

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/00

A61K 39/02 A61K 39/002

A61K 39/385 A61P 31/04

A61P 33/02



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00811745.4

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1182871C

[22] 申请日 2000.8.18 [21] 申请号 00811745.4

[30] 优先权

[32] 1999.8.19 [33] GB [31] 9919733.7

[86] 国际申请 PCT/GB2000/003225 2000.8.18

[87] 国际公布 WO2001/013943 英 2001.3.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.19

[71] 专利权人 免疫生物学有限公司

地址 英国剑桥

[72] 发明人 卡米洛·安东尼·利奥·塞尔温·科拉科

审查员 祝海燕

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称 抗胞内病原体的疫苗

[57] 摘要

本发明涉及产生和分离特异性免疫原性热激蛋白的方法，该蛋白由经胞内病原体感染的细胞的热或肿瘤坏死因子处理而诱导；本发明还涉及由这类蛋白制备的疫苗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种生产含有免疫原性决定簇的疫苗的方法，其特征在于包括以下步骤：

- a) 使得经胞内细菌病原体、原生动物病原体或寄生虫病原体感染的细胞经历热或肿瘤坏死因子的应激；
- b) 从应激的细胞中提取内源性应激诱导的产物；和
- c) 使用提取的产物作为免疫原性决定簇，制备疫苗组合物。

2、权利要求 1 的方法，其特征在于免疫原性决定簇的活性成分主要由一或多种休克蛋白/抗原性肽片段复合物组成。

3、权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于细胞用细菌病原体感染且所施加的应激是热。

4、权利要求 3 的方法，其特征在于热应激通过在比细胞正常培养温度高 5—8℃下加热而实现。

5、权利要求 1 的方法，其特征在于细胞用寄生虫病原体感染且应激由肿瘤坏死因子诱导。

6、权利要求 1、2、4 或 5 中任一项的方法，其特征在于细胞已被修饰而诱导应激蛋白的合成。

7、权利要求 1、2、4 或 5 中任一项的方法，其特征在于施加应激至细胞是体外进行的。

8、一种含有一种免疫原性决定簇的疫苗组合物，其特征在于该免疫原性决定簇用权利要求 1—7 中任一项的方法产生。

9、权利要求 8 的疫苗组合物，其特征在于该免疫原性决定簇包含一种休克蛋白和一种抗原性肽片段之间的一或多种复合物，其衍生自细菌胞内病原体、原生动物胞内病原体或寄生虫胞内病原体感染的细胞的热或肿瘤坏死因子应激。

10、权利要求 8 或 9 的疫苗组合物，其特征在于所述组合物还含有该免疫原性决定簇的佐剂。

11、权利要求 8 或 9 的疫苗组合物，其特征在于所述组合物是水性组合物。

## 抗胞内病原体的疫苗

本发明涉及一种疫苗和一种生产疫苗的方法。更特别的，本发明涉及从胞内病原体感染的细胞中生产应激诱导的蛋白质的疫苗的方法，及由此获得的组合物。

### 发明背景

任何人体免疫应答的一重要组分是通过抗原呈递细胞（APCs）如巨噬细胞，B 细胞或树突细胞，将抗原呈递到 T 细胞。外源抗原的肽片段与主要组织相容性复合物（MHC）分子一起经与辅助分子如 CD4 和 CD8 分子结合而呈递到巨噬细胞的表面。以这种方式呈递的这种抗原性肽片段，通过 T 细胞的 T 细胞受体识别。抗原性肽片段与 T 细胞受体的相互作用导致抗原特异性 T 细胞增殖及通过 T 细胞分泌淋巴因子。通过 APCs 呈递的抗原性肽片段的性质对建立免疫性是关键性的。

热激蛋白（HSPs）形成一个高保守蛋白质家族，其广泛分布于植物和动物王国。基于其分子量，将 HSPs 分为 6 个不同家族：小型（hsp 20—30kDa）；hsp40；hsp60；hsp70；hsp90；和 hsp100。尽管 HSPs 最初是在进行热应激的细胞中鉴别的，但已经发现它们与其它形式的应激如感染相关，且因此更通常的已知为应激蛋白（SPs）。为方便起见，本文中缩写 SP 用于表示任何方法所产生的所有形式的应激蛋白，而缩写 HSP 用于表示那些通过热应激特异性诱导的蛋白质。

哺乳动物 hsp90 家族的成员包括胞质 hsp90（hsp83），和内质网相应物 hsp90（hsp83），hsp87，Grp94（Erp99）和 gp97，见例如 Gething 等，（1992），自然 355：33—45。hsp70 家族的成员包括胞质 hsp70

(p73) 和 hsp70 (p72), 内质网相应物 BiP (Grp78), 和线粒体相应物 hsp70 (Grp75)。hsp60 家族成员只在线粒体中鉴别。

SPs 在细胞内是普遍存在的, SPs 的一个作用是陪伴肽从一个细胞区室至另一个区室, 并将肽呈递给 MHC 分子, 以实现细胞表面呈递至免疫系统。在疾病细胞的情况下, SPs 还陪伴病毒或肿瘤相关的肽至细胞表面, 见 Li 和 Sirivastave (1994), *Behring Inst.Mitt.*, 94: 37—47, 及 Suzue 等 (1997), 美国科学院院报 94: 13146—51。陪伴功能是通过在 ATP 依赖型反应中, SPs 与抗原性肽片段之间, 及 SPs 和病毒或肿瘤相关的肽片段之间形成复合物而完成的。SPs 以 ATP 依赖型形式与广谱肽片段结合或复合。在这种复合物中的肽是肽片段的随机混合物。此种肽片段的混合物和精确性质还未确定。SPs 与各种肽片段形成复合物已在正常组织中观测到, 其不是肿瘤特异性现象, 见 Srivastava (1994), *Experimentia* 50: 1054—60。

在治疗方面, 已经将哺乳动物 HSPs 用作疫苗。WO 97/10000 和 WO 97/10001 揭示了分离自癌细胞或病毒感染的细胞的 HSPs 混合物, 能激发对同类肿瘤或病毒抗原的保护性免疫或胞毒性 T 淋巴细胞。然而相反, 分离自正常细胞的 HSPs 不能激发这种免疫性。目前认为 HSPs 没有免疫原性, 但由于其与在抗原加工期间产生的肿瘤或病毒特异性抗原性肽片段结合而能激发免疫性。具体地, 与 HSPs 结合的肽片段是免疫原性的, 并被呈递给 T 细胞。与肽片段剥离的 HSPs 丧失其免疫原性, 见 Udonon, H.和 Srivastava, P.K., 实验医学杂志, 178, p1391, 1993。到目前为止, 还未确定这些肽片段的性质。

目前认为 SPs 的免疫原性不是得自 SP 本身, 而是得自与 SP 结合的肽片段的复合物, 此论点是基于复合物的一些特性。从正常和肿瘤细胞衍生的 SPs 的结构没有差别。某些 SP 与肽片段的复合物用 ATP 处理后丧失其免疫原性, Udonon 等, (1993), 实验医学杂志 178:

1391—96。免疫原性的这种丧失是由于复合物解离为其 SP 和肽组分所致。SP 制备物的免疫原性依赖于吞噬细胞的存在，如巨噬细胞和其它 APCs。目前认为 SPs 由巨噬细胞摄入，然后将那些与 SPs 结合的肽片段通过巨噬细胞的 MHC I 类分子呈递。以此方式，起始 T 细胞应答。

使用哺乳动物 HSP/抗原性肽片段复合物作为抗胞内病原体的疫苗见于 WO95/24923 揭示。已经提示将分离自病毒感染的细胞的 HSPs 作为抗原性肽的来源，其然后可被呈递给 T 细胞。这必须从这种细胞中生产和纯化 HSPs。通过热激刺激细胞通常使热激蛋白的水平提高。

然而，尚未提示通过热激或其它应激处理细胞，以提高 HSPs 的胞内水平。这也许是因为其需要只刺激产生 HSPs 的一亚型，尤其是免疫原性亚型，目前没有特异性刺激细胞产生这种具有增强的免疫原性的 HSPs 亚型的方式。

## 发明概述

本发明的第一个方面是提供一种生产包含免疫原性决定簇活性成分的疫苗组合物的方法，包括以下步骤：

- a) 使得经胞内细菌病原体、原生动植物病原体或寄生虫病原体感染的细胞经历热或肿瘤坏死因子的应激；
- b) 从应激的细胞中提取内源性应激诱导的产物，尤其 SP/抗原性肽片段复合物；
- c) 使用提取的产物作为免疫原性决定簇，制备疫苗组合物。

令人惊奇的是用热或肿瘤坏死因子处理胞内病原体感染的细胞，产生的 SPs 比衍生自未诱导的细胞或已经通过其它刺激应激的细胞的 SPs 具有更强的免疫原性。通过这些诱导的 SPs 激发的免疫性的一个令人注目的方面是，与通过其它 SP 亚型免疫诱导的免疫性

相比具有长期记忆。对细菌病原体的最佳记忆应答在用热诱导的应激蛋白中观测到，对原生动物和寄生虫病原体的最佳记忆应答在用肿瘤坏死因子诱导的应激蛋白中观测到。

本文所用术语“疫苗”是指刺激免疫系统使其能更好地应答随后的感染的含有免疫原性决定簇的任何组合物。应意识到疫苗通常含有一免疫原性决定簇和一佐剂，该佐剂非特异性地增强对该决定簇的应答。

优选地，本发明的免疫原性决定簇与佐剂组合输送。本领域技术人员已知适当的佐剂，如 Freund' s 完全佐剂，Freund' s 不完全佐剂，Quil A, Detox, ISCOMs 或鲨烯。然而应意识到本发明的疫苗不用佐剂也是有效的。这种疫苗可通过任何适当方式施用，如口服，或通过注射。

术语“应激蛋白”和“热激蛋白”，包括那些包含细菌 HSPs 的 GroEL, GroES 和 DnaK 和 DnaJ 家族，和其它胞外病原体中的相关家族的蛋白质。这些家族是基于它们编码的肽的大小而命名的。这些家族在物种之间是高度保守的。另外，许多细菌也表达真核蛋白的同源物。优选地，本发明疫苗含有多个衍生自应激的病原体的 SP/抗原性肽片段复合物。我们特别优选将 GroEL, GroES, DnaK 和 DnaJ 家族的蛋白质在本发明中用作免疫原性决定簇，最优选的是 DnaJ 和 GroEL。优选地，SP 复合物与热诱导的 HSP 蛋白家族在氨基酸水平具有高于 25%的同源性和/或 20%的相同性。

本发明要求所用的应激处理能刺激感染的细胞中存在 SPs。针对由原生动物和寄生虫病原体感染的细胞而言，我们优选应激是通过肿瘤坏死因子尤其肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的。对由细菌病原体感染的细胞而言，我们优选应激是通过在未感染的细胞正常生长温度之上的 5-10 $^{\circ}$ C，对感染的细胞进行热处理诱导的。不拘泥于理论，据认为对胞内病原体感染的细胞进行处理特异性诱导

与来自病原体的抗原性肽最大程度相互作用的 HSPs, 或诱导最易于被 APCs 吞噬的 HSPs, 或两者均诱导。

诱导 SPs 的最佳条件可易于通过简便的反复试验确定, 以及通过用常规技术评价的刺激物的变化的作用而确定, 如对动物进行体内实验, 或通过其它方法例如“免疫学通用方法”, Wiley Interscience, 1997 所述方法确定。

当用 TNF 处理而应激细胞时, 适当使用的 TNF 为 0.5—1000 国际单位 (i.u) /ml, 优选为大约 1—500 i.u/ml。特别地, 就 TNF- $\alpha$  而言, 我们优选细胞是用 10—500 i.u/ml 处理的, 然后培养 10—16 小时。或者, 可将细胞在产生细胞因子的饲养单层上生长, 或诱导产生内源性 TNF。另外, 用应激刺激温育细胞的时间也是可变的。我们优选使用 10—16 小时的暴露时间, 但此时间在一些情况中可降低至 2—4 小时, 并仍是有效的。

本领域技术人员已知测试最佳热或 TNF 水平和温育时间的方法。然而, 应意识到精确处理对本发明不是关键的, 只要此处理刺激所需免疫原性产物尤其 SP/抗原性肽片段复合物在处理的细胞内产生即可。相似地, 处理的其它条件如暴露时间长短和细胞温育培养基不是本发明的关键特征, 且可以根据所用细胞群的实际性质而变化。本领域技术人员已知改变和最佳化这些参数的方法。

优选地, TNF 是分离自与处理的细胞相同的生物体。用来自相同生物体的 TNF 处理细胞, 可最佳刺激 SP 复合物的形成。然而, 来自其它物种和个体的 TNF 也可用于在细胞中正向调节 SP 水平, 以提供适当的 SP 复合物用于本发明中。

本发明可使用任何适当的病原体感染的细胞或细胞系, 以提供 SP 复合物的来源。感染的细胞是通过用所需的病原体在体外感染适当的细胞系, 或通过体内分离病原体感染的细胞而获得的。以此方式感染的细胞然后可在体外进行适当应激, 以产生抗此病原体的

适于接种的免疫原性 SP 复合物。这包括表达来自所需胞内病原体的异源抗原的重组细胞。这些也包括用于产生重组疫苗的所有类型的转染的重组细胞，如通过本领域标准方法如电穿孔法，脂质体融合和磷酸钙，用重组载体转染的哺乳动物细胞系。本发明还包括从真核细胞中形成所需的 SP 复合物，该真核细胞表达对热或 TNF 处理应答的异源胞内病原体抗原。尽管抗原性片段主要是蛋白质或肽，它们也可包括碳水化合物，核酸和结合 SPs 的脂质组分。

应意识到对目前使用的胞内病原体感染的细胞可进行修饰，以使它们组成型地合成正常情况下通过适当的胞外应激刺激物即热或 TNF 处理诱导的 SPs，所述修饰是通过用任何适当重组 DNA 方法修饰其遗传结构，例如“分子生物学当前方案”，Wiley Interscience, 1997 所述。

可用任何适当的方法提取和纯化从施加应激的细胞材料中诱导的蛋白质物质，尤其 SP/抗原性肽片段复合物，使之与剩余的细胞材料分离。例如，可将应激处理的材料通过均质化或超声片段化而破坏，随后离心在上清中获得粗制 SP 制备物。粗制的内源性 SP 制备物可直接用作本发明的疫苗。任选地，SP 制备物可通过使用 ADP 结合柱或本领域技术人员已知的其它适当方法进一步纯化，见例如 WO 97/10000 和 WO 97/10001 所述。

应意识到特异性免疫原性 SP/抗原性肽片段复合物可从细胞材料的应激产生的复合物混合物中分离，以产生病原体特异性的疫苗。然而，通常不需要这样，且复合物混合物可用于诱导广谱免疫。如果需要，特异性抗原性肽片段可从复合物中回收，例如通过用常规方法经 ATP 处理而回收。

本发明疫苗的 SP/抗原性肽片段复合物可与佐剂组合在水性载体中输送。本领域技术人员已知适当的佐剂，如 Freund' s 完全佐剂，Freund' s 不完全佐剂，Quil A, Detox, ISCOMs 或鲨烯。然而，

本发明的疫苗组合物没有佐剂也可以是有效的。

本发明还提供了一种用本发明疫苗处理动物的方法，包括任选地与佐剂组合施用药物学可接受量的本发明疫苗，该量足以激发动物体内免疫应答。此动物典型地是人。然而，本发明还可用于处理其它动物，如马，牛，山羊，绵羊或猪，及可用于处理鸟类，尤其家禽如鸡或火鸡。

本发明的疫苗组合物可通过任何适当方法施用，如口服，吸入，经皮或通过注射和在任何适当载体介质中施用。然而，优选将疫苗以水性组合物形式通过用任何适当针头或无针方法注射。

本发明的疫苗可含有任何适当浓度的 SP/抗原性肽片段复合物。我们优选是每 kg 经处理的动物体重施用 10—600 $\mu$ g，更优选 10—100 $\mu$ g，最优选 25 $\mu$ g 的 SP 复合物。应意识到本发明的疫苗可用作初始处理，随后进行一或多次相同或不同剂量处理，每次处理间隔 1—26 周，以提供对病原体的延长免疫作用。

以下实施例例证但非限制本发明。图 1—3 是通过各种应激方法获得的 SP 复合物的毛细管区带电泳 (CZE) 图。图 1 是分离自结核分枝杆菌感染的小鼠腹膜巨噬细胞的组成型 SPs 的肽/多肽的 CZE 图；图 2 是分离自结核分枝杆菌感染的小鼠腹膜巨噬细胞的热诱导的 SPs 的肽 /多肽的 CZE 图；图 3 是分离自结核分枝杆菌感染的小鼠腹膜巨噬细胞的 TNF 诱导的 SPs 的肽/多肽的 CZE 图。

#### 实施例 1：制备热诱导的 SPs

将用牛分枝杆菌感染的细胞在无血清的培养基如 RPMI (Sigma) 清洗，然后在 45 $^{\circ}$ C 热激 0.5 小时，或在 42 $^{\circ}$ C 热激 5 小时，并培养过夜。然后将细胞在无血清培养基中清洗，随后在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中清洗。将细胞再悬浮于均质化缓冲液中。此均质化缓冲液可以是低渗缓冲液，如含有 2mM MgCl<sub>2</sub> 的 10mM 磷酸盐，pH7.4。

然后将细胞用细胞同质器(例如 Dounce 或 Potter 同质器, Ultraturrax 或 Waring 搅拌机)破坏。或者,均质化缓冲液可含有去污剂,如具有 0.5%Tween 的 PBS,去污剂的浓度在 0.1—1%之间,并适于使细胞膜增溶。然后将细胞裂解物通过离心处理,典型的在 3—5000g 离心 5 分钟,以除去细胞核和细胞碎片,随后在 100000g 高速离心 15—30 分钟。将这样获得的上清加工以提供适用于疫苗中的 SP/抗原性肽片段复合物。这可通过硫酸铵沉淀进一步加工,使用 20—70%的硫酸铵。特别地,在 4°C 加入 20%(w/w)硫酸铵,弃去沉淀,随后加入更多的硫酸铵使浓度达到 70%w/w。通过离心收集蛋白质沉淀,然后用适当的生理学可注射的缓冲液如盐水透析,以在使用之前除去硫酸铵。应意识到以此方式分离的 HSPs 不是纯化为同质的,但仍然适用作疫苗成分。

如果需要更纯化的 HSP 制备物,然后可将 HSP 通过在携带腺苷二磷酸的基质如 ADP-琼脂糖或 ADP-琼脂糖凝胶上进行亲和层析从上清中纯化,这些方法例如 WO97/10000, WO97/10001, WO97/10002 所述。

SP 复合物可在任何适当浓度使用,以提供疫苗组合物中的免疫原性决定簇。我们优选每 kg 动物体重施用的诱导的 SP 复合物的量在 10—600 $\mu$ g 范围内,优选 10—100 $\mu$ g,更优选 25 $\mu$ g。

为确定 SP 复合物的免疫原性,可使用 T 细胞增殖分析。适当的分析包括混合淋巴细胞反应 (MLR),通过含氘胸苷吸收分析;和胞毒性分析以确定从靶细胞中释放的  $^{51}\text{Cr}$ ,见“免疫学当前方案”, Wiley Interscience, 1997。或者,可用标准免疫分析或噬斑裂解分析测试抗体产生,或通过胎子宫内保护确定,见“免疫学当前方案”。

#### 实施例 2: 制备 TNF 诱导的 SPs

将用疟原虫感染的细胞系在无血清培养基如 RPMI (Sigma) 中

温育，并与 TNF- $\alpha$ 温育过夜。典型地，将通过胶原酶处理大鼠肝组织制备的大鼠肝细胞用 *Plasmodium Berghei* 感染，其是将大鼠肝细胞与 3 倍数目的寄生虫细胞在 35°C 温育 5 小时而进行。然后将细胞与或不与 TNF- $\alpha$ 温育过夜。将 TNF 诱导的和对照细胞在无血清培养基中清洗，随后在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中清洗。

#### 实施例 3：用诱导的 HSPs 免疫；在疫苗受体内的免疫性

含有 HSP 复合物的疫苗组合物是如实施例 1 所述制备的，并将小鼠和兔通过注射 1-10 $\mu$ g 在磷酸盐缓冲液中的含应激蛋白的提取物进行接种，在初始注射一个月后用相同剂量的疫苗加强。由病原体诱导的免疫性用疟原虫或牛分枝杆菌蛋白通过 Western 印迹分析。通常获得 1: 1-10000 的抗体效价，抗病原体感染的细胞的胞毒性 T 细胞活性也可在免疫的小鼠中检测。用固定的疟原虫或牛分枝杆菌在初次免疫后 6, 12 和 18 个月攻击，导致效价为 1: 1-10000 的良好抗体应答，表明在免疫的动物体内良好的记忆应答。

#### 实施例 4：对比在组成型和诱导的 SP 复合物中结合的肽及其作为疫苗的应用

用结核分枝杆菌感染经腹腔灌洗液分离的小鼠腹膜巨噬细胞 ( $3 \times 10^6$  细胞用  $10^7$  细菌细胞在 35°C 温育 6 小时)。感染的细胞培养物在存在 1 $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$ 或不存在时在 37°C 培养过夜，以分离组成型或 TNF 诱导的 SPs，或者通过在 42°C 保温 2 小时而热激以分离热诱导的 SPs(HSPs)。通过在 3000 g 离心 5 分钟沉淀处理的细胞并重悬于在 100mM Tris-HCl, pH8 中的 1% Tween 的裂解溶液中。细胞裂解物在 5000g 离心 5 分钟以除去细胞核和细胞碎片，随后在 100000g 高速离心 15-30 分钟。如实施例 1 所述经硫酸铵沉淀从澄清的裂解物中制备 SPs 和 HSPs。

通过将沉淀的复合物重悬于 10%乙酸中，并煮沸 15 分钟解离复合物而将结合的肽从纯化的 HSPs 和 SPs 中洗脱。将变性的 HSPs 和 SPs 在冷室中在 Beckman airfuge 中沉淀 30 分钟，并通过冻干收集含有肽的上清，用 Beckman CZE 系统通过毛细管区带电泳分析。洗脱自组成型和 TNF 诱导的结核分枝杆菌 SPs 和 HSPs 的肽的 CZE 图明显不同，如图 1—3 所示，表明这三种类型的 SPs 携带不同家族的结合肽。用三种类型的 SPs 接种兔显示，在用组成型和 TNF 诱导的 SPs 免疫的动物中抗体效价类似，而在用热诱导的细菌 SPs 免疫的动物中有明显较高的抗体效价（10—50 倍）。用洗脱的肽和分离该肽后的变性 SPs 或 HSPs 的混合物免疫产生的抗体应答较差，提示诱导免疫性需要天然完整的 SP 结合的肽复合物。

#### 实施例 5：组成型和诱导的 SPs 作为疫苗的比较

将胶原酶消化的 PVG 大鼠肝通过细目筛并通过 DMEM 组织培养基离心清洗分离的细胞而制备大鼠肝细胞。将清洗的细胞以  $7 \times 10^6$  细胞/ml 的密度重悬并通过在 37°C 共培养 4 小时而用 Plasmodium Berghei 感染。感染的细胞用于制备抗体效价分析所用的裂解物，或者在存在  $1 \mu\text{g/ml}$  TNF- $\alpha$  或不存在时在 37°C 培养过夜，以分离组成型或 TNF 诱导的 SPs。通过在 3000 g 离心 5 分钟沉淀细胞并重悬于在 100mM Tris-HCl, pH8 中的 1% Tween 的裂解溶液中。细胞裂解物在 5000g 离心 5 分钟以除去细胞核和细胞碎片，随后在 100000g 高速离心 15—30 分钟。澄清的裂解物随后用于抗体效价分析或分离用于接种的 SPs。如实施例 1 所述经硫酸铵沉淀从澄清的裂解物中制备组成型和 TNF 诱导的 SPs。

用重悬于磷酸盐缓冲盐水中的分离自组成型或 TNF 诱导的和热诱导的细菌的 SPs 在不添加佐剂时初次或加强免疫兔。免疫动物中的抗体效价用 10 倍连续稀释液经斑点印迹分析在如上所述制备自新

---

鲜感染的肝细胞的总细胞裂解物上进行分析。用 TNF 诱导的 SPs 接种的动物的抗体效价比用组成型 SPs 接种的动物的抗体效价高 10—100 倍。

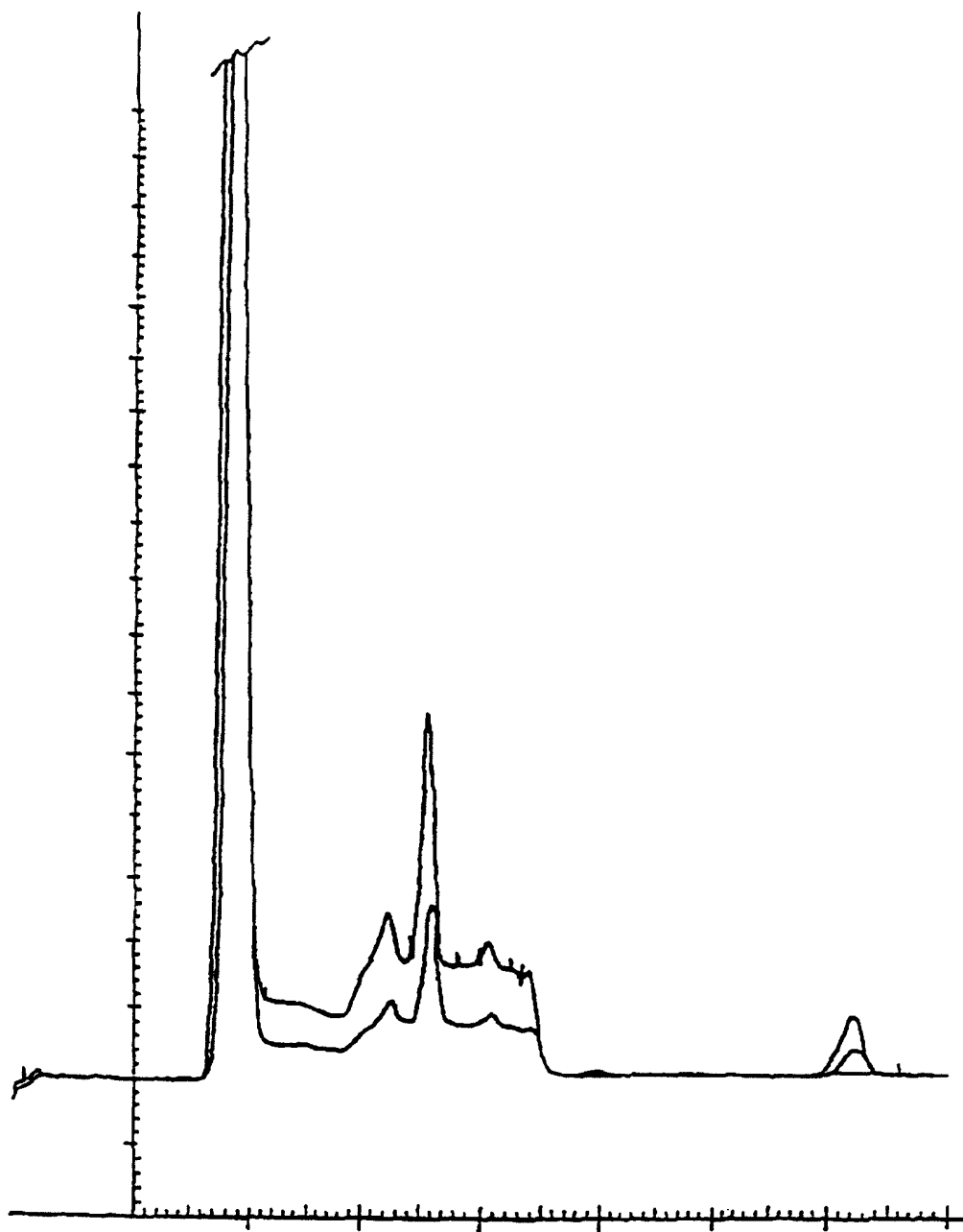


图1

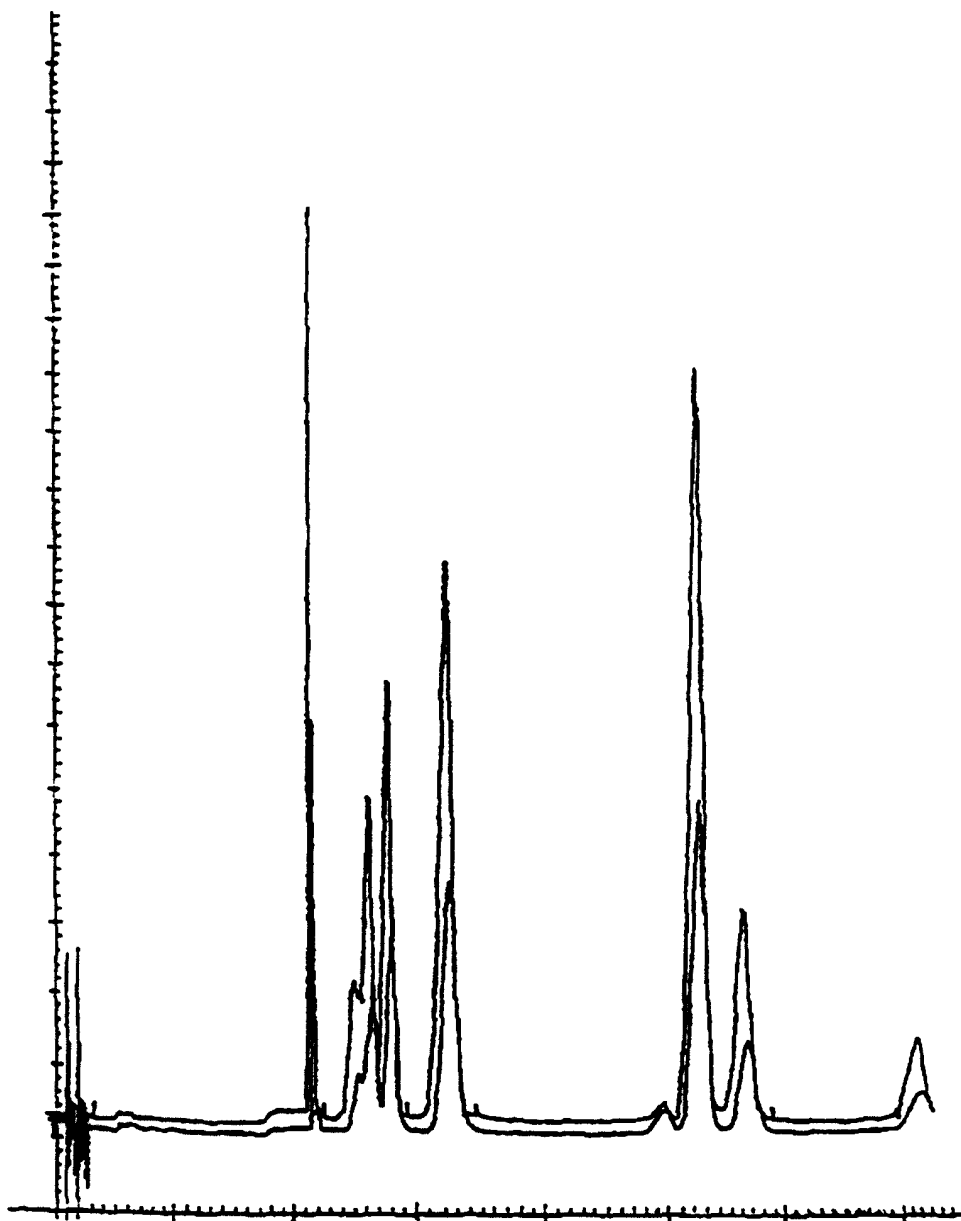


图2

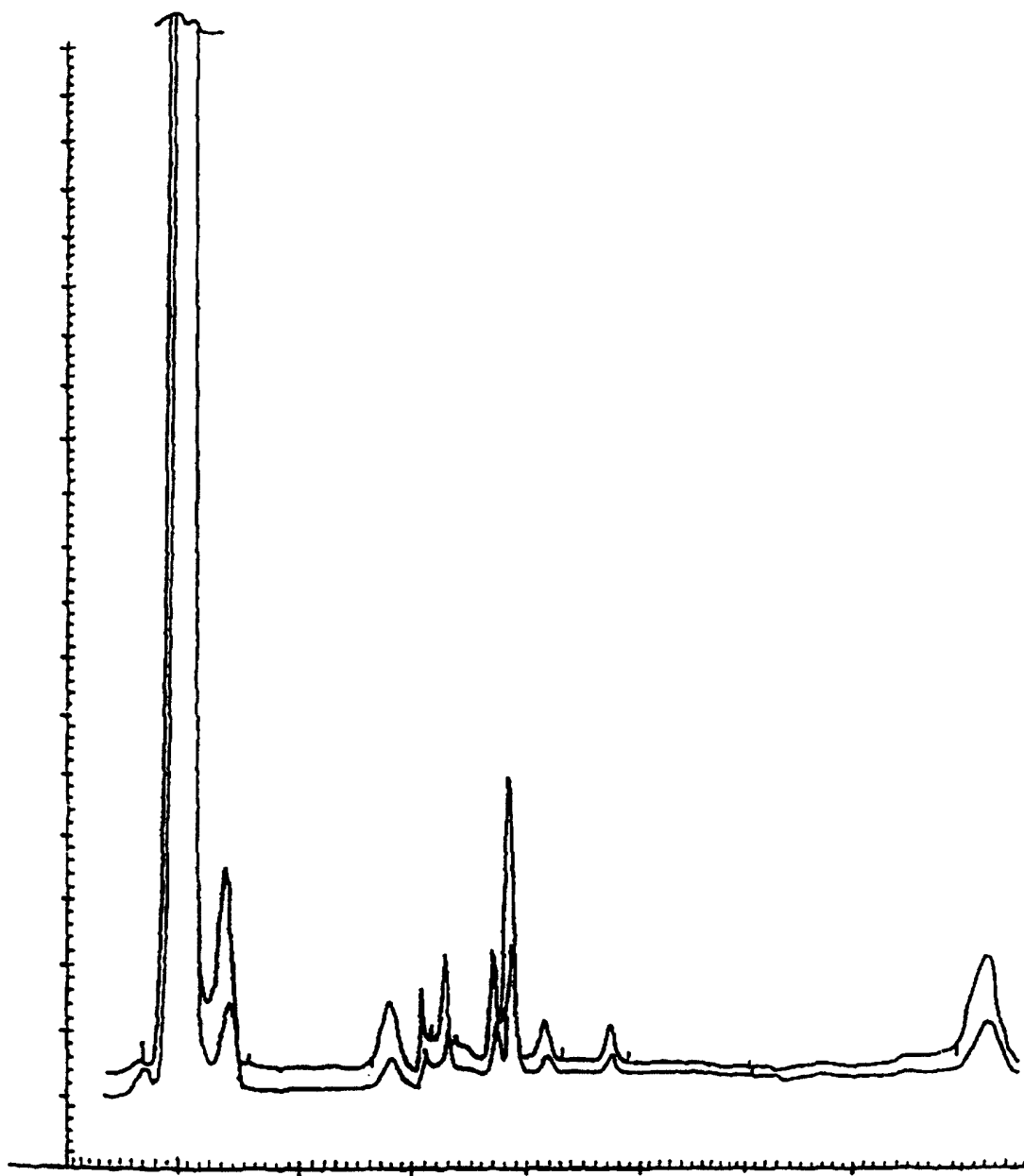


图3