

alen

Uitvinder

□□

□□□

□□□

□□□

□□

Huidige Gevolmachtigde

Technische Universiteit van Peking

Wereldwijde toepassingen2020 CN**Aanvraag CN202011159718.7A gebeurtenissen****2020-10-26**

Aanvraag ingediend door de Technische Universiteit van Peking

2020-10-26

Prioriteit voor CN202011159718.7A

2020-12-18

Publicatie van CN112089834A

Status

In afwachting van

Info[Wettelijke bepalingen](#)[Vergelijkbare documenten](#)[Prioriteit en verwante toepassingen](#)**Externe links**[Espacenet](#)[Globaal Dossier](#)[Bespreek](#)

Bereiding en toepassing van pachyman nano adjuvans op basis van grafeenoxide en adjuvans/antigeen co-delivery vaccin

Abstract

Bereiding en toepassing van pachyman nano-adjuvans en daarop gebaseerde adjuvans/antigeen co-delivery, behorend tot het gebied van geneesmiddelen. De uitvinding omvat een pachyman nanoadjuvant die wordt gevormd door een nanomateriaal als drager te nemen en pachyman geladen op de drager, en een adjuvant/antigeen co-delivery gevormd door de adjuvant en een antigeen. De pachyman nanometer adjuvans kan de rijping van dendritische cellen bevorderen, de lymfocytenfunctie verbeteren, het vrijkomen van geneesmiddelen vergemakkelijken, het effect van geneesmiddelen effectief verlengen, immuuntolerantie voorkomen, en het immuuneffect en de reactietijd sterk verbeteren. De adjuvans/antigeen co-delivery verhoogt de biologische beschikbaarheid van pachyman en antigeen, maakt het mogelijk dat het antigeen en de adjuvans door dezelfde cel worden opgenomen, verbetert sterk de targeting eigenschap van het , en kan niet alleen humorale immuniteit maar ook sterkere cellulaire immuniteit induceren. De uitvinding wordt gebruikt als een nieuwe adjuvans en , en kan naar verwachting worden gebruikt voor het voorkomen en behandelen van ziekten bij de mens.

Classificaties

[A61K39/39](#) Geneesmiddelenpreparaten die antigenen of antilichamen bevatten die worden gekenmerkt door de immunostimulerende additieven, bv. chemische hulpstoffen

Bekijk nog 3 classificaties

CN112089834A

China

[Download PDF Vindvergelijkbarestand van de techniek](#)

Andere talen

[Chinees](#)

Uitvinder

□□

□□□

□□□

□□□

□□

Huidige Gevolmachtigde

Technische Universiteit van Peking

Wereldwijde toepassingen
2020 [CN](#)

Aanvraag CN202011159718.7A gebeurtenissen

2020-10-26

Aanvraag ingediend door de Technische Universiteit van Peking

2020-10-26

Prioriteit voor CN202011159718.7A

2020-12-18

Publicatie van CN112089834A

Status

In afwachting van

Info

[Wettelijke bepalingen](#)

[Vergelijkbare documenten](#)

[Prioriteit en verwante toepassingen](#)

Externe links

[Espacenet](#)

[Globaal Dossier](#)

[Bespreek](#)

Beschrijving

en adjuvante/antigeen co-delivery

Technisch gebied

De uitvinding behoort tot het gebied van geneesmiddelen, en heeft in het bijzonder betrekking op een pachyman nano-adjuvant op basis van een materiaal, en een bereidingsmethode en toepassing van een adjuvant/antigeen co-delivery gevormd door de pachyman nano-adjuvant en een antigeen.

Achtergrond

De ontwikkeling en toepassing van vaccins is uitgebreid van ziektepreventie tot de behandeling van vele niet-infectieuze ziekten, en traditionele verzwakte levende vaccins hebben over het algemeen een hoge immunogeniciteit, maar het risico van rugmutatie, en het immuuneffect heeft bepaalde beperkingen. Geïnactiveerde vaccins, subunitvaccins, DNA-vaccins en recombinante vaccins zijn relatief veilig, maar hebben een beperkte immunogeniciteit, en kunnen op lange termijn een doeltreffende beschermende werking uitoefenen door ze aan te vullen met hulpstoffen (adjuvantia). De immunoadjuvans, als niet-specifieke immunopotentiator, kan het immunologische effect aanzienlijk versterken of het type immuunrespons na vaccinatie veranderen door vooraf of gelijktijdig met een antigeen in het lichaam te worden geïnjecteerd. Sinds de aluminiumadjuvant in de 20e eeuw werd goedgekeurd, is het de meest gebruikte adjuvant geworden, en het kan de primaire immuniteit verbeteren, de antigeendosis en de immunisatiefrequentie verminderen, maar kan geen CTL-respons opwekken, en kan verschillende bijwerkingen veroorzaken. Met een langzame vooruitgang van tientallen jaren, werd olie-in-water emulsie MF59 goedgekeurd voor het op de markt brengen op het einde van de jaren 90 van de 20e eeuw, en AS03, AS01, AS04 en CpG ODN adjuvantia zijn achtereenvolgens goedgekeurd sinds de 21e eeuw. Naast de enkele bovengenoemde adjuvantia die zijn goedgekeurd voor gebruik bij de mens, bevinden de meeste zich nog in de klinische of preklinische testfase, en is het aantal adjuvantia dat beschikbaar is voor

gebruik bij de mens zeer beperkt, zodat de ontwikkeling van nieuwe adjuvantia dringend noodzakelijk is.

Tuckahoe (*Poria cocos* (Schw.) Wolf) is een reeds lang bestaand traditioneel Chinees geneesmiddel en wordt op grote schaal toegepast bij de behandeling van traditionele Chinese geneesmiddelen. *Poria cocos* (Schw.) wolf van de Polyporaceae, Polyporusschimmels, heeft een droog sclerotium, dat voornamelijk groeit op de wortel van pijnboom. De actieve bestanddelen bestaan hoofdzakelijk uit: polysacchariden, alkaloiden, saponinen, terpenen, polyfenolen, enz. De polysacchariden zijn de hoofdbestanddelen van *Poria cocos*, en de pachyman is een mengsel van verschillende soorten polysacchariden die uit *Poria cocos* zijn geëxtraheerd en gezuiverd, en het gehalte ervan is ongeveer 84% van het droge sclerotium van *Poria cocos*, en het omvat in water oplosbare polysacchariden en in alkali oplosbare polysacchariden, en is samengesteld uit glucose, fucose, arabinose, xylose, mannose en galactose. Uit een groot aantal onderzoeken blijkt dat pachyman de immuniteit versterkt, de immuunorganen van organismen beschermt, de functies van T-cellen en B-cellen versterkt, de activiteit van dendritische cellen beïnvloedt en het vrijkomen van bepaalde cytokinen beïnvloedt, waardoor specifieke en niet-specifieke immunoreacties worden bevorderd. En de lage toxiciteit en minder bijwerkingen van pachyman maken het tot een ideale immunologische hulpstof. Het molecuulgewicht van pachyman is echter groot en het geneesmiddel komt te snel vrij, wat kan leiden tot een te hoge injectiedosis, waardoor de klinische toepassing van pachyman bemoeilijkt wordt. Daarom is het dringend noodzakelijk dit probleem op te lossen.

Nanomateriaal verwijst naar enkelvoudige kristallen of polykristallijne lichamen met een korrelgrootte van minder dan 100 nm. De nanodeeltjes hebben de biologische eigenschap dat zij gemakkelijk door diverse cellen worden opgenomen en kunnen worden gefagocytiseerd door antigeen presenterende cellen, zodat de immunrespons ten gevolge van antigenen wordt versterkt. Het nanomateriaal kan ook het antigeen langzaam vrijgeven, de dosering of de tijd van het antigeen verminderen, de grootte van het kleine molecule-antigeen vergroten, en het antigeen volledig verwerken en behandelen, zodat het immuneeffect duurzamer is. Sommige nanodeeltjes hebben zelf een stimulerend effect op het immuunsysteem en immunisatie met vaccins die nanomaterialen bevatten kan resulteren in een immunrespons in het slijmvlies en het maagdarmslijmvlies. is een koolstofnanomateriaal met een tweedimensionale vlakke structuur, en de speciale monoatomaire laagstructuur van de maakt het mogelijk om een veelheid van unieke fysisch-chemische eigenschappen te hebben. is een van , en aangezien bevat meer zuurstof-bevattende functionele groepen na oxidatie, kunnen eigenschappen van worden verbeterd door verschillende reacties met de zuurstof-bevattende functionele groepen. De en de derivaten daarvan hebben de voordelen van hoog specifiek oppervlaktegebied, sterke elektrische en thermische geleidbaarheid, goede biocompatibiliteit en dergelijke, en worden wijd toegepast op de biomedische gebieden van drugdragers, kankerdetectie en -behandeling en dergelijke. Daarom moet pachyman als grondstof worden gekozen, wordt een coatingmethode aangenomen, komt het geneesmiddel langzaam vrij, wordt de dosering van de pachyman verlaagd, en wordt een effectieve, veilige en stabiele immunopotentiator gevonden, namelijk de pachyman nano-adjuvans op basis van het materiaal.

Bekendmaking van uitvinding

De uitvinding voorziet in een pachyman nano-adjuvans en een adjuvans/antigeen co-delivery gevormd door de adjuvans. De pachyman nano-adjuvans kan het immuneeffect van vaccins sterk verbeteren, de dosering van pachyman verminderen, de dosering van antigenen verminderen nadat

de antigenen zijn ingekapseld, en diverse beperkte problemen bij klinische toepassing in de voorafgaande kunst oplossen.

De uitvinding voorziet ook in een pachyman nano-adjuvans en een bereidingsmethode van de adjuvans/antigeen co-delivery gevormd door de adjuvans, en de bereidingsmethode is eenvoudig en gemakkelijk te bedienen, heeft een duidelijk effect en is geschikt voor productie op grote schaal.

Om dit doel te bereiken, wordt in de uitvinding het volgende technische schema toegepast:

de uitvinding verstrekt een pachyman nanohulpstof, waarin een dragermateriaal van de pachyman nanohulpstof nano is, en pachyman aan een nanodrager wordt verbonden om de pachyman nanohulpstof op basis van een materiaal te vormen. De pachyman nano-adjuvant die door de uitvinding wordt verstrekt kan pachyman met hoog rendement laden, en lost de klinische toepassingsproblemen van snelle versie van pachymangeneesmiddel en overmaatse injectiedosering op.

De nano is behandeld volgens een nano-methode, heeft meer zuurstofhoudende functionele groepen, en is een nanomateriaal met een hoog specifiek oppervlak en goede biocompatibiliteit. De deeltjesgrootte is 1-100 nm, het molecuulgewicht is 5-10 kDa, de drager kan de lymfeklieren binnendringen om te werken, en de drager wordt op grote schaal toegepast op het gebied van dragers van geneesmiddelen en vaccins.

Het molecuulgewicht van de pachyman is 8-15 kDa, de constitutionele monosachariden van de pachyman omvatten glucose, mannose, fucose, galactose en dergelijke, en de massaverhouding van de constitutionele monosachariden is (2-3,5): (1-2): (0.3-4): 1.

De massaverhouding tussen de nano en de pachyman is 1: 2,5-1: 10, bij voorkeur 1: 5.

de deeltjesgrootte van de pachyman nanometer-adjuvans is bij voorkeur 100-500 nm, en het molecuulgewicht is 15-45 kDa.

Een methode voor de bereiding van pachyman nanometer adjuvans omvat de volgende stappen:

(1) oplossen en dispergeren met steriel water, ultrasoonbehandeling gedurende 2 uur, ultrasoonbehandeling in ijsbad gedurende 30 minuten, toevoegen van natriumhydroxide (de uiteindelijke concentratie is 5M), en ultrasoonbehandeling gedurende 2 uur; centrifugereren bij hoge snelheid bij 16.000g superzwartekracht, en opvangen van supernatans om een nanodrageroplossing te verkrijgen, waarbij de uiteindelijke concentratie van de nanodrageroplossing 0,1-10 mg/ml is, en bij voorkeur 1 mg/ml;

(2) en (3) uitvoeren van een ultrasone behandeling op de nano-oplossing in stap (1) gedurende 1 uur, en aanpassen van de pH naar 9-10, bij voorkeur 9,5. Toevoegen van epoxychlorpropan, inbrengen van stikstof voor de reactie, roeren en reageren gedurende 4 uur bij een temperatuur van 40 °C in een waterbad, en dialyseren om de niet-gereageerde epoxychlorpropan te verwijderen;

(3) bereiding van een pachymaranoplossing met gedeïoniseerd water, en uitvoering van een endotoxineverwijderende affiniteits-chromatografiebehandeling, waarbij het endotoxinegehalte minder dan 5EU/mL bedraagt, en de concentratie van de pachymaranoplossing 2-20 mg/mL, bij voorkeur 5 mg/mL, bedraagt.

(4) En (3) oplossen van de pachymaran oplossing in de nano-oplossing in stap (2), aanpassen van de pH naar 9-10, bij voorkeur 9, uitvoeren van waterbad bij 42 °C gedurende 1-3 uur, bij voorkeur 3 uur, en centrifugeren en verzamelen om de pachymaran nano adjuvant met de nano te verkrijgen .

De pachymaran-adjuvans die volgens een van de bereidingswijzen is bereid, valt ook binnen de beschermingsomvang van de uitvinding.

De uitvinding voorziet ook in een adjuvans/antigeen co-delivery , die wordt bereid door de pachyman nano-adjuvans te laden met een virusantigeen. Het antigeen en de pachyman van de adjuvans/antigeen co-delivery zijn beide verbonden met . De deeltjesgrootte van de is 50 nm-1000 nm, en de absolute waarde van zeta-potentiaal is 20-30 mv.

De virale antigenen omvatten: het virusantigeen is een van de volgende virussen: geïnactiveerd EV71-virus, geïnactiveerd hepatitis A-virus, geïnactiveerd poliovirus, geïnactiveerd influenza-virus, HPV-virusachtige deeltjes, hepatitis B-virusachtige deeltjes of recombinante eiwitten die de virusantigenen bevatten.

De massaverhouding van de nano tot de pachyman is 1: 2,5-1: 10, en bij voorkeur 1: 5.

De massaverhouding tussen het virusantigeen en de pachyman is 1 : 2-1 : 50, en bij voorkeur 1 : 25.

In de uitvinding bestaat de bereidingsmethode van de adjuvans/antigeen co-delivery uit de volgende stappen:

(1) oplossen in steriel water, uitvoeren van ultrasone behandeling gedurende 2 uur, uitvoeren van ultrasone behandeling in ijsbad gedurende 30 minuten, toevoegen van sterke base, uitvoeren van continue ultrasone behandeling gedurende 2 uur, uitvoeren van centrifugeren met hoge snelheid bij een hyperzwaartekracht van 16.000 g, en opvangen van supernatans om een nanodrageroplossing te verkrijgen, waarbij de uiteindelijke concentratie van de nanodrageroplossing 0,1-10 mg/ml bedraagt. Bij voorkeur 1 mg/ml.

(2) Uitvoeren van ultrasone behandeling op de nano-oplossing in stap (1) gedurende 1 uur, aanpassen van de pH-waarde tot 9-10, bij voorkeur 9,5, toevoegen van epoxychlorpropaan, inbrengen van stikstof voor de reactie, roeren en reageren bij een temperatuur van 40 °C in een waterbad gedurende 4 uur, en dialyse om niet-gereageerd epoxychlorpropaan te verwijderen;

(3) bereiding van een pachymanoplossing met gedeïoniseerd water, en uitvoering van een endotoxineverwijderingsbehandeling, waarbij de concentratie van de pachymanoplossing 2-20 mg/ml bedraagt, en bij voorkeur 5 mg/ml.

(4) En (3) oplossen van de pachymaran oplossing in stap (3) in de nano-oplossing in stap (2), aanpassen van de pH naar 9-10, bij voorkeur 9, uitvoeren van waterbad bij 42 °C gedurende 1-3 uur, bij voorkeur 3 uur, en centrifugeren en verzamelen om de pachymaran nano adjuvant bedekt met nano te verkrijgen .

(5) Aanpassen van de pH van de pachyman nano-adjuvansoplossing met nano in stap (4) tot 4,5-7,2, bij voorkeur 6; toevoegen van EDC en Sulfo-NHS, en mengen gedurende 15 min-1 u, bij voorkeur 30 min; aanpassen van de pH-waarde tot 7-8, bij voorkeur 7,2, toevoegen van een virusantigeenoplossing, mengen gedurende 1-5 u, bij voorkeur 2 u, ontzouten door een ontzalkingskolom om een adjuvans/antigeen co-delivery te verkrijgen ;

in stap (4) is de molaire verhouding EDC/Sulfo-NHS 1: 2-10: 1, bij voorkeur 4: 1. De EDC/concentratieverhouding is 1: 5-1: 20, bij voorkeur 1: 10.

in stap (4) bedraagt de concentratie van de virusantigeenoplossing 0,1-20 mg/ml, bij voorkeur 1 mg/ml.

Het gebruik van de hierboven beschreven antigeen/adjuvans co-delivery bij de bereiding van een geneesmiddel valt ook binnen het toepassingsgebied van de onderhavige uitvinding. Voor gebruik op het gebied van profylactische en therapeutische vaccins.

De grondstoffen van de door de uitvinding gebruikte kit zijn in de handel verkrijgbaar; voor de inrichtingen, voorwaarden (temperatuur, tijd, enz.), stoffen, hoeveelheden, methoden, enz. die in de onderhavige uitvinding niet specifiek worden beschreven, kan eenieder die in de kunst bekend is of die gewoonlijk bekwaam is in de kunst, worden gebruikt om hetzelfde te bepalen.

Vergeleken met de stand van de techniek heeft de uitvinding de volgende voordelen:

1. de bereiding van de pachyman nano-adjuvans is in binnen- en buitenland niet gerapporteerd, en de uitvinding voorziet in een bereidingsmethode van de pachyman nano-adjuvans op basis van een materiaal en geoptimaliseerde omstandigheden daarvan.
2. De immunopotentiëringsactiviteit van de pachyman nanometer adjuvant is niet gerapporteerd. De toepassing van de uitvinding bewijst dat het immuuneffect sterk wordt versterkt nadat het pachyman is bereid tot het pachyman nanometer adjuvant, dat tot uiting komt door de dendritische cellen van muizen te stimuleren om in vitro te rijpen en de immuunrespons van het TH1-type te induceren. Daarom biedt de pachyman-nano-adjuvant materiaal en demonstratie voor de ontwikkeling van nieuwe adjuvantia.
3. De adjuvante/antigeen co-delivery die de pachyman nano-adjuvante bevat die door de uitvinding wordt geleverd, heeft een hoge stabiliteit, verbetert de biologische beschikbaarheid van pachyman en antigeen aanzienlijk, maakt het mogelijk dat het antigeen en de adjuvante door dezelfde cel worden opgenomen, verbetert de targeting eigenschap van de, kan de TH1-type immuunrespons versterken, en heeft de voordelen van een sterke persistentie van de immuunrespons, een goed immuuneffect, een verhoogde cytokinesecretie en dergelijke.

Tekeningen

Figuur 1 toont het bereidingsproces van pachyman nano-adjuvans en adjuvans antigeen co-delivery .

Figuur 2 toont de Zeta-potentiaal van pachyman nanohulpstof.

FIG. 3 toont elektronenmicroscopie van pachyman nanoadjuvant.

Figuur 4 laat zien dat de pachyman nano-adjuvans werd opgenomen door dendritische cellen.

Figuur 5 laat zien dat pachyman nano-adjuvant geïnduceerde BMDC CD86 expressie up-reguleerde.

Figuur 6 laat zien dat pachyman nano-adjuvant geïnduceerde BMDC CD80 expressie up-reguleerde.

Figuur 7 laat zien dat pachyman nano-adjuvant de BMDC aanzette tot een hogere MHCII expressie.

Figuur 8 toont aan dat pachyman nano-adjuvans antigeenspecifieke IgG-antilichaamproductie induceerde na immunisatie van muizen.

FIG. 9 laat zien dat de Pachymaran nanometer adjuvans miltcellen aanzet tot de afscheiding van IFN-gamma cytokines nadat muizen zijn geïmmuniseerd.

FIG. 10 toont dat de IL-4 cytokine secretie door splenocyten werd geïnduceerd na immunisatie van muizen met de Pachymaran nanometer adjuvans .

Gedetailleerde Beschrijving

De onderhavige uitvinding wordt verder geïllustreerd door de volgende voorbeelden, die onder meer, maar niet uitsluitend, de volgende voorbeelden omvatten.

De experimentele procedures die in de volgende voorbeelden worden gebruikt, zijn alle conventionele procedures, tenzij anders vermeld.

De in de volgende voorbeelden gebruikte materialen, reagentia en dergelijke zijn in de handel verkrijgbaar, tenzij anders vermeld.

Voorbeeld 1

De belichaming is een bereidingsproces van de pachyman nano-adjuvans op basis van het materiaal en de door de adjuvans gevormde co-delivery adjuvans/antigeen.

De bereidingsmethode omvat de volgende stappen:

(1) oplossen in steriel water, uitvoeren van ultrasone behandeling gedurende 2 uur, uitvoeren van ultrasone behandeling in ijsbad gedurende 30 minuten, toevoegen van sterke base, en uitvoeren van ultrasone behandeling gedurende 2 uur. Centrifugeren bij een hoge snelheid van 16.000 g, en opvangen van het supernatans om een nanodrageroplossing met een eindconcentratie van 1 mg/ml te verkrijgen.

(2) en (2) de nano-oplossing in stap (1) gedurende 1 uur ultrasoon behandelen, de pH-waarde op 9,5 instellen, epoxychlorpropan toevoegen, stikstof voor de reactie inbrengen, gedurende 4 uur in een waterbad bij 40 °C voor de reactie roeren, en dialyseren om het niet-gereageerde epoxychlorpropan te verwijderen.

(3) Bereiding van de pachymanoplossing met gedeïoniseerd water, en verwijdering van endotoxine om een pachymanoplossing met een concentratie van 5 mg/ml te verkrijgen.

(4) En (3) het oplossen van de pachymaran oplossing in stap (3) in de nano-oplossing in stap (2), het aanpassen van de pH-waarde tot 9, het uitvoeren van waterbad bij 42 °C gedurende 3 uur, en het uitvoeren van centrifugale collectie om de pachymaran nano adjuvant bedekt met nano te verkrijgen .

(5) En (4) aanpassing van de pH van de pachyman nanometer adjuvant-oplossing met de nanometer in stap (4) tot 6. Ligatie EDC en Sulfo-NHS werden toegevoegd en gedurende 30 min. gemengd. Aanpassing van de pH-waarde tot 7, toevoeging van een virusantigeenoplossing, mengen gedurende 2 uur, ontzouten door een ontzoutingskolom om een adjuvans/antigeen co-delivery te verkrijgen ;

de methode voor de bereiding van de blanco drager is dezelfde als hierboven, behalve dat pachyman en antigeen niet worden toegevoegd.

Het adjuvans/antigeen co-delivery constructieschema op basis van pachyman nano-adjuvans is weergegeven in figuur 1,

voorbeeld 2 karakterisering van adjuvant/antigeen Co-delivered vaccins met Pachymaran Nano adjuvant

(1) Meting van de Zeta-potentiaal van het oppervlak

Pachymaran nanoadjuvant/antigeen co-delivered monsteroplossingen werden nauwkeurig bereid in een concentratie van 0,1mg/mL met Milli-Q ultrapuur water. 1mL van de monsteroplossing werd gebruikt om het Zeta-potentiaal van het oppervlak van de nanodeeltjes te bepalen met behulp van een Zeta-potentiaalanalysator (Malvern, UK, Zetasizer NanoZS). De temperatuur wordt 20min voor elke detectie gehouden, elk monster wordt driemaal getest, het resultaat wordt gemiddeld, het resultaat wordt getoond in figuur 2, en de zeta potentiaal absolute waarde is meer dan 20Mv, wat aangeeft dat het monster relatief stabiel is.

(2) Waarneming met een transmissie elektronen microscoop

Een pachyman nano-adjuvans/antigeen co-delivered monsteroplossing met een concentratie van 0,1mg/mL wordt nauwkeurig bereid met Milli-Q ultrapuur water, 10-20 μ L van de monsteroplossing wordt gedruppeld op een kopernet met 230 mazen dat een koolstofhoudende film bevat, en na drogen bij een constante temperatuur wordt de morfologie van het monster waargenomen met een transmissie-elektronenmicroscoop (TEM, FEI in de VS, Tecnai G220S-TWIN, 200kV) (figuur 3).

(3) Stabiliteitsstudies adjuvant/antigeen co-delivery

Het Zeta-potentiaal van een samen geleverd adjuvans/antigeen dat een juiste hoeveelheid pachyman nano-adjuvans bevat, wordt gemeten met een laserdeeltjesverwijderaar, dezelfde batch samen geleverd adjuvans/antigeen wordt na twee weken genomen, het Zeta-potentiaal wordt gemeten met dezelfde methode, er is geen duidelijk verschil, en het adjuvans/antigeen dat samen is geleverd zoals beschreven in de uitvinding is goed qua stabiliteit.

(4) In vitro geneesmiddeltoediening

Het nemen van een juiste hoeveelheid adjuvant / antigeen co-delivery met pachyman nano adjuvant, waarin een modus antigeen OVA wordt gemarkeerd door FITC en vervolgens wordt toegevoegd aan DC2.4 muizen dendritische cellen, na een kweek van 6 uur, worden de cellen gefixeerd, DAPI wordt gebruikt om celkernen te kleuren, fluorescentie wordt waargenomen onder een fluorescentiemicroscoop, zoals weergegeven in figuur 4, groene fluorescentie expressie wordt gezien buiten de celkernen, een deel van de dendritische cellen nemen het antigeen op, en het adjuvant/antigeen co-delivery systeem kan het antigeen in de cellen brengen.

(5) Meting van de dosering

Het nemen van een juiste hoeveelheid adjuvans/antigeen co-delivery die pachyman nano-adjuvans bevat, en het meten van de laadcapaciteit van antigeen-eiwit met behulp van een BCA-methode, waarbij de laadconcentratie van het antigeen-eiwit 0,5mg/mL is, en de laadcapaciteit van het geneesmiddel goed is.

Voorbeeld 3

(a) De in voorbeeld 1 bereide adjuvans/antigeen co-delivery, pachyman, de in voorbeeld 1 bereide blanco nanodrager, het modelantigeen en de PBS-oplossinggroep werden als negatieve controle (PBS) gebruikt om van beenmerg afkomstige dendritische cellen (BMDC) van muizen te behandelen, en het effect van de negatieve controle op de rijping van de dendritische cellen van muizen in vitro werd als volgt onderzocht:

SPF-klasse C57/BL6 muizen, vrouwtjes, werden geselecteerd voor 6-8 weken.

(1) Bereiding van beenmergcellen

Het doden van een muis door middel van een cervicale dislocatiemethode, het afscheren van huid en haar van de muis, het nemen van het dijbeen, het weken in 70% alcohol gedurende 2-5 minuten, het overbrengen in een RPMI1640 volserum kweekmedium (op ijs), het voorzichtig afschuiven van twee uiteinden van het dijbeen, het opzuigen van telkens 100-200 μ L RPMI1640 met behulp van een injectiespuit, en het herhaaldelijk spoelen van het beenmerg naar een steriele buis met de RPMI1640 totdat het bot volledig wit is geworden. De beenmergspoeling werd uit het buisje overgebracht in een petrischaal met RPMI1640 volledig serum door filtratie door een nylon gaas met mazen van 200 mesh. Kweek in celkweekbakje gedurende 30 min. Het aantal niet-adherente of losjes adherente cellen werd verzameld, aangepast tot 1×10^6 cellen/mL, 20 ng/mL GM-CSF toegevoegd en uitgezet.

(2) Kweek van uit beenmerg afkomstige dendritische cellen

De volgende dag van de beenmergcelkweek werd de vloeistof gedeeltelijk ververst en werd nieuw RPMI1640-geheel serummedium met GM-CSF toegevoegd. Op de derde dag werd de oplossing volledig ververst, werd het celsupernatans afgezogen, werden de nietadherente cellen voorzichtig weggespoeld, en werd aan elk putje een nieuw RPMI1640-geheel serummedium met GM-CSF toegevoegd. Op de vierde of vijfde dag werden de niet-adherente of losjes adherente cellen door wassen verzameld en werden de adherente cellen verwijderd. Op dag zes of dag zeven, na 48 uur kweek, werden onrijpe BMDC's verzameld voor verdere tests.

(3) Flowcytometrie voor de bepaling van CD80 en CD86 op de celoppervlakte, MHCII

Onrijpe BMDC's werden verzameld en in een celconcentratie van 1×10^6 /mL in 24-wells-platen gezaaid. Respectievelijk toevoegen van pachymaran, adjuvant/antigeen co-delivery, drager, modelantigeen en PBS, behandelen gedurende 24u, verzamelen van onvolledig gehechte cellen, verzegelen gedurende 30min met behulp van anti-muis CD16/32 antilichaam, toevoegen APC anti-muis CD80, PE/Cy7 anti-muis CD86 en PE anti-muis MHC II antilichaam, en verven gedurende 30min tot 1u bij 4 °C in het donker plaats. En het verzamelen van cellen, en het opsporen met een flowcytometer.

De experimentele resultaten zijn te zien in fig. 5-7, de drager heeft geen significante invloed op de expressie van BMDC oppervlakte marker moleculen, en pachyman kan CD86 en MHCII moleculen op het BMDC oppervlak significant up-reguleren. Adjuvant/antigen co-delivered vaccins kunnen effectief BMDC maturatie in vitro induceren.

Voorbeeld 4

(a) De adjuvans/antigeen co-delivered bereid in voorbeeld 1, pachyman, modelantigeen en PBS-oplossing groep werden gebruikt als negatieve controle (kortweg PBS) om muizen te immuniseren,

en de invloed van de negatieve controle op de cellulaire immuniteit en humorale immuniteit in de muis in vivo werd onderzocht, als volgt:

c57BL/6 muizen (vrouwjes, 6-8w) werden subcutaan geïmmuniseerd op dag D0, en elke groep werd gevaccineerd met PBS, modelantigeen (10 µg), pachyman (500 µg) of een co-deliver die 10mg modelantigeen bevatte. Na 2 weken wordt bloed afgenomen voor opslag, de boosting-immunisatie wordt eenmaal uitgevoerd, de muizen worden na 4 weken geofferd, en het bloed wordt afgenomen voor het aantonen van het specifieke IgG-antigeen van het serum-antigeen OVA van respectievelijk de muizen. Milt wordt genomen en gemalen door een 70 µm cel zeef en gewassen door PBS / EDTA tot de milt-cel enkele celsuspensie te bereiden. Na het tellen van de cellen worden de cellen toegevoegd aan een 96-well-plaat volgens 2×10^5 per putje, wordt 300 µg/ml patroonantigeenoplossing toegevoegd, wordt de kweek gedurende 72 uur voortgezet, wordt het celsupernatant opgevangen en wordt het gehalte aan IFN-gamma- en IL-4-cytokines in het celsupernatant gedetecteerd door middel van ELISA.

Zoals blijkt uit figuur 8, verhoogde de combinatie adjuvans/antigeen de expressie van de patroonantigeenspecifieke IgG-antilichamen in het muizenserum aanzienlijk in vergelijking met de controlegroep, wat erop wijst dat de humorale immuniteit kon worden bevorderd.

De adjuvans/antigeen co-delivering verhoogde de IFN- γ secretie door muis-splenocyten aanzienlijk in vergelijking met de controlegroep, wat erop wijst dat de cellulaire immunresponsen konden worden versterkt (fig. 9-10).

Claims (10)

Verberg Afhankelijke

1. Het pachyman nano-adjuvant op basis van het materiaal wordt gekenmerkt door het feit dat een dragermateriaal van het pachyman nano-adjuvant nano is, en pachyman wordt verbonden met een nano-drager om het pachyman nano-adjuvant op basis van het materiaal te vormen.
2. De pachyman nanohulpstof op basis van materiaal volgens claim 1, gekenmerkt doordat het materiaal nanobewerkt is, de deeltjesgrootte van de nano 1-100 nm is en het molecuulgewicht 5-10 kDa is; het molecuulgewicht van de pachyman is 8-15 kDa, de constitutionele monosachariden van de pachyman bestaan uit glucose, mannose, fucose, galactose en dergelijke, en de massaverhouding van de constitutionele monosachariden is (2-3,5): (1-2): (0.3-4): 1.
3. De pachyman nano-adjuvans op basis van materialen zoals beweerd in claim 1, waarbij de massaverhouding van nano tot pachyman 1: 2,5-1: 10 is.
4. De pachyman nano-adjuvans op basis van materiaal zoals geclaimd in claim 1, waarbij de deeltjesgrootte van de pachyman nano-adjuvans 50 nm-500 nm is, en het molecuulgewicht 15 kDa-45 kDa is.
5. De methode voor het bereiden van de pachyman nanohulpstof op basis van materiaal zoals geclaimd in claim 1, wordt gekarakteriseerd door de volgende stappen te omvatten:
 - (1) oplossen in steriel water, ultrasoonbehandeling gedurende 2 uur, ultrasoonbehandeling in ijsbad gedurende 30 minuten, sterke base toevoegen en ultrasoonbehandeling gedurende 2 uur; centrifugeren bij een hoge snelheid van

16.000 g, en opvangen van het supernatans om een nanodrageroplossing te verkrijgen, waarbij de uiteindelijke concentratie van de nanodrageroplossing 0,1-10 mg/ml bedraagt;

(2) uitvoeren van ultrasone behandeling op de nano-oplossing in stap (1) gedurende 1 uur, aanpassen van de pH-waarde tot 9-10, toevoegen van epoxychloropropaan, inbrengen van stikstof voor de reactie, roeren en reageren bij een temperatuur van 40 °C in een waterbad gedurende 4 uur, en dialyse om niet-gereageerd epoxychloropropaan te verwijderen;

(3) en (3) oplossen van de pachymaranoplossing in de nano-oplossing in stap (2), bijstellen van de pH-waarde op 9-10, uitvoeren van het waterbad bij 42 °C gedurende 3 uur, en centrifugeren en verzamelen om de pachymaran-nano-adjuvans gecoat met nano te verkrijgen .

6. Een adjuvans/antigeen co-delivery bestaande uit de pachyman nano-adjuvans van zin 1 en geladen met een viraal antigeen.

7. Een adjuvans/antigeen co-delivery volgens claim 6, waarbij de virale antigenen bestaan uit: het inactiveren van het virus of recombinant eiwit.

8. De adjuvante/antigeen co-delivery van claim 6, waarbij het antigeen en de pachyman van de adjuvante/antigeen co-delivery beide gekoppeld zijn aan .

9. Een methode voor het bereiden van een adjuvans/antigeen co-delivery volgens claim 6, die bestaat uit de volgende stappen:

(1) de pH-waarde van de pachymaran-adjuvansoplossing waarin de nano's zijn ingekapseld, op 4,5-7 brengen²) toevoeging van EDC (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidehydrochloride) en Sulfo-NHS (N-hydroxythiosuccinimide), mengen gedurende 15 min-1 u, bijstellen van de pH-waarde tot 6-8, toevoegen van een virusantigeenoplossing, mengen gedurende 1-5 u, en ontzouten met behulp van een ontzalkingskolom om het adjuvans/antigeen te verkrijgen dat coëleert;

De molaire verhouding EDC/Sulfo-NHS is 1: 2-10: 1, de concentratie van de virusantigeenoplossing is 0,1-20 mg/ml; de EDC-concentratieverhouding is 1: 5-1: 20, bij voorkeur 1: 10.

10. gebruik van een pachyman nanoadjuvant of een adjuvant/antigeen co-delivery gevormd uit de adjuvant overeenkomstig een van de claims 1 tot en met 9, voor het gebied van profylactische en therapeutische vaccins.

Vergelijkbare documenten

PublicatiePublicatiedatumTitel

[JP6434995B2](#)2018-12-05Surfactant-vrije olie-in-water emulsie en gebruik ervan

[CN101428145B](#)2013-01-02Nieuwe hulpstof voor vaccins

[KR101342641B1](#)2013-12-20Samenstelling voor hulpstof bestaande uit polygamma-glutaminezuur-chitosan nanodeeltje

[CN108434122B](#)2020-09-08Polyelektrolyt hybride hol siliciumdioxide nanodeeltje en bereidingswijze en toepassing daarvan

[Cibulski et al. 2016](#)Nieuwe ISCOMs van Quillaja brasiliensis saponinen induceren mucosale en systemische antilichaamproductie, T-celresponsen en verbeterde antigeenopname

[Nanda et al. 2014](#)Immunologische evaluatie van gemanosyleerde chitosan nanodeeltjes op basis van het mond- en klauwzeervirus DNA-vaccin, pVAC FMDV VP1-OmpA bij cavia's

[JP2019203004A](#)2019-11-28Vaccin toedieningsystemen met behulp van gistcelwanddeeltjes

[CN112089834A2020-12-18Preparatie](#) en toepassing van pachyman nano-adjuvans op basis van grafeenoxide en adjuvans/antigeen co-delivery vaccin

[CN110613844A2019-12-27Mini](#) gecombineerde hulpstofnanodeeltje en bereidingswijze en toepassing daarvan

[US10849962B22020-12-01Methode](#) en apparaat voor transdermale toediening via micronaalden

[US10786558B22020-09-29Oraal](#) oplossende films

[CN109939229A2019-06-28Een](#) soort nanometeradjuvant van zelfassemblage en de bereidingsmethode en toepassing van het nanovaccin gevormd door de adjuvant

[Salvador et al. 2012](#)Dendritische cellen interacties met het immuunsysteem-Implicaties voor de ontwikkeling van vaccins

[Zheng et al. 2018](#)Maturatie van dendritische cellen in vitro en immunologische verbetering van muizen in vivo door pachyman-en/of OVA-ingekapselde poly (D, L-melkzuur) nanosferen

[KR20210065952A2021-06-04Geïnactiveerd](#) transfer-influenzavaccin en bereidingswijze daarvan

[CN108578689B2020-08-28Micron](#) doornbal voor het activeren van specifieke immuniteit via een fysische methode en bereidingswijze daarvan

[CN110237249A2019-09-17De](#) nieuwe aluminium adjuvans van speciale doel Dendritische Cellen en de toepassing in de voorbereiding van vaccins

[CN110917136A2020-03-27Anti-tumor](#) nano-emulsie adjuvans neusslijmvliesvaccin en bereidingswijze daarvan

[CN111658767A2020-09-15Hydrofiel](#) antigeen en/of hydrofoob antigeen vaccin toedieningssysteem en bereidingswijze daarvan

[CA2977958A12018-02-28Vaccin](#) toedieningssystemen met behulp van gistcelwanddeeltjes [Liu et al. 2020](#)Geconstrueerde cubosomen dienen als een nieuwe vaccinadjuvans om de aangeboren immuniteit te moduleren en de adaptieve immuniteit in vivo te verbeteren

[CN112569348A2021-03-30Herpes](#) zoster-vaccin

Prioriteit en verwante toepassingen

Prioritaire aanvragen (1)

AanvraagPrioriteit DatumInschrijving DatumTitel

[CN202011159718.7A2020-10-2620-10-26Preparatie](#) en toepassing van pachyman nano-adjuvans op basis van grafeenoxide en adjuvans/antigeen co-delivery vaccin

Aanvragen die aanspraak maken op voorrang (1)

Datum indiening aanvraagTitel

[CN202011159718.7A2020-10-26Preparatie](#) en toepassing van pachyman nano-adjuvans op basis van grafeenoxide en adjuvans/antigeen co-delivery vaccin

Wettelijke Gebeurtenissen

DateCodeTitleDescription

2020-12-18PB01Publication

2020-12-18PB01Publication

2021-01-05SE01Inwerkingtreding van het verzoek om een inhoudelijk onderzoek

2021-01-05SE01Inwerkingtreding van het verzoek om een inhoudelijk onderzoek

Concepten

[DownloadFilter](#) tabel

NamImageSectionsCountQuery wedstrijd

adjuvantstitel,claims,samenvatting,beschrijving1130.000
adjuvantitel,claims,samenvatting,beschrijving1050.000
antigeennaam,claims,samenvatting,beschrijving840.000



titel koolstof, vorderingen, samenvatting, beschrijving700.000
titel, claims, samenvatting, beschrijving700.000
vaccinnaam,claims,samenvatting,beschrijving640.000
bereidingswijzebenaming,samenvatting,beschrijving150.000
antigenstitel10.000
antigenstitel10.000



oxide(2-) titel10.000
antigenenclaims,samenvatting,beschrijving850.000
antigenenclaims,samenvatting,beschrijving850.000
carriereclaims,samenvatting,beschrijving200.000
materiaalclaims,samenvatting,beschrijving170.000
therapie door ultrageluidclaims,beschrijving160.000



waterschadeclaims,beschrijving150.000
Virusclaims,beschrijving140.000

2-chloor-3-methyloxiraanschattingen80.000



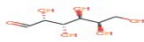
stikstof vorderingen,beschrijving80.000
deeltjesclaims,beschrijving80.000
bovendrijvende vorderingen,beschrijving70.000
chemische reactieclaims,beschrijving60.000
ontzoutingsclaims,beschrijving60.000
mixclaims,beschrijving50.000

natrium; 1-hydroxy-2,5-dioxopyrrolidine-3-sulfonaat
monosaccharidenclaims,beschrijving40.000
stikstofclaims,beschrijving40.000
steriele waterclaims,beschrijving40.000
roerendclaims,beschrijving40.000



eisen,beschrijving50.000

D-(+)-Galactose eisen,beschrijving30.000



D-Glucose vorderingen,beschrijving30.000



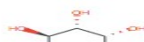
D-mannopyranose eisen,beschrijving30.000



Fucose vorderingen,beschrijving30.000

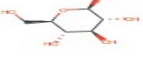


Fucose vorderingen,beschrijving30.000
glucoseclaims,beschrijving30.000
virologischeclaims,beschrijving30.000



α-D-galactose eisen,beschrijving30.000



 OC[C@H]1O[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O O=C1C=CC(=O)N1 ON1C(=O)CCC1=S vorderingen, beschrijving 30.000
Recombinant Proteins claims, beschrijving 20.000
Recombinant Proteins claims, beschrijving 20.000
therapeutische claims, beschrijving 20.000

3-(dimethylamino)propyliminomethylideen-ethylazanium; chloride
beweringen 10.000


ON1C(=O)CCC1=S claims 10.000
inactiveren van vorderingen 10.000
cellen abstract, beschrijving 220.000
Drugs abstract, beschrijving 130.000
verrijking abstract, beschrijving 120.000
drugs abstract, beschrijving 90.000
immuun effect abstract, beschrijving 70.000
immuuniteits abstract, beschrijving 40.000
humorale immuuniteit abstract, beschrijving 30.000
Biobeschikbaarheids abstract, beschrijving 20.000
biobeschikbaarheids abstract, beschrijving 20.000
cellulair abstract, beschrijving 20.000
dendritische cel maturatie abstract, beschrijving 20.000
ziekte-abstract, beschrijving 20.000
Lymfocyten abstract 10.000
drug effect abstract 10.000
reactietijd abstract 10.000

[Toon alle concepten uit de beschrijvingssectie](#)

[Over Feedback sturen Publieke Datasets Voorwaarden Privacybeleid](#)