

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580048734.6

[43] 公开日 2008年4月16日

[11] 公开号 CN 101163500A

[22] 申请日 2005.12.6

[21] 申请号 200580048734.6

[30] 优先权

[32] 2005.2.25 [33] KR [31] 10-2005-0015955

[86] 国际申请 PCT/KR2005/004160 2005.12.6

[87] 国际公布 WO2006/090968 英 2006.8.31

[85] 进入国家阶段日期 2007.8.27

[71] 申请人 生物领先公司

地址 韩国大田广域市

共同申请人 恩蒂莱株式会社

韩国生命工学研究院

[72] 发明人 成文喜 金哲仲 夫夏玲 洪承杓

李宗洙 金智渊

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司
代理人 楼高潮

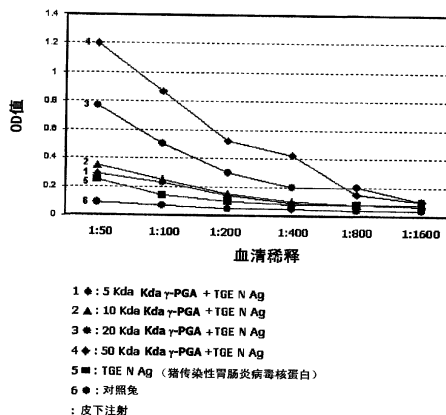
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

[54] 发明名称

含有聚-γ-谷氨酸的用作佐剂的合成物

[57] 摘要

本发明涉及一种含有聚-γ-谷氨酸的用作免疫增强剂(佐剂)的合成物和含有该免疫增强剂的用作疫苗的合成物,更详细地,涉及含有聚-γ-谷氨酸的免疫增强剂,其可通过与具有低免疫原性的抗原一起给药到动物来增强抗体产率,本发明还涉及含有所述免疫增强剂和抗原的用作疫苗的合成物。本发明的佐剂几乎没有毒性和副作用,甚至当与低免疫性的抗原一起使用时显示出高抗体滴度,所以可通过将其加入到用作非传染性慢性疾病以及癌症的预防和治疗疫苗医学合成物中使用,尤其是加入到用作前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头和颈部肿瘤、阴部肿瘤、膀胱癌、脑肿瘤和胶质瘤的疫苗中。



1、一种用作免疫增强剂（佐剂）的包含有效剂量的聚- γ -谷氨酸和药学上可接受的载体的合成物。

2、如权利要求 1 所述的用作免疫增强剂（佐剂）的合成物，其特征在于，其中聚- γ -谷氨酸的分子量为 10kDa~10,000kDa。

3、包括如权利要求 1 所述的用作免疫增强剂和抗原物质的的疫苗用合成物。

4、如权利要求 3 所述的用作疫苗的合成物，其特征在于，上述抗原物质选自由以下构成组中的任一种物质：肽、多肽、表达多肽的乳酸菌、抗原蛋白质，表达抗原蛋白质的乳酸菌，寡核苷酸、多核苷酸、重组细菌和重组病毒。

5、如权利要求 3 所述的用作疫苗的合成物，其特征在于，上述抗原物质是猪传染性胃肠炎病毒核蛋白（N）、犬细小病毒抗原蛋白 VP2 或者乙肝病毒表面抗原（L 粒子）。

6、如权利要求 5 所述的用作疫苗的合成物，其特征在于，上述核蛋白（N）抗原物质是表达核蛋白（N）的产乳酸微生物，所述 VP2 抗原物质是表达 VP2 的产乳酸微生物。

7、如权利要求 3 所述的用作疫苗的合成物，其特征在于，加含有选自由以下构成组中的任一种以上第二辅剂：稳定剂、乳化剂、氢氧化铝、磷酸铝、pH 调节剂、表面活性剂、脂质体、iscom 辅剂、合成糖肽、膨胀剂、外用凝胶剂、细菌细胞壁、细菌细胞壁衍生物、细菌疫苗、动物痘病毒蛋白、亚病毒粒子辅剂、霍乱毒素、N、N-双十八烷基-N'、N'-二(2-羟乙基)-丙邻二胺、单磷酸类脂 A、二甲基双十八烷基-溴化铵以及它们的混合物。

8、如权利要求 3 所述的用作疫苗的合成物，其特征在于，其用途是

预防或治疗至少一种选自包括以下组的疾病：前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头和颈部肿瘤、阴部肿瘤、膀胱癌、脑肿瘤和胶质瘤。

9、一种增强针对抗原的抗体产率的方法，上述方法包括将权利要求3所述的合成物给药到除人以外的动物。

10、如权利要求9所述的方法，其特征在于，上述动物是哺乳动物或鸟类。

11、如权利要求9所述的方法，其特征在于，通过选自包括以下组的任一种给药方法进行：皮下注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射、鼻腔给药、透皮给药和口腔给药。

含有聚- γ -谷氨酸的用作佐剂的合成物

技术领域

本发明涉及含有聚- γ -谷氨酸的用作免疫增强剂（佐剂）的合成物和含有该免疫增强剂的用作疫苗的合成物，更具体地，涉及一种含有聚- γ -谷氨酸的免疫增强剂，其可通过与具有低免疫原性的抗原一起给药到动物来增强抗体产率，还涉及一种含有所述免疫增强剂和抗原的用作疫苗的合成物。

背景技术

到目前为止，进行了许多关于使用抗原蛋白质或抗原肽的亚单位疫苗、使用抗原 DNA 的 DNA 疫苗和各种重组疫苗的研究。这些疫苗候选物质的优点在于具有很小的副作用，但具有弱免疫原性的缺点。因此，有效增强疫苗候选物质的免疫反应的免疫增强剂（佐剂）的发展在该领域上是迫切需要的（O' Hagan, *J.Pharm. Pharmacol.*, 50:1-10, 1998）。

佐剂是能够增强抗原特定体液和/或细胞反应的物质。佐剂的体液反应（B 细胞反应）显示了对特定抗原的强有力的抗体反应，并其反应为形成在迅速的分解新陈代谢中保护抗原的沉淀物并刺激非特异的免疫反应。当沉淀形成时，因为使抗原得到储存并随着时间的流逝又分开，在一定时间内延长对免疫系统的刺激，从而抗原的能力更小，可更持久地维持抗原反应。佐剂本身非特定地刺激免疫系统的细胞从而增强包含的抗原反应的作用，也就是说，通过提高淋巴因子的水平具有刺激免疫反应的功能。

因为佐剂具有引起强有力的 T 细胞介导的免疫反应（细胞介导应答）

的另一种特征，当与抗原一同给药时，其被抗原呈递细胞（APC）识别以激活免疫系统，从而具有增强预防接种疫苗和治疗接种疫苗效果的用途。该佐剂具有对感染疾病和肿瘤有寄主抗性的非特异的刺激作用的用途，并具有增强预防接种疫苗和治疗接种疫苗的免疫原性的用途。

弗氏佐剂是原有已报道的佐剂中的典型佐剂。弗氏佐剂是表面活性剂 Arlacel-A 被添加到矿物中形成的一种佐剂，可溶性抗原被很好地混合到该佐剂中制成悬液并将其注射到血管中或者皮下注射上以提高抗体产率。由于弗氏佐剂的抗体产率高，所以最广泛用作试验动物的佐剂，但具有因其毒性高而不能使用为人类药物使用的缺点。另外，作为细菌产物表现出免疫刺激效果的各种成分被鉴别为佐剂来开发（LPS；脂多糖，胞壁酰二肽，霍乱毒素 B 亚单位），并且作为从植物中分离的一种皂角苷的 QuilA 的形式以及免疫刺激复合物（ISCOMs）的形式，特别是胆汁盐和磷脂等制剂作为佐剂被开发。但这些中的大多数为没有安全性保证的制剂。

当前，铝种类（aluminum species）几乎是唯一的被核准用作人类患者的佐剂，但具有与其它佐剂相比免疫增强效果相对较低的缺点。而且，在免疫反应时铝种类主要通过刺激 Th2 免疫反应增强免疫反应（Audibert and Lise, *Immunol. Today*, 14: 281-284, 1993），因此其被限制为用作需要增强细胞毒素 T 细胞免疫应答中所需的疫苗的佐剂。此外，由于其粘性、当铝被冷冻时其沉淀特性，含有铝佐剂的疫苗具有难以在体内分解并难以通过冻干法保存的缺点。另外，铝化合物（硫酸铝、氢氧化铝、磷酸铝等）可被用于人体的疫苗，但具有质量容易受影响并容易在生产过程中发生变化的缺点，并且由于纯化操作很困难，其不适于大量生产。

除了这些佐剂以外，正在开发更安全和有效的佐剂，并且正在研究如细胞因子的佐剂与疫苗抗原一起给药的方法。然而，这些细胞因子在安全方面也需要改进。

绝大部分病毒的侵透途径是经过粘膜表面，并且许多感染首先在粘膜和粘膜下组织中发生。由于普通肠道外疫苗在诱导粘膜免疫应答时是高度无效的，已经付出了相当多的努力来开发用作优化粘膜免疫的系统。例如，尝试开发增加用作粘膜下组织的免疫细胞的抗原输送的佐剂（脂质体、免疫刺激复合物和微球）（Sjolander *et al*, *J.Leukocyte Biol.*64:713-723, 1998），尽管粘膜免疫在许多情况下具有效果，但为了可在许多感染中有效地诱导免疫应答需要将粘膜和非粘膜免疫结合起来。

当考虑上述技术时，要想开发在商业上可行及可利用的疫苗，将其效果最大化并能够安全地输送以及大量生产所选抗原物质的佐剂其成本效果必须合算。另外，需要能够对经皮、粘膜和整个身体给药且可正确地控制并集中免疫应答的佐剂，。

发明内容

本发明的发明人已经进行了极大地努力来开发更有效并更安全的佐剂，结果通过提供由 *Bacillus sp.*产生的聚- γ -谷氨酸，发现聚- γ -谷氨酸可用作佐剂，增强了各种抗原和疫苗候选物质的效果，从而完成了本发明。

因而，本发明的主要目的是提供包含有效剂量的聚- γ -谷氨酸的用作免疫增强剂（佐剂）的合成物。

本发明的另一目的在于提供含有所述佐剂和抗原的用作疫苗的合成物。

通过下列详细描述和所附的权利要求书，本发明的其它特征和实施方式将更加显而易见。

附图说明

图 1 是显示在兔子皮下注射聚- γ -谷氨酸和猪传染性胃肠炎病毒的核

蛋白(N)抗原之后在某一时间内的血液中核蛋白抗原特定 IgG 抗体滴度的图表。

图 2 是显示将聚- γ -谷氨酸和乙肝病毒 (HBV) 的表面抗原 (L 粒子) 注射到鼠腹腔中之后在某一时间内的血清中 HBs 抗原特定 IgG 抗体滴度的图表。

图 3 是显示将聚- γ -谷氨酸和表面表达犬细小病毒的作为衣壳蛋白抗原的 VP2 的乳酸菌注射到鼠口腔和肠腔中之后在某一时间内的血清中 VP2 抗原特定 IgG 抗体滴度的图表。

图 4 是显示将聚- γ -谷氨酸和表面表达犬细小病毒的作为衣壳蛋白抗原的 VP2 的乳酸菌注射到鼠口腔和鼻腔中之后在某一时间内的小肠和支气管肺泡的灌洗液中针对 VP2 的 IgA 抗体滴度的图表。

图 5 是显示将聚- γ -谷氨酸和猪传染性胃肠炎病毒的表面表达核蛋白抗原的乳酸菌与饲料一起供给到猪口腔中之后在某一时间内的血清中核蛋白抗原特定 IgG 抗体滴度的图表。

具体实施方式

本发明提供一种用作含有有效剂量的聚- γ -谷氨酸和治疗上可接受的载体的用作免疫增强剂(佐剂)的合成物。在本发明中,优选地所述聚- γ -谷氨酸的分子量在 10kDa~10,000kDa。

本发明还提供了一种含有所述免疫增强剂和抗原物质的用作疫苗的合成物。在本发明中,所述抗原物质优选地选自包括以下组的任何一种物质:肽、多肽、表达多肽的乳酸菌、蛋白质、表达蛋白质的乳酸菌、寡聚核苷酸、多聚核苷酸、重组细菌和重组病毒。另外,所述抗原物质优选猪传染性胃肠炎病毒的核蛋白(N)、犬细小病毒的抗原蛋白 VP2 或者乙肝表面抗原(L 粒子),所述核蛋白(N)抗原物质是表达核蛋白(N)的产乳酸微生物,并且所述 VP2 抗原物质是表达 VP2 的产乳酸微生物。

根据本发明的用作疫苗的合成物还包括至少一种选自包括以下混合物群的第二辅剂：稳定剂、乳化剂、氢氧化铝、磷酸铝、pH调节剂、表面活性剂、脂质体、iscom辅剂、合成糖肽、膨胀剂、外用凝胶剂、细菌细胞壁、细菌细胞壁衍生物、细菌疫苗、动物痘病毒蛋白、亚病毒粒子辅剂、霍乱毒素、N、N-双十八烷基-N'、N'-二(2-羟乙基)-丙邻二胺、单磷酸类脂A、二甲基双十八烷基-溴化铵以及它们的混合物。而且，根据本发明的用作疫苗的合成物优选地用作至少一种选自包括以下群组的疾病的预防或治疗：前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头和颈部肿瘤、阴部肿瘤、膀胱癌、脑肿瘤和胶质瘤。

本发明还提供一种通过将用作疫苗的所述合成物给药到除人之外的动物来增强针对抗原的抗体产率。在本发明中，所述动物优选哺乳动物或鸟类，给药优选选自以下组中任一种方法进行：皮下注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射、鼻腔给药、透皮给药和口腔给药。

包含本发明的聚- γ -谷氨酸的免疫增强剂（佐剂）另外还可包含在药理学合成物的生产中通常使用的适当的添加剂和稀释剂。而且，包含本发明的聚- γ -谷氨酸的免疫增强剂可通过制成口服制剂和灭菌注射液的制剂形式来使用，如一般的粉末、粒剂、片剂、胶囊、悬液、乳液、糖浆、烟雾剂等方法。

乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、淀粉、甘油、阿拉伯橡胶、海藻酸盐、白明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、丙基羟苯酸酯、云母、硬脂酸镁和矿物质是可被包含在含有聚- γ -谷氨酸的佐剂合成物中的载体、添加剂、稀释剂。

假如用作医疗制剂，其可使用通常使用的稀释剂或者添加剂来制备，如填料、膨胀剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等。用作口腔给药的固体制剂包括粉末、丸剂、片剂、粒剂、胶囊等，并且这些制剂

可通过将至少一种添加剂与所述聚- γ -谷氨酸混合来制备，例如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、白明胶等。而且，除了简单添加剂之外，润滑剂如硬脂酸镁滑石粉可被使用。悬液、内服药物、乳剂、糖浆等可被用作口腔给药的液体制剂，并另外加入通常被用作简单稀释剂的水、液体石蜡，也可包括各种添加剂例如湿润剂、甜料芳香剂、防腐剂等。用作肠道外给药的制剂包括灭菌溶液、非溶剂、悬液、乳剂、冻干剂。菜油如丙二醇、聚丙二醇、橄榄油以及可注射酯如醋酸乙酯等可被用作不溶性试剂和悬液。

在包含本发明的聚- γ -谷氨酸的佐剂中，给药剂量可根据对象的年龄、性别、体重等而变化，并且给药的疫苗剂量可根据给药途径、疾病的严重性、性别、体重、年龄等而变化。

在本发明中使用的聚- γ -谷氨酸本身是可被安全地用作预防的佐剂，因为其几乎没有毒性和副作用。可使用本发明的聚- γ -谷氨酸作为疫苗的佐剂制备的抗原物质可选自以下群组：包括具有低免疫性的抗原或者肽、多肽、蛋白质或者与它们相应的 DNA 序列，或者作为疫苗目标的目标细胞或其混合物，并可选自可作为疫苗的重组细菌或者重组病毒。

当通过肠道外、粘膜（口腔和鼻腔等）和穿过皮肤的路径给药疫苗时用作本发明的疫苗的免疫增强剂（佐剂）可一起被使用。当使用表达抗原蛋白质的微生物作为疫苗时，优选地使用本发明的聚- γ -谷氨酸作为免疫增强剂（佐剂）。特别是，当使用表达所述抗原蛋白的乳酸菌作为口服疫苗时，优选地将本发明的聚- γ -谷氨酸作为免疫增强剂（佐剂）一起使用。

而且，本发明的聚- γ -谷氨酸可通过将其加入到包括用作预防或治疗非传染性慢性疾病以及癌症，尤其是前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头和颈部肿瘤、阴部肿瘤、膀胱癌、脑肿瘤和胶质瘤的预防或者治疗性疫苗的医学合成物中来使用。

具体实施例

以下，将通过具体实施例对本发明进行详细描述。但是，本发明并不限于这些实施例，对本领域技术人员来说显而易见的是，可在本发明的精神和范围内进行许多变化和修改。

实施例 1. 聚- γ -谷氨酸的制作

含有用作生产聚- γ -谷氨酸的 3L 基本培养基（含有 5% L-谷氨酸盐的 GS 培养基，5% 葡萄糖，1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，0.27% KH_2PO_4 ，0.42% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，0.05% NaCl ，0.3% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，1 ml/L 维生素溶液，pH 6.8）的 5L 发酵罐中接种了 1% 的 *Bacillus subtilis var. chungkookjang* (KCTC 0697BP) 培养液，并在 150rpm 的搅拌速度、1vvm 的吹气速率和 37°C 下培养 72 小时，然后加入 2N 硫酸溶液将 pH 调节到 3.0，从而得到含聚- γ -谷氨酸的样品溶液。

样品溶液在 4°C 下静置 10 小时以去除发酵液中存在的多糖，并加入两倍体积的乙醇到发酵液中，然后完全混合。将混合溶液在 4°C 下静置 10 小时，然后离心，以得到聚- γ -谷氨酸沉淀。沉淀加入蒸馏水溶解，加入 100 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白酶，并在 37°C 恒温箱中反应 6 小时，从而分解样品中存在的胞外蛋白。含有聚- γ -谷氨酸的样品溶液与足够量的蒸馏水对流而被透析除去游离的谷氨酸盐，然后浓缩以提供纯净的聚- γ -谷氨酸。

在根据其使用需要的情况下，通过将生产的聚- γ -谷氨酸以适当方式切割后按一定分子量制作使用，或者可通过合适的分离途径根据给定分子量通过再生来使用，在下面的例子中使用 5kDa，10 kDa，20 kDa，50 kDa，1000 kDa 和 2000 kDa 的聚- γ -谷氨酸。

实施例 2. 通过聚- γ -谷氨酸生产 TGE 病毒抗原的抗体

在本实施例中，为了检验发明的聚- γ -谷氨酸是否显示出对可溶性抗原特异的免疫增强效果，在对抗体特异的免疫应答中，尤其是检验对在抗体产生中涉及的由 B 细胞引起的体液免疫应答的效果。诱导猪传染性

消化器官疾病的猪传染性胃肠炎病毒 (TGE) 的核蛋白 (N) 被用作抗原, 兔子被用作试验动物。

在皮下仅仅注射了 TGEN 抗原 (400 μ g/PBS) 的兔子被用作对照组, TGEN 抗原 (400 μ g/PBS) 和分别具有 5kDa, 10 kDa, 20 kDa, 50 kDa 分子量的聚- γ -谷氨酸混合后皮下注射的兔子被作为试验组。

第一次皮下注射两星期之后, 将相同量的抗原和每种分子量的聚- γ -谷氨酸给药。第一次皮下注射后, 兔血清每 2 周被提取一次, 并通过 ELISA (酶联免疫测定) 测定血清中 TGEN 抗原的抗体滴度。

在 ELISA 方法中, 在使用 PBS/5% 胎牛血清封闭 TGEN 抗原 (0.1 μ g/ml) 包被的平板之后, 对照组和试验组中的兔血清以不同系列的稀释率被培养。在此之后, 加入辣根过氧化物酶结合的抗-IgG 抗体 (对 Fc 特异)。所有的培养在 37 $^{\circ}$ C 下进行 1 小时, 在所提到的每个步骤之后, 用 PBS/0.05% 吐温 20 将血清洗涤 3 次。加入 1mg/ml 的 ABTS(2, 2-联氨基双(3-乙基苯并二氢噻唑啉磺酸))作为底质反应 30 分钟后, 使用 ELISA 阅读仪在 450nm 处测定吸光度。

结果, 如图 1 所示, 在每种分子量的聚- γ -谷氨酸和 TGEN 抗原通过皮下注射一起给药的情况下, 与皮下注射仅仅进行 TGEN 抗原给药相比, 在兔中针对 TGEN 抗原的抗体滴度更高。特别是, 当与 50kDa 聚- γ -谷氨酸一起处理时抗体滴度显示最高。在第一次注射后, 至少到 6 周时, 与对照组相比抗体滴度的增加才显著改善。

实施例 3. 通过聚- γ -谷氨酸生产针对 HBV 病毒的抗体

在实施例中, 为了检验通过腹膜注射聚- γ -谷氨酸是否显示出对其它可溶性抗原特异的免疫增强效果 (体液免疫应答), 使用 Balb/c 小鼠作为试验动物对来自酵母的乙肝病毒 (HBV) 的表面抗原进行试验。

作为对照组, 使用腹部单独注射精制 HBsAg (乙肝病毒表面抗原) L 粒子抗原 (1 μ g/PBS ml) 的 6 周大的 Balb/c 雌性小鼠, 并且作为对照

组，HbsAg L 粒子抗原（1 μ g/PBS ml）和分别具有 10kDa、50kDa 和 1000kDa 的聚- γ -谷氨酸（ γ -PGA）混合并腹部注射。而且，随着抗原浓度的变化，其中鼠腹部单独注射了精制 HbsAg L 粒子抗原（0.5 μ g/PBS ml）的对照组和 HbsAg L 粒子抗原（0.5 μ g/PBS ml）和分子量分别为 10kDa、50kDa 和 1000kDa 的聚- γ -谷氨酸混合物腹膜注射的试验组被用作实验。腹部注射后 5 周时，从试验组和对照组抽取血液并通过 ELISA（酶联免疫测定）测定血清中 HbsAg L 粒子血清转化率和抗体滴度。与实施例 2 相同，使用包被有 HbsAg L 粒子抗原（1 μ g/PBS ml）的平板进行 ELISA 检测。

结果，如图 2 所示，在每种分子量的聚- γ -谷氨酸和 HbsAg L 粒子抗原通过腹部注射一起给药的情况下，在鼠中针对 HbsAg L 粒子抗原的抗体抗 HbsAg L 粒子血清转化率与 HbsAg L 粒子抗原的量成比例，并高于那些仅仅皮下注射抗原的情况。特别是，当与 1000kDa 聚- γ -谷氨酸一起处理时抗体的血清转化率和滴度显示最高。

实施例 4. 通过聚- γ -谷氨酸表面表达犬细小病毒抗原蛋白质的乳酸菌的疫苗效果分析

在本实施例中，当除了可溶性抗原之外表达抗原蛋白的微生物被用作疫苗时，检验用作佐剂的本发明的聚- γ -谷氨酸是否显示出对抗原特异的免疫增强效应（体液免疫应答和粘膜免疫应答）。

犬细小病毒的衣壳抗原蛋白 VP2 被用作抗原。本发明的发明人已经开发了具有在表面上表达的所述衣壳抗原蛋白并将作为新的口服疫苗的乳酸菌（申请号为 2004-007321 的韩国专利申请）。在本实施例中，聚- γ -谷氨酸的抗体产率使用具有在表面上表达的犬细小病毒的所述衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌来检验。

特别地，在本发明中，具有在表面上表达犬细小病毒衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌被收集成给定的细菌浓度，然后使用 PBS 缓冲液（pH7.4）

清洗细胞，将在它们的表面上表达抗原的 5×10^9 个细胞的乳酸菌，口腔给药到 4-6 周大的 C57BL/6 鼠，以 1 天为间隔给药 5 次，1 周后以 1 天为间隔给药 5 次，2 周后以 1 天为间隔给药 5 次。而且，将在它们的表面上表达抗原的 1×10^9 个细胞的乳酸菌经鼻腔给药到鼠，以 1 天为间隔给药 3 次，1 周后，以 1 天为间隔给药 3 次，2 周后以 1 天为间隔给药 3 次并用作对照组。此外，以与所述对照组相同的组制备，将 $100\mu\text{g}$ 的 2000kDa 的聚- γ -谷氨酸与每个乳酸菌的混合给药到鼠，从而测定没有给药聚- γ -谷氨酸的鼠组和乳酸菌和 PGA 的混合物给药的鼠组的衣壳抗原蛋白 VP2 的抗体产率。

在口腔给药和鼻腔给药之后，以 2 周为间隔，收集鼠血清并测定血清中针对衣壳抗原蛋白的 IgG 抗体滴度，收集鼠小肠并使用 ELISA 测定肠洗液中和支气管肺泡洗液中针对衣壳抗原蛋白的 IgA 抗体滴度。

图 3 显示了鼠血清中针对犬细小病毒的衣壳抗原蛋白 VP2 的 IgG 抗体滴度，A 显示将表面表达衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌单独给药到口腔和鼻腔的组的抗体滴度，B 显示将表面表达衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌和聚- γ -谷氨酸混合给药到口腔和鼻腔的组的抗体滴度。

图 4 显示通过 ELISA 测定的肠洗液中和支气管肺泡洗液中针对犬细小病毒的衣壳抗原蛋白 VP2 的 IgA 抗体滴度，A 和 C 显示将表面表达衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌单独给药到口腔和鼻腔的组的 IgA 抗体滴度，B 和 D 显示表面表达衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌和聚- γ -谷氨酸混合给药到口腔和鼻腔的组的 IgA 抗体滴度。

如图 3 和 4 中所示，当表面表达衣壳抗原蛋白 VP2 的乳酸菌与聚- γ -谷氨酸一起给药时，确认血液、肠洗液和支气管肺泡洗液中针对犬细小病毒的衣壳抗原蛋白的 VP2 抗原的 IgG 和 IgA 抗体的滴度明显高于对照组。通过这些结果可以发现，与本发明的表面表达犬细小病毒的衣壳抗原蛋白 VP2 抗原的乳酸菌混合使用的聚- γ -谷氨酸是可使口腔给药的粘膜

疫苗的效果最大化的佐剂。

实施例 5. 通过聚- γ -谷氨酸表面表达传染性胃肠炎病毒抗原蛋白质的乳酸菌的疫苗效果分析

在实施例中，当将表面表达诱导猪传染性消化器官疾病的猪传染性胃肠炎病毒（TGE）核蛋白（N）抗原的乳酸菌口腔给药到猪时，检验以聚- γ -谷氨酸作为辅剂的效果。

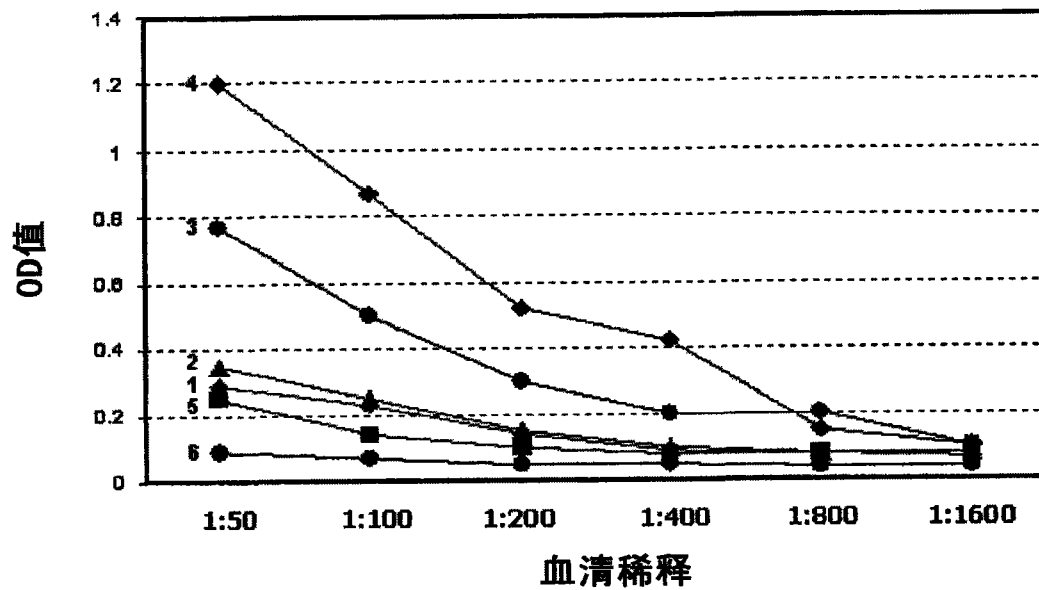
特别地，在本发明中，将表面表达猪传染性胃肠炎病毒的核壳体抗原蛋白 N 的乳酸菌被收集成给定的细菌浓度，在使用 PBS 缓冲液（pH7.4）清洗细胞后，在它们的表面上表达抗原的乳酸菌被粉末化。将粉末化的乳酸菌与猪饲料以猪饲料占 0.3% 的量混合并且将混合的饲料按 2kg/天喂给三个月大的猪 4 周作为对照组。2000kDa 的聚- γ -谷氨酸与乳酸菌以粉末化的乳酸菌的 0.3% 的量混合，将粉末与猪饲料以猪饲料占 0.3% 的量混合，然后按 2kg/天喂给三个月大的猪 4 周作为试验组。喂饲料之后，以 2 周为间隔，抽取血液并通过 ELISA 测定血清中针对 N 抗原蛋白的 IgG 抗体滴度。

结果，如图 5 所示，表面表达核壳体抗原蛋白的 N 抗原的乳酸菌与聚- γ -谷氨酸的混合物作为饲料被喂养的情况下，可以看出，与单独喂养表面表达核壳体抗原蛋白的 N 抗原的乳酸菌的情况相比，血清的 IgG 抗体滴度要高。通过这些结果证实，本发明的聚- γ -谷氨酸是可使口腔给药的粘膜疫苗的效果最大化的佐剂。

虽然已经参照具体特征对本发明进行了详细描述，对本领域技术人员来说显而易见的是，该描述仅仅是优选实施方式，并不是对本发明的范围的限制。因此，本发明的实质范围将由所附的权利要求项及其等同物来限定。

工业实用性

本发明提供一种包括有效剂量的聚- γ -谷氨酸的用作免疫增强剂（佐剂）的合成物的效果。本发明还提供包括所述免疫增强剂和抗原的用作疫苗的合成物的效果。本发明的佐剂几乎没有毒性和副作用，甚至与具有低免疫原性的抗原一起使用时显示出高抗体滴度，所以可通过将其加入到用作非传染性慢性疾病以及癌症的预防和治疗疫苗医学合成物中使用，尤其是加入到用作前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头和颈部肿瘤、阴部肿瘤、膀胱癌、脑肿瘤和胶质瘤的疫苗中。



- 1 ◆ : 5 Kda Kda γ -PGA + TGE N Ag
 2 ▲ : 10 Kda Kda γ -PGA + TGE N Ag
 3 ● : 20 Kda Kda γ -PGA + TGE N Ag
 4 ◆ : 50 Kda Kda γ -PGA + TGE N Ag
 5 ■ : TGE N Ag (猪传染性胃肠炎病毒核蛋白)
 6 ● : 对照兔
 : 皮下注射

图1

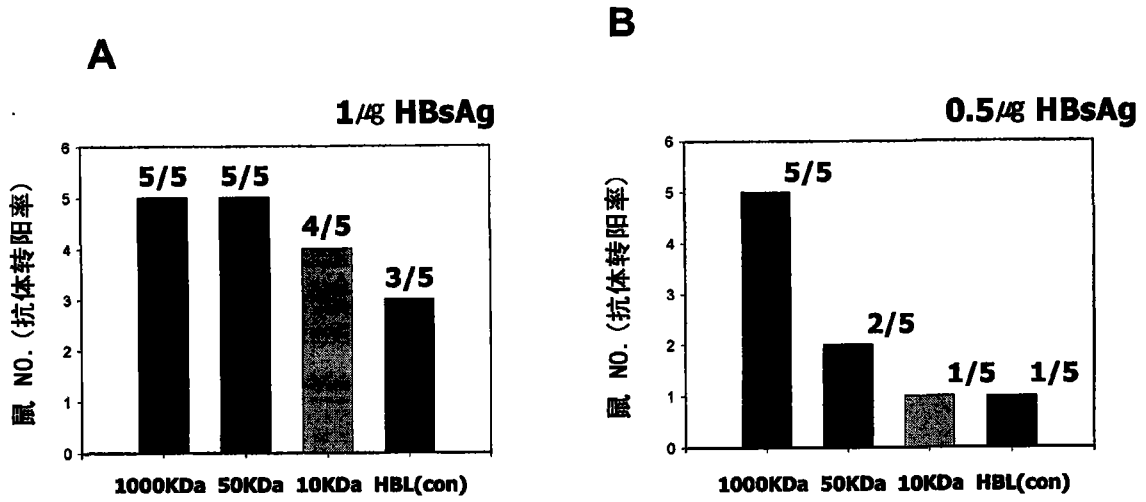


图2

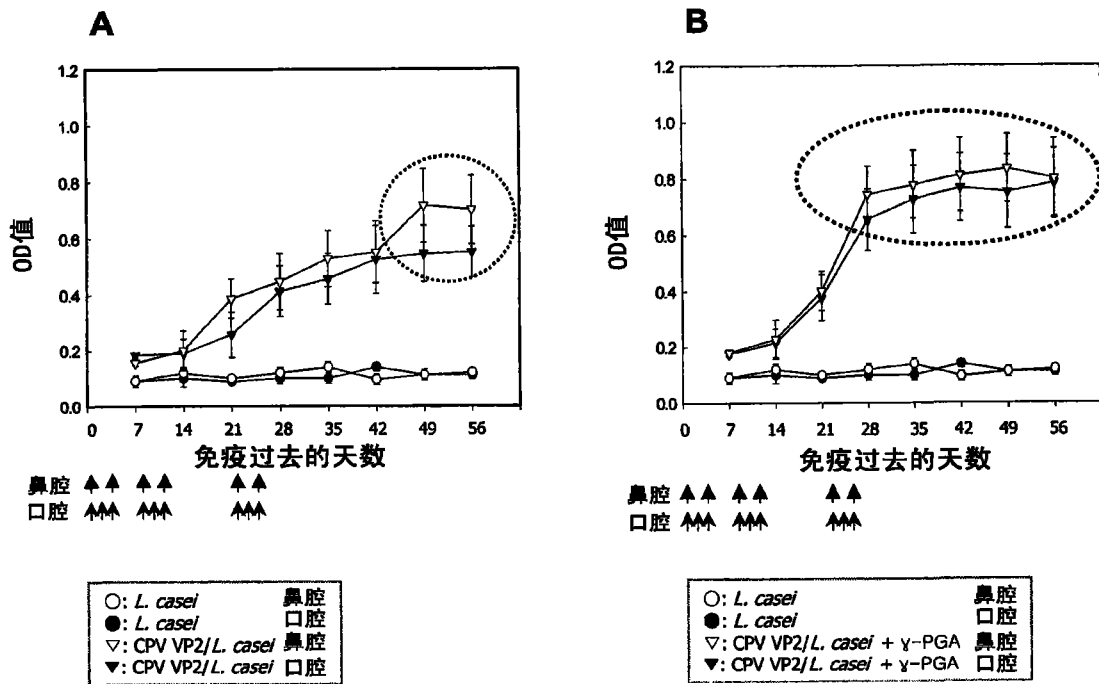


图3

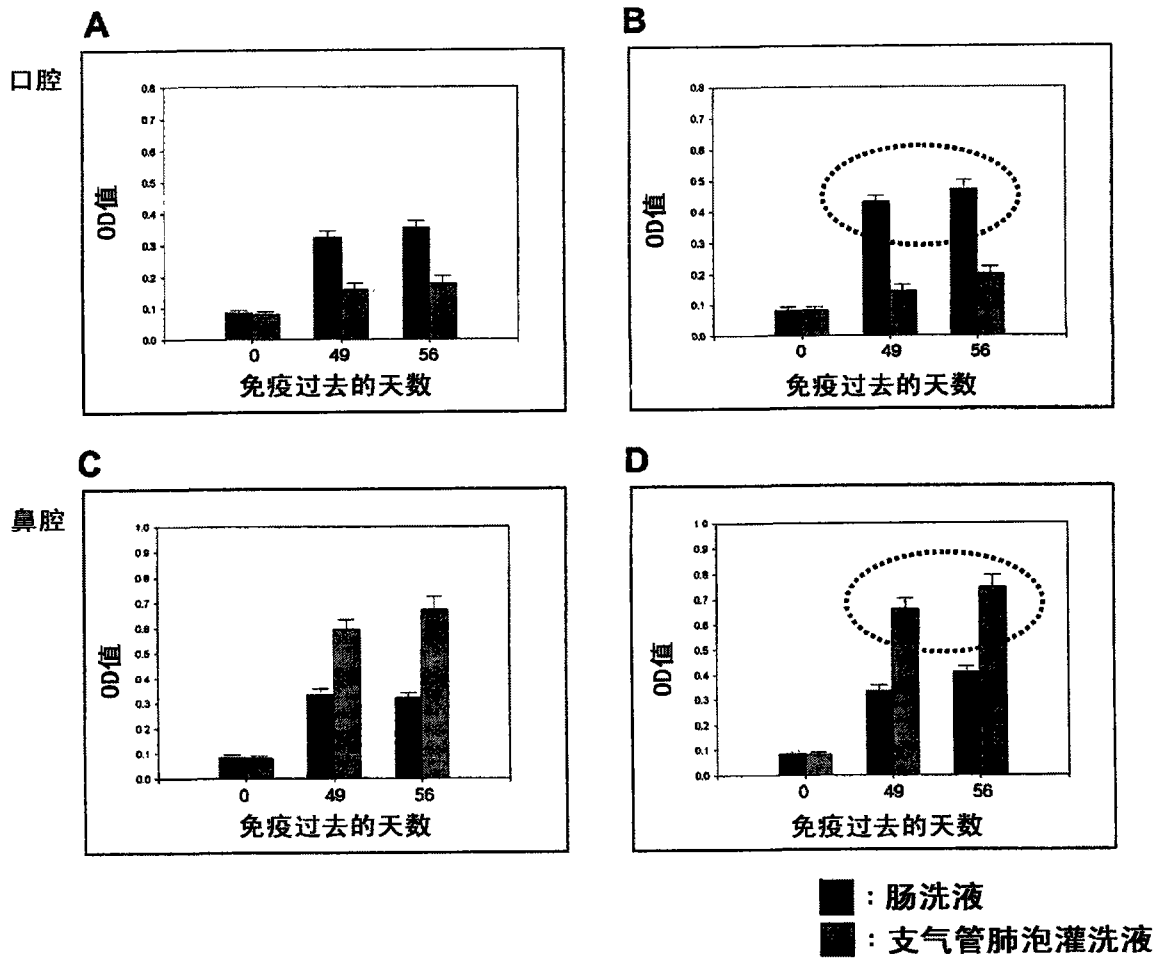


图4

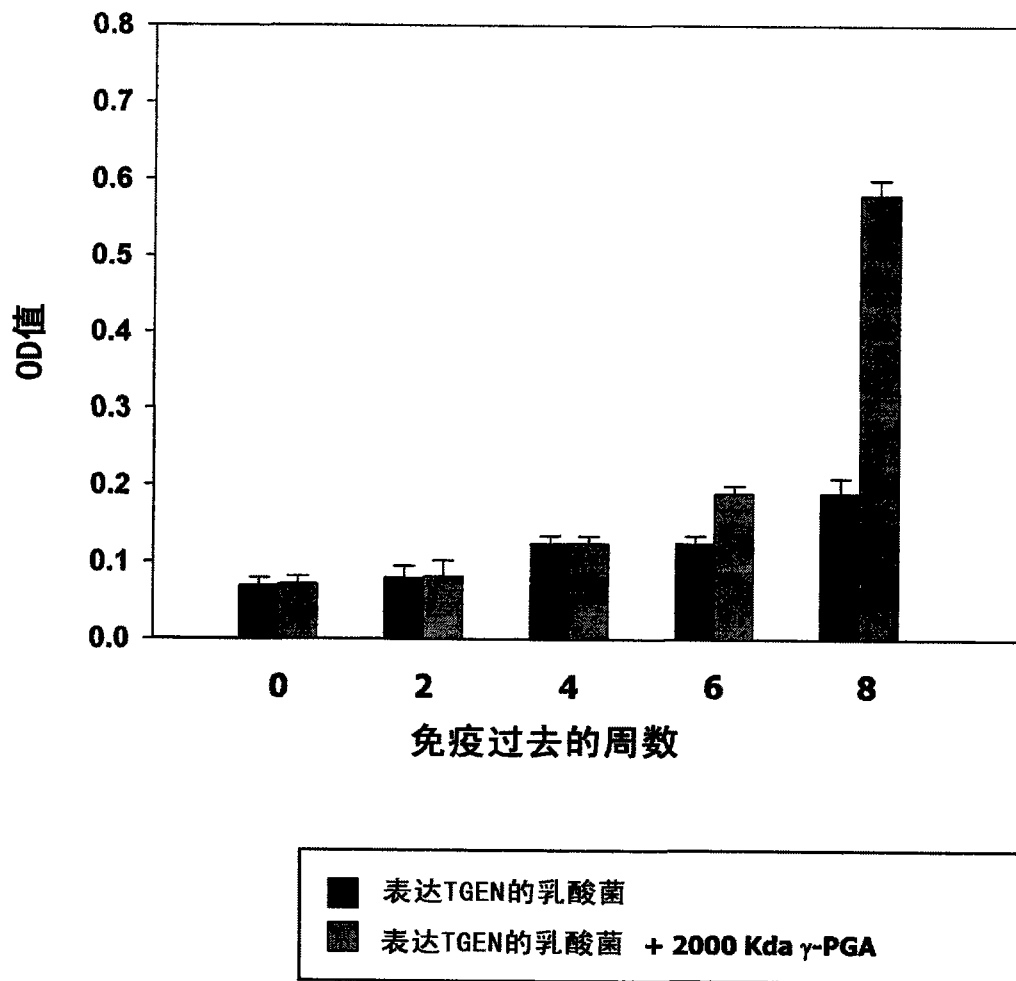


图5