



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112089834 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 18

(21) 申请号 202011159718.7

A61P 31/12 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 105237649 A, 2016.01.13

申请公布号 CN 112089834 A

WO 2016062020 A1, 2016.04.28

(43) 申请公布日 2020.12.18

GB 2532449 A, 2016.05.25

(73) 专利权人 北京工业大学

Zhengguang Liu, et al.. "Lentigin-functionalized grapheme oxide is an effective antigen delivery system that modulates innate immunity and improves adaptive immunity". 《ACS Appl. Mater. Interfaces》. 2020,

地址 100124 北京市朝阳区平乐园100号

(72) 发明人 胡秦 于渤洋 窦相南 董晓筱 盛望

审查员 于地美

(74) 专利代理机构 北京博海嘉知识产权代理事务所(普通合伙) 16007

专利代理师 郝彦东

(51) Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

基于氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂及佐剂/抗原共递送疫苗的制备与应用

(57) 摘要

基于氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂及佐剂/抗原共递送疫苗的制备与应用,属于药物领域。该发明包括以纳米氧化石墨烯材料作为载体,与负载在该载体上的茯苓多糖形成的茯苓多糖纳米佐剂,及由该佐剂与抗原形成的佐剂/抗原共递送疫苗。茯苓多糖纳米佐剂能促进树突状细胞成熟,增强淋巴细胞功能,并利于药物缓释,有效地延长药效,防止免疫耐受,极大增强了免疫效果和反应时间。佐剂/抗原共递送疫苗增强了茯苓多糖和抗原的生物利用率,使抗原和佐剂可被同一细胞摄取,大大增强疫苗靶向性,该疫苗不仅可诱导体液免疫,同时还能诱导较强的细胞免疫。本发明作为一种新型佐剂及疫苗,可预期用于人类疾病的预防和治疗。

1. 一种基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂,其特征在于,所述的茯苓多糖纳米佐剂的载体材料为纳米氧化石墨烯,在纳米氧化石墨烯载体上连接茯苓多糖,形成基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂;所述纳米氧化石墨烯与茯苓多糖的质量比为1:2.5~1:10;所述的茯苓多糖纳米佐剂的粒径为50nm~500nm,分子量为15kDa~45kDa;

所述的氧化石墨烯材料为纳米化处理的纳米氧化石墨烯,该纳米氧化石墨烯粒径在1~100nm之间,分子量为5kDa~10kDa;所述的茯苓多糖的分子量为8kDa~15kDa,其组成单糖包括葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖,其质量比依次为(2~3.5):(1~2):(0.3~4):1;

所述基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂的制备方法,包括以下步骤:

(1) 用无菌水溶解氧化石墨烯,超声2小时后冰浴超声30分钟,加入强碱,继续超声2小时;16,000g高速离心,收集上清液,即获得纳米化的氧化石墨烯载体溶液,该纳米氧化石墨烯载体溶液终浓度为0.1~10mg/mL;

(2) 将上述(1)中的纳米氧化石墨烯溶液超声1小时,调节pH至9-10,加入环氧氯丙烷,通入氮气反应,在水浴40℃搅拌反应4小时后透析去除未反应环氧氯丙烷;

(3) 用去离子水制备茯苓多糖溶液,并经过过去内毒素处理,茯苓多糖溶液浓度为2~20mg/mL;

(4) 将上述(3)中的茯苓多糖溶液溶于上述(2)中的纳米氧化石墨烯溶液中,调节pH至9~10,42℃水浴3小时,离心收集即得包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂。

2. 制备权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 用无菌水溶解氧化石墨烯,超声2小时后冰浴超声30分钟,加入强碱,继续超声2小时;16,000g高速离心,收集上清液,即获得纳米化的氧化石墨烯载体溶液,该纳米氧化石墨烯载体溶液终浓度为0.1~10mg/mL;

(2) 将上述(1)中的纳米氧化石墨烯溶液超声1小时,调节pH至9-10,加入环氧氯丙烷,通入氮气反应,在水浴40℃搅拌反应4小时后透析去除未反应环氧氯丙烷;

(3) 用去离子水制备茯苓多糖溶液,并经过过去内毒素处理,茯苓多糖溶液浓度为2~20mg/mL;

(4) 将上述(3)中的茯苓多糖溶液溶于上述(2)中的纳米氧化石墨烯溶液中,调节pH至9~10,42℃水浴3小时,离心收集即得包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂。

3. 一种佐剂/抗原共递送疫苗,所述的佐剂/抗原共递送疫苗包含有如权利要求1所述茯苓多糖纳米佐剂,并负载病毒抗原。

4. 如权利要求3所述的佐剂/抗原共递送疫苗,所述病毒抗原包括:灭活病毒或重组蛋白。

5. 根据权利要求3所述的佐剂/抗原共递送疫苗,其特征在于,所述的佐剂/抗原共递送疫苗的抗原与茯苓多糖均与氧化石墨烯相连。

6. 制备如权利要求3所述的佐剂/抗原共递送疫苗的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂溶液调pH至4.5~7.2,加入连接1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,混合30min,调pH至6~8,加入病毒抗原溶液,混合1~5小时,脱盐柱脱盐处理即得佐剂/抗原共递送疫苗;

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1:2

~10:1,病毒抗原溶液浓度为0.1~20mg/mL;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/氧化石墨烯浓度比为1:10。

7.权利要求1~6中任一项中所述的一种茯苓多糖纳米佐剂或由该佐剂形成的佐剂/抗原共递送疫苗的用途,其特征在于,用于制备疫苗的应用。

基于氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂及佐剂/抗原共递送疫苗的制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物领域,具体涉及一种基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂及由该茯苓多糖纳米佐剂与抗原形成的佐剂/抗原共递送疫苗的制备方法与应用。

背景技术

[0002] 疫苗的开发和应用已从预防疾病扩展到许多非传染性疾病的治疗,传统减毒活疫苗通常具有较高的免疫原性,但具有回复突变的危险,免疫效果也具有一定局限性。而灭活疫苗、亚单位疫苗、DNA疫苗、重组疫苗相对安全,但免疫原性有限,需要辅以佐剂才能发挥长期有效的保护效果。免疫佐剂作为一种非特异性免疫增强剂,通过预先或与抗原同时注入体内,可以显著增强免疫效果或改变接种疫苗后的免疫反应类型。自从铝佐剂在20世纪20年代开始被批准使用以来,已经成为了使用最多最广泛的佐剂,铝佐剂可以增强初次免疫,减少抗原用量以及免疫次数,但不能诱导CTL反应,且可能发生多种不良反应。经过几十年的缓慢进展,20世纪90年代末期水包油乳剂MF59被批准上市,21世纪以来已经先后批准了AS03、AS01、AS04、CpG ODN佐剂。除了上述这些少数疫苗佐剂被批准可供人类使用,大部分佐剂还处于临床或临床前试验阶段,可供人类使用的佐剂十分有限,所以急需开发出新型佐剂。

[0003] 茯苓[Poria cocos (Schw.) Wolf]是一种历史悠久的中药,广泛应用于中药的治疗中。茯苓属多孔菌科卧孔菌属真菌的干燥菌核,主要生长在松树的根上。其有效成分主要有:多糖、生物碱、皂苷、萜类、多酚类等物质。多糖是茯苓的主要成分,茯苓多糖是从茯苓中提取和纯化的不同类型多糖的混合物,其含量约占茯苓干菌核的84%,其中包括水溶性多糖和碱溶性多糖,由葡萄糖,岩藻糖,阿拉伯糖,木糖,甘露糖和半乳糖组成。大量研究表明,茯苓多糖具有免疫增强作用,保护机体免疫器官,增强T细胞、B细胞功能,影响树突状细胞的活性,并对某些细胞因子的释放产生影响,从而促进了特异性和非特异性免疫应答。且茯苓多糖的低毒性和较少的副作用更使其成为理想的免疫佐剂。但茯苓多糖分子量较大,药物释放太快,会导致注射药量过大,从而加大了茯苓多糖在临床应用的难度。因此,急需解决这一问题。

[0004] 纳米材料是指晶粒尺寸小于100nm的单晶体或多晶体。纳米颗粒具有容易被多种细胞摄取的生物学特征,能被抗原提呈细胞吞噬,从而增强抗原引起的免疫反应。纳米材料还可以缓慢释放抗原,减少抗原用量或次数,增加小分子抗原的尺寸,充分加工处理抗原,使免疫效应更加持久。某些纳米颗粒本身对免疫系统具有刺激作用,使用含有纳米材料的疫苗进行免疫接种,会导致粘膜层和胃肠道粘膜发生免疫反应。石墨烯是一种具有二维平面结构的碳纳米材料,它的特殊单原子层结构使其具有许多独特的物理化学性质。氧化石墨烯是石墨烯的氧化物,因经氧化后,其上含有更多的含氧官能团,可经由各种与含氧官能团的反应而改善本身性质。氧化石墨烯及其衍生物因具有很高的比表面积,导电导热性强,生物相容性好等优点,在药物载体、癌症的检疗等生物医学领域具有广泛的应用。因此,有

必要选择茯苓多糖作为原料,通过氧化石墨烯包载的手段,缓慢释放药物,减少茯苓多糖用量,找到一种有效,安全,稳定的免疫增强剂——基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂。

发明内容

[0005] 本发明提供一种茯苓多糖纳米佐剂及由该佐剂形成的佐剂/抗原共递送疫苗。该茯苓多糖纳米佐剂可以极大增强疫苗免疫效果,减少茯苓多糖的用量,包载抗原后可以减少疫苗抗原的使用量,可解决现有技术存在的临床应用中的各种限制问题。

[0006] 本发明还提供了一种茯苓多糖纳米佐剂及由该佐剂形成的佐剂/抗原共递送疫苗的制备方法,操作方法简单易行,效果显著,适合大规模生产。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明提供一种茯苓多糖纳米佐剂,所述的茯苓多糖纳米佐剂的载体材料为纳米氧化石墨烯,在纳米氧化石墨烯载体上连接茯苓多糖,形成基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂。本发明提供的茯苓多糖纳米佐剂,能够高效率地负载茯苓多糖,解决了茯苓多糖药物释放快,注射药量过大的临床应用难题。

[0009] 所述的纳米氧化石墨烯为经过纳米化方法处理的石墨烯氧化物,具有更多的含氧官能团,具有很高的比表面积、生物相容性好的纳米材料。其粒径在1~100nm之间,分子量为5kDa~10kDa,可以进入淋巴结作用,广泛的应用于药物和疫苗的运载体领域。

[0010] 所述的茯苓多糖分子量为8kDa~15kDa,其组成单糖包括葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖等,其质量比依次为(2~3.5):(1~2):(0.3~4):1。

[0011] 所述纳米氧化石墨烯与茯苓多糖的质量比为1:2.5~1:10,优选为1:5。

[0012] 所述的茯苓多糖纳米佐剂粒径优选为100nm~500nm,分子量为15kDa~45kDa。

[0013] 一种制备茯苓多糖纳米佐剂的方法,包括如下步骤:

[0014] (1)用无菌水溶解分散氧化石墨烯,超声2小时后冰浴超声30分钟,加入氢氧化钠(终浓度为5M),继续超声2小时;16,000g超重力高速离心,收集上清液,即获得纳米化的氧化石墨烯载体溶液,该纳米氧化石墨烯载体溶液终浓度为0.1~10mg/mL,优选为1mg/mL;

[0015] (2)将上述(1)中的纳米氧化石墨烯溶液超声1小时,调节pH至9-10,优选为9.5。加入环氧氯丙烷,通入氮气反应,在水浴40℃搅拌反应4小时后透析去除未反应环氧氯丙烷;

[0016] (3)用去离子水制备茯苓多糖溶液,并经过去内毒素亲和层析处理,内毒素含量<5EU/mL,茯苓多糖溶液浓度为2~20mg/mL,优选为5mg/mL。

[0017] (4)将茯苓多糖溶液溶于上述(2)中的纳米氧化石墨烯溶液中,调节pH至9~10,优选为9,42℃水浴1~3小时,优选为3小时,离心收集即得包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂。

[0018] 上述制备方法中的任意一项制备得到的茯苓多糖纳佐剂也在本发明的保护范围之内。

[0019] 本发明还提供一种佐剂/抗原共递送疫苗,所述的佐剂/抗原共递送疫苗由上述茯苓多糖纳米佐剂负载病毒抗原而成。所述的佐剂/抗原共递送疫苗的抗原与茯苓多糖均与氧化石墨烯相连。疫苗粒径为50nm~1000nm,zeta电位绝对值为20~30mv。

[0020] 所述病毒抗原包括:EV71灭活病毒、甲肝灭活病毒、脊髓灰质炎灭活病毒、流感灭

活病毒、HPV病毒样颗粒、乙肝病毒样颗粒或含有以上病毒抗原的重组蛋白中的任意一种。

[0021] 所述纳米氧化石墨烯与茯苓多糖的质量比为1:2.5~1:10,优选为1:5。

[0022] 所述病毒抗原与茯苓多糖的质量比为1:2~1:50,优选为1:25。

[0023] 本发明中,佐剂/抗原共递送疫苗的制备方法,包括以下步骤:

[0024] (1)用无菌水溶解氧化石墨烯,超声2小时后冰浴超声30分钟,加入强碱,继续超声2小时,16,000g超重力高速离心,收集上清液,即获得纳米化的氧化石墨烯载体溶液,该纳米氧化石墨烯载体溶液终浓度为0.1~10mg/mL。优选为1mg/mL。

[0025] (2)将上述(1)中的纳米氧化石墨烯溶液超声1小时,调节PH至9-10,优选为9.5,加入环氧氯丙烷,通入氮气反应,在水浴40℃搅拌反应4小时后透析去除未反应环氧氯丙烷;

[0026] (3)用去离子水制备茯苓多糖溶液,并经过去内毒素处理,茯苓多糖溶液浓度为2~20mg/mL,优选为5mg/mL。

[0027] (4)将(3)中的茯苓多糖溶液溶于上述(2)中的纳米氧化石墨烯溶液中,调节PH至9~10,优选为9,42℃水浴1~3小时,优选为3小时,离心收集即得包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂。

[0028] (5)将上述(4)中的包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂溶液调pH至4.5~7.2,优选为6;加入EDC和Sulfo-NHS,混合15min~1h,优选30min;调pH至7~8,优选为7.2,加入病毒抗原溶液,混合1~5h,优选为2h,脱盐柱脱盐即得佐剂/抗原共递送疫苗;

[0029] 步骤(4)中,EDC/Sulfo-NHS的摩尔比为1:2~10:1,优选为4:1。EDC/氧化石墨烯浓度为1:5~1:20,优选为1:10。

[0030] 步骤(4)中,病毒抗原溶液浓度为0.1~20mg/mL,优选为1mg/mL。

[0031] 上述抗原/佐剂共递送疫苗在制备药物中的应用也在本发明的保护范围之内。用于预防性及治疗性疫苗领域的应用。

[0032] 本发明所用试剂盒原料均市售可得;对于本发明中没有具体描述的装置、条件(温度、时间等)、物质、用量、方法等,均可采用本领域已知的或本领域技术人员按照常规技术可确定的。

[0033] 与现有技术相比,本发明优点如下:

[0034] 1.茯苓多糖纳米佐剂的制备国内外未见报道,本发明提供了一种基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂的制备方法及其优化的条件。

[0035] 2.茯苓多糖纳米佐剂的免疫增强活性未见报道。通过本发明的实施,证明茯苓多糖通过制备成茯苓多糖纳米佐剂后极大增强了免疫效果,表现为体外刺激小鼠树突状细胞成熟,诱导TH1型免疫应答,与茯苓多糖相比,具有较强的缓释作用,从而长时间增强动物免疫功能,减少茯苓多糖的用量。因此,茯苓多糖纳米佐剂为新型佐剂的研制提供了材料和示范。

[0036] 3.本发明提供的含茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗,稳定性高,大大增强了茯苓多糖和抗原的生物利用率,使抗原和佐剂可以被同一细胞摄取,增强疫苗靶向性,并能增强TH1型免疫反应,具有免疫反应持续性强,免疫效果好,细胞因子分泌增加等优点。

附图说明

[0037] 图1显示茯苓多糖纳米佐剂和佐剂抗原共递送疫苗的制备流程。

- [0038] 图2显示茯苓多糖纳米佐剂的Zeta电位。
- [0039] 图3显示茯苓多糖纳米佐剂的电镜。
- [0040] 图4显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗被树突状细胞摄取。
- [0041] 图5显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗诱导BMDC上调CD86表达。
- [0042] 图6显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗诱导BMDC上调CD80表达。
- [0043] 图7显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗诱导BMDC上调MHCII表达。
- [0044] 图8显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗免疫小鼠后诱导抗原特异性IgG抗体产生。
- [0045] 图9显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗免疫小鼠后诱导脾细胞分泌IFN- γ 细胞因子。
- [0046] 图10显示茯苓多糖纳米佐剂疫苗免疫小鼠后诱导脾细胞分泌IL-4细胞因子。

具体实施方式

- [0047] 以下结合实施例对本发明做进一步说明,本发明包括但不限于以下实施例。
- [0048] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0049] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0050] 实施例1
- [0051] 本实施例是本发明所公开的基于氧化石墨烯材料的茯苓多糖纳米佐剂及由该佐剂形成的佐剂/抗原共递送疫苗的制备过程。
- [0052] 该制备方法包括以下步骤:
- [0053] (1)用无菌水溶解氧化石墨烯,超声2小时后冰浴超声30分钟,加入强碱,继续超声2小时。16,000g高速离心,收集上清液,即获得纳米化的氧化石墨烯载体溶液,该纳米氧化石墨烯载体溶液终浓度为1mg/mL。
- [0054] (2)将上述(1)中的纳米氧化石墨烯溶液超声1小时,调节PH至9.5,加入环氧氯丙烷,通入氮气反应,在水浴40度搅拌反应4小时后透析去除未反应环氧氯丙烷。
- [0055] (3)用去离子水制备茯苓多糖溶液,并经过去内毒素处理,茯苓多糖溶液浓度为5mg/mL。
- [0056] (4)将(3)中的茯苓多糖溶液溶于上述(2)中的纳米氧化石墨烯溶液中,调节PH至9,42度水浴3小时,离心收集即得包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂。
- [0057] (5)将上述(4)中的包载纳米氧化石墨烯的茯苓多糖纳米佐剂溶液调PH至6。加入连接EDC和Sulfo-NHS,混合30min。调PH至7,加入病毒抗原溶液,混合2h,脱盐柱脱盐即得佐剂/抗原共递送疫苗;
- [0058] 制备空白氧化石墨烯载体的方法同上,所不同的是,不添加茯苓多糖和抗原。
- [0059] 基于茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗构建示意图见图1,
- [0060] 实施例2含茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗的特征
- [0061] (1)表面 ζ 电位测定
- [0062] 用Milli-Q超纯水精确制备浓度为0.1mg/mL的茯苓多糖纳米佐剂/抗原共递送疫苗样品溶液。取1mL样品溶液,用Zeta电位分析仪(英国Malvern,Zetasizer NanoZS)测定纳米粒子表面 ζ 电位。每次检测前恒温20min,每个样品测试三次,结果取平均值,结果见图2,zeta电位绝对值大于20Mv,表示样品较为稳定。
- [0063] (2)透射电镜观察

[0064] 用Milli-Q超纯水精确制备浓度为0.1mg/mL的茯苓多糖纳米佐剂/抗原共递送疫苗样品溶液,取10~20 μ L样品溶液滴加到含有碳支持膜的230目铜网上,恒温干燥后,用透射电镜(TEM,美国FEI,Tecnai G2 20S-TWIN,200kV)观察样品形态(图3)。

[0065] (3) 佐剂/抗原共递送疫苗稳定性考察

[0066] 取适量含茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗用激光粒度仪测定Zeta电位,两周后取同一批佐剂/抗原共递送疫苗,用同样方法测定Zeta电位,无显著差异,表明本发明的佐剂/抗原共递送疫苗稳定性良好。

[0067] (4) 体外药物释放

[0068] 取适量含茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗,其中模式抗原OVA采用FITC标记后加入DC2.4小鼠树突状细胞中,培养6h后,细胞固定,采用DAPI染细胞核,荧光显微镜下观察荧光,如图4所示,可见细胞核外有绿色荧光表达,部分树突状细胞已摄取抗原,本发明的佐剂/抗原共递送体系可携带抗原进入细胞。

[0069] (5) 载药量测定

[0070] 取适量含茯苓多糖纳米佐剂的佐剂/抗原共递送疫苗,使用BCA法测量抗原蛋白的负载量,抗原蛋白负载浓度为0.5mg/mL,载药量良好。

[0071] 实施例3

[0072] (a) 用实施例1中制备得到的佐剂/抗原共递送疫苗、茯苓多糖、实施例1中制备得到的空白纳米氧化石墨烯载体、模式抗原及PBS溶液组作为阴性对照(简称PBS)处理小鼠骨髓来源的树突状细胞(简称BMDC),探索其在体外对小鼠树突状细胞的成熟影响,方案如下:

[0073] 选择SPF级C57/BL6小鼠,雌性,6-8周。

[0074] (1) 骨髓细胞的准备

[0075] 用颈椎脱臼法处死小鼠,剪除小鼠皮毛,取股骨,在70%的酒精中浸泡2~5min,转移至RPMI1640全血清培养基中(冰上),小心剪除股骨两端,注射器每次吸取100~200 μ L RPMI1640,反复冲洗骨髓至含有RPMI1640的无菌管中,直至骨完全变白。用200目尼龙网过滤,把骨髓冲洗液从管中转移到含RPMI1640全血清的培养皿中。在细胞培养箱中培养30min。收集未贴壁或松散贴壁的细胞计数,调整细胞数为 1×10^6 个/mL,加入20ng/mL GM-CSF,铺板。

[0076] (2) 骨髓来源树突状细胞的培养

[0077] 骨髓细胞培养第二天,部分换液,加入新的含GM-CSF的RPMI1640全血清培养基。第三天,完全换液,吸弃细胞上清,轻轻洗去未贴壁细胞,每孔加入新的含GM-CSF的RPMI1640全血清培养基。第四天或第五天,冲洗收集未贴壁或松散贴壁的细胞,弃掉贴壁细胞。第六天或第七天,培养48h后,收集未成熟的BMDC用于后续检测。

[0078] (3) 流式细胞仪测定细胞表面CD80和CD86,MHCII

[0079] 收集未成熟BMDC,按细胞浓度 1×10^6 个/mL接种于24孔板中。分别加入茯苓多糖,佐剂/抗原共递送疫苗,氧化石墨烯载体,模式抗原和PBS,处理24h,收集不完全贴壁细胞,采用anti-mouse CD16/32抗体封闭30min,加入APC anti-mouse CD80、PE/Cy7 anti-mouse CD86、PE anti-mouse MHC II抗体,4 $^{\circ}$ C避光染色30min至1h。收集细胞,流式细胞仪进行检测。

[0080] 实验结果如图5-7所示,氧化石墨烯载体对BMDC表面标志分子的表达无显著影响,

茯苓多糖可显著上调BMDC表面CD86和MHCII分子。佐剂/抗原共递送疫苗可有效的诱导BMDC体外成熟。

[0081] 实施例4

[0082] (a) 用实施例1中制备得到的佐剂/抗原共递送疫苗、茯苓多糖、模式抗原及PBS溶液组作为阴性对照(简称PBS)免疫小鼠,探索其在体内对小鼠细胞免疫和体液免疫的影响,方案如下:

[0083] D0天皮下接种免疫C57BL/6小鼠(雌性,6-8w),每组小鼠分别接种PBS,模式抗原(10 μ g),茯苓多糖(500 μ g)或含10mg模式抗原的共递送疫苗。2周后取血保存,加强免疫一次,4周后处死小鼠,取血分别检测小鼠血清抗模式抗原OVA特异性IgG抗原。取脾经70 μ m细胞筛网研磨,PBS/EDTA冲洗,制备脾细胞单细胞悬液。细胞计数后按每孔 2×10^5 /孔加入96孔板中,加入300 μ g/mL模式抗原溶液,继续培养72h,收集细胞上清,ELISA检测细胞上清中的IFN- γ 和IL-4细胞因子含量。

[0084] 如图8所示,与对照组相比,佐剂/抗原共递送疫苗显著的增加小鼠血清中模式抗原特异性IgG抗体的表达,表明可促进体液免疫。

[0085] 与对照组相比,佐剂/抗原共递送疫苗显著的增加小鼠脾细胞分泌IFN- γ ,表明可增强细胞免疫应答(图9-图10)。

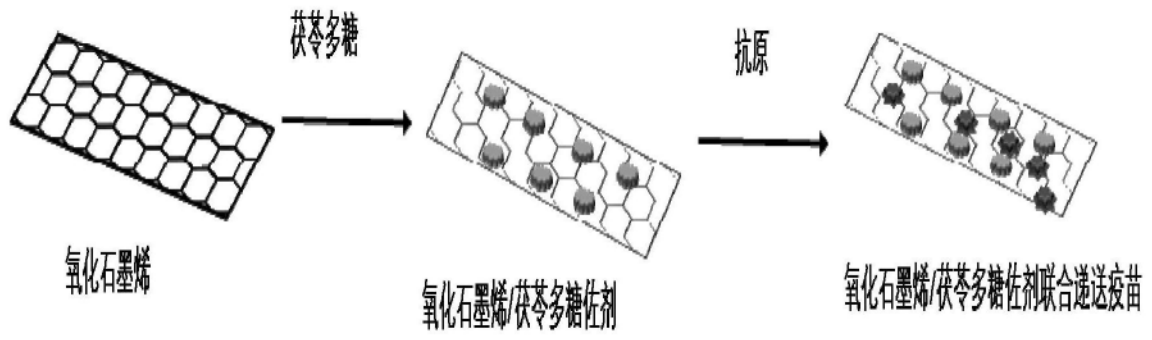


图1

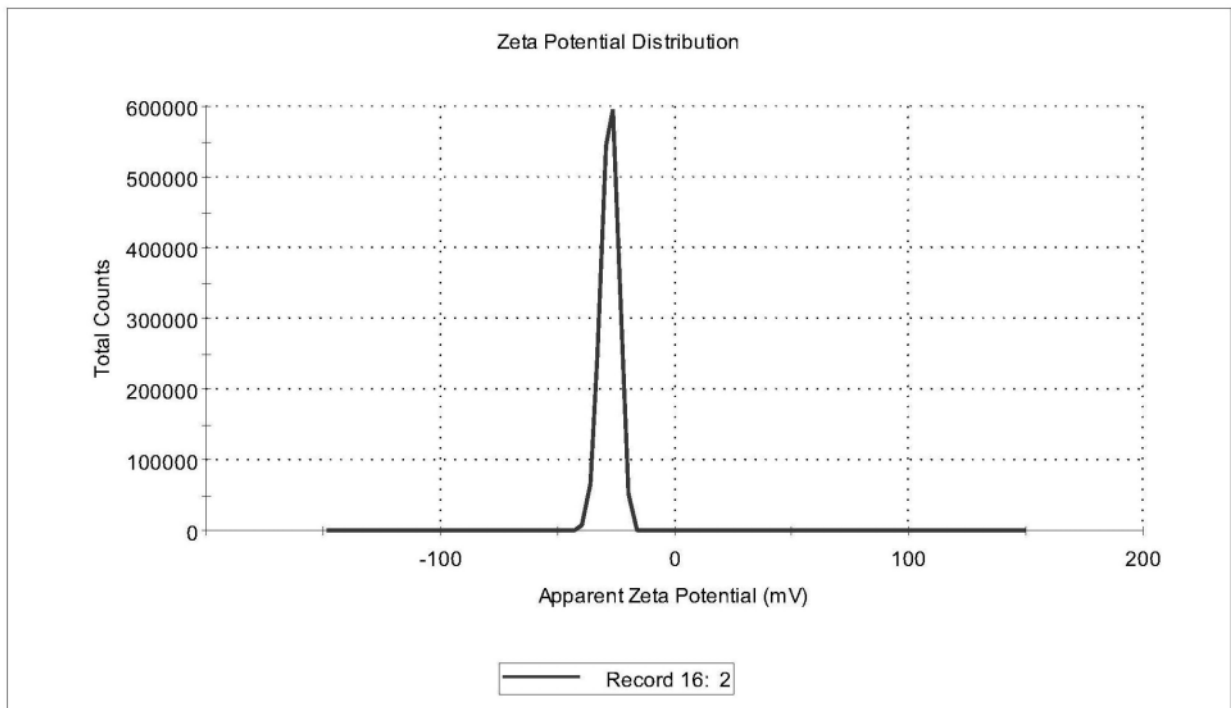


图2

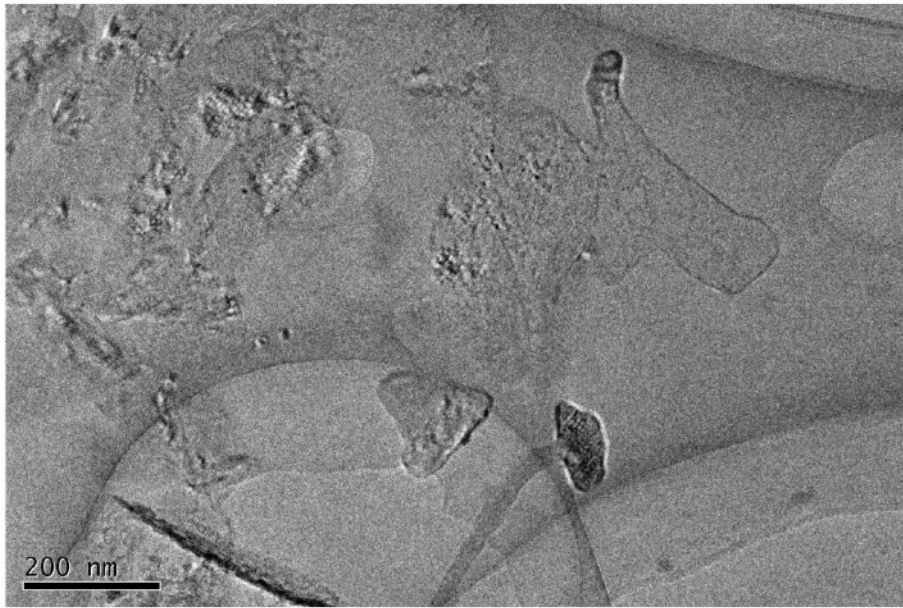


图3

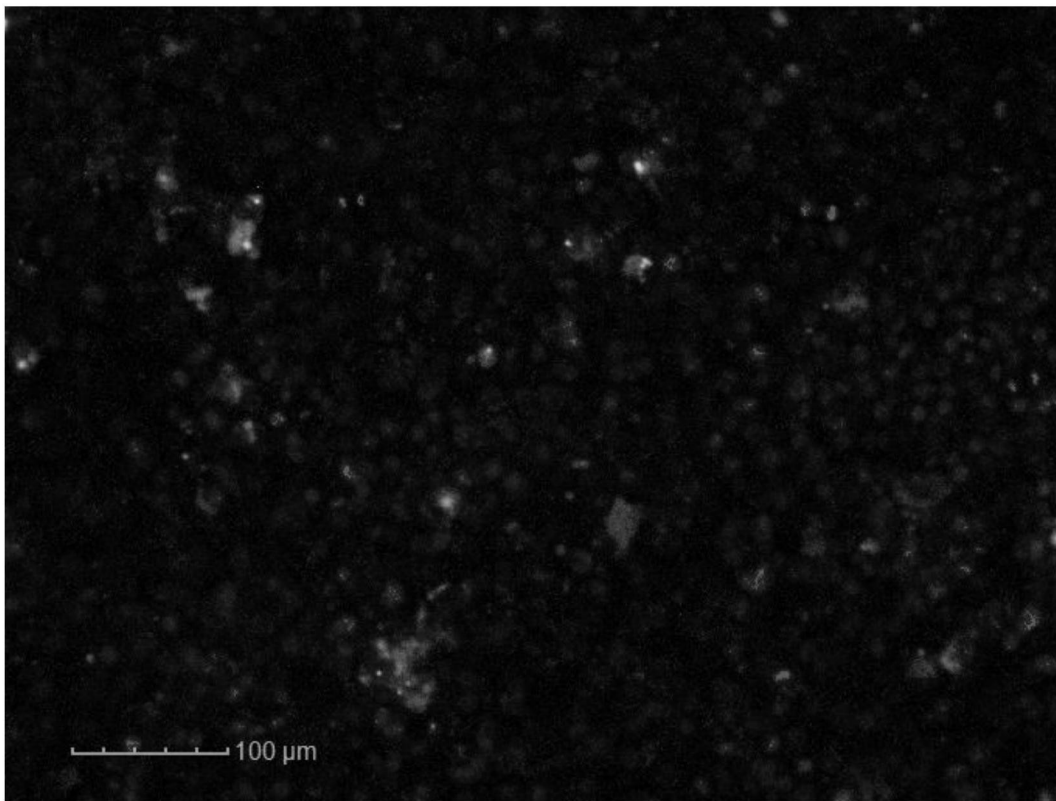


图4

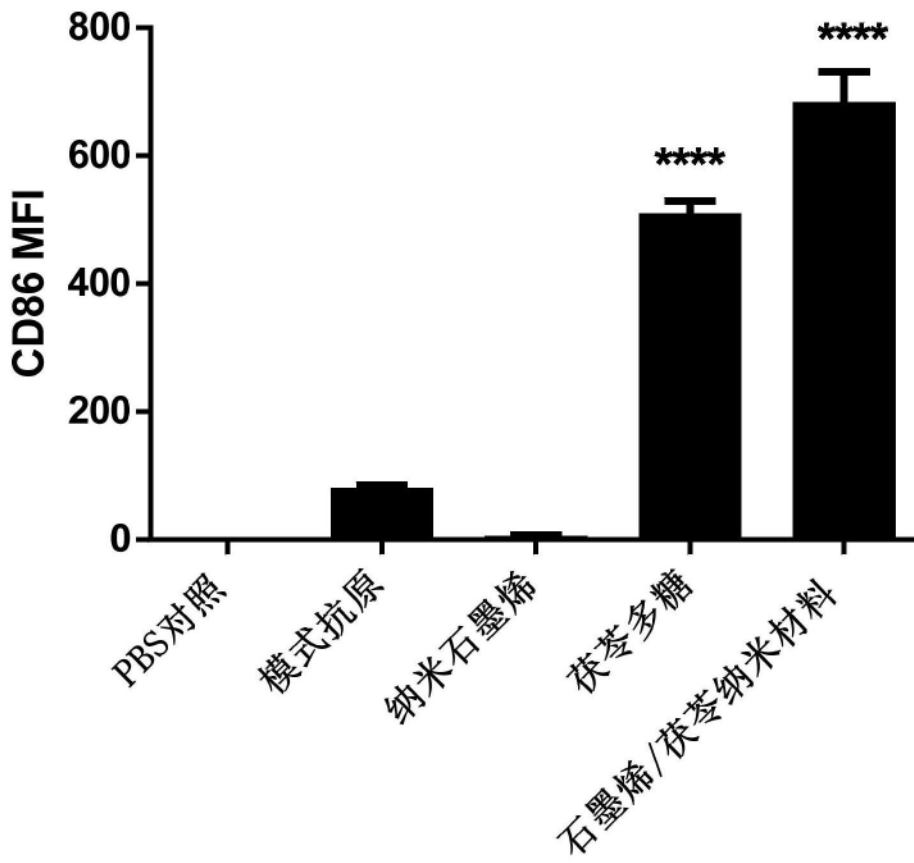


图5

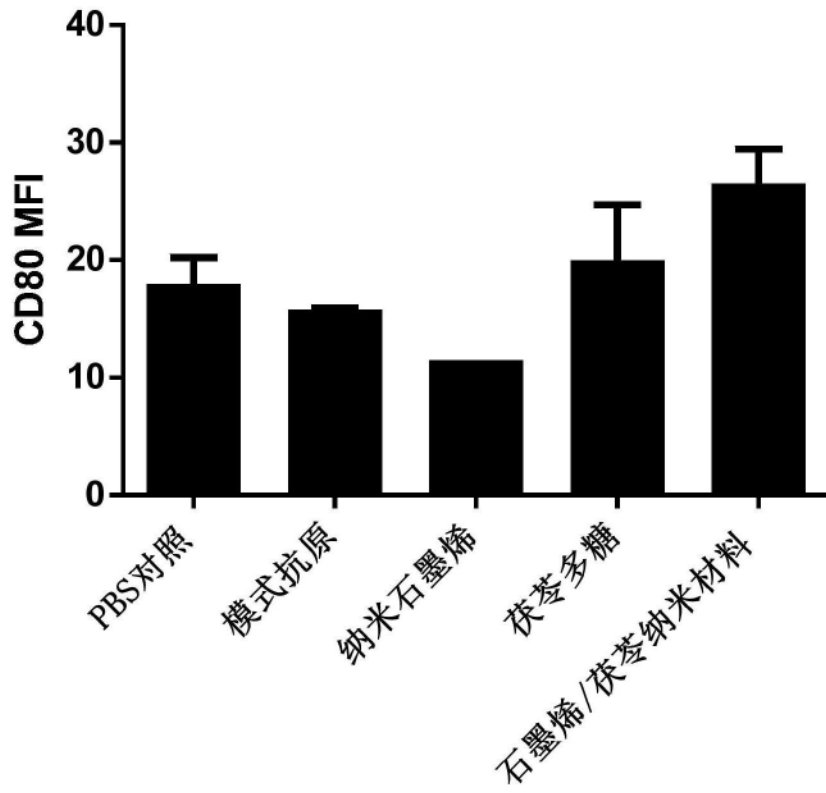


图6

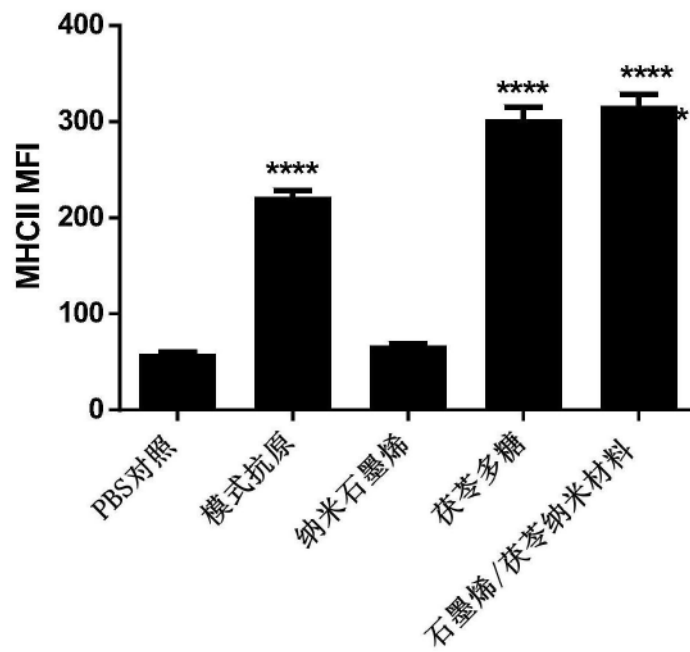


图7

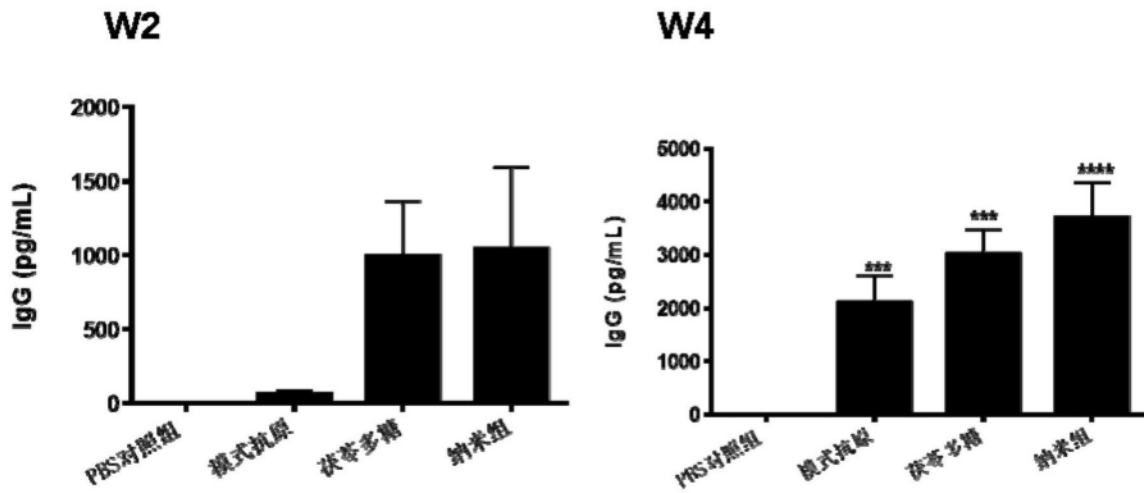


图8

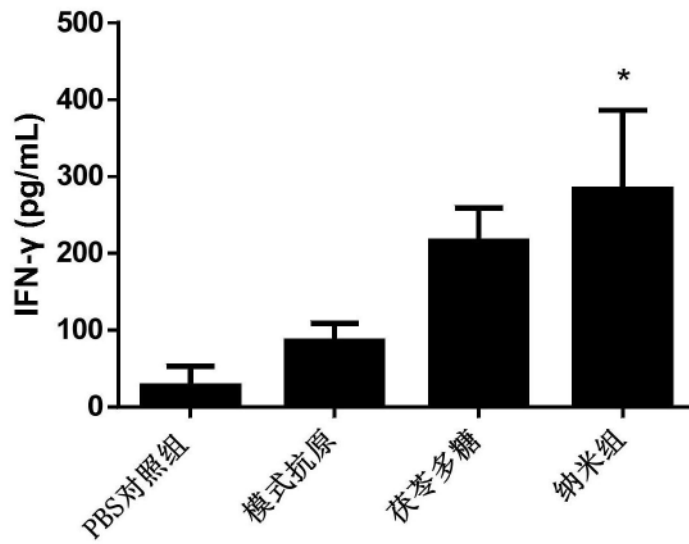


图9

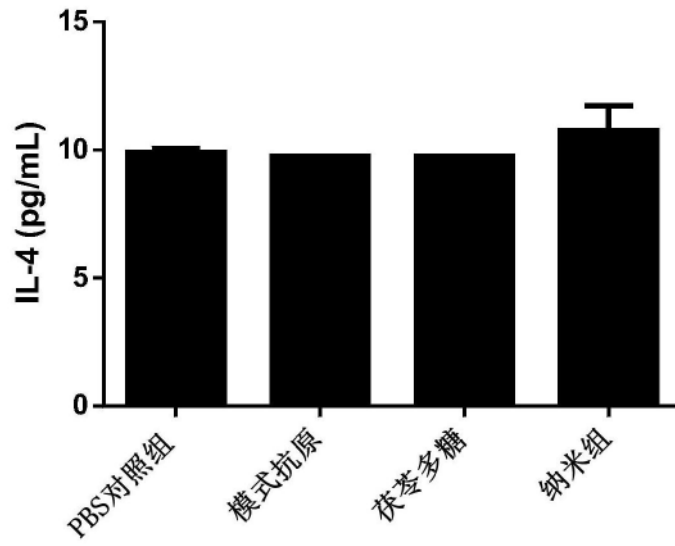


图10