

# 单剂 HBsAg-PLGA控释疫苗微球小鼠体内免疫学研究

冯 利<sup>1</sup>, 周兴军<sup>2</sup>, 王世聪<sup>2</sup>, 姜 杨<sup>3</sup>, 齐宪荣<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学 药学院 药剂学研究室, 北京 100083; 2. 华北制药集团 新药研究开发公司, 河北 石家庄 050031;  
3. 华北制药集团 金坦生物技术股份有限公司, 河北 石家庄 050035)

**摘要:** 目的 研究小鼠皮下注射重组乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)-乳酸 乙醇酸共聚物 (PLGA)微球后的体内抗体应答水平和免疫学机制。方法 采用复乳法制备疫苗微球后,单剂注射到 BALB/c小鼠皮下,在一定时间内检测全抗体、IgG抗体亚型及细胞因子的应答水平。结果 HBsAg-PLGA微球在小鼠体内主要引发体液免疫应答;其中单剂注射 HBsAg-PLGA50/50-COOH微球在免疫早期产生较高免疫表达,6周后降低,全抗体水平显著低于常规铝佐剂疫苗 ( $P < 0.01$ );分别单剂注射 HBsAg-PLGA50/50微球及 HBsAg-PLGA75/25微球后产生的免疫应答在18周内与铝佐剂疫苗相当 ( $P > 0.05$ )。结论 PLGA微球作为乙肝疫苗的长效缓释可生物降解载体,具有一定潜在优势。

**关键词:** 乙肝病毒表面抗原; 乳酸 乙醇酸共聚物微球; 控释; 单剂疫苗; 免疫学

中图分类号: R943.41 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)02 - 0132 - 06

## Immunogenicity of single-dose HBsAg-PLGA controlled release microspheres in mice

FENG Li<sup>1</sup>, ZHOU Xing-jun<sup>2</sup>, WANG Shi-cong<sup>2</sup>, JIANG Yang<sup>3</sup>, QI Xian-rong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. NCPC New Drug R&D Co., Ltd., Shijiazhuang 050031, China;

3. NCPC Gene Tech Biotechnology Development Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

**Abstract:** **Aim** To investigate the level of immune response and the immune mechanism of the single-dose hepatitis B surface antigen (HBsAg)-poly (d, l)-lactide-co-glycolide acid (PLGA) microspheres in BALB/c mice. **Methods** Three kind of HBsAg-PLGA microspheres, HBsAg-PLGA50/50-COOH microspheres, HBsAg-PLGA75/25 microspheres and HBsAg-PLGA50/50 microspheres, were prepared by double emulsion microencapsulation technique used three kinds of PLGA with different L/G ratio. The single-dose of HBsAg-PLGA microspheres was subcutaneously injected into BALB/c mice at the dose of 7.5  $\mu$ g HBsAg per mouse. The conventional aluminum-adjuvant vaccine was subcutaneously injected at 0, 1 and 2 month as positive control. In certain time interval, the induced immune level of total antibody was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). For subclass of IgG antibody and cytokines studies, the dose of HBsAg was 2.5  $\mu$ g per mouse. **Results** The HBsAg-PLGA microspheres could successfully induce a humoral immune response in BALB/c mice. Compared with the conventional aluminum-adjuvant vaccine, the antibody response of the HBsAg-PLGA50/50-COOH microspheres was significantly lower than the group received three injections of aluminum-adjuvant vaccine ( $P < 0.01$ ) except for a higher priming response during the early 6 weeks. The results were ascribed to the relatively rapid degradation charactics of PLGA50/50-COOH polymer. The immune response for the HBsAg-PLGA50/50 microspheres and HBsAg-PLGA75/25 microspheres were comparable to the group administered with aluminum-adjuvant vaccine ( $P > 0.05$ ) which was due to the sustained degradation of

PLGA50/50 and PLGA75/25 polymer. **Conclusion** The HBsAg-PLGA microsphere is a promising candidate for the controlled delivery of a vaccine which does not require multiple injections.

**Key words:** hepatitis B surface antigen; poly(*d, l*)-lactide-co-glycolide acid microspheres; controlled release; single dose vaccine; immunogenicity

乙型肝炎是世界三大顽症之一。中国是乙型肝炎的高发区,有 1.2 亿乙肝携带者,占全世界乙肝携带者的 30%,推行乙肝疫苗接种是预防和控制乙型肝炎的有效方法,95% 的免疫人群全程免疫后可产生抗感染的保护作用<sup>[1,2]</sup>。但在一些发展中国家,由于漏种率高达 70%,简化给药次数以提高整体免疫水平显得尤为重要<sup>[3-5]</sup>。采用可生物降解的乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)作为单剂缓控释乙肝疫苗的载体,可以在体内长时间达到良好的、持续的免疫效果,为开发替代传统的需要全程免疫三针的铝佐剂疫苗奠定了基础<sup>[6-8]</sup>。

## 材料与方法

**试剂** PLGA50/50(乳酸-乙醇酸比率即 L/G 比为 50/50,固有黏度为  $0.67 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $M_w$  50 kD), PLGA75/25(L/G 比为 75/25,固有黏度为  $0.67 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $M_w$  88 kD), PLGA50/50-COOH(L/G 比为 50/50,具有羧基末端,固有黏度为  $0.22 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $M_w$  18 kD)均购于美国伯明翰公司。重组乙肝病毒表面抗原(HBsAg)原液及乙肝疫苗(华北制药集团金坦生物技术股份有限公司);乙肝病毒表面抗体(HBsAb)酶联免疫诊断试剂盒(北京万泰生物药业有限公司);小鼠干扰素- $\gamma$ 定量 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-2 定量 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-5 定量 ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司);山羊抗鼠 IgG1(特异性  $\gamma 1$  链)辣根过氧化物酶(HRP)共聚物和山羊抗鼠 IgG2a(特异性  $\gamma 2a$  链)辣根过氧化物酶(HRP)共聚物(美国 Southern Biotechnology Associates Inc.)。

**微球制备** 3 种包封 HBsAg 的 PLGA 微球(HBsAg-PLGA50/50-COOH, HBsAg-PLGA75/25, HBsAg-PLGA50/50 微球)由本室采用复乳法制备:将 HBsAg 原液加至 1 mL 含 100 mg PLGA 的二氯甲烷中,超声分散 1 min 制初乳,然后滴加到搅拌转速为  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的 5% PVA 水溶液 5 mL 中,乳化 3 h,使有机溶剂挥发完全。所得的复乳,  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心,用 PBS 洗涤 3 次,冻干 48 h,干燥器内贮存<sup>[9,10]</sup>。

**动物** 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠,体重 20 g

(北京维通利华实验动物公司);雌性 Wistar 大鼠,体重 250 g(北京大学医学部动物中心)。

**仪器** 超声处理器(美国 Cole Pamer 公司, CP130 型),分子排组高效液相色谱系统(SEC-HPLC)(美国 Thermo Electron 公司),分子排组色谱柱(日本 TOSOH 公司, TSK-G5000 PW<sub>XL</sub> 型),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司, 450 型)。

**抗原完整性检查** 将载有 HBsAg 的 3 种微球分别用二氯甲烷溶解,用磷酸盐缓冲溶液抽提、收集,超滤浓缩后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分析及分子排组高效液相色谱(SEC-HPLC)纯度分析。

**全抗体检测** 40 只 BALB/c 小鼠,随机均分成 5 组。3 种微球分别混悬于无菌 0.9% NaCl 溶液中,所得混悬液中 HBsAg 质量浓度为  $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。3 组试验组分别皮下注射上述微球混悬液 0.25 mL。阳性对照组分别在 0, 1 和 2 月皮下注射铝佐剂吸附的乙肝疫苗( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 0.25 mL,空白对照组皮下注射无菌 0.9% NaCl 溶液 0.25 mL。所有动物由眼眶后静脉丛取血,分离血清。取血时间为第 1 次注射后 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 和 18 周。每个时间点的血清样品用酶联免疫分析法(ELISA)检测抗-HBsAg 全抗体的表达水平。

**IgG 抗体亚型检测及细胞因子检测** 75 只 BALB/c 小鼠,随机均分成 5 组。3 种微球分别混悬于无菌 0.9% NaCl 溶液中,所得混悬液中 HBsAg 质量浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。3 个试验组分别皮下注射上述微球混悬液 0.25 mL。阳性对照组小鼠皮下注射铝佐剂吸附的乙肝疫苗( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 0.25 mL,空白对照组皮下注射无菌 0.9% NaCl 溶液 0.25 mL。每组动物在不同时间(各 3 只)摘眼球放血处死,分离的血清用 ELISA 检测 IgG 抗体亚型 IgG1 和 IgG2a 的表达水平(用同一稀释度血清的 A 值表示)。取脾细胞体外培养,48 h 后测培养上清液中细胞因子(IL-2, INF- $\gamma$  和 IL-5)的表达水平(用培养上清液的 A 值表示)。

**病理组织学研究** 将 60 mg PLGA50/50 空白微球, PLGA75/25 空白微球和 PLGA50/50-COOH 空白微球分别加入蒸馏水 1 mL 后充分混悬,在 3 只大

鼠背部的不同位置皮下注射,分别在 2, 4和 8周时,将大鼠处死,观察注射部位组织变化情况,考察 PLGA在体内的生物相容性。

统计分析 计算小鼠血清抗-HBsAg全抗体滴度的平均值和 SEM;计算 IgG抗体亚型及细胞因子 A值的平均值和标准差。微球试验组和对照组免疫效果用 *t*检验判断有无显著性差异。

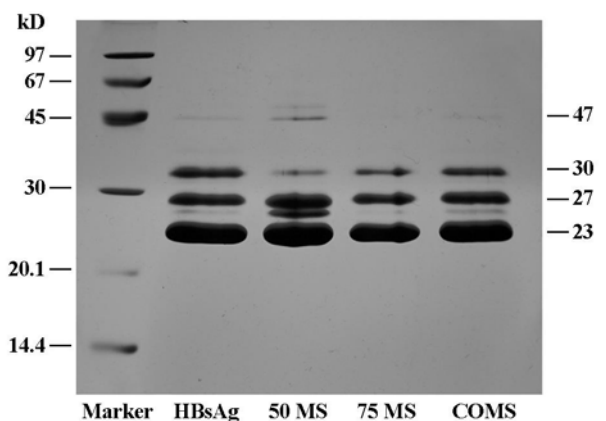
## 结果

### 1 微球特性

微球表面基本光滑,成球规整。一些微球,特别是 HBsAg-PLGA50/50-COOH微球,表面有一些微孔结构或呈扁平球状。微球的粒径范围为 1.92 ~ 7.93 μm,包封率为 56% ~ 73%。在 63 d的体外实验中,HBsAg-PLGA50/50-COOH微球、HBsAg-PLGA50/50微球和 HBsAg-PLGA75/25微球分别释放了所载抗原的 (92.61 ± 1.37)%, (45.2 ± 5.50)%和 (35.35 ± 1.73)%。

### 2 微球制备过程对 HBsAg蛋白结构完整性的影响

从微球中抽提 HBsAg的 SDS-PAGE结果见图 1。与 HBsAg原液的电泳条带比较,从微球中抽提 HBsAg的电泳条带没有明显的增加,证实微球的制备没有造成蛋白显著的聚合或降解。



**Figure 1** SDS-PAGE (5% stacking gel and subjected to electrophoresis on a 15% separation gel at 200 V) of native antigen and entrapped HBsAg extracted from the HBsAg-PLGA50/50 microspheres (50 MS), HBsAg-PLGA75/25 microspheres (75 MS) and HBsAg-PLGA50/50-COOH microspheres (COMS). The  $M_w$  in kD of the peptide bands of marker after gel electrophoretic analysis was showed on the left, and the numbers on the right were that of the peptide bands of antigen

同样的样品经 SEC-HPLC检测,其结果如表 1

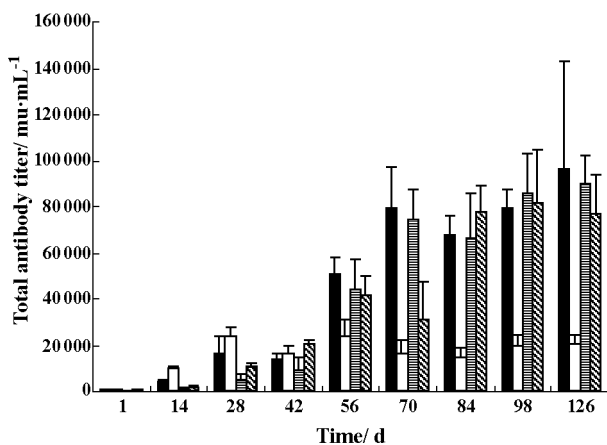
所示,从微球中抽提的 HBsAg与 HBsAg原液的保留时间接近,纯度均大于 95%。可见微球的制备过程对 HBsAg蛋白结构完整性的破坏不显著。

**Table 1** The retention times and purities of the extracted antigen determined by SEC-HPLC

Lot	Retention time /min	Purity /%
HBsAg aqueous solution	13.465	100
HBsAg-PLGA50/50 microspheres	12.337	96.97
HBsAg-PLGA75/25 microspheres	12.438	97.71
HBsAg-PLGA50/50-COOH microspheres	12.438	96.70

### 3 全抗体水平的评价

免疫小鼠后产生的全抗体应答如图 2所示。HBsAg-PLGA50/50微球组和 HBsAg-PLGA75/25微球组与阳性对照组小鼠血清抗-HBsAg全抗体的几何平均滴度用 *t*检验判断无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。HBsAg-PLGA50/50-COOH微球组与 HBsAg-PLGA50/50微球组和 HBsAg-PLGA75/25微球组相比,在免疫初期产生较高的抗体应答,但 6周后降低,抗体应答显著低于阳性对照组 ( $P < 0.01$ )。



**Figure 2** Total antibody titer ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ ) obtained from BALB/c mice by quantitative ELISA using a HBsAb ELISA Kit precoated with purified HBsAg as recommended by the description after immunizations with three injections of aluminum (Alum)-HBsAg at 0, 1 and 2 months interval (■), HBsAg-PLGA50/50-COOH microspheres (□), HBsAg-PLGA50/50 microspheres (▨) and HBsAg-PLGA75/25 microspheres (▩), respectively. The total dose of HBsAg was 7.5 μg/mouse

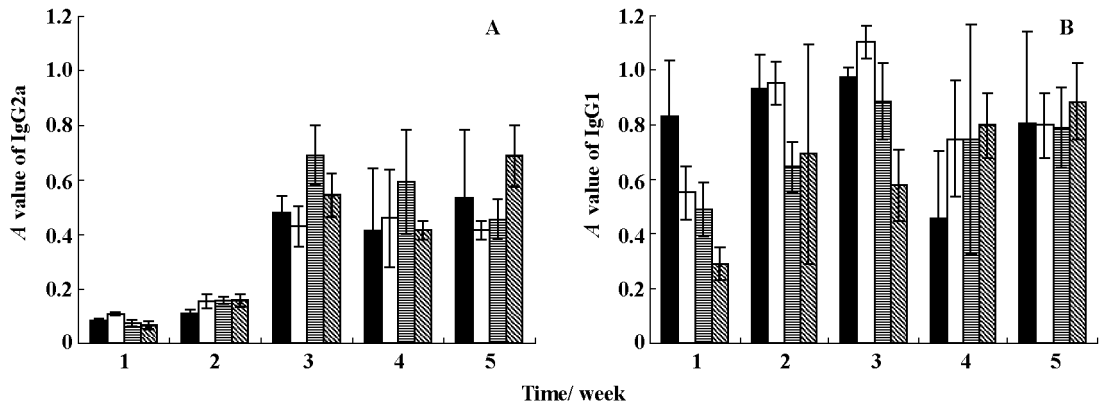
### 4 IgG抗体亚型分析

抗体亚型免疫结果如图 3和图 4所示,HBsAg-PLGA微球组能够在体内持续诱发 IgG1和 IgG2a表达,产生的免疫效果与传统铝佐剂相当 ( $P > 0.05$ )。

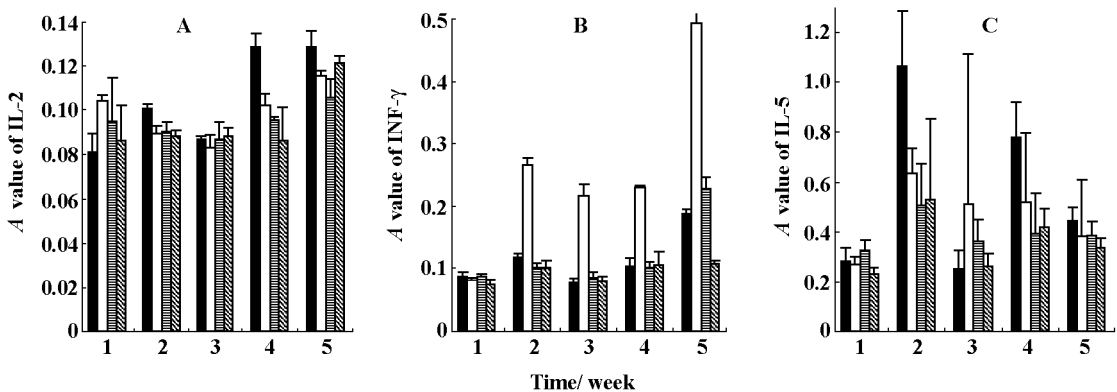
所有实验组和阳性对照组的 IgG2a 的 A 值在 2 周内仅为 0.07 ~ 0.16, 此后增加至 0.41 ~ 0.69。而免疫后 5 周内与 IgG2a 相对应的 IgG1 抗体水平始终处于较高水平, 并且由于所有实验组 IgG2a / IgG1 的比率均小于 1, 说明体液免疫应答起着主要的保护作用。

### 5 细胞因子考察

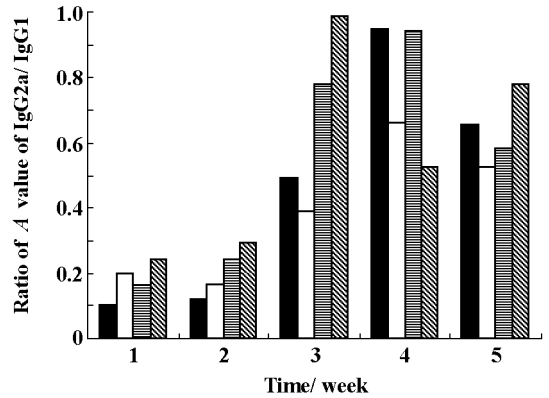
在免疫早期, 作者同时考察了诱发小鼠脾细胞表达的细胞因子水平, 结果见图 5。HBsAg-PLGA 微球组细胞因子表达的水平与传统铝佐剂疫苗诱发的细胞因子表达水平相当 ( $P > 0.05$ )。其中, HBsAg-PLGA50 / 50-COOH 微球组激发了较强的细胞因子水平, 特别是 IFN- $\gamma$  的表达水平较高; 但所有 HBsAg-PLGA 微球组 IL-2 的 A 值均小于 0.129; IFN- $\gamma$  的 A 值均小于 0.49; 与此对应的 IL-5 的 A 值在



**Figure 3** The A values ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) obtained by direct ELISA using goat anti-mouse IgG1-HRP conjugate ( $\gamma 1$  chain specific) or goat anti-mouse IgG2a-HRP conjugate ( $\gamma 2a$  chain specific) of IgG2a (A) and IgG1 (B) secreted by BALB/c mice after immunization with Alum-HBsAg (■), HBsAg-PLGA50 / 50-COOH microspheres (□), HBsAg-PLGA50 / 50 microspheres (▨) and HBsAg-PLGA75 / 25 microspheres (▩), respectively. The injected dose was 2.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$



**Figure 5** The A values ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) of IL-2 (A), INF- $\gamma$  (B), and IL-5 (C) secreted by spleen cells of BALB/c mice after immunizations with Alum-HBsAg (■), HBsAg-PLGA50 / 50-COOH microspheres (□), HBsAg-PLGA50 / 50 microspheres (▨) and HBsAg-PLGA75 / 25 microspheres (▩) respectively obtained by avidin-biotin complex ELISA (ABC-ELISA) using ELISA kits precoated with anti-mouse IL-5, IL-2 or IFN- $\gamma$ . The injected dose was 2.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$



**Figure 4** The ratios of A value of IgG2a / IgG1 of BALB/c mice after immunizations with Alum-HBsAg (■), HBsAg-PLGA50 / 50-COOH microspheres (□), HBsAg-PLGA50 / 50 microspheres (▨) and HBsAg-PLGA75 / 25 microspheres (▩), respectively. The injected dose was 2.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$

0.23 ~ 1.06, 说明 HBsAg-PLGA 微球组和传统铝佐剂疫苗都能诱发小鼠体内产生体液免疫和细胞免疫, 但体液免疫的作用较细胞免疫作用显著。

### 6 PLGA 体内生物相容性评价

8 周的大鼠体内研究显示, PLGA 微球在大鼠背部皮下均形成了不同程度的炎症反应, 但随着 PLGA 的降解、吸收, 大鼠皮下组织中的肉芽肿逐渐缓解、愈合。说明 PLGA 是可生物降解的具有生物相容性的载体材料<sup>[11]</sup>。

### 讨论

尽管在微球的制备过程中可能会产生一些影响蛋白稳定的破坏作用, 诸如机械力、热、化学反应等, 在降解过程中形成的酸性环境对蛋白也可能有一些破坏作用<sup>[12,13]</sup>, 但通过体外 SDS-PAGE, SEC-HPLC 以及体内免疫学实验表明, 采用复乳法制备 HBsAg-PLGA 微球对 HBsAg 的蛋白质结构和抗原活性未造成很大的破坏。

由于 PLGA50/50-COOH 含有较多亲水性羧基末端, 加速了酯键的水解, 在体内降解形成了许多乳酸、乙醇酸的单体和单聚体, 而单体和单聚体进一步催化了微球的降解和 HBsAg 释放, 因此 HBsAg-PLGA50/50-COOH 微球在体内很快产生较高的免疫应答。同时 PLGA50/50-COOH 固有黏度和相对分子质量均较低, 决定了 HBsAg-PLGA50/50-COOH 微球在 6 周内降解和释放蛋白比较完全, 因此在后续的时间里缺乏对小鼠持续有效的免疫刺激。与 HBsAg-PLGA50/50-COOH 微球相比, HBsAg-PLGA50/50 微球和 HBsAg-PLGA75/25 微球由较高固有黏度和相对分子质量的 PLGA 制备, PLGA50/50 及 PLGA75/25 微球在体内降解缓慢, HBsAg 得以持续释放, 激发体内产生长效的免疫应答。特别是 PLGA75/25 微球, PLGA75/25 中的 L/G 比例大于 PLGA50/50, L/G 比例越高, PLGA 降解速度越慢, 因此, HBsAg-PLGA75/25 微球产生的免疫应答略慢于 HBsAg-PLGA50/50 微球, 并将延续更长时间的免疫效果<sup>[8,13,14]</sup>。

铝佐剂疫苗在体内一般诱发体液免疫应答以及 CD4<sup>+</sup> TH2 细胞介导的帮助作用, 还可通过分泌 IL-3, 4, 5, 6, 10, 13, TNF- $\alpha$  等细胞因子促进 B 细胞分化、增殖、分泌 IgG1, IgA 和 IgE 抗体。而细胞免疫一般通过 CD4<sup>+</sup> TH1 细胞介导的帮助作用以及 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 有效清除病原体。IgG2a 抗体 (小鼠体内) 以及 IL-2, 3, TNF- $\alpha$ ,

TNF- $\beta$  和 IFN- $\gamma$  是细胞免疫特征性标志, 作者选用具有代表性的 IgG1 和 IgG2a 抗体以及细胞因子 IL-2, 5 和 IFN- $\gamma$  对 PLGA 微球的免疫机制进行了评价<sup>[15,16]</sup>, 证实 PLGA 微球与现行的铝佐剂疫苗激发的体液免疫效果相当。鉴于 PLGA50/50-COOH 微球在免疫早期能够快速诱发机体免疫应答, 特别是在增强和活化 T 细胞的作用方面有一定的辅佐作用; 而 PLGA50/50 微球和 PLGA75/25 微球能够在体内缓慢、持续激发体液免疫应答, 将 3 种处方的微球混合免疫, 将是一个很好的“Autobooster”疫苗, 是实现一次注射就能完成全程免疫的很有希望的给药方式。

### References

- [1] Dai QL, Zhang MJ. Discussion about the prevention of hepatitis B and gene technological hepatitis B vaccines [J]. China Pharm (中国药业), 2003, 12: 44 - 44.
- [2] Guo XC, Yi ZJ, Bi JP. The status in China of the development of recombinant hepatitis B vaccine expressed by Chinese Hamster Ovary (CHO) [J]. Dis Monitor (疾病监测), 1999, 14: 238 - 239.
- [3] Li XH, Zhou SB, Yuan ML, et al. Biodegradable microspheres as hepatitis B vaccine delivery system [J]. Chin J Synth Chem (合成化学), 1999, 7: 389 - 393.
- [4] Men Y, Thomasin C, Merkle HP, et al. A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide [J]. Vaccine, 1995, 13: 683 - 689.
- [5] Johansen P, Gander B, Merkle HP, et al. Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18: 203 - 210.
- [6] Singh M, Li XM, McGee JP, et al. Controlled release microparticles as a single dose hepatitis B vaccine: evaluation of immunogenicity in mice [J]. Vaccine, 1997, 15: 475 - 481.
- [7] He Y, Chen ZH, Wei SL. Long term immunogenicity and immunologic priming of animals to pulsed controlled-release system for tetanus toxoid vaccine delivery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 695 - 698.
- [8] Bitner B, Witt C, Mäder K, et al. Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release [J]. J Control Release, 1999, 60: 297 - 309.
- [9] Chen JH, Chen K, Shagufa M, et al. Study on preparation of diazepam-poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)/polylactide microspheres [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35: 613 - 616.
- [10] Zheng CH, Liang WQ, Yu HY. Preparation of alginate-

- chitosan-poly( lactic-co-glycolic acid) composite microsphere and its regulation of protein release [ J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40:182 - 186.
- [ 11 ] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres [ J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28: 5 - 24.
- [ 12 ] Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, et al. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly( lactide-co-glycolide) microspheres [ J]. Int J Pharm, 1999, 185: 255 - 266.
- [ 13 ] Cohen S, Chen L, Apte RN, et al. Controlled release of peptides and proteins from biodegradable polyester microspheres: an approach for treating infectious diseases and malignancies [ J]. React Polym, 1995, 25: 177 - 187.
- [ 14 ] Ghaderi R, Stureson C, Carlfors J. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly( *D, L*-lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method [ J]. Int J Pharm, 1996, 141: 205 - 216.
- [ 15 ] Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects [ J]. Vaccine, 1995, 13(14): 1263 - 1276.
- [ 16 ] Ada G. The immunology of vaccine [ M ]//Plotkin SA, Orenstein WA. Vaccines. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999: 28 - 39.