



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103007294 A

(43) 申请公布日 2013.04.03

(21) 申请号 201210586959.9

(22) 申请日 2012.12.28

(71) 申请人 中国科学院上海应用物理研究所  
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路 2019 号

(72) 发明人 黄庆 陈楠 魏敏 裴洁 李凡  
孙艳红 李晓明 樊春海

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002  
代理人 邓琪 宋丽荣

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

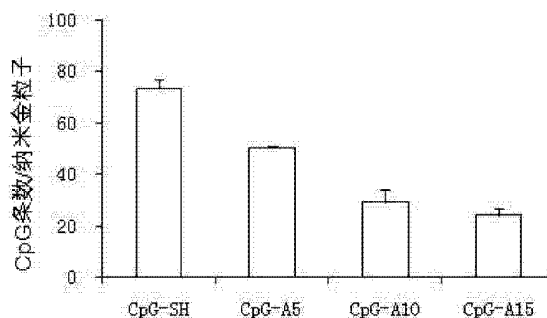
序列表 3 页 附图 8 页

### (54) 发明名称

一种多价免疫刺激纳米制剂及其制备方法和应用

### (57) 摘要

本发明提供一种多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,包括:(1)提供纳米金水溶液;(2)利用多聚腺苷酸修饰 CpG ODN 的 3' 端得到 CpGODN-polyA;以及(3)将所述 CpG ODN-polyA 组装到所述纳米金上形成所述多价免疫刺激纳米制剂。本发明还提供一种通过该制备方法得到的多价免疫刺激纳米制剂及其用途。该多价免疫刺激纳米制剂与传统的 CpG ODN 相比,具有很高的稳定性,对细胞活力没有影响,细胞摄取率高,给药剂量低,免疫刺激活性好,在低剂量时效果尤为突出。



1. 一种多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,包括:
  - (1) 提供纳米金水溶液;
  - (2) 利用多聚腺苷酸修饰 CpG ODN 的 3' 端得到 CpG ODN-polyA;以及
  - (3) 将所述 CpG ODN-polyA 组装到所述纳米金上形成所述多价免疫刺激纳米制剂。
2. 如权利要求 1 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,在所述步骤(1)中,通过柠檬酸三钠水溶液还原氯金酸得到所述纳米金水溶液。
3. 如权利要求 1 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)进一步包括:
  - (3.1) 将所述纳米金水溶液和所述 CpG ODN-polyA 混合均匀并震荡反应;
  - (3.2) 分批加入磷酸盐缓冲液,分离得到所述多价免疫刺激纳米制剂。
4. 如权利要求 3 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,在所述步骤(3.1)之前,步骤(3)进一步包括浓缩所述纳米金水溶液。
5. 如权利要求 3 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,在所述步骤(3.2)中,所述分离操作包括利用磷酸盐缓冲液进行洗涤和重悬。
6. 如权利要求 1 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,所述 CpG ODN-polyA 的序列选自 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2 或 SEQ ID NO. 3。
7. 如权利要求 1 所述的多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,其特征在于,所述 CpG ODN-polyA 在其 5' 端进行 FAM 标记或 Cy5 标记。
8. 一种如权利要求 1-7 中任一项所述的制备方法所获得的多价免疫刺激纳米制剂,其特征在于,所述多价免疫刺激纳米制剂为 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物。
9. 一种如权利要求 8 所述的多价免疫刺激纳米制剂在免疫刺激上的应用。
10. 如权利要求 9 所述的多价免疫刺激纳米制剂在免疫刺激上的应用,其特征在于,所述 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物的浓度为 5-25nM。

## 一种多价免疫刺激纳米制剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,尤其涉及一种多价免疫刺激纳米制剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] CpG DNA 是一类具有免疫激活功能的以未甲基化的 CpG 基序为核心的 DNA 序列,它包括含 CpG 基序的人工合成的寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides,此时简称为 CpG ODN)和自然界中细菌、病毒、无脊椎动物等低等生物的基因组 DNA。其中,CpG 基序(CpG motifs)是指一类以非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤核苷酸为核心的寡聚脱氧核糖核苷酸。

[0003] CpG DNA 是首先在卡介苗(BCG)提取液中发现的,它可以刺激多种免疫细胞的活化或增殖,产生多种细胞因子,具有强烈的免疫激活功能。CpG DNA 在细菌、病毒基因组中的出现频率远高于在脊椎动物中的出现频率,相应地,脊椎动物的 80%胞嘧啶的第五位碳原子是甲基化的。这种显著的差异使脊椎动物可以识别入侵的细菌及病毒,CpG 基序成为人等哺乳动物免疫刺激信号的基础。

[0004] 人工合成的含有 CpG 基序的 DNA 序列(CpG ODN)可以完全模仿细菌 DNA 的刺激作用,具有激活多种免疫细胞,诱导多种细胞因子的作用,尤其可用于调节例如免疫应答向 Th1 型转换等免疫学效应。另外,CpG ODN 可作为具有治疗性作用的 DNA,在抗感染免疫、癌症治疗、过敏性疾病以及免疫佐剂等领域具有巨大的潜在应用前景。

[0005] 但是,未经过修饰的 CpG ODN 易降解、摄取率低、需要高剂量重复给药,极大地限制了它在医学领域的应用。

[0006] 现有的应用于临床实验的 CpG ODN 主要是 DNA 骨架经过硫代修饰的硫代磷酸酯骨架,简称为 S-CpG ODN。研究表明,通过硫代方法修饰的 CpG ODN 药物存在明显的毒副作用,重复注射高剂量硫代 CpG ODN 会引发机体急性毒性,引起剂量依赖性脾肿大、导致肾损伤并造成其它与过度激活免疫相关的毒性表现甚至死亡。

[0007] 在此基础上,申请人利用巯基修饰 CpG ODN,从而将 CpG ODN 偶联到纳米金粒子表面,稳定地形成自组装纳米结构载体,此时,该自组装结构又被称为 CpG ODN-SH- 纳米金复合物。该 CpG ODN-SH- 纳米金复合物具有很低的细胞毒性并在细胞内具有很好的稳定性,另外,该 CpG ODN-SH- 纳米金复合物还具有良好的生物相容性和高效载运特性。该工作已发表在著名期刊 Angew. Chem. Int. Ed. 上(Polyvalent Immunostimulatory Nanoagents with Self-Assembled CpG Oligonucleotide-Conjugated Gold Nanoparticles. Min Wei, Nan Chen, Jiang Li, Min Yin, Le Liang, Yao He, Haiyun Song, Chunhai Fan, and Qing Huang, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 5: 1202-1206)。但是,申请人发现,对 CpG ODN 进行巯基修饰需要耗费大量的成本,而且,所形成的 CpG ODN-SH- 纳米金复合物在低剂量下的免疫刺激效果非常有限。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术中的未经修饰的 CpG ODN 易降解、摄取率低和需要高剂量重复给药,而修饰的 CpG ODN 具有各种副作用以及低剂量下免疫刺激效果低等问题。

[0009] 本发明提供一种多价免疫刺激纳米制剂的制备方法,包括:(1)提供纳米金水溶液;(2)利用多聚腺苷酸修饰 CpG ODN 的 3' 端得到 CpG ODN-polyA;以及(3)将所述 CpG ODN-polyA 组装到所述纳米金上形成所述多价免疫刺激纳米制剂。该制备方法简便快速、原料易得、成本较低且可重复性高。

[0010] 在所述步骤(1)中,通过柠檬酸三钠水溶液还原氯金酸得到所述纳米金水溶液。该还原方法操作简便,工艺成熟。虽然在实施例 1 中仅给出了 15nm 的纳米金水溶液的制备步骤,但是通过调节反应的条件,本领域的技术人员可以根据实际得到各种粒径的纳米金。

[0011] 所述步骤(3)进一步包括:(3.1)将所述纳米金水溶液和所述 CpG ODN-polyA 混合均匀并震荡反应;(3.2)分批加入磷酸盐缓冲液,分离得到所述多价免疫刺激纳米制剂。磷酸盐缓冲液采用分批加入的原因是可以防止由于盐浓度的骤然增高而导致的纳米金的聚集,从而使得 CpG ODN-polyA 更为有效地结合到纳米金表面。

[0012] 在所述步骤(3.1)之前,步骤(3)进一步包括浓缩所述纳米金水溶液。实验证明,高浓度的纳米金水溶液更有利于组装到所述 CpG ODN-polyA 表面。通过上述浓缩步骤,所述纳米金与所述 CpG ODN-polyA 的终浓度优选比值为 10nM:3 $\mu$ M。应该理解,虽然实施例 1 中仅给出了该具体的比例值,但是,其他终浓度比例的纳米金和 CpG ODN-polyA 同样能够发生结合,只要 CpG ODN 序列上存在多聚腺苷酸 polyA 即可。

[0013] 在所述步骤(3.2)中,所述分离操作包括利用磷酸盐缓冲液进行洗涤和重悬。该具体的分离操作主要用于洗涤除去没有组装到纳米金表面的 CpG ODN-polyA,消除其它干扰因素。

[0014] 所述 CpG ODN-polyA 的序列选自 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.3。

[0015] 所述 CpG ODN-polyA 在其 5' 端进行 FAM 标记或 Cy5 标记。

[0016] 本发明提供一种上述制备方法所获得的多价免疫刺激纳米制剂,所述多价免疫刺激纳米制剂为 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物。该 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物的免疫刺激活性及材料稳定性与传统的巯基修饰的 CpG- 纳米金复合物相当,但价格更为低廉。

[0017] 本发明还提供一种上述多价免疫刺激纳米制剂在免疫刺激上的应用。

[0018] 所述 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物的浓度为 5-25nM。

[0019] 通过透射电子显微镜 TEM 观察 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物进入细胞后在细胞内的位置,以及通过氯喹抑制其受体 TLR-9 确定复合物的细胞通路。结果表明,本发明的多价免疫刺激纳米制剂进入细胞后主要位于内吞小体内,且该多价免疫刺激纳米制剂与传统 CpG DNA 细胞通路一致,均是通过其受体 TLR-9 起作用的。本发明提供的 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物分别刺激 RAW264.7 细胞 8h、24h,取细胞培养上清进行细胞因子 TNF- $\alpha$  (8h)、IL-6/IL-12 (24h) 的 ELISA 检测。结果表明,本发明的多价免疫刺激纳米制剂可以显著提高细胞水平的免疫刺激活性,活性的提高在低浓度时尤为明显。通过将本发明提供的 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物通过尾静脉注射到小鼠体内,3h 后取血清进行 ELISA 检测。结果表明,与传统未经修饰的 CpG DNA 相比,本发明的多价免疫刺激纳米制剂可以提高 CpG 的体内免疫刺激活性。

[0020] 总之,本发明提供的多价免疫刺激纳米制剂与传统的 CpG ODN 相比,具有很高的稳定性,对细胞活力没有影响,细胞摄取率高,给药剂量低,免疫刺激活性好,在低剂量时效果尤为突出。

#### 附图说明

[0021] 图 1A 是通过透射电子显微镜 TEM 表征所获得的纳米金的照片;

[0022] 图 1B 是通过透射电子显微镜 TEM 表征所获得的根据本发明的纳米金复合物的照片;

[0023] 图 2 是通过荧光分光光度计所获得的 CpG ODN 浓度的数据分析图,其中,横坐标 CpG-SH 表示 CpG ODN-SH;CpG-A5 表示 CpG ODN-polyA5;CpG-A10 表示 CpG ODN-polyA10;CpG-A15 表示 CpG ODN-polyA15;纵坐标表示每个纳米金粒子表面的 CpG ODN 的条数;

[0024] 图 3A 是通过动态光散射粒子分析仪所获得的 CpG ODN-SH 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图;

[0025] 图 3B 是通过动态光散射粒子分析仪所获得的 CpG ODN-polyA5 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图;

[0026] 图 3C 是通过动态光散射粒子分析仪所获得的 CpG ODN-polyA10 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图;

[0027] 图 3D 是通过动态光散射粒子分析仪所获得的 CpG ODN-polyA15 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图;

[0028] 图 4 是通过噻唑蓝(MTT)细胞活力检测方法所获得的 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物细胞活力的数据分析图,其中,CpG-A5-AuNPs 表示 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物;CpG-A15-AuNPs 表示 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物;横坐标表示复合物的浓度;纵坐标表示细胞活力;

[0029] 图 5 是通过流式细胞仪检测所获得的纳米金复合物的细胞摄取图,其中,空白对照组表示的是序列为 Cy5-CpG-poly A5,其序列为 SEQ ID NO.9: Cy5-TCCATGACGTTCTGACGT TTTTTTAAAAA;Cy5-CpG-A5-AuNPs 表示 Cy5 修饰的 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物;

[0030] 图 6A 是细胞摄取 Cy5-ssCpG ODN 的细胞亮场视野图;

[0031] 图 6B 是细胞摄取 Cy5-CpG-A5-AuNPs 的细胞亮场视野图;

[0032] 图 6C 是细胞摄取 Cy5-ssCpG ODN 的细胞荧光图片,单链 ODN 由于难以进入细胞,所以没有观察到荧光;

[0033] 图 6D 是细胞摄取 Cy5-CpG-A5-AuNPs 的细胞的荧光图片,可见 Cy5-CpG-A5-AuNPs 大量摄取;

[0034] 图 7A 表示 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物与硫代 CpG 在不同溶度下的 TNF- $\alpha$  细胞因子分泌水平对比,其中,S-CpG 表示硫代 CpG ODN,其指的是 CpG ODN1826 对应的硫代磷酸酯骨架;CpG-A15-AuNPs 表示 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物;

[0035] 图 7B 表示 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物、CpG ODN-SH- 纳米金复合物、硫代 CpG 在不同溶度下的 TNF- $\alpha$  细胞因子分泌水平对比,其中,S-CpG ODN 表示 CpG ODN1826 对应的硫代磷酸酯骨架;CpG-SH-AuNPs 表示 CpG ODN-SH- 纳米金复合物;CpG-A15-AuNPs 表示 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物;

[0036] 图7C表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物、polyA10tailed CpG ODN-纳米金复合物、polyA15tailed CpG ODN-纳米金复合物在不同溶度下的IL-6细胞因子分泌水平对比,其中,CpG-A5-AuNPs表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-A10-AuNPs表示polyA10tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-A15-AuNPs表示polyA15tailed CpG ODN-纳米金复合物;

[0037] 图7D表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物、polyA10tailed CpG ODN-纳米金复合物、polyA15tailed CpG ODN-纳米金复合物在不同溶度下的IL-12细胞因子分泌水平对比,其中,CpG-A5-AuNPs表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-A10-AuNPs表示polyA10tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-A15-AuNPs表示polyA15tailed CpG ODN-纳米金复合物;

[0038] 图8A表示磷酸缓冲液、纳米金、指3'端修饰有5个腺苷酸的非CpG ODN、单链CpG ODN、polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物、CpG ODN-SH-纳米金复合物、硫代CpG ODN的IL-12细胞因子分泌水平对比,其中,PBS表示磷酸缓冲液;AuNPs表示纳米金;Non-CpG-A5-Au表示3'端修饰有5个腺苷酸的非CpG ODN;ssCpG ODN表示单链CpG ODN;CpG-A5-Au表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-SH-Au表示CpG ODN-SH-纳米金复合物;S-CpG ODN表示硫代CpG ODN;

[0039] 图8B表示磷酸缓冲液、纳米金、指3'端修饰有5个腺苷酸的非CpG ODN、单链CpG ODN、polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物、CpG ODN-SH-纳米金复合物、硫代CpG ODN的MCP-1细胞因子分泌水平对比,其中,PBS表示磷酸缓冲液;AuNPs表示纳米金;Non-CpG-A5-AuNPs表示3'端修饰有5个腺苷酸的非CpG ODN;ssCpG ODN表示单链CpG ODN;CpG-A5-AuNPs表示polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物;CpG-(SH)-AuNPs表示CpG ODN-SH-纳米金复合物;S-CpG ODN表示硫代CpG ODN。

## 具体实施方式

[0040] 下面结合附图,给出本发明的较佳实施例,并予以详细描述,使能更好地理解本发明的功能、特点。

[0041] 在本文中,CpG DNA是指一类具有免疫激活功能的以未甲基化的CpG基序为核心的DNA序列。

[0042] CpG ODN是指一类含CpG基序的人工合成的寡聚脱氧核苷酸。

[0043] CpG ODN-SH是指3'端修饰有巯基的CpG ODN。

[0044] CpG ODN-SH-纳米金复合物是指CpG ODN-SH与纳米金组装形成的复合物。

[0045] CpG ODN-polyA是指一类3'端修饰有多聚腺苷酸的CpG ODN。其中,CpG ODN-polyA5是指3'端修饰有5个腺苷酸的CpG ODN。CpG ODN-polyA10是指3'端修饰有10个腺苷酸的CpG ODN。CpG ODN-polyA15是指3'端修饰有15个腺苷酸的CpG ODN。

[0046] CpG ODN-polyA-纳米金复合物是指CpG ODN-polyA与纳米金组装形成的复合物,同时也被称为polyAtailed CpG ODN-纳米金复合物。其中,polyA5tailed CpG ODN-纳米金复合物是指CpG ODN-polyA5与纳米金组装形成的复合物。polyA10tailed CpG ODN-纳米金复合物是指CpG ODN-polyA10与纳米金组装形成的复合物。polyA15tailed CpG ODN-纳米金复合物是指CpG ODN-polyA15与纳米金组装形成的复合物。

[0047] FAM-CpG ODN 是指一类 5' 端修饰有荧光基团 FAM 的 CpG ODN。

[0048] FAM-CpG ODN-polyA 是指一类 5' 端修饰有荧光基团 FAM, 3' 端修饰有多聚腺苷酸的 CpG ODN。其中, FAM-CpG ODN-polyA5 是指 5' 端修饰有荧光基团 FAM, 3' 端修饰有 5 个腺苷酸的 CpG ODN。FAM-CpG ODN-polyA10 是指 5' 端修饰有荧光基团 FAM, 3' 端修饰有 10 个腺苷酸的 CpG ODN。FAM-CpG ODN-polyA15 是指 5' 端修饰有荧光基团 FAM, 3' 端修饰有 15 个腺苷酸的 CpG ODN。

[0049] Cy5-CpG ODN-polyA 是指一类 5' 端修饰有荧光基团 Cy5, 3' 端修饰有多聚腺苷酸的 CpG ODN。其中, Cy5-CpG ODN-polyA5 是指 5' 端修饰有荧光基团 Cy5, 3' 端修饰有 5 个腺苷酸的 CpG ODN。Cy5-CpG ODN-polyA10 是指 5' 端修饰有荧光基团 Cy5, 3' 端修饰有 10 个腺苷酸的 CpG ODN。Cy5-CpG ODN-polyA15 是指 5' 端修饰有荧光基团 Cy5, 3' 端修饰有 15 个腺苷酸的 CpG ODN。

[0050] 实施例 1 纳米金的制备

[0051] 试剂包括:

[0052] 氯金酸购自阿拉丁公司, 分析纯的柠檬酸三钠购自国药化学试剂有限公司。

[0053] 制备过程包括以下几个步骤:

[0054] (1) 取 1% 氯金酸  $\text{HAuCl}_4$  溶液 1ml 和 99ml 的 Milli-Q 水倒入干净的蒸馏瓶内, 制成 0.01%  $\text{HAuCl}_4$  工作溶液, 加入搅拌子, 置于磁力搅拌加热器上加热并搅拌;

[0055] (2) 待溶液完全沸腾后, 将转速调至 30, 并一次性快速加入 3.5ml 新鲜配制的 10mg/ml 柠檬酸三钠水溶液;

[0056] (3) 保持溶液沸腾且快速搅拌 20min, 停止加热, 继续搅拌, 冷却;

[0057] (4) 老化过夜, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 得到粒径基本均一的 15nm 的纳米金水溶液, 4°C 保存。

[0058] 应该理解, 上述提供的纳米金的制备方法是已知的, 通过调节反应的条件, 本领域的技术人员可以根据实际需要调节最终的所获得的纳米金的粒径。同样, 除了上述通过柠檬酸三钠还原氯金酸的方法来获得纳米金之外, 其他任何合适的能够得到纳米金的方法均在本发明的保护范围之内。

[0059] 实施例 2 纳米金复合物的制备及表征

[0060] 试剂包括:

[0061] HPLC 纯化的 CpG ODN 合成自 Invitrogen 公司, 分析纯的氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠购自国药化学试剂有限公司。

[0062] 制备过程包括以下几个步骤:

[0063] (1) 取 1ml 纳米金 12000rpm 4°C 离心 20min, 弃去 800  $\mu\text{l}$  上清, 沉淀重悬即得浓缩 5 倍的纳米金溶液。

[0064] (2) 取 1ml 浓缩 5 倍的纳米金于 1.5mL 离心管中至终浓度 10nM, 加入 100  $\mu\text{M}$  CpG ODN 至终浓度 3  $\mu\text{M}$ , 轻轻吹打混合均匀, 25°C 400rpm 震荡过夜。

[0065] 其中, 该 CpG ODN 是 CpG ODN-polyA5 (其序列为 SEQ ID NO.1: TCCATGACGTTTCCTGACGTTTTTTTAAAAA)、CpG ODN-polyA10 (其序列为 SEQ ID NO.2: TCCATGACGTTTCCTGACGTTTTTTTAAAAA) 或 CpG ODN-polyA15 (其序列为 SEQ ID NO.3: TCCATGACGTTTCCTGACGTTTTTTTAAAAA)。不难看出, 本实施例所利用的 CpG ODN 的

DNA 序列仅是简单地在 CpG ODN1826 序列的 3' 端加上一段不同长度的多聚腺苷酸 polyA 序列。为了便于后续的特征, 该 CpG ODN 可以首先进行荧光基团 FAM 在其 5' 端进行标记, 此时对应的 CpG ODN 为 FAM-CpG ODN-polyA5、FAM-CpG ODN-polyA10、FAM-CpG ODN-polyA15。

[0066] (3) 缓慢加入 1M 磷酸盐缓冲液 PBS(1M NaCl/0.1M PB, pH7.4) 使其终浓度为 0.1M, PBS (分 5~6 次加入, 大于 30min/ 次间隔), 25℃ 400rpm 震荡 24h。

[0067] (4) 13000rpm, 4℃, 20min 离心, 弃上清, 加入 500  $\mu$ l 的 0.1M PBS, 如此反复洗 3 次, 加入适量 0.1M PBS 重悬, 4℃ 保存待用。

[0068] 通过透射电子显微镜 TEM 表征所获得的纳米金复合物可知, 上述方法成功地将 CpG ODN 偶联到纳米金粒子表面从而形成纳米金复合物, 该纳米金复合物又被称为 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物。具体的表征步骤包括: 将纳米金和所形成的纳米金复合物用 1% 磷钨酸水溶液 (pH7.0) 染色, 滴于铜网上烘干, 然后利用 TEM 观察 (Jeol, JEM2010, 200KV)。结果如图 1 所示, 由于纳米金本身是不会被染色的, 裸露的纳米金呈现出图 1A 所示的视野; 相反, 由于纳米金复合物表面包裹有 DNA (CpG ODN), 即 CpG ODN 偶联到纳米金粒子表面, 则纳米金复合物呈现出图 1B 所示的染色后的界面。

[0069] 通过荧光分光光度计可以对上述获得的 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物进行进一步表征。具体表征步骤包括: 将巯基乙醇加入 FAM 荧光标记的 CpG- 纳米金溶液中至终浓度 20mM, 震荡孵育过夜, 离心取上清后, 用荧光分光光度计测定荧光强度, 换算得到 DNA 的摩尔浓度。结果如图 2 所示, 不同 polyA 长度的 CpG 序列 (FAM-CpG ODN-polyA5、FAM-CpG ODN-polyA10、FAM-CpG ODN-polyA15) 及巯基修饰的 CpG 序列 (CpG ODN-SH) 组装到纳米金的数量, 随着 polyA 长度的增加, 每个纳米金粒子上组装的 CpG 序列条数减少。

[0070] 另外, 通过动态光散射粒子分析仪 (BECKMAN COULTER, America) 可以测定上述获得的 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物的水合半径及分散度, 结果如图 3A- 图 3D 所示, 其中, 图 3A 表示的是 CpG ODN-SH 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图; 图 3B 表示的是 CpG ODN-polyA5 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图; 图 3C 表示的是 CpG ODN-polyA10 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图; 图 3D 表示的是 CpG ODN-polyA15 与纳米金组装形成的复合物对应的谱图; 相关的数据归纳为下表 1:

[0071] 表 1

[0072]

	平均粒径大小 (nm)	分散系数
CpG ODN-SH- 纳米金复合物	30.0	0.175
polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物	35.3	0.304
polyA10tailed CpG ODN- 纳米金复合物	35.9	0.292
polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物	37.6	0.282

[0073] 由此可知, 随着 polyA 长度增加, CpG ODN- 纳米金复合物的粒径逐渐增大。而且, 所形成的各组复合物的分散良好, 呈单一分布峰。

[0074] 实施例 3 细胞活力及摄取率检测



[0075] 试剂包括：

[0076] Raw264.7 细胞购自中科院上海细胞库，噻唑蓝(MTT)，十二烷基磺酸钠(SDS)，Hoechst33258 购自 Sigma-Aldrich 公司，Cy5 标记的荧光修饰 CpGODN 购自 Invitrogen 公司

[0077] MTT 细胞活力检测方法：

[0078] (1) 前一日铺板，24 孔板每孔铺  $2 \times 10^5$  个细胞， $37^{\circ}\text{C}$  5%CO<sub>2</sub> 培养过夜。

[0079] (2) 500  $\mu\text{l}$  PBS 洗一次，将新鲜的含有 5-25nM 的 CpG ODN-polyA- 纳米金的培养基加入各孔，继续培养 24 小时

[0080] (3) 每孔加入 50  $\mu\text{l}$  15mg/ml 的 MTT，37 度孵育 4 小时后，会有蓝紫色不溶甲瓚生成，此时每孔加入 10%SDS (pH2-3) 1ml 溶解甲瓚，37 度孵育过夜

[0081] (4) 12000rpm, 20min 离心，取 200  $\mu\text{l}$  上清至 96 孔板中，OD570nm 处测吸光值(参考波长 633nm)

[0082] (5) 细胞存活率计算公式：生存率 = (实验组 OD 值 / 对照组 OD 值)  $\times$  100%

[0083] 细胞摄取率检测：

[0084] (1) Cy5 荧光标记的 CpG ODN-polyA5、CpG ODN-polyA15 与纳米金组装，组装方法与实施例 2 相同，形成 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物、polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物。

[0085] (2) 不同浓度 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物、polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物(5nM、10nM、25nM) 分别加入预先铺好的细胞中， $37^{\circ}\text{C}$  孵育 4 小时，分别进行流式细胞仪及激光共聚焦显微镜检测。

[0086] 结果如图 4 所示，纵坐标表示 MTT 检测 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物细胞活力，由此可以看出所测浓度(5-25nM) 范围内，纳米金复合物对细胞活力没有影响，表现出良好的生物相容性。

[0087] 通过流式细胞仪检测可以得到纳米金复合物的细胞摄取图，结果如图 5 所示，由于单链 CpG 序列(CpG1826，其序列为 SEQ ID NO. 4: TCCATGACGTTCTGACGTT) 很难进入细胞，所以几乎没有检测到荧光；而 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物可以进入细胞，且检测到的荧光呈现浓度依赖性变化，即随着纳米金复合物浓度的增大，荧光强度逐渐增加。

[0088] 另外，通过激光共聚焦显微镜可以检测细胞对 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物的摄取，结果如图 6A- 图 6D 所示，可以直观从其看到细胞对 polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物的摄取；相对应的，单链 Cy5-CpG DNA 很难进入细胞，细胞内没有荧光。

[0089] 实施例 4 细胞水平免疫刺激检测

[0090] 试剂包括：

[0091] Raw264.7 细胞购自中科院上海细胞库，ELISA 抗体及标准品购自 eBioscience 公司。

[0092] 实验方法如下：

[0093] (1) 铺 24 孔板，每孔  $2 \times 10^5$  个 Raw264.7 细胞， $37^{\circ}\text{C}$  过夜

[0094] (2) 新鲜培养基含有不同浓度的 polyA-tailed CpG- 纳米金复合物加入各孔，37 度孵育 8h (TNF- $\alpha$ ) or 24h (IL-6, IL-12)

[0095] (3) 8h、24h 取细胞培养上清，进行 ELISA 检测。

[0096] 结果如 7A- 图 7D 所示, 图 7A 为 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物与硫代 CpG 在不同溶度下的 TNF- $\alpha$  分泌水平比较, 可以看出, 在 5nM-25nM 范围内, polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物分泌 TNF- $\alpha$  多于硫代 CpG, 且浓度越低, 差异越明显, 说明 CpG ODN-polyA- 纳米金具有低剂量高免疫刺激活性的特点。图 7B- 图 7D 分别检测了不同 polyA 长度的纳米金复合物的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 细胞因子的分泌, 说明 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物具有明显的免疫刺激活性, 并且在 CpG 浓度相同的情况下, 细胞因子的分泌量 polyA15tailed CpG ODN- 纳米金复合物 >polyA10tailed CpG ODN- 纳米金复合物 >polyA5tailed CpG ODN- 纳米金复合物。

[0097] 实施例 5 动物体内免疫刺激测试

[0098] 试剂包括:

[0099] ICR 小鼠购自上海斯莱克实验动物公司; IL-12 细胞因子由上海森雄生物科技实业有限公司提供检测; CBA 试剂盒购自 BD 公司

[0100] 实验方法如下:

[0101] (1) 4-6 周大的 ICR 小鼠饲养在无菌、恒温的动物房内, 称取体重大约 20-25g 时用于实验。

[0102] (2) 将小鼠随机分为 7 组, 每组 7 只。

[0103] (2) 单链 CpG DNA 或不同修饰 / 组装的 CpG DNA 均溶于 PBS 中, 以 PBS 作为对照, 通过尾静脉注射注入小鼠体内, 注射剂量为 60  $\mu$ g/kg (0.1ml/10g 体重)。

[0104] (3) 注射 3 小时后, 将小鼠通过摘眼球放血的方法, 取小鼠全血 37 $^{\circ}$ C 静置半小时, 3000rpm 离心 15 分钟后取血清 -80 度待测

[0105] (4) 血清 IL-12 及 MCP-1 含量通过 ELISA/CBA 试剂盒按照说明书进行检测。

[0106] 结果如图 8A 和图 8B 所示, 通过实验动物体内实验, 取血清测得 IL-12、MCP-1 细胞因子的含量, 说明 polyA tailed CpG ODN- 纳米金复合物在体内也具有一定的免疫刺激活性。

[0107] 以上所述的, 仅为本发明的较佳实施例, 并非用以限定本发明的范围。凡是依据本发明申请的权利要求书及说明书内容所作的简单、等效变化与修饰, 皆落入本发明专利的权利要求保护范围。本发明未详尽描述的均为常规技术内容。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 中国科学院上海应用物理研究所

&lt;120&gt; 一种多价免疫刺激纳米制剂及其制备方法和应用

&lt;160&gt; 5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 未知

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 购自 Invitrogen 公司

&lt;400&gt; 1

tccatgacgt tctgacgtt ttttaaaaa 30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 未知

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 购自 Invitrogen 公司

[0002]

<400> 2

tccatgacgt tcctgacgtt ttttaaaaa aaaaa 35

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221> 购自 Invitrogen 公司

<400> 3

tccatgacgt tcctgacgtt ttttaaaaa aaaaaaaaaa 40

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221> 购自 Invitrogen 公司

<400> 4

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 5

<211> 35

[0003]

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221> 购自 Invitrogen 公司

<400> 5

tccatgagct tcctgagctt ttttaaaaa aaaaa 35

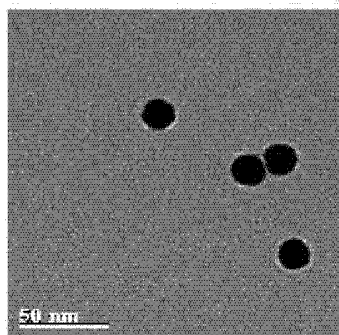


图 1A

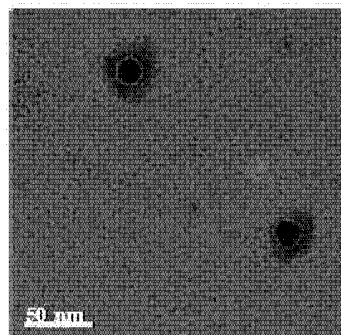


图 1B

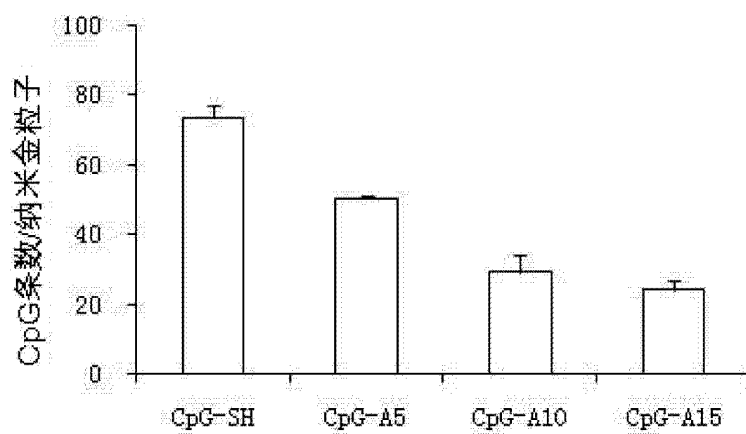


图 2

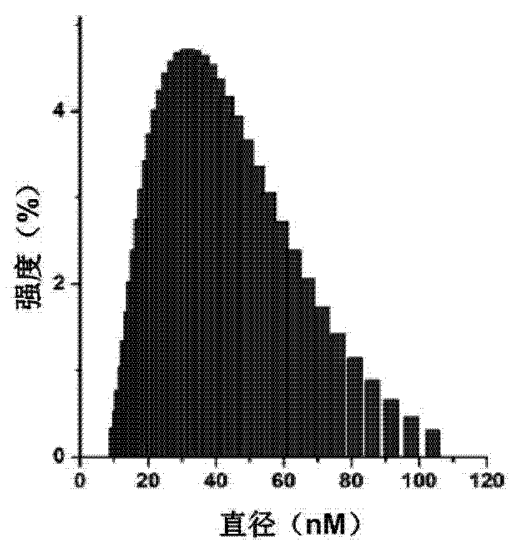


图 3A

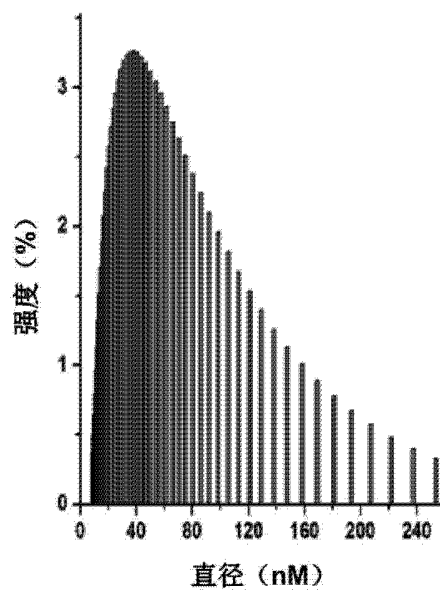


图 3B

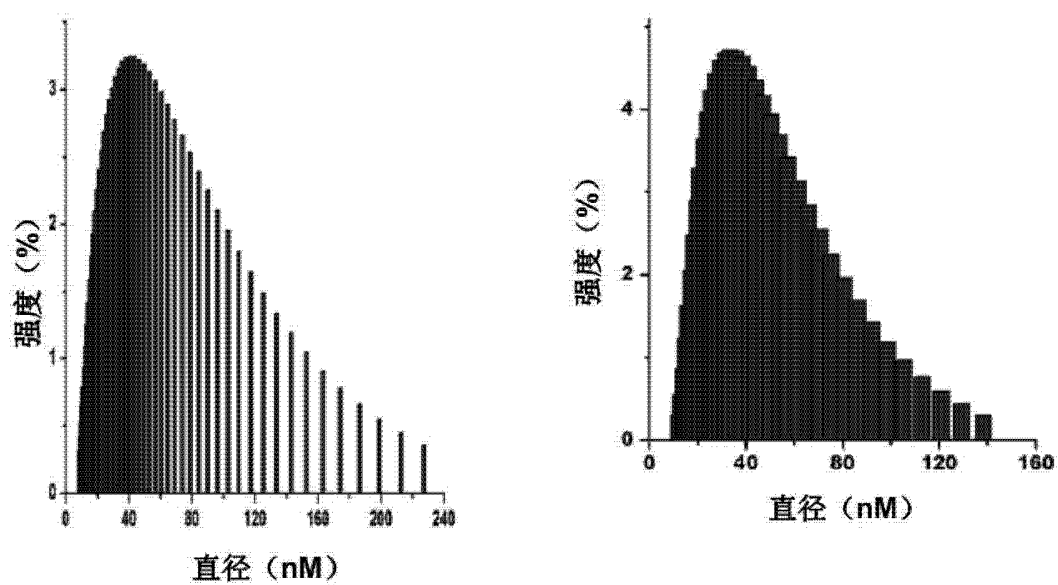


图 3D

图 3C

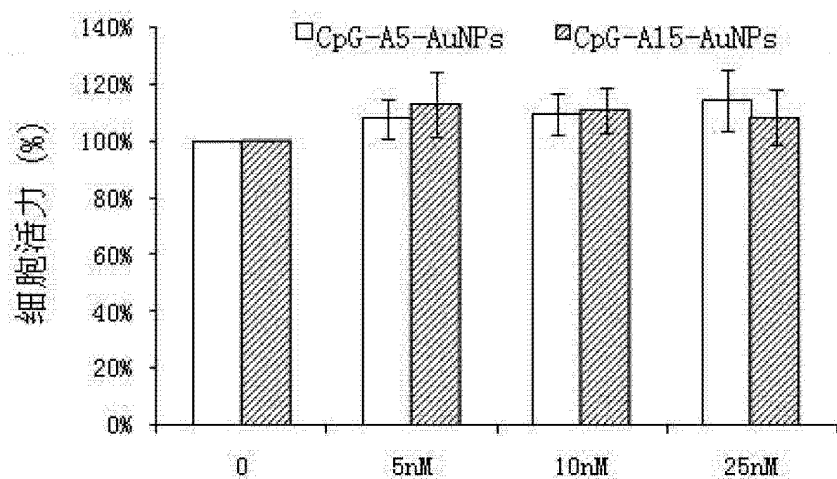


图 4

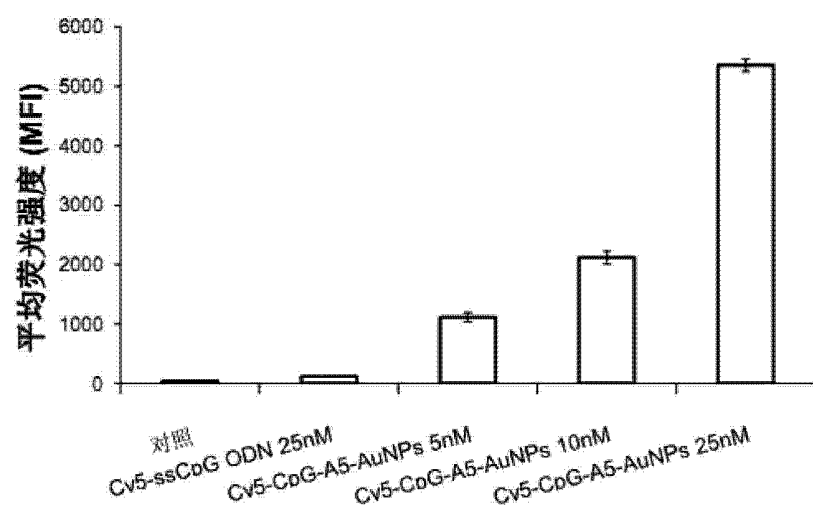


图 5

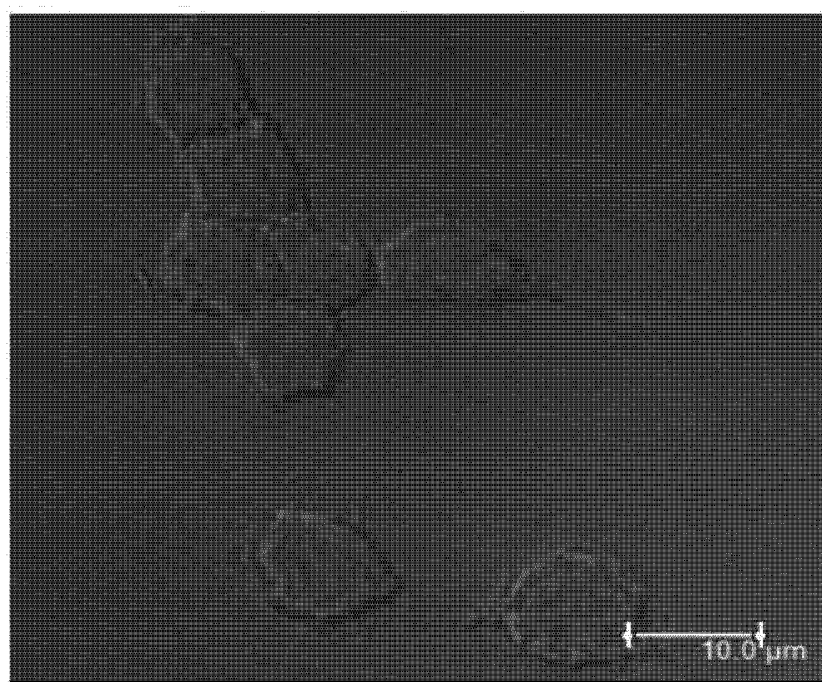


图 6A



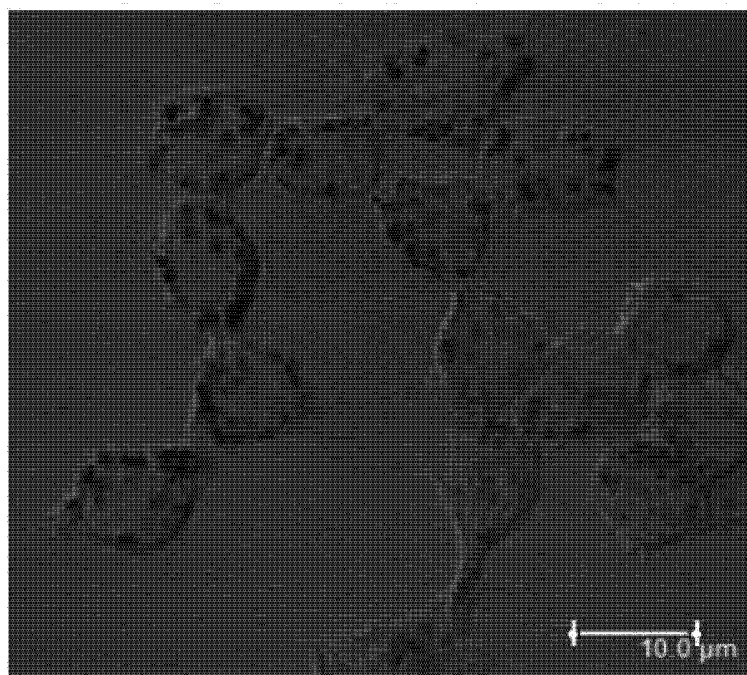


图 6B

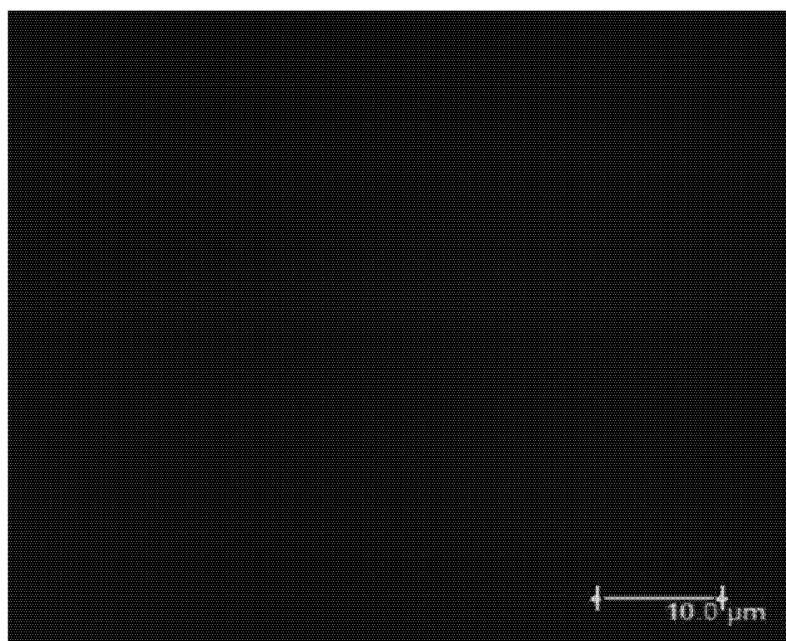


图 6C

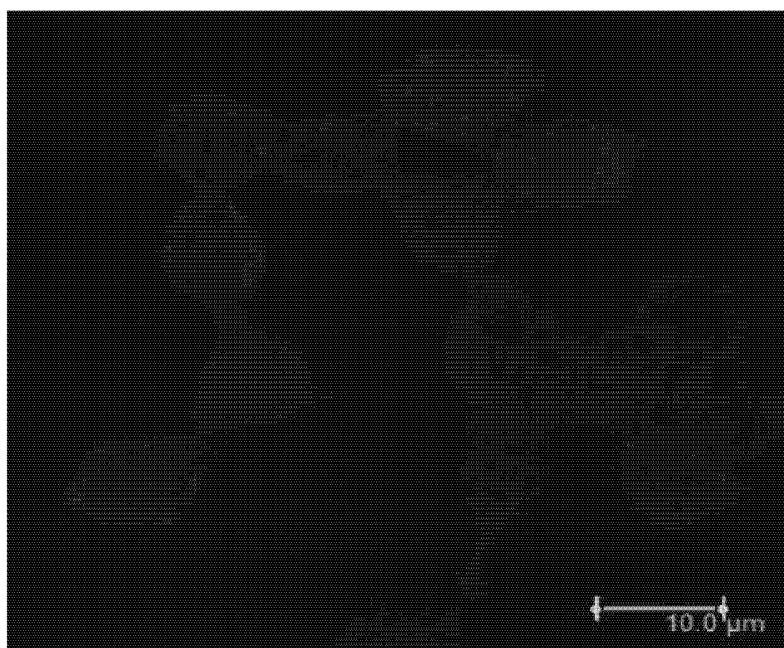


图 6D

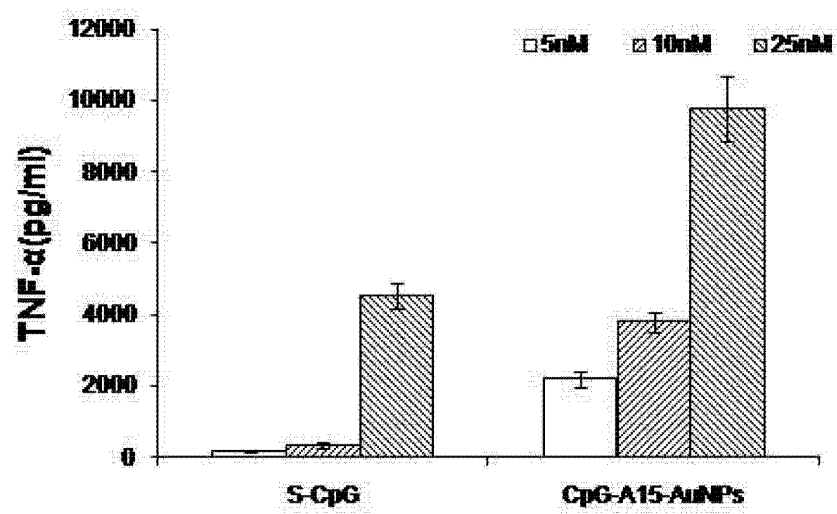


图 7A

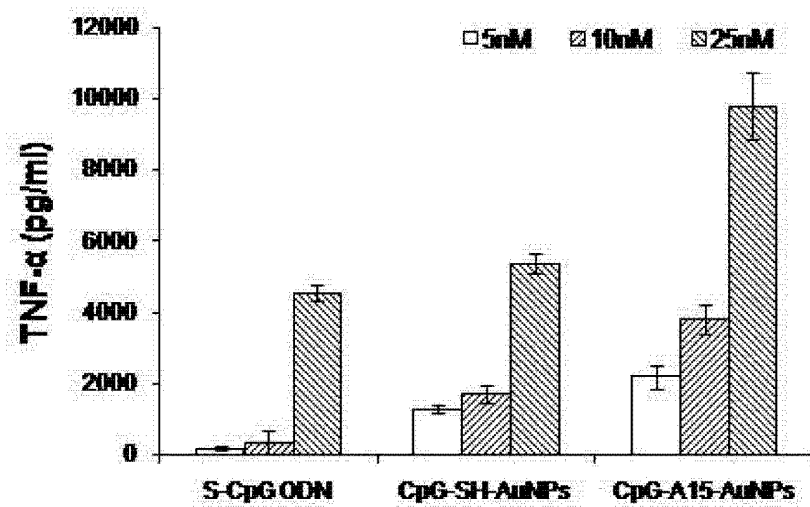


图 7B

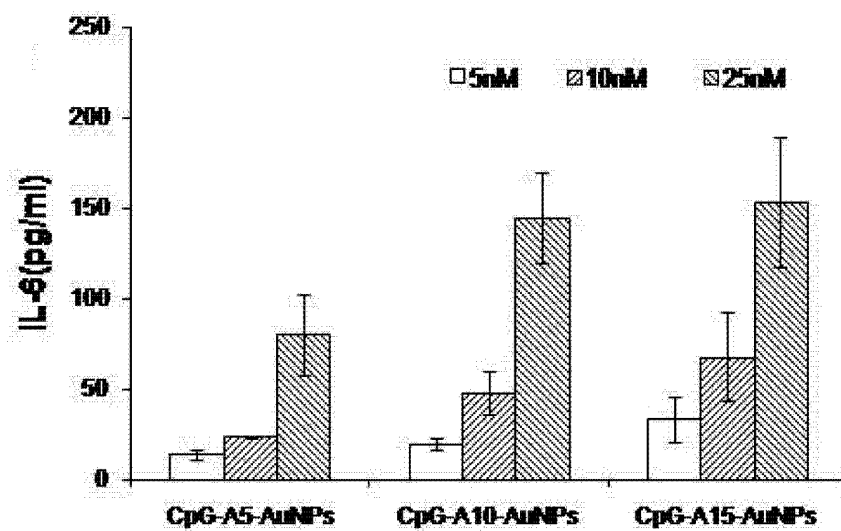


图 7C

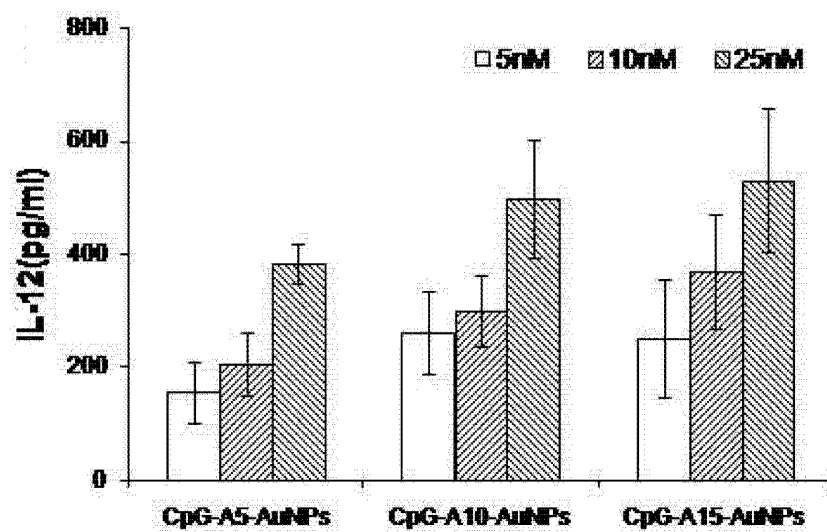


图 7D

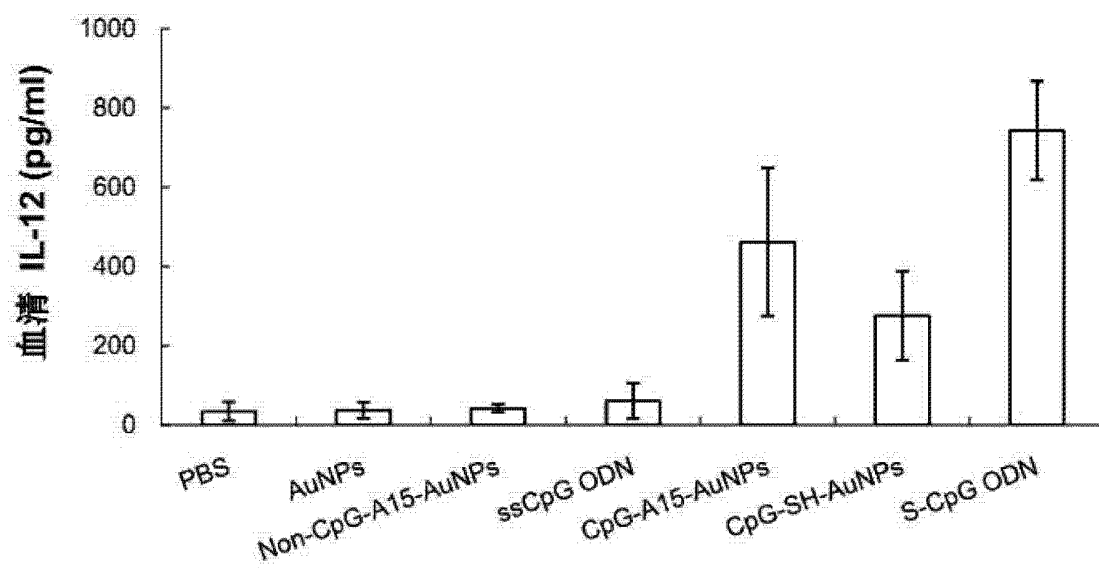


图 8A

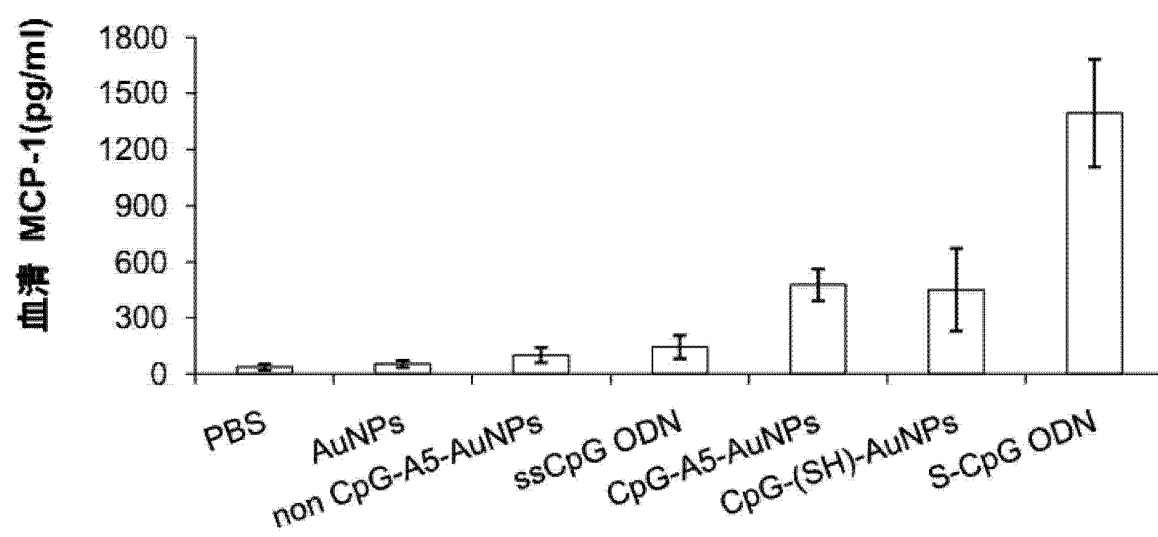


图 8B