



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transcutaneous subunit vaccine delivery. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays

Ding, Z.

Citation

Ding, Z. (2010, February 23). *Transcutaneous subunit vaccine delivery. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14943>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14943>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

透皮免疫

纳米颗粒载体剂型和微针阵列的综合应用

本论文研究透皮免疫，即经由皮肤的疫苗接种。皮肤是人体的物理屏障。这一功能主要是由皮肤最表层的死细胞层，即角质层来执行的。角质层下活细胞层中分布着的树突状细胞，在触发免疫反应中起至关重要的作用。由于在分布着高密度的树突状细胞的皮肤活细胞层中，痛觉神经的分布很少，透皮免疫可以实现有效和无痛的疫苗接种。但是，实现有效透皮免疫的最大挑战在于输送足够剂量的抗原（疫苗的有效成份）透过皮肤的角质层屏障，到达树突状细胞。本研究中，我们使用微针阵列和纳米颗粒载体两种方法来增加抗原的透皮输送。我们使用的是实心微针阵列，其中的微针长度小于1毫米，直径小于300微米。用于在施用疫苗前对皮肤进行预处理。我们首先使用微针阵列对小鼠进行的白喉和流感疫苗的透皮免疫实验。在此基础上，使用不同的免疫佐剂，比如 *1pxL1* 脂多糖，皂甙 QuilA, CpG 寡聚核苷酸和霍乱毒素，与白喉抗原混合涂布在微针阵列处理后的皮肤上，研究它们对免疫反应的调节作用。另一种增加疫苗透皮输送的途径是使用柔性纳米颗粒载体。这种剂型包含由两性表面活性剂的双分子层组成的油包水颗粒结构。根据以往的研究，纳米颗粒的柔性以及促进小分子药物穿透皮肤的性能取决于它们的组成。我们发展了两类不同的抗原-纳米颗粒剂型并对它们的胶体性质进行了测定。通过将它们涂布到完整的和经过微针处理的小鼠皮肤上，对它们增强免疫反应的能力进行了研究。我们也添加了免疫佐剂以增加疫苗剂型的免疫原性。

具体来说，改进透皮免疫效果的努力开始于微针阵列的使用，在第三章中，我们使用了一个经过优化的微针阵列投射装置，该装置可以使短至300微米的微针阵列均一和可重复的刺透小鼠皮肤的角质层。穿刺的效果通过苔酚蓝染色和透皮水分散失的测量显示。使用这一组合，我们进行了白喉和流感抗原的透皮免疫实验，并使用霍乱毒素作为免疫佐剂。实验表明，对于白喉疫苗，使用微针阵列预处理皮肤对于诱导出显著的免疫球蛋白和中和抗体滴度起到了关键的作用，可以使抗体滴度较完整皮肤增加1000倍。添加霍乱毒素进一步增强免疫反应，使抗体滴度达到和传统疫苗接种方法（皮下注射白喉铝佐剂疫苗）相近的水平。与此形成鲜明对比的是：微针阵列对皮肤的预处理对增进流感抗原

的免疫保护并没有显著的效果。但是霍乱毒素的添加却可显著增强其免疫原性。这一结果显示；在透皮免疫中，微针阵列对皮肤的预处理对免疫效果的作用依赖于抗原本身的属性。也因此，后续的实验只使用白喉类毒素作为模型抗原。

由于经皮疫苗接种和经传统注射方式将疫苗输送至不同亚型的树突状细胞，免疫佐剂的作用也可能有所不同。在**第四章**，我们研究了不同免疫佐剂对于经皮输送抗原的免疫调节作用。我们已知微针阵列对皮肤预处理可显著增强白喉疫苗的免疫反应。添加不同的佐剂不同程度的提高了白喉特异的免疫球蛋白滴度：其效果排序为：皂甙 QuilA < CpG 寡聚核苷酸 < 霍乱毒素。而 IgG1/IgG2a 两种亚型免疫球蛋白的比值按以下顺序排列：无佐剂 < 皂甙 QuilA < 霍乱毒素 < CpG 寡聚核苷酸，说明在这一疫苗输送途径中，取决于使用佐剂的种类，免疫反应的类型可以从无佐剂时的 Th2 偏向型调节到 Th1 偏向型。这一研究表明，经皮疫苗输送诱导的免疫反应也可以通过使用免疫佐剂来进行调节和优化。

据报道，柔性纳米颗粒可以有效的促进小分子药物的透皮吸收，在**第五章**中，我们设计和发展了一种基于表面活性剂的白喉疫苗纳米颗粒剂型。这种纳米颗粒载体由蔗糖-月桂酸脂和磺化琥珀酸钠盐组成，八溴乙烯月桂酸脂被添加以增加脂双层的柔性。研究的参数包括：组成成分的摩尔比，白喉类毒素的浓度，缓冲液的种类，pH 值以及离子强度。疫苗的剂型根据胶体稳定性和白喉类毒素与颗粒的结合比例进行了优化。我们发现系统的 pH 值对白喉类毒素和纳米颗粒的相互作用有显著的影响。pH 值 4.5 的时候，超过 70% 的抗原和纳米颗粒结合，而在 pH 5.0 的时候，只有约 20% 和纳米颗粒结合。同时，疏水相互作用在这个过程中起到重要的作用，白喉类毒素的蛋白结构完整性在制备过程中也得到了保留。

在**第六章**的研究中，我们综合使用了上述两种方式。在完整的或者经过微针阵列预处理过的小鼠皮肤上涂布了在第五章中发展的带负电的纳米颗粒白喉疫苗剂型，并且采用的开放式和封闭式两种涂布方式。然而，和单独使用白喉抗原溶液相比，纳米颗粒剂型并没有显著提高抗原的免疫原性。根据后续实验的结果，我们推测，纳米微粒在加载白喉抗原后柔性的丧失、它的带负电性、以及皮肤的中性 pH 环境造成的白喉抗原从纳米颗粒上的迅速释放，可能是造成这种结果的原因。根据这样的推测，我们发展了在中性 pH 环境下和白喉抗原稳定结合的阳离子脂质体剂型。其中的脂质体由大豆卵磷脂、DOTAP（一种带正电的两性分子）通过高压挤出法制备。制得的载有白喉抗原的脂质体直径约 150 纳米，性质稳定。和上述的带负电纳米颗粒剂型一样，我们测定了这种剂型的

物理化学和胶体属性，如 ζ -表面电位，抗原结合率以及颗粒的柔性。在 pH7.4 时，绝大部分的白喉类毒素抗原和脂质体通过静电相互作用而结合。在剂型制备过程中加入 Span 80，可以在不改变白喉类毒素和脂质体结合比例的情况下，使脂质体保持柔性。在接下来进行的透皮疫苗接种实验中，我们尝试了开放式和封闭式涂布于完整皮肤表面，以及封闭式涂布于经微针预处理的皮肤表面。遗憾的是，在这些情况下，这种带正电的白喉类毒素-脂质体剂型没有显示出较白喉类毒素抗原本身更强的免疫原性。通过与皮间注射对照组的比较，我们发现白喉类毒素的刚性脂质体颗粒剂型较类毒素抗原更难透过皮肤上经微针处理产生的微小孔道。此外，在体外的细胞培养实验中，带正电和带负电的这两种纳米颗粒和树突状细胞培养基混合时，对于树突状细胞的成熟没有明显的刺激作用。

综上所述，在完整皮肤表面涂布白喉类毒素，流感抗原，或者结合白喉类毒素的纳米颗粒剂型都不能引发有效的免疫保护。流感疫苗的透皮接种效果可以通过添加佐剂显著增强，但不受微针阵列对皮肤预处理的影响。而白喉抗原的透皮免疫可以通过微针阵列预处理皮肤，以及和免疫佐剂的共同施用来增强免疫效果，获得有效的免疫保护，但所研究的纳米颗粒剂型对此没有帮助。