(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1744883 B
(45)授权公告日 2011.06.08

(21)申请号 200380109258.5

(22)申请日 2003.11.27

(30)优先权数据
2002-0292 2002.11.27 CU

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.07.27

(86)PCT申请的申请数据
PCT/CU2003/000016 2003.11.27

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/047805 ES 2004.06.10

(73)专利权人 血清疫苗研究生产中心芬雷学院
地址 古巴哈瓦那

(72)发明人 O·G·佩雷斯马丁
G·R·布拉乔格兰多
M·D·S·J·B·拉斯特雷冈萨雷斯
V·G·谢拉冈萨雷斯
C·坎帕韦尔戈 N·莫拉冈萨雷斯
R·F·巴尔贝拉莫拉莱斯
J·M·德尔坎波阿隆索
T·罗德里格斯拉米雷斯
C·萨亚斯维涅 D·希尔马丁内斯
C·塔沃阿达苏亚雷斯

(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 赵艳华

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 9/127(2006.01)

(56)对比文件
WO 9314744 A1,1993.08.05, 全文.
US 5994318 A,1999.12.30, 说明书第2页第12行－第3栏第56行,第7栏第20－65行,第8栏第7－19行,实施例1－6,权利要求1－54.
US 5834015 A,1998.12.10, 全文.

审查员 李凤云

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 20 页

(54)发明名称

获得蜗形结构的方法、其疫苗组合物、佐剂以及中间体

(57)摘要

本发明涉及免疫学领域,具体地说涉及佐剂和疫苗的领域。本发明涉及从微生物外膜囊泡获得蜗形结构的方法,用作佐剂和疫苗。本发明也涉及获得所述蜗形结构的方法。

CN 1744883 B

1. 疫苗组合物，含有从活的奈瑟氏球菌属 (Neisseria)、沙门氏菌属 (Salmonella)、或利什曼原虫属 (Leishmania) 外膜囊泡获得的蜗形结构及适当的赋形剂；所述蜗形结构包含蛋白、脂质和与病原体相关的分子结构。

2. 根据权利要求 1 的疫苗组合物，其引入有一种或多种抗原，或与一种或多种抗原共施用，所述抗原选自缀合的多糖 Vi、丙型肝炎病毒、霍乱弧菌脂多糖、DNA 质粒和破伤风类毒素；所引入或共施用的抗原的浓度范围为 0.2 至 2.7μg 每 3 至 9μg 蛋白。

3. 根据权利要求 1 的疫苗组合物，其中所述与病原体相关的分子结构选自下组：脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白和脂磷酸聚糖，所述与病原体相关的分子结构的浓度为蜗形结构之蛋白重量的 1％至 30％。

4. 疫苗佐剂，含有从活的奈瑟氏球菌属、沙门氏菌属、或利什曼原虫属外膜囊泡获得的蜗形结构；所述蜗形结构包含蛋白、脂质和与病原体相关的分子结构。

5. 根据权利要求 4 的疫苗佐剂，其中所述与病原体相关的分子结构选自：脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白和脂磷酸聚糖，所述分子结构的浓度为蜗形结构之蛋白重量的 1％至 30％。

6. 疫苗组合物，含有从活的奈瑟氏球菌属、沙门氏菌属、或利什曼原虫属外膜获得的囊泡及适当的赋形剂；所述囊泡包含蛋白、脂质和与病原体相关的分子结构。

7. 根据权利要求 6 的疫苗组合物，其中所述与病原体相关的分子结构选自：脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白和脂磷酸聚糖，所述分子结构的浓度为该结构的蛋白重量的 1％ -7％。

8. 含有从活的奈瑟氏球菌属、沙门氏菌属、或利什曼原虫属外膜提取的囊泡的疫苗佐剂；所述囊泡包含蛋白、脂质和与病原体相关的分子结构。

9. 根据权利要求 8 的疫苗佐剂，其中所述与病原体相关的分子结构选自：脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白和脂磷酸聚糖，所述分子结构的浓度为该结构的蛋白重量的 1％ -7％。

10. 一种从活的奈瑟氏球菌属、沙门氏菌属、或利什曼原虫属外膜囊泡获得蜗形结构的方法，由下列步骤组成：

a. 从外膜囊泡制备含有 3-6mg/mL 的总蛋白浓度的溶液，向其中添加 10 倍蛋白浓度的非离子型洗涤剂；

b. 如果希望作为疫苗佐剂引入感兴趣的其它抗原或选自脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白和脂磷酸聚糖的与病原体相关的分子结构，将所述抗原和与病原体相关的分子结构添加到 a) 中制备的溶液中，均匀其至对于每 3 至 9μg 蛋白，抗原为 0.2 至 2.7μg，和与病原体相关的分子结构的蛋白浓度为 1-30％；

c. 然后，为了灭菌和消除其中仍发现的囊泡集合体，步骤 a) 和 b) 的溶液通过孔径大小 0.2μm 的膜过滤；

d. 然后将步骤 c) 的产物针对含有浓度在 2.5-6.5mM 的多价离子的溶液，在缓冲至 pH 7.4±0.2 的条件下进行转动透析或正切过滤；

e. 最后，为了使颗粒大小均匀，机械处理获得的蜗形结构。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中步骤 d) 中所述的多价离子是 Ca^{2+}、Zn^{2+} 或 Mg^{2+}。

12. 根据权利要求 10 的方法，其中步骤 e) 中所述的机械处理为在温度为 15℃ -25℃的

水浴中超声处理 45 分钟的一段时间。

获得蜗形结构的方法、其疫苗组合物、佐剂以及中间体

[0001] 本发明应用于免疫学领域，具体地说佐剂和疫苗的领域。

[0002] 在有效疫苗的探索中，已经证明发现适当的抗原在疫苗学之外的各种领域中存在挑战。一旦已经分离了合适的抗原，后者常常产生不满足于目的的免疫作用，或没有诱导期望效果，因此需要应用适当的佐剂。直到今天，制备当前没有保护的疾病的疫苗，以及改善现存疫苗和开发用于多样和新一代疫苗的强大佐剂构成了急迫的需要。开发包括不同抗原和证明在治疗成人和儿童，更重要地在治疗新生儿中有效的疫苗，以及发现在粘膜水平起作用和能够抵抗胃的酸性内容物的佐剂也是如此。

[0003] 粘膜免疫处于越来越广泛的免疫学实践，因为很多微生物通过粘膜穿透身体。粘膜呈现出很多特殊性，包括：普通粘液系统的存在（允许我们诱导局部以及远距离的应答）和 Ig（免疫球蛋白）A 是从事其免疫防御机制的主要抗体的事实。

[0004] 这种类型的免疫还提供了很多优点，包括给药不复杂，不需要使用注射器，较低的生产成本和低水平发生反应原性 (reactogenesis)，后者致使关于肠胃外疫苗和诱导粘膜和全身反应的所有这些安全得多。

[0005] 然而，粘膜免疫遇到很多障碍：胃的酸性内容物，其达到极端酸性 pH 水平；十二指肠的碱性和消化道的蠕动，它与来自在粘膜水平运作的感应器官的 M 细胞的作用结合专门作用于抗原抽样 (sampling)，降低疫苗中抗原的功效。呼吸道粘膜器官中纤毛和粘液的形成也通过 M 细胞干扰抗原抽样。

[0006] 用来避免抗原与酸性 pH 介质接触的策略在于疫苗于碳酸氢盐溶液中在远离进餐的时间给药，使得降低胃的酸性并确保迅速通过它 (Benitez JA 等，Infect and Immun 1999,67(2)：539-545)，或用抵抗酸性物质的试剂包裹抗原，如脂质体。

[0007] 当前，用于制备脂质体的方法，和固体脂溶性原料包裹的方法是熟知的 (Schneider 美国专利 4,089,801、Ash 等美国专利 4,448,765 和 Miller 等美国专利 4,133,874)。药物原料被脂质体胶囊化提出的主要问题包括：它在实验室试验中所显示的微小稳定性；包封材料的溢出；药物功效降低；对不利的环境条件所显示的易感性，在胃肠道中消化和与细胞膜间接融合 (http://www.BDSiAdvantages.html)。另一方面，脂质体是不稳定结构，在极大程度上不能冷冻干燥－已经被蜗形结构 (cochlear structure) 的发展克服的问题。

[0008] 蜗形是卷起成海壳形式的多层脂质结构。通过单层脂质体的融合和二价阳离子的使用制备蜗形结构是熟知的实践操作 (D.Papahadjopolous 等 Biochem.Biophys.Acta，1975；394：483)。已经改进了这个程序以产生含有抗原和被抗原环绕的脂质多层囊泡的悬浮液。后者在氮气下超声处理转变为小的单层脂质蛋白囊泡，该超声处理是为了在二价离子存在下形成蜗形结构 (Gould-Fogerite 等美国专利 5,643,574，1997 年 7 月 1 日)。图 1 总结了这些技术。

[0009] 蜗形，以及其它自身装配的微结构已经用于治疗剂的给药 (Yager 等美国专利 5,851,536，1998 年 12 月 22 日，Gould-Forgerite 等美国专利 5,994,318，1999 年 11 月 30 日，和 Yager 等美国专利 6,180,114，2001 年 1 月 30 日)。这些包括含有蜗形的佐剂的制备

(Gould-Fogerite 等美国专利 5,994,318,1999 年 11 月 30 日)。然而,脂质体和蜗形都必须在胆固醇存在下从负脂质 (negative lipids) 得到,两者通常都以昂贵程序从动物中提取 (Mannino 等美国专利 4,663,161,1987 年 5 月 5 日),根据新药物规则,这越来越不能被接受,和在疫苗制剂的情况下,优选包括从微生物获得的纯化蛋白,或肽。此外,我们应该指出以前尚未考虑过蜗形以其自身能力作为佐剂,或其含有诱导免疫反应中的重要信号的其它活化剂的制剂作为佐剂,如与病原体相关的分子结构(种系发生学保守的结构,宿主中有其受体,和被宿主识别为危险征兆)。

[0010] 本发明的目的是从活生物外膜中发现的囊泡获得新蜗形结构,由于它们特殊的蛋白和脂质组成,以及由于与生物中发现的病原体相关的分子结构,其呈现出佐剂和疫苗性质。一旦形成,该蜗形结构在其自身大小范围内均匀化而使它们免疫更有效。

[0011] 通过本发明获得的蜗形结构的特征是——具有蛋白脂质成分,至今其它作者未尝试过,它们能够自身装配和能够产生卷起的海壳状结构。蜗形结构的蛋白和脂质的组成将取决于供给其外膜的囊泡的微生物,也就是说,它将取决于其膜中发现的蛋白的特征。以相同方式,提及的结构含有相对于蛋白浓度为 1-7%的浓度的与病原体相关的分子结构,它由所述的微生物的膜供给,它被插入并且游离状态下不能发现它在所提及的结构内。此外,可以从其它微生物纯化这些结构并可以添加到制剂中。添加的和已存在的结构相对于蛋白的浓度应该是 1-30%之间的浓度。制备蜗形结构过程中利用的与病原体相关的分子结构之一是霍乱弧菌 (Vibrio cholerae) 或脑膜炎奈瑟氏球菌 (N.Meningitidis) 的脂多糖(实施例 20)。

[0012] 通过本发明获得的蜗形结构诱导在母乳哺养的婴儿中证明有效的细胞反应,显示出抗热以及抗酸和碱的性质,和全面证明适于粘膜给药(实施例 2、4、6、8 和 10)。这些性质在使用提及的结构设计异种佐剂(用于加强不同于产生外膜囊泡的疫苗的疫苗的佐剂)和同种疫苗(用于抵 抗供给外膜囊泡的微生物的疫苗)中有效。

[0013] 关于含有所述结构的疫苗组合物,重要地指出在实验的各个时期,血清反应优越于使用含氧化铝佐剂的基于外膜囊泡的疫苗时获得的血清反应,后一疫苗在市场上称作 VAMENGOC-BC®,并且给予它时,也通过粘膜诱导特异性免疫球蛋白 A。此外,该蜗形结构刺激 CD8 淋巴细胞 - 细胞内生物的所有免疫反应的重要部分。

[0014] 通过各种试验评估蜗形结构的佐剂作用,包括:在缺少所有刺激下,人组织细胞系 U937 中 IL12 的产生(实施例 11)和鼠巨噬细胞系 J774 中一氧化氮的产生(实施例 13);人树突的刺激(实施例 15)和挑战实验中损害硬结减小,“挑战”含有来源于该原生动物生物硕大利什曼原虫 (Leishmania major) 的抗原的蜗形结构免疫的小鼠(实施例 16)。

[0015] 通过本发明制备的蜗形结构使得产生的佐剂或疫苗诱导“体内”更早、更强和更持久的应答,同时“体外”观察到细胞结构诱导中涉及的介质的有效诱导,和呈递专业抗原的细胞的很好刺激(树突细胞)(实施例 11、13 和 15)。

[0016] 本发明的另一个目的是微生物外膜中发现的囊泡用作疫苗或用作异种佐剂,该囊泡构成蜗形结构形成的起点,因此消除氢氧化铝吸附不限制前者的免疫原性能力。值得提及的是尚未充分研究过这些囊泡全部靠它们自身诱导肠胃外反应的能力。

[0017] 所述囊泡被认为是自身装配的微球体,并由蛋白和多糖插入其中的脂质双层构成。这些可以从任何病原体提取并可以存在不同的分子结构(特别是脂多糖、肽聚糖、脂蛋

白、磷壁酸(teicoic acid)、鞭毛蛋白或脂磷酸聚糖)。脂磷酸聚糖和脂多糖分别从硕大利什曼原虫和脑膜炎奈瑟氏球菌或伤寒沙门氏菌(Salmonella tiphy)获得,从生物外膜获得囊泡的过程中,以蛋白重量的1-7%的比例保持插在囊泡中且永不以游离状态存在。

[0018] 用于疫苗制剂时,当鼻内接种时,从伤寒沙门氏菌或从脑膜炎奈瑟氏球菌B提取的外膜囊泡诱导来自IgA的应答,和当肠胃外接种时,诱导好的免疫应答(实施例3、5、7、12和14)。

[0019] 通过很多试验评估外膜囊泡的佐剂作用,包括:在缺少其它刺激下,人组织细胞系U937中IL12的产生(实施例12)和鼠巨噬细胞系J774中一氧化氮的产生(实施例14);通过多糖与脑膜炎萘瑟氏球菌外膜中发现的囊泡的组合与它和破伤风类毒素融合相比,加强细胞应答(IgG2a增加)(实施例18),和通过与相同细菌中发现的外膜囊泡组合,加强抗来自伤寒沙门氏菌的多糖Vi的反应性抗体的应答(实施例19)。

[0020] 蜗形结构和外膜囊泡用作佐剂或疫苗引起通过在先剂量疫苗或通过接触细菌而诱导的免疫应答出乎意料的加强。重要地指出后者与来源于蜗形结构或囊泡的那些以不同方式给予(实施例22)。

[0021] 本发明也公开了从活生物外膜中发现的囊泡获得蜗形结构的方法。采用下列步骤引导来完成:首先,使用本领域专家广泛使用的任何方法纯化由活微生物或细胞形成囊泡的外膜。优选方法是在EP 301992、US5,597,572、EP 11243或US 4,271,147、Zollinger等(J.Clin.Invest.1979,63:836-848)、Frederikson等(NIPH Annals 1991,14:67-80)、Sauders等(Infect.Immun.1999,67:113-119)、Drabick等(Vaccine2000,18:160-172)、WO 01/09350或EP 885900077.8和US 5,597,572中公开的方法。纯化该膜,使它们含有完全插入囊泡的1-7%的脂多糖。制备总蛋白浓度为3-6mg/mL的溶液,为了完全溶解囊泡,非离子型洗涤剂的浓度增加至蛋白浓度的8至12倍。这个溶液随后通过孔径大小为0.2μm的膜过滤灭菌,其中尚未溶解的囊泡集合体也被去除。这之后,进行转动透析或正切过滤。用含有适当浓度多价离子(尤其是Ca^{2+}、Zn^{2+}或Mg^{2+},浓度范围从2.5至6.5mM)的溶液,在pH 7.4±0.2的pH条件下进行透析24小时。最后,为了使颗粒大小均匀,获得的蜗形结构接受机械处理(特别是在温度为15℃和25℃之间的水浴中超声处理45分钟)。

[0022] 这构成了获得含有来自所用微生物的外膜的多种蛋白和脂质,以及与自然获得的病原体相关的分子结构的蜗形结构的快速和有效方法。这些结构显示高水平的稳定性和免疫原性。

[0023] 另一方面,获得它们的简单和有效方法允许我们将新抗原引入提及的结构。在透析过程期间,增加洗涤剂浓度之后和添加多价离子之前,将新抗原添加到为获得所述结构制备的外膜囊泡的悬浮液中。可以添加的抗原是糖类、脂蛋白、肽、缀合物和核酸。这些应该是以每3-9μg蛋白0.2-2.7μg的浓度。也可能引入与病原体相关的其它分子结构以刺激先天性和获得性反应-使其有效作为异种佐剂。霍乱弧菌的脂多糖、硕大利什曼原虫的无鞭毛体或前鞭毛体是特别采用的结构,其允许我们诱导细胞应答以及抗它们的反应性抗体的活性。除了这些,含有绿荧光蛋白的质粒DNA导入并置于巨噬细胞系;该分子的荧光随后允许我们确定其在细胞内存在。也导入来源于Derma tophagoides siboney的变应原(alergenic),测定诱导的所产生的细胞应签(实施例16和17)。

[0024] 在一个具体实施方案中,本发明的疫苗组合物中的蜗形结构包含的与病原体相关

的分子结构以蜗形结构蛋白重量的 1% -30%的浓度添加。

[0025] 在一个具体实施方案中，本发明的疫苗组合物另外包括的抗原选自下组：天然或重组蛋白、肽、糖类、核酸、缀合物或变应原。在一个具体实施方案中，其中添加的抗原是表位 T 或 B。

[0026] 任何作者都没有描述过活生物用作获得蜗形结构的原料来源。也没有如同本发明的情况描述过将一种或多种与病原体相关的分子结构引入蜗形结构的方法。

[0027] 将通过下列具体的实施例描述本发明。

[0028] 实施例 1. 获得蜗形结构

[0029] 我们从使用 EP 885900077.8 或 US 5,597,572 中描述的方法从微生物外膜提取囊泡开始。这些重悬于含 0.5%脱氧胆酸钠的 Tris-EDTA 的缓冲溶液中。使用 Peterson 改进的 Lowry's 方法 (Analyt.Biochem.83,346,1977) 确定悬浮液的蛋白浓度。通过确定无机磷含量而确定囊泡的磷脂含量 (Bartlett,J Biol.Chem 234,466,1959)。蛋白和磷脂浓度都用于确定蜗形结构形成所需的最佳条件和洗涤剂的量。制备含有囊泡的溶液，调节至含有总蛋白浓度 6 至 15 倍浓度的脱氧胆酸钠的 Tris-EDTA 缓冲液中含有 5-6mg/mL 的蛋白终浓度。在透析装置中用孔径大小 0.2μm 的过滤器过滤这种溶液。使用转动搅拌方法透析 24 小时的时间，伴连续和缓慢改变透析缓冲液。这最后的溶液由程序每一步骤中保持不变的无菌条件下制备的含 NaCl 50-150mM、咪唑 1-4mM、HEPES3-5mM 和 CaCl 2-7mM 的水组成。蜗形结构的形成由白色沉淀出现和随后的光学和电子显微观察证实。再次计算蛋白和磷脂的浓度并调节进行随后的试验。检测蜗形结构中包括的蛋白的物理和化学性质并通过在考马斯蓝着色的聚丙烯酰胺凝胶中电泳与囊泡的蛋白进行比较。使用 Western 印迹方法确定和证实后者的结构完整性 (图 2-4)。

[0030] 实施例 2. 小鼠中蜗形结构诱导的反应与疫苗 VA-MENGOC-BC® 诱导的反应比较

[0031] 用 VA-MENGOC-BC® 或蜗形结构，以每只小鼠 12μg 蛋白肌内免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。第二剂后，在所示时间从动物抽取血液样品并通过 ELISA 试验评估抗外膜囊泡的 IgG 血清反应。第二剂后 17、27 和 180 天，观察到蜗形结构和疫苗诱导的反应之间有显著性差异 ($p < 0.05$)，总是有利于前者 (图 5)。

[0032] 实施例 3. 肠胃外给予外膜囊泡在小鼠中诱导的反应与疫苗 VA-MENGOC-BC® 诱导的反应比较

[0033] 用 VA-MENGOC-BC® 或蜗形结构，以每只小鼠 12μg 蛋白肌内免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。第二剂后，在所示时间从动物抽取血液样品并通过 ELISA 试验评估抗囊泡的 IgG 血清反应。没有观察到囊泡诱导的反应和疫苗诱导的反应之间有显著性差异 ($p < 0.05$)。这些结果证实囊泡和疫苗其自身能力的有用性 (图 6)。

[0034] 实施例 4. 用蜗形结构鼻内 (IN) 或胃内 (IG) 免疫的有效性

[0035] 用每只小鼠 100 或 12μg 蛋白分别鼻内 (IN) 或胃内 (IG) 免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。第二剂后，在所示时间从动物抽取血液样品并通过 ELISA 试验评估抗囊泡的 IgG 血清反应。鼻内和胃内接种两种浓度的蜗形结构都诱导了抗外膜囊泡的来自 IgG 的良好反应。这提示通过粘膜接种获得好的全身反应 (图 7)。

[0036] 实施例 5. 用外膜囊泡鼻内免疫 (IN) 的有效性

[0037] 用每只小鼠 12μg 蛋白鼻内 (IN) 免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。第二剂后，在所示时间从动物抽取血液样品并通过 ELISA 试验评估抗囊泡的 IgG 血清反应。通过这个接种方法获得了抗囊泡的良好 IgG 反应提示可以通过鼻内接种获得有价值的全身反应 (图 8)。

[0038] 实施例 6. 鼻内或胃内给予蜗形结构诱导唾液中 IgA 的有效性

[0039] 用每只小鼠 100 或 12μg 蛋白分别鼻内 (IN) 或胃内 (IG) 免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。给予最后一剂后 9 天，从动物抽取唾液样品并通过 ELISA 试验评估抗外膜囊泡的 IgA 反应。使用 IN 方法获得了抗囊泡的 IgA 的显著反应，和使用 IG 方法获得了抗囊泡的较小但是重要的 IgA 增加 (图 9)。

[0040] 实施例 7. 鼻内给予外膜囊泡诱导唾液中 IgA 的有效性

[0041] 用每只小鼠 12μg 蛋白鼻内 (IN) 免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。给予最后一剂后 9 天，从动物抽取唾液样品并通过 ELISA 试验评估抗外膜囊泡的 IgA 反应。使用 IN 方法获得了抗囊泡的 IgA 的显著反应 (图 10)。

[0042] 实施例 8. 用蜗形结构免疫诱导的血清中抗外膜囊泡的反应性 IgG 的亚类

[0043] 鼻内 (IN)、胃内 (IG) 或肌内 (IM) 免疫 Balb/c 小鼠。在 IN 方法的情况下，给予每只小鼠 100μg 蛋白的蜗形结构浓度，而其余情况下使用 12μg 的浓度。所有情况下这些剂隔开 21 天的时间。疫苗 VA-MENGOC-BC® 用作阳性对照，以 12μg 浓度肌内给予。给予第二剂后 21 天，从动物抽取血液样品并通过 ELISA 试验确定血清中存在的 IgG1 和 IgG2a 的滴度。在所考虑的所有情况下 (除了阴性对照情况)，获得 IgG2a 的显著滴度 ($p < 0.05$)。当鼻内给予蜗形结构时，这些处于它们的最高值。这些表明鼻内接种特别有利于细胞 Th1 型抗体 -IgG 的诱导模式 (图 11)。

[0044] 实施例 9. 用外膜囊泡 (OMV) 免疫诱导的血清中 IgG 的亚类

[0045] 每只小鼠 12μg 蛋白的外膜囊泡鼻内 (IN) 和肌内 (IM) 免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。以相同浓度给予疫苗 VA-MENGOC-BC® 作为阳性对照。给予第二剂后 21 天抽取血液样品并通过 ELISA 试验分析血清中存在的抗 OMV 的 IgG1 和 IgG2a 的滴度。在所有考虑的情况下，外膜囊 泡诱导了显著滴度的 IgG2a，表明细胞 Th1 型 IgG 抗体的诱导模式。用阴性 IM 或 IN 对照的情况不是这样。在 IN 接种的情况下观察到模式完全逆转，其中几乎排除了 IgG2a 反应 (图 12)。

[0046] 实施例 10. 从外膜囊泡获得的蜗形结构的抗热和抗酸性

[0047] 通过样品暴露于 60℃的温度下 7 天时间评估蜗形结构的抗热性。通过样品暴露于 pH 值为 1 的介质中 45 分钟时间评估抗酸性。这之后，处理和对照样品用于鼻内接种 Balb/c 小鼠，以每只小鼠 12μg 的浓度，两剂，隔开 14 天。实验开始后 28 天后从小鼠抽取血液样品，血清单独保存在 -20℃，直到使用它们的时候。如可以观察到的，每只动物和组中诱导的抗囊泡 IgG 反应之间没有显著性差异 ($p < 0.5$)。

[0048] 实施例 11. 仅用蜗形结构刺激的 U937 细胞系中 IL12 的产生

[0049] 在补充 50μg/mL 浓度的庆大霉素、L- 谷酰胺 (2mM)、丙酮酸钠 (1mM)、HEPES(15mM) 和 10％胎牛血清 (Sigma) 的 RPMI 1640 中培养 U937 细胞。通过 PMA 处理，这些细胞分化为

巨噬细胞并置于平底 24 孔培养皿中，每孔 5×10^5 个细胞。24 小时后，蜗形结构以 250ng/mL 培养基的浓度添加到它们中。24 小时刺激后，收集存活细胞并通过夹心型 ELISA 试验确定 IL12 的存在。观察到蜗形结构刺激 U937 细胞产生 IL12（图 14）。

[0050] 实施例 12. 仅用外膜囊泡 (OMV) 刺激的 U937 细胞系中 IL12 的产生

[0051] 在补充 50μg/mL 浓度的庆大霉素、L-谷酰胺 (2mM)、丙酮酸钠 (1mM)、HEPES(15mM) 和 10％胎牛血清 (Sigma) 的 RPMI 1640 中培养 U937 细胞。通过 PMA 处理，这些细胞分化为巨噬细胞并置于平底 24 孔培养 皿中，每孔 5×10^5 个细胞。24 小时后，外膜囊泡以 250ng/mL 培养基的浓度添加到它们中。24 小时刺激后，收集存活细胞并通过夹心型 ELISA 试验确定 IL12 的存在。观察到外膜泡刺激造成 U937 细胞产生 IL12（图 15）。

[0052] 实施例 13. 仅用蜗形结构刺激的 J774 鼠巨噬细胞系中一氧化氮的产生

[0053] 在补充 50μg/mL 浓度的庆大霉素、L-谷酰胺 (2mM)、丙酮酸钠 (1mM)、HEPES(15mM) 和 10％预先 56℃灭活 30 分钟的胎牛血清 (Sigma) 的 DMEN 培养基中培养 J774 细胞。它们置于平底 96 孔培养皿中，以每孔 1×10^5 个细胞的浓度，它们在 37℃和 5％ CO2 下培养 24 小时的时间。这之后，贴壁细胞用具有 250ng/mL 浓度的蜗形结构的 200L DMEN 培养。也包括与产生一氧化氮的抑制剂 L-NMMA（以 1μM) 培养的其它变式。24 和 48 小时后收集存活细胞并使用 Greiss' 反应分析氮含量 (Rockett，KA 等 Infect. Immun. 1992,60 :3725-3730)。观察到与蜗形结构培养的细胞显著产生一氧化氮。使用 L-NMMA 抑制该产生（图 16)。

[0054] 实施例 14. 仅用外膜囊泡 (OMV) 刺激的 J774 鼠巨噬细胞系中一氧化氮的产生

[0055] 在补充 50μg/mL 浓度的庆大霉素、L-谷酰胺 (2mM)、丙酮酸钠 (1mM)、HEPES(15mM) 和 10％预先 56℃灭活 30 分钟的胎牛血清 (Sigma) 的 DMEN 培养基中培养 J774 细胞。它们置于平底 96 孔培养皿中，以每孔 1×10^5 个细胞的浓度，它们在 37℃和 5％ CO2 下培养 24 小时的时间。这之后，贴壁细胞用具有 250ng/mL 浓度的外膜囊泡的 200L DMEN 培养。也包括与产生一氧化氮的抑制剂 L-NMMA(1μM) 培养的其它变式。24 和 48 小时后收集存活细胞并使用 Greiss' 反应分析氮含量 (Rockett,KA 等 Infect. Immun. 1992,60 :3725-3730)。观察到与外膜囊泡培养的细胞产生显著的一氧化氮，大于用作对照的 LPS 诱导的一氧化氮。使用 L-NMMA 抑制该产生（图 17)。

[0056] 实施例 15. 蜗形结构对人树突细胞的刺激

[0057] 抽取血液并使用 ficoll 纯化外周单核细胞。在 LPS 或蜗形结构存在下，以每毫升 10×10^{16} 个细胞培养细胞并通过流式细胞计数仪确定树突细胞的活化。如在图 18 中观察到的，树突细胞被活化（通过共刺激分子表达而确定，如 CD40、CD80 和 CD86)，MHC 分子表达增加。这显示了这些结构的佐剂性质。

[0058] 实施例 16. 含有硕大利什曼原虫无鞭毛体 (amastygote) 的蜗形结构免疫的和用相同原生动物生物攻击的 Balb/c 中的硬结减小

[0059] 通过将半纯化抗原包括入蜗形结构形成的第一步而完成来源于硕大利什曼原虫的无鞭毛体的包含。根据总蛋白含量调整使用的洗涤剂量和总蛋白浓度维持在 5-6mg/mL 的范围。囊泡蛋白与包含的新抗原的比率是 12 ： 1。通过光学和电子显微测定法证实蜗形结构的形成。也通过在考马斯蓝着色的聚丙烯酰胺凝胶中电泳证实来自硕大利什曼原虫的蛋白的包含。用 12μg 蜗形结构肌内免疫 Balb/c 小鼠，2 剂隔开 21 天。在左后肢端接种蜗形结构。第二剂后 21 天，在与接种相同的肢端用 3×10^6 个前鞭毛体感染小鼠。前鞭毛体从

DMEN 培养基中固体琼脂 - 血液培养基上生长的培养物的静止期获得。感染后第四周开始，每周刺激损害的体积。用含有硕大利什曼原虫抗原的蜗形结构免疫的组中观察到损害大小明显减小。这证明了这些结构的佐剂特性（图 19）。

[0060] 实施例 17. 含有绿荧光蛋白的质粒 DNA 的包含

[0061] 在 CMV 启动子下含有绿荧光蛋白基因的纯化质粒包含入用于获得蜗形结构的起始溶液，根据实施例 1 中描述的获得所述结构同样的步骤。 质粒与囊泡蛋白的比率调节至 1 ： 100。为了激起它们内部质粒的释放，添加 EDTA 至 2mM，之后在 37℃培养 30 分钟，以 1％浓度的蜗形结构在琼脂糖凝胶中电泳检查质粒的包含。凝胶用乙锭染色并在紫外线下观察。仅在 EDTA 处理后的含有质粒的蜗形结构中检测到质粒的存在。这之后，使用这些结构在 J774 细胞系中进行转染试验。培养 2 小时后，从培养基中清除蜗形结构。24 小时后荧光下对细胞的检查显示存在细胞质中具有荧光信号的很多细胞。

[0062] 实施例 18. 通过外膜囊泡的缀合加强细胞反应

[0063] 脑膜炎奈瑟氏球菌 C 血清组的多糖 (PsC) 与破伤风类毒素 (TT) 或脑膜炎萘瑟氏球菌血清组 B 的外膜囊泡 (OMV) 缀合。给 Balb/c 小鼠腹膜内接种三次（在第 0、14 和 28 天）含有 10μg 组合的 PsC。免疫之前和免疫后 42 天从动物抽取血液样品。确定血清中 IgG 及其亚类的反应。与外膜囊泡缀合的组中发现最强的 IgG2a 反应表明与和破伤风类毒素 (TT) 缀合的组中诱导的相比获得了较好的细胞应答（图 20）。

[0064] 实施例 19. 通过缀合，抗多糖 Vi 抗体反应的加强

[0065] 来自伤寒沙门氏菌的多糖 Vi 与伤寒沙门氏菌的外膜囊泡 (OMV) 缀合。用含有 10μg Vi 的两剂（在第 0 天和 28 天给予）腹膜内免疫 Balb/c 小鼠。接种之前和接种后 42 天从动物抽取血液样品。确定血清中 IgG 及其亚类的反应。该缀合增加和确信了抗 Vi 多糖的反应并检测到由 IgG2a 提供的反应（图 21）。

[0066] 实施例 20. 蜗形结构中包括不同浓度的与病原体相关的分子结构的可能性

[0067] 对来源于脑膜炎奈瑟氏球菌 B 的不同量 LPS 进行与蜗形结构中不同 浓度的病原体相关的分子结构的包含的实验。LPS 浓度与用于小鼠免疫的蛋白浓度的比率是 0.05 ： 12、0.5 ： 12、1 ： 12 和 2 ： 12。通过光学显微术证实蜗形结构的形成，其确定 1 ： 12 的比率作为 LPS 导入而不影响蜗形结构形成的最大比率。更大数量明显地影响结构形成，引起集合体形成。获得的所有变体 (variant) 以两剂给予 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天，每只小鼠 12μg 蛋白。测定抗囊泡 IgG 的滴度。观察到使用不同的变体产生的结果之间没有差异。然而，该实验保证了这些结构中引入不同 LPS 的可能性。（图 22）。

[0068] 实施例 21. 制备蜗形结构的最后一步的建议方法的有效性

[0069] 使用在水浴中，以 20℃，光超声处理 (Tto) 处理 45 分钟的蜗形结构，以及未处理的结构。用 100μg 蛋白每只小鼠鼻内免疫 Balb/c 小鼠，两剂隔开 21 天。给予最后一剂后 9 天，抽取唾液样品并通过 ELISA 试验评估抗外膜囊泡 (OMV) 的 IgG 反应。用该结构处理的那些动物中免疫应答明显较早发生或运作更长一段时间，如图 23 所示。

[0070] 实施例 22. 由肠胃外和粘膜免疫诱导和通过 ELISA 试验评估的血清、唾液和阴道中的抗外膜囊泡的 IgA 反应

[0071] 分别用 2 或 3 剂外膜囊泡 (OMV) 鼻内 (IN) 免疫，3 剂疫苗 VA-MENGOC-BC® 作为对照肌内给予，和使用 IM 和 IN 方法将 1 和 2 剂疫苗的组合给予 Balb/c 小鼠。在 0、21 和

42 天，给予每只小鼠 12μg 蛋白。15 天后取血清和最后一剂后 9 天取唾液和阴道液体。通过 ELISA 试验评估结果。如可以观察到的，鼻内免疫诱导血清水平 IgA 少量增加，而使用 IM 方法用疫苗免疫的不是如此。粘膜反应依赖于剂量数量：两剂不诱导反应，而 3 剂引起抗囊泡 IgA 反应。最后，鼻内给予的 2 剂在接受过肌内给予疫苗刺激（一剂）的动物中证明有效（图 24）。

[0072] 所建议的方案的优点

[0073] 1. 外膜囊泡从活生物提取，在外膜提取过程中允许组分的选择，该外膜构成宿主和病原体之间接触的第一个防御屏障，使得这些组分适于动物和人的保护；

[0074] 2. 提取过程中，可以包括感兴趣的其它蛋白，它们是天然的或重新组合的；

[0075] 3. 从活生物提取的外膜囊泡比人工构建的脂质体更稳定，并可以保持若干月，甚至很多年完整无损，不遭受可以影响未来蜗形结构形成的重大改变。

[0076] 4. 动物和人中诱导的 Th1 细胞反应使得这些佐剂不仅在成人和儿童中有效，而且在母乳哺养期间也有效。

[0077] 5. 形成的蜗形结构具有抗热性，其可以证明对解决与很多疫苗冷藏环节相关的问题有用，通过它们配制作为佐剂或它们从外膜囊泡和蜗形结构开发。

[0078] 6. 形成的蜗形结构抗碱和酸，当考虑口服给予疫苗时要考虑的事情。

[0079] 7. 生产过程中抗原被引入该结构，使得最终产品具有抗热、抗酸和抗碱性；

[0080] 8. 可以包括的抗原的多变性，该抗原是可溶的或微粒，包括核酸，允许很多疫苗的制备，包括复合疫苗。

[0081] 9. 该蜗形结构含有与病原体相关的分子结构，和为了增加其佐剂和免疫有效性可以随意引入的其它物质；允许我们降低一些结构的潜在毒性并因此降低它们的炎性作用；

[0082] 10. 该蜗形结构诱导体内更早、更强和时间较长的反应；

[0083] 11. 该蜗形结构在体外诱导在诱导细胞免疫应签模式的细胞分裂素水平的更好反应；

[0084] 12. 该结构保持人工蜗形的性质（疏水性抗原的有效引入、缓慢展开系统、作为主要矿物质的钙含量、脂质氧化减少、冷冻干燥等等）。但是它在免疫原性上优越于人工蜗形，因为它包含与病原体相关的分子结构，和其诱导 Th1 模式，包括 T 细胞毒性反应的能力优越于人工蜗形，和避免了使用来源于动物血清的脂质和胆固醇。

[0085] 附图简述

[0086] 图 1Gould Fogerite 等 1997 年 7 月 1 日申请的美国专利 5,643,574 中描述的制备蜗形的方法。

[0087] 图 2. 获得蜗形结构的简化方法 - 本发明的目的。

[0088] 图 3. 蜗形结构的电子显微镜检查。

[0089] 图 4.A：外膜囊泡中存在的蛋白在考马斯蓝着色的 12.5％丙烯酰胺凝胶中电泳。B：外膜囊泡和蜗形结构中存在的蛋白的 Western 印迹，使用高滴度的抗外膜囊泡的反应性抗体的人血清。

[0090] 图 5. 用 VA-MENGOC-BC® 或蜗形结构肠胃外免疫的小鼠中的抗外膜囊泡的 IgG 血清反应，用 ELISA 试验评估。

[0091] 图 6. 用 VA-MENGOC-BC® 或外膜囊泡肌内免疫的小鼠中的抗外膜囊泡的 IgG 血清反应，用 ELISA 试验评估。

[0092] 图 7. 用外膜囊泡胃内 (IG) 或鼻内 (IN) 免疫的小鼠中的抗外膜囊泡的 IgG 血清反应，用 ELISA 试验评估。

[0093] 图 8. 用外膜囊泡鼻内 (IN) 免疫的小鼠中的抗外膜囊泡的 IgG 血清反应，用 ELISA 试验评估。

[0094] 图 9. 用蜗形结构胃内或鼻内免疫的小鼠唾液中的抗外膜囊泡的 IgA 反应，用 ELISA 试验评估。

[0095] 图 10. 用外膜囊泡鼻内免疫的小鼠唾液中的抗外膜囊泡的 IgA 反应，用 ELISA 试验评估。

[0096] 图 11. 用蜗形结构免疫的动物中抗外膜囊泡的反应性 IgG 亚类的结果，用 ELISA 试验评估。

[0097] 图 12. 用外膜囊泡免疫的动物中抗外膜囊泡的反应性 IgG 亚类的结果，用 ELISA 试验评估。

[0098] 图 13. 该蜗形结构的抗热和抗酸性结果，用 ELISA 试验评估。

[0099] 图 14. 用蜗形结构刺激的 U937 细胞产生 IL12 的评估。

[0100] 图 15. 用来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜囊泡刺激的 U937 细胞产 生 IL12 的评估。

[0101] 图 16. 与蜗形结构培养的 J774 细胞产生一氧化氮。

[0102] 图 17. 与来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜囊泡培养的 J774 细胞产生一氧化氮。

[0103] 图 18. 蜗形结构对人树突细胞的刺激。

[0104] 图 19. 用含有无鞭毛体的蜗形结构免疫和用硕大利什曼原虫攻击的动物中硬结的结果。

[0105] 图 20. 多糖与脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜囊泡的缀合的佐剂作用结果。

[0106] 图 21. 多糖与伤寒沙门氏菌的外膜囊泡的缀合的佐剂作用结果。

[0107] 图 22. 引入与病原体相关的分子结构的结果。

[0108] 图 23. 超声处理对蜗形结构诱导的反应的影响结果。

[0109] 图 24. 初始肌内刺激后 IN 接种后粘膜反应加强的结果。

[0110] 图 25. 蜗形结构影响 (potenciates)IgG 抗 -OMV 反应的动力学 (AFCo1)。在用 OMV、AFCo1 或 VA-MENGOC-BC™ 疫苗肌内免疫的小鼠的血清中测定抗 OMV IgG 应答。AFCo1 诱导明显高和持久的 IgG 应答。

[0111] 图 26.DC 可以另工来自包含于包膜囊泡 (OMV) 中的 OVA(OMV-Ova) 的 OVA 肽用于 MHC-II 提呈。与 OMV-Ova 共温育的 OT4HT 杂交瘤细胞的 IL-2 产生通过 IL-2 依赖的 CTLL 细胞系的 [^{3}H] 胸苷掺入来定量。数据表示为三次实验平均值 +SD。

[0112] * 明显不同于其它组。

[0113] 图 27. 用 OMV-Ova 免疫的小鼠中的 IgG 抗 Ova 应答。用 5mg/ml 的 OMV-Ova、磷酸盐缓冲液或 Titemax-Ova 乳液（阳性对照）免疫 C3H/HeN 小鼠两次，第一次免疫后 21 天收集血清，并用 ELISA 检测。数据显示每组 5 只小鼠的平均 IgG 浓度 ± 标准差，代表三次不同试验。

[0114] 图 28 用 OMV-Ova 免疫的小鼠中的 IgG 抗 Ova 亚类应答。用 5mg/ml 的 OMV-Ova、磷酸盐缓冲液或 Titemax-Ova 乳液（阳性对照）免疫 C3H/HeN 小鼠两次，第一次免疫后 21 天收集血清，并用 ELISA 检测。数据显示每组 5 只小鼠混合血清中 IgG1 和 IgG2a 的滴度，代表三次不同试验。

[0115] 图 29 用 ELISA 评估的肌内免疫的动物中诱导的抗丙型肝炎病毒 (VHC) 核心蛋白的 IgG 应答。在通过肌内途径免疫三次 (0,3 和 7 周）的动物的血清中确定抗核心蛋白 IgG，并在最后一次后 2 周收集样品，表明了在 AFCo1 中的两种抗原（核心和衣壳蛋白）的结合诱导明显高的应答。

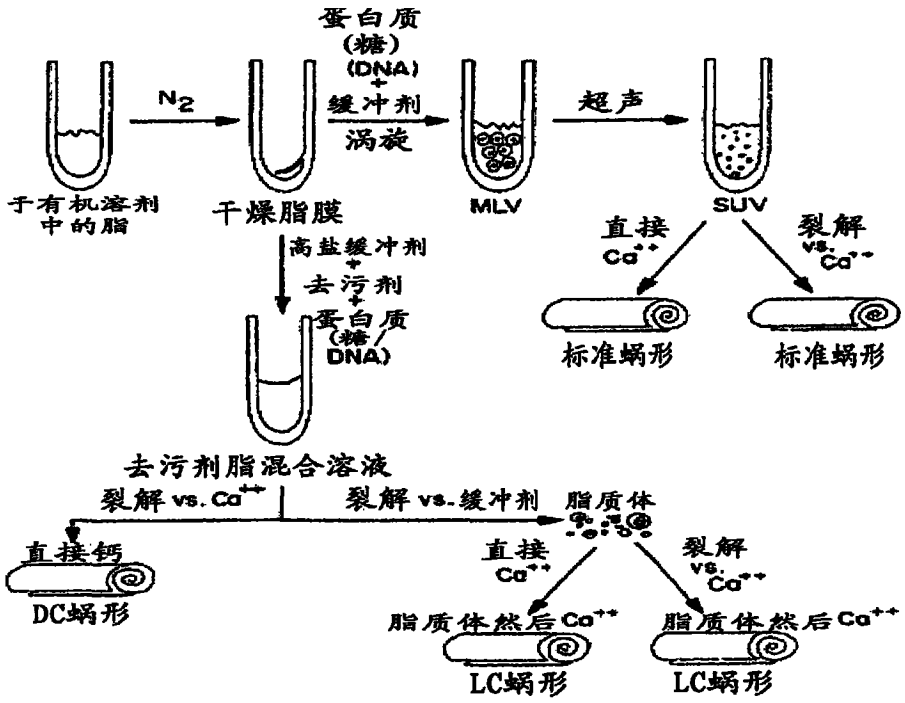

蛋白质
(糖)
(DNA)
+
缓冲剂
涡旋
N2
超声
于有机溶剂
中的脂
干燥脂膜
MLV
SUV
直接
Ca++
裂解
vs.
Ca++
标准蜗形
标准蜗形
高盐缓冲剂
+
去污剂
+
蛋白质
(糖
DNA)
去污剂脂混合溶液
裂解 vs. Ca++
裂解 vs.缓冲剂
脂质体
直接钙
DC蜗形
直接
Ca++
裂解
vs.
Ca++
脂质体然后Ca++
脂质体然后Ca++
LC蜗形
LC蜗形

图 1

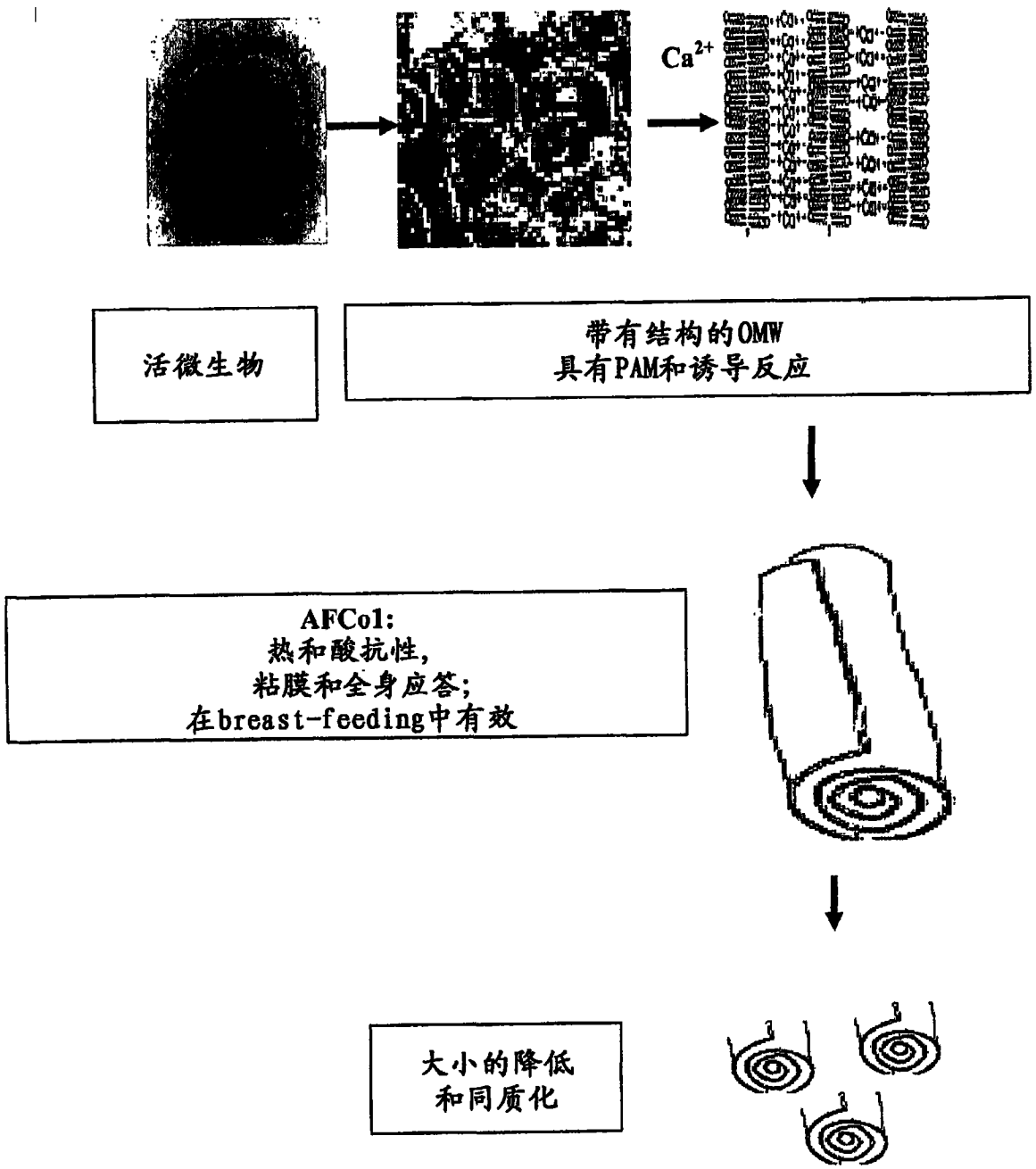

Ca2+
活微生物
带有结构的OMW
具有PAM和诱导反应
AFCol:
热和酸抗性,
粘膜和全身应答;
在breast-feeding中有效
大小的降低
和同质化

图 2

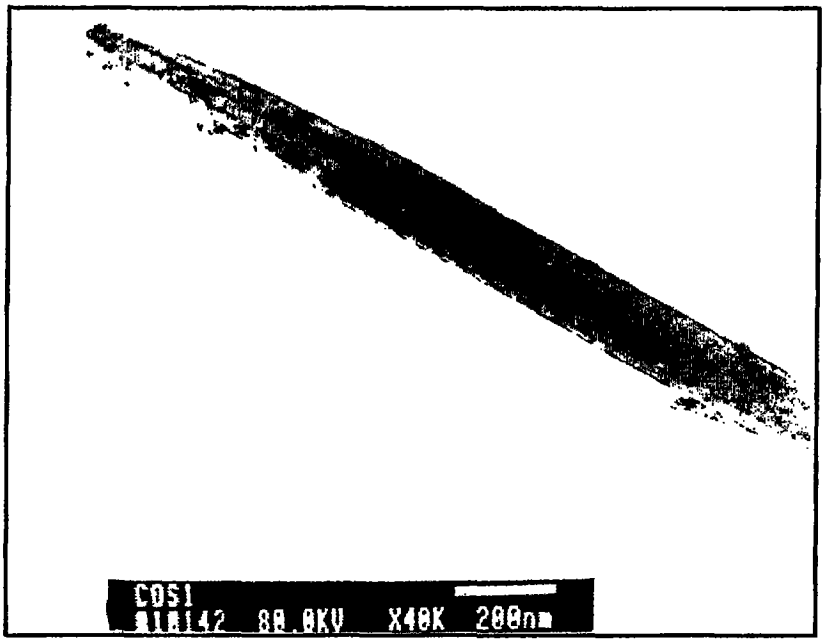
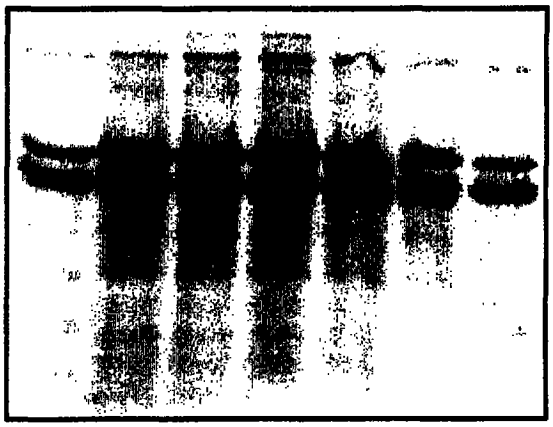


图 3

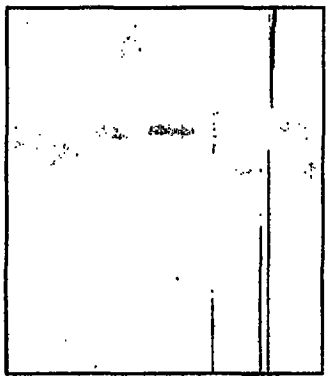
A



1 2 3 4 5 6 7

A: SDS-PAGE
1,5和7外膜囊泡
2-4和6蜗形

B



1 2 3 4 5

B: Western印迹,在针对脑膜炎奈瑟氏球菌B蛋白反应性的IgG的高滴度血清中的蛋白识别。
蜗形结构(1和5:外膜囊泡,2-4蜗形结构)。

图 4

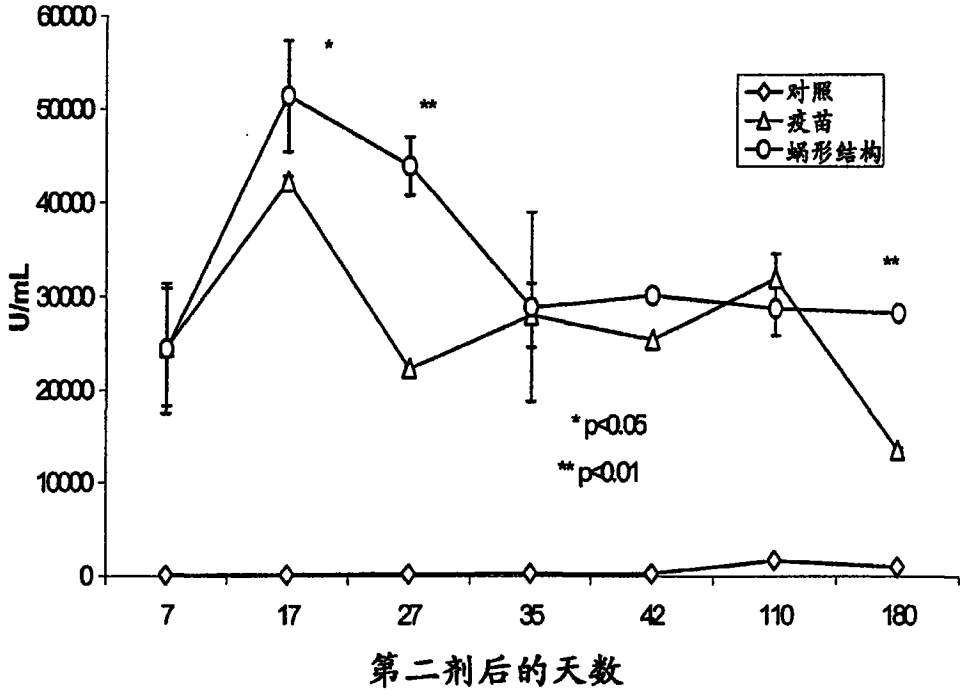

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
U/mL
*
**
**
对照
疫苗
蜗形结构
*p<0.05
**p<0.01
7
17
27
35
42
110
180
第二剂后的天数

图 5

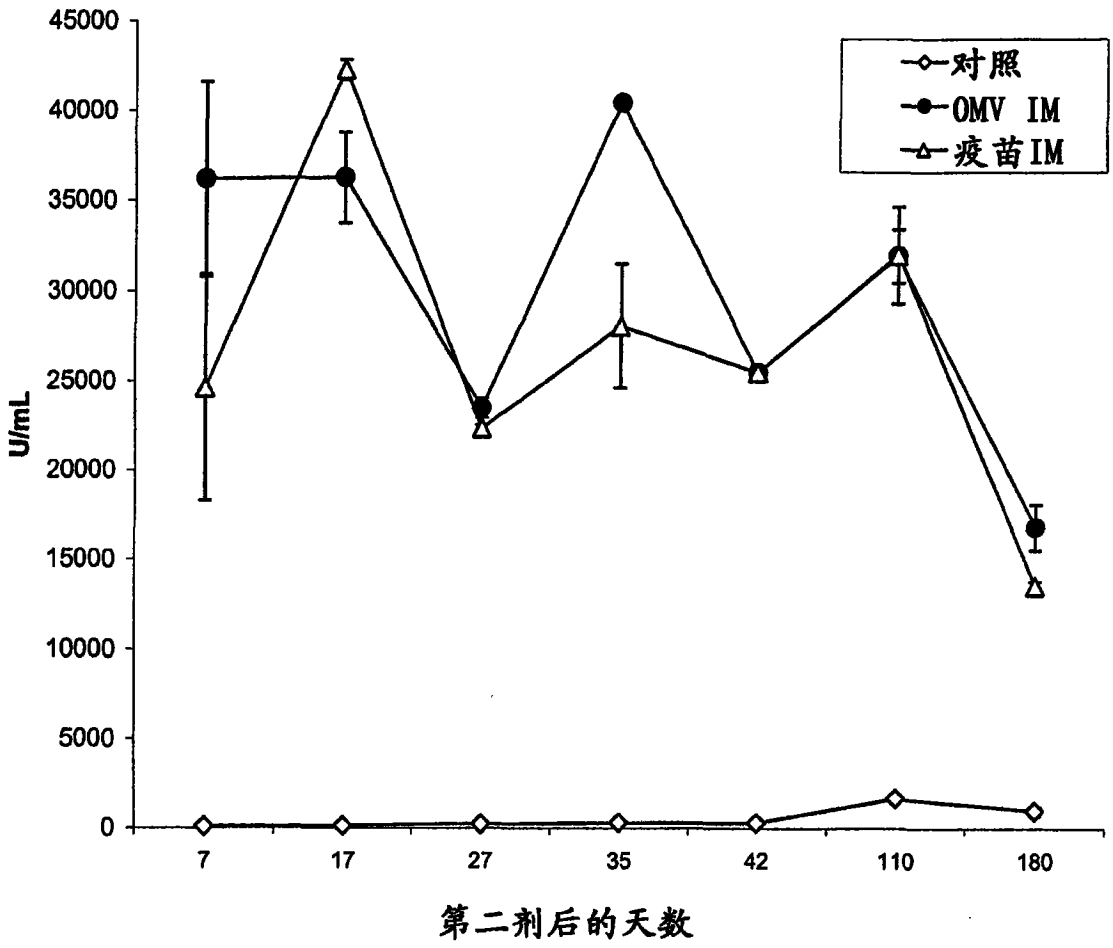

45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
U/mL
7
17
27
35
42
110
180
第二剂后的天数
对照
OMV IM
疫苗IM

图 6

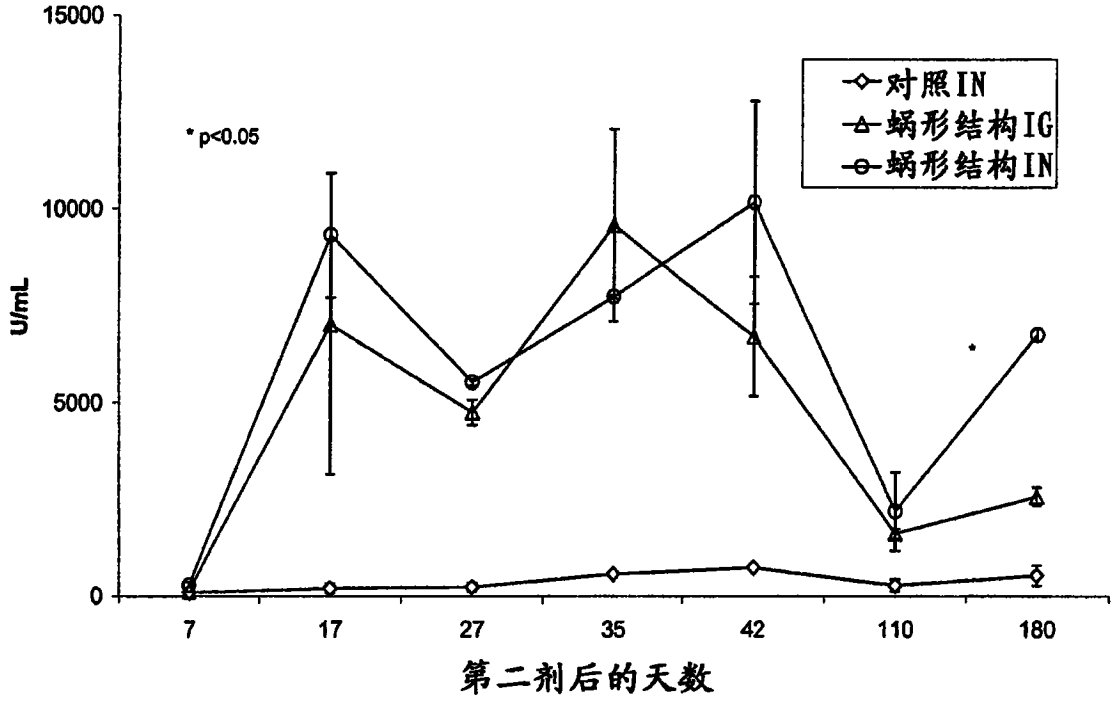

15000
10000
5000
0
U/mL
* p<0.05
对照IN
蜗形结构IG
蜗形结构IN
7
17
27
35
42
110
180
第二剂后的天数

图 7

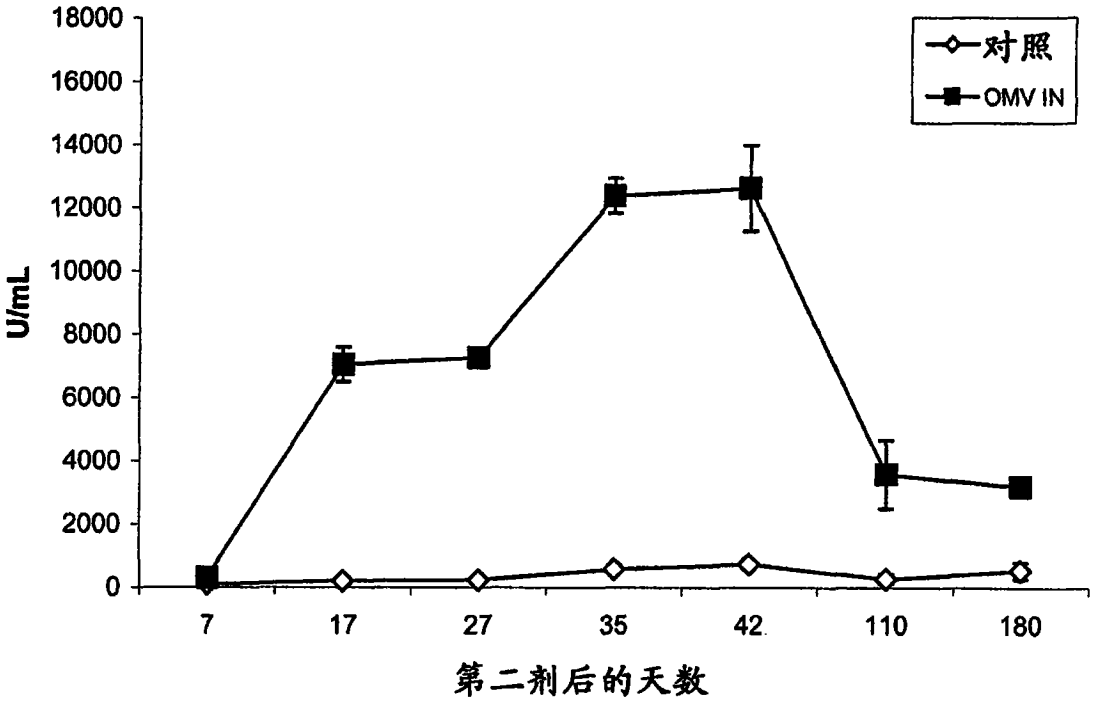

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
U/mL
对照
OMV IN
7
17
27
35
42
110
180
第二剂后的天数

图 8

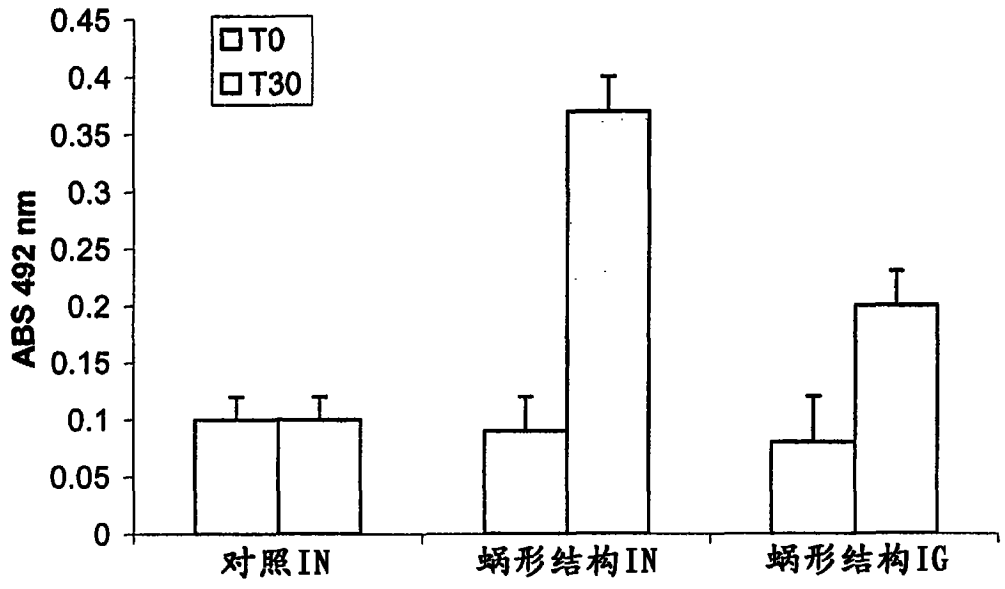

0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
ABS 492 nm
T0
T30
对照IN
蜗形结构IN
蜗形结构IG

图 9

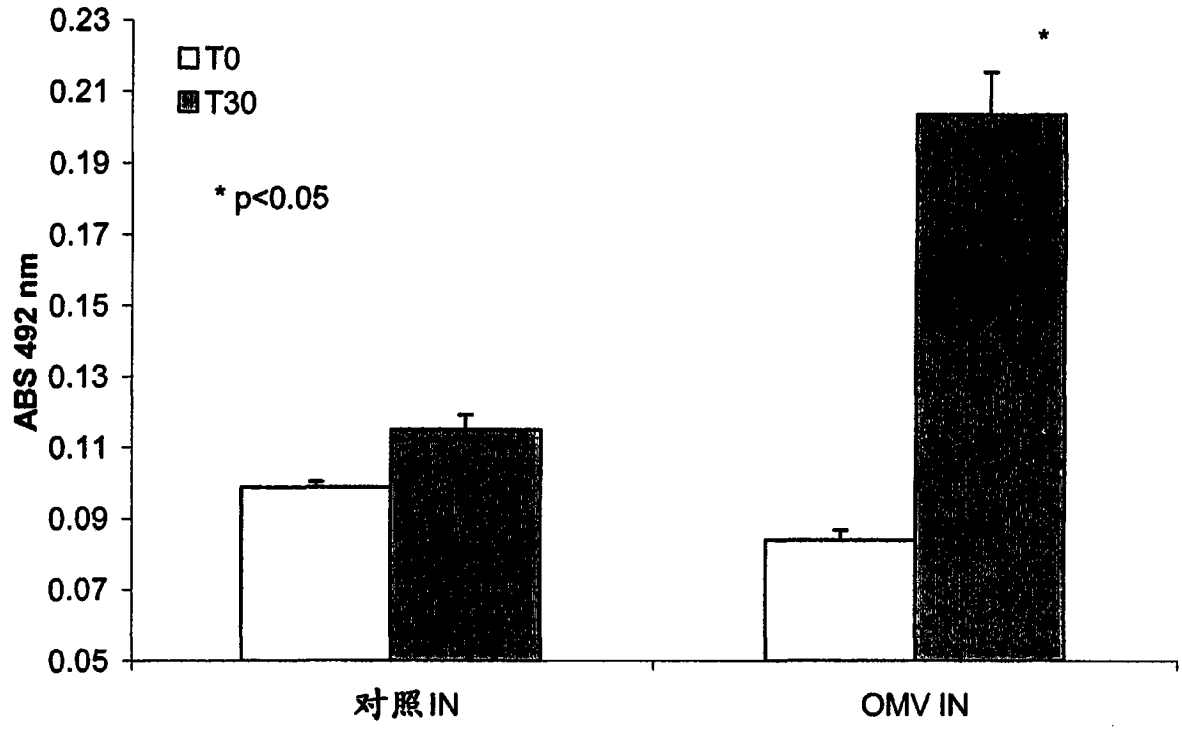

0.23
0.21
0.19
0.17
0.15
0.13
0.11
0.09
0.07
0.05
ABS 492 nm
T0
T30
* p<0.05
*
对照 IN
OMV IN

图 10

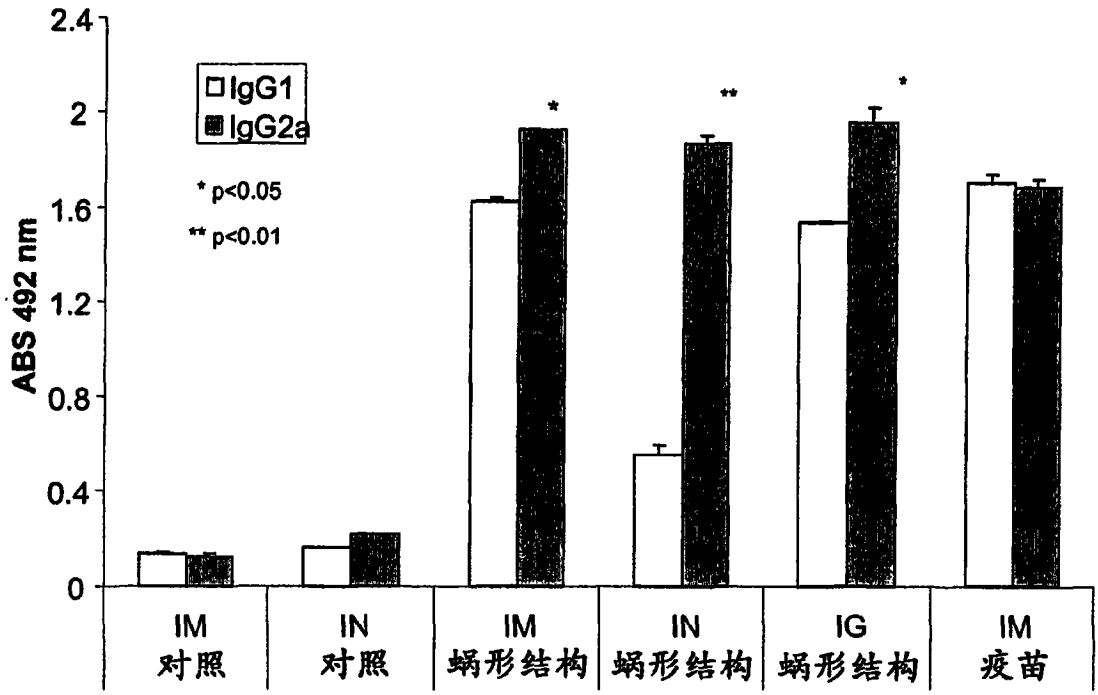

2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
ABS 492 nm
IgG1
IgG2a
* p<0.05
** p<0.01
*
**
*
IM
对照
IN
对照
IM
蜗形结构
IN
蜗形结构
IG
蜗形结构
IM
疫苗

图 11

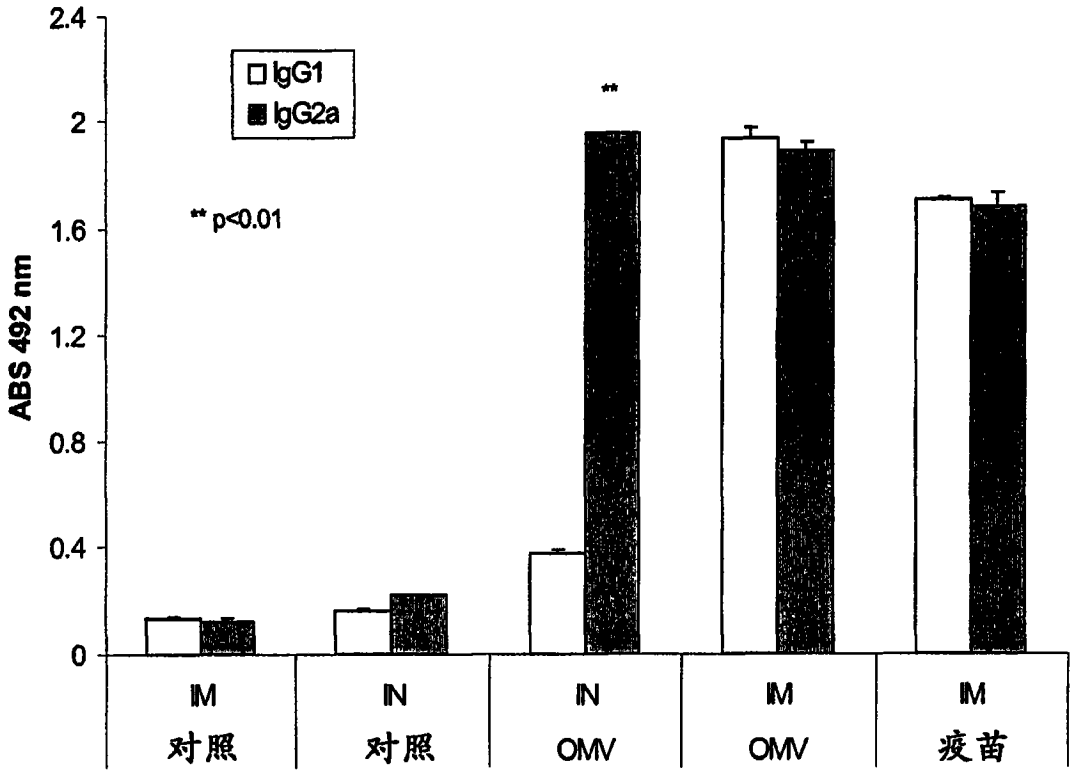

2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
ABS 492 nm
IgG1
IgG2a
** p<0.01
**
IM
对照
IN
对照
IN
OMV
IM
OMV
IM
疫苗

图 12

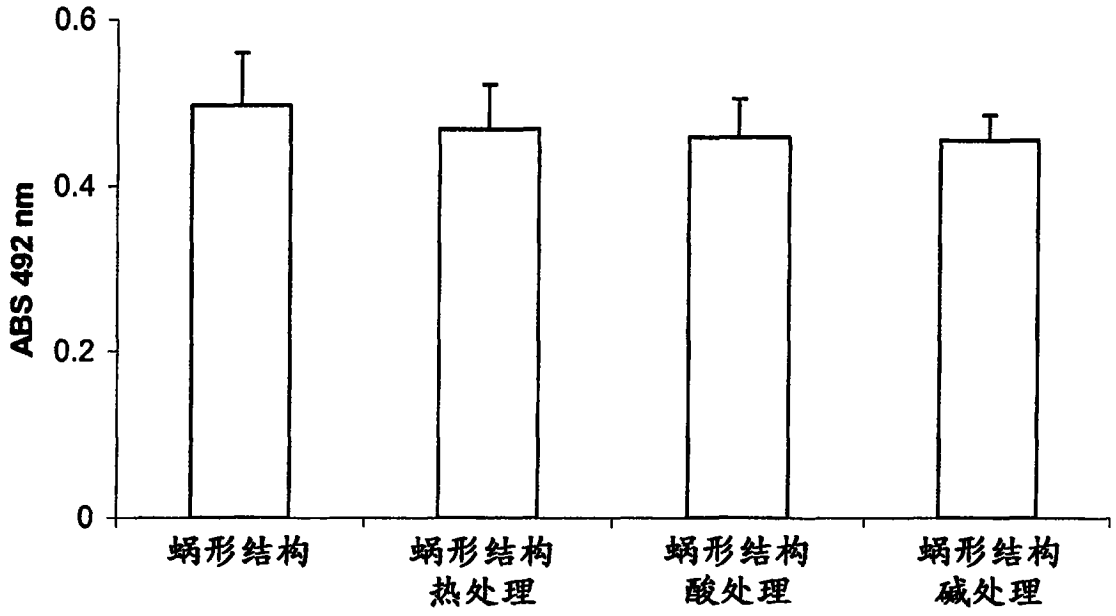

0.6
0.4
0.2
0
ABS 492 nm
蜗形结构
蜗形结构
热处理
蜗形结构
酸处理
蜗形结构
碱处理

图 13

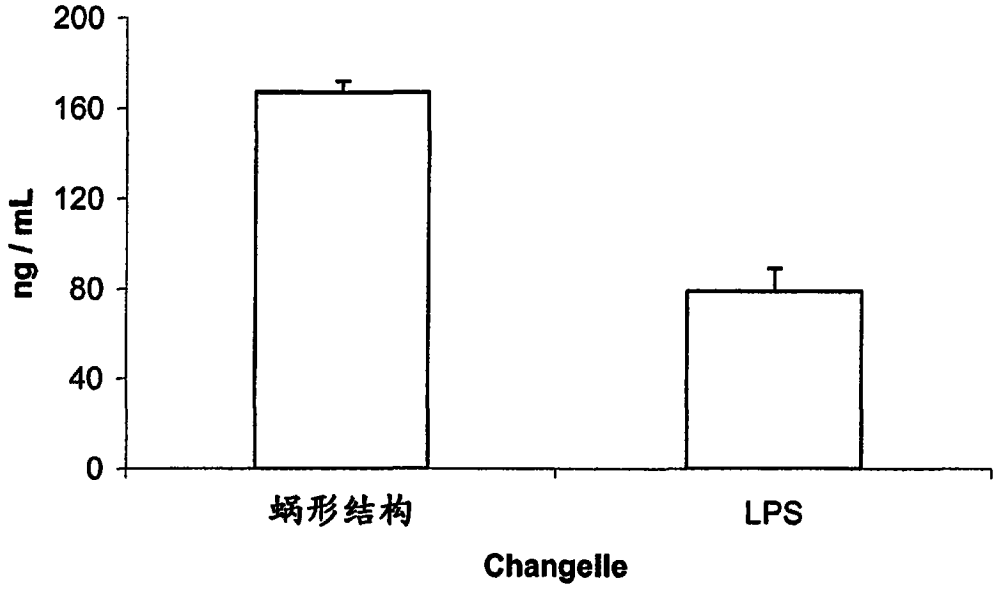

200
160
120
80
40
0
ng / mL
蜗形结构
LPS
Changelle

图 14

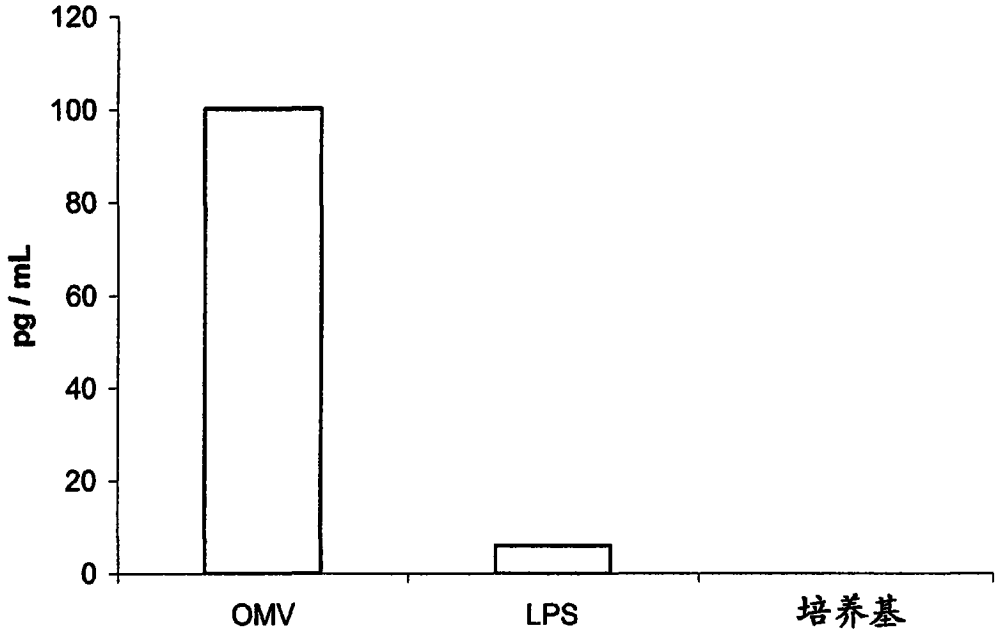

120
100
80
60
40
20
0
pg / mL
OMV
LPS
培养基

图 15

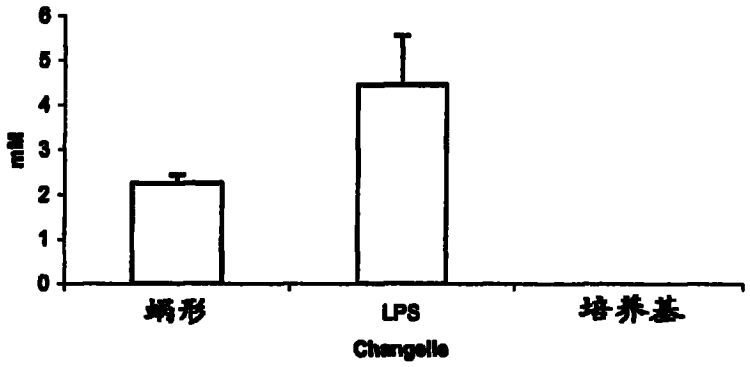

6
5
4
3
2
1
0
蜗形
LPS
培养基
Changeile

图 16

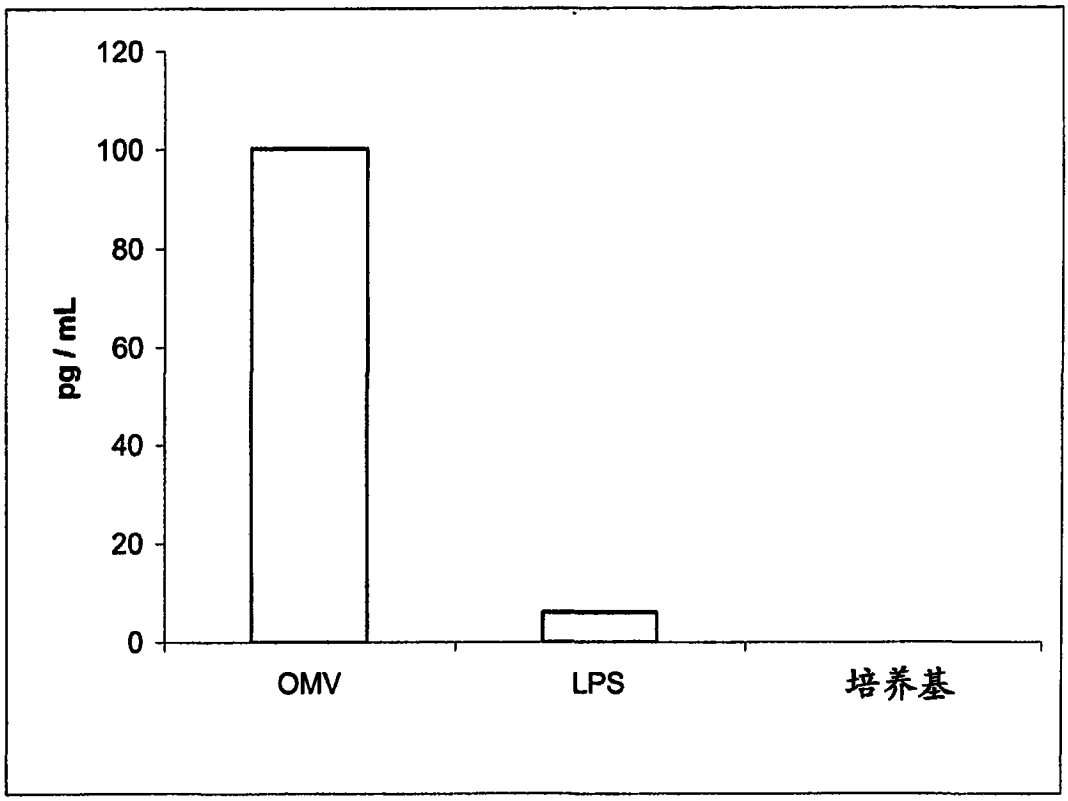


图 17

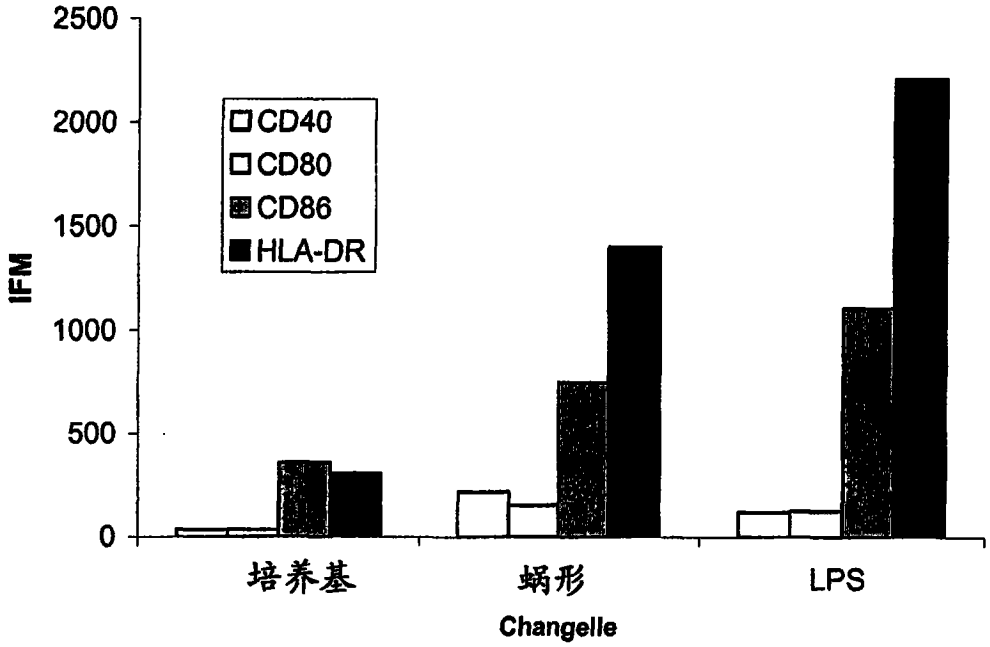

2500
2000
1500
1000
500
0
IFM
CD40
CD80
CD86
HLA-DR
培养基
蜗形
LPS
Changelle

图 18

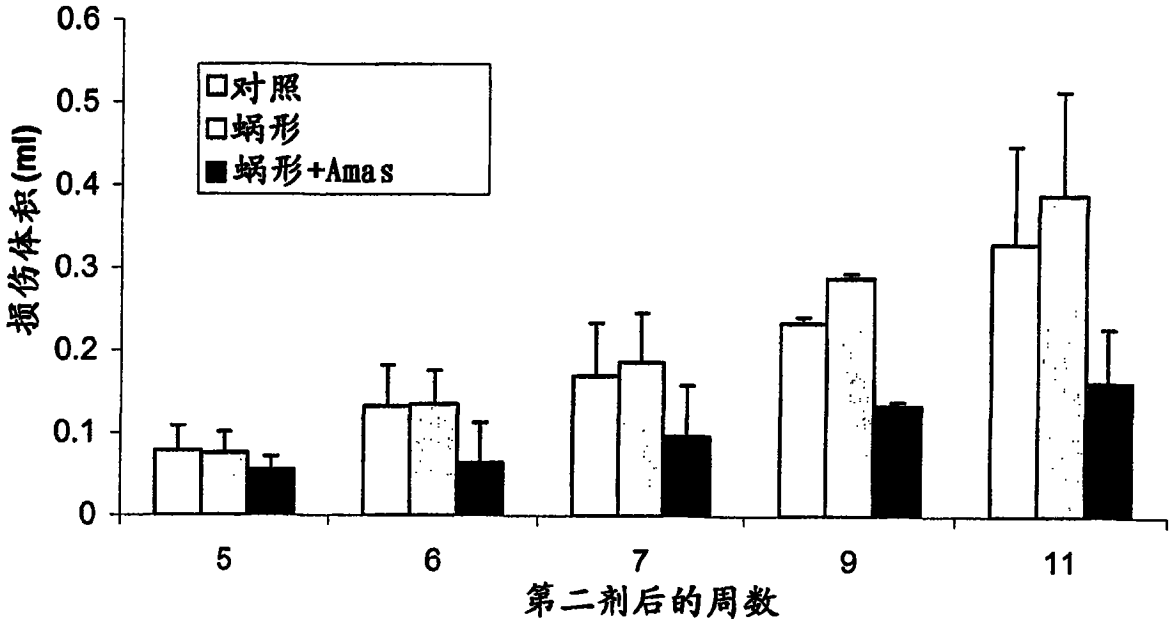

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
损伤体积(ml)
对照
蜗形
蜗形+Amas
5
6
7
9
11
第二剂后的周数

图 19

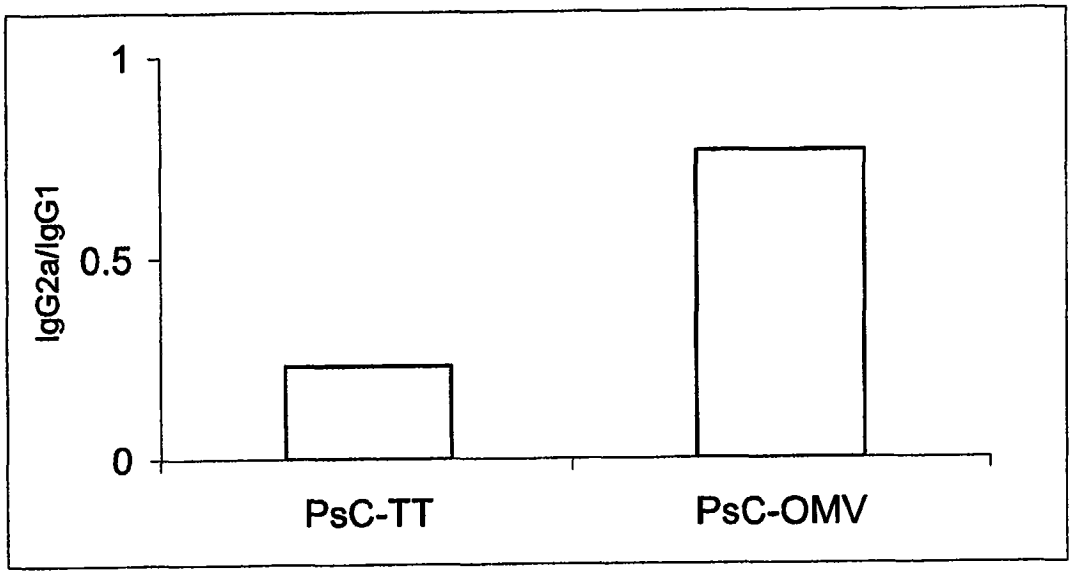

1
0.5
0
IgG2a/IgG1
PsC-TT
PsC-OMV

图 20

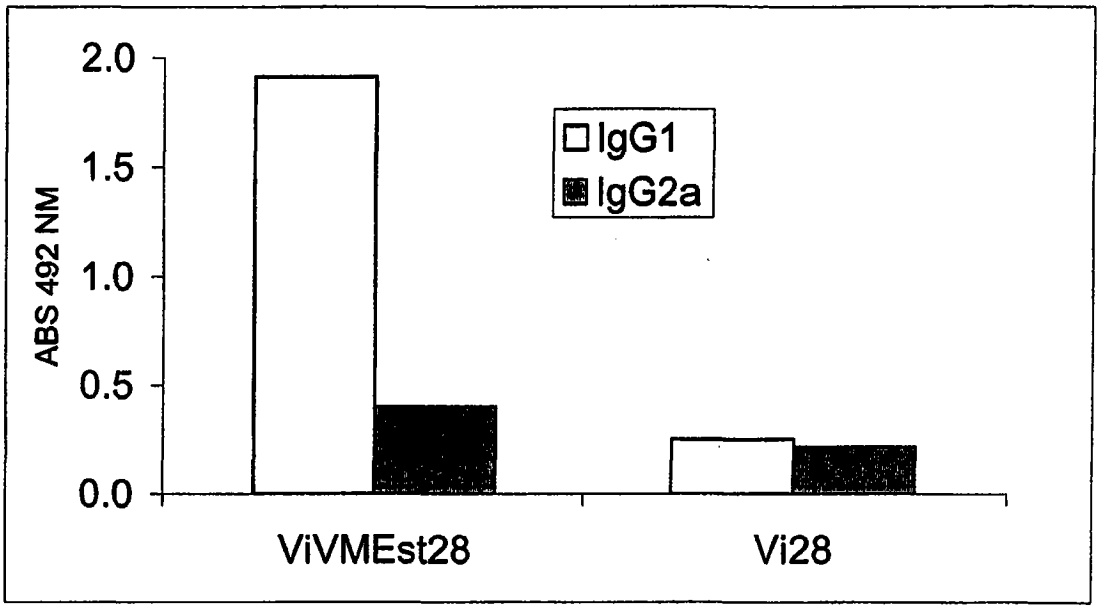

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ABS 492 NM
IgG1
IgG2a
ViVMEst28
Vi28

图 21

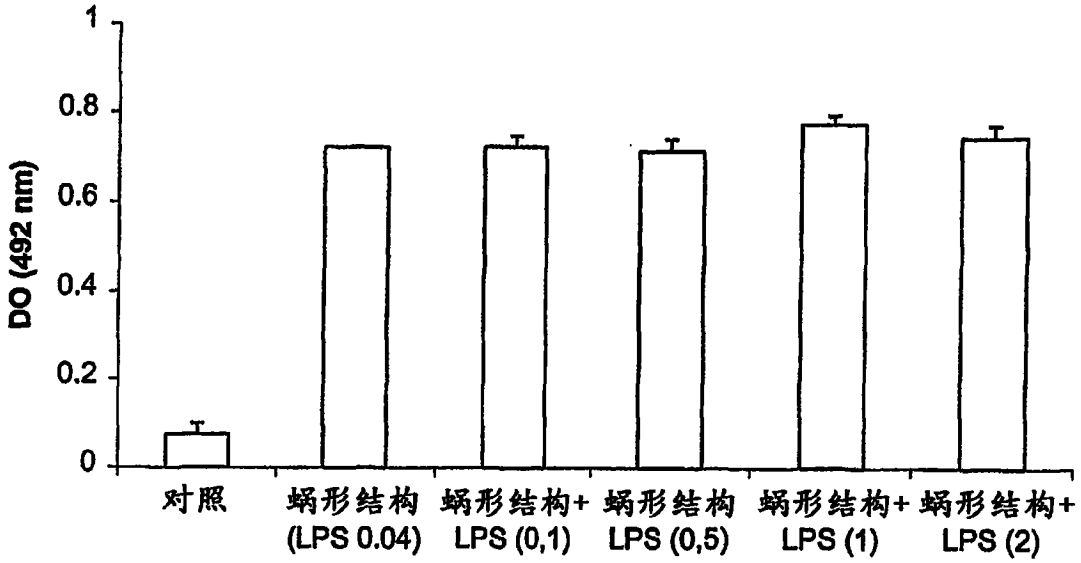

DO (492 nm)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照
蜗形结构 (LPS 0.04)
蜗形结构+ LPS (0,1)
蜗形结构 LPS (0,5)
蜗形结构+ LPS (1)
蜗形结构+ LPS (2)

图 22

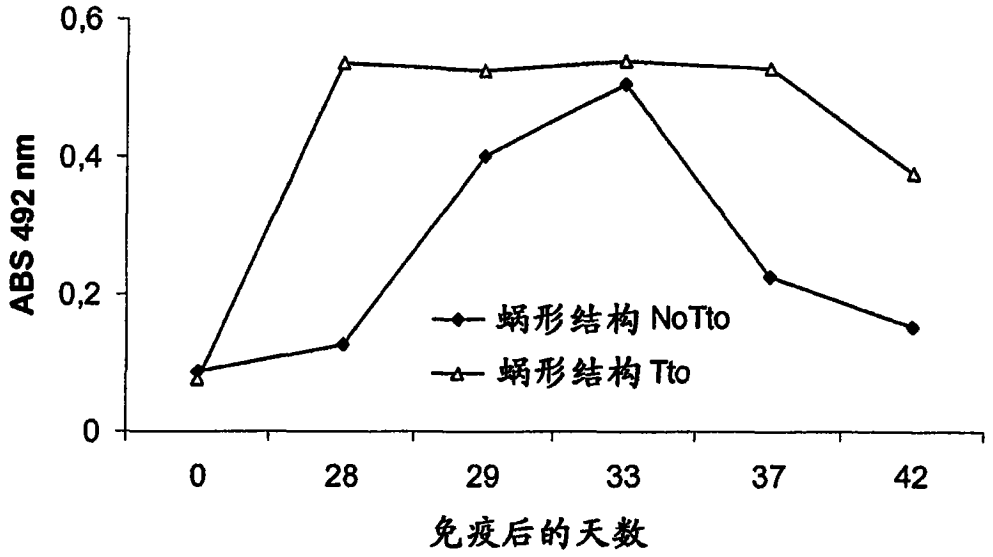

ABS 492 nm
0,6
0,4
0,2
0
蜗形结构 NoTto
蜗形结构 Tto
0
28
29
33
37
42
免疫后的天数

图 23

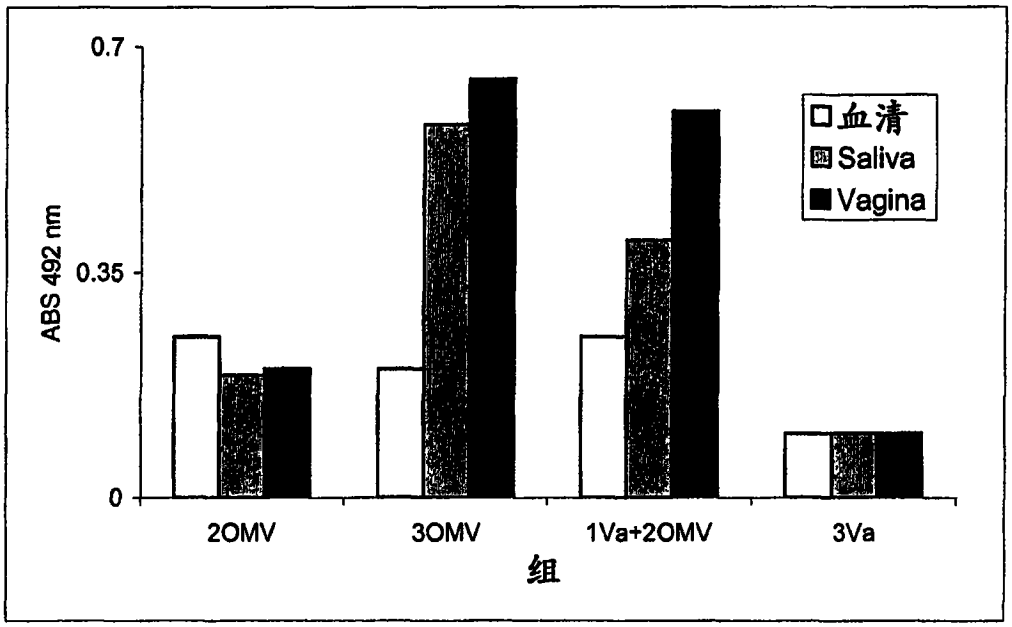

0.7
0.35
0
ABS 492 nm
血清
Saliva
Vagina
2OMV
3OMV
1Va+2OMV
3Va
组

图 24

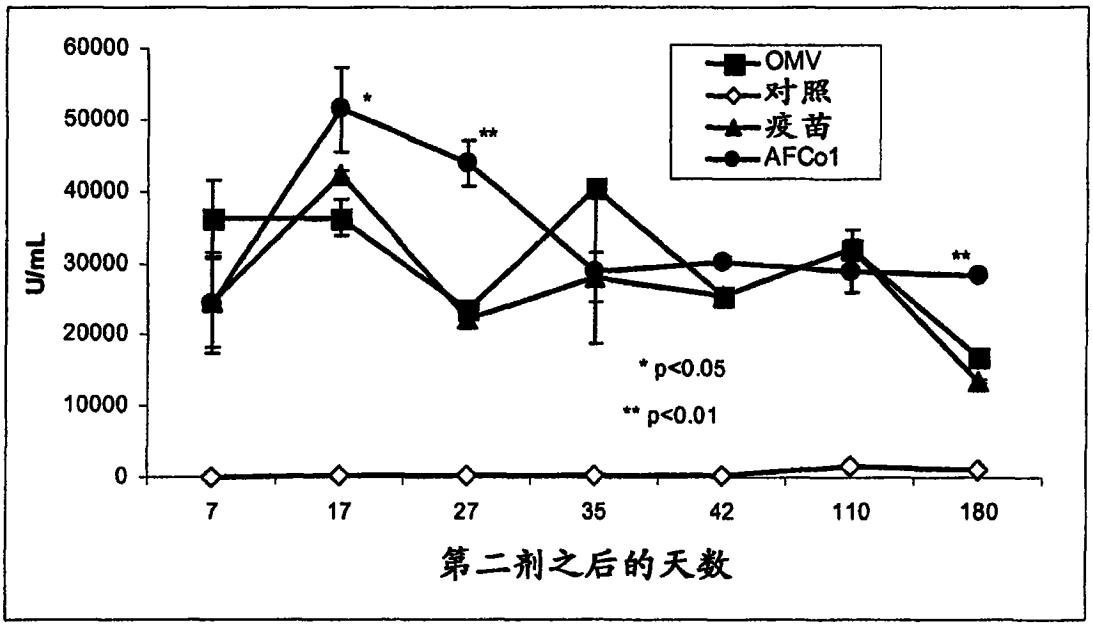

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
U/mL
OMV
对照
疫苗
AFCo1
*
**
**
* p<0.05
** p<0.01
7
17
27
35
42
110
180
第二剂之后的天数

图 25

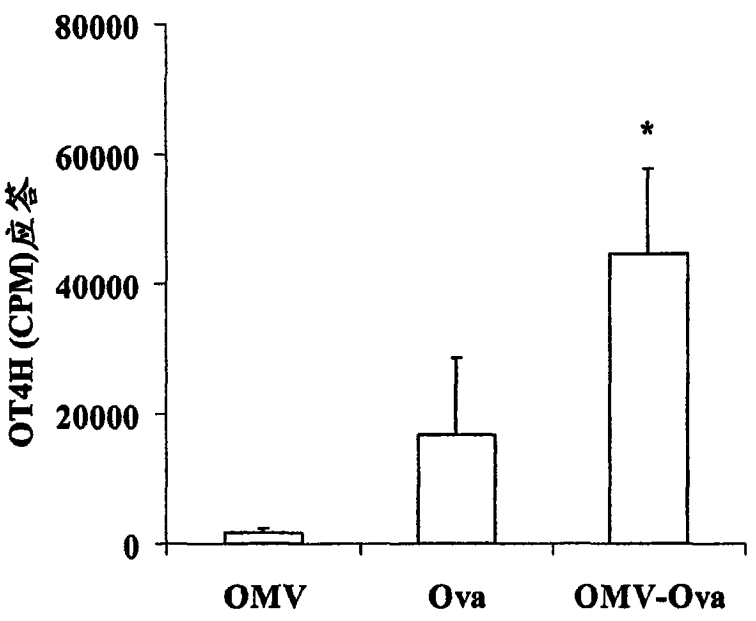

80000
60000
40000
20000
0
OT4H (CPM)应答
*
OMV
Ova
OMV-Ova

图 26

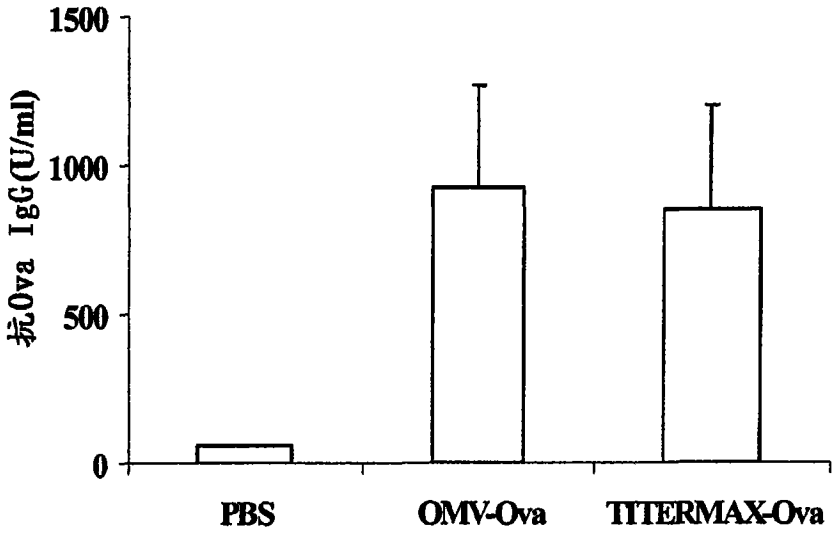

1500
1000
500
0
抗Ova IgG(U/ml)
PBS
OMV-Ova
TITERMAX-Ova

图 27

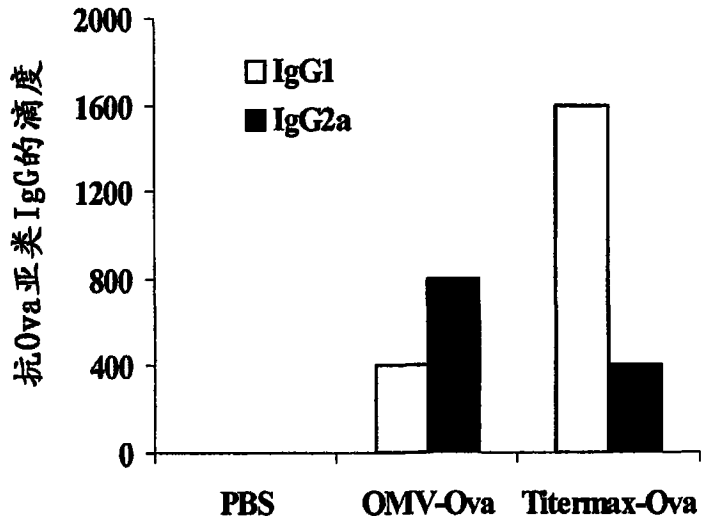

抗Ova亚类IgG的滴度
2000
1600
1200
800
400
0
IgG1
IgG2a
PBS
OMV-Ova
Titermax-Ova

图 28

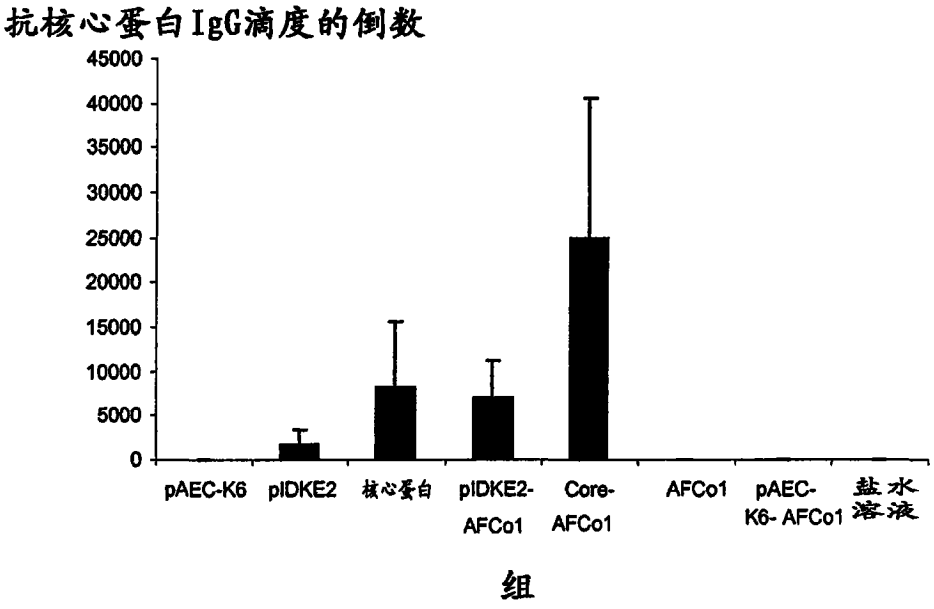

抗核心蛋白IgG滴度的倒数
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
pAEC-K6
pIDKE2
核心蛋白
pIDKE2-AFCo1
Core-AFCo1
AFCo1
pAEC-K6-AFCo1
盐水溶液
组

图 29