



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111012904 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911148765.9

A61K 9/19(2006.01)

(22)申请日 2019.11.21

A61K 47/42(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务
外环路12号7层3号

(72)发明人 王云龙 蒋丹丹 李玉林 王继创
张怡青

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

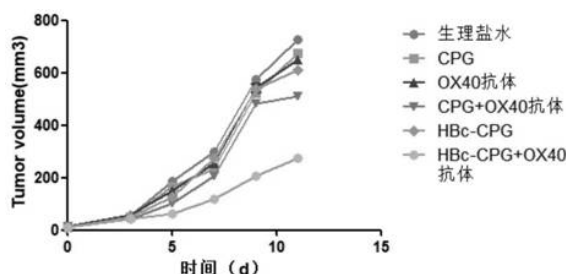
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种免疫复合物及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及肿瘤免疫治疗技术领域,具体涉及一种免疫复合物及其制备方法和用途。该免疫复合物包括OX40抗原或OX40抗体、乙肝核心病毒样颗粒和CPG;其中,CPG包封于所述乙肝核心病毒样颗粒内部,所述免疫复合物可用于抑制肿瘤,且安全性好,可显著减少CPG和OX40的用量。



1. 一种免疫复合物,其特征在于,包括OX40抗原或OX40抗体、乙肝核心病毒样颗粒和CPG,所述CPG包封于所述乙肝核心病毒样颗粒内部,所述免疫复合物可用于抑制肿瘤。

2. 根据权利要求1所述的免疫复合物,其特征在于,所述CPG为A类CPG或C类CPG,所述CPG为硫代或非硫代CPG,所述CPG用于激活TIR9信号通路;所述OX40抗体为OX40激动型抗体。

3. 根据权利要求1所述的免疫复合物,其特征在于,所述乙肝核心病毒样颗粒与所述OX40的质量比为1:50-20:1。

4. 根据权利要求1所述的免疫复合物,其特征在于,每个所述乙肝核心病毒样颗粒所包封的CPG的数量为50-3000个。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的免疫复合物,其特征在于,所述乙肝核心病毒样颗粒主要由HBc-144组成,所述HBc-144的第79和80位氨基酸被靶向肽取代。

6. 根据权利要求5所述的免疫复合物,其特征在于,所述靶向肽为RGD序列,所述RGD序列两端分别通过连接肽与所述HBc-144相连,所述连接肽的氨基酸序列为GGGGSGGGSGGGSGGGGS。

7. 根据权利要求6所述的免疫复合物,其特征在于,所述免疫复合物的剂型为水针剂或冻干剂。

8. 根据权利要求1-7中任意一项所述的免疫复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)通过基因工程的方法表达、纯化所述乙肝核心病毒样颗粒;(2)将所述CPG包封于所述乙肝核心病毒样颗粒内部;(3)向步骤(2)所得产品中加入OX40抗原或OX40抗体,即得所述免疫治疗复合物。

9. 根据权利要求8所述的免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)为:将所述乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温解聚2h;解聚结束后,加入CPG溶液,使混合液中CPG与所述乙肝核心病毒样颗粒的质量比为1:(1-10),冰浴2h;冰浴结束后,将上述混合液置于pH为7.4的含有150mm NaCl的20mM磷酸缓冲液中透析聚合;离心,取上清,并用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG,得到负载有CPG的乙肝核心病毒样颗粒;所述负载有CPG的乙肝核心病毒样颗粒与所述OX40抗原或抗体的质量比为1:50-20:1。

10. 根据权利要求1-7中任意一项所述的免疫复合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种免疫复合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤免疫治疗技术领域,具体涉及一种免疫复合物及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 含非甲基化的CPG二核苷酸寡脱氧核苷酸能直接激活B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、抗原递呈细胞等;间接激活T细胞、NK细胞;诱导以Th1型为主的免疫系统。作为一种高效低毒的免疫佐剂,在肿瘤、免疫缺陷性疾病、感染性疾病、过敏性疾病的治疗中有强大的潜在价值。大量关于CPG ODN刺激机体自身抗肿瘤免疫反应的研究表明,作为免疫佐剂,CPG ODN能增强某些单克隆抗体、肿瘤疫苗、化疗药物或放射治疗的抗肿瘤效应。单独应用CPG ODN,对包括淋巴瘤、恶性黑色素瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、直肠癌等都有显著的抑制作用。但CPG ODN带有负电荷、分子量过小,免疫细胞对其摄取率低,应用时需反复高剂量给药。而据报道,当CPG ODN每天给药60ug时会改变小鼠淋巴器官的结构和功能,严重是会出现脾肿大、淋巴结肿大和出血性腹水、多灶性肝坏死等副作用。近年来,纳米递送系统的发展为CPG的应用提供了更广阔的空间。通过纳米递送系统可将药物装在到纳米颗粒内部,通过增加其稳定性和提高其细胞吞噬率的方法增强其免疫刺激活性,增加应用价值和应用效果。

[0003] OX40是1型跨膜糖蛋白,近30年前作为一个激活的T细胞表达的细胞表面抗原得到报道。自发现以来,它被证实是T细胞和肿瘤坏死因子受体家族成员的共刺激分子,也称为“肿瘤坏死因子受体超家族成员4”。目前OX40只有一个已知配体,即OX40L (CD252),其表达在活化的APC细胞上,OX40与其配体的结合会共刺激T细胞增殖和细胞因子的产生。正是因为OX40对T细胞具有激活作用,其涉及多种疾病,可考虑将其用于肿瘤免疫治疗。但单独采用OX40用于抑制肿瘤时,其对肿瘤的抑制作用也较差。

发明内容

[0004] 本发明通过将CPG包封于乙肝核心病毒样颗粒内部,再加上OX40抗原或抗体制备得到了免疫复合物,该免疫复合物抑制肿瘤的效果显著优于CPG和OX40。

[0005] 本发明的免疫复合物采用如下技术方案:一种免疫复合物,包括OX40抗原或OX40抗体、乙肝核心病毒样颗粒和CPG,所述CPG包封于所述乙肝核心病毒样颗粒内部。

[0006] 优选的,所述CPG为A类CPG或C类CPG,所述CPG为硫代或非硫代CPG,所述CPG用于激活TIR9等信号通路;所述OX40抗体为OX40激动型抗体。

[0007] 优选的,所述乙肝核心病毒样颗粒与所述OX40的质量比为1:50-20:1。

[0008] 优选的,每个所述乙肝核心病毒样颗粒所包封的CPG的数量为50-3000个。

[0009] 优选的,所述乙肝核心病毒样颗粒主要由HBc-144组成,所述HBc-144的第79和80位氨基酸被靶向肽取代。

[0010] 优选的,所述靶向肽为RGD序列,所述RGD两端分别通过连接肽与所述HBc-144相连,所述连接肽的氨基酸序列为GGGSGGGSGGGSGGGGS。HBc-144上的优势表位抗原决定簇

被替换为靶向肽后,可具有靶向的功能。其中,靶向肽可为RGD等多个肿瘤表面标准物或T、B、NK细胞表面标志物,实现靶向功能。

[0011] 优选的,所述免疫复合物的剂型为水针剂或冻干剂。

[0012] 本发明的另一目的在于提供了如上述任意一项所述的免疫复合物的制备方法,具体技术方案为:包括以下步骤:(1)通过基因工程的方法表达、纯化所述乙肝核心病毒样颗粒;(2)将所述CPG包封于所述乙肝核心病毒样颗粒内部;(3)向步骤(2)所得产品中加入OX40抗原或OX40抗体,即得所述免疫治疗复合物。

[0013] 优选的,所述步骤(2)为:将所述乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温解聚2h;解聚结束后,加入CPG溶液,使混合液中CPG与所述乙肝核心病毒样颗粒的质量比为1:(1-10),冰浴2h;冰浴结束后,将上述混合液置于pH为7.4的含有150mm NaCl的20mM磷酸缓冲液中透析聚合;离心,取上清,并用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG,得到负载有CPG的乙肝核心病毒样颗粒。

[0014] 本发明的目的还在于提供如上述任意一项所述的免疫治疗复合物的用途。具体技术方案为:本发明的免疫复合物可用于制备抗肿瘤药物。例如,可将本发明的免疫复合物用于制备治疗肺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、宫颈癌、神经胶质细胞瘤、黑色素瘤、TLR9阳性肿瘤或TLR9阴性肿瘤中的任意一种的药物。

[0015] 本发明的有益效果是:本发明的免疫治疗复合物将CPG包封于乙肝病毒核心病毒样颗粒,并包括OX40抗原或抗体,可有效减小CPG的毒性,降低CPG和OX40用量。本发明的免疫治疗复合物在0.005mg-6.4mg间无剂量相关毒副作用,安全剂量范围广。

[0016] 本发明的免疫复合物通过将作为载体的HBc-144的主要免疫区域替换为靶向肽,将CPG负载于具有靶向功能的乙肝核心病毒样颗粒载体上实现功能化,通过被动靶向和肿瘤微环境的EPR效应,实现药物在肿瘤部位的富集,实现了高效低毒的递送效果。通过CPG介导TLR9阳性肿瘤细胞的自噬,导致肿瘤细胞的死亡,从而产生相应的治疗效果。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1为实施例1制备得到的乙肝核心病毒样颗粒的电镜图;

[0019] 图2为实施例1制备得到的乙肝核心病毒样颗粒的粒度分布图;

[0020] 图3为本发明的免疫复合物的安全性评估结果图;

[0021] 图4为本发明的免疫复合物的抑瘤实验效果图。

具体实施方式

[0022] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0023] 实施例1 表达、纯化乙肝核心病毒样颗粒

[0024] 1.1 通过NCBI数据库下载乙肝病毒抗原 (HBc) 序列 (NCBI登录号为ABC97614.1), 得到HBc前144个氨基酸HBc-144序列, 结合大肠杆菌密码子偏爱性, 设计编码HBc-144的核苷酸序列; 将编码RGD序列的基因序列插入到编码HBc-144主要免疫区第78-79位置处的氨基酸的基因序列之间, 并在编码RGD序列的基因序列两端与其插入到编码HBc-144的基因序列之间分别连接上编码连接肽 (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG) 的基因序列; 在编码HBc-144氨基酸的基因序列的尾部 (C端末尾) 插入6个组氨酸的基因序列。上述编码本发明的乙肝核心病毒样颗粒的核苷酸序列由上海杰瑞生物技术有限公司按照所提供的乙肝核心病毒样颗粒的氨基酸序列设计合成, 并将合成的核苷酸序列连接于质粒 (pET21a)。其中, 乙肝核心病毒样颗粒的氨基酸序列为MDIDHYKEFG ASVELLSFLP SDFFPSIRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL CWGELMNLAT WVGSNLEDGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGRDSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SRELVVGYVN VNMGLKIRQI LWFHISCLTF GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPHHHHHH。

[0025] 1.2 转化质粒:

[0026] 1.2.1. 取100 μ l感受态细胞于冰浴上融化。

[0027] 1.2.2. 加入2 μ l纯质粒或连接产物, (枪头蘸一下即可) 轻轻吹打混匀, 冰浴30min。

[0028] 1.2.3. 将管放入42 $^{\circ}$ C (温度计测温度) 水浴中热激90秒

[0029] 1.2.4. 立即放入冰浴中2min (以上都可以)。

[0030] 1.2.5. 加入800 μ l LB液体培养基 (不加抗生素) 轻轻混匀, 于37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上 200rpm温育45Min。

[0031] 照台子, 擦涂布棒

[0032] 1.2.6. 将菌液4000rpm/min离心5min, 留300 μ l上清将菌体轻轻打散, 拿三个平板分别涂50 μ l、100 μ l、150 μ l菌液于含抗生素 (1:1000, AMP) 的琼脂平板表面;

[0033] 1.2.7. 平板于37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜 (12~16h)。

[0034] 1.3 目的蛋白 (乙肝核心病毒样颗粒) 的诱导表达: (1) 挑取含表达载体的BL21 (DE3) 单菌落, 在LB培养基 (含100 μ g/mL氨苄青霉素) 中37 $^{\circ}$ C, 255rpm培养至对数期;

[0035] (2) 菌液与培养基按1:1000的比例稀释, 37 $^{\circ}$ C, 255rpm培养过夜, 使其OD600值达到0.5~0.6; 按照1:1将菌种稀释至新鲜培养基, 37 $^{\circ}$ C, 255rpm培养2h;

[0036] (3) 37 $^{\circ}$ C温度下诱导, IPTG终浓度为1mM;

[0037] (4) 诱导4h后, 取出1mL菌液, 12,000rpm离心1min后去上清

[0038] 1.4 硫酸铵沉淀初纯目的蛋白 (乙肝核心病毒样颗粒): (1) 将诱导结束的菌液以4000rpm离心10min后收集菌体, 用10mM Tris、0.5% Triton pH8.0缓冲溶液将菌体吹起;

[0039] (2) 用超声破碎的方法将菌体破碎, 功率300W共超声30min将菌体破碎, 此时菌液成粘稠半透明状, 12000rpm离心10min, 收集上清 (目的蛋白在上清液中, 为可溶性蛋白);

[0040] (3) 将上清液分装在1.5ml离心管中, 每管500 μ L, 分别用10%、20%、30%、40%、50%的饱和硫酸铵溶液进行蛋白盐析, 在4 $^{\circ}$ C下盐析30min, 12,000rpm离心10min, 收集沉淀, 每个浓度的沉淀取样品进行SDS-PAGE检测融合蛋白分布。

[0041] 1.5 DEAE离子交换色谱纯化

[0042] (1) 基液平衡柱子: 用10倍柱体积含10mM Tris-Cl (pH8.0) 的基液冲洗柱子, 至流出液的pH与基液pH一致。

[0043] (2) 上样:将收集到的样品即硫酸铵沉淀透析后的蛋白粗提取物以3mL/min的流速上样。

[0044] (3) 上样洗脱:用5个柱体积的基液冲洗层析柱,至紫外检测仪的示数重新回到基线。

[0045] (4) 洗脱液I洗脱:用5倍柱体积的洗脱液I(含10mM Tris-Cl (pH8.0)、50mM NaCl)冲洗柱子,收集洗脱峰。

[0046] (5) 洗脱液II洗脱:用5倍柱体积的洗脱液II(含10mM Tris-Cl (pH8.0)、100mMNaCl)冲洗柱子,收集洗脱峰。

[0047] (6) 洗脱液III洗脱:用5倍柱体积的洗脱液III(含10mM Tris-Cl (pH8.0)、200mMNaCl)冲洗柱子,收集洗脱峰。

[0048] (7) 洗脱液III洗脱:用5倍柱体积的洗脱液IV(含10mM Tris-Cl (pH8.0)、300mMNaCl)冲洗柱子,收集洗脱峰。

[0049] (8) 洗脱液III洗脱:用5倍柱体积的洗脱液IV(含10mM Tris-Cl (pH8.0)、400mM NaCl)冲洗柱子,收集洗脱峰。

[0050] 1.6 蛋白透析及浓缩

[0051] (1) 将盛有蛋白溶液的透析袋放入预冷好的透析液中,放在4℃冰箱进行透析;

[0052] (2) 整个透析过程换4次透析液,直至透析完全;

[0053] (3) 将透析完全的蛋白溶液放入新的大烧杯中,加聚乙二醇粉末覆盖在透析袋上,袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去,将烧杯置于4℃冰箱进行浓缩;

[0054] (4) 在浓缩过程中,少量多次加入干燥的聚乙二醇粉末,以增加浓缩速度,聚乙二醇被水饱和后要更换新的直至达到所需要的浓缩体积;

[0055] (5) 浓缩结束后,用蒸馏水将透析袋冲洗干净,将浓缩的蛋白溶液取出,即得纯化后的目的蛋白(乙肝核心病毒样颗粒)。

[0056] 经SDS-PAGE鉴定得到乙肝核心病毒样颗粒纯度大于98%;经透射电镜(见图1)和粒度仪分析(见图2)得到的乙肝核心病毒样颗粒均一、稳定。

[0057] 实施例2 制备本发明的免疫复合物

[0058] 2.1 含非甲基化CPG二核苷酸寡脱氧核苷酸的装载

[0059] (1) 将10mgCPG粉末溶于10ml的去离子水中,制成浓度为1mg/ml的CPG储备液,存放于-20度,备用。

[0060] (2) 取5mg的乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温2h,进行解聚。然后加入上述CPG储备液,使CPG与乙肝核心病毒样颗粒的质量为1:1-1:10。加入后冰浴2h后在含有150mm氯化钠的20mm磷酸缓冲液中(PH7.4)透析聚合。

[0061] (3) 将上述透析液进行10000rpm离心10min。上清进一步用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG。通过紫外检测仪检测280nm吸光度收集的穿柱的样品,得到负载CPG的乙肝核心病毒样颗粒(HBc-VLPs/CPG)。

[0062] 2.2 向上述制备得到的HBc-VLPs/CPG与OX40按照质量比为1:50-20:1进行混合,混合均匀后即制备得到本发明的免疫复合物(HBc-VLPs/CPG+OX40)。

[0063] 实施例3 制备本发明的免疫复合物

[0064] 3.1 含非甲基化CPG二核苷酸寡脱氧核苷酸的装载

[0065] (1) 将10mgCPG粉末溶于10ml的去离子水中,制成浓度为1mg/ml的CPG储备液,存放于-20度,备用。

[0066] (2) 取5mg的乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温2h,进行解聚。然后加入上述CPG储备液,使CPG与乙肝核心病毒样颗粒的质量为1:10。加入后冰浴2h后在含有150mm氯化钠的20mm磷酸缓冲液中 (PH7.4) 透析聚合。

[0067] (3) 将上述透析液进行10000rpm离心10min。上清进一步用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG。通过紫外检测仪检测280nm吸光度收集的穿柱的样品,得到负载CPG的乙肝核心病毒样颗粒 (HBc-VLPs/CPG)。

[0068] 3.2 向上述制备得到的HBc-VLPs/CPG与OX40按照质量比为20:1进行混合,混合均匀后即制备得到本发明的免疫复合物 (HBc-VLPs/CPG+OX40)。

[0069] 实施例4 制备本发明的免疫复合物

[0070] 4.1 含非甲基化CPG二核苷酸寡脱氧核苷酸的装载

[0071] (1) 将10mgCPG粉末溶于10ml的去离子水中,制成浓度为1mg/ml的CPG储备液,存放于-20度,备用。

[0072] (2) 取5mg的乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温2h,进行解聚。然后加入上述CPG储备液,使CPG与乙肝核心病毒样颗粒的质量为1:5。加入后冰浴2h后在含有150mm氯化钠的20mm磷酸缓冲液中 (PH7.4) 透析聚合。

[0073] (3) 将上述透析液进行10000rpm离心10min。上清进一步用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG。通过紫外检测仪检测280nm吸光度收集的穿柱的样品,得到负载CPG的乙肝核心病毒样颗粒 (HBc-VLPs/CPG)。

[0074] 4.2 向上述制备得到的HBc-VLPs/CPG与OX40按照质量比为20:1进行混合,混合均匀后即制备得到本发明的免疫复合物 (HBc-VLPs/CPG+OX40)。

[0075] 实施例5 制备免疫复合物

[0076] 5.1 含非甲基化CPG二核苷酸寡脱氧核苷酸的装载

[0077] (1) 将10mgCPG粉末溶于10ml的去离子水中,制成浓度为1mg/ml的CPG储备液,存放于-20度,备用。

[0078] (2) 取5mg的乙肝核心病毒样颗粒加入3M尿素中,室温2h,进行解聚。然后加入上述CPG储备液,使CPG与乙肝核心病毒样颗粒的质量为1:10。加入后冰浴2h后在含有150mm氯化钠的20mm磷酸缓冲液中 (PH7.4) 透析聚合。

[0079] (3) 将上述透析液进行10000rpm离心10min。上清进一步用DEAE stream Flow层析柱去除游离的CPG。通过紫外检测仪检测280nm吸光度收集的穿柱的样品,得到负载CPG的乙肝核心病毒样颗粒 (HBc-VLPs/CPG)。

[0080] 5.2 向上述制备得到的HBc-VLPs/CPG与OX40按照质量比为20:1进行混合,混合均匀后即制备得到本发明的免疫复合物 (HBc-VLPs/CPG+OX40)。

[0081] 实施例6 评估HBC-VLPs/CPG+OX40抗体药物的安全性

[0082] 将4T1乳腺癌细胞以 5×10^6 细胞的剂量通过皮下途径植入8至10周龄雌性BALB/c小鼠中,分别种植于腹部左右两侧,接种量为50 μ l,待肿瘤生长至40-50mm³,将小鼠随机分为PBS组、HBC-VLPs/CPG组 (CPG用量为50 μ g)、HBC-VLPs/CPG+OX40抗体 (CPG用量为50 μ g, OX40用量为4 μ g),每组6只鼠。采用瘤内注射的方法进行注射,每次注射的剂量为50 μ l。隔天

给药1次,共给药3次。当PBS对照组瘤体体积达到 1000mm^3 后分别取小鼠的心、肝、脾、肺、肾进行HE染色,同时取各组小鼠的血液进行生化检测,AST、ALT、肌酐、尿素氮均在正常范围(见图3)。实验结果证明,HBC-VLPs/CPG+OX40抗体药物对小鼠的各脏器未造成损伤。

[0083] 实施例7 HBC-VLPs/CPG+OX40抗体药物对DC细胞的激活能力评估

[0084] 从6-8周龄雄性C57小鼠股骨及胫骨获取骨髓干细胞,用含有M-CSF的1640培养基培育5天获得未成熟的DC细胞后种植在24孔板中,分为PBS组、HBC-VLPs/CPG(CPG的用量为 $50\mu\text{g}$)、HBC-VLPs/CPG+OX40组(CPG用量为 $50\mu\text{g}$,OX40用量为 $4\mu\text{g}$),各组取 $40\mu\text{l}$ 对应的溶液与未成熟的DC细胞共孵育,刺激DC细胞成熟,24小时后利用流式细胞术检测CD11c、CD80、CD86细胞激活情况,实验结果表明:PBS对DC细胞成熟作用不明显,HBC-VLPs/CPG和具有稳定装载的新型HBC-VLPs/CPG+OX40抗体药物可以促进DC的成熟。

[0085] 实施例8 采用瘤内注射评估HBC-VLPs/CPG+OX40抗体的抑瘤效果

[0086] 构建荷瘤小鼠模型并随机分成4组,当肿瘤达到最大直径5mm至7mm时开始治疗。第一组为生理盐水组、第二组为CPG组($50\mu\text{g}$)、第三组为OX40抗体组($4\mu\text{g}$)、第四组为CPG+OX40抗体组(CPG: $50\mu\text{g}$,OX40: $4\mu\text{g}$)、第五组为HBC-VLPs/CPG组(CPG: $50\mu\text{g}$)、第六组为HBC-VLPs/CPG+OX40抗体(CPG: $50\mu\text{g}$,OX40: $4\mu\text{g}$)。隔天给药1次,共给药3次,当各组小鼠瘤体体积达到 1000mm^3 时记录小鼠死亡情况,进行生存分析(结果见图4)。

[0087] 实施例9 安全剂量检测

[0088] 分别向荷瘤小鼠模型皮下注射0.005mg、0.1mg、1mg、2mg、4mg和6.4mg本发明实施例3-5中任意一项制备得到的HBC-VLPs/CPG+OX40抗体,实验过程中均未出现小鼠死亡、过敏等现象,表明本发明的HBC-VLPs/CPG+OX40抗体在0.005mg-6.4mg剂量范围内安全。

[0089] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心

<120> 一种免疫复合物及其制备方法和用途

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Met Asp Ile Asp His Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50 55 60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly

65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

85 90 95

Gly Ser Arg Gly Asp Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Leu Val Val Gly

115 120 125

Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Ile Leu Trp Phe

130 135 140

His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu

145					150					155					160
Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro
					165					170					175
Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	His	His	His	His	His	His	His
				180						185					190

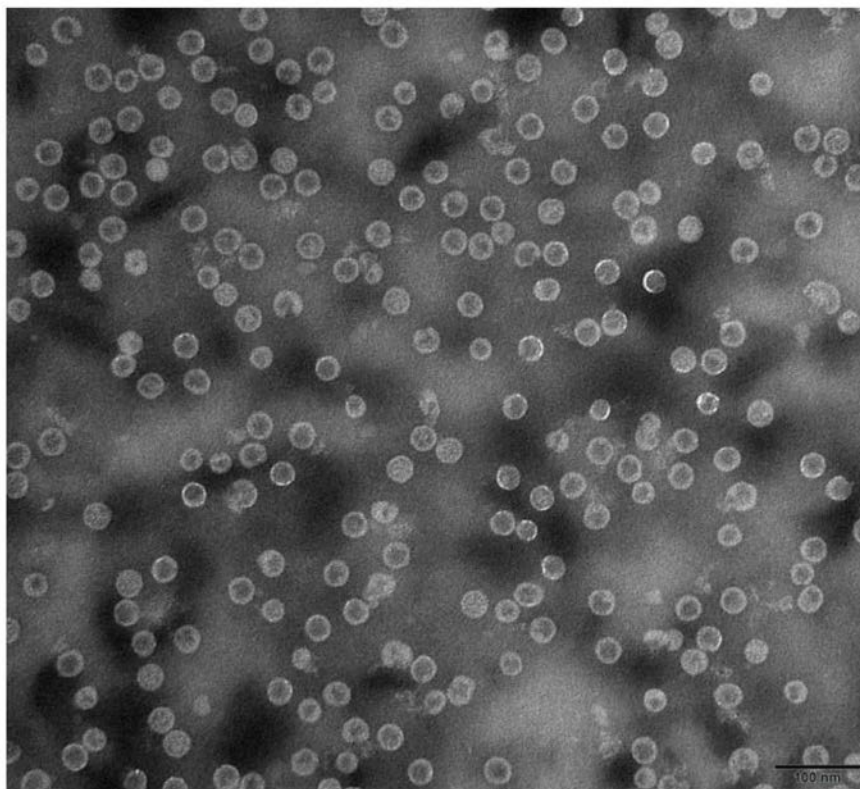


图1

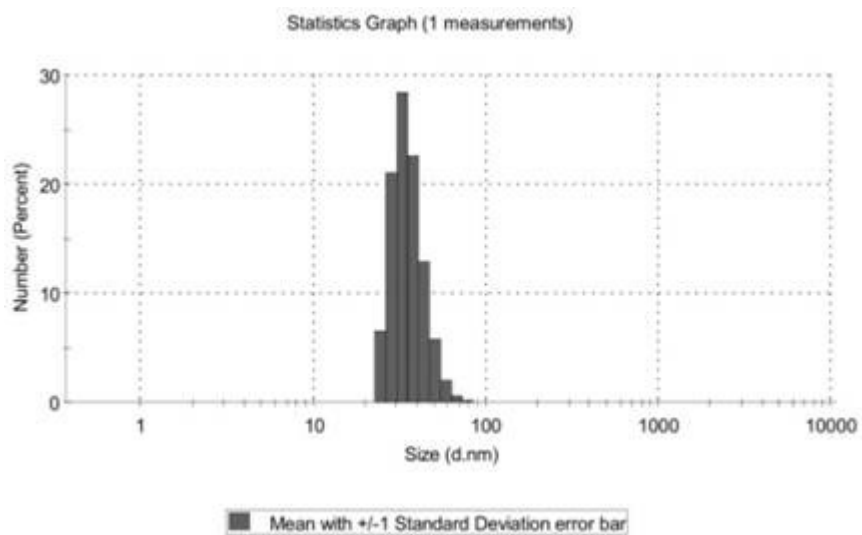


图2

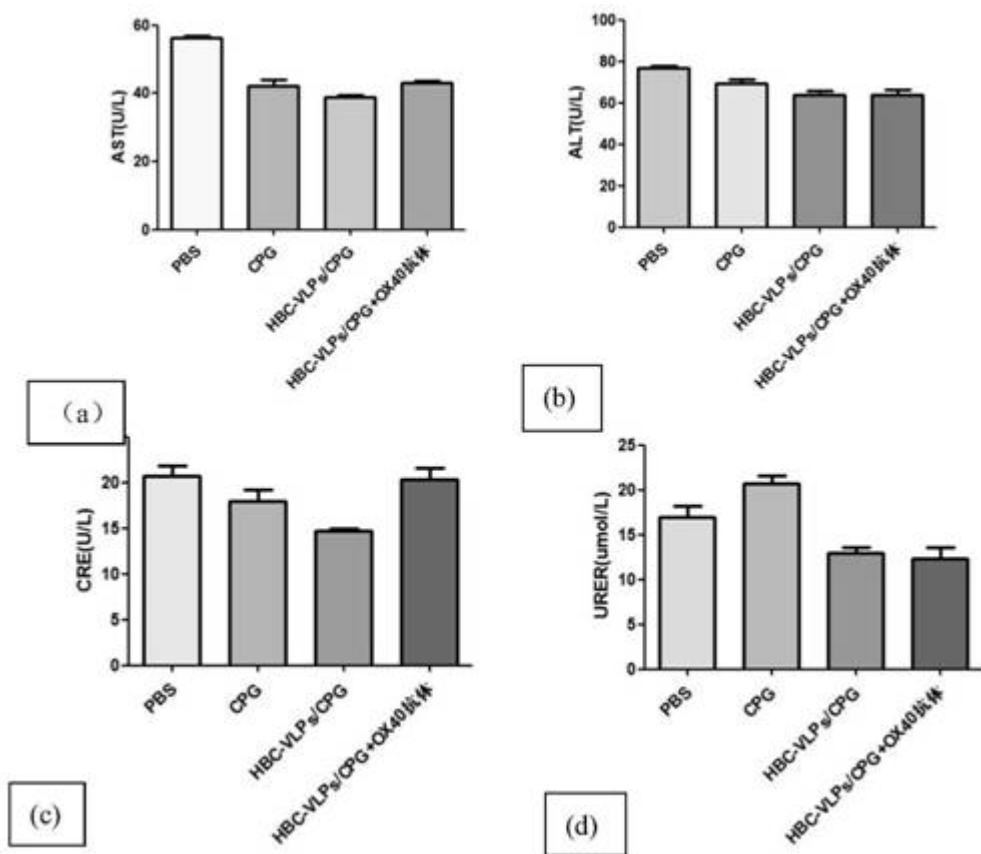


图3

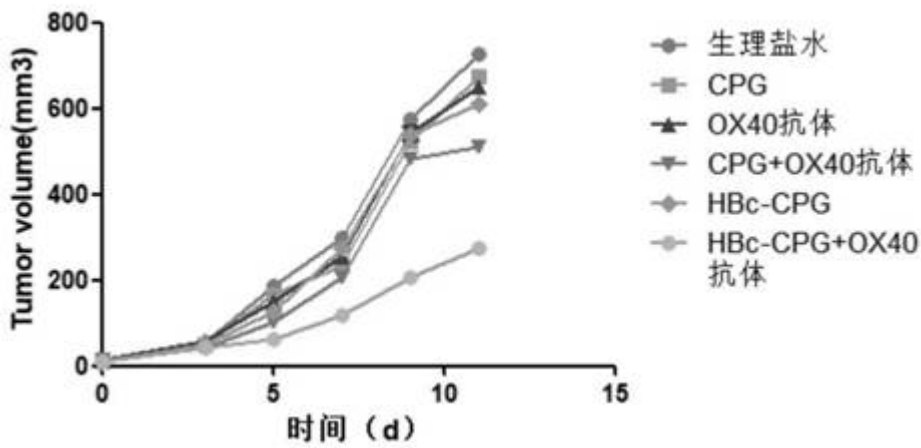


图4