

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

M 細胞標的型微球體之開發 ()

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2313 - B - 039 - 004 -

執行期間：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：侯庭鏞

共同主持人：吳世祿、王淑紅

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中國醫藥學院中國醫學研究所

中 華 民 國 90 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

M 細胞標的型微球體之開發 ()

Development of M cell-targeting microspheres ()

計畫編號：NSC 89-2313-B-039-004

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：侯庭鏞 中國醫藥學院中國醫學研究所

共同主持人：吳世祿 中國醫藥學院生化學科

共同主持人：王淑紅 仁德醫護管理專科學校護理科

一、中文摘要

現今許多疾病的感染是病原由口或是呼吸道侵入。就免疫反應而言，傳統針劑疫苗無法誘發黏膜性免疫反應的產生，以製造多量的分泌型 IgA，防止呼吸道及胃腸道病原的感染。誘發黏膜性免疫反應必須將抗原直接與黏膜面接觸，但黏膜免疫方式在抗原的傳遞方面，仍有許多問題待克服。因此為了開發可經口投與、抗原經胃及小腸後不會失去其抗原性、並能標的至 M 細胞的口服疫苗，本計畫結合遺傳工程及化工之高分子合成技術，研發一種腸道細胞標的型的微球體劑型 (M cell-targeting microsphere)，以完成口服疫苗的核心技術。我們以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin ; BSA) 為模式蛋白質，選定具有生物可分解性的 poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG) 為基礎包覆材質，利用溶劑蒸發法，製作包埋 BSA 的 water-in-oil-in-water 形式之微球體，同時完成微球體的物化特性分析及蛋白質釋放試驗，顯示以 PLG 為包覆材質所製成之微球體具有控制釋放的能力。為了使微球體具有 M 細胞標的功能，我們選定大腸桿菌熱性腸毒素 (heat-labile enterotoxin ; LT) 為腸道標的分子。利用大腸桿菌表現純化 LT 後，進行口服試驗。結果顯示，LT 經由口服接種，確實可誘發小白鼠產生良好的黏膜性免疫反應，也證實 LT 作為腸道標的分子的可能性。進一步我們將呼吸道病原 胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 與熱性腸毒素進行接合，再包埋入微球體中，以口服方式免疫老鼠，結果發現單獨給予

抗原不易引起免疫反應，而口服給予經接合腸毒素後的抗原，在酵素連結免疫吸附試驗偵測時有較明顯的 IgA 免疫反應。顯示熱性腸毒素確實可以作為黏膜性佐劑，協助口服抗原產生黏膜性免疫反應。因此由本計畫研究的結果，已完成微球體包覆及特性分析，並證實 LT 作為腸道標的分子的可能性。

關鍵詞：微球體、大腸桿菌熱性腸毒素、黏膜免疫

Abstract

Historically, immunization has relied on the induction of humoral immunity by parenteral administration of vaccine. Antibodies induced in this manner, however, do not necessarily reach mucosal surfaces where most infectious agents enter the host. Induction of immunity at mucosal surface requires administration of antigen directly to the mucosal site. However, mucosal administration must overcome several challenges, such as a suitable antigen delivery system. In order to develop the oral vaccine that could be administered orally, be stable during oral administration and be targeted to M cells, we prepared the poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres containing bovine serum albumin (BSA) as a model antigen by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. The BSA-loaded microspheres displayed a controlled release kinetic. To develop the M-cell targeting microspheres, we purified the *Escherichia*

coli heat-labile enterotoxin (LT) from prokaryotic expression system. The significant amount of secretory IgA was produced on the mucosal surfaces by oral administration of LT, suggests that LT could be used as an M-cell targeting molecule to induce mucosal immunity. To further analyze the efficiency of LT as a mucosal adjuvant, we conjugated a respiratory pathogen — *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) with LT by glutaraldehyde. The conjugate was then administered to mice orally and the humoral immunity was detected. Oral administration of *A. pleuropneumoniae* alone didn't induce a detectable antibody response in serum and mucosal washes; however, oral administration of *A. pleuropneumoniae*-LT conjugate induced a significant amount of IgA response in lung and intestinal washes. Taken together, the recombinant LT could not only be used as an oral vaccine to induce a significant mucosal immune response, but also be used as a mucosal adjuvant to improve the mucosal immunity of respiratory pathogen by oral administration.

Keywords: Microsphere, Heat-labile Enterotoxin, Mucosal Immunity

二、緣由與目的

預防注射對於預防不同疾病的感染是非常有效的一種途徑。習慣上，疫苗的接種通常是藉由皮下注射完成，這種免疫方式可以激發良好的體液性免疫反應，使個體產生抗體，但藉由這種途徑產生的抗體，並不能有效地到達黏膜層，以防止病原經口或呼吸道感染。在黏膜面上，IgA 是最主要的抗體形式，分泌型的 IgA 可以預防病原與黏膜面接觸，並中和會傷害宿主的病毒及毒素。因為黏膜免疫系統為個體對抗外在病原感染的第一道防線，因此如何有效地誘發黏膜性免疫反應是非常重要的 [1]。一般而言，誘發黏膜性免疫反應必須將抗原直接與黏膜面接觸，例如，為了避免下呼吸道感染，疫苗必須以噴霧的方式直接送到肺部。雖然黏膜免疫方式具有相當多優點，但在抗原的傳遞上，仍有許

多問題待克服，因此目前的預防接種還是以皮下注射為主。

雖然口服疫苗具有相當多優點，但口服疫苗的開發仍然相當緩慢。因為在缺乏適當的抗原包覆系統下，疫苗抗原會遭受口及胃腸道中細菌及酵素的分解，此外，疫苗在食糜中的稀釋及無法有效地滲透至黏膜面，都降低了疫苗的效力 [2]。因此，為了開發可經口投與、抗原經胃及小腸後不會失去其抗原性、並能標的至 M 細胞上的口服疫苗，本計畫結合遺傳工程及化工之高分子合成技術，研發一種腸道細胞標的型的微球體劑型 (M cell-targeting microsphere)，以完成口服疫苗的核心技術。並以牛血清白蛋白為模式蛋白質，來模擬微球體經口投與釋放的效果。

三、結果與討論

(一) 微球體的製備

微球體的包覆材質選定 poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG)，因為 PLG 具有生物可分解性、生物相容性及控制釋放的能力等優點，因此已被廣泛地使用在醫學材料方面，應用於創傷口的縫合、手術後防組織沾黏用吸收性薄膜、韌帶修補材及藥物疫苗傳輸等方面 [3]。微球體的製作是採溶劑蒸發法完成 [4]，簡言之，將模式蛋白質牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 與 PLG 混合後，利用超音波打碎機混合均勻，以形成 water-in-oil 之內膜，之後加入 polyvinyl alcohol 再用超音波打碎機混合均勻，即形成 water-in-oil-in-water 的微球體雛形，最後將微球體置於室溫至少 16 小時，待溶劑蒸發後，再利用冷凍乾燥技術，即完成微球體的製備。

(二) 大腸桿菌忌熱性腸毒素的產製及特性分析

將腸毒性大腸桿菌於 37 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以設計好的引子 (分別位於忌熱性腸毒素基因 5'端及 3'端)，進行聚合鏈鎖反應。利用特異性的引子進行反應，可以增殖出長約 1147 bp 的忌熱性腸毒素基因。進一步利用設計於

引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Xho*I 切割，送入已利用 *Bam*HI 及 *Xho*I 切割後的載體 pET-28a(+)中，成為表現質體 pET-LT。經定序確定無誤後，進行大腸桿菌忌熱性腸毒素蛋白質的產製。

我們選擇 pET 系統，是因為它有兩個重要的特性。一是具有嚴謹的系統以誘導目標基因表現蛋白質。在 pET 表現系統中，IPTG 必須先誘導宿主表現 T7 RNA 聚合鈐後，再藉 T7 RNA 聚合鈐結合到 T7 啟動子上，才能進一步進行基因的轉錄及轉譯，以表現出目標基因，同時 pET 系統會分解少量 T7 RNA 聚合鈐，以避免在無 IPTG 誘導的狀態下，因為少量 T7 RNA 聚合鈐的產生，造成少量目標基因的表現。另一個特性是，pET 載體可以誘導 N 端或 C 端融合 6 到 10 個連續組胺酸 (histidine) 的融合蛋白質 (fusion protein) 表現，這種一連串的 histidine 對含鎳金屬鉗合樹脂 (metal chelation resin) 具有親和性，因此可以利用親和性層析的方法，將蛋白質純化的步驟單純化。

為了取得大量而且純度很高的忌熱性腸毒素蛋白質，我們利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量產製。首先進行表現最佳條件之測試：在不同 IPTG 濃度 (0.1、0.25、0.5、0.75、1 mM) 及細菌濃度 ($OD_{600}=0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0$) 的變因調整下，發現於 IPTG 濃度 0.5 mM、細菌濃度為 $OD_{600}=0.7$ 的條件下，可以產生大量的蛋白質，蛋白質大小分別如同預估為 A 次單位 27 kDa 及 B 次單位 11.5 kDa。進一步為了設定純化的流程，我們分析利用原核表現系統產製的忌熱性腸毒素是否如預期般，以不可溶的方式存在。由結果顯示，在 IPTG 誘導的狀況下，雖然可誘導多量的蛋白質產生，但都以可溶性的狀態存在，因此在純化時只需將細菌打破，即可進入純化步驟。

在純化蛋白質的步驟方面，因為重組型忌熱性腸毒素為 N 端含有 6 個 histidine 的融合蛋白質，另外因為忌熱性腸毒素具有與糖基 galactose 結合的能力，因此我們利用含鎳金屬鉗合樹脂及 galactose resin 兩種樹脂進行親和性色層分析法。經由一連串的純化步驟後，我們發現只有利用

galactose resin 才能純化出忌熱性腸毒素。Sixma *et al.* [5] 利用 X-ray 繞射分析忌熱性腸毒素的結果顯示，在忌熱性腸毒素的蛋白質立體結構中，N 端被折疊在內部，而 C 端暴露在外，位於 N 端的 histidine 因為無法暴露，所以不能順利與鎳結合，因此經由其他學者的立體結構分析，與我們進行純化的分析，得到相同的結論。

因為忌熱性腸毒可以與 GM1 上的 galactose 結合，因此我們利用親和性樹脂 immobilized D-galactose resin 進行純化。在三小時的操作時間內，可自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素，其純度至少 99%。進一步為了瞭解重組型忌熱性腸毒素的抗原性及功能方面是否與野外型相同，我們進行西方雜合反應及 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析。將野外型與重組型忌熱性腸毒素利用蛋白質電泳分析後，轉移至濾紙上，以野外型忌熱性腸毒素所產製的多價抗體偵測，再利用標示酵素的二次抗體及受質加以呈色，結果發現抗體可以成功地偵測到野生型及重組型忌熱性腸毒素，顯示重組型忌熱性腸毒素仍保持其抗原性。另外，利用 GM1—ELISA 測定並比較野外型與重組型忌熱性腸毒素結合 GM1 的能力，結果顯示隨著蛋白質濃度的增加，吸光值也隨之增加，顯示野外型與重組型忌熱性腸毒素都具備與 GM1 結合的能力，而且結合的動力學也非常相似。因此，利用大腸桿菌大量產製的重組型忌熱性腸毒素具備與野外型忌熱性腸毒素相同的特性，並具備有容易生產、容易純化的特性，可以應用於產業界的大量生產用。

(三) 大腸桿菌忌熱性腸毒素作為腸道標的性佐劑可行性之探討

現今許多疾病的感染是病原由口或是呼吸道侵入。就免疫反應而言，傳統針劑疫苗無法誘發黏膜性免疫反應的產生，以製造多量的分泌型 IgA，防止呼吸道及胃腸道病原的感染。一般而言，誘發黏膜性免疫反應必須將抗原直接與黏膜面接觸，藉由腸道免疫所活化的淋巴球移行到呼吸道，而在呼吸道纖毛及黏膜面產生大量具特異性的 IgA，以形成有效的第一道防線，

防止病原著床及增殖。為了要達成此項目的，便是開發呼吸道病原的口服疫苗以引起良好之黏膜免疫反應。而開發口服疫苗除了考慮病原本身外，黏膜性佐劑便成為主要關鍵。因此在這一部份的研究中，我們選定引起呼吸道感染的病原胸膜肺炎放線桿菌為抗原模式，探討大腸桿菌忌熱性腸毒素作為黏膜性佐劑的可行性。

一般鋁膠或油質佐劑大多是藉由物理性的混合，與抗原形成油水互溶之膠體粒子（micelle），而在注射到動物體後，緩慢地釋放抗原，刺激免疫反應的產生。至於在生物性黏膜佐劑的操作上，為了考量使黏膜佐劑能有效的將抗原導引至小腸上皮M細胞上，因此我們採取化學接合的方式，將黏膜性佐劑與抗原接合後，再進行免疫試驗。經由交聯劑戊二醛的處理下，再藉由親合性樹脂immobilized D-galactose resin的純化及蛋白質電泳分析，可以發現胸膜肺炎放線桿菌抗原可以有效的與忌熱性腸毒素結合，而在電泳膠片上同時呈現這兩群的蛋白質。

在小白鼠試驗中，單獨口服胸膜肺炎放線桿菌所引發的免疫反應與陰性組相似，顯示胸膜肺炎放線桿菌在口服後，可能已遭受胃酸及消化酵素的破壞，無法藉由腸道免疫系統，誘發體液性免疫反應。而在口服忌熱性腸毒素-胸膜肺炎放線桿菌接合組中，在小白鼠的血清、肺及腸道分別可以誘發1.7、2.7、1.1倍的IgA反應及1.9、1.2、0.9倍的IgG反應。這些結果呈現，利用口服方式給予忌熱性腸毒素-胸膜肺炎放線桿菌接合物，在小白鼠主要都會在肺部引起高量的IgA反應，其次為腸道，顯示忌熱性腸毒素可以協助胸膜肺炎放線桿菌通過消化酵素的破壞，並將胸膜肺炎放線桿菌導引至小腸M細胞，進入Peyer's patches，活化淋巴球，而活化之淋巴球進一步會回歸到胸膜肺炎放線桿菌所感染的部位呼吸道，誘發黏膜性免疫反應的發生。另外，在傳統針劑陽性對照組中，在血清及肺中也可以測到高量的IgA，這一點是否也涉及活化之淋巴球回歸至黏膜系統呢？值得深入探討。

四、計畫成果自評

（一）研究內容與原計畫相符程度

本研究利用 PLG 為包覆材質，以 BSA 為模式蛋白質，製備 water-in-oil-water 的微球體。此微球體具備有控制釋放的特性。此外，腸道標的分子—LT 已利用大腸桿菌進行表現及純化，得到具功能性的 LT。進一步將 LT 與胸膜肺炎放線桿菌接合後，以 PLG 包覆，再以口服的方式給予小白鼠，也顯示 LT 可以成功地誘發黏膜性免疫反應的發生。本研究與原計畫研究內容相符。

（二）達成預期目標情況

本計畫之進行，已完成計畫的三個主要項目：（一）微球體的製備、（二）大腸桿菌忌熱性腸毒素的產製及特性分析、（三）大腸桿菌忌熱性腸毒素作為腸道標的性佐劑可行性之探討。

（三）研究成果的學術或應用價值

本計畫的研究主軸為探討疫苗微球體包覆技術的特性分析，目的在於增加疫苗投與途徑的多樣性。本項實驗結果應可成功的與下游產業結合，建立量產技術、標準制程規範、到實際應用於疫苗之價值。在將來製程成熟後，便可有效地轉移至廠商，提高動物用疫苗之整體競爭力，進而可將此一研究成果推展應用於人用疫苗上，拓展獸醫在生醫材料上之研究，使實驗所得的結果得到最大之邊際效應。

（四）主要發現或其他有關價值

本研究利用 PLG 為包覆材質，以 BSA 為模式蛋白質，已成功地製備大小約 11~160 μm 的微球體。此微球體表面大多呈現平滑狀態，在釋放試驗的測試下，具備有控制釋放的特性。此外，腸道標的分子—LT 已利用聚合鈣連鎖反應選殖，並利用大腸桿菌進行表現及純化，得到具功能性的 LT。進一步將 LT 以口服的方式給予小白鼠，也顯示 LT 具備 M 細胞標的的特性，可以成功地誘發黏膜性免疫反應的發生。進一步將結合 LT 及微球體包覆技術，以完成 M 細胞標的型口服疫苗的雛形。

（五）是否適合在學術期刊發表或申請專利

本研究相關之結果已發表於 Journal of Chinese Society of Veterinary Science [6,7] 及 Archives of Virology [8]。

五、參考文獻

- [1] Beardsley, T. 1995. Better than a cure. *Sci. Am.* 272: 88-95.
- [2] Bowersock, T.L., HogenEsch, H., Suckow, M., Porter, R.E., Jackson, R., Park, H., and Park, K. 1996. Oral vaccination with alginate microsphere systems. *J. Control. Releas.* 39: 209-220.
- [3] McGee, J.P., Stanley, S.D., and O'Hagan, D.T. 1995. Zero order release of protein from poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique. *J. Controlled Release* 34: 77-86.
- [4] Alonso, M.J., Cohen, S., Park, T.G., Gupta, R.K., Siber, G.R., and Langer, R. 1993. Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharma. Res.* 10: 945-953.
- [5] Sixma, T. K., S. E. Pronk, K. H. Kalk, E. S. Wartna, B. A. M. van Zanten, B. Witholy and W. G. J. Hol. 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351: 371-377
- [6] Ho, T.Y., Wu, S.L., Hsiang, C.H., Hou, B.H., and Hsiang, C.Y. 1998. Characterization and morphologic analysis of bovine serum albumin-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 24: 128-134.
- [7] Ho, T.Y., Hsiang, C.Y. and Chang, T.J. 1998. Review: new trends in development of pseudorabies vaccines. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 24: 1-13.
- [8] Ho, T.Y., Hsiang, C.Y., Hsiang, C.H. and Chang, T.J. 1998. DNA vaccination induces long-term humoral immune responses against pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 143: 115-125.