得到纳米材料. 但纯度偏低, 颗粒半径大, 适合制备氧化物. 水热合成法是在高温高压条件下, 将原料置于水溶液或蒸汽等流体中, 经分离和热处理后得纳米粒子, 具有纯度高、分散性好、粒度易控制等优点. 溶胶凝胶法是将金属化合物经溶液、溶胶、凝胶而固化, 再经低温热处理而生成纳米粒子, 具有颗粒均一、易操作控制等优点. 微乳液法是在两种互不相溶的溶剂中, 在表面活性剂的作用下使之形成乳液, 在微泡中经成核、聚结、团聚、热处理等过程后得到纳米粒子, Li 等^[16] 采用油包水技术和反复冻融程序制作聚乙烯醇 (poly-vinyl alcohol, PVA) 纳米颗粒, 该纳米材料由于形成了水凝胶, 特别适合制作蛋白质/多肽类药物载体, 而且不需要交联别的试剂或佐剂, 也不需要其他的纳米材料, 更为特别的是, 不需要乳化剂. PVA 纳米颗粒的直径为 (675.5 ± 42.7) nm, 将 BSA 与 PVA 偶联, 负载率为 $96.2\% \pm 3.8\%$, PVA 纳米颗粒在水溶液中会膨胀, 膨胀度随溶液温度上升而增加, BSA 以弥散释放的形式从 PVA 颗粒中释放长达 30 h. 冻融的次数和释放的温度明显影响 BSA 的释放效率, 冻融温度越低、释放温度越高均可加速 BSA 的释放, BSA 在 PVA 颗粒中很稳定.

采用挤出冻干设备生产和空白脂质体包合是对生产工艺的重大改进, 将细胞因子包埋于脂质体中可以改变在体内的分布特性, 使其更易进入细胞、提高受体的敏感性及细胞因子的活性, 甚至将脂质体作为基因片段的载体, 保护 DNA 免受酶的降解, 并且脂质体易与细胞膜融合, 有利于目的基因导入细胞, 美国癌症协会已将脂质体介导的基因转移方法作为临床基因治疗的筛选方案.

4 问题与展望

由于大量血清型的存在, 要设计能够针对所有菌/毒株的通用型疫苗越来越困难, 所以多肽疫苗倍受重视, 尤其对表位进行精细定位研究之后, 表位多肽疫苗已被大量地应用.

免疫学和遗传学是推动生物学前进的两大车轮, 在纳米技术领域, 纳米生物学更显示其无穷的

魅力。它将是纳米技术的核心领域,在其目前所指的两方面涵义中,一是利用纳米技术来研究、解决一些生物学问题;二是利用生物大分子制造分子器件,模仿和制造类似生物大分子的分子机器,甚至将制造分子机器作为纳米科技的最终目的。其实这还远远不够,可以用纳米材料制作疫苗佐剂,以增强其免疫原性和抗原性,结束目前疫苗佐剂使用的多序状态和特异性不强等局面,推动应用免疫学的发展,从而推动整个生物学的发展。

参 考 文 献

- 1 Kreuter J, Liehl E. Long-term studies of microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles. *J Pharm Sci*, 1981, **70** (4): 367~ 371
- 2 Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *J Anat*, 1996, **189** (3): 503~ 505
- 3 Gilewski T, Adluri S, Ragupathi G, *et al.* Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin I (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res*, 2000, **6** (5): 1693~ 1701
- 4 Liu D W, Tsao Y P, Kung J T, *et al.* Recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol*, 2000, **74** (6): 2888~ 2894
- 5 Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, *et al.* The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol*, 2000, **165** (6): 3301~ 3308
- 6 Morris Cb, Cheng E, Thanawastien A, *et al.* Effectiveness of intranasal immunization with HIV-gp160 and an HIV-1 env CTL epitope peptide (E7) in combination with the mucosal adjuvant LT (R192G). *Vaccine*, 2000, **18** (18): 1944~ 1951
- 7 Castignolles N, Morgeaux S, Gontier-Jallet C, *et al.* A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine*, 1996, **14** (14): 1353~ 1360
- 8 Plum S M, Holaday J W, Ruiz A, *et al.* Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. *Vaccine*, 2000, **19** (9~ 10): 1294~ 1303
- 9 Vitiello A, Ishioka G, Grey H M, *et al.* Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 341~ 349
- 10 Ludewig B, Barchiesi F, Pericin M, *et al.* *In vivo* antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity. *Vaccine*, 2000, **19** (1): 23~ 32
- 11 Scholer N, Zimmermann E, Katzfey U, *et al.* Effect of solid lipid nanoparticles (SLN) on cytokine production and the viability of murine peritoneal macrophages. *J Microencapsul*, 2000, **17** (5): 639~ 650
- 12 Frey A, Mantis N, Kozlowski P A, *et al.* Immunization of mice with peptomers covalently coupled to aluminum oxide nanoparticles. *Vaccine*, 1999, **17** (23-24): 3007~ 3019
- 13 Kim S Y, Doh H J, Jang M H, *et al.* Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*, 1999, **4** (1): 33~ 39
- 14 Stieneker F, Kreuter J, Lower J, *et al.* High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines. *AIDS*, 1991, **5** (4): 431~ 435
- 15 Kreuter J. Nanoparticles as adjuvants for vaccines. *Pharm Biotechnol*, 1995, **6**: 463~ 472
- 16 Li J K, Wang N, Wu X S. Poly (vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process. *J Control Release*, 1998, **56** (1-3): 117~ 126

Nanoparticles as Adjuvants for the Epitope Peptide Vaccines*

L Ü Feng-Lin**, HE Feng-Ci

(Research Institute of Surgery, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstracts The loading of peptide into ultrafine host vesicles or in the nanometer size range is an important technique for the optimization of controlled peptide antigens delivery. There are closed relationship between the nanoparticle and the organism, the size range of DNA-protein complex is 15~ 20 nanometer. Several virus particles are also nanoparticle. For the nanoparticle adjuvants, the carrier effects and side effects and foreign body irritation will be avoid. Furthermore, the actual state of the nanoparticle materials is shown with 4 practical application examples, that is: a targeted cellular uptake by macrophage and dendritic cells; the strong immunity stimulation of nanocapsules, as new adjuvants, when loaded with viral or other antigens; the better blood-brain barrier transfer of a biochemistry drug when covalently bound to special liposomes; and the use of minivesicles for controlled site-specific anticancer drug release (tumor targeting). The nanoparticle materials were manufactured by physics and chemistry methods. Almost all biochemistry drug and DNA drugs, particularly, adjuvants for the epitope peptide vaccine were loaded with nanoparticle carriers for the good stability and body-friendly and biodegradable excipients.

Key words nanoparticle adjuvants, peptide vaccine, epitope

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (30170884).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68804699, E-mail: Lufenglin@hotmail.com

Received: February 14, 2001 Accepted: April 5, 2001