

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

A61K 39/205 C12N 1/00

C12N 15/00 C12N 15/47



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01820695.6

[43] 公开日 2004 年 5 月 5 日

[11] 公开号 CN 1494432A

[22] 申请日 2001.2.15 [21] 申请号 01820695.6

[86] 国际申请 PCT/IN2001/000018 2001.2.15

[87] 国际公布 WO02/078732 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.16

[71] 申请人 雷吉斯特印度科学院

地址 印度卡纳塔克邦

共同申请人 印度免疫有限公司

[72] 发明人 纳拉辛汉·兰加拉詹·蓬迪

奥尔沃·斯里尼瓦桑·维卢帕诺

比斯瓦斯·苏巴布拉塔

斯里尼瓦萨·雷迪·古德提

[74] 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公司

代理人 万学堂

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种包含 DNA 疫苗和灭活病毒的新
的疫苗制剂

[57] 摘要

本发明公开了一种预防性或治疗性的脊椎动物免疫的新的疫苗制剂，以抗由脊椎动物病毒所引起的感染。所述疫苗含有最低量的两种成分，一种是含有编码病毒多肽 DNA 分子的脱氧核糖核酸 (DNA) 疫苗，另外一种组分包含灭活形式的病毒。本发明也可用来开发低成本的基于灭活病毒的疫苗，该疫苗含有比现有领域已知的类似疫苗中存在的病毒更低数量的所述病毒。本发明也涉及一种生产所述新的疫苗制剂的方法以及所述制剂的用途。

- 1、一种新的疫苗制剂, 包含具有编码一个或多个病毒多肽的 DNA 序列的质粒和灭活病毒制备物。
- 2、如权利要求 1 所述的新的疫苗制剂, 其中具有编码一个或多个病毒多肽的 DNA 序列的质粒具有以下特征:
 - 5 a. 来自病毒编码多肽的基因序列, 当其在目的物种中表达时能够赋予靶物种抗病毒的保护性免疫力;
 - b. 来自真核基因组的启动子和增强子序列, 当其与病毒基因序列相连时能引起脊椎动物细胞中病毒多肽的合成; 以及
 - c. 细菌复制起点。
- 10 3、如权利要求 1 所述的新的疫苗制剂, 其中, 质粒携带有编码如构建体 pCMVRab 所描述的狂犬病毒表面糖蛋白的 DNA 序列。
- 4、如权利要求 1 所述的新的疫苗制剂, 包含产自脊椎动物细胞如 Vero 细胞、幼仓鼠肾细胞、小鸡胚胎细胞等的灭活病毒制备物。
- 5、如权利要求 1 所述的新的疫苗制剂, 其中灭活病毒是狂犬病毒。
- 15 6、一种生产新的包含特异 DNA 疫苗和灭活的病毒制备物的疫苗制剂的方法。
- 7、如权利要求 6 所述的生产新的疫苗制剂的方法, 包括下面步骤:
 - a) 构建能在脊椎动物细胞中表达病毒多肽的质粒;
 - b) 由已知的方法大规模生产质粒;
 - c) 由已知的方法生产灭活的病毒;
 - 20 d) 混合质粒构建体和灭活的病毒制备物;
 - e) pH 值在 8.0 和 9.0 之间的缓冲液如磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液等;
 - f) 盐如氯化钠;
 - g) 稳定剂或防腐剂如 Thiomersol、人血清白蛋白、麦芽糖等;
 - h) 可选使用佐剂如氢氧化铝;
 - 25 i) 混合制备物; 以及
 - j) 按定义的剂量用瓶子分装制备物。
- 8、如权利要求 6 所述的一种生产新的抗狂犬病疫苗制剂的方法, 包括下面步骤:
 - a) 用已知的方法制备具有狂犬病毒表面糖蛋白基因序列的质粒构建体 (pCMVRab);
 - 30 b) 用已知的方法制备灭活的狂犬病毒制备物;

-
- c) 混合 pCMVRab (1—200 毫克) 与灭活的狂犬病毒制备物;
 - d) pH 值在 8.0 和 9.0 之间的缓冲液如磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液等;
 - e) 盐如氯化钠;
 - f) 稳定剂或防腐剂如 Thiomersol、麦芽糖、人血清白蛋白等;
 - 5 g) 可选使用佐剂如氢氧化铝;
 - h) 用已知方法混合制备物; 以及
 - i) 用已知方法用瓶子分装制备物。
- 9、包含具有编码一个或多个病毒多肽 DNA 序列的质粒和灭活病毒的新的疫苗制剂在抗病毒疾病的脊椎动物免疫中的用途。
- 10 10、 包含具有编码狂犬病毒表面糖蛋白 DNA 序列的质粒和灭活狂犬病毒的新的狂犬病疫苗制剂在脊椎动物的免疫, 如牛、狗、人等的用途。

一种包含 DNA 疫苗和灭活病毒的新的疫苗制剂

技术领域

- 5 本发明涉及一种预防性或治疗性的脊椎动物免疫方法，以对抗脊椎动物病毒引起的感染。该方法包括脊椎动物的用药、一种疫苗组合物，该疫苗组合物含有最低量的两种成分，一种是由编码病毒多肽的 DNA 分子组成的脱氧核糖核酸（DNA）疫苗，另外一种成分由灭活形式的病毒组成。联合施用这两种成分所诱发的保护性免疫应答要优于单独施用单个成分所诱发的免疫应答。因此，本发明可用来开发一种
- 10 种包含 DNA 疫苗和灭活病毒的联合疫苗。另一方面，本发明可用来开发低成本的基于灭活病毒的疫苗，与现有领域已知类似疫苗中存在的所述病毒比较，该疫苗含有更低数量的所述病毒。

背景技术

- 15 自从爱德华·詹纳（Edward Jenner）两百多年前第一次记载了针对天花的成功接种疫苗方法以来，疫苗发展经历了巨大的变化。第一代疫苗包括使用减毒的、活的或杀死的病原体作为疫苗，这种模式的接种疫苗主要负责消灭诸如脊髓灰质炎、天花等疾病。动物细胞培养技术的快速进展导致基于细胞培养的疫苗的发展，其中，
- 20 大规模培养、纯化、灭活病原性的生物，并用作疫苗。对于诸如脊髓灰质炎、狂犬病、麻疹等疾病，广泛使用杀死或灭活的病毒做为疫苗的用途。在本接种疫苗方法中，病毒以非感染的形式呈递给免疫系统，因此，个体能增加抗病毒的免疫应答。杀死的或灭活的病毒通过直接产生抗病毒免疫原的 T 辅助细胞和体液免疫应答来提供保护。然而，在这种类型的接种疫苗中，因为病毒不能复制或经历感染循环，
- 25 不会产生由细胞毒性 T 淋巴细胞（CTLs）介导的细胞介导免疫应答。在缺乏足够的 CTL 应答的情况下，这些疫苗经常不能赋予抗病原体的完全保护。与基于杀死的或灭活的病毒疫苗相关联的另一个主要问题是其高的生产成本。尽管可以商购得到一些针对疾病如狂犬病的基于组织培养的灭活病毒疫苗，但使用组织培养的方法获得高滴度病毒的高生产成本使得这些疫苗在世界很多地方，特别是发展中国家变得很

不经济，而在这些地方对基于灭活病毒疫苗的需求远超过供应。因此，这些类型疫苗的一个主要缺点就是高的生产成本和大量生产的困难。在疫苗制剂中减少灭活病毒的量，而不损害疫苗效力的策略能降低基于灭活病毒疫苗的生产成本。因此，有必要开发一种新型疫苗，该疫苗能克服与基于灭活病毒疫苗相关联的所有或某些缺点。

因为质粒 DNA 能以很低的成本生产并且能在室温贮藏，所以认为质粒 DNA 作为疫苗的用途具有重要意义。在 Wolff 等人进行的“质粒或裸”DNA 体内接种的精液研究中，表明编码几种不同报道基因的质粒 DNA 的直接肌肉内接种能在肌肉细胞内诱导蛋白质的表达（1）。这一研究为以下观点提供了强有力的基础，即纯化的/重组核酸（“裸 DNA”）可以被递送到体内并且能指导蛋白的表达。这些发现进一步在 Tang 等人研究中得到扩展（2），他们证明注射了编码 hGH 的质粒 DNA 的小鼠能诱导抗原特异的抗体应答。随后，Ulmer 等人（3）和 Robinson 等人（4）证明 DNA 疫苗能分别保护小鼠或小鸡免受流感的感染，这提供了 DNA 接种怎样介导保护性免疫的显著例子。小鼠研究进一步记载了抗体和 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞应答（CTL）都能诱发出来（3，4），这与 DNA 疫苗激发体液和细胞免疫是一致的。这一研究后，又有几篇报告证明了 DNA 疫苗在实验模型中诱导保护性免疫应答以抗包括癌症在内的几种感染性疾病的用途。这一技术在关于 DNA 疫苗的文献中有很丰富的记载，关于该主题，从出版的一些书籍（5-9）和综述文章中可以很明显的看出来。关于这一领域所取得的进展，一个 DNA 疫苗的专门网站也提供了有价值的信息（39）。进一步也可以得到 DNA 疫苗在动物和人临床试验中应用的指南。其它有助于理解和进行 DNA 疫苗技术的信息可在以下专利中找到，即专利 US05580859、US05589466、US05620896、US05736524、US05939400、US05989553、US06063385、US06087341、US06090790、US06110898、US06156322、US05576196、US05707812、US5643578、US0557619、US0570781、US05916879、US05958895、US05830876、US05817637、US6133244、US6020319、US5593972、WO00/24428、WO99/51745、WO99/43841、WO99/388880、WO99/02132、WO98/14586、WO98/08947、WO98/04720、WO00/77188、WO00/77043、WO00/77218、WO0077188、WO00037649、WO00044406、WO9904009、WO00053019、W00050044、WO00012127、WO9852603、WO9748370 和 WO97730587。可得到的大量关于 DNA 疫苗的文献表明 DNA 疫苗在预防和治疗包括癌症在内的一些感染性疾病方面

具有良好的前景。在几种动物模型已经很好地建立了 DNA 疫苗诱导保护性免疫的一般性应用，并且已经进行到人一期临床试验。过去许多年开展的研究表明，对于某些疾病，单独的 DNA 接种不能产生预期的效果，但如果联合使用其它的预防性或治疗性的策略就能产生预期的效果。一个如现有技术“启动—加强（prime-boost）策略”所提及的策略包括施用 DNA 疫苗以“启动”免疫系统，随后施用重组蛋白或活的减毒疫苗或基于灭活的病原体疫苗以“加强”免疫系统（41—59）。除了启动—加强（prime-boost）策略之外，在现有技术中描述了几种提高 DNA 疫苗效力的其它策略。这些策略包括：

1. 共接种多个表达病原体不同抗原的质粒或表达病原体不同抗原多个表位的质粒（60-71）。
 2. 共接种编码细胞因子或共刺激分子的质粒和表达目的抗原的质粒（72-94）。
 3. 在 DNA 疫苗制剂中包含一些化合物如皂甙、明矾、壳聚糖、脂质体、阳离子脂质等化合物（95-106）。
 4. 在质粒 DNA 中包含如 CpG 基序之类的特异序列（107-117）。
- 而且，证明对质粒载体和 / 或编码抗原的基因进行修饰的各种策略能提高 DNA 疫苗的效力（118-136）。因此，存在开发能提高 DNA 疫苗效力的新的组合物的余地。

发明概述

- 本发明描述了一种通过在 DNA 疫苗制剂中添加少量灭活病毒来增强 DNA 疫苗效力的新的方法。在一个实施方案中，本发明致力于开发含有 DNA 疫苗和灭活病毒的联合疫苗。在另一个实施方案中，本发明致力于开发含有比基于传统灭活病毒疫苗中存在的灭活病毒更低量的灭活病毒疫苗。本发明也描述了一种生产抗狂犬病毒的新的疫苗组合物的方法。

附图说明

图 1 为编码狂犬病毒糖蛋白的狂犬病毒 DNA 疫苗质粒（pCMVRab）的示意图。

发明详述

本发明描述了一种新的抗传染性疾病的脊椎动物免疫方法，该方法使用一种疫苗制剂，其含有最低量的杀死或灭活形式的病毒以及编码存在于灭活病毒中的一种或多种多肽的质粒 DNA。本发明中描述的方法可用来开发一种联合疫苗，主要包含灭活病毒和编码病毒的一种或多种多肽的质粒 DNA。当以存在于联合疫苗中的数量使用包含灭活病毒和 DNA 疫苗的疫苗制剂时，其比单独含有灭活病毒或单独含有 DNA 疫苗的疫苗制剂具有更高的效力。如本发明所有实施方案所述事实，本疫苗制剂不包含活的或减毒病毒。

10 本发明在开发联合疫苗中的用途可以用狂犬病毒作为例子来解释，但由于涉及 DNA 疫苗或基于灭活病毒的疫苗所诱发的保护性免疫机理对所有脊椎动物病毒都是相似的，故本发明的方法对其它脊椎动物病毒也是适用的。

本发明所描述的效力是指疫苗诱导病毒中和抗体和 / 或保护免疫的宿主抗随后的病毒攻击的能力。在一个实施方案中，通过用快速荧光聚焦抑制试验或 RFFIT 测量免疫动物血清中狂犬病毒中和抗体的效价评价狂犬病疫苗效力（137）。在另外一个实施方案中，通过免疫宿主体内抗狂犬病毒攻击的狂犬病疫苗所赋予的保护水平评价狂犬病疫苗效力。

使用本领域已知的任何脊椎动物细胞系，通过细胞 / 组织培养的方法可以生产本发明所描述的基于灭活病毒的疫苗。例如，灭活狂犬病毒可以如美国专利 3423505、3585266、4040904、3769415、4115195、3397267、4664912 和 4726946 所描述的那样用脊椎动物细胞培养来生产。在一个实施方案中，产自小鸡胚胎细胞的纯化的小鸡胚胎细胞狂犬病疫苗（PCEC）和狂犬病 DNA 疫苗一起联合使用。在另一个实施方案中，产自 Vero 细胞的纯化的 Vero 细胞狂犬病疫苗（PVRV）与狂犬病 DNA 疫苗一起联合使用。在另一个实施方案中，产自幼仓鼠肾（BHK）细胞的狂犬病毒被用作灭活狂犬病毒的来源。进一步，认为本发明的方法适合脊椎动物物种如鼠科动物、犬科动物、绵羊科动物或人类的免疫。在一个实施方案中，鼠科动物物种是小鼠。在另一个实施方案中，犬科动物物种是狗。在另一个实施方案中，牛科动物物种是牛。

联合疫苗中灭活病毒的数量可以广泛变化，这取决于基于灭活病毒的疫苗制剂的免疫原性和效力。在一个实施方案中，联合疫苗中灭活狂犬病毒的数量比现有技术

术已知的组织培养狂犬病疫苗中存在的病毒数量低 600 倍。在仔细滴定分析不同稀释度的灭活狂犬病毒疫苗的基础上，确定与狂犬病 DNA 疫苗一起使用的灭活狂犬病毒的数量。狂犬病毒攻击后，在免疫宿主中不能诱导出可测量的 VNA 水平和 / 或不能赋予 100%保护的剂量被选作同 DNA 疫苗一起使用的剂量，以开发更高效力的联合疫苗。疫苗制剂中存在的灭活狂犬病毒和质粒 DNA 的最终浓度应该用现有技术所描述的标准程序来确定，如那些用世界卫生组织（WHO）的疫苗标准的美国或英国药典中所提到的程序，这是生产狂犬病疫苗领域的专业技术人员所熟知的。

正如本发明所使用的，质粒 DNA 是指染色体外的、共价闭合的环状 DNA 分子，该 DNA 分子能在细菌细胞中自主复制，并由转录单位（即编码多肽的核苷酸序列）组成，这些转录单位与存在于目的病毒中的转录单元相似或相同，其可操作性地与在脊椎动物细胞中蛋白表达所必需的转录和翻译调节序列连接在一起。

本发明所描述的质粒转录单位可以含有任何大量的已知的真核启动子，如那些在动物病毒和包括人类在内的基因组中所发现的启动子。进一步，转录单位可以含有编码脊椎动物病原体如病毒、细菌、寄生虫等多肽的 DNA。在一个优选实施方案中，转录单位包含编码狂犬病毒表面糖蛋白的 DNA。

将编码脊椎动物病原体多肽的 DNA 导入质粒可以用现有技术所描述的任何已知的程序来实现（138）。进一步，将这些质粒导入细菌、在营养培养基中培养以及从细菌培养物中纯化质粒的方法可以使用现有技术已知的任何方法来实现（138，139）。

下面给出示例本发明各个方面的实施例。这些实施例仅仅是示例性的而不是以任何方式限制本公开的其它部分。

实施例 1：狂犬病 DNA 疫苗的制备和纯化

狂犬病 DNA 疫苗质粒的构建如下。用限制性内切酶 *HindIII* 和 *PstI* 消化 pCMVintBL 质粒分离巨细胞病毒立即早期启动子和内含子，并将其克隆在 pEGFP1 质粒(Clontech, CA, USA)的 *HindIII* 和 *PstI* 位点，得到 pCMVEGFP 构建体。从 pgt155 载体上分离出做为 *BglII* 限制性片段的编码狂犬病毒表面糖蛋白 cDNA（141），并将其克隆至 pCMVEGFP 的 *BamHI* 位点。最后，以 *XbaI*—*NotI* 片段的形式切除编码 EGFP 的 cDNA，载体重新连接得到 pCMVRab 构建体。在构建 pCMVRab 过程中使用了现有技术所描述的标准重组 DNA 技术（138）。pCMVRab 的示意图如图 1 所示。用碱裂解方法（138，139）进行 pCMVRab 的大量分离和纯化。最终的质粒

制备物溶解在盐 (0.15M NaCl) 中, 并用作狂犬病 DNA 疫苗。上述方法的多个变化可用于狂犬病 DNA 疫苗质粒的开发, 这一点是制备真核表达质粒的本领域技术人员所熟知的。例如, 编码狂犬糖蛋白的 cDNA 可以从其它狂犬病毒株系如 Challenge Virus Standard (CVS)、Street—Alabama—Dufferin (SAD)、Evelyn Rokitniki 5 Abelseth (ERA) 等获得。类似地, 巨细胞病毒启动子可以从多种商购而来的真核表达质粒中获得。

实施例 2: 从脊椎动物细胞组织培养物中制备灭活狂犬病毒疫苗。

可以用现有技术公开的任何方法制备灭活的狂犬病毒疫苗, 如在美国专利 10 3423505、3585266、4040904、3769415、4115195、3397267、4664912、4726946 中所描述的方法。简言之, 用狂犬病毒感染脊椎动物细胞如 Vero 细胞、幼仓鼠肾(BHK) 细胞等。用过滤的方法从细胞碎片中分离得到病毒, 然后通过加入 β -丙内酯或溴乙亚胺来灭活病毒。然后, 将病毒浓缩, 取出一部分, 采用接种敏感的单层细胞培养物和小鼠脑内接种的方法检验其中不含感染性的病毒。浓缩的病毒制备物与佐剂 15 如氢氧化铝 (每剂量 3 毫克) 混合, 该液态疫苗用作动物接种。可替代地, 可以通过区带离心进一步纯化病毒, 之后, 在化合物如人血清白蛋白、麦芽糖存在的情况下冻干病毒, 该冻干的病毒制备物即用作狂犬病疫苗。在一个实施方案中, 由印度的 Indian Immunologicals Ltd., Hyderabad 生产的纯化 Vero 细胞来源的狂犬病疫苗 (PVRV), 已知也称为 Abhayrab^R, 被用作灭活狂犬病毒疫苗的来源。在另一个实 20 施方案中, 印度 Hoechst Marion Roussel 生产的纯化小鸡胚胎细胞 (PCEC) 来源的狂犬病疫苗, 已知也称为 Rabipur^R, 被用作灭活狂犬病毒疫苗的来源。在另一个实施方案中, 印度 Indian Immunologicals Ltd., Hyderabad 从幼仓鼠肾 (BHK) 细胞生产的兽用狂犬病毒疫苗, 已知称为 Raksharab^R, 被用作灭活狂犬病毒疫苗的来源。

25 实施例 3: 制备包含灭活狂犬病毒和狂犬病 DNA 疫苗的联合疫苗。

灭活的狂犬病毒疫苗如 Abhayrab^R, Raksharab^R 或 Rabipur^R 用盐稀释 625 倍, 取 0.5 毫升稀释的样品与 100 毫克狂犬病 DNA 疫苗混合, 用该混合物做为联合狂犬病疫苗免疫小鼠、狗或牛。必要时, 加入氢氧化铝至终浓度为每剂量 3 毫克。最终的疫苗制备物也可以含有防腐剂如 Thiomersol (0.015%), 并且可以被用作液态或冻干 30 疫苗。

实施例 4: 在鼠的狂犬病毒攻击模型中评价狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗以及包含灭活的狂犬病毒和 DNA 疫苗的联合疫苗的效力。

在鼠的外周狂犬病毒攻击模型中评价狂犬病 DNA 疫苗的效力。十只小鼠为一组，每只小鼠接种 100 毫克狂犬病 DNA 疫苗，共两次，每次间隔两周。第二次剂量用药之后两周，在小鼠脚肉趾部位接种 challenge virus standard (CVS) 株系的毒性狂犬病毒并观察 14 天。表 1 给出的结果显示仅有 80% 的用狂犬病 DNA 疫苗接种的小鼠从狂犬病毒攻击中得到保护。因此，我们研究了是否在狂犬病 DNA 疫苗制备物中添加少量灭活的狂犬病毒能得到更高的保护水平。在加入灭活的狂犬病毒到 DNA 疫苗之前，我们检验了 Abhayrab^R 的效力，这是一种灭活的狂犬病毒疫苗，产自鼠的狂犬病毒攻击模型的 Vero 细胞。在每一小瓶 Abhayrab^R (大于 2.5 IU) 中加入两百毫升盐水，十只小鼠为一组，每只肌肉注射 0.1 毫升疫苗。按 5 倍稀释制备 Abhayrab^R 系列溶液 (1: 5、1: 25、1: 125、1: 625)，取 0.1 毫升每一稀释的 Abhayrab^R 制备物，通过腹膜内途径注射每一只小鼠。14 天后，重复该免疫。第二次剂量用药之后两周，在小鼠肉趾部位接种 CVS 株系的毒性狂犬病毒，并观察 14 天。表 1 给出的结果显示未稀释的 Abhayrab^R 疫苗和 5、25、125 倍稀释的疫苗赋予了抗狂犬病毒攻击的 100% 保护。既然这些稀释物中的灭活病毒疫苗赋予 100% 的保护，因此，不在 DNA 疫苗中一起使用这些稀释度。然而，当稀释到 625 倍时，Abhayrab^R 的效力显著减少，只有 50% 的小鼠在狂犬病毒攻击中得到保护。用赋予次优保护的 Abhayrab^R 的剂量研究灭活的狂犬病毒对狂犬病 DNA 疫苗效力的影响。重复免疫实验，单独用 0.1 毫升 625 倍稀释的 Abhayrab^R 或单独用 100 毫克狂犬病 DNA 疫苗或两者联合使用接种小鼠两次，每次间隔两周。两周后对小鼠进行攻击，表 1 给出的结果显示 Abhayrab^R 和狂犬病 DNA 疫苗分别赋予 50% 和 80% 的保护，但这两种疫苗联合使用导致抗狂犬病毒攻击的 100% 保护。因此，在狂犬病 DNA 疫苗中添加次优剂量的灭活狂犬病毒致使开发出一种具有更高效力的新的联合狂犬病疫苗。

为研究是否产自小鸡胚胎细胞的灭活的狂犬病毒也能增强狂犬病 DNA 疫苗的效力，用一种产自小鸡胚胎细胞的灭活的狂犬病毒 Rabipur^R 进行了病毒攻击实验。在每一小瓶 Rabipur^R (大于 2.5 IU) 中加入两百毫升盐水，取 100 毫升，用盐水稀释到 625 倍。用稀释的疫苗 (100 毫升) 单独或与狂犬病 DNA 疫苗联合注射每只小鼠两次，每次间隔两周。如上所述，最后一次免疫两周后对小鼠进行攻击。表 1 给

出的结果显示 625 倍稀释的 Rabipur^R 赋予抗狂犬病毒攻击的 60% 保护, 但与狂犬病 DNA 疫苗联合使用, 保护水平上升至 100%。

因此, 产自 Vero 细胞或小鸡胚胎细胞的灭活的狂犬病毒疫苗制备物都能增强狂犬病 DNA 疫苗的效力。

5

实施例 5: 在鼠模型中用 RFFIT 评价狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗以及包含灭活的狂犬病毒和 DNA 疫苗的联合疫苗的效力。

狂犬病疫苗的效力也可以通过 RFFIT 评价其在免疫宿主中诱导病毒中和抗体 (VNA) 的能力来确定。简言之, 在组织培养箱载片小孔中温育不同稀释度的血清与标准剂量的攻击病毒制备物, 并使载片在 35°C 温度下, 湿润的二氧化碳培养箱中温育 60 至 90 分钟。然后加入 BHK 细胞 (每孔 1×10^5 个细胞), 混合物如上所述进一步温育 20 小时。在磷酸缓冲液中 (PBS) 洗载片, 在冷的丙酮中固定。干燥之后, 以合适的稀释度加入共轭结合荧光素异硫氰酸酯的抗狂犬核蛋白, 在 37°C 继续温育 20 至 30 分钟。最后, 在 PBS 中漂洗载片并在荧光显微镜下观察。使用已知的程序计算病毒的中和滴度。在滴定实验血清效价的每一测试中使用稀释到 1.0 IU / 毫升效力的国家或国际参考血清, 结果以术语 IU / 毫升表达。诱导 VNA 效价达 0.5 及 0.5 以上 IU / 毫升的狂犬病疫苗即认为具有保护性。因此, 免疫宿主中 VNA 的水平是狂犬病疫苗效力的测量标准, 具有更好效力的疫苗诱导更高的 VNA 效价。因而, 我们研究了是否施用包含 625 倍稀释的 Abhayrab^R 和狂犬病 DNA 疫苗 (100 毫克) 的联合疫苗能在免疫的动物中引起更高的 VNA 诱导。如上所述, 十只小鼠一组, 单独用狂犬病 DNA 疫苗, 不同稀释度的 Abhayrab^R 或联合用 625 倍稀释的 Abhayrab^R 和狂犬病 DNA 疫苗接种每组小鼠。在第二次剂量施用之前 (免疫后 14 天) 以及第二次剂量施用之后两周 (免疫后 28 天), 由眼眶后穿刺对小鼠进行取血。收集每组小鼠的血清样本, 用 RFFIT 检测狂犬病 VNA 的水平。表 2 给出的结果显示在单独施用单一剂量的狂犬病 DNA 疫苗、1/625 倍稀释的 Abhayrab^R 或两种联合后 14 天, 产生的 VNA 效价 (IU / 毫升) 分别为 0.287、0.095 和 1.42。当施用第二剂量两周后分析血清时, 单独用狂犬病 DNA 疫苗、1 / 625 倍稀释的 Abhayrab^R 或两种联合免疫的小鼠体内 VNA 效价分别增加到 1.96、0.55 和 4.07。这些结果清楚地显示灭活的狂犬病毒疫苗与狂犬病 DNA 疫苗的联合使用比单独使用两者之一在小鼠体内诱导更高水平的 VNA。

实施例 6：在狗体内用 RFFIT 评价狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗以及包含灭活的狂犬病毒和 DNA 疫苗的联合疫苗的效力。

为检验在小鼠体内得到的结果是否能在其它脊椎动物物种体内得到重复，在狗体内重复了免疫实验。用 625 倍稀释的 Abhayrab^R、100 毫克狂犬病 DNA 疫苗或两者联合通过肌肉内途径对狂犬病 VNA 血清反应阴性的 3 至 4 个月龄的狗进行免疫两次，每次间隔两周。每一组包括一只动物。在免疫之后 7、14、28 和 35 天对动物进行取血，用 RFFIT 分析血清中狂犬病 VNA 的效价。表 3 给出的结果清楚显示用 625 倍稀释的 Abhayrab^R 和 DNA 疫苗接种的动物体内产生的 VNA 效价在所有测试的时间点都比单独用 DNA 疫苗或单独用 625 倍稀释的 Abhayrab^R 接种的动物体内所产生的效价高。

因而，灭活的狂犬病毒和狂犬病 DNA 疫苗联合接种既能在小鼠体内也能在狗体内诱导更高水平的狂犬病 VNA。

实施例 7：在牛体内用 RFFIT 评价狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗以及包含灭活的狂犬病毒和 DNA 疫苗的联合疫苗的效力

已经证明包含灭活的狂犬病毒疫苗和狂犬病 DNA 疫苗的联合疫苗在小鼠和狗体内的效力，接着我们又评价了其在大动物模型牛体内的免疫原性。实验中，使用了产自 BHK 细胞的灭活兽药用狂犬病毒疫苗 Raksharab^R 和 Abhayrab^R。单独用 625 倍稀释的 Abhayrab^R 或 Raksharab^R，或者与 100 毫克狂犬病 DNA 疫苗一起通过肌肉内途径对狂犬病 VNA 血清反应阴性的 12 至 16 个月龄的杂种牛进行免疫接种两次，每次间隔两周，并在免疫后 7、14、28 和 35 天收集血样。每一组由 3 头牛组成，在每一个时间点，收集每一组的牛血清，然后进行 RFFIT 分析。表 4 给出的结果清楚显示用灭活的狂犬病毒（Abhayrab^R 或 Raksharab^R）和狂犬病 DNA 疫苗接种的牛比单独用灭活的狂犬病毒或单独用狂犬病 DNA 疫苗免疫的牛有更高水平的狂犬病 VNA。

在另一独立的实验中，评价了佐剂如氢氧化铝对联合疫苗（灭活的狂犬病毒 + DNA 疫苗）效力的影响。在存在或不存在氢氧化铝的情况下，用 DNA 疫苗、625 倍稀释的 Raksharab^R 或两者一起免疫牛两次，中间间隔两周（第 0 天和第 14 天）。

在固定的间隔时间对牛进行取血，用 RFFIT 评价 VNA 水平。表 5 给出的结果显示添加氢氧化铝进一步增强了联合狂犬病疫苗的效力。

描述狂犬病 DNA 疫苗和不同灭活的狂犬病毒疫苗一起使用的这些实施例应被认为是示例而不是限制本发明，本发明是由所附权利要求所限定的。

5

表 1
接种了狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗（Abhayrab^R 或 Rabipur^R）
或联合疫苗的小鼠获得的免受狂犬病毒攻击的保护

动物组	狂犬病疫苗	接种的小鼠数 目	存活的小鼠数 目	保护百分 比
1.	DNA 疫苗	10	8	80
2.	Abhayrab ^R （未稀释）	10	10	100
3.	Abhayrab ^R 1: 5 稀释	10	10	100
4.	Abhayrab ^R 1: 25 稀释	10	10	100
5.	Abhayrab ^R 1: 125 稀 释	10	10	100
6.	Abhayrab ^R 1: 625 稀 释	10	5	50
7.	Abhayrab ^R 1: 625 稀 释+DNA 疫苗	10	10	100
8.	Rabipur 1: 625 稀释	10	6	60
9.	Rabipur 1: 625 稀释 +DNA 疫苗	10	10	100
10.	盐水	10	0	0

10

表 2
狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗或联合疫苗
在小鼠体内诱导狂犬病毒中和抗体（VNA）。

动物组	狂犬病疫苗	VNA 效价 (IU / ml)	
		免疫后第 14 天	免疫后第 28 天
1.	DNA 疫苗	0.287	1.96
2.	Abhayrab ^R （未稀释）	2.46	4.65
3.	Abhayrab ^R 1: 5 稀释	0.62	2.82
4.	Abhayrab ^R 1: 25 稀释	0.5	2.13

5.	Abhayrab ^R 1: 125 稀释	0.19	1.0
6.	Abhayrab ^R 1: 625 稀释	0.095	0.55
7.	Abhayrab ^R 1: 625 稀释 + DNA 疫苗	1.42	4.07
8.	Rabipur ^R 1: 625 稀释	0.095	0.38
9.	Rabipur ^R 1: 625 稀释 + DNA 疫苗	0.54	4.26

表 3

狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗 (Abhayrab^R) 或联合疫苗
在狗体内诱导狂犬病毒中和抗体 (VNA)。

动物组	狂犬病疫苗	狗的数目	VNA 效价 (IU / ml) [#]					
			第0天	第7天	第14天	第21天	第28天	第35天
1.	DNA 疫苗	1	<0.095	<0.095	0.217	0.575	0.76	1.0
2.	Abhayrab ^R (1: 625 稀释)	1	<0.095	<0.095	0.217	0.28	0.5	0.575
3.	DNA 疫苗 + Abhayrab ^R (1: 625 稀释)	1	<0.095	<0.095	0.575	2.0	3.02	3.02

5

表 4

狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗 (Abhayrab^R 或 Raksharab^R) 或联合疫苗
在牛体内诱导狂犬病毒中和抗体 (VNA)

动物组	狂犬病疫苗	牛的数目	VNA 效价 (IU / ml)					
			第0天	第7天	第14天	第21天	第28天	第35天
1.	DNA 疫苗	3	<0.095	0.66	0.36	0.80	0.87	0.96
2.	Abhayrab ^R (1: 625 稀释)	3	<0.095	0.21	0.33	0.32	0.47	0.64

3.	DNA 疫苗+ Abhayrab ^R (1: 625 稀 释)	3	<0.095	0.34	0.76	2.0	3.5	3.82
4.	Raksharab ^R (1: 625 稀 释)	3	<0.095	0.14	0.21	0.31	0.54	1.06
5.	DNA 疫苗+ Raksharab ^R (1: 625 稀 释)	3	<0.095	0.16	0.28	1.81	2.68	3.25

表 5

佐剂如氢氧化铝对狂犬病 DNA 疫苗、灭活的狂犬病毒疫苗 (Raksharab) 或联合疫苗在牛体内诱导狂犬病毒中和抗体 (VNA) 的影响

动物组	狂犬病疫苗	牛的数量	VNA 效价 (IU / ml)			
			第 0 天	第 14 天	第 21 天	第 60 天
1.	DNA 疫苗	4	<0.095	0.09	0.29	0.39
2.	Raksharab ^R (1: 625 稀释)	4	<0.095	0.13	0.30	0.11
3.	DNA 疫苗+ Raksharab ^R (1: 625 稀释)	4	<0.095	0.56	1.28	1.37
4.	Raksharab ^R (1: 625 稀释) + 氢氧化铝	4	<0.095	0.20	0.79	0.49
5.	DNA 疫苗+ Raksharab ^R (1: 625 稀释) + 氢氧化铝	4	<0.095	0.79	2.12	1.88

5

参考文献:

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990, 直接基因转移进入小鼠体内肌肉(Direct gene transfer into mouse muscle in vivo), *Science* 247:1465-68。

10

2. Tang DC, De Vit M, Johnston SA.1992, 基因免疫是诱发免疫应答的简单方法 (Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response) , *Nature* 356 :152-54。
3. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski
5 SH, Deck RR, De Witt DM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry
HC, Shiver JW, Montgomery DC, Liu MA. 1993, 通过注射编码病毒蛋白质抗流感的
异源保护 (Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a
viral protein) , *Science* 259 : 1745-49。
4. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG 1993. 用表达血球凝集素的质粒 DNA 免疫抗
10 致死流感病毒攻击的保护 (Protection against a lethal influenza virus challenge by
immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA), *Vaccine* 11 : 957-60。
5. DNA 疫苗: 方法和程序 (DNA Vaccines : Methods and Protocols), Robert G
Whalen, Douglas B. Lowrie (Editor)/Hardcover/Humana Press / 1999 年 8 月。
6. 基因接种: 理论和实践 (Gene Vaccination ; Theory and Practice), Eyal Raz
15 (Editor)) /Hardcover/Springer- Verlag New York, Incorporated / 1998 年 7 月。
7. DNA 疫苗: 疫苗学的新时代 (DNA Vaccines : A New Era in Vaccinology),
Margaret A. Liu, Reinhard Kurth (Editor)),Maurice R. Hilleman (Editor)) /
Paperback/New York Academy of Sciences /1995 年 10 月。
8. Current Topics in Microbiology and Immunology (226 卷) entitled : DNA 接种/基因接
20 种 (DNA Vaccination/Genetic Vaccination) edited by David Weiner and Hilary
Koprowski。
9. Lewis PJ, Cox GJ, van Drunen Littel-vanden Hurk S, Babiuk LA. 1997, 在动物中的多
核苷酸疫苗: 增强和调节的应答 (Polynucleotide vaccines in animals: enhancing
and modulating responses), *Vaccine*。
- 25 10. Babiuk LA, Lewis J, Suradhat S, Baca-Estrada M, Foldvari M, Babiuk S (1999), 多核
苷酸疫苗: 诱导动物免疫的潜力 (Polynucleotide vaccines : potential for inducing
immunity in animals), *J Biotechnol*, 73: 131-140。
11. Babiuk LA, Lewis J, van den. Hurk S, Braun R (1999) , DNA 免疫: 当前和将来
(DNA immunization : present and future), *Adv Vet Med*, 41 : 163-179。
- 30 12. Babiuk LA (1999) 扩大方法以开发更有效的疫苗 (Broadening the approaches to

- developing more effective vaccines) *Vaccine*, 17 1587-1595。
13. Boyle JS, Barr IG, Lew AM (1999) 改进对 DNA 疫苗应答的策略 (Strategies for improving responses to DNA vaccines), *Mol Med*, 5: 1-8。
14. Cichutek K (1999) , DNA 疫苗的发展和标准化 (Development and standardisation of DNA vaccines), *Dev Biol Stand*, 100: 119-129。
- 5
15. Davis HL (1999), 用于抗乙肝病毒的预防性或治疗性免疫的 DNA 疫苗 (DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B virus), *Mt Sinai J Med*, 66: 84-90。
16. Donnelly JJ, Ulmer JB (1999), 用于病毒疾病的 DNA 疫苗 (DNA vaccines for viral diseases), *Braz J Med Biol Res*, 32: 215-222。
- 10
17. Encke J, zu Putlitz J, Wands JR (1999), 病毒学间的 DNA 疫苗 (DNA vaccines Intervirology) , 42: 117-124。
18. Fomsgaard A (1999), HIV-1 DNA 疫苗 (HIV-1 DNA vaccines), *Immunol Lett*, 65 : 127-131。
- 15
19. Freis PC (1999), DNA 疫苗 (DNA vaccines), [letter] *N Engl J Med*, 341 : 1623-1624。
20. Gendon Iu Z (1999), 开发病毒多核苷酸 (DNA) 疫苗的进展 (Progress in developing viral polynucleotide (DNA) vaccines), *Vopr Virusol*, 44 : 148-154。
21. Gorecki DC, Simons JP (1999), DNA 接种的危险 (The dangers of DNA vaccination) , [letter] *Nat Med*, 5 : 126。
- 20
22. Gursel M, Tunca S, Ozkan M, Ozcengiz G, Alaeddinoglu G (1999), 质粒 DNA 脂质体形式免疫佐剂的作用 (Immunoadjuvant action of plasmid DNA in liposomes), *Vaccine*, 17 ; 1376-1383。
23. Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJ (1999), 核酸免疫: 与第三代疫苗有关的概念和技术 (Nucleic acid immunization : concepts and techniques associated with third generation vaccines), *J Immunol Methods*, 229 1-22。
- 25
24. Haynes JR (1999), 基因疫苗 (Genetic vaccines), *Infect Dis Clin North Am*, 13: 11-26。
25. Kowalczyk DW, Ertl HC (1999) , 对 DNA 疫苗的免疫应答 (Immune responses to DNA vaccines), *Cell Mol Life Sci*, 55 : 751-770。
- 30

26. Kurane I (1999) , DNA 疫苗基础研究和发展的现状 (Present status of basic studies and development of DNA vaccines), *Nippon Rinsho*, 57: 975-981。
27. Leitner WW, Ying H, Restifo NP (1999), 基于 DNA 和 RNA 的疫苗: 原理, 进展和展望 (DNA and RNA-based vaccines : principles, progress and prospects),
5 *Vaccine*, 18 : 765-777。
28. Lewis PJ, Babiuk LA (1999) , DNA 疫苗: 综述 (DNA vaccines : a review), *Adv Virus Res*, 54: 129-188。
29. Ramsay AJ, Kent SJ, Strugnell RA, Suhrbier A, Thomson SA, Ramshaw IA (1999),
10 (用于增强细胞, 体液和粘膜免疫的基因接种策略) (Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity), *Immunol Rev*, 171: 27-44。
30. Sasaki S, Inamura K, Okuda K (1999), 诱导 DNA 疫苗免疫的基因 (Genes that induce immunity--DNA vaccines) , *Microbiol Immunol*, 43: 191-200。
31. Seder RA, Gurunathan S (1999) , DNA 疫苗-21 世纪设计者疫苗 (DNA vaccines-designer vaccines for the 21st century), *N Engl J Med*, 341: 277-278。
- 15 32. Spiegelberg HL, Raz E (1999), DNA 疫苗变态反应 (DNA vaccines Allergy) , 54: 47-48。
33. Stevenson FK (1999), 抗癌症 DNA 疫苗: 从基因到治疗 (DNA vaccines against cancer: from genes to therapy), *Ann Oncol*, 10: 1413-1418。
34. Stevenson FK, Link CJ, Jr., Traynor A, Yu H, Corr M (1999), 抗多骨髓瘤的 DNA
20 接种 (DNA vaccination against multiple myeloma), *Semin Hematol*, 36 : 38-42。
35. Tuteja R (1999) , DNA 疫苗: 一线希望 (DNA vaccines : a ray of hope), *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34 : 1-24。
36. Watts AM, Kennedy RC (1999), 抗感染疾病的 DNA 接种策略 (DNA vaccination strategies against infectious diseases), *Int J Parasitol*, 29: 1149-1163。
- 25 37. Weiner DB, Kennedy RC (1999), 基因疫苗 (Genetic vaccines), *Sci Am*, 281: 50-57。
38. Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE (1999) DNA 免疫: 机理研究(DNA immunization : mechanistic studies), *Vaccine*, 17 : 1612-1619。
39. www.dnavaccine. com。
- 30 40. U. S. Food and Drug Administration. 要考虑的几点 (Points to Consider) .

<http://www.fda.gov/cber/points.html>.

41. De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P (1999), DNA 和蛋白质接种绵羊后 Bm86 抗原诱导抗 Boophilus microplus 的保护免疫应答 (Bm86 antigen induces a protective immune response against Boophilus microplus following DNA and protein vaccination in sheep), Vet Immunol Immunopathol, 71 : 151-160.
42. Okuda K, Xin KO, Tsuji T, Bukawa H, Tanaka S, Koff WC, Tani K, Honma K, Kawamoto S, Hamajima K, Fukushima J. 1997, 通过抗 HIV-1 的大分子多成分肽接种的 DNA 接种诱导强抗原特异性免疫 (DNA vaccination followed by macromolecular multicomponent peptide vaccination against HIV-1 induces strong antigen-specific immunity. Vaccine 15:1049-56.
43. Barnett SW, Rajasekar S, Legg H, Doe B, Fuller DH, Haynes JR, Walker CM, Steimer KS. 1997, 用 HIV-1 gp120 DNA 接种诱导免疫应答, 该免疫应答通过重组 gp120 蛋白质亚基加强 (Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit), Vaccine 15:869-73.
44. Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW. 1997, 双分子 HIV 包膜 DNA 和蛋白质接种产生的有效, 保护性抗 HIV 免疫应答 (Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9378-83.
45. Fuller DH, Corb MM, Barnett S, Steimer K, Haynes JR. 1997. (在 DNA 免疫的恒河猴短尾猿中病毒特异性免疫缺陷免疫应答的增强) (Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques.), Vaccine 15:924-26.
46. Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL, McMichael A. 1998, 通过 DNA 初次/MVA 加强接种方法, MHC I 类限制性的肽特异 T 细胞诱导的增强 (Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime). Vaccine 16 : 439-45.
47. Haddad D, Liljeqvist S, Stahl S, Hansson M, Perlmann P, Ahlborg N, Berzins K

- (1999), DNA 初次/蛋白质加强免疫方法诱导的对恶性疟原虫血液阶段抗原应答的抗体特征 (Characterization of antibody responses to a Plasmodium Falciparum blood-stage antigen induced by a DNA prime/protein boost immunization protocol), *Scand J Immunol*, 49: 506-514。
- 5 48. Fensterle J, Grode L, Hess J, Kaufmann SH (1999), 通过用基因枪初次/加强接种, 抗李斯特菌病的有效 DNA 接种 (Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun), *J Immunol*, 163: 4510-4518。
49. Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, Tine JA, Hoffman SL. 1998, 用重组痘苗加强免疫增加了疟疾 DNA 疫苗的免疫原性和保护效力 (Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7648-53。
- 10 50. Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM, Becker M, Sinden R, Smith GL, Hill AV, 1998, 通过用修饰痘苗病毒加强免疫, 对疟疾 DNA 接种的 CD8 T 细胞诱导和完全保护效力的增强免疫原性 (Enhanced immunogenicity for CD8 T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus), *Ankara. Nat. Med.* 4:397-402。
- 15 51. Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA, 1998, 由 DNA 连续初次免疫和重组鸟痘病毒加强免疫组成的人免疫缺陷病毒类型 1 疫苗方法的增强的 T 细胞免疫原性和保护效力 (Enhanced T- cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus), *J. Virol.* 72:1080-88。
- 20 52. Xiang ZQ, Pasquini S, Ertl HC (1999) 用复制缺陷腺病毒重组体, 通过 DNA 初次免疫和鼻内加强免疫, 生殖器免疫的诱导 (Induction of genital immunity by DNA priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant), *J Immunol*, 162: 6716-6723。
- 25 53. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, Rizvi TA, Lu S, Hu SL, Mazzara GP, Panicali DL, Herndon JG, Glickman R, Candido MA, Lydy SL, Wyand MS, McClure HM. 1999, 通过 DNA 初次免疫和重组痘病毒加强免疫中和免疫缺陷病毒攻击抑制的独立抗体 (Neutralizing antibody-independent
- 30

- containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations), *Nat. Med.* 5:526-34.
54. Richmond JF, Mustafa F, Lu S, Santoro JC, Weng J, O'Connell M, Fenyo EM, Hurwitz JL, Montefiori DC, Robinson HL. 1997, 用 DNA 免疫和重组痘苗病毒加强免疫筛选能提高中和抗体的 HIV-1 包膜糖蛋白质 (Screening of HIV-1 Env glycoproteins for the ability to raise neutralizing antibody using DNA immunization and recombinant vaccinia virus boosting), *Virology* 230 : 265-74.
55. Richmond JF, Lu S, Santoro JC, Weng J, Hu SL, Montefiori DC, Robinson HL. 1998, DNA 初次和蛋白质加强免疫诱导的抗人免疫缺陷病毒类型 1 包膜抗体的中和活性和亲合力研究 (Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type I Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting), *J. Virol.* 72:9092-100.
56. Hanke T, McMichael A (1999), 以用于 AIDS 的 DNA 初次免疫 MVA 加强免疫疫苗为基础的多 CTL 表位的临床前发展 (Pre-clinical development of a multi-CTL epitope based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS), *Immunol Lett*, 66: 177-181.
57. Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael AJ (1999) , 通过用多表位基因和 DNA 初次修饰的痘苗病毒 Ankara 加强免疫方法, 在短尾猿中猿免疫缺陷病毒特异细胞毒性 T 淋巴细胞的有效诱导 (Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen), *J Virol*, 73 : 7524-7532.
58. Calarota SA, Leandersson AC, Bratt G, Hinkula J, Klinman DM, Weinhold KJ, Sandstrom E, Wahren B (1999), HIV-DNA 免疫后, 随后通过高活性抗逆转录病毒治疗在无症状 HIV-1 感染的患者中免疫应答, (Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment), *J Immunol*.
59. Caver TE, Lockey TD, Srinivas RV, Webster RG, Hurwitz JL (1999), 一种新的利用 DNA, 痘苗病毒和蛋白质免疫用于 HIV-1 包膜提呈的疫苗方法 (A novel vaccine regimen utilizing DNA, vaccinia virus and protein immunizations for HIV-1 envelope

- presentation), *Vaccine*, 17: 1567-1572。
60. Bot A, Bot S, Bona C. 1998, 抗用表达血球凝集素和核蛋白质的质粒混合物免疫的新生鼠抗流感病毒的增强保护 (Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing hemagglutinin and nucleoprotein), *Vaccine* 16: 1675-82。
5
61. Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Boyer JD, Wang B, Weiner DB. 1997, 多成分 HIV-1 候选疫苗的发展 (Development of a multicomponent candidate vaccine for HIV-1), *Vaccine* 15 : 879-83。
62. Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE. 1999, DNA 免疫: 机理研究 (DNA immunization : mechanistic studies) , *Vaccine* 17: 1612-19。
10
63. Ciernik IF, Berzofsky JA, Carbone DP. 1996, 用表达单 T 细胞表位的 DNA 疫苗诱导细胞毒性 T-淋巴细胞和抗肿瘤免疫 (Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T-cell epitopes), *J. Immunol.* 156:2369-75。
- 15 64. Iwasaki A, Dela Cruz CS, Young AR, Barber BH. 1999, 通过小基因 DNA 免疫诱导表位特异细胞毒性 T 淋巴细胞 (Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by mini-gene DNA immunization) . *Vaccine* 17 : 2081-88。
65. Yu Z, Karem KL, Kanagat S, Manickan E, Rouse BT. 1998., 小基因的保护: 一种新的 DNA 疫苗的方法 (Protection by mini-genes : a novel approach of DNA vaccines),
20 *Vaccine* 16:1660-67。
66. Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. 1998, 用于 HIV 和恶性疟原虫的 DNA 多 CTL 表位疫苗: 在鼠中免疫原性 (DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice), *Vaccine* 16:426-35。
- 25 67. Thomson SA, Sheritt MA, Medveczky J, Elliott SL, Moss DJ, Fernando JG, Brown LE, Suhrbier A. 1998, 通过 DNA 接种递送多 CD8 细胞毒性 T 细胞表位 (Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination) , *J. Immunol.* 160:1717-23。
68. Suhrbier A. 1997, 多表位 DNA 疫苗 (Multi-epitope DNA vaccines), *Immunol. Cell Biol.* 75:402-8。
30

69. Wang R, Doolan DL, Charoenvit Y, Hedstrom RC, Gardner NJ, Hobart P, Tine J, Sedegah M, Fallarme V, Sacci JB Jr, Kaur M, Klinman DM, Hoffman SL, Weiss WR 1998, 通过用四个恶性疟原虫 DNA 质粒混合物免疫在非人灵长目中同时诱导多抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four *Plasmodium falciparum* DNA plasmids) , *Infect. Immun.* 66 : 4193-202。
70. Shi YP, Hasnain SE, Sacci JB, Holloway BP, Fujioka H, Kumar N, Wohlhueter R, Hoffman SL, Collins WE, Lal AA 1999, 重组多阶段恶性疟原虫候选疫苗的免疫原性和体外保护效力 (Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1615-20。
71. Mossman SP, Pierce CC, Robertson MN, Watson AJ, Montefiori DC, Rabin M, Kuller L, Thompson J, Lynch JB, Morton WR, Benveniste RE, Munn R, Hu SL, Greenberg P, Haigwood NL (1999), 用多基因 DNA 疫苗在短尾猿中免疫抗 SIV mne (Immunization against SIV mne in macaques using multigenic DNA vaccines), *J Med Primatol*, 28 : 206-213。
72. Mendoza RB, Cantwell MJ, Kipps TJ. 1997, 表达 CD40 配体 (CD154) 的质粒对基因免疫的免疫刺激作用 (Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization), *J. Immunol.* 159:5777-81。
73. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JJ, Dang K, Oh J, Dentchev T, Lee D, Nottingham LK, Chalian AA, McCallus D, Ciccarelli R, Agadjanyan MG, Weiner DB (1999), 细胞因子分子佐剂调节 HIV-1 和 SIV 的 DNA 疫苗构建体诱导的免疫应答 (cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV), *J Interferon Cytokine Res*, 19: 77-84。
74. Corr M, Tighe H, Lee D, Dudler J, Trieu M, Brinson DC, Carson DA. 1997, DNA 免疫提供的共刺激增强了抗肿瘤免疫 (Co- stimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity), *J. Immunol.* 159:4999-5004。
75. Lee AH, Suh YS, Sung YC (1999), 用表达细胞因子基因的 HIV-1 重组基因组接种 DNA 增强了 HIV-1 特异免疫应答 (DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses),

- Vaccine, 17: 473-479。
76. Kim JJ, Bagarazzi ML, Trivedi N, Hu Y, Kazahaya K, Wilson DM, Ciccarelli R, Chattergoon MA, Dang K, Mahalingam S, Chalian AA, Agadjanyan MG, Boyer JD, Wang B, Weiner DB. 1997, 通过共递送共刺激分子基因体内基因工程改造对 DNA 免疫的免疫应答 (Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes), *Nat. Bio-technol.* 15 : 641-46。
 - 5 77. Tsuji T, Hamajima K, Ishii N, Aoki I, Fukushima J, Xin KQ, Kawamoto S, Sasaki S, Matsunaga K, Ishigatsubo Y, Tani K, Okubo T, Okuda K. 1997, 表达 B7-2 的质粒对编码病毒抗原的质粒诱导的人免疫缺陷病毒 1 特异的细胞介导的免疫的免疫调节作用 (Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen), *Eur. J. Immunol.* 27:782-87。
 - 10 78. Xiang Z, Ertl HC. 1995, 通过用表达细胞因子的质粒共接种, 对编码病毒抗原的质粒的免疫应答操作 (Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines), *Immunity* 2:129-35。
 - 15 79. Lee AH, Sub YS, Sung YC. 1999, 用表达细胞因子基因的 HIV-1 重组基因组的 DNA 接种增强了 HIV-1 特异性免疫应答 (DNA inoculations with HIV-1 recombinant genomes that express cytokine genes enhance HIV-1 specific immune responses), *Vaccine* 17 : 473-79。
 - 20 80. Weiss WR, Ishii KJ, Hedstrom RC, Sedegah M, Ichino M, Barnhart K, Klinman DM, Hoffman SL. 1998, 编码鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的质粒增加恶劣疟疾 DNA 疫苗赋予的保护 (A plasmid encoding murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine), *J Immunol.* 161 : 2325-32。
 - 25 81. Svanholm C, Lowenadler B, Wigzell H. 1997, 用 HIV-1 Nef 与 GM- CSF 表达载体共注射, 在基于 DNA 免疫中的 T 细胞和抗体应答的增加 (Amplification of T-cell and anti-body responses in DNA-based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with a GM- CSF expression vector), *Scand J. Immunol.* 46:298-303。
 - 30 82. Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Xin KQ, Ishii N, Aoki I, Ishigatsubo Y, Tani K,

- Kawamoto S, Nitta Y, Miyazaki J, Koff WC, Okubo T, Okuda K. 1997, 通过共接种编码 HIV-1 抗原的质粒和表达 IL-12 的质粒诱导抗 HIV-1 的细胞介导免疫的增强 (Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12), *J. Immunol.* 5 158:4008-13.
83. Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chat-tergoon MA, Dang K, Wang B, Boyer JD, Weiner DB. 1997. 通过 IL-12 表达载体和 DNA 免疫原的共施用, 体内细胞免疫应答的基因工程改造 (In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen), *J Immunol.* 10 158 : 816-26.
84. Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, Mc-Gregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, Lunn DP, Olsen CW. 1998, 在小鼠中, 编码白细胞介素和血球凝集素 DNA 的共施用赋予了免受病毒攻击的保护。(Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice), *J. Virol.* 15 72 ; 1704-8.
85. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JI, I Dang K, Oh J, Dentchev T, Lee D, Nottingham LK, Chalian AA, McCallus D, Ciccarelli E, Agadjanyan MG, Weiner DB. 1999, 细胞因子分子佐剂调节 HIV-1 和 SIV DNA 疫苗构建体诱导的免疫应答 (Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV), *J. Interferon Cytokine Res.* 19 : 77-84. 20
86. Chow YH, Chiang BL, Lee YL, Chi WK, Lin WC, Chen YT, Tao MH. 1998, 通过各种细胞因子基因的共递送可以调节对乙型肝炎病毒 DNA 疫苗的 Th1 和 Th2 群的发展和免疫应答属性 (Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes), *J. Immunol.* 160:1320-29. 25
87. Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR, 1997, 用表达细胞因子的质粒增大的基于 DNA 的疫苗对丙型肝炎病毒核心蛋白质的细胞和体液免疫应答的增强 (Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids), *J. Immunol.* 158:1231-37. 30

88. Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. 1997, 通过共表达乙肝表面抗原和白细胞介素 2 的质粒, 乙肝病毒 DNA 疫苗的改进 (Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2), *J. Virol.* 71:169-78。
- 5 89. Kim JJ, Trivedi NN, Nottingham LK, Morrison L, Tsai A, Hu Y, Mahalingam S, Dang K, Ahn L, Doyle NK, Wilson DM, Chattergoon MA, Chalian AA, Boyer JD, Agadjanyan MG, Weiner DB, 1998, 通过用 DNA 免疫原共施用细胞因子基因表达盒子, 体内免疫应答的放大和定向调节 (Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with
- 10 DNA immunogens), *Eur. J. Immunol.* 28: 1089-103。
90. Gurunathan S, Irvine KR, Wu CY, Cohen JI, Thomas E, Prussin C, Restifo NP, Seder RA. 1998, CD40 配体/三聚体 DNA 增强了体液和细胞免疫应答, 诱导了对感染和肿瘤攻击的保护性免疫 (CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge) .
- 15 *J. Immunol.* 161:4563-71。
91. Maecker HT, Umetsu DT, DeKruyff RH, Levy S. 1997, 用细胞因子融合构建体的 DNA 接种偏向对卵白蛋白的免疫应答 (DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin), *Vaccine* 15:1687-96。
92. Hakim I, Levy S, Levy R. 1996, IL-1 β 的 9 氨基酸肽增加了蛋白质和 DNA 疫苗诱导的抗肿瘤免疫应答 (A nine amino acid peptide from IL-1 β augments antitumor
- 20 immune responses induced by protein and DNA vaccines), *J. Immunol.* 157 : 5503-11。
93. Ishii KJ, Weiss WR, Ichino D, Verthelyi D, Klinman DM. 1999, 编码 IL-4 和 IFN- γ 的 DNA 质粒的活性和安全性 (Activity and safety of DNA plasmids encoding IL-4 and IFN- γ), *Gene Ther.* 6 : 237-44。
- 25
94. Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K. 1997, 脂质体中具有 IL-12 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 表达质粒的 DNA 疫苗的鼻内免疫诱导抗 HIV-1 抗原的强粘膜和细胞介
- 30 导的免疫应答 (Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in

- lipo-somes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens), *J. Immunol.* 159:3638-47。
95. Iwasaki A, Stiernholm BJ, Chan AK, Berinstein NL, Barber BH, 1997, 编码共刺激分子和细胞因子的质粒 DNA 免疫原介导的增强 CTL 应答 (Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines), *J. Immunol.* 158:4591-601。
96. Operschall E, Schuh T, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K (1999), 在小鼠中, 通过共施用编码病毒抗原和细胞因子的质粒 DNA 增强抗病毒感染的保护 (Enhanced protection against viral infection by co-administration of plasmid DNA coding for viral antigen and cytokines in mice), *J Clin Virol*, 13: 17-27。
97. Ishii N, Tsuji T, Yin KQ, Mohri H, Okuda K. 1998, Uben-imex 对 HIV-1 DNA 疫苗的佐剂效果 (Adjuvant effect of Uben-imex on a DNA vaccine for HIV-1), *Clin. Exp. Immunol.* 111:30-35。
98. Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kawamoto S, Mohri H, Kensil CR, Okuda K. 1998, 用 QS-21 皂甙佐剂制成的 DNA 疫苗, 通过肌肉内和鼻内途径诱导对人免疫缺陷病毒类型 1 的系统和粘膜免疫应答 (Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes), *J. Virol.* 72:4931-39。
99. Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, Ihata A, Ishii N, Gorai I, Hirahara F, Mohri H, Okuda K. 1998, (用单磷酸 DNA 脂质 A 佐剂疫苗, 抗人免疫缺陷病毒类型 1 的鼻内和肌肉免疫的比较 Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine), *Infect. Immun.* 66:823-26。
100. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. 1999, 在花生变应原的鼠模型中, 用壳聚糖 DNA 纳米颗粒口服基因递送产生免疫保护 (Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* 5 :387-91。
101. Klavinskis LS, Gao L, Barnfield C, Lehner T, Parker S. 1997, DNA-脂质体复合物的粘膜免疫 (Mucosal immunization with DNA-liposome complexes), *Vaccine*

- 15:818-20。
102. Haigwood NL, Pierce CC, Robertson MN, Watson AJ, Montefiori DC, Rabin M, Lynch JB, Kuller L, Thompson J, Morton WR, Benveniste RE, HU. SL, Greenberg P, Mossman SP (1999), 用多基因 DNA 疫苗的免受 SIV 攻击的保护 (Protection from pathogenic SIV challenge using multigenic DNA vaccines), *Immunol Lett*, 66: 183-188。
103. Herrmann JE, Chen SC, Jones DH, Tin-sley-Bown A, Fynan EF, Greenberg HB, Farrar GH. 1999, 用微粒胶囊的轮状病毒 VP4 和 VP7 DNA 疫苗口服免疫获得免疫应答和保护 (Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles), *Virology* 259:148-53。
- 104, Chen SC, Jones DH, Fynan EF, Farrar GH, Clegg JC, Greenberg HB, Hermann JE. 1998., 用微粒胶囊的轮状病毒 DNA 疫苗口服免疫诱导保护性免疫 (Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles), *J. Virol.* 72:5757-61。
105. Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JC, Farrar GH. 1997, 口服施用后, 聚 (DL-丙交酯共乙交酯) 胶囊质粒 DNA 诱导对编码蛋白质的系统和粘膜抗体应答 (Poly (DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration), *Vaccine* 15:814-17。
106. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC (2000) , 抗狂犬病毒的鼠 DNA 接种: 接种途径和佐剂单磷酸脂质 A (MPL) 的作用, (DNA vaccination of mice against rabies virus : effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL)) , *Vaccine*, 18 : 1059-1066。
107. Krieg AM (1999) CpG DNA: 一种新的免疫调节物 (CpG DNA : a novel immunomodulator), *Trends Microbiol* 7。
108. Sato Y, Roman M, Tighe J, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. 1996, 有效皮内基因免疫必需的免疫刺激 DNA 序列 (Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization), *Science* 273:352-54。
109. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Wald-schmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky

- GA, Klinman DM. 1995, 细菌 DNA 中 CpG 基序诱导了定向 B 细胞活化 (CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation), *Nature* 374 : 546-49。
110. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigat-subo Y, 1997, CpG 基序对 DNA 疫苗免疫原性的作用 (Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines), *J. Immunol.* 158:3635-39。
111. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. 1998, 在幼小鼠标中, CpG DNA 能诱导抗乙型肝炎表面抗原的强 Th1 体液和细胞介导的免疫应答 (CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15553-58。
112. Klinman DM, 1998, 含有 CpG 的寡脱氧核糖核苷酸的治疗应用 (Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides), *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 8:181-84。
113. Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. 1999, CpG 基序做为免疫佐剂 (CpG motifs as immune adjuvants), *Vaccine* 17 : 19-25。
114. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. 1998, CpG 寡脱氧核糖核苷酸诱导了致死鼠的利什曼病中保护性和治疗性 Th1 应答 (CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis), *J. Immunol.* 160:3627-30。
115. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E, 1997, 免疫刺激 DNA 序列做为 T 辅助细胞促进佐剂起作用 (Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1 promoting adjuvants) *Nat. Med.* 3:849-54。
116. Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klennerman P (1999), 含有 CpG-寡核苷酸是用 T 细胞肽疫苗诱导保护性免疫应答的有效佐剂 (CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines), *J Virol*, 73: 4120-4126。
117. Paillard F (1999) , CpG: 双刃剑[评论] (CpG : the double-edged sword [comment]), *Hum Gene Ther*, 10: 2089-2090。
118. Bryder K, Sbali H, Nielsen HV, Corbet S, Nielsen C, Whalen RG, Fomsgaard A

- (1999), 通过 HBsAg DNA 的结构突变, HbsAg 嵌合 DNA 疫苗质粒的改进的 HIV-1 表位免疫原性 (Improved immunogenicity of HIV-1 epitopes in HBsAg chimeric DNA vaccine plasmids by structural mutations of HBsAg DNA), *Cell Biol.*
119. Norman JA, Hobart P, Manthorpe M, Feigner P, Wheeler C. 1997, 基于 DNA 免疫的改进载体和其它基因治疗应用的进展 (Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications), *Vaccine* 15:801-3.
120. Wild J, Gruner B, Metzger K, Kuhrober A, Pudollek HP, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. 1998, 用 dicistronic 表达质粒的抗乙型肝炎表面和核心抗原的多价接种 (Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid), *Vaccine* 16: 353-60.
121. Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y. 1998, 对于抗细胞内细菌的有效 MHC I 类限制性 T 细胞应答需要质粒 DNA 疫苗密码子使用的最优化 (Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium), *J. Immunol.* 161:5594-99.
122. Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A, Haas J. 1998, 用具有最优化密码子使用的合成 gp120 序列, 通过 DNA 接种诱导增加的免疫应答 (Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usages), *J. Viral* 72 :1497-503.
123. Vinner L, Nielsen HV, Bryder K, Corbet S, Nielsen C, Fomsgaard A. 1999, 基因枪 DNA 接种利用哺乳动物密码子的反向独立合成的 HIV gp160 包膜基因 (Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV gp 160 envelope gene using mammalian codons), *Vaccine* 17 : 2166-75.
124. Inchauspe G, Vitvitski L, Major ME, Jung G, Spengler U, Maisonnas M, Trepo C. 1997, 表达分泌或非分泌形式丙型肝炎病毒核壳体的质粒 DNA: 基因免疫后的抗体和 T 辅助细胞应答的比较研究 (Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid : comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization), *DNA Cell Biol.* 16:185-95.
125. Rice J, King CA, Spellerberg MB, Fairweather N, Stevenson FK. 1999, 通过 DNA 疫苗, 病原体来源的基因影响抗原提呈的操作 (Manipulation of pathogen-derived genes to influence antigen presentation via DNA vaccines), *Vaccine* 17 : 3030-38.

126. Wu Y, Kipps TJ. 1997, 编码具有快速依赖蛋白酶体降解抗原的脱氧核糖核苷酸疫苗是溶细胞 T 淋巴细胞的高效诱导物 (Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes) , *J. Immunol.* 159 : 6037-43。
- 5 127. Tobery TW, Siliciano RF. 1997, 免疫后用于快速细胞内降解的 HIV-1 抗原的靶向增强了体内细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 识别和从头 CTL 应答的诱导 (Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization), *J. Exp. Med.* 185:909-20。
- 10 128. Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. 1997, DNA 免疫: 病毒蛋白质的遍在蛋白化增强了细胞毒性 T 淋巴细胞的诱导和抗病毒保护, 但是取消了抗体诱导 (DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction), *J. Virol.* 71 : 8497-503。
- 15 129. Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, McWaters P, Kelly J, Tennent JM, Lew AM, Scheerlinck JP (1999), 在绵羊中, 靶向改进了抗假白喉棒状杆菌的 DNA 疫苗的效力 (Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Infect Immun*, 67 : 6434-6438。
- 20 130. Foms X, Emerson SU, Tobin GJ, Mushahwar IK, Purcell RH, Bukh J (1999), 用编码丙型肝炎病毒包膜 E2 蛋白的质粒 DNA 接种小鼠和短尾猿, 该蛋白质在细胞内和细胞表面表达 (DNA immunization of mice and macaques with plasmids encoding hepatitis C virus envelope E2 protein expressed intracellularly and on the cell surface), *Vaccine*, 17: 1992-2002。
- 25 131. Lewis PJ, van Drunen Little-van den H, Babiuk LA (1999), 改变基于 DNA 疫苗表达的抗原的细胞位置调节了免疫应答 (Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response), *J Virol*, 73 : 10214-10223。
- 30 132. Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S (1999) , 表达与组织血纤维蛋白溶酶原激活物信号序列融合的肺结核蛋白质的 DNA 疫苗的免疫原性 (Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue

- plasminogen activator signal sequences), *Infect Immun*, 67: 4780-4786。
133. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL (1999), 通过 DNA 疫苗, 小鼠肺结核的治疗 (Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination), *Nature*, 400 : 269-271。
- 5 134. Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Kawashima M, Koide Y (1999), 在哺乳动物细胞中, 密码子最优化对 DNA 疫苗的翻译效率的影响: 编码来源于微生物的 CTL 表位的质粒 DNA 分析 (Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms), *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 445-451。
- 10 135. Svanholm C, Bandholtz L, Lobell A, Wigzell H (1999), 用介导有效抗原分泌的表达载体, 通过 DNA 免疫, 抗体应答的增强 (Enhancement of antibody responses by DNA immunization using expression vectors mediating efficient antigen secretion), *J Immunol Methods*, 228 : 121-130。
136. Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL (1999) , DNA 免疫: DNA 表达的血球凝集素的分泌对抗体应答的作用 (DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses), *Vaccine*, 18: 805-814。
- 15 137. Smith J S, Yager P A, Baer G M. 狂犬病的实验室技术 (in Laboratory techniques in rabies) , by Meslin F-X, Kaplan M M & Koprowski H, (WHO, Geneva) 1996, 181。
138. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) 分子克隆: 实验指南 (Molecular cloning; A laboratory Manual) , 2nd ed. (Cold Spring Harbour laboratory press, Cold Spring Harbour, NY)。
- 20 139. Prazeres DMF, Ferreira GNM, Monteiro GA, Cooney CL, Cabral JMS. (1999) , 用于基因治疗的药物级别质粒 DNA 的大规模生产: 问题和瓶颈 (large scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy : problems and bottlenecks), *TIBTECH* 17: 169-174。
- 25 140. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki VJ. (1993), 通过质粒 DNA 肌内注射的基因治疗: 对小鼠中萤火虫荧光素酶基因表达的研究 (Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice), *Hum, Gene Ther.* 4: 419-421。
- 30 141. Keiny, MP, Lathe R, Drillen R, Spehner D, Skory S, Schnitt D, Wiktor T, Koprowski

H, Lecocq JP. (1984), 来自于重组痘苗病毒的狂犬病毒糖蛋白质的表达 (Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus), Nature 312: 163-166。

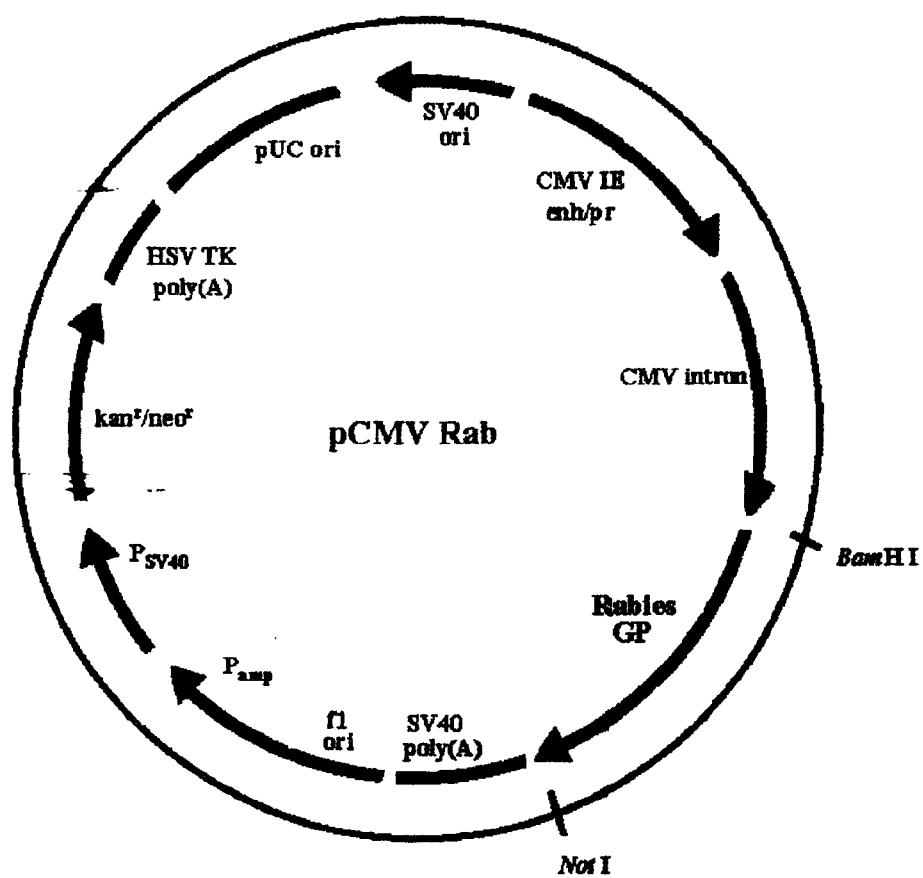


图 1