

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 39/395

A61K 39/29

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97106291.9

[45]授权公告日 1999年7月14日

[11]授权公告号 CN 1044092C

[22]申请日 97.2.26 [24]颁证日 99.5.26

[21]申请号 97106291.9

[73]专利权人 上海医科大学

地址 200032 上海市医学院路 138 号

[72]发明人 闻玉梅 何丽芳 瞿 涤

[56]参考文献

CN1093927A 1993. 4. 22 A61K39/395

审查员 常 矛

[74]专利代理机构 上海医科大学专利事务所

代理人 吴桂琴

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抗原-抗体-重组 DNA 复合型疫苗

[57]摘要

本发明是一种抗原-抗体-重组 DNA 复合型疫苗。

本发明由微生物抗原-抗体与带有编码微生物的一种或几种基因的重组质粒 DNA 制备成复合型疫苗,通过诱生对微生物感染处于免疫应答低下或免疫耐受者产生应答,可显著提高机体的特异性体液免疫与细胞免疫,具有抗原提呈形式多,诱生免疫应答速度快,而且用量少,稳定性高等特点,不仅可用于注射免疫,还可用于呼吸道粘膜等局部免疫,经小鼠试验,抗体阳性率和效价以及特异性细胞免疫应答均高于对照组。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种复合型疫苗，其特征在于含有乙型肝炎病毒抗原、其相应抗体以及克隆有编码相同或不相同病毒蛋白基因的重组质粒 DNA，质粒 DNA 与抗原量的比例为 20-100:1，抗原与抗体的比例通过下列方法确定：用不同稀释度的抗原与抗体做方阵式滴定，共同在 37℃ 孵育 0.5-2 小时后置 4℃ 作用 12-20 小时，经 12,000 转/分离心沉淀，ELISA 测定上清液中抗原及抗体的吸光度均小于 0.4 后，为最适抗原与抗体比例管，吸去上清液，在沉淀物中加入与第一次相同量的抗原。
2. 根据权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于所述的乙型肝炎病毒抗原为乙型肝炎重组抗原或天然抗原。
3. 根据权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于所述的相应抗体为重组或经免疫后制备的动物或人源抗体，或免疫球蛋白。
4. 根据权利要求 3 所述的疫苗，其特征在于所述的抗体为乙型肝炎病毒抗体。
5. 根据权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于所述的重组质粒 DNA 含有真核细胞表达元件，同时含有编码相同或不相同病毒的蛋白基因的质粒 DNA。
6. 根据权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于其中的重组质粒 DNA 为含有编码乙肝病毒蛋白基因的重组质粒 DNA。
7. 根据权利要求 5 所述疫苗，其特征在于其中的重组质粒 DNA 含有编码丙肝病毒蛋白基因的重组质粒 DNA。

8. 一种按权利要求 1 所述的复合型疫苗的制备方法，其特征在于采用下列步骤完成：
- (1)用重组或血源纯化的肝炎病毒抗原，与重组或免疫获得的相应多克隆或单克隆抗体，用不同稀释度的抗原与抗体做方阵式滴定，共同在 37℃ 孵育 0.5-2 小时后置 4℃ 作用 12-20 小时，经 12,000 转/分离心沉淀，ELISA 测定上清液中抗原及抗体的吸光度均小于 0.4 后，加入与第一次相同量的抗原，制成抗原-抗体复合物；
 - (2)用真核细胞表达载体质粒 DNA，其中克隆有编码肝炎病毒蛋白基因，经转化细菌后，扩增、纯化、重组质粒 DNA，按 1 μ g 抗原加入 20-100 μ g 的比例缓慢将重组质粒 DNA 加入抗原-抗体复合物中，制成复合型疫苗。
9. 根据权利要求 8 所述的复合型疫苗制备方法，其特征在于其中抗原的稀释度为 0.5-5 微克/毫升，抗体 ELISA 效价为 1:1600-1:12800。

说 明 书

抗原—抗体—重组 D N A 复合型疫苗

本发明属疫苗领域。

疫苗作为预防疾病的一种手段对消灭天花及降低传染病的发病率已有显著的贡献。治疗性疫苗也已成为一种慢性细菌性和病毒性疾病的治疗制剂。治疗性疫苗可分为非特异性与特异性两类。非特异性治疗性疫苗（如卡介苗、短小棒状杆菌疫苗等）通过诱生机体的非特异性免疫应答，特别是细胞免疫，虽有部分治疗效果，但其作用不强。特异性治疗性疫苗可诱生机体产生特异性的细胞及 / 或体液免疫应答，从而可清除慢性感染的微生物，治疗疾病。目前已有的特异性治疗疫苗可分为：(1) 灭活或死的全菌疫苗：以特殊菌株或毒株作为疫苗株，灭活或杀死后制成。(2) 重组表达抗原疫苗：以基因重组方法表达一种或多种微生物抗原为疫苗。(3) 嵌合疫苗：以微生物特异抗原与细胞因子（干扰素或白细胞介素 - 2 等）组建表达融合蛋白制成疫苗。(4) 合成肽疫苗：根据微生物的抗原表位，用人工合成肽或嵌合肽（加佐剂或细胞因子等）制备疫苗。(5) 核酸（D N A 或聚核苷酸）疫苗：用编码微生物保护性抗原的基因片段克隆入转录表达载体，用该重组核酸注入机体诱生特异性免疫应答。迄今，尚无抗原—抗体—重组 D N A 复合型治疗性疫苗。与本发明有关的文献有：(1) WEN YM etc: Enhanced Immunogenicity in mice with Hepatitis B Vaccine Complexed to Human Hepatitis B Immunoglobulin, Chinese Medical Journal 1994; 107: 741; (2) Davis HL etc: DNA- based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody, Human Molecular Genetics 1993; 2: 1847; (3) PCT WO 95/11307, Nucleotide vector, composition containing such vector and vaccine for immunization against hepatitis. (4) PCT WO 95/20660, Immunization by inoculation of DNA transcription unit.

本发明的目的是提供一种由微生物抗原与抗体及重组DNA组成的治疗性疫苗及其制备方法。这种复合型治疗性疫苗可显著提高机体的特异性体液与细胞免疫，通过诱生对微生物感染处于免疫状态低下或免疫耐受者产生免疫应答，可用于治疗微生物的慢性或持续性感染者，如慢性病及无症状携带者。

本发明的技术方案是采用一种微生物的天然或重组抗原与相应的特异抗体加入克隆有编码微生物的某一种或几种蛋白基因的重组质粒DNA组成的复合型疫苗，其特点为：微生物蛋白抗原与相应的动物或人源免疫抗体或免疫球蛋白，在分别作不同稀释度的方阵滴定测定方法下，测定最适比例管。根据抗原蛋白的特性和抗体亲和力的不同，在37℃孵育2-4小时后，再经12,000转/分离心沉淀后，其上清残存的抗原及抗体量均很低，用ELISA测定法，吸光度(A)为0.4以下即为最适抗原与抗体比例管。之后吸去上清液，在沉淀物中再加入原来该管加入量同样量的抗原，以保证该复合物为抗原略过量，然后加入重组DNA(pCMV HBS)，该质粒DNA是采用带有在真核细胞内表达的调控元件，如巨细胞病毒的启动子等，及编码一种微生物的一种或几种蛋白基因的重组质粒DNA，也可以是带有编码其他微生物蛋白基因的重组质粒DNA。重组基因DNA量与抗原抗体复合物中的蛋白抗原量为20-100比1。这一种复合型疫苗用于免疫机体后，可有效地诱生强的特异性细胞免疫及体液免疫，表现为产生更高的特异性IgG抗体，其亚类可包括IgG1、IgG2a、IgG2b等，特异性淋巴细胞增殖反应阳性率升高，以及在特异抗原刺激下诱生机体的单核细胞产生更多的白细胞介素-2、 γ -干扰素等细胞因子。

本发明的特点为将微生物抗原与抗体与带有编码微生物的一种或几种基因的重组质粒DNA组成复合型免疫原，其优点为：(1)免疫原作为内源性及外源性抗原两种形式被提呈：仅用抗原-抗体复合物通过抗体IgG的Fc段可增强作为外源性抗原的提呈效率，本发明在抗原-抗体复合物中加入重组质粒DNA，则可通过质粒DNA被摄入细胞后，在细胞内表达所编码的微生物抗原作为内源性抗原提呈，这种免疫原是同时具备模拟灭活的微生物抗原疫苗及模拟减毒活疫苗特性的一种新型疫苗。(2)更有效地诱生体液与细胞免疫：抗原-抗体复合物较单纯抗原可诱生

更高滴度的抗体及淋巴细胞增殖反应，但是重组DNA直接免疫可诱导特异性T杀伤性细胞活性及释放更多的淋巴因子。二者相加后可更有效地使机体产生体液与细胞免疫。(3)诱导免疫应答的速度快：用核酸疫苗免疫后，需经机体内表达抗原后被抗原提呈细胞加工，用抗原—抗体复合物作为载体，可以迅速地携带核酸疫苗进入抗原提呈细胞，加速诱导抗体及特异性细胞免疫，因此比单独采用重组DNA免疫更有效。(4)可组成多价疫苗：有些微生物疫苗制备时或因难以获得稳定、有效的核酸疫苗，或因培养微生物条件苛刻，难以大量制备疫苗，利用一种容易获得的微生物抗原—抗体为复合物加入数种多价核酸质粒DNA，可有效地组建数种微生物疫苗。(5)由于通过抗原—抗体复合物携带核酸疫苗，各种微生物抗原的用量及重组核酸的用量均可相应减少，并可以增强重组质粒DNA的稳定性。(6)复合型疫苗中的抗原—抗体复合物与有抗原受体的细胞接触后其中的质粒DNA有更多的机会与免疫细胞接触，可吸引多种免疫细胞，更有利于重组核酸的抗原表达。(7)由于抗原—抗体复合物加入重组核酸后，后者相对稳定，不仅可用于注射免疫，还可用于呼吸道粘膜、生殖道粘膜等局部免疫，扩大疫苗的使用途径。

本发明通过以下步骤制备抗原—抗体—重组DNA复合型疫苗（以乙肝病毒为例）：(1)先用重组表达或血源纯化的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)与重组表达的相应抗体(抗-HBs)或动物免疫血清或人源的含抗HBs的高效价免疫球蛋白(HBIG)，以HBsAg 0.5-5微克/毫升蛋白量与至少含有200-400国际单位抗HBs的HBIG或抗-HBs效价为1:1600-12800(ELISA法)，0.5-5微克/毫升的蛋白量组建成抗原—抗体复合物；(2)将上述两种成份各自从1:50起作5倍系列稀释，用ELISA进行方阵式滴定，各管经37℃孵育2小时后置4℃ 12-20小时，经12,000转/分离心30分钟，吸出上清液分别测定游离的HBsAg及抗HBs。在方阵滴定中，选择残余HBsAg及抗HBs量均用ELISA测定为吸光度<0.4，则确定为最适比例管，吸去该管上清液后，再加入原加入该管量相同量的HBsAg悬浮沉淀物；(3)扩增并提取、克隆有编码HBsAg基因，用含有巨细胞病毒早期启动子及克隆有乙肝病毒S基因的真核细胞表达载体质粒DNA，经用Qiagen柱纯化，获得纯度高的重组质粒DNA，在上述悬浮的HBsAg-抗HBs复合管中缓慢滴入上述

重组质粒DNA，根据HBsAg量，按20-100倍加入质粒DNA。(4)根据需要，加入氢氧化铝为佐剂，经无菌、安全、毒性实验合格后可作为治疗性疫苗。

本发明实施例与效果：

实施例一：

对小鼠进行HBsAg，HBsAg-HBIG及HBsAg-HBIG-重组带HBs编码基因的质粒DNA的体液免疫应答实验，结果显示，HBsAg-HBIG-重组质粒DNA免疫小鼠的抗体阳性率高，抗体效价亦高于其他对照组。

取血源纯化的抗原HBsAg27.5ug，加入经1:30稀释后的效价ELISA为1:3200的鼠抗HBs 47ul，制成抗原-抗体复合物后，在其中加入带有编码HBs基因及CMV启动子的重组质粒DNA100ug，对8组，每组6只，共48只Balb/c小鼠，分别进行不同剂量肌肉注射后，定期采血清用ELISA试剂盒测抗-HBs效价，8周后再加强注射一次，结果显示，抗原-抗体-重组DNA作为免疫原，抗体出现早、效价高，加氢氧化铝佐剂后尤为明显，单纯空载体DNA无诱生抗体活性，单纯抗原及单纯抗体免疫组鼠产生抗体的能力或为无，或为极低。

表一为不同组别小鼠免疫后抗-HBs阳性率，其中在第八周后进行第二次免疫。表二为不同组别的小鼠抗-HBs效价，其中表内数字为该效价的阳性动物数。

表一：不同组别小鼠免疫后抗-HBs阳性率(%)

组别	免疫成份	周 次			
		4	6	8	9
1	HBsAg	0	/	17	83
2	鼠抗-HBs	0	/	0	0
3	重组质粒DNA	67	67	83	80
4	HBsAg+鼠抗-HBs	20	60	60	100
5	HBsAg+鼠抗-HBs+氢氧化铝	100	100	100	100
6	HBsAg+鼠抗-HBs+重组质粒DNA	100	100	100	100
7	HBsAg+鼠抗-HBs+重组质粒DNA+氢氧化铝	100	100	100	100
8	空载体质粒DNA	0	/	0	0

表二：不同组别小鼠抗HBs效价

组 别	第一次免疫后		第二次免疫后			
	<1: 400	1: 800-1600	<1: 400	1: 800-1600	1: 3200-12800	>1: 25600
1 HBsAg	1	0	4	1	0	0
2 鼠抗-HBs	0	0	0	0	0	0
3 重组质粒DNA	5	0	3	1	0	0
4 HBsAg+鼠抗-HBs	3	0	4	1	0	0
5 HBsAg+鼠抗-HBs +氢氧化铝	2	3	0	0	5	0
6 HBsAg+鼠抗-HBs +重组质粒DNA	2	4	0	0	5	0
7 HBsAg+鼠抗-HBs +重组质粒DNA +氢氧化铝	3	3	0	0	0	6
8 空载体质粒DNA	0	0	0	0	0	0

实施例二：

经小鼠脾细胞对重组质粒DNA—抗原抗体复合物及单纯抗原的特异性细胞免疫试验显示，重组质粒DNA免疫可诱导产生较抗原—抗体复合物更高更多的白介素2 (IL2)。

取血浆纯化的HBsAg抗原和效价ELISA为1: 3200的鼠抗HBs制成抗原抗体复合物后，加入重组质粒DNA，对5组共30只Balb/c小鼠分别肌肉注射进行免疫，第一组免疫原为HBsAg 1ug，第二组免疫原为相当于含1ug HBsAg的抗原抗体复合物，第三组免疫原为重组质粒DNA 200ug，第四组免疫原为抗原—抗体—重组质粒DNA，其中含1ug的HBsAg及200ug的重组质粒DNA。第五组为空白载体200ug作为对照。免疫后取脾细胞培养，以Amersham公司生产的试剂盒测定上清液中白细胞介素2，结果显示：HBsAg—抗HBs—重组质粒DNA免疫后的鼠脾细胞经特异HBsAg 诱生的IL-2量高于单用HBsAg—抗HBs复合物或单用重组质粒DNA免疫，说明HBsAg—抗HBs—重组质粒DNA新型疫苗可明显提高动物的特异性细胞免疫应答。

表三为不同组别小鼠脾细胞在特异抗原 (HBsAg) 刺激下诱生的白细胞介素—2。

表三：不同组别小鼠脾细胞在特异抗原 (HBsAg)
刺激下诱生的白细胞介素—2

组别	诱生IL-2 pg/ml
1 单独HBsAg免疫	111
2 HBsAg-抗HBs复合物	122
3 重组质粒DNA	254
4 HBsAg-抗HBs-重组质粒DNA	307
5 空载体DNA对照	119