



中國醫藥大學

免疫學研究所

碩士學位論文

新型乳化型佐劑含有 CpG 去氧寡核苷酸能增  
強 CD8<sup>+</sup> T 細胞免疫以治療子宮頸癌

A Novel Emulsion-Type Adjuvant Contains CpG  
Oligodeoxynucleotides Enhances CD8<sup>+</sup> T Cell Immunity  
against Cervical Cancer

指導教授：劉士任 博士

林欣榮 博士

研究生：鄭涵尹

中華民國 一 百 年 七 月

## 致謝

碩士這兩年首先最感謝就是我的指導教授劉博士，我從茫茫不懂到熟知許多實驗進而能順利完成碩士的學業，受到最多就是劉博士的教導與指引，非常感謝他很有耐心的指導與照顧。另外也很感謝實驗室的各位學長姐，不管是我在學業或是生活上的問題，大家都非常願意協助我、教導我，另外也很感謝我那幾位可靠的同學們和學弟妹，我人雖不常在學校，可是有他們不時提供給我的資訊，使我不會錯過學校的大小事情，感謝你們兩年下來的照顧！最後最大的感謝當然是我的父母，因為有您們的資助我才能無後顧之憂的求學，在此獻上最大最誠摯的感謝！



## 中文摘要

本實驗的目標是期望發展一種能有效活化毒殺型 T 細胞之佐劑組合，此組合將結合疫苗遞送系統以及免疫刺激型的佐劑。PELC 是種乳狀疫苗遞送系統，由生物可吸收式高分子 PEG-b-PLACL、Span®85 和角鯊烯(Squalene)這三種物質組成。由近期的研究中指出 PELC 與 TLR9 之配體 CpG(PELC/CpG)之組合在 H5N1 疫苗中可以增強體液性免疫去對抗 H5N1 的病毒，爲了想知道這種組合是否也可以增強細胞性免疫去治療子宮頸癌，因此在本實驗中，利用此組合在重組蛋白和胜肽免疫療法觀察其效用。

胜肽 RAHYNIVTF (RAH) 是段抗原決定位，爲 HPV16E7 第 49-57 之胺基酸序列，會被 H-2D<sup>b</sup> 之毒殺型 T 細胞給專一辨識，在本實驗中，RAH 混合 PELC/CpG 希望能活化毒殺型 T 細胞並應用在治療型子宮頸癌疫苗中。將這疫苗組合免疫 C57BL/6 小鼠，可發現比起只加單一佐劑的組別相比，RAH 和 PELC/CpG 的組合能引起較高量的細胞分泌 IFN- $\gamma$  且能活化較多的 CD107a<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>的毒殺型 T 細胞，且有較多專一辨識 RAH 的 CD8T 細胞。之後又更一部應用在 TC-1 子宮頸癌模型中，將 RAH 和 PELC/CpG 免疫已注射過 TC-1 癌細胞

的小鼠，同時加入 RAH 和 PELC/CpG 的組別可以顯著的抑制腫瘤生長，比起 RAH 單加 PELC 或 CpG 的組別。

另外爲了測 PELC/CpG 的組合是否也是用在重組蛋白免疫療法上，因此改用重組修飾後的 E7 蛋白 (rE7m)爲抗原與 PELC/CpG 的組合去做小鼠免疫的測試，可發現 PELC/CpG 這組合可以引起 Th1 免疫力去對抗腫瘤。

本論文發現合併抗原遞送系統的 PELC 佐劑與免疫刺激型的佐劑(TLR9 之配體 CpG)有助於活化毒殺型 T 細胞去對抗腫瘤，爲癌症免疫療法提供新的方向。



## Abstract

A rational approach towards the development of strong CTL-inducing adjuvant formulation is to combine vaccine delivery system and immune-stimulating reagents. PELC is an emulsion-type vaccine delivery system which contains a bioresorbable polymer PEG-b-PLACL, Span®85 and squalene. Our previous report has been shown that PELC formulated with TLR9 ligand (CpG) (PELC/CpG) in H5N1 vaccine could enhance humoral immunity to against H5N1 virus. In order to determine whether PELC/CpG can also enhance cellular immunity to treat cervical cancer, both protein and CTL epitope-based immunotherapies were used in this study.

Peptide RAHYNIVTF (RAH) is an H-2D<sup>b</sup>-restricted CTL epitope that derived from HPV16 E7 (amino acid 49-57). We formulated this peptide with PELC/CpG to induce CTL for developing therapeutic cervical cancer vaccine. The RAH formulated with PELC/CpG, immunization with C57BL/6 mice could induce higher number of IFN- $\gamma$ -secreting cells and CD107a<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells than RAH formulated with PELC or CpG only. RAH formulated with PELC/CpG could also induce higher number of RAH-specific CD8<sup>+</sup> T cells that determined using PE conjugated RAH/H-2K<sup>b</sup> tetramer. Furthermore, RAH formulated with PELC/CpG to immunize TC-1 tumor-bearing mice once could induce strong inhibition of tumor growth compare to formulate with PELC or CpG only. In order to test whether this

formulation could be used for protein antigen, recombinant mutant E7 protein (rE7m) was formulated with PELC/CpG. We found that rE7m formulated with PELC/CpG could induce a Th1-bias immunity against tumor.

Our results demonstrate that antigen formulated with both delivery system and immune-stimulating reagent (TLR9 ligand) could induce strong CTL responses against cancer.



# 目錄

致謝.....	I
中文摘要 .....	II
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
縮寫表.....	XII
第一章 緒論 .....	1
1.1 人類乳突病毒和子宮頸癌概況 .....	1
1.2 目前市面上子宮頸癌疫苗 .....	2
1.3 治療性子宮頸癌疫苗發展 .....	3
1.4 治療策略.....	5
1.5 研究動機.....	8
第二章 材料與方法 .....	9
2.1 實驗材料.....	9
2.1.1 動物.....	9
2.1.2 抗原.....	9
2.1.3 佐劑 CpG 去氧寡核苷酸 .....	12

2.1.4 PEG-b-PLACL 之合成.....	12
2.1.5 細胞株與細胞培養.....	13
2.1.6 培養液與培養基.....	13
2.1.7 PE RAH tetramer(四架體)的製備.....	14
2.2 實驗方法.....	16
2.2.1 PELC 製備 .....	16
2.2.2 小鼠免疫試驗.....	16
2.2.3 脾臟細胞的製備.....	17
2.2.4 TC-1 腫瘤治療疫苗模型.....	23
第三章 實驗結果 .....	25
3.1 胜肽抗原(RAH)最佳化.....	25
3.2 顯微鏡下觀察 PELC .....	26
3.3 以專一性 RAH 四價體測定 RAH/PELC 誘發專一性 CD8 <sup>+</sup> 細胞 的能力 .....	26
3.4 以 TC-1 腫瘤治療模型觀察 PELC 治療能力.....	27
3.5 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並觀察抗原引發脾臟 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$ .....	27
3.6 以 RAH 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並測定 RAH 專一性 T 細胞量 .....	28



3.7 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定毒殺型 T 細胞 .....	29
3.8 以 TC-1 腫瘤治療模型比較 RAH 與 CpG、PELC 佐劑組合的抗癌能力 .....	30
3.9 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並觀察抗原引發脾臟 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$ .....	30
3.10 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IFN- $\gamma$ 酵素免疫分析法測定 .....	31
3.11 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IL-10 酵素免疫分析法測定 .....	32
3.12 以 TC-1 腫瘤治療模型測定 30 $\mu$ 的重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合效果 .....	32
3.13 以 TC-1 腫瘤治療模型測定 1 $\mu$ g 的重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合效果 .....	33
第四章 討論 .....	34
第五章 結論 .....	37
參考文獻 .....	38

## 圖目錄

圖 一 胜肽抗原(RAH)最佳化.....	40
圖 二 RAH/PELC 的顆粒.....	41
圖 三 RAH/PELC 免疫小鼠產生之 RAH 專一性 T 細胞.....	42
圖 四 RAH/PELC 治療腫瘤的能力.....	43
圖 五 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合增加分泌 IFN- $\gamma$ 的 T 細胞 .....	44
圖 六 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定專一性 RAH T 細胞量.....	45
圖 七 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定毒殺型 T 細胞 .....	46
圖 八 以 TC-1 腫瘤治療模型比較 RAH 搭配 CpG、PELC 佐劑組合 .....	47
圖 九 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫引發脾臟 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$ .....	48
圖 十 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IFN- $\gamma$ 酵素免疫分析法測定 .....	49
圖 十一 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IL-10 酵素免疫分析法測定 .....	50
圖 十二 以 TC-1 腫瘤治療模型測定重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合效果 .....	51

圖 十三 1 $\mu$ g 重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合抑制腫瘤生長  
的能力.....52



## 表目錄

附表 一.預防型子宮頸癌疫苗比較 .....	53
附表 二.疫苗的組成結構 .....	54
附表 三.複合相乳狀液 PELC 製備流程圖 .....	55



## 縮寫表

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT: Enzyme-linked immunosorbent spot

HPLC: high performance liquid chromatography

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma

LC/MS : Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer

LCM: Lymphocyte culture medium

ml: milliliter

mM: millimolar

PBS: Phosphate-buffered saline

$\mu\text{g}$ : microgram

$\mu\text{l}$ : microliter

$\mu\text{l}$ : micrometer



## 第一章 緒論

### 1.1 人類乳突病毒和子宮頸癌概況

子宮頸癌在全世界是女性第二常見的癌症，每年約有 510,000 的新案例發生、288,000 的死亡案例[1-3]。目前造成子宮頸癌的危險因子有很多種，例如：抽菸、性行為...等，但是最主要造成的原因還是因為透過性行為。因為性行為感染到人類乳突病毒(Human Papillomavirus, HPV)，已被證實可能和子宮頸癌的發生最有關係，在全世界 93%的侵襲性子宮頸癌病例中，皆可發現人類乳突病毒的存在。[4]

人類乳突病毒屬於 Papovavirus 科，具有高度宿主專一性只感染人類。是種 DNA 病毒，其 DNA 呈環狀雙股，內含早期基因(early gene)E1、E2、E4-E8 以及晚期基因(late gene)L1-L2[1]，會被冠上乳突主要是因為此類病毒多會造成一般良性皮膚的增生，致使皮膚上有些突起物而得名。目前已知的人類乳突病毒已超過一百多種基因型，其中約三十餘種會感染人類生殖器官的黏膜、皮膚，造成各種疾病及相關癌症。其中比較受到重視的約有 40 型，這 40 型中約 10-15 種稱為低致癌型(low-risk human papillomavirus)，主要引起生殖道疣或菜花等性病，如第六型和十一型，另外有 15-20 種的高致癌型(high-risk human papillomavirus)，主要引起侵襲性的子宮頸癌或是其他相關癌症，當皮

膚或黏膜受到此病毒感染後大部分是無症狀的，並且會因自體的免疫力而去消除病毒，可是仍有些少部分的人其病毒會潛伏在上皮細胞中，使人體內抑癌蛋白的失控，促使上皮細胞的突變、癌前病變的產生，最終病毒的 DNA 嵌入宿主的染色體中，造成不可逆的癌化進而形成癌症。這群高危險型的人類乳突病毒就是如此造成子宮頸癌的形成，其中又以第十六型和十八型為大宗，這兩型就佔有 75% 以上子宮頸癌病例，而兩型裡又以第十六型佔多數[1]，故市面上現行預防型子宮頸癌疫苗主要也是針對這兩型去設計的[附表一]，然而漸漸陸續發現其他較少數的型別也一樣會造成子宮頸癌，但第十六型和第十八型仍是目前研究的大宗。

## 1.2 目前市面上子宮頸癌疫苗

目前市面上之子宮頸癌疫苗有兩種，皆屬於預防型的疫苗，分別是默克(Merck)藥廠的嘉喜(Gardasil®)，主要針對人類乳突病毒第 6、11、16、18 型，以及葛蘭素史克(GlaxoSmithKline)藥廠的保蓓(Cervarix)，針對人類乳突病毒第 16 和 18 型，這兩種疫苗在其針對的人類乳突病毒感染預防上可達到 99%[5]，而且對於另外同樣也會致癌的少數型別也會有交叉保護的作用，例如:第 31 和 45 型，故光嘉喜和保蓓這兩型疫苗就幾乎可以預防高達 80% 的子宮頸癌了[2]。這兩種疫苗都是用人類乳突病毒的外鞘蛋白 L1 所製成的類病毒粒子(VLPs)予

以高度純化後製備而成之非感染性基因重組疫苗，並搭配佐劑增強疫苗功能而製備成的。兩疫苗的整理表如附表一。

兩型疫苗一次療程皆需肌肉注射三劑，免疫時間的長短仍未知，其中嘉喜除了子宮頸癌的預防之外，還同時可以預防人類乳突病毒引起的相關生殖道疣高達 90%[5]。而兩型疫苗都有些副作用，如在注射部位可能會有疼痛腫脹的狀況，除此之外可能還伴隨有發燒等徵狀的產生。

### 1.3 治療性子宮頸癌疫苗發展

目前現行之預防型子宮頸癌疫苗在預防某幾種特定型別的人類乳突病毒上確實很有效果，然而這兩種疫苗在對於已感染人類乳突病毒的人就無法發揮作用，所以對於這些早已感染此病毒的女性，若在無症狀下去接受預防型疫苗，在未來仍有機會發展成子宮頸癌。且預防性疫苗主要也只有針對第十六型和第十八型，但還是有些病例佔較少數的高危險型人類乳突病毒型別，預防型疫苗在這些型別上並無保護作用，再加上預防型疫苗正式上市前本來有就已發展成子宮頸癌或是癌前病變的人。因此，發展治療型子宮頸癌疫苗，成爲一個很迫切的課題。

發展治療型疫苗，首先要面對的，就是要針對人類乳突病毒的哪部分作爲設計目標，在預防型的疫苗是利用 L1 這種晚期產生的外鞘



蛋白當作抗原去設計的，但是在子宮頸癌的細胞並不表現 L1 外鞘蛋白。治療型疫苗是針對在癌細胞會表現的蛋白，並以之為目標去作用，故舊有針對 L1 蛋白就不適用了。取而代之，人類乳突病毒的早期蛋白中的 E6 和 E7，是目前已知主要造成子宮頸癌發展的致病基因，這兩種蛋白並非特定時期才表現，而是普遍表現在子宮頸癌發展的各時期，再加上 E6 和 E7 對人體而言是外來蛋白，不同於其它癌症會因有自身抗原而導致免疫耐受性問題，因此這兩種蛋白成為最熱門研究的目標[1]。因為是治療癌症，故去設計會活化增強毒殺型 T 細胞成了治療型免疫療法的策略。目前針對治療子宮頸癌的疫苗仍都還在被研究中或是進入臨床階段，還未有上市商品化的，下表是幾種仍在發展的治療型疫苗。

藥廠	疫苗組成	臨床階段	抗原	HPV 基因型
Xenova/ Cantab	Recombinant Vaccinia virus(TA-HPV)	Phase I /II	E6andE7	HPV-16 HPV-18 [6]
NCI,Cytel Coporation, Dutch Cancer Society	Peptide& Montanide ISA 51 adjuvant	Phase I /II	E7 epitopes(aa11-22 和 aa 86-93) 和 PADRE	HPV-16 [7-8]
GlaxoSmithKline	Fusion protein (PD-E7)&AS02B adjuvant	Phase I /II	E7 linked to first 108aa of Haemophilus influenza protein	HPV-16 [9]

			D	
National Taiwan University Hospital	DC	Phase I	E7	HPV-16 [1]
Inovio Biomedical Corporation/ VGX Pharmaceuticals	DNA( VGX-3100)	Phase I	E6 and E7	HPV-16 HPV-18 [1]

#### 1.4 治療策略

本研究分別利用 HPV 的 E7 重組蛋白與來自 E7 的毒殺性 T 細胞表位以研究新型佐劑是否強化其抗癌能力。策略一是利用 H-2D<sup>b</sup> 小鼠的毒殺型 T 細胞表位 HPV16E7，胜肽抗原為人類乳突病毒第 16 型之 E7 之第 49-57 之胺基酸(RAHYNIIVTF)。由於這段胜肽序列清楚，可以做為未來以胜肽免疫治療子宮頸癌的動物模型。因胜肽在製備上很便利、成本又低，且不含致癌基因的片段，故對人體的安全性也較高。不過也因胜肽片段短、結構不夠複雜，故其免疫原性也較低，因此單用胜肽做治療仍有所不足的地方，體內的免疫細胞可能無法被完全的活化或無法引起足夠的 T 細胞去對抗外來物，再加上胜肽可能會在到達目標的抗原呈現細胞前就被分解掉了。故需要再添加一些佐劑來增強疫苗的作用，本論文選擇生物可吸收式高分子所製成之 P ELC 作為疫苗遞送系統，以及未甲基化 CpG 去氧寡核苷酸(CpG

Oligodeoxynucleotides)作為免疫刺激型的佐劑，後面將更進一步去介紹這兩種佐劑，疫苗的組成參考附表二。

策略二，重組蛋白 E7m(簡稱 rE7m)，為 HPV16E7 經過修飾後之蛋白，重組蛋白免疫療法和勝肽免疫療法一樣，在安全性上較高，但也是免疫原性不好，需要添加佐劑去增強作用，故本實驗中希望同樣的佐劑組合，除了在勝肽療法上也可在重組蛋白療法去評估其效果。

### **(A)PELC**

PELC是由生物可吸收式高分子PEG-b-PLACL、Span®85和角鯊烯(Squalene)這三種物質所組成的，由國家衛生研究院感染症與疫苗研究所研發出的佐劑，是一種水包油-油包水(W/O/W)的乳化型佐劑，其中Span®85和角鯊烯已被使用在一些人用疫苗當中，而PEG-b-PLACL的組成成分已被FDA認可使用在醫療、藥物之中，在生物體內將會被水解成乳酸、己醇酸，並經由柯氏循環(Cori cycle)轉化成為對人體無傷害性的二氧化碳和水，排除體外，故PELC在安全上是可以肯定的。在先前的文獻中可以知道PELC是種疫苗遞送系統[10]，疫苗遞送系統具有控制疫苗中之抗原在人體內的停留時間，也能保護抗原在到達目標細胞(如抗原呈現細胞)前就被代謝分解掉，並能幫助抗原緩慢釋放到生物體內，使免疫細胞更有時間去認識這抗原。

PELTC在H5N1的流感疫苗上有極好的效果，在注射疫苗後的小鼠體內，疫苗中有含PELTC的有無，對於產生抗體的效價有顯著的差異，疫苗中含PELTC的小鼠體內可測出較高的抗體效價[10]。由此就可得知PELTC對於體液性免疫反應確實有幫助。

### **(B)未甲基化 CpG 去氧寡核苷酸**

未甲基化 CpG 去氧寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide，簡寫為 CpG ODN，在後面一律以 CpG 稱之)是一段含 C-G 較高量的去氧寡核苷酸，原為細菌之未甲基化的 DNA，後來被研究出是種抗原相關的分子片段(PAMP，Pathogen-associated molecular patterns)，會被宿主體內免疫細胞上的類鐸受體 9(TLR 9，Toll like receptor 9)給辨識，進而促使抗原呈現細胞上的共激分子(Costimulatory molecule)如 CD80、CD86 和第二型主要組織相容性複合體(Major Histocompatibility Complex, MHC II)的表現以及一些前發炎因子的產生，更能有效去幫助活化 T 細胞[11]。因此 CpG 也被廣泛以人工合成去做研究，在現今有許多研究中已指出 CpG 若在疫苗中當佐劑使用，具有增強免疫反應的作用，可以增強對抗腫瘤的能力，因為具備這些效果，故 CpG 已被應用在某些癌症(如血癌、肺癌)治療中，有些治療已進入臨床研究中[12-13]。因此在本實驗選用 CpG 做為免疫刺激型佐劑去幫助活化抗原呈現細

胞，進而去促使 T 細胞第二訊號( signal 2)的產生，使 T 細胞能充分的活化，能夠更有效的去作用。

## 1.5 研究動機

從先前的文獻中可得知 PELC 和 CpG 的佐劑組合在 H5N1 流感的疫苗上能有效引起體液性反應[14]，產生中和性抗體中和病毒，但是這種組合是否能促進細胞性免疫，產生毒殺性 T 細胞以治療癌症是本論文的研究重點。而 CpG 就如許多文獻指出當佐劑時，會刺激 Th1 免疫反應，促進毒殺型 T 細胞具有抗腫瘤的效果[12-13]，這屬於細胞性免疫的作用，故若結合 PELC 和 CpG 這樣的組合是否也能更進一步強化細胞性免疫的作用呢?還是說只能單純引起體液性反應，因此我們利用子宮頸癌這個模型去做更進一步的探討。

## 第二章 材料與方法

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 動物

C57BL/6 小黑鼠購自於國家實驗動物中心，飼養於國家衛生研究院動物中心，所有老鼠均飼養在相同的環境、飼料下進行與控管。

#### 2.1.2 抗原

##### (A) 胜肽合成

胜肽抗原使用 RAHYNIVTF(後面簡稱 RAH)，這段胜肽是人類乳突病毒第 16 型之早期蛋白 E7 的第 49-57 胺基酸片段，由莊再成博士實驗室所合成，RAH 是段能被小鼠 H-2D<sup>b</sup> 專一性之毒殺型 T 細胞所辨識的序列。

RAH 這段胜肽的合成是用利用 Fmoc 固相胜肽合成法 (Fmoc-SPPS)，使用 HBTU 活化並將胺基酸順序接上，合成是在 PTI 公司的 Prelude 多胜肽合成儀中進行，胜肽的合成是從王氏樹脂(Wang Resin)上開始的。當合成完畢後加入 90% TFA、5% thioanisole、3% EDT 和 2% anisole 作用 2.5 小時，以切除胺基酸側鏈上所有保護基並從樹

脂上回收胜肽，製備好的成品用乙醚沉澱(ether precipitation)處理後獲得產物，再用 HPLC(高效液相層析儀)和 LC-MS(液相層析儀)去測定純度及分子量。待確定完純度將此胜肽冷凍乾燥成粉末狀，當要使用前再用 PBS 將 RAH 的濃度調成  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

## (B) 重組蛋白

在實驗中用到的重組蛋白為重組 E7m 蛋白(rE7m)，為人類乳突病毒第 16 型之 E7 早期蛋白經修飾後製備而成，此重組蛋白由冷治湘博士實驗室所純化。rE7m 選用大腸桿菌株 BL21Star(DE3) (Invitrogen) 做表現宿主，當質體轉入後就用 LB 培養液在  $37^{\circ}\text{C}$  下培養。在吸光值達到 0.4 時，即加入 IPTG(Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) 誘導 4 小時(菌液中濃度為 1 mM)。誘導完再離心( $5000\times\text{g}$ , 20 分鐘)去除菌液，離心完的菌塊以 bug master mix buffer (Novagen)去裂解(與菌塊比例為 1ml: 160ml 菌液離心完所得之菌塊)，裂解完後再用超高速離心( $80000\times\text{g}$ , 40 分鐘)去除上清液，接著加入 40ml E7m 結合溶液(binding buffer)回溶，並輔以組織研磨器幫助溶解均勻，再以超高速離心( $80000\times\text{g}$ , 40 分鐘)收集上清液，將最後收集到的樣品進一步進行純化。

純化凝膠使用的為管柱體積(Column Volume)5 ml 的 Chelating Sepharose(GE Healthcare)，凝膠先用溶液( $0.2\text{ M CuSO}_4$ )去潤濕，使其吸附銅離子，再用去離子水清洗管柱，使用 E7m 結合溶液( $2\text{ M Urea}$  /

50 mM Tris , pH 8.0)平衡管柱，之後取出凝膠與樣品混合後，在 4°C 用震盪器低速震盪，將其反應一晚，隔天再將凝膠注入回管柱中，再用 E7m 結合溶液(2 M Urea / 50 mM Tris , pH 8.0)沖洗 20 個管柱體積，之後再用含有 100mM 之 E7m 結合溶液(100 mM imidazole / 2 M Urea / 50 mM Tris , pH 8.0)沖洗 10 個管柱體積以便沖洗出目標蛋白。收集含目標蛋白的沖洗液，使用濃縮離心管再次純化，先將樣品加到膜孔徑較大的濃縮管( Amicon Ultra-30 Centrifugal Filter Unit)收集 30KD 以下的蛋白，再用膜孔徑較小的濃縮管( Amicon Ultra-10 Centrifugal Filter Unit)去濃縮 E7m 蛋白(分子量約為 11 KD)，再用透析膜(cut off 3.5 KD , Cellu Sep)透析兩次(sample 與 PBS 體積比例為 = 1 : 200)。接著使用去內毒素凝膠 (detoxi-gel , PIERCE)去除掉細菌內毒素(Endotoxin)。去內毒素凝膠使用前先以含有清潔劑溶液( 1% deoxycholic acid sodium salt)清洗 3 個管柱體積(5ml 共 3 次)，再以去離子水清洗 3 個管柱體積，再用 1X 之 PBS 平衡 3 個管柱體積，最後將先前已純化好的蛋白質樣品 1 ml 加到管柱中，直接收集通過管柱的液體，最後樣品用 BCA protein assay reagent (PIERCE) 來測定蛋白濃度，以 gel-clot Limulus Amebocyte Lysate ( Pyrotell , Cape Cod)來測定內毒素殘留量，其濃度與內毒素殘留量測定法是參考該種試劑套組所附的說明書。



### 2.1.3 佐劑 CpG 去氧寡核苷酸

用到之小鼠未甲基化 CpG 去氧寡核苷酸( CpG oligodeoxynucleotides , CpG ODN , 後面簡稱 CpG)序列為 TCCATGACGTTCTGACGTT , 為 typeB 類 CpG , 由 Gene DireX 公司所合成的 , CpG 去氧寡核苷酸是類鐸受體 9 的配體。

### 2.1.4 PEG-b-PLACL 之合成

PEG-b-PLACL 為複合相乳狀液 PELC 之基材 , 而 PEG-b-PLACL 由黃明熙博士實驗室提供。PEG-b-PLACL 的合成首先秤取等莫耳比例的乳酸單體(lactide,  $M_n=144\text{g/mol}$ )與己內酯單體( $\epsilon$ -caprolactone,  $M_n=114\text{ g/mol}$ ) , 加入其兩倍重量之聚乙二醇甲基醚(polyethylene glycol monomethyl ether, mPEG,  $M_n=5000\text{g/mol}$ )共約 20 克 , 置入乾燥的 50ml 圓底反應瓶內 , 加入 20 $\mu$  l 辛酸亞錫( stannous octoate,  $\text{SnOct}_2$ )當作催化劑。整體反應裝置於充分去除空氣與水氣之後熔封燒結 , 聚合反應溫度控制在 140 $^{\circ}\text{C}$  反應一天 , 得到透明產物。使用丙酮與乙醇再沉澱洗去未反應物 , 待共聚物析出後過濾 , 再置入真空乾燥箱內乾燥至恆重 , 即可得到三成分兩團聯的生物可吸收式高分子 PEG-b-PLACL。高分子之分析方面 , 使用質子核磁共振光譜( $^1\text{H-NMR}$ )

分析聚合物之化學結構，並計算共聚物中各成份之比例。根據各成份之重量比例，可再計算此高分子產物的親水-親油比值 ( hydrophilic-lipophilic balance value, HLB)。此外，亦使用凝膠滲透層析儀( gel permeation chromatography, GPC)測量高分子產物的相對分子量及分子量之分散性( polydispersity)。

### 2.1.5 細胞株與細胞培養

TC-1 癌細胞，來自於 T-C-Wu 實驗室(John Hopkins Hospital)，其細胞源自於 C57BL/6 老鼠之肺表皮細胞，經由轉殖致癌基因 K-Ras、HPV16E6E7 而成為癌細胞株，做為研究子宮頸癌的動物模型，將之培養於 TC-1 培養液，並在 37°C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱下做培養。

### 2.1.6 培養液與培養基

#### (A) LCM-1000ml

RPMI1640(Thermo)	866ml
10%Fetal Bovine Serum 胎牛血清(Thermo)	100ml
HEPES Buffer(Biological industries)	25ml
PEN-STREP Solution 青鏈黴素溶液(Biological industries)	10ml
0.05M 2-mercaptoethanol(2-ME)	1ml

### **(B) TC-1 培養液 500ml**

RPMI1640(Thermo)	430ml
10%Fetal Bovine Serum 胎牛血清(Hyclone)	50ml
25mM Hepes Buffer(Biological industries)	10ml
100nM Sodium Pyruvate(Biological industries)	5ml
PEN-STREP Solution 青鏈黴素溶液(Biological industries)	5ml
0.5M 2-mercaptoethanol (2-ME)	50 $\mu$ l

### **(C)TC-1 細胞培養基**

Nunclon™Surface(NUNC)

### **(D) Staining Buffer(Flow 清洗液)**

2%FBS 0.05% Sodi-Azide 在 1000ml PBS

### **(E) LB 培養液**

25 克 Novagen®之 LB Broth,Miller 溶在 1000ml 一次水

## **2.1.7 PE RAH tetramer(四架體)的製備**

將老鼠白血球抗原的 H-2D<sup>b</sup> 的 DNA 序列在 3'端加入生物素接合酶(Biotin ligase)可辨認的序列(LHHILDAQKMVWNHR)，與  $\beta$ 2-球蛋白的 DNA 序列放入可在細菌中表現蛋白質的載體(pET15 and

pET 28 vector)中，由選殖入的大腸桿菌進行蛋白質的大量表現，此兩種重組蛋白分別為主要組織相容複合物(MHC complex)中的重鏈、輕鏈 (Heavy and light chain)。這兩種蛋白於大腸桿菌大量表現後，經由菌體打破，再以不同濃度尿素進行沖提，最後得到純度大於 90%的輕鏈與重鏈重組蛋白。

主要組織相容複合物單體(monomer)包含輕鏈、重鏈與胜肽。將純化後輕鏈、重鏈重組蛋白與胜肽(RAHYNIIVTF)放入緩衝液中，在 4°C 反應 48 小時以上，進行重新摺疊反應(Refolding reaction)形成主要組織相容複合物單體(monomer)後，經由濃縮步驟使體積降為 1/20，再以生物素接合酶進行生物素與主要組織相容複合物單體的接合反應 (Biotinylation reaction)。將進行過生物素接合反應的溶液再次濃縮為更小的體積，以管柱層析法(Superdex G-75)依照分子大小(size exclusion)分離出結合反應後的主要組織相容複合物單體(monomer)，此組合為辨識專一性 T 細胞的基本單元。接著將這些結合反應後的主要組織相容複合物單體，4：1 的比例加入螢光染劑 PE-Streptavidin 形成四價體即形成 PE RAH tetramer。

## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 PELC 製備

材料: PEG-b-PLACL、玻璃瓶、PBS、Span®85、角鯊烯

步驟: PELC 的製備首先先秤 120mg 的 PEG-b-PLACL 加到玻璃瓶中，之後再加入 800 $\mu$ l 無菌的 PBS，放到 4°C 冰箱中過夜，隔天再取出裝有 PEG-b-PLACL 之罐子，之後直接加入 1100 $\mu$ l 的 Span®85/角鯊烯(比例為 v/v 15/85)，加好後直接拿去均質機(Polytron PT3100 homogenizer, Kinematica AG, Swiss)混合(6000rpm, 5min)。均質混合完即可得到乳液狀之 PELC，等要免疫小鼠前才混和抗原和 PELC 使用。製備流程簡圖參考附表三。

### 2.2.2 小鼠免疫試驗

材料: 剪刀(做記號剪小鼠的腳趾頭)、鑷子、1ml 胰島素注射針筒(29G, Terumo)

步驟: 以 RAH 為抗原，每次每組 C57BL/6 老鼠兩隻，重複做 2-3 次，在第 0 天注射各組疫苗(背部皮下注射，除了在 RAH 劑量測試的實驗，其他 RAH 相關實驗一律用 10 $\mu$ g/dose，到第 7 天再將老鼠斷頸犧牲，

而若是用 rE7m 為抗原，一樣也是背部皮下注射，但是是在注射疫苗(背部皮下注射 30ug/dose)後的第 14 天才斷頸犧牲老鼠。

### 2.2.3 脾臟細胞的製備

材料:剪刀、鑷子、LCM、ACK buffer(RBC Lysis Buffer10X，Biolegend)、70 $\mu$  m 無菌濾網、3ml 不含針頭的針筒(取針筒去磨脾臟)

步驟:犧牲老鼠之後就立刻取出其脾臟泡在 LCM 中。接著將 70 $\mu$  m 無菌濾網放到 50ml 離心管上，隨後立即將之放在無菌濾網上研磨，加入 RPMI1640 去沖洗細胞，使被磨好的細胞流到 50ml 離心管中，再離心 5 分鐘 1200rpm。去除掉上清液後，將留在管內的細胞拍散，接著每管細胞再加入 1ml 之 ACK buffer 搖一下即靜置 1 分鐘，使紅血球被溶解掉，1 分鐘後直接加入 10ml 之 RPMI1640 去中和 ACK 的反應，再一次離心 5 分鐘 1200rpm，之後再加 10ml 之 RPMI1640 清洗兩次，第二次清洗離心前先取 10 $\mu$  l 混合均勻的細胞拿到細胞計數器去計算，最後將每一管之細胞用 LCM 將之調整為 5x10<sup>6</sup> 細胞/ml(若有做 CD107a 試驗則調整為 2 x10<sup>6</sup> 細胞/ml)，之後就用這些細胞做小鼠免疫反應。若是做酵素免疫分析法，則脾臟細胞(5x10<sup>6</sup> 細胞/ml)取 1ml 加到 24 孔培養盤，之後再加 1ml 的刺激物(rE7m 10 $\mu$  g/ml)，再因需求

決定收抗原刺激幾天後之上清液，之後將收好之上清液凍在-20°C的冰箱，需要測試前在解凍稀釋。

其中有使用到的小鼠免疫反應測試有酵素結合免疫斑點分析法(ELISPOT)、酵素免疫分析法(ELISA)、CD107a 染色、RAH 四架體(RAH tetramer)染色等測試。

### (A) 酵素結合免疫斑點分析法 ELISPOT

材料: Mouse IFN gamma ELISPOT Ready-SET-Go!<sup>®</sup>

Filter Plate( Multi Screen)

anti-mouse IFN- $\gamma$ Capture Antibody

anti-mouse IFN- $\gamma$ Detection Antibody

Avidin-HRP

ELISA/ELISPOT Coating Buffer Powder

Assay Diluent

AEC Staining kit(Sigma)

目的原理:

測量細胞受抗原刺激後，能產生 IFN- $\gamma$  的細胞數量

步驟:

先將 ELISPOT 的 96 孔盤(Filter Plate, Multi Screen)，用 20 $\mu$  l 的 35% 酒精浸潤每一孔，之後甩掉酒精，加入 200 $\mu$  l /well 無菌的 PBS 清洗

兩次，用乾盤子後就加入 100 $\mu$  l/well 含誘捕抗體(capture antibody)之液體，使用保鮮膜包好，置於 4 $^{\circ}$ C 的冰箱放至隔天。第二天將盤子取出，甩掉誘捕抗體的液體後，使用無菌的 PBS 清洗兩次，之後加入 200 $\mu$  l/well 的 LCM 後靜置於室溫一小時，一小時後將 LCM 甩掉，使用無菌 PBS 清洗兩次，之後就依實驗需求個別加入不同的胜肽或蛋白刺激物(RAH1 $\mu$  g/ml 或 rE7m10 $\mu$  g/ml)100 $\mu$  l/well，最後將前面計算好的小鼠脾臟細胞混合均勻後取 100 $\mu$  l 加到已有加有 100 $\mu$  l 刺激物的 96 孔盤中，靜置在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 之培養箱培養 2 天(此段時間嚴禁移動到盤子)。兩天後將盤子取出，先用 PBST 清洗三次，之後加入 100 $\mu$  l/well 含偵測抗體(detection antibody)的液體，在室溫下放置兩小時後，用 PBST 清洗四次，加入 100 $\mu$  l/well 的 AvHRP，在室溫下靜置 45 分鐘後，用 200 $\mu$  l/well PBST 清洗 3 次後再用 200 $\mu$  l/well 的 PBS 清洗兩次後，甩乾加入 100 $\mu$  l/well AEC 呈色劑呈色一小時，之後直接拆掉 ELISPOT96 孔盤的塑膠底部，用自來水直接沖洗 96 孔盤上面和下面來回至少 5-7 次後，即將 96 孔盤避光並讓盤子自然風乾後再拿去 ELISPOT 讀值機判讀。

## **(B) 酵素免疫分析法 ELISA**

材料:

(a)R&D(INF- $\gamma$ )



Anti-mouse INF- $\gamma$  Capture Antibody

Anti-mouse INF- $\gamma$  Detection Antibody

mouse I NF- $\gamma$  Standard

BD : Streptavidin-HRP

(b)Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup> ( eBioscience)

Anti-mouse IL-10 Capture Antibody

Anti-mouse IL-10 Detection Antibody

mouse IL-10 Standard

ELISA/ELISPOT Coating Buffer Powder

Assay Diluent

Detection enzyme

Substrate Solution(TMB, eBioscience)

2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

EIA/RIA Plate 96 well(COSTAR)

目的原理: 利用抗体的專一性去偵測細胞激素的多寡，並以酵素為放大信息的標示

步驟:

測試前一天，在 ELISA96 孔盤(COSTAR)先加入 100 $\mu$  l/well 已稀釋好的誘捕抗體(capture antibody)，用保鮮膜包好放在 4 $^{\circ}$ C 放隔夜，隔天先用 200 $\mu$  l/well PBST 清洗盤子一次後，再加入 200 $\mu$  l/well 試驗稀釋液(Assay Diluent)後靜置室溫下兩小時，兩小時候用 PBST 清洗盤子兩次，接著加入 100 $\mu$  l/well 2X 序列稀釋液或已稀釋過的測試上清液，

加好靜置室溫下兩小時，之後用 PBST 清洗盤子四次，清洗完加入 100  $\mu$  l/well 稀釋好的偵測抗體(detection antibody)，加完在靜置室溫下兩小時，兩小時後用 PBST 清洗盤子六次，接著加入 100  $\mu$  l/well 已稀釋好的生物活性酶(Streptavidin)避光靜置室溫下 20 分鐘，接著用 PBST 清洗盤子八次，加完即加入 100  $\mu$  l/well 的 TMB 顯色液 (Tetramethylbenzidine substrate solution)避光，接著看反應的顏色，若反應足夠了就加 100  $\mu$  l/well 2N 的硫酸去終止反應，接著立即將 96 孔盤拿去測 OD 值。

### (C)CD107a 染色

材料:

BD Golgi Stop<sup>TM</sup> Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin)(BD):  
1mg/ml

1000X Brefeldin A(eBioscience)

Anti-mouse CD16/CD32(Fc Block)(BD)

PE anti-mouse CD107a(eBioscience): 0.2mg/ml

FITC anti-mouse CD8(Biolegend):0.5mg/ml

LCM

Staining Buffer

目的原理:

因 CD8T 細胞受到活化成爲毒殺型 T 細胞會在其細胞表面表現 CD107a 這個蛋白，故藉由染 CD107a 的量來偵測毒殺型 T 細胞的量。

步驟:

取  $2 \times 10^6$  細胞/ $100 \mu\text{l}$  之胰臟細胞依組別加到 96 孔 U 型盤，之後每格加入  $1 \mu\text{l}$  之 CD107a 的抗體(此步驟後都要將此盤盡量避光)，再加入  $100 \mu\text{l}$  抗原(RAH  $10 \mu\text{g/ml}$  刺激後即在  $37^\circ\text{C}$  含  $5\% \text{CO}_2$  的培養箱避光放置 2hr，2hr 後將每格加入  $1.33 \mu\text{l}$  Monensin 以及  $2 \mu\text{l}$  的 Brefeldin A 抑制蛋白的分泌，加好重新將盤子放回培養箱，靜置 6hr 後即可將之從培養箱移出，避光保存在  $4^\circ\text{C}$  的冰箱，並在 18hr 內重新將每格的細胞移到流式細胞儀專用的管中，吸出後離心 1200rpm 共 5 分鐘，接著再用流式細胞儀專用溶液(Staining Buffer)1ml 去洗細胞，接著加入終止溶液(Fc Block) $2 \mu\text{l}$  共 5 分鐘，之後再染 CD8 的抗體避光 30 分鐘，染完後再加入流式細胞儀專用溶液 1ml 清洗一次，離心 1200rpm 共 5 分鐘，離好後加入  $100 \mu\text{l}$  流式細胞儀專用溶液後，即可用流氏細胞儀做判讀。

#### **(D)RAH Tetramer 四價體染色**

材料:

Anti-mouse CD16/CD32(Fc Block)(BD)

FITC anti-mouse CD4(BD):0.5mg/ml

PerCP anti-mouse CD8(Biolegend):0.2mg/ml

APC anti-mouse CD19(BD):0.2mg/ml

PE RAH-tetramer

Staining Buffer

目的原理:

染受過 RAH 刺激過的細胞內有多少 T 細胞上有 RAH 抗原專一的 T 細胞接受器，藉以去計算出有多少 CD8T 細胞會認識抗原。

步驟:

首先取  $1 \times 10^7$  細胞放到流式細胞儀專用管子中，離心 1200rpm 共 5 分鐘，接著在室溫下加入終止溶液(Fc block)2 $\mu$ l 共 5 分鐘，接著直接染 2 $\mu$ l RAH tetramer 並搭配 CD8、CD19 和 CD4 的抗體去染，接著避光在室溫下放置 30 分鐘，CD19 和 CD4 用於排除非所要之細胞，之後將細胞加入 1ml 的流式細胞儀專用溶液清洗一次，洗完後再加入 100 $\mu$ l 的流式細胞儀專用溶液，就可以用流式細胞儀做判讀。

#### 2.2.4 TC-1 腫瘤治療疫苗模型

解凍的 TC-1 細胞，培養細胞到第三代或第四代(約培養一個星期左右)使 TC-1 細胞適應環境後才對小鼠施打，每隻小鼠皆注射  $2 \times 10^5$

TC-1 細胞/100 $\mu$  l 於腹部皮下。7 天後再背部皮下注射一劑疫苗(抗原量: RAH10 $\mu$  g/ml 而 rE7m1 $\mu$  g/ml), 注射完後再約 7 天開始測量腫瘤大小( $\text{mm}^3$ ), 每隔 2-3 天就量一次, 腫瘤大小計算公式為[長(mm)x 寬(mm)x 寬(mm)]/2, 當老鼠測量到腫瘤大小 $>2500\text{mm}^3$  即進行犧牲。



## 第三章 實驗結果

### 3.1 胜肽抗原(RAH)最佳化

實驗的開始，首先要確定最佳化胜肽抗原 RAH 的劑量，使用的量不可太少否則會致使疫苗沒效果，但若使用過多，不僅浪費也有可能造成免疫耐受性致使反效果。所以開始首要目標是先定出一個最佳化的 RAH 用量以便在後續的實驗統一使用。首先選定 1 $\mu$ g、10 $\mu$ g 和 30 $\mu$ g 的這三種 RAH 劑量來做測試，因未來將使用 RAH 搭配 PELC 當佐劑做治療，故就先以這三種 RAH 量分別和 PELC 混合去做小鼠免疫測試，免疫七天後，犧牲取出小鼠脾臟以 RAH(1 $\mu$ g)去刺激 24-48 小時，之後再分析有多少 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$ ，結果如圖一所示，發現以 10 $\mu$ g 之 RAH 搭配 PELC 去免疫小鼠，其脾臟細胞中有最多 T 細胞會因辨識出抗原(RAH)而受刺激產生 IFN- $\gamma$ ，然而以 30 $\mu$ g 的 RAH 免疫的小鼠，其脾臟細胞被 RAH 刺激後，並未產生比 10 $\mu$ g/ PELC 那組較高的 IFN- $\gamma$  分泌 T 細胞，因此在未來都使用 RAH 10 $\mu$ g 的劑量與 PELC 去做後續的實驗。

### 3.2 顯微鏡下觀察 PELC

在最佳化 RAH 用量後，接著就是要將 RAH 混合 PELC 做各項測試，首先將混合好之 RAH 與 PELC 取 10 $\mu$ l 放在載玻片上，蓋上蓋玻片即拿到顯微鏡下觀察，直接觀察 PELC 顆粒大小結果如圖二，看起來是內部大小顆粒皆具有之混合物，其大小分佈在 1-10nm。

### 3.3 以專一性 RAH 四價體測定 RAH/PELC 誘發專一性 CD8<sup>+</sup>細胞的能力

雖然，上述的實驗已經確定 PELC 能增加 IFN- $\gamma$  的 T 細胞反應，爲了更進一步分析其產生的 T 細胞爲 RAH 專一性的 CD8T 細胞，因此，我們利用 RAH 螢光四價體與 CD8 抗體分析專一性的 RAH CD8<sup>+</sup>T 細胞。以 RAH 混合 PELC 注射老鼠，七天後犧牲小鼠取脾臟細胞做 RAH 四價體的染色，結果如圖三(A)，RAH/PELC 免疫小鼠後，能產生比控制組較多的 RAH 四價體<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的 T 細胞(0.09%v.s.0.05%)，而 RAH 在沒有 PELC 存在下免疫小鼠，其 RAH 四價體<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的 T 細胞則無明顯變化(0.07%v.s.0.05%)，經由個別小鼠的結果，利用統計方法分析如圖三(B)，即顯示 RAH/PELC 免疫小鼠能產生較多的 RAH 專一性 CD8<sup>+</sup>T 細胞。

### 3.4 以 TC-1 腫瘤治療模型觀察 PELC 治療能力

爲了評估 RAH/PELC 在腫瘤治療上之效果，故使用 TC-1 癌細胞的模型做測試，每組小鼠有六隻，每隻注射  $2 \times 10^5$  TC-1 細胞/ $100 \mu l$ ，七天後再注射疫苗做治療，再七天左右後開始測量腫瘤大小，結果如圖四，跟 PBS 組和單加 RAH 組的相比，RAH 若有添加 PELC 在腫瘤治療上有效果。在第 38 天時，RAH/PELC 的腫瘤大小  $455.5094 \text{mm}^3$  明顯小於控制組  $1113.526 \text{mm}^3$  或單用 RAH 免疫  $1214.55 \text{mm}^3$ 。

利用 RAH/PELC 治療腫瘤確實有其效果，但腫瘤還是沒有被完全抑制，因此考慮再加入另一種免疫刺激型的佐劑 CpG 來看似否能讓治療效果更好。

### 3.5 以 RAH 與 CpG、PELC 爲佐劑組合免疫並觀察抗原引發脾臟 T

#### 細胞分泌 IFN- $\gamma$

從前面的實驗結果可以看出 RAH 搭配 PELC 去治療腫瘤確實有效果，但有可能因 PELC 屬於一種疫苗遞送系統，只能調節抗原在體內釋放之速率，增長抗原被體內免疫細胞認識的時間，僅能讓抗原呈現細胞有效引起 T 細胞的第一訊號(Signal 1)。但由圖四的結果可知光只產生第一訊號是不足的，需再搭配能刺激另一種訊號的佐劑來幫助



活化 T 細胞，因此就選用 CpG，因從相關文獻知道 CpG 能促使抗原呈現細胞上的共激分子活化進而幫助 T 細胞第二訊號的產生。

故用 RAH 配合 PELC 和 CpG 作組合加上 PBS 組設計出五組的疫苗，就用這五種組合去免疫小鼠，七天後犧牲小鼠，收好細胞做酵素結合免疫斑點分析法試驗，再用 RAH(1 $\mu$ g/ml)刺激細胞 24-48 小時，結果如圖五，從結果來看可知脾臟細胞來自於 RAH/PELC/CpG 的組別再次遇到抗原刺激後能有最多的 T 細胞產生 IFN- $\gamma$  (346 顆細胞)。而只用 RAH/PELC 免疫的組別，其產生的 IFN- $\gamma$  T 細胞只有 103 顆，且 RAH/CpG 免疫的組別也只有 92 個。

### 3.6 以 RAH 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並測定 RAH 專一性 T 細胞量

爲了測定 RAH 配合 PELC 和 CpG 作佐劑的效果，並更進一步分析其產生的 T 細胞爲 RAH 專一性的 CD8T 細胞，因此，我們利用 RAH 螢光四價體與 CD8 抗體分析專一性的 RAH CD8<sup>+</sup>T 細胞。以 RAH 混合 PELC/CpG 加上 PBS 組共五組注射老鼠，七天後犧牲小鼠取脾臟細胞做 RAH 四價體的染色，結果如圖六(A)，RAH/PELC/CpG 這組合免疫小鼠後，能產生比控制組較多的 RAH 四價體<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的 T 細胞 (0.32%v.s.0.03%)，而若 RAH 單加 PELC 下免疫小鼠或單加 CpG，其

RAH 四價體<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的 T 細胞則比控制組稍高(0.09%v.s.0.03%以及 0.10%v.s.0.03%)，單加 RAH 則無差別。由個別小鼠的結果，利用統計方法分析如圖六(B)，即顯示 RAH/PELC/CpG 免疫小鼠能產生較多的 RAH 專一性 CD8<sup>+</sup>T 細胞。

### 3.7 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定毒殺型 T 細胞

爲了進一步評估 RAH 與 PELC/CpG 作佐劑的效果，是否有助於產生具有抗癌能力的毒殺型 T 細胞，故藉由染 CD107a 來判定，因當 CD8T 細胞遇抗原活化成毒殺 T 細胞時，其細胞膜會有 CD107a 的表現，故 CD107a 可當作 CD8T 細胞活化成毒殺型 T 細胞的指標。因此以 RAH 搭配 PELC 和 CpG 再加上 PBS 組的五組的疫苗，使用這些組合疫苗免疫小鼠，七天後犧牲小鼠，取出脾臟細胞用 RAH(1μ g)刺激後，再做 CD107a 的染色，結果如圖七，從 CD107a 的染色也可看出以 RAH/PELC/CpG 去免疫的小鼠脾臟細胞會有最多的 CD8 T 細胞 (0.07%)會因再次受到抗原刺激，而活化成爲毒殺型 T 細胞，故其細胞表面會染到 CD107a 這個蛋白，而 RAH/PELC 或 RAH/CpG 的組別其 CD107a<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的只有 0%和 0.003%。

### 3.8 以 TC-1 腫瘤治療模型比較 RAH 與 CpG、PELC 佐劑組合的抗癌

#### 能力

從前面的結果中可得知，不管在 RAH 專一性四價體的染色或是毒殺型 T 細胞測定或是酵素結合免疫斑點分析法試驗中，都可得到以 RAH/PELC/CpG 免疫之小鼠能有最顯著的結果。接著就想知道這種顯著的結果是否也能一致表現在腫瘤治療上。因此先將老鼠腹部皮下種  $2 \times 10^5$  TC-1 細胞/ $100 \mu l$ ，七天後再用這幾組疫苗注射在這些老鼠背部皮下上，結果如圖八，在第 42 天時，RAH/PELC/CpG 的腫瘤都被抑制了( $0 \text{ mm}^3$ )，而 RAH 只加 PELC( $522.8205 \text{ mm}^3$ )或 CpG ( $339.8597 \text{ mm}^3$ )的組別腫瘤比起控制組( $1656.578 \text{ mm}^3$ )或是單加 RAH 組( $1900.539 \text{ mm}^3$ )仍是有抑制。由此結果可發現在腫瘤治療與前面結果是一致的，皆是 RAH/PELC/CpG 這組效果最為顯著，最能有效去活化 T 細胞，進而去幫助抑制腫瘤生長。

### 3.9 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並觀察抗原引發

#### 脾臟 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$

由前面結果可知若以 RAH 為抗原合併 PELC 和 CpG 為佐劑組合之疫苗最能有效活化 T 細胞，不管是在小鼠免疫測試還是在腫瘤治療

上皆是如此。但既然知道 PELC 和 CpG 這樣組合的佐劑有它的作用，若應用在重組蛋白疫苗上，是否也有相同的效果呢？因此把抗原由胜肽 (RAH) 改為重組蛋白 E7m(rE7m)，組別和 RAH 的小鼠免疫測試一樣，除了把抗原量由 10 $\mu$  g 的 RAH 改為 30 $\mu$  g 的 rE7m，將疫苗免疫小鼠十四天後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g/ml 的 rE7m 刺激 24-48 小時，再測酵素結合免疫斑點分析，結果如圖九。由圖中可發現若再次用 rE7m 刺激，rE7m/PELC/CpG 的組別皆有較多的脾臟細胞會因受刺激而產生 IFN- $\gamma$  (246 顆 T 細胞)，而 rE7m 分別在 PELC 或是 CpG 的存在下，也能促進 IFN- $\gamma$  -T 細胞的產生，其數目分別是 164 顆(rE7m/PELC)和 189 顆(rE7m/CpG)。

### 3.10 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IFN- $\gamma$ 酵素免疫分析法測定

爲了評估 rE7m 與 CpG、PELC 這種佐劑組合是否產生 rE7m 專一性的細胞激素分泌，分別以 30 $\mu$  g 的 rE7m 搭配 PELC 或 CpG，以 PBS 做對照組共有五種組合去免疫小鼠，十四天後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g/ml 的 rE7m 刺激並在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養，等五天後離心收上清液，收好的上清液凍在 -20 $^{\circ}$ C，之後將上清液拿去測 IFN- $\gamma$  酵素免疫分析法實驗，結果如圖十，從結果可以看出免疫 rE7m

/PELC/CpG 和 rE7m /CpG 這兩組小鼠上清液中皆可測出 IFN- $\gamma$ ，其值分別是 2280.662pg/ml 和 1399.816pg/ml。

### 3.11 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IL-10 酵素免疫分析法測定

爲了評估 rE7m 與 CpG、PELC 這種佐劑組合是否產生 rE7m 專一性的細胞激素分泌，分別以 30 $\mu$  g 的 rE7m 搭配 PELC 或 CpG，以 PBS 做對照組共有五種組合去免疫小鼠，十四天後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g/ml 的 rE7m 刺激並在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養，等五天後離心收上清液，收好的上清液凍在 -20 $^{\circ}$ C，之後將上清液拿去測 IL-10 酵素免疫分析法實驗，結果如圖十一，從結果可看到只有 rE7m/PELC 那組的上清液有顯著的產生 IL-10，其值爲 3391.813 pg/ml，IL-10 是促使 T 細胞走向體液性免疫重要的細胞激素。

### 3.12 以 TC-1 腫瘤治療模型測定 30 $\mu$ 的重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合效果

由前面可知 rE7m 和 PELC 或 CpG 或兩者皆加之組別在酵素結合免疫斑點法中，可以看出當小鼠免疫細胞再次受抗原(10 $\mu$  g/ml 的

rE7m)刺激會有較多的細胞產生 IFN- $\gamma$ ，但因目標是用在癌症治療上，故利用 TC-1 腫瘤模型做測試，因此先將老鼠腹部皮下種  $2 \times 10^5$  TC-1 細胞/ $100 \mu\text{l}$ ，七天後再以  $30 \mu\text{g}$  的 rE7m 搭配兩種佐劑做出五種組合個別去注射在小鼠背部皮下，約七天後開始測量腫瘤大小，結果如圖十二。可以看到 rE7m 只要有加 CpG 之組合對腫瘤皆可完全抑制，顯示 CpG 確實有加強 rE7m 的抗癌能力。

### 3.13 以 TC-1 腫瘤治療模型測定 $1 \mu\text{g}$ 的重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC

#### 佐劑組合效果

由上述實驗得知 rE7m( $30 \mu\text{g}$  在 CpG 存在下皆能抑制 TC-1 腫瘤的生長，因此進一步探討 PELC 與 CpG 是否有加成的作用，所以降低抗原量為  $1 \mu\text{g}$ ，重複上述實驗。先將老鼠腹部皮下種  $2 \times 10^5$  TC-1 細胞/ $100 \mu\text{l}$ ，七天後再以  $1 \mu\text{g}$  的 rE7m 分別與 PELC 或 CpG 或兩者混合去注射在小鼠背部皮下，約七天後開始測量腫瘤大小，結果如圖十三，可以看到 rE7m/PELC/CpG 那組可以完全抑制腫瘤的生長，而只在 PELC 或 CpG 存在下，其抑制腫瘤的能力皆明顯低於同時合併 PELC 與 CpG。

## 第四章 討論

從一開始最佳化抗原為 RAH10 $\mu$  g(圖一),接著做 PELC 混合 RAH 之相關免疫測試(圖二-四),同時在圖四中可以知道 RAH 單只使用 PELC 並不能完全抑制腫瘤生長,雖然有 PELC 幫忙 T 細胞第一訊號的產生,但是還要第二訊號幫忙,因此就選擇 CpG 當作免疫刺激型佐劑,兩者合併使用使的 RAH 這段 HPV16 E7 上的抗原決定位被 T 細胞充分的認識,因此不管在小鼠免疫試驗(圖五-七)或是腫瘤抑制(圖八)上都能有很顯著的效果,這些測試的結果,皆說明 PELC 與 CpG 的組合對於細胞性免疫的效果,也回答一開始對於這組合除了體液性免疫上功用是否也能在細胞性免疫上反應?結果是肯定的!

同樣的配方運用在 rE7m 重組蛋白也得到類似的結果,在腫瘤治療上以 1 $\mu$  g 的 rE7m 和 CpG 合併 PELC 那組的腫瘤還是受到明顯的抑制(圖十三),不過 rE7m 和 CpG 那組腫瘤也有受抑制,兩組的差距不似 RAH 模型(圖八)顯著。但從結果中可以知道以 CpG 為免疫刺激型佐劑搭配疫苗遞送系統的複合相乳狀液 PELC 合併使用在胜肽疫苗或是重組蛋白疫苗上皆能有作用,不管是腫瘤的抑制還是活化毒殺型 T 細胞上皆有效果。

正如緒論中提到，目前針對治療子宮頸癌的疫苗已有多種進入臨床試驗，包括有活載體疫苗(包括病毒性和細菌性)、胜肽疫苗、蛋白質疫苗、DNA 疫苗、樹突細胞疫苗(DC-based)...等多種[1]，可是活載體疫苗雖免疫原性好可是有安全上的顧慮，DNA 疫苗雖穩定也容易製造但也是有安全上的疑慮，樹突細胞疫苗雖有高免疫原性可是價格不菲，要如何同時兼顧安全、治療效果、價格就成了重要的課題。雖然胜肽疫苗和蛋白質疫苗在使用上較安全、穩定，因其使用之抗原屬於對人體較不會傷害或感染物質，但也因為如此，這些抗原的免疫原性也就較低，可是這問題可以藉由佐劑去克服，此外胜肽疫苗和蛋白疫苗在製備上較容易，較能大量生產，而本實驗即是提出一種有效的佐劑組合能去針對加強這兩種免疫療法去對抗腫瘤。

在 Daftarian et al.的文獻中與本實驗一樣使用抗原搭配 CpG 以及另一種運輸型佐劑 VacciMax<sup>®</sup>來設計治療型子宮頸癌疫苗，裡面使用之抗原是 RAH 融合幫助型 T 細胞(helper T cell)的抗原決定位—PADRE (簡稱 FP)。<sup>[15]</sup>在此疫苗的策略是胜肽疫苗同時刺激活化毒殺型和幫助型 T 細胞，在 C3 腫瘤細胞(帶有 HPV16 基因)的模型中呈現其效果，而其結果可看出對於治療 C3 腫瘤很顯著，也是印證結合免疫刺激型佐劑及運輸型系統去治療是個可行的策略。



然而在那篇文章中的效果畢竟是同時結合兩種抗原決定位而展現其效果，若是只單用胜肽 RAH 不知效果又會如何，效果是否會降低或是一樣顯著，但是本實驗中，CpG 與 PELC 在單一胜肽(RAH)就可以顯著增強細胞性免疫。也許未來也可效仿此篇文章去更改本實驗的疫苗，因在實驗只觀察到約四十天左右之腫瘤治療，但若是同時融合幫助型 T 細胞是否可以使疫苗除了增強抗腫瘤的功效還能增強本疫苗的持久性呢?另外也可以再更去了解這些受活化的 T 細胞型別與其分泌的細胞激素是否還有其它差異?這些都是未來可以去嘗試的目標。



## 第五章 結論

本論文發現 PELC 加 CpG 這種佐劑組合在對於增強一些免疫原性低的抗原上(如胜肽、重組蛋白)除了保護抗原在到達抗原呈現細胞前不會被輕易分解之外，還有增強細胞性免疫功能，產生 IFN- $\gamma$ 、幫助活化 CD8 為毒殺型 T 細胞去對抗腫瘤，顯示 PELC/CpG 作為佐劑將是未來癌症免疫療法的新選擇。

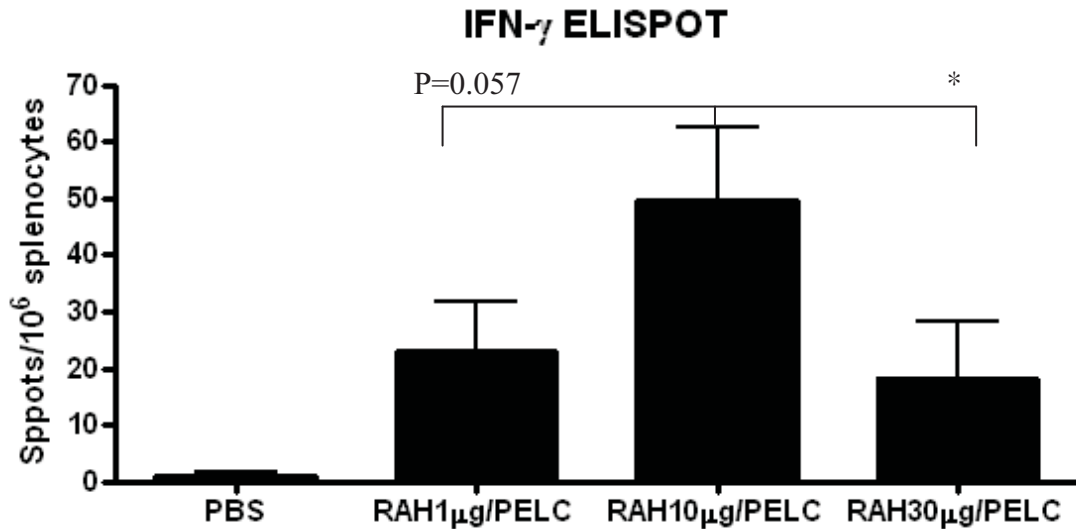


## 參考文獻

1. Su, J.H., et al., *Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential*. *BioDrugs*, 2010. 24(2): p. 109-29.
2. Hung, C.F., et al., *Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. 8(4): p. 421-39.
3. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2): p. 74-108.
4. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. *J Pathol*, 1999. 189(1): p. 12-9.
5. Braaten, K.P. and M.R. Laufer, *Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine*. *Rev Obstet Gynecol*, 2008. 1(1): p. 2-10.
6. Borysiewicz, L.K., et al., *A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer*. *Lancet*, 1996. 347(9014): p. 1523-7.
7. van Driel, W.J., et al., *Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial*. *Eur J Cancer*, 1999. 35(6): p. 946-52.
8. Rensing, M.E., et al., *Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma*. *J Immunother*, 2000. 23(2): p. 255-66.
9. Hallez, S., et al., *Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. 53(7): p. 642-50.
10. Huang, M.H., et al., *Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single-dose, novel nanoemulsion-formulated pandemic influenza vaccine*. *Microbes Infect*, 2009. 11(6-7): p. 654-60.
11. Goldstein, M.J., et al., *A CpG-loaded tumor cell vaccine induces antitumor CD4+ T cells that are effective in adoptive therapy for large and established tumors*. *Blood*, 2011. 117(1): p. 118-27.

12. Nierkens, S., et al., *Route of administration of the TLR9 agonist CpG critically determines the efficacy of cancer immunotherapy in mice*. PLoS One, 2009. 4(12): p. e8368.
13. Baines, J. and E. Celis, *Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides*. Clin Cancer Res, 2003. 9(7): p. 2693-700.
14. Huang, M.H., et al., *Emulsified nanoparticles containing inactivated influenza virus and CpG oligodeoxynucleotides critically influences the host immune responses in mice*. PLoS One, 2010. 5(8): p. e12279.
15. Daftarian, P., et al., *Eradication of established HPV 16-expressing tumors by a single administration of a vaccine composed of a liposome-encapsulated CTL-T helper fusion peptide in a water-in-oil emulsion*. Vaccine, 2006. 24(24): p. 5235-44.





圖一 胜肽抗原(RAH)最佳化

分別選定 1 $\mu$  g、10 $\mu$  g 和 30 $\mu$  g 的 RAH(RAHYNIIVTF, E7 49-57)混合 PELC 以免疫 C57BL/6 小鼠，七天後犧牲老鼠取出脾臟細胞用 1 $\mu$  g 的 RAH 刺激 24-48 小時後，再用酵素結合免疫斑點法(ELISPOT)的方法測試 IFN- $\gamma$  的分泌細胞。由圖中可看出，與 PBS 組做比較，以 10 $\mu$  g 的 RAH 混合 PELC 這組的脾臟細胞顯著具有最多會去辨識出 RAH 而分泌 IFN- $\gamma$ ，因此未來就使用 10 $\mu$  g 的 RAH 去做之後的實驗。圖示為 n=4，mean+ SEM，統計方法為 T test 單尾檢定，\*表示 P<0.05。

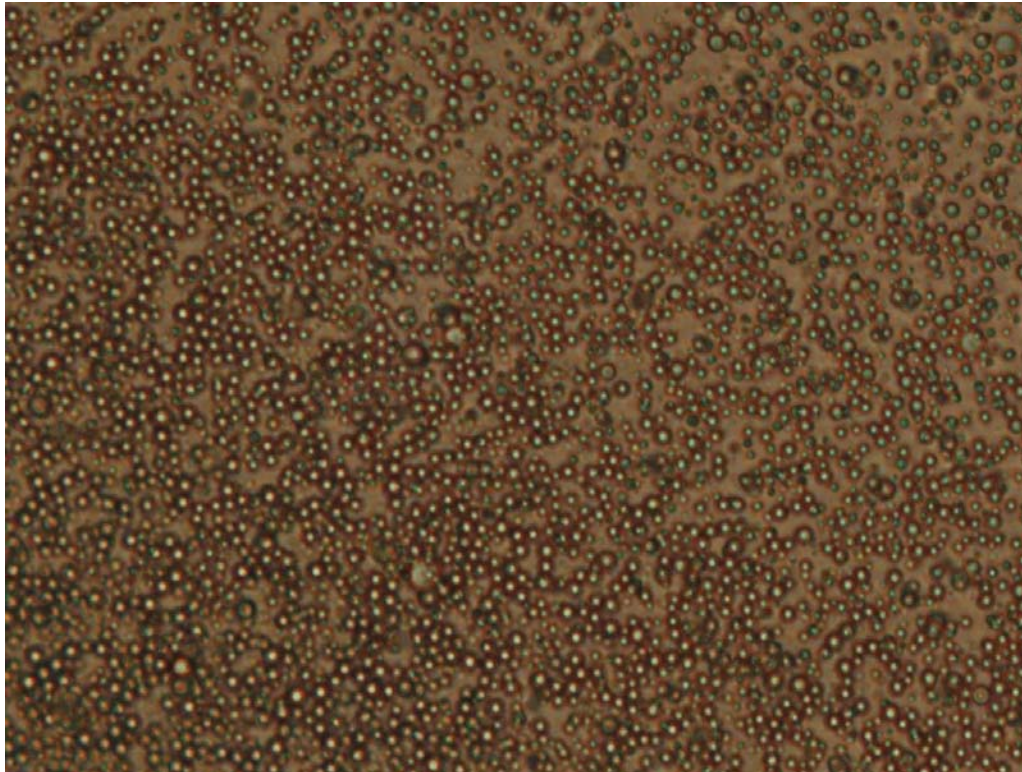
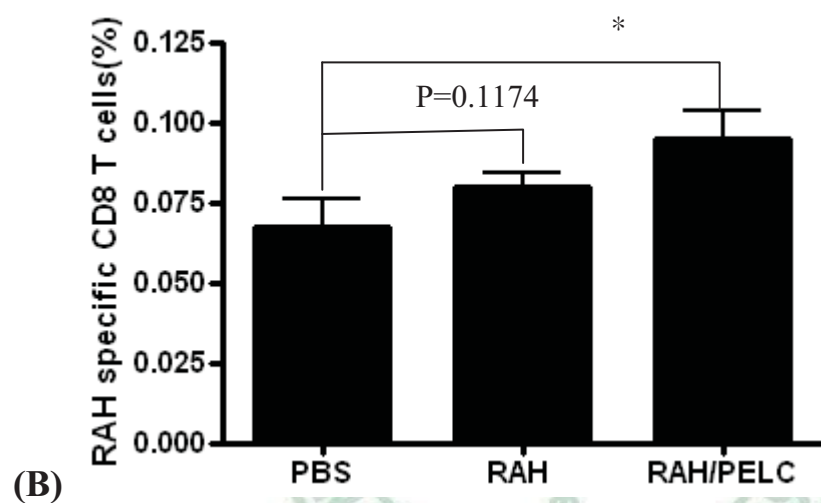
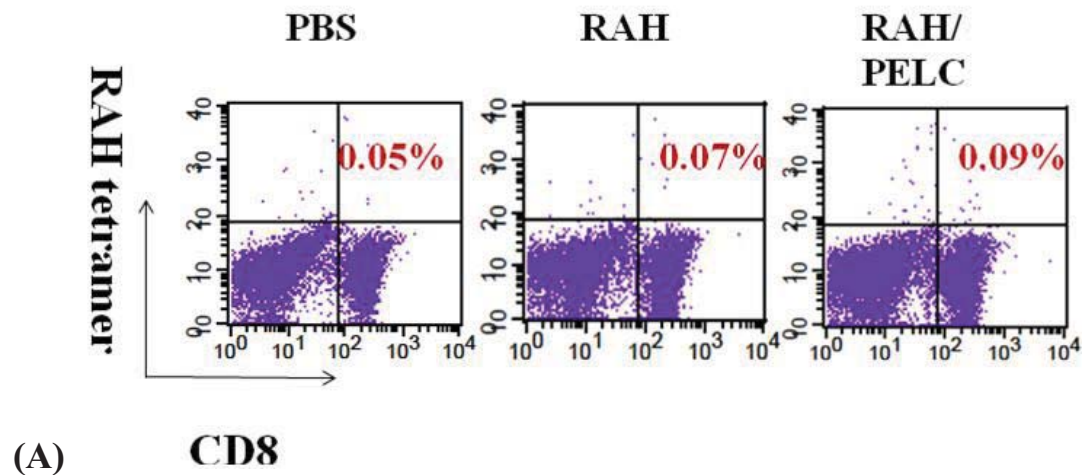


圖 二 RAH/PELC 的顆粒

此為 PELC 加入  $10\mu\text{g}$  的 RAH 均勻混合後，直接取  $10\mu\text{l}$  在顯微鏡下 (400X) 觀察結果，可見顆粒大小為  $1\text{-}10\mu\text{m}$  的混合物。



圖三 RAH/PELC 免疫小鼠產生之 RAH 專一性 T 細胞

爲了測定 RAH/PELC 免疫後產生專一性 T 細胞的能力，因此將 RAH 混合 PELC 免疫小鼠，七天後犧牲小鼠取脾臟細胞，並將小鼠的脾臟細胞分別染 PerCP anti-mouse CD8(2 $\mu$  l)和專一性 PE-RAH tetramer 四價體(2 $\mu$  l)，結果如上圖。可見 RAH 有添加 PELC 之組別比起 PBS 組或是 RAH 組之脾臟細胞，所能染到專一辨識 RAH 之 CD8T 細胞有顯著的增加。(B)將個別免疫小鼠的 RAH 專一性 T 細胞以長體圖表示。

(\*表示  $P < 0.05$ )

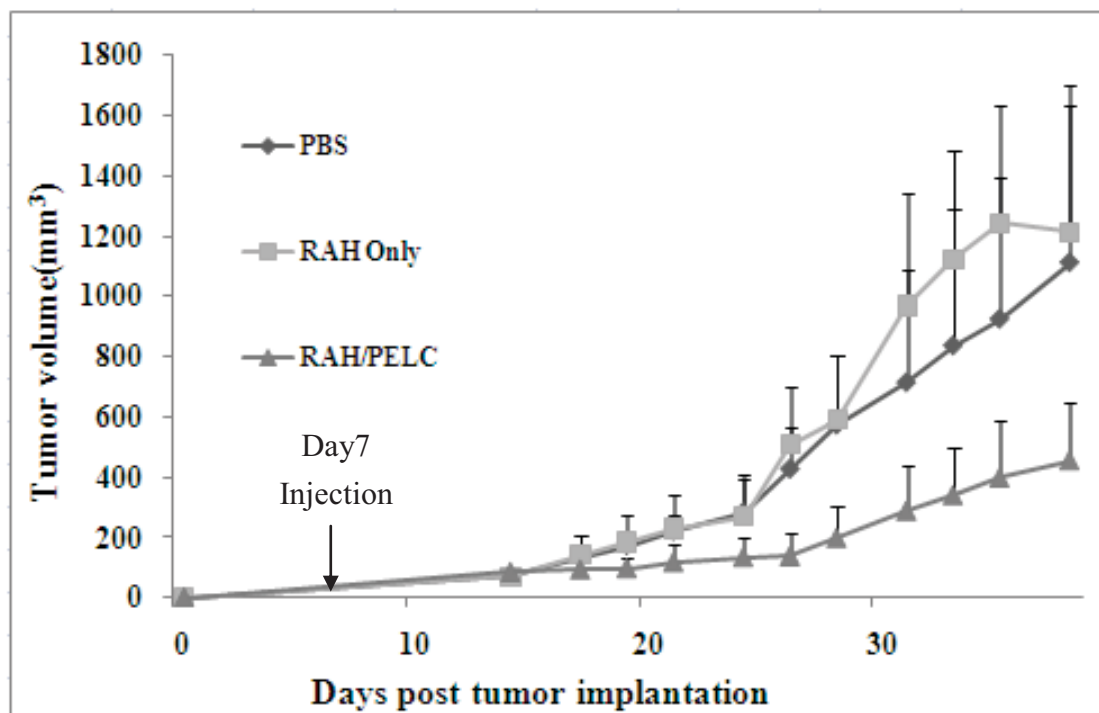
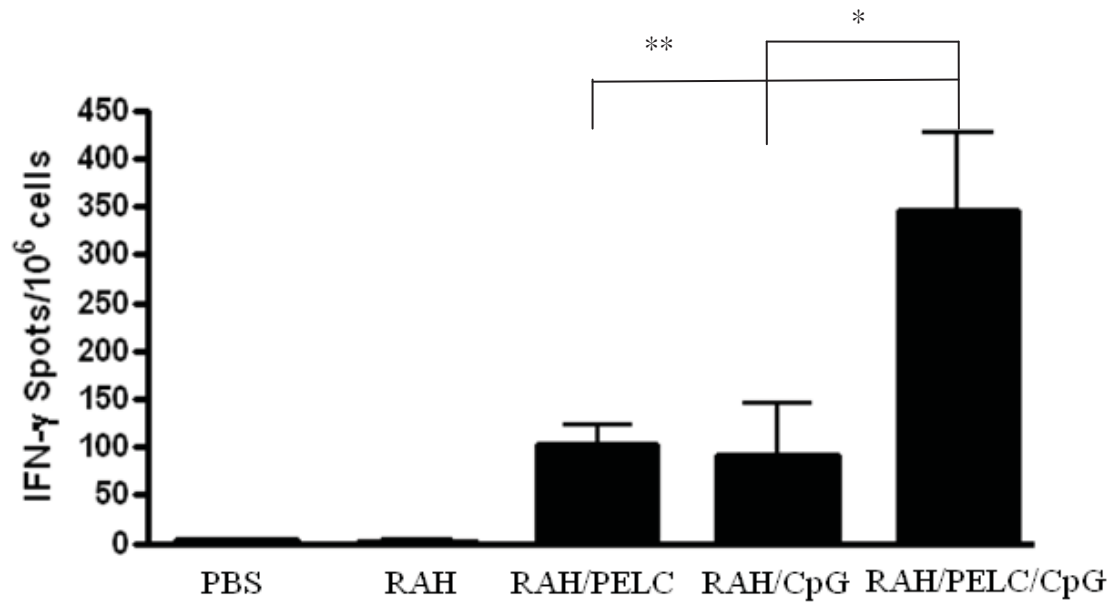


圖 四 RAH/PELC 治療腫瘤的能力

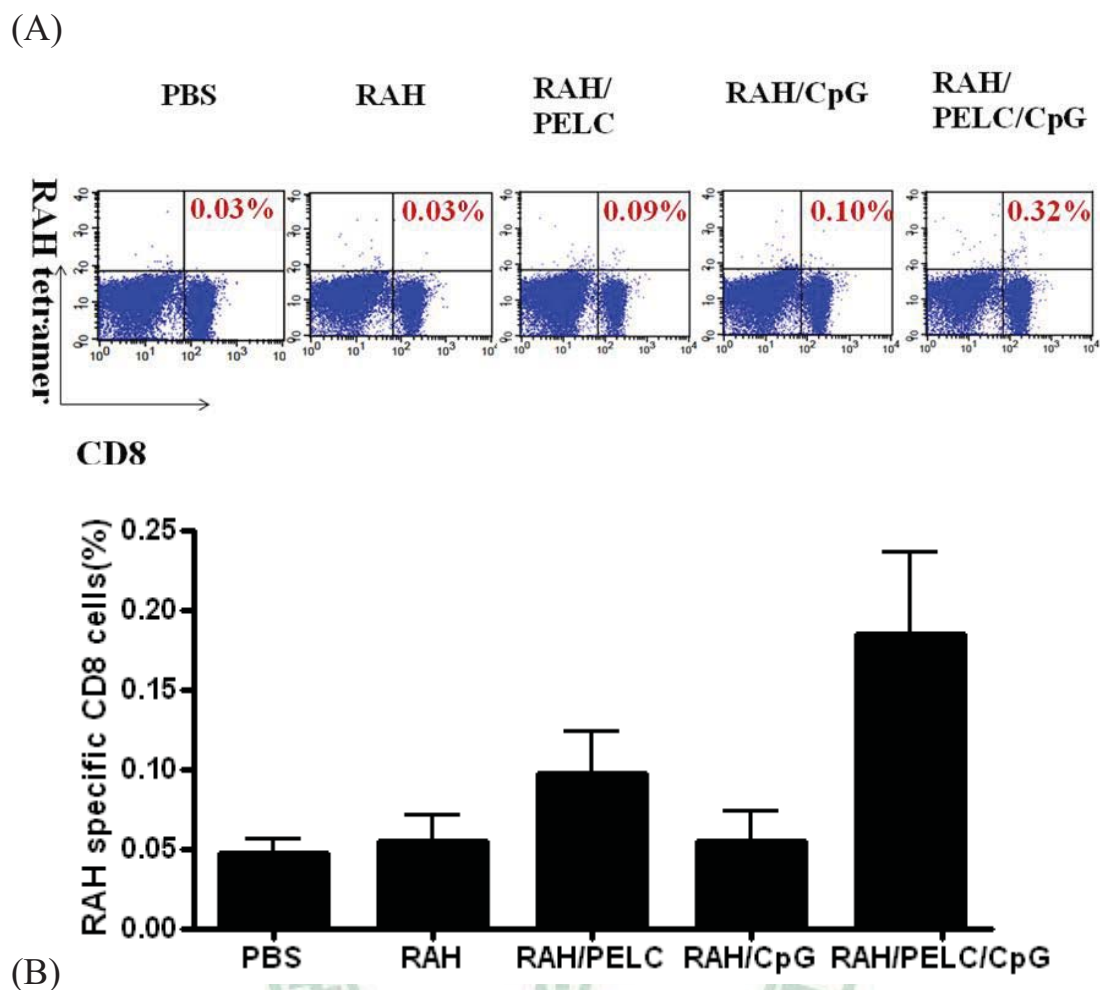
爲了證明 PELC 佐劑在胜肽疫苗治療腫瘤的能力，因此利用 TC-1(表現 HPV16 E6E7)腫瘤治療模型來測試。每組老鼠皆注射  $2 \times 10^5$  的 TC-1 癌細胞在腹部皮下，七天後個別注射 PBS、RAH(10 $\mu$ g)、RAH(10 $\mu$ g)/PELC 在背部皮下，再過七天左右開始測量腫瘤大小。腫瘤計算公式爲: [長(mm)x 寬(mm)x 寬(mm)]/2，當測量到腫瘤大小  $> 2500 \text{mm}^3$  即進行犧牲，結果如上圖，RAH 若有添加 PELC 可使腫瘤長的較小，比起 PBS 和 RAH 組，具有抑制的效果。圖示爲每組 n=6( PBS 組 n=5)。





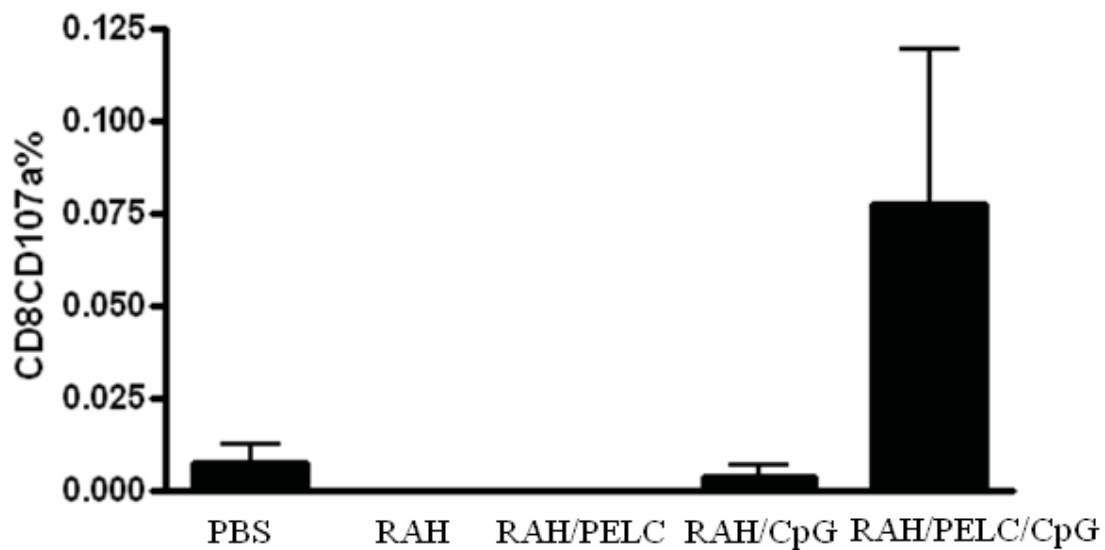
圖五 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合增加分泌 IFN- $\gamma$  的 T 細胞

以 10 $\mu$  g 的 RAH 搭配 PELC 和 CpG(10 $\mu$  g)加上 PBS 設計出幾組疫苗，將疫苗注射小鼠，七天後犧牲小鼠取出脾臟細胞再用 1 $\mu$  g/ml 的 RAH 刺激 24-48 小時後，再用酵素結合免疫斑點法測定 IFN- $\gamma$  的分泌細胞。從上圖可以看出 RAH/PELC/CpG 這組的脾臟細胞有最多的細胞會辨識出 RAH 而分泌 IFN- $\gamma$ 。圖示為 n=4，mean+ SEM，統計方法為 T test 單尾檢定，\*\*表示 P<0.01，\*表示 P<0.05。



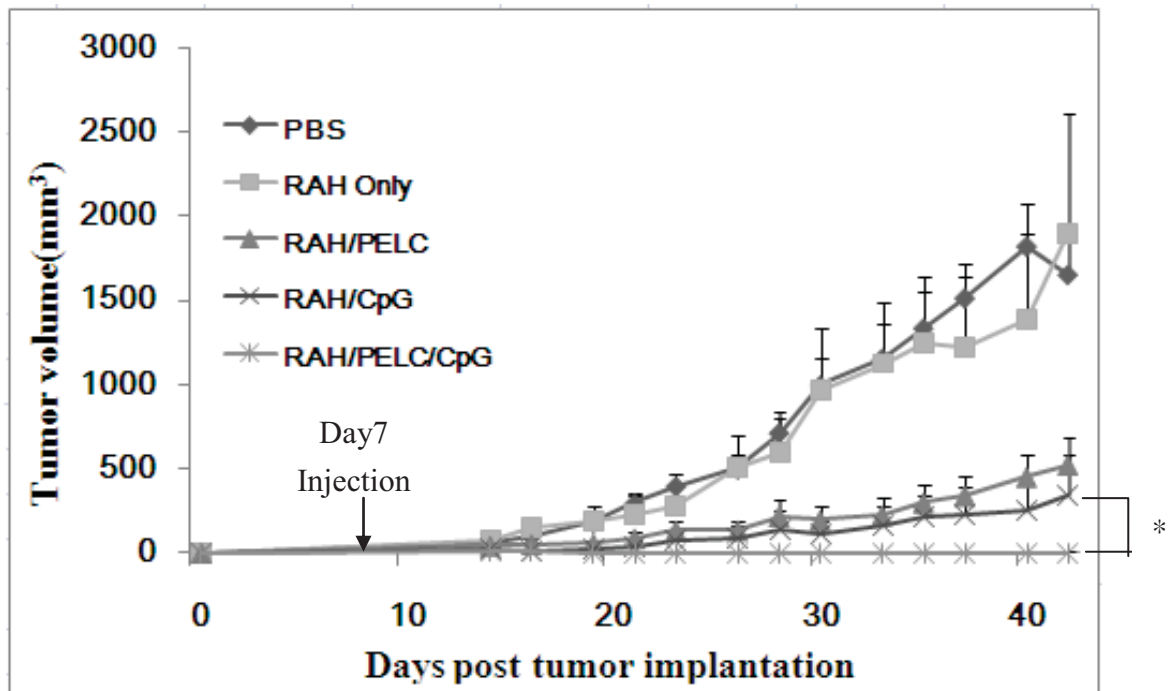
圖六 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定專一性 RAH T 細胞量

為了測定 RAH 和 CpG、PELC 疫苗組合的效果，以 RAH、CpG、PELC 和 PBS 設計出五組疫苗注射小鼠，七天後犧牲小鼠取出脾臟細胞，再分別用 PE-鍵結的 RAH 四價體(2 $\mu$  l)與 anti-CD8-PerCP(2 $\mu$  l)染脾臟細胞。由上圖可以看出 RAH /PELC/CpG 這組細胞能染到最多的會專一性辨識 RAH 的 CD8 T 細胞。圖(A)為代表性的點圖分析。圖(B)為將個別免疫小鼠的專一性 T 細胞的平均+SEM，n=4。

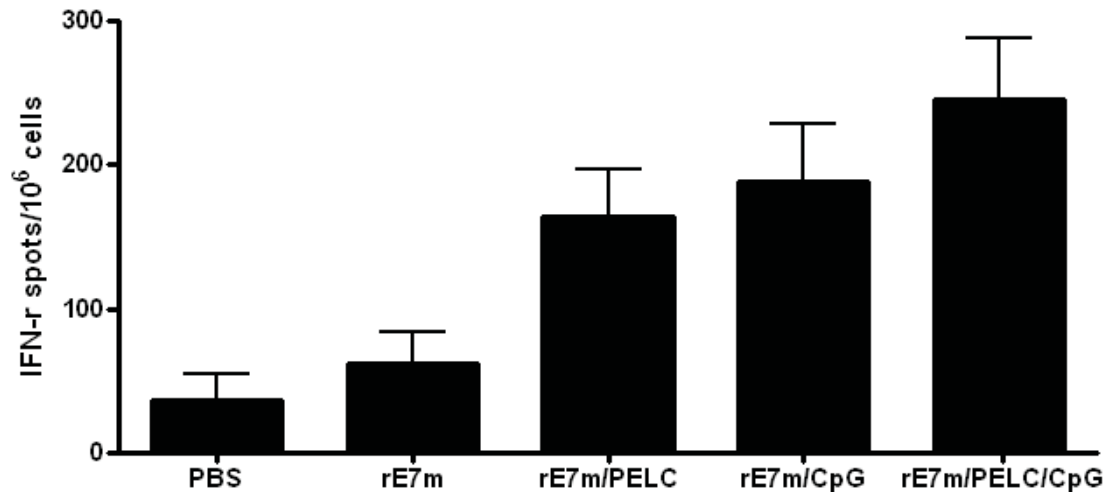


圖七 以 RAH 與 CpG、PELC 為佐劑組合免疫並測定毒殺型 T 細胞

為了測定 RAH 與 CpG、PELC 為疫苗組合對於毒殺型 T 細胞的產生是否有影響，因此以 RAH 和 CpG、PELC 設計出幾組疫苗，先用疫苗注射小鼠背部皮下，七天後犧牲小鼠取  $2 \times 10^6 / 100 \mu l$  脾臟細胞染 anti-CD107a-PE( $1 \mu l$ ) 並加入  $10 \mu g$  的 RAH 刺激兩小時，接著加  $1.33 \mu l$  Monensin 以及  $2 \mu l$  的 Brefeldin A 終止刺激 6 小時後，再用 anti-CD8-FITC( $1 \mu l$ ) 做染色，染完並上機計算完之 CD8CD107a 之百分比如上。不同於酵素結合免疫斑點法和 RAH 四架體染色只有測定 CD8 的部分，CD107a 是進一步去看有多少 CD8T 細胞受到抗原刺激後會活化為對腫瘤有摧毀功能的毒殺型 T 細胞，從上圖結果可以看出 RAH/PELC/CpG 這組的細胞有最多的 CD8T 細胞會因再次遭受抗原而活化成毒殺型 T 細胞。圖示為  $n=4$ ， $mean \pm SEM$ 。



圖八 以 TC-1 腫瘤治療模型比較 RAH 搭配 CpG、PELC 佐劑組合。為了測試 RAH 搭配 CpG、PELC 佐劑組合對於腫瘤治療上的效果，因此將每組小鼠在腹部皮下注射  $2 \times 10^5$  的 TC-1 癌細胞，七天後在背部皮下分別注射疫苗治療，再過七天左右開始測量腫瘤大小。由上圖可看出注射 RAH/PELC/CpG 這組的老鼠腫瘤到後來都消失了，且若 RAH 有混 CpG 或 PELC 的組別，比起 PBS 組或單加 RAH 的組別，也有明顯抑制腫瘤生長。圖示為  $n=12$  (除了 RAH/CpG 那組  $n=6$ )， $\text{mean} + \text{SEM}$ ，統計方法為 T test 單尾檢定，\*表示  $P < 0.05$ 。



圖九 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫引發脾臟 T 細胞分泌 IFN- $\gamma$

在 RAH 胜肽疫苗上可以看出 CpG 和 PELC 組合的效果，也因此想知道在其他種抗原上是否也會有相同的作用。因此用 30 $\mu$  g 的 rE7m 重組蛋白搭配 10 $\mu$  g 的 CpG 和 PELC 注射小鼠，兩星期後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g 的 rE7m 刺激 24-48 小時，後用酵素結合免疫斑點法測定分泌 IFN- $\gamma$  的細胞。結果如上圖，當抗原換成 rE7m 後，可發現只要 rE7m 有加 PELC 或是 CpG，當再次遭遇 rE7m 能辨識而受刺激產生 IFN- $\gamma$  的細胞無顯著差異。圖示為 n=4，mean+ SEM。

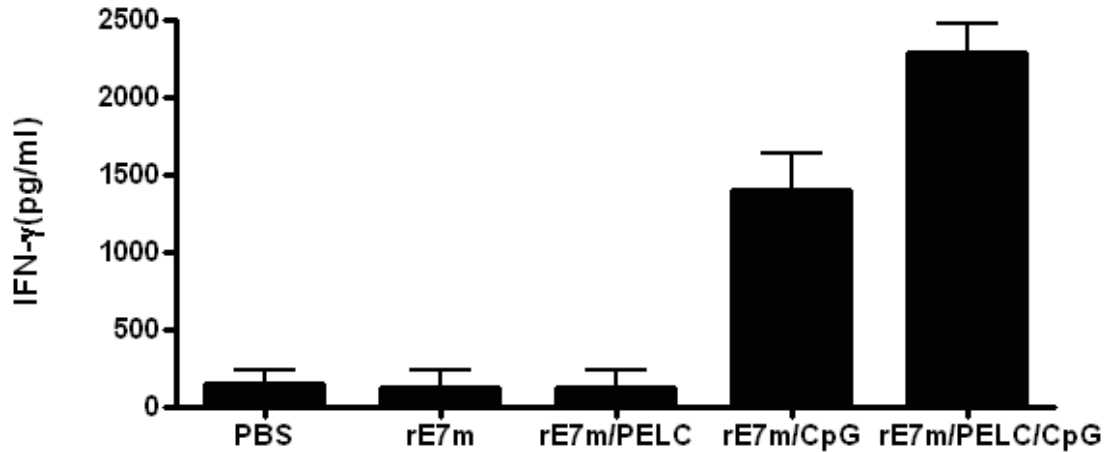


圖 十 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IFN- $\gamma$  酵素免疫分析法測定

為了測定 rE7m 與 CpG、PELC 組合的疫苗效果，因此用 30 $\mu$  g 的 rE7m 搭配 CpG 及 PELC 背部皮下注射小鼠，兩星期後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g 的 rE7m 刺激並在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱培養，五天後收集上清液，收好凍在 -20 $^{\circ}$ C，之後用 IFN- $\gamma$  酵素免疫分析法測定，結果如上圖，可看出 rE7m/CpG 和 rE7m/PELC/CpG 這兩組細胞在受到抗原刺激後，皆能產生較其他組別多的 IFN- $\gamma$ 。圖示為 n=2，mean+ SEM。

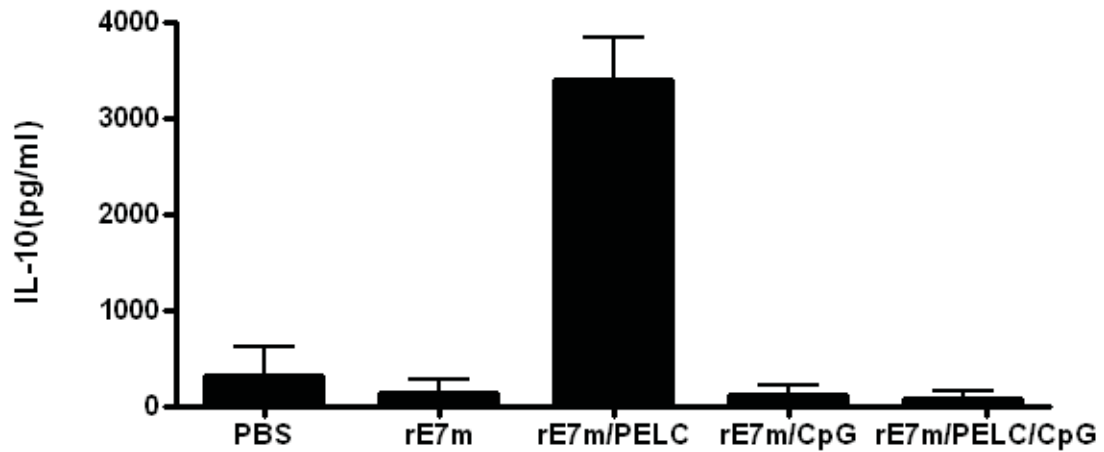


圖 十一 以重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合免疫並以 IL-10 酵素免疫分析法測定

爲了測定 rE7m 與 CpG、PELC 組合的疫苗效果，因此用 30 $\mu$  g 的 rE7m 搭配 CpG 及 PELC 背部皮下注射小鼠，兩星期後犧牲小鼠取脾臟細胞用 10 $\mu$  g 的 rE7m 刺激並在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱培養，五天後收集上清液，收好凍在 -20 $^{\circ}$ C，之後用 IL-10 酵素免疫分析法測定，結果如上圖，可看出只有 rE7m/PELC 這組有顯著產生 IL-10。圖示爲 n=2，mean+ SEM。

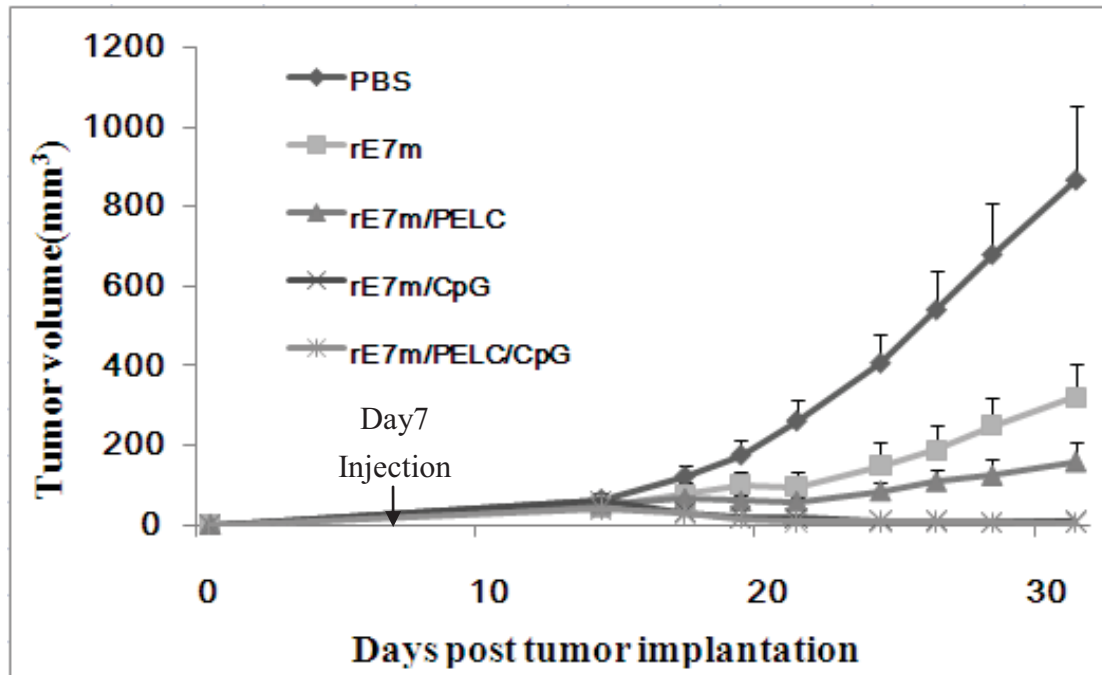


圖 十二 以 TC-1 腫瘤治療模型測定重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合效果

為了測試 E7m 搭配 CpG、PELC 佐劑組合對於腫瘤治療上的效果，因此每組老鼠在腹部皮下注射  $2 \times 10^5$  的 TC-1 癌細胞，七天後在背部皮下注射  $30 \mu\text{g}$  的 rE7m 和 CpG、PELC 組合，再過七天左右開始測量腫瘤大小。由上圖可看出注射 rE7m/PELC/CpG 和 rE7m/CpG 這兩組腫瘤皆能幾乎完全抑制腫瘤，由此可知， $30 \mu\text{g}$  的 rE7m 在 CpG 存在下皆能完全抑制腫瘤生長。圖示為  $n=6$ ， $\text{mean} + \text{SEM}$ 。



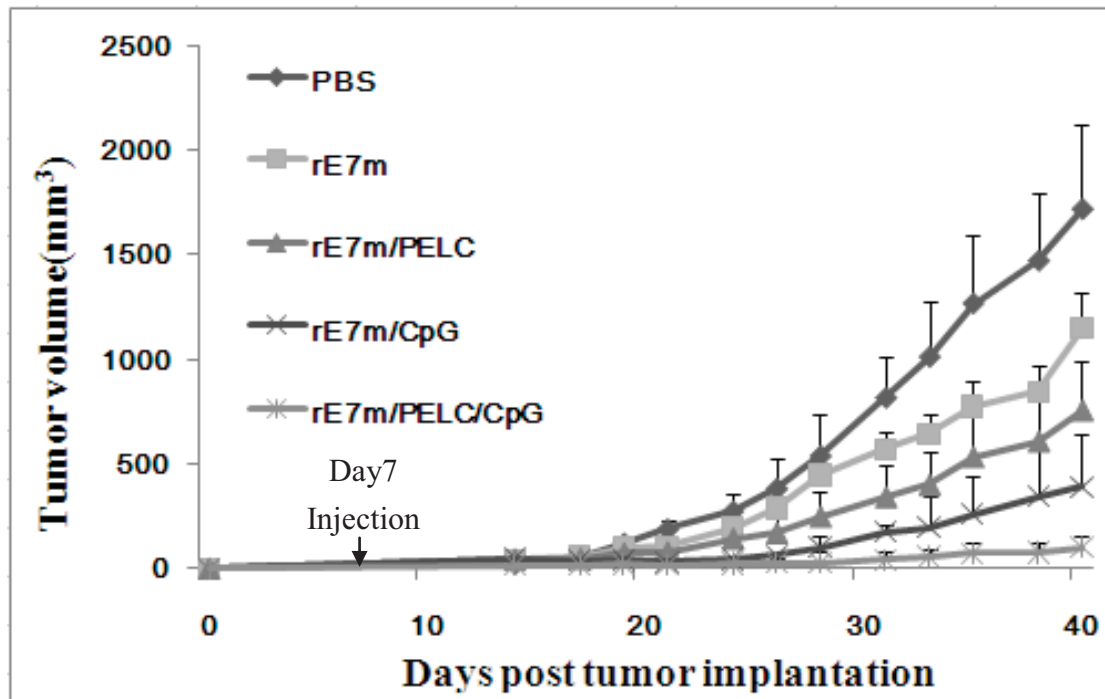


圖 十三 1 $\mu$  g 重組蛋白 rE7m 與 CpG、PELC 佐劑組合抑制腫瘤生長的能力

爲了測試 rE7m 搭配 CpG、PELC 佐劑組合對於腫瘤治療上的效果，以 1 $\mu$  g 的 rE7m 分別和 PELC，CpG 或 PELC/CpG 免疫小鼠。每組小鼠在腹部皮下注射  $2 \times 10^5$  的 TC-1 癌細胞，七天後在背部皮下注射 1 $\mu$  g 的 rE7m 和 CpG、PELC 組合，再過七天左右開始測量腫瘤大小。由上圖可看出注射 rE7m/PELC/CpG 這組比起 PBS 組有顯著的抑制。

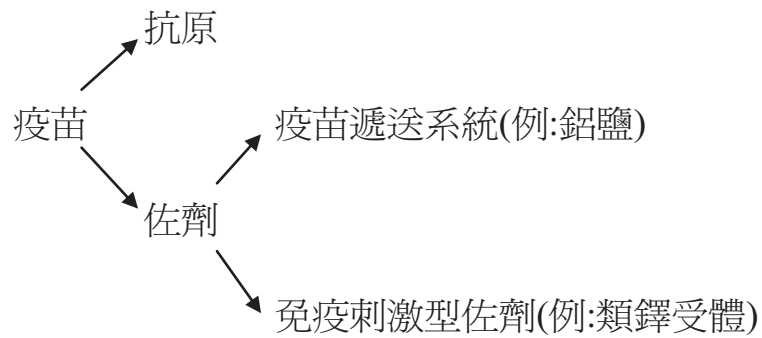
圖示爲 n=6，mean+ SEM。

附表 一.預防型子宮頸癌疫苗比較

商品名	藥廠	預防型別	佐劑	表現系統
嘉喜	默克	6、11、16、 18	鋁鹽佐劑	酵母菌
保蓓	葛蘭素史克	16、18	專利佐劑 ASO4(鋁鹽 /MPL)	桿狀病毒



## 附表 二.疫苗的組成結構



疫苗中的組成含有抗原和佐劑，抗原就是一般所熟知的胜肽、蛋白或是病毒，而佐劑可以因其功能分成運輸型和免疫刺激型，運輸型的最代表莫過於以使用悠久之鋁鹽，而免疫刺激型有目前最熱門之類鐸受體。



附表 三.複合相乳狀液 PELC 製備流程圖

