(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104043121 A
(43)申请公布日 2014.09.17

(21)申请号 201410199545.X
(22)申请日 2010.06.16
(30)优先权数据
10-2009-0065495 2009.07.17 KR
(62)分案原申请数据
201080032046.1 2010.06.16
(71)申请人 翰林大学校产学协力团
地址 韩国江原道
(72)发明人 权滢周
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 林远成
(51)Int.Cl.
A61K 39/39(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/145(2006.01)
A61K 39/155(2006.01)
A61K 39/29(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 9/127(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

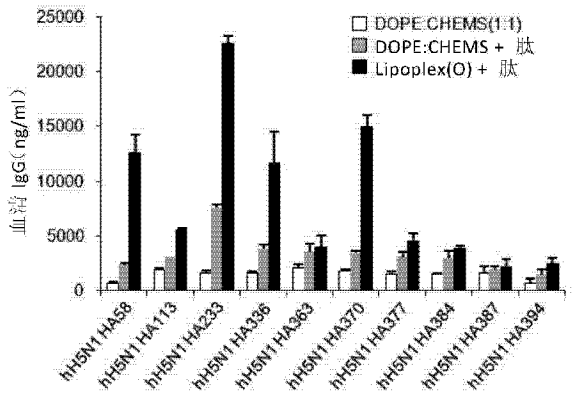
权利要求书1页 说明书42页
序列表9页 附图57页

(54)发明名称

包含脂质体包胶的寡核苷酸和表位的免疫刺激性组合物

(57)摘要

本发明涉及用于增强免疫应答的组合物、具有免疫原性的表位、其筛选和制备方法、针对肽抗原的抗体及其筛选和制备方法。本发明的组合物可用于通过增强免疫应答来预防或治疗各种免疫缺陷疾病，例如癌症、流感病毒、丙肝病毒和RSV(呼吸道合胞病毒)。



CN 104043121 A

1. 一种用于增强免疫应答的组合物，所述组合物作为活性成分包含了包胶在脂质体中的 (a) 免疫刺激性寡核苷酸和 (b) 表位，其中所述脂质体是 CHEMS 和 DOPE 的混合物，并且其中混合物中的 CHEMS:DOPE 的摩尔比为 4.5 :5.5 至 5.5 :4.5。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所述免疫刺激性寡核苷酸具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架。

3. 权利要求 1 的组合物，其中所述表位是具有选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列的肽表位。

4. 一种用于具有免疫原性的表位的筛选方法，所述方法包含下列步骤 :

(a) 将 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的肽包胶在脂质体中，其中所述脂质体是 CHEMS 和 DOPE 的混合物，并且其中混合物中的 CHEMS:DOPE 的摩尔比为 4.5 :5.5 至 5.5 :4.5 ;

(b) 用所述包胶有 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物 ;

(c) 分析所述被免疫非人类动物的免疫应答。

5. 一种用于针对蛋白抗原的抗体的筛选方法，所述方法包含下列步骤 :

(a) 将 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在脂质体中，其中所述脂质体是 CHEMS 和 DOPE 的混合物，并且其中混合物中的 CHEMS:DOPE 的摩尔比为 4.5 :5.5 至 5.5 :4.5 ;

(b) 用所述包胶有 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物 ;以及

(c) 通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位 ;

(d) 将所述筛选到的肽表位与待分析的目标抗体相接触 ;

(e) 将步骤 (d) 的结果与所述蛋白抗原相接触 ;以及

(f) 分析所述蛋白抗原与目标抗体的结合。

6. 一种用于制备针对蛋白抗原的抗体的方法，所述方法包含下列步骤 :

(a) 将 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在脂质体中，其中所述脂质体是 CHEMS 和 DOPE 的混合物，并且其中混合物中的 CHEMS:DOPE 的摩尔比为 4.5 :5.5 至 5.5 :4.5 ;

(b) 用所述包胶有 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物 ;以及

(c) 通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位 ;

(d) 通过用所述筛选到的肽表位免疫非人类动物来生产抗体。

7. 权利要求 4 至 6 任一项的方法，其中所述免疫刺激性寡核苷酸含有 CpG 基序、CpT 基序、多个 G 的结构域或形成发夹二级结构的回文序列。

包含脂质体包胶的寡核苷酸和表位的免疫刺激性组合物

[0001] 本申请是申请日为2010年6月16日、申请号为201080032046.1的同名申请的分案申请。

[0002] 发明背景

发明领域

[0003] 本发明涉及包含脂质体包胶的寡核苷酸和表位的免疫刺激性组合物。

[0004] 相关技术描述

[0005] 对基于表位的肽类疫苗已进行了大规模研究，通过它们与作为B-细胞表位和T-细胞表位的B细胞受体(BCR)和MHC的结合能力，这些疫苗对于诱导和调节免疫应答以防止传染性和恶性疾病来说是至关重要的(1-3)。化学失活的疫苗被广泛用于临床，但是这些疫苗具有缺点，例如病毒重新激活的风险、用于维持疫苗稳定性的成本、引起自体免疫疾病以及某些疫苗中不支持足够的保护作用(1,3,4)。为了克服这些缺点，最近30年中开发了合成肽类，通过使用被设计用于刺激特定淋巴细胞亚群的表位来操控免疫应答，以引起选择性的B-和T-细胞癒大。因此，肽类疫苗作为用于抗癌疫苗(5,6)和传染病例如流感病毒(3)、疟疾(7)、乙型肝炎(8)和HIV(9)的潜在有用的预防和治疗方法，受到关注。尽管肽类疫苗在各种动物模型中被活跃地研究，但它们的功效仅限于治疗人类。为了提高肽类疫苗的效能，评估了将脂质体用于疫苗递送(10)，并使用佐剂例如鞭毛(11)和CpG-DNA(12)进行配制以增加免疫应答的强度。

[0006] 在开发增强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答的疫苗中，对脂质体作为递送介质以进行了大规模评估(10,13)。包胶的脂质体能够针对环境提供保护并递送到靶细胞。pH敏感性脂质体例如磷脂酰-β-油酰-γ-棕榈酰乙醇胺(DOPE，二油酰磷脂酰乙醇胺)/胆甾醇半琥珀酸酯(CHEMS)的特征在于在低pH(5.0)下将内含物释放到胞质溶胶中并发生脂类掺混(14)。研究人员已显示，pH敏感性脂质体提高了抗原向胞质溶胶的递送和CTL应答的诱导(15)。此外，在用包胶在pH敏感性脂质体中的从汉坦病毒核衣壳蛋白(M6)或人乳头状瘤病毒E7合成的CTL表位免疫的小鼠中，报道了有效的抗原特异性CTL应答(16)。为了增加抗原被巨噬细胞和树突状细胞的摄取，使用阳离子型脂质体作为递送介质。通过包胶的阳离子型脂质体例如lipofectamine、DC-Chol、DC-Chol/DOPE、EPC/SA/C等，增强了CTL应答和抗体生产(10)。

[0007] 尽管脂质体是用于将抗原递送至APC的强有力载体，但仍对其进行了调查以增强免疫原性和佐剂活性。CpG-DNA与其他免疫刺激剂例如鞭毛、脂A、细胞因子等相比，作为用于免疫佐剂的潜在有用的治疗形式，其免疫刺激活性受到关注(17,18)。几项调查显示，CpG-DNA上调抗原呈递细胞活性、Th1免疫应答、免疫球蛋白(Ig)同种型转换(19-21)。通过用脂质体包胶CpG-DNA，增强了作为强有力佐剂的免疫刺激活性。Suzuki等显示，包胶在阳离子型脂质体中的CpG-DNA诱导了IL-12和IFN-γ的表达，并且共包胶有卵清蛋白(OVA)的CpG-DNA-脂质体引起OVA特异性CTL的诱导，其表现出对抗表达OVA的肿瘤的强细胞毒性(22)。此外，SSCL增加了被B细胞、树突状细胞和巨噬细胞的摄取，并且CpG-DNA与OVA

的共包胶增加了抗原特异性 IFN-γ 和 IgG 生产 (23)。此外，Li 等的调查显示，共包胶在 DSPC/Chol 脂质体中的 CpG-DNA 和 HER-2/neu 衍生肽增强了 CTL 应答和 IgG 生产 (24)。

[0008] 硫代磷酸酯改性的 CpG-DNA(PS-DNA) 已被用于临床应用 (25)，所述改性用硫取代骨架中非桥接的氧，为其提供了核酸酶抗性和向细胞中的高效摄入。然而，几项研究指出，PS-DNA 引起骨架相关的副作用，例如暂时性脾肿大、淋巴滤泡破坏和关节炎 (26-28)。因此，调查人员开发了磷酸二酯键 CpG-DNA(PO-DNA) 的天然对应物以诱导没有严重副作用的最优先天免疫应答。与 PS-DNA 相反，在人类细胞中没有观察到 PO-DNA 的效应。然而，报道了在用包胶在脂质体 (DOTAP，lipofectin) 中的 PO-DNA 和非 CpG-DNA 刺激的人类细胞中，诱导了有效的免疫应答 (29,30)。

[0009] 在以前的研究中，我们通过牛分枝杆菌 (M.bovis) 基因组 DNA 的计算机辅助分析鉴定了天然磷酸二酯键 CpG-DNA(PO-DNA)，并筛选到具有免疫刺激活性的牛分枝杆菌基因组 DNA 序列 (31)。我们的实验分析证实了含有 CpG 基序的有效 PO-DNA、即 MB-ODN4531(O)，具有作为强有力佐剂诱导抗原驱动的 Th1 应答而没有严重副作用的功能效应 (31,32)。在本研究中，我们比较了包胶在几种脂质体中的 PO-DNA(MB-ODN4531(O)) 在人类和小鼠细胞中刺激免疫应答的能力。此外，我们显示，包胶在 DOPE/CHEMS 脂质体中的 PO-DNA(MB-ODN4531(O)) 和几种肽显著增加了肽特异性 IgG 生产。这些结果表明，通过用 DOPE/CHEMS 脂质体递送以及使用 MB-ODN4531(O) 的佐剂效应，增进了肽疫苗的效能，其可以被迅捷地用于传染病大流行、治疗性抗体的开发和暴露于生物恐怖主义药剂的应用中。

[0010] 在整个本申请中参考了各种出版物和专利，其引用被提供在括号中。为了充分描述本发明以及本发明所属技术领域的现状，在此将这些出版物和专利的公开内容以其全文引为本申请的参考。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人进行了深入研究，以开发能够预防和治疗各种癌症和传染病的新的免疫佐剂。结果，他们鉴定到了蛋白抗原的肽表位，并发现将所述表位和寡核苷酸包胶在具有特定组成的脂质体中提供了极大增强的免疫刺激活性。

[0013] 因此，本发明的目的是提供用于增强免疫应答的组合物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于具有免疫原性的表位的筛选方法。

[0015] 本发明的另一个目的是提供用于针对蛋白抗原的抗体的筛选方法。

[0016] 本发明的另一个目的是提供针对蛋白抗原的抗体的制备方法。

[0017] 本发明的另一个目的是提供对抗甲型流感病毒、癌症、丙肝病毒或 RSV（呼吸道合胞病毒）的肽类疫苗组合物。

[0018] 从下面的详细描述以及随附的权利要求书和附图，本发明的其他目的和优点将变得明显。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1a-1c 显示了用脂质体 (DOPE:CHEMS(1:1)) 和 HEL（鸡卵溶菌酶）复合物腹膜内免疫的 BALB/c 小鼠的体液应答。以 10 日的时间间隔三次注射 HEL-MB-ODN4531(O)- 脂质体复合物。然后分析 IgG（图 1a）、Ig G1（图 1b）和 Ig G2a（图 1c）的生产，以证实总 IgG 的生产和与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产增加。我们将包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 MB-ODN4531(O) 定义为 Lipoplex(O)。

[0021] 图 2a-2e 显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性，从甲型禽流感 (H5N1)/Vietnam/2004 毒株的 HA（血细胞凝集素）选择用于制备肽 -PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 脂质体复合物的表位。将所选的 10 个候选表位 (hH5N1HA58、hH5N1HA113、hH5N1HA233、hH5N1HA336、hH5N1HA363、hH5N1HA370、hH5N1HA377、hH5N1HA384、hH5N1HA387 和 hH5N1HA394) 制备成肽 -PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 脂质体复合物，然后三次腹膜内给药于 BALB/c 小鼠，并收集血清。作为分析 IgG 量的结果，证实了每种肽特异性总 IgG 的量（图 2a) 和每种肽特异性总 IgG 的滴度（图 2d) 以及与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产（图 2c) 增加了。此外，我们还检查到在二次和三次应答中产生了更大量的 hH5N1HA370 肽特异性 IgG(IgG2a)（图 2e)。A/Vietnam/1203/2004hH5N1HA 蛋白的氨基酸序列根据与人类 H3 序列 (A/Aichi/2/68) 的比对进行编号。

[0022] 图 3a-3b 显示了从收集到的血清得到的结果，所述血清通过向 BLAB/c 小鼠三次腹膜内给药与各种脂质体 (DOPE:CHEMS（比例为 6:4)、DOPE:CHEMS（比例为 1:1)、DOPE:CHEMS（比例为 1:0)、DOPE:CHEMS（比例为 0:1)、lipofectin、lipofectamine、DOTAP 或泊洛沙姆 407) 复合的 PO-DNA(MB-ODN4531(O)) 和肽 (H5N1HA233) 来获得。结果表明，当 DOPE:CHEMS 的摩尔比为 1:1 时，抗 H5N1HA233 肽的总 IgG 的量（图 3a) 和总 IgG 的滴度（图 3b) 最高。

[0023] 图 4 显示了从收集到的血清得到的结果，所述血清通过向 BLAB/c 小鼠三次腹膜内给药与 PO-DNA、PS-DNA 或各种非 CpG-DNA 复合的肽 (H5N1HA233) 和脂质体 (DOPE:CHEMS(1:1)) 来获得。结果表明，与非 CpG-DNA 相比，当与 PO-DNA4531(O) 或 PS-DNA4531(S) 复合时，抗 H5N1HA233 肽的总 IgG 的量最高。MB-ODN4531 在 H5N1HA233 肽特异性 IgG 生产中的佐剂效应是 CG 序列依赖性和骨架修饰不依赖性的。

[0024] 图 5 显示了对应于 H1N1 毒株和 H5N1 毒株中的 hH5N1HA370 表位的保守序列，以及保守序列特异性 IgG 的生产。按照表 3 和表 4 中的描述合成了 H1N1 毒株和 H5N1 毒株中对应于 A/Vietnam/1203/2004 毒株的 hH5N1HA370 表位的长为 17 个氨基酸的保守序列。用共包胶在 DOPE:CHEMS（比例为 1:1) 复合物中的 50μg 每种肽 (hH1N1-NYHA370、hH1N1-OH HA370、hH1N1-WSN HA370、A/H1N1-TX HA370、hH5N1HA370 和 hH5N1-HK HA370) 和 50μg MB-ODN4531(O)（用 Lipoplex(O)+ 肽表示），以 10 日的时间间隔对 5 只 BALB/c 小鼠进行三次腹膜内免疫接种。在最后一次免疫后 10 天收集抗血清，然后通过 ELISA 测定抗每种肽的特异性总 IgG 的量（图 5a)、抗每种肽的特异性 IgG1 的量（图 5b)、抗每种肽的特异性 IgG2a 的量（图 5c) 以及抗每种肽的特异性 IgG 的滴度（图 5d)。

[0025] 图 6 显示了使用 Lipoplex(O) 与对应于 hH5N1HA233 表位的保守序列的复合物的免疫接种对 IgG 生产的影响。合成了甲型流感病毒 H5N1 毒株（表 5) 和各种甲型流感病毒亚型（表 6) 中对应于 A/VietNam/1203/2004 毒株的 hH5N1HA233 表位的长为 14 个氨基酸的保守序列。用共包胶在 DOPE:CHEMS（比例为 1:1) 复合物中的 50μg 每种肽和 50μg MB-ODN4531(O)（用 Lipoplex(O)+ 肽表示），以 10 日的时间间隔对 3 只 BALB/c 小鼠进行三次腹膜内免疫接种。在最后一次免疫后 10 天收集抗血清，然后通过 ELISA 测定抗每种肽的特异性总 IgG 的量（图 6a，图 6d)、抗每种肽的特异性 IgG1 的量（图 6b)、抗每种肽的特异性 IgG2a 的量（图 6c)。

[0026] 图 7 显示了共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的对应于 hH5N1HA370（或 hH5N1HA233)

的保守序列和MB-ODN4531(O)对IgG生产的影响。合成了甲型流感病毒亚型(H7和H9)(表6,表9)中对应于A/Viet Nam/1203/2004毒株的hH5N1HA370(或hH5N1HA233)表位的长为17个氨基酸的保守序列。用共包胶在DOPE:CHEMS(比例为1:1)复合物中的50μg每种肽和50μg MB-ODN4531(O)(用Lipoplex(O)+肽表示),以10日的时间间隔对3只BALB/c小鼠进行三次腹膜内免疫接种。在最后一次免疫后10天收集抗血清,然后通过ELISA测定抗每种肽的特异性总IgG的量。

[0027] 图8a-8f显示了血凝抑制和病毒中和的分析,证实了H5N1HA蛋白和H1N1HA蛋白被通过PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233、hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS复合物所产生的抗血清的特异性识别。图8a显示,由PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233、hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS复合物所产生的每种抗血清抑制由重组H5N1病毒(rH5N1病毒PR8/H5Lo)和A/WSN/1993病毒诱导的鸡红细胞的血凝。图8b-f显示,由PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSNHA233、hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS复合物所产生的每种抗血清抑制rH5N1病毒PR8/H5Lo和A/WSN/1993病毒对MDCK细胞的感染。

[0028] 图9a-9d显示了在rH5N1病毒激惹的小鼠中用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-DOPE:CHEMS复合物预防接种的预防效能。以10日的时间间隔两次用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物对BALB/c小鼠进行腹膜内免疫接种,然后鼻部给药10LD50rH5N1病毒(PR8/H5Lo)。图9a显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后存活。图9b表明,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后体重重新增加。图9c显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后具有正常的肺部组织。图9d显示,在用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠中,在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后3日内和6日内肺部组织中的病毒减少。

[0029] 图10a-10d显示了在小鼠适应性A/WSN/1933H1N1病毒(maA/WSN/1933病毒)激惹的小鼠中用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-DOPE:CHEMS复合物预防接种的预防效能。以10日的时间间隔两次用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物对BALB/c小鼠进行腹膜内免疫接种,然后鼻部给药10LD50maA/WSN/1933病毒。图10a显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50maA/WSN/1993病毒后存活。图10b表明,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50maA/WSN/1993病毒后体重重新增加。图10c显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50maA/WSN/1993病毒后具有正常的肺部组织。图10d显示,在用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠中,在鼻部给药10LD50maA/WSN/1993病毒后3日内和6日内肺部组织中的病毒减少。

[0030] 图11a-11c显示了在rH5N1病毒激惹的小鼠中用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA233)-DOPE:CHEMS复合物预防接种的预防效能。以10日的时间间隔两次

用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫接种，然后鼻部给药 10LD50rH5N1 病毒 (PR8/H5Lo)。图 11a 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50rH5N1 病毒后存活。图 11b 表明，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50rH5N1 病毒后恢复其体重。图 11c 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50rH5N1 病毒后具有正常的肺部组织。

[0031] 图 12a-12b 显示了在 maA/WSN/1933 病毒激惹的小鼠中用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)-DOPE:CHEMS 复合物预防接种的预防效能。以 10 日的时间间隔两次用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫接种，然后鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒。图 12a 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1993 病毒后存活。图 12b 表明，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1993 病毒后恢复其体重。

[0032] 图 13a-13c 显示了在 maA/WSN/1933 病毒或 rH5N1 病毒 (PR8/H5Lo) 激惹的小鼠中用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-WSN HA233)-DOPE:CHEMS 复合物预防接种的预防效能。以 10 日的时间间隔两次用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-WSN HA233)- 脂质体复合物对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫接种，然后鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒或 10LD50rH5N1 病毒 PR8/H5Lo。图 13a 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-WSN HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒或 10LD50rH5N1 病毒后存活。图 13b 表明，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-WSN HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒或 10LD50rH5N1 病毒后恢复其体重。图 13c 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-WSN HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒或 10LD50rH5N1 病毒后具有正常的肺部组织。

[0033] 图 14a-14c 显示了在 maA/WSN/1933 病毒激惹的小鼠中用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-HKN HA233)-DOPE:CHEMS 复合物预防接种的预防效能。以 10 日的时间间隔两次用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-HK HA233)- 脂质体复合物对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫接种，然后鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒。图 14a 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-HK HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒后存活。图 14b 表明，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-HK HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒后恢复其体重。图 13c 显示，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH1N1-HK HA233)- 脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药 10LD50maA/WSN/1933 病毒后具有正常的肺部组织。

[0034] 图 15a-15b 显示了在 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233、hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 复合物给药的小鼠中，通过在鼻部给药 10LD50rH5N1 病毒 (PR8/H5Lo)(图 15a) 和 10LD50maA/WSN/1993 病毒 (图 15b) 后产生的抗血清进行的血凝抑制。

[0035] 图 16a-16f 显示，在用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233、hH1N1-HK HA233)-DOPE:CHEMS 复合物给药、然后鼻部给药 10LD50rH5N1

病毒或10LD50maA/WSN/1993病毒的小鼠的血清和BALF(支气管肺泡灌洗液)中,针对每种表位的IgG和IgA抗体的生产显著增加。

[0036] 图17a-17d显示了在rH5N1病毒激惹的小鼠中用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-DOPE:CHEMS复合物预防接种的预防效能。以10日的时间间隔两次用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物对BALB/c小鼠进行腹膜内免疫接种,然后在接种后2个月内鼻部给药10LD50rH5N1病毒。图17a显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后存活。图17b表明,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后恢复其体重。图17c显示,用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后具有正常的肺部组织。图17d显示,在用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽(hH5N1HA370)-脂质体复合物给药的小鼠中,在鼻部给药10LD50rH5N1病毒后3日或6日内肺部组织中的病毒减少。

[0037] 图18a-18d表明,使用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-表位-DOPE:CHEMS复合物进行表位特异性抗体生产比使用病毒更有效。图18a显示,在以10日的时间间隔三次腹膜内给药PO-DNA(MB-ODN4531(O))-UV灭活的rH5N1病毒-DOPE:CHEMS复合物(Lipoplex(O)+灭活的PR8/H5Lo)的小鼠中,与病毒特异性结合的总IgG和与Th1免疫应答相关的IgG2a的生产增加。图18b显示,在以10日的时间间隔三次腹膜内给药PO-DNA(MB-ODN4531(O))-UV灭活的rH5N1病毒-DOPE:CHEMS复合物的小鼠中,总IgG的滴度增加。图18c-18d显示,在使用PO-DNA(MB-ODN4531(O))-表位(hH5N1HA233或hH5N1HA370)-DOPE:CHEMS复合物预防接种的血清中,与每种肽结合的总IgG的滴度增加。

[0038] 图19a-19d显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性,从HCV-E1蛋白的三个候选表位(表10)中选择用于开发基于PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽-DOPE:CHEMS复合物的疫苗的表位。将所选的3个候选表位(HCV-E157、HCV-E1202、HCV-E1269)制备成PO-DNA(MB-ODN4531(O))-每种肽-脂质体复合物,然后三次腹膜内给药于BALB/c小鼠,并收集血清。证实了HCV-E157肽特异性总IgG的生产(图19a)增加。此外,在用HCV-E1202肽预防接种的血清中,总IgG的量(图19a)以及与Th1免疫应答相关的IgG2a的量和滴度(图19b和19c)增加。此外,本发明人还从用与各种脂质体复合的MB-ODN4531(O)和肽(HCV-E1202)三次腹膜内给药的BALB/c小鼠收集血清。当DOPE:CHEMS的摩尔比为1:1时(图19d),HCV-E1202肽特异性总IgG的滴度最高。

[0039] 图20a-20c显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性,从HSRV(人类呼吸道合胞病毒)G和F蛋白中的3个候选表位(表10)中选择用于开发基于PO-DNA(MB-ODN4531(O))-肽-DOPE:CHEMS复合物的疫苗的表位。将所选的3个候选表位(HSRV-G1、HSRV-G150、HSRV-F99)制备成MB-ODN4531(O)-每种肽-脂质体复合物,然后三次腹膜内给药于BALB/c小鼠,并收集血清。证实了HSRV-G1肽特异性总IgG(图20a)和IgG2a(图20b)的生产增加。此外,在用HSRV-G1肽肽预防接种的血清中,HSRV-G1肽特异性总IgG的滴度(图20c)和与Th1免疫应答相关的IgG2a的生产(图20b和20c)增加。

[0040] 图21a-21d显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性,从HSRV(人类呼吸道合胞病毒)F蛋白中的17个候选表位(表11和12)中选择用于开发

基于 PO-DNA- 肽 - 脂质体复合物的疫苗的表位。将每种所选的 17 个候选表位制备成 MB-ODN4531(O)- 每种肽 - 脂质体复合物，然后三或四次腹膜内给药于 BALB/c 小鼠，并收集血清。证实了与 4 个候选 (HSRV-F3a、HSRV-F3a-2、HSRV-F7、HSRV-F9) 肽特异性结合的总 IgG(图 21a、21b、21c 和 21d) 和 IgG2a(图 21b、21c 和 21d) 的生产增加。

[0041] 图 22a-22b 显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性，从人类整合蛋白 β4(在大多数癌细胞中表达) 中的 6 个候选表位 (表 13) 中选择用于开发基于 PO-DNA- 肽 - 脂质体复合物的疫苗的表位。将每个所选的 6 个候选表位制备成 MB-ODN4531(O)- 每种肽 - 脂质体复合物，然后四次腹膜内给药于 BALB/c 小鼠，并收集血清。证实了与 4 个候选表位 (hIB4-VWA-1-2、hIB4-VWA-1-3、hIB4-VWA-2、hIB4-VWA-3、hIB4-EGF-1) 肽特异性结合的总 IgG 的量 (图 22a) 和总 IgG 的滴度 (图 22b) 增加。

[0042] 图 23a-23f 显示了考虑到亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性，从已知在肝癌中特异性表达的 hTM4SF5(人类四次跨膜蛋白 4 超家族成员 5) 蛋白中的 6 个候选表位 (表 10) 中选择表位。将所选的 6 个候选表位 (hTM4SF5R1、hTM4SF5R2-1、hTM4SF5R2-2、hTM4SF5R2-3、hTM4SF5R2-4、hTM4SF5R2-5) 制备成 MB-ODN4531(O)- 每种肽 - 脂质体复合物，然后三次腹膜内给药于 BALB/c 小鼠，并收集血清。证实了 hTM4SF5R2-3 和 hTM4SF5R2-5 肽特异性总 IgG(图 22a) 以及 IgG2a(图 22b) 的生产增加。此外，在用 hTM4SF5R2-3 肽预防接种的血清中，总 IgG 的滴度 (图 22b) 和与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产 (图 22b) 增加。此外，本发明人还从用与各种脂质体复合的 MB-ODN4531(O) 和肽 (hTM4SF5R2-3) 三次腹膜内给药的 BALB/c 小鼠收集血清。当 DOPE:CHEMS 的摩尔比为 1:1 时 (图 22c)，hTM4SF5R2-3 肽特异性总 IgG 的滴度最高。本发明人从用与脂质体 (DOPE:CHEMS(1:1)) 复合的 hTM4SF5R2-3-CpG-DNA(MB-ODN4531(O)、MB-ODN4531GC(O) 或 MB-ODN4531(S)) 给药的小鼠收集血清 (图 22d)。在 MB-ODN4531(O) 中 hTM4SF5R2-3 肽特异性总 IgG 的滴度最高。本发明人从用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SFR2-3 肽 -DOPE:CHEMS 复合物三次腹膜内给药的 TLR9 敲除的 BALB/c 小鼠收集血清 (图 22e-22f)。TLR9 敲除的 BALB/c 小鼠没有显示出总 hTM4SF5R2-3 肽特异性 IgG 的任何滴度，表明通过 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SFR2-3 肽 -DOPE:CHEMS 复合物产生抗体依赖于 TLR9。

[0043] 图 24a-24f 显示了 II 类 MHC 介导的呈递和 Th1 分化对通过用共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的表位和 MB-ODN4531(O) 免疫接种引起的 IgG 生产的影响。图 24a 显示了对共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 做出响应的 IgG 生产的动力学。以 10 日的时间间隔三次用共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 对 3 只 BALB/c 小鼠进行腹膜内注射。在相对于免疫接种时间的第 1 天四次腹膜内收集血清，并通过 ELISA 测定肽特异性总 IgG、IgG1、IgG2a 和 IgM 的量。图 24b 显示，$CD4^+$ 细胞的瞬时贫化阻止了由共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种所引起的 IgG 生产。在相对于免疫接种时间的第 -3、-1、1 和 3 日，四次向每只小鼠腹膜内注射 100μg GK1.5(抗 CD4 抗体)。从第 0 日起，以 10 日的间隔时间三次向 3 只小鼠腹膜内注射共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O)(用 Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3 表示)。收集血清并通过 ELISA 测定肽特异性总 IgG 的量。使用正常 IgG 作为对照。(图 24c 和 24d)。由共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 HCVE2-202 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种所引起的 IgG 生产需要 II 类 MHC 和 II

类 MHC 限制的 T 细胞活化。以 10 日的时间间隔，用共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 50μg HCVE2-202 肽和 50μgMB-ODN4531(O)（用 Lipoplex(O)+HCVE2-202 表示）三次腹膜内注射 C57BL/6 小鼠、C57BL/6II 类 MHC 敲除小鼠 (MHC-II KO)（图 23c）或 C57BL/6OT-II 转基因小鼠 (OT-II TG)（图 23d)(n = 3)。收集血清并通过 ELISA 测定 HCVE2-202 肽特异性总 IgG、IgG1、IgG2a 的量（图 24e and24f)。由共包胶在 DOPE:CHEMS 复合物中的 50μghTM4SF5R2-3 肽和 50μg MB-ODN4531(O) 的免疫接种所引起的 IgG 生产需要 STAT4 而不是 STAT6。以 10 日的时间间隔，用共包胶在 DOPE:CHEMS（比例为 1:1）复合物中的 50μg hTM4SF5R2-3 肽和 50μgMB-ODN4531(O)（用 Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3 表示）三次腹膜内注射 BALB/c 小鼠、BALB/c STAT4 敲除小鼠 (STAT4KO)（图 23e）或 BALB/c STAT6 敲除小鼠 (STAT6KO)（图 23f)(n = 3)。收集血清并使用 ELISA 测定 hTM4SF5R2-3 肽特异性总 IgG、IgG1、IgG2a 的量。这些实验执行了 2 或 3 次，获得相同的结果。

[0044] 图 25a-25e 显示出 hTM4SF5R2-3 肽特异性抗体识别肝癌细胞的 TM4SF5 蛋白并调节肝癌细胞的功能。在 Huh-7 和 SNU-761 中通过 RT-PCR 观察到 TM4SF5 的表达（图 25a)。通过 FACS 证实了 hTM4SF5R2-3 肽特异性单克隆抗体识别 Huh-7 和 SNU-761 细胞的 TM4SF5 蛋白（图 25b)。图 25c 通过 MTT 测定法显示，当用 hTM4SF5R2-3 肽特异性单克隆抗体处理肝癌细胞时，表达 TM4SF5 的 Huh-7 细胞的生长被抑制。图 25d 显示，通过 hTM4SF5R2-3 肽特异性单克隆抗体的处理，Huh-7 细胞的 S- 期减少。图 25e 显示，当用 hTM4SF5R2-3 肽特异性单克隆抗体处理表达 TM4SF5 的肝癌细胞 (Huh-7) 时，肌动蛋白具有独特的应力纤维外形，支撑着与不表达 TM4SF5 的细胞中相同的外延的多边形形状。尽管已知在表达 TM4SF5 的肝癌细胞中能够观察到肌动蛋白的异常集束，但通过肌动蛋白染色在不表达 TM4SF5 的细胞中检测到了具有支撑外延的多边形形状的独特外形的应力纤维。用抗 hTM4SF5R2-3 抗体处理的表达 TM4SF5 的细胞 (Huh-7)，强烈诱导与不表达 TM4SF5 的细胞的肌动蛋白类似的外形独特的应力纤维。这些结果表明抗体靶向表达 hTM4SF5 的细胞。

[0045] 图 26a-26c 显示出 hTM4SF5R2-3 肽特异性抗体在体内抑制人类肝癌细胞生长。从肿瘤移植后第 7 日起，以 3 日的时间间隔 5 次给药 10mg/Kg hTM4SF5R2-3 肽特异性抗体，对带有 Huh-7 细胞异体移植物的无胸腺裸鼠进行处理（图 26a)。当肿瘤尺寸达到 ±2000mm^3 的体积时，将小鼠处死并评估肿瘤的重量（图 26b)。

[0046] 图 27a-27b 显示了在用 BNL-HCC 细胞激惹的同种异体移植肝癌模型中，用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SF5R2-3 肽 -DOPE:CHEMS 复合物进行预防接种的预防效能。以 10 日的时间间隔三次用 PO-DNA(MB-ODN4531(O))-hTM4SF5R2-3 肽 - 脂质体复合物对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫接种，然后将含有 50％基质胶的 5x10^6 个 BNL-HCC 细胞皮下接种到背部右侧中。在肿瘤细胞抑制后 7 周将小鼠处死，并评估肿瘤的重量。

[0047] 发明详述

[0048] 在本发明的一个方面，提供了用于增强免疫应答的组合物，所述组合物作为活性成分包含包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中的 (a) 免疫刺激性寡核苷酸和 (b) 表位。本发明人为了开发能够预防和治疗各种癌症和传染病的的新免疫佐剂已进行了深入研究。结果，它们鉴定了蛋白抗原的肽表位，并发现包胶在特定组成的脂质体中的表位和寡核苷酸提供了极大增强的免疫刺激活性。

[0049] 当在本文中使用时，术语“阴离子型表面活性剂”是指由具有疏水和亲水两部分

并在整个分子上带有负电荷的两亲分子构成的试剂。优选情况下，本发明的阴离子型表面活性剂包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰丝氨酸、磷酸二鲸蜡酯、磷脂酸、二酰基磷脂酸、油酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、NSPE(N- 琥珀酰磷脂酰乙醇胺)、NGPE(N- 戊二酰磷脂酰乙醇胺)、LPG(赖氨酰磷脂酰甘油)和 CHEMS(胆甾醇半琥珀酸酯)。更优选情况下，本发明的阴离子型表面活性剂是 CHEMS。

[0050] 当在本文中使用时，术语“中性磷脂”是指类似两性离子，在即使在一部分原子上带电荷，但在整个分子上具有零正电荷的磷脂，以及其中每个原子都不带电荷的磷脂。优选情况下，本发明的中性磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱、DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)、DSPC(1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱)、DMPC(二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱)、胆甾醇、PEG-PE(聚乙二醇磷脂酰乙醇胺)、DOPC(二油酰磷脂酰胆碱)和 DOPE(二油烯基磷脂酰乙醇胺)。更优选情况下，本发明的中性磷脂是 DOPE。

[0051] 当在本文中使用时，术语“脂质体”是指通过形成脂双层而制备的脂类载体。脂质体通常是生物相容的，并且由于其两亲性能够通过疏水质膜。取决于制备方法和所递送的核苷酸的长度，脂质体的直径一般为 20-2000nm。

[0052] 根据优选实施方案，本发明的脂质体是 CHEMS 与 DOPE 的混合物。

[0053] 本发明的 DOPE :CHEMS 的摩尔比优选为 7 :3-3 :7，更优选为 4.5 :5.5-5.5 :4.5，最优选为 5.0 :5.0。

[0054] 本发明的脂质体的制备可以通过本技术领域的专业人员已知的各种方法来进行，并优选通过有机溶液混合法或去污剂混合法 (US5705385 ;US08/660,025) 来制备。更优选情况下，可以通过将 DOPE 与 CHEMS 混合，用氮气蒸发成无溶剂脂质膜的形式，溶解在醇溶液中，最后与水溶性核苷酸混合物混合，来制造脂质体。

[0055] 在通过混合有机溶剂制备本发明的脂质体的情况下，所述有机溶剂包括氯仿、甲醇、乙醇、正丙醇或丁醇。优选情况下，所述有机溶剂是乙醇。

[0056] 当在本文中使用时，术语“包胶”是指将待递送材料包封在相对稳定的壳中，用于在体内高效递送。

[0057] 当在本文中使用时，术语“免疫刺激性”是指以可测量的程度诱导针对抗原的初始免疫应答或增加已有免疫应答。

[0058] 本发明的免疫刺激性寡核苷酸包含本技术领域的专业人员已知的任何免疫刺激性寡核苷酸。例如，所述免疫刺激性寡核苷酸可以是形成发夹结构的回文序列、CpG 基序、CpT 基序、多个 G 的结构域或其他已知 ISS(免疫刺激性序列)。例如，本发明的免疫刺激性寡核苷酸包含在 US20080045473、WO2006/063152 或 WO1998/18810 中公开的寡核苷酸。

[0059] 所述 CpG 寡核苷酸包括在 WO2006/080596 中公开的由本发明人开发的那些 CpG 寡核苷酸。例如，可以使用由下式表示的 CpG 寡核苷酸 :HKCGTTCRTGCSGM(其中 R 是 A 或 G ;S 是 C 或 G ;H 是 A、T 或 C ;K 是 G 或 T ;M 是 C 或 A)。

[0060] 本发明的免疫刺激性寡核苷酸包括天然存在的核苷酸、骨架修饰的核苷酸(例如肽核酸 (PNA)(M.Egholm 等，Nature,365:566-568(1993))、硫代磷酸酯 DNA、二硫代磷酸酯 DNA、氨基磷酸酯 DNA、酰胺连接的 DNA、MMI 连接的 DNA、2'-O- 甲基 RNA、α -DNA 和膦酸甲酯 DNA)、糖修饰的核苷酸(例如 2'-O- 甲基 RNA、2'- 氟代 RNA、2'- 氨基 RNA、2'-O- 烷基 DNA、2'-O- 烯丙基 DNA、2'-O- 炔基 DNA、己糖 DNA、吡喃糖基 RNA 和失水己糖醇 DNA) 以及碱基修

饰的核苷酸（例如 C-5 取代的嘧啶（取代基包括氟 -、溴 -、氯 -、碘 -、甲基 -、乙基 -、乙烯基 -、甲酰基 -、乙炔基 -、丙炔基 -、炔基 -、噻唑基 -、咪唑基 - 和吡啶基）、具有 C-7 取代基的 7- 脱氮杂嘌呤（取代基包括氟 -、溴 -、氯 -、碘 -、甲基 -、乙基 -、乙烯基 -、甲酰基 -、炔基 -、烯基 -、噻唑基 -、咪唑基 - 和吡啶基）、次黄苷和二氨基嘌呤）。优选情况下，本发明的寡核苷酸是天然存在的核苷酸。

[0061] 根据优选实施方案，本发明的免疫刺激性寡核苷酸具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架。

[0062] 本发明的免疫刺激性寡核苷酸的长度是优选为 8-100 个核苷酸，更优选为 15-50 个核苷酸，最优选为 13-25 个核苷酸，但不限于此。

[0063] 优选情况下，本发明的免疫刺激性寡核苷酸选自 SEQ ID NO:14 至 SEQ ID NO:18。更优选情况下，本发明的免疫刺激性寡核苷酸是 SEQ ID NO:14。

[0064] 本发明人以前的实验分析证实了源于牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis) 基因组 DNA 的潜在的 CpG-DNA 作为 Th1 应答性佐剂发挥效力，并且它激活转录因子 NF-κB(31)。

[0065] 具体来说，本发明的寡核苷酸是位于牛分枝杆菌基因组 DNA 上 4531 位的 20bp 的寡核苷酸 MB-ODN4531(SEQ ID NO:14)、MB-ODN4531 上的一个 CG 二核苷酸被 GC 二核苷酸代替的 MB-ODN4531(GCO)(SEQ ID NO:15)、MB-ODN4531 的 3’- 末端的 7 个碱基被删除并且骨架中的桥接氧原子被硫原子代替的 MB-ODN4531(S)T13(SEQ ID NO:16)、一个 CG 二核苷酸被 CT 二核苷酸代替并且骨架中的桥接氧原子被硫原子代替的 MB-ODN4531(S)CT 寡核苷酸 (SEQ ID NO:17) 和具有与 MB-ODN4531 互补的序列并且骨架中的桥接氧原子被硫原子代替的 MB-ODN4531(S)CS 寡核苷酸 (SEQ ID NO:18)。本发明人的实验分析揭示，在各具有不同寡核苷酸的所有复合物中，给药 MB-ODN4531 寡核苷酸 / 肽 / 脂质体复合物诱导最高的总 IgG 水平。

[0066] 当在本文中使用时，术语“表位”是指抗原与抗体相互作用的部分。更具体来说，术语表位包括能够与免疫球蛋白或 T- 细胞受体特异性结合的任何蛋白决定簇。此外，本发明的表位包括能够增强免疫应答的任何分子或材料。例如，本发明的表位包括但不限于肽、编码所述肽的核酸和糖蛋白。

[0067] 当在本文中使用时，术语“肽”是指通过氨基酸残基之间的肽键形成的线性分子，术语“肽表位”是指包含能够诱导 B 细胞和 / 或 T 细胞的特异性应答的表位的肽。

[0068] 本发明的肽表位的长度优选为 7-30 个氨基酸，更优选为 10-25 个氨基酸，最优选为 10-17 个氨基酸，但不限于此。

[0069] 根据优选实施方案，本发明的表位是具有选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列的肽表位。

[0070] 本发明人合成了源于甲型禽流感病毒的 HA 蛋白、甲型猪流感病毒的 HA 蛋白、H1N1 甲型流感病毒的 HA 蛋白、H7 甲型流感病毒的 HA 蛋白、H9 甲型流感病毒的 HA 蛋白、肝癌的 hTM4SF5（人类四次跨膜蛋白 4 超家族成员 5）蛋白、人类整合蛋白 β4(hIB4)、丙肝病毒的包膜蛋白、RSV（呼吸道合胞病毒）的黏附 (G) 糖蛋白 (HRSV-G) 和 RSV 的融合蛋白 (HRSV-F) 的肽。然后通过筛选在给药时增加免疫应答的肽，获得了 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:46。因此，包含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:37 的任一氨基酸序列的肽都具有针对甲型流感病毒的免疫刺激效应，包含 SEQ

ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的肽都具有针对肝癌的免疫刺激效应，包含 SEQ ID NO:42 至 SEQ ID NO46 的氨基酸序列的肽都具有对人类整合蛋白 β4 的免疫刺激效应，包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的肽具有针对丙肝病毒的免疫刺激效应，包含 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:38 至 SEQ ID NO41 的氨基酸序列的肽都具有针对 RSV 的免疫刺激效应。

[0071] 本发明的组合物可以包含其他药物或免疫佐剂以提供附加的免疫刺激效应。免疫佐剂的类型对于本技术领域的专业人员来说是已知的（“疫苗设计——亚基和佐剂方法”(Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach)，1995，《药物生物技术》(Pharmaceutical Biotechnology)，第 6 卷，Powell,M.F. 和 Newman,M.J. 主编，Plenum Press,New York and London,ISBN0-306-44867-X)。优选情况下，本发明的免疫佐剂包括铝盐或钙盐（例如氢氧化物或磷酸盐）。

[0072] 优选的免疫佐剂的实例包括但不限于：铝盐，钙盐（例如氢氧化物或磷酸盐），颗粒载体 (WO96/33739) 如水包油乳液 (WO95/17210，EP0399843) 或脂质体，源于石碱木 (Quillaja Saponaria Molina) 的免疫活性皂角苷提取物（例如 Quil A)，3-O- 脱乙酰单磷酰脂 A，胞壁酰二肽，3D-MPL(3-O- 脱酰基单磷酰脂 A)。

[0073] 可以使用本发明的组合物作为治疗方法的病症或疾病的实例包括但不限于：

[0074] (i) 癌症（例如胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、支气管癌、鼻咽癌、喉癌、胰腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、前列腺癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌和输尿管癌）；

[0075] (ii) 病毒性疾病，例如由下列病毒的感染所引起的疾病：腺病毒、疱疹病毒（例如 HSV-I、HSV-II、CMV 或 VZV)、痘病毒（例如正痘病毒，如天花或牛痘或传染性软疣）、细小核糖核酸病毒（例如鼻病毒或肠道病毒）、正粘病毒（例如流感病毒包括 H5N1 禽流感病毒）、副粘病毒（例如 5- 副流感病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒和呼吸道合胞病毒 (RSV))、冠状病毒（例如 SARS)、乳多空病毒（例如乳头状瘤病毒，例如引起生殖器疣、寻常疣或跖疣的乳头状瘤病毒）、嗜肝 DNA 病毒（例如乙肝病毒）、黄病毒（例如丙肝病毒或登革病毒）或反转录病毒（例如慢病毒如 HIV）；

[0076] (iii) 细菌性疾病，例如由例如下列细菌的感染引起的疾病：埃希式杆菌属 (Escherichia)、肠杆菌属 (Enterobacter)、沙门氏菌属 (Salmonella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、志贺菌属 (Shigella)、李斯特菌属 (Listeria)、气杆菌属 (Aerobacter)、螺旋杆菌属 (Helicobacter)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形杆菌属 (Proteus)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、奈瑟菌属 (Neisseria)、梭状芽胞杆菌属 (Clostridium)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、棒状杆菌属 (Corynebacterium)、分枝杆菌属 (Mycobacterium)、弯曲杆菌属 (Campylobacter)、弧菌属 (Vibrio)、沙雷氏菌属 (Serratia)、普罗威登斯菌属 (Providencia)、色杆菌属 (Chromobacterium)、布鲁氏杆菌属 (Brucella)、耶尔森氏菌属 (Yersinia)、嗜血杆菌属 (Haemophilus) 或包特菌属 (Bordetella)；

[0077] (iv) 其他传染病，例如衣原体、真菌性疾病包括但不限于念珠菌病、曲霉病、组织胞浆菌病、隐球菌脑膜炎，或寄生性疾病包括但不限于疟疾、卡氏肺囊虫肺炎、利什曼原虫病、隐孢子虫病、弓形体病和锥虫感染；

[0078] (v)T_{H2} 介导的特异反应性疾病，例如特异反应性皮炎或湿疹、嗜酸性细胞增多症、

哮喘、过敏症、过敏性鼻炎和 Ommen 综合征；

[0079] (vi) 某些自体免疫疾病，例如 alopecia greata、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、自体免疫性阿狄森病、自体免疫性肾上腺炎、自体免疫性溶血性贫血、自体免疫性肝炎、自体免疫性卵巢炎和睾丸炎、自体免疫性血小板减少症、Behset 病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻 - 皮肤炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss 综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST 综合征、冷血凝素病、克罗恩病、盘状红斑狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛 - 纤维肌炎、肾小球肾炎、突眼性甲状腺肿、Guillain-Barre 综合征并发桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA 神经病、溃疡性结肠炎引起的幼年型关节炎、扁平苔癣、红斑狼疮、美尼尔氏病、混合型结缔组织病、多发性硬化症、I 型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、自身免疫性多内分泌腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷诺现象、赖特综合征、类风湿性关节炎、肉样瘤病、硬皮病、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、多发性大动脉炎、颞动脉炎、巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、眼色素层炎、白癜风和韦格纳肉芽肿；

[0080] (vii) 炎性疾病包括哮喘、脑炎、炎性结肠炎、慢性阻塞性肺病、过敏症、脓毒性休克、肺纤维变性、未分化脊柱关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解和由慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症；以及

[0081] (viii) 与伤口修复相关的疾病，例如瘢痕瘤形成和其他瘢痕类型的抑制，以及增强伤口愈合、包括慢性伤口。

[0082] 优选情况下，本发明的组合物用于癌症、病毒性疾病、细菌性疾病、传染病或自体免疫疾病。

[0083] 本发明的组合物可以提供成药物组合物。本发明的药物组合物除了活性成分化合物之外还包括可药用载体。本发明的药物组合物中包含的常用于药物制剂的可药用载体，包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钾、藻酸盐、明胶、硅酸钾、微晶体纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、甲基羟基苯甲酸酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油。本发明的药物组合物还可以包含润滑剂、保湿剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂和防腐剂。适合的可药用载体和制剂的详细情况，可以在《Remington 药物学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第 19 版，1995) 中发现。

[0084] 本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给药，并且优选通过肠胃外给药。对于肠胃外给药来说，它可以静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内或透皮给药。

[0085] 本发明的药物组合物的适合剂量，可以随着药物制剂方法、给药方法、患者的年龄、体重、性别、病原体状态、饮食、给药时间、给药路线、排泄率和对所使用的药物组合物的敏感性而变。优选情况下，本发明的药物组合物可以以 0.001-10000mg/kg(体重) 的每日剂量给药。

[0086] 可以按照本技术领域的专业人员已知的常规技术，用如上所述的可药用载体和 / 或介质配制本发明的药物组合物，最终提供几种形式，包括单位药剂形式和多剂形式。制剂的非限制性实例包括但不限于在油性或水性介质中的溶液、悬液或乳液、酏剂、粉剂、颗粒剂、片剂和胶囊，并且还可以包含分散剂或稳定剂。

[0087] 在本发明的另一方面，提供了用于具有免疫原性的表位的筛选方法，所述方法包含下列步骤：

[0088] (a)将(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0089] (b)用所述包胶有(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；

[0090] (c)分析所述被免疫非人类动物的免疫应答。

[0091] 由于本发明的表位、肽、免疫刺激性寡核苷酸和脂质体已在上文描述，因此在这里为了避免过度重复而将其省略。

[0092] 脂质体包胶的免疫刺激性寡核苷酸或肽的免疫接种方法包括本技术领域的专业人员已知的方法，优选为肠胃外给药。对于肠胃外给药来说，它可以静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内或透皮给药。

[0093] 在本发明中使用的“非人类动物”包括通常在本技术领域中使用的各种动物，优选为哺乳动物，最优选为小鼠、兔或大鼠。

[0094] 被免疫动物中免疫应答的测量，通过分析用所选脂质体包胶的肽给药的对象动物的血清中抗肽抗体(总IgG、IgG1和IgG2a)的滴度来进行。优选情况下，用于测量抗体滴度的方法包括但不限于ELISA(酶联免疫吸附测定法)、侧向流试验、MIA(磁免疫测定法)、免疫沉淀。更优选情况下，可以使用ELISA分析。

[0095] 当特定肽序列增加抗肽抗体的滴度时，所述特定肽被确定为表位或肽疫苗。

[0096] 在本发明的另一方面，提供了针对蛋白抗原的抗体的筛选方法，所述方法包含下列步骤：

[0097] (a)将(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0098] (b)用所述包胶有(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；以及

[0099] (c)通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位；

[0100] (d)将所述筛选到的肽表位与待分析的目标抗体相接触；

[0101] (e)将步骤(d)的结果与所述蛋白抗原相接触；以及

[0102] (f)分析所述蛋白抗原与目标抗体的结合。

[0103] 本发明的筛选方法可以通过各种方法来执行，特别是通过本技术领域的专业人员已知的各种结合测定法进行的高通量方法。

[0104] 本发明的蛋白抗原或候选抗体可以用可检测标记物标记。例如，所述可检测标记物包括但不限于化学标记物(例如生物素)、酶标记物(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、萤光素酶、β-半乳糖苷酶和β-葡萄糖苷酶)、放射活性标记物(例如C^{14}、I^{125}、P^{32}和S^{35})、荧光标记物(例如香豆素、荧光素、FITC(荧光素异硫氰酸酯)、罗丹明6G、罗丹明B、TAMRA(6-羧基-四甲基-罗丹明)、Cy-3、Cy-5、德克萨斯红、Alexa Fluor、DAPI(4,6-二咪基-2-苯基吲哚)、HEX、TET、Dabsyl和FAM)、发光标记物、化学发光标记物、FRET(荧光共振能量转移)标记物或金属标记物(例如金和银)。

[0105] 为了使用可检测标记的蛋白抗原或候选抗体，可以通过由标记物产生的信号来

分析蛋白抗原与抗体的结合。当使用碱性磷酸酶时，可以使用溴氯吲哚磷酸 (BCIP)、硝基四氮唑蓝 (NBT)、萘酚 -AS-B1- 磷酸盐和 ECF（增强化学发光物）作为底物；在使用辣根过氧化物酶的情况下，可以使用氯萘酚、氨基乙基咔唑、二氨基联苯胺、D- 萤光素、光泽精（双 -N- 甲基吖啶硝酸酯）、试卤灵苯甲基醚、发光氨、Amplex 红试剂 (10- 乙酰基 -3,7- 二羟基吩噁嗪，Pierce)、HYR（对苯二胺 -HCL 和邻苯二酚）、TMB(3,3,5,5- 四甲基联苯胺）、ABTS(2,2- 吖嗪 - 二 [3- 乙基苯并噻唑啉磺酸酯])、OPD（邻苯二胺）和萘酚 / 派洛宁作为底物。

[0106] 可选地，蛋白抗原与抗体的结合可以不需标记相互作用物来测量。例如，可以使用微生理记录仪来分析抗体与抗原的结合。微生理记录仪是使用 LAPS（光可寻址电位测定传感器）测定细胞的环境酸化率的装置。酸化率的改变可用作候选抗体与蛋白抗原结合的指示物 (33)。

[0107] 候选抗体与蛋白抗原的结合能力可以通过实时 BIA（生物分子相互作用分析）来测定 (34,35)。BIA 是不需标记相互作用物的特异性相互作用实时分析技术（例如 BIAcore™）。使用 SPR（表面等离子体共振）的变化作为分子间实时反应的指示物。

[0108] 在本发明的另一方面，提供了用于制备针对蛋白抗原的抗体的方法，所述方法包含下列步骤：

[0109] (a) 将 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0110] (b) 用所述包胶有 (i) 免疫刺激性寡核苷酸和 (ii) 作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；以及

[0111] (c) 通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位；

[0112] (d) 通过用所述筛选到的肽表位免疫非人类动物来生产抗体。

[0113] 根据本发明，从被免疫动物获得抗体的步骤通过本技术领域的专业人员已知的各种不同方法来剂型，所述方法包括乙醇沉淀方法、离子交换吸附层析或蛋白 A 或蛋白 G 柱层析。可选地，可以使用结合有特异性抗原的琼脂糖珠通过吸附层析从哺乳动物血浆分离纯的免疫球蛋白。可选地，还可以从具有从外周血淋巴结或 B 细胞获得的抗体蛋白的遗传信息的 cDNA 文库获取免疫球蛋白信息。根据所述信息，可以通过遗传工程方式制备免疫球蛋白。通过上述方法制备的遗传重组免疫球蛋白含有哺乳动物免疫球蛋白氨基酸或人源化遗传重组免疫球蛋白的基本序列及其部分突变 (Vaughan TJ 等，“人类抗体设计”(Human antibodies design)，Nature Biotech16:535-539(1998))。纯化的抗体在使用前可以储存在冰上。此外，本发明的方法可以另外包含通过从被免疫动物捕获 B 细胞来产生单克隆抗体、人源化抗体或亲和成熟抗体的步骤。

[0114] 在本发明的另一方面，提供了针对甲型流感病毒的肽类疫苗组合物，其包含选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列。

[0115] 在本发明的另一方面，提供了针对人类整合蛋白 β4 的肽类疫苗组合物，其包含选自 SEQ ID NO:42 至 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列。

[0116] 在本发明的另一方面，提供了针对肝癌的肽类疫苗组合物，其包含选自 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0117] 在本发明的另一方面，提供了针对丙肝病毒的肽类疫苗组合物，其包含 SEQ ID

NO:12 的氨基酸序列。

[0118] 在本发明的另一方面，提供了针对 RSV（呼吸道合胞病毒）的肽类疫苗组合物，其包含选自 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:38 至 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列。

[0119] 由于本发明的肽类疫苗在描述免疫刺激性组合物中已经提到过，因此在这里为了避免过度重复而将其省略。

[0120] 在本发明的另一方面，提供了用于预防或治疗甲型流感病毒传染病、癌症、肝癌、丙型肝炎或 RSV（呼吸道合胞病毒）传染病的方法。

[0121] 本发明的特点和优点概述如下：

[0122] (a) 本发明提供了用于增强免疫应答的组合物、具有免疫原性的表位、其筛选和制备方法、针对肽抗原的抗体及其筛选和制备方法。

[0123] (b) 本发明可以有效用于通过增强免疫应答来预防或治疗各种免疫缺陷疾病，例如癌症、流感病毒、丙肝病毒和 RSV（呼吸道合胞病毒）。

[0124] 现在将通过实施例对本发明进行进一步详细描述。对于本技术领域的专业人员来说，显然这些实施例的目的在于更具体地说明，而在随附的权利要求书中提出的本发明的范围不限于实施例或受实施例所限。

实施例

[0125] 实施例 1：寡脱氧核苷酸和试剂

[0126] ODN（寡脱氧核苷酸）从 Samchully Pharm(Seoul，韩国）合成。MB-ODN4531 由 20 的碱基构成，含有三个 CpG 基序（下划线）：AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT。在本研究中使用的 MB-ODN4531 序列是磷酸二酯 (O) 或硫代磷酸酯 (S) 修饰的。MB-ODN4531(O) 的硫代磷酸酯形式是 MB-ODN4531(S)。MB-ODN4531GC 是 MB-ODN4531 的衍生物，其中一个 CG 序列被倒置成 GC（下划线）：AGCAGGCTTCGTGTCGGCCT。将荧光或生物素标签偶联到每个 ODN 的 3’末端。ODN 的内毒素含量当通过 Limulus amebocyte 测定法 (Whittaker Bioproducts,Walkersville,MD,USA) 测量时，小于 1ng/mgODN。

[0127] 表 1. 合成的 ODN 衍生物

[0128]

ODN	序列	修饰
MB-ODN 4531（O）	AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT	无
MB-ODN 4531（GCO）	AGCAG**GC**TTCGTGTCGGCCT	无
MB-ODN 4531（S）	AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT	S
MB-ODN 4531（S）T13	AGCAGCGTTCTTG	S
MB-ODN 4531（S）CT	AGCAGCGTT**CT**TGTCGGCCT	S
MB-ODN 4531（S）CS	AGGCCGACAAGAACGCTGCT	S

[0129] CG 二核苷酸向 GC 或 CT 的改变用下划线的粗体字母标出。MB-ODN4531(S)CS 是 MB-ODN4531 的互补序列。无，磷酸二酯骨架连接；S，硫代磷酸酯骨架修饰

[0130] 实施例 2：候选表位的选择和肽的合成

[0131] 根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性指数、两亲性来选择肽序列。为了鉴定基于表位的肽的效应，我们从几个甲型流感病毒毒株的 HA 蛋白（表 2、3、4、5、6、7、8 和 9）、肝癌的 hTM4SF5（人类四次跨膜蛋白 4 超家族成员 5）蛋白、丙肝病毒的包膜蛋白、RSV（呼吸道合胞病毒）的黏附 (G) 糖蛋白 (G(hRSV-G))（表 10）、RSV 的融合蛋白 (HRSV-F)（表 11 和 12）和人类整合蛋白 β4(hIB4)（表 13）合成了长为 14 或 17 个氨基酸的肽。甲型流感病毒 HA 蛋白的氨基酸序列根据与人类 H3 序列 (A/Aichi/2/68) 的比对进行编号。肽通过 Fmoc 固相方法，使用自动肽合成仪 (Peptron III-R24, Peptron, Daejeon，韩国）来合成。在将合成的肽从树脂上去保护后，通过反相 HPLC(Waters2690Separations Module, Waters, Milford, USA)，使用 Vydac C8 分析型 RP 柱对肽进行纯化和分析，达到纯度 >90％。使用质谱仪 (HP1100Series LC/MSD, Hewlett-Packard, Roseville, USA) 对肽进行鉴定。

[0132] 表 2. A/Viet Nam/1203/2004hH5N1HA 蛋白的候选表位

[0133]

毒株	序列	位置	缩写
A/Vietnam/1203/2004 H5N1	ILEKKHNGKLC	58-68	hH5N1 HA58
	CYPGDFNDYEELK	113-125	hH5N1 HA113
	IATRSKVNGQSGRM	233-246	hH5N1 HA233
	LRNSPQRERRRKKRG	336-350	hH5N1 HA336
	VDGWYGYHHSNEQGSGYA	363-380	hH5N1 HA363
	HHSNEQGSGYAADKEST	370-386	hH5N1 HA370
	SGYAADKESTQKAIDGVT	377-394	hH5N1 HA377
	ESTQKAIDGVTNKVNSII	384-401	hH5N1 HA384
	QKAIDGVTNKVNSI	387-400	hH5N1 HA387
	TNKVNSIIDKMNTQ	394-407	hH5N1 HA394

[0134]

[0135] 根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性指数、两亲性，从 A/Vietnam/1203/2004H5N1HA 蛋白 (NCBI 数据库 AAW80717) 中选择用于表位筛选的肽序列 (http://tools.immuneepitpoe.org/main/index.html)。A/Vietnam/1203/2004hH5N1HA 蛋白的氨基酸序列根据与人类 H3 序列 (A/Aichi/2/68) 的比对进行编号。

[0136] 表 3. 对应于 hH5N1HA370 表位的序列在甲型流感病毒 H5N1 和 H1N1 毒株中的保守性

[0137]

毒株（亚型）	登记号	缩写	序列
A/Vietnam/1203/2004（H5N1）	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSNEQGSGYAADKEST
A/Hong Kong/485/97（H5N1）	AAD52043	hH5N1-HK HA370	HHSNEQGSGYAADQEST
A/WSN/1933（H1N1）	AAA43209	hH1N1-WSN HA370	HHQNEQGSGYAADQKST
A/New York/604/1995（H1N1）	ABE11867	hH1N1-NY HA370	HHQNEQGSGYAADKKST
A/Ohio/3559/1988（H1N1）	ABU80400	hH1N1-OH HA370	HHQNEQGSGYAADRKST

[0138]

[0139] 甲型流感病毒 HA 蛋白的氨基酸序列根据与人类 H3 序列 (A/Aichi/2/68) 的比对进行编号。

[0140] 表 4. 对应于 hH5N1 HA370 表位的序列在猪来源的甲型流感病毒 H1N1 毒株中的保守性

[0141]

毒株（分离编号）*	登记号	缩写	序列
A/Vietnam/1203/2004（H5N1）	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSNEQGSGYAADKEST
A/Texas/05/2009（H1N1）（1749/1750）	ACP41934	A/H1N1-TX HA370	HHQNEQGSGYAADLKST
A/San Antonio/PR922/2009（H1N1）（1/1750）	ACU29959	A/H1N1-SA HA370	HHQNEQGSGYAADMKST

[0142] （分离编号）* 表示含有特定序列的毒株在迄今为止分离到的猪来源的甲型流感 H1N1 病毒的 1750 个不同毒株中的编号。

[0143] 表 5. 来自 A/Vietnam/1203/2004 的 hH5N1 HA233 表位与来自其他 H5N1 毒株的相应序列的序列比对

[0144]

毒株/分离（分离编号）	登记号	缩写	序列
A/Viet Nam/1203/2004（229）	AAW80717	hH5N1 HA233	IATRSKVNGQSGRM
A/Hong Kong/482/97	AAC3210	hH5N1	IATRPKVNGQ

	（20）	0	HA233-1	SGRM
	A/Hong Kong/213/03（9）	BAE07201	hH5N1 HA233-2	IATRSKVNGQNGRM
	A/Indonesia/TLL007/2006（4）	ABW74707	hH5N1 HA233-3	MATRSKVNGQSGRM
	A/Viet Nam/JP4207/2005（3）	ABO10183	hH5N1 HA233-4	IATRSKVNGQSGRI
	A/Hong Kong/483/97（2）	AAC32099	hH5N1 HA233-5	IATRPKVNGQSGRI
	A/Egypt/14724-NAMRU3/2006（2）	ABM54179	hH5N1 HA233-6	IATRSKINGQSGRI
[0145]	A/Viet Nam/CL100/2004（2）	ABE97630	hH5N1 HA233-7	IATRSKINGQSGRM
	A/Anhui/2/2005（2）	ABD28181	hH5N1 HA233-8	IATRSKVNGRSGRM
	A/Egypt/0636-NAMRU3/2007（1）	ABM92273	hH5N1 HA233-9	IAARSKVNGQSGRM
	A/Thailand/1（KAN-1A）/2004（1）	ABL10088	hH5N1 HA233-10	IATRSEVNGQSGRM
	A/Egypt/2289-NAMRU3/2008（1）	ACI06181	hH5N1 HA233-11	IATRSKVNGQIGRM
	A/Egypt/3300-NAMRU3/2008（1）	ACI06185	hH5N1 HA233-12	IATRSKVNGQSGRV
	A/Anhui/T2/2006（1）	ABU80630	hH5N1 HA233-13	IATRTKVNGQSGRM

[0146]

A/Indonesia/CDC1032N/2007（1）	ABM90489	hH5N1 HA233-14	TATRSKVNGQSGRM

[0147] （分离编号）*表示含有特定序列的毒株在迄今为止分离到的人类H5N1病毒的279个不同毒株中的编号。

[0148] 表6. 对应于H5N1 HA233表位的序列在甲型流感病毒亚型中的保守性

[0149]

毒株/分离（亚型）	**登记号**	**缩写**	**序列**
A/Vietnam/1203/2004（H5N1）	AAW80717	hH5N1 HA233	IATRSKVNGQSGRM
A/WSN/1933（H1N1）	AAA43209	hH1N1-WSN HA233	IA**A**R**P**KV**KD**Q**H**GRM
A/Hong Kong/1131/1998（H1N1）	AAK70451	hH1N1-HK HA233	IA**K**R**P**KV**RD**Q**E**GR**I**
A/Thailand/271/2005（H1N1）	ABK57093	hH1N1-Thai HA233	IA**K**R**P**KV**R**GQ**A**GRM
A/Texas/05/2009（H1N1）	ACP41934	A/H1N1-TX HA233	IA**I**R**P**KV**RD**Q**E**GRM
A/Michigan/2/2003（H1N2）	ABI96104	hH1N2 HA233	I**T**K**P**KV**RD**Q**E**GR**I**
A/mallard/Alberta/202/96（H2N5）	AAT65325	mH2N5 HA233	IATR**P**KVNGQ**G**GRM
A/Hong Kong/1143/99（H3N2）	AAK62039	hH3N2 HA233	I**GSRPWVRGVSSRI**
A/equine/Jilin/1/1989（H3N8）	AAA43151	eH3N8 HA233	I**GSRPWVR**GQSGR**V**
A/Tern/South Africa/61（H5N3）	ABI84970	tH5N3 HA233	IATR**P**KVNGQSGR**V**
A/Canada/rv504/2004（H7N3）	ABI85000	hH7N3 HA233	**PGARPQ**VNGQSGR**I**
A/England/268/1996	AAC4099	hH7N7 HA233	**PGARPQ**VNGQS

[0150]

（H7N7）	8		GRI
A/Hong Kong/1074/99（H9N2）	CAB95857	hH9N2 HA233	IGPRPLVNGLQGRI
A/mallard/Astrakhan/263/1982（H14N5）	ABI84453	mH14N5 HA233	IGSRPRVRNQSGRI
A/shelduck/WA/1756/1983（H15N2）	ABB90704	sH15N2 HA233	PGARPKVNGQAGRI

[0151] 表 7. 对应于 H5N1HA233 表位的序列在迄今为止报道的 H1N1 毒株中的保守性

[0152]

毒株（分离编号）*	登记号	序列
A/Hong Kong/1131/1998（1896）	AAK70451	IAKRPKVRDQEGRI
A/Brazil/11/1978（68）	ABO38065	--------G-----
A/Chile/1/1983（67）	ABO38340	--------N-----
A/Iowa/1943（29）	ABO38373	--E-----G-A---
A/Nagoya/27/1995（23）	BAC82887	-T----------
A/South Australia/26/2000（17）	ABK79970	--R----------
A/Puerto Rico/8/34（15）	AAA43194	--E-------A--M
A/Hickox/1940（13）	ABI20826	--E-----G-A--M
A/Kyoto/1/1995（11）	BAC82881	------I-------
A/Fukushima/2/1988（10）	AAA43170	---------R----
A/Hong Kong/470/1997（8）	CAD29932	-V----------
A/Ohio/3559/1988（4）	ABU80400	--T-------A--M
A/Maryland/2/1980（3）	ABO33006	-S----------
A/WSN/1933（3）	ACF54598	--A----K—-H--M
A/Fort Worth/50（3）	ABD61735	----------P--M
A/Kojiya/1/1952（2）	BAA96113	--------G-P--M
A/Malaysia/54（2）	ABD60966	--E-----G-P--M
A/Texas/UR06-0502/2007（1）	ABV29612	V----------
A/Texas/UR06-0502/2007（1）	ABO38021	M----------

A/Hong Kong/1134/1998（1）	AAK70459	-V-------R----
A/Switzerland/8808/2002（1）	CAD57618	-VA-----E-A---
A/Wisconsin/10/1998（1）	AAO88265	-TT-------A--M
A/New York/626/1996（1）	ABG47829	-T------N-----
A/Georgia/5/2003（1）	ABI96112	-T------G-----
A/Memphis/2/1983（1）	ABG88344	-S------N-----
A/Memphis/1/1983（1）	ABG88333	-S------G-----
A/Albany/20/1978（1）	ABP49448	-SE-----G-----
A/Lackland/7/1978（1）	ABO32992	-SE-------K---
A/Texas/AF1960/2008（1）	ACH69241	--Q----------
A/South Africa/42/2000（1）	ABO21724	-----P--------
A/Saga/2/1957（1）	BAA96117	--------G-S--M
A/Thailand/271/2005（1）	ABK57093	--------G-A--M
A/Kentucky/UR06-0339/2007（1）	ABW91526	--------E-----
A/Denver/57（1）	ABD15258	----------S--M
A/Singapore/03/1990（1）	AAA16778	----------R---
A/Austria/404738/2008（1）	ACA03766	----------G---
A/New Caledonia/V77245/2007（1）	ABQ52695	----------RKN
A/RiodeJaneiro/404/01（1）	AAY42121	----------G-
A/Texas/06/2007（1）	ABW23325	--------B-----
A/Kamata/69/1996（1）	BAA96123	------I-N-----
A/Milan/11/2006（1）	ABZ85909	----L---------
A/Kamata/85/1987（1）	BAA96118	--I----------
A/Huston/43（1）	AAM76691	--G-----G-A--M
A/Phila/1935（1）	ABO38384	--E-------T--M
A/Arizona/14/1978（1）	ABN59423	--E----------
A/Lackland/3/1978（1）	ABO32981	--E-------A---
A/Henry/1936（1）	ABO38351	--E—-E----A--M
A/Wisconsin/301/1976（1）	ABV45838	--A-----G-A--M
A/Wilson-Smith/33（1）	ABD77796	--A-------P--M

[0153]

[0154]

A/Wilson-Smith/1933（1）	ABF21278	--A-------H--M
A/Brevig_Mission/1/18（1）	AAD17218	--A-------A--M
A/London/1/1919（1）	AAO65769	--A---I-G-A--M

[0155] （分离编号）*表示含有对应于H5N1 HA233表位的特定序列的毒株在迄今为止分离到的人类H1N1病毒的2209个不同毒株中的编号。

[0156] 表8. 对应于H5N1 HA233表位的序列在迄今为止的猪来源的甲型流感病毒H1N1毒株中的保守性

[0157]

毒株（分离编号）*	**登记号**	**序列**
A/Viet Nam/1203/2004（H5N1）	AAW80717	IATRSKVNGQSGRM
A/Texas/05/2009（1608/1751）	ACP41934	**--I-P--RD-E---**
A/Almati/01/2009（48/1751）	ACU56931	**--I-P--RE-E---**
A/Argentina/HNRG16/2009（29/1751）	ADA83595	**--I-P--R--E---**
A/California/12/2009（14/1751）	ACT36662	**--I-P--RDXE---**
A/Ekaterinburg/01/2009（10/1751）	ACU56924	**--I-P--RDRE---**
A/Finland/614/2009（9/1751）	ACZ81656	**--I-P--RX-E---**
A/Malaysia/8860/2009（8/1751）	ADD14139	**--I-P--RN-E---**
A/Pennsylvania/14/2009（3/1751）	ACV67237	**-XI-P--RD-E---**
A/South Carolina/09/2009（2/1751）	ACR49284	**--I-P--RB-E---**
A/Texas/04/2009（2/1751）	ACR49285	**--I-P--RXXE---**
A/Singapore/9061364（2/1751）	ACZ04992	**--I-P--RD-E-X-**
A/Singapore/GP2641/2009（2/1751）	ACY46823	**--I-P-XXX-XX--**
A/Singapore/GP2695/2009（2/1751）	ACY46873	**--I-P--XD-E---**
A/Ancona/04/2009（1/1751）	ACT83739	**----P--RD-E---**

[0158]

A/Argentina/HNRG15/2009（1/1751）	ADA83591	**-SI-P--RD-E---**
A/Argentina/HNRG42/2009（1/1751）	ADA83664	**T-I-P--RD-E---**
A/Hiroshima/201/2009（1/1751）	ACX31934	**-TI-P--RG-E---**
A/Novgorod/01/2009（1/1751）	ADA83043	**--I-P--RERE---**
A/Santo Domingo/WR1057N/2009（1/1751）	ACY77693	**-TI-P--RD-E---**
A/Singapore/GP2316/2009（1/1751）	ACY46813	**X-I-P--RD-EXX-**
A/Singapore/GP2687/2009（1/1751）	ACY46863	**--I-P--XD-E-X-**
A/Singapore/ON1187/2009（1/1751）	ACY46782	**--I-P--XX-X-X-**
A/Singapore/ON141/2009（1/1751）	ACY46123	**--I-P--GD-E---**
A/Singapore/ON2081/2009（1/1751）	ACY46843	**--I-P--XD-XXX-**
A/Wisconsin/629-S0339/2009（1/1751）	ACZ16840	**--I-T--RD-E---**

[0159] （分离编号）*表示含有对应于 H5N1 HA233 表位的特定序列的毒株在迄今为止分离到的猪来源的甲型流感 H1N1 病毒的 1751 个不同毒株中的编号。

[0160] 表 9. 对应于 A/H1N1HA370 表位的序列在迄今为止报道的甲型流感病毒亚型中的保守性

[0161]

毒株	登记号	缩写	序列
A/Texas/05/2009（H1N1）	ACP41934	A/H1N1-TX HA370	HHQNEQGSGYAA DLKST
A/San Antonio/PR922/2009（H1N1）	ACU29959	A/H1N1-SA HA370	HHQNEQGSGYAA DMKST

[0162]

A/WSN/1933（H1N1）	AAA43209	hH1N1-WSN HA370	HHQNEQGSGYAA DQKST
A/New York/604/1995 （H1N1）	ABE11867	hH1N1-NY HA370	HHQNEQGSGYAA DKKST
A/Ohio/3559/1988 （H1N1）	ABU80400	hH1N1-OH HA370	HHQNEQGSGYAA DRKST
A/Adachi/2/1957 （H2N2）	BAG72216	hH2N2 HA370	HHSNDQGSGYAA DKEST
A/New York/61A/2003 （H3N2）	AAX11455	hH3N2 HA370	RHQNSEGTGQAA DLKST
A/New York/356/2004 （H3N2）	AAZ74419	hH3N2 HA370-1	RHQNSEGIGQAA DLKST
A/Viet Nam/1203/2004 （H5N1）	AAW80717	hH5N1 HA370	HHSNEQGSGYAA DKEST
A/Hong Kong/485/97 （H5N1）	AAD52043	hH5N1-HK HA370	HHSNEQGSGYAA DQEST
A/England/268/1996 （H7N7）	AAC40998	hH7N7 HA370	RHQNAQGEGTAA DYKST
A A/Shantou/239/98 （H9N2）	AAL32476	hH9N2-ST HA370	QHSKYQGVGMA ADRDST
A/Hong Kong/1074/99	CAB95857	hH9N2-HK HA370	QHSNDQGVGMA ADRDST

[0163]

（H9N2）

[0164] 表 10. 人类肝癌的人类四次跨膜蛋白 4 超家族成员 5(hTM4SF5)、HCV(HCV-E) 的包膜蛋白 (E 蛋白)、人类 RSV 中的黏附糖蛋白 G 和融合蛋白 (F 蛋白)(HRSV-G, HRSV-F) 的候选表位

[0165]

蛋白	肽	序列	位置	长 度（mer）
hTM4SF5	TM4SF5R1	NGETSWTNTNHLSL	32-45	14
	TM4SF5R2-1	RNGPRCLMNGEWGY	113-126	14
	TM4SF5R2-2	GEWGYHFEDTAGAY	122-135	14
	TM4SF5R2-3	NRTLWDRCEAPPRV	138-151	14
	TM4SF5R2-4	WDRCEAPPRVVPWN	142-155	14
	TM4SF5R2-5	GAYLLNRTLWDRCEA	133-147	15
HCV-E	HCVE1 57	TRDGKLPTTQLRR	57-69	13
	HCVE2 202	CFRKHPEATYSR	202-213	12
	HCVE2 269	CDLEDRDRSELSP	269-281	13
HRSV-G	hRSVG1	MSKHKNQRTARTLEKTWD	1-18	18
HRSV-G	hRSVG150	PRLKNPPKKPKDDY	150-163	14
HRSV-F	hRSVF99	NTPAANNRARREAPQYM	99-115	17

[0166] 表 11. hRSV A 长毒株 F 蛋白的候选表位

[0167]

毒株	序列	位置	缩写	变异
人类甲型呼吸道合胞病毒长毒株（hRSV A 长毒株）	CFASSQNITEEFYQ	21-34	HRSV-Fa1	5 型
	IKENKCNGTDAKVKL	64-78	HRSV-Fa2	2 型
	KVKLIKQELDKYKNA	75-89	HRSV-Fa3	4 型
	TSPLCTTNTKEGSNI	318-332	HRSV-F1	2 型
	GCDYASNKGVDTVSV	438-452	HRSV-F2	3 型
	LVFPSDEFDASISQV	481-495	HRSV-F3	1 型
	SDEFDASISQVNEKI	485-499	HRSV-F4	1 型
	RSTPVTLSKDQLSGI	553-567	HRSV-F5	3 型

[0168]

TDRGWYCDNAGSVSF	337-351	HRSV-F6	1 型
AGSVSFFPQAETCKV	346-360	HRSV-F7	3 型
YGKTKCTASNKNRGII	417-432	HRSV-F8	2 型
CKIMTSKTDVSSSVI	393-407	HRSV-F9	3 型

[0169] 根据hRSV A长毒株F蛋白的亲水性、疏水性、二级结构、抗原性指数、两亲性来选择用于表位筛选的肽序列。

[0170] 表 12. hRSV A 长毒株中候选表位的序列变异

[0171]

缩写	长毒株序列	其他序列	缩写
HRSV-Fa1	CFASSQNITEEFYQ	CFASGQNITEEFYQ	
		YLTSSQNITEEFYQ	
HRSV-Fa2	IKENKCNGTDAKVKL	IKETKCNGTDTKV	
HRSV-Fa3	KVKLIKQELDKYKNA	KVKLMKQELDKYKNA	HRSV-Fa3-1
		KVKLIKQELDKYKSA	HRSV-Fa3-2
		KVKLINQELDKYKNA	HRSV-Fa3-3
HRSV-Fa4	TPAANNRARRE	TPAANSRARRE	
		TSAANNRARRE	
		TTAANNRARRE	
		TPATNNRARRE	
		TPPTNNRARRE	
HRSV-F1	TSPLCTTNTKEGSNI	TSPLCTTNIKEGSNI	
HRSV-F2	GCDYASNKGVDTVSV	GCDYVSNKGVDTVSV	
		GCDYASNKGMDTVSV	
HRSV-F3	LVFPSDEFDASISQV	无	
HRSV-F4	SDEFDASISQVNEKI	无	
HRSV-F5	RSTPVTLSKDQLSGI	RNTPVTLSKDQLSGI	
		KSTPVTLSKDQLSGI	
HRSV-F6	TDRGWYCDNAGSVSF	无	

[0172]

HRSV-F7	AGSVSFFPQAETCKV	AGSVSFFPLAETCKV	HRSV-F7-1
		AGSVSFFPQADTCKV	HRSV-F7-2
HRSV-F8	YGKTKCTASNKNRGII	YGKTKCTASNKDRGII	
HRSV-F9	CKIMTSKTDVSSSVI	CKIMTSKADVSSSVI	
		CKIMTSKTDISSSVI	

[0173] 表 13. 人类整合蛋白 β4(hIB4) 的候选表位

[0174]

蛋白	序列	位置	缩写	长度
人类整合蛋白 β4	DKVSVPQTDMRPEKL	176-190	hIB4-VWA-1-1	15
	KEPWPNSDPPFSFKN	191-205	hIB4-VWA-1-2	15
	PQTDMRPEKLKEPWPNS DP	181-199	hIB4-VWA-1-3	19
	LTEDVDEFRNKLQGERIS GN	209-228	hIB4-VWA-2	20
	LDTTGTYTQYRTQDYPS VPT	290-309	hIB4-VWA-3	20
	LQKEVRSARCSFNGD	459-473	hIB4-EGF-1	15

[0175] 实施例 3 :CpG-DNA- 肽 (或蛋白)- 脂质体复合物的制备

[0176] 在本发明中使用了下列脂质体 :CHEMS、Chol、DOPE 和 DSPC 购自 Sigma。DC-Chol 和 PEG-PE 从 Avanti-Polar Lipids(Alabaster,AL,USA) 获得。CpG-DNA 和蛋白 (或肽) 与 DOTAP(Roche,Indianapolis,IN,USA)、lipofectamine(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 或 lipofectin(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 的复合物按照制造商的详细说明来制备。用 DOPE/CHEMS、DSPC/Chol、DSPC/CHEMS/PEG-PE、Chol/DOPE/PEG-PE 或 Dc-Chol/DOPE/PEG-PE 包胶 CpG-DNA 和蛋白 (或肽) 所构成的脂质体复合物的制备按照以前的报道 (14,23) 并进行了修改。简单来说,将 DOPE 和 CHEMS 以 1 :1 的摩尔比混合,然后将混合物用氮气蒸发以制造无溶剂的脂质薄膜,并混合在乙醇中 (终浓度为 10％),然后重悬浮在等体积的水溶性 CpG-DNA 和蛋白 (或肽) 混合物中,在室温下剧烈搅拌 30 分钟。在将 pH 调整到 7.0 后,使用超声波发生器将 lipoplex 溶液轻微超声 30 秒,并用 0.22μm 滤膜过滤,然后在液氮中重复冻融三次 (14,23)。

[0177] 实施例 4 :通过 CpG-DNA- 肽 (或蛋白)- 脂质体复合物诱导体液免疫应答

[0178] <4-1> 免疫接种

[0179] 小鼠维持在无特定病原体条件下。4 周龄雄性 BALB/c(H-2^b) 小鼠购自 Central Lab.Animal Inc.(Seoul,韩国)。本发明人的动物研究得到 Hallym 大学动物护理和使用管理委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee of Hallym University) 的批准。

[0180] 以10日的时间间隔三次向4周龄BALB/c小鼠腹膜内注射HEL(鸡卵溶菌酶)(50μg/小鼠)和MB-ODN4531(O)(50μg/小鼠)复合物或HEL-MB-ODN4531-脂质体复合物。10日后,通过心脏穿刺方法获得血液,并通过离心沉淀血细胞来收集血清。从收集到的血清,通过ELISA分析抗HEL抗体(总IgG、IgG1、IgG2a)的滴度。

[0181] <4-2>ELISA

[0182] 在注射后10天将小鼠处死。从小鼠收集血清并将其储存在-70℃。为了测量IgG、IgG1和IgG2a滴度,我们用10μg/ml的HEL包被96孔免疫板(Nalgen Nunc International),然后用含1%BSA的PBST阻断它们。将血清添加到每块板的顶行,然后将PBST的连续1:3稀释液置于下面的行中。我们将板在室温下温育4小时,然后用PBST清洗它们。接下来,我们加入辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG抗体、抗小鼠IgG1抗体或抗小鼠IgG2a抗体,并将板温育2小时。比色测定法使用一步ABTS(Pierce Biotechnology Inc.,Rockford,IL,USA)显色,我们使用Labsystems Multiskan微孔板读板器(GMI Inc.,Ramsey,MI,USA)测量405nm处的吸收值(19)。

[0183] 调查了用HEL-MB-ODN4531和脂质体复合物腹膜内免疫接种的BALB/c小鼠的体液免疫应答。注射HEL-MB-ODN4531-脂质体复合物与注射单独的HEL、HEL-MB-ODN4531混合物或HEL-脂质体复合物相比增加了抗体量,证实了MB-ODN4531-脂质体复合物在体液免疫应答中的免疫佐剂效应。不完全弗氏佐剂是从60年前就已使用的代表性免疫佐剂。但它的局限性在于它不诱导细胞免疫刺激效应,并且不能应用于人类。MB-ODN4531-脂质体复合物被证明起到增加体液免疫力以及通过刺激免疫细胞诱导细胞免疫应答的免疫佐剂的作用。此外,MB-ODN4531-脂质体复合物在Th1-免疫应答特异性IgG2a抗体的生产中有效。

[0184] <4-3>小鼠和免疫接种

[0185] 小鼠维持在无特定病原体条件下。4周龄雄性BALB/c(H-2^b)小鼠购自Central Lab.Animal Inc.(Seoul,韩国)。本发明人的动物研究得到Hallym大学动物护理和使用管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee of Hallym University)的批准。

[0186] 以10日的时间间隔三或四次向小鼠腹膜内注射肽(50μg/小鼠)-CpG-DNA(MB-ODN4531)-脂质体复合物。

[0187] <4-4>抗原特异性Ig ELISA

[0188] 在注射后10天将小鼠处死。从小鼠收集血清并将其储存在-70℃。将获得的血清用PBS/0.2%叠氮钠进行1:10稀释,然后储存在-20℃。为了测量IgG、IgG1和IgG2a的总量,我们用10μg/ml的每种肽包被96孔免疫板(Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA),然后用含有1%BSA的含0.05%Tween20的PBS(PBST)阻断它们。将血清用PBS进行1:400稀释,并添加到每块板的孔中。

[0189] 为了检测总IgG、IgG1和IgG2a,我们使用了1:5,000稀释的生物素偶联的大鼠抗小鼠IgG抗体、大鼠抗小鼠IgG1抗体和大鼠抗小鼠IgG2a抗体(BD Pharmingen,San Diego,CA,USA)。

[0190] 为了测量IgG、IgG1和IgG2a的滴度,我们用10μg/ml每种蛋白或肽包被96孔免疫板(Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA),然后用含有1%BSA的PBST阻断它们。将血清添加到每块板的顶行,然后将PBST的1:3连续稀释液置于下面的行中。我们将板在室温下温育2小时,然后用PBST清洗它们。接下来,我们加入生物素偶联的大鼠

抗小鼠 IgG 抗体、大鼠抗小鼠 IgG1 抗体或大鼠抗小鼠 IgG2a 抗体，并将板温育 2 小时。在清洗三次后，向板加入 HRP（辣根过氧化物酶）偶联的链亲和素，然后温育 1 小时。使用 TMB 溶液 (KPL, Gaithersburg, MD, USA) 执行比色测定分析，并使用分光光度计 (Spectra Max250, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) 分析 450nm 处的吸收值。

[0191] 实施例 5：使用 CpG-DNA-H5N1（或其他流感病毒毒株）HA 肽 - 脂质体复合物筛选表位

[0192] <5-1>CpG-DNA-H5N1（或其他流感病毒毒株）HA 肽 - 脂质体复合物的免疫接种

[0193] 如实施例 3 中所述，根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性从各种甲型流感病毒的 HA（血细胞凝集素）蛋白中选择候选表位（表 2- 表 9），来制备 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物。将制备的 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物 (50μg/ 小鼠）以 10 日的时间间隔三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞收集血清。从收集的血清，通过 ELISA 分析抗肽抗体（总 IgG、IgG1、IgG2a）的滴度和量。

[0194] <5-2>ELISA

[0195] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1：10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA) 添加每种所选的肽 (10μg/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析与每种肽特异性结合的总 IgG（图 2a、2d、2e、5a、5d、6a、6d 和 7）、IgG1（图 2b、2e、5b、5b 和 7）、IgG2a（图 2c、2e、5c、6c 和 7）的量和滴度。

[0196] 在选自甲型禽流感 (H5N1)/Vietnam/2004 毒株 HA 蛋白的肽中，hH5N1HA58、hH5N1HA233、hH5N1HA336 和 hH5N1HA370 增加了总 IgG（图 2a、2d）和 IgG2a（图 2c）的量和滴度。对应于 hH5N1HA370 肽的 H1N1 肽 (hH1N1-NY HA370、hH1N1-OH HA370、hH1N1-WSN HA370、A/H1N1-TX HA370) 和 H5N1 病毒中存在的 hH5N1-HK HA370 肽（表 3、表 4）增加了总 IgG 的量和滴度（图 5a、5d）。此外，与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产也增加了（图 5c）。此外，H5N1 病毒毒株中存在的对应于 hH5N1HA233 肽的 hH5N1HA233-1、hH5N1HA233-2、hH5N1HA233-3、hH5N1HA233-4、hH5N1HA233-6、hH5N1HA233-7、hH5N1HA233-9 和 hH5N1HA233-11 肽（表 5），以及各种甲型流感病毒毒株中存在的对应于 hH5N1HA233 肽的 hH1N1-WSNHA233、hH1N1-HK HA233、hH1N1-Thai HA233、A/H1N1-TX HA233、mH2N5HA233、hH7N7HA233、hH9N2HA233、sH15N2HA233 肽（表 6），增加了总 IgG 的量（图 6d）。

[0197] 另外，H7N7 和 H9N2 病毒中存在的对应于 hH5N1HA370 肽的 hH7N7HA370、hH9N2-ST HA370 和 hH9N2-HK HA370 肽（表 9），增加了总 IgG 的量（图 7a）。H7N7 和 H9N2 病毒中存在的对应于 hH5N1HA233 肽的 hH7N7HA233 和 hH9N2HA233 肽（表 6）增加了总 IgG 的量（图 7b）。

[0198] 实施例 6：CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物对体液免疫应答的诱导依赖于脂质体和 CpG-DNA 的种类

[0199] 如实施例 3 中所述将 MB-ODN4531- 肽 (hH5N1HA233) 与各种脂质体 (DOPE：CHEMS(6：4、1：1、1：0 和 0：1)、lipofectin、lipofectamine、DOTAP 和泊洛沙姆 407) 复合，如实施例 <4-3> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠并收集血清。作为测量 hH5N1HA233 肽特异性总 IgG 的量的结果（图 3a），它在 DOPE：CHEMS 摩尔比为 1：1 时最高。H5N1HA233

肽特异性总 IgG 的滴度也在 DOPE :CHEMS 摩尔比为 1 :1 时最高 (图 3b)。

[0200] 如实施例 3 中所述将肽 (hH5N1HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS(1 :1)) 与表 1 中显示的各种 PO-DNA 或 PS-DNA 进行复合,如实施例 <4-3> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠,然后收集血清。作为测量 H5N1HA233 肽特异性总 IgG 的量的结果,当使用 PO-DNA MB-ODN4531(O) 和 PS-DNA MB-ODN4531(S) 复合物时量最高 (图 4)。这些结果表明 PO-DNA 或 PS-DNA 的 CG 序列发挥了重要作用。

[0201] 实施例 7 :由 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物产生的抗体的血凝抑制和病毒中和的分析

[0202] <7-1> 重组 H5N1 病毒

[0203] 通过八质粒反向遗传学方法 (36),将 A/Vietnam/1203/2004(H5N1) 和 A/Puerto Rico/8/34(PR8)(H1N1) 流感病毒的基因区段克隆到用于病毒挽救和基因重配的质粒中。将如此获得的病毒在 10 日龄孵化鸡卵的尿囊腔中繁殖。这些重配病毒包括“PR8/H5Lo”,其带有禽谱系 A/Vietnam/1203/2004 的 HA 基因区段和 PR8 的 7 个互补基因区段。

[0204] <7-2> 血凝抑制测定法

[0205] 血凝抑制测定法按照以前的描述进行 (37)。简单来说,将病毒稀释至 4HA 单位,并与等体积的受体破坏酶处理过的血清样品的两倍连续稀释液在室温下温育 1 小时。向孔中加入等体积的 0.5%鸡红细胞并温育 30 分钟,以测量 HI 滴度。

[0206] <7-3> 病毒中和测定法

[0207] 在 MDCK 细胞中进行的病毒中和测定法按照以前的描述进行 (38)。将约 100PFU/ml 的流感病毒 (rH5N1 病毒和 A/WSN/1933) 与等体积的热灭活的两倍连续稀释的血清样品在 37℃温育 1 小时。温育后,向增补有 10% FBS 和 TPCK((L- 甲苯磺酰基氨酰 -2- 苯基) 乙基氯甲基酮,1μg/ml) 处理过的胰蛋白酶的最低必需培养基中的 MDCK 细胞合生单层加入该混合物。将细胞培养 72 小时,然后测定细胞病理效应。通过下列方程计算中和百分率 :中和 (%,抑制百分数) = [(只用病毒处理的噬斑数 - 与病毒混合的连续稀释血清的噬斑数)/ 只用病毒处理的噬斑数]x100。

[0208] 如实施例 3 中所述将 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233 或 hH1N1-HK HA233) 与脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合,如实施例 <4-3> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠并收集血清。证实了 hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233 或 hH1N1-HK HA233 肽特异性抗体抑制了由 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 和 A/WSN/1933 病毒所诱导的血凝 (图 8a)。

[0209] 如实施例 3 中所述将 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233、hH1N1-HK HA233 或 A/H1N1-TX HA233) 与脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合,如实施例 <4-3> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠并收集血清。将 hH5N1HA233 肽特异性抗体预先用 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 和 A/WSN/1933 处理 (图 8b),然后感染 MDCK 细胞。证实了病毒的滴度低,并且 hH5N1HA233 肽特异性抗体中和病毒。

[0210] 将 hH5N1HA370 肽特异性抗体预先用 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 和 A/WSN/1933 处理 (图 8c),然后感染 MDCK 细胞。证实了病毒的滴度低,并且 hH5N1HA370 肽特异性抗体中和病毒。

[0211] 将给药 PO-DNA- 肽 (hH1N1-WSN HA233 或 hH1N1-HK HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 的血清预先用 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 和 A/WSN/1933 处理,然后感染 MDCK 细胞。证实了病毒

的滴度低，并且每种肽特异性抗体中和病毒（图 8d 和 8e）。

[0212] 此外，将给药 PO-DNA- 肽 (A/H1N1-TX HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 的血清预先用 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 和 A/WSN/1933 处理，然后感染 MDCK 细胞。证实了病毒的滴度低，并且 A/H1N1-TX HA233 肽特异性抗体中和病毒（图 8f）。

[0213] 实施例 8 :CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物预防接种的效能

[0214] <8-1> 预防接种和病毒激惹实验

[0215] 以 10 日的时间间隔两次向 4 周龄 BALB/c 小鼠腹膜内注射包胶在 DOPE/CHEMS 脂质体中的增补有 50μg MB-ODN4531(O) 的 50μg 肽。第二次免疫接种后 10 日，用 10LD50maA/WSN/1933 或 10LD50rH5N1 病毒鼻内接种小鼠进行激惹。

[0216] <8-2> 病毒激惹后的体重和存活率测量

[0217] 感染后，每日观察小鼠的临床征兆并称量体重。10LD50rH5N1 病毒鼻内感染后 3 日，小鼠开始失去体重并在 12 日内死亡。但是用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA370、hH5N1HA233 或 hH1N1-WSN HA230)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染的小鼠直到第 9 日才失去体重，并且逐渐恢复并存活（图 9a、9b、11a、11b、13a 和 13b）。

[0218] 用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA370、hH5N1HA233、hH1N1-WSN HA233 或 hH1N1-HK HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠起先失去体重，然后逐渐恢复并存活（图 10a、10b、12a、12b、13a、13b、14a 和 14b）。

[0219] 用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠显示出 50％的存活率（图 12a）。

[0220] 用 PO-DNA- 肽 (hH1N1-WSN HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 rH5N1 病毒 PR8/H5Lo 鼻内感染的的小鼠显示出 38％的存活率（图 13a）。

[0221] <8-3> 肺组织染色

[0222] 在指定时间点通过吸入二乙醚麻醉剂处死小鼠并取出整个肺组织。为了进行组织病理学检查，将肺固定在 4％的缓冲甲醛溶液中，通过常规方法包埋在石蜡中，并切成 4μm 厚的切片。将样本用苏木精和曙红染色。在用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233 或 hH5N1HA370)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒或 10LD50maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠中，肺组织恢复到正常状况（图 9c、10c、11c）。

[0223] 此外，在用 PO-DNA- 肽 (hH5N1-WSN HA233 或 hH5N1-HK HA233)- 脂质体复合物以 10 日的时间间隔接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒或 10LD50maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠中，肺组织恢复到正常状况（图 13c 和 14c）。

[0224] <8-4> 小鼠组织中病毒滴度的测量

[0225] 在用 10LD50rH5N1 病毒或 10LD50maA/WSN/19333 鼻内感染 3 日和 6 日后，分离肺脏并在 1ml PBS 中匀浆，以分析病毒的滴度。将病毒储用液或肺组织匀浆液的 10 倍连续稀释悬液添加到 6 孔板中 MDCK 细胞的合生单层上，并在室温下温育 1 小时进行吸附，每 10 分钟振摇一次。取出悬液，并用含有 2％ oxoid 琼脂、5％ $NaHCO_3$、1％ DEAE 葡聚糖和 (L- 甲苯磺酰基氨酰 -2- 苯基）乙基氯甲基酮 (TPCK，1μg/ml) 处理过的胰蛋白酶的 MEM 覆盖细胞。在 37℃温育 3 天后，将板用 1ml 结晶紫染色 15 分钟，以使我们能够观察到噬斑。对噬斑数进行计数以确定滴度。在用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA370)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒或 10LD50maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠中，肺组织的病毒滴度

减少了（图 9d 和 10d）。

[0226] <8-5> 血凝抑制测定法

[0227] 在 用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSNHA233 或 hH1N1-HK HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染的小鼠中，由所产生的抗体诱导的凝血的抑制显著增加（图 15a）。

[0228] 在 用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSNHA233 或 hH1N1-HK HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 maA/WSN/1933 病毒鼻内感染的小鼠中，由所产生的抗体诱导的凝血的抑制显著增加（图 15b）。

[0229] <8-6> 抗体的测量

[0230] 将小鼠用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370、hH1N1-WSN HA233 或 hH1N1-HK HA233)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次，然后用 10LD50rH5N1 病毒或 10LD50maA/WSN/1933 病毒鼻内感染。在感染后 6 天分离血清。也分离了 BALF（支气管肺泡灌洗液）以测量 hH5N1HA229 或 hH5N1HA371 肽特异性抗体（总 IgG 和 IgA）的量。当用 10LD50rH5N1 病毒感染时，血清中的总 IgG 和 BALF 中的 IgA 显著增加（图 16a、16c 和 16f）。当用 10LD50maA/WSN/1933 病毒感染时，血清中的总 IgG 和 BALF 中的 IgA 显著增加（图 16b、16d、16e 和 16f）。

[0231] 实施例 9 :CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物预防接种的记忆效能

[0232] <9-1> 预防接种和病毒激惹试验

[0233] 以 10 日的时间间隔两次向 4 周龄 BALB/c 小鼠腹膜内注射包胶在 DOPE :CHEMS 脂质体中的增补有 50μg MB-ODN4531(O) 的 50μg 肽。第二次免疫接种后两个月，用 10LD50rH5N1 病毒鼻内接种小鼠进行激惹。

[0234] <9-2> 病毒激惹后的体重和存活率测量

[0235] 感染后，每日观察小鼠的临床征兆并称量体重。用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染后 3 天，小鼠开始失去体重，并在 14 天内死亡。但是用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA370)- 脂质体 (DOPE : CHEMS) 接种两次然后在两个月内用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染的小鼠直到 11 天才失去体重，并且逐渐恢复并存活（图 17a 和 17b）。

[0236] <9-3> 肺组织染色

[0237] 在指定时间点通过吸入二乙醚麻醉剂处死小鼠并取出整个肺组织。为了进行组织病理学检查，将肺固定在 4％的缓冲甲醛溶液中，通过常规方法包埋在石蜡中，并切成 4μm 厚的切片。将样本用苏木精和曙红染色。在用 PO-DNA- 肽 (hH5N1HA370)- 脂质体 (DOPE : CHEMS) 以 10 日的时间间隔接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染的小鼠中，肺组织恢复到正常状态（图 17c）。

[0238] <9-4> 小鼠组织中病毒滴度的测量

[0239] 在用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染 3 日或 6 日后，分离肺组织并在 1ml PBS 中匀浆，以分析病毒的滴度。病毒滴度通过实施例 <8-4> 中所描述的噬斑测定法测量。在用 PO-ODN- 肽 (hH5N1HA370)- 脂质体 (DOPE :CHEMS) 接种两次然后用 10LD50rH5N1 病毒鼻内感染的小鼠中，在感染后 6 日内肺组织的病毒滴度显著降低（图 17d）。

[0240] 实施例 10 :使用 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物的表位筛选效能

[0241] <10-1> 重组甲型禽流感病毒的灭活

[0242] 将 rH5N1 病毒 (PR8/H5Lo) 暴露于紫外光 (UV) 以便灭活病毒，波长为 254nm，暴露

时间为 5 分钟，病毒粒子与 UV 光之间的距离为 5cm。通过噬斑测定法验证病毒感染性的灭活。

[0243] <10-2> 免疫接种

[0244] 用灭活的 rH5N1 病毒或灭活的 rH5N1 病毒与脂质体的复合物或灭活的 rH5N1 病毒 -MB-ODN4531(50μg/ 小鼠)- 脂质体复合物腹膜内注射 4 周龄 BALB/c 小鼠。以 10 日的时间间隔三次注射同样量的灭活 rH5N1 病毒与 MB-ODN4531 的混合物。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞来收集血清。从收集的血清，按照实施例 <4-4> 中的描述通过 ELISA 分析抗重组 H5N1 病毒抗体 (总 IgG、IgG1、IgG2a) 的量和滴度。

[0245] <10-3>ELISA

[0246] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1 :10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA) 添加每种所选的肽 (hH5N1HA233、hH5N1HA370) 或灭活的 rH5N1 病毒 (10μg/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析与 H5N1 病毒或每种肽特异性结合的总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的生产 (图 18)。

[0247] 证实了在用灭活 rH5N1 病毒接种的血清中，总 IgG 的量和滴度 (图 18a 和 18b) 以及与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产增加了。

[0248] 在甲型禽流感 /H5N1/Vietnam/2004 毒株的 HA 蛋白中，hH5N1HA233 和 hH5N1HA370 肽增加每种肽特异性总 IgG 的滴度，而用灭活 rH5N1 病毒免疫接种的血清不显示 hH5N1HA233 或 hH5N1HA370 肽特异性抗体的任何滴度 (图 18c 和 18d)，表明在用 MB-ODN4531(O)- 每种肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物免疫接种的血清中产生了 hH5N1HA233 或 hH5N1HA370 肽特异性抗体。

[0249] 实施例 11 :使用 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物筛选 HCV 表位

[0250] <11-1>CpG-DNA-HCV 肽 - 脂质体复合物的免疫接种

[0251] 在 HCV E1 和 E2 蛋白中，如实施例 3 中所述根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性选择了三个表位 (表 10)，用于制备 CpG-DNA-HCV 肽 - 脂质体复合物。如实施例 <4-3> 中所述，将制备的 CpG-DNA-HCV 肽 - 脂质体复合物 (50μg/ 小鼠) 以 10 日的时间间隔三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞收集血清。从收集的血清，通过 ELISA 分析抗肽抗体 (总 IgG、IgG1、IgG2a) 的滴度。

[0252] <11-2>ELISA

[0253] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1 :10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA) 添加每种所选的肽 (10μg/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析与每种肽特异性结合的总 IgG(图 19a)、IgG1 和 IgG2a(图 19b 和 19c) 的生产。

[0254] 证实了在用选自 HCV E2 蛋白的 HCV-E2202 肽免疫接种的血清中，总 IgG 的滴度 (图 19c) 和与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产增加了。

[0255] <11-3> 脂质体类型对 CpG-DNA- 肽 - 脂质体诱导的体液免疫应答的影响

[0256] 如实施例 3 中所述将 MB-ODN4531- 肽 (HCV-E1202) 与各种类型的脂质体

(DOPE:CHEMS(1 :1)、DSPC:Chol(1 :1)、DSPC :CHEMS :PEG-PE(1 :1 :1)、Chol :DOPE :PEG-PE(1 :1 :1)、Dc-Chol :DOPE :PEG-PE(1 :1)) 复合，并如实施例 <4-4> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠。作为测量 HCV-E2202 肽特异性总 IgG 的滴度的结果，在 DOPE :CHEMS 的摩尔比为 1 :1 时滴度最高 (图 19d)。

[0257] 实施例 12 :使用 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物筛选 hRSV 表位

[0258] <12-1>CpG-DNA-hRSV 肽 - 脂质体复合物的免疫接种

[0259] 在 hRSV G 和 F 蛋白中，如实施例 3 中所述根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性选择了 20 个表位 (表 10、11 和 12)，用于制备 CpG-DNA- 每种 hRSV 肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物。如实施例 <4-3> 中所述，将制备的 CpG-DNA- 每种 hRSV 肽 - 脂质体复合物 (50 μ g/ 小鼠) 以 10 日的时间间隔三次或四次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞收集血清。从收集的血清，通过 ELISA 分析抗肽抗体 (总 IgG、IgG1、IgG2a) 的滴度。

[0260] <12-2>ELISA

[0261] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1 :10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA) 添加每种所选的肽 (10 μ g/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析与每种肽特异性结合的总 IgG(图 20a 和 21)、IgG1 和 IgG2a(图 21b 和 21c) 的生产。

[0262] 证实了在用来自 hRSV G 和 F 蛋白的 HRSV-G1、HRSV-Fa3、HRSV-Fa3-2、HRSV-F7 和 HRSV-F9 肽免疫接种的血清中，总 IgG 的量 (图 20a、21a 和 21d) 和与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产 (图 20b、20c、21b、21c 和 21d) 增加了。

[0263] 实施例 13 :使用 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物筛选人类整合蛋白 β 4 表位

[0264] <13-1>CpG-DNA-hIB4 肽 - 脂质体复合物的免疫接种

[0265] 在大多数癌细胞中表达的人类整合蛋白 β 4 蛋白 (hIB4) 中，如实施例 3 中所述根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性选择了 6 个表位 (表 13)，用于制备 CpG-DNA- 每种 hIB4 肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物。如实施例 <4-3> 中所述，将制备的 CpG-DNA- 每种 hIB4 肽 - 脂质体复合物 (50 μ g/ 小鼠) 以 10 日的时间间隔三次或四次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞收集血清。从收集的血清，通过 ELISA 分析抗肽抗体 (总 IgG) 的滴度。

[0266] <13-2>ELISA

[0267] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1 :10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA) 添加每种所选的肽 (10 μ g/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析总 IgG 的量 (图 22a) 和总 IgG 的滴度 (图 22b)。

[0268] 证实了在用选自 hIB4 蛋白的 hIB4-VWA-1-2、hIB4-VWA-1-3、hIB4-VWA-2、hIB4-VWA-3 和 hIB4-EGF-1 肽免疫接种的血清中，总 IgG 的量 (图 22a) 和总 IgG 的滴度 (图 22b) 增加了。

[0269] 实施例 14 :使用 CpG-DNA- 肽 - 脂质体复合物筛选肝癌特异性 TM4SF5 蛋白表位

[0270] <14-1>CpG-DNA-TM4SF5 肽 - 脂质体复合物的免疫接种

[0271] 在 TM4SF5 蛋白中，如实施例 3 中所述根据亲水性、疏水性、二级结构、抗原性和两亲性选择了 6 个表位（表 10），用于制备 CpG-DNA-TM4SF5 肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物。如实施例 <4-3> 中所述，将制备的 CpG-DNA- 每种 TM4SF5 肽 - 脂质体复合物 (50μg/小鼠）以 10 日的时间间隔三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中。10 日后，通过心脏穿刺方法获得血液，并通过离心沉淀血细胞收集血清。从收集的血清，通过 ELISA 分析抗每种肽抗体（总 IgG、IgG1、IgG2a) 的滴度。

[0272] <14-2>ELISA

[0273] 在注射后 10 日将小鼠处死。将获得的血清用 PBS/0.2％叠氮钠进行 1 :10 稀释，然后储存在 -20℃。向 96 孔免疫板 (Nalgen Nunc International,Rochester,NY,USA) 添加每种所选的肽 (10μg/ml，碳酸氢钠缓冲液，pH9.6)，并在 4℃留置 16 小时。然后按照实施例 <4-4> 中所述分析与每种肽特异性结合的总 IgG（图 23a)、IgG1 和 IgG2a（图 23b) 的生产。

[0274] 证实了在用选自 TM4SF5 蛋白的 TM4SF5R2-3 或 TM4SF5R2-5 肽免疫接种的血清中，总 IgG 的滴度（图 23a) 和与 Th1 免疫应答相关的 IgG2a 的生产（图 23b) 增加了。

[0275] <14-3> 脂质体类型对 CpG-DNA- 肽 - 脂质体诱导的体液免疫应答的影响

[0276] 如实施例 3 中所述将 MB-ODN4531- 肽 (TM4SF5R2-3) 与各种类型的脂质体 (DOPE :CHEMS(1 :1)、DSPC :Chol(1 :1)、DSPC :CHEMS :PEG-PE(1 :1 :1)、Chol :DOPE :PEG-PE(1 :1 :1)、Dc-Chol :DOPE :PEG-PE(1 :1)) 复合，并如实施例 <4-4> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠。作为测量 TM4SF5R2-3 肽特异性总 IgG 的滴度的结果，在 DOPE :CHEMS 的摩尔比为 1 :1 时滴度最高（图 23c)。

[0277] <14-4>CpG-DNA 类型对 CpG-DNA- 肽 - 脂质体诱导的体液免疫应答的影响

[0278] 如实施例 3 中所述将 TM4SF5R2-3 肽 - 脂质体 DOPE :CHEMS(1 :1) 与表 1 中显示的各种类型的 PO-DNA(MB-ODN4531(O)、MB-ODN4531(GCO) 或 PS-DNA(MB-ODN4531(S)) 复合，并如实施例 <4-4> 中所述三次腹膜内注射到 BALB/c 小鼠。作为测量 TM4SF5R2-3 肽特异性总 IgG 的滴度的结果，在使用 PO-DNA(MB-ODN4531(O)) 或 PS-DNA(MB-ODN4531(S)) 时滴度最高（图 23d)。

[0279] <14-5>TLR9 对 CpG-DNA- 肽 - 脂质体诱导的免疫应答的影响

[0280] 为了调查 TLR9 在用共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 注射的小鼠的抗体生产中的作用，我们使用 BALB/c TLR9 敲除小鼠和野生型小鼠评估了 IgG 生产。正如所预期的，共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的 IgG 生产能力绝对依赖于 TLR9，因为当用共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 注射时，TLR9 敲除小鼠不产生 IgG（图 23e)。相反，发现用 HEL 与 IFA 的组合注射小鼠增加了野生型小鼠和 TLR9 敲除小鼠的 IgG 生产（图 23f)。

[0281] <14-5>II 类 MHC 介导的呈递和 Th1 分化对 CpG-DNA- 肽 - 脂质体诱导的体液免疫应答的影响

[0282] 为了评估对表位和 MB-ODN4531(O) 共包胶 DOPE :CHEMS 复合物免疫接种作出响应的 IgG 生产的动力学，我们用共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 以 10 日的时间间隔三次腹膜内注射 BALB/c 小鼠。BALB/c 小鼠在二次和三次应答中产生较大量肽特异性 IgG(IgG2a)（图 24a)。接下来，我们调查了对共包胶在 DOPE :

HEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 作出响应的 IgG 生产对 II 类 MHC 介导的呈递的需要性。如图 24b 中所示，通过用抗 CD4 抗体腹膜内注射 BALB/c 小鼠以贫化 $CD4^+$ 细胞，极大降低了肽特异性 IgG 的生产。此外，我们还观察到在 II 类 MHC 敲除小鼠和 OT-II 转基因小鼠中，对共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种作出响应的 IgG 和 IgG2a 生产的减少（图 24c、24d）。我们还研究了在对共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种作出响应的 IgG 生产中 Th1 分化的参与性。在 STAT4 敲除小鼠中，检测到对共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种作出响应的 IgG 和 IgG2a 生产的降低，所述 STAT4 促进 T 细胞分化成 Th1 细胞（图 24e）。然而，如图 24f 中所示，没有观察到 STAT6 敲除对共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 诱导的 IgG 生产的影响。这些结果表明，在 $CD4^+$ 细胞中，来自共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽和 MB-ODN4531(O) 的免疫接种的 IgG(IgG2a) 的生产，需要 II 类 MHC 介导的呈递和 Th1 分化。

[0283] 实施例 15 :小鼠抗 hTM4SF5 单克隆抗体的生产

[0284] 在用共包胶在 DOPE :CHEMS 复合物中的 hTM4SF5R2-3 肽 (50μg) 和 MB-ODN4531(O) (50μg) 以 10 日的时间间隔三次腹膜内注射 BALB/c 小鼠后，按照标准杂交瘤技术筛选产抗 hTM4SF5R2-3 肽特异性 mAb 的杂交瘤细胞 (39)。通过蛋白 A 柱层析 (Amersham Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ,USA) 从腹水液纯化抗 hTM4SF5R2-3 肽 mAb(IgG2a)。

[0285] 实施例 16 :通过由 CpG-DNA-TM4SF5 肽 - 脂质体复合物产生的单克隆抗体识别 TM4SF5 蛋白

[0286] <16-1>TM4SF5 在人类肝细胞瘤细胞中的表达分析

[0287] 人类肝癌细胞系 (Huh-7) 购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)(ATCC,Manassas,VA,USA)。人类肝细胞系 (SNU-398、SNU-423、SNU-739 和 SNU-761) 购自韩国细胞系库 (Korean Cell Line Bank)(Seoul，韩国）。Huh-7、SNU-398、SNU-423、SNU-739 和 SNU-761 细胞培养在含有 10 % FBS（胎牛血清 ;Hyclone,Logan,UT,USA) 的 RPMI1640 培养基中。人类正常肝细胞 (Promo Cell,Heidelberg，德国）按照制造商的详细说明进行培养。所有细胞在 5% CO_2 和 95% 空气条件下在 37℃温育。为了调查 hTM4SF5mRNA 的表达，进行 RT-PCR。使用 RNeasy 小提试剂盒 (Qiagen,Germantown,MD,USA) 分离总 RNA，并通过以前描述的方法进行 cDNA 的制备 (40)。使用下列引物组执行标准的 25 个 PCR 循环 :人类 β - 肌动蛋白，5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'和 5'-CCTTAATGTCACGCACGATTT-3'(500bp) ;hTM4SF5。Huh-7 和 SNU-761 细胞显示出高的 TM4SF5mRNA 表达水平（图 25a)。

[0288] <16-2> 通过识别 TM4SF5R2-3 肽的单克隆抗体识别 TM4SF5 蛋白 (FACS 分析）

[0289] 为了调查抗体的结合，将肝癌细胞在含 0.1% BSA 的 PBS 中清洗，并在 4℃下与 10μg/ml 人类 IgG(sigma) 温育 20 分钟，用于阻断 Fc 受体结合。在阻断后，将细胞与纯化的抗 TM4SF5R2-3 肽抗体（实施例 15) 培养 1 小时。然后将细胞在含 0.1% BSA 的 PBS 中清洗，并与 FITC 偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (BD Biosciences) 在 4℃培养 30 分钟。证实了纯化的抗 TM4SF5R2-3 肽抗体与被证明表达 TM4SF5mRNA 的 Huh-7 和 SNU-761 细胞结合（图 25c)。

[0290] 实施例 17 :通过由 CpG-DNA-TM4SF5 肽 - 脂质体复合物产生的抗体抑制肝癌细胞生长

[0291] <17-1> 通过抗抗 TM4SF5R2-3 肽单克隆抗体抑制细胞生长

[0292] 在用抗 TM4SF5R2-3 肽抗体 (10μg/ml) 处理 72 小时后,通过 MTT 测定法分析人类肝癌细胞 (Huh-7 和 SNU-739) 的生长。

[0293] 将肝癌细胞在 48 孔板中温育 72 小时,向每块板加入 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四氮唑 (MTT,Sigma-Aldrich) 溶液,并在 37℃继续温育 4 小时。在除去培养基后,将甲腊晶体溶解在 DMSO 中。使用分光光度计 (SpectraMax250,Molecular Devices,Downingtown,PA,USA) 在 570nm 处监测显色,参比波长为 650nm。通过 MTT 测定法证实了表达 TM4SF5 的 Huh-7 细胞当用抗 TM4SF5R2-3 肽抗体处理时,其生长被抑制 (图 25d)。相反,不表达 TM4SF5 的细胞 (SNU-739) 不受影响 (图 25d)。

[0294] <17-2> 通过抗 TM4SF5R2-3 肽抗体调控细胞周期

[0295] 将肝癌细胞 (Huh-7 和 SNU-739) 用抗 TM4SF5R2-3 肽抗体 (10μg/ml) 处理 72 小时,并观察细胞周期。通过在溶解于含 RNase(200μg/ml) 的 PBS 的 PI(碘化丙啶)(20μg/ml) 中进行温育,来测量 DNA 含量。将细胞在室温下染色 30 分钟,并通过 FACScan 流式细胞仪 (BD biosciences) 进行分析。通过 ModFit LT3.0 软件分析数据以获得细胞周期分布。

[0296] 对每个群体中细胞周期阶段的分布进行比较。观察到表达 TM4SF5 的 Huh-7 细胞当用抗 TM4SF5R2-3 肽抗体处理时,其 S 期被停止。相反,不表达 TM4SF5 的 SNU-739 的细胞周期不受影响 (图 25d)。

[0297] <17-3> 通过抗 TM4SF5R2-3 肽抗体抑制肝癌细胞

[0298] 已经发现,表达 TM4SF5 的肝癌细胞失去细胞 - 细胞接触抑制能力,从而发育成肝癌细胞 (41)。尽管表达 TM4SF5 的肝癌细胞显示出肌动蛋白的异常集束,但在不表达 TM4SF5 的细胞中,通过肌动蛋白染色检测到了支撑外延的多边形形状的应力纤维的独特外形 (41)。因此,我们用抗 TM4SF5R2-3 肽抗体 (10μg/ml) 对肝癌细胞 (Huh-7 和 SNU-739) 处理 72 小时,并对肌动蛋白进行观察。

[0299] 在抗 hTM4SF5 抗体 (10μg/ml) 处理前,将细胞在 12 孔板中的玻璃盖片上培养 1 天。在用抗体处理细胞 72 小时后,将细胞用 4% 聚甲醛固定,用 0.1% Triton X-100 通透化,并用偶联有罗丹明的鬼笔环肽 (Molecular Probes,Eugene,OR,USA) 染色。细胞核用 Hoechst No.33258 染色。用 LSM510META NLO(Carl Zeiss,Jena,德国) 对固定后的样品进行扫描。

[0300] 当用抗 hTM4SF5R2-3 肽特异性抗体处理表达 TM4SF5 的肝细胞瘤细胞 (Huh-7) 时,肌动蛋白具有与不表达 TM4SF5 的细胞中相同的支撑外延的多边形形状的应力纤维的独特外形,表明抗体靶向表达 hTM4SF5 的细胞 (图 25f)。这些结果表明,由共包胶在脂质体 (DOPE :CHEMS) 中的 MB-ODN4531(O) 和 hTM4SF5R2-3 所产生的抗体可以有效地用于检测 hTM4SF5 蛋白,并且抗体介导的 hTM4SF5 定向与肝细胞瘤细胞的功能变化相关,其能够使细胞生长降低,以改变细胞功能的多样性。

[0301] 实施例 18 :在体内通过 hTM4SF5R2-3 肽特异性抗体抑制肝癌细胞生长

[0302] <18-1> 裸鼠中的异种移植实验

[0303] 将 $5x10^6$ 个肝癌细胞 (Huh-7) 皮下注射到裸鼠的右胁。在癌症生长至直径为 5mm

后，将样品分成三组，即 PBS、正常 IgG 和抗 TM4SF5R2-3 肽抗体组（n = 5/ 组）。每个组以 3 日的时间间隔 5 次注射 PBS 和每种抗体（100mg/Kg 小鼠）。在 5 周的观察期间使用卡尺测量癌症的总体积。异种移植实验的分析揭示，靶向肝癌细胞的抗 TM4SF5R2-3 肽抗体足以在体内降低肿瘤生长（图 26a 和 26b）。

[0304] 实施例 19：通过用 MB-ODN4531(O)-hTM4SF5R2-3 肽 - 脂质体复合物预防接种在体内抑制肝癌细胞生长

[0305] <19-1> 小鼠肿瘤同种异体移植实验

[0306] 以 10 日的时间间隔三次用 MB-ODN4531(O)-TM4SF5R2-3 肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物腹膜内注射 4 周龄 BALB/c 小鼠。在第三次免疫接种后 10 日，将含有 $5x10^6$ 个 BNL-HCC 细胞的 50％基质胶皮下注射到 BALB/c 小鼠的右胁中。在 7 周的观察期间使用卡尺测量癌症的总体积。用 MB-ODN4531(O)-TM4SF5R2-3 肽 - 脂质体 (DOPE :CHEMS) 复合物免疫接种的小鼠与未处理的小鼠相比，肿瘤体积明显减小（图 27a 和 27b）.

[0307] 尽管已经描述了本发明的优选实施方案，但应该理解，在本发明的精神范围之内对其进行改变和修改，对于本技术领域的专业人员来说可能变得显而易见，本发明的范围将由随附的权利要求书及其等效物确定。

[0308] 本申请还涉及下列实施方案：

[0309] 1. 一种用于增强免疫应答的组合物，所述组合物作为活性成分包含了包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中的 (a) 免疫刺激性寡核苷酸和 (b) 表位。

[0310] 2. 项目 1 的组合物，其中阴离子型表面活性剂选自磷脂酰甘油、心磷脂、磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰丝氨酸、磷酸二鲸蜡酯、磷脂酸、二酰基磷脂酸、油酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、NSPE(N- 琥珀酰磷脂酰乙醇胺）、NGPE(N- 戊二酰磷脂酰乙醇胺）、LPG（赖氨酰磷脂酰甘油）和 CHEMS（胆甾醇半琥珀酸酯）。

[0311] 3. 项目 2 的组合物，其中阴离子型表面活性剂是 CHEMS（胆甾醇半琥珀酸酯）。

[0312] 4. 项目 1 的组合物，其中中性磷脂选自磷脂酰胆碱、DPPC（二棕榈酰磷脂酰胆碱）、DSPC(1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱）、DMPC（二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱）、胆甾醇、PEG-PE（聚乙二醇磷脂酰乙醇胺）、DOPC（二油酰磷脂酰胆碱）和 DOPE（二油烯基磷脂酰乙醇胺）。

[0313] 5. 项目 4 的组合物，其中中性磷脂是 DOPE（二油烯基磷脂酰乙醇胺）。

[0314] 6. 项目 1 的组合物，其中脂质体是 CHEMS 和 DOPE 的混合物。

[0315] 7. 项目 6 的组合物，其中脂质体含有摩尔比为 4.5 :5.5 至 5.5 :4.5 的 DOPE 和 CHEMS。

[0316] 8. 项目 7 的组合物，其中 DOPE 与 CHEMS 的摩尔比为 5.0 :5.0。

[0317] 9. 项目 1 的组合物，其中免疫刺激性寡核苷酸具有磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架。

[0318] 10. 项目 9 的组合物，其中免疫刺激性寡核苷酸含有 CpG 基序、CpT 基序、多个 G 的结构域或形成发夹二级结构的回文序列。

[0319] 11. 项目 1 的组合物，其中表位是具有选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列的肽表位。

[0320] 12. 一种用于具有免疫原性的表位的筛选方法，所述方法包含下列步骤：

[0321] (a)将(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0322] (b)用所述包胶有(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；

[0323] (c)分析所述被免疫非人类动物的免疫应答。

[0324] 13.一种用于针对蛋白抗原的抗体的筛选方法，所述方法包含下列步骤：

[0325] (a)将(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0326] (b)用所述包胶有(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；以及

[0327] (c)通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位；

[0328] (d)将所述筛选到的肽表位与待分析的目标抗体相接触；

[0329] (e)将步骤(d)的结果与所述蛋白抗原相接触；以及

[0330] (f)分析所述蛋白抗原与目标抗体的结合。

[0331] 14.一种用于制备针对蛋白抗原的抗体的方法，所述方法包含下列步骤：

[0332] (a)将(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的蛋白抗原的肽包胶在含有阴离子型表面活性剂和中性磷脂的脂质体中；

[0333] (b)用所述包胶有(i)免疫刺激性寡核苷酸和(ii)作为表位候选材料的肽的脂质体免疫非人类动物；以及

[0334] (c)通过分析所述被免疫非人类动物的免疫应答来筛选具有免疫原性的肽表位；

[0335] (d)通过用所述筛选到的肽表位免疫非人类动物来生产抗体。

[0336] 15.项目12至14任一项的方法，其中阴离子型表面活性剂是CHEMS(胆甾醇半琥珀酸酯)。

[0337] 16.项目12至14任一项的方法，其中中性磷脂是DOPE(二油烯基磷脂酰乙醇胺)。

[0338] 17.项目12至14任一项的方法，其中脂质体是CHEMS和DOPE的混合物。

[0339] 18.项目12至14任一项的方法，其中脂质体含有摩尔比为4.5:5.5至5.5:4.5的DOPE和CHEMS。

[0340] 19.项目12至14任一项的方法，其中DOPE与CHEMS的摩尔比为5.0:5.0。

[0341] 20.项目12至14任一项的方法，其中免疫刺激性寡核苷酸含有CpG基序、CpT基序、多个G的结构域或形成发夹二级结构的回文序列。

[0342] 21.一种针对甲型流感病毒的肽类疫苗组合物，其包含选自SEQID NO:1至SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:19至SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0343] 22.一种针对人类整合蛋白β4的肽类疫苗组合物，其包含选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0344] 23.一种针对肝癌的肽类疫苗组合物，其包含SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0345] 24.一种针对丙肝病毒的肽类疫苗组合物，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0346] 25.一种针对RSV(呼吸道合胞病毒)的肽类疫苗组合物，其包含SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:38至SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0347] 26. 一种用于预防或治疗甲型流感病毒传染病的方法，所述方法包含向对象给药项目 21 的组合物。

[0348] 27. 一种用于预防或治疗癌症的方法，所述方法包含向对象给药项目 22 的组合物。

[0349] 28. 一种用于预防或治疗肝癌的方法，所述方法包含向对象给药项目 23 的组合物。

[0350] 29. 一种用于预防或治疗丙型肝炎的方法，所述方法包含向对象给药项目 24 的组合物。

[0351] 30. 一种用于预防或治疗 RSV（呼吸道合胞病毒）传染病的方法，所述方法包含向对象给药项目 25 的组合物。

[0352] 参考文献

[0353] 1.Ben-Yedidia,T. 等，Curr.Opin.Biotechnol.8:442-448(1997).

[0354] 2.Bijker,M.S. 等，Expert Rev.Vaccines6:591-603(2007).

[0355] 3.Ben-Yedidia,T. 等，Expert Rev.Vaccines6:939-948(2007).

[0356] 4.Castilow,E.M. 等，Immunol.Res.39:225-239(2007).

[0357] 5.Rosenberg,S.A. 等，Nat.Med.10:909-915(2004).

[0358] 6.Zhao,L. 等，Expert Rev.Vaccines7:1547-1555(2008).

[0359] 7.Kashala,O. 等，Vaccine20:2263-2277(2002).

[0360] 8.Engler,O. 等，Mol.Immunol.38:457-465(2001).

[0361] 9.Pinto,L.A 等，AIDS13:2003-2012(1999).

[0362] 10.Chikh,G. 等，Bioscience Reports22:339-353(2002).

[0363] 11.Ben-Yedidia,T. 等，Int.Immunol.11:1043-1051(1999).

[0364] 12.Speiser,D.E. 等，J.Clin.Invest.115:739-746(2005).

[0365] 13.Felnerova,D. 等，Curr.Opin.Biotechnol.15:518-529(2004).

[0366] 14.Simoes,S. 等，Adv.Drug Deliv.Rev.56:947-965(2004).

[0367] 15.Collins,D.S. 等，J.Immunol.148:3336-3341(1992).

[0368] 16.Chang,J. 等，Vaccine19:3608-3614(2001).

[0369] 17.Krieg,A.M.Annu.Rev.Immunol.20:709-760(2002).

[0370] 18.Klinman,D.M. 等，Immunological Reviews199:201-216(2004).

[0371] 19.Chu,R.S. 等，J.Exp.Med.186:1623-1631(1997).

[0372] 20.Carson,D.A. 等，J.Exp.Med.186:1621-1622(1997).

[0373] 21.Davis,H.L. 等，J.Immunol.160:870-876(1998).

[0374] 22.Suzuki,Y. 等，Cancer Res.64:8754-9760(2004).

[0375] 23.Gursel,I 等，J.Immunol.167:3324-3328(2001).

[0376] 24.Li,W.M. 等，Vaccine21:3319-3329(2003).

[0377] 25.Krieg,A.M.Nat.Rev.Drug.Discov.5:471-484(2006).

[0378] 26.Sparwasser,T. 等，J.Immunol.162:2368-2374(1999).

[0379] 27.Deng,G.M. 等，Nat.Med.5:702-705(1999).

[0380] 28.Ronaghy,A. 等，J.Immunol.168:51-56(2002).

[0381] 29. Yasuda, K. 等, J. Immunol. 174:6129-6136(2005).

[0382] 30. Magnusson, M. 等, J. Immunol. 179:31-35(2007).

[0383] 31. Lee, K. W. 等, Mol. Immunol. 43:2107-2118(2006).

[0384] 32. Kim, D. 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 379:362-367(2009).

[0385] 33. McConnell, H. M. 等, Science257:1906 - 1912(1992).

[0386] 34. Sjolander, S. 等, Anal. Chem. 63:2338 - 2345(1991).

[0387] 35. Szabo, A. 等, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699 - 705(1995).

[0388] 36. Hoffmann, E. 等, Vaccine20:3165-3170(2002).

[0389] 37. Palmer, D. F. 等, Immunol. Ser. 6:51-52(1975).

[0390] 38. Kida, H. 等, Virology122:38-47(1982).

[0391] 39. Yokoyama, W. M. “单克隆抗体的生产”(Production of monoclonal antibody), p. 2. 5. 1-2. 5. 17. 在 J. E. Ciligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, &W. Strober 主编的《免疫学现代方法》(Current protocols in Immunology) 中, John Wiley&Sons. Inc., Newcastle, United Kingdom. (2001).

[0392] 40. Kim, D. 等, Immunol. Invest. 38:132-152(2009).

[0393] 41. Lee, S. A. 等, J. Clin. Invest. 118:1354-1365(2008))

[0001]

序列表

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University

<120> 包含脂质体包胶的寡核苷酸和表位的免疫刺激性组合物

<130> PP100018CN

<150> KR 10-2009-0065495
<151> 2009-07-17

<150> PCT/KR2010/003879
<151> 2010-06-16

<160> 46

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 1
Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys
1 5 10

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 2
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
1 5 10

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 3
Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10 15

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 4
His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 5
Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

[0002]

<400> 6
Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Lys Asp Gln His Gly Arg Met
1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 7
Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Met
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 8
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 9
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg Cys Glu Ala Pro Pro Arg Val
1 5 10

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg Cys Glu Ala
1 5 10 15

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 丙肝病毒

<400> 12
Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒

[0003]

<400> 13
Met Ser Lys His Lys Asn Gln Arg Thr Ala Arg Thr Leu Glu Lys Thr
1 5 10 15

Trp Asp

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 牛分枝杆菌

<400> 14
agcagcgttc gtgtcggcct 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MB-ODN 4531(0)GC

<400> 15
agcaggcttc gtgtcggcct 20

<210> 16
<211> 13
<212> DNA
<213> 牛分枝杆菌

<400> 16
agcagcgttc ttg 13

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MB-ODN 4531(S)CT

<400> 17
agcagcgttc ttgtcggcct 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MB-4531(S)CS

<400> 18
aggccgacaa gaacgctgct 20

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1-HK HA370

<400> 19
His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Glu Ser

[0004]

1 5 10 15

Thr

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA 233-1

<400> 20
Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
1 5 10

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 233-2

<400> 21
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly Arg Met
1 5 10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-3

<400> 22
Met Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-4

<400> 23
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-6

<400> 24
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile
1 5 10

[0005]

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-7

<400> 25
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
1 5 10

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-9

<400> 26
Ile Ala Ala Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met
1 5 10

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH5N1 HA233-11

<400> 27
Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ile Gly Arg Met
1 5 10

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH1N1-NY HA370

<400> 28
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Lys Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH1N1-OH HA370

<400> 29
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Arg Lys Ser
1 5 10 15

Thr

[0006]

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH1N1-Thai HA233

<400> 30
Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln Ala Gly Arg Met
1 5 10

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mH2N5 HA233

<400> 31
Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Gly Gly Arg Met
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH7N7 HA233

<400> 32
Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH7N7 HA370

<400> 33
Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH9N2 HA233

<400> 34
Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Gln Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 35
<211> 17
<212> PRT

[0007]

<213> 人工序列

<220>
<223> hH9N2-ST HA370

<400> 35
Gln His Ser Lys Tyr Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hH9N2-HK HA370

<400> 36
Gln His Ser Asn Asp Gln Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser
1 5 10 15

Thr

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> sH15N2 HA233

<400> 37
Pro Gly Ala Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HRSV-Fa3

<400> 38
Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala
1 5 10 15

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HRSV-Fa3-2

<400> 39
Lys Val Lys Leu Ile Lys Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT

[0008]

<213> 人工序列

<220>
<223> HRSV-F7

<400> 40
Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val
1 5 10 15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HRSV-F9

<400> 41
Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hIB4-VWA-1-2

<400> 42
Lys Glu Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys Asn
1 5 10 15

<210> 43
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hIB4-VWA-1-3

<400> 43
Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys Leu Lys Glu Pro Trp Pro Asn
1 5 10 15

Ser Asp Pro

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hIB4-VWA-2

<400> 44
Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg Asn Lys Leu Gln Gly Glu Arg
1 5 10 15

Ile Ser Gly Asn
20

<210> 45
<211> 20
<212> PRT

[0009]

<213> 人工序列

<220>
<223> hIB4-VWA-3

<400> 45
Leu Asp Thr Thr Gly Thr Tyr Thr Gln Tyr Arg Thr Gln Asp Tyr Pro
1 5 10 15

Ser Val Pro Thr
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hIB4-EGF-1

<400> 46
Leu Gln Lys Glu Val Arg Ser Ala Arg Cys Ser Phe Asn Gly Asp
1 5 10 15

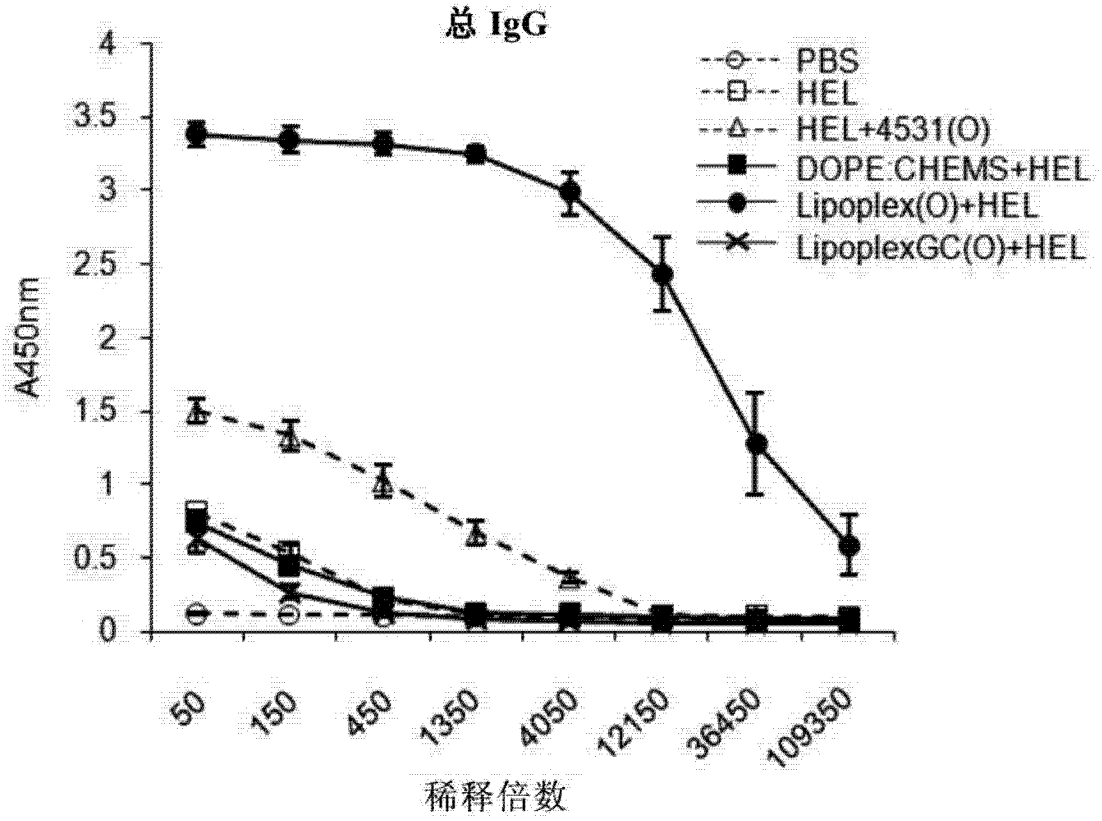

总 IgG
PBS
HEL
HEL+4531(O)
DOPE:CHEMS+HEL
Lipoplex(O)+HEL
LipoplexGC(O)+HEL
A450nm
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 1a

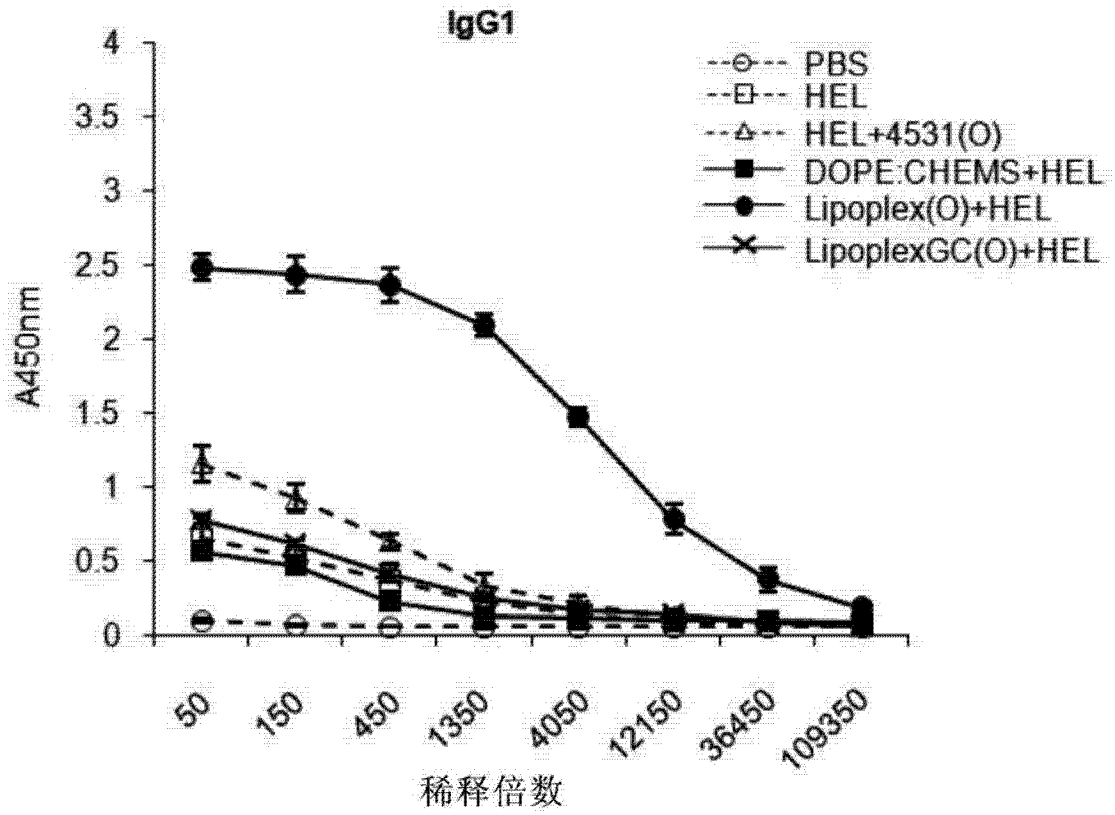

IgG1
PBS
HEL
HEL+4531(O)
DOPE:CHEMS+HEL
Lipoplex(O)+HEL
LipoplexGC(O)+HEL
A450nm
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 1b

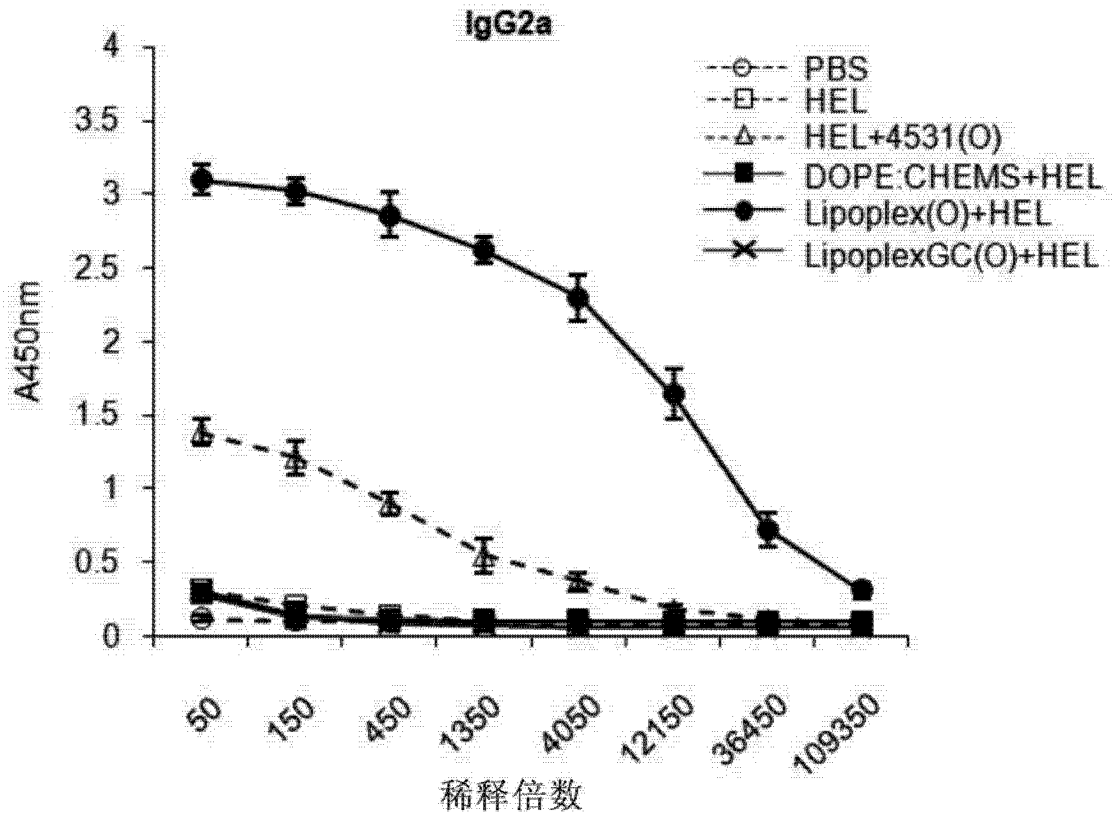

IgG2a
PBS
HEL
HEL+4531(O)
DOPE:CHEMS+HEL
Lipoplex(O)+HEL
LipoplexGC(O)+HEL
A450nm
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 1c

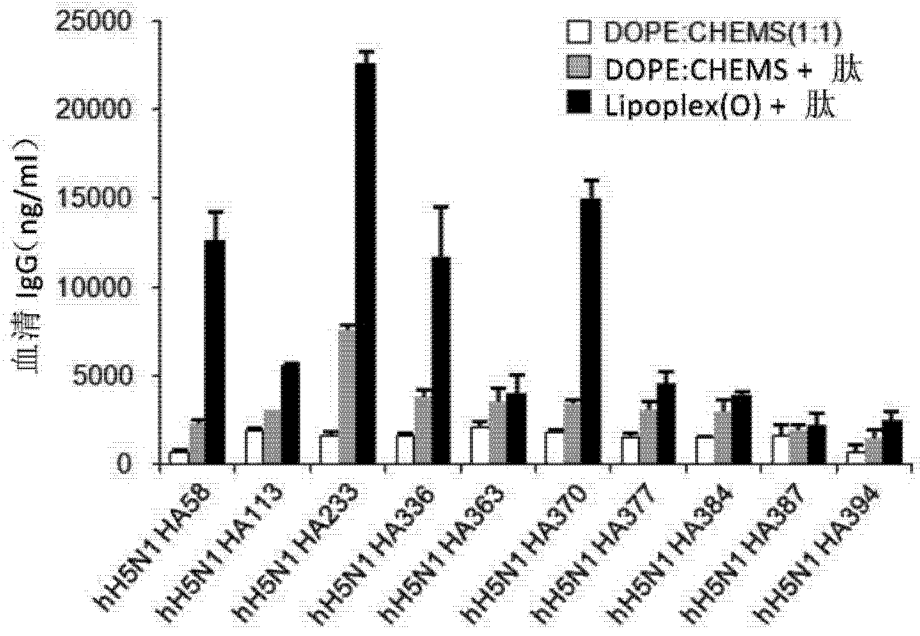

DOPE:CHEMS(1:1)
DOPE:CHEMS + 肽
Lipoplex(O) + 肽
血清 IgG(ng/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
hH5N1 HA58
hH5N1 HA113
hH5N1 HA233
hH5N1 HA336
hH5N1 HA363
hH5N1 HA370
hH5N1 HA377
hH5N1 HA384
hH5N1 HA387
hH5N1 HA394

图 2a

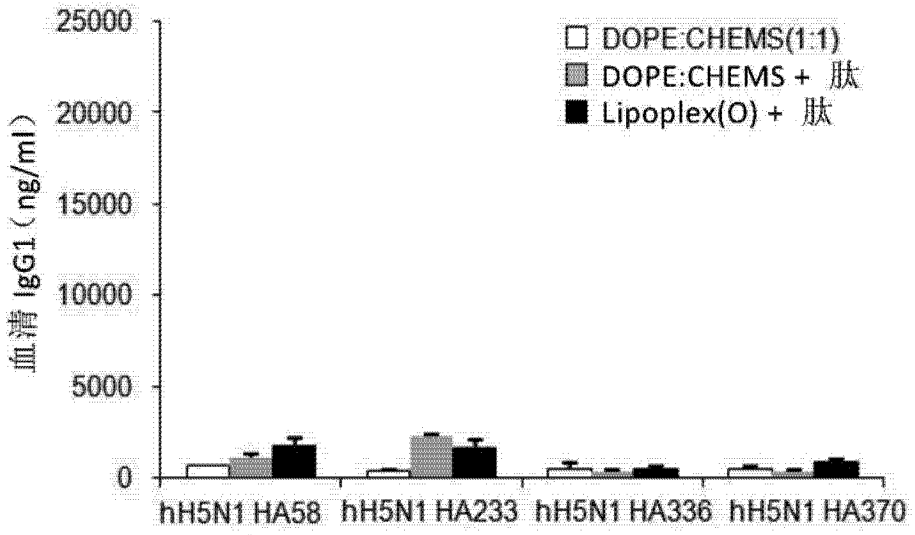

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG1（ng/ml）
DOPE:CHEMS(1:1)
DOPE:CHEMS + 肽
Lipoplex(O) + 肽
hH5N1 HA58
hH5N1 HA233
hH5N1 HA336
hH5N1 HA370

图 2b

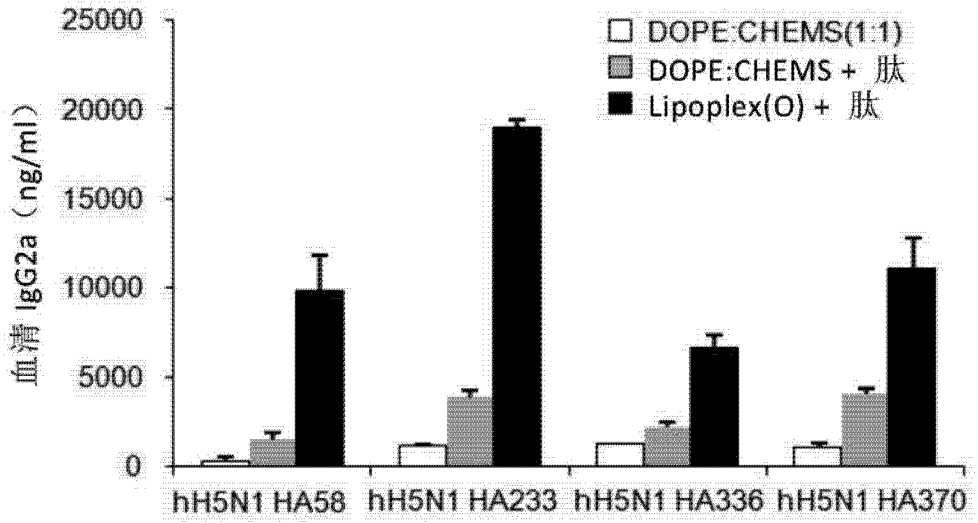

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG2a（ng/ml）
DOPE:CHEMS(1:1)
DOPE:CHEMS + 肽
Lipoplex(O) + 肽
hH5N1 HA58
hH5N1 HA233
hH5N1 HA336
hH5N1 HA370

图 2c

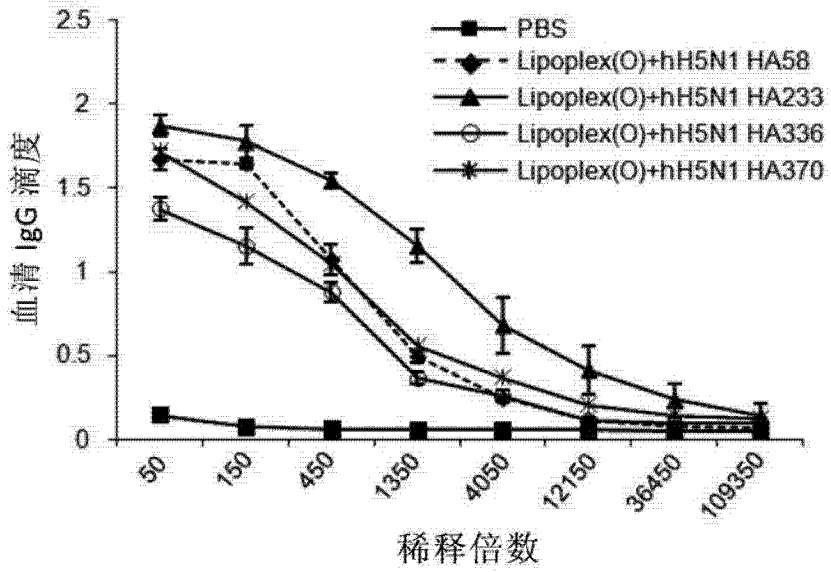

PBS
Lipoplex(O)+hH5N1 HA58
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233
Lipoplex(O)+hH5N1 HA336
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370
血清 IgG 滴度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 2d

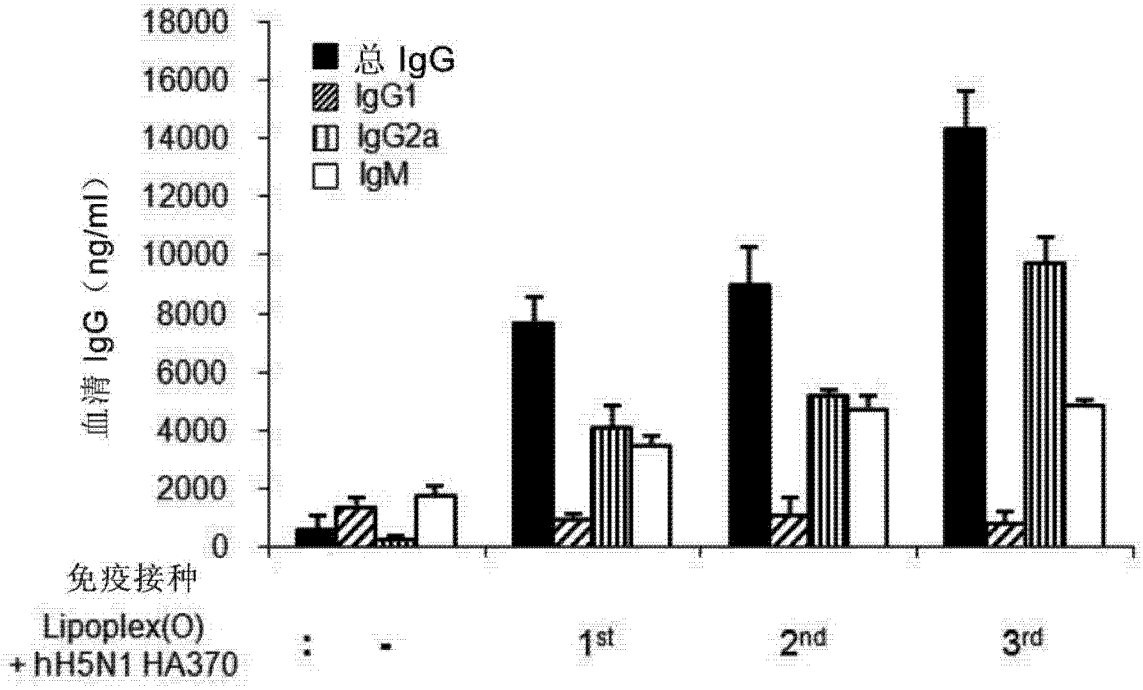

总 IgG
IgG1
IgG2a
IgM
血清 IgG（ng/ml）
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
免疫接种
Lipoplex(O)
+ hH5N1 HA370
: -
1st
2nd
3rd

图 2e

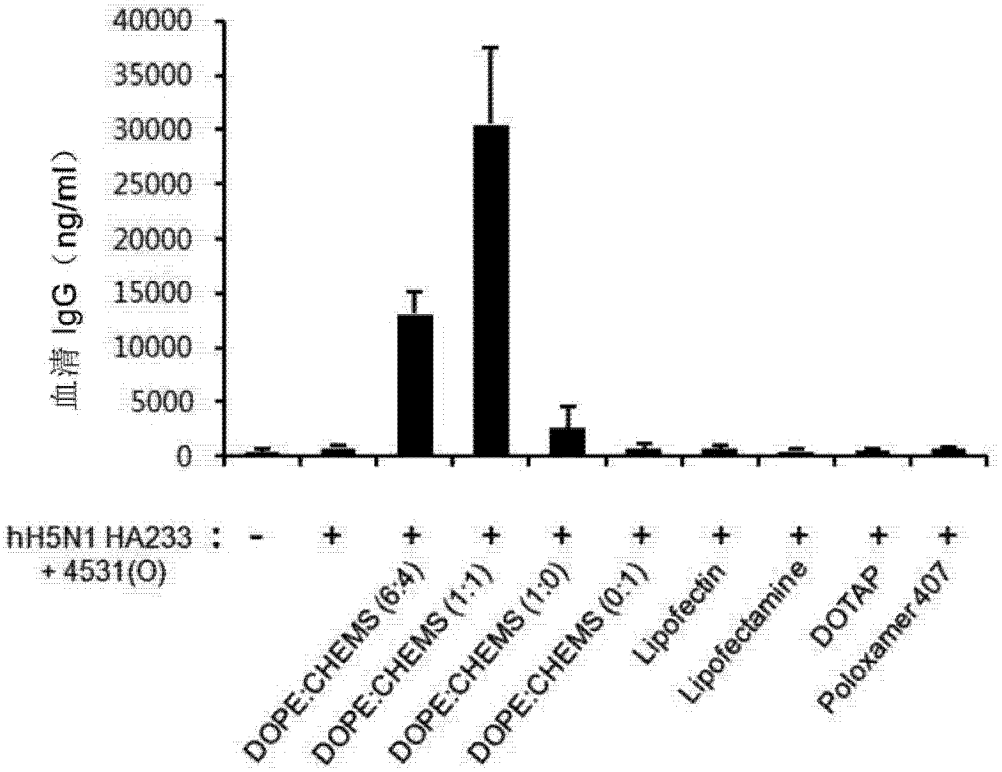

40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
hH5N1 HA233 + 4531(O) : - + + + + + + + + +
DOPE:CHEMS (6:4)
DOPE:CHEMS (1:1)
DOPE:CHEMS (1:0)
DOPE:CHEMS (0:1)
Lipofectin
Lipofectamine
DOTAP
Poloxamer407

图 3a

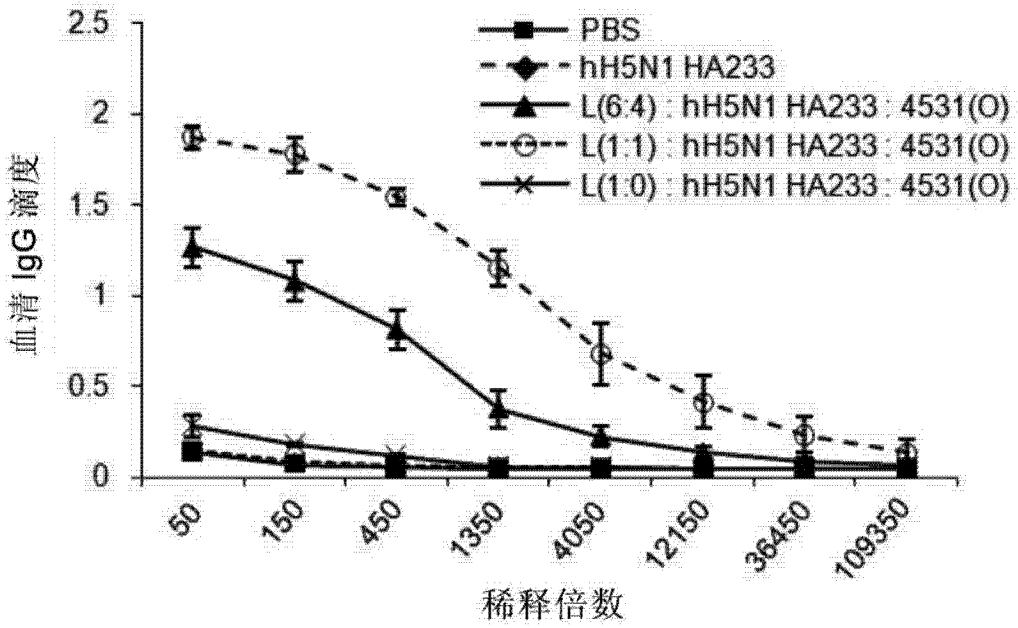

2.5
2
1.5
1
0.5
0
血清 IgG 滴度
PBS
hH5N1 HA233
L(6:4) : hH5N1 HA233 : 4531(O)
L(1:1) : hH5N1 HA233 : 4531(O)
L(1:0) : hH5N1 HA233 : 4531(O)
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 3b

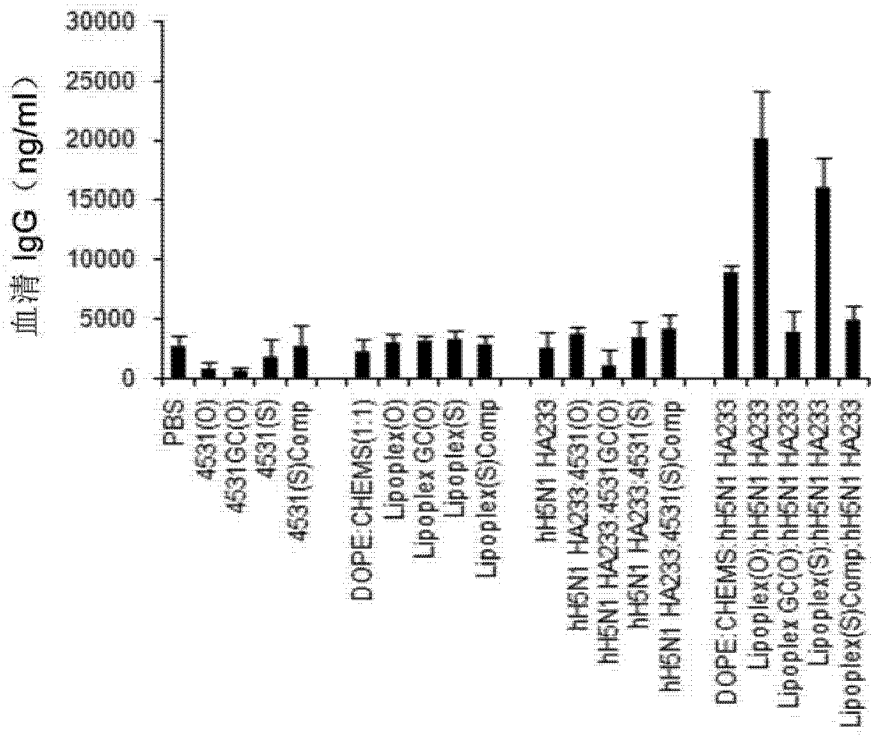

血清 IgG（ng/ml）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
4531(O)
4531GC(O)
4531(S)
4531(S)Comp
DOPE:CHEMS(1:1)
Lipoplex(O)
Lipoplex GC(O)
Lipoplex(S)
Lipoplex(S)Comp
hH5N1 HA233
hH5N1 HA233:4531(O)
hH5N1 HA233:4531GC(O)
hH5N1 HA233:4531(S)
hH5N1 HA233:4531(S)Comp
DOPE:CHEMS:hH5N1 HA233
Lipoplex(O):hH5N1 HA233
Lipoplex GC(O):hH5N1 HA233
Lipoplex(S):hH5N1 HA233
Lipoplex(S)Comp:hH5N1 HA233

图 4

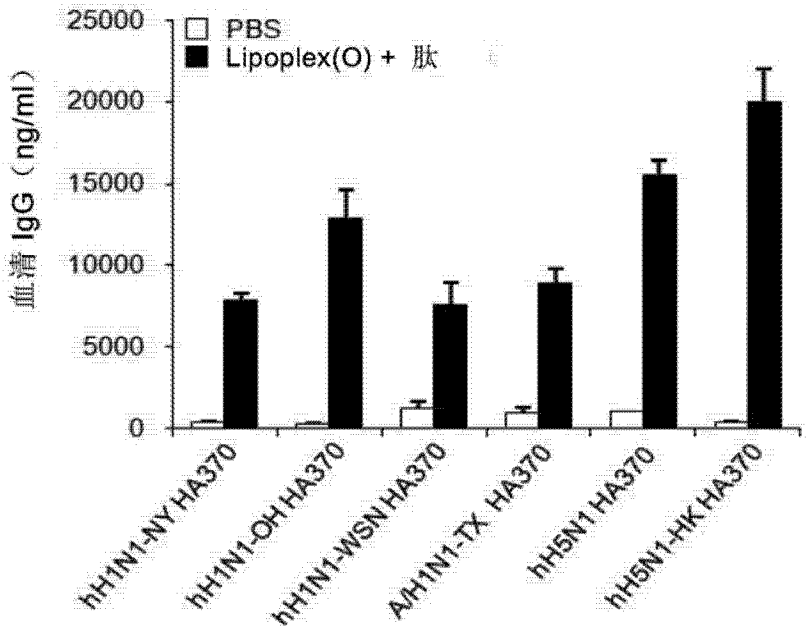

血清 IgG（ng/ml）
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
Lipoplex(O) + 肽
hH1N1-NY HA370
hH1N1-OH HA370
hH1N1-WSN HA370
A/H1N1-TX HA370
hH5N1 HA370
hH5N1-HK HA370

图 5a

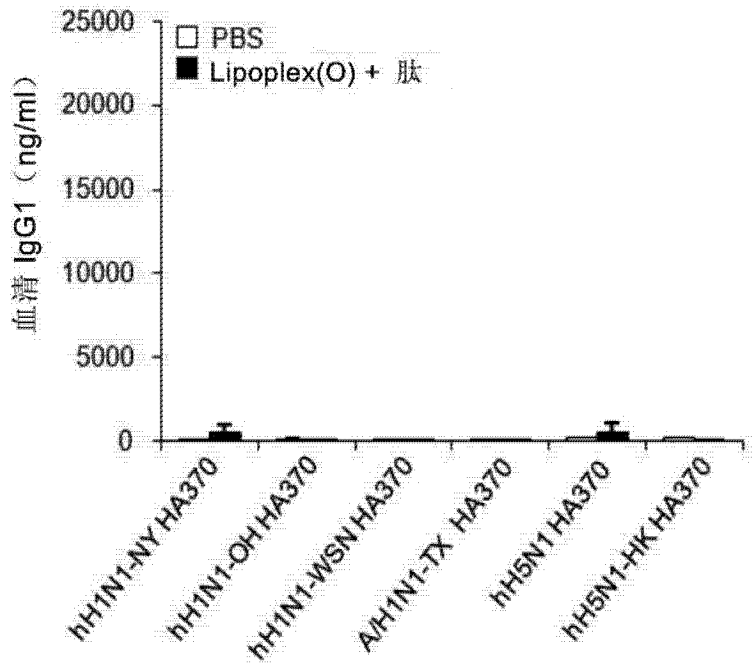

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG1（ng/ml）
PBS
Lipoplex(O) + 肽
hH1N1-NY HA370
hH1N1-OH HA370
hH1N1-WSN HA370
A/H1N1-TX HA370
hH5N1 HA370
hH5N1-HK HA370

图 5b

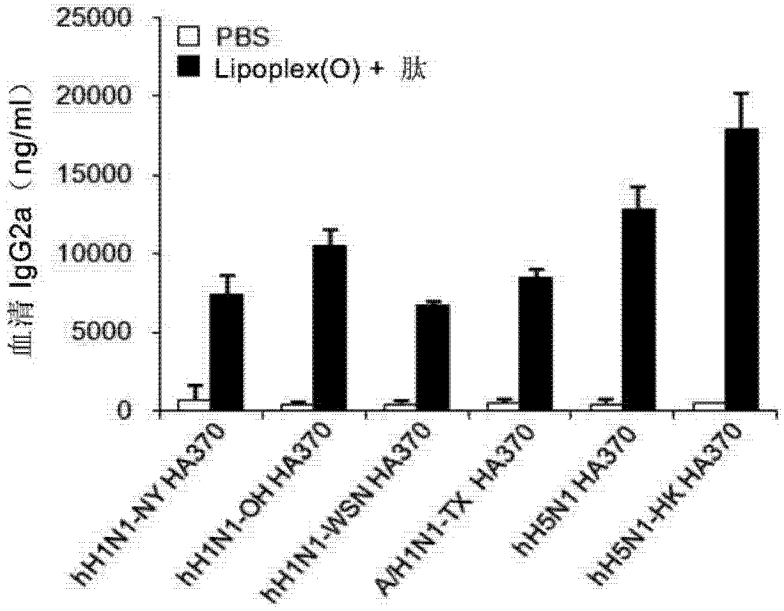

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG2a（ng/ml）
PBS
Lipoplex(O) + 肽
hH1N1-NY HA370
hH1N1-OH HA370
hH1N1-WSN HA370
A/H1N1-TX HA370
hH5N1 HA370
hH5N1-HK HA370

图 5c

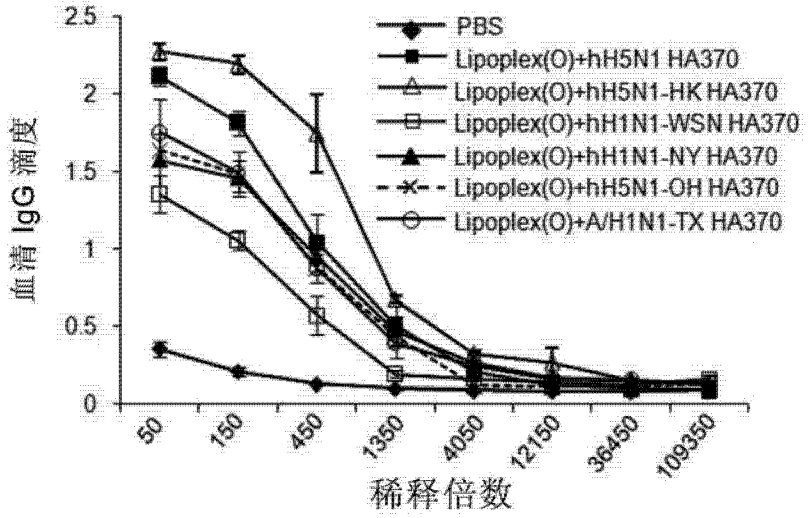

2.5
2
1.5
1
0.5
0
血清 IgG 滴度
PBS
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370
Lipoplex(O)+hH5N1-HK HA370
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA370
Lipoplex(O)+hH1N1-NY HA370
Lipoplex(O)+hH5N1-OH HA370
Lipoplex(O)+A/H1N1-TX HA370
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 5d

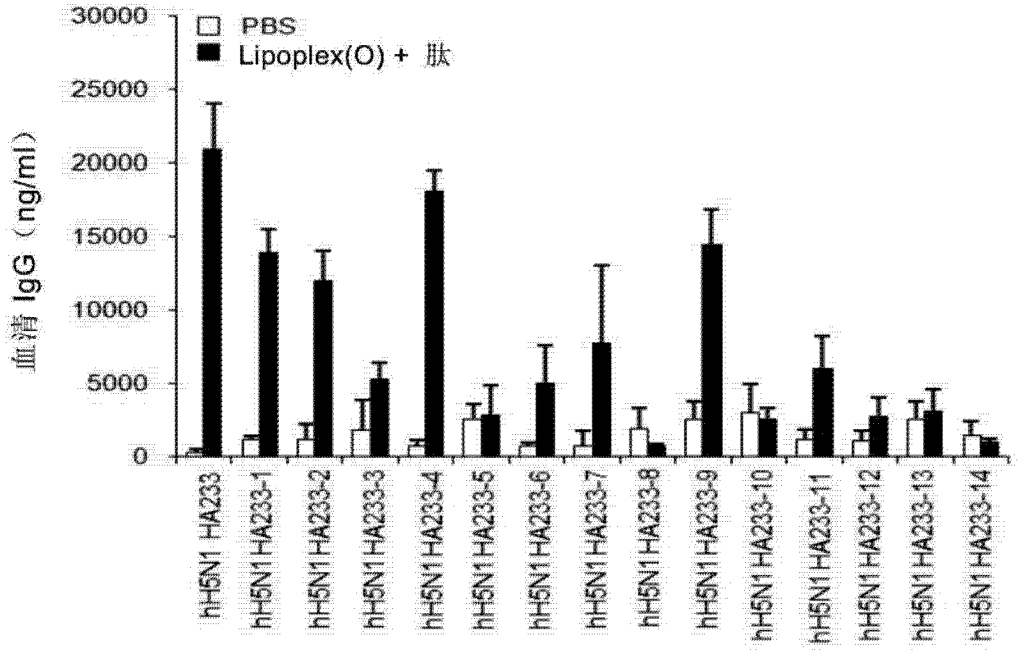

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
PBS
Lipoplex(O) + 肽
hH5N1 HA233
hH5N1 HA233-1
hH5N1 HA233-2
hH5N1 HA233-3
hH5N1 HA233-4
hH5N1 HA233-5
hH5N1 HA233-6
hH5N1 HA233-7
hH5N1 HA233-8
hH5N1 HA233-9
hH5N1 HA233-10
hH5N1 HA233-11
hH5N1 HA233-12
hH5N1 HA233-13
hH5N1 HA233-14

图 6a

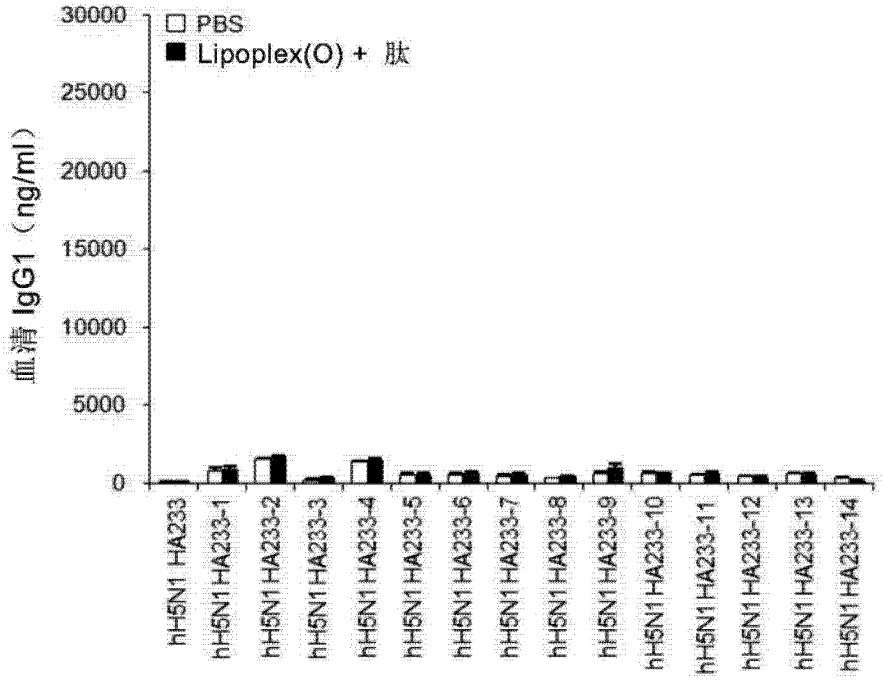

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
Lipoplex(O) + 肽
血清 IgG1（ng/ml）
hH5N1 HA233
hH5N1 HA233-1
hH5N1 HA233-2
hH5N1 HA233-3
hH5N1 HA233-4
hH5N1 HA233-5
hH5N1 HA233-6
hH5N1 HA233-7
hH5N1 HA233-8
hH5N1 HA233-9
hH5N1 HA233-10
hH5N1 HA233-11
hH5N1 HA233-12
hH5N1 HA233-13
hH5N1 HA233-14

图 6b

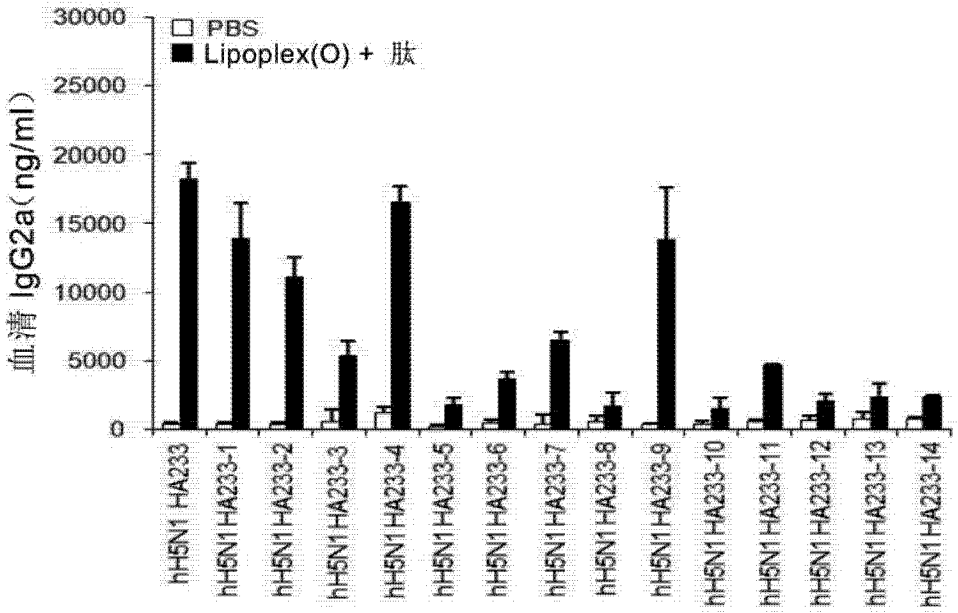

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
Lipoplex(O) + 肽
血清 IgG2a（ng/ml）
hH5N1 HA233
hH5N1 HA233-1
hH5N1 HA233-2
hH5N1 HA233-3
hH5N1 HA233-4
hH5N1 HA233-5
hH5N1 HA233-6
hH5N1 HA233-7
hH5N1 HA233-8
hH5N1 HA233-9
hH5N1 HA233-10
hH5N1 HA233-11
hH5N1 HA233-12
hH5N1 HA233-13
hH5N1 HA233-14

图 6c

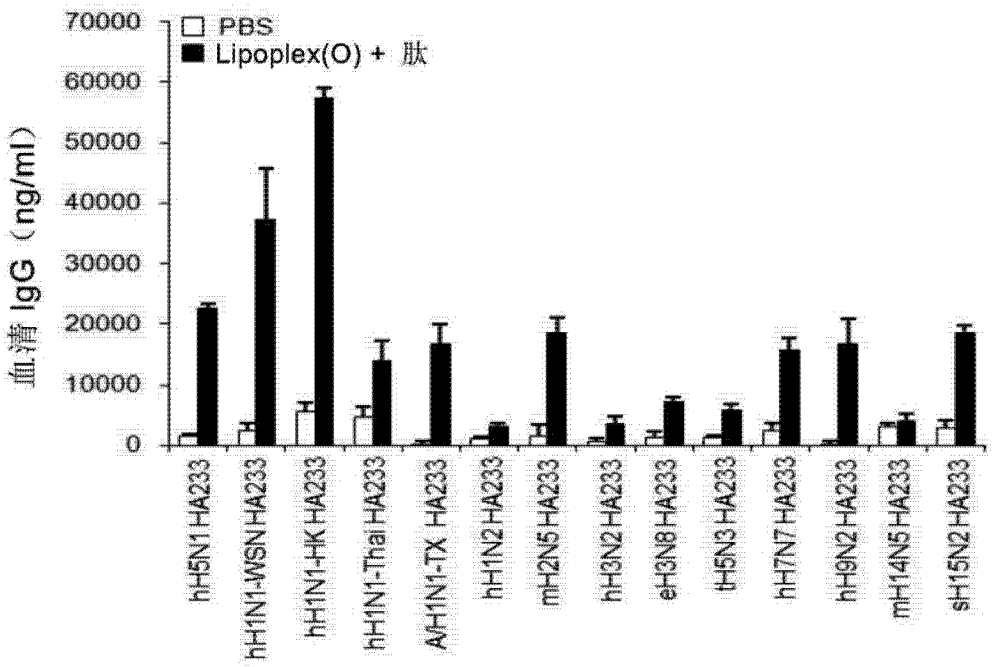

70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
血清 IgG（ng/ml）
PBS
Lipoplex(O) + 肽
hH5N1 HA233
hH1N1-WSN HA233
hH1N1-HK HA233
hH1N1-Thai HA233
A/H1N1-TX HA233
hH1N2 HA233
mH2N5 HA233
hH3N2 HA233
eH3N8 HA233
tH5N3 HA233
hH7N7 HA233
hH9N2 HA233
mH14N5 HA233
sH15N2 HA233

图 6d

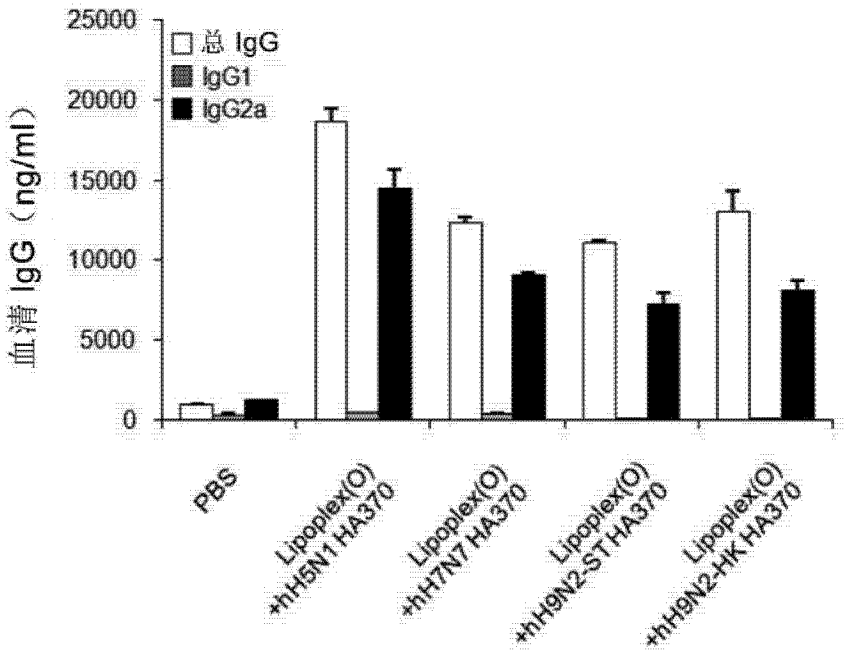

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
总 IgG
IgG1
IgG2a
PBS
Lipoplex(O) +hH5N1 HA370
Lipoplex(O) +hH7N7 HA370
Lipoplex(O) +hH9N2-ST HA370
Lipoplex(O) +hH9N2-HK HA370

图 7a

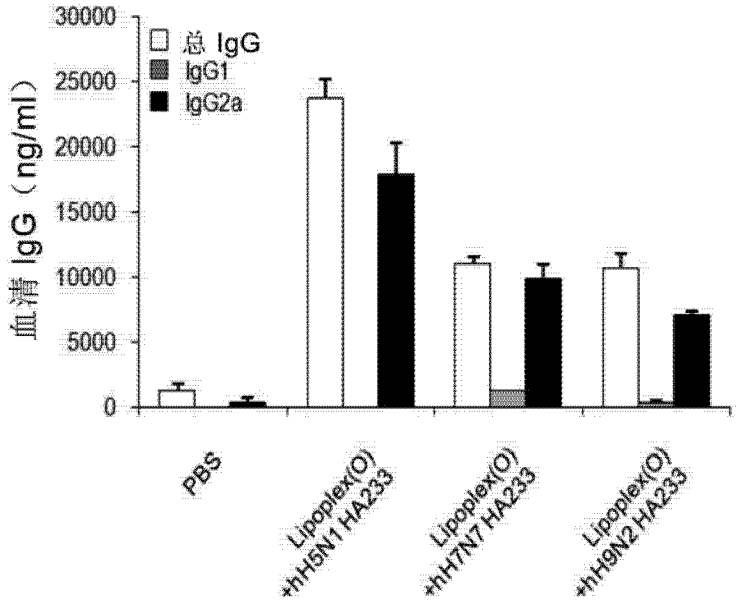

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
总 IgG
IgG1
IgG2a
PBS
Lipoplex(O) +hH5N1 HA233
Lipoplex(O) +hH7N7 HA233
Lipoplex(O) +hH9N2 HA233

图 7b

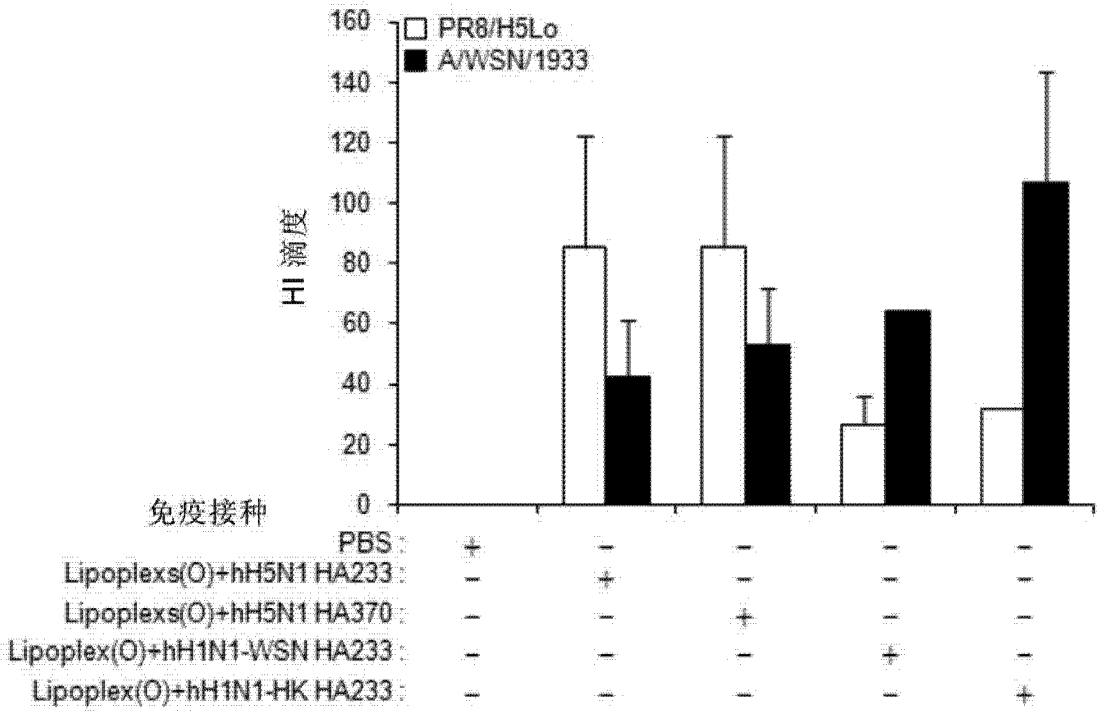
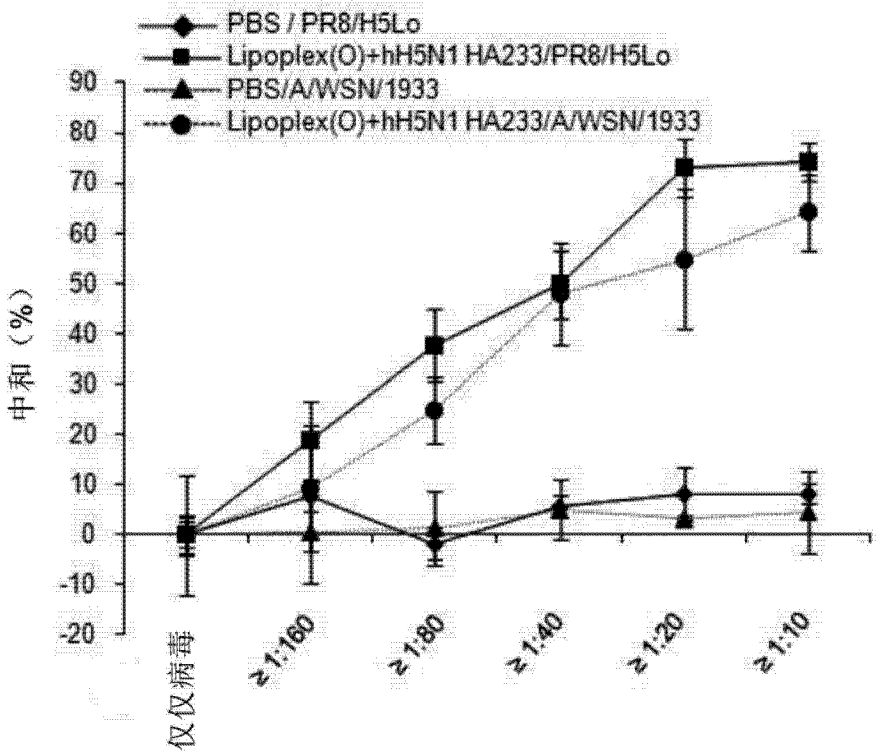
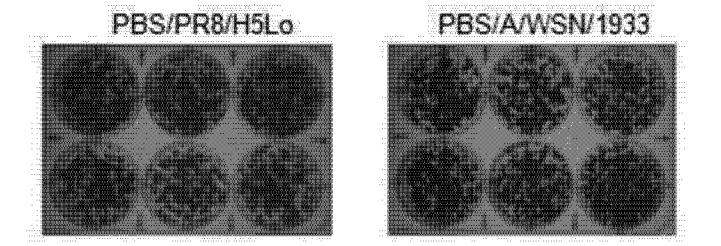
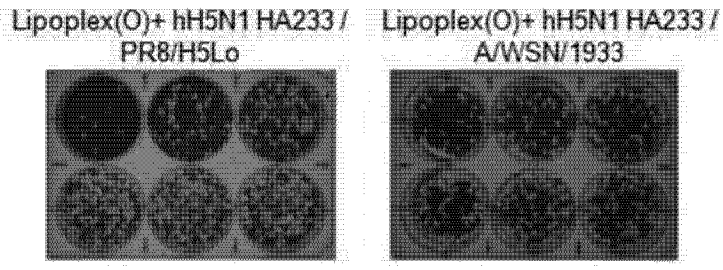

160
140
120
100
80
60
40
20
0
HI 滴度
PR8/H5Lo
A/WSN/1933
免疫接种
PBS : + − − − −
Lipoplexs(O)+hH5N1 HA233 : − + − − −
Lipoplexs(O)+hH5N1 HA370 : − − + − −
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233 : − − − + −
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233 : − − − − +

图 8a







1:10	1:20	1:40
1:80	1:160	仅仅病毒

图 8b

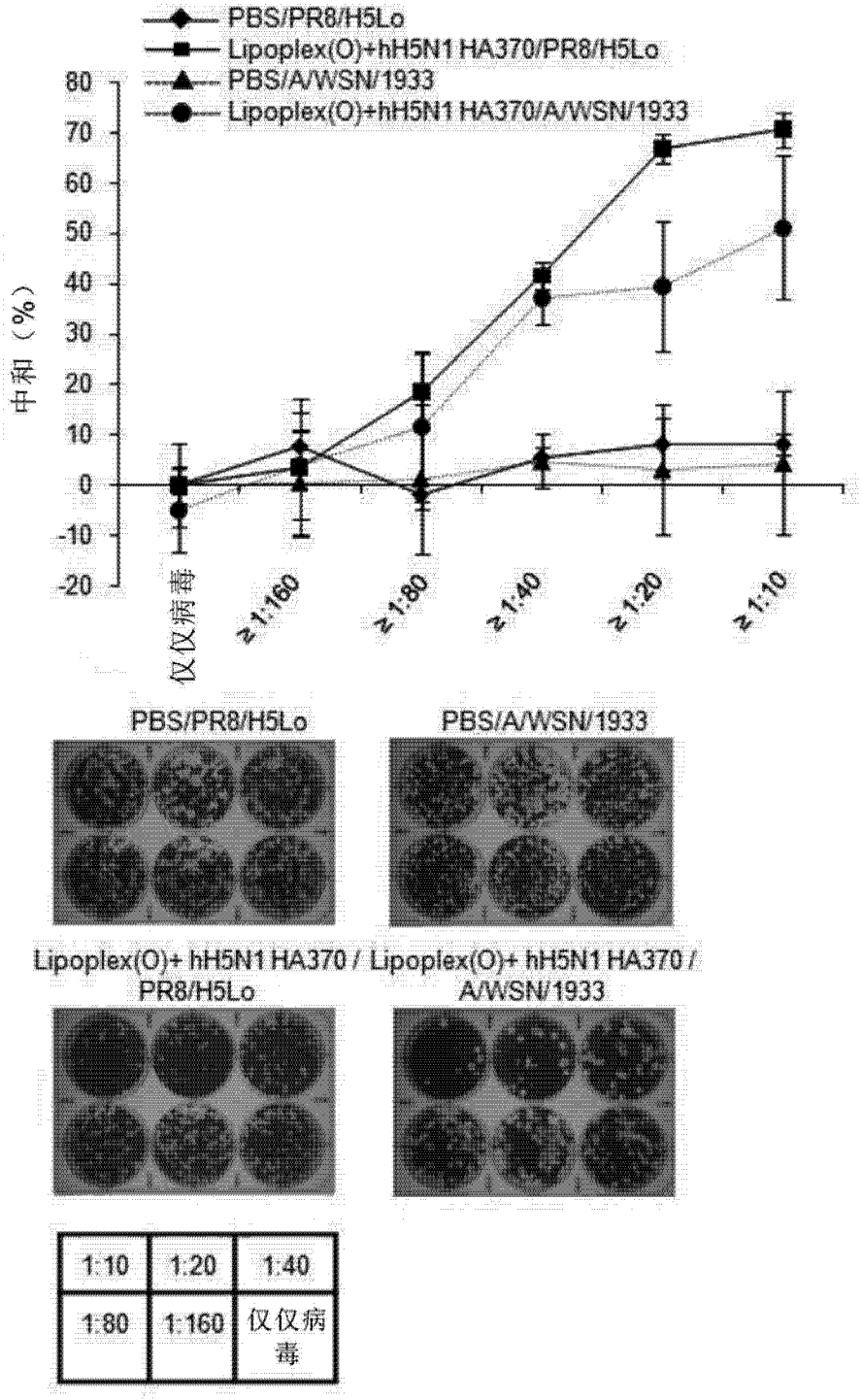
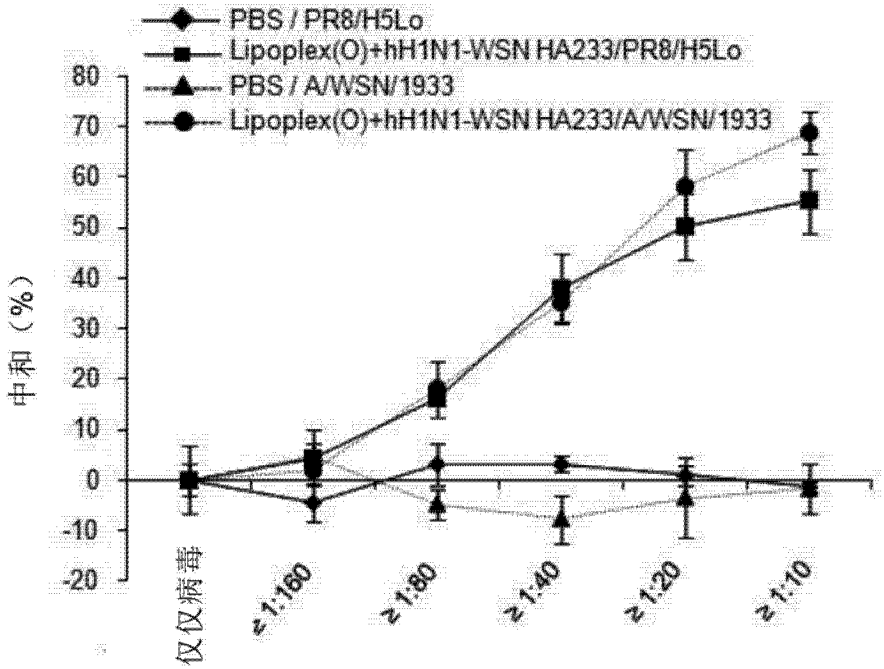
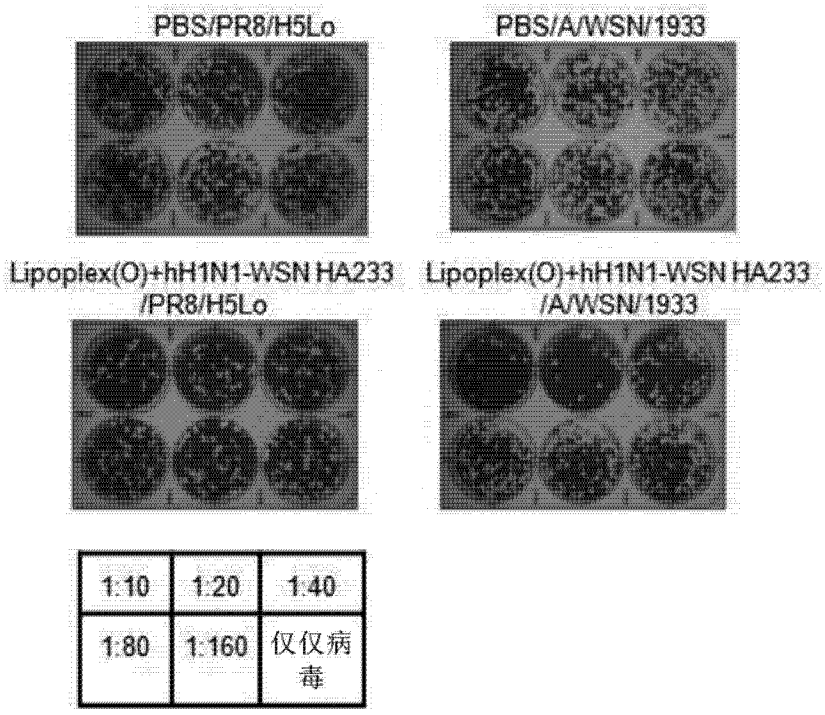

PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/A/WSN/1933
中和（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
仅仅病毒
≥1:160
≥1:80
≥1:40
≥1:20
≥1:10
PBS/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+ hH5N1 HA370 / PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+ hH5N1 HA370 / A/WSN/1933
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
仅仅病毒

图 8c





1:10	1:20	1:40
1:80	1:160	仅仅病毒

图 8d

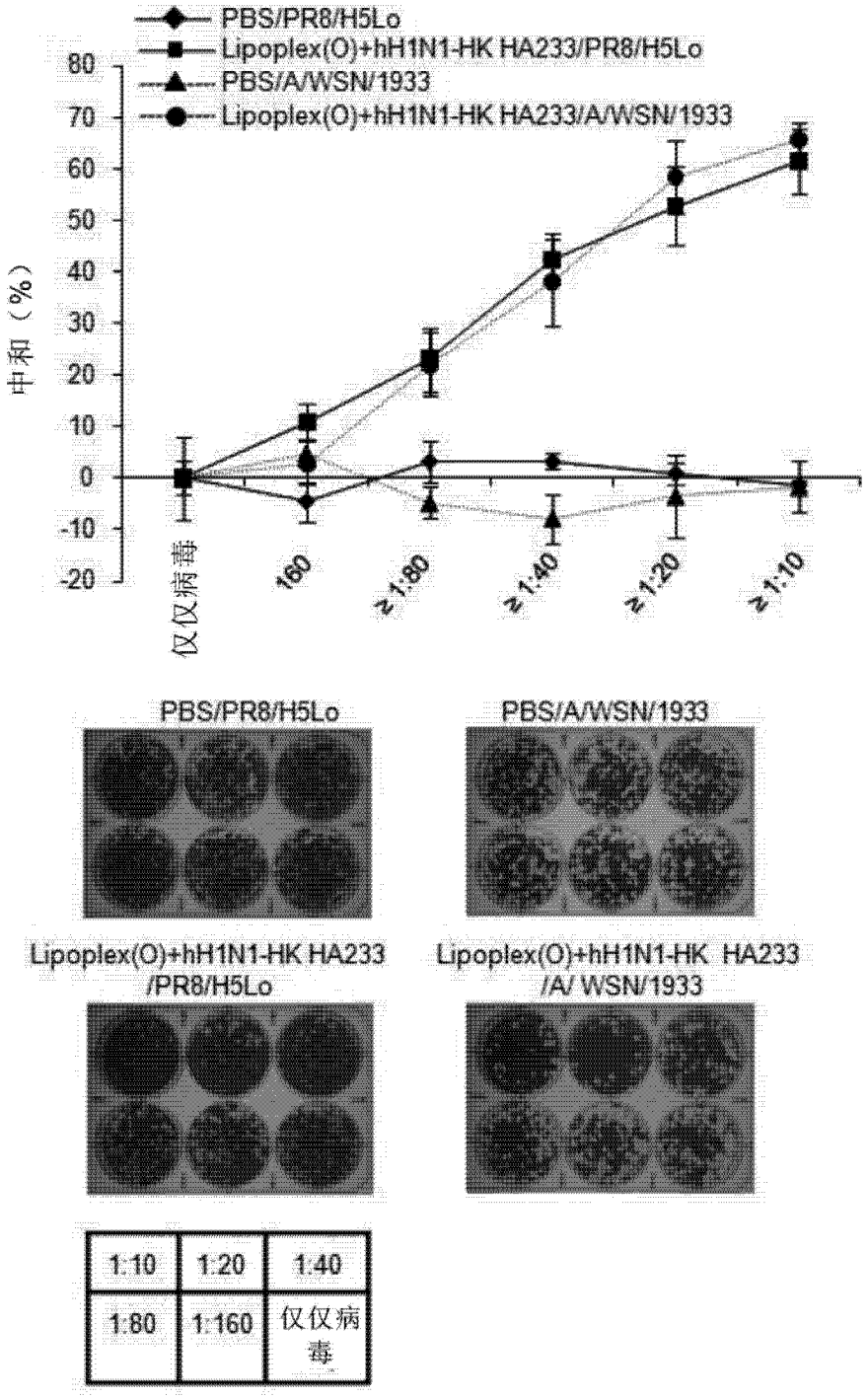

PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233/A/WSN/1933
中和（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
仅仅病毒
160
≥1:80
≥1:40
≥1:20
≥1:10
PBS/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233 /PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233 /A/ WSN/1933
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
仅仅病毒

图 8e

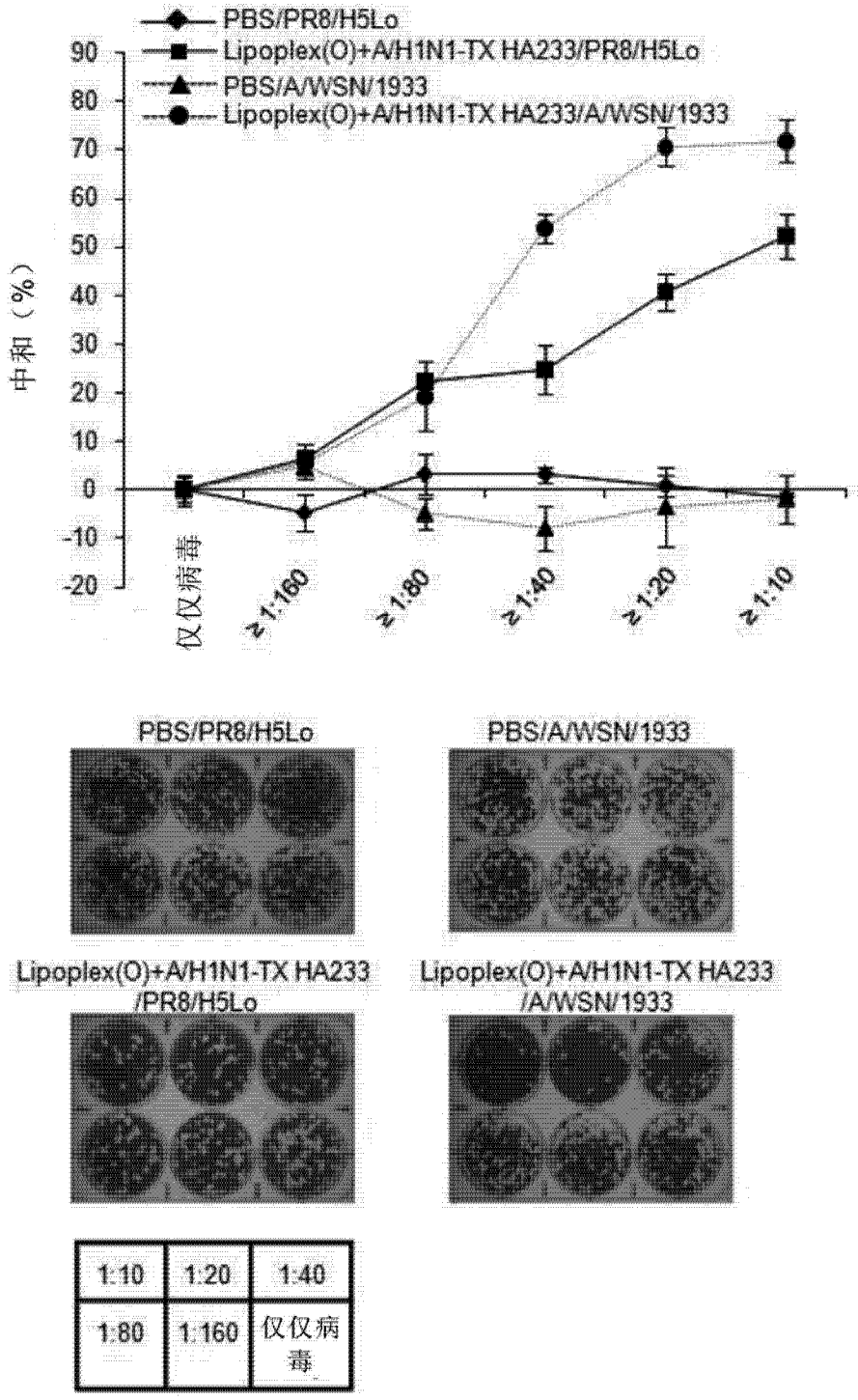

PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+A/H1N1-TX HA233/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+A/H1N1-TX HA233/A/WSN/1933
中和（%）
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
仅仅病毒
≥1:160
≥1:80
≥1:40
≥1:20
≥1:10
PBS/PR8/H5Lo
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+A/H1N1-TX HA233 /PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+A/H1N1-TX HA233 /A/WSN/1933
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
仅仅病毒

图 8f

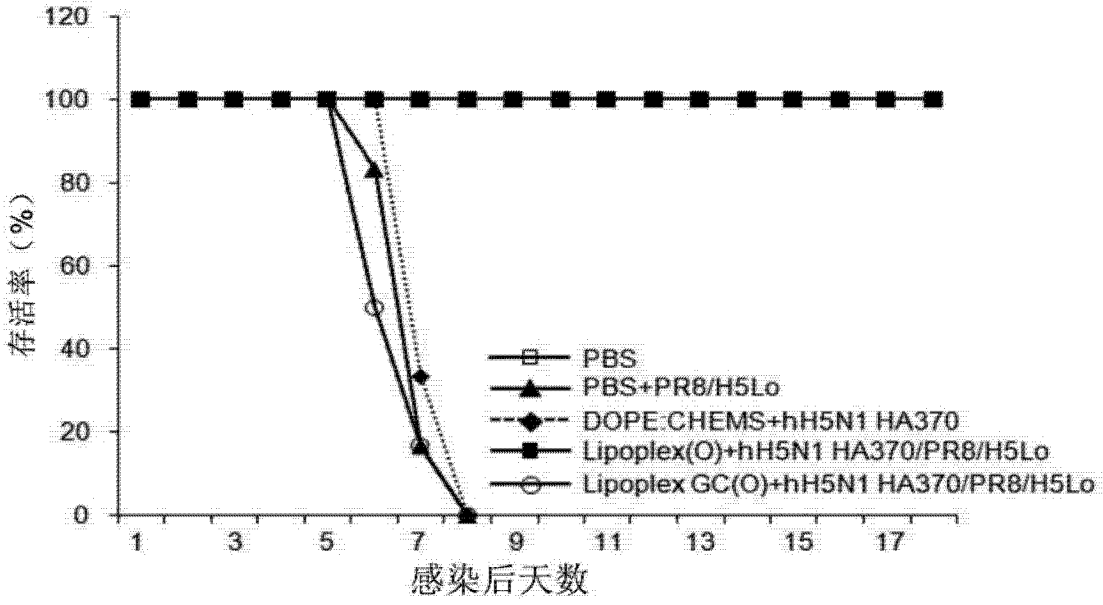

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
感染后天数
PBS
PBS+PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/PR8/H5Lo
Lipoplex GC(O)+hH5N1 HA370/PR8/H5Lo

图 9a

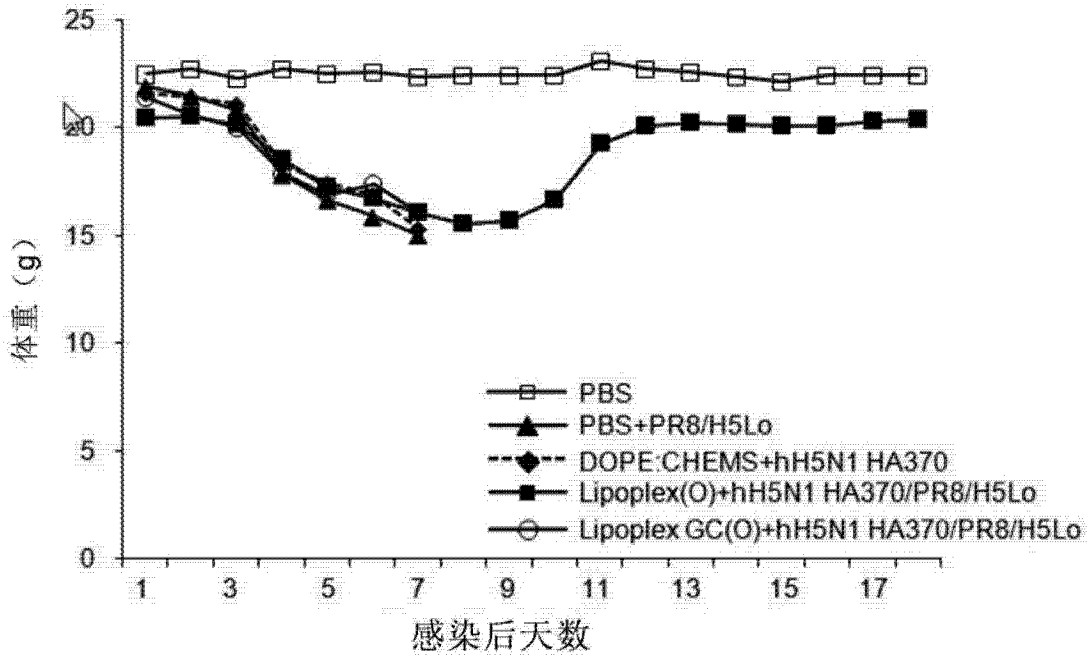

25
20
15
10
5
0
体重（g）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
感染后天数
PBS
PBS+PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/PR8/H5Lo
Lipoplex GC(O)+hH5N1 HA370/PR8/H5Lo

图 9b

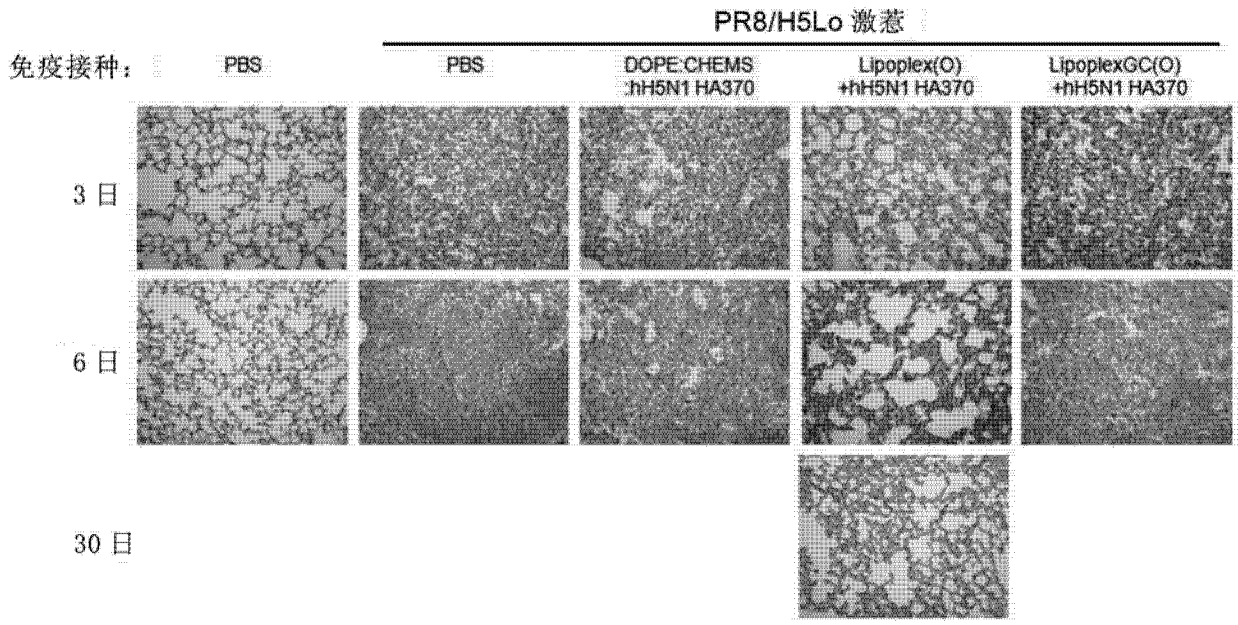

PR8/H5Lo 激惹
免疫接种：
PBS
PBS
DOPE:CHEMS :hH5N1 HA370
Lipoplex(O) +hH5N1 HA370
LipoplexGC(O) +hH5N1 HA370
3 日
6 日
30 日

图 9c

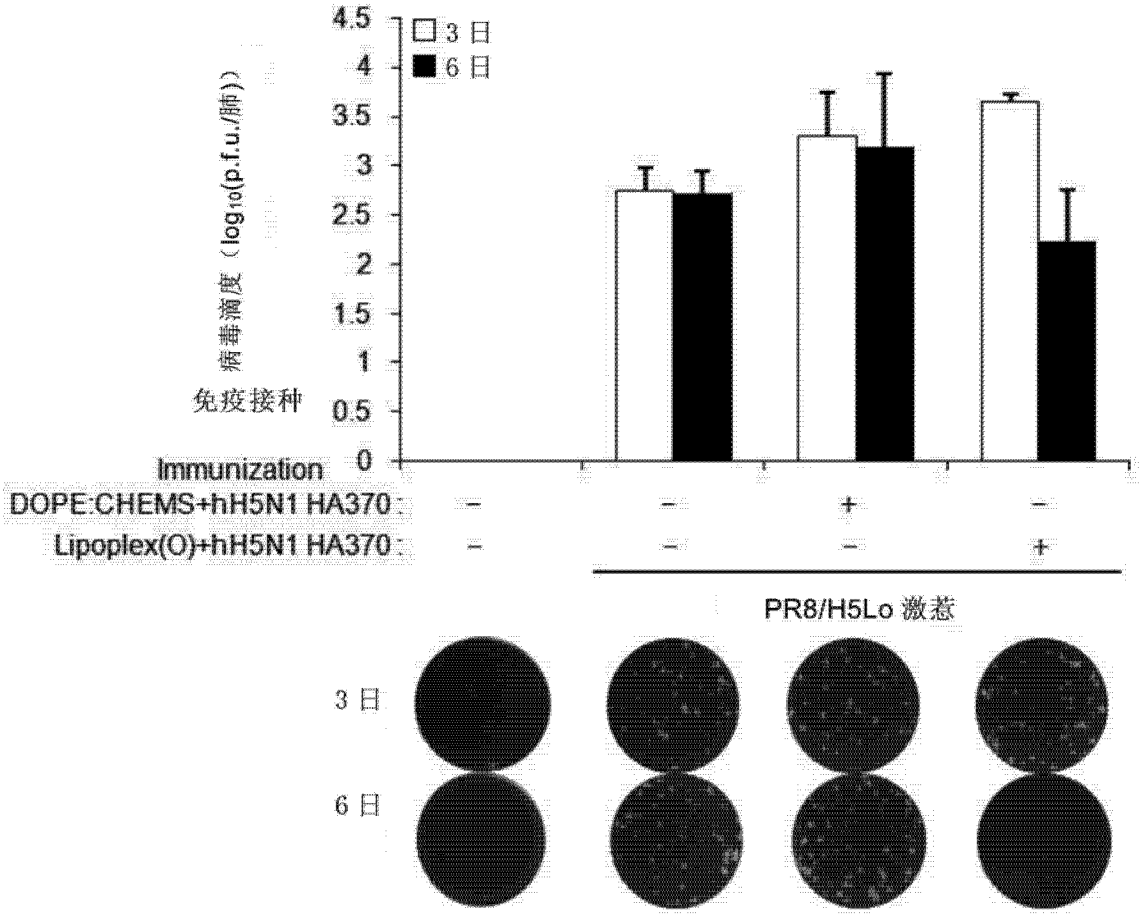

4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
3 日
6 日
病毒滴度（log10(p.f.u./肺)）
免疫接种
Immunization
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370
PR8/H5Lo 激惹
3 日
6 日

图 9d

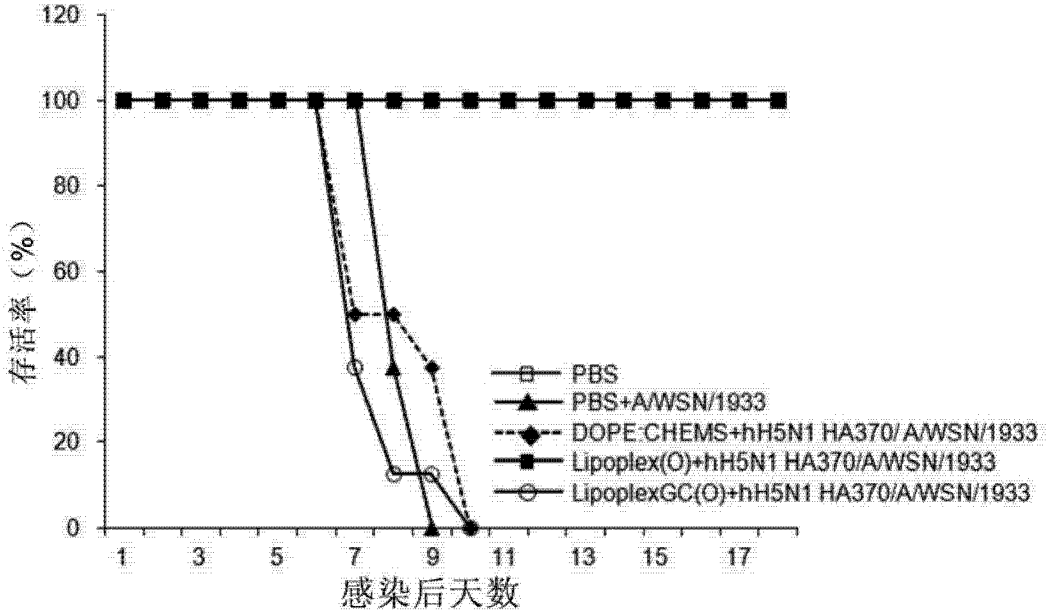

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
感染后天数
PBS
PBS+A/WSN/1933
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370/ A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/A/WSN/1933
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA370/A/WSN/1933

图 10a

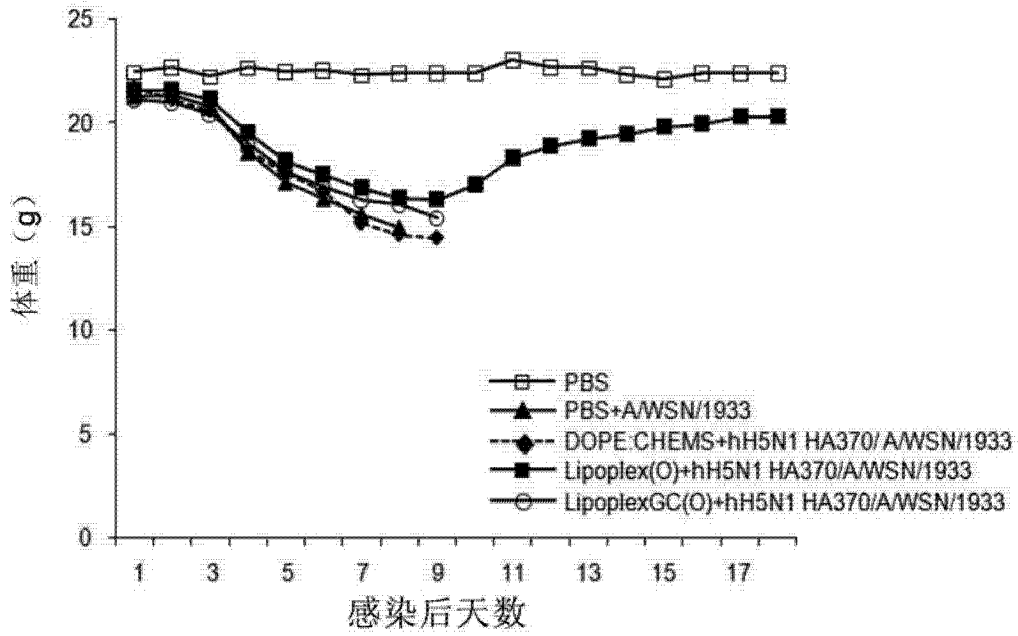

25
20
15
10
5
0
体重（g）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
感染后天数
PBS
PBS+A/WSN/1933
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370/ A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/A/WSN/1933
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA370/A/WSN/1933

图 10b

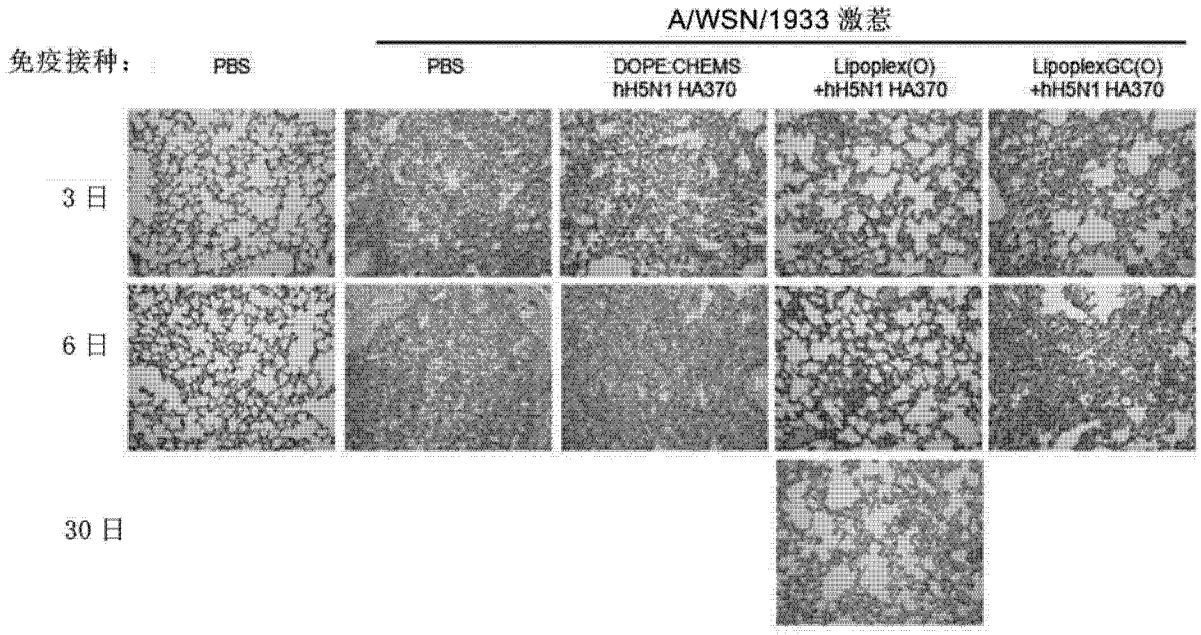

A/WSN/1933 激惹
免疫接种：
PBS
PBS
DOPE:CHEMS hH5N1 HA370
Lipoplex(O) +hH5N1 HA370
LipoplexGC(O) +hH5N1 HA370
3 日
6 日
30 日

图 10c

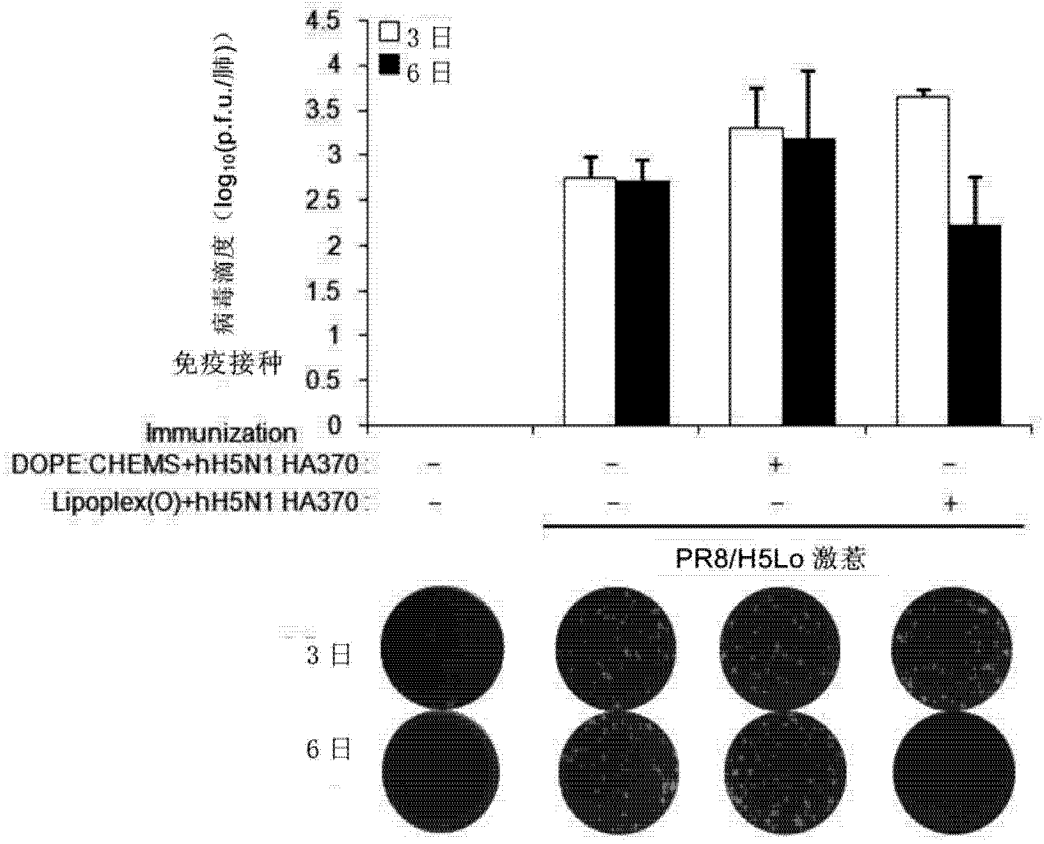

病毒滴度（log10(p.f.u./肺)）
3 日
6 日
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
免疫接种
Immunization
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370 - - + -
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 - - - +
PR8/H5Lo 激惹
3 日
6 日

图 10d

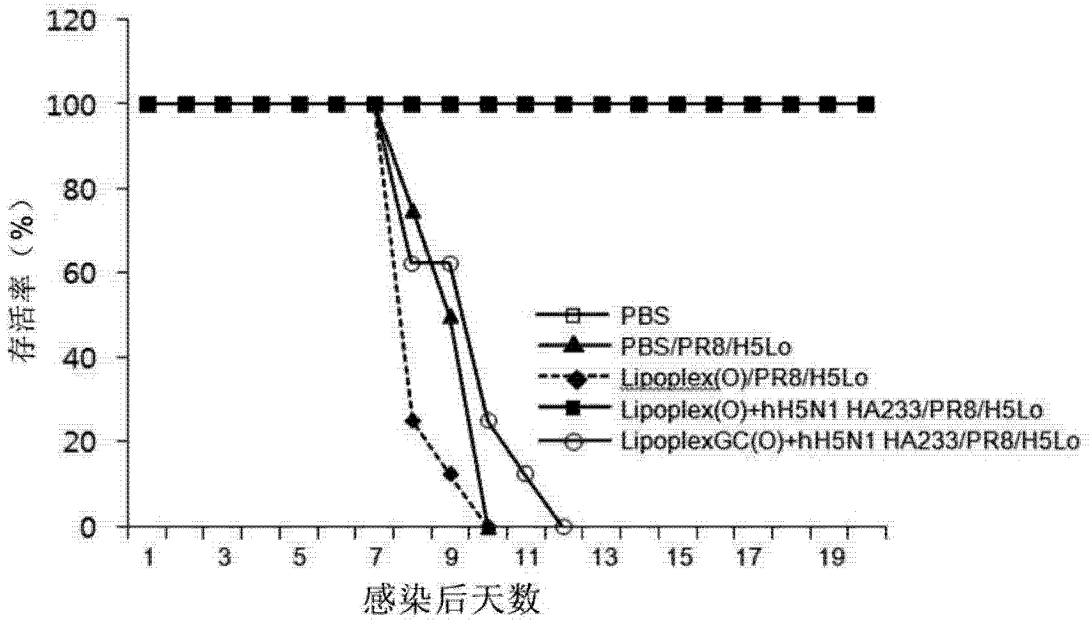

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
感染后天数
PBS
PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233/PR8/H5Lo
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA233/PR8/H5Lo

图 11a

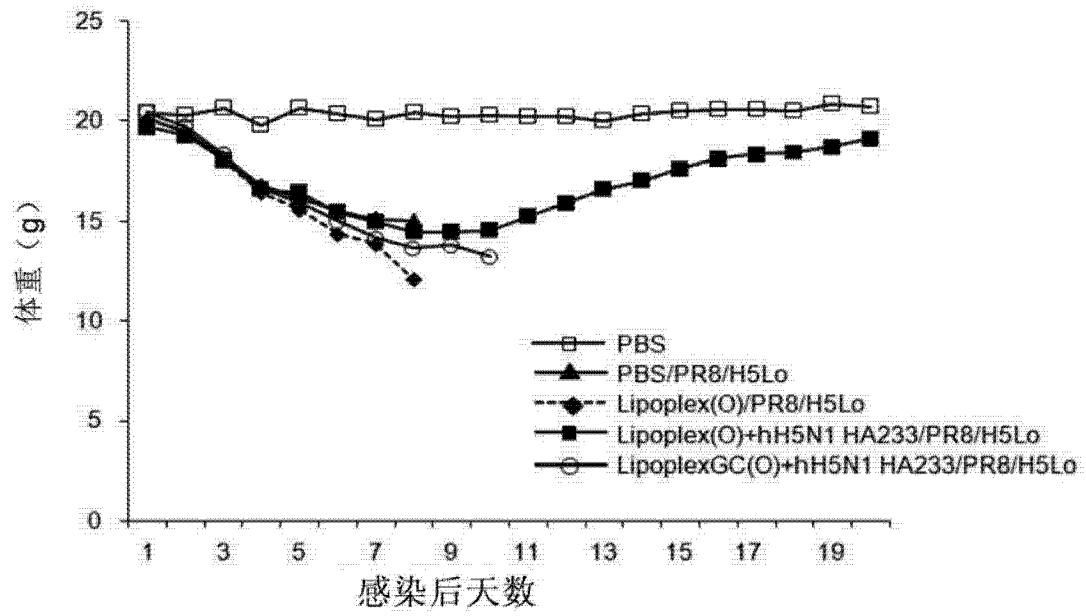

25
20
15
10
5
0
体重（g）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
感染后天数
PBS
PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233/PR8/H5Lo
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA233/PR8/H5Lo

图 11b

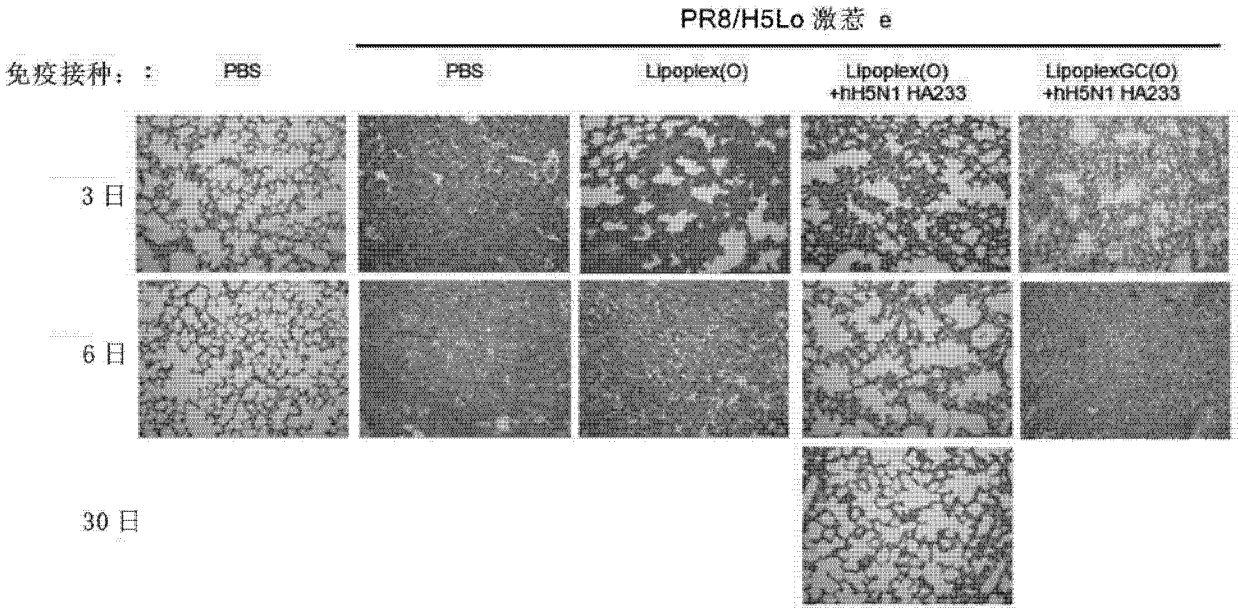

PR8/H5Lo 激惹 e
免疫接种：：
PBS
PBS
Lipoplex(O)
Lipoplex(O)
+hH5N1 HA233
LipoplexGC(O)
+hH5N1 HA233
3 日
6 日
30 日

图 11c

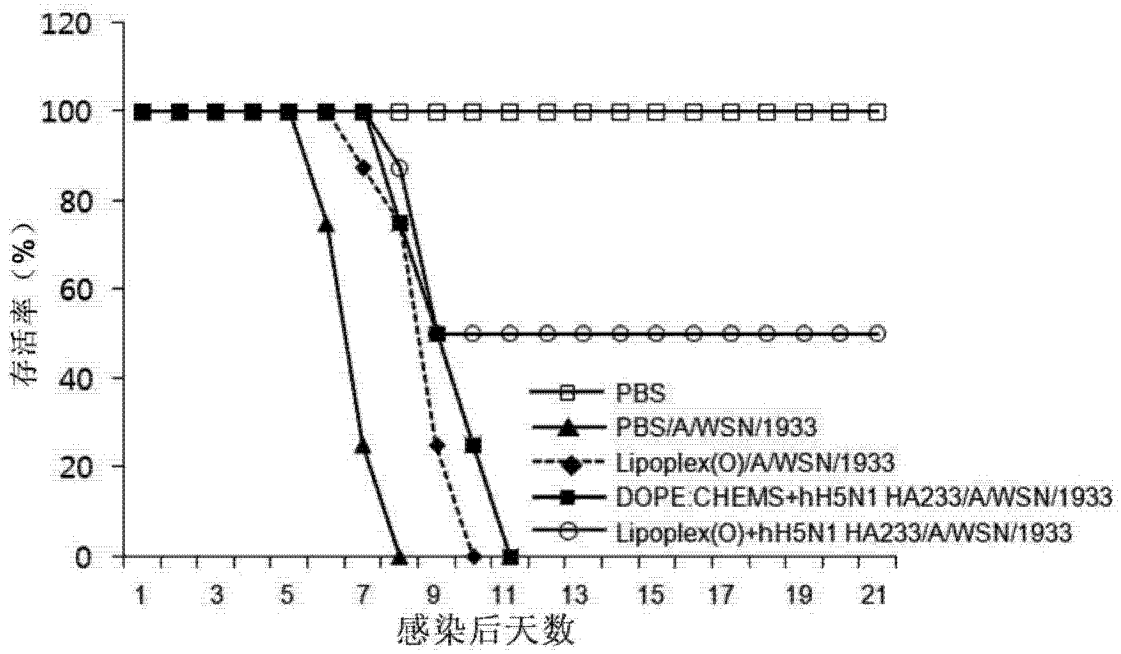

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
感染后天数
PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)/A/WSN/1933
DOPE.CHEMS+hH5N1 HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233/A/WSN/1933

图 12a

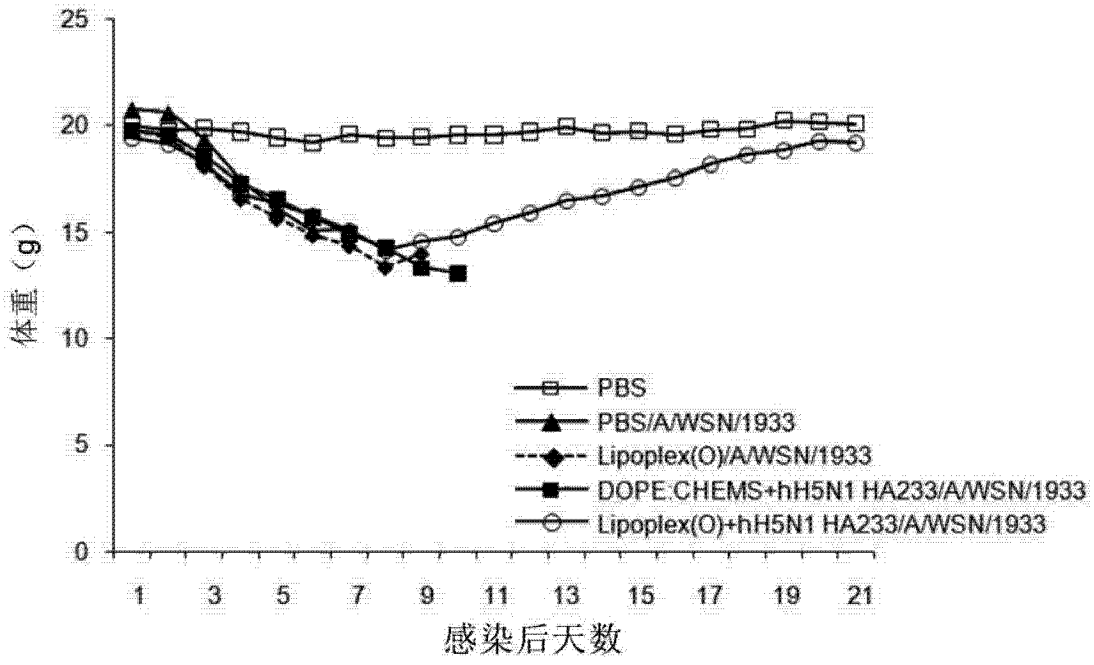

25
20
15
10
5
0
体重（g）
PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)/A/WSN/1933
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233/A/WSN/1933
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21
感染后天数

图 12b

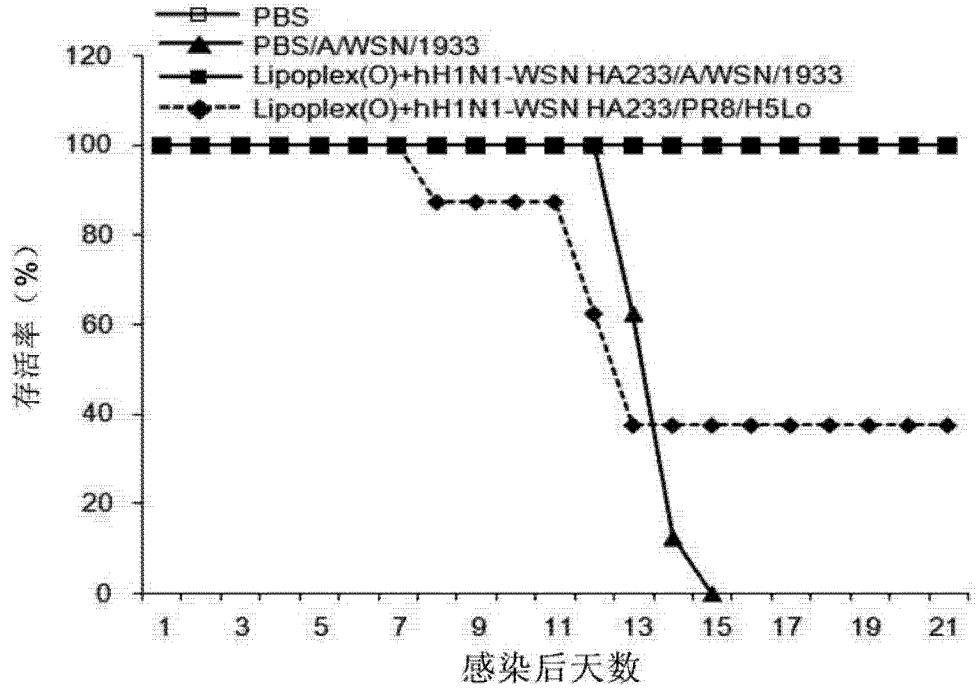

PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233/PR8/H5Lo
120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21
感染后天数

图 13a

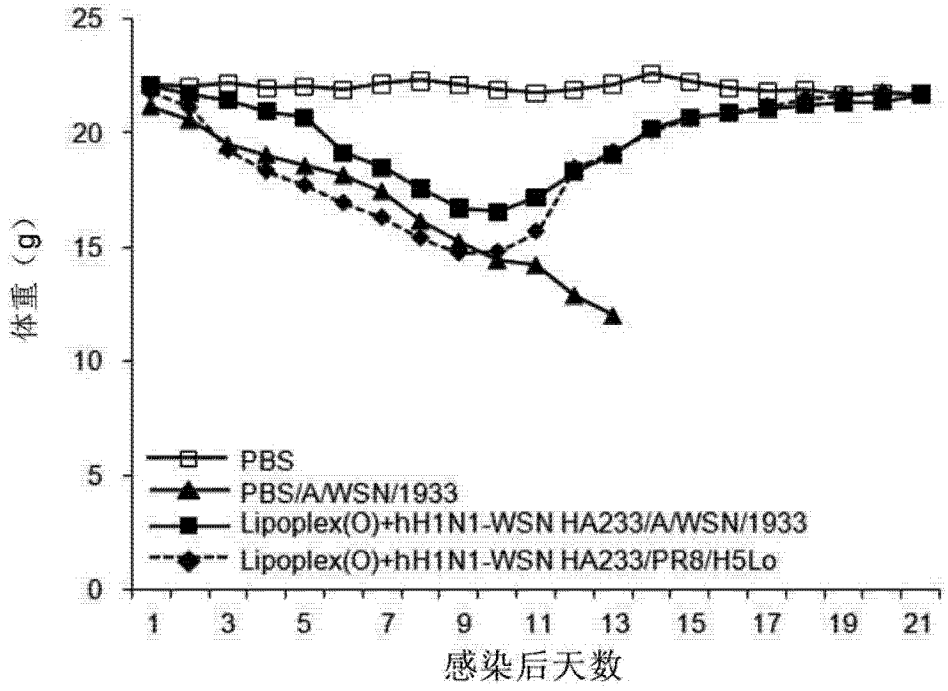

25
20
15
10
5
0
体重（g）
PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233/PR8/H5Lo
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
感染后天数

图 13b

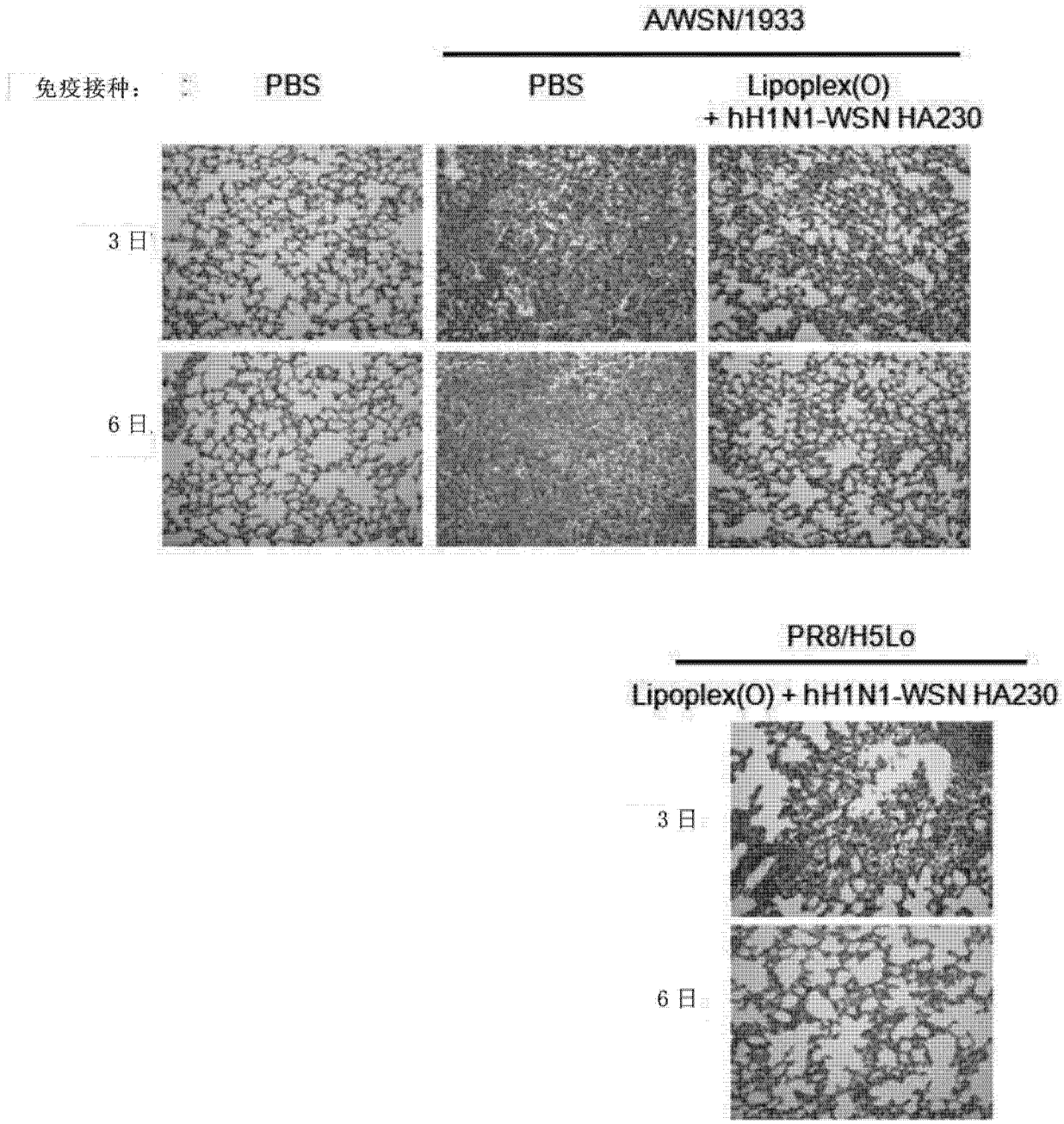

A/WSN/1933
免疫接种：
PBS
PBS
Lipoplex(O)
+ hH1N1-WSN HA230
3 日
6 日
PR8/H5Lo
Lipoplex(O) + hH1N1-WSN HA230
3 日
6 日

图 13c

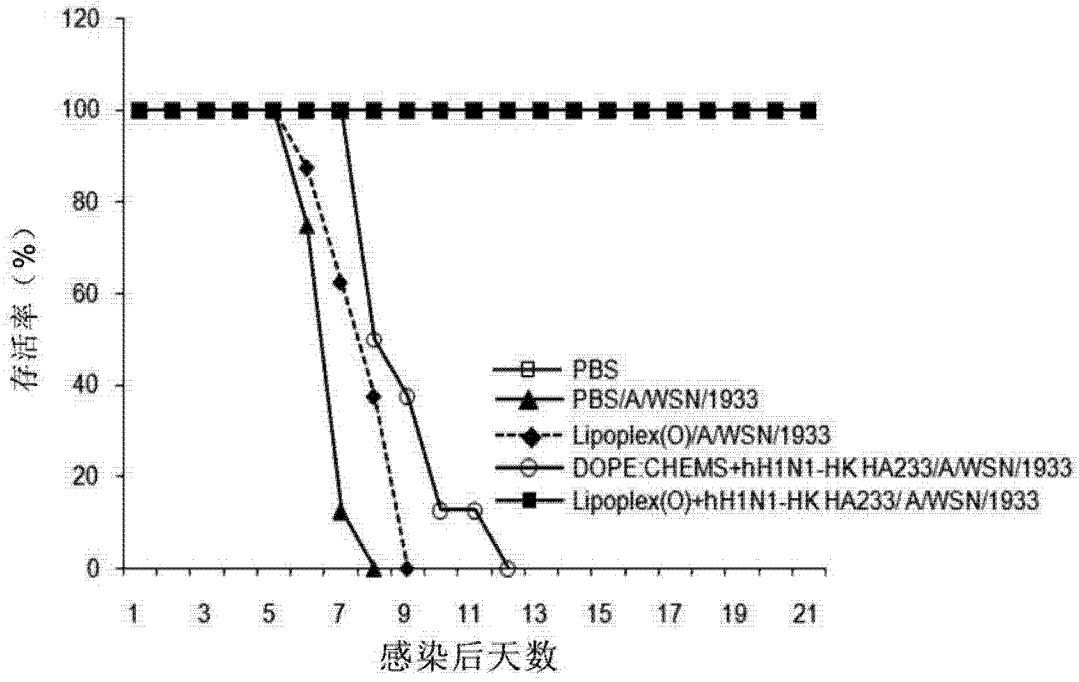

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21
感染后天数
PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)/A/WSN/1933
DOPE:CHEMS+hH1N1-HK HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233/ A/WSN/1933

图 14a

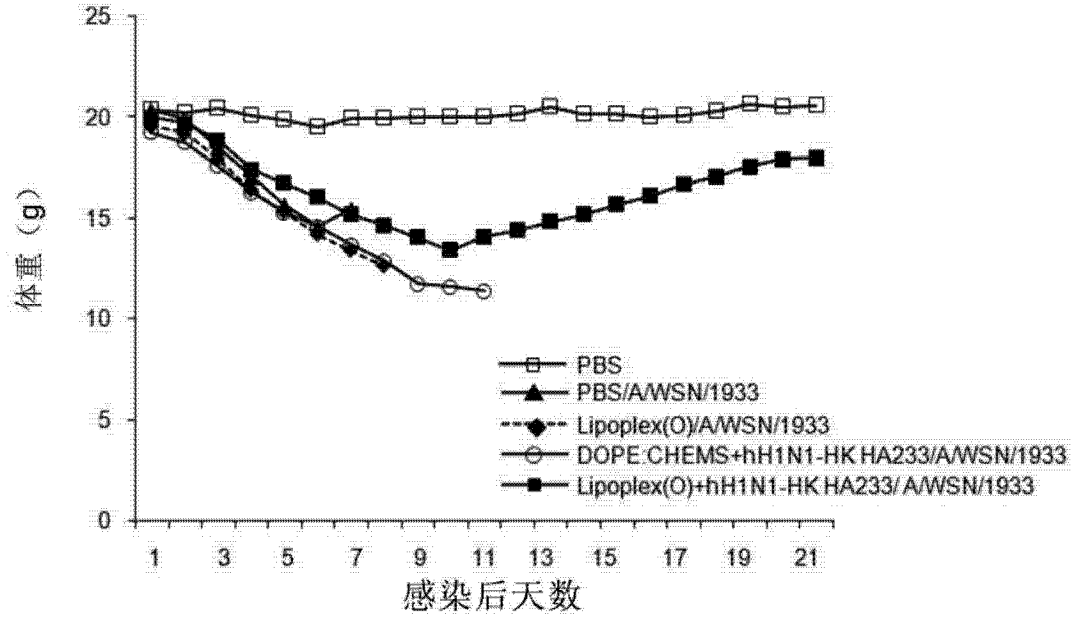

25
20
15
10
5
0
体重（g）
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21
感染后天数
PBS
PBS/A/WSN/1933
Lipoplex(O)/A/WSN/1933
DOPE:CHEMS+hH1N1-HK HA233/A/WSN/1933
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233/ A/WSN/1933

图 14b

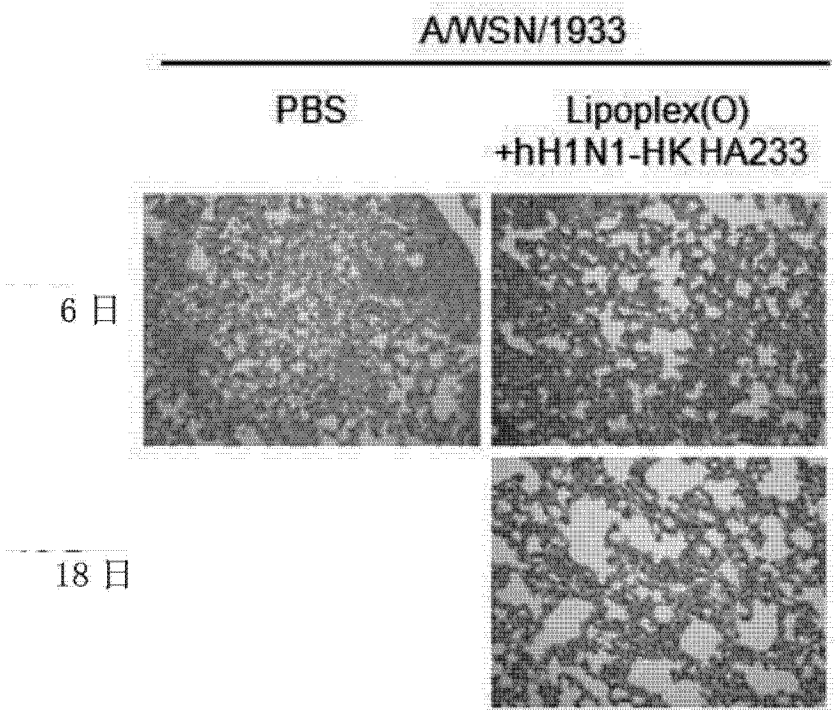

A/WSN/1933
PBS
Lipoplex(O)
+hH1N1-HK HA233
6 日
18 日

图 14c

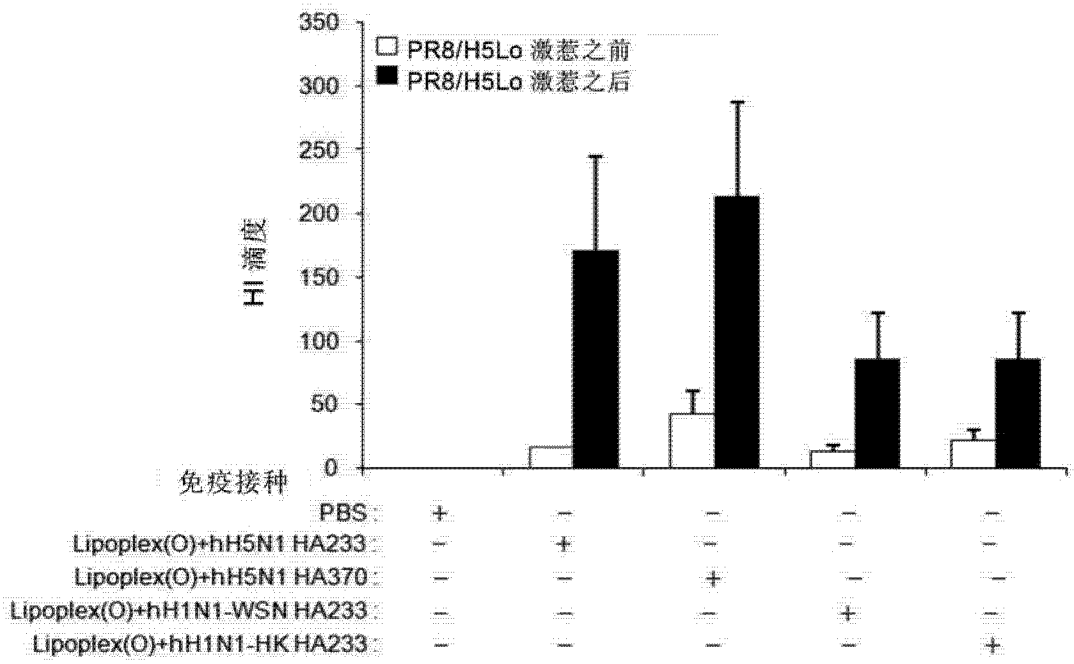

350
300
250
200
150
100
50
0
HI 滴度
PR8/H5Lo 激惹之前
PR8/H5Lo 激惹之后
免疫接种
PBS + − − − −
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233 − + − − −
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 − − + − −
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233 − − − + −
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233 − − − − +

图 15a

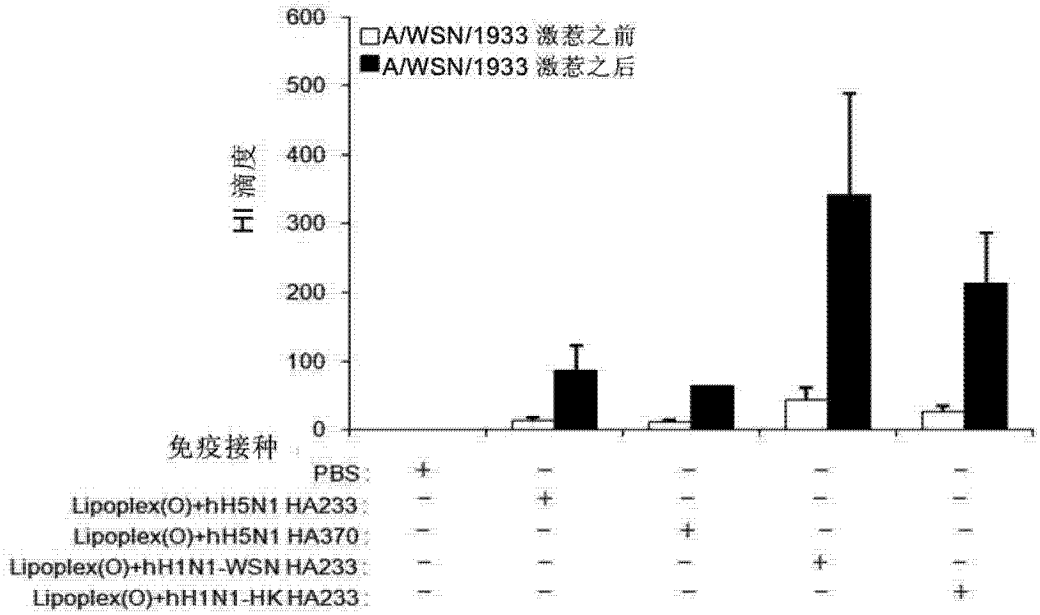

600
500
400
300
200
100
0
HI 滴度
□A/WSN/1933 激惹之前
■A/WSN/1933 激惹之后
免疫接种
PBS + − − − −
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233 − + − − −
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 − − + − −
Lipoplex(O)+hH1N1-WSN HA233 − − − + −
Lipoplex(O)+hH1N1-HK HA233 − − − − +

图 15b

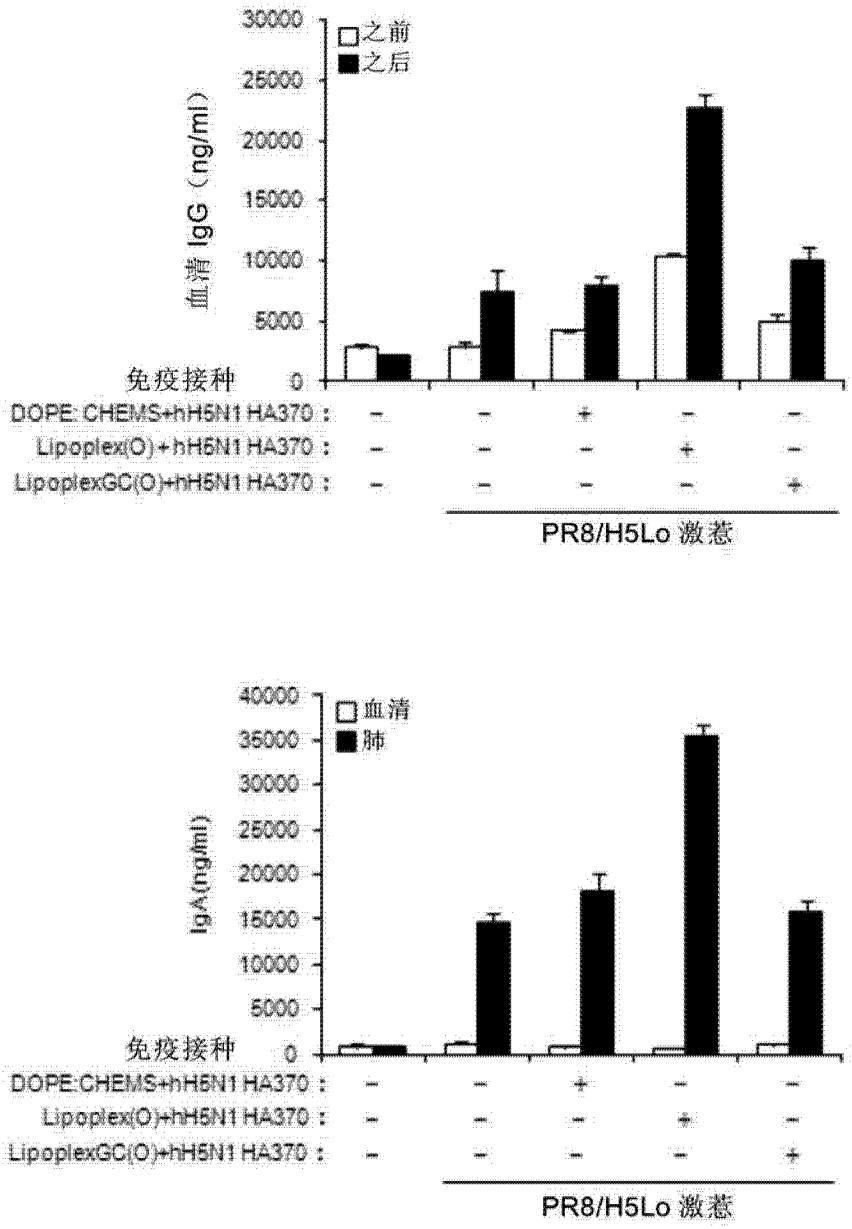

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
之前
之后
血清 IgG（ng/ml）
免疫接种
DOPE: CHEMS+hH5N1 HA370 :
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 :
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA370 :
PR8/H5Lo 激惹
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清
肺
IgA(ng/ml)
免疫接种
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370 :
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 :
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA370 :
PR8/H5Lo 激惹

图 16a

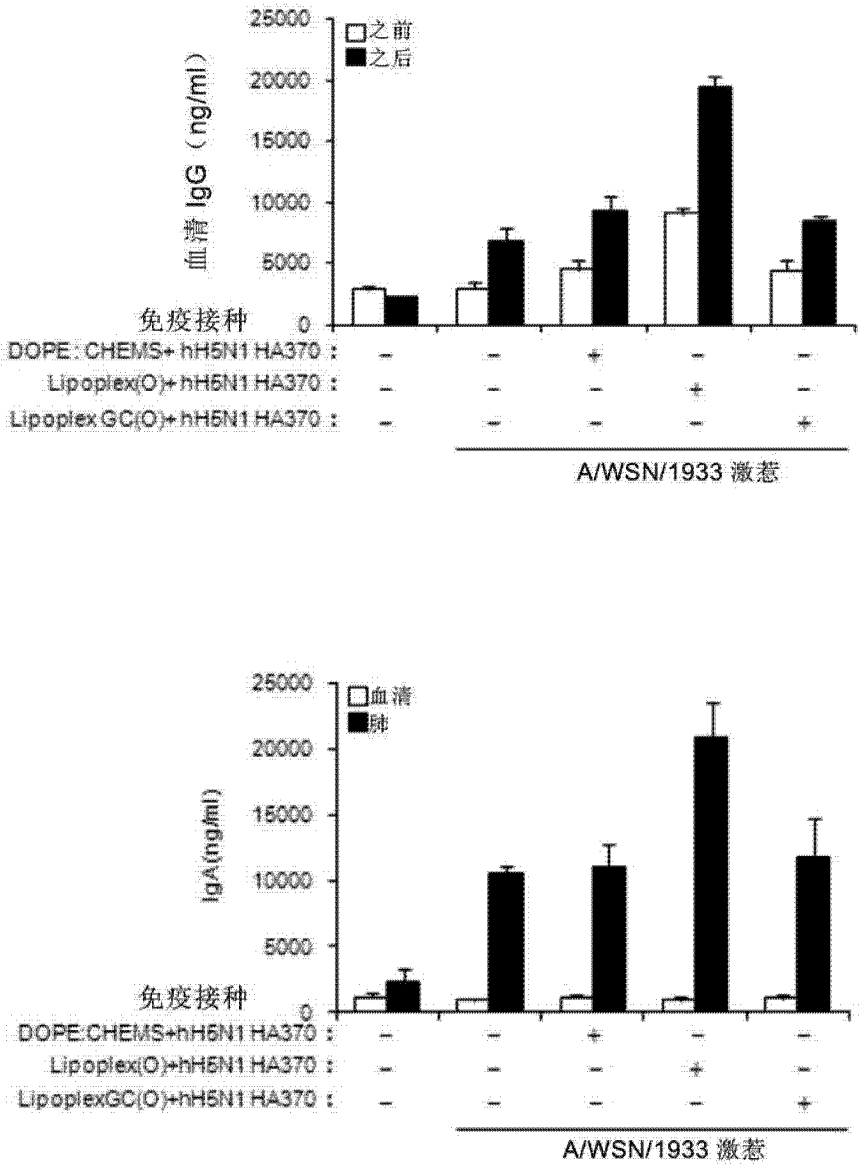

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
之前
之后
免疫接种
DOPE: CHEMS+ hH5N1 HA370 :
Lipoplex(O)+ hH5N1 HA370 :
Lipoplex GC(O)+ hH5N1 HA370 :
A/WSN/1933 激惹
25000
20000
15000
10000
5000
0
IgA(ng/ml)
血清
肺
免疫接种
DOPE:CHEMS+hH5N1 HA370 :
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370 :
LipoplexGC(O)+hH5N1 HA370 :
A/WSN/1933 激惹

图 16b

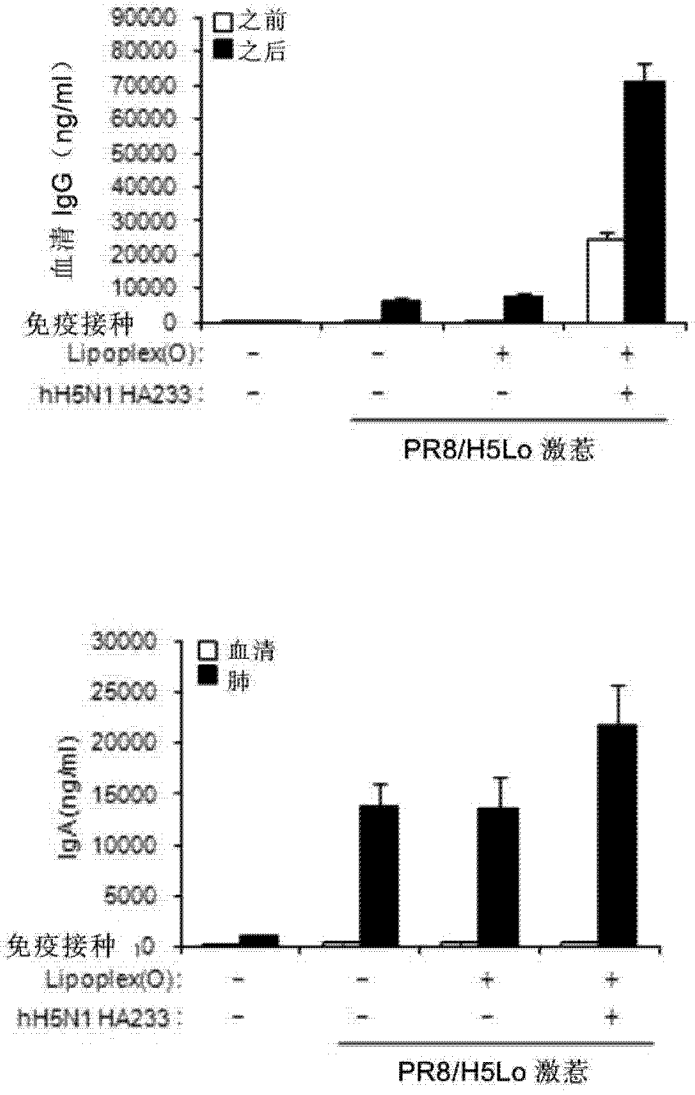

90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
之前
之后
血清 IgG（ng/ml）
免疫接种
Lipoplex(O):
hH5N1 HA233 :
PR8/H5Lo 激惹
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清
肺
IgA(ng/ml)
免疫接种
Lipoplex(O):
hH5N1 HA233 :
PR8/H5Lo 激惹

图 16c

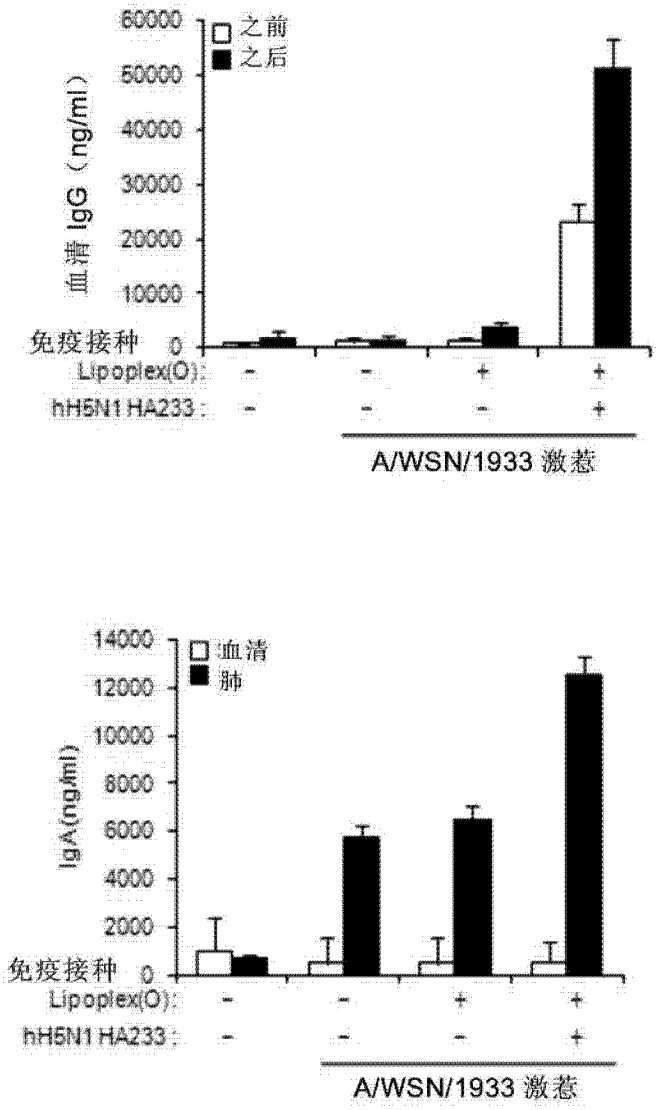
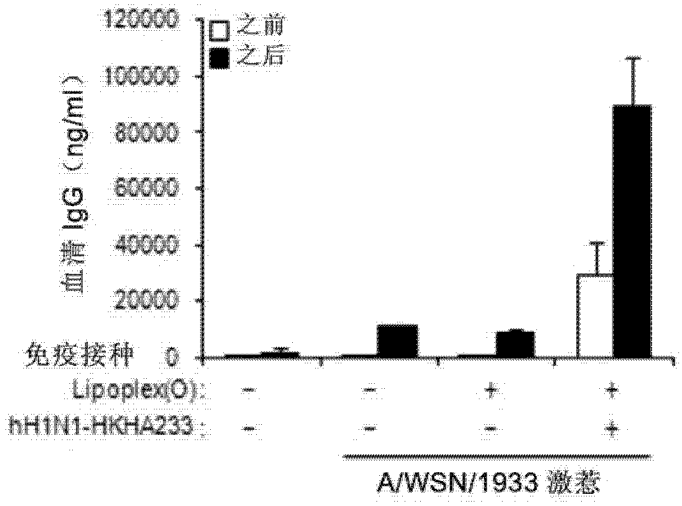

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
血清 IgG（ng/ml）
之前
之后
免疫接种
Lipoplex(O):
hH5N1 HA233:
A/WSN/1933 激惹
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IgA(ng/ml)
血清
肺
免疫接种
Lipoplex(O):
hH5N1 HA233:
A/WSN/1933 激惹

图 16d


120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
血清 IgG（ng/ml）
之前
之后
免疫接种
Lipoplex(O):
hH1N1-HKHA233:
A/WSN/1933 激惹

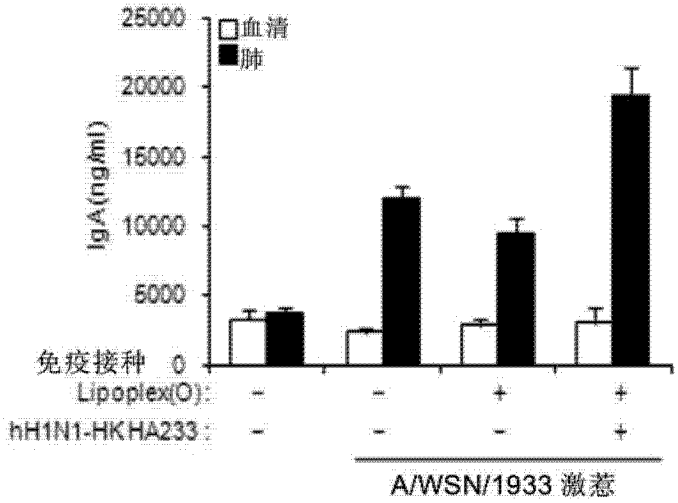
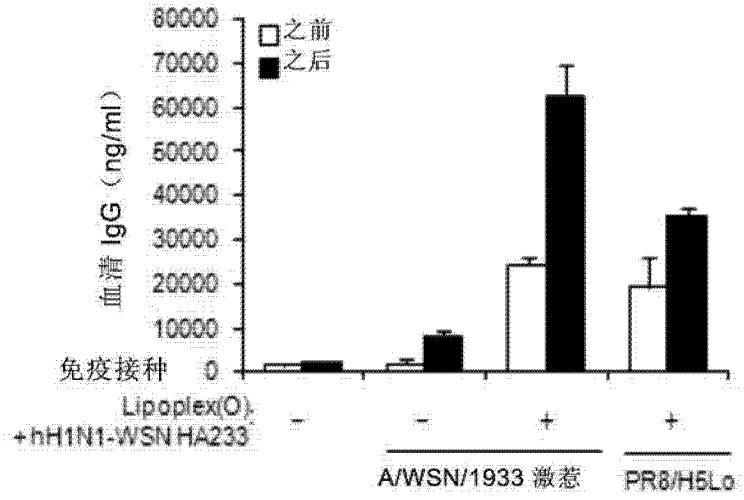

25000
20000
15000
10000
5000
0
IgA(ng/ml)
血清
肺
免疫接种
Lipoplex(O):
hH1N1-HKHA233:
A/WSN/1933 激惹

图 16e


80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
之前
之后
血清 IgG（ng/ml）
免疫接种
Lipoplex(O)
+hH1N1-WSN HA233
-
-
+
+
A/WSN/1933 激惹
PR8/H5Lo

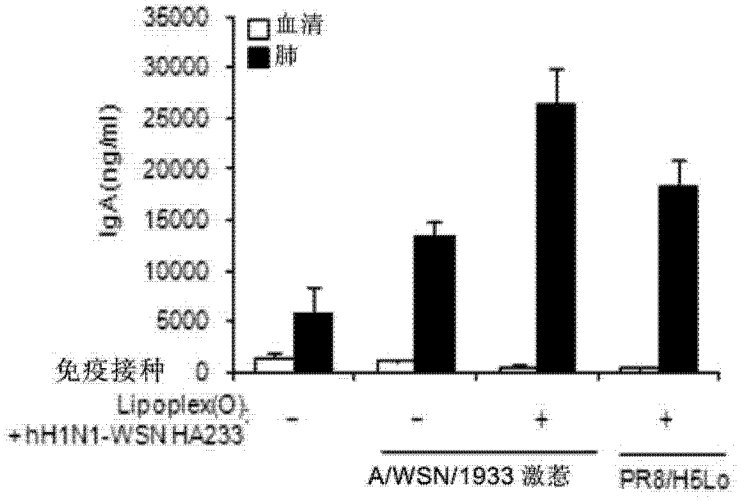

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清
肺
IgA(ng/ml)
免疫接种
Lipoplex(O)
+hH1N1-WSN HA233
-
-
+
+
A/WSN/1933 激惹
PR8/H5Lo

图 16f

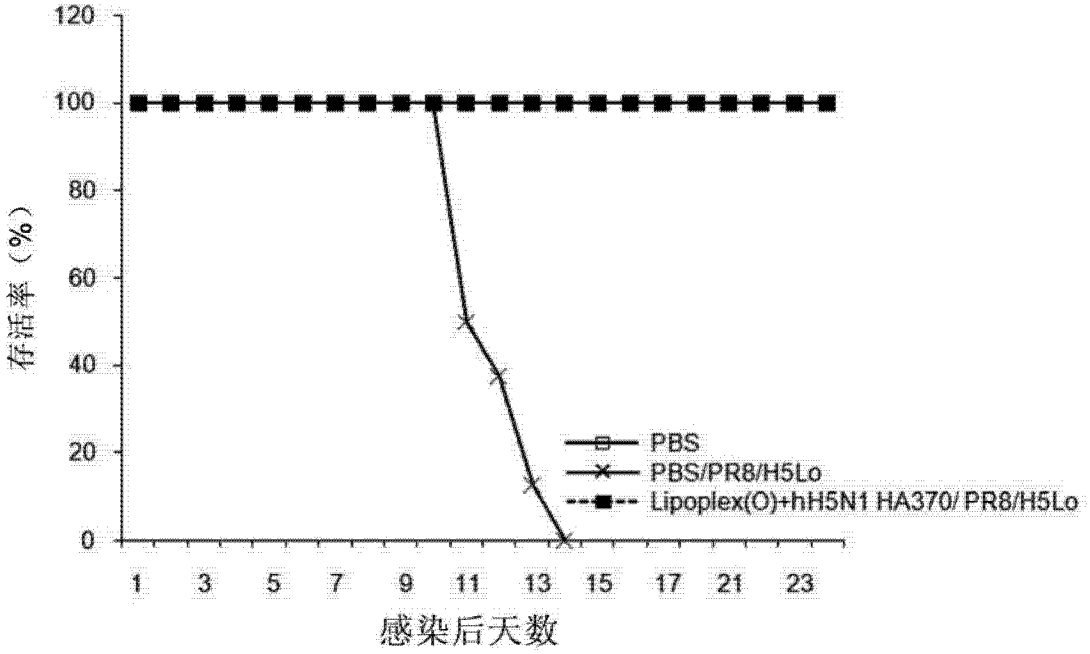

120
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
21
23
感染后天数
PBS
PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/ PR8/H5Lo

图 17a

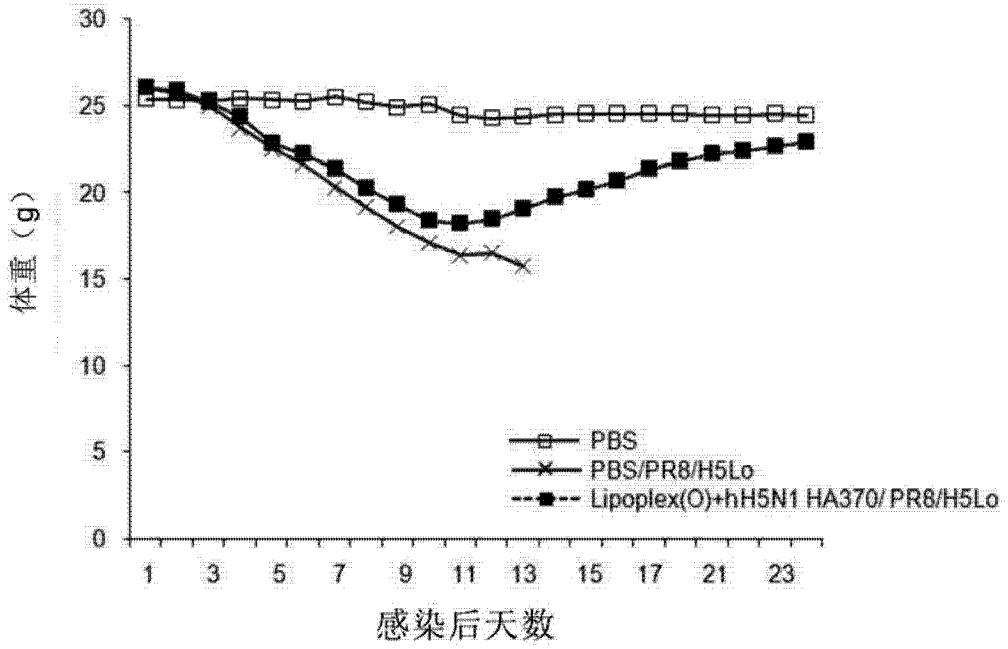

30
25
20
15
10
5
0
体重（g）
1
3
5
7
9
11
13
15
17
21
23
感染后天数
PBS
PBS/PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370/ PR8/H5Lo

图 17b

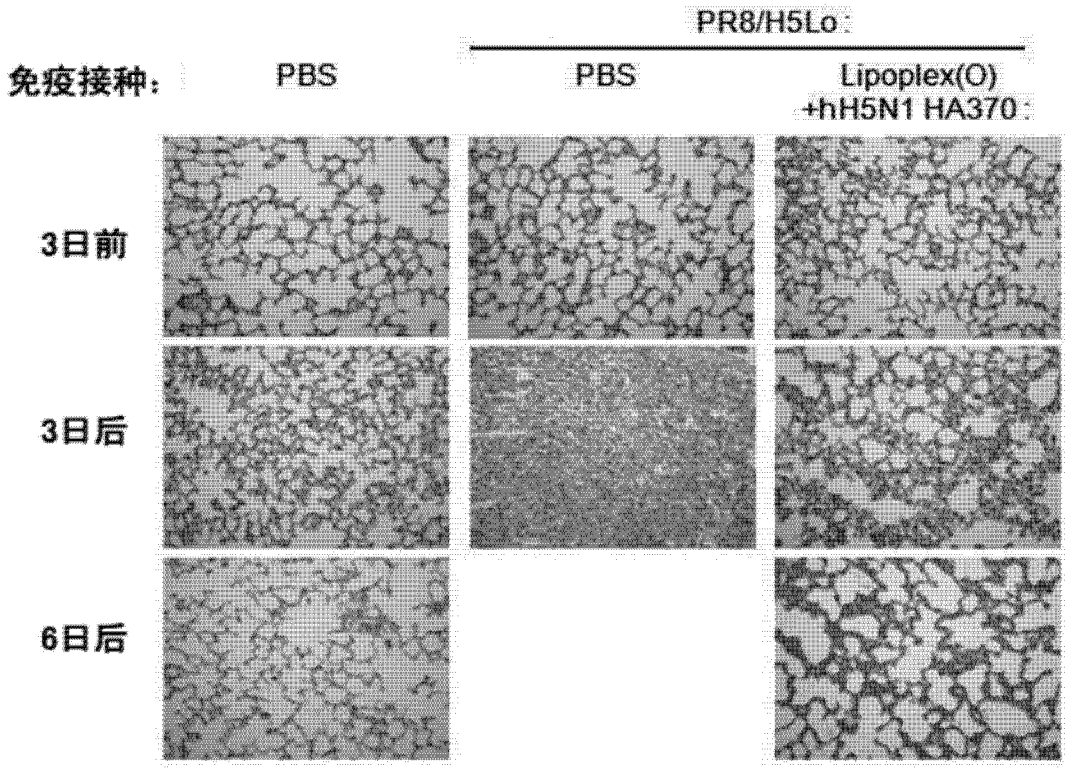

PR8/H5Lo：
免疫接种：
PBS
PBS
Lipoplex(O)
+hH5N1 HA370：
3日前
3日后
6日后

图 17c

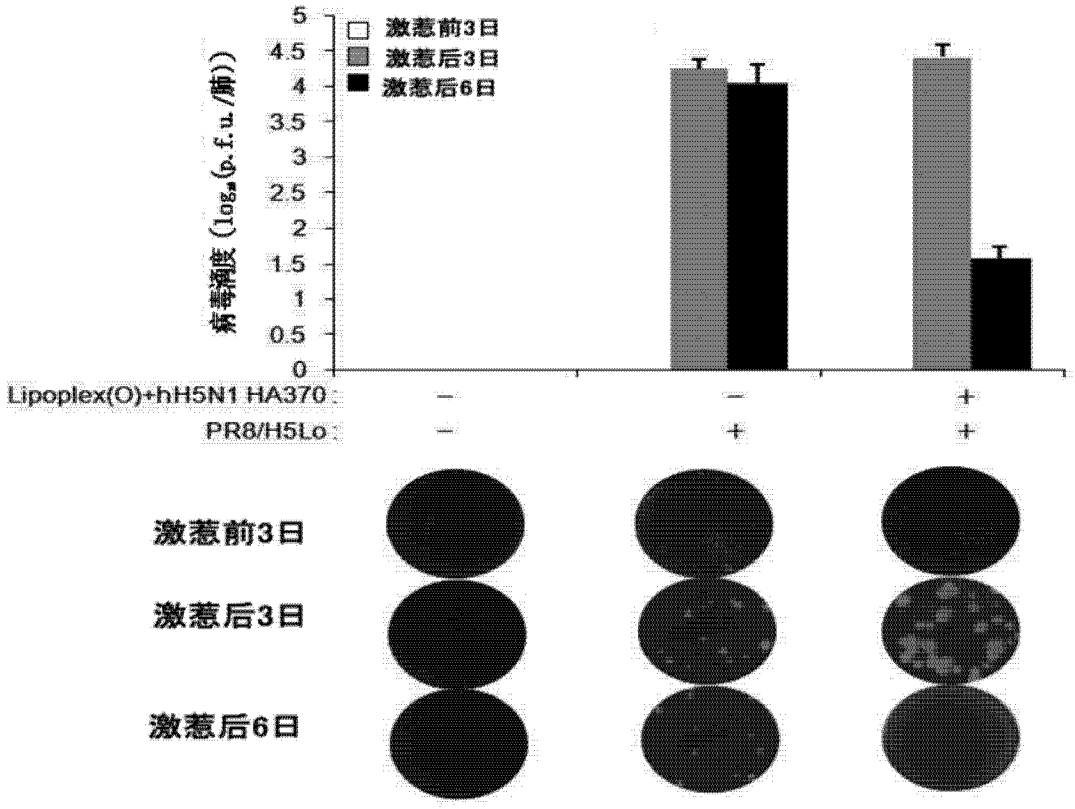

激惹前3日
激惹后3日
激惹后6日
病毒滴度（log10(p.f.u./肺)）
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370：
PR8/H5Lo：
－
－
＋
－
＋
＋
激惹前3日
激惹后3日
激惹后6日

图 17d

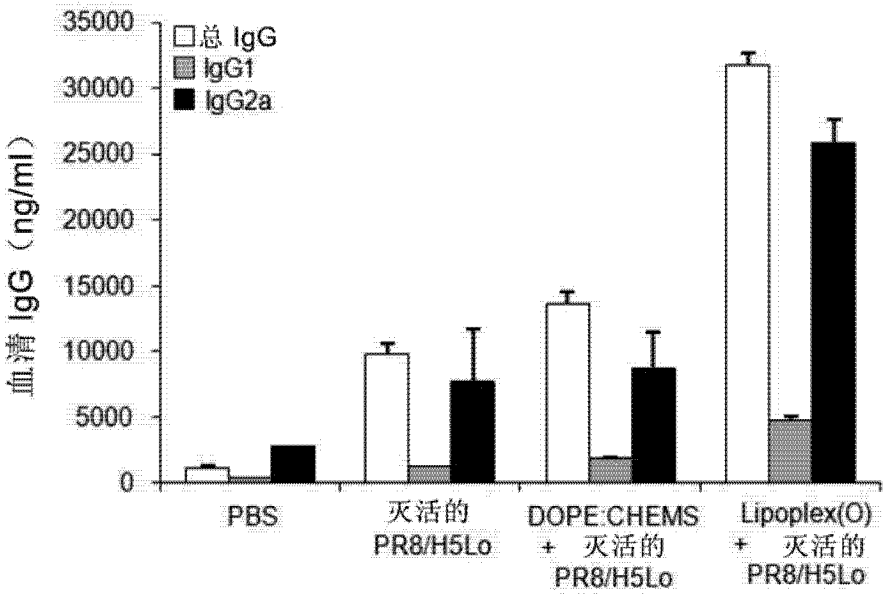

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
总 IgG
IgG1
IgG2a
PBS
灭活的 PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS + 灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O) + 灭活的 PR8/H5Lo

图 18a

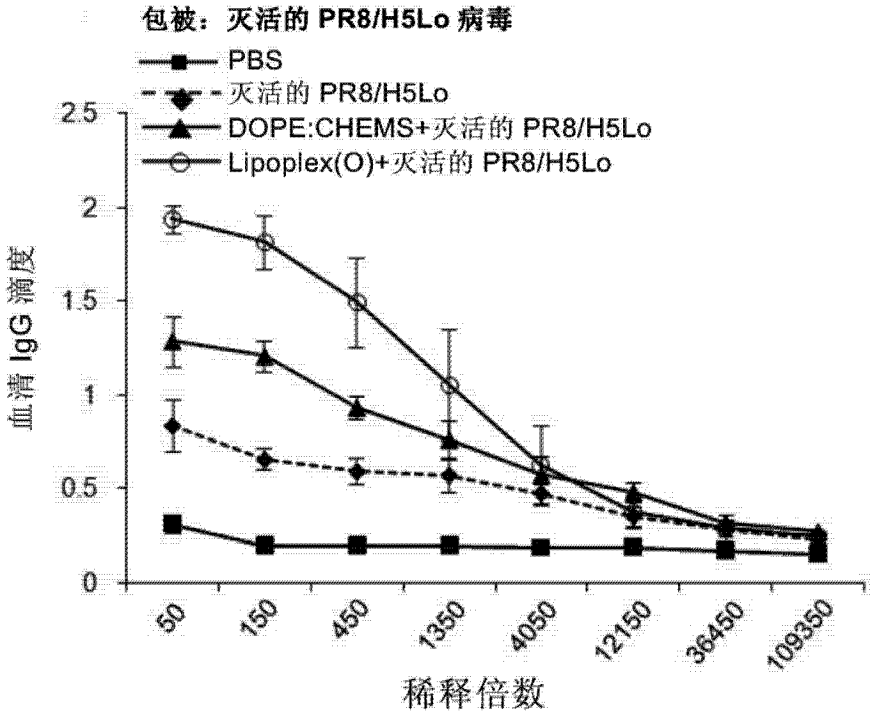

包被：灭活的 PR8/H5Lo 病毒
PBS
灭活的 PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS+灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+灭活的 PR8/H5Lo
2.5
2
1.5
1
0.5
0
血清 IgG 滴度
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 18b

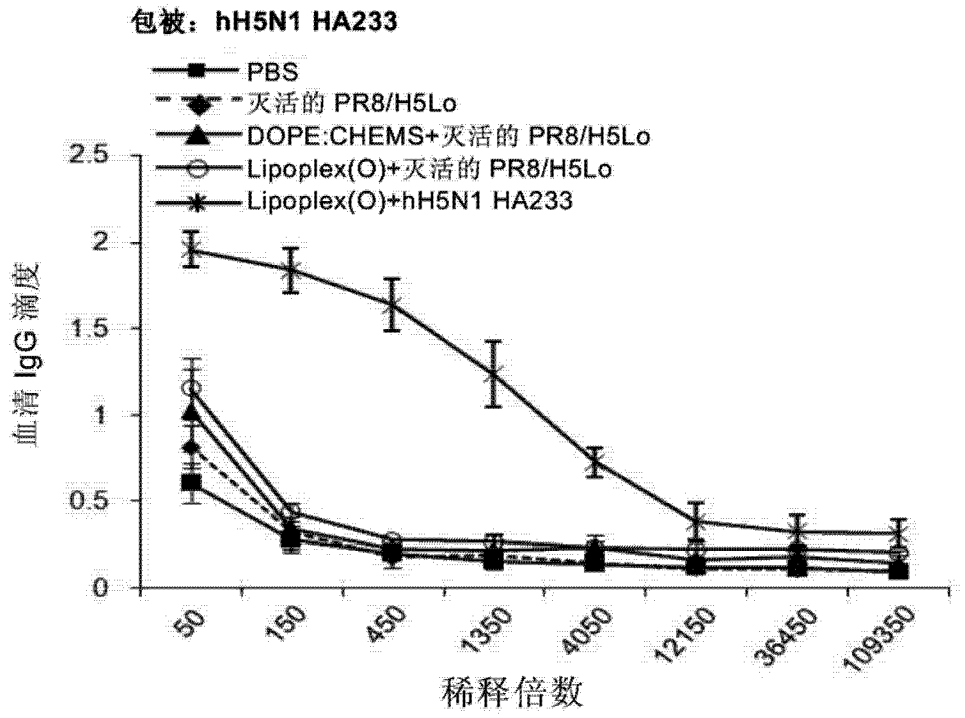

包被：hH5N1 HA233
PBS
灭活的 PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS+灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA233
血清 IgG 滴度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 18c

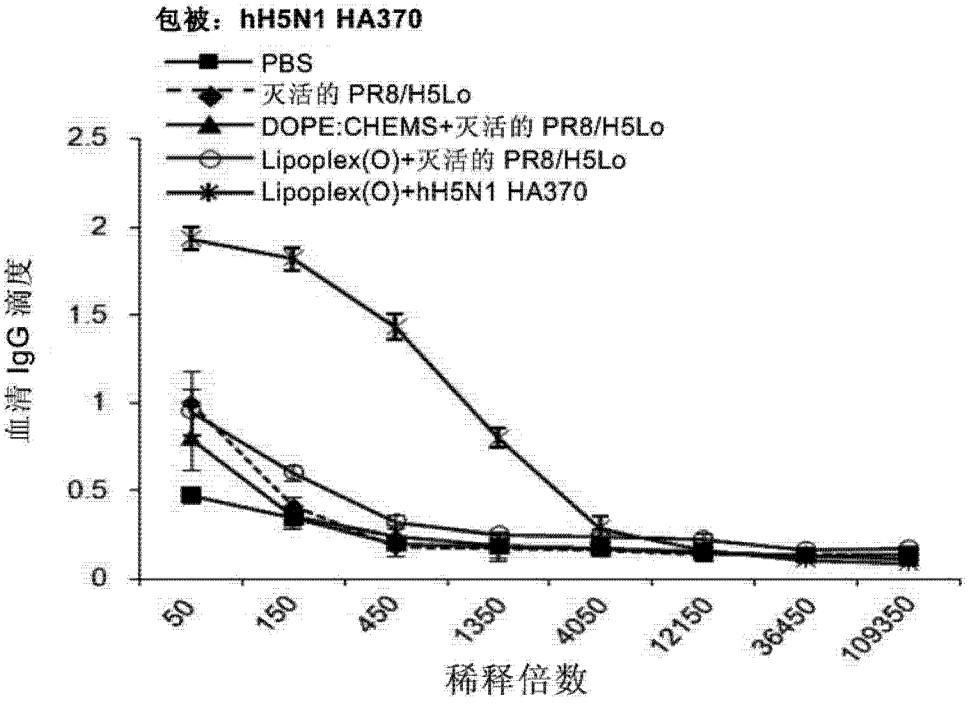

包被：hH5N1 HA370
PBS
灭活的 PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS+灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+灭活的 PR8/H5Lo
Lipoplex(O)+hH5N1 HA370
血清 IgG 滴度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 18d

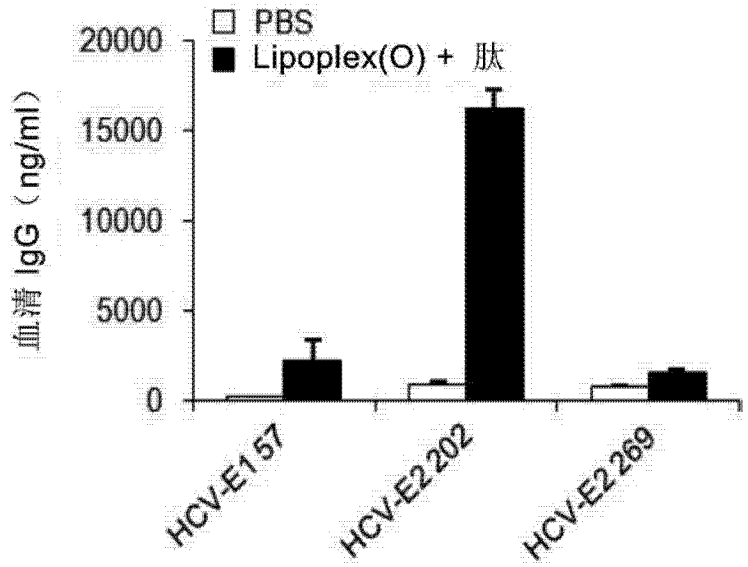

PBS
Lipoplex(O) + 肽
血清 IgG（ng/ml）
20000
15000
10000
5000
0
HCV-E1 57
HCV-E2 202
HCV-E2 269

图 19a

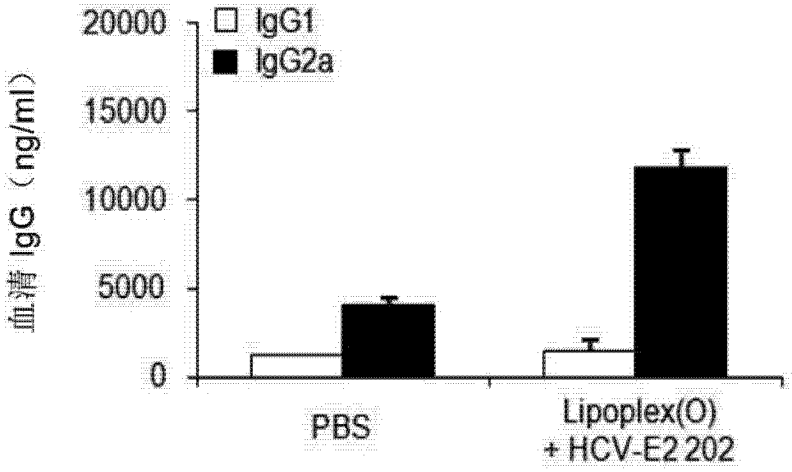

IgG1
IgG2a
血清 IgG（ng/ml）
20000
15000
10000
5000
0
PBS
Lipoplex(O)
+ HCV-E2 202

图 19b

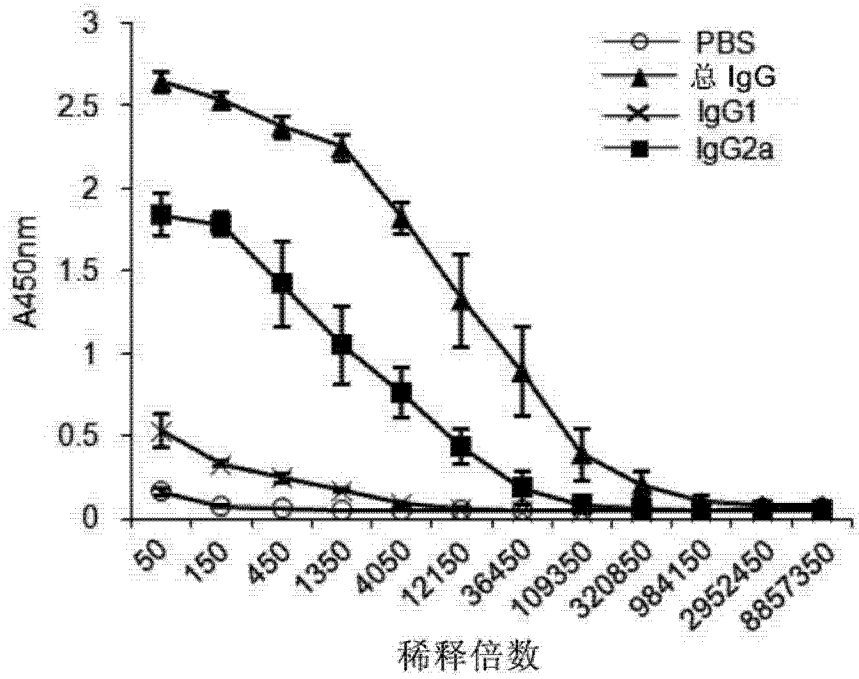

PBS
总 IgG
IgG1
IgG2a
A450nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
320850
984150
2952450
8857350
稀释倍数

图 19c

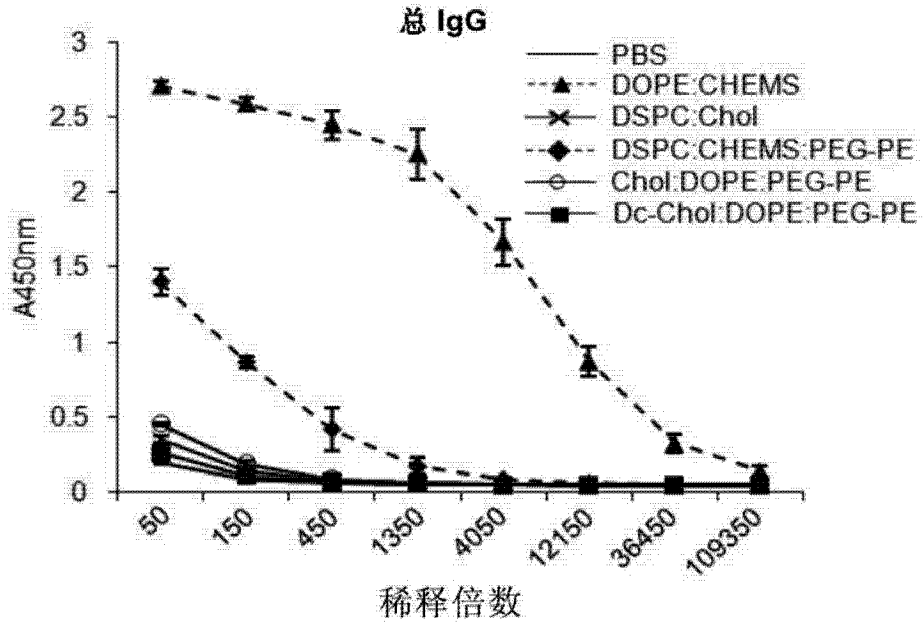

总 IgG
PBS
DOPE:CHEMS
DSPC:Chol
DSPC:CHEMS:PEG-PE
Chol:DOPE:PEG-PE
Dc-Chol:DOPE:PEG-PE
A450nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 19d

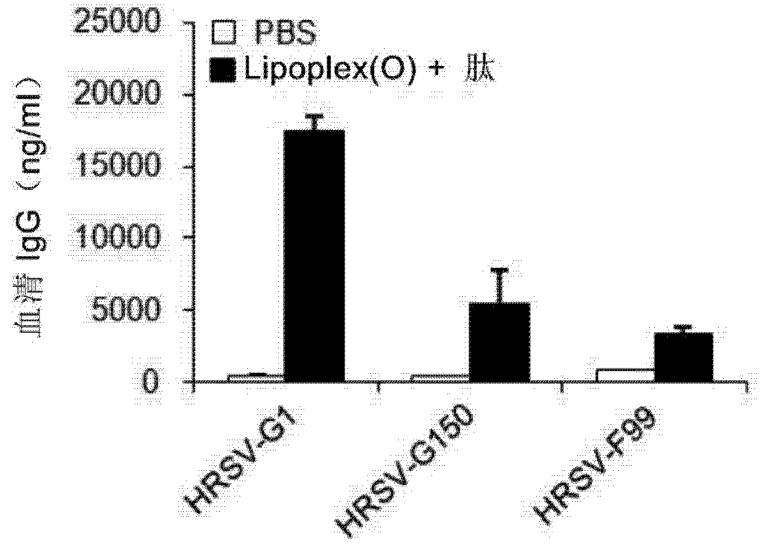

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
PBS
Lipoplex(O) + 肽
HRSV-G1
HRSV-G150
HRSV-F99

图 20a

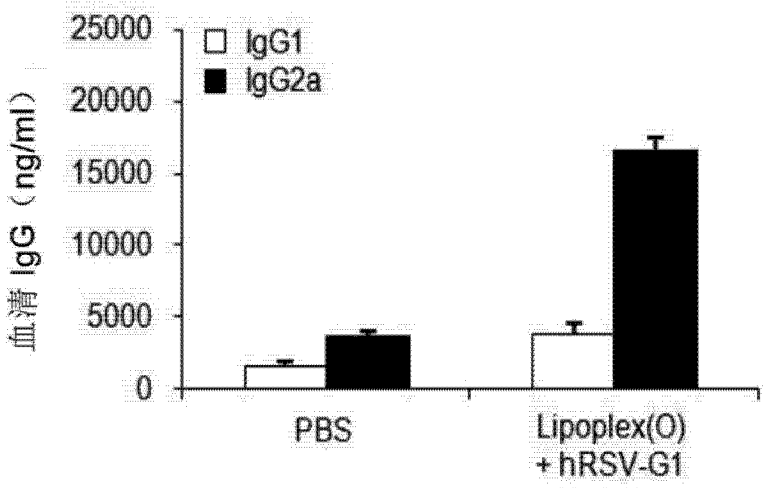

25000
20000
15000
10000
5000
0
血清 IgG（ng/ml）
IgG1
IgG2a
PBS
Lipoplex(O)
+ hRSV-G1

图 20b

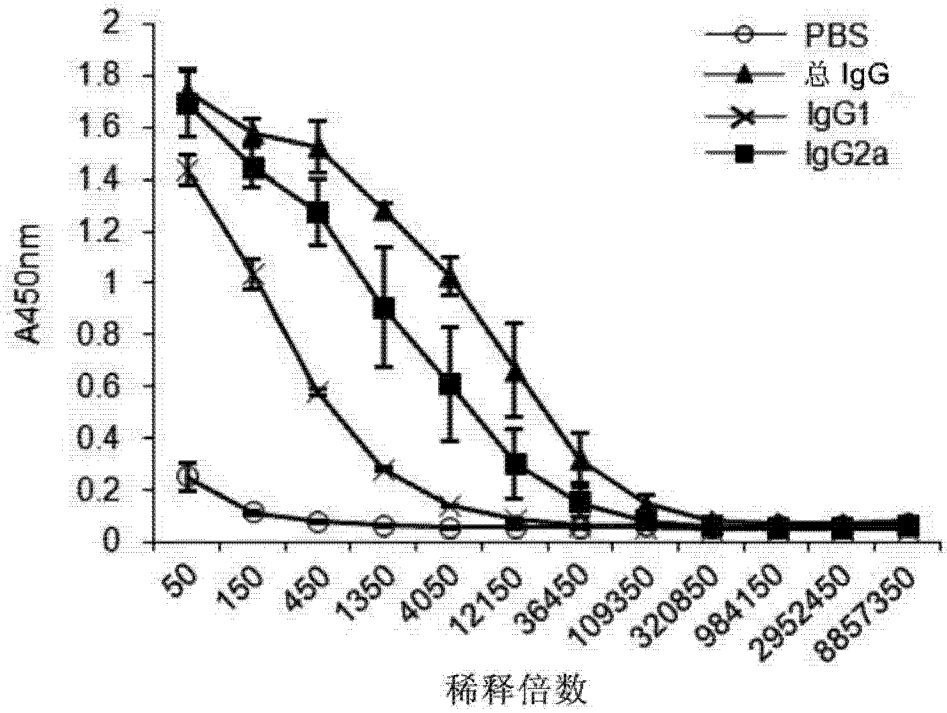

PBS
总 IgG
IgG1
IgG2a
A450nm
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
320850
984150
2952450
8857350
稀释倍数

图 20c

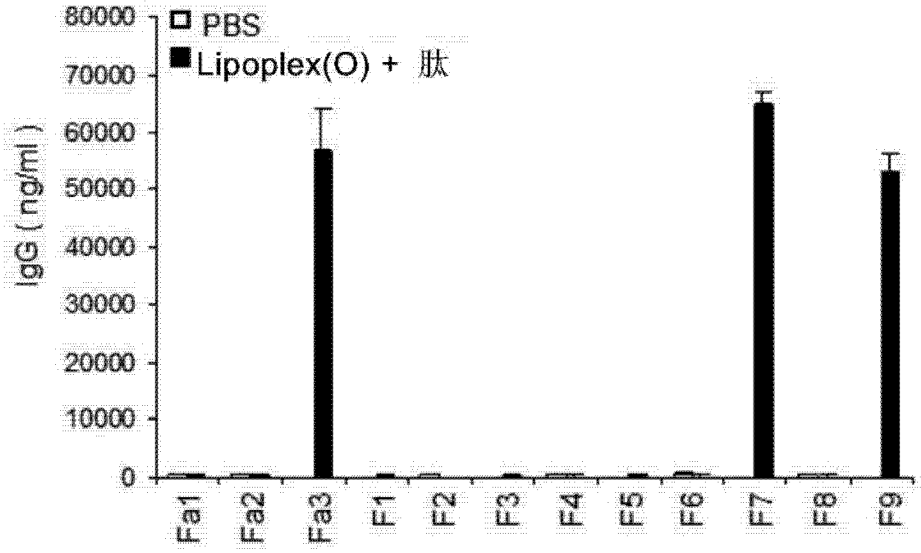

PBS
Lipoplex(O) + 肽
IgG (ng/ml)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fa1
Fa2
Fa3
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9

图 21a

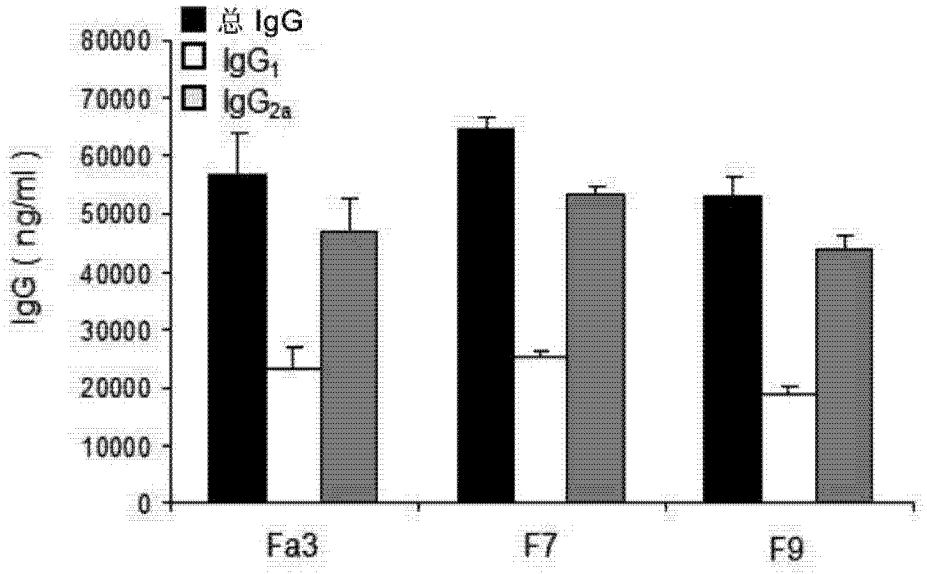

总 IgG
IgG1
IgG2a
IgG (ng/ml)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fa3
F7
F9

图 21b

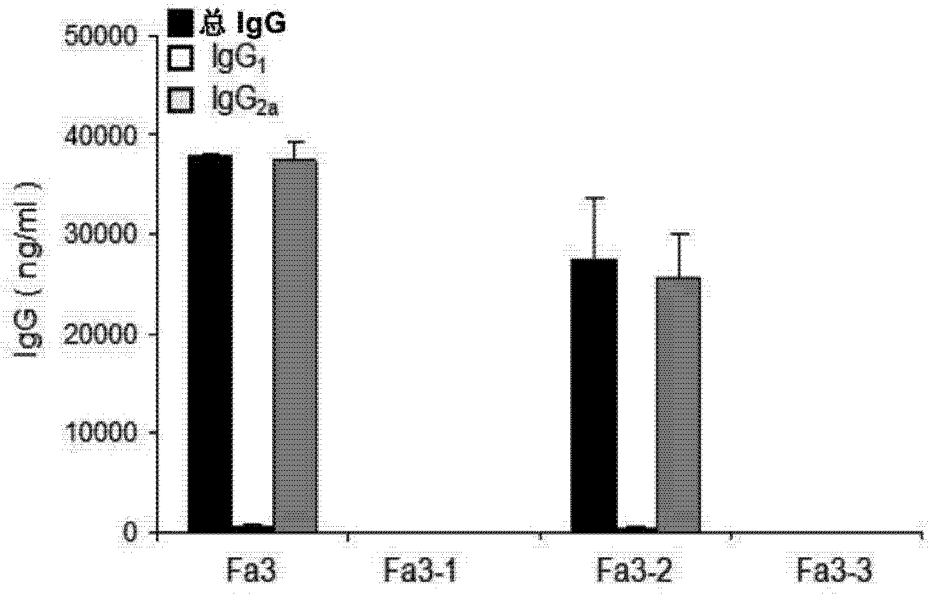

总 IgG
IgG1
IgG2a
IgG (ng/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fa3
Fa3-1
Fa3-2
Fa3-3

图 21c

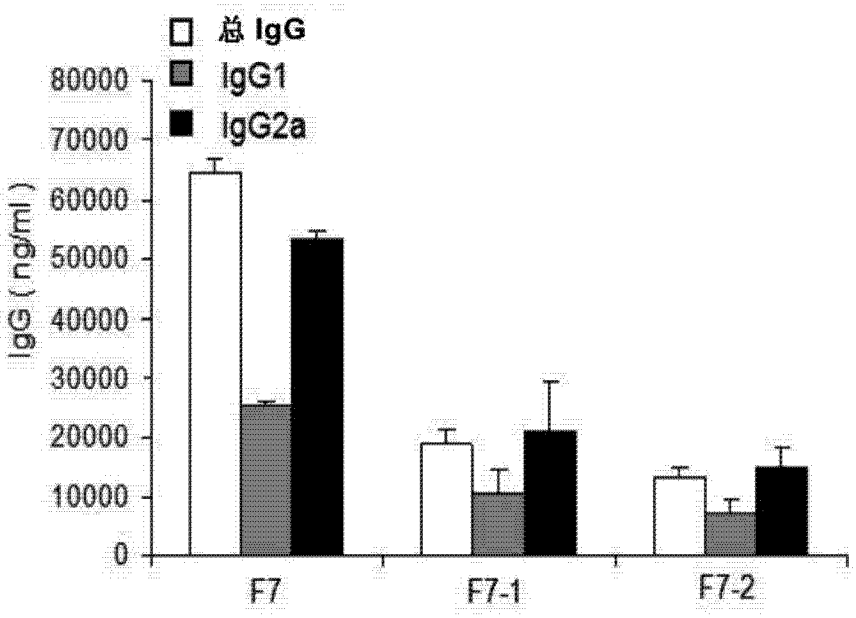

总 IgG
IgG1
IgG2a
IgG（ng/ml）
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
F7
F7-1
F7-2

图 21d

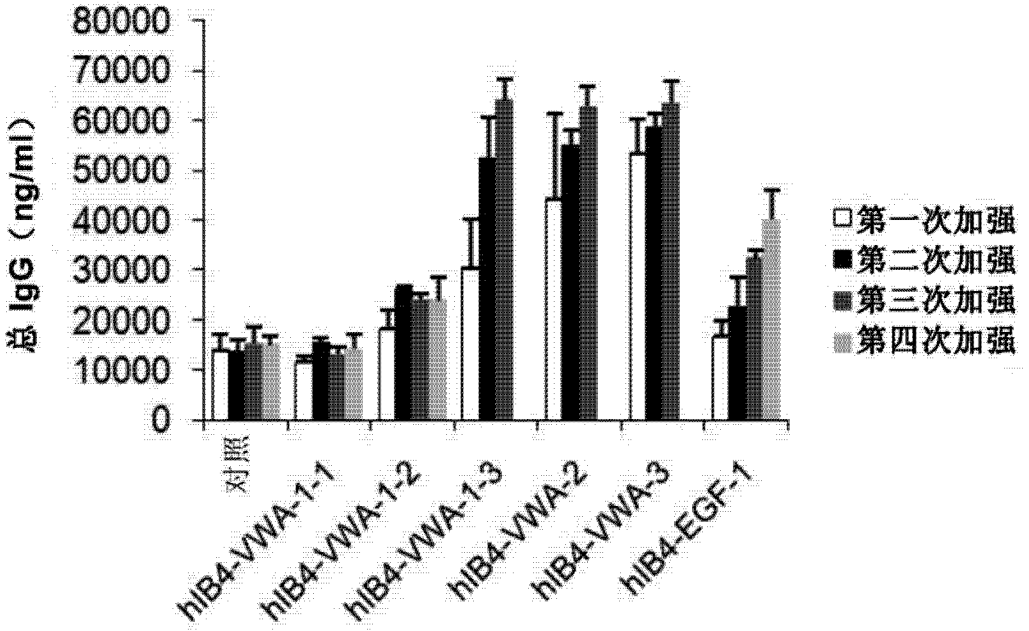

总 IgG（ng/ml）
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
第一次加强
第二次加强
第三次加强
第四次加强
对照
hIB4-VWA-1-1
hIB4-VWA-1-2
hIB4-VWA-1-3
hIB4-VWA-2
hIB4-VWA-3
hIB4-EGF-1

图 22a

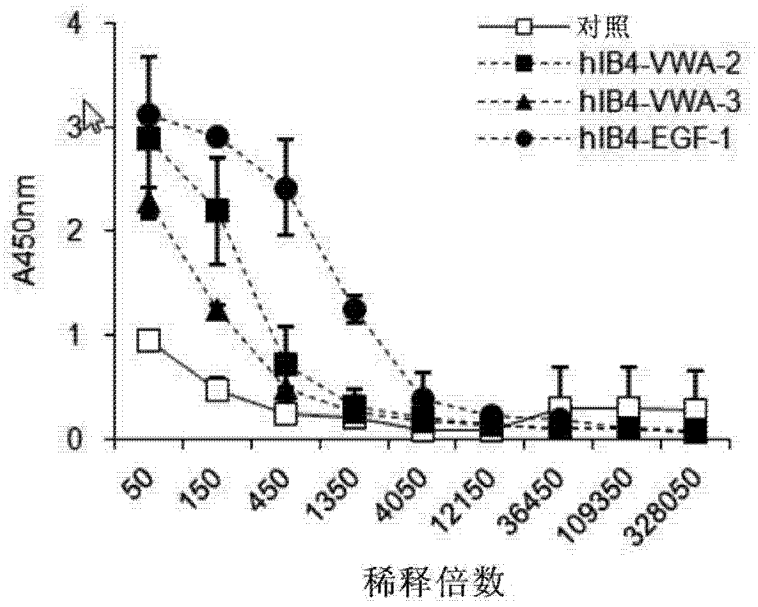

对照
hIB4-VWA-2
hIB4-VWA-3
hIB4-EGF-1
A450nm
0
1
2
3
4
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
328050
稀释倍数

图 22b

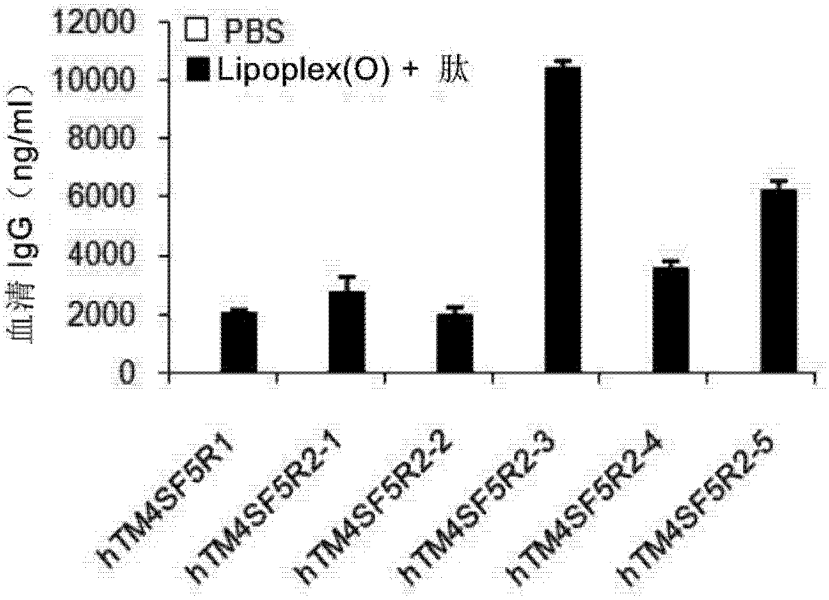

PBS
Lipoplex(O) + 肽
血清 IgG（ng/ml）
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
hTM4SF5R1
hTM4SF5R2-1
hTM4SF5R2-2
hTM4SF5R2-3
hTM4SF5R2-4
hTM4SF5R2-5

图 23a

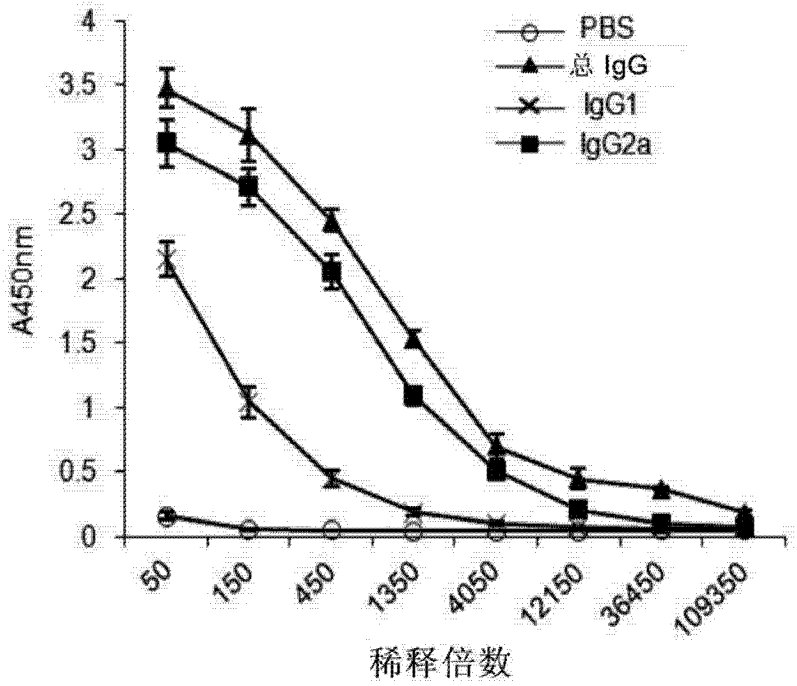

PBS
总 IgG
IgG1
IgG2a
A450nm
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 23b

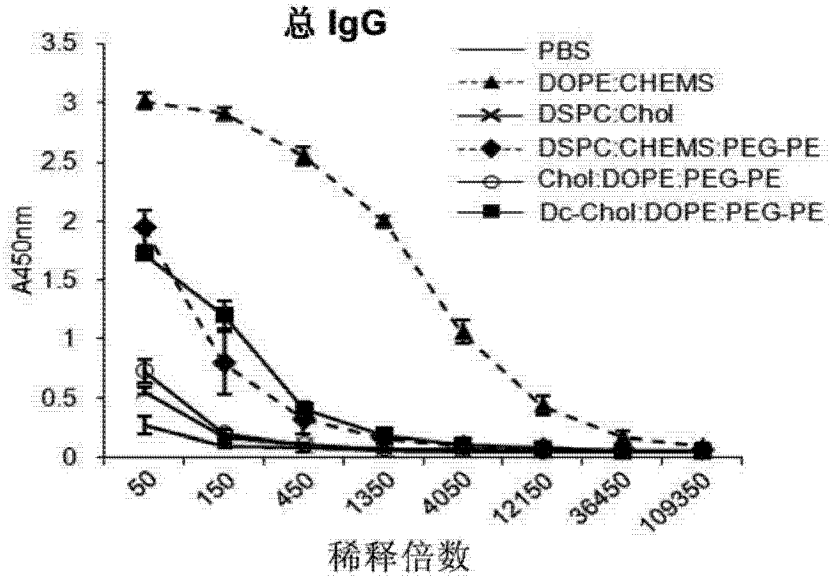

总 IgG
PBS
DOPE:CHEMS
DSPC:Chol
DSPC:CHEMS:PEG-PE
Chol:DOPE:PEG-PE
Dc-Chol:DOPE:PEG-PE
A450nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 23c

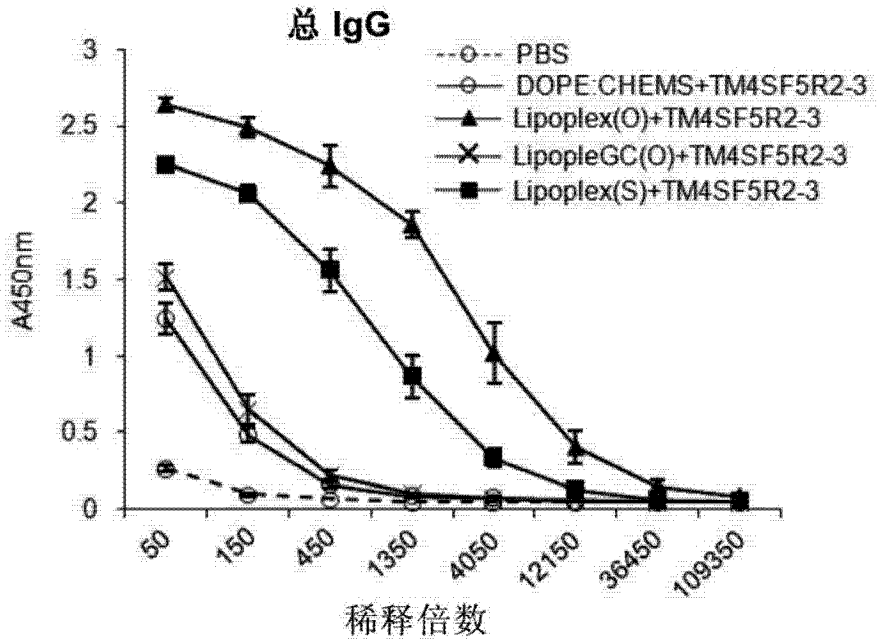

总 IgG
PBS
DOPE:CHEMS+TM4SF5R2-3
Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3
LipopleGC(O)+TM4SF5R2-3
Lipoplex(S)+TM4SF5R2-3
A450nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 23d

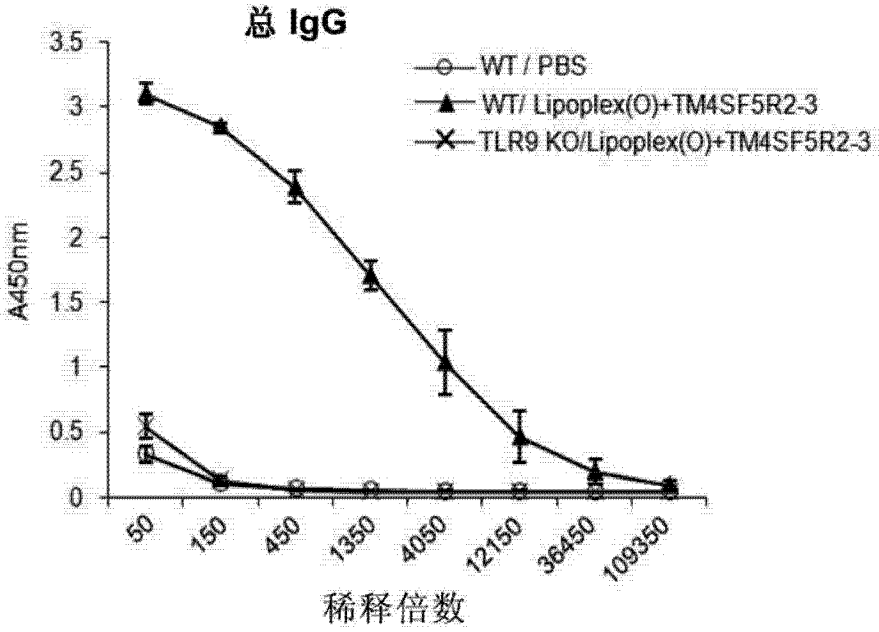

总 IgG
WT / PBS
WT/ Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3
TLR9 KO/Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3
A450nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
稀释倍数

图 23e

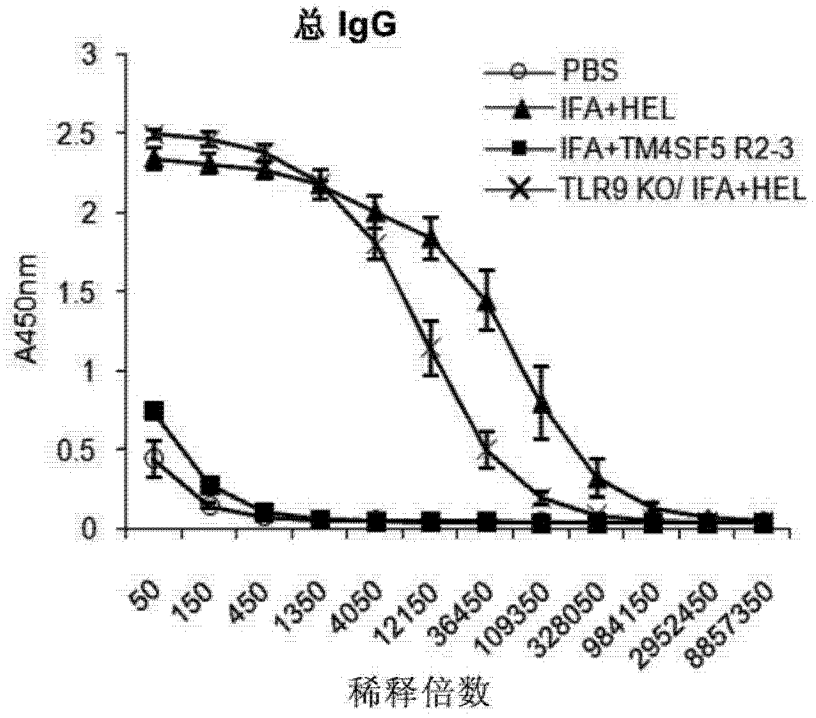

总 IgG
PBS
IFA+HEL
IFA+TM4SF5 R2-3
TLR9 KO/ IFA+HEL
A450nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
328050
984150
2952450
8857350
稀释倍数

图 23f

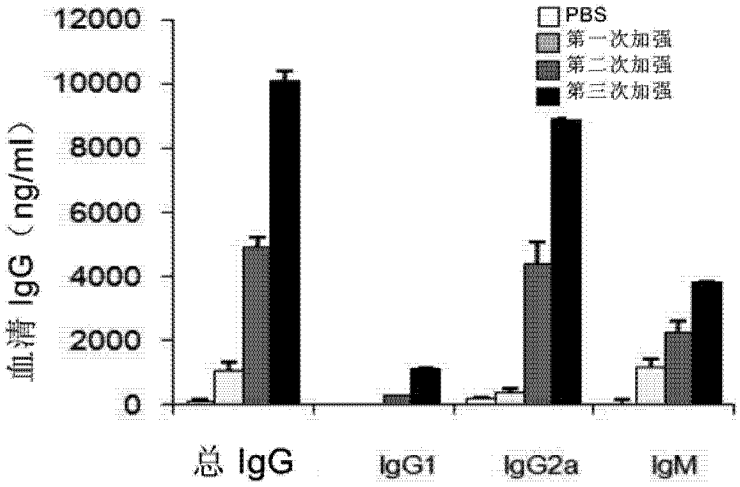

PBS
第一次加强
第二次加强
第三次加强
血清 IgG（ng/ml）
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
总 IgG
IgG1
IgG2a
IgM

图 24a

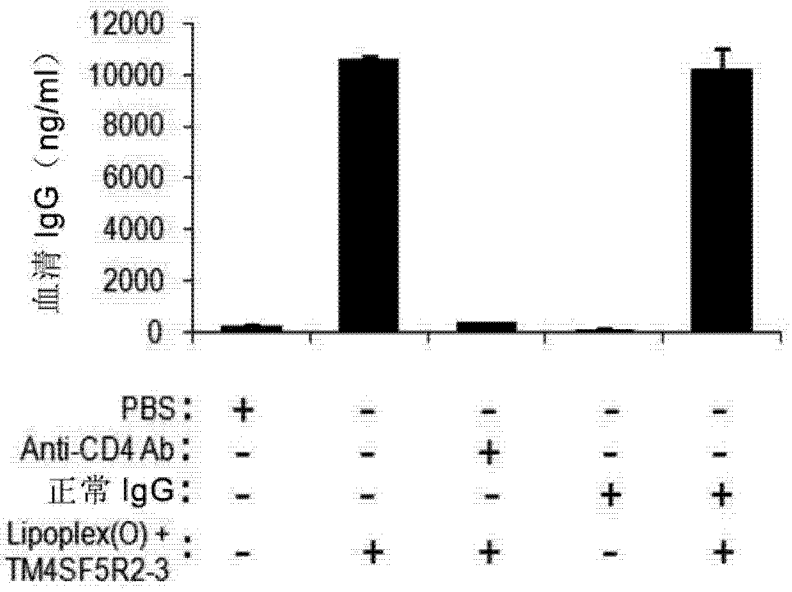

血清 IgG（ng/ml）
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
PBS：
Anti-CD4 Ab：
正常 IgG：
Lipoplex(O) + TM4SF5R2-3：

图 24b

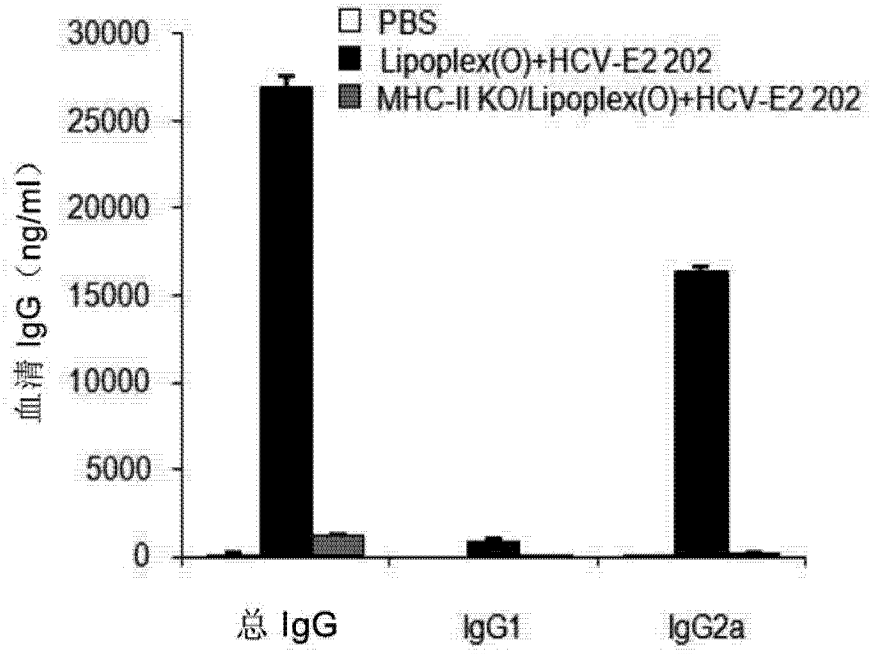

PBS
Lipoplex(O)+HCV-E2 202
MHC-II KO/Lipoplex(O)+HCV-E2 202
血清 IgG（ng/ml）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
总 IgG
IgG1
IgG2a

图 24c

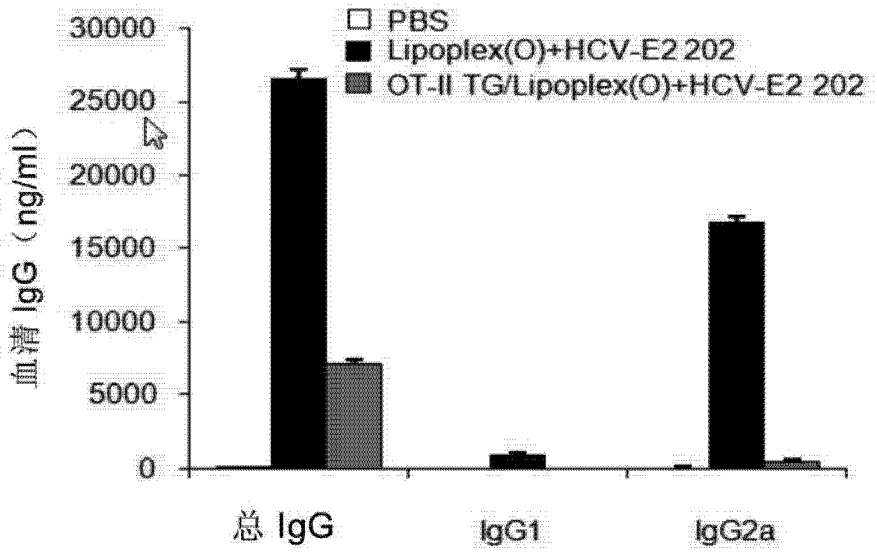

PBS
Lipoplex(O)+HCV-E2 202
OT-II TG/Lipoplex(O)+HCV-E2 202
血清 IgG（ng/ml）
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
总 IgG
IgG1
IgG2a

图 24d

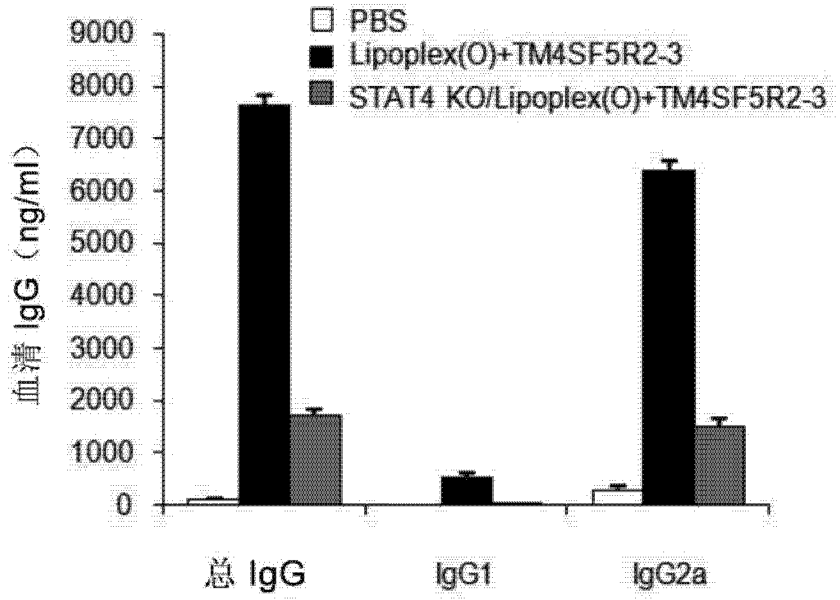

PBS
Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3
STAT4 KO/Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3
血清 IgG（ng/ml）
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
总 IgG
IgG1
IgG2a

图 24e

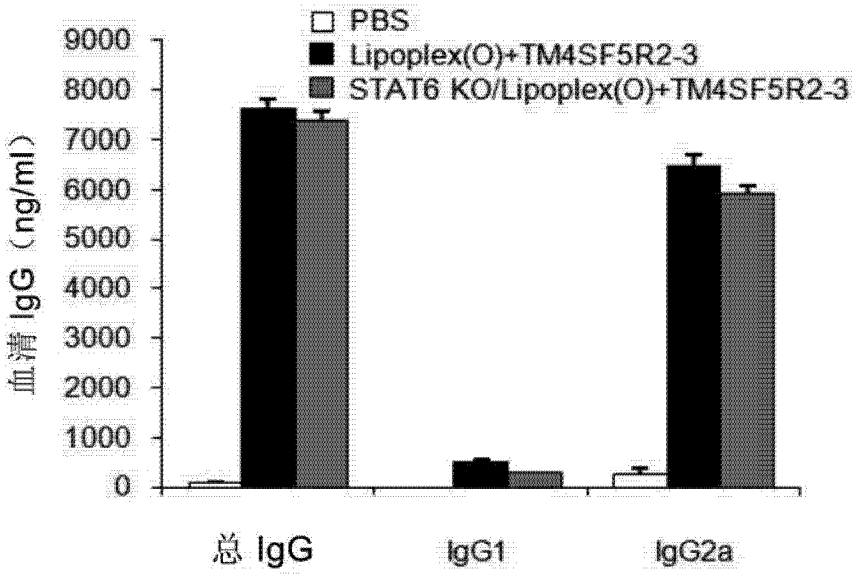


图 24f

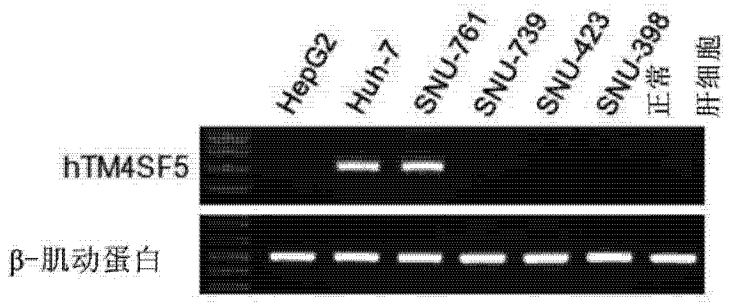


图 25a

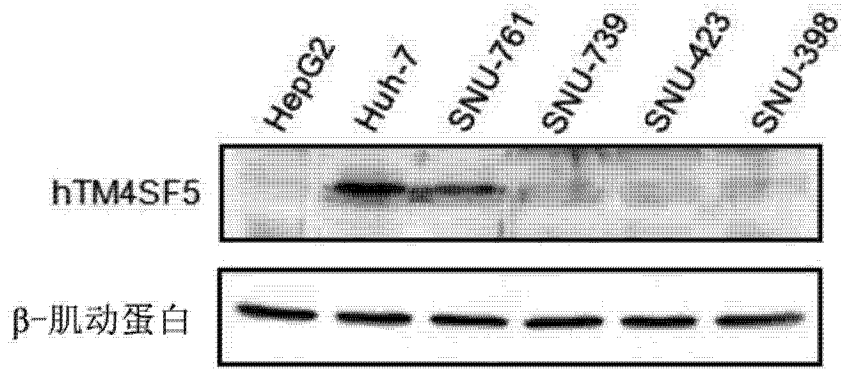


图 25b

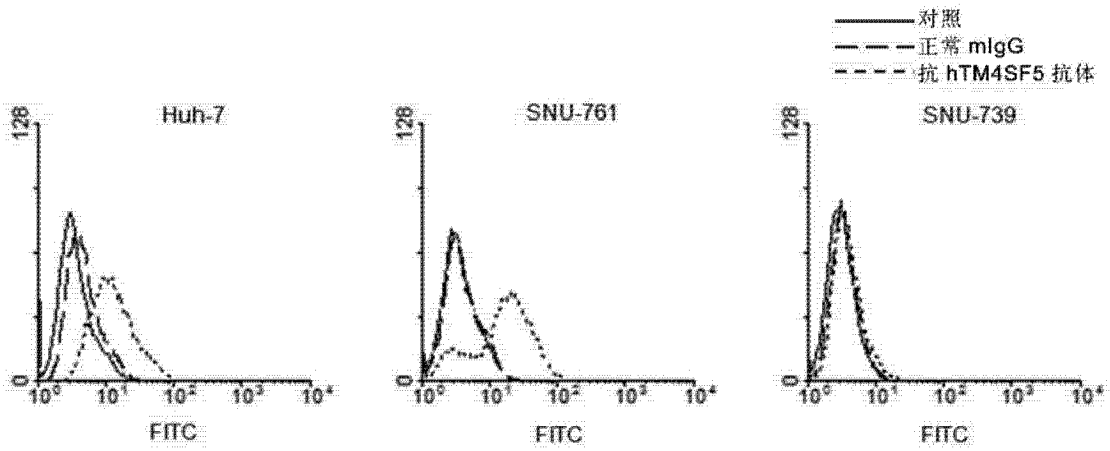

对照
正常 mIgG
抗 hTM4SF5 抗体
Huh-7
SNU-761
SNU-739
128
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FITC

图 25c

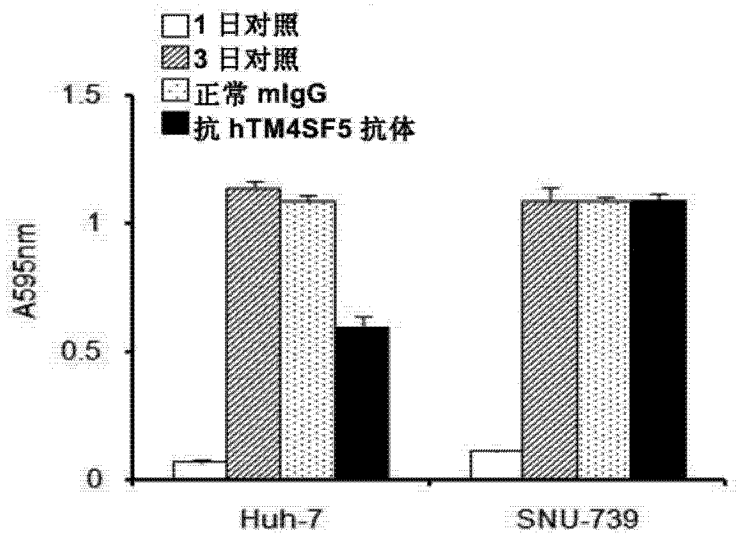

1 日对照
3 日对照
正常 mIgG
抗 hTM4SF5 抗体
A595nm
1.5
1
0.5
0
Huh-7
SNU-739

图 25d

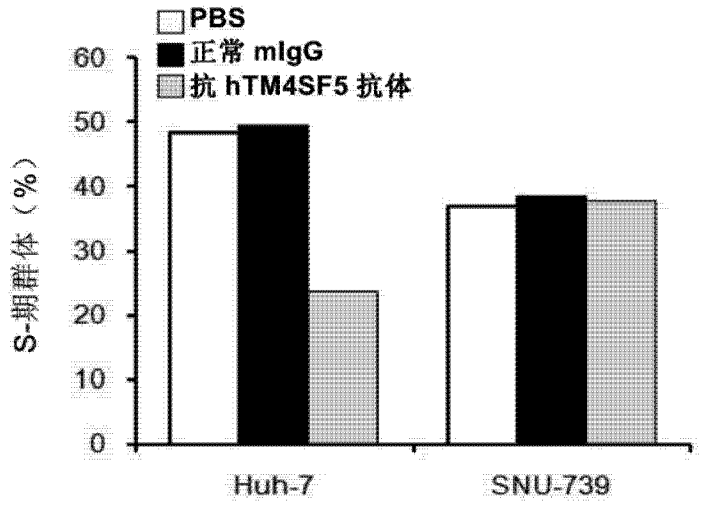

PBS
正常 mIgG
抗 hTM4SF5 抗体
S-期群体（%）
60
50
40
30
20
10
0
Huh-7
SNU-739

图 25e

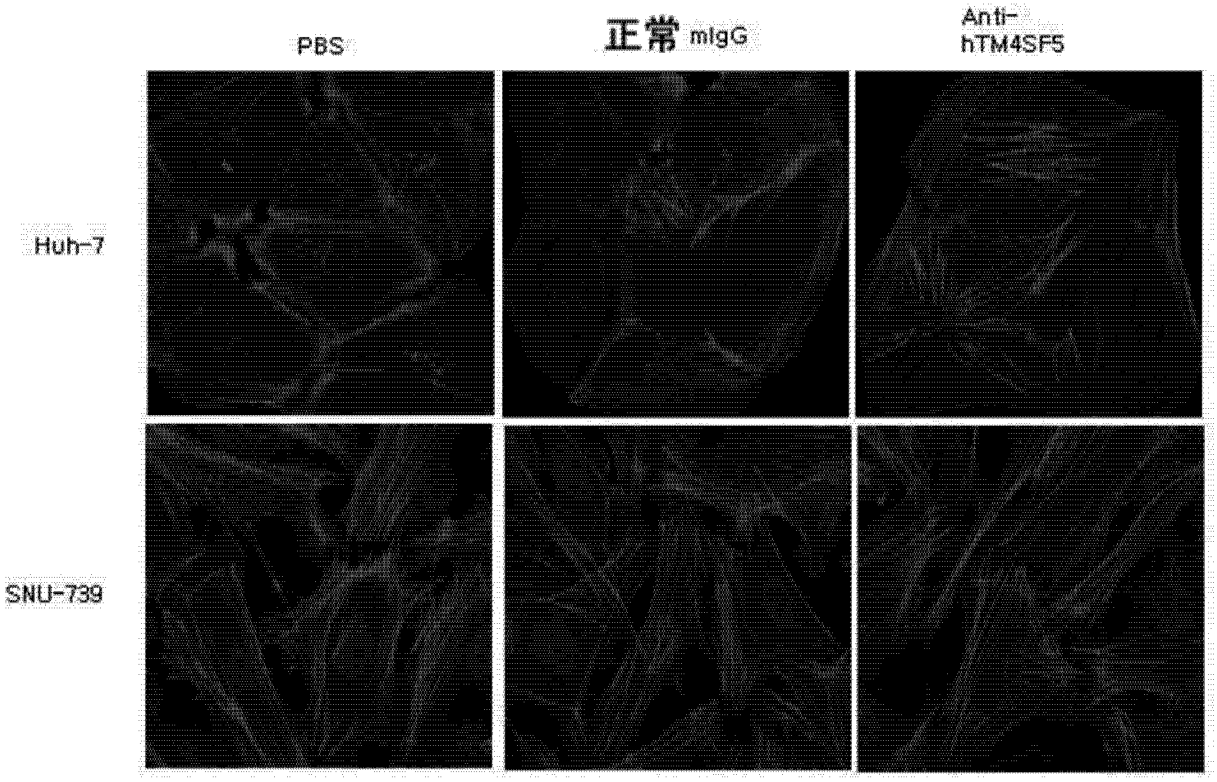

PBS
正常 mIgG
Anti-
hTM4SF5
Huh-7
SNU-739

图 25f

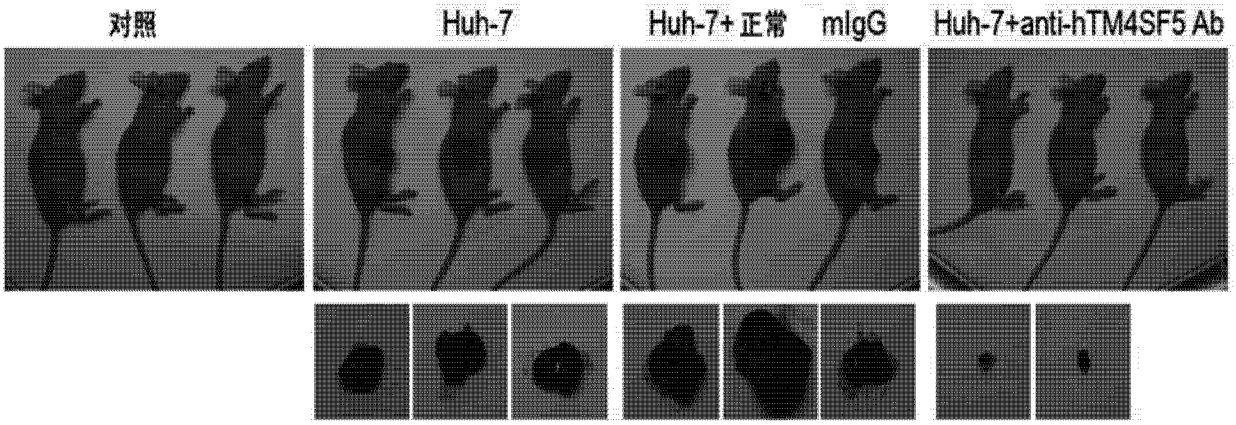

对照
Huh-7
Huh-7+正常 mIgG
Huh-7+anti-hTM4SF5 Ab

图 26a

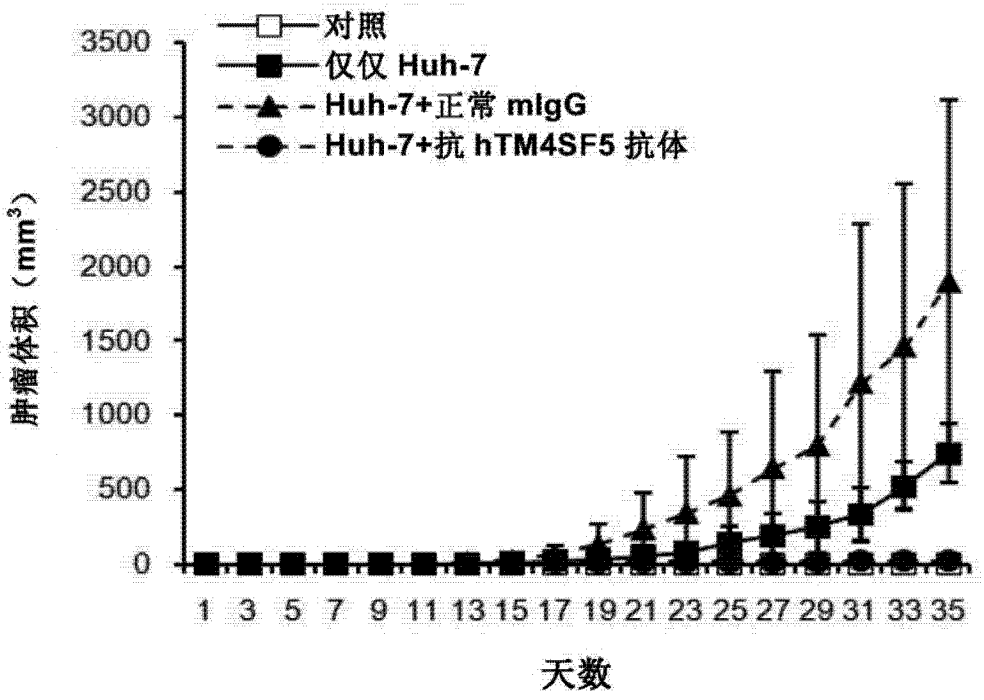

对照
仅仅 Huh-7
Huh-7+正常 mIgG
Huh-7+抗 hTM4SF5 抗体
肿瘤体积（mm3）
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35
天数

图 26b

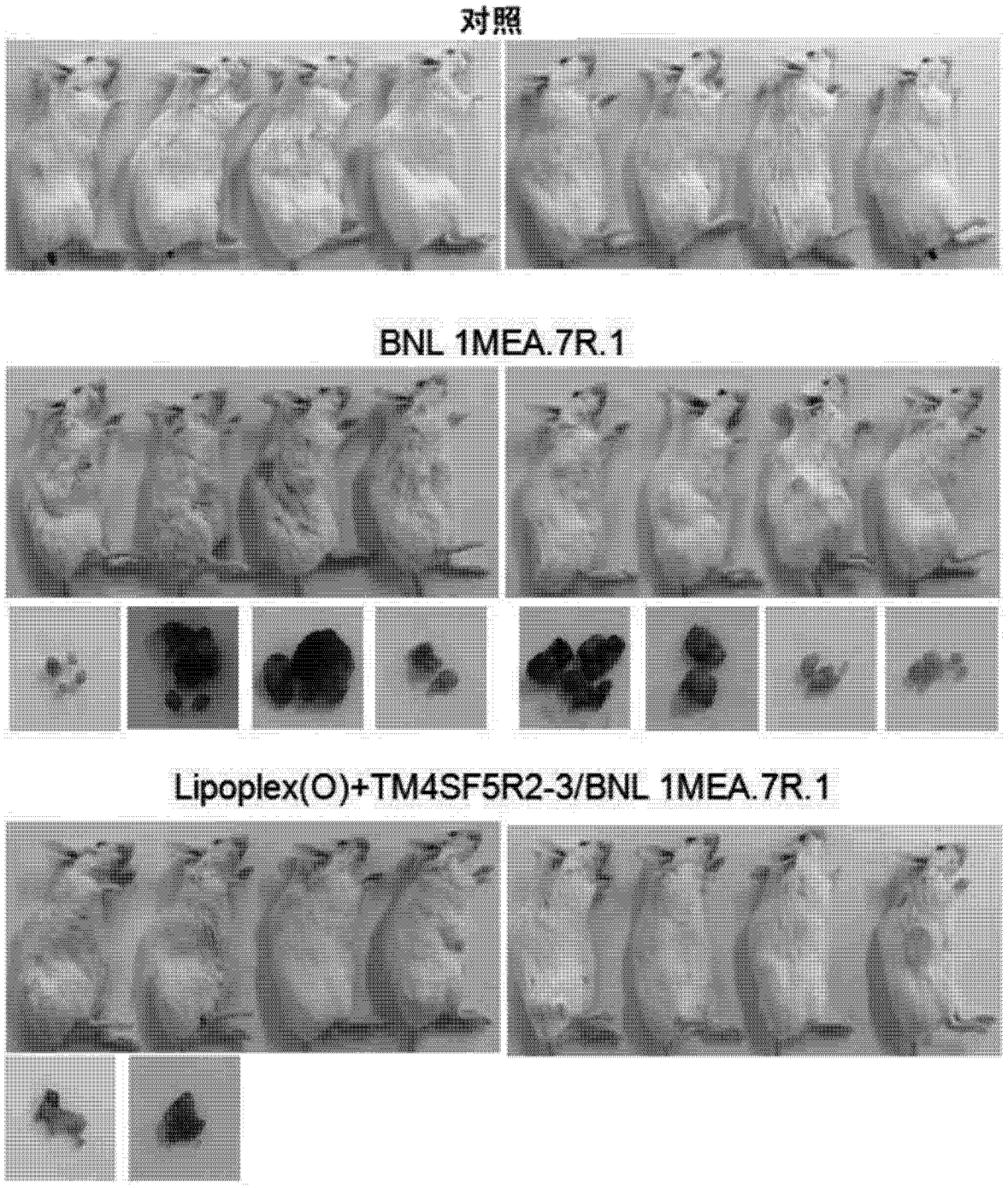


图 27a

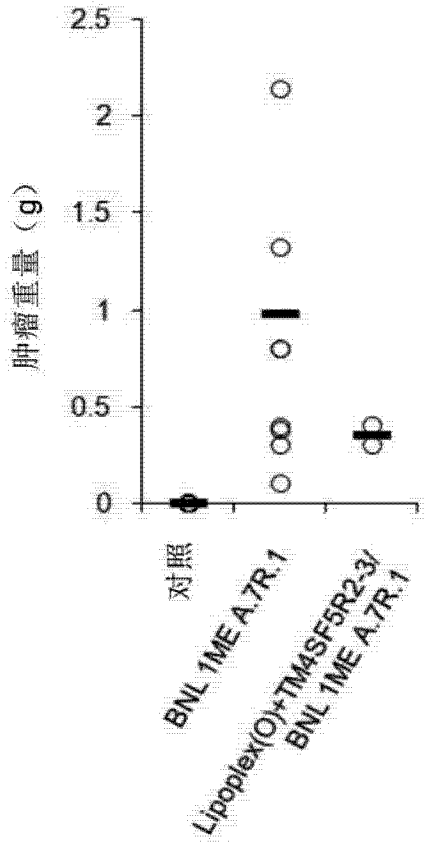

肿瘤重量（g）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
BNL 1ME A.7R.1
Lipoplex(O)+TM4SF5R2-3/
BNL 1ME A.7R.1

图 27b