



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106943592 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710120639.7

(22)申请日 2017.03.02

(71)申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 刘宗华 薛巍 魏建业

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 崔红丽 陈燕娴

(51)Int.Cl.

A61K 39/39(2006.01)

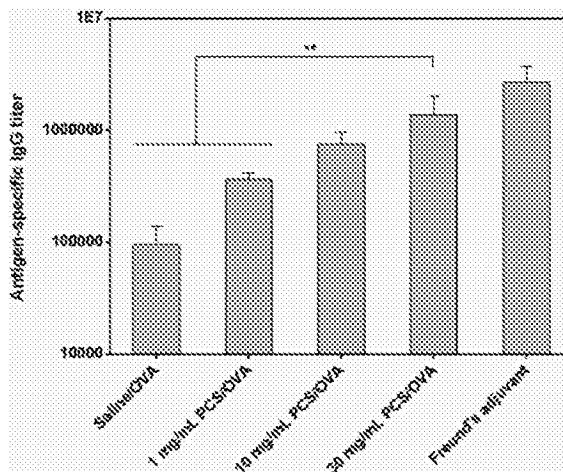
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用

(57)摘要

本发明公开一种磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用,属于生物材料及免疫治疗领域。首次采用磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂,与传统的佐剂相比,磷酸化壳聚糖合成简单、成本低廉,且具有良好的生物可降解性和生物相容性,对生物体和环境均不产生危害。磷酸化壳聚糖具有良好的水溶性,可很好的应用于人体内环境中而不产生不良毒副作用。磷酸化壳聚糖作为一种免疫佐剂能显著诱导更高水平的抗原特异性IgG抗体效价、IFN-γ/IL-4细胞因子和CD4+/CD8+T淋巴细胞免疫反应以及能更好地活化树突状细胞,增强疫苗的免疫原性,有效提高机体的抗原特异性免疫应答,因此在疫苗治疗领域具有重要的应用价值。



1. 磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂的应用。
2. 根据权利要求1的应用,其特征在於:
所述的磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於:
所述的疫苗治疗免疫方式为腿部肌肉注射。
4. 根据权利要求2或3所述的应用,其特征在於:
所述的疫苗为模型疫苗卵清蛋白OVA抗原。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於:
配制磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液,其为1~30mg/mL PCS/OVA。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於:
所述的磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液为10~30mg/mL PCS/OVA。
7. 根据权利要求5或6所述的应用,其特征在於:
所述的磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液为30mg/mL PCS/OVA。

磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料及免疫治疗领域,具体涉及一种磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用。

背景技术

[0002] 壳聚糖因具有良好的生物相容性、生物活性、生物可降解性、生物粘附性等优点而被广泛研究。有研究证明,壳聚糖作为抗原递送载体可显著提高亚单位疫苗的免疫活性。然而由于壳聚糖只溶解在稀酸条件下,这使其在生物医学应用领域受到很大的限制。为了克服此缺点,研发人员将壳聚糖进行水溶性改性并用于制备免疫佐剂已经有较多的报道。目前国内外更多的研究是将壳聚糖季铵化,并用于提高亚单位疫苗的IgG抗体效价和血凝抑制抗体水平(Amidi,M.,et al.,N-Trimethyl chitosan(TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination:Biological properties and immunogenicity in a mouse model [J].Vaccine,2007.25(1):p.144-153.)。而壳聚糖含磷衍生物磷酸化壳聚糖除了具有壳聚糖的优点外,最重要的是具有良好的水溶性,因此在生物医学应用领域备受关注。目前对磷酸化壳聚糖的研究集中在合成、表征及其组织再生与修复应用方面(孙国栋,李志忠等,壳聚糖/亚磷酸化壳聚糖复合海绵复合人脐带间充质干细胞用于异位成骨的实验研究,中国修复重建外科杂志,2011年12期),而尚没发现将磷酸化壳聚糖(PCS)作为免疫佐剂用于疫苗治疗的相关研究。

[0003] 随着现代医学技术的发展,疫苗已经被视为可最有效地防止和根除威胁生命的传染病如肝炎、肺结核等,可保护机体免受不同病原体的感染。大部分传统疫苗来源于具有良好免疫原性的病原体浆液或裂解物,然而此类疫苗的不彻底减毒和灭活将会引发一系列安全问题。随着现代生物技术的发展,不同类型的新型疫苗被广泛开发如重组亚单位疫苗、DNA疫苗和合成肽疫苗,然而即使该类疫苗具有较高的纯度和安全性,不足的是他们具有免疫原性较低等缺点。因此设计具有更高的免疫原性、安全性,同时能有效增强机体特异性免疫应答的免疫佐剂成为首要任务。免疫佐剂是一类能帮助递送抗原、活化抗原递呈细胞(APC)并引发机体免疫细胞的活化与分化的非特异性免疫刺激分子。理想的免疫佐剂必须包括以下几个条件:他们必须便宜且可规模生产;他们必须安全用于人体;他们可提高抗原的免疫原性并增强体液和细胞免疫应答。而目前传统的佐剂主要是弗氏完全佐剂和铝佐剂。弗氏完全佐剂主要用于实验室,虽然能有效提高机体的体液和细胞免疫反应,但对机体具有毒副作用。而铝佐剂是唯一一种被批准用于临床治疗的佐剂,但具有诱导细胞免疫能力较弱和引发局部炎症反应等缺点。因此研究开发新型、安全并且能有效诱导细胞和体液免疫的免疫佐剂具有重大的意义。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用。用于增强机体抗原特异性免疫应答。

[0005] 本发明所要解决的第一个技术问题是,提供一种水溶性的磷酸化壳聚糖作为疫苗佐剂。为解决该技术问题,本发明采用均相法合成水溶性磷酸化壳聚糖。作为免疫佐剂,所述的磷酸化壳聚糖能溶于生理盐水中,且磷酸化壳聚糖生理盐水溶液浓度设置分别为1mg/mL、10mg/mL、30mg/mL。

[0006] 本发明要解决的第二个技术问题是,提供制备的磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂用于疫苗治疗的应用。所述的疫苗治疗免疫方式为腿部肌肉注射,所述的疫苗为模型疫苗卵清蛋白OVA抗原。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 本发明提供一种磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂的应用。

[0009] 所述的磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂在疫苗治疗中的应用。

[0010] 所述的疫苗治疗免疫方式为腿部肌肉注射;

[0011] 所述的疫苗为模型疫苗卵清蛋白OVA抗原;

[0012] 配制磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液,其为1~30mg/mL PCS/OVA;优选为10~30mg/mL PCS/OVA;更优选为30mg/mL PCS/OVA。

[0013] 所述的疫苗治疗方法主要包括以下步骤:

[0014] 1) 配制浓度梯度的磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液,分别为1mg/mL PCS/OVA、10mg/mL PCS/OVA、30mg/mL PCS/OVA。

[0015] 2) 分别用不同浓度的磷酸化壳聚糖/OVA生理盐水溶液免疫小鼠。对小鼠进行三次腿部肌肉注射,每次注射间隔时间为10天。

[0016] 3) 第三次免疫10天后,眼球取血,分离血清;取脾脏,制备不同浓度的脾细胞悬液。

[0017] 4) 通过ELISA、elispot、流式细胞仪、免疫组化、动物活体成像等方法考察磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂能否显著诱导机体产生抗原特异性免疫应答,并且研究其是否具有磷酸化壳聚糖浓度依赖性。

[0018] 本发明的机理是:磷酸化壳聚糖基佐剂与传统免疫佐剂的作用机理不同。磷酸化壳聚糖作为佐剂用于疫苗治疗具有以下优势:第一,生物可降解的磷酸化壳聚糖制备简单、来源丰富、无致突性、无毒副作用,具有良好的生物相容性。第二,磷酸化壳聚糖具有良好的水溶性、生物粘附性且带丰富的正电荷,可高效包裹带负电荷的抗原,并通过静电相互作用粘附于带负电荷的细胞膜,使抗原更有效的被抗原递呈细胞(APC)识别、摄取。此外磷酸化壳聚糖能保护抗原免受体内的酸、碱、蛋白酶等破坏,提高抗原的利用率。第三,我们也研究发现,凭借良好的生物粘性、pH响应性和带电性,当将磷酸化壳聚糖/抗原疫苗免疫于机体内时,磷酸化壳聚糖对包裹的抗原具有一定的仓储效应,并对抗原进行缓控释放,使机体不断接受免疫刺激从而诱导长期有效的免疫应答。第四,据国外学者研究,磷酸化壳聚糖本身具有一定的免疫原性,能激活抗原递呈细胞,从而提高机体的免疫水平。因此将磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂用于提高疫苗的抗原特异性免疫应答具有重要的应用价值。

[0019] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及效果:

[0020] (1) 首次采用磷酸化壳聚糖作为免疫佐剂,具有一定的创新性。

[0021] (2) 与传统的佐剂相比,磷酸化壳聚糖合成简单、成本低廉,且具有良好的生物可降解性和生物相容性,对生物体和环境均不产生危害。

[0022] (3) 磷酸化壳聚糖具有良好的水溶性,可很好的应用于人体内环境中而不产生不

良毒副作用。

[0023] (4) 磷酸化壳聚糖作为一种免疫佐剂能显著诱导更高水平的抗原特异性IgG抗体效价、IFN- γ /IL-4细胞因子和CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞免疫反应以及能更好地活化树突状细胞(DCs),增强疫苗的免疫原性,有效提高机体的抗原特异性免疫应答,因此在疫苗治疗领域具有重要的应用价值。

附图说明

[0024] 图1是不同免疫组小鼠的血清抗原特异性IgG抗体效价(n=5)的结果图。

[0025] 图2是不同免疫组小鼠的脾细胞增殖系数(n=5)的结果图。

[0026] 图3是不同免疫组小鼠的脾细胞因子分泌水平(n=5)的结果图;其中,通过ELISA测定IFN- γ (A)和IL-4 (B)细胞因子分泌水平;IFN- γ (C)和IL-4 (D)分泌型细胞数量由ELIspot测定,SFC表示形成的斑点细胞;IFN- γ 和IL-4分泌型细胞的ELIspot二维图(E)。

[0027] 图4是不同免疫组小鼠的CD4⁺和CD8⁺效应/中央记忆T细胞数量(n=5)的结果图;其中,CD4⁺中央记忆T细胞(A)、CD4⁺效应记忆T细胞(B)、CD8⁺中央记忆T细胞(C)及CD8⁺效应记忆T细胞数量均由流式细胞仪测定;FACS流式图(E)为每个免疫组代表图。

[0028] 图5是抗原在免疫部位的控制释放的结果图;其中,不同免疫组小鼠的腿部荧光活体成像代表图(n=3)(A);Cy5.5标记抗原在免疫部位不同时间点的相对荧光强度(占免疫部位初始荧光强度的百分比)(B)。

[0029] 图6是在免疫2天和7天后通过免疫组化法测定抗原转移至脾脏(n=4)的结果图;箭头指示的黄色点代表抗原。

[0030] 图7是不同免疫组小鼠MHC II分子在脾脏树突状细胞上的表达水平(n=5)的结果图;其中,MHC II分子在CD11c⁺树突状细胞上表达的百分比(A)和平均荧光强度(B);不同免疫组小鼠MHC II分子在树突状细胞表达的流式代表图(C)。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0032] 下列实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,实施例中所使用的实验材料、试剂等如无特殊说明,均为商业途径获取。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不是用于限制本发明的范围。

[0033] 实施例1

[0034] 一、磷酸化壳聚糖的制备:

[0035] 10g壳聚糖(3000cps)溶于500mL 1% (v/v)的乙酸中,并升温至70℃。将10g亚磷酸溶于20mL水中,并一次性加入反应体系中。混合均匀后,加入13mL 37%~40%的甲醛溶液中,搅拌3小时。反应结束后,将反应液加入至无水乙醇中进行分离沉淀。用乙醇重复洗涤、纯化两次,透析后冷冻干燥得到水溶性磷酸化壳聚糖。

[0036] 二、6种不同配方疫苗的制备:

[0037] 以卵清蛋白OVA为抗原,不同配方的疫苗按以下表格进行配制,分别为生理盐水(空白对照组)、OVA/生理盐水(阴性对照组)、1mg/mL PCS/OVA、10mg/mL PCS/OVA、30mg/mL

PCS/OVA及弗氏佐剂(阳性对照组)。

[0038] 表1不同组别疫苗的配方

[0039]

组别	PCS	OVA	生理盐水	弗氏佐剂
空白对照组	0	0	1mL	0
OVA/生理盐水(阴性对照)	0	1mg	1mL	0
1mg/mL PCS/OVA	1mg	1mg	1mL	0
10mg/mL PCS/OVA	10mg	1mg	1mL	0
30mg/mL PCS/OVA	30mg	1mg	1mL	0
阳性对照	0	1mg	500 μ L	500 μ L

[0040] 三、小鼠免疫方案的制定:

[0041] 6~8周的雌性Balb/c小鼠随机分成6组,每组5只;分别于第0、10、20天腿部注射疫苗免疫小鼠,剂量为每只小鼠每次注射100 μ L疫苗溶液(每次注射含100 μ g OVA,每只腿注射一半剂量)。第三次免疫10天后,摘取小鼠眼球取血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C下保存备用;取小鼠脾脏,研磨、重悬制备不同浓度的脾细胞悬浮液,备用。

[0042] 四、各项免疫指标的测定:

[0043] 1) IgG抗体效价的测定

[0044] 用5 μ g/mL的OVA抗原包被液包被96孔板,4 $^{\circ}$ C包被过夜。然后用然后用的PBST洗板1次。在每孔中加入200 μ L的封闭液置于37 $^{\circ}$ C的摇床上孵育60min,然后用PBST洗板3次。在空白对照孔中加入100 μ L PBS,样品孔中100 μ L小鼠血清稀释液,置于37 $^{\circ}$ C的摇床上孵育60min。然后用PBST洗板3次,并在所有孔中加入50 μ L HRP标记的抗小鼠IgG二抗,在37 $^{\circ}$ C的摇床上孵育1h,然后用PBST洗板4次。每孔加入100 μ L的TMB显色液。在室温下避光孵育15min。随后每孔加入100 μ L的终止液。立即用酶标仪在450nm处检测吸收值。

[0045] 2) 脾细胞增殖实验

[0046] 在96孔板中,每孔加100 μ L上述脾细胞悬液(2×10^6 cells/mL),分别加100 μ L的卵清蛋白溶液(浓度为100 μ g/mL,RPMI1640基础培养液)或RPMI1640基础培养液(空白对照),每组3个平行。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养72h后,向每孔加入20 μ L CCK-8溶液(注意不要在孔中生成气泡,它们会影响OD值的读数,CCK-8溶液需混匀);将培养板在培养箱内孵育1~4h;用酶标仪测定在450nm处的吸光度。

[0047] 3) ELISA测定脾细胞分泌的细胞因子水平

[0048] 在24孔板中,每孔加750 μ L脾细胞悬液(2×10^6 cells/mL),分别加750 μ L的卵清蛋白溶液(浓度为100 μ g/mL,RPMI1640培养液),每只小鼠脾细胞1个孔。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养60h,收集细胞悬液到1.5mL EP管中,2000r/min,离心5min,收集上清,-80 $^{\circ}$ C保存备用。通过ELISA法测定脾细胞IFN- γ 和IL-4细胞因子水平。

[0049] 4) ELISpot实验(酶联免疫斑点法)

[0050] 在超净台中用无菌PBS洗板4次,然后在每孔中加入200 μ L含10%血清的培养基,在室温下孵育30min以上。弃液,每孔加100 μ L脾细胞悬液(2.5×10^6 cells/mL),分别加100 μ L的卵清蛋白溶液,每组3个平行,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养12~48h。弃液,每孔加入PBS 200 μ L,洗板5次。将二抗加入到孔中,每孔100 μ L,在室温下孵育2小时,弃液,每孔加入PBS 200 μ L,洗板5

次。用PBS-0.5%FCS按1:1000稀释Streptavidin-ALP,每孔加入100 μ L稀释液,室温下孵育1h,弃液,每孔加入PBS 200 μ L,洗板5次。每孔加入100 μ L显色液,斑点出现后用自来水终止反应。用ELISpot Reader观察和计数。

[0051] 5) 流式细胞术测定记忆T细胞反应

[0052] 取脾细胞悬液(1×10^6 cells) 100 μ L转移到1.5mL离心管中,离心,弃上清,加入100 μ L配含四种染料(FITC 450-anti-CD4, PerCP-Cy5.5-anti-CD8 α , PE-anti-CD44和APC-anti-CD62L)的PBS溶液重悬。4 $^{\circ}$ C下静置15min。3000rpm离心5min,弃上清,用300 μ L PBS重悬。用流式细胞仪测定。

[0053] 6) 荧光染色活体成像实验检测抗原的缓释

[0054] 为了监测体内注射部位抗原的缓释,用Cy5.5染料标记卵清蛋白。设5个实验组,每组3只雌性BALB/c小鼠,通过腿部肌肉注射,每条后腿注射50 μ L上述卵清蛋白疫苗混合液(除空白对照组外),在指定的时间点,通过活体成像仪记录抗原在注射部位的缓释情况。

[0055] 7) 免疫组化试验

[0056] 将小鼠随机分为6组($n=4$),并用100 μ L不同的疫苗制剂(每只小鼠100 μ g OVA,每条腿半剂量)进行肌内免疫。在免疫后2或7天,对小鼠实施安乐死,并手术分离脾脏,固定在10%甲醛中,石蜡包埋,并在聚赖氨酸包被的载玻片上切成4 μ m厚的切片。根据制造商的说明书进行免疫组织化学染色。

[0057] 8) 检测活化的CD11c⁺树突细胞

[0058] 取脾细胞悬液(1×10^6 cells) 100 μ L转移到1.5mL离心管中,离心,弃上清,加入100 μ L配含四种染料(FITC-CD11c和PE-MHC-II)的PBS溶液重悬。4 $^{\circ}$ C下静置15min。3000rpm离心5min,弃上清,用300 μ L PBS重悬。用流式细胞仪测定。

[0059] 五、结果与讨论

[0060] 1) 血清IgG抗体效价

[0061] 血清IgG抗体水平是评价体液免疫反应强度的重要指标。在本研究中,通过测定免疫小鼠的抗原特异性IgG抗体水平来评价磷酸化壳聚糖凝胶基疫苗载体的递送效力。如图1所示,免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠产生的IgG效价显著高于生理盐水/OVA组和1mg/mL PCS/OVA组,表明30mg/mL PCS/OVA组疫苗能诱导显著高水平的抗原特异性体液免疫反应。

[0062] 2) 体外脾细胞增殖实验

[0063] 体外抗原重刺激脾细胞增殖水平可以反映抗原特异性脾细胞的活化能力。如图2所示,经过体外抗原重刺激后,免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠脾细胞增殖水平显著高于生理盐水/OVA组和1mg/mL PCS/OVA组,表明30mg/mL PCS/OVA组疫苗可诱导显著高的抗原特异性脾细胞活化水平。

[0064] 3) 细胞因子分泌水平

[0065] 脾细胞因子分泌水平也是反映抗原特异性免疫反应的一个重要指标。IFN- γ 和IL-4细胞因子分别为Th1型和Th2型免疫反应的标志物。本实验通过测定小鼠脾细胞分泌的IFN- γ 和IL-4细胞因子水平来评价Th1型和Th2型免疫反应水平。如图3A所示,免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠分泌的IFN- γ 水平显著高于生理盐水/OVA组和1mg/mL PCS/OVA组;如图3B所示,免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠分泌的IL-4水平显著高于生理盐水/OVA

组。这结果表明30mg/mL PCS/OVA组疫苗均可诱导显著高水平的Th1型和Th2型免疫反应。此外,本实验还通过ELISpot法测定细胞因子分泌型细胞频数。如图3C-E所示,免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠产生的IFN- γ -和IL-4-分泌型细胞频数均显著高于生理盐水/OVA组。这一系列结果表明,30mg/mL PCS/OVA组疫苗可作为一种疫苗递送系统诱导高水平的Th1型和Th2型免疫反应。

[0066] 4) 抗原特异性记忆T细胞反应

[0067] 免疫记忆反应是疫苗免疫的基础和前提,疫苗的主要目的是诱导免疫记忆。记忆T细胞在免疫记忆反应中起着重要的作用,当宿主再次被同样的抗原感染的时候,记忆T细胞将会快速地诱导抗原特异性免疫反应,提供有效的免疫保护,抵抗抗原的侵入。记忆T细胞依据其表型、分布及生物功能可分为两种亚型:记忆CD4⁺和CD8⁺T细胞。而每一种亚型又分为中央记忆T细胞和效应记忆T细胞,且他们的表面标志物分别为CD44^{hi}CD62L^{hi}和CD44^{hi}CD62L^{low}。在本实验中,通过流式细胞仪分别测定记忆CD4⁺和CD8⁺T细胞的表面标志物(CD44^{hi}CD62L^{hi}和CD44^{hi}CD62L^{low})比例。如图4A-B所示,相比生理盐水/OVA组,30mg/mL PCS/OVA组疫苗诱导显著高的CD4⁺中央记忆T细胞和效应记忆T细胞比例。如图4C所示,相比生理盐水/OVA组,1、10和30mg/mL PCS/OVA组疫苗均能诱导显著高的CD8⁺中央记忆T细胞比例;而如图4D所示,相比生理盐水/OVA组,30mg/mL PCS/OVA组疫苗诱导显著高的CD8⁺效应记忆T细胞比例。如图4E所示分别为流式细胞术代表图。此外我们发现,无论是记忆CD4⁺或CD8⁺T细胞,其效应记忆T细胞比例(CD4⁺:17.5~33.5%;CD8⁺:18.9~43.0%)均高于中央记忆T细胞(CD4⁺:7.45~17.4%;CD8⁺:1.16~5.22%)。这意味着效应记忆T细胞在抗原特异性免疫记忆反应中起主要作用。总之,30mg/mL PCS/OVA组疫苗可诱导显著高水平的记忆T细胞免疫反应。

[0068] 5) 抗原在免疫部位释放

[0069] 上述的实验结果表明,30mg/mL PCS/OVA组疫苗可诱导显著高水平的抗原特异性免疫反应。为了揭示其诱导机理,我们通过荧光活体成像实验检测标记Cy5.5的OVA抗原在免疫部位的释放情况,并计算不同时间点的平均荧光强度变化。如图5A所示,免疫生理盐水/OVA组疫苗的小鼠在注射120h后几乎无法检测到荧光信号,而免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠即使在注射240h后仍可清晰地检测到荧光信号。如图5B所示,随着PCS浓度的增高,抗原在免疫部位的停留时间越长。免疫30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠即使在注射240h后仍可在免疫部位检测到约32.7%的抗原。综上结果可知,PCS的引入可以显著增长抗原在注射部位的停留时间,并具有一定的PCS浓度依赖性。因此PCS可对抗原进行控制释放进而提供长期的免疫刺激,诱导更有效的免疫应答。

[0070] 6) 免疫组化实验

[0071] 免疫组化实验进一步用于检验从注射部位释放的抗原是否被抗原递呈细胞有效呈递至脾淋巴器官。如图6所示,免疫2天后,检测所有组别的小鼠脾脏的抗原阳性反应几乎没有差异。而当免疫7天后,免疫生理盐水/OVA组疫苗的小鼠脾脏几乎无法检测到抗原阳性;而免疫1、10和30mg/mL PCS/OVA组疫苗的小鼠脾脏仍能检测到明显的抗原阳性。这结果进一步表明,在PCS基疫苗中(尤其是30mg/mL PCS/OVA组疫苗),随着抗原在注射部位的持续释放,抗原逐渐被呈递至脾淋巴组织。

[0072] 7) 树突状细胞(DCs)活化

[0073] 未成熟的DCs随着对抗原的摄取而活化、成熟。只有活化及成熟的DCs才能呈递抗原至T淋巴细胞。活化及成熟的DCs在其膜表面表达高水平的MHC I和MHC II分子及共刺激分子。在本工作中,我们通过流式细胞术检测MHC II分子在CD11c⁺DCs上的表达水平,用于评价DCs的活化程度。如图7A-B所示,30mg/mL PCS/OVA组疫苗诱导的MHC II⁺百分比及平均荧光强度均显著高于生理盐水/OVA组及1mg/mL PCS/OVA组;10mg/mL PCS/OVA组疫苗诱导的MHC II⁺平均荧光强度显著高于生理盐水/OVA组。如图7C所示为流式细胞术代表图。总之,30mg/mL PCS/OVA组疫苗能诱导DCs膜表面显著高表达MHC II分子,从而促进DCs的活化。

[0074] 六、结论

[0075] 综上所述结果,具有良好水溶性、pH敏感性的磷酸化壳聚糖在免疫佐剂领域比壳聚糖本身更方便更具可行性。一系列的免疫结果表明,30mg/mL PCS基水凝胶具有良好的抗原控制释放能力,从而进一步提高免疫效率,诱导显著高水平的抗原特异性免疫反应。因此磷酸化壳聚糖作为疫苗递送载体用于免疫治疗具有良好的应用前景。

[0076] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

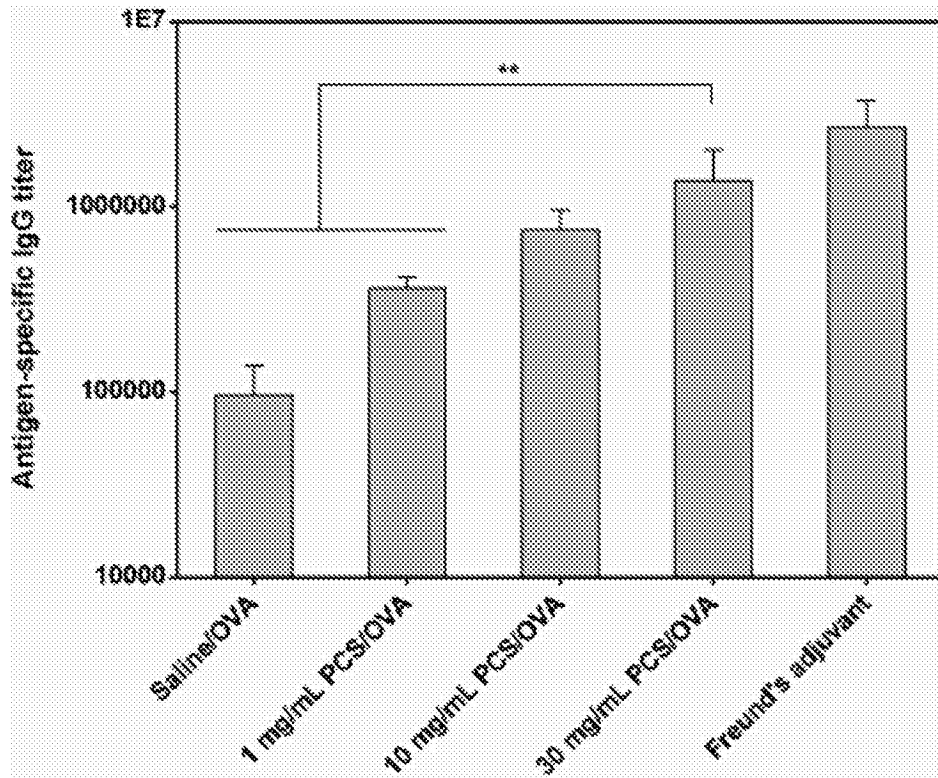


图1

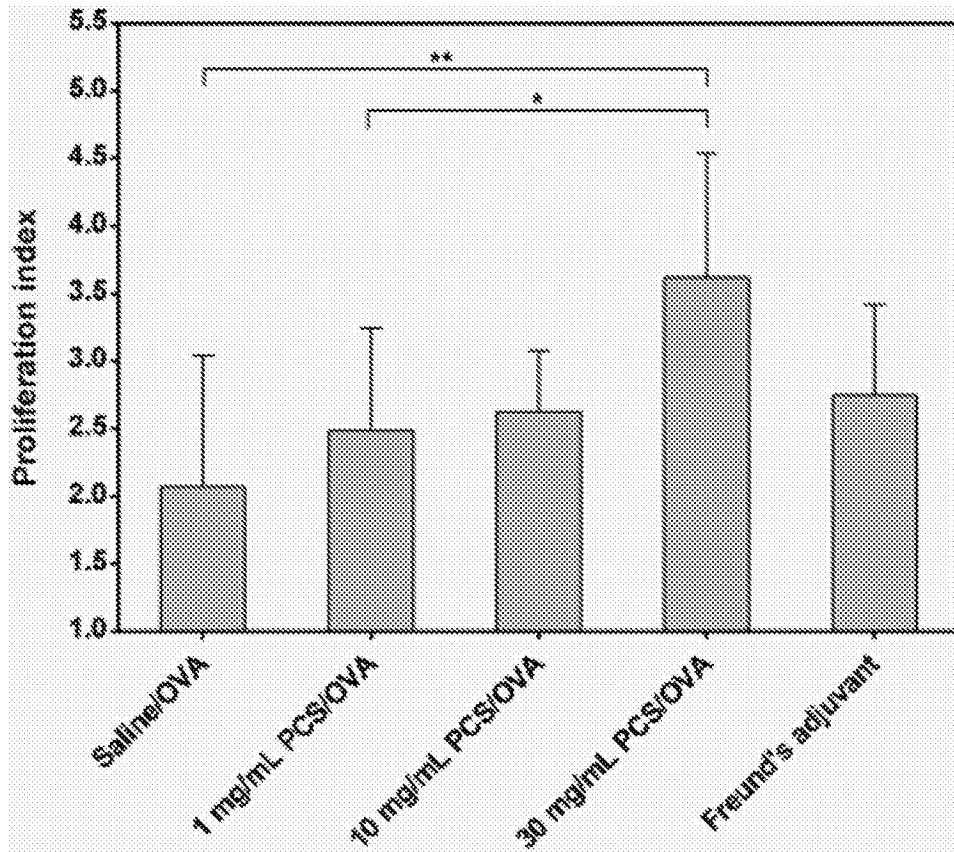


图2

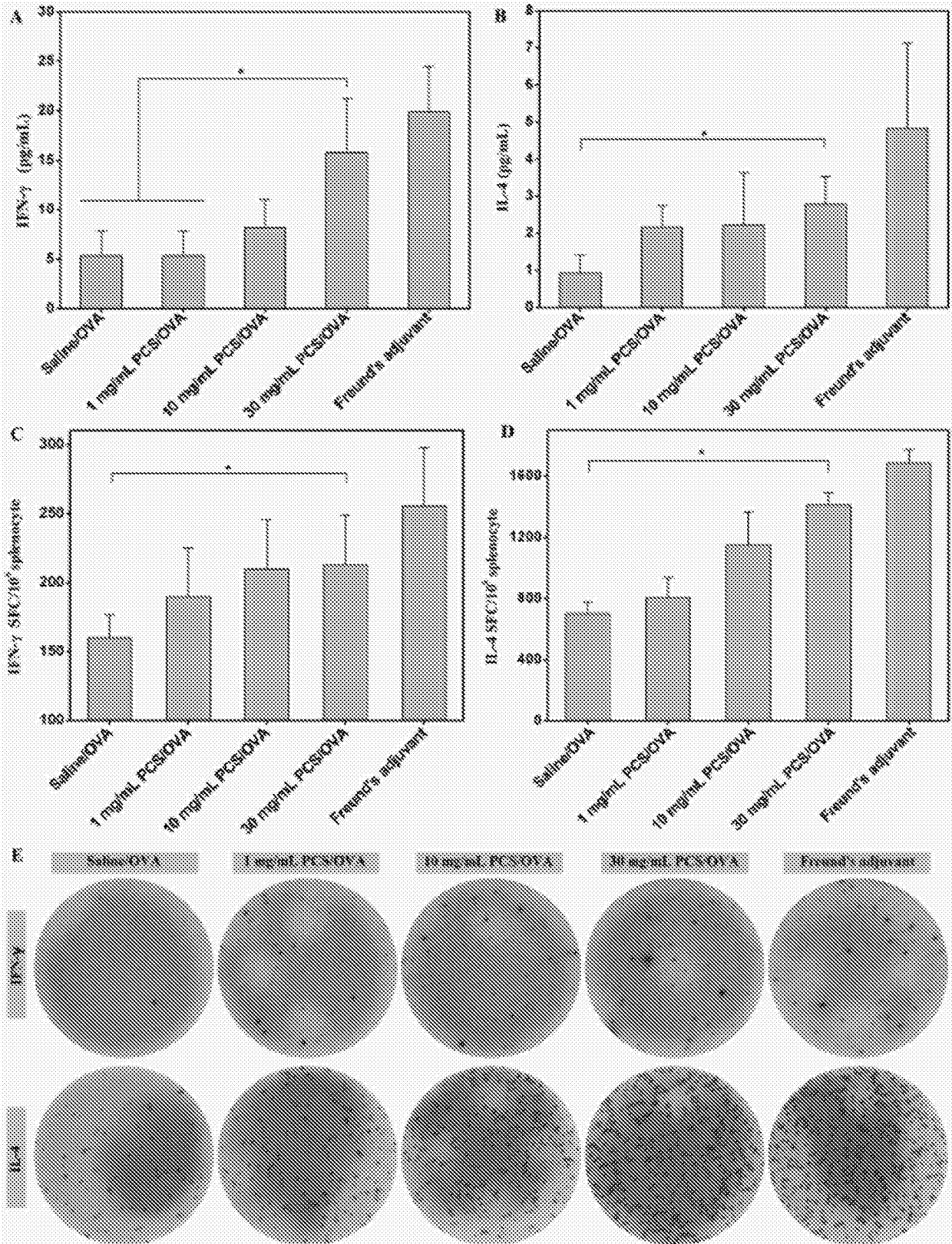


图3

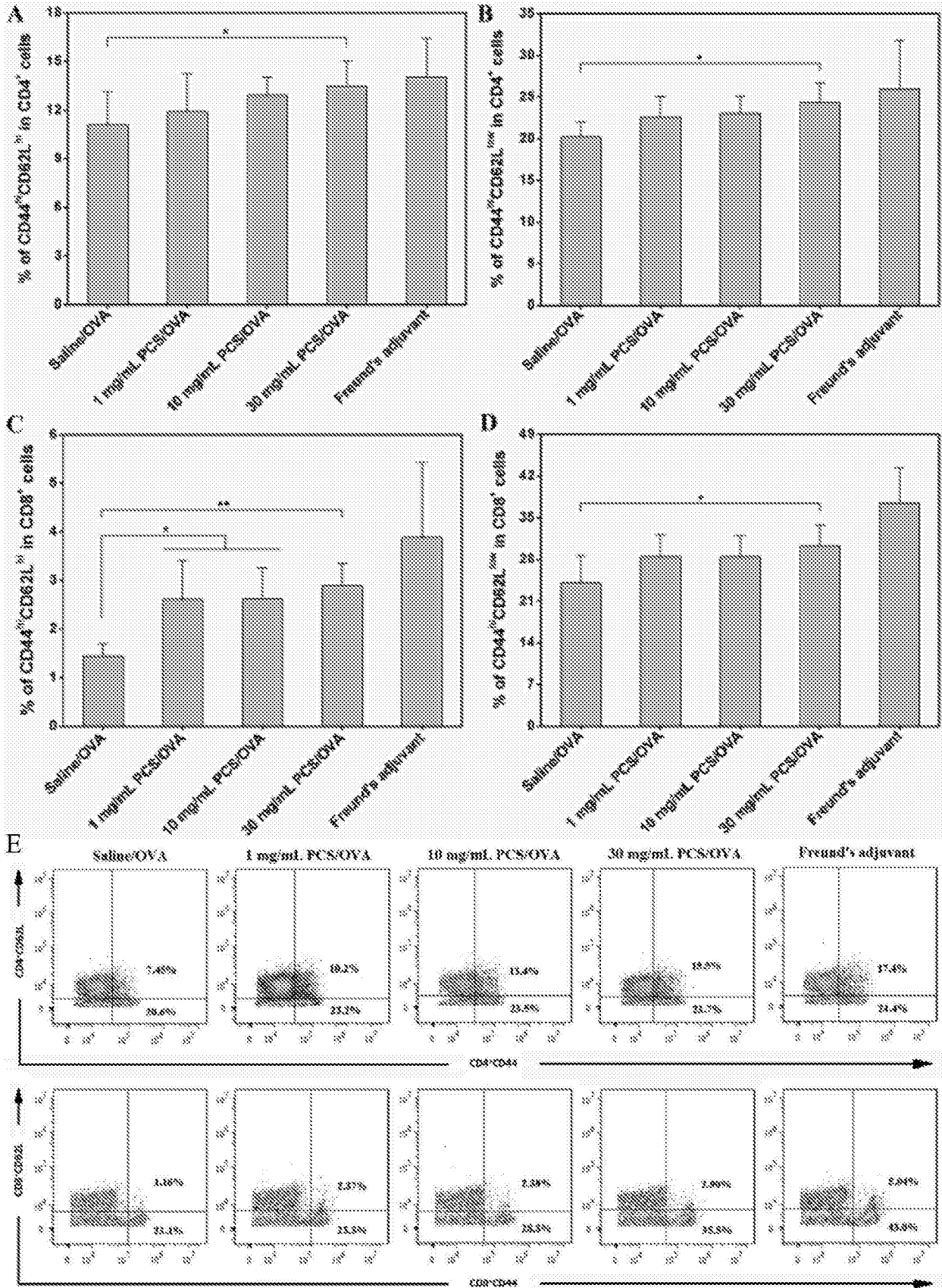


图4

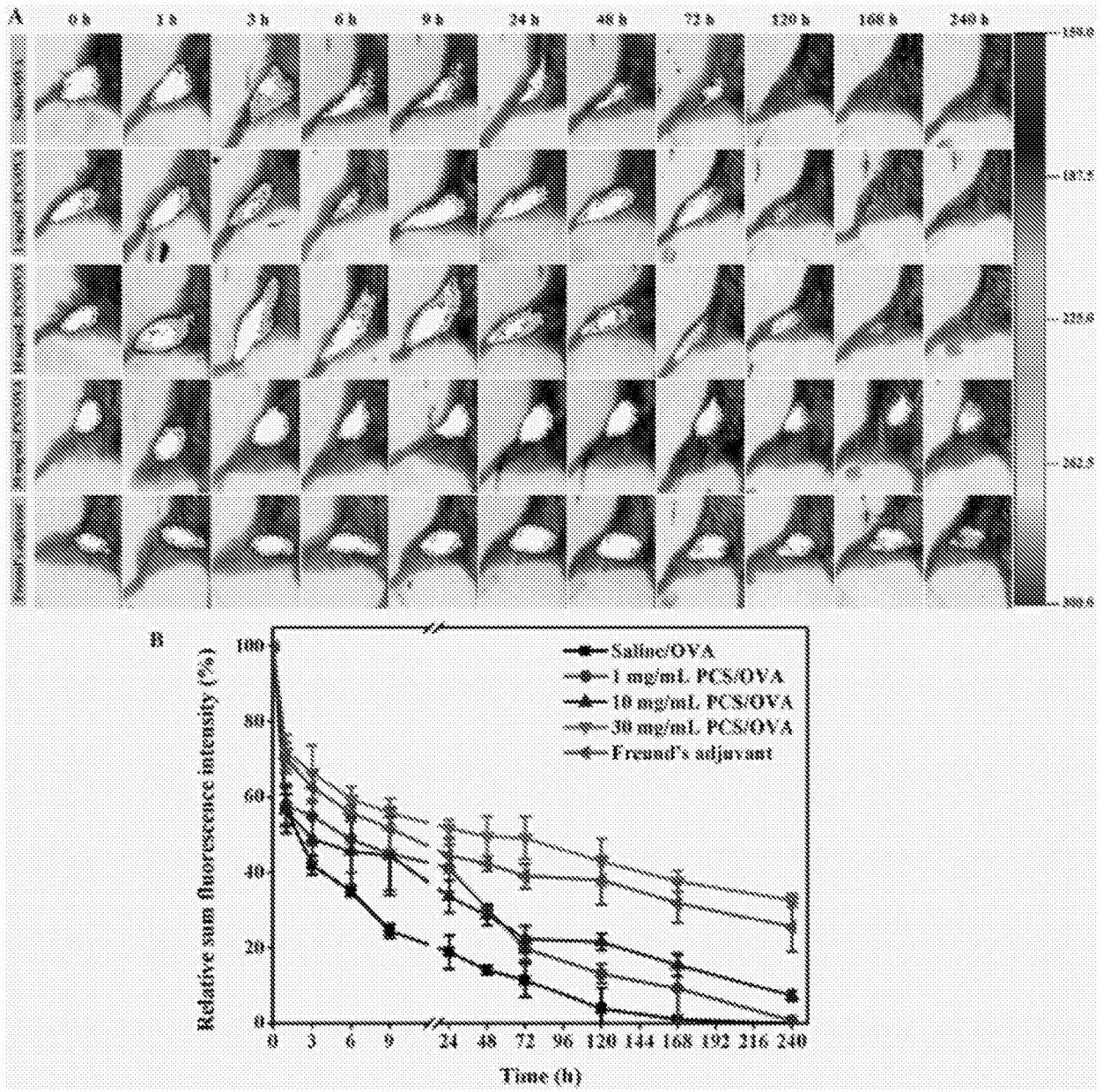


图5

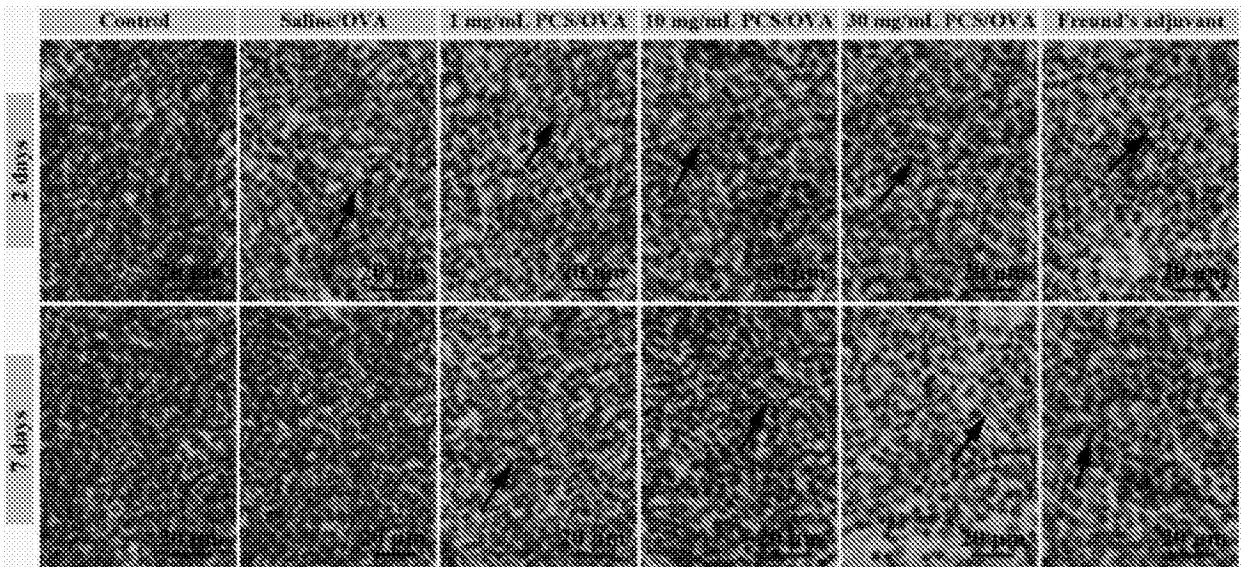


图6

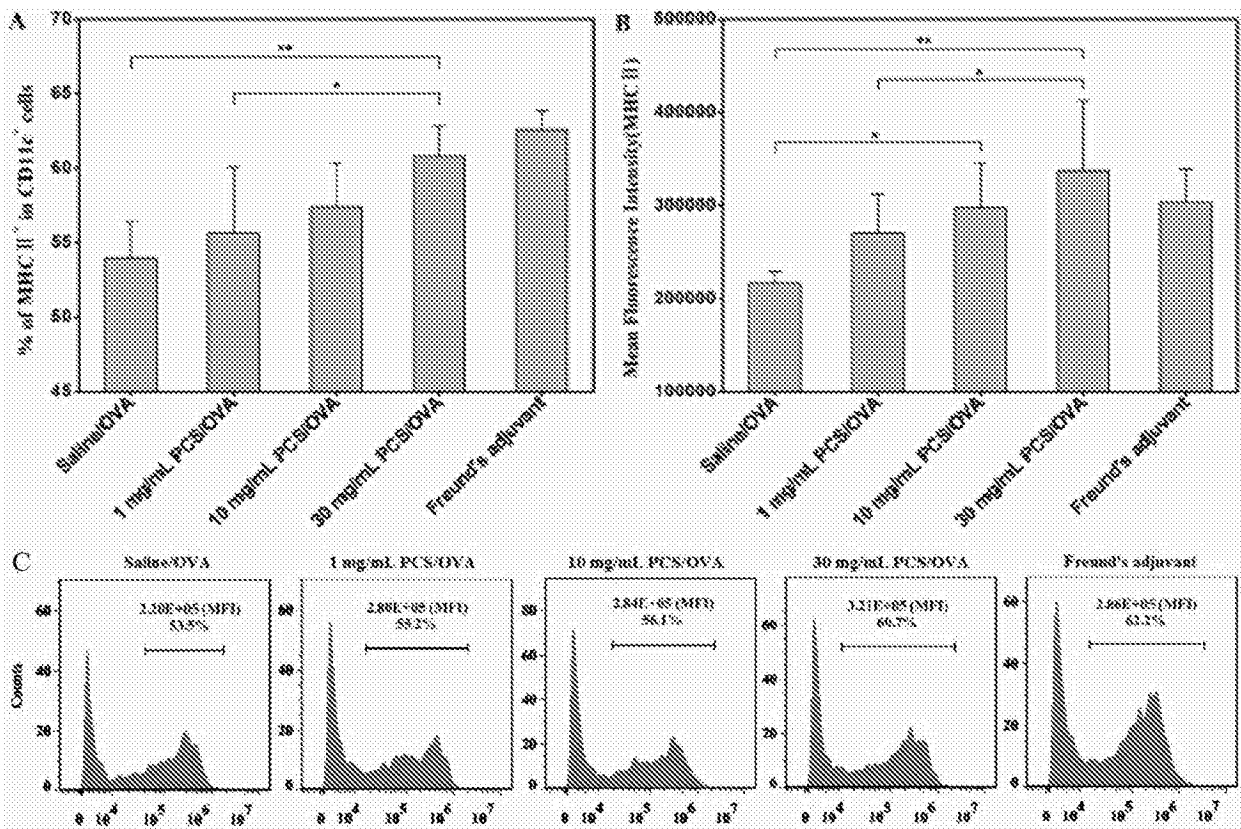


图7