



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103789315 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201310554458. 7

(22) 申请日 2013. 11. 08

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 徐宇虹 向小飞 岳洋 吴彩兴

王辉

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限

公司 31236

代理人 牛山 陈少凌

(51) Int. Cl.

C12N 15/117(2010. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

权利要求书3页 说明书17页

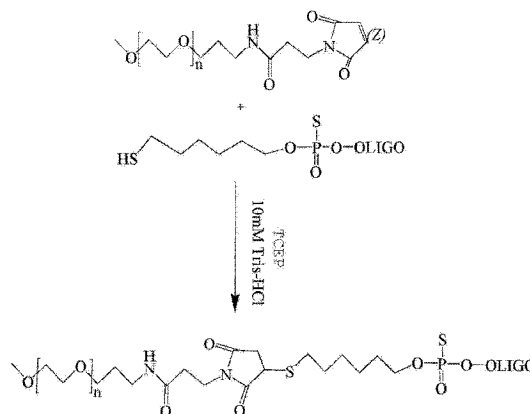
序列表5页 附图17页

(54) 发明名称

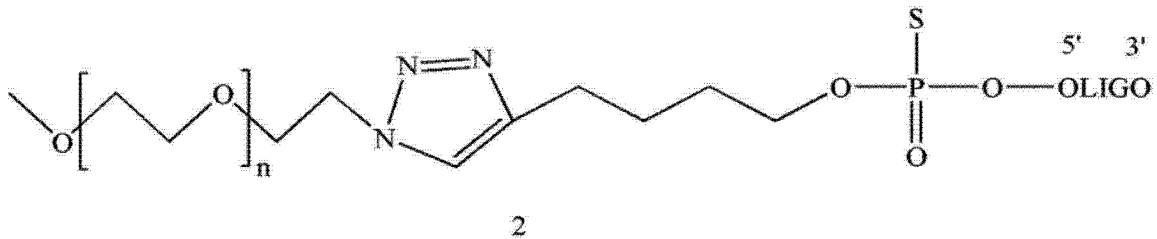
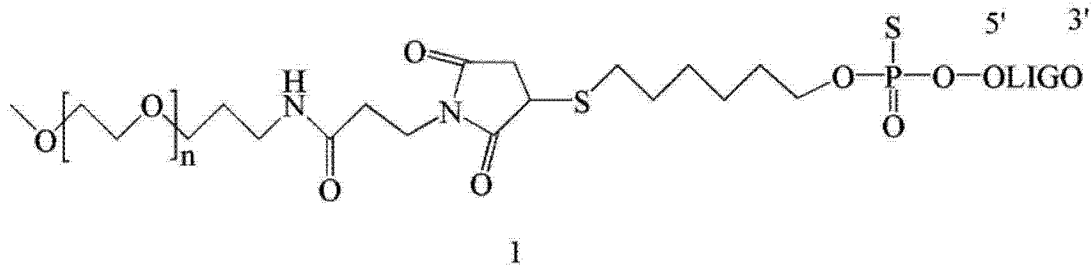
PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种疫苗和肿瘤免疫治疗给药系统领域的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用。本发明涉及一种 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸；本发明还涉及所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备提高血清中的 IL-12 表达量药物中的应用；本发明还涉及所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备诱导对于内源性抗原如肿瘤抗原的免疫源性药物中的应用。本发明还涉及所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备刺激 B 细胞、浆细胞样树突状细胞、髓系树突状细胞、巨噬细胞、外周单核细胞的免疫活性药物中的应用。本发明涉及 PEG 修饰的 CpG；具有增加体内稳定性及免疫调节功能，能提高在体内对于持续存在的抗原的应答反应。



1. 一种 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸。
2. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述 PEG 的 $mw \geq 10K$ 。
3. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述寡核苷酸的骨架是全硫代修饰、部分硫代修饰或者无硫代修饰的。
4. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述 PEG 修饰的位点为 5' - 末端或者 3' - 末端。
5. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述结构为式 1 或式 2 所示,所述 OLIGO 其中的寡核苷酸包含 1-5 个单位的 CpG 单元;

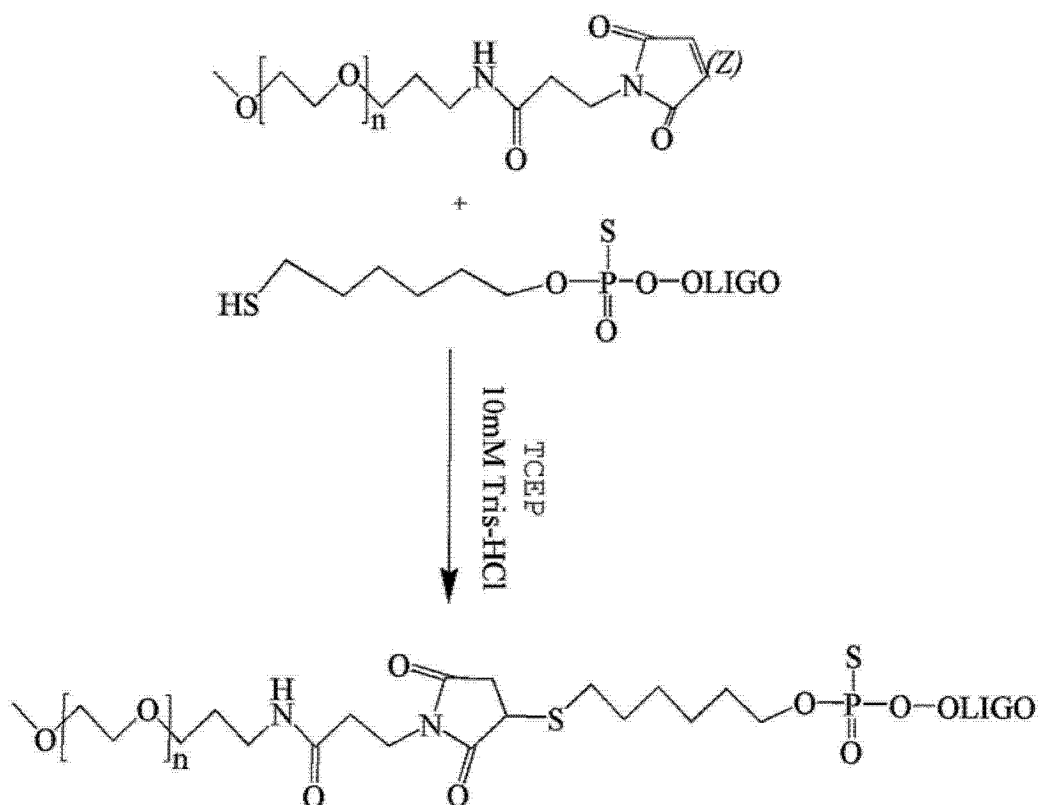


6. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述 CpG 寡核苷酸的序列为:

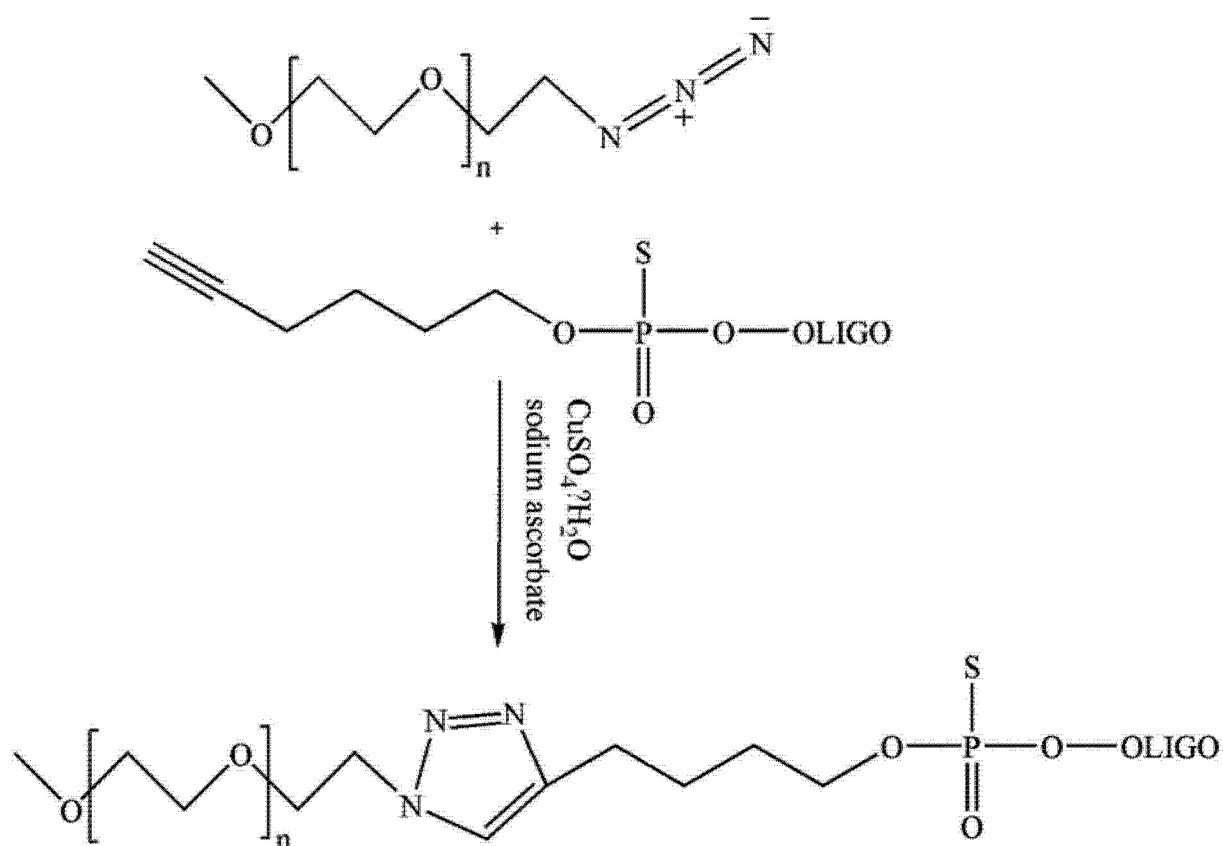
序列如 SEQ ID NO. 1 所示的 CpG-7,
 序列如 SEQ ID NO. 2 所示的 CpG-8,
 序列如 SEQ ID NO. 3 所示的 CpG-13,
 序列如 SEQ ID NO. 4 所示的 CpG1826,
 序列如 SEQ ID NO. 5 所示的 CpG7909,
 序列如 SEQ ID NO. 6 所示的 CpG-H7,
 序列如 SEQ ID NO. 7 所示的 CpG-H8,
 序列如 SEQ ID NO. 8 所示的 CpG-H13,
 序列如 SEQ ID NO. 9 所示的 CpG-H1826。

7. 如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸,其特征在于,所述 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸可通过包括如下步骤的方法合成而得;

路线 a, 将巯基修饰的 CpG 加入到 Tris-HCL 中,吹 N_2 5min, 再加入三(2-羰基乙基)膦酸盐,混匀,再加 mPEG_{20K}-Mal, 整个过程中 N_2 保护, 涡旋混匀, 25°C, 500-1300rpm 反应 5h; 将得到的产物的混合物用二氯甲烷萃取, 收集二氯甲烷层溶液, 反复萃取三次, 用氮气挥干, 加入超纯水溶解; 最后将所得到的合成产物用 3500Da 的透析膜制成的透析管 4°C 透析过夜, 透析结束样品冻干, 即得;



路线 b, 炔基修饰的 CpG 与叠氮修饰的 mPEG 在由水和甲醇按体积比为 1:1 配制的反应溶剂中, 在五水硫酸铜和维 C 钠做催化剂的条件下振荡混匀, 与 37°C 反应 18h 即得;



8. 一种如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备提高血清中的 IL-12 表达量药物中的应用。

9. 一种如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备诱导对于内源性抗原如肿瘤抗原的免疫源性药物中的应用。

10. 一种如权利要求 1 所述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备刺激 B 细胞、浆细胞样树突状细胞、髓系树突状细胞、巨噬细胞、外周单核细胞的免疫活性药物中的应用。

PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于疫苗和肿瘤免疫治疗给药系统领域,具体涉及一种 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用。

背景技术

[0002] CpG 寡聚脱氧核糖核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN)是一些人工合成的以具有免疫激活功能的 CpG 序列(胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤)基序为核心的寡聚脱氧核糖核苷酸,其结构特征为 5'-PuPuCPGPyPy-3',既 5'端有两个嘌呤或者一个嘌呤接一个胸腺嘧啶,3'端有两个嘧啶的寡核苷酸序列。

[0003] 在 19 世纪 90 年代,美国肿瘤医生 Coley 将细菌粗提取物用于 900 名长期肿瘤患者的治疗中时,发现有 40% 的病人肿瘤自行消退。在当时,人们认为是其中的脂多糖发挥作用,而没有引起足够的重视。在后来,用卡介苗进行小鼠体内试验时发现,DNA 酶处理过的卡介苗并不具有抗肿瘤作用,这说明细菌 DNA 才是发生抗肿瘤作用的药物。之后,有研究证实,细菌 DNA 有直接的抗肿瘤和免疫刺激的作用。1995 年, Krieg 等发现细菌 DNA 中,发生较强免疫作用的是 CpG 基序,并把这类序列成为免疫刺激序列。与细菌不同,哺乳动物和其他动物的 DNA 分子中 CpG 基序的出现频率很低,同时 60%-90% 的 CpG 基序中,胞嘧啶的第五个碳原子发生甲基化,因为这一变动,哺乳动物的 DNA 分子并不具有免疫刺激作用。CpG 基序是 CpG DNA 产生免疫刺激功能的基本结构,在合成的一段 CpG ODN 之中,可以有一个基序或者多个 CpG 基序,CpG 基序两侧的嘌呤和嘧啶以及构成不同基序之间的几个碱基,都会影响 CpG 基序的免疫刺激功能。关于 CpG ODN 的结构早期研究显示,CpG 基序的免疫作用具有种属特异性,例如对小鼠最有效的 CpG 基序是 5'-GACGTT-3',而对人最有效的 CpG 基序是 5'-GTCGTT-3'。根据 CpG ODN 结构和在体外对人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)刺激作用的不同,一般认为把 CpG ODN 分为 3 类:A 型,B 型,和 C 型。A 型 CpG ODN 能刺激产生大量干扰素 α (IFN- α),并能大量激活自然杀伤细胞(natural killer, NK);B 型 CpG ODN 能够刺激 B 细胞增殖同时分泌大量免疫球蛋白(Immunoglobulin, IgG)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)和白介素 10 (Interleukin-10, IL-10);C 型 CpG ODN 兼有 A 型和 B 型 CpG ODN 的作用特点。

[0004] 含有非甲基化 CpG 基序的寡聚脱氧核糖核苷酸(CpG ODN)会被细胞内的 Toll 样受体 9 (TLR9) 识别,激活 Th1 免疫应答以加强固有和获得性免疫,一方面,CpG ODN 激活 TLR9 信号诱导了核转录因子和其它细胞内信号途径激活,启动了快速天然免疫反应,包括多种促炎症反应细胞因子及抗病毒细胞因子的分泌,如 IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 I 型干扰素 (IFN);以及免疫调节细胞因子的分泌,如 IL-10,以控制炎症反应的强度,而且, NK 细胞和其它天然免疫细胞通过 IFN 依赖途径或非 IFN 依赖的途径被间接激活。另一方面,CpG ODN 活化的 B 细胞对抗原刺激的敏感性大大提高,加速分化为分泌抗原特异性抗体的浆细胞,从而促进了获得性免疫应答;CpG ODN 激活的 pDC 向淋巴结和其它次级淋巴组织的 T 细胞区迁移,表达协同刺激分子水平上调,使其激活初始 T 细胞和记忆性 T 细胞的能力增

强,并且 pDC 向 CD8T 细胞交叉提呈可溶性蛋白抗原的能力增强,强烈促进了依赖 Th1 途径的 CD4 和 CD8T 细胞的免疫应答。CpG 目前其作为免疫佐剂在抗病毒和抗肿瘤治疗领域有很广的应用前景。

[0005] 但自从上世界 90 年代 CpG ODN 发现具有激活免疫应答的功效至今,却仍然没有一个成熟的 CpG 药品上市。辉瑞公司的 CpG7909 停止在临床三期的研究阶段,主要是由于 CpG7909 在与化药联合使用治疗非小细胞肺癌没有增加疗效,这些失败的案例,体现了现有 CpG 药物结构上的缺陷。我们的数据表明,普通 CpG ODN 和常规的在磷酸二酯键骨架上的修饰结构在血清中稳定性还是很差,连接 PEG 有助于大大提高其血清稳定性。但人们一般认为,并有大量文献支持,PEG 修饰会阻碍含 PEG 的分子与免疫细胞的相互作用,特别是根据文献报道,CpG 的受体 TLR9 主要分布在内吞体内侧,所以 PEG 修饰的 CpG ODN 将不再具有免疫活性。但我们通过研究发现,PEG 修饰的 CpG ODN 不仅能作用于 B 细胞和 DC 细胞分泌细胞因子,还能提高体内血清中 IL-12 的浓度,甚至在体内实验中还优于未修饰的 CpG。

[0006] 此外,PEG 修饰(PEGylation)虽然已经被成功应用于多种蛋白分子以及纳米载药系统的修饰,可以大大提高蛋白的血清稳定性和半衰期,但却几乎很少用来修饰寡核苷酸(ODN)分子,包括 siRNA, microRNA, CpG ODN 等,主要原因在于 ODN 的作用靶点大多在细胞内,经过 PEG 修饰的 ODN 分子量更大,进入细胞的效率应该更低。业内更青睐的方法,是利用一些纳米载药系统,来保护 ODN 的稳定性,提高细胞摄取。但我们发现,对于特定的 CpG ODN 系列序列修饰 PEG,并不会阻滞其进入细胞产生免疫刺激作用,甚至在体内作用中效果还有提高,从而揭示了 CpG ODN 作为肿瘤治疗药物的新机理和新方向。

发明内容

[0007] 本发明是通过以下的技术方案实现的,本发明涉及一种 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用。本发明涉及 PEG 修饰的 CpG ;具有增加体内稳定性及免疫调节功能,能提高在体内对于持续存在的抗原的应答反应。

[0008] 本发明是通过以下的技术方案实现的,

[0009] 第一方面,本发明涉及一种 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸。

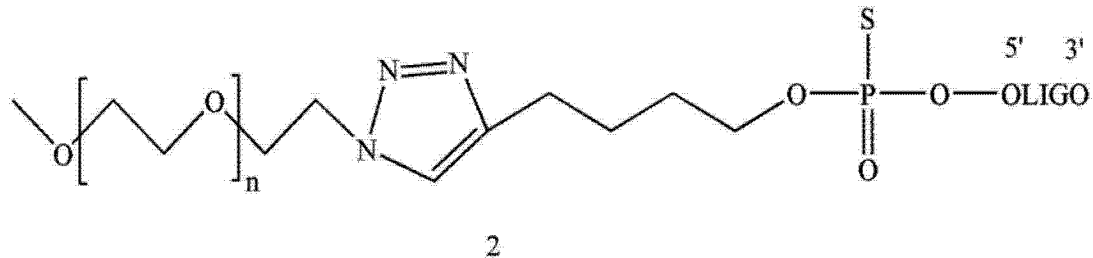
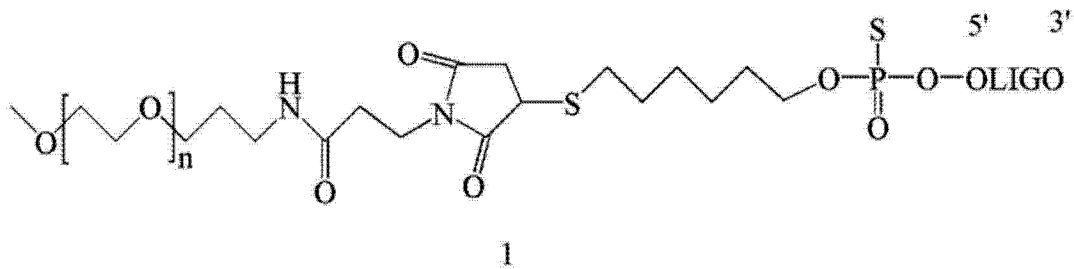
[0010] 优选地,所述 PEG 的 $mw \geq 10K$ 。

[0011] 优选地,所述寡核苷酸的骨架是全硫代修饰、部分硫代修饰或者无硫代修饰的。

[0012] 优选地,所述 PEG 修饰的位点为 5' - 末端或者 3' - 末端。

[0013] 优选地,所述结构为式 1 或式 2 所示,所述 OLIGO 其中的寡核苷酸包含 1-5 个单位的 CpG 单元 ;

[0014]



[0015] 优选地,所述 CpG 寡核苷酸的序列为:

[0016] 序列如 SEQ ID NO. 1 所示的 CpG-7,

[0017] 序列如 SEQ ID NO. 2 所示的 CpG-8,

[0018] 序列如 SEQ ID NO. 3 所示的 CpG-13,

[0019] 序列如 SEQ ID NO. 4 所示的 CpG1826,

[0020] 序列如 SEQ ID NO. 5 所示的 CpG7909,

[0021] 序列如 SEQ ID NO. 6 所示的 CpG-H7,

[0022] 序列如 SEQ ID NO. 7 所示的 CpG-H8,

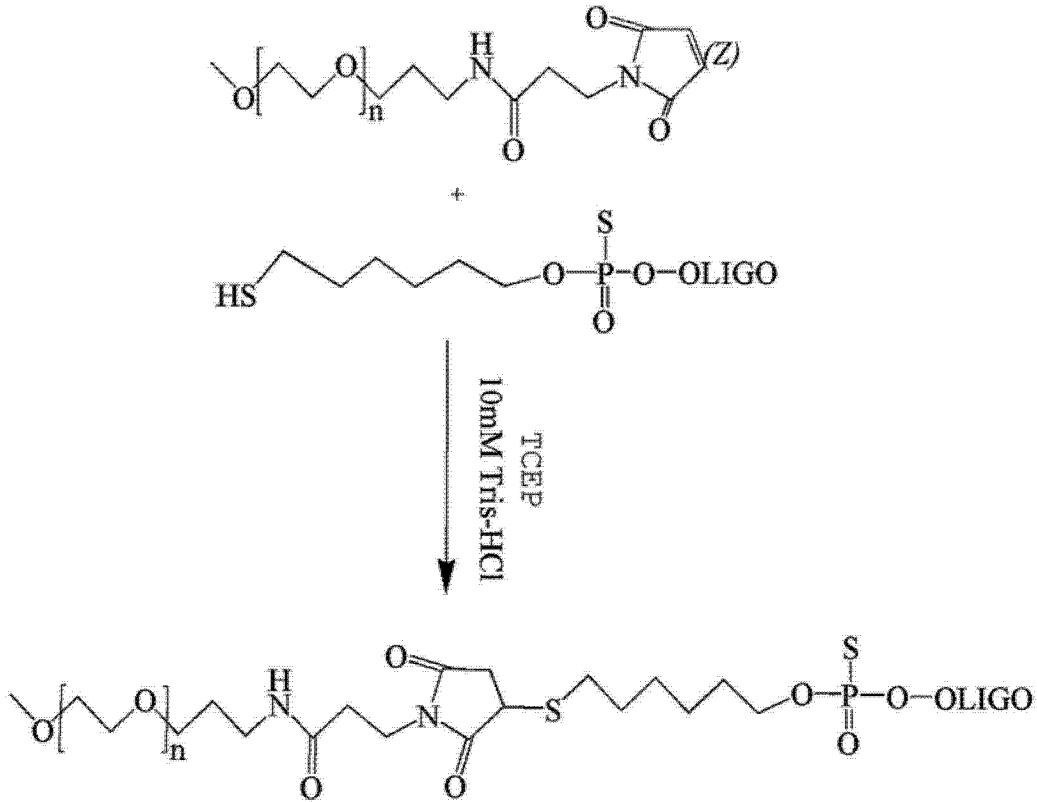
[0023] 序列如 SEQ ID NO. 8 所示的 CpG-H13,

[0024] 序列如 SEQ ID NO. 9 所示的 CpG-H1826。

[0025] 优选地,所述 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸可通过包括如下步骤的方法合成而得:

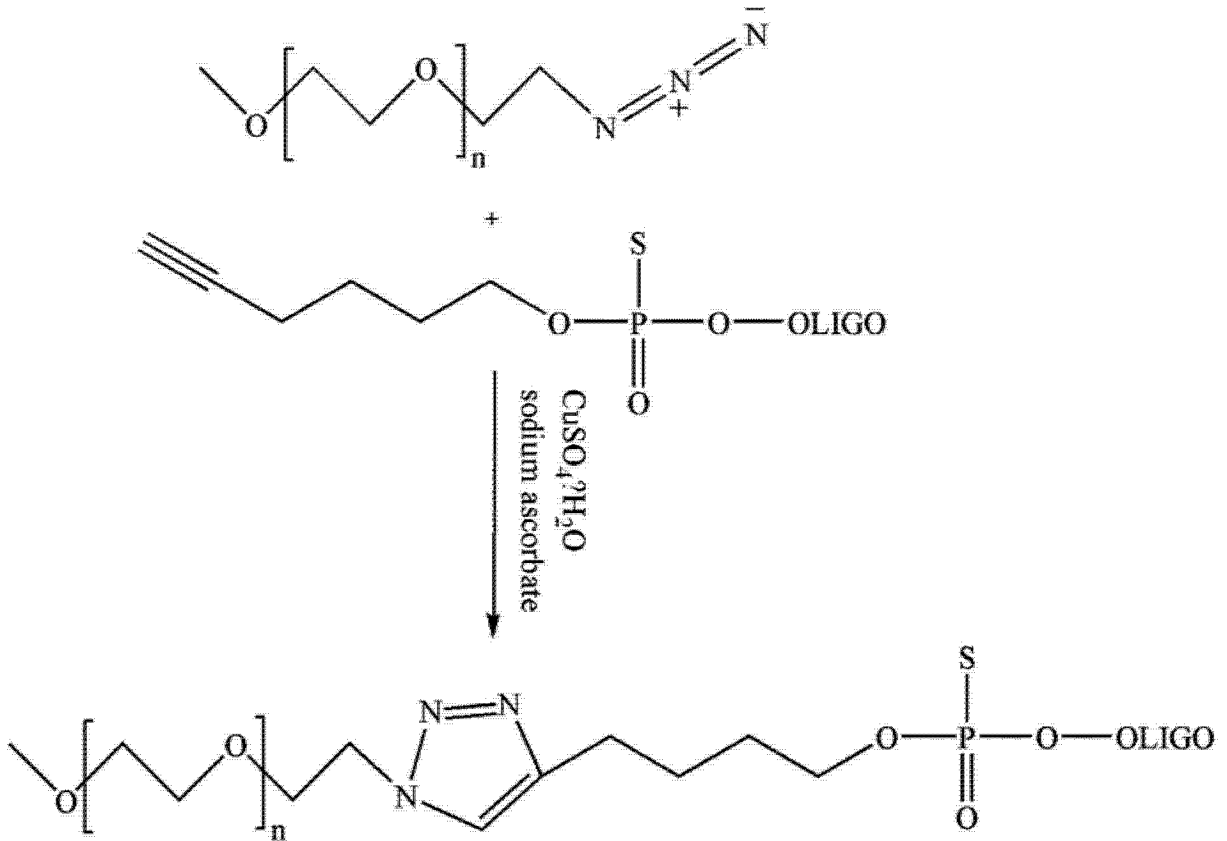
[0026] 路线 a, 将巯基修饰的 CpG 加入到 Tris-HCL 中, 吹 N₂5min, 再加入三(2- 巯基乙基)磷酸盐, 混匀, 再加 mPEG-Mal, 整个过程中 N₂ 保护, 涡旋混匀, 25℃, 500-1300rpm 反应 5h; 将得到的产物的混合物用二氯甲烷萃取, 收集二氯甲烷层溶液, 反复萃取三次, 用氮气挥干, 加入超纯水溶解; 最后将所得到的合成产物用 3500Da 的透析膜制成的透析管 4℃ 透析过夜, 透析结束样品冻干, 即得;

[0027]



[0028] 路线 b, 炔基修饰的 CpG 与叠氮修饰的 mPEG 在由水和甲醇按体积比为 1:1 配制的反应溶剂中, 在五水硫酸铜和维 C 钠做催化剂的条件下振荡混匀, 与 37°C 反应 18h 即得;

[0029]



[0030] 第二方面,本发明涉及一种如前述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备提高血清中的 IL-12 表达量药物中的应用。

[0031] 第三方面,本发明还涉及一种如前述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备诱导对于内源性抗原如肿瘤抗原的免疫源性药物中的应用。

[0032] 第四方面,本发明还涉及一种如前述的 PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸在制备刺激 B 细胞、浆细胞样树突状细胞、髓系树突状细胞、巨噬细胞、外周单核细胞的免疫活性药物中的应用。

[0033] 本发明具有如下的有益效果:

[0034] 本发明涉及 PEG 修饰的 CpG ;具有增加体内稳定性及免疫调节功能;

[0035] 具体采用 10K-20K 链长的 PEG 修饰含有 CpG 序列的寡核苷酸分子,尽管 PEG 修饰使其对 mDC 和脾细胞的刺激作用有所降低,但却能提高在体内对于持续存在的抗原的应答反应,特别是对于荷瘤小鼠内源性的肿瘤抗原;

[0036] PEG 修饰一方面可以提高 IL-12,提高免疫应答,还能降低 CpG 针对调节性 T 细胞 (Treg) 的作用效果,在肿瘤免疫治疗中有重要意义。

[0037] PEG 修饰在一定程度上对 CpG ODN 的细胞摄取和靶点结合有一定影响,但仍然具有较好的免疫刺激作用和量效关系;PEG 修饰能够起到延长体内作用时间的作用,修饰后的结构在体内激发的免疫应答效果更好,抗肿瘤效果更强;

[0038] CpG 系统给药的长循环性的提高,其由 PEG 与具有免疫调节功能的 CpG 寡核苷酸反应合成;这种结合能够有效提高 CpG 寡核苷酸的体内稳定性从而提高其在体内的免疫调节功能,用以增强免疫应答;

[0039] CpG 基序的免疫作用具有种属特异性,例如对小鼠最有效的 CpG 基序是 5'-gacggtt-3',而对人最有效的 CpG 基序是 5'-gtcgtt-3';按照已知的理论对小鼠敏感的序列如可以转换成人敏感的序列,如可以将 CpG-7 (tgacgttccggtt) 转换为针对人有效的序列 CpG-H7 (atgtcgttgcggtt),更有效地作为药物用于过敏性疾病、传染性疾病、免疫缺陷性疾病及癌症等。

附图说明

[0040] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0041] 图 1. 不同反应时间对合成率的影响;

[0042] 图 2. 不同的 CpG 与 PEG 的投料比对反应效率影响琼脂糖电泳图;

[0043] 图 3. CpG-PEG 合成路线图;

[0044] 图 4. CpG-PEG 的琼脂糖凝胶电泳图像;

[0045] 图 5. CpG 与 CpG-PEG 的高效液相 (HPLC) 色谱图;

[0046] 图 6. DCC 反应的红外光谱图;

[0047] 图 7. 切胶回收后三种不同分子量 PEG-CpG 的 SDS-PAGE 电泳图像;

[0048] 图 8. 不同链长 CpG 的体外免疫刺激效果;

[0049] 图 9. 不同链长的 CpG-PEG 体外免疫效果差别;

[0050] 图 10. 初次免疫后第 14 天小鼠血清 IgG 浓度;

- [0051] 图 11. 初次免疫后第 14 天小鼠血清 IgG1 浓度；
[0052] 图 12. 初次免疫后第 14 天小鼠血清 IgG2a 浓度；
[0053] 图 13. 初次免疫后第 14 天小鼠血清 IgG2a/IgG1 浓度比值；
[0054] 图 14. 初次免疫后第 28 天小鼠血清 IgG 浓度；
[0055] 图 15. 初次免疫后第 28 天小鼠血清 IgG1 浓度；
[0056] 图 16. 初次免疫后第 28 天小鼠血清 IgG2a 浓度；
[0057] 图 17. 初次免疫后第 28 天小鼠血清 IgG2a/IgG1 浓度比值；
[0058] 图 18. 小鼠血清 IgG2a 浓度的动态变化；
[0059] 图 19. 小鼠血清 IFN- γ 浓度的动态变化；
[0060] 图 20. 不同浓度 CpG 和 CpG-PEG 对 4T1-pGL3 细胞活性影响；
[0061] 图 21. CpG-PEG 刺激 BMDC 细胞分泌 IL-12p70 的浓度；
[0062] 图 22. 不同给药组小鼠肿瘤生长曲线；
[0063] 图 23. 荷瘤小鼠血清 IL-12p70 的动态变化。

具体实施方式

[0064] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,例如萨姆布鲁克等分子克隆:实验手册第三版(科学出版社,2002)中所述的条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0065] 实施例 1、不同反应时间对结构 1 合成率的影响

[0066] (1) 超纯水煮沸后,通入 N₂ 冷却后,以除氧,用该超纯水配制成 pH=7.4, 10mM 的 Tris-HCl 作为反应溶剂。取 20nmol 的 CpG-SH 溶解于 100ul 的 10mM 的 Tris-HCl 中,溶解后,吹 N₂5min 钟。称取 3.5mg 的 TCEP, 加入 4ml 的 10mM Tris-HCL (pH=7.4), 得到为 3nmol/ μ l 的 TCEP, 用氮气吹 5min, 吸取 10ul 到 CPG-SH 的 EP 管中, 混匀。称取 1.0mg 的 mPEG_{20K}-mal (其他分子量同等比例增加或减少) 溶于 CpG-SH 溶液中, 整个过程中氮气保护。在恒温振荡仪上 25 $^{\circ}$ C, 800rpm 分别反应 5h, 10h, 15h, 25h。

[0067] (2) 将(1)所得到的样品采用琼脂糖凝胶电泳比较合成率的差异, 结果见图 1, 图 1 中从左至右条带顺序为: DNA marker, CpG, 反应时间为 5h 的反应产物, 反应时间为 10h 的反应产物, 反应时间为 15h 的反应产物, 反应时间为 20h 的反应产物。。实验结果表明: 反应时间对合成率影响不大, 考虑到实验的性, 可以在时间上选择反应时间为 5h。

[0068] 实施例 2、CpG-PEG 与 CpG 的投料比对结构 1 反应产率的影响

[0069] (1) 超纯水煮沸后, 通入 N₂ 冷却后, 以除氧, 用该超纯水配制成 pH=7.4, 10mM 的 Tris-HCl 作为反应溶剂。取 15nmol 的 CpG-SH 溶解于 20ul 的 10mM Tris-HCl 中, 溶解后, 吹氮气 5min 钟。称取 3.5mg 的 TCEP, 加入 4ml 的 10mM Tris-HCl (pH=7.4), 得到为 3nmol/ μ l 的 TCEP, 用氮气吹 5min, 吸取 10ul 到 CPG-SH 的 ep 管中, 混匀。并分装为 3 管, 分别称取称取 0.2mg, 0.4mg, 0.6mg 的 mPEG_{20K}-mal (其他分子量同等比例增加或减少) 溶于 CpG-SH 溶液中, 涡旋振荡。整个过程中氮气保护。在恒温振荡仪上 25 $^{\circ}$ C, 800rpm 分别反应 5h。

[0070] (2) 将(1)所得到的样品采用琼脂糖凝胶电泳比较合成率的差异, 结果见图 2, (条带从左至右的顺序为: 20bp 的 DNA marker, CpG, 反应物摩尔比例为 1:2 的产物, 反应摩尔

比例为 1:6 的产物,反应物摩尔比例 1:12 的产物)结论:反应物摩尔比为 1:6 和 1:12 比 1:2 的合成效率高,合成效率可以达到 80%,但是 1:6 和 1:12 的差别不大,所以在后续实验中考虑使用 1:6 的反应比例。

[0071] 实施例 3、结构 1 所示 CpG-PEG 的合成纯化方法

[0072] 1. CpG-PEG_{20k} 的合成方法(图 3)。

[0073] (1) 超纯水煮沸后,通入 N₂ 冷却后,以除氧,用该超纯水配制成 pH=7.4, 10mM 的 Tris-HCL 作为反应溶剂。取 20nmol 的 CpG-SH 溶解于 100ul 的 10mM 的 Tris-HCL 中,溶解后,吹氮气 5min 钟。称取 3.5mg 的 TCEP, 加入 4ml 的 10mM Tris-HCL(pH=7.4), 得到为 3nmol/ μ l 的 TCEP, 用氮气吹 5min, 吸取 10ul 到 CPG-SH 的 EP 管中, 混匀。称取 1.6mg 的 mPEG20K-mal(其他分子量同等比例增加或减少)加入上述溶液中, 涡旋振荡, 使其完全溶解。整个过程中 N₂ 保护。在恒温振荡仪上 25℃, 800rpm 分别反应 5h。可同比例放大或缩小剂量合成。

[0074] (2) 将(1)得到的反应后得到的混合物采用体积比为(混合物:二氯甲烷)=1:10 的比例萃取溶液, 得到分层的溶液, 二氯甲烷层即为 PEG 和 CpG-PEG_{20k} 的混合物, 水层为未参与反应的 CpG, 4℃, 10000rpm 离心, 以去除乳化现象, 取出二氯甲烷层, 重复萃取 3 次, 将得到的二氯甲烷层用氮气挥干, 加入超纯水溶解。

[0075] (3) 将(2)所得到的合成产物用 3500Da 的透析膜制成的透析管 4℃透析过夜, 透析除去多余的杂质。得到 CpG-PEG 与 PEG 的混合产物。将透析后的样品冻干以利于保存。

[0076] 2. CpG-PEG 的表征方法, 包括了琼脂糖凝胶电泳和高效液相色谱仪。

[0077] (1) 琼脂糖凝胶电泳相关实验参数如下:

[0078] 琼脂糖凝胶电泳表征:0.75-3%的琼脂糖, 缓冲液:TBE, DNA marker:20bp, 上样量:100ng-600ng, 荧光染料:Gelred。在此条件下, 能够将 CpG 和 CpG-PEG_{20k} 明显的区分开来。合成率可以达到 80% 左右。(图 4, 从左至右的条带顺序为:20bp 的 DNA marker, CpG, 未纯化的合成产物 CpG-PEG, 纯化的合成产物 CpG-PEG)

[0079] (2) 高效液相色谱(HPLC)表征的相关实验参数如下:

[0080] CpG-PEG 的高效液相色谱检测条件为:流动相采用乙腈和 100mMTEAA(pH=6), 洗脱梯度为:乙腈:5-65%(0-15min), 65%-5%(15-20min);色谱柱:ZORBAX300SB-C18 色谱柱(200mm \times 4.6mm, 5 μ m, Agilent, Technologies);安捷伦 1200 高效液相色谱仪;检测波长:260nm;流速 1mL/min;进样量:10 μ L。结果见(图 5), 在此条件下, 分离效果好, 峰形对称, 出峰时间短, 保留时间稳定。

[0081] 实施例 4、结构 2 所示的 CpG-PEG 合成方法

[0082] 1. DCC 反应合成叠氮修饰的不同分子量 PEG

[0083] 实验试剂:DCC(1,3-二环己基碳二亚胺), DMAP(4-二甲氨基吡啶), mPEG。

[0084] 反应机理:本反应利用 DCC 使 PEG 的羟基部分与叠氮乙酸的羧基部分脱水缩合, 使 PEG 顺利连接上叠氮基, 为接下来的 click 反应做准备。DMAP 作为一种高亲核性的催化剂经探索发现加入 DMAP 于反应中也可以使反应的效率进一步的提高。

[0085] (1) 将反应所用到的试剂瓶等放入真空干燥箱中烘干待用, 要保证整个反应中的无水条件。

[0086] (2) 取干燥好的分子筛放入装有二氯甲烷的试剂瓶中, 保证二氯甲烷的无水条件。

- [0087] (3) 制备氮气保护囊。
- [0088] (4) 将 mPEG 和叠氮乙酸按照要求的量快速称好,然后迅速加入 25ml 的二氯甲烷中,以减少试剂吸收空气中的水分而影响反应。
- [0089] (5) 加入 DCC,将反应体系放于磁力搅拌器上搅拌,在未加入 DMAP 的时候就开始浑浊。当加入 DMAP 时,溶液马上变成淡黄色,并出现浑浊。
- [0090] (6) 此时将氮气充气囊扎在反应的圆底烧瓶上,在常温反应 48h。
- [0091] (7) 反应经过 48h 后,停止反应。
- [0092] (8) 采用旋转蒸发仪将二氯甲烷除去。
- [0093] (9) 将产物加水溶解,过滤。
- [0094] (10) 将反应的产物放于透析袋中,用透析夹夹紧,透析过夜。
- [0095] (11) 将透析后的样品放于冻干机中进行干燥。
- [0096] 2. 红外光谱检测
- [0097] 操作步骤
- [0098] (1) 仪器的检测:
- [0099] 测试波数范围:4000 ~ 400 cm^{-1} 波数精度: $\leq 0.1\text{cm}^{-1}$ 分辨率:0.1 ~ 16 cm^{-1} 。仪器供电电压:220V $\pm 10\%$,频率 50Hz $\pm 10\%$,仪器所在的环境:室内温度为 20 摄氏度相对湿度为 30% 左右。
- [0100] (2) 试样的制备
- [0101] 取 1 到 2mg 的未反应的 PEG 样品,加适量的溴化钾放于玛瑙研钵中研磨成细粉,装入模具中,在压片机上压制成透明状的片,用于检验。
- [0102] (3) 重复(2)的步骤制备其他的供试品和对照品
- [0103] (4) 检测样品检查出峰状况(图 6)。
- [0104] 注:(a)所示为未经过反应的 PEG_{5K}
- [0105] (b)为已反应的 PEG_{5K}
- [0106] 对比两个图片可以发现在图 b 中的 2107 处有有叠氮基的峰位出现证明反应成功。
- [0107] (c)所示为未经过反应的 PEG_{10K}
- [0108] (d)为已反应的 PEG_{10K}
- [0109] 对比两个图片可以发现在图 d 中的 2107 处有有叠氮基的峰位出现证明反应成功。
- [0110] (e)所示为未经过反应的 PEG_{20K}
- [0111] (f)为已反应的 PEG_{20K}
- [0112] 对比两个图片可以发现在图 2 中的 2107 处有有叠氮基的峰位出现证明反应成功。
- [0113] 通过以上红外结果可知,DCC 反应成功的将叠氮集团连到了不同分子量的 PEG 上,同时,因为接下来叠氮 PEG 属于反应的过量方,所以对所得叠氮修饰 PEG 的纯度没有太大要求,故并不需要经过纯化的步骤,但是必须除去反应的副产物。在这里,采取了透析和冷冻干燥的方法来处理样品。
- [0114] 3. Click 反应合成 PEG 修饰的 CpGODN
- [0115] (1)先准确称取 8mg 的 PEG_{20K} (其他分子量同等比例增加或减少)、6mg 的五水硫酸铜、4.75mg 的维 C 钠,分别放于不同的 ep 管中,且做好标记。
- [0116] (2)将 6mg 的五水硫酸铜溶于 1ml 水中取 25 μl ,与 4.75mg 维 C 钠溶于 1ml 水中取

250ul 相互混合。

[0117] (3)将已经称量好的 PEG 溶于已经配比好的 100ul 水 :100ul 甲醇混合溶剂中。取混合好的催化剂 27.5ul 加入到 PEG 中,放于振荡器中混合均匀。

[0118] (4)将 20ul 的 CpG 溶于 PEG 之中并震荡混匀,于 37℃ 反应 18h。

[0119] 4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证反应产物

[0120] (1)制胶原料和用量 :4.2g 的尿素,1mlTBE 缓冲液,4.44ml 丙烯酰胺,40ulAP,4ulTBMB。注意制胶的时候不要有尿素析出。

[0121] (2)将配好的胶液快速加入已准备好的玻璃板中,待 1h 左右,等胶凝好之后加入 TEA 缓冲液,加过缓冲液后,要保证缓冲液不会漏出来,之后上样。等胶凝固期间可配制样品。上完样品后打开电泳仪,开始跑胶,大约两三个小时后,即样品已经到胶体边缘的时候,停止电泳。将胶取下,放入表面皿,加入染色剂 supergreen 开始染色,大约染半个小时左右的时候,将胶取出,显影。

[0122] 5. 切胶回收,操作步骤 :

[0123] (1)在湿润凝胶的分型区中切出含有目的条带的凝胶片段,注意要使切下的凝胶片段尽可能的细,避免混入非特异带。切胶时应使用一次性手术刀片,防止 DNA 交叉污染。

[0124] (2)将切下的条带置于装有 20mlTE 液的 ep 管中,将凝胶充分碾碎后振荡洗脱,以封口膜密封后置于 56℃ 烤箱中过夜

[0125] (3)取出后置于 4℃ 冰箱中冷却,经 12000rpm 离心 3min 后取上清液。

[0126] 6. 样品处理

[0127] 因为经过 PEG 修饰的 CpGODN 在其反应液中含有大量的金属离子,不能直接用于注射小鼠,需要进过透析,冻干,再溶解的过程,才能进行安全无毒的动物实验。经过 PEG 修饰的 CpGODN 其分子量大于 10,000Da, CpGODN 单体的分子量也有 6,500Da,而所含的有机试剂,重金属离子的分子量均小于 1,000Da,因此我们选用截留分子量(即留在透析袋内的生物大分子的最小分子量)为 3,500Da 的透析膜,剪取 2cm 长度,一端用透析夹夹紧,制成一个透析袋,然后将 PEG 修饰的 CpGODN 反应液加入透析袋内,而后在透析袋开口端也用透析夹夹紧,放入盛满超纯水的大烧杯内,4℃ 搅拌透析 6h。

[0128] 实施例 5、比较不同修饰方法对的 CpG-PEG 之间的差异

[0129] 1. 脾细胞的体外收集与培养 :取 8 周 Balb/c 小鼠一只,脱颈法处死,75% 酒精浸泡 5min。解剖小鼠,打开腹腔,取出脾脏。将脾脏放于细胞筛上,加入 PBS,研磨。吸管收集研磨后的液体,加入离心管,4℃ 1400rpm 离心 5min。离心后,弃去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,重悬,4℃ 1400 转离心 5 分钟,弃去上清液,重复此步骤至管底细胞为白色。用 1640 培养基,重悬细胞,吸取 10 μ l 滴入细胞计数板,显微镜下细胞计数。将细胞加入到 96 孔板。将 96 孔板放置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内分别培养 2h。

[0130] 2. 样品溶液制备 :用 PBS 配制浓度相同的不同修饰方法的 CpG-PEG 的溶液。

[0131] 3. 细胞给药 :取出不同浓度的样品溶液加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养箱中,37 度,CO₂ 浓度 5% 培养 24h 后,4℃,1400rpm 离心 5mim,收集上清液用于 ELISA 测定。

[0132] 4. 结果 :体外实验表明不同的修饰方法对 CpG 体外刺激效果没有显著性差异。

[0133] 实施例 6、比较不同链长的 CpG 寡核苷酸序列体外免疫效果差异

[0134] 1. 脾细胞的体外收集与培养:取 8 周 Balb/c 小鼠一只,脱颈法处死,75%酒精浸泡 5min。解剖小鼠,打开腹腔,取出脾脏。将脾脏放于细胞筛上,加入 PBS,研磨。吸管收集研磨后的液体,加入离心管,4℃ 1400rpm 离心 5min。离心后,弃去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,重悬,4℃ 1400rpm 离心 5min,弃去上清液,重复此步骤至管底细胞为白色。用 1640 培养基,重悬细胞,吸取 10 μ l 滴入细胞计数板,显微镜下细胞计数。加入到 96 孔板中。将 96 孔板放置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内分别培养 2h。

[0135] 2. 样品溶液制备:用 PBS 配制浓度相同的如下表所示的 CpG 的溶液。

[0136]

组别	序列 (5' -3')	序列编号 (SEQ ID NO.)
CpG1826	tccatgacgttcctgacgtt	9
CpG-1	atggacgttcg	10
CpG-2	atagacgttcg	11
CpG-3	atgaacgttcg	12
CpG-4	tcagacgttcg	13
CpG-5	tcaaacgttcg	14
CpG-6	gacgttcccgtt	15
CpG-7	tgacgttccgtt	1
CpG-8	atgacgttgcgtt	2
CpG-9	tcgcggtcgttcgeg	16
CpG-10	ttgtcgttcgcg	17
CpG-11	gtcgttcgcg	18
CpG-12	tccatgacgttcc	19
CpG-13	tccatgacgttcctgacgttcctgacgtt	3
CpG7909 (CpG2006)	tcgtcgttttgcgttttgcgtt	5

[0137] 3. 细胞给药:取出样品溶液加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养箱中,37 度,CO₂ 浓度 5% 培养 24 小时后,4℃,1400rpm 离心 5min,收集上清液用于 ELISA 测定。

[0138] 4. 结果:通过上结果可以看出,不同链长的 CpG 刺激脾细胞分泌 IL-6 存在差异,与空白组相比,CpG1826,CpG-7,CpG-8,CpG-13,CpG7909 (CpG2006) 刺激小鼠脾细胞分泌

IL-6 的表达有了显著性提高(图 8)。

[0139] 实施例 7、比较不同骨架修饰的 CpG 寡核苷酸序列免疫效果的差异

[0140] 1. 脾细胞的体外收集与培养:取 8 周 Balb/c 小鼠一只,脱颈法处死,75%酒精浸泡 5min。解剖小鼠,打开腹腔,取出脾脏。将脾脏放于细胞筛上,加入 PBS,研磨。吸管收集研磨后的液体,加入离心管,4℃ 1400rpm 离心 5min。离心后,弃去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,重悬,4℃ 1400 转离心 5 分钟,弃去上清液,重复此步骤至管底细胞为白色。用 10ml1640 培养基,重悬细胞,吸取 10 μ l 滴入细胞计数板,显微镜下细胞计数。加入 96 孔板中,将 96 孔板放置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内分别培养 2h。

[0141] 2. 样品溶液制备:用 PBS 配制浓度相同的不同骨架修饰的 CpG 的溶液,包括全硫代修饰,部分硫代修饰,无硫代修饰的 CpG。

[0142] 3. 细胞给药:取出不同浓度的样品溶液 5 μ l, 加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养箱中,37℃,CO₂ 浓度 5% 培养 24h 后,4℃,1400rpm 离心 5min,收集上清液用于 ELISA 测定。

[0143] 4. 结果:通过上结果可以看出,不同骨架修饰的 CpG 刺激脾细胞分泌 IL-6 存在差异,全硫代修饰组的刺激效果最好。但是与空白组相比,不同骨架修饰的 CpG 刺激脾细胞分泌 IL-6 的表达有了显著性提高。

[0144] 实施例 8、比较不同骨架修饰的 CpG-PEG 寡核苷酸序列免疫效果的差异

[0145] 1. 脾细胞的体外收集与培养:取 8 周 Balb/c 小鼠一只,脱颈法处死,75%酒精浸泡 5 分钟。解剖小鼠,打开腹腔,取出脾脏。将脾脏放于细胞筛上,加入 PBS,研磨。吸管收集研磨后的液体,加入离心管,4℃ 1400rpm 离心 5min。离心后,弃去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,重悬,4℃ 1400rpm 离心 5min,弃去上清液,重复此步骤至管底细胞为白色。用 10ml1640 培养基,重悬细胞,吸取 10 μ l 滴入细胞计数板,显微镜下细胞计数。将细胞加入到 96 孔板中,放置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内分别培养 2h。

[0146] 2. 样品溶液制备:用 PBS 配制浓度相同的不同骨架修饰的 CpG-PEG 的溶液,包括全硫代修饰的 CpG-PEG,部分硫代修饰 CpG-PEG,无硫代修饰的 CpG-PEG。

[0147] 3. 细胞给药:取出样品溶液加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养箱中,37℃,CO₂ 浓度 5% 培养 24h 后,4℃,1400rpm 离心 5min,收集上清液用于 ELISA 测定。

[0148] 4. 结果:通过上结果可以看出,不同骨架修饰的 CpG-PEG 刺激脾细胞分泌 IL-6 存在差异,全硫代修饰的 CpG-PEG 的刺激效果最好。但是与空白组相比,不同骨架修饰的 CpG-PEG 刺激脾细胞分泌 IL-6 的表达有了显著性提高。

[0149] 实施例 9、比较不同链长的 PEG 修饰的 CpG 体外免疫活性的差异

[0150] 1. 脾细胞的体外收集与培养:取 8 周 Balb/c 小鼠一只,脱颈法处死,75%酒精浸泡 5 分钟。解剖小鼠,打开腹腔,取出脾脏。将脾脏放于细胞筛上,加入 PBS,研磨。吸管收集研磨后的液体,加入离心管,4℃ 1400rpm 离心 5min。离心后,弃去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,重悬,4℃ 1400rpm 离心 5 分钟,弃去上清液,重复此步骤至管底细胞为白色。用 10ml1640 培养基,重悬细胞,吸取 10 μ l 滴入细胞计数板,显微镜下细胞计数。将细胞加入到 96 孔板中,放置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内分别培养 2h。

[0151] 2. 样品溶液制备:用 PBS 配制浓度相同的 CpG, CpG-PEG_{5K}, CpG-PEG_{10K}, CpG-PEG_{20K}。

[0152] 3. 细胞给药:取出样品溶液加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养

箱中, 37 度, CO₂ 浓度 5% 培养 24h 后, 4℃, 1400rpm 离心 5min, 收集上清液用于 ELISA 测定。

[0153] 4. 结果: 通过图 9 可以看出, 经过 PEG 修饰之后, 各组对脾细胞的刺激作用均有不同程度的降低, 但是与空白组对比, 仍可看出经过 PEG 修饰之后, 仍然起到对脾细胞的刺激作用。随着分子量的增大, IL-6 的表达水平降低。

[0154] 实施例 10、比较不同链长的 PEG 修饰的 CpG 血清稳定性的差异

[0155] 1. 样品准备: 用 0.9% 的 NaCl 配制相同浓度的 CpG 以及 CpG-PEG_{5K}, CpG-PEG_{10K}, CpG-PEG_{20K} 的溶液。

[0156] 2. 给药: 将 Balb/c 小鼠分为 CpG 组和 CpG-PEG_{5K}, CpG-PEG_{10K}, CpG-PEG_{20K} 组, 采取了对小鼠进行尾静脉注射的给药方式, 每只小鼠注射 200 μL CpG 和 CpG-PEG 注射液。分别在注射后 5min、15min、30min、1h、5h、10h、15h、20h、25h 九个时间点通过眼眶取血获得血液样品。由于在将血液处理成血清的过程中会有体积损耗, 所以每次的取血量应不低于 50 μL, 避免处理得到的血清量太少而达不到检测所需量。

[0157] 3. 样品处理: 将取得的血液样品在室温下静置 30min, 待血液充分凝固后, 以 3000rpm 的速度离心 10min, 取出上清液, 并再次以 2200rpm 的速度离心 10min。离心完成后, 取出上清液, 置于 -20℃ 冷冻保存。

[0158] 4. 结果: 采用 QRT-PCR 对样品进行测定, 实验结果表明, CpG-PEG_{10K}, CpG-PEG_{20K} 的药时曲线下面积大于 CpG, CpG-PEG_{5K} 与 CpG 组药时曲线没有显著性差异。CpG, CpG-PEG_{5K}, CpG-PEG_{10K}, CpG-PEG_{20K} 的半衰期分别为 30min, 1h, 4h, 5h。说明分子量大于 10K 的 PEG 修饰的 CpG 的可以提高 CpG 在体内的稳定性, 避免核酸酶的降解,

[0159] 实施例 11、比较不同链长的 PEG 修饰的 CpG 体内免疫效果差异

[0160] 1. 样品制备, 将所合成的 PEG 修饰的 CpG 粉末, 每 100 μg 有效 CpG ODN (仅计 CpG 质量, 不计 PEG 质量) 溶于 200 μL PBS 缓冲液, 制成 500 μg/ml 的储备液, 现配现用。

[0161] 2. 免疫方案, 采用腹腔注射的方式进行给药。以下操作均为无菌操作。每只小鼠接受 200 μL 剂量注射。初次免疫时, 用移液枪分别将所用剂量 CpG 和不同链长的 CpG 加入 ep 管中, 然后将加入所用剂量鸡卵清蛋白 (OVA), 最后加入 PBS 缓冲液至总体积为 200 μL。在小鼠初次免疫之后 7 天进行, 每只小鼠接受 200 μL 剂量注射, 操作见初次免疫。分组情况见下表。

[0162]

组别	初次免疫 (第 0 天)		加强免疫 (第 7 天)	
	OVA	佐剂	OVA	佐剂
第一组	10 μg	无	10 μg	无
第二组	10 μg	CpG 5 μg	10 μg	CpG 5 μg
第三组	10 μg	CpG-PEG _{5K} 5 μg	10 μg	CpG-PEG _{5K} 5 μg
第四组	10 μg	CpG-PEG _{10K} 5 μg	10 μg	CpG-PEG _{10K} 5 μg
第五组	10 μg	CpG-PEG _{20K} 5 μg	10 μg	CpG-PEG _{20K} 5 μg

[0163] 3. 血液采集,在初次免疫后的第 14 天,第 21 天分别取血,小鼠血液采集使用眼眶静脉取血的方法。收集的血样通过离心(3000rpm,10min)取上清,如仍然有血色,可重复离心过程,直到完全无血色。保存至 -20°C 以备分析。

[0164] 4 ELISA 检测小鼠血清抗体水平,通过检测抗体的间接法 ELISA 来定量测量血清中特异性抗 OVA 抗体 IgG, IgG1, IgG2a 的浓度水平。

[0165] 5. 统计分析,每组实验小鼠 5 只,组内显着性差异用单侧 t 检验(one-tailed Student's test)分析,组间统计学差异用单因素方差(one-way ANOVA)分析,数据处理及作图使用 OriginPro8 完成。各图中数据表示为平均值 \pm 标准差(mean values \pm standard deviation)。

[0166] 6. 实验结果,对于第 14 天的结果(图 10-13),我们可以看出,对于 IgG,佐剂组都显着性高于 OVA 组($p < 0.05$),但是各个 CpG-PEG 组与普通 CpG ODN 组并没有显着性的差异(图 10);对于 IgG1,佐剂组都显着性低于无佐剂组($p < 0.05$) (图 11);对于 IgG2a,佐剂组显着性高于 OVA 组($p < 0.05$),但是 CpG-PEG 组与普通 CpG ODN 组并无显着性的差异(图 12);对于揭示 Th1 类免疫应答还是 Th2 类免疫应答的 IgG2a/IgG1 的比值,各 CpG-PEG 组和 CpG 组没有显着性差异,说明 PEG-CpG 的免疫刺激效果在第 14 天时,与普通 CpG 组相同(图 13)。实验结果表明对于各个分子量 PEG-CpG 组, IgG, IgG1, IgG2a 三个指标均没有显着性差异,说明在 14 天时,PEG 修饰对 CpG 的免疫效果没有起到明显的影响。

[0167] 在第 21 天,小鼠的特异性免疫抗体表达如下图(14-17),对于第 21 天的结果,我们可以看出,对于 IgG,佐剂组都显着性高于 OVA 组($p < 0.05$) (图 14);对于 IgG1,佐剂组都显着性低于无佐剂组($p < 0.05$),同时各个 CpG-PEG 组显着性低于 CpG 组(图 15);对于 IgG2a,佐剂组显着性高于 OVA 组($p < 0.05$),但是 CpG-PEG 组与普通 CpG ODN 组并无显着性的差异(图 16);对于揭示 Th1 类免疫应答还是 Th2 类免疫应答的 IgG2a/IgG1 的比值,各 PEG-CpG 组显着性高于 CpG 组($p < 0.05$)(图 17)。实验结果表明 CpG-PEG 的免疫刺激效果在第 21 天时,明显优于普通 CpG 组。

[0168] 对于各个分子量的 CpG-PEG 组, IgG 三个指标没有显着性差异,20K 分子量 CpG-PEG 的 IgG1 水平略低于另外两组 CpG-PEG,同时对于揭示 Th1 类免疫应答还是 Th2 类免疫应答的 IgG2a/IgG1 的比值, CpG-PEG_{20K} 组略高于其他两组 CpG-PEG,说明在 21 天时,20K 分子量 PEG 修饰对 CpG 的免疫效果较于低分子量 PEG 修饰的 CpG 有着更显著的免疫增强作用。

[0169] 实施例 12、比较不同链长 PEG 修饰的 CpG 免疫效果的长效性的差异

[0170] 1. 样品制备

[0171] 将所合成的 PEG 修饰的 CpG 粉末,每 $100 \mu\text{g}$ 有效 CpG ODN (仅计 CpG 质量,不计 PEG 质量)溶于 $200 \mu\text{l}$ PBS 缓冲液,制成 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的储备液,现配现用。

[0172] 2. 免疫方案

[0173] 采用腹腔注射的方式进行给药。以下操作均为无菌操作。每只小鼠接受 $200 \mu\text{l}$ 剂量注射。初次免疫时,用移液枪将所用剂量 CpG 和不同链长的 CpG 加入 eppendorf 管中,然后将加入所用剂量 OVA,最后加入 PBS 缓冲液至总体积为 $200 \mu\text{l}$ 。在小鼠初次免疫之后 7 天进行,每只小鼠接受 $200 \mu\text{l}$ 剂量注射,操作见初次免疫。具体免疫方法见下表。

[0174]

[0175]

组别	初次免疫(第 0 天)		加强免疫(第 7 天)	
	OVA	佐剂	OVA	佐剂
第一组	10 μ g	无	10 μ g	无
第二组	10 μ g	CpG5 μ g	10 μ g	CpG5 μ g
第三组	10 μ g	CpG-PEG _{5k} 5 μ g	10 μ g	CpG-PEG _{5k} 5 μ g
第四组	10 μ g	CpG-PEG _{10k} 5 μ g	10 μ g	CpG-PEG _{10k} 5 μ g
第五组	10 μ g	CpG-PEG _{20k} 5 μ g	10 μ g	CpG-PEG _{20k} 5 μ g

[0176] 3. 血液采集

[0177] 在初次免疫后的第 14, 21, 28, 35 天分别取血, 小鼠血液采集使用眼眶静脉取血的方法。收集的血样通过离心(3000rpm, 10min)取上清, 如仍然有血色, 可重复离心过程, 直到完全无血色。保存至 -20°C 以备分析。

[0178] 4. ELISA 检测小鼠血清抗体水平

[0179] 我们通过检测抗体的间接法 ELISA 来定量测量血清中特异性抗 OVA 抗体 IgG2a 以及细胞因子 IFN- γ 的浓度水平。

[0180] 5. 统计分析

[0181] 每组实验小鼠 5 只, 组内显着性差异用单侧 t 检验(one-tailed Student's test)分析, 组间统计学差异用单因素方差(one-way ANOVA)分析, 数据处理及作图使用 OriginPro8 完成。各图中数据表示为平均值 \pm 标准差(mean values \pm standard deviation)。

[0182] 6. 实验结果

[0183] 从图 18 结果可知, 从 28 天开始, CpG-PEG 组显着性高于 CpG 组($p < 0.05$); 20K 分子量 PEG 效果优于 10k 分子量 PEG 效果, 优于 5K 分子量 PEG 效果。实验结果表明 PEG 分子量越大, 对延长 CpG 体内半衰期的效果越强, 长效性越好。为了验证这一结果, 我们将小鼠血清 IFN- γ 浓度水平与 IgG2a 浓度水平放在一起进行比较(图 19), 发现两者的变化趋势基本一致。IgG2a 是体液抗体应答方面表现 Th1 类免疫应答效果, IFN- γ 是细胞免疫应答方面表现出 Th1 类免疫应答效果。我们的实验中, 由于两者具有相似的变化方式, 说明两者都可以代表机体 Th1 类免疫应答程度, 也说明了 CpG ODN 帮助蛋白类抗原激发的 Th1 类免疫应答, 既包括体液免疫应答又包括细胞免疫应答。

[0184] 实施例 13、CpG-PEG 与 CpG 对乳腺癌细胞 4T1-pGL₃ 细胞活性实验比较

[0185] 1. 细胞接种 : 4T1-PGL₃ 鼠源乳腺癌细胞在含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基中, 于 37°C , 5%CO₂ 培养箱中培养。观察细胞生长状态良好, 培养至对数生长期后, 将细胞接种至 96 孔板中。

[0186] 2. 样品溶液制备 : 用培养基配制成浓度为 25、100、250 μ g/ml 的 CpG 和 CpG-PEG 溶液, 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌。

[0187] 3. 细胞给药:过夜待细胞在培养板上贴壁后,取出原培养液,分别加入 200 μ l 的用 1640 培养基配制成的 25、100、250 μ g/ml 的 CpG 和 CpG-PEG 溶液。以纯培养液作为空白对照,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱内分别培养 24h 和 72h。

[0188] 4. 检测:孵育完成后,向每孔加入 10 μ l CCK8 溶液(注意不要再孔中生成气泡,它们会影响 OD 值的读数)。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱内孵育 2h 后用酶标仪测定在 450nm 处的吸亮度。

[0189] 5. 结果:培养 24h 时,CpG ODN1826 和 CpG-PEG 各浓度干预的 4T1-pGL₃ 细胞,实验组与空白对照比较差异均无统计学意义(P > 0.05)。培养 72h 时点,250 μ g/ml 的 CpG ODN 和 CpG-PEG_{20K} 干预的 4T1-pGL₃ 细胞活性相对空白组右减小,但是差异无统计学意义(p > 0.05)(见图 20)。表明 CpG1826 和 CpG-PEG 对 4T1-pGL₃ 细胞的生长无抑制效果。

[0190] 实施例 14、CpG-PEG 体外实验效果,考察 PEG 修饰 CpG 对 BMDC 的免疫刺激影响

[0191] 1. mDC 细胞的收集与培养:取 C57/BL6 小鼠 6 只,雄性,断颈椎处死,75% 乙醇中浸泡约 15 分钟;将小鼠移至超净工作台中,分离胫骨和股骨,去除肌肉和结缔组织,剪开骨骺端,以注射器吸取无血清无双抗 RPMI1640 培养液,将骨髓细胞冲出至骨色发白;收集骨髓细胞,1400rpm 离心 5min,弃上清,加 7ml Tris - NH₄Cl 溶液裂解红细胞,置于室温下静置 5 分钟;4 $^{\circ}$ C 1400rpm 离心 5 分钟,弃上清,加 24ml 含 10ng/ml 小鼠重组的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mGM-CSF)和 1ng/ml 白介素-4(IL-4)的 1640 培养液重新悬浮分散,加入 6 个 6 孔细胞培养板中,每孔 4ml,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养;72 小时后,移去所有细胞培养液和悬浮细胞,仅保留贴壁细胞,然后每孔补加 4ml 含 10ng/ml mGM-CSF 和 1ng/ml IL-4 的 1640 培养液,继续培养;第 5 天每孔移出 2ml 培养液,再补加入 2ml 含 10ng/ml mGM-CSF 和 1ng/ml IL-4 的 1640 培养液,继续培养;第 6 天时,收集悬浮细胞和轻微贴壁细胞,即为小鼠来源的 BMDC,可用于下一步实验。将收集到的 mDC 至于 96 孔板中,将 IFN- γ (5ng/ml)与 BMDC 孵育 12h 后,去掉培养基,加入 1640 培养基,在细胞培养箱中孵育 2h。

[0192] 2. 样品溶液的制备:用 PBS 配制浓度分别为 5, 2.5, 1.25nmol/ml 的 CpG 以及 CpG-PEG_{20K} 的溶液。

[0193] 3. 细胞给药:取出不同浓度的样品溶液 5 μ l, 加入到 96 孔板中,每个样品三个复孔。恒温细胞培养箱中,37 度,CO₂ 浓度 5% 培养 24 小时后,4 $^{\circ}$ C,1400rpm 离心 5min,收集细胞上清液,ELISA 测定 IL-p70 的表达量。

[0194] 4. 结果:通过上结果可以看出,经过 PEG 修饰之后,各组对脾细胞的刺激作用均有不同程度的降低,但是与空白组对比,仍可看出经过 PEG 修饰之后,仍然起到 BMDC 的刺激作用,IL-12p70 分泌有了较大的提高,与对脾细胞刺激分泌 IL-6 的具有相似性(图 21)。

[0195] 实施例 15、PEG 修饰后的 CpG 对调节性 T 细胞的作用效果

[0196] 1. 样品制备

[0197] 将所合成的 PEG 修饰的 CpG 粉末,每 100 μ g 有效 CpG ODN 溶于 200 μ l PBS 缓冲液,制成储备液,现配现用。

[0198] 2. 免疫方案

[0199] 8 周大 C57 小鼠,采用腹腔注射的方式进行给药。以下操作均为无菌操作。每只小鼠接受 200 μ l 剂量注射。用移液枪将所用剂量 CpG 和 CpG-PEG 加入 ep 管中,然后将加入所用剂量 OVA,最后加入 PBS 缓冲液至总体积为 200 μ l。一周后,再给予 OVA + CpG/CpG-PEG,

再过一周后再次给予 OVA, 处死, 取脾和淋巴结。

[0200] 3. 从脾脏和淋巴结中分离出 T 细胞, 培养出 T 细胞, 用 OVA 刺激, 测定 IL-10 表达水平。

[0201] 4. 结果: CpG-PEG 组的 IL-10 表达水平低于 CpG 组, 证明 CpG-PEG 可以降低 CpG 针对调节性 T 细胞(Treg)的作用效果。

[0202] 实施例 16、PEG 修饰的 CpG 静脉注射给药后能对正常小鼠固有免疫的影响

[0203] 1. 样品制备

[0204] 将所合成的 PEG 修饰的 CpG 粉末, 每 100 μ g 有效 CpG ODN 溶于 200 μ l PBS 缓冲液, 制成储备液, 现配现用。

[0205] 2. 免疫方案

[0206] 8 周大 C57 小鼠, 采用静脉注射的方式进行给药, 将小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只。

① CpG1826-iv: 尾静脉注射 CpG-1826, 每周两次; ② CpG-PEG_{20k}-iv: 静脉注射 CpG-PEG, 每周两次; ③对照组-iv: 静脉注射 0.9%NaCl, 每周两次。以下操作均为无菌操作。每周取血一次, 共两周。收集的血样通过离心(3000rpm, 10min)取上清加入另外一只干净的 ep 管中, 如仍然有血色, 可重复离心过程, 直到完全无血色。保存至 -20℃用于 ELISA 分析。

[0207] 3. 结果: 从实验结果可以看出, CpG-PEG 组的 IL-12p70 的表达水平相对于 CpG 组有一定提高, 证明 CpG-PEG 加强小鼠固有免疫应答。

[0208] 实施例 17、PEG 修饰后的 CpG 的体内免疫抗肿瘤效果

[0209] 1. 模型建立及分组: BALB/c 鼠源性乳腺癌细胞系 4T1-pGL3 培养于含 10%FBS, 1%双抗的 RPMI1640 培养基中, 37℃, 5%CO₂, 待单层细胞片层达到 90% 融合时, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞进行传代。收集对数生长期的 4T1-pGL3 细胞, PBS 洗 1 次, 细胞计数。BALB/c 小鼠的左上侧乳腺皮下以 5×10^5 细胞 / 只种瘤。待肿瘤长到直径有 5mm 左右开始给药。将长有肿瘤的小鼠随机分为 5 组, 每组 5 只。① CpG1826-iv: 尾静脉注射 200 μ l (4nmol) 的 CpG-1826, 每周两次; ② CpG-PEG_{20k}-iv: 静脉注射 200 μ l 的 CpG-PEG20K, 每周两次; ③对照组-iv: 静脉注射 200 μ l 的 0.9%NaCl, 每周两次; ④ CpG-1826-pt 组: 肿瘤旁注射 200 μ l (4nmol) 的 CpG-1826, 每周两次; ⑤对照组-pt 组: 肿瘤旁注射 200 μ l 的 0.9%NaCl, 每周两次。

[0210] 2. 肿瘤生长比较

[0211] 观察肿瘤增长情况, 每隔两天用游标卡尺测量一次肿瘤体积(V=) $1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。一个月后结束观察。

[0212] 3. 荷瘤小鼠血清中 IL-12p70 的表达量测定

[0213] 每周取血一次, 共四周。收集的血样通过离心(3000rpm, 10min)取上清加入另外一只干净的 ep 管中, 如仍然有血色, 可重复离心过程, 直到完全无血色。保存至 -20℃用于 ELISA 分析。

[0214] 4. 结果:

[0215] 从肿瘤生长曲线可以看出 CpG-pt 组和 CpG-PEG_{20k} 与 0.9%NaCl 组有显著性差异(P<0.05), CpG-iv 组与 0.9%NaCl 没有显著性差异(P>0.05), 表明 PEG 修饰后的 CpG 抗肿瘤效果增强(见图 22)。CpG-PEG 组的小鼠血清中 IL-12p70 的水平明显高于其他组(P<0.05), CpG-iv 和 CpG-pt 组并不存在显著性差异(P>0.05), 表明 PEG 修饰后的 CpG 刺激

免疫细胞分泌 IL-12p70 的作用更强(见图 23)。

[0216] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

[0001]

序列表

- <110> 上海交通大学
 <120> PEG 修饰的 CpG 寡核苷酸及其应用
 <130> DAG14523
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG-7
 <400> 1
 tgacgttccg tt 12
 <210> 2
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG-8
 <400> 2
 atgacgttgc gtt 13
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG-13
 <400> 3
 tccatgacgt tectgacgtt cctgacgtt 29
 <210> 4
 <211> 20

[0002]

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG1826	
<400> 4	
tccatgacgt tctgacgtt	20
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG7909(CpG2006)	
<400> 5	
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210> 6	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG-H7	
<400> 6	
tgtcgttccg t	11
<210> 7	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG-H8	
<400> 7	
atgtcgttgc gtt	13
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

[0003]

<220>		
<223>	CpG-H13	
<400>	8	
	tccatgtegt tctgtcgtt cctgtcgtt	29
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CpG-H1826	
<400>	9	
	tccatgtegt tctgtcgtt	20
<210>	10	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CpG-1	
<400>	10	
	atggacgttc g	11
<210>	11	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CpG-2	
<400>	11	
	atagacgttc g	11
<210>	12	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	CpG-3	

[0004]

<400> 12 atgaacgttc g	11
<210> 13 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> CpG-4	
<400> 13 tcagacgttc g	11
<210> 14 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> CpG-5	
<400> 14 tcaaacgttc g	11
<210> 15 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> CpG-6	
<400> 15 gacgttcccg tt	12
<210> 16 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> CpG-9	
<400> 16 tcgcggtcgt tcgcg	15

[0005]

<210> 17	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG-10	
<400> 17	
ttgtcgttcg cg	12
<210> 18	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG-11	
<400> 18	
gtcgttcg	10
<210> 19	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CpG-12	
<400> 19	
tccatgacgt tcc	13

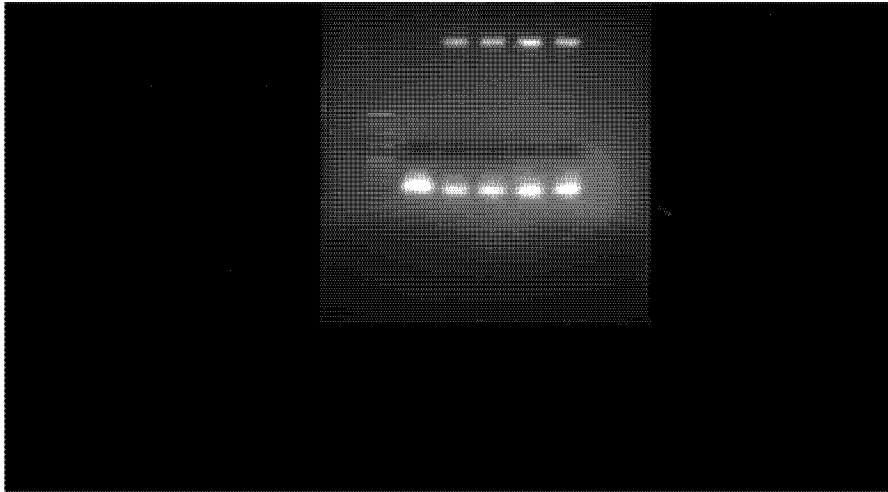


图 1

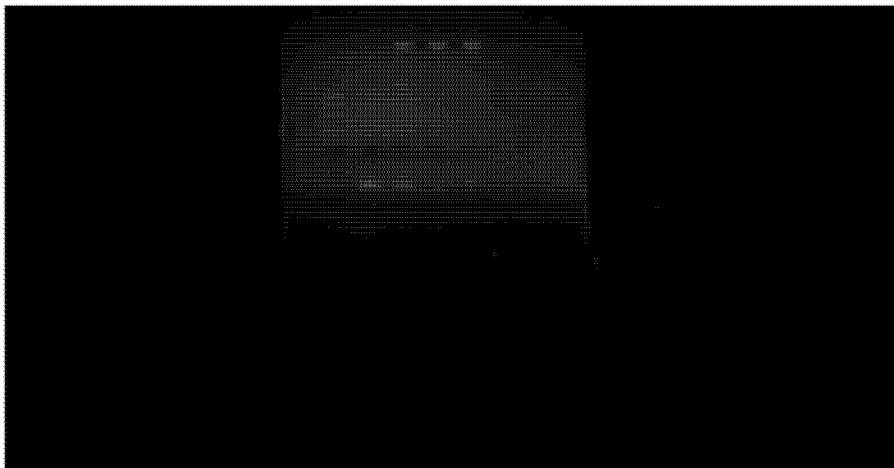


图 2

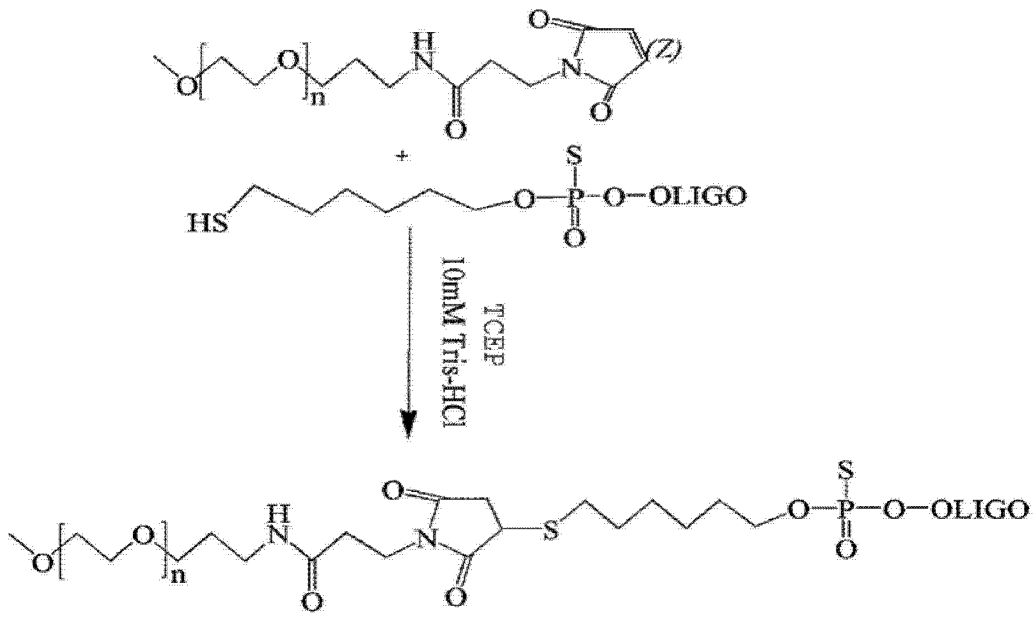


图 3

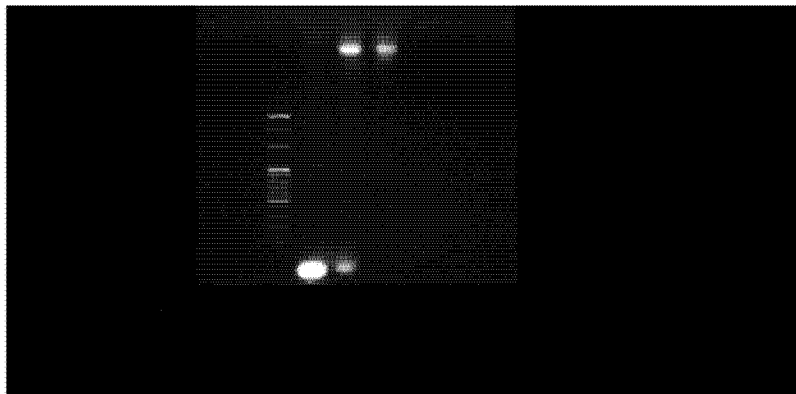


图 4

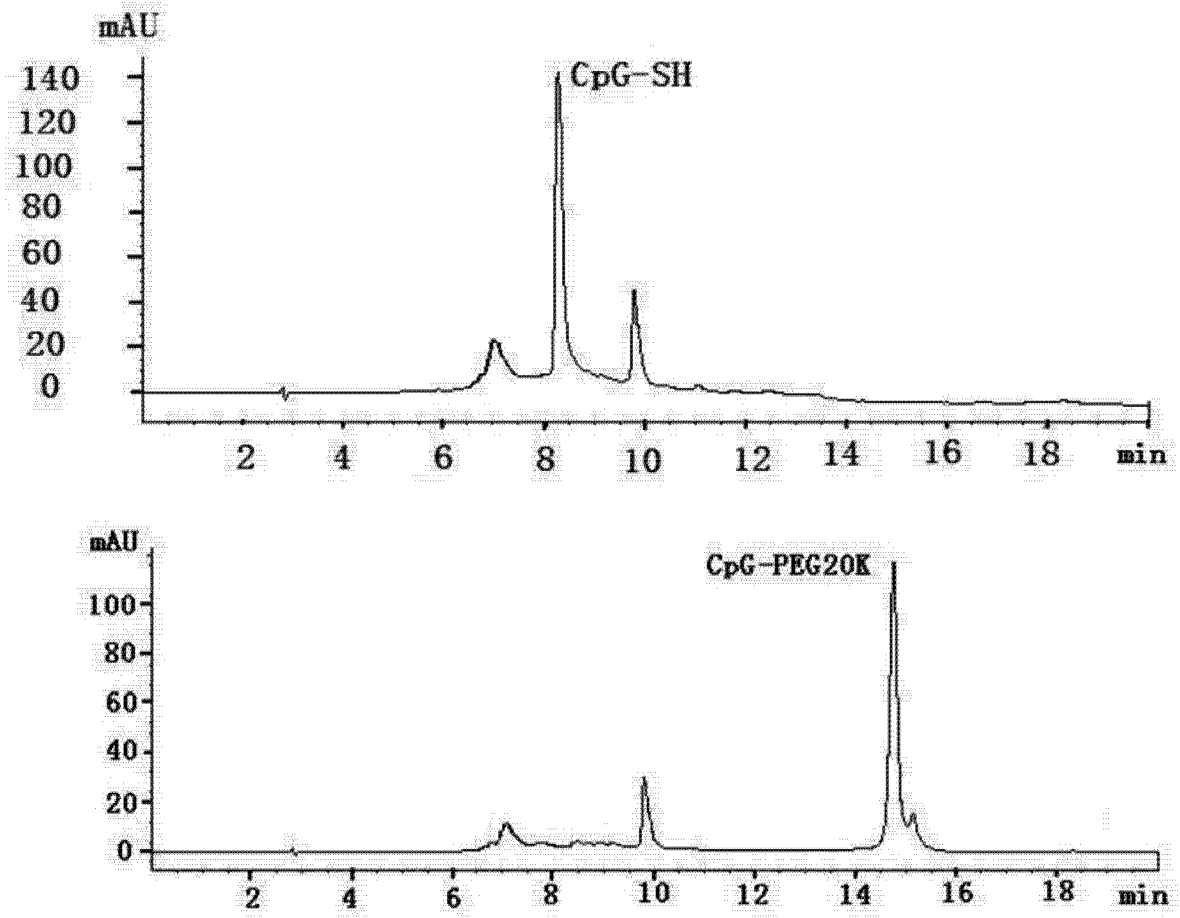
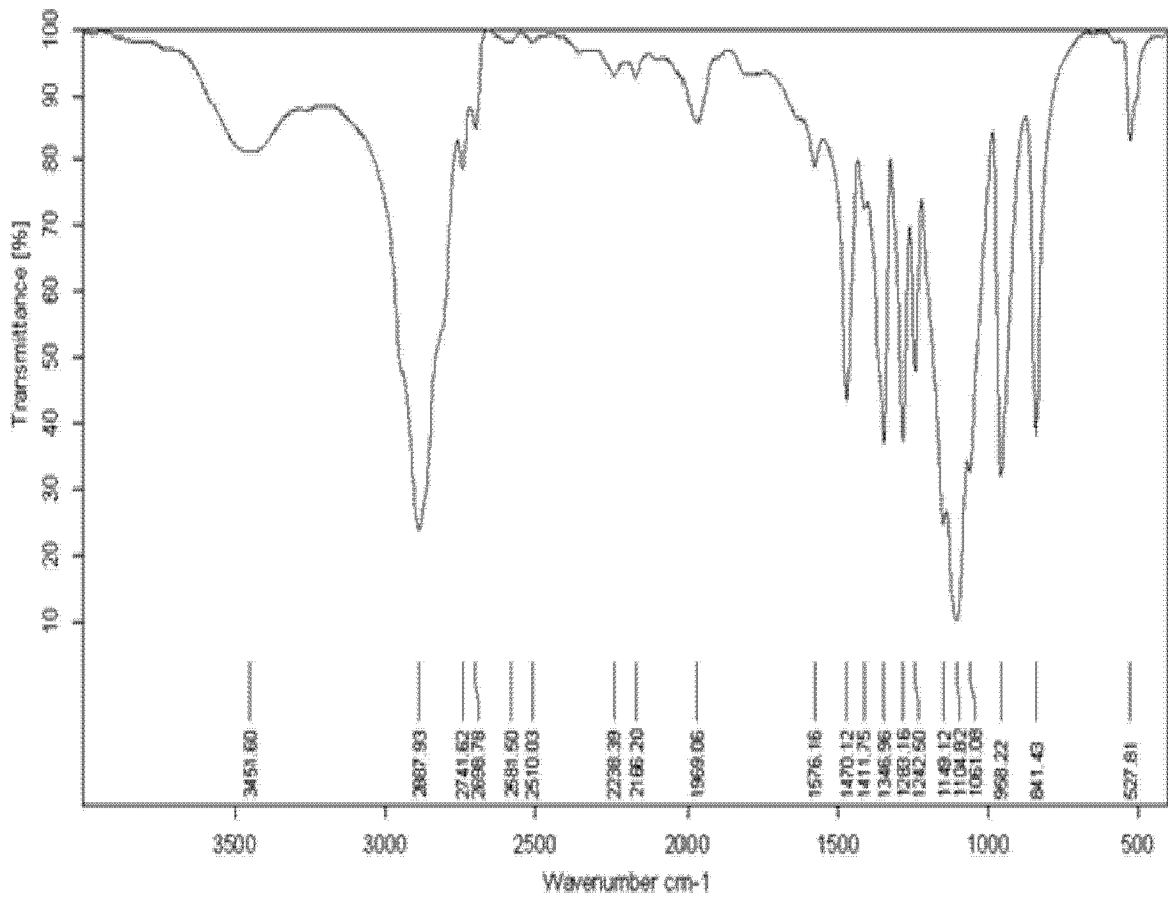


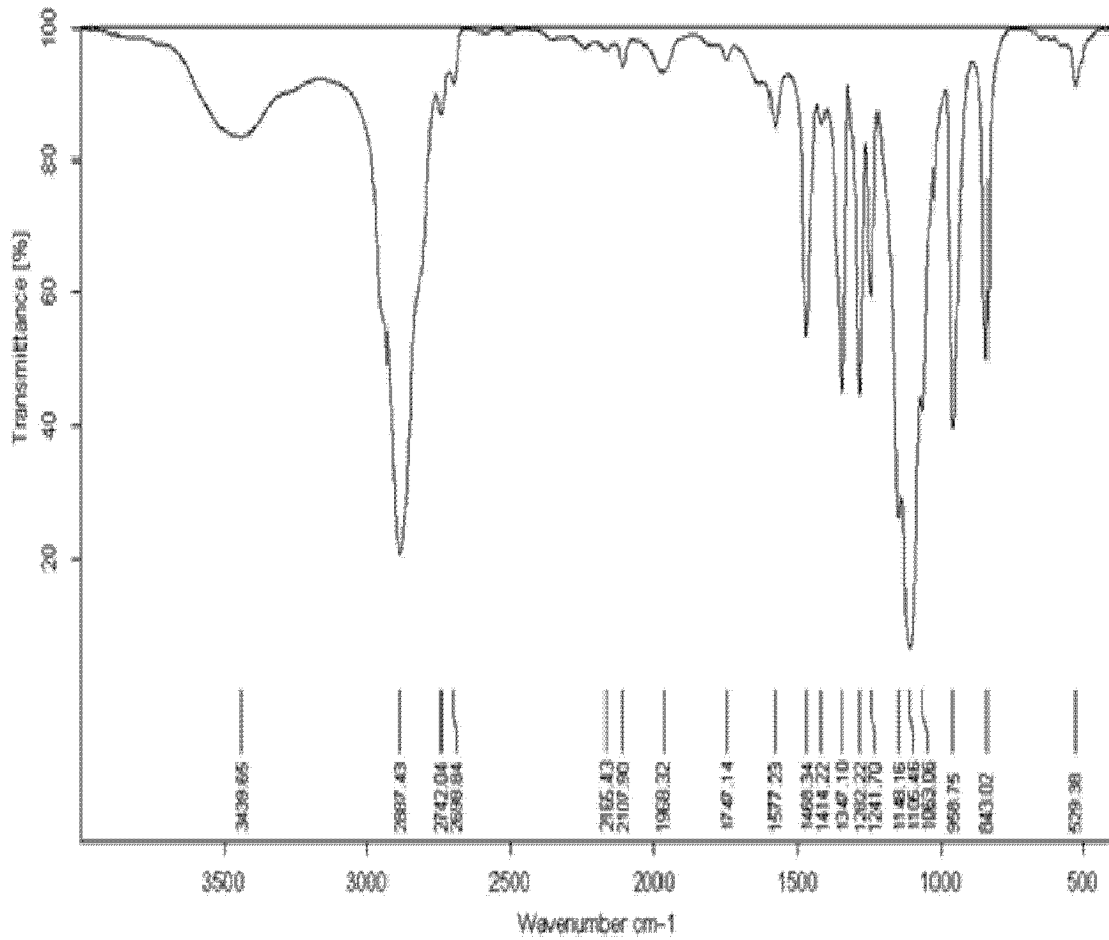
图 5



Q:\2011\DATA\? ? ? \? ? ? \2011030005.0	6000	DLATQS, KBr-BMS, Globak, IFS 66	2011-3-8
---	------	---------------------------------	----------

Page 1 of 1

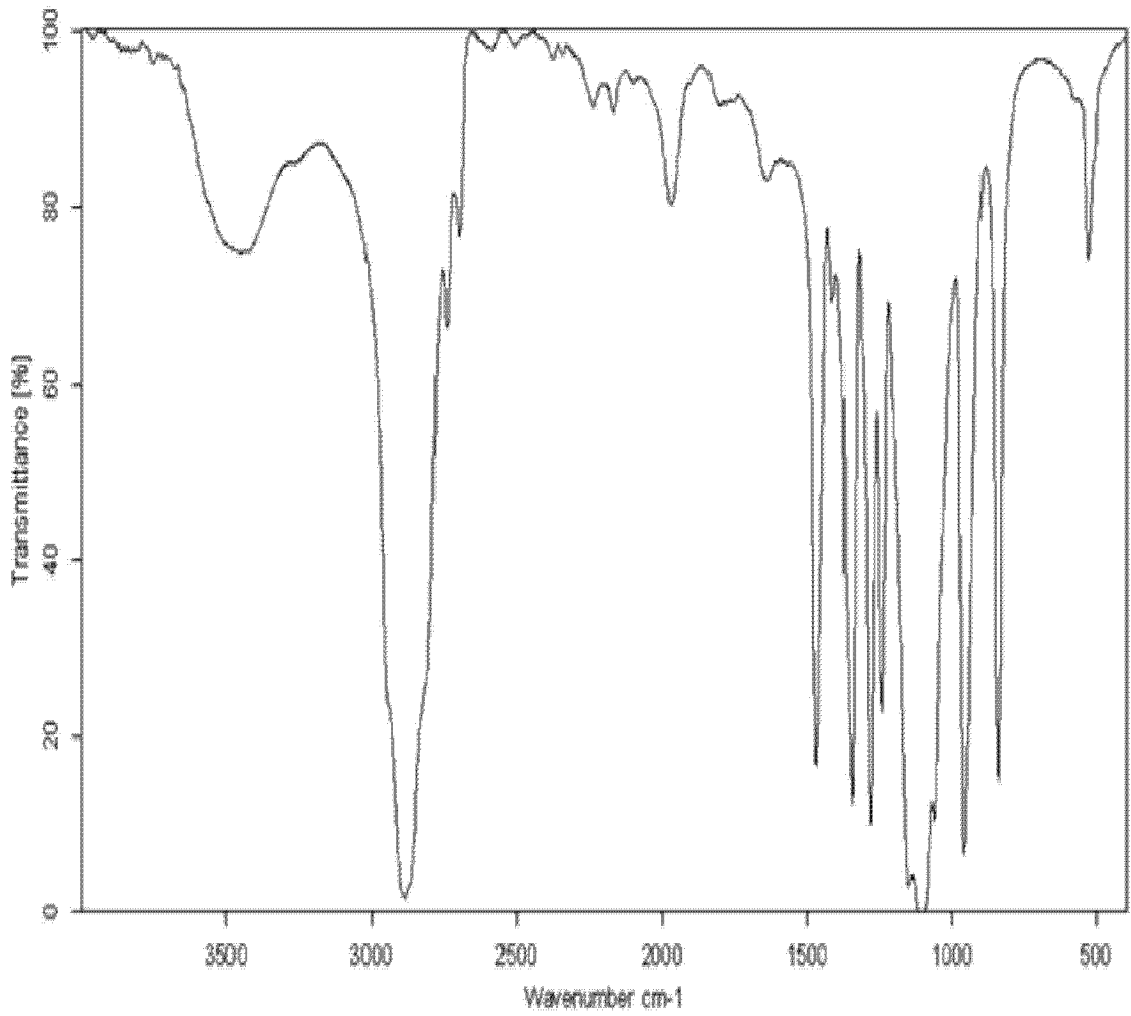
图 6A



D:\2011\DATA\??\??\??\2011030805.1	8000-N3	DLATGS, KBr-BMS, Globar, JFS 66	2011-38
------------------------------------	---------	---------------------------------	---------

Page 1 of 1

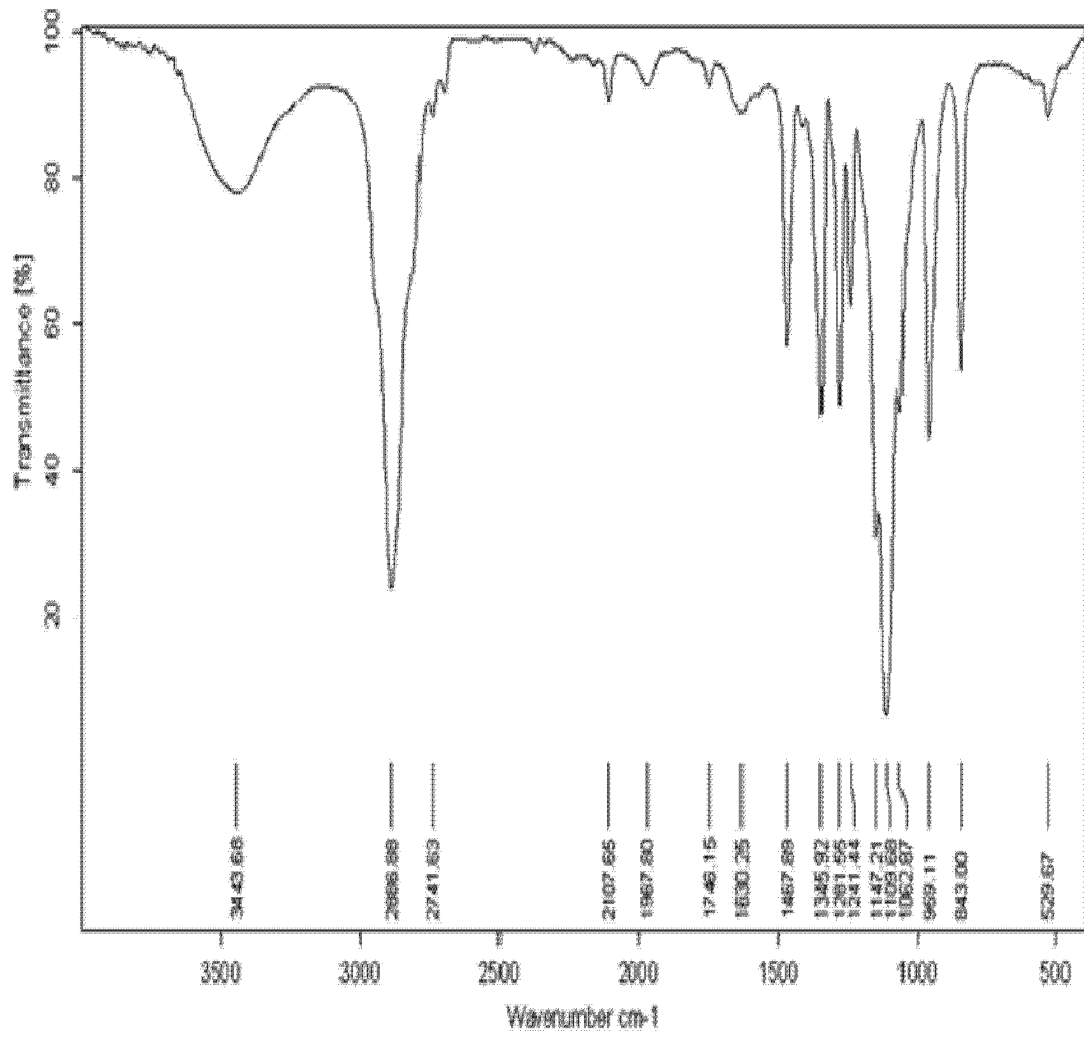
图 6b



D:\2011\DATA\?? V ?? V ?\2011.5.6	peg10000	D:\TGS_KB-BMS_Globar_IRS.66	2011-5-6
-----------------------------------	----------	-----------------------------	----------

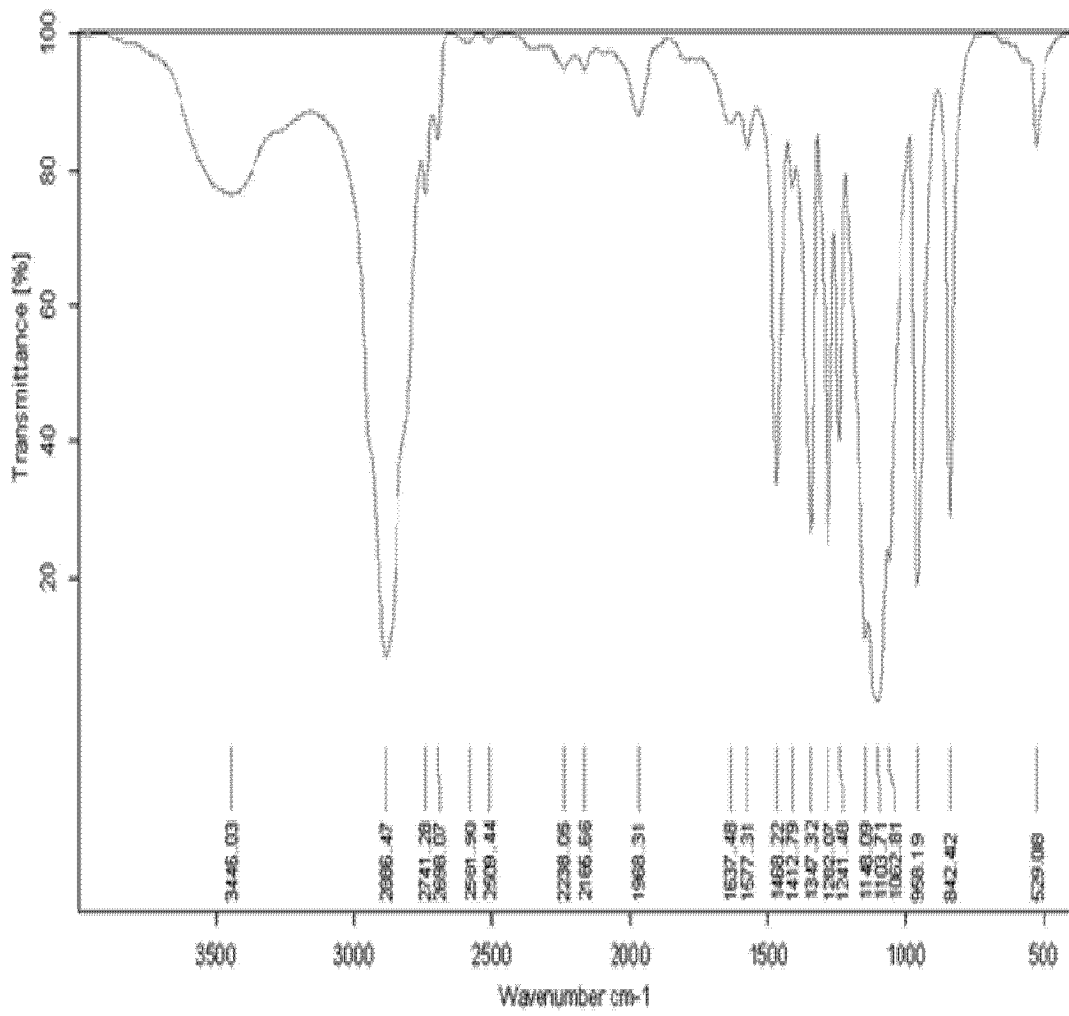
Page 1 of 1

图 6c



D:\2011\DATA\?? V ? ? V ? \2011.5\PEG1000\NN.1	peg1000N	DLTGS, KBr-BMS, Glebar, IFS 66	2011-6-6
--	----------	--------------------------------	----------

图 6d



D:\2011DATA\1 7 7 7 7 7 10116000052	3000	DLITGS, MTE-SMS, Olibar, FS 68	2011-5-8
-------------------------------------	------	--------------------------------	----------

图 6e

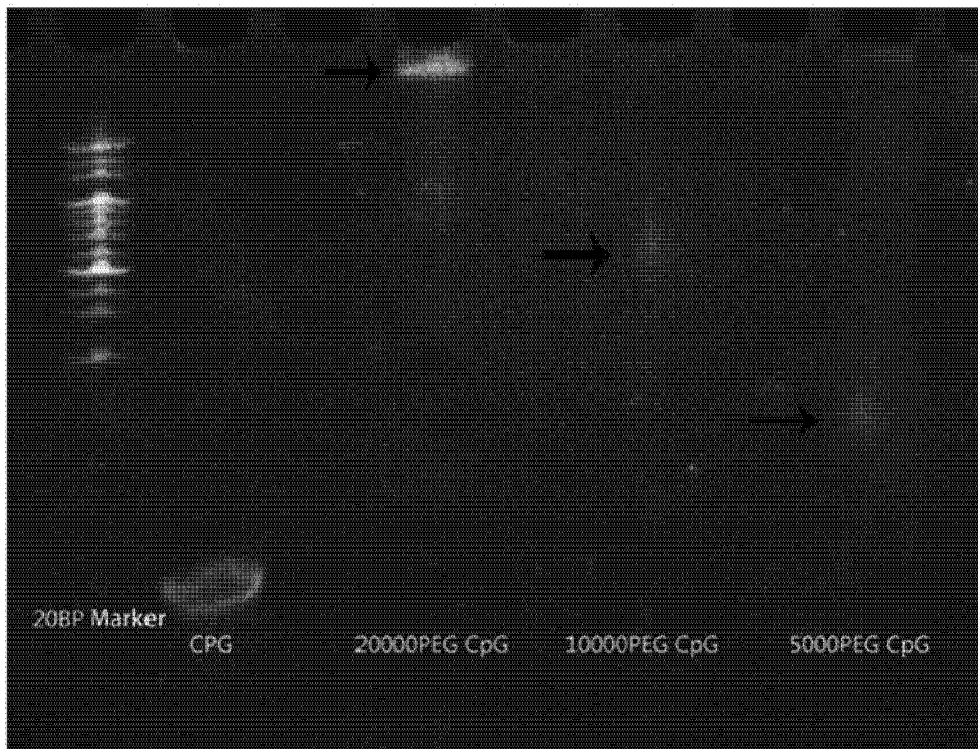


图 7

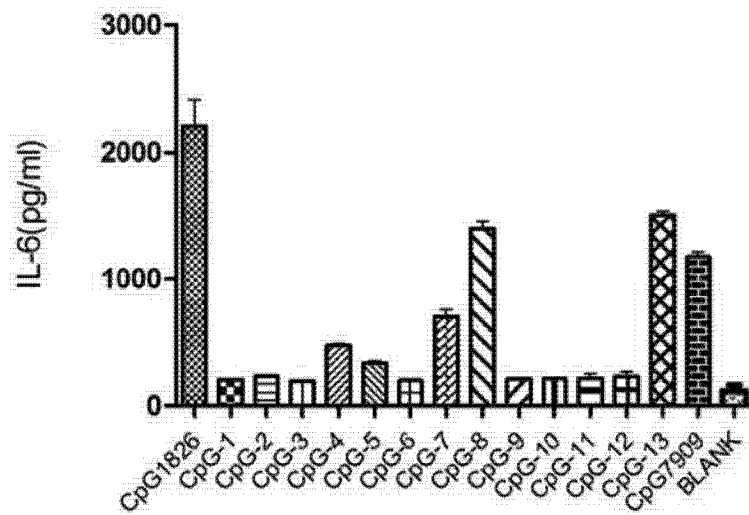


图 8

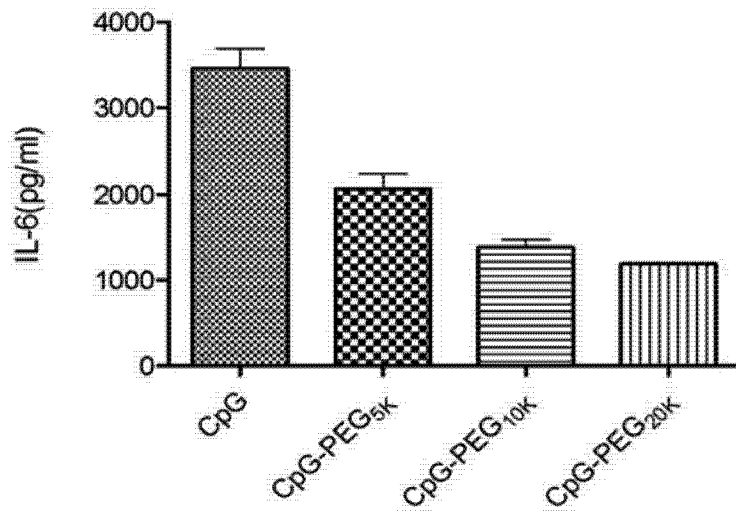


图 9

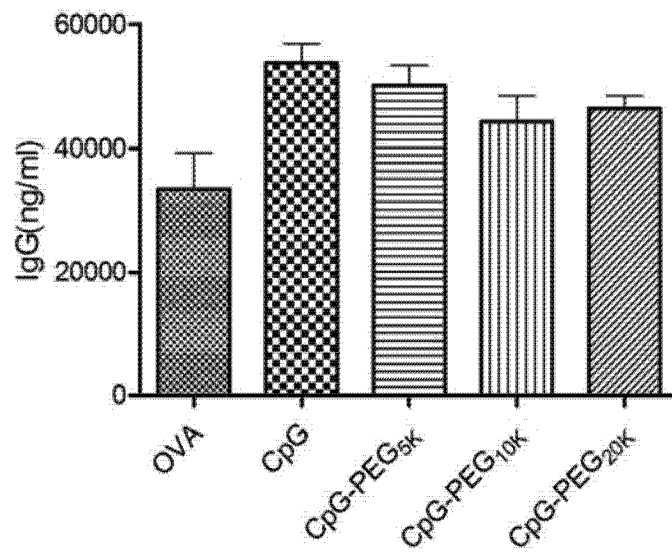


图 10

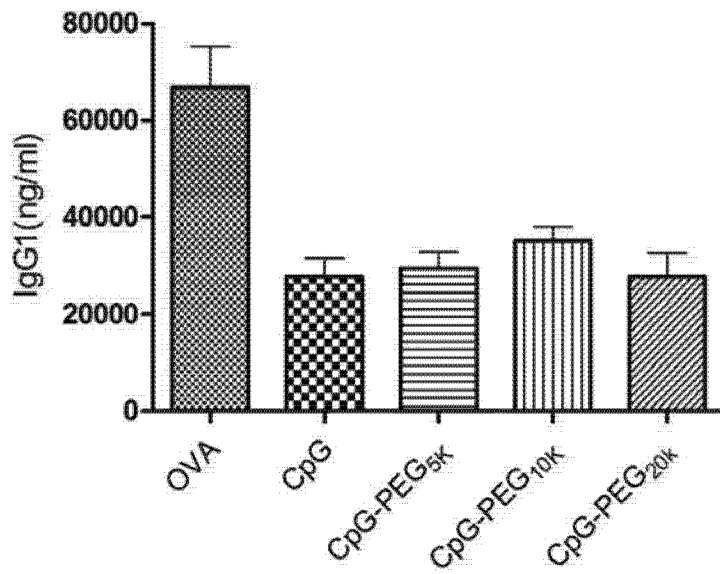


图 11

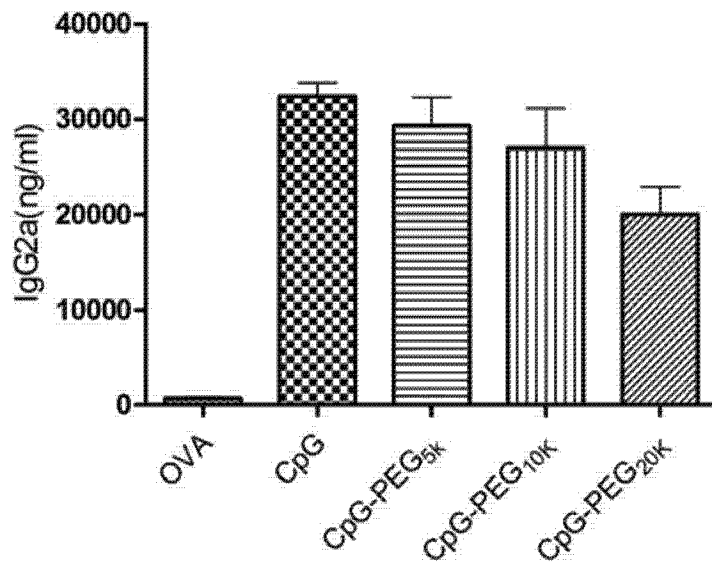


图 12

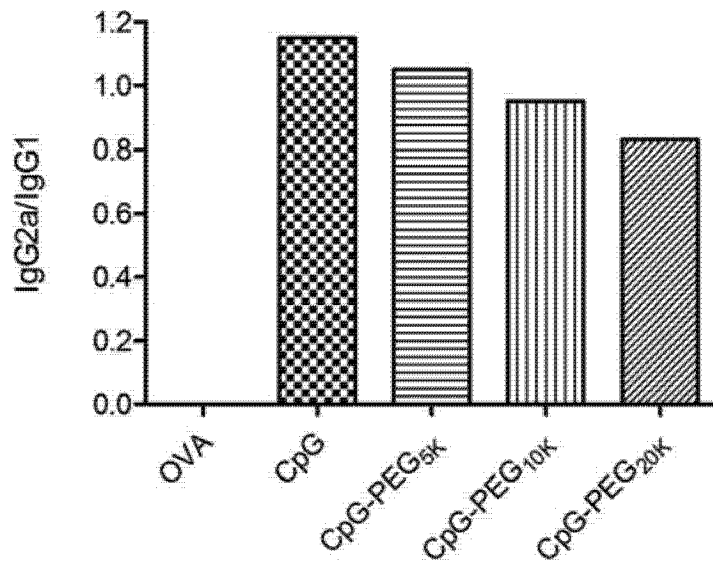


图 13

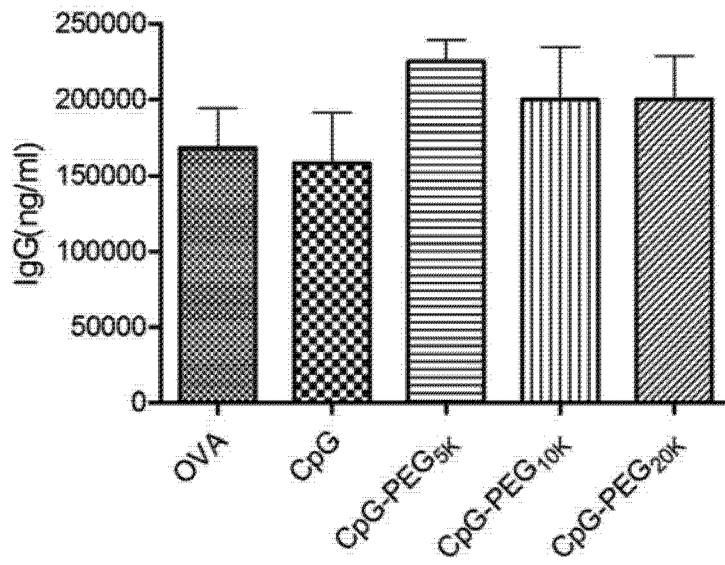


图 14

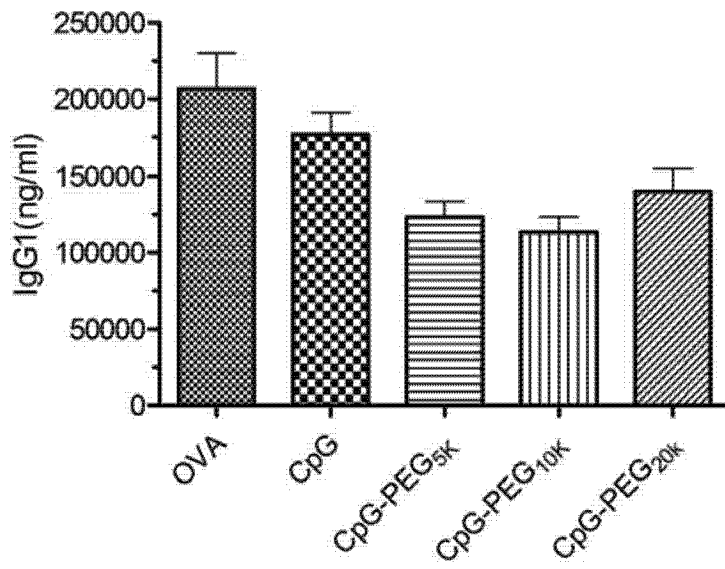


图 15

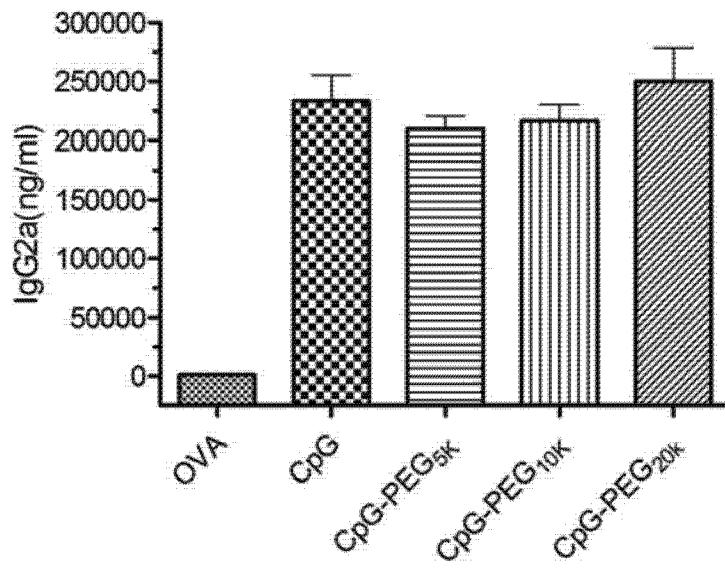


图 16

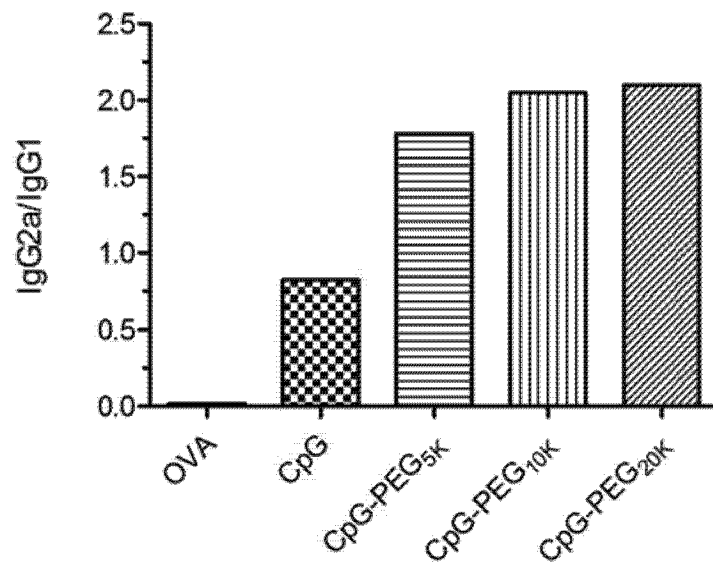


图 17

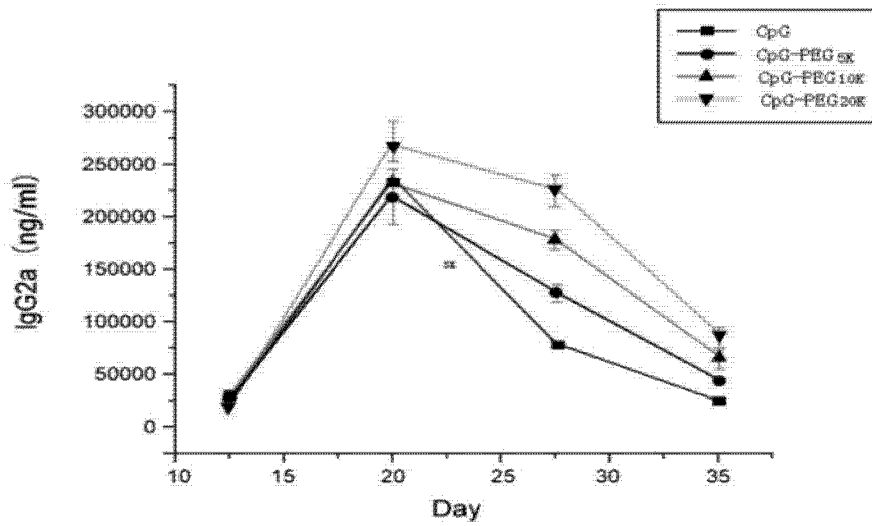


图 18

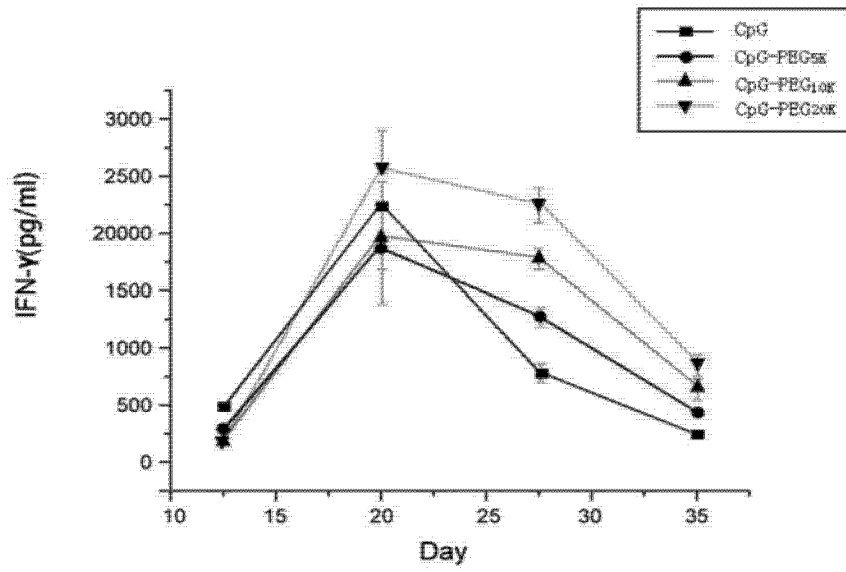


图 19

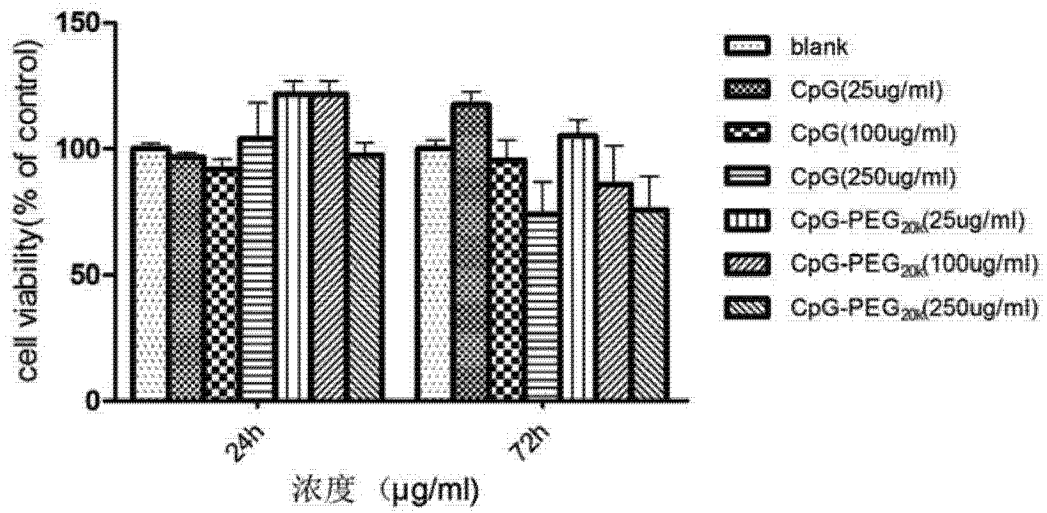


图 20

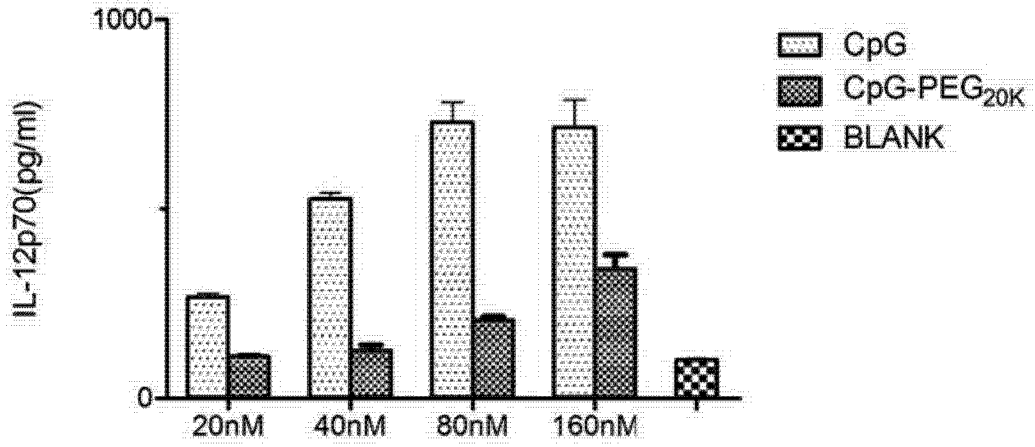


图 21

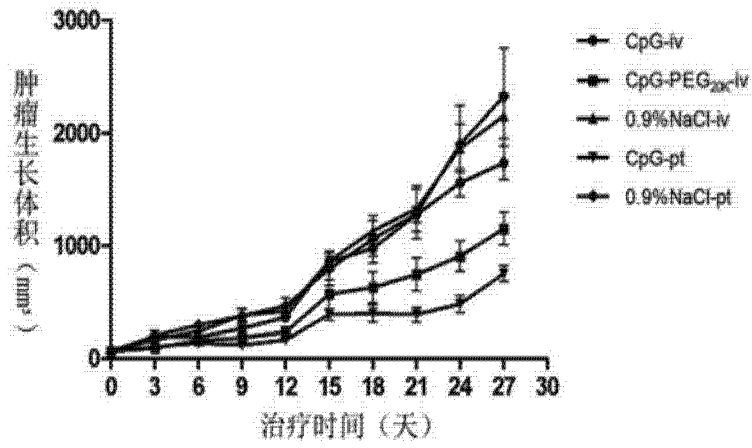


图 22

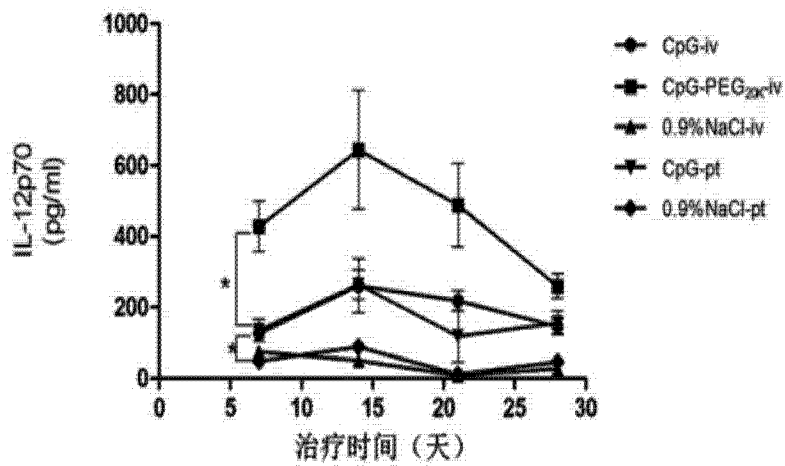


图 23