

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03110738.9

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

C12N 15/51 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100528238C

[22] 申请日 2003.2.28 [21] 申请号 03110738.9

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 28 [33] US [31] 60/359945

[73] 专利权人 香港大学

地址 中国香港

[72] 发明人 吴文翰 袁国勇 郑伯建

[56] 参考文献

CN1316518A 2001.10.10

审查员 赵彦豪

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 52 页 附图 19 页

[54] 发明名称

用于治疗乙型肝炎病毒慢性感染的口服 DNA 组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种用于改善与乙型肝炎病毒 (HBV) 慢性感染相关的受损免疫力并在一个延长的期限内抑制转基因的表达的口服 DNA 组合物, 该组合物包含一种优先以肠粘膜吞噬细胞为靶的减毒株细菌细胞, 用来运送质粒载体, 该质粒载体携带了编码至少一部分乙型肝炎病毒蛋白或肽的一个或多个基因或其互补 DNA。经口服给予, 在进入被感染的宿主细胞以后, 所述 DNA 组合物会通过细菌细胞的自溶以及质粒的释放在肠道内造成一个短暂的、自限性的感染。质粒中含有的启动子保证 HBV 基因在真核环境中表达, 所表达的病毒产物有助于增强细胞介导的免疫, 从而清除感染并逆转 HBV 慢性感染所特有的免疫耐受状态。

1. 一种口服 DNA 组合物，用于改善与 HBV 慢性感染相关的受损免疫力并在一个延长的期限内抑制转基因的表达，该组合物包含：

一种优先以吞噬细胞为靶的细菌减毒株和一种药学上可接受的载体，其中细菌菌株的细胞被一种质粒载体转化，该质粒载体包含：

编码至少一部分乙型肝炎病毒蛋白或肽或其抗原部分的一个或多个基因或其互补 DNA；

一个可操作性连接于基因或互补 DNA 以使其在真核环境中表达的启动子；和，

一种营养缺陷型突变，该突变导致细菌菌株的细胞一旦进入吞噬细胞就会自溶。

2. 权利要求 1 所述的口服 DNA 组合物，其中的吞噬细胞是肠粘膜吞噬细胞。

3. 权利要求 1 所述的口服 DNA 组合物，其中的吞噬细胞包括因感染反应而募集的炎症细胞。

4. 权利要求 1 所述的口服 DNA 组合物，其中的细菌减毒株选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株 S7207 或减毒的伤寒沙门氏菌菌株 Ty21a。

5. 一种优先以吞噬细胞为靶的细菌减毒株在制备用于在慢性感染的 HBV 携带者中诱导细胞介导的免疫应答的药物中的用途，

其中的细菌菌株为缺陷型突变株，该突变导致细菌菌株一旦进入吞噬细胞就会自溶，并将所携带的质粒载体释放在细胞内，该质粒载体能够在真核环境中表达至少一部分 HBV 基因组。

6. 根据权利要求 5 所述的用途，其中的吞噬细胞是肠粘膜吞噬细胞。

7. 根据权利要求 5 所述的用途，其中的吞噬细胞包括因感染反应而募集的炎症细胞。

8. 根据权利要求 5 所述的用途，其中的细菌减毒株选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株 S7207 或减毒的伤寒沙门氏菌菌株 Ty21a。

9. 根据权利要求 5 所述的用途，其中被减毒细菌株释放到细胞内的质

粒载体包含：

 编码至少一部分乙型肝炎病毒蛋白或肽或其抗原部分的一个或多个基因或其互补 DNA；

 一个可操作性连接于病毒基因或互补 DNA，以使其在真核细胞内环境中表达的启动子；和

 一种营养缺陷型突变，该突变导致细菌菌株的细胞一旦进入吞噬细胞就会自溶。

用于治疗乙型肝炎病毒慢性感染的口服DNA组合物

技术领域

本发明涉及一种改善乙型肝炎病毒（HBV）慢性感染个体的受损免疫力的口服DNA组合物（ODV）。该口服DNA组合物可以用于抗HBV的加强免疫，改善由此病引起的免疫缺陷，并清除感染。

背景技术

据世界卫生组织(WHO)估计全世界有350,000,000人为乙型肝炎病毒的慢性感染者[1]。这些个体非常容易患肝硬化和肝癌。另外，这些个体除了自身作为HBV的重要携带者外，也对公众健康构成了很大的威胁。现有的慢性HBV感染的治疗方法中还没有能够从患者中清除病毒的，而仅仅是在降低病毒复制方面有一定效果[4-5]。

HBV感染可以通过免疫干涉予以清除的想法是建立在这样一个发现的基础上，即急性自限性HBV感染引发多克隆T型辅助细胞（Th）和细胞毒性T淋巴细胞（CTL）对病毒衣壳及被膜抗原的强烈免疫应答，从而清除身体内的病毒。在另一方面，慢性HBV感染常伴随着具有有限抗病毒特异性范围的弱Th细胞应答，且通常检测不到病毒特异性的CTL细胞活性[6]。这些发现表明未受攻击的细胞所介导的免疫是清除病毒的主要决定因素，并为用加强细胞介导的抗病毒免疫性（CMI）以清除感染的观点来免疫干涉慢性HBV感染提供了合理的依据[7]。这一理念进一步被骨髓移植中的发现所证实，即供体骨髓细胞的继承性转移可改善慢性病毒感染的受体的免疫缺陷从而消除感染[8]，其中的供体具有由于先天感染而获得的抗病毒完全免疫性。

在此基础上，用于治疗慢性肝炎的备选疫苗、或其它免疫干预手段开始被选择用来测试其在小鼠中引发强烈CMI的能力，并进一步在含有部分或全部HBV基因组的转基因小鼠中进行测试。在胚胎阶段病毒转基因的表达明显的在这些动物体内诱发了一种免疫耐受状态，这与慢性感染的人类中所常见的情形类似[9]。因为没有动物能够被慢性感染HBV，因此这些动物通常被用作一

种方便模型以评价试验疫苗治疗慢性 HBV 感染的效果[9-11]。那些具有功能(1) 在免疫的感受态小鼠中引发强烈 CMI, (2) 逆转免疫耐受状态, 以及 (3) 抑制转基因在 HBV 转基因动物中的表达的试验疫苗被看作是潜在的能够对人类乙型肝炎病毒慢性感染实施免疫干预的候选疫苗。

现有的 HBV 疫苗为蛋白疫苗, 由重组 HBV 表面抗原 (HBsAg) 构成。它们通常会引发强烈的抗体反应, 在预防感染方面有效, 但是它们并不引发强烈的 CMI 反应, CMI 反应是治疗慢性感染所适用的。蛋白疫苗引发 CMI 反应的能力可以通过将重组 HBV 疫苗与最佳量的抗体混合而增强[12]。所得的免疫复合物疫苗较之于原先的重组疫苗能够在免疫的感受态小鼠中引发更强烈的 CMI 反应, 而且它也能够终止转基因小鼠中常见的免疫耐受状态[13]。然而, 所述免疫复合物疫苗所引发的免疫水平不足以额外抑制转基因的表达。

另外一种治疗慢性 HBV 感染的可选择途径是制备 DNA 疫苗。DNA 疫苗能比蛋白疫苗在免疫的感受态小鼠中引发更强烈的 CMI 反应, 也具有阻断 HBV 转基因小鼠中常见的免疫耐受的功能, 但通常它们也无法抑制转基因的表达 [10, 13-16]。已知的唯一例外就是 Mancini 等人所作的一个研究[17], 然而还无法确定该项实验中所观察到的抑制现象究竟是由疫苗引发的, 还是由于他们实验中选用的特定转基因小鼠株所自发产生的。所有已知的报道中, 唯一一个转基因表达的抑制确系疫苗引发的例子是组合运用了免疫复合物疫苗和 DNA 疫苗的例子, 是通过两种疫苗的重复给药实现的[13]。

发明内容

本发明的目的之一是提供一种口服 DNA 组合物, 用于改善与乙型肝炎病毒 (HBV) 慢性感染相关的受损免疫力并在一个延长的期限内抑制转基因的表达。根据本发明, 提供了一种改善 HBV 慢性感染相关的受损免疫力并能在一个延长的期限内抑制转基因表达的口服 DNA 组合物, 它包含:

一种优先以吞噬细胞为靶的细菌减毒株和 DNA 质粒载体, 以及一种药学上可接受的载体。

在优选的实施方案中, 吞噬细胞是肠粘膜吞噬细胞, 包括因感染反应而募集的炎症细胞。

本发明组合物中的细菌减毒株可以为一种营养缺陷型突变株, 该细菌突变株一旦进入宿主细胞就会自溶并释放所携带的 DNA 质粒。

在优选实施方案中，细菌减毒株为一种营养缺陷型突变株，该细菌突变株一旦进入宿主细胞就会自溶并释放所携带的 DNA 质粒。

在更优选的实施方案中，其中的细菌减毒株选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株 S7207 或减毒的伤寒沙门氏菌菌株 Ty21a。

本发明的另一个方面，还提供了一种优先以吞噬细胞为靶的细菌减毒株在制备用于在慢性感染的 HBV 携带者中诱导细胞介导的免疫应答的药物中的用途，其中的细菌菌株为缺陷型突变株，该突变导致细菌菌株一旦进入吞噬细胞就会自溶，并将所携带的质粒载体释放在细胞内，该质粒载体能够在真核环境中表达至少一部分 HBV 基因组。

附图说明

下面结合附图更详细的阐述本发明：

附图 1 是 HBsAg 表达质粒 pRc/CMV-HBs(S)的结构示意图，它由质粒载体 pRc 构建而来，含有与编码乙型肝炎病毒(ayw)表面抗原的疫苗基因 (HBs(S)) 连接的 CMV 启动子。

附图 2 显示的是用三剂量的 DNA 组合物每三周对三只小鼠行肌肉注射免疫并于第 8 周杀死，对其淋巴细胞增殖情况进行的分析。从这些免疫的动物中收获脾细胞，按 5×10^5 细胞/孔培养于微量滴定板中，一式三份。培养物用感染了 ODV(M-ODV)或载体细菌的(M-BC)或加载了提纯的 HBsAg 的(M-P)腹膜 MF 刺激。免疫的脾细胞还分别被放射性的 P815-S、P815 或 PHA 刺激；或者作为对照不加任何刺激物（培养基）而培养。培养物按图示的时间保温培养，然后用 [^3H] 胸腺嘧啶核苷继续标记 16 小时。以这些培养物掺入的 [^3H] 胸腺嘧啶核苷的平均 cpm 值所表示的淋巴细胞增殖情况与未刺激的对照培养物进行了比较。

附图 3 显示的是为了确定 HBsAg 特异性的 Th1 细胞而进行的 IFN- γ 诱导分析。进行了 ELISA 分析以确定在如图所示的时间、如图 2 所描述的刺激或未刺激过的脾细胞培养物上清收集物中的 IFN- γ 含量。

附图 4 显示的是 HBsAg 特异性细胞毒性 T 细胞前体分析。按效应物：刺激物为 20 的比例将 HBsAg 免疫脾细胞与 M-OVD、M-BC、M-P 或放射性 P815-S 共培养 3 天。然后加入 25IU/ml 的小鼠 rIL-2 继续保温培养 4 天。被刺激的免疫脾细胞针对靶 P815-S 的细胞毒性是由效应物：靶比值在 30 和 0.3 之间的

一式三份样品通过一个标准的4小时钙黄绿素释放分析法来确定的。

附图5显示了接种后血清抗-HBs反应。9组各5只Balb/C小鼠分别由图示的免疫原进行免疫。按(A)中所示时间取样检测血清中的HBsAb。(B)显示第9周取样分析抗体不同亚型的含量。

附图6显示了针对疫苗的Th1或CTL反应。Balb/C小鼠按图5所示方法免疫并于接种后第9周杀死。得自这些动物的脾细胞按 5×10^6 细胞/ml在存在10mg/ml提纯HBsAg蛋白的条件下培养。按(A)中所示时间收集上清物用ELISA测量IFN- γ 的分泌。加入25IU/ml的rIL-2进一步再保温培养4到5天。(B)显示用CTL分析测得的这些培养物中的细胞毒活性。

附图7显示的是得自接种了口服DNA和细菌载体的HBs-Tg小鼠肝切片中表达的HBsAg免疫组织化学法染色的结果。接种了口服DNA组合物(A)或细菌载体(B)的HBs-Tg小鼠在免疫后12周杀死,取其肝切片用DAKO免疫组织化学试剂盒进行分析以确定HBsAg转基因在其肝细胞中的表达(放大倍数 $\times 100$)。值得注意的是所有接种了细菌载体的动物肝细胞HBsAg的表达为阳性(B, 4-A到-E),然而得自一个正常B57/6J小鼠的肝切片(B, N-C)显示该病毒抗原是阴性的。免疫接种了口服DNA组合物的小鼠肝组织(A, 3-A到-E)中病毒抗原的表达表现出斑片状。在接种口服DNA组合物后的第13天死于暴发性肝炎的小鼠的肝切片(A, 3-F)中绝大多数都是溶细胞的或坏死的HBsAg阳性肝细胞(\leq)和HBsAg阴性肝细胞($<-$)。

附图8显示了得自免疫接种了口服DNA组合物(A)或细菌载体(B)的HBs-Tg小鼠的肝切片的组织病理学分析。肝切片是由图5图例中所描述的小鼠来制备的,用H&E染色(放大倍数 $\times 100$)。免疫接种后第13天死于暴发性肝炎的小鼠的肝切片显示了强烈的淋巴细胞炎症并伴有突出的嗜酸性肝细胞的退化。而其他动物的肝组织中仅出现最小程度的或根本没发现病变。

附图9表明口服DNA组合物在HBs-Tg小鼠中引发一个早期肝炎高峰。按图示的周数从接种口服DNA组合物的小鼠(3)以及接种载体细菌的对照(4)中获取肝切片,用H&E染色(放大倍数 $\times 200$)。接种口服DNA组合物后2周就出现了强烈的病灶性炎症并伴有嗜酸性肝细胞的退化(b & j)。在第3周炎症减弱并伴有很少的嗜酸性肝细胞的退化(c),第4周能观察到的病变最少(d)。载体细菌免疫的对照组动物在接种2周后观察到轻度的灶性炎症以及较

少的嗜酸性肝细胞变性 (f)，随后的肝样品显示了最少的病变 (g & h)。

附图 10 显示了不同组别的免疫 HBs-Tg 小鼠中的血清 ALT 水平。5 组 HBs-Tg 小鼠分别由图示的免疫原接种并以 3 周的间隔期收集血清样品 (A)。还以 1 周的间隔从两组各 12 只接种口服 DNA 组合物或载体细菌的 HBs-Tg 小鼠在免疫后前 4 周内收集血清样品 (B)。接种后的周数及相应的 ALT 平均值和 SD 值均显示在图中。

附图 11 显示口服 DNA 组合物在 HBs-Tg 小鼠中诱发了转基因的早期表达抑制。按图示的周数从接种口服 DNA 组合物的小鼠 (3) 以及接种载体细菌的对照 (4) 中获取肝切片，用免疫组织化学法检测 HBsAg 的表达 (放大倍数×200)。免疫组织化学法分析表明在接种免疫口服 DNA 组合物后第 2 周 HBsAg 的表达发生了显著的抑制 (j)，在这些样品中占相当比例的是 HBsAg 阳性肝细胞 (←或→)，而且能够很明显的观察到正常的 HBsAg 阴性肝细胞 (↑或↓)。而大多数对照动物的肝细胞都是 HBsAg 阳性的 (m 到 p)。

附图 12 显示了不同组别的免疫 HBs-Tg 小鼠血清中抗-HBs 水平及抗体的亚型。不同组别的 HBs-Tg 小鼠分别由图示的免疫原进行免疫 (A)。另一组 HBs-Tg 小鼠由口服 DNA 组合物或载体细菌免疫 (A')。接种后的周数及相应的抗-HBs 平均值和 SD 值均显示在图中。第 12 周获得的样品表示为 OD 值±SD (B)。

附图 13 显示了转染后 48h 获取的被 pRc/CMV-HBs(S)转染的 293 个细胞的细胞裂解物以及被鼠伤寒沙门氏菌 pRc/CMV-HBs(S)感染的巨嗜细胞感染后 24h、48h、72h 获取的裂解物中的 HBsAg 水平 (O.D.450)。

附图 14 显示了 Balb/C 小鼠经肌肉注射 pRc/CMV-HBs(S)、口服 pRc/CMV-HBs(S)转化的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌、腹腔注射重组的 HBsAg、以及口服减毒存活鼠伤寒沙门氏菌免疫后第 7 天 (A) 及第 21 天 (B) 时血清中的抗体水平 (O.D.492)。

附图 15 显示了以表达 HBsAg 的 P815 细胞 (P815S) 和不表达 HBsAg 的 P815 细胞 (P815N) 为靶细胞，Balb/C 小鼠经口服减毒的存活鼠伤寒沙门氏菌、肌肉注射 pRc/CMV-HBs(S)、口服 pRc/CMV-HBs(S)转化的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌、以及经腹腔注射重组的 HBsAg 免疫后的 CTL 反应。用 pRc/CMV-HBs(S) 转化的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌口服免疫的小鼠中 CTL 反应要比由重组

HBsAg 经腹膜注射免疫的小鼠中 CTL 反应强的多 (E:T 比为 100:1 时 $p < 0.01$), 而与 pRc/CMV-HBs(S)肌肉注射免疫的小鼠在任何 E:T 比时 CTL 反应都不相上下。

附图 16 显示了 Balb/C 小鼠经 pRc/CMV-HBs(S)肌肉注射、口服 pRc/CMV-HBs(S)转化的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌、腹膜注射重组的 HBsAg 以及口服减毒的存活鼠伤寒沙门氏菌后 24h、48h、72h 收集的脾细胞培养物上清液中白介素-4 (A) 及 IFN- γ (B) 的水平 (O.D. 450)。

附图 17 显示了不同组别免疫的转基因小鼠中的血清 HBsAg 水平。不同组别的小鼠以 3 周的间隔计 4 针分别进行如下的肌肉注射免疫: 2 μ g HBsAg/鼠 (\square), 或含 2 μ g HBsAg 的 HBsAg-抗-HBs 复合物 / 鼠, 缩写为 IC (\square), 或含 2 μ g HBsAg 的 IC 加 100 μ g 具有 S 基因的裸质粒 DNA / 鼠, 缩写为 IC-sDNA (\square), 或 100 μ g 具有 S 基因的裸质粒 DNA / 鼠(\square), 还有未免疫的对照组(\times)。免疫后不同周数测定的血清 HBsAg 平均值及 S.D.值均标示于图中。

附图 18 显示了不同组别免疫的转基因小鼠中的血清抗-HBs 抗体水平。不同组别的小鼠分别按照图 1 所描述的进行肌肉注射免疫。免疫后不同周数测定的血清抗-HBs 抗体的平均值及 S.D.值均标示于图中。

附图 19 显示了不同免疫组中的 CTL 反应。不同组别的小鼠分别由 HBsAg、IC、IC-sDNA 或 sDNA 免疫。小鼠在杀死前先加强 7 天, 收集小鼠脾细胞中的 T 细胞, 用 HBsAg 进行刺激, 并与 IL-2 一起温育以进一步扩增。所用的靶细胞来自感染了 Vac- HBsAg 病毒的正常 C57/6J 小鼠的脾细胞 (A), 而感染了牛痘病毒的脾细胞作为对照 (B)。给出了 HBsAg 免疫组、IC 免疫组、IC-sDNA 免疫组、sDNA 免疫组及未免疫组在不同的效应细胞 / 靶细胞比例(范围从 100/1 到 170.3/1) 时特异性细胞裂解的百分比。

附图 20 显示了由 IC-sDNA 免疫及未免疫的转基因小鼠肝切片中表达的 HBsAg 的免疫组织化学印迹。(A) 5 只用 IC-sDNA 每隔 3 周计 4 针肌肉注射免疫 (如图 1 的描述所示) 的转基因小鼠于第 15 周杀死, 其肝切片通过 Dako 免疫组织化学反应试剂盒进行染色以测定 HBsAg 含量。简单的说, 切片首先用山羊抗- HBs 过夜染色, 随后与生物素化的兔抗山羊抗体反应 30 分钟, 冲洗后进一步与链霉亲和素-HPR 偶联物再反应 30 分钟。最后, 加入辣根过氧化物酶底物。与未免疫的对照小鼠相比, 每 5 只免疫小鼠中有 2 只能观察到 HBsAg

阳性肝细胞。NC 是一个正常对照小鼠的肝切片。(B) 6 只未免疫的对照转基因小鼠的肝切片。

具体实施方式

除非特别说明，这里所使用的科技术语与本发明所属的技术领域的普通技术人员所通常理解的含义是相同的。一般说来，这里所使用的术语以及下面所描述的细胞培养学、分子遗传学、核酸化学方面的实验操作步骤都是本领域所通用的。重组核酸方法、细胞培养及转化用的是标准技术。本发明所使用的术语除非另外指出都具有以下含义：

疫苗基因：在本发明中是指编码至少一部分 乙型肝炎病毒蛋白或肽或其抗原部分的一个或多个基因或其互补 DNA。

疫苗质粒：在本发明中是指携带编码至少一部分 乙型肝炎病毒蛋白或肽或其抗原成分的一个或多个基因或其互补 DNA 的质粒，所述基因或互补 DNA 能够在真核环境中表达。

根据本发明，提供了一种口服 DNA 组合物，该组合物在单剂量时能够阻断转基因小鼠中常见的 HBV 免疫耐受并在这些转基因表达被长时期抑制的动物中引发强烈的 CMI 反应 [18]。所述口服 DNA 组合物包含两个主要组成成分：(1) 一种细菌减毒株；以及 (2) 含有编码至少一部分 乙型肝炎病毒蛋白或肽或其抗原成分的一个或多个基因或其互补 DNA 的质粒载体，该质粒能够转化上述细菌株的细胞。所述口服 DNA 组合物的两个固有特性及其用途使其比现有的疫苗更为有效：(1) 能够将疫苗基因运送到肠道中的专门的抗原呈递细胞的载体细菌；以及 (2) 被运送到肠道细胞后能够表达疫苗基因的质粒载体。经口服给予，所述口服 DNA 组合物在肠道内造成一个短暂的、自限性的感染。该口服 DNA 组合物的效力是由以下特性决定的：(1) 载体细菌优先将疫苗载体运送到吞噬细胞的能力，包括位于肠粘膜中的吞噬细胞和因感染而募集到感染部位的炎症细胞；(2) 一种导致细菌进入吞噬细胞后能够自溶从而将疫苗质粒释放到感染细胞中的突变；以及 (3) 疫苗质粒中所含的 CMV 启动子，该启动子能够在感染细胞的真核环境中促使疫苗基因表达。这样，与其它疫苗不同，用本发明的口服 DNA 组合物所进行的免疫实质上使得其感染过程跟天然感染所获得的免疫方式很相似。因此，是载体细菌与质粒载体特殊的组合赋予了该口服 DNA 组合物治疗 乙型肝炎病毒慢性感染的功效。可以确信，

正是因为缺少了这两个特性成分中的一个或全部，才导致其它已知的疫苗在逆转免疫耐受状态方面不如本发明的口服 DNA 组合物有效。可以预期相同特性的组合对于研发治疗除 HBV 以外的其它病毒慢性感染的疫苗是很重要的，例如 C 型肝炎病毒 (HCV) 和人类免疫缺陷病病毒 (HIV)。

所用的细菌菌株是鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 菌株 S7207 或伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 菌株 Ty21a，均是由 Stocker 博士开发的。细菌菌株 Ty21a 在商业上可用作伤寒疫苗。疫苗质粒 pRc/CMV-HBs(S) 是由 Wheland 博士作为治疗 HBV 感染的实验性 DNA 疫苗构建的。口服 DNA 组合物是通过标准实验流程用疫苗质粒转化细菌配成的。两种成份的组合产生了一个新的组合物，可以口服给药，而且单次剂量能够在 HBV 转基因小鼠中抑制 HBV 转基因的表达。

转基因小鼠表现出的对 HBV 的免疫耐受状态，可用来模拟长期为该病毒所感染人类的免疫状态。由于没有慢性感染 HBV 的动物模型，通常采用 HBV 转基因小鼠来测试试验疫苗以确定它们是否具有适于治疗人类 HBV 慢性感染的潜力。可以确定的是，至今还没有研发出其他的能够在这种模型中抑制转基因表达的疫苗。所述口服 DNA 组合物能够实现长时期抑制转基因表达的能力使其成为治疗人类 HBV 慢性感染和阻断该疾病所特有的免疫耐受状态的一种有效的组合物。

口服 DNA 组合物在这些动物中激发强烈的 Th1 型免疫应答，而且该阶段是短暂的、与肝组织中转基因表达抑制现象的出现有关。这暗示抑制主要是由免疫而非内在的机制引起的。该论点在用载体细菌免疫的对照动物中得到了支持。细菌也激活了内在机制，然而它不能实现对转基因表达的抑制。

其它疫苗、特别是 DNA 疫苗所引发的不能抑制转基因表达的免疫应答与所述口服 DNA 组合物所引发的免疫应答仅仅是在数量上有差别。这意味着口服组合物所激发的强烈的 Th1 型免疫应答是该组合物治疗 HBV 慢性感染效力的一个重要决定性因素。

可以确信，所述口服组合物是同类产品中所发现的第一个能够在延长的期限内对转基因表达实现抑制的疫苗。因此，特别的讲，本申请的权利要求与治疗乙型肝炎病毒慢性感染的口服 DNA 组合物的配方有关，而一般的讲，本申请的权利要求也涉及用于治疗其它病毒慢性感染的相同或相似的疫苗的配

方。

下面提供实施例来详细描述本发明的一些有代表性的、目前优选的方法和材料。这些实施例以解释本发明的原理为目的，而不是象从属权利要求那样限定本发明的范围。

实施例 1： 用于治疗 HBV 慢性感染的口服 DNA 组合物 (ODV) 的组成成分、配方及服用模式

组成成分

口服 DNA 组合物是由两种组成成分构成的，它们是包含在一种载体细菌菌株中的疫苗质粒。所述疫苗质粒 pRc/CMV-HBs(S)是由 J Wheland 博士开发的 [17, 20]。如图 1 中的描述，它包含了具有一个连接到编码 HBsAg(S)的疫苗基因的 CMV 启动子的质粒载体 (pRc)。该质粒及其相似的疫苗质粒构建物可以使疫苗基因在合适的细菌宿主中扩增，并使其编码的病毒抗原在真菌细胞环境中表达。

所用的载体细菌是减毒的伤寒沙门氏菌 (*S. ty21a*)，一种用于制造商用口服伤寒疫苗的菌株，或者是减毒的鼠伤寒沙门氏菌[鼠伤寒沙门氏菌 2337-65 衍生的 hisG46, DEL407[aroA:Tn10{Tc-s}]，以下记作鼠伤寒沙门氏菌 aro 株 SL 7207。两个菌株都是由 B Stocker 博士开发的 [19]，是已确认的肠道感染的常见胞内寄生菌，在那里该细菌优先为肠粘膜中包括 APC 在内的淋巴细胞摄入。两个菌株都已被减毒，带有营养缺陷型突变，导致其一旦进入宿主细胞就会进行自溶。

配方及服用模式

口服 DNA 组合物 (ODV) 是通过标准实验流程用疫苗质粒转化载体细菌得到的。该组合物经口服或注射给药。由于营养缺陷型突变的存在，随之发生的肠道感染是瞬时的、自限性的。尽管如此，这种感染还是可以将疫苗质粒运送到肠道细胞中，特别淋巴细胞中，包括那些早就位于肠粘膜中的淋巴细胞及因感染而募集到此的炎症细胞。一旦载体细菌自溶，疫苗质粒就会被释放在被感染的细胞中，而且该质粒载体中所含的 CMV 启动子使病毒抗原在被感染的细胞环境中产生。被感染的细胞所产生的一部分抗原随后被加工并呈递到细胞表面作为 T 细胞表位，而其它的被分泌出来的抗原作为游离抗原。免疫应答不但直接由被感染的细胞实现，而且通过这些细胞分泌的抗原实现。

由于免疫是通过感染实现的，这使得 ODV 的配方及服用模式与其它疫苗有着根本上的区别。较之于其它疫苗，用这种方式获得的免疫与天然获得免疫的方式更为类似，因而在该过程中更有可能调动起免疫系统更广范围的成份。正如下面的例子所表明的，ODV 的一个突出特点就是较之于常规疫苗它能够引发更强烈的 CMI 反应，而且它是迄今为止所知的唯一能够在转基因小鼠中对 HBV 表达实现长期抑制的组合物。

实施例 2：由巨嗜细胞表达的 ODV 的抗原活性

口服组合物的效力首先在 Balb/c 小鼠中展开实验进行测试。设计一种类型的试验来测试口服组合物感染腹膜巨嗜细胞的能力以及被感染的细胞表达、加工、呈递疫苗基因的程度。在这些试验中，腹膜巨嗜细胞是作为粘附细胞根据标准试验流程从这些动物中收集的。以 10 个细菌比 1 个巨嗜细胞的比例用疫苗细菌或对照载体细菌感染细胞。细胞冲洗后用 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素处理，以杀死残余的过量的细菌细胞，然后在含 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素的培养基中保温 16 小时以抑制细菌生长。作为对照，细胞与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 提纯的 HBsAg 一起温育 2hr。另外还有 P815 细胞系及转染了 HBsAg 基因的同细胞系作为对照 (P815-S)。

表 1 表明在 P815-S 的培养物上清液及胞质溶胶中检测到高水平的病毒抗原，而且细胞也显示了病毒抗原免疫印迹的阳性结果。而在另一方面，在被口服组合物感染的巨嗜细胞 (M-ODV) 胞质溶胶中只能检测到低水平的病毒抗原，在其培养物上清液中检测不到，而且细胞病毒抗原免疫印迹结果是阴性的。对对照细胞，包括被载体细菌感染的 (M-BC)或由植物凝集素处理的巨嗜细胞 (M-PHA) 以及 815 亲本细胞系 (P815)，进行相似的测试，结果病毒抗原免疫印迹是阴性的，而且也检测不到病毒抗原的表达或分泌。

表 1
口服 DNA 组合物在腹膜巨嗜细胞中的表达及呈递

	表达		T 细胞表位的呈递 ^a				
	ELISA ^b ng/ml	免疫 染色	增殖 SI	IFN- γ pg/ml	IL-4 pg/ml	CTL m E:T	
	裂解物上清液						
M-ODV	2.8	-	-	16.7	39165	2	3
M-BC	-	-	-	1.1	10	0	>30
M-P	NA	NA	NA	6.3	2318	2	3
P815-S	870	328	0	4.2	890	1	10
P815	-	-	-	1.1	4	0	NA
PHA	NA	NA	NA	16.3	38235	1	NA

腹膜 MF 被活性口服 DNA 组合物 (M-ODV) 或载体细菌感染 (M-BC)。细胞裂解物及培养物上清液中的 HBsAg 含量通过 ELISA 测定。在细胞涂片中用 HBsAg 特异性的抗血清进行免疫印迹以测定这些细胞对病毒抗原的反应性。这些细胞呈递 HBsAg 特异性 T 细胞表位是通过以下方法以这些细胞刺激事先免疫过 HBV DNA 疫苗的 Balb-C 小鼠脾细胞的能力来测定的：这些方法是图 2 中描述的细胞增殖的分析方法；图 3 所示的 HBsAg 诱导 γ 干扰素及 IL-4 产生的方法；图 4 给出的 HBsAg 特异性细胞毒性分析方法。将所得结果与 MF (M-P)、P815 细胞系、P815 细胞 (P815S) 及 T 细胞有丝分裂原 PHA 对相同的免疫脾细胞的效果进行比较，其中的 MF 通过将细胞和 10mg/ml 提纯蛋白一起温育而加载了提纯的 HBsAg，P815 细胞含有与口服组合物相同的疫苗质粒。

进一步通过试验来测试 M-ODV 是否能够加工并呈递病毒抗原到免疫 T 细胞。实验所用的免疫细胞来源于事先各自被 3 剂量 100 μ g 疫苗质粒免疫过的小鼠的脾细胞。DNA 疫苗每隔 3 周肌肉注射胫骨前肌，并于末次给药后 2 周杀死。图 2 显示了对 M-ODV 呈递的抗原的识别激发了免疫细胞的强势增殖，其程度和 T 细胞有丝分裂原植物凝集素 (PHA) 的刺激效果不相上下，且超过了

P815S 及加载了提纯的重组 HBsAg 的巨嗜细胞 (M-P) 的刺激效果。而 M-BC 和 P815 没有刺激性, 用这些细胞刺激的免疫脾细胞的增殖和未经刺激的培养基对照物很相似。

免疫 T 细胞 Th1 亚群对病毒抗原的识别是通过如图 3 所示的 γ 干扰素增生分析测定的。结果表明 M-ODV 和 PHA 刺激细胞因子强势增生, 而 P815 和 M-P 显示了中等强度的刺激效果。对照物对免疫脾细胞没有刺激性。

细胞毒性 T 细胞 (CTL) 对病毒抗原的识别是通过如图 4 所示的 CTLp 分析方法测定的。在该方法中, 免疫细胞中的 CTL 前体首先被刺激增殖并分化为功能性的细胞毒性细胞。然后将事先由钙黄绿素 AM 标记好的靶细胞与梯度数量的刺激过的免疫细胞 (效应物) 混合。细胞毒性的水平是以导致 20% 靶细胞特异性裂解所需的刺激过的免疫细胞的最低数目来衡量的。结果表明由 M-ODV、M-P 或 P815-S 刺激过的免疫细胞对靶 P815-S 具有相似的细胞毒性, 而由 M-BC 刺激的免疫细胞不具备细胞毒性, 这说明刺激是 HBsAg 特异性的。

表 1 总结了 HBsAg 在感染了 ODV 的小鼠腹膜巨嗜细胞中表达和呈递的情况。结果证实疫苗基因由载体细菌通过主动感染的过程被运送到巨嗜细胞中, 而巨嗜细胞自溶导致了病毒基因的释放。很明显表达的病毒基因被充分加工并呈递为 T 细胞表位。所以, 被感染的细胞激发了免疫 T 细胞的强势增殖, 其程度和常用 T 细胞有丝分裂原 PHA 的刺激效果不相上下。被感染的细胞也被 HBsAg 特异性的 Th1 细胞及 CTLp 识别, 前者激发 γ IFN 的活性增生, 后者发展成为有功能的 HBsAg 特异性 CTL。在另一方面, 它们不能刺激 Th2 以诱导 IL-4 的增生。而且, 似乎大多数表达的病毒抗原经 Th1 途径进行加工, 只能在胞质溶胶中检测到很低水平的游离抗原, 而在培养物上清液中检测不到抗原的分泌。这和 P815-S 相反, 它在培养物上清液中分泌大量的病毒抗原, 而将其加工并呈递为 T 细胞抗原方面不如 M-ODV 有效。所以, 在胞质溶胶和培养物上清液中检测到高水平的游离抗原, 但这些细胞对免疫 T 细胞的刺激性较小。M-P 对免疫 T 细胞及其不同亚群的刺激效果介于 M-ODV 和 P815-S 之间。

综上所述, 上述的试验结果突出显示了关于 ODV 的以下几个特点: (1) 载体细菌提供了将疫苗质粒运送和释放到宿主细胞中的一个行之有效的方法; (2) 随后的疫苗基因在宿主细胞的真核环境下表达为 HBsAg 是在 CMV 启动

子的控制下进行的；和（3）内源性表达的抗原的活性是依宿主细胞的类型而定的。这样，在专门的抗原呈递细胞中，例如巨嗜细胞和树突细胞，表达的抗原主要呈递为 T 细胞表位，而在其它类型的细胞中，例如 P815-S，绝大部分比例的抗原作为游离抗原存在并被分泌。巨嗜细胞也可以摄入外源性抗原并加工呈递为 T 细胞表位，但其抗原活性水平要比来自内源性表达的抗原活性低。

实施例 3：在小鼠中 ODV 激发强烈的 Th1 型免疫应答

ODV 引发免疫应答的能力在免疫的感受态 Balb C 小鼠中进行测评，并与 DNA 疫苗 (pRc/CMV-HBs(S)) 及商用重组蛋白疫苗 (HB-VAXII, MSD, USA) 进行比较。这些动物被分 5 组进行研究。通过每隔 2 天喂食 3 剂量的 6×10^9 疫苗细菌或对照细菌给予口服 DNA 组合物，或者如实施例 2 中所描述的每 3 周一次计 3 次静脉注射和腹膜注射 6×10^7 M-ODV 或 M-BC。其它组别的动物每 3 周一次分别肌肉注射胫骨前肌 3 剂量 $2 \mu\text{g}$ 的蛋白疫苗或者 $100 \mu\text{g}$ 的 DNA 疫苗。DNA 疫苗含有的疫苗质粒与 ODV 中包含的相同。每 3 周取 1 次血样以检测抗 HBsAg 的抗体 (HBsAb) (图 5)。动物在第 9 周杀死，即末次剂量免疫后 3 周。得自这些动物的脾细胞分别通过 IFN- γ 诱导分析 (图 6A) 及针对 P815S 和 P815 靶细胞的细胞毒性分析 (图 6B) 来测试 HBsAg 特异性的 Th1 细胞及 CTL。

结果表明蛋白及 DNA 疫苗在这些动物中激发了强烈的抗体反应，而且分别由这些疫苗加强免疫后抗体的水平提高了 (图 5 A)。应答这些疫苗所产生的抗体占优势的是 IgG1 同种型 (图 5 B)。另一方面，通过喂食 或者通过被感染的巨嗜细胞给予的口服 DNA 组合物在这些动物中引发中等强度的反应。免疫后 9 周抗体所达到的水平比应答蛋白及 DNA 疫苗所产生的抗体低 10 倍左右，而且其所产生的抗体主要是 IgG2 同种型。另一方面，口服 DNA 组合物，不管是喂食还是通过巨嗜细胞给予，都在这些动物中引发强烈的 Th1 及 CTL 反应。以 IFN- γ 增生的量来反映的 Th1 反应的水平 (图 6A) 以及显示为 P815S 靶细胞特异性裂解的百分比的 CTL 反应的水平 (图 6B) 都显著的比 DNA 疫苗所引发的反应要高的多，而蛋白疫苗既检测不到激发的 Th1 反应，也没有明显的 CTL 反应。

ODV 所引发的反应与免疫是通过一个载体细菌所致的主动感染过程获得的观点是一致的。这表明，正如天然感染那样，载体细菌优先感染位于肠粘膜

中的吞噬细胞和那些因应答与此感染相关的炎症反应而募集到此的细胞。的确，作为已确认的胞内寄生菌，该载体细菌适于感染这样的炎症细胞。所以，该组合物引发了强烈的 Th1 及 CTL 反应，并产生中等水平的 IgG2 抗体，这与通过注射离体感染了 ODV 的巨嗜细胞所带来的反应很相似（表 2）。

表 2

用口服 DNA 组合物感染的巨嗜细胞的继承性转移产生的免疫特征
与口服 DNA 疫苗诱导产生的免疫特征相同

类型	免疫原	抗-HBsAg mIU/ml 平均值±SD (主要亚型)	IFN- γ pg/ml 平均值±SD	IL-4 pg/ml 平均值 ±SD	CTL m E:T 中值
1	蛋白疫苗	9632±413 (IgG1)	256±167	13±3	30
2	DNA 疫苗	9250±948 (IgG1)	2587±771	13±5	10
3	口服 DNA 组 合物	160±24 (IgG2a)	8272±1423	11±3	3
3	M-ODV i.v.	253±7 (IgG2a)	15690±5827	58±29	3
3	M-ODV i.p.	466±94 (IgG2a)	12302±3062	48±13	10
0	载体细菌	<4	197±140	<1	>30
0	M-BC i.v.	<4	1206±140	14±7	>30
0	M-BC i.p.	<4	251±65a	10±8	>30
0	未免疫的	<4	199±41	10±2	>30

9 组各 5 只小鼠按以下方法免疫：2 组肌肉注射蛋白或 DNA 疫苗。2 组口服给药口服 DNA 组合物或载体细菌。4 组分别静脉或腹膜注射感染了口服 DNA 组合物（M-ODV i.v.或 i.p.）或载体细菌（M-BC i.v.或 i.p.）的 MF。最后 1 组不进行免疫。抗体反应按照图 5 所示方法测定，而 T 细胞反应按照图 6 所示方

法测定。

通过与表 2 中其它疫苗引发的反应相比较,表明 ODV 的效力很大程度上取决于与其配方相关的两个特性的组合。第一个是优先将疫苗基因定位到 APC 的载体细菌,第二个是包含在质粒载体中的、使得这些细胞能内源性产生病毒抗原的 CMV 启动子。APC 靶向的重要性通过与肌肉注射的 DNA 疫苗进行比较而得到了证实。在后者的例子中,疫苗基因很可能大部分被作为非专门的抗原呈递细胞的肌肉细胞摄入,表达并主动分泌病毒抗原,因而象蛋白疫苗那样激发了高水平的 IgG1 产生。然而,DNA 疫苗引发 Th1 型免疫应答不如 ODV 有效,ODV 中内源性表达的抗原被 APC 加工并呈递。

下面提供关于实施例 2 和 3 更为详尽的讨论。在以前的研究中,我们发现含有可递送质粒 DNA-HBsAg (口服 DNA 疫苗)的活鼠伤寒沙门氏菌的口服免疫激发了强烈的 T 细胞反应,并在小鼠中产生以 IgG2a 亚型占主导地位的弱的抗体反应,这暗示了专门的抗原呈递细胞(APC)的有效参与。在当前的研究中,通过用口服 DNA 疫苗感染腹膜巨嗜细胞(M Φ)进一步研究了这种可能性。虽然被感染的细胞仅能表达低水平的病毒抗原,但是它们还是能刺激免疫小鼠脾细胞的强烈淋巴细胞增殖,诱导这些细胞中产生 γ 干扰素,刺激针对表达病毒抗原的靶细胞的 HBV 特异性的细胞毒性的出现。注射被感染的 M Φ 在小鼠中激发了强烈的 Th1 和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应和弱的 IgG2a 抗体反应,这与口服 DNA 疫苗所引发的反应基本上是相同的。相反,重组蛋白疫苗引起强烈的 IgG1 抗体反应和弱的 T 细胞反应。而通过肌肉注射给予,与包含在口服 DNA 疫苗中相同的质粒 DNA 疫苗在这些动物中激发强烈的 IgG1 抗体反应和中等强度的 T 细胞反应。这可以归结为专门的 APC 协调了针对活性口服 DNA 疫苗的免疫应答,值得注意的是不同的疫苗配方和给药方式激发了针对 HBV 的截然不同的免疫应答。

材料和方法

小鼠

BALB/c 小鼠(H-2^d)在香港大学动物实验室(the Laboratory Animal Unit of the University of Hong Kong)的标准无病原体条件下饲养。本实验中所用的雌鼠鼠龄 4-6 周,体重 14-16g。该标准列于“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”(NIH 出版社 86-23, 1985)。

细胞系

P815 细胞系 (TIB-64) 自美国典型培养物保藏中心 (the American Type Culture Collection USA) 获得。能稳定表达 HBsAg 的 P815 细胞系 (P815-S) 是由 Reimann 及合作者赠送的。两种细胞系均在添加了 10% 的 FCS 和抗生素的 MEM 培养基中 (Gibco-BRL, USA) 培养, 但是对于后者, 培养基中还含有 1mg/ml 的 G418 (Sigma, USA)。

细菌菌株和质粒

鼠伤寒沙门氏菌 *aroA* 菌株 SL 7207 (由 Stoker 赠送) 被用作体内和体外实验的载体。质粒 pRc/CMV-HBs 是由 Whalen 及 15 个合作者惠赠的, 被用于转化鼠伤寒沙门氏菌 (口服 DNA 疫苗) 和肌肉注射免疫 (DNA 疫苗)。

M Φ 离体转染及抗原加载

每只 BALB/c 小鼠被腹膜注射溶在 1ml 无血清的 RPMI (0% RPMI, Gibco-BRL, USA) 中的 100 μ g Concanavalin A (Sigma, USA)。3 天后用 30ml 的注射器 / 20G 针头以 10ml 无抗生素的 0% RPMI 冲洗小鼠腹膜, 收集原代腹膜 M Φ 细胞。这些 M Φ 细胞以 2×10^7 细胞每孔置于 6 孔板中在 37 $^{\circ}$ C 保温培养 2 小时。去除非粘附细胞后, 这些 M Φ 细胞分别被口服 DNA 疫苗或其载体细菌鼠伤寒沙门氏菌 (MOI 为 10) 感染, 得到 M-ODV 和 M-BC。30 分钟后在添加了 10% FCS 的 RPMI 中 (10% RPMI) 加入 50 μ g/ml 庆大霉素温育 4 小时以杀死胞外残余的过量的细菌。在 10 μ g/ml 四环素存在的条件下另外再过夜温育来抑制胞内细菌的繁殖。M Φ 细胞还加载了 10 μ g / ml 的 HBsAg 蛋白并一起温育 2hr 以生成 M-P。这些 M Φ 细胞由 10ml EDTA 在 4 $^{\circ}$ C 处理 5-10 分钟, 收集脱离的细胞。

免疫方案及继承性转移

大约 45 只小鼠被分成 9 组 (每组 5 只小鼠)。2 组以 3 周的间隔肌肉注射 (i.m., 胫骨前肌) 3 次单次剂量 2 μ g 的蛋白 HBsAg 疫苗 (HB-VAX II, MSD, USA) (蛋白疫苗) 或者单次剂量 100 μ g 的 DNA 疫苗。其它 2 组鼠以 2 天的间隔口服给予 3 剂量的 6×10^9 口服 DNA 疫苗或载体细菌。以 3 周的间隔通过 3 次静脉注射或腹膜注射给予继承性转移的 5×10^7 / 剂的 M-ODV 或 M-BC。未免疫的小鼠作为阴性对照。

被感染的 M Φ 细胞中 HBsAg 表达的检测

根据制造商的指示用 ELISA (BIOKIT, SA, Spain) 方法检测达到 5×10^7 个细胞/ml 的 M-ODV 或 M-BC 培养物上清液或细胞裂解物中的 HBsAg。P815-S 和 P815 细胞的培养物上清液或细胞裂解物在该实验中用来作为对照。HBsAg 的水平由 Abbott Diagnostics (USA) 提供的一系列 HBsAg 校准器 (3.769-0.248 ng/ml) 来定量。个体细胞中表达的抗原也以标准实验流程用抗 HBsAg 免疫染色试剂盒 (DAKO, USA) 通过免疫染色进行了测定。

血清中抗-HBs 的检测

以 3 周的间隔从免疫前后的小鼠中获取血清。抗-HBs 是根据制造商的指示用 ELISA (BIOKIT, SA, Spain) 方法测定的。抗体水平用该试剂盒提供的标准阳性对照 (10-100 mIU/ml) 进行了定量。这些抗体的亚型也用相同的试剂盒由 ELISA 进行了确认, 但是用了 HRP-偶联的山羊抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a (SeroTec, UK) 作为替代。

增殖分析

脾细胞取游离 3 剂量的 DNA-HBsAg 疫苗免疫后 9 周的 3 只小鼠并悬浮于 10% RPMI 中。收集的脾细胞 (5×10^5 每孔) 分别与 M-ODV、M-BC、M-P、放射性 (20,000 拉德) P815-S 及 P815 以效应物: 刺激物为 20 的比率, 与 25 μ g/ml 的 PHA 或仅仅与培养基进行混合。混合物分 3 个孔在 37°C 培养于 96 孔微量滴定板中。培养 24、48、72 及 96 小时后, 这些细胞以每孔 1 μ Ci 的 [3 H] 胸腺嘧啶核苷标记 16 小时。掺入 DNA 的放射性强度随即用闪烁计数器来测量。结果或者表示为 3 份培养物每分钟的平均计数 (cpm), 或者表示为刺激指数 (SI), 它是以刺激物存在和不存在情况下平均 cpm 的比值计算的。

抗原诱导的细胞因子分泌分析

在与上文所描述的相同培养物中 根据制造商的指示用 Opt EIA 试剂盒 (PharMingen, USA) 以 ELISA 方法测定 HBsAg 诱导产生的 IFN- γ 及 IL-4。免疫后 24、48 及 72 小时获取的上清液中的 IFN- γ 及 IL-4 水平用该试剂盒中提供的至少 6 种浓度的标准 IFN- γ 及 IL-4 进行了定量。

CTL 分析

取自个体小鼠的脾细胞分别用 M-ODV、M-BC、M-P 及放射性 P815-S 以效应物: 刺激物为 20 的比率、或者用 10 μ g/ml 提纯的 HBsAg 蛋白 (Research Diagnostics Inc., USA) 刺激 3 天。随后这些特异性的 CTLs 又通过加入 25IU/ml

小鼠 rIL-2 (R&D systems, USA) 另外扩增 4-5 天。培养物的 CTL 活性是在一个 U 型底的 96 孔微量滴定板中通过一个标准的 4 小时钙黄绿素释放分析法对一式三份样品进行测量来确定的。通过荧光计测量钙黄绿素 AM (Molecular Probes Inc., USA) 的荧光强度 (FI) 来鉴定靶细胞的裂解, 特异性裂解的百分比 (5) 通过下式计算:

$$\left(1 - \frac{\text{实验测得的 FI} - \text{总裂解 FI}}{\text{靶对照 FI} - \text{总裂解 FI}} \right) \times 100\%$$

结果

被口服 DNA 疫苗感染的 MΦ 细胞对 HBsAg 的表达和呈递

腹膜 MΦ 由口服 DNA 疫苗 (M-ODV) 及其载体细菌对照 (M-BC) 感染, 或者加载 10 μg/ml 提纯的 HBsAg 蛋白 (M-P)。还包括 P815-S 和 P815 细胞另作对照。被感染的 MΦ 及 P815-S 所表达的病毒抗原是以 ELISA 和免疫细胞学方法鉴定的。这些细胞对已表达抗原的加工和呈递是以它们对来自事先经肌肉注射 3 剂量 DNA 疫苗免疫过的同源小鼠的脾细胞的刺激效果来评估的。

与早期发现相一致, P815-S 细胞能有效的表达 HBsAg, 该蛋白在培养物上清液和细胞裂解物中均能检测到。以口服 DNA 疫苗体外感染 MΦ, 结果在感染 3 天后能检测到的 HBsAg 达 2.8 ng 每 5×10⁷ 个细胞裂解物, 然而这些细胞中表达的 HBsAg 水平至少比 P815-S 表达的量低 300 倍。此外, 这些细胞在培养物上清液中没有产生足以检测得到的病毒抗原量, 而且表达的抗原水平太低以至于不能通过免疫染色看到 (结果未显示)。

M-ODV 细胞对病毒抗原的呈递是通过其对免疫 T 细胞的刺激效果来研究的, 通过淋巴细胞的增殖、细胞因子的诱导及 CTL 的分析来检测。所得结果与 M-P、P815-S 及非特异性刺激物 PHA 的刺激效果进行了比较。

淋巴细胞增殖分析表明 M-ODV 细胞刺激了来自免疫小鼠的脾细胞强烈增殖。这些感染的 MΦ 的刺激效果与 T 细胞有丝分裂原 PHA 相似, 而且分别超过了 M-P 及 P815-S, 而对照 M-BC 和 P815 与培养基对照比较没有显示出刺激效果 (附图 2)。

M-ODV 细胞对 Th1 及 Th2 细胞的刺激效果进一步通过 IFN-γ 及 IL-4 的产

生来测评。在脾细胞用 M-ODV 刺激 24 小时后检测了 IFN- γ 的产生 (附图 3)。随后 IFN- γ 的产生达到了最高的水平, 与 PHA 诱导相似, 比 M-P 及 P815-S 刺激的培养物中的 IFN- γ 分别高大约 17 和 40 倍。该反应是 HBsAg 诱导的, 因为由 M-P 及 P815-S 刺激过的所有对照培养物中都没有诱导 IFN- γ 的显著产生。也测定了同样培养物上清液中的 IL-4。然而, 也可能因为细胞因子与脾细胞上的受体结合 (Doherty, 私人通信), 培养物上清液中存在的 IL-4 水平太低而不能反应其刺激效果 (数据未显示)。

CTL 分析的进行是将脾细胞与 M-ODV、M-BC、M-P 和放射性 P815-S 细胞共培养 7 天以刺激 CTL 前体增殖并分化为功能性 CTLs。然后按效应物: 靶 (E: T) 为 0.3 和 30 之间的比值将梯度数量的钙黄绿素 AM 标记的 P815-S 或其对照 P815 靶细胞加入到培养物中。培养物中 CTL 的活性以 4 小时 CTL 方法进行检测 (附图 4)。结果表明由 M-ODV 刺激过的脾细胞显示出了对靶细胞 P815-S 较高水平的细胞毒性。观察到的细胞毒性是特异性的、直接针对靶细胞呈递的病毒抗原的, 该刺激过的脾细胞对对照 P815 靶细胞就不具有细胞毒性, 它不表达病毒抗原。该特异性的细胞毒性的水平比放射性 P815-S 刺激过的脾细胞要低, 与 M-P 的效果相似。由 M-BC 刺激过的脾细胞没有表现出可以检测得到的 HBsAg 特异性细胞毒性。

综上所述, 结果表明, 在口服 DNA 疫苗感染的 M Φ 细胞中, 未充分表达的病毒抗原被这些细胞与 MHC I 和 MHC II 分子充分加工和呈递了。所以, 这些细胞而不是用与载体细菌相同的菌株感染的对照 M Φ 细胞, 对 Th1 及 CTL 细胞亚群具有很强的刺激作用 (表 1)。

对口服 DNA 疫苗及 HBV 疫苗感染过的 M Φ 细胞的继承性转移的免疫应答

为了测试其免疫原性, 将 M-ODV 细胞经静脉或腹膜注射到 BALB/c 小鼠, 继发的 B 细胞和 T 细胞反应与 3 组免疫动物和 4 组对照动物中观察到反应的进行了比较, 3 组免疫动物包括那些被口服给予口服 DNA 疫苗的和肌肉注射给予 DNA 或蛋白疫苗的动物, 另外的 4 组作为对照的动物是静脉注射或腹膜注射 M-BC 的、口服载体细菌的及未进行免疫的动物。

DNA 和蛋白疫苗引起了以 IgG1 亚型为主的 (附图 3B) 强烈的抗体反应 (附图 5A)。这些动物产生的抗体水平免疫后 9 周比其它组别高 20 倍以上。口服

DNA 疫苗引发的抗体反应与静脉或腹膜注射 M-ODV 后观察到的相似(附图 5A), 且这些动物产生的抗体主要是 IgG2a 亚型(附图 5B)。所有 4 组对照动物都没有表现出可以检测得到的特异性抗体反应。

为了研究 T 细胞反应, 从免疫后 9 周的动物获取脾细胞, 以 5×10^6 个细胞 / ml 的浓度在 $10 \mu\text{g/ml}$ 提纯的 HBsAg 存在条件下培养 3 天。在培养后 24、48 及 72 小时取样等份的培养物上清液并分析抗原诱导的细胞因子。培养物在另外加入 25 IU/ml 小鼠 rIL-2 的条件下继续培养 4-5 天并检测针对钙黄绿素 AM 标记的 P815-S 及其对照 P815 靶细胞的细胞毒性。结果表明静脉或腹膜注射 M-ODV, 正如口服 DNA 免疫那样, 引起了剧烈的 Th1 反应, 这通过 IFN- γ 的强烈产生得到了证实(附图 6A), 还引起了 CTL 反应(附图 6B)。DNA 肌肉注射接种的反应较弱。蛋白疫苗激发了一个不明确的 CTL 反应, 但检测不到 Th1 反应。与 IFN- γ 的分泌不同, 各组别之间 IL-4 的产生没有显著的差别, 且特异性刺激后的 IL-4 的产生也没有明显增加(数据未显示)。

上面描述的结果表明动物产生的免疫应答是受疫苗配方和免疫方式影响的(表 2)。常规蛋白疫苗的反应所具有的特征是强烈的 IgG1 抗体(Th2) 反应, 并伴有弱的 Th1 和 CTL 反应(特征之 1)。肌肉注射的 DNA 疫苗激发了类似蛋白疫苗的 IgG1 抗体的强烈产生, 并引发中等强度的 T 细胞反应(特征之 2)。相反, 同样的 DNA 疫苗, 当通过载体细菌口服给药时, 激发强烈的 Th1 和 CTL 反应, 但是抗体产生较弱, 以 IgG2a 亚型为主(特征之 3)。重要的是, 活性口服 DNA 疫苗所引发的反应与注射感染了口服 DNA 疫苗的 M Φ 细胞后观察到的反应基本上相同。这意味着针对口服 DNA 疫苗的反应可能是由专门的 APC 细胞协调的, 例如 M Φ 和 DC。

讨论

我们测定了被活性口服 DNA 疫苗感染过的腹膜 M Φ 细胞的抗原性和免疫原性以评估在针对该疫苗的免疫应答中 APC 的作用。M Φ 在该免疫策略中的重要作用不仅是通过 M Φ 能表达、加工和呈递外源体病毒抗原而证实, 而且还进一步被通过静脉和腹膜注射被口服 DNA 疫苗离体感染的 M Φ 都能产生在基本上与口服 DNA 免疫所看到的相同的免疫类型所证明。

口服 DNA 疫苗包含具有质粒 DNA-HBsAg 的鼠伤寒沙门氏菌 aroA 株 SL 7207。载体细菌具有一个突变, 导致其在被细胞摄取后进行自溶 [18]。被释

放的 DNA 疫苗的表达通过在被感染细胞的裂解物中检测到小量的胞内病毒抗原得到了证实。然而，被感染的细胞并不在培养物上清液中分泌可检测量的游离抗原，而且表达的抗原量太低以至于无法通过免疫细胞学的方法直接在被感染的细胞中观察到，这至少部分地归因于这些专门的 APC 对表达的抗原的有效加工和呈递。虽然，加工过的肽不与 HBsAg 反应，但是其还是能被感染过的 M Φ 呈递，并被免疫 T 细胞联合 MHC 分子识别。所以，当被感染的细胞与来自事先被肌肉注射的 DNA 疫苗免疫过的同源小鼠的脾细胞共培养时，会刺激淋巴细胞的强烈增殖。被感染的 M Φ 还能诱导 Th1 细胞产生 IFN- γ 并刺激 HBsAg 特异性的 CTL。这些发现进一步表明加工过的抗原可以被联合 MHC II 类分子的免疫 Th 细胞及联合 MHC I 类分子的 CTLs 识别。与被感染的 M Φ 相比，P815-S 及加载 HBsAg 蛋白的 M Φ 不能有效的刺激 HBsAg 特异性的淋巴细胞增殖及 Th1 反应（表 1）。鼠伤寒沙门氏菌的一个特有的特征就是它始终限制性残留于一个膜被的室中，因此在侵入宿主细胞后与胞质环境隔绝。在被感染的 M Φ 中低水平表达的外源 HBsAg 随之被充分加工和呈递，这说明残留的已裂解的沙门氏菌可能是联合 MHC 分子呈递抗原以刺激 Th 和 CTL 反应的强有力的辅助物。

发现注射感染过的 M Φ 在动物中激发强烈的 Th1 型免疫应答。该反应通过依赖 Th1 的 IgG2a 亚型为主的抗体被弱诱导产生、强烈的抗原诱导的 IFN- γ 产生及抗原特异性的细胞毒性的出现得到了证实。这与口服 DNA 免疫后所观察到的反应基本上相同。这样就更突出了 APC 协调免疫应答的重要作用。以前的研究揭示免疫是通过一个感染过程导致的。伴随发生的炎症反应似乎保证了专门的 APC 细胞通过吞噬作用和转胞吞作用对摄入的菌体进行有效的吸收。参与的 APC 包括那些本来就位于肠粘膜中的及后来募集到感染部位的 M Φ 和 DC。免疫应答可能起始于被感染的 APC 排进淋巴集结处的区域性淋巴结的时候，且以强烈的 Th1 和 CTL 反应为主，与腹膜注射离体感染口服 DNA 疫苗的 M Φ 所引起的效果相似。

特别值得注意的是相同的质粒 DNA 疫苗肌肉注射给药后激发了截然不同的免疫特征，介于口服 DNA 免疫协调的 Th1 型反应和蛋白疫苗激发的 Th2 型反应之间。这可能归因于 APC 参与的程度及该反应类型中释放的游离抗原。肌肉注射 DNA 疫苗免疫既不诱导明显的炎症反应，又不导致吞噬性 APC 的增

加。与蛋白免疫所致的瞬间存在的大量抗原不同，肌肉细胞中的 DNA 表达的抗原是逐步释放到循环中并可能持续一个延长的时间。释放的抗原可能被 APC 摄入进行初级 Th1 型反应，或者通过 Th2 途径扩增 B 细胞以产生抗体。相反，由沙门氏菌运送的相同的 DNA 疫苗所致的以 Th1 型为主的免疫应答似乎更优选由被感染的 APC 引发的而非游离抗原引发。吞噬性 APC 可以很快的募集到感染部位，表达并呈递由细菌携带的外源基因，以协调这种类型的免疫应答。在另一方面看来，除了专门的 APC 之外，感染了口服疫苗的其他类型的细胞并不分泌足够量的病毒抗原以刺激产生 IgG1 抗体。所以，口服疫苗，象感染的巨嗜细胞一样，只能在这些动物中引发弱的抗体反应，并以 IgG2a 亚型为主。因此，同一个质粒 DNA 疫苗的不同配方可以诱导截然不同的免疫应答。

慢性 HBV 感染是世界上许多地区的重要健康议题，其主要归因于 T 细胞对该病毒的免疫耐受。通过由于天然 HBV 感染而获得免疫力的供体的免疫继承性转移，可以阻断这种免疫耐受，从而永久清除 HBV 慢性感染的病人中的 HBV。以前的研究表明用 HBsAg-抗-HBs 免疫复合物 (IC) 接种后可以实现 HBsAg 的血清转变并清除病人血清中的 HBV DNA。在一个 HBsAg 转基因小鼠模型中，我们也发现对转基因的免疫耐受也可以通过 IC+DNA-HBsAg 免疫而有效的阻断，这与其他研究者在 HBV 转基因小鼠接受过继性细胞因子激活的 DC 后所观察到的现象相似 [23]。推测起来，IC+DNA 的治疗效果是通过促进 APC 通过其 Fc 受体摄取疫苗及有效吞入抗原颗粒来实现的。本研究开发了吞噬性 APC 在口服 DNA 接种中的一个重要作用，即有效激发强烈的 Th1 和 CTL 反应。这样可以合理地推测，这种免疫策略有助于阻断慢性 HBV 感染的免疫耐受。关于口服 DNA 接种是否真的能阻断 HBV 转基因小鼠模型的免疫耐受并触发抗原特异性的、T 细胞介导的免疫应答的研究正在进行中。

实施例 4：诱发转基因表达长时间抑制的 ODV 的单次剂量

在免疫感受态小鼠中，发现 ODV 引起强烈的 Th1 型反应，其特征是高水平的 HBV 特异性 CTL 和 Th1 细胞反应及中等水平的 IgG2a 抗体。另一方面，蛋白疫苗引起高水平的 IgG1 抗体的产生，但不引起明显的细胞介导的免疫应答。而 DNA 疫苗产生的反应介于这两者之间时，特征是产生以 IgG1 为主的高水平抗体和中等水平的 CTL 及 Th1 反应。在该部分中，我们将进一步揭露只有口服 DNA 组合及其引起的强烈的 Th1 型免疫应答才能抑制 HBsAg 转基因

小鼠中转基因的表达。

所用的转基因小鼠是 C57BL/6J-TgN(A1B1HBV)44Bri 小鼠 (H-2^b)，从 Jackson 实验室 (USA) 获得，鼠龄 8—12 周，体重 16—18g，这些动物的肝和肾中含有并表达 HBsAg 基因[21]。在胚胎阶段转基因的表达明显的在这些动物中引起一个免疫耐受状态以至于它们不产生可检测的 HBV 特异性抗体或免疫 T 细胞。正如图 7 所示的对照动物例证的那样，也是该特定株的转基因小鼠的一个特殊特征，就是其血清中的病毒抗原含量随着鼠龄的增长而增加。血液中病毒抗原的积累推测是因为抗原产生和释放到血液中的速度超过了其从血液中清除的速度。

我们进行了两个系列的试验。一个系列中每 5—6 个动物一组，对其处理超过 12 个星期以比较不同疫苗的效果。两组动物口服单次剂量的 ODV 或 BC，另外两组每隔 3 星期肌肉注射 4 剂量的 DNA 疫苗或蛋白疫苗，第五组是不经处理的对照组。设计另外一个系列的试验以证实口服 DNA 疫苗超过 4 星期的短期效果，该系列使用 2 组各 12 个动物，一组被给予 ODV，另一组被给予 BC。

两系列的试验结果一致表明单剂量的 ODV 足以抑制这些动物中的转基因。在第一个系列的试验中有一个动物在被给予 ODV13 天后死于暴发性肝炎，这个组中的另外 5 个活着的动物在处理 12 个星期后其肝组织的平均病毒 RNA 含量比从对照的未免疫动物中测得的相应值多降低了 4 倍以上 (表 3)，而这两组动物的平均转基因含量基本上是相同的。免疫染色进一步表明了在对照的未免疫动物肝切片上大量的肝细胞对病毒抗原发生了免疫应答，在被免疫的动物中有相当大但不同比例的肝细胞对病毒抗原阴性着色 (图 8)。两组动物肝切片的 H&E 染色是正常的，但是，从被给予 ODV 后死于暴发性肝炎的动物中获得的解剖材料除外 (图 9)。后者动物的肝切片表现出强烈的淋巴细胞浸润并伴随着嗜酸性肝细胞的变性。其他的疫苗对这些动物的转基因表达没有影响。在用 DNA 或蛋白质疫苗反复免疫后，肝组织的平均病毒 RNA 含量基本上和对照的未免疫动物或被给予 BC 的动物相同 (表 3)。来自这两组免疫动物的大部分肝细胞与对照动物的肝细胞一样也与病毒抗原反应 (未显示)。

表3
肝组织中 HBsAg DNA 和 mRNA 的检测

组号	免疫原	DNA	mRNA	比较组	P	
		(\pm SD) pg/mg 肝	(\pm SD) pg/mg 肝		DNA	MRNA
1	蛋白质疫苗	26 \pm 15	91 \pm 56	37315	0.495	0.013
2	DNA 疫苗	26 \pm 7	99 \pm 14	37316	0.466	<0.001
3	口服 DNA 组合物	26 \pm 7	22 \pm 11	37318	0.452	0.004
4	细菌载体	26 \pm 8	111 \pm 60	37319	0.484	<0.001
5	未免疫的	25 \pm 8	95 \pm 20	1245	>0.430	>0.280

在第二个系列的试验中进一步研究 ODV 对转基因表达的抑制，动物在给予 ODV 后在第一周和第四周期间隔周杀死，对其肝切片进行的免疫染色表明转基因表达的抑制最早发生在免疫后第 2—3 个星期，该抑制由肝组织的 HBsAg 反应性的降低证实。与给予组合物 12 个星期后观察到的抑制效果相反，早期的抑制伴随着显著的以局灶性炎症和肝细胞变性为特征的肝病变（图 10），在第 2 和第 3 个星期样品中的血清 ALT 水平也升高，在第 4 个星期回复到正常水平（图 11）。在第 4 周肝病变消退，血清 ALT 也回复到正常水平，但此时在肝损伤不存在的情况下转基因的表达仍然被抑制，与免疫后 12 个星期的情形一样。

因此，两个系列的试验结果表明转基因的抑制最初主要受细胞病变机制的影响并伴随着肝炎高峰，后来，抑制主要通过最小病变相关的非细胞病变机制保持一个延长的时期，从前者机制到后者机制的转换被表明大约发生在给予 ODV 后的 4 周中。该组合物在这些动物中引起一种强烈的 Th1 型反应，如同在早些的实施例中所描述的其在免疫感受态小鼠中引起的反应一样（表 4）。当首次观察到转基因抑制现象时，抗体产量在两周后达到顶峰水平（图 12），HBV 特异性 Th1 和 CTL 活性在接受 ODV 后的两周里显著增加（表 4）。这种时间

关系表明了转基因的抑制可能主要是由于免疫，而不是由于先天的机制，虽然后者也可能是其影响因素。该观点被利用细菌载体获得的结果支持，该细菌载体激活先天机制，但不能引起特异性免疫应答，也不能抑制转基因的表达。

表 4

在 HBs-Tg 小鼠中由口服 DNA 组合物诱发的早期 Th1 和 CTL 反应

免疫后周数	免疫原	HBsAg 诱发的 IFN- γ 平均值 pg/mg \pm SD	CTL 活性 HBsAg 靶细胞裂解 (%) E : T = 30 \pm SD
1	口服 DNA 组合物	372 \pm 54	24 \pm 2
	细菌载体	192 \pm 49	17 \pm 1
2	口服 DNA 组合物	1986 \pm 164	45 \pm 2
	细菌载体	420 \pm 64	21 \pm 2
3	口服 DNA 组合物	2636 \pm 335	43 \pm 3
	细菌载体	268 \pm 65	23 \pm 3
4	口服 DNA 组合物	2786 \pm 513	38 \pm 2
	细菌载体	267 \pm 27	16 \pm 2

由 DNA 疫苗，例如那些也能破坏免疫耐受性（虽然效果比 ODV 差）但不能抑制转基因表达的 DNA 疫苗，诱发的免疫状态与 ODV 诱发的免疫状态相比，差别非常大，这个结果突出显示了疫苗组合物中具有这两个特征的结合以有效抑制转基因表达的重要性。因为转基因小鼠表现出慢性 HBV 感染所常见的免疫耐受性，这个发现使 ODV 成为治疗乙型肝炎病毒慢性感染的一种理想疫苗候选物。更一般的，可以预见到这两个特征的同样结合在治疗其他慢性病毒感染，包括 HIV 感染的疫苗配方中是重要的。

下文提供了有关实施例 4 的更详细的讨论，在 HBsAg 转基因小鼠模型中，用递送质粒 pRc/CMV-HBsAg（口服 DNA 疫苗）的鼠伤寒沙门氏菌 *aroA* 进行口服免疫，用同样的质粒 DNA 和重组蛋白 HBsAg 进行肌肉免疫，比较两者的治疗效果。单剂量的口服 DNA 疫苗能阻断对转基因编码的 HBsAg 的免疫耐受性，而产生强烈的 Th1 型淋巴细胞反应和抗 HBs 的 IgG2 亚型产物。虽然重

复剂量的肌肉注射给予蛋白或 DNA 疫苗可以在不同数量水平上分别逆转免疫无反应性, 但只有口服 DNA 疫苗对肝细胞中的病毒转基因的转录和表达产生下调。在肝组织中病毒 mRNA 的水平降低超过 4 倍, 病毒抗原的表达显著降低, 被限制在肝切片的小且分散的灶中。而且, 由口服 DNA 疫苗导致的免疫耐受性的逆转可以通过在肝组织中发生的早期短暂的炎症反应及于前第 3 周升高、随后又回复到正常水平的 ALT 来证实。早期的下调显然是归因于非细胞病变和细胞病变途径, 但后来转变为非细胞病变途径。这种免疫策略的机制可能包括活性细菌的感染、包含 APC 和 NK 细胞的快速募集在内的天然的免疫应答、炎症细胞因子的激活和细菌的辅助影响之间的相互作用。所有的这些作用都可能增强内源性病毒抗原被活化的 APC 呈递, 并引起强烈的 Th1 型宿主免疫应答。

材料和方法

小鼠

C57BL/6J-TgN(A1b1HBV)44Bri 小鼠 (H-2^b) 由 Jackson 实验室 (USA) 提供, 该小鼠证实是血清 HBsAg 阳性。用于研究的总共有 52 只 HBs-tg 小鼠 (27 只雄性, 25 只雌性), 鼠龄 8—12 星期, 重 16—18g。非转基因的 C57BL/6J(H-2^b) 和 Balb/c (H-2^d) 小鼠在香港大学动物实验室 (the Laboratory Animal Unit of the University of Hong Kong) 的标准无病原体条件下饲养, 该标准列于“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH 出版社 86—23, 1985)。

细菌菌株和质粒

鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株 SL 7207 (S. ty) 由 D.Stoker 博士提供, 在该研究中作为口服 DNA 疫苗的载体。DNA-HBsAg (pRc/CMV-HBs) 由 R.Whalen 博士赠送, 用于转化 S.ty (口服 DNA 疫苗) 和肌肉注射免疫 (DNA 疫苗)。

免疫方案和评价

28 只 HBs-tg 小鼠被编号, 随机分成 5 组 (5 到 6 只小鼠一组), 两组用相同剂量的巴比妥钠麻醉, 肌肉 (两只后腿的胫骨前肌) 注射 每剂 2 μ g 的商业蛋白 HBsAg 疫苗 (HB-VAX II, MSD, USA) (蛋白疫苗) 或每剂 100 μ g 的 DNA 疫苗, 每隔 3 星期注射一次, 共注射 4 次。另外两组的每只小鼠喂食单次剂量的含有 6×10^9 集落形成单位的口服 DNA 疫苗或仅细菌载体 S.ty。第 5 组的 5 只未免疫小鼠作为对照。在免疫前和免疫后每 3 个星期从小鼠中收集血

清样品，检测其 HBsAg、抗 HBs 和丙氨酸氨基转移酶（ALT）的水平。在第 12 星期，将小鼠杀死，取其脾、肝、肾来评价免疫后肝和肾组织中的细胞免疫应答、转基因 DNA 和 mRNA 及免疫组织病理学的改变。

因为发现口服 DNA 疫苗引起早期免疫应答，并在第 3 周伴随着血清 ALT 水平的短暂升高，因此，补充另外一个系列的 24 只 HBs-tg 小鼠作进一步的研究。它们被随机分成两组，一组用一个剂量的口服 DNA 疫苗免疫，另一组用载体细菌对照免疫。每星期收集血清样品共计 4 星期，测量抗体和 ALT 的水平。分别在第 1、2、3、4 周杀死每组中的 3 只小鼠，收集脾、肝、肾以检测早期炎症反应。非 tg C57/6J 和 Balb/c 小鼠各 12 只也用口服 DNA 疫苗或其空白细菌对照接种，在开始的 3 个星期里每星期从这些动物中收集血清，检测 ALT 水平，鉴定肝损伤是否是由细菌毒性影响而导致的。

血清学和生物化学分析

血清 HBsAg 和抗 HBs 用 ELISA (BIOKIT, S.A.Spain) 分析，并由一系列 HBsAg 校准器 (Abbott Diagnostics, Chicago, USA) 和试剂盒提供的抗 HBs 标准阳性对照定量。用同样的试剂盒通过 ELISA 鉴定这些抗体的亚型，分别用 HRP 偶联的绵羊抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2 (SeroTec, UK) 代替。通过用 Vitros 950 dry-chemistry 分析仪 (Ortho Clinical Diagnostics, Inc, Rochester, NY, USA) 进行多点比色 (multiple-point rate colorimetric) 法来测定血清 ALT 水平而监测肝细胞的损伤。

接种后 T 细胞介导的反应的检测

将各个小鼠的脾细胞以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度悬浮在 10% 的 FCS-RPMI 1640 中，用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯 HBsAg (Aldevron, Fargo, ND, USA) 刺激三天，在刺激后 24、48 和 72 小时收集培养物的上清液以使用 OptEIA 试剂盒 (PharMingen, USA) 通过 ELISA 分别检测干扰素 IFN- γ 和白介素 IL-4。

在存在 25IU/ml 小鼠 rIL-2 (R&D Systems, USA) 的情况下进一步培养细胞 4—5 天，用标准四小时钙黄绿素释放分析法一式三份在 U 形底 96 孔微孔板上检测脾细胞的 CTL 活性，在 CTL 分析中使用的靶细胞是正常 C57/6J 小鼠的脾细胞，该细胞被 10PFU/细胞的牛痘 HBsAg 病毒 (Vac-HBsAg) 或作为阴性对照的空白牛痘病毒 (Vac 空白) 感染了 12 小时，上述两种病毒都由 Y.Wong 博士赠送。通过测量荧光强度 (FI) 来鉴定靶细胞的裂解，特异性裂解的百分

比通过下式计算:

$$(1 - \frac{\text{实验测得的 FI} - \text{总裂解 FI}}{\text{总对照 FI} - \text{总裂解 FI}}) \times 100\%$$

通过 PCR 和 RT-PCR 半定量转基因 DNA 和 mRNA

用 QIAamp DNA 迷你试剂盒 (Qiagen, USA) 和 mRNA 分离试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 分别从小鼠的肝组织中提取 DNA 和 mRNA。第一链 cDNA 用 RNA H⁺ 逆转录酶 (Life Technologies, USA) 合成, 接着进行一个 PCR 循环。利用 HBsAg 区域的一组内部引物(正向 5'-AAC ATG GAG AAC ATC ACA TC-3'; 反向 5'-AGC GAT AAC CAG GAC AAG TT-3'), 通过 LightCycler PCR (LC-PCR) 对 HBsAg 转基因 DNA 和转基因编码的 mRNA 进行定量分析, 得到一个 203bp 的产物。根据该 203bp 的产物设计一个供体荧光素探针 (5'-ATT GAG AGA AGT CCA CCA CGA GAC TAG AC-荧光素-3') 和受体 LightCycler-Red 640 探针 (5'-LC-Red 640-CTG TGG TAT TGT GAG GAT TCT TGT CAA CAA G-3') 进行分析。根据制造商的描述利用 LightCycler-FastStart DNA Master 杂交探针试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 和 LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 进行 LC-PCR。Hybrid CaptureII (HCII) 分析 (Digene Corp, Beltsville, MD, USA) 校准器 5 中的范围从 0.015pg/ml 到 150pg/ml 的 10 倍系列稀释液被用于作为定量对照。

免疫组织病理学研究

肝和肾部分立即在液氮中冷冻或固定在 10% 的缓冲甲醛中, 包埋在石蜡中, 制成 4 或 6 μm 厚的切片, 固定在载玻片上。用苏木精和曙红 (H&E) 染色检测组织病理学改变, 而用山羊抗 HBsAg、兔抗山羊生物素标记抗体和链亲和素-HRP-偶联物 (DAKO, USA) 根据标准方法通过免疫组织化学染色来检测肝组织中的病毒基因的表达。

统计学分析

组间差异的显著性是通过成对 Student's T-检验来分析的。

结果

口服 DNA 疫苗抑制血清 HBsAg 的积累

所有 5 组 HBs-Tg 小鼠在第 0 个星期获得的样品中的血清 HBsAg 水平基

本上是相同的 ($p>0.30$)。在细菌载体和未免疫组中,血清抗原水平在观察的 12 周期间内持续升高,平均值分别从原来的 $60\pm 9\text{ng/ml}$ 和 $59\pm 14\text{ ng/ml}$ 升到第 12 星期的 $162\pm 10\text{ ng/ml}$ 和 $176\pm 15\text{ ng/ml}$ 。明显的,表达的抗原分泌到外周血液中的速度超过了其清除速度,以至于在整个试验过程中血液中的抗原积累升高。在用蛋白质或 DNA 疫苗肌肉注射免疫过的动物中,血清抗原水平分别从原来的 $60\pm 5\text{ng/ml}$ 和 $58\pm 7\text{ng/ml}$ 升到第 3 星期的 $130\pm 35\text{ ng/ml}$ 和 $114\pm 29\text{ ng/ml}$ 。随后,在蛋白质疫苗免疫组中血清水平保持不变,而在 DNA 免疫组中稍有降低,在第 12 周降到 $94\pm 6\text{ng/ml}$ 。相反,在被给予单剂量的口服 DNA 疫苗的动物中,血清抗原的积累早在第 3 周就被抑制,且血清 HBsAg 水平在 12 周的期限内自始至终都比其他组要低 ($p>0.01$)。

口服 DNA 疫苗引起快速的特异性抗体反应

在被给予单剂量口服 DNA 疫苗的 HBs-tg 小鼠中,血清抗 HBs 迅速升高,在第 2 周达到 $45\pm 8\text{mIU/ml}$ (图 12),随后稍微升高,在第 12 周达到 $74\pm 20\text{mIU/ml}$ (图 12),在这些动物中还伴随着 HBsAg 积累的停止。相反,用 3 剂量的蛋白或 DNA 疫苗肌肉注射接种和加强的动物直到第 9 周后仍没有产生明显的针对 HBsAg 的抗体反应。给予这些动物一个额外的加强剂量引起特异性抗体反应,在第 12 周分别达到 36 ± 26 和 $167\pm 53\text{mIU/ml}$ 。从两组对照小鼠中获得的所有血清样品在整个试验过程中都一致的是阴性。

口服 DNA 疫苗引起强烈的 Th1 和 CTL 反应

在第 12 周获得的血清样品被进一步测定病毒抗体总 IgG、IgG1 和 IgG2 亚型的含量(图 12)。在口服 DNA 免疫动物中,诱导的抗体主要是亚型 IgG2,肌肉注射蛋白免疫主要引起 IgG1 亚型抗体反应,针对肌肉注射 DNA 疫苗的特异性抗体反应主要为亚型 IgG1 伴随着可检测量的亚型 IgG2。

用纯化的 HBsAg 刺激从被免疫和对照动物中获得的脾细胞,通过 IFN- γ 和 IL-4 诱导分析分别检测活化的 Th1 和 Th2 细胞,在第 12 周从口服 DNA 免疫小鼠中获得的脾细胞产生最高水平的 HBsAg 诱导的 IFN- γ ,在刺激后 72 小时达到 $2801\pm 480\text{pg/ml}$,这明显比用 DNA 疫苗(在第 72 小时为 $2044\pm 639\text{pg/ml}$, $p=0.03$)和蛋白质疫苗(在第 72 小时为 $607\pm 639\text{pg/ml}$, $p<0.01$)肌肉注射免疫的其他组高得多,在对照动物的脾细胞培养物中没有检测到明显的 HBsAg 诱导的 IFN- γ 。与 IFN- γ 的分泌不同,在用口服 DNA 疫苗免疫的动物中 IL-4 产

量没有发现明显的增加,用蛋白质和 DNA 疫苗肌肉注射免疫的小鼠的培养物中只发现低水平的 IL-4 (数据没有显示)。从用口服 DNA 疫苗免疫后 1 周的 HBs-tg 小鼠中获得脾细胞的 72 小时培养物中可以检测到 IFN- γ 的分泌,此后,这种细胞因子的水平迅速升高,在第 2 周达到 $1986\pm 164\text{pg/ml}$,在第 3 周达到 $2636\pm 335\text{pg/ml}$,在第 4 周达到 $2786\pm 513\text{pg/ml}$ 。在用细菌载体免疫的小鼠的脾细胞的 72 小时培养物中,分泌的 IFN- γ 要低得多,在第 1 到 4 周分别达到 192 ± 49 、 420 ± 64 、 268 ± 65 和 $267\pm 27\text{pg/ml}$ 。

在用口服 DNA 疫苗免疫或被肌肉注射给予 DNA 疫苗的动物中,小鼠的脾细胞对 Vac-HBsAg 感染的靶细胞具有强烈的细胞毒性,但是对于病毒对照靶细胞不表现出细胞毒性。在蛋白 HBsAg 免疫小鼠和对照动物中几乎不诱发 CTL 反应。重要的是,早在它们接受口服 DNA 疫苗后的 2 周内,在小鼠的脾细胞培养物里就能检测到强烈的抗原特异性细胞毒性,虽然伴随着低水平的 Vac 空白感染的对照靶细胞的非特异性细胞裂解。被给予细菌载体小鼠的脾细胞培养物也表现出了低水平的非特异性 Vac-HBsAg 和 Vac 空白靶细胞裂解,这表明载体细菌自身的感染可以诱发非特异性的先天免疫应答。

总的说来,口服 DNA 疫苗引起明显的 Th1 型反应,该反应以 IgG2 亚型抗体反应、早期强烈的抗原诱导的 IFN- γ 和强的 CTL 活性为特征。由细菌载体感染而导致的先天性免疫应答可能先于这种特异性细胞反应。蛋白质疫苗引起弱的 Th2 型反应,但是动物并不表现出明显的 Th1 和 CTL 反应,而肌肉注射 DNA 免疫引起 IgG1 抗体、Th1&2 和 CTL 反应。

口服 DNA 免疫下调肝组织中的 HBsAg 转基因的转录和表达

与被给予细菌载体(图 7B)和其他疫苗(数据没有显示)的小鼠对 HBsAg 均匀着色的肝组织相比较,6 只被给予口服 DNA 疫苗小鼠的肝组织产生较少的 HBsAg 阳性肝细胞(图 7A)。HBsAg 的表达降低的程度在动物中是变化的,在两只小鼠中最显著,在这两只小鼠的肝切片中斑片状区域 HBsAg 着色显阴性。从肝组织中提取 DNA 和 mRNA 以检测 HBsAg 转基因的量和转录水平(表),在不同组动物($p>0.43$)中转基因 DNA 的含量是相同的,对于对照小鼠和其他的接受 DNA 蛋白疫苗小鼠,病毒转录 mRNA 的水平基本上是相同的,但是,发现口服 DNA 疫苗降低了病毒转录的水平至少 4 倍($p<0.02$)。因此,这个结果表明在肝细胞中由于口服 DNA 疫苗而导致的 HBsAg 表达的抑

制可能主要是由于肝组织中 HBsAg-mRNA 转录的下调。

在免疫的早期阶段口服 DNA 疫苗引起短暂的炎症反应和肝损伤

值得注意的是口服 DNA 疫苗导致强烈的炎症反应，在接种 13 天后由于暴发性肝炎致使一只 (1/15) 死亡，根据表现出强烈淋巴细胞浸润的肝特征病理学证实了严重肝炎的诊断。在肝切片 (图 8A, 3-F) 可以看到单核炎症细胞主要是淋巴细胞的局灶性聚集和分散肝细胞中的空泡变性。轻度的和局灶性的淋巴细胞浸润在 1 周时于第 3 和 4 组的小鼠的肝组织中被发现 (图 9, A-3a 和 A-4e)，第 3 组样品中的淋巴细胞浸润在第 2 周变得最强烈，其标志是淋巴细胞中嗜曙红细胞的降解 (A-3b)，但随后变弱 (A-3c 和 A-3d)。第 4 组的肝组织也在第 2 周表现出强烈的淋巴细胞浸润 (A-4f)，但比第 3 组要轻，在随后的样品中肝活性降低，有丝分裂的肝细胞出现 (A-4g&4h)。

免疫后第 3 周，第 3 组活着的小鼠中的血清 ALT 水平明显升高，比接种前大约高了 14 倍 ($p < 0.001$)，但是这种升高是暂时的，在随后的样品中 ALT 回复到正常水平 (图 10A)。被给予细菌载体的对照动物在第 3 周也表现出 ALT 水平的中度升高，但是其水平比口服 DNA 免疫小鼠 ($p < 0.001$) 的水平要低得多，这种肝损伤也是暂时的，在随后 ALT 回复到正常水平。在免疫后前 4 周进行的详细研究表明口服 DNA 免疫小鼠的血清 ALT 水平在第 1 周升高，达到最高水平 $2203 \pm 153 \text{U/ml}$ ，随后降低，到第 4 周几乎达到正常水平 (图 10B)。这不可能与细菌毒性影响有关，因为非转基因 C57/6J 和 Balb/c 小鼠在接受口服 DNA 疫苗和其细菌载体后其 ALT 水平没有发生改变 (数据没有显示)，被给予蛋白质或 DNA 疫苗的动物和未免疫的小鼠在整个试验过程中具有正常的 ALT 水平。而且，在免疫最后发现所有组的动物的肝组织都没有明显的组织病理学改变，包括用口服 DNA 疫苗 (图 8A、3A 到 3E) 和细菌载体 (图 8B、4A 到 4E) 免疫的动物。

口服 DNA 疫苗在早期阶段诱发 HBsAg 转基因的细胞病变性和非细胞病变性抑制

口服 DNA 疫苗通过细胞病变和非细胞病变两种途径引发早期抑制肝组织中的转基因的表达 (图 9B)，该肝细胞表现出弥散的 HBsAg 免疫应答性，在 2 周的小鼠 (图 9B-3j) 和接受口服 DNA 免疫后第 13 天死亡 (图 7A, 3F) 的小鼠的肝切片中发现免疫应答性肝细胞显著减少。这些肝表现出严重的肝细胞

浸润，由肝细胞裂解产生的区域缺失，HBsAg 阳性肝细胞的嗜曙红细胞变性和很少的抗原阴性正常肝细胞。在 3 和 4 周的肝样品中，病毒抗原的表达仍然被明显的抑制，淋巴细胞浸润减弱，其特征是 HBsAg 阳性坏死和 HBsAg 阴性正常肝细胞增加，并伴随着肝细胞的嗜曙红细胞变性的减少。在第 1 周，第 3 和 4 组肝组织中的 HBsAg 表达没有明显差别（图 9B-3i 和 4m）。然而，用细菌载体免疫的动物经历了一个短暂的转基因的细胞裂解抑制，如图 9B-4n，而在第 3 和 4 周的随后样品中并不显示出非细胞裂解抑制（图 9B-4o 和 4p）。既然在免疫后第 2 到 4 周从口服 DNA 免疫小鼠中获得的脾细胞均表现出特异性和非特异性细胞毒性，而从细菌载体免疫小鼠中获得的脾细胞仅仅表现出非特异性细胞裂解活性，因而该结果表明前者在早期阶段的抑制效果最初是由细胞裂解途径引起的，后来转变为非细胞裂解途径，而后者仅仅只有非细胞裂解途径。

讨论

在该研究中，我们比较了三种配方不同、给药途径不同的疫苗对 HBs-tg 小鼠的 HBsAg 免疫耐受状态的治疗效果。我们的结果表明：虽然不同的疫苗和配方以一定的量都能改变 HBs-tg 小鼠常见的免疫无反应性，但是只有口服 DNA 疫苗抑制病毒转基因的表达。

与以前的研究一致，我们的研究表明用三剂量的蛋白质或 DNA 疫苗肌肉注射免疫不能在 HBs-tg 小鼠中诱发产生明显的 HBsAg 的免疫应答。使用蛋白质疫苗，通过检测出低水平的 IgG1 亚型占优势的抗体证实免疫能力的改变仅发生在免疫 9 周之后。这些动物也表现出弱的 Th2 反应，但是他们不表现出可检测的特异性 CTL 或 Th1 活性。通过给予第三次加强剂量，肌肉注射 DNA 疫苗引起强烈的抗体反应，该反应主要是 IgG1 亚型和 Th 及 CTL 反应。在给予第二剂量的 DNA 疫苗和第三剂量的蛋白质疫苗之后抗原积累被抑制，但是各组动物这样获得的免疫性还不足以控制病毒基因的表达。在肝组织中检测到的转基因 mRNA 的水平和这些小鼠中表达病毒抗原的肝细胞的量和对照动物基本上是相同的。在血清样品中病毒抗原积累的抑制可以解释为抗原和新产生的抗体以免疫复合物的形式从外周血液中被更有效的清除，可能抗原作为免疫复合物比作为游离抗原更不易检测到。这个结果表明给予重复剂量的这两种疫苗对于改变 HBsAg 免疫能力是必需的，使用连续剂量产生的加强效果可能是由于炎症反应增强和接种位点 APC 的募集。我们的结果不同于 Mancini 等的结果，

他们的结果表明肌肉注射一剂量的 DNA 疫苗诱发 HBV-Tg 小鼠的血清 HbsAg 清除和肝组织中的转基因表达的下调。这可能是由于使用了不同的 Tg 小鼠系, 在他们的试验中使用的是 E36, 而在我们的试验中使用的是 44Bri。

单剂量的口服 DNA 疫苗引起以 CTL 和免疫 T 细胞亚型 Th1 发生强烈反应为特征的 Th1 型反应, 并依赖 Th1 产生 IgG2 亚型抗体, 从而使 HBs-tg 小鼠中的血清 HBsAg 降低。重要的是, 宿主肝细胞中的 HBsAg 基因的转录和表达明显通过接种疫苗被抑制。与其他的疫苗相比较, 口服 DNA 疫苗的效果至少部分归功于专门 APC 呈递内生抗原所协调的免疫应答。我们以前的研究表明由口服 DNA 疫苗产生的免疫在肠道中引起一个主动的胞内感染过程, 这可以通过诱导抗沙门氏菌的 IgG2 亚型抗体来证明, 还可以通过这种口服 DNA 疫苗的热失活形式和含有同样质粒 DNA 但不引起特异性免疫应答的大肠杆菌 (*E.coli*) 来进一步证实。显然, 疫苗细菌被原位 APC 和募集到感染部位的 APC 有效的摄取。由于存在一种突变 (*AroA*), 载体细菌被 APC 吞入后不久即自溶, 被释放的 DNA 疫苗进入核, 其携带的基因在 APC 中被有效表达, 产生的细菌残片能作为一种佐剂上调表达在细胞膜与 MHC 上呈递的抗原。发现由 APC 进行的内源性抗原的呈递和伴随发生的细菌内毒素激活作用在小鼠中引起 Th1 型反应, 该反应的特征是诱发产生 IgG2 抗体、强烈的 Th1 细胞和 CTL 反应。发现注入预先用口服 DNA 疫苗感染的活性腹膜巨噬细胞, 产生与口服 DNA 疫苗基本相同的免疫应答类型, 这证明了 APC 在针对疫苗的协调免疫应答中的重要作用。在微环境中比先天免疫应答次要的炎症细胞因子的存在可以更进一步激活原位的和募集的 APC, 这可能是通过共刺激分子, 如 II 类 MHC 和 B7 的上调实现的, 其中的共刺激分子不仅向 T 细胞刺激信号, 还传递存活信号。另外, 最近有报道鼠伤寒沙门氏菌感染能刺激 DC 以增加 IL-12 的分泌, IL-12 是引起特异性免疫应答的最初信号。

我们的结果表明了仅口服疫苗能抑制肝组织中的转基因的表达。有其他研究者进行的在先研究表明基于蛋白质和基于 DNA 的疫苗引起特异性体液和细胞免疫应答, 从而清除血清病毒抗原, 但是不能抑制肝细胞中的病毒基因的表达。这些治疗性疫苗候选物不能引起肝炎高峰。而且, 在 HBs-tg 小鼠的肝中细胞因子激活的 DC 或特异性 T 细胞的继承性转移也不能够阻止转基因的表达, 也不表现特异性 T 细胞的浸润。我们的方法的最大的区别特征是口服 DNA

疫苗引起沙门氏菌的主动胞内感染，该感染激活包括 NK 和 NKT 细胞在内的先天的免疫系统。激活的 NK 细胞可以回复其效应物功能，如，致使靶细胞裂解和产生炎症细胞因子，从而在 HBs-tg 小鼠的肝中产生轻度炎症和组织损伤。这和我们观察到的是一致的，我们观察到细菌载体疫苗在 HBs-tg 小鼠的肝中也导致轻微的短时间非特异性细胞反应和肝损伤，而在正常小鼠的肝中不导致同样的细胞反应和肝损伤。接着，先天的免疫应答可能引起微环境的未知改变，该改变使适应性 CTL 浸润肝并影响靶细胞，如以前的报道所述，由于不相关的细胞内感染而使肝中的病毒基因表达中止。

口服 DNA 疫苗免疫小鼠的肝组织中的转基因抑制在早期阶段可以通过细胞病变性和非细胞病变性两种途径来实现，在开始的 4 个星期对小鼠进行肝免疫组织病理学研究可以证明这一点。细胞裂解反应在第 2 个星期最为突出。在这个时候获得的肝切片，包括从第 13 天死亡的小鼠中获得的肝切片，表现出高强度的肝细胞的细胞裂解性缺乏和嗜曙红细胞变性，只有少数正常细胞。先天性免疫应答诱导的炎症细胞因子，如 IL-2 和 IFN- γ 可能可以刺激 I 类 MHC 和蛋白酶体亚基在肝细胞中表达，从而增强了这些靶细胞中的病毒表位的加工和呈递，这可能有利于特异性 CTL 介导的细胞裂解效果。无论作何种解释，在第 4 周内细胞裂解活性降低，随后的样品中坏死的 HBsAg 阳性肝细胞和正常的 HBsAg 阴性肝细胞增多。自此以后转基因抑制可能仅由非细胞裂解途径维持，因为测定这些小鼠中的血清 ALT 水平和肝切片的组织病变没有发现可检测的肝损伤。使细胞裂解机制向非细胞裂解机制转变的体内平衡调控仍需作进一步研究，但可能归因于抗病毒细胞因子产物的增加。已经表明，CTL 和细胞因子都能抑制病毒基因表达和病毒复制而不破坏 HBV-Tg 小鼠中的那些被感染细胞。在用急性试验 HBV 感染的黑猩猩中这可能归因于抗病毒细胞因子，特别是 IFN- γ 和 TNF- α 。不相关的细胞内感染也可以通过抗病毒细胞因子的诱导而产生非细胞裂解性抗 HBV 作用。在口服 DNA 免疫小鼠中发现的 HBsAg 转基因的非细胞病变抑制可能是通过同样的机制介导的，如抗病毒 IFN- γ ，用 HBsAg 刺激后，该机制在这组小鼠的脾细胞中比其他组小鼠的脾细胞中表现得更早且更强烈。

值得注意的是该口服 DNA 疫苗在早期阶段引起强烈的炎症反应，导致免疫后 13 天一只动物死于急性肝炎，在免疫后第 2 周获得的样品中，成活小鼠

的血清 ALT 水平显著升高，但在第 4 周和随后的样品中回复到正常水平。因为几乎所有 HBs-Tg 小鼠的肝细胞都表达转基因，存活的这些小鼠（14/15）没有死于急性肝炎可能是由于在这些动物中非细胞裂解作用比细胞裂解作用更具优势。非细胞裂解作用抑制病毒基因表达的下调，防止 CTL 介导的靶肝细胞过量裂解，然而，其潜在的机制还需要更多的时间和实验进一步的调查研究。由口服 DNA 疫苗可能导致的肝炎高峰对于人的临床学意义仍有待证实，在这方面，不像 HBV-Tg 小鼠，人中只有一部分肝细胞被 HBV 感染，而且，通过进行抗病毒治疗可以使感染的肝细胞中的病毒复制和病毒抗原表达达到最小化，该抗病毒治疗有利于缓解与接种疫苗有关的肝损伤。最后，应该注意的是在 HBsAg 阳性骨髓移植受体的 HBV 的成功清除病例中显现出相似的与口服 DNA 疫苗相关的肝损伤，其中的骨髓移植受体从 HBV 免疫供体中转移了过继性免疫后患过急性肝炎。

HBV 转基因小鼠是用来研究慢性 HBV 感染中常见的免疫耐受性的唯一动物模型，虽然不能直接适用，但仍然预期它可以为免疫干预慢性人类 HBV 感染的可能性提供指导。在本研究中，我们已经表明单剂量的口服 DNA 疫苗在动物模型中不仅能引发强烈的细胞反应，还能抑制病毒基因的表达。为了更进一步的了解不同转基因小鼠模型，特别是具有活性病毒复制能力的小鼠模型中这种治疗性免疫策略的机制，还要作其他的研究，但是，现有的和以前的发现都一致表明口服 DNA 疫苗是免疫干预慢性 HBV 感染的一种可行方法。

实施例 5：减毒的存活鼠伤寒沙门氏菌所代表的乙型肝炎病毒 DNA 疫苗的独特免疫原性

通过使一个携带有乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的裸露 DNA 疫苗进入减毒的存活鼠伤寒沙门氏菌中而设计出一种针对乙型肝炎病毒（HBV）的新疫苗，通过口服途径对小鼠进行粘膜免疫表现出比重组 HBsAg 疫苗（ $P < 0.01$ ，效应细胞：靶细胞为 100：1）强得多的细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）反应，而在所有的效应物：靶细胞比例中都与裸露 DNA 的肌肉注射免疫不相上下。与以前所报道的肌肉注射给予裸露 DNA 疫苗相反，由粘膜 DNA 疫苗诱发的 IgG 抗体反应比重组 HBsAg 疫苗（第 21 天， $p < 0.01$ ）要弱。从粘膜免疫小鼠中获得的脾细胞培养物的上清液中检测到高水平的干扰素- γ 和低水平白介素-4，这支持了上述发现。区别于在预防方面有效的重组 HBsAg 疫苗，口服粘膜 DNA

疫苗应该可以作为候选疫苗,用于慢性 HBV 感染的治疗免疫、HBV 特异性 CTL 继承性转移给 HBsAg 阳性骨髓移植受体之前的供体的免疫、以及对重组 HBsAg 疫苗无反应者的免疫。这种强烈的细胞反应和相对缺乏的体液反应使该疫苗成为一种比裸露 DNA 疫苗更好的治疗慢性 HBV 携带者的疫苗候选物,因为该体液反应对于清除肝细胞中的 HBV 的重要性相对来说要低,但是该反应的存在可以在慢性 HBV 携带者中产生副作用,如血清病和免疫复合物沉降。

材料和方法

动物

雌性 Balb/c (H-2^d) 小鼠 (鼠龄 6-8 星期, 18-22g) 被用于所有动物试验, 它们被关在笼子里, 在可调节的昼长度、温度和湿度的标准条件下饲养, 随意给予块状食物和自来水。

用 pRc/CMV-HBs(S) 转染 293 个细胞

转染前一天, 将 293 个细胞在 6 孔板上铺板, 使每个装有含 10% 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM (Gibco BRL) 的孔中有细胞 1×10^7 个, 在转染时, 按照制造商的介绍, 每孔用 $1 \mu\text{g}$ 编码 HBsAg 的真核表达型质粒 [pRc/CMV-HBs(S)] 转染, 该质粒由 Robert Whalen 博士赠送, 或用含有 FugENE6 试剂 (Boehringer Mannheim, Germany) 的蒸馏水转染 (阴性对照), 转染 48 小时后, 收集细胞, 通过冰冻融解 3 次使其裂解, 14000rpm 离心, 上清液用来测定 HBsAg。

用被 pRc/CMV-HBs (S) 转化了的鼠伤寒沙门氏菌胞外转染巨噬细胞

溶在 1ml 无血清 RPMI (Gibco-BRL) 中的 100 微升 Concanavalin A (Sigma) 被腹腔注射到 2 只 Balb/c 小鼠中, 3 天后将这些小鼠安乐死, 用 10ml 无血清 RPMI 冲洗小鼠的腹腔, 收集原代腹腔巨噬细胞, 冲洗两次后, 合并巨噬细胞, 用无血清 RPMI 以 5×10^6 细胞/ml 重悬, 这些巨噬细胞在 6 孔板中以 2×10^7 细胞每孔 37°C 培养 2 小时, 除去非粘附细胞并用无血清 RPMI 冲洗两次后, 用营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株 SL7207 (鼠伤寒沙门氏菌 2337-65 来源的 hisG46, DEL 407 [aroA: Tn10 {Tc-s}]) 或用 MOI 10 的营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株 SL7207 (阴性对照) 转染巨噬细胞, 其中营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株 SL7207 被 pRc/CMV-HBs (S) 转化, 由 Bruce Stocker 博士赠送。培养物在 37°C 被进一步培养 30min, 冲洗两次后, 在补充有 10% FCS 的 RPMI ($50 \mu\text{g/ml}$) 中额外加入庆大霉素杀死残留的胞外细菌, 37°C 温育 4 小

时后, 额外加入四环素 ($10 \mu\text{g/ml}$) 抑制细胞中的细菌增殖, 在 37°C 温育培养物, 在 24、48 和 72 小时收集细胞, 冰冻溶解 3 次使其裂解, 14000rpm 离心后, 收集上清液用于测定 HBsAg。

乙型肝炎表面抗原的测定

100 微升每种细胞的裂解液被加到一个用豚鼠抗 HBsAg 抗体 (Biokit, Spain) 包被的 ELISA 平板中, 37°C 保温该平板 1 小时, 用冲洗液冲洗 3 次, 根据制造商的指导稀释 $100 \mu\text{l}$ 过氧化酶偶联的山羊抗 HBsAg 抗体, 将其加到孔中, 37°C 培养 30min, 用冲洗液冲洗 3 次后, 将 $100 \mu\text{l}$ 稀释的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 加到各个孔中, 室温下 (RT) 培养 30min, 加入 $100 \mu\text{l}$ 1M 的 H_2SO_4 , 在 450nm 处测量每孔的吸收值, 用 TMB 缓冲液作为空白, 每个样品测两份, 计算每个血清的平均吸光度。

免疫程序

24 只 Balb/c 小鼠被用于免疫试验, 每组 6 只小鼠, 在第 0 天分别用 pRc/CMV-HBs(S)肌肉注射免疫 (胫骨前肌肌肉) (每只小鼠 $100 \mu\text{g}$, DNA 免疫组)、用被 pRc/CMV-HBs(S)转化了的营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株 SL7207 口服免疫 (每只小鼠 6×10^9 个细菌细胞, 粘膜 DNA 疫苗组)、用 HBsAg 疫苗和硫酸铝佐剂腹膜注射免疫 (H-B-VAX II, MSD, 每只小鼠 $0.5 \mu\text{g}$, 蛋白质疫苗组) 或用鼠伤寒沙门氏菌 aroA 菌株口服免疫 (每只小鼠 6×10^9 个细菌细胞, 对照组)。

抗 HBsAg 的血清抗体的测定

每组的小鼠在第 1, 7 和 21 天被放血, 将血液在 $2700 \times g$ 离心 20min, 抗体测定之前将上清液 (血清) 贮藏在 -70°C 。

将小鼠血清 (用 PBS-2% BSA 稀释) 加到用 HBsAg (Biokit, Spain) 包被的 ELISA 平板中, 在 37°C 温育该平板 1 小时, 用洗液冲洗 3 次后, 根据制造商的指导用 PBS-2% BSA 稀释 $100 \mu\text{l}$ 过氧化酶耦合的山羊抗鼠抗体 (Zymed Laboratories Inc.), 将其加到孔中, 37°C 温育 30min, 检测 IgM 和总的 IgG 水平以测定一级和二级免疫应答, 而 IgG1 和 IgG2a 被用来检测体液反应是否分别偏向 Th2 或 Th1 模式。用冲洗缓冲液冲洗 3 次后, $100 \mu\text{l}$ 正亚苯基乙二胺 (orthophenylenediamine) (OPD) 底物 (将 2mgOPD [Calbiochem] 稀释在含有 $2.5 \mu\text{l}$ 30% 的 H_2O_2 的 2.5ml 50mM 柠檬酸 [pH 5] 中制得) 被加到每个孔中, 室温下

温育 30min, 加入 100 微升 1M 的 H_2SO_4 , 在 492nm 处测量每个孔的吸收值, 用 OPD 缓冲液作为空白, 每个样品测两份, 计算每个血清的平均吸光度。将特定一天所获得的血清吸光度减去前一天相应小鼠获得的吸光度就得出在特定的一天的特定小鼠的血清抗体水平。

细胞毒性 T 淋巴细胞测定

P815 细胞稳定表达 HBsAg (P815-HBsAg), 该细胞由 Jorg Reimann 博士赠送。一式三份, 用标准四小时钙黄绿素 AM 释放分析法 测定细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的活性, 在第 25 天从免疫小鼠中收集脾细胞, 用 γ 射线照射的 P815-HBsAg 细胞以脾细胞/刺激物为 20: 1 的比例体外刺激这些细胞 3 天, 然后加入鼠重组白介素 2 (rIL-2) (25 IU/ml), 将培养物再温育 4 天, 通过 Ficoll-Hypaque(Pharmacia Biotech, Sweden)纯化得到的经过刺激和扩增的脾细胞用作效应细胞。将靶细胞 (P815-HBsAg 细胞和 P815 细胞) 在使用之前在预定的最佳浓度钙黄绿素 AM ($2 \mu M$) 中 $37^\circ C$ 温育 40min 使其被标记, 冲洗, 以 5×10^4 细胞每 ml 重悬浮, 靶细胞 ($100 \mu l$) 与等体积的效应物在 96 孔 U 形底微量滴定板上培养, 效应细胞: 靶细胞 (E:T) 的比例从 0.3:1 到 100:1, 低速离心平板 3min, $37^\circ C$ 温育 4 小时, 用荧光计测定钙黄绿素 AM 荧光来检测靶细胞的裂解。通过将靶细胞与 5% 的 SDS (Sigma) 共同温育检测最大释放 (总量), 通过在培养基中仅温育靶细胞测定自发释放 (对照)。通过下式计算特异性靶细胞裂解的百分比:

$$1 - (\text{荧光}_{\text{样品}} - \text{荧光}_{\text{总量}}) / (\text{荧光}_{\text{对照}} - \text{荧光}_{\text{总量}}) \times 100\%$$

白介素和干扰素- γ 测定

从免疫小鼠中收集脾细胞, 在用 γ -放射的 P815-HBsAg 刺激这些细胞的过程中, 在第 24, 48 和 72h 收集每个样品的上清液 $200 \mu l$, 根据制造商的指导将抗 IL-4 或 IFN- γ 的单克隆抗体以 1: 250 的稀释率包被到 96 孔微量滴定板 (OptEIA, PharMingen, Becton Dickinson) 的孔上, 在常温下温育平板 24h, 用冲洗缓冲液冲洗 3 次后, 平板用测定稀释液在常温下封闭 1h, 用冲洗缓冲液冲洗 3 次后, 将 $100 \mu l$ 的每个样品的上清液加到孔中, 一式两份, 在常温下温育平板 2h。用冲洗缓冲液冲洗 5 次后, 将 $100 \mu l$ 稀释的生物素标记的抗 IL-4 或 IFN- γ 抗体和亲和素-辣根 过氧化酶偶联物加到孔中, 常温温育 1h, 用冲洗缓冲液冲洗 8 次后, 将 $100 \mu l$ 稀释的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物加到各个孔中,

室温下 (RT) 温育 30min, 加入 $100 \mu\text{l}$ 0.3M 的 H_2SO_4 , 在 450nm 处测量每孔的吸收值。

统计学分析

用单向单因素方差分析对在第 7 和 21 天的血清抗体亚型水平、不同 E: T 比率的靶细胞特异性裂解的百分比和在 24、48 和 72h 上清液的 IL-4 和 IFN- γ 水平进行比较, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

图 13 显示了用 pRc/CMV-HBs(S)转染的 293 个细胞和用 pRc/CMV-HBs(S)转化的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌感染的巨噬细胞中 HBsAg 的表达, 在转染后 48h 收集的用 pRc/CMV-HBs(S)转染的 293 个细胞的裂解液和在感染后 24、48 和 72h 收集的用鼠伤寒沙门氏菌 pRc/CMV-HBs(S)感染的巨噬细胞中的 HBsAg 水平。用 pRc/CMV-HBs(S)转染的 293 个细胞转染 48h 后表现出 HBsAg 的良好表达, 用鼠伤寒沙门氏菌 pRc/CMV-HBs(S)感染的巨噬细胞在感染 48 和 72h 后表现出 HBsAg 的良好表达。

抗体反应

4 组小鼠在第 7 和 21 天的抗体亚型水平分别列在图 14A 和 14B 中, 蛋白质疫苗组的血清 IgG 水平在第 7 和 21 天分别比对照组的血清 IgG 水平明显高得多 ($P < 0.05$ 和 < 0.001), 而且, 蛋白质疫苗组的血清 IgG 水平在第 21 天比粘膜 DNA 疫苗组的明显要高得多 ($P < 0.001$), 但是, IgG 亚型的 OD 值太低以至于无法评估 Th1/Th2 型反应。

细胞毒性 T 淋巴细胞反应

在 4 组小鼠中, 不同 E:T 比例的靶细胞特异性裂解的百分比如图 15 所示, DNA 疫苗、粘膜 DNA 疫苗和蛋白质疫苗组的脾细胞在最小 E:T 比例 $\geq 10:1$ 时都表现出有效的靶细胞裂解。DNA 疫苗组在 E:T 比例为 3:1、10:1、30:1 和 100:1 时的靶细胞特异性裂解的百分比明显比对照组高得多 ($P < 0.01$, < 0.05 , < 0.0001 和 < 0.0001), 粘膜 DNA 疫苗组在 E:T 比例为 10:1、30:1 和 100:1 时的靶细胞特异性裂解的百分比明显比对照组高得多 ($P < 0.01$, < 0.0001 和 < 0.0001), 蛋白质疫苗组在 E:T 比例为 30:1 和 100:1 时的靶细胞特异性裂解的百分比明显比对照组高得多 ($P < 0.0001$ 和 < 0.0001), 而且, DNA 疫苗组在 E:T 比例为 3:1、10:1 和 100:1 时的靶细胞特异性裂解的百分比明显比蛋白质免疫组高得多

($P < 0.05$, < 0.05 和 < 0.001), 粘膜疫苗组在 E:T 比例为 100:1 时的靶细胞特异性裂解的百分比明显比蛋白质疫苗组高得多 ($P < 0.01$), DNA 疫苗组和粘膜疫苗组。在所有 E:T 比例时的靶细胞特异性裂解的百分比差别没有统计学意义。

细胞因子分析

从 4 组小鼠的 24、48 和 72h 的脾细胞培养物中获得的上清液中的 IL-4 和 IFN- γ 水平分别如图 16A 和 16B 所示。DNA 疫苗组的 IFN- γ 水平在第 24、48 和 72h 明显比对照组要高得多 ($P < 0.0001$, < 0.05 和 < 0.005), 而且, DNA 疫苗组的 IFN- γ 水平在第 24、48 和 72h 明显比蛋白质疫苗组要高得多 ($P < 0.0001$, < 0.05 , < 0.05), 在第 24h 明显比粘膜疫苗组要高得多 ($P < 0.001$), 4 组小鼠的 IL-4 水平在第 24、48 和 72h 很低, 且 4 组小鼠间的 IL-4 水平的差别没有统计学意义。

讨论

用于人的临床试验已经证明: 使用 lamivudine、IFN- α 和重组 HBsAg 与乙型肝炎免疫球蛋白 (HBIG) 形成的复合物在某些病例中能清除慢性 HBV 携带者中的 HBeAg。至于清除 HBsAg, 已经证实了只有在骨髓移植 (BMT) 过程中从具有天然 HBV 免疫性的供体继承性转移得到的免疫性在我们的 BMT 受体中表现了一致的效果。虽然在 高加索人的一个研究中用含有重组 HBsAg 的疫苗成功清除了慢性携带者中的 HBsAg, 但是该发现可能不能在人群中再现, 因为 HBV 主要是垂直传播的, 在我们以前的研究中 IFN- α 在清除 HbeAg 方面的低效性也反应了这一点。用重组 HBsAg 免疫来清除 HBV 携带者中的 HBsAg 失败不是意料之外的, 因为动物研究和人体研究一致表明其产生了强烈的抗体反应但较弱的 CTL 反应。因此, 设计能引起强烈 CTL 反应的疫苗或疫苗递送系统可能是实现慢性 HBV 感染的治疗性清除的关键。

通过用含有 DNA 疫苗的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌免疫, 引起的是独特的强烈的 CTL 反应但相对弱的抗体反应。裸露 DNA 疫苗比重组蛋白质疫苗能产生更强烈的 CTL 反应, 这已经被重复证明, 并得到该研究的结果的支持。在本研究中, 我们也证明了与裸露 DNA 疫苗所引起的相当的、并比重组蛋白质疫苗所引起的强烈得多的 CTL 反应与含有 DNA 疫苗的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌的给予有关, 这种强烈的 CTL 反应更进一步的被检测到的高水平 IFN- γ 证实, IFN- γ 是脾细胞培养物上清液中的一种与 CTL 相关的细胞因子, 其中的脾细胞

培养物来自用含有 DNA 疫苗的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌口服免疫的小鼠。另一方面，由含有 DNA 疫苗的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌引起的抗体反应相对较弱，这与在第 21 天检测到的裸露 DNA 和重组蛋白质疫苗所引起的强烈 IgG 反应相反。这种由裸露 DNA、口粘膜和重组蛋白质疫苗所引起的不同 CTL/抗体偏向性免疫应答可以解释为 HBsAg 抗原呈递的方式和佐剂类型的不同。当小鼠用重组 HBsAg 免疫时，产生的免疫应答的主要类型是抗体反应，因为外源抗原主要是由 B 细胞通过 II 类 MHC 途径呈递给 Th2 细胞。至于裸露 DNA 疫苗，在体内的肌肉细胞中产生的部分 HBsAg 被分泌，由 B 细胞通过 II 类 MHC 途径呈递而引起有效的抗体反应。部分抗原在抗原呈递细胞中被剪切，通过 I 型 MHC 途径呈递而引起强烈的 CTL 反应。但是，仍然不明白为什么同样的 DNA，当由减毒存活的鼠伤寒沙门氏菌携带时会诱发强烈的 CTL 反应和相对弱的抗体反应，我们推导这可能是由于减毒存活的鼠伤寒沙门氏菌选择性感染粘膜相关的淋巴组织 (MALT) 细胞的结果。当编码 HBsAg 的 DNA 被选择性带进 MALT 细胞时，大部分 HBsAg 产物在 MALT 细胞中被切除并被 I 类 MHC 途径呈递，因而引起强烈的 CTL 反应。另一方面，在 MALT 细胞中产生的 HBsAg 仅仅只有非常少量被分泌并被 B 细胞通过 II 类 MHC 途径呈递，因而引起弱的抗体反应。该假设得到了一个研究的支持，该研究表明含有 HBsAg 的巨噬细胞在转移到同源 (synergeneic) 小鼠中时引起强烈的 CTL 反应，不幸的是，作者没有说明这种巨噬细胞转移是否能引起有效的抗体反应。除了 MALT 细胞的这种选择性感染外，这种强烈的 CTL 反应也可能进一步受佐剂，即与 DNA 共给予的减毒存活鼠伤寒沙门氏菌的脂多糖 (LPS) 的影响。由于已经有报道，沙门氏菌的 LPS 能引起向 Th1 和 CTL 免疫应答的转移，因此当 DNA 疫苗以减毒存活的鼠伤寒沙门氏菌作为载体被给予时，免疫应答明显的向强烈的 CTL，但相对弱的抗体反应的方向进行是不奇怪的。

这种强烈的细胞反应和相对缺乏的体液反应使该疫苗成为一种比重组 HBsAg 或裸露 DNA 疫苗更好的治疗慢性 HBV 携带者的疫苗候选物。虽然最近法国的一个 Pilot 研究表明用标准重组 HBsAg 疫苗治疗可以有效的减少 50% 慢性活动性 HBV 复制的患者中的 HBV 复制并消除对 HBsAg 颗粒的免疫耐受性。这个结果可能不适用于发展中国家的情况，因为大多数慢性 HBV 的感染是由于病毒的垂直传播。与之类似的情况是，相对于发达国家的 30%-40% 的

反应, 在我们当地进行的 IFN- α 处理只引起相对弱的反应。令人难以想象的是, 相同的小组最近还发现在处于 HBV 慢性携带者状态的 HBsAg 转基因小鼠模型中, CTL 反应对于长期控制肝细胞中的 HBsAg 的转基因表达最重要, 且 HBsAg 表达的清除与肝中的细胞病变作用无关。有越来越多的证据表明产生的 CTL 反应和相关的抗病毒细胞因子 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) 是从 HBV 感染恢复的主要决定因素, 根据这个线索, 其他的研究小组通过利用 CTL 能够识别的肽表位作为免疫原或通过脂修饰抗原肽试图改进 CTL 反应。尽管体液反应对于清除肝细胞中的 HBC 的重要性相对较小, 其存在可以引起副作用, 如血清病和 HBV 慢性携带者中的免疫复合物沉降。因此, 这种疫苗在产生强烈 CTL, 但最小化的体液反应方面的独特性使其成为一种有效且安全的治疗性疫苗。在本研究中, 没有疫苗在小鼠中表现出任何毒性, 可以在表达 HBsAg 的转基因小鼠中进一步开展实验以研究在可能的 HBsAg 清除过程中由相应的疫苗引发的毒性。

这种强烈的 CTL 可以使该疫苗成为一种比重组 HBsAg 疫苗更好的候选物以免疫供体, 随后将 HBV 特异性 CD8+T 细胞继承性转移给 HBsAg 阳性 BMT 受体。HBV 携带状态的消除在我们的 BMT 中心被证实, HBsAg 阳性 BMT 受体接受了 HbsAb 阳性骨髓供体的骨髓。但是, 这种消除与供体有关, 该供体的 HBsAg 是由自然感染产生, 而不是由重组 HBsAg 疫苗免疫产生, 因此, 看到能引起强烈 CTL 反应的本发明的粘膜 DNA 疫苗是否能引起受体中的 HBV 的清除是合理的, 但是, 假如使用这种策略, 在免疫重建和可能的 HBV 清除时所发生的肝炎高峰成为主要的关注因素。最近研究表明, 在我们的 BMT 受体中, 每天口服 famciclovir 250mg 三次, 在 BMT 之前至少 1 周开始, 移植后持续 24 周大大减少了肝炎的发病, 这是由于在进行异源 BMT 后 HBsAg 阳性受体中的 HBV 被再激活。因此, HBV 特异性 CD8+T 细胞从 BMT 供体继承性转移的同时用 famciclovir 抑制 BMT 受体中的 HBV 的复制的方法是一个合理的值得一试的方法以清除 HBsAg 阳性 BMT 受体中的 HBV。

除了作为治疗性疫苗的潜在用途外, 本发明的粘膜 DNA 疫苗是一种免疫那些对常规重组 HBsAg 疫苗不能产生抗体反应的人的有效候选物, 因为这种疫苗的 HBsAg 以完全不同的方式被呈递到免疫系统。而且, 已经表明一些明显的不反应者在用重组 HBsAg 免疫后事实上被激发, 当在数年后 被给予一剂

量的 HBsAg, 一些人就能产生 HBsAg 反应。可以推断这些不反应者中的一些在重组 HBsAg 初次免疫后已经产生了细胞介导的免疫性, 但体液反应只在加强免疫后产生。这进一步证实了 CTL 在防止 HBV 感染方面扮演着重要角色。

假如将这种疫苗用于全身免疫, 用含有 DNA 疫苗的减毒存活沙门氏菌口服免疫所引起的非持续性抗体反应还需要改进, 因为还不清楚细胞免疫自身是否在预防感染方面与体液免疫性和细胞免疫两者一样有效。抗 HBV 感染的全身免疫需要高效、安全、便宜的疫苗, 重组蛋白质疫苗和最近开发的 DNA 疫苗总体上有一定的效果, 但是, 由于它们不得不肠外给药, 针头的再利用导致的微生物传播成为一个主要问题, 而且, 这些疫苗需要生产和纯化大量的蛋白质或质粒 DNA, 因而非常昂贵。在发展中国家 HBV 感染是地方性的, 由于这些国家针头的再利用和缺乏是主要问题, 因此用重组蛋白或裸露 DNA 疫苗进行全身免疫远远不够理想。当用减毒存活的 *S.typhi* (Ty21a), 一种商业上使用的安全疫苗代替减活的鼠伤寒沙门氏菌进行试验时, 得到相同的结果 (数据没有显示), 所以, 这样的一种粘膜疫苗可能可以用于全身免疫, 用一种相对便宜的方式可以大量制备含有真核表达质粒的 Ty21a。

实施例 6: 乙型肝炎表面抗原-抗体-重组 DNA 组合物在 HBsAg 转基因小鼠中的治疗效果

将含有乙型肝炎病毒 (HBV) S 基因复合物的 HBsAg-抗-HBs-重组 DNA 的治疗效果与另外三种治疗性疫苗候选物 (重组 HBsAg, 抗-HBs 抗体的 HBsAg 复合物和编码 HBV S 基因的裸露质粒 DNA) 进行比较。每隔 3 周注射一次, 注射 4 次后, 在 HBsAg-抗 HBs-sDNA 免疫组中出现最突出的血清 HBsAg 降低、最高滴度的抗 HBs 反应、由脾细胞产生的最高水平的干扰素- γ 和强烈的细胞毒性 T 细胞反应。在肝细胞中也表现出 HBsAg 表达降低。推导 HBsAg-抗-HBs-DNA 的治疗机制是通过内源的和外源的途径调节 HBsAg 的呈递。

材料和方法

小鼠

C57BL/6J-TgN(A1b1HBV)44Bri 小鼠 (H-2^b) 由 Jackson 实验室 (USA) 提供, 检测过这些小鼠的肝和肾组织中血清 HBsAg 呈阳性, 抗 HBs 呈阴性和 HBsAg 呈阳性 (杀死后)。用于研究的总共有 28 只转基因小鼠 (13 只雄性, 15 只雌性), 鼠龄 8—12 星期, 重 16—18g。正常的 C57BL/6J(H-2^b) 小鼠在香港大

学动物实验室 (the Laboratory Animal Unit of the University of Hong Kong) 的标准无病原体条件下饲养, 所有的小鼠都被关在标准条件的笼子中, 该标准列于 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH 出版社 86-23, 1985)。

免疫原

重组酵母来源的 HBsAg (批号 (lot) YHB 9811223): 商业用的酵母来源的重组乙型肝炎疫苗由北京生物制品研究所提供 (中国)。

HBsAg-小鼠抗-HBs IC: 用于制备 IC 的 HBsAg 来源于上文同样批号的疫苗, 所用的小鼠抗 HBs 抗体由我们自己的实验室提供, 按照 Qu 等的描述在过量 HBsAg 存在条件下制备 IC。

插入了由巨细胞病毒立即早期启动子 (s-DNA) 驱动的 HBV S 基因的重组质粒 DNA 由 Whalen 赠送。扩增质粒 DNA, 用阴离子交换柱 (Wiagen, Hilden, Germany) 纯化, 最后在无内毒素的消毒生理盐水中重悬浮用于注射。在接种之前所用的所有质粒 DNA 都进行内毒素检测 (小于 0.25 内毒素单位/ μg), 按照一定的比例结合裸露的质粒 DNA 和 IC 制备 IC-sDNA。

表 5

在不同组转基因小鼠中使用的免疫原

组号	免疫原	剂量 (每只小鼠)	动物数		
			雄性	雌性	总数
1	HBsAg + 硫酸铝	2 μg HBsAg	2	4	6
2	IC ^a + 硫酸铝	2 μg HBsAg	3	3	6
3	IC-sDNA ^b	2 μg HBsAg + 100 μg sDNA	2	3	5
4	s-DNA	100 μg sDNA	3	2	5
5	未免疫的	NA ^c	3	3	6
总计			13	15	28

^aIC—HBsAg-抗-Hbs 复合物

^bsDNA—含 S 基因的重组质粒 DNA

^cNA—未注射

免疫

将 28 只 HBsAg 转基因小鼠编号, 随机分成 5 组, 用不同的免疫原接种 (表 5)。为了排除麻醉对小鼠免疫应答的影响, 所有的免疫小鼠都用同样剂量的巴比妥钠麻醉, 所有的免疫原都注射到小鼠的两只后腿的胫骨前肌中, 每 3 周一次计 4 剂量进行免疫, 共给予 12 周, 在第 14 周, 用同样的免疫原加强免疫小鼠, 7 天后杀死这些小鼠以进行细胞介导的免疫应答检测。

免疫应答的检测

在每剂量免疫之前采集血清样品以检测 HBsAg 和抗 HBs, 血清 HBsAg 和抗 HBs 都由 ELISA(BIOKIT, S.A.Spain)检测。为了定量 HBsAg, 在检测中使用了一系列 HBsAg 校准器 (Abbott Diagnostics, Chicago), 用试剂盒提供的标准阳性对照 (10-100mIU/ml) 定量抗 HBs 的水平。在第 15 周杀死动物, 所有动物的脾细胞都被用来检测 HBsAg 特异性 Th1 和 Th2 细胞细胞因子, 将各个小鼠的 5×10^5 个脾细胞培养在 10% 的牛血清-RPMI 1640 中, 用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的重组 HBsAg 在 37°C 下刺激三天, 收集培养细胞的上清液, 通过 ELISA 使用 OptEIA 试剂盒 (PharMingen, USA) 检测干扰素 $\text{IFN-}\gamma$ 和白介素 IL-4。

在加有 25 IU/ml 鼠重组 IL-2 (R&D Systems, USA) 的情况下进一步培养细胞 4-5 天以扩增特异性 T 细胞, 用标准四小时钙黄绿素释放分析法一式三份在 U 形底 96 孔微孔板上检测脾细胞的 CTL 活性。在 CTL 分析中使用的靶细胞是正常 C57/6J 小鼠的脾细胞, 该细胞被 10PFU/细胞的含 HBsAg 基因的重组牛痘病毒 (牛痘-HBsAg 病毒, 简称 Vac-HBsAg) 或牛痘病毒 (Vac, 阴性对照) 感染了 12 小时, 在使用之前在 2M 的钙黄绿素 AM (molecular Probes Inc., USA) 中 37°C 温育细胞 40min 使靶细胞迅速标记, 扩增的效应脾细胞被纯化, 在 10% 的牛血清-RPMI 1640 中重悬浮, 以 100:0.3 的效应细胞/靶细胞 (E:T) 比例与 5000 钙黄绿素 AM 标记靶细胞混合, $100 \times g$ 离心平板 3 分钟, 37°C 继续温育 4 小时, 通过测量荧光强度 (FI) 来测定靶细胞的裂解, 特异性裂解的百分比通过下式计算:

$$\left(1 - \frac{\text{实验测得的 FI} - \text{总裂解 FI}}{\text{靶对照 FI} - \text{总裂解 FI}}\right) \times 100\%$$

免疫组织病理学研究

在处死小鼠后，将肝和肾组织在液氮中迅速冰冻或固定在 10% 的缓冲甲醛中，接着包埋在石蜡中，用 HBsAg 检测试剂盒 (Dako, USA) 对切片进行免疫组织化学染色以检测 HBsAg 的表达，或者通过苏木精和曙红染色以研究组织病理学改变，根据两个独立实验室的病理学学者的定义读取组织的切片。

统计学分析

组间差异的显著性是通过成对 Student's T-检验来分析的。

结果

血清 HBsAg 水平

结果列在图 17 中，在第 0 和 3 周获得的 5 组动物的样品中的血清 HBsAg 水平基本上相同。在对照未免疫组中，在 15 周的观察期间中血清抗原水平升高，平均值由 $113 \pm 13 \text{ ng/ml}$ 上升到第 15 周的 $189 \pm 17 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.02$)。与对照相反，所有免疫组中的抗原水平增加被抑制。在 IC 免疫组中，与第 3 周的抗原水平比较，在第 12 周首次发现抗原水平下降 ($P < 0.05$)，且抗原保持相似的水平直到第 15 周。用 IC-sDNA 免疫引发血清抗原水平最显著和最快速的降低，在这组小鼠中第 9 周就首次发现了抗原水平的降低，该组第 3 周的血清 HBsAg 水平是 $126 \pm 22 \text{ ng/ml}$ ，但在第 9 周下降到 $56 \pm 14 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.02$)，这种下降持续到后来的 6 周多，在第 12 周达到 28 ng/ml 的最低平均水平，且血清 HBsAg 保持相似的水平直到第 15 周实验结束的时候。

抗 HBs 抗体

用 IC-sDNA 复合物免疫，在给予第一剂量的疫苗 3 周后诱发最强烈的抗 HBs 抗体反应 (图 18)，在接受第二剂量后抗体迅速升高，持续升高到第 15 周的 $4223 \pm 3301 \text{ mIU/ml}$ ，在 IC 和 HBsAg 免疫组，抗体反应强度较低，抗体水平分别是 904 ± 359 和 $149 \pm 149 \text{ mIU/ml}$ 。由 DNA 疫苗引起的抗体反应与由 HBsAg 单独引起的抗体反应 ($203 \pm 59 \text{ mIU/ml}$) 相似，在整个试验过程中未免疫的对照动物中没有产生可检测水平的抗 HBs。

免疫原	小鼠数目	IFN- γ	48h	72h
		(pg/ml) 24h		
HBsAg	6	98 ^a (106) ^b	303(211)	607(502)
IC	6	234(124)	1044(688)	3396(3180)
IC-sDNA	5	679(683)	2980(2280)	13396(16881)
sDNA	5	132(52)	815(573)	2044(639)
未免疫的	6	33(55)	100(106)	75(93)

^a干扰素- γ 的平均值

^b干扰素- γ 的 S.D.

细胞因子产量

从每个免疫组的 HBsAg 刺激脾细胞获得的干扰素产量如表 6 所示。在每组的各个小鼠之间干扰素- γ 水平有很大的不同，IC-sDNA 引起强烈的 Th1 型免疫应答，如表所示产生最高水平的干扰素- γ ，而且在 IC-sDNA 组中 IL-4 产物弱有升高，该升高没有统计学意义（数据没有显示）。

细胞毒性 T 细胞反应

所有免疫组中的 HBV 特异性 CTL 活性结果如图 19 所示。在 IC、DNA、IC-sDNA 免疫组中，小鼠脾细胞对于 Vac-HBsAg 重组病毒感染的靶细胞是细胞毒性的，但是它们对于对照牛痘病毒感染的细胞并不表现出细胞毒性。在 HBsAg 免疫小鼠中很少引起 CTL 反应。

肝 HBsAg 的表达和组织学

在所有组的动物的肝或肾中都没有发现组织病理学改变，通过免疫组织化学染色，除了用 IC-sDNA 免疫的小鼠外，动物肝组织中的 HBsAg 的表达与对照组相似，在 IC-sDNA 免疫小鼠的肝切片中较少发现 HBsAg 阳性肝细胞，HBsAg 的表达降低的程度在这一组的各个小鼠中互不相同，在两只小鼠中最为突出（图 20）。

讨论

在 pilot 研究中, 我们已经证明与人 HBIG 复合的 HBsAg(IC)能有效的减少或清除慢性乙型肝炎患者中的血清 HBV 病毒血症, 然而, 没有观察到被治疗的患者的血清 HBsAg 水平降低。当在正常 Balb/c 小鼠中研究这种抗原-抗体复合物的免疫治疗机制时, 我们发现当质粒 DNA 被加到抗原-抗体复合物中而形成一种新的组合物时会引起更强烈的体液和细胞免疫应答。然而, 当载体质粒 DNA 被加到 HBsAg-抗-HBs 复合物中用来免疫小鼠时发现仅仅只提高了抗 HBs 反应, 但是当含有 HBsAg 基因的重组质粒 DNA 被加到复合物中时, 体液和细胞介导的免疫应答都被提高。这个结果表明 HBsAg-抗-HBs-DNA 复合物可以被用来作为一种新的方法以治疗 HBV 携带及与之相关的慢性疾病。为了证实这种可能性并与其他描述的免疫治疗性疫苗候选物进行比较, 我们用 4 种免疫原来免疫同系的转基因小鼠, 设计各个免疫组中小鼠的免疫方案、途径和接种体积、动物的麻醉和小鼠的性别, 以使其对获得的结果的偏差达到最小化。

在本研究中使用的 HBV-转基因小鼠系中, 几乎所有的肝细胞都表达 HBsAg, 且在我们试验的 15 周期间获得的连续血清样品中检测到抗原的浓度逐渐升高, 我们推测这可能是由于抗原产生的速度超过了清除速度, 于是就产生抗原随着动物年龄增加积累的趋势。虽然我们没有成功清除肝细胞中的血清 HBsAg, 也没有消除 HBsAg 的表达, 但是在 IC-sDNA 免疫小鼠中 HBsAg 表达的显著降低令人鼓舞。

在本研究中, 甚至蛋白质疫苗也能阻断免疫耐受性并在这些小鼠中引起弱的 HBV 特异性免疫应答。在本研究中由 s-DNA 免疫引起的免疫应答没有其他人所报导的那样显著, 这可能是由于重组质粒结构的不同或是由于所用的小鼠株不同。然而, 裸露 DNA 免疫确实诱导 CTL 反应, 产生干扰素- γ 和抗 HBs, 这足够抑制动物中血清抗原水平的增加。IC 免疫原引发有效但中度的免疫应答, 有效的 CTL 反应、高水平的干扰素- γ 产量、抗 HBs 反应和血清抗原水平的降低表明了这一点。IC-sDNA 免疫产生最有效的反应, 血清 HBsAg 显著降低、引发高水平的干扰素- γ 、高滴度的抗-HBs 和有效的 CTL 活性。然而, 在大多数动物中, 血清 HBsAg 水平的降低与肝组织中 HBsAg 的表达并没有很大的关联, 这种不一致强有力的证明了血清 HBsAg 的降低主要是由于诱导的抗 HBs 的中和作用, 该作用在清除肝细胞中的 HBsAg 方面是无效的。

仅仅在 IC-sDNA 免疫小鼠的肝组织的切片中发现很少的 HBsAg 阳性细胞。在黑猩猩中具有非细胞病变性抗病毒机制且细胞因子扮演着重要角色。由于技术问题, 我们没能成功检测这些肝组织中的 HBsAg mRNA, 但是, 因为在这一组小鼠中脾细胞产生的干扰素- γ 的水平最高, 因此 HBsAg 表达的下调可能是通过细胞因子, 如干扰素- γ 介导。

在肝组织切片中没有发现体外细胞裂解活性, 这可能是由于转基因小鼠的肝组织中缺少效应细胞。通过苏木精曙红染色, 在免疫的和对照的转基因小鼠的肝组织中很少发现单核细胞, 另外, 在体内和体外靶细胞是不同的, 体内作为靶细胞表达转基因 (HBsAg) 的肝细胞起的反应与体外重组 Bac-HBsAg 病毒感染脾细胞完全不同。

我们已经表明, 通过 IC 免疫, 增强了巨噬细胞和枝突细胞上的 Fc 受体对 HBsAg 的吸收并加强了体外特异性淋巴细胞的增值, 这可能是由于专门的抗原呈递细胞对 HBsAg 呈递的调节。我们推断, 当 IC-DNA 组合物被用于肌肉注射时, 在接种部位由 IC 引发的专门 APC 提供一种优良的微环境以使裸露 DNA 与 APC 接触并相互作用, 我们还推断, 当 IC 与 DNA 被共摄入并加工时, 抗原呈递的外源和内源途径的结合将引起强烈的宿主免疫应答。另外, 组合物中的裸露 DNA 被保护以防止酶介导的降解, 因而是稳定的。质粒 DNA 中的 CpGs 将作为佐剂以增强复合物的免疫原性。对这种组合物的免疫机制进行进一步的研究将清楚的阐明其在转基因小鼠模型中的协同治疗作用。由于使用不同小鼠系和采用不同结构的免疫原影响了免疫治疗研究的结果, 因此, IC-sDNA 免疫应该在其他的转基因小鼠模型中研究, 特别是在带有活跃复制病毒复制的小鼠中。

参考文献

1. World Health Organization. 1998. The World Health Report. Geneva:WHO.
2. Lok A. S. F., C. L. Lai, P. C. Wu, E. K. Leung. 1998. Long-term follow-up in a randomised controlled trial of recombinant alpha 2-

- interferon in Chinese patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2:298.
3. Tassopoulos N. C., R. Volpes, G. Pastore, J. Heathcote, M. Buti, R.D. Goldin, S. Hawley, J. Barber, L. Condey, D. F. Gray. 1999. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 29:889.
 4. Lau D. T., E. Doo, Y. Park, D. E. Kleiner, P. Schmid, M. C. Kuhns, J. H. Hoofnagle. 1999. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 30:546.
 5. Jardi R., M. Buti, F. Rodriguez-Frias, M. Cotrina, X. Costa, C. Pascual, R. Esteban, J. Guardia. 1999. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J. Virol. Methods* 83:181.
 6. Rehmann B., P. Fowler, J. Sidney, J. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette, F.V..Chisari. 1995. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 181:1047.
 7. Chisari F. V.. 1997. Perspectives series: Host/pathogen interactions. *J. Clin. Invest.* 99:1472.
 8. Lau G. K., R. Liang, C. K. Lee, S. T. Yuen, J. Hou, W.L. Lim, R. Williams. 1998. Clearance of persistent hepatitis B virus infection in Chinese bone marrow transplant recipients whose donors were anti-hepatitis B core- and anti-hepatitis B surface antibody-positive. *J. Infect. Dis.* 178:1585.
 9. Akbar F and Onji M. 1998. Hepatitis B virus (HBV)-transgenic mice as an investigative tool to study immunopathology during HBV infection. *Int. J Exp. Path.* 79:279-291.

10. Wirth, S., L. G. Guidotti, K.-I. Ando, H. J. Schlicht, F. V. Chisari. 1995. Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis B virus envelope transgenic mice. *J. Immunol.* 154:2504.
11. Shimizu Y., L. G. Guidotti, P. Fowler, F. V. Chisari. 1998. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Immunol.* 161:4520.
12. Wen YM., Xiong SD, Zhang W. 1994. Solid matrix-antibody-antigen complex can clear viremia and antigenemia in persistent duck hepatitis B virus infection. *J Gen. Virol.* 75:335-339.
13. Zheng BJ, Ng MH, He LF, Yao X, Chan KW, Yuen KY, Wen YM. 2001. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibody-recombinant composite in HBsAg transgenic mice. *Vaccine* 19:4219-4225.
14. Zheng BJ, Tsoi HW, Woo PCY, Ng MH, Yuen KY. A crucial role of macrophage in the immune responses to oral vaccination against hepatitis B virus in a murine model. *Vaccine.* 2001; 19:4219-4225.
15. Shimizu Y., L. G. Guidotti, P. Fowler, F. V. Chisari. 1998. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Immunol.* 161:4520.
16. Schirmbeck R., J. Wild, D. Stober, H. E. Blum, F. V. Chisari, M. Geissler, J. Reimann. 2000. Ongoing murine T1 or T2 immune responses to the hepatitis B surface antigen are excluded from the liver that expresses transgene-encoded hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 164:4235.
17. Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tiollais P, Michel ML. 1996. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 93:12496-12501.

18. Zheng BJ, Ng MH, Chan KW, Tam S, Woo PCY, Ng SP, Yuen KY. A Single Dose of Oral DNA Immunization Delivered by Attenuated *Salmonella typhimurium* Down-regulates Transgene Expression in HBsAg Transgenic Mice (Submitted to *J. Immunol.*)
19. Hoiseth SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-239.
20. Darji A., C. A. Guzman, B. Gerstel, P. Wachholz, K. N. Timmis, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss. 1997. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*. 91:765.
21. Chisari, F. V., K. Klopchin, T. Moriyama, C. Pasquinelli, H. A. Dunsdorf, S. Sell, C. A. Pinkert, R. L. Brinster, R. D. Palmiter. 1989. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59:1145.

Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1988.

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989.

Zinkernagel, R. M. *Fundamental Immunology*, 3rd edition. Raven Press, Paul, W.-editor. Chapter 34, pp.1211-1250, 1993.

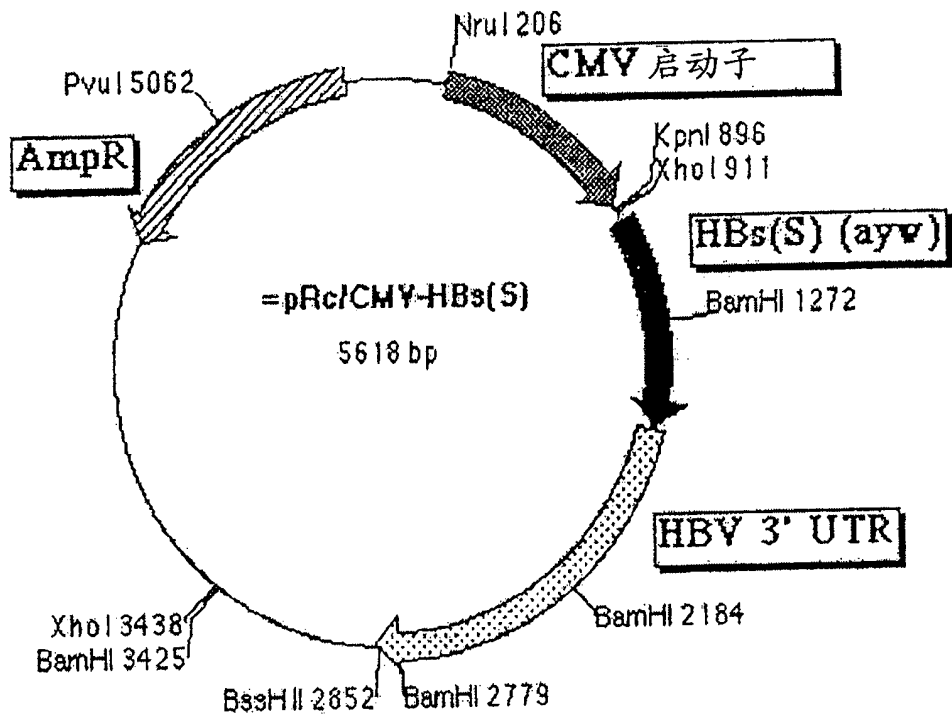


图 1

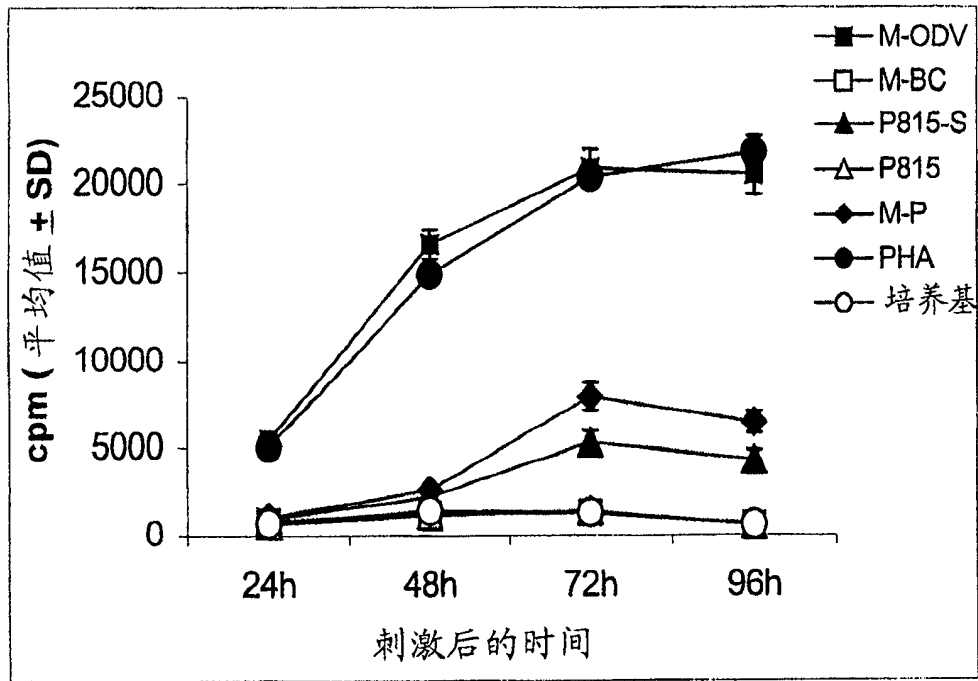


图 2

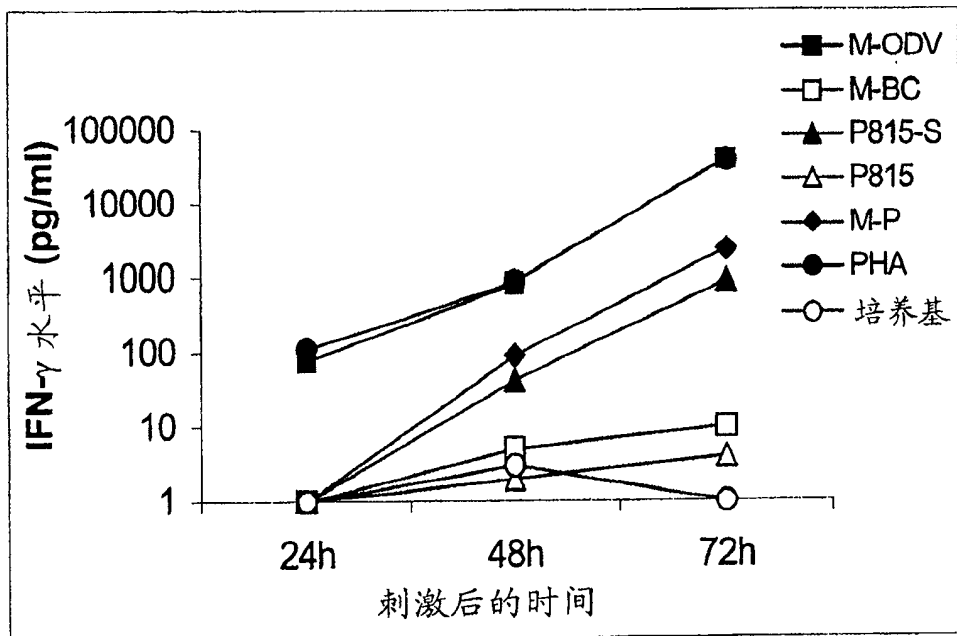


图 3

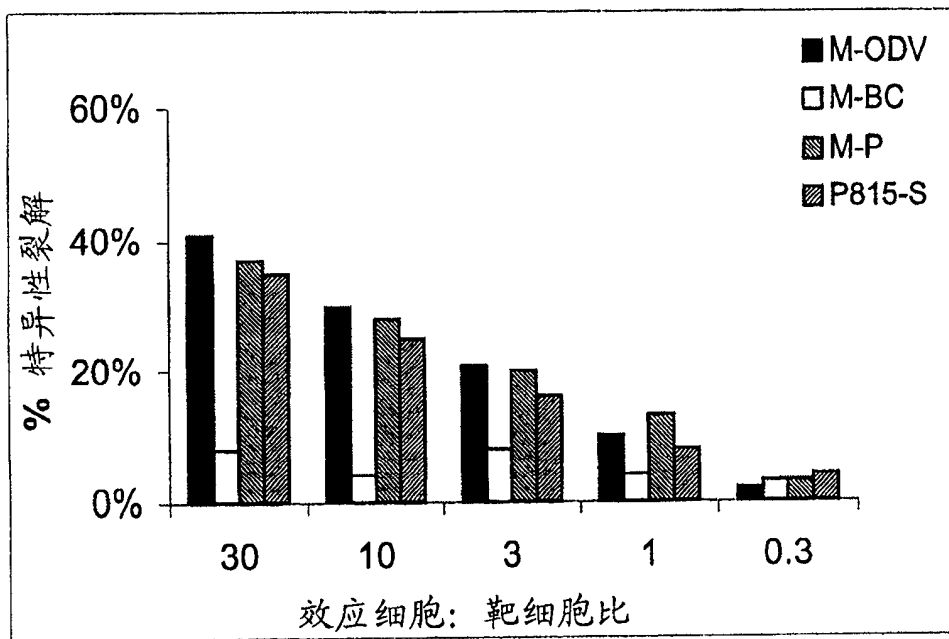


图 4

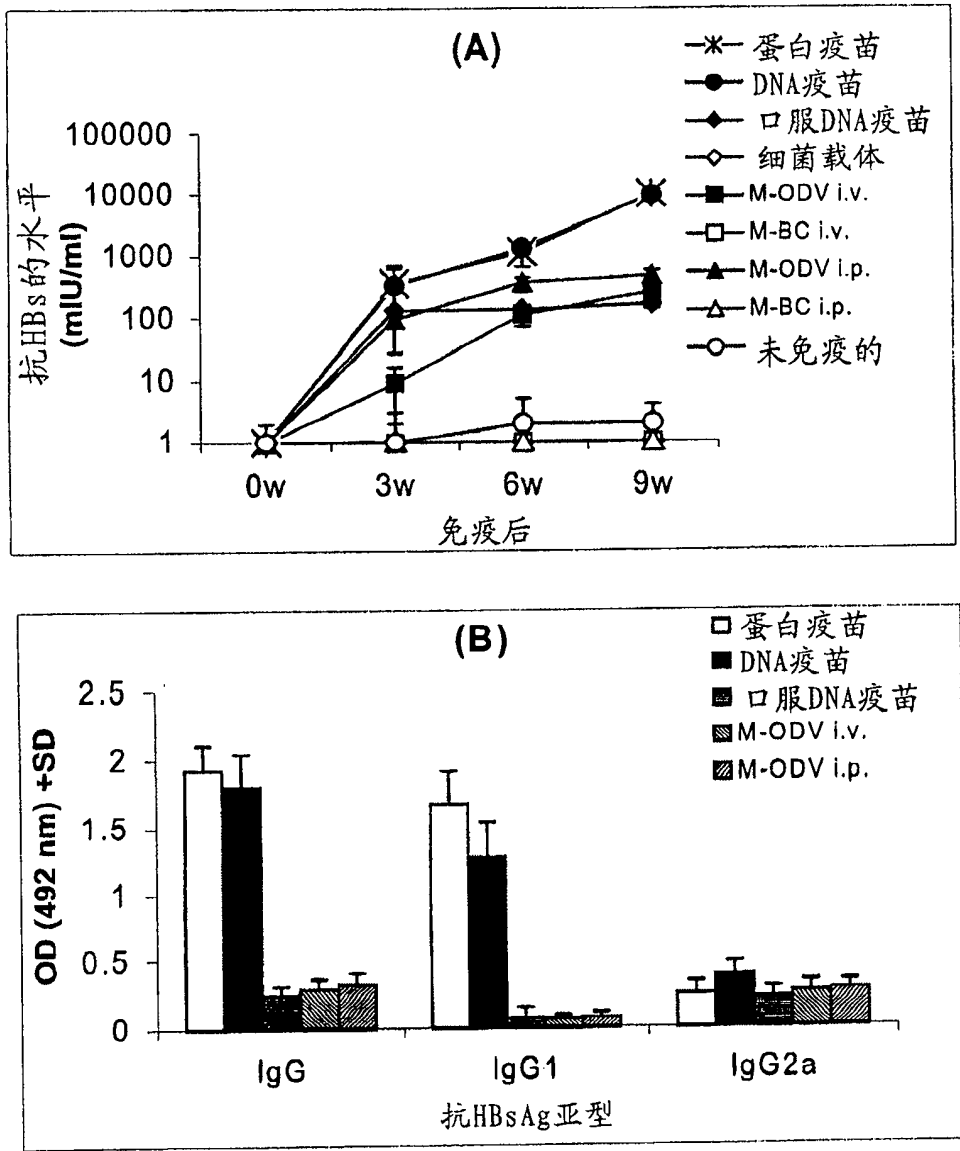


图 5

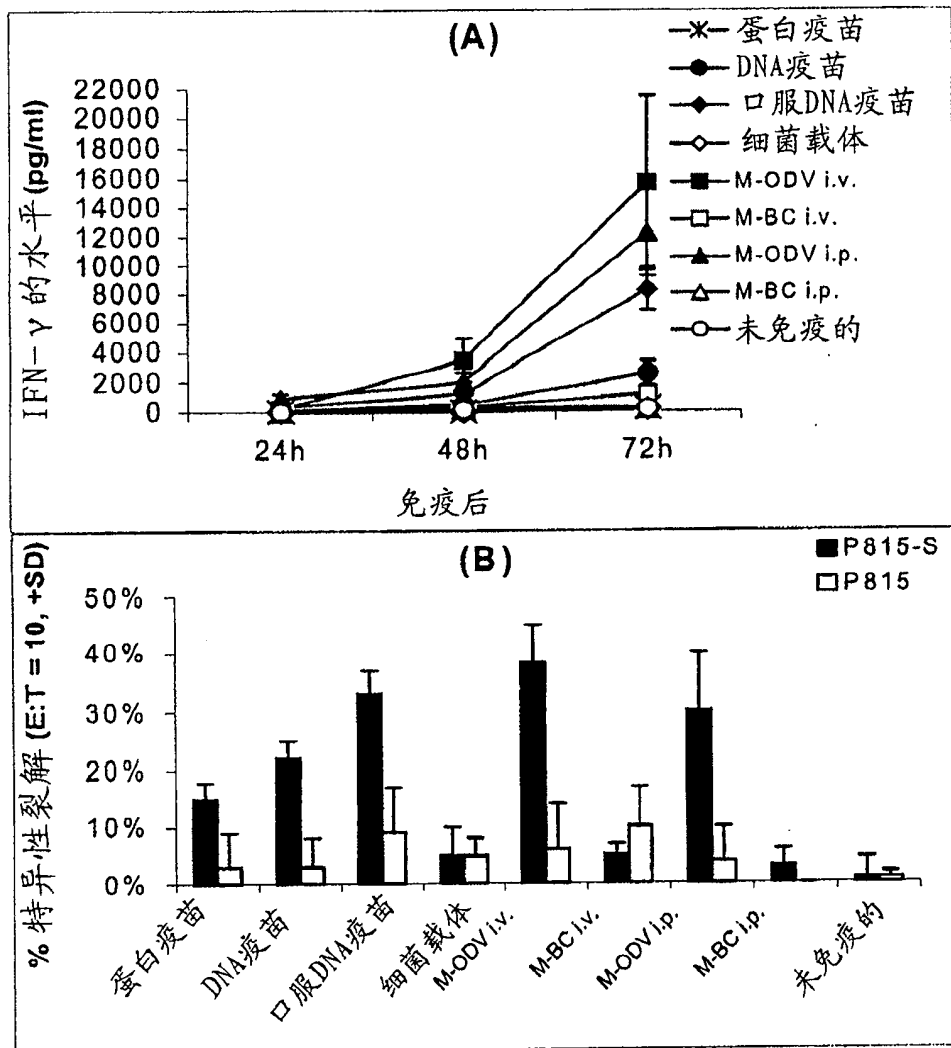


图 6

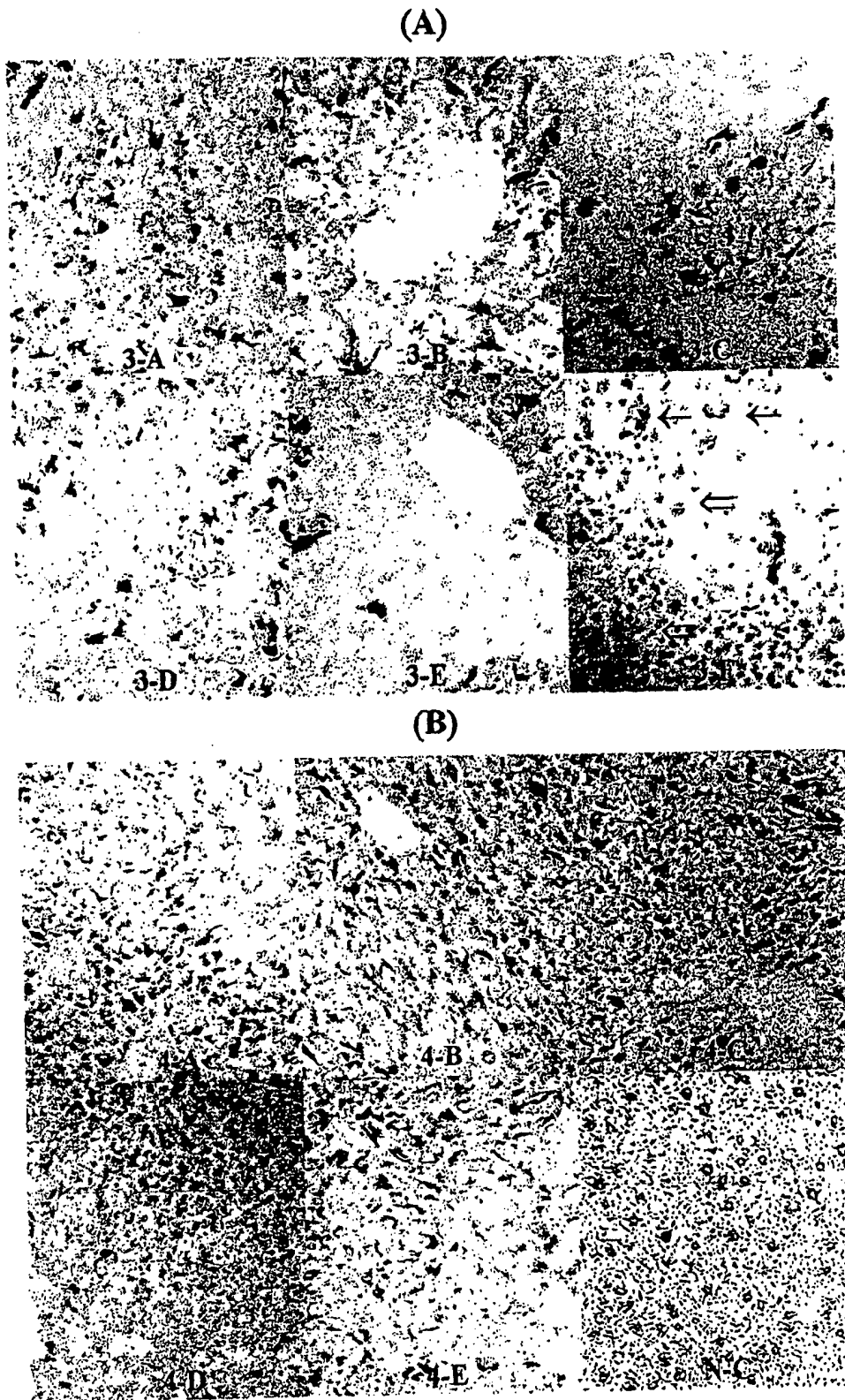
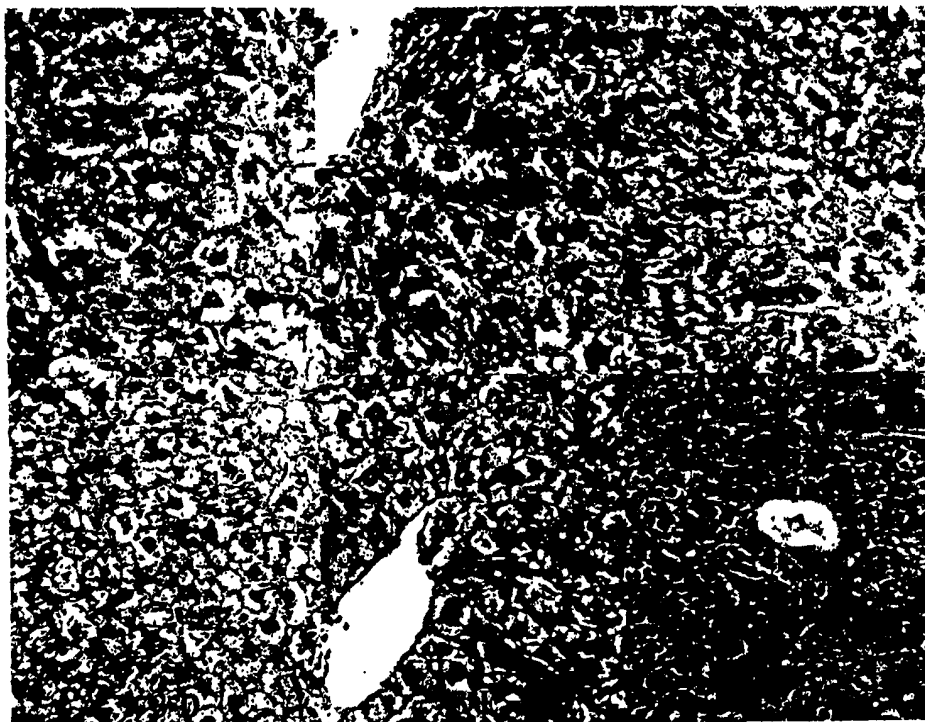


图 7

(A)



(B)

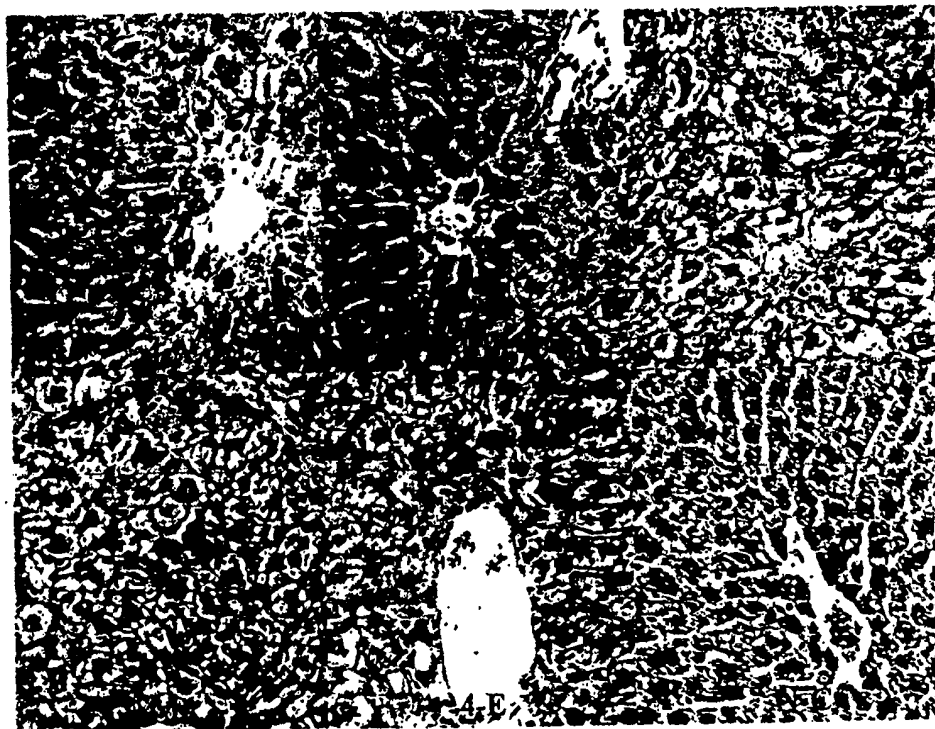


图 8

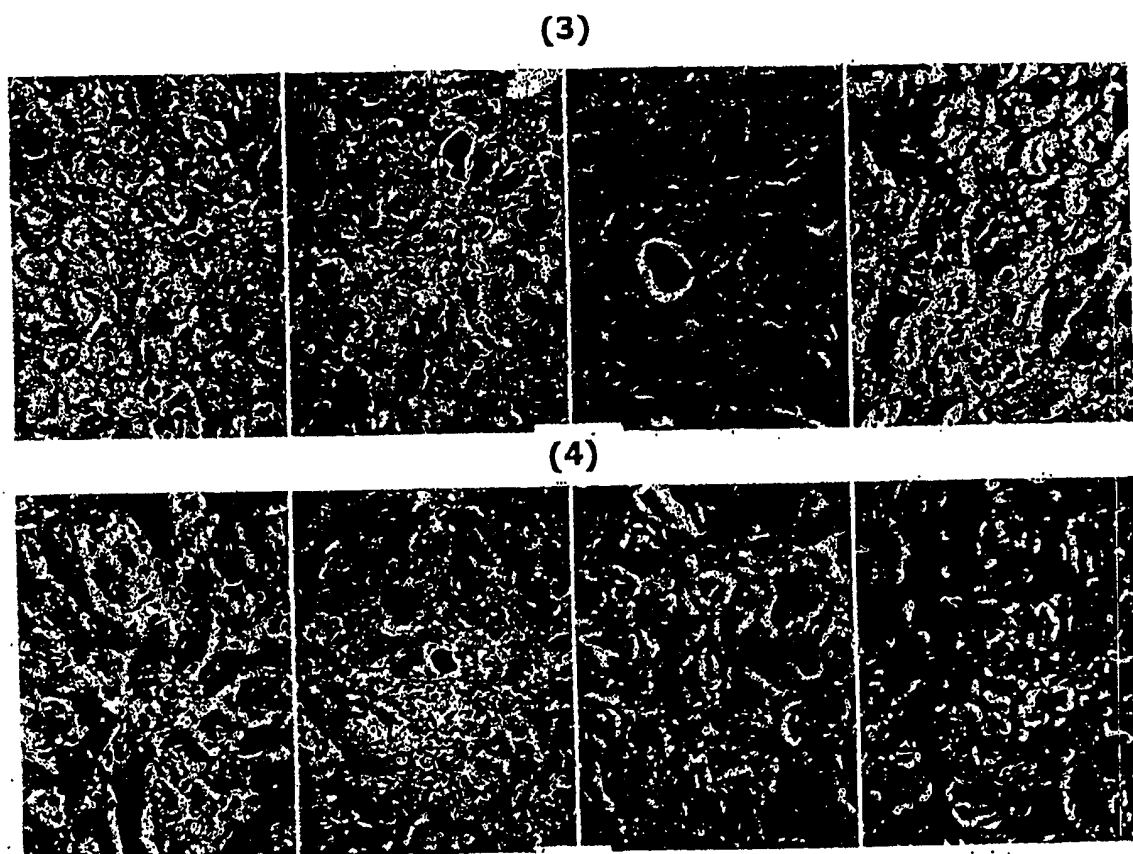


图 9

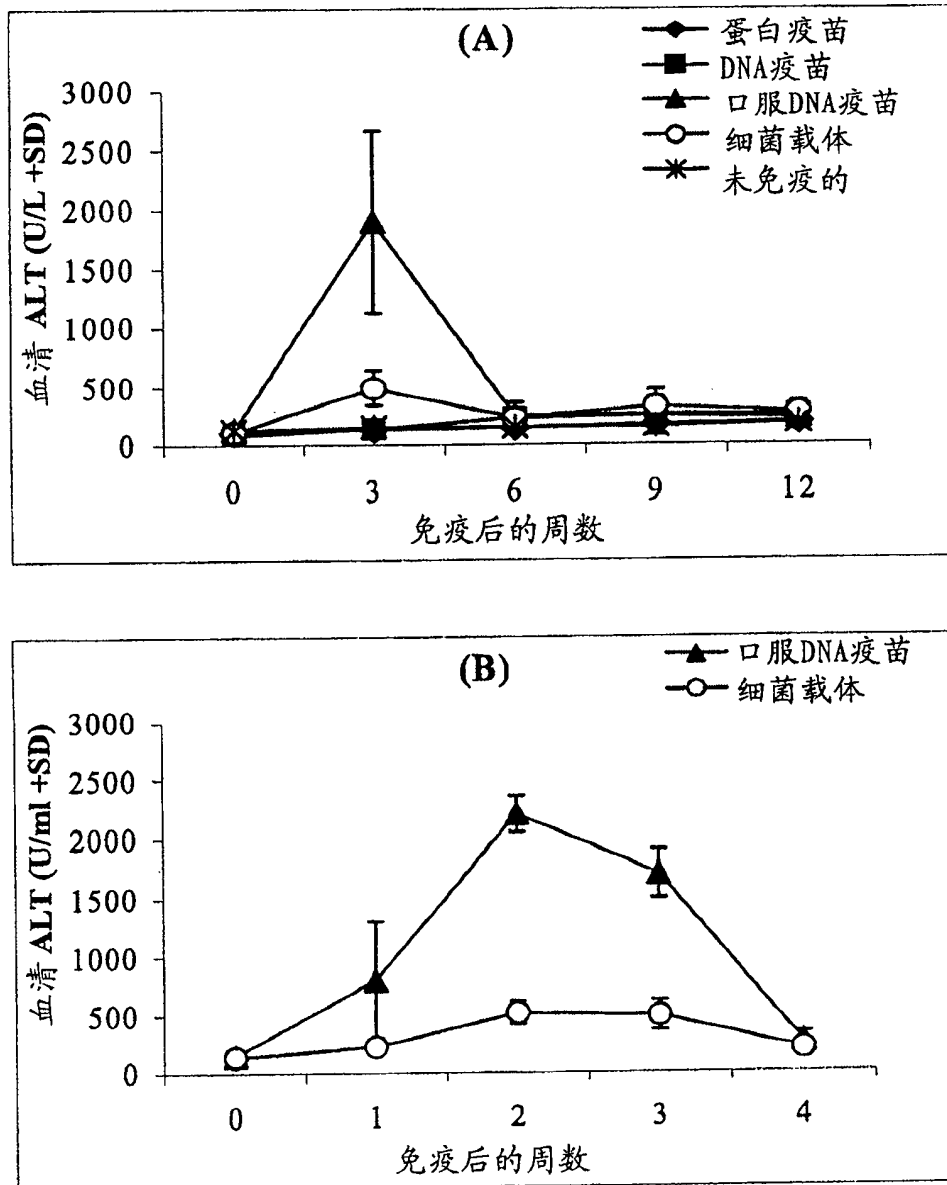


图 10

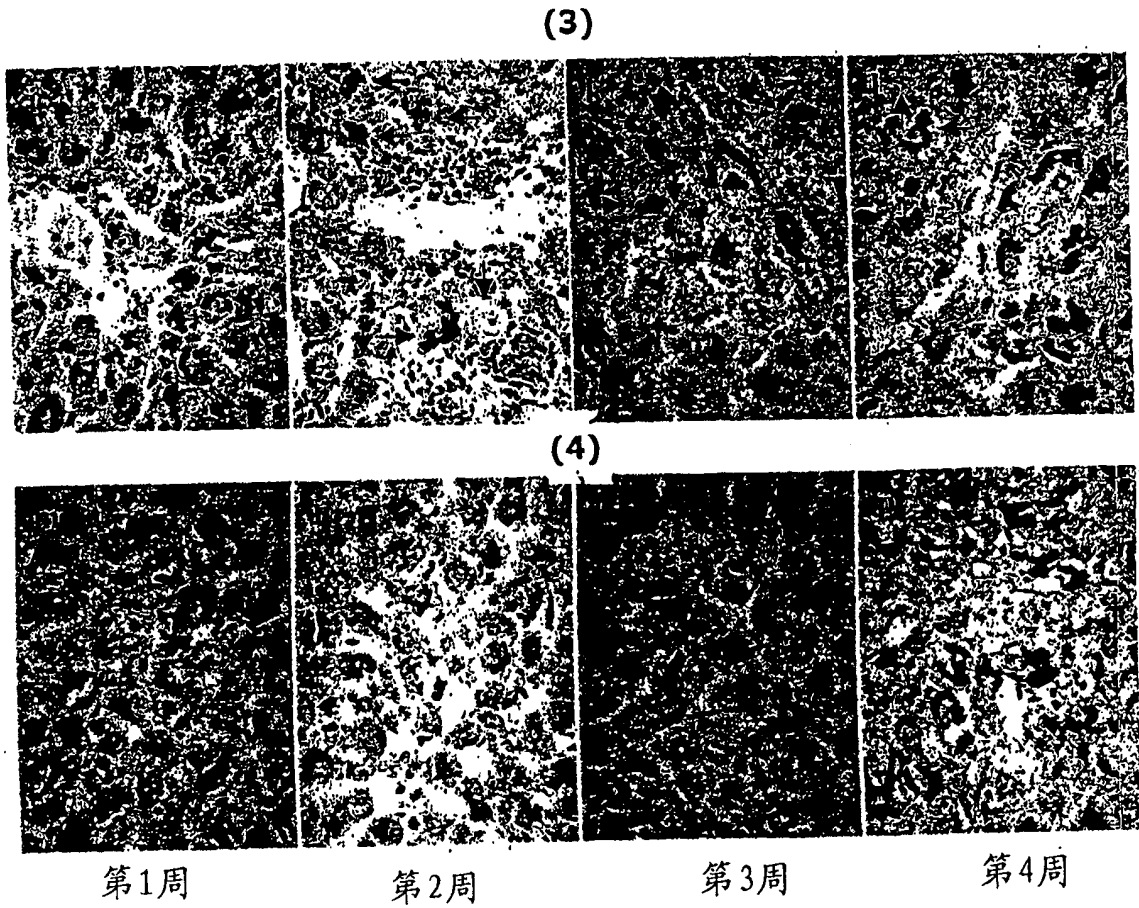


图 11

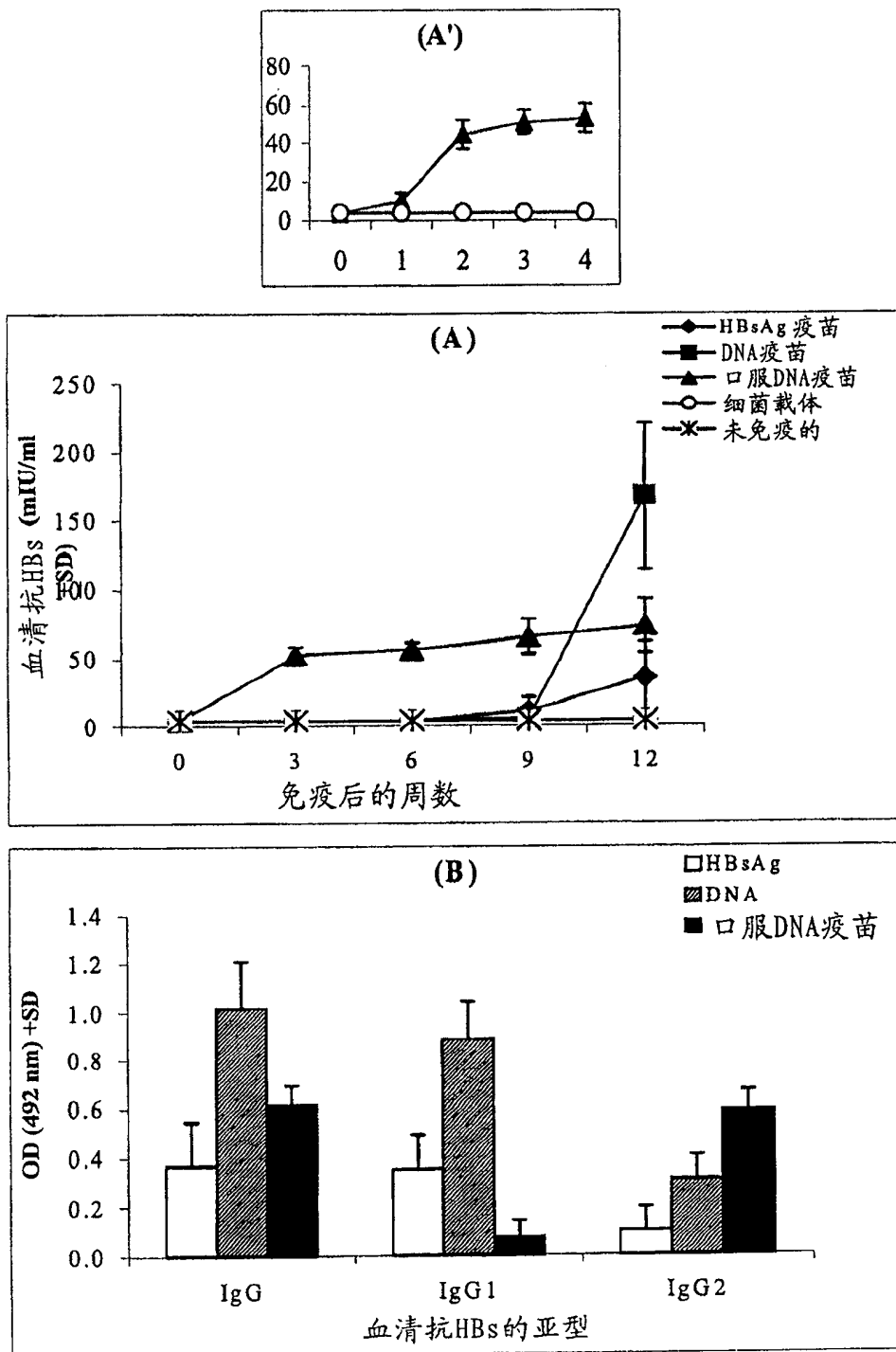


图 12

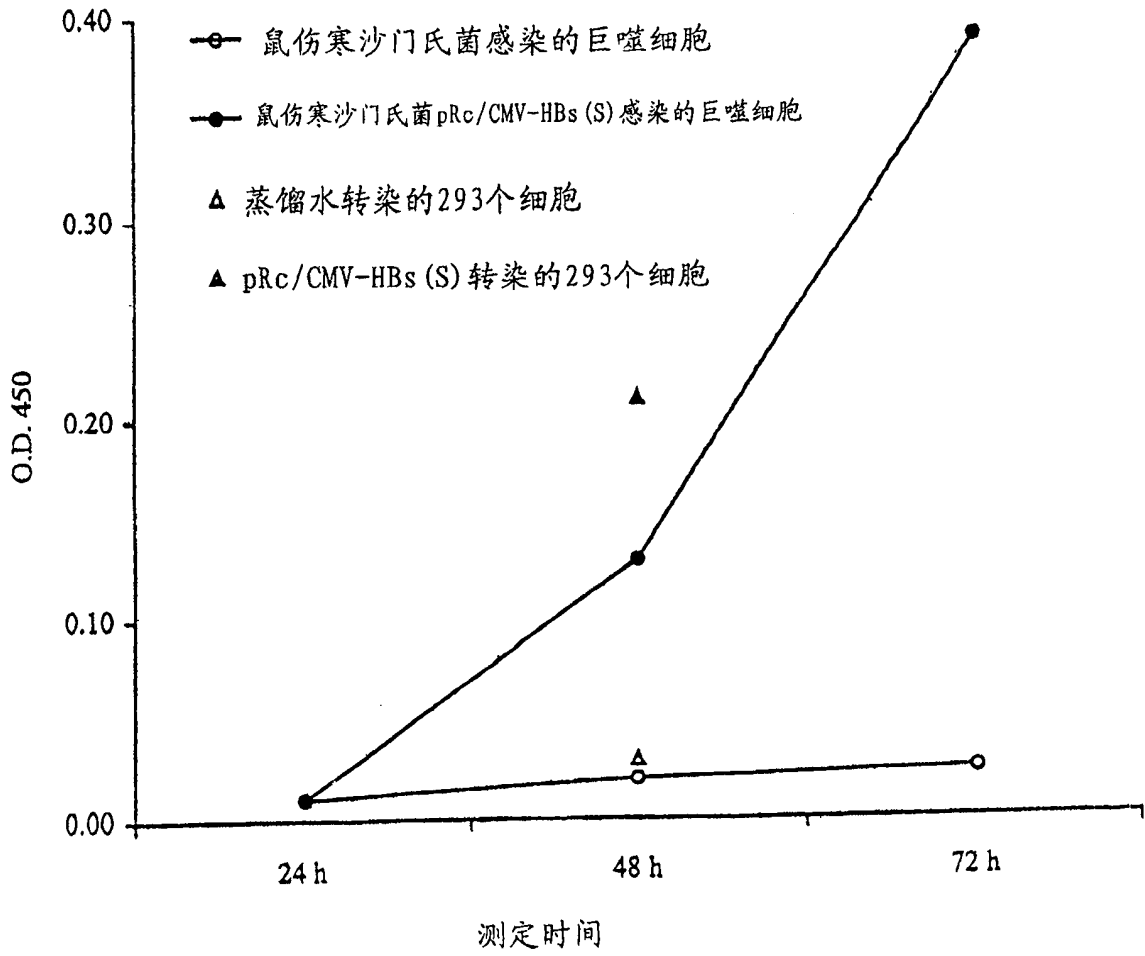


图 13

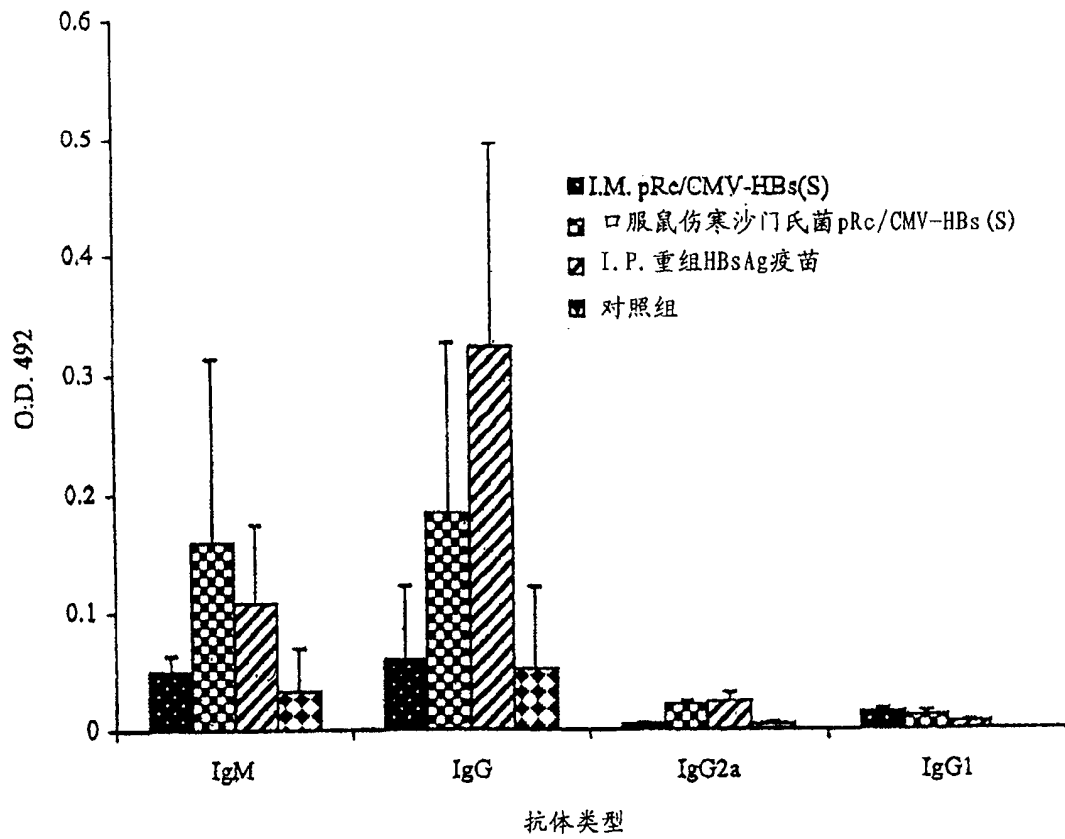


图 14A

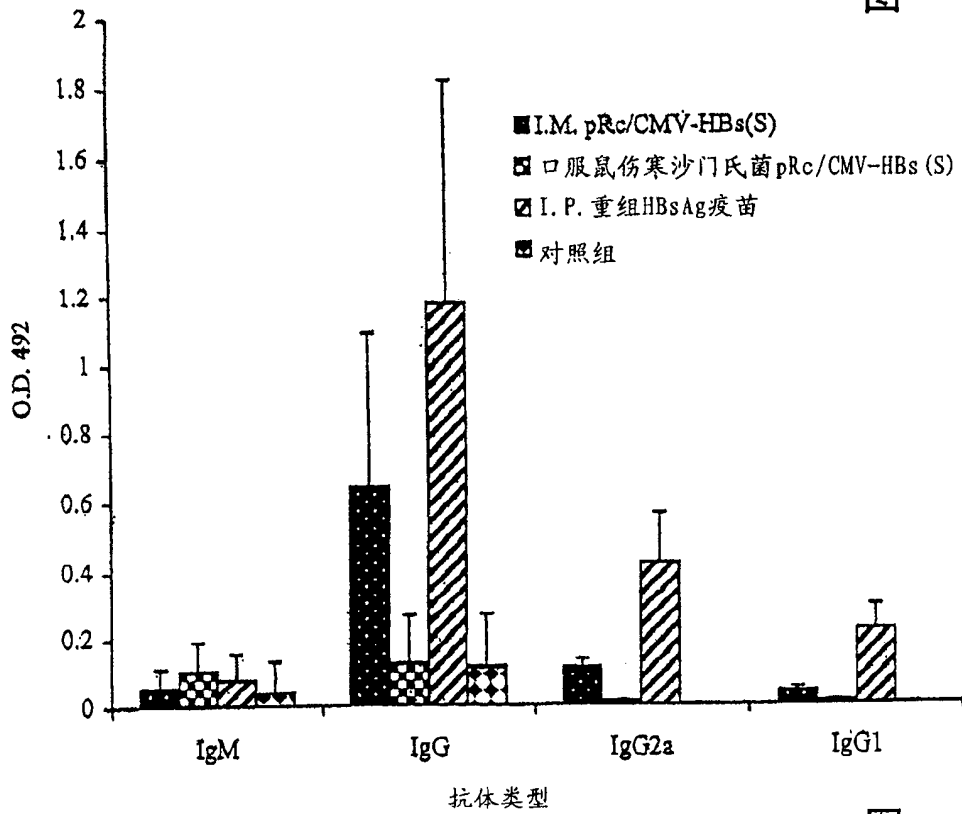


图 14B

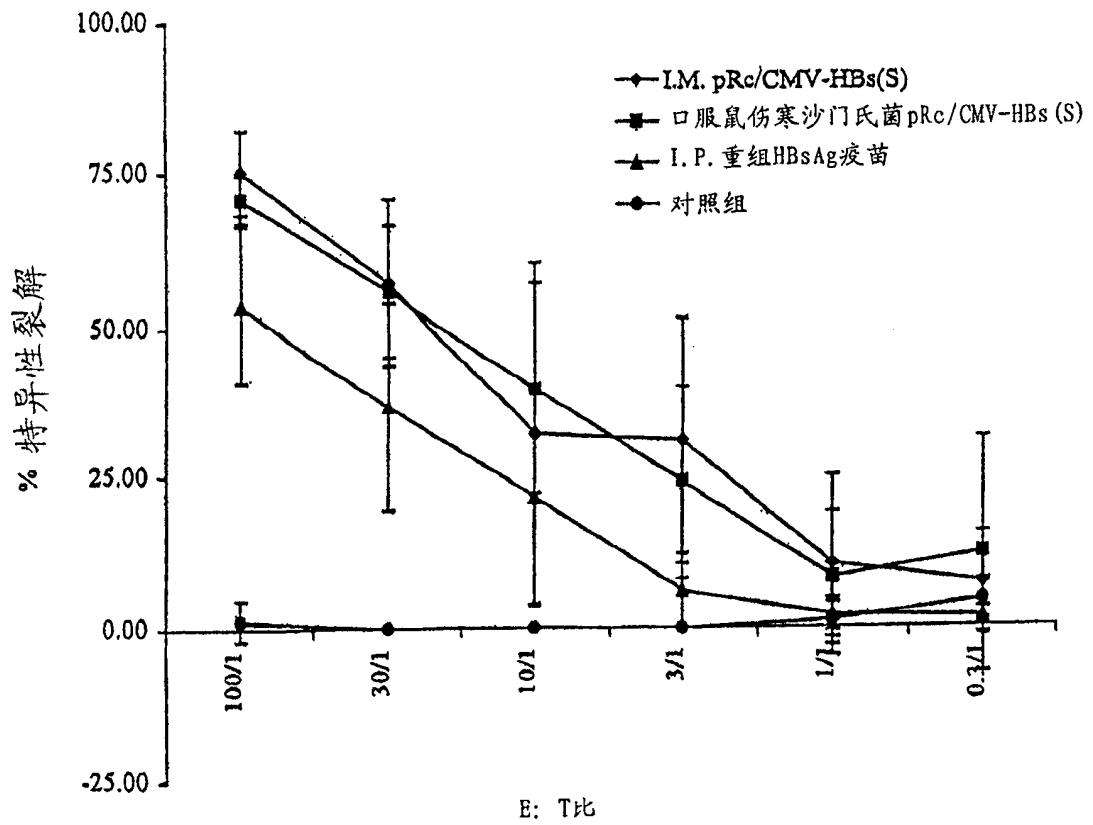


图 15

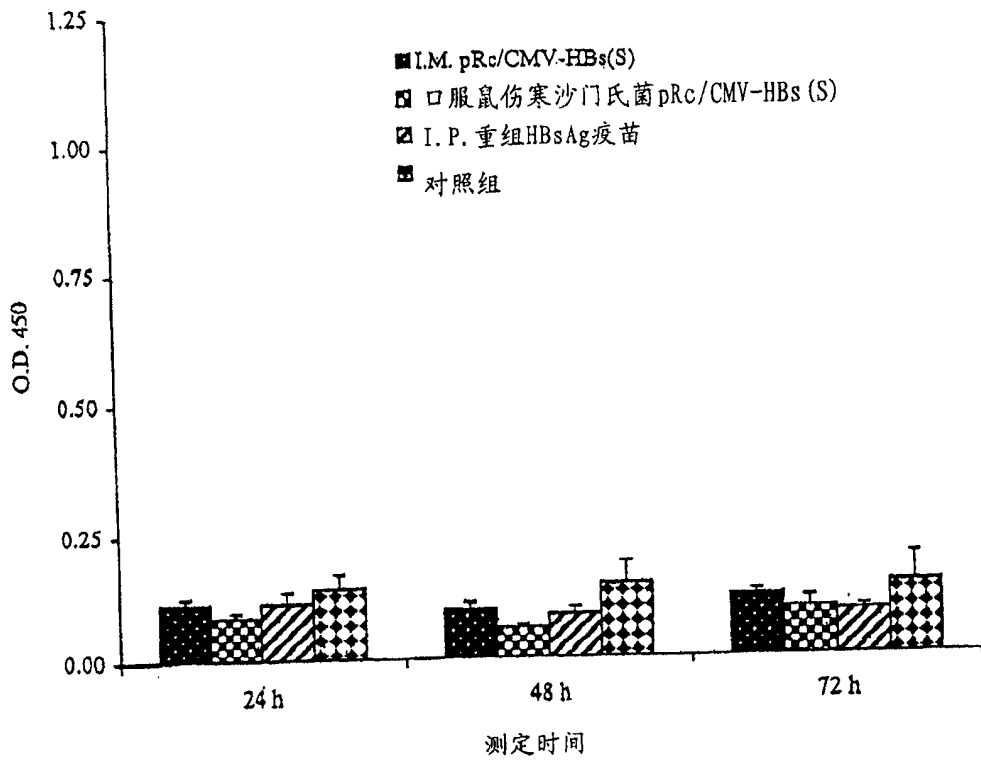


图 16A

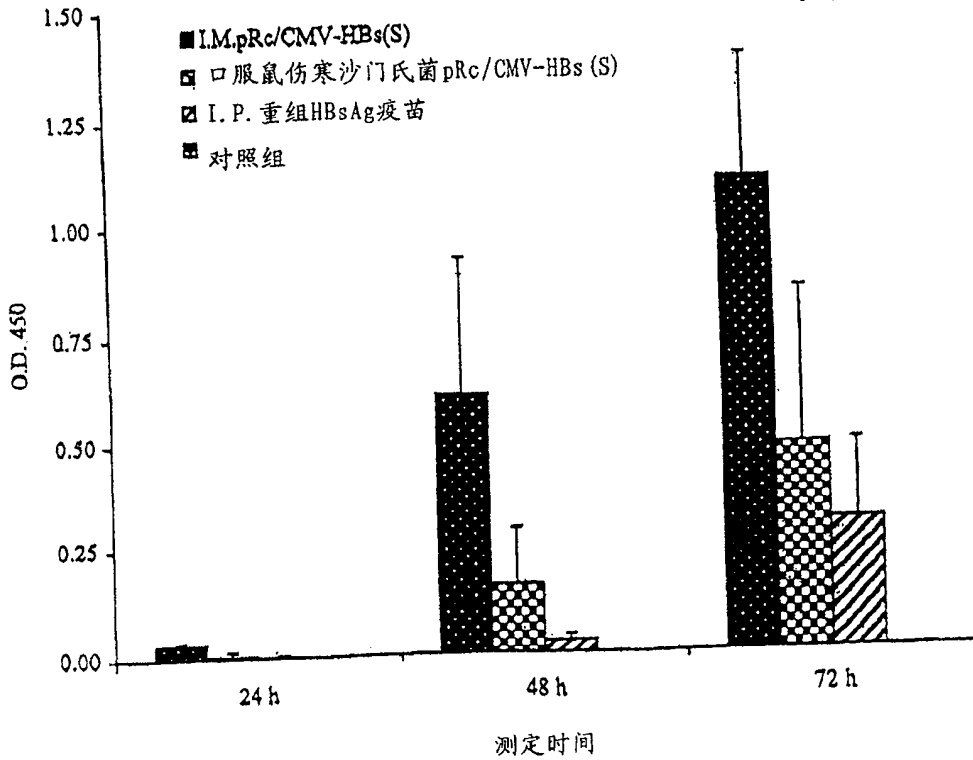


图 16B

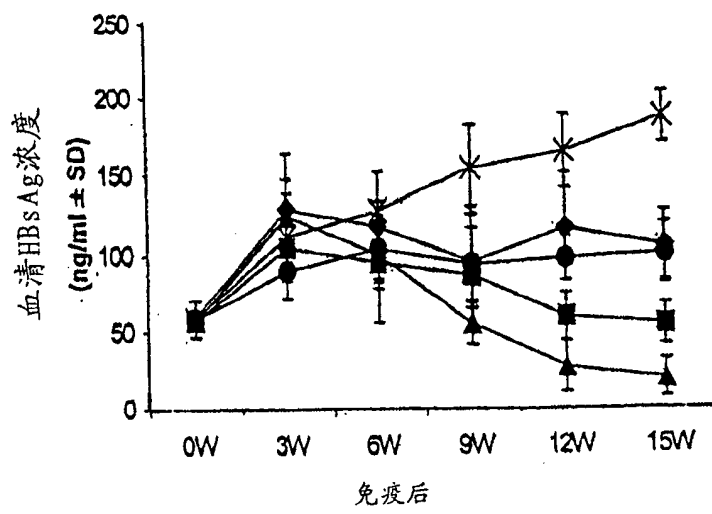


图 17

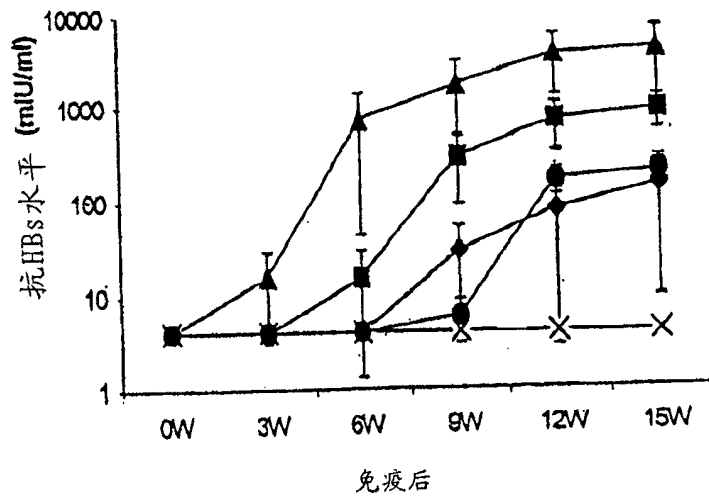


图 18

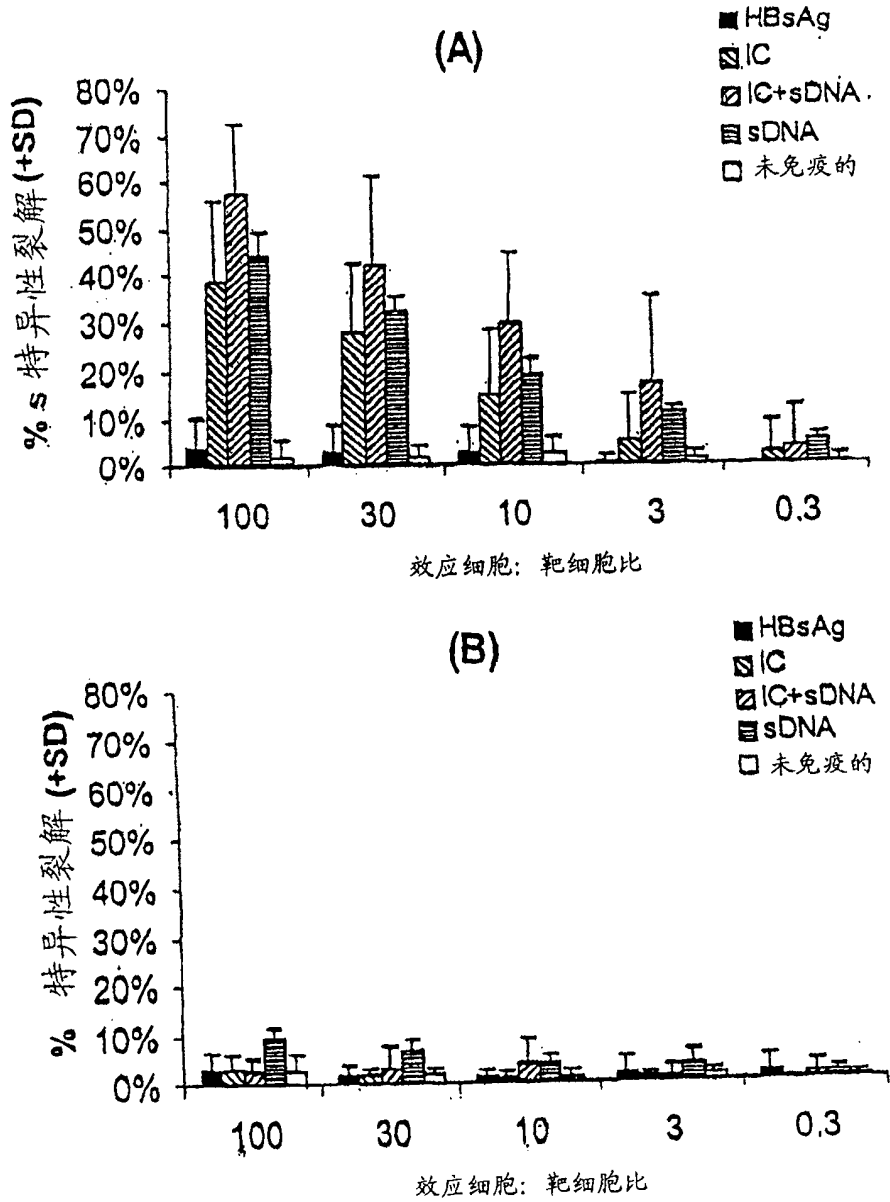


图 19

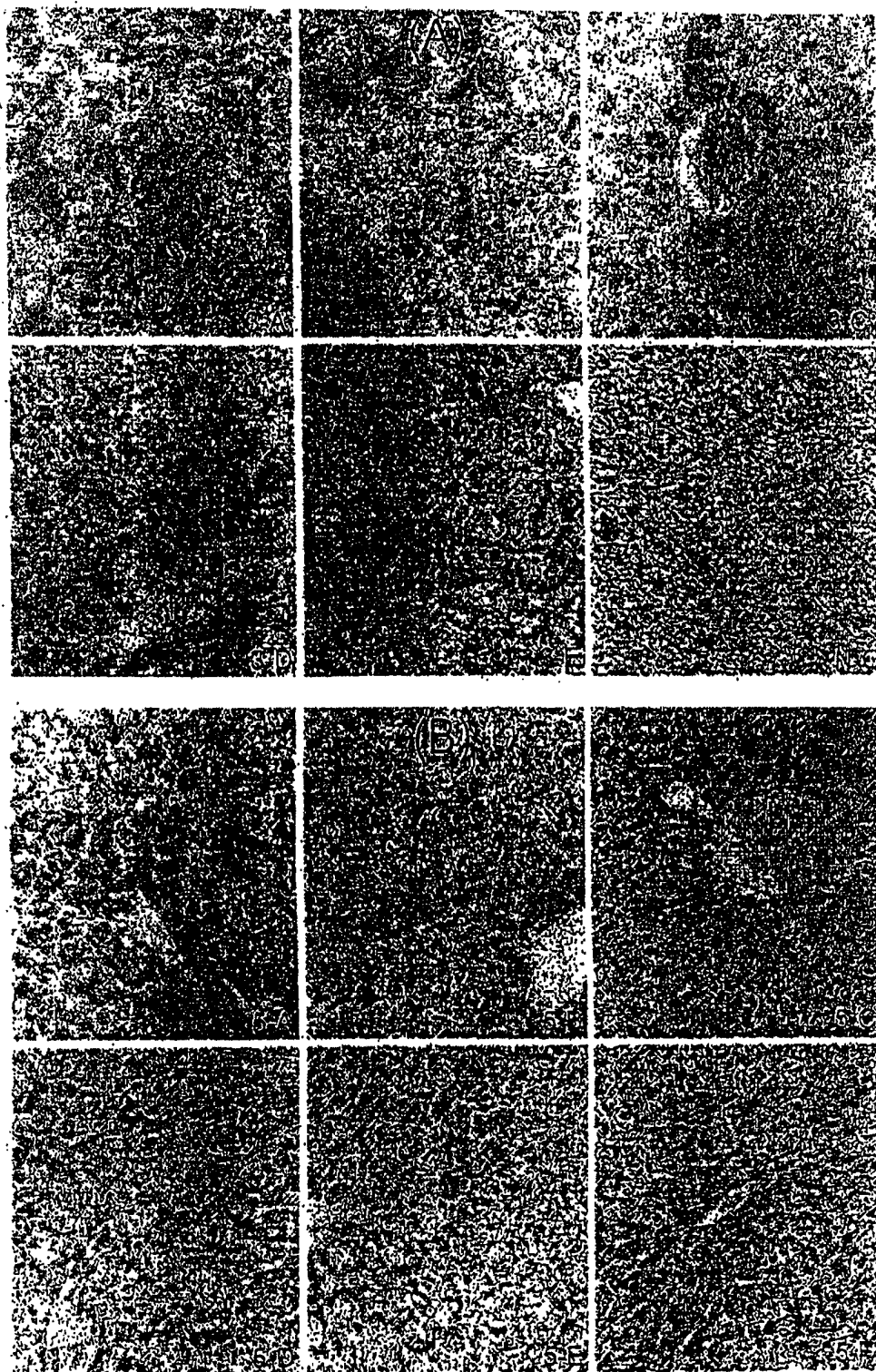


图 20