

一种铝锰复合纳米晶及其制备方法和应用

本申请要求于 2021 年 12 月 28 日提交中国专利局、申请号为 202111633153.6、发明名称为“一种铝锰复合纳米晶及其制备方法和应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5

技术领域

本申请属于疫苗技术领域，尤其涉及一种铝锰复合纳米晶及其制备方法和应用。

10 背景技术

在现有疫苗佐剂中，铝盐佐剂是目前使用最多、最安全的免疫佐剂，包括硫酸铝钾、磷酸铝以及氢氧化铝。其中氢氧化铝佐剂应用最为广泛。目前对于铝佐剂刺激免疫的机制解释主要有“储存库”效应，促吞噬作用，以及促炎通路 NLRP3 的激活等。商品氢氧化铝佐剂通常为弱晶型的勃姆石，大小在 1~10 μm 之间，一般激活体液免疫而很少有 T 细胞介导的免疫，这与氢氧化铝佐剂吸附抗原呈递方式有关。微米级氢氧化铝佐剂吸附抗原后时，铝佐剂一般与抗原呈递细胞如树突状细胞（DC 细胞）细胞膜结合，诱导脂筏的形成，引起下游通路的激活，未能干扰其呈递抗原在细胞内的命运，抗原则通过溶酶体途径处理后通过主要的组织相容性复合物 II(MHC-II)呈现，而不是通过主要的组织相容性复合物 I(MHC-I)的交叉呈递。但现在的最新研究表明，为了应对更普适性的病症需求，不仅仅需要引起体液免疫产生抗体中和病原微生物，也同样需要 T 细胞介导免疫来清除病毒、细菌或异常生理反应，并产生记忆 T 细胞来预防保护机体。所以，我们需要寻求新型的铝佐剂配方或者是复合佐剂满足预防性疫苗保护的需求。

25 由于铝佐剂长期使用安全性及便捷性优势，以及其作为抗原、分子佐剂载体的便利，以铝盐和分子佐剂复合形成的新型佐剂逐渐成为新型佐剂开发的主要趋势，如铝盐与 3M-052、CpG、TLR 激动剂形成的复合佐剂对于提升疫苗的抗体滴度，及细胞免疫能力展现出更好的优势。然而，分子佐剂的预先制备、与铝佐剂复配工艺过程步骤多，极易影响新型佐剂的效力。因此，开发具备铝

佐剂制备便捷、载体和抗原缓释以及高安全性特点，并能弥补铝佐剂在细胞免疫缺失方面不足，同时制备、生产便捷的新型复合佐剂，将更具实用价值。

发明内容

5 有鉴于此，本申请提供了一种铝锰复合纳米晶及其制备方法和应用，能有效解决现有铝佐剂无法同时激活体液免疫和细胞免疫的技术问题。

本申请第一方面提供了一种铝锰复合纳米晶的制备方法，包括：

步骤1、铝盐溶液、锰盐溶液和阴离子助剂溶液混合得混合物，调节所述混合物的pH至5.5~8.5；

10 步骤2、将所述混合物加热反应，将得到的固体反应物洗涤后制得铝锰复合纳米晶。

具体的，步骤1中，采用酸碱调节剂调节所述混合物的pH，所述酸碱调节剂可以为碱溶液或/和酸溶液，所述碱溶液和所述酸溶液为现有常规调节pH的溶液，所述碱溶液的浓度为0.01~1 mol/L，优选浓度为0.05~0.6 mol/L；所述碱
15 溶液可以为氢氧化钠的水溶液、氢氧化钾的水溶液、氨水、碳酸氢钠的水溶液和磷酸钠的水溶液中的一种或多种；所述氢氧化钠的水溶液的浓度为0.05~1 mol/L，优选的所述氢氧化钠的水溶液的浓度为0.3~0.6 mol/L。

具体的，调节所述混合物的pH，在此范围内得到的铝锰复合纳米晶晶型稳定，灭菌不会改变。

20 具体的，所述和磷酸钠的水溶液的磷酸盐选自 Na_2HPO_4 和/或 Na_3PO_4 。

具体的，步骤1中，所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的溶质之和与所述碱溶液的溶质的摩尔比为1: (1~6)，例如所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的溶质之和与所述碱溶液的NaOH的摩尔比为1: (1~6)；优选的，所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的
25 溶质之和与所述碱溶液的溶质的摩尔比为1: (2~4)，例如所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的溶质之和与所述碱溶液的NaOH的摩尔比为1: (2~4)。

具体的，步骤1中，所述混合物的pH值为5.5-8.0，优选地，所述混合物的pH值为6.0-7.0。

具体的，步骤1中，所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的混合方法为边滴加溶液边搅拌的混合方式，所述铝盐溶液、所述锰盐溶液和所述阴离子助剂溶液的滴加速度为2-15 mL/分钟，优选为3-8 mL/分钟，所述混合时搅拌速度为50-1000 rpm；优选为300-800 rpm；所述混合的搅拌时间为1.5~10 h，优选的，所述搅拌时间为1~5 h。

具体的，采用碱溶液调节所述混合物pH值时，所述碱溶液滴加速度为0.5-10mL/分钟，优选为1-4 mL/分钟。

具体的，步骤2中采用NaCl溶液进行离心洗涤，除去未反应的各种游离离子以及解吸附的阴离子助剂，并最终用NaCl溶液重新溶解分散；采用湿热灭菌121 °C下灭菌30 -60 分钟后分装制得铝锰复合纳米晶。铝锰复合纳米晶可冷藏(2 ~ 8 °C)储存。其中，所述离心洗涤的离心转速为2000-10000 g，所述离心洗涤的离心时间1~100 分钟，所述离心洗涤的洗涤次数为2-5次；优选的，所述离心洗涤的离心转速为4000-8000 g，所述离心洗涤的离心时间5-20 分钟，所述离心洗涤的洗涤次数为2-3次。

具体的，所述用NaCl溶液的浓度为0.1 % ~ 1.5 % ，优选地，所述NaCl溶液的浓度为0.15 % ~ 0.8 %。

另一实施例中，所述铝盐溶液的溶质选自氯化铝、硫酸铝、硝酸铝和乙酸铝中的一种或多种；所述铝盐溶液的溶剂选自醋酸钠溶液、生理盐水、水和乙醇中的一种或多种。具体的，所述铝盐溶液的溶剂的浓度为0.01~1 mol/L，如所述醋酸钠溶液的浓度为0.03~0.07 mol/L。

另一实施例中，所述锰盐溶液的溶质选自氯化锰、硫酸锰、硝酸锰、乙酸锰中的一种或多种；所述锰盐溶液的溶剂选自水、生理盐水和乙醇中的一种或多种。

另一实施例中，所述阴离子助剂溶液的溶质选自有机酸盐或/和氨基酸；所述阴离子助剂溶液的溶剂选自水、生理盐水和乙醇中的一种或多种。

具体的，所述阴离子助剂溶液可充分完成阴离子助剂与金属离子(铝和锰)的配合作用，混合物中预沉淀物通过加热处理，促进混合物中预沉淀物均匀生长、促进结晶形成，提升灭菌稳定性。经离心沉淀、洗涤、灭菌获得铝锰复合纳米晶。

具体的，所述阴离子助剂为含有多羟基、羧基结构、含磷元素的有机物，本申请的阴离子助剂与铝离子和锰离子均可形成较为稳定的配合物，是较为理想的辅助剂，用于稳定和调控铝锰复合纳米晶的粒径大小和分布。

另一实施例中，所述有机酸盐选自柠檬酸或/和水杨酸；所述氨基酸选自
5 半胱氨酸、胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸和谷氨酸中的一种或多种。

另一实施例中，所述混合物中，所述铝盐溶液的铝元素与所述锰盐溶液的锰元素的摩尔比为1: (0.05~1)；优选的，所述铝盐溶液的铝元素与所述锰盐溶液的锰元素的摩尔比为1: (0.1~0.5)；所述阴离子助剂的浓度与金属离子总浓度的比为 (0.1~10): 1，优选的，所述阴离子助剂的浓度与金属离子总浓度的比为 (0.3~3): 1；所述金属离子总浓度为所述铝盐溶液和所述锰盐溶液的浓度和。
10

具体的，所述铝盐溶液的浓度为0.01~1 mol/L，优选浓度为0.03~0.07 mol/L；所述锰盐溶液的浓度为0.001~1 mol/L，优选浓度为0.003-0.05 mol/L；阴离子助剂溶液的浓度为0.01~0.5 mol/L，优选浓度为0.05-0.5 mol/L。

另一实施例中，步骤2中，所述加热反应为60℃~130℃，所述加热反应的时间为0.5~20 h。
15

本申请第二方面提供了一种铝锰复合纳米晶，包括：所述制备方法制得的铝锰复合纳米晶。

具体的，所述铝锰复合纳米晶灭菌前后的pH值为5.5~8.5；所述铝锰复合纳米晶的粒径为20~5000 nm，其粒径保持稳定；所述铝锰复合纳米晶对牛血清白蛋白的吸附率大于1.6 mg，得到的铝锰复合纳米晶，该产品具有优异的分散性和稳定性。
20

本申请第三方面公开了所述制备方法制得的铝锰复合纳米晶和所述铝锰复合纳米晶在制备疫苗佐剂、免疫增强剂、药物组合物、药物递送载体或免疫原性组合物中的应用。
25

具体的，本申请所提供的铝锰复合纳米晶在制备用于改善固有免疫和/或适应性免疫的疫苗佐剂及免疫增强剂用途。在一些实施方案中，所述铝锰复合纳米晶通过刺激I型干扰素、 γ 干扰素表达来改善固有免疫和/或适应性免疫，调控免疫平衡。在又一些实施方案中，铝锰复合纳米晶能够促进抗原递呈，提

升抗体产生水平来改善固有免疫和/或适应性免疫。在又一些实施方案中，铝锰复合纳米晶通过与免疫调剂联合、组合或者序贯施用，促进多免疫通路激活，来改善固有免疫和/或适应性免疫。本申请的铝锰复合纳米晶可作为免疫增强剂，增强免疫是用于肿瘤预防和/或治疗疾病，如细菌感染，真菌感染、病毒感染、寄生虫感染、肿瘤、自身免疫病。

5 此外，本申请的铝锰复合纳米晶可作为药物组合物，以治疗自身免疫性疾病，其中所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、I型糖尿病、银屑病、系统性红斑狼疮和多发性硬化。更具体的，本申请的铝锰复合纳米晶作为药物组合物的成分时，药物组合物包括铝锰复合纳米晶与预防/治疗剂，两者一起施用与需要的对象，可通过共混、序贯施用及修饰改性方式组合小分子、多肽、抗体等免疫调节剂、抗体药物、多肽类药物。

10 具体的，所述药物递送载体中，包括铝锰纳米晶与液体、固体或者是常用药物助剂和/或任选的一种或多种辅助成分结合在一起的组合物。药物助剂为药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、惰性稀释剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。

15 本申请第四方面提供了一种抗肿瘤的组合物，包括：所述铝锰复合纳米晶和治疗抗肿瘤疾病的药物。

20 具体的，所述抗肿瘤的组合物在治疗实体瘤和非实体瘤中的应用；所述实体瘤为肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、口腔癌、食管癌、恶性黑色素瘤、头颈癌、肉瘤、胆管癌、膀胱癌、肾癌、结直肠癌、胎盘绒毛膜癌、宫颈癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫癌和白血病等；所述非实体瘤为胶质瘤、血液瘤等。

25 具体的，所述治疗抗肿瘤疾病的药物为抗肿瘤的小分子、多肽及抗体类药物，如PD-L1抗体、曲妥单抗、二甲双胍（Met）、紫杉醇、阿霉素、顺铂、门冬酰胺酶、利妥昔单抗、吉非替尼、曲谱瑞林、多西他赛、多柔比星、氟尿嘧啶中的一种或多种。

本申请第五方面提供了一种疫苗组合物，包括：抗原和所述铝锰复合纳米晶。

具体的，所述疫苗组合物为蛋白疫苗或/和灭活疫苗，例如流感疫苗株重

组抗原、乙肝重组抗原；所述疫苗组合物也可水痘带状疱疹病毒重组蛋白疫苗、新冠亚单位蛋白疫苗或新冠灭活疫苗。

具体的，所述疫苗组合物中的抗原源自病毒、细菌、寄生虫及肿瘤新抗原。例如所述病毒选自：DNA病毒和RNA病毒，优选地，所述病毒选自：冠状病毒科、疱疹病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、小RNA病毒科、嗜肝DNA病毒科、黄病毒科、乳头瘤病毒科、痘病毒科、和逆转录病毒科，更优选地，所述病毒选自：新型冠状病毒、流感病毒、单纯疱疹病毒、水疱性口炎病毒、牛痘病毒、HIV或HBV；例如所述细菌选自革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，优选地，所述细菌选自肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、沙门氏菌、脑膜炎双球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、产酸克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、绿脓假单胞菌和波美不动杆菌、结核杆菌或幽门螺杆菌。

更具体地，所述疫苗组合物中的抗原源自流感病毒、 α 或 β 冠状病毒（如新冠病毒及变异株）肝炎病毒（如甲肝病毒、乙肝病毒）、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、HPV病毒、脑炎病毒（如乙型脑炎病毒）、腮腺炎病毒、风疹病毒、破伤风杆菌、百日咳杆菌、白喉杆菌、麻风杆菌、结核杆菌、脑膜炎双球菌、肺炎双球菌及其任意组合的灭活病毒/细菌形式、减毒活病毒/细菌形式及亚单位蛋白、重组蛋白或嵌合蛋白等多种形式的抗原。

具体的，本申请所用的水可以为超纯水或/和注射水。

20 锰是人体生长、代谢、神经元功能和抗氧化防御过程中所必需的微量元素。将铝和锰两种无机元素结合在一起形成复合佐剂既能保留铝佐剂自身“储存库”效应，促吞噬作用，以及促炎通路NLRP3的激活作用，也能补充Mn²⁺介导的固有免疫和适应性免疫，满足体液免疫和细胞免疫同时抵御传染性病原体的需求。同时，本申请的制备方法可制得尺寸均一、形貌可控的铝锰复合纳米晶。

25 因此，本申请旨在公开一种工艺简单、成分均一、结构稳定，灭菌后可长期保存、使用便捷的可作为疫苗佐剂的铝锰复合纳米晶，该铝锰复合纳米晶能够同时激活体液免疫和细胞免疫，为传染性细菌或病毒的预防提供更好的免疫屏障。

附图说明

- 图 1 为本申请实施例 1 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-001)的透射电镜图;
图 2 为本申请实施例 2 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-002)的透射电镜图;
图 3 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-003)的透射电镜图;
5 图 4 为本申请实施例 1~3 提供的铝锰复合纳米晶的 XRD 结果;
图 5 为本申请实施例 1~3 提供的不同比例铝锰复合纳米晶的 DC 激活效果;
图 6 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-003)或商品铝佐剂与抗原结合后 DC 细胞内吞荧光成像图像;
10 图 7 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-003)或商品铝佐剂与 OVA 抗原二者联用肌肉注射小鼠后, 抗体滴度检测结果;
图 8 为本申请实施例 1~3 提供的铝锰复合纳米晶配伍新冠 RBD 重组蛋白抗原免疫后, 小鼠的抗体滴度结果;
图 9 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶(AlMn-003)或商品铝佐剂
15 Alum 与 H1N1 HA 抗原配伍后, 肌肉注射小鼠后, 抗体滴度检测结果;
图 10 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与 H1N1 HA 抗原配伍免疫后 56d, 小鼠脾细胞 IFN- γ 表达结果;
图 11 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 配伍 H1N1-HA 抗原免疫后 56d, 小鼠的脾中细胞因子结果;
20 图 12 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 配伍 H1N1-HA 抗原免疫后 56d, 小鼠的脾和肺中记忆 B 细胞比例;
图 13 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 配伍 H1N1-HA 抗原免疫后 56d, 小鼠的脾中记忆 T 细胞比例。
图 14 为本申请实施例 1 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-001 作为免疫增效
25 剂增强机体抗肿瘤效果, 三幅图从左往右的图分别为图 14A、图 14B 和图 14C;
图 15 为本申请实施例 2 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-002 作为免疫增效剂增强机体抗远端肿瘤效果;
图 16 为本申请实施例 3 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 作为免疫增效剂增强机体抗肝癌效果;

图 17 为本申请实施例 1 提供的铝锰复合纳米晶 AlMn-001 作为免疫增效剂增强机体抗转移瘤效果。

具体实施方式

5 本申请提供了一种铝锰复合纳米晶及其制备方法和应用,用于解决现有技术中现有铝佐剂无法同时激活体液免疫和细胞免疫的技术缺陷。

下面将对本申请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申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,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,都属于本申请保护的范围。

其中,以下实施例所用原料或试剂均为市售或自制。

实施例 1

本申请实施例提供了一种铝锰复合纳米晶 AlMn-001,具体制备方法包括:

15 (1)称取 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 0.01 mol/L NaAc 中,配制成铝离子含量 1 mol/L 的铝盐溶液。称取 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于注射用水中,配制成锰离子含量 0.1 mol/L 的锰盐溶液。称取水杨酸溶于纯净水中,配置成 0.05mol/L 的阴离子助剂溶液。称取 NaOH 用注射用水进行溶解,配制成 NaOH 含量为 0.1 mol/L 的碱溶液。

20 (2)先将铝盐溶液和锰盐溶液等体积混合后得混合液,取 30mL 混合液以 10mL/分钟的速度加入到 50mL 的水杨酸溶液中,并在 1000rpm 的速度下,搅拌 3 小时,使配合反应充分发生,得混合物。

(3)在室温下转速调整至 600 rpm 搅拌,以 12 mL/分钟的速度加入 30mL 氨水溶液。滴加完毕后,调节混合物的 pH 值至 7.6,并升高温度至 100 °C,反应 1 小时。

25 (4)冷却至室温,于离心机中以 6000 g 的转速,离心 20 分钟,得到的固体反应物用 0.5 % 的氯化钠溶液洗涤两次。再用 6000 g,离心 10 分钟,用 0.5 % 的氯化钠溶液重溶,得到铝锰复合纳米晶,标记为 AlMn-001。然后于 121 °C, 30 分钟湿热灭菌后分装。

(5)将铝锰复合纳米晶长期保存至冷藏 (2~8 °C)。

参见图 1。图 1 为本申请实施例 1 制备的铝锰复合纳米晶的电子透射显微镜(FEI 公司, 型号 Tecnai G2 20S-TWIN)测定铝锰复合纳米晶的尺寸形貌图像。由图 1 可知, 本申请实施例 1 制备的铝锰复合纳米晶为宽度 30~120 纳米, 长度 50~300 纳米的薄片状纳米片堆积的复合颗粒。

5 实施例 2

本申请实施例提供了一种铝锰复合纳米晶 AlMn-002, 具体制备方法包括:

(1) 称取 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 0.01 mol/L NaAC 中, 配制成铝离子含量 0.4 mol/L 的铝盐溶液。称取 $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于注射用水中, 配制成锰离子含量 0.1 mol/L 的锰盐溶液。称取谷氨酸溶于纯水溶液中, 配置成浓度为 0.20 mol/L 的阴离子助剂溶液。称取 KOH 用注射用水进行溶解, 配制成 KOH 含量为 0.5 mol/L 的碱溶液。

(2) 先将铝盐溶液和锰盐溶液等体积混合后得混合液, 取 40mL 加入到含有 30mL 谷氨酸水溶液的容器中, 在室温下转速为 800rpm 的搅拌速度下反应 7 小时, 使得配合反应充分, 得混合物。

(3) 调整转速至 500 rpm 搅拌, 接着以 6.9 mL/分钟的速度加入氢氧化钾溶液, 使得溶液 pH 为 8.5, 将温度调至 80 °C, 并维持稳定反应 7 小时。

(4) 冷却至室温, 于离心机中以 6000 g 的转速, 离心 20 分钟, 得到的固体反应物用 0.5 % 的氯化钠溶液洗涤两次。再用 6000 g, 离心 10 分钟, 用 0.5 % 的氯化钠溶液重溶, 得到铝锰复合纳米晶, 标记为 AlMn-002。

(5) 然后于 121 °C, 30 分钟湿热灭菌后分装。将铝锰复合纳米晶长期保存至冷藏 (2~8 °C)。

参见图 2。图 2 为本申请实施例 2 制备的铝锰复合纳米晶的电子透射显微镜(FEI 公司, 型号 Tecnai G2 20S-TWIN)测定铝锰复合纳米晶的尺寸形貌图像。由图 2 可知, 本申请实施例 2 制备的铝锰复合纳米晶为宽度 20~70 纳米, 长度 30~100 纳米的薄片状纳米片堆积的复合颗粒。

实施例 3

本申请实施例提供了一种铝锰复合纳米晶 AlMn-003, 具体制备方法包括:

(1) 称取醋酸铝溶于 0.01 mol/L NaAC 中, 配制成铝离子含量 0.5 mol/L 的铝盐溶液。称取 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于注射用水中, 配制成锰离子含量 0.1875

mol/L 的锰盐溶液。量取柠檬酸配置成浓度为 0.1 mol/L 的阴离子助剂溶液。称取氢氧化钠并用注射用水进行溶解，配制成含量为 0.2 mol/L 的碱溶液。

(2) 先将铝盐溶液和锰盐溶液等体积混合后得混合液，取 10mL 混合液加入到含有 50mL 柠檬酸溶液的反应器中，在室温下开启 1200 rpm 搅拌 1 小时，使配合反应充分发生，得混合物。

(3) 接着以 16.9 mL/分钟的速度滴加入 10mL 氢氧化钠水溶液，调整溶液 pH 为 9，升高温度至 60 °C，并维持稳定反应 12 小时。

(4) 冷却至室温，于离心机中以 8000 g 的转速，离心 10 分钟，得到的固体反应物用 0.5 % 的氯化钠溶液洗涤三次。再用 8000 g, 10 分钟离心，用 0.5 % 的氯化钠溶液重溶，得到铝锰复合纳米晶，标记为 AlMn-003。

(5) 然后于 121 °C，30 分钟湿热灭菌后分装。将铝锰复合纳米晶长期保存至冷藏 (2~8 °C)。

参见图 3。图 3 为本申请实施例 3 制备的铝锰复合纳米晶的电子透射显微镜(FEI 公司，型号 Tecnai G2 20S-TWIN)测定铝锰复合纳米晶的尺寸形貌图像。由图 3 可知，本申请实施例 3 制备的铝锰复合纳米晶为宽度 20~100 纳米，长度 30~200 纳米的薄片状纳米片堆积的复合颗粒。

实施例 4

本申请实施例提供了实施例 1~实施例 3 的铝锰复合纳米晶的理化性质测试试验，具体包括：

以下检测方法适用于任何一种 Mn: Al 摩尔配比的铝锰复合纳米晶理化性质测定；

(1) 水合粒径与电位的表征：

将实施例 1、实施例 2 和实施例 3 制备的铝锰复合纳米晶用超纯水稀释 100~200 倍至澄清无色，取 800 μ L 至 Zeta 电位样品池，进行测试。

(2) X 射线衍射 (XRD) 表征：

将铝锰复合纳米晶装入离心管，冷冻干燥后，将固体粉末均匀装填到玻璃样品台的窗口中，再用载玻片压实，将凸起的部分刮平，使粉末填满整个凹进去的窗口并与载玻片上表面平齐。将样品台装载到 X 射线衍射仪中，在软件中设置参数，进行扫描。

结果如图 4 所示, 图 4 可知, 本申请实施例 1~实施例 3 所获得的铝锰复合纳米晶样品所含锰皆为四氧化三锰晶型, 铝均为 $\text{AlO}(\text{OH})$ 晶型。

(3) 铝锰复合纳米晶的消解定量:

用超纯水将本申请实施例 1~实施例 3 所获得的铝锰复合纳米晶稀释 10 倍, 取 100 μL 于 50 mL 聚四氟乙烯消解瓶中, 加入 2~3 mL MOS 级浓硝酸, 在电热板上升温到 90 $^{\circ}\text{C}$, 滴加 MOS 级过氧化氢 2 mL, 使溶液呈澄清透明的状态。然后梯度升温到 160 $^{\circ}\text{C}$, 每次升温 10 $^{\circ}\text{C}$, 停留 20 分钟, 缓慢蒸发至溶液剩 0.5 mL 即可取下, 冷却至室温, 定容到 3 g。用 MOS 级硝酸配制 3% 的冲洗液, 用标准样品配制标准曲线, 通过电感耦合等离子质谱联用仪进行检测定量。

(4) 吸附率: 以铝锰复合纳米晶对牛血清白蛋白的吸附作用计算吸附率。

供试品溶液制备: 取供试品适量, 用 0.85%~0.90%氯化钠溶液稀释至铝含量为 1mg/mL, 调节 pH 值至 6.0~7.0, 即为供试品溶液。同一种铝锰佐剂不同批次的 pH 值应调节为固定值, 以保证不同批次检测的批间一致性。

牛血清白蛋白 (简称牛白) 溶液: 取牛血清白蛋白适量, 用 0.85%~0.90%氯化钠溶液配制成 10 mg/mL 溶液, 调节 pH 值与供试品溶液 pH 值一致。

测定法: 取 15 ml 离心管 5 支, 分别加牛血清白蛋白溶液 (10 mg/mL) 0.08 mL、0.16 mL、0.4 mL、0.8 mL、1.2 mL, 并补 0.85%~0.90%氯化钠溶液至 4.0 mL, 混匀后, 每管分别加入供试品溶液 1.0 mL, 混匀, 使各管牛血清白蛋白量分别为 0.8 mg、1.6 mg、4 mg、8 mg、12 mg, 各管含铝元素为 1 mg。

将上述各管室温放置 1 小时 (期间每隔 10 分钟用力振摇 1 次) 后, 5000g 离心 10 分钟, 收集上清液, 采用 Lowry 法 (通则 0731 第二法) 或其他适宜方法测定各管上清液中游离牛血清白蛋白含量, 记录各管吸光度值并计算蛋白质含量, 以各管上清液游离的牛血清白蛋白含量对应其牛血清白蛋白总量计算各管吸附率 (A)。上清液体积按 5ml 计算。吸附率 = (总牛白量 - 上清牛白量) $\div$ 总牛白量 $\times 100$ 。

结果判定: 牛白含量为 0.8mg、1.6mg 的 2 管上清蛋白质应为未检出, 即吸附率应不低于 90%; 且牛白含量为 4mg、8mg、12mg 各管吸光度值应呈总体递增趋势 (如吸光度值无法判定, 需通过检测上清蛋白质含量判定其总体递

增趋势), 吸附率判为合格。

(5) 24 小时沉降率: 用稀盐酸或氢氧化钠溶液将供试品 pH 值调至 6.0~7.0, 用水将供试品稀释至含铝 5mg/mL, 如供试品铝含量低于 5mg/mL, 调整 pH 后用 9g/L 的氯化钠溶液稀释至 1mg/mL。如供试品铝含量低于 1mg/mL, 静置适宜时间, 吸弃上清液使铝含量至 1mg/mL。振摇至少 30 秒, 取 25mL 溶液至量筒或刻度比色管, 静置 24 小时, 根据析出的上清液量, 按照下列公式计算供试品的沉降率。沉降率 (%) = 上清体积/25×100%。

以上实施例中, 采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (购自 Malvern 公司, Zetasizer Nano ZS 型号) 测定氢氧化铝佐剂的水合粒径及表面电荷; 采用电感耦合等离子体原子发射光谱仪 (ICP-OES, 购自 Perkin Elmer 公司, PerkinElmer Optima 5300DV 型号) 测定铝锰复合佐剂的铝含量以及锰含量; 吸附度与沉降情况的测定参照《中国药典》(2020 版), 上述试验结果如表 1 所示。

表 1

检测项目	实施例 1 的 AlMn-001	实施例 2 的 AlMn-002	实施例 3 的 AlMn-003
平均粒径(μm)	2.39	1.73	2.15
铝含量(mg/mL)	0.89	0.88	0.61
锰含量(mg/mL)	0.10	0.24	0.33
电位 (mV)	+26	+20	+15
吸附能力 (mg)	>1.6	>1.6	>1.6
沉降率%	15%~20%	15%~20%	15%~20%

实施例 5

本申请实施例提供了实施例 1~实施例 3 制得的铝锰复合纳米晶的 BMDC 激活能力比较, 包括:

本申请的实施例 1~3 制备的铝锰复合纳米晶 AlMn-001、铝锰复合纳米晶

AlMn-002、铝锰复合纳米晶 AlMn-003 的 BMDC 激活效果评估。

将未成熟的 BMDC 以每孔 5×10^5 个细胞接种在 6 孔板中，贴壁后每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 金属离子总浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$ 的商品铝佐剂 Alum（购自 Invivogen 公司，CAS:21645-51-2）、实施例 1 获得的铝锰复合纳米晶 AlMn-001、实施例 5 2 获得的铝锰复合纳米晶 AlMn-002、实施例 3 获得的铝锰复合纳米晶 AlMn-003，每组 3 个平行，孵育 24 小时后，收集细胞并用抗 CD11c、抗 CD80 和抗 CD86 流式染色液对细胞进行染色。用流式细胞分析仪测定 BMDCs 表面共刺激因子 CD80、CD86 表达水平。

由图 5 可知，本发明的实施所得的铝锰复合纳米晶对树突细胞激活能力随着 Mn 比例提升而增加，且铝锰复合纳米晶 AlMn-003 树突细胞激活能力是商品铝佐剂约 2 倍的。说明本申请得到的铝锰复合纳米晶具有更加优异的树突细胞激活能力。

实施例 6

本申请实施例提供了铝锰复合纳米晶吸附抗原后的细胞摄取效果，包括：
15 DC2.4 细胞使用含有 10% (v/v) FBS 的 RPMI 1640 培养基，并在 37°C ，5% CO_2 的湿润环境中培养。将细胞与构建的纳米疫苗（ 10 mg/L 浓度的 FITC 标记的抗原分子与 25 mg/L 浓度的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 或 100 mg/L 的商品铝佐剂 Alum（购自 Invivogen 公司，CAS:21645-51-2）Alum 的混合液）分别孵育 8 和 24 小时。然后将细胞洗涤并用 Lysotracker Red 标记，固定并通过
20 过荧光显微镜（Perkin Elmer Spinning Disc 共聚焦显微镜， $60\times$ 油浸透镜）观察，使用 UltraVIEW VoX 软件获取图片。

如图 6 所示，图 6 为本申请的实施例 3 制备的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 或铝佐剂 Alum 与抗原结合后 DC 细胞内吞荧光成像图像。

实验结果如图 6 所示，本申请实施例 3 得到的铝锰复合纳米晶在仅用相当于商品铝佐剂四分之一使用量的情况下，仍能载带比商品铝佐剂 Alum 更多的
25 抗原进入细胞内部。说明本申请得到的铝锰复合纳米晶具有更加优异的疫苗载带效果。

实施例 7

本申请实施例提供了实施例 1~实施例 3 的铝锰复合纳米晶免疫增强效果

量效关系验证, 具体包括:

实施例 1~实施例 3 的铝锰复合纳米晶中 Mn: Al 的摩尔比不同, 将不同 Mn/Al 的摩尔比的铝锰复合纳米晶分别与 OVA 抗原二者联用肌肉注射小鼠, 测定产生的特异性抗体滴度。具体方法如下:

5 实验动物: Balb/C 小鼠, 6-8 周, 5 只/组, 雌性。

对照组: 商品铝佐剂 Alum (购自 Invivogen 公司, CAS: 21645-51-2)。

给药剂量: OVA 抗原(卵清白蛋白 OVA 购自上海源叶生物科技有限公司, CAS: 9006-59-1): 10 μ g/鼠; 铝锰复合佐剂: 50 μ g/100 μ L/鼠; 铝佐剂: 50 μ g/100 μ L/鼠。

10 实验组: (1)AlMn-001 (Mn/Al = 0.1); (2)AlMn-002 (Mn/Al = 0.25); (3) AlMn-003 (Mn/Al = 0.375)。

免疫方案: 上述各药物分别与抗原等体积混合, 肌肉注射, 间隔 3 周, 3 针免疫小鼠, 小鼠按照分组免疫后 19d、35d 和 56d 眼眶取血。ELISA 测定血清中的抗体滴度。

15 实验结果如图 7 所示, 实施例 1~实施例 3 的不同 Mn/Al 摩尔比的铝锰复合纳米晶组, 小鼠免疫一针后, 不仅起效快, 且具有明显的正相关的量效关系; 免疫 2 针后, 量效关系依然明显; 说明铝锰复合纳米晶在 OVA 疫苗的体液免疫增强方面具有明显的效果。

实施例 8

20 本申请实施例提供了实施例 1~3 的铝锰复合纳米晶增强新冠 SARS-CoV-2 RBD 重组亚单位蛋白抗原的免疫保护效果试验, 具体包括:

实验动物: Balb/C 小鼠, 6-8 周, 5 只/组, 雌性。

25 给药剂量: 抗原 10 μ g/鼠; 商品铝佐剂 Alum (购自 Invivogen 公司, CAS: 21645-51-2): 100 μ g/100 μ L/鼠; AlMn-003 铝锰复合纳米晶: 100 μ g /100 μ L/鼠;

实验组: (1)新型冠状病毒刺突蛋白 RBD(简称 RBD 抗原, 购自义翘神州, 货号 40592-V08H4); (2)商品铝佐剂 Alum+RBD; (3)实施例 1~3 得到的铝锰复合纳米晶+RBD, 即 AlMn-001+RBD、AlMn-002+RBD 和 AlMn-003+RBD;

免疫方案: 用(1)组免疫小鼠, 其余两组将商品铝佐剂 Alum 或实施例 3 得

到的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与抗原等体积混合后免疫小鼠，小鼠按照免疫分组首次免疫后第 3 周加强免疫，第二针免疫后 14d，眼眶取血，测定血清中抗体滴度。

- 5 实验结果如图 8 所示，抗体滴度依然随着铝锰复合纳米晶中的锰比例升高而增加，且高于商品铝佐剂的抗体滴度，铝锰复合纳米晶对于新冠亚单位蛋白抗原也有很好的免疫增效能力。

实施例 9

本申请实施例提供了实施例 3 的铝锰复合纳米晶增强流感亚单位疫苗保护效果试验，具体包括：

- 10 将制备好的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 作为佐剂，与流感 H1N1 HA 抗原二者联用肌肉注射小鼠，测定产生的特异性 IgG、IgM 抗体滴度。具体方法如下：

实验动物：Balb/C 小鼠，6-8 周，10 只/组，雌性。

- 15 给药剂量：H1N1 HA（购自义翘神州，货号 40731-V07H）抗原 5 μ g/鼠；
商品铝佐剂 Alum（购自 Invivogen 公司，CAS: 21645-51-2）：100 μ g/100 μ l/鼠；
AlMn-003 铝锰复合纳米晶：100 μ g/100 μ l/鼠；

实验组：(1) H1N1 HA 抗原；(2) 商品铝佐剂 Alum+H1N1 HA；(3) 实施例 3 得到的铝锰复合纳米晶 AlMn-003+ H1N1 HA；

- 20 免疫方案：用(1)组免疫小鼠，其余两组将商品铝佐剂 Alum 或实施例 3 得到的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与抗原等体积混合后免疫小鼠，小鼠按照分组首次免疫后第 3 周加强免疫，在二次免疫后 2 周，眼眶取血，测定血清中抗体滴度。

- 25 血清中的抗体滴度采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测，评估小鼠血清中疫苗诱导的 IgG 和 IgM 水平。简而言之，96 孔微量滴定板分别用 H1N1 HA 预包被，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，37 $^{\circ}$ C 用 2% BSA 封闭 2 小时。然后将连续稀释的小鼠血清加入到 96 孔板中，然后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时，然后用 PBS 洗涤四次。结合的抗体与 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。用 PBS 洗涤 4 次后，将底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB；Sigma）加入平板中，加入 0.05% H₂SO₄ 终止反应。在 ELISA 酶标仪（Tecan, San Jose, CA）

中测量 450 nm 和 630 nm 处的吸光度。

图 9 为本申请的实施例 3 制备的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 或商品铝佐剂 Alum 与 H1N1 HA 抗原二者联用, 肌肉注射小鼠间隔 3 周, 2 次免疫后 2 周, 产生的特异性抗体滴度分析结果。

5 实验结果如图 9A, 本申请的实施例 3 得到的铝锰复合纳米晶相较于商品铝佐剂更好地增强免疫应答, 产生的抗体滴度为铝佐剂的 104 倍。

实验结果如图 9B, 本发明实施例 3 得到的铝锰复合纳米晶相较于商品铝佐剂具有更高的 IgM 水平, 抗体滴度为铝佐剂的 3 倍。

10 后续实施例 10~13 所用测试来源于实施例 9 中不同疫苗免疫小鼠, 免疫后 56d, 将其中 5 只进行安乐死, 收集脾脏、肺组织制备细胞悬液进行后续测试, 评估疫苗的免疫效力。

实施例 10

本申请实施例提供了实施例 3 的铝锰复合纳米晶和商品铝佐剂 Alum 免疫小鼠后 ELISPOT 检测抗原特异性 IFN- γ 的 T 细胞试验, 具体包括:

- 15 1) 将 ELISPOT 的板子预先包被 anti-IFN- γ 抗体 (5 μ g/ml), 4°C 过夜;
2) 使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基室温封闭 2 h;
3) 将实施例 9 免疫后 56d 小鼠的脾脏用 200 目的纱布研磨制备成单细胞悬液, 每孔加入 5×10^5 个细胞, 在 5%CO₂, 37°C 培养箱中孵育 24 h;
4) 加入生物素化的 anti-IFN- γ 抗体, 室温孵育 2 h;
20 5) 加入 HRP 交联的亲合素, 室温孵育 1 h;
6) 使用 Immunospot Analyzer ELISPOT reader 读板, 利用 Immunospot 软件 (v.3.0) 读取分泌 IFN- γ 的细胞数 (IFN- γ spot-forming cells, SFC)。

实验结果如图 10 所示, AlMn-003 铝锰复合纳米晶促进 T 细胞分泌 γ -IFN, 且促进分泌 γ -IFN 的分泌量大于商品铝佐剂 Alum, 商品铝佐剂 Alum 组促进 T
25 细胞分泌 γ -IFN+ 为 H1N1 HA 抗原组的 PBMC 比例为 43.5%, AlMn-003 铝锰复合纳米晶组为 H1N1 HA 抗原组的 73%, 说明 AlMn-003 铝锰复合纳米晶在刺激细胞免疫反应中较好的效果。

实施例 11

本申请实施例提供了实施例 9 收集不同疫苗免疫后 56d 小鼠的脾脏组织所

提取的脾细胞，进行细胞内因子测定试验，具体包括：

流式细胞术测定通过多色细胞内细胞因子染色测定进行，使用 2 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白（H1N1 HA 蛋白）刺激小鼠衍生的脾细胞。DMSO 用作阴性对照（背景）。在 Golgistop (BD Biosciences) 和 Brefeldin A (Sigma) 的存在下，在 37°C 和 5% CO_2 中孵育 1000 万个细胞 6 小时。使用 DAPI-live/dead 活性染料 (Invitrogen) 和抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD69、抗 CD134 和抗 CD137 抗体进行细胞内细胞因子染色测定，以评估细胞活力 (Biolegend) 用于表面染色。将细胞透化并用抗 IL-2、抗 IL-4、抗 IFN- γ 和抗 TNF- α 抗体 (Biolegend) 染色。BD LSR Fortessa (BD Biosciences) 收集了至少 100,000 ~ 200,000 个淋巴细胞，并使用 FlowJo 软件 (Tree Star, Ashland, OR) 进行分析。如果抗原特异性反应至少比背景大三倍，并且比背景高出至少 0.05%，则样品被定义为阳性。

由图 11 所示，在脾部中的细胞因子中 IL-2、IL-4、TNF- α 和 IFN- γ 水平都较高，并且 IL-4 水平较 IL-2 高，IL-2 属于 Th1 型因子，IL-4 属于 Th2 型因子；说明本申请的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 可促进 IFN- γ 因子的分泌，IFN- γ 因子能增强巨噬细胞的吞噬能力，铝锰复合纳米晶 AlMn-003 也可促进 T 细胞分化，促进 CD8 CTL 的成熟。

实施例 12

本申请实施例提供了实施例 9 不同疫苗免疫后 56d 小鼠脾、肺记忆 B 细胞水平试验，具体包括：

B 细胞可生成高亲和力抗体、生成免疫记忆、充当抗原呈递细胞，并分泌细胞因子（包括 CCL22、CCL17、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-10、TGF- β 1、IL-35。）。记忆 B 细胞和浆 B 细胞可生成诸如免疫球蛋白 (Ig)、IgM、IgG 和 IgE 等抗体。记忆 B 细胞的寿命很长，在重新遇到抗原之前其在一直处于休眠状态。再次暴露抗原时，记忆 B 细胞可立即生成对抗其抗原的抗体。随着再次暴露于外源抗原，记忆 B 细胞立即重新活化并分化为能分泌抗体的浆细胞。IgG 同型抗体由这些浆细胞中分泌，对特异性外源抗原具有高亲和力。这些 IgG 抗体能有效地快速中和病毒和细菌抗原，是包括免疫记忆（尤其是来自记忆 B 细胞和记忆 T 淋巴细胞）在内的二次免疫反应的一部分。

因此，本申请评估了实施例 3 的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 佐剂配伍 H1N1

HA 抗原免疫小鼠，56d 的记忆 B 细胞水平。

测定实施例 3 的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 配伍 H1N1 HA 抗原免疫小鼠，56d 的记忆 B 细胞水平，结果如图 12 所示，根据记忆 B 细胞流式结果表明铝锰复合纳米晶组，能在脾脏和在肺部诱导产生更多的记忆 B 细胞，具有良好的抗二次感染的潜力。

实施例 13

本申请实施例提供了实施例 9 不同疫苗免疫后 56d 小鼠脾记忆 T 细胞水平试验，具体包括：

考虑到记忆 CD4+ T 和 CD8+ T 细胞是保护性免疫的关键组成部分，诱导有效的记忆 T 细胞反应是慢性感染疫苗的主要目标，本申请在 H1N1 HA 疫苗免疫后第 56 天检查了小鼠记忆 T 细胞的表型。

测定实施例 3 的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 配伍 H1N1 HA 抗原免疫小鼠，56d 的 CD4+ T 和 CD8+ T 细胞水平，结果实验结果如图 13，流式细胞术结果显示，在脾脏中，CD4+T，CD8+ T 细胞中都呈现铝锰复合纳米晶组中枢性记忆 T 细胞（Tcm）的增加。

实施例 14

本申请实施例提供了实施例 1 的铝锰复合纳米晶 AlMn-001 作为免疫增效剂抗肿瘤效果，具体包括：

小鼠按体重随机分为 4 组，分别为：空白对照组(Ctrl)，OVA 对照组，OVA 与 AlMn-001 (AlMn-001-OVA)，及 OVA 与商品铝佐剂组(Alum-OVA)。根据实验设计免疫小鼠三次后(每隔 7 天免疫一次)，皮下接种黑色素瘤 B16-OVA，建立原位瘤模型。如图 14A 至 14C 所示，图 14A 为各组别小鼠体重变化情况，14B 为各组别小鼠肿瘤体积变化情况，14C 为各组别小鼠存活率情况。如图 14A 所示，各组别小鼠体重变化并不大；如图 14B 所示，20 天时，对照组小鼠肿瘤平均大小为 1982mm³；商品铝佐剂免疫组能一定程度上抑制肿瘤的生长，肿瘤平均大小为 734.9mm³，而使用本申请的 AlMn-001 能够有效抑制肿瘤的生长，免疫的小鼠肿瘤平均大小为 201.7mm³；如图 14C 所示，对照小鼠存活时间最长为 26 天，商品铝佐剂组免疫小鼠的存活时间最长为 43 天，而 AlMn-001 免疫组小鼠在 65 天时仍有部分存活，组内其余小鼠存活时间也有显著延长。

该结果表明,预先使用铝佐剂只能轻微抑制肿瘤生长及提高小鼠存活率,而预先使用 AlMn-001 能显著抑制肿瘤生长并提高小鼠存活率以及延长存活时间,AlMn-001 可作为肿瘤免疫增效剂增强机体的抗原位瘤效果。

实施例 15

5 本申请实施例提供了实施例 2 的铝锰复合纳米晶 AlMn-002 与 PD-L1 抗体联用抗乳腺癌远端肿瘤试验,具体包括:

将 100 μL 4T1 细胞 (1×10^5) 接种到 Balb/c 小鼠右后腿上,记为原位肿瘤。待肿瘤平均体积长到 100 mm^3 时,将小鼠随机分为 4 组:分别是对照组 (Ctrl), AlMn-002 组, PD-L1 抗体组 (购自美国 Biolegend 公司, catalog:124329, clone 10F.9G2), AlMn-002-PD-L1 抗体联合组,尾静脉注射材料 (AlMn-002 100 μg /次/鼠)。并记为第 0 天,分别于第 1 天,第 3 天,第 5 天对各组小鼠进行相应的治疗。每两天记录一次各组小鼠的肿瘤体积。于第 10 天时,在小鼠左后腿上接种 5×10^4 个 4T1 细胞,记为远端肿瘤,继续分别记录两侧肿瘤体积,直至第 25 天。

15 结果如图 15 所示,图 15 为铝锰复合纳米晶 AlMn-002 与 PD-L1 抗体联用乳腺癌远端肿瘤治疗效果。由图 15 可知,铝锰复合纳米晶 AlMn-002 与 PD-L1 抗体联用,除了可以对已有肿瘤的生长产生明显抑制效果,对于新生肿瘤的生长也有明显的抑制作用。

实施例 16

20 本申请实施例提供了实施例 3 的铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与二甲双胍 (Met) 联用抗肝癌肿瘤试验,具体包括:

将 100 μL HepG2 细胞 (1×10^5) 接种到 Balb/c 小鼠右后腿上。待肿瘤平均体积长到 100 mm^3 时,将小鼠随机分为 4 组:分别是对照组 (Ctrl), AlMn-003 组,二甲双胍 (Met, 购自大连美仑生物, CAS: 657-24-9) 组, AlMn-003-Met 联合组,尾静脉注射材料 (AlMn-003 100 μg /次/鼠)。并记为第 0 天,分别于第 1 天,第 3 天,第 5 天对各组小鼠进行相应的治疗。每两天记录一次各组小鼠的肿瘤体积。

结果如图 16 所示,图 16 为铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与 Met 抗体联用肝癌肿瘤模型治疗效果。由图 16 可知,铝锰复合纳米晶 AlMn-003 与 Met 抗体

联用，对肝癌模型肿瘤的生长有显著抑制效果。

实施例 17

本申请实施例提供了实施例 1 的铝锰复合纳米晶 AlMn-001 抑制转移瘤生长的试验，具体包括：

- 5 建立小鼠 4T1 乳腺癌模型，将荷瘤小鼠随机分为 3 组，分别瘤内注射（1）生理盐水，（2）紫杉醇（购自上海吉至生化科技有限公司，CAS: 33069-62-4），（3）AlMn-001-紫杉醇，进行分组治疗，每隔 2 天治疗一次，治疗 3 次。在第 10 天，将含有 4×10^5 4T1 细胞的 100 μ L PBS 注入尾部静脉用于肺转移诱导。在第 28 天处死小鼠，取出肺组织，结果如图 17 所示，图 17 为 AlMn-001 与紫杉醇联合治疗肝癌转移的效果（最左边为空白对照组，中间为仅使用紫杉醇组，最右边为 AlMn-001 与紫杉醇联合治疗组）。结果显示空白对照组小鼠肺上长满了转移瘤灶，仅使用紫杉醇治疗的小鼠肺上出现一定数量的转移瘤灶，而使用了 AlMn-001 的小鼠肺上几乎没有肿瘤。该结果表明，AlMn-001 可作为免疫增强剂增强机体的抗转移瘤效果。
- 10
- 15 综上所述，本申请的铝锰复合纳米晶具有与商品铝佐剂同样的使用便捷性，能够在比商品铝佐剂使用浓度更低的情况下有更好的 DC 细胞激活效果，更好的抗原递呈效果，和更好的促进抗原细胞摄取和溶酶体逃逸效果，且能够同时激活体液免疫和细胞免疫。同时也具有较强的肿瘤免疫治疗增效能力，可以作为联合免疫治疗剂的递送系统，提升免疫治疗效果。
- 20 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求

- 1、一种铝锰复合纳米晶的制备方法，其特征在于，包括：
步骤 1、铝盐溶液、锰盐溶液和阴离子助剂溶液混合得混合物，调节所述
5 混合物的 pH 至 5.5~8.5；
步骤 2、将所述混合物加热反应，将得到的固体反应物洗涤后制得铝锰复合纳米晶。
- 2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述铝盐溶液的溶质选自氯化铝、硫酸铝、硝酸铝和乙酸铝中的一种或多种；所述铝盐溶液的溶剂
10 选自醋酸钠溶液、生理盐水、水和乙醇中的一种或多种；
所述锰盐溶液的溶质选自氯化锰、硫酸锰、硝酸锰、乙酸锰中的一种或多种；所述锰盐溶液的溶剂选自水、生理盐水和乙醇中的一种或多种。
- 3、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述阴离子助剂溶液的溶质选自有机酸盐或/和氨基酸；所述阴离子助剂溶液的溶剂选自水、生理盐
15 水和乙醇中的一种或多种。
- 4、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，所述有机酸盐选自柠檬酸或/和水杨酸；所述氨基酸选自半胱氨酸、胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、和谷氨酸中的一种或多种。
- 5、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述混合物中，所述
20 铝盐溶液的铝元素与所述锰盐溶液的锰元素的摩尔比为 1: (0.05~1)；所述阴离子助剂的浓度与金属离子总浓度的比为 (0.1~10): 1；所述金属离子总浓度为所述铝盐溶液和所述锰盐溶液的浓度和。
- 6、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 2 中，所述加热反应为 60℃~130℃，所述加热反应的时间为 0.5~20 h。
- 25 7、一种铝锰复合纳米晶，其特征在于，包括：权利要求 1~6 任意一项所述的制备方法制得的铝锰复合纳米晶。
- 8、权利要求 1~6 任意一项所述的制备方法制得的铝锰复合纳米晶和权利要求 7 所述的铝锰复合纳米晶在制备疫苗佐剂、免疫增强剂、药物组合物、药物递送载体或免疫原性组合物中的应用。

9、一种抗肿瘤的药物组合物，其特征在于，包括：权利要求 7 所述的铝锰复合纳米晶和治疗抗肿瘤疾病的药物。

10、一种疫苗组合物，其特征在于，包括：抗原和权利要求 7 所述的铝锰复合纳米晶。