



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105396131 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201511022856. X

(22) 申请日 2015. 12. 29

(71) 申请人 天津佐沐生物科技有限公司

地址 300000 天津市滨海新区经济技术开发区洞庭路 220 号天津国际医药联合研究院 14 层 S1401、1421 室

(72) 发明人 吴全忠 王寿山 米娜 刘恒权
高小光 张忠江

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61K 39/15(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用于呼肠弧灭活疫苗的佐剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于呼肠弧灭活疫苗的佐剂及其制备方法,该佐剂创新性的引入了 ISCOM 基质成分,可刺激机体产生较强的细胞免疫和体液免疫,具有更好的免疫促进作用,延长疫苗免疫保护期。当本发明佐剂用于呼肠弧灭活疫苗制备时,剂型为油包水 (W/O) 型,由于成分配方的合理化设计使得利用该佐剂制备的呼肠弧灭活疫苗具有较好的稳定性,在 2 ~ 8℃ 条件下保存 18 个月仍保持性状稳定。此外,实际应用发现,以该佐剂制备的呼肠弧灭活疫苗接种鸡后无局部或全身性不良反应,安全性可靠,而且较现有技术佐剂制备的呼肠弧灭活疫苗具有更好的免疫效果。本发明以创新性的技术改进实现了突出的技术效果,同时成本较低,易于实现,因此具有突出的推广前景。

1. 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂,其特征在于该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分,其中所述油相包括以下成分:注射级白油 80 ~ 85% (w/w),span806 ~ 8% (w/w),吐温 806 ~ 8% (w/w);所述 ISCOM 基质包括以下成分:QuilA0.2 ~ 5mg/ml,胆固醇 0.2 ~ 5mg/ml,左旋咪唑 3 ~ 8mg/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的佐剂,其特征在于所述 QuilA 的含量是 1 ~ 5mg/ml。

3. 根据权利要求 1 所述的佐剂,其特征在于所述胆固醇的含量是 1 ~ 5mg/ml。

4. 一种权利要求 1 所述佐剂的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

2) 取配方量的注射级白油,灭菌后向其中加入配方量的 span80 和吐温 80,乳化后即得到油相。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于步骤 2) 是:取配方量的注射级白油,灭菌后向其中加入配方量的 span80,以 60 ~ 100r/min 的转速搅拌 4 ~ 6min,而后在搅拌状态下向其中加入吐温 80,以 60 ~ 100r/min 的转速搅拌 4 ~ 6min,即得到油相。

一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及兽用疫苗技术领域,具体涉及一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 呼肠孤病毒是具有分节段的双链 RNA 基因组的一类病毒,该病毒分布极广,易在禽类间爆发流行,致死率较高,同时还可以突破宿主屏障,感染包括人类在内的哺乳动物,因此该疾病对人类健康和经济发展具有严重危害。呼肠孤宿主广泛,因此防控工作具有较大难度,除了保证适当的卫生条件和隔离措施之外,接种疫苗是控制呼肠孤流行的关键性措施。现有技术中,尽管呼肠孤疫苗早已形成产品,但仍存在着诸如保护效力不足、需多次免疫才能起效、成本较高等技术缺陷,从而难以满足使用需求。

[0003] 为了提升疫苗的免疫效果,现有技术的研究者从多方面进行了努力,例如开发免疫效果更好的抗原物质、在接种疫苗的同时饲喂免疫促进剂等。佐剂 (adjuvant) 是与抗原混合后注射于生物体内、能非特异性改变或增强机体对该抗原的特异性免疫应答的物质,因此开发适宜的疫苗佐剂将有助于提升疫苗质量,增强免疫效果。

[0004] 现有技术中,免疫佐剂多选用白油佐剂、氢氧化铝佐剂、类脂佐剂和蜂胶佐剂等,其中白油佐剂被认为有助于强化疫苗免疫效力,目前应用较为广泛。白油佐剂常用剂型包括水包油 (O/W)、水包油包水 (W/O/W)、油包水 (W/O) 三种,其中油包水 (W/O) 型应用最为普遍,但也存在一定的技术缺陷,例如其粘度较高、注射困难;同时由于疫苗中白油含量相对较高,常常导致严重的接种副反应,形成无菌性化脓损害和接种部位周围的肉芽肿,可产生外部可见的浮肿、肿胀、硬结和坏死;此外有研究认为该剂型的佐剂接种后可能在接种部位形成残留,从而带来安全隐患。

发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂及其制备方法,以解决现有技术的佐剂对呼肠孤灭活疫苗免疫效力促进作用较低的技术问题。

[0006] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术的油包水型佐剂易使得疫苗注射后产生副作用。

[0007] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术的佐剂不稳定、易随时间推移发生性质改变。

[0008] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂,该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分,其中所述油相包括以下成分:注射级白油 80 ~ 85% (w/w), span806 ~ 8% (w/w), 吐温 806 ~ 8% (w/w);所述 ISCOM 基质中包括以下成分:QuilA 0.2 ~ 5mg/ml, 胆固醇 0.2 ~ 5mg/ml, 左旋咪唑 3 ~ 8mg/ml。

[0010] 优选的,所述 QuilA 的含量是 1 ~ 5mg/ml。

[0011] 优选的,所述胆固醇的含量是 1 ~ 5mg/ml。

[0012] 本发明同时还提供了上述佐剂的制备方法,该方法包括以下步骤:

[0013] 1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

[0014] 2) 取配方量的注射级白油,灭菌后向其中加入配方量的 span80 和吐温 80,乳化后即得到油相。

[0015] 在此方法基础上优选的,步骤 2) 是:取配方量的注射级白油,灭菌后向其中加入配方量的 span80,以 60 ~ 100r/min 的转速搅拌 4 ~ 6min,而后在搅拌状态下向其中加入吐温 80,以 60 ~ 100r/min 的转速搅拌 4 ~ 6min,即得到油相;更优的,上述两次搅拌转速均为 80r/min、搅拌时间均为 5min。

[0016] 本发明的佐剂在疫苗的制备过程中可以是通过以下方法使用的:将疫苗抗原溶液与本发明佐剂的 ISCOM 基质混合作为水相,将该水相与本发明佐剂的油相按 (1:1) ~ (1:3) (v/v) 比例混合,即得到疫苗。

[0017] 在以上技术方案中,ISCOM(immunostimulatingcomplex) 基质是一种含有抗原成分的免疫刺激复合物,称为免疫刺激复合物基质,由 QuilA(皂苷活性成分)、胆固醇等制备得到,其特点在于能有效地活化辅助型 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,促进细胞免疫应答,尤其是 Th1 型细胞免疫应答,其次,ISCOM 基质通常人们将其应用到活疫苗中,本发明创造性地将其应用到灭活疫苗中,实验证实,能更有效地激活免疫,显著提高了全病毒的抗原呈递及疫苗的持续性。左旋咪唑是一种广谱驱虫药,同时研究发现其具有明显的免疫调节作用。

[0018] 本发明用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂创新性的引入了 ISCOM 基质成分,提升了免疫促进效果,可刺激机体产生较强的细胞免疫和体液免疫,具有更好的保护作用,延长疫苗免疫保护期。当本发明佐剂用于呼肠孤灭活疫苗制备时,剂型为油包水 (W/O) 型,由于成分配方的合理化设计使得利用该佐剂制备的呼肠孤灭活疫苗具有较好的稳定性,在 2-8℃ 条件下保存 18 个月仍保持性状稳定。此外,实际应用发现,以该佐剂制备的呼肠孤灭活疫苗接种鸡后无局部或全身性不良反应,安全性可靠,而且较现有技术佐剂制备的呼肠孤灭活疫苗具有更好的免疫效果。本发明以创新性的技术改进实现了突出的技术效果,同时成本较低,易于实现,因此具有突出的推广前景。

具体实施方式

[0019] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的相同含义。

[0020] 实施例 1

[0021] (1) 佐剂油相的制备

[0022] 油相是向按照百分比 (白油 :span80 = 17:1) 组成的混合液中加入硬脂酸铝,其加入量为每 100ml 混合液加入 2g 硬脂酸铝。120℃、20min 高温蒸汽灭菌,室温保存备用。

[0023] (2) 佐剂 ISCOM 基质的制备

[0024] 分别称取 Quil A 100mg、胆固醇 100mg、左旋咪唑 500mg,用 10mlPBS 溶解混匀得 10 倍浓度的 ISCOM 基质。

[0025] (3) 呼肠孤灭活病毒液的制备

[0026] 按照《兽用生物制品质量标准汇编》(2012),相关要求制备灭活的呼肠孤病毒抗原水溶液,灭活前每 0.2ml 病毒液病毒含量应 $\geq 10^{7.0}LD_{50}$ 。

[0027] (4) 呼肠孤疫苗的制备

[0028] 在无菌操作情况下,将上述 (2) 中制备的 ISCOM3ml 与 (3) 中制备的呼肠孤灭活病毒液 15g 放入 50ml 的烧杯中,混匀;另取 (1) 中制备的油相加热至 30℃,取 13g 也放入该烧杯中,同时加入磁力转子置磁力搅拌器(含加热功能)上进行搅拌乳化,转速为 2000 转/min,温度为 30℃,搅拌 30min,即成,命名为呼肠孤疫苗 A。

[0029] 同法不加 ISCOM 基质制作白油对照疫苗,命名为对照疫苗 B

[0030] 同法用法国 SEPPIC 公司生产的 ISA206 佐剂替代本发明的复方油佐剂,制备对照疫苗,命名对照疫苗 M。

[0031] (5) 疫苗物理性状和免疫活性的比较见表 1。

[0032] 表 1 疫苗呼肠孤疫苗 A 和对照疫苗 B、M 的比较

[0033]

对比项	呼肠孤疫苗 A	对照疫苗 B	对照疫苗 M
外观	均匀乳状液	均匀乳状液	均匀乳状液
离心稳定性	3000r/min 离心 15min, 无水相析出	3000r/min 离心 15min, 有 0.2ml 水相析出	3000r/min 离心 15min, 有 0.2ml 水相析出
2-8℃ 稳定性	18 个月稳定	12 个月稳定	12 个月稳定
粘度	3.3 秒/0.4ml	3.9 秒/0.4ml	3.7 秒/0.4ml
抗体测定	小鼠免疫后 4 周抗体阳性率 90%	小鼠免疫后 4 周抗体阳性率 60%	小鼠免疫后 4 周抗体阳性率 75%
副反应	10 只雏鸡免疫后, 注射部位均没有肿块发生	10 只雏鸡免疫后, 有 2 只注射部位有肿块, 1 周后消失	10 只雏鸡免疫后, 有 1 只注射部位有肿块, 1 周后消失

[0034] 通过表 1 可以看出,采用本发明复合佐剂制备的疫苗,稳定性为 18 个月,比对照疫苗 M 稳定,同时,其免疫效果比对照疫苗 M 好,副反应比对照疫苗 M 少,具有非常好的实际使用价值。

[0035] 表 2 :肉雏鸡接种不同呼肠孤疫苗后的呼肠孤血凝抑制抗体水平 (log₂ 平均值)

[0036]

免疫周数	呼肠孤疫苗 A	对照疫苗 B	对照疫苗 M
0	10.21	8.20	8.19
1	9.92	4.88	5.15
2	7.65	4.15	4.85
3	8.07	4.20	4.93
4	8.64	2.00	3.85
5	7.89	2.12	3.23
6	7.97	2.08	3.03

[0037] 依据表 2 的分组情况, 每组重复 3 批制得呼肠孤复合佐剂灭活疫苗, 肉雏鸡注射本发明的疫苗和对照疫苗后, 鸡组的血凝抑制抗体水平上升速度比对照组更快, 随着注射天数的增加, 呼肠孤疫苗抗体水平持续性较好, 白油对照组和对照疫苗 M 组抗体水平持续性均比呼肠孤疫苗组低。

[0038] 实施例 2

[0039] 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂, 该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分, 其中所述油相由以下成分组成: 注射级白油 85% (w/w), span807% (w/w), 吐温 808% (w/w); 所述 ISCOM 基质中包括以下成分: QuilA 0.2mg/ml, 胆固醇 0.2mg/ml, 左旋咪唑 3mg/ml。

[0040] 所述佐剂是通过以下方法制备的:

[0041] 1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

[0042] 2) 取配方量的注射级白油, 灭菌后向其中加入配方量的 span80, 以 60r/min 的转速搅拌 4min, 然后在搅拌状态下向其中加入吐温 80, 以 60r/min 的转速搅拌 4min, 即得到油相。

[0043] 实施例 3

[0044] 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂, 该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分, 其中所述油相由以下成分组成: 注射级白油 84% (w/w), span808% (w/w), 吐温 808% (w/w); 所述 ISCOM 基质中包括以下成分: QuilA5mg/ml, 胆固醇 5mg/ml, 左旋咪唑 8mg/ml。

[0045] 所述佐剂是通过以下方法制备的:

[0046] 1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

[0047] 2) 取配方量的注射级白油, 灭菌后向其中加入配方量的 span80, 以 100r/min 的转速搅拌 6min, 然后在搅拌状态下向其中加入吐温 80, 以 100r/min 的转速搅拌 6min, 即得到油相。

[0048] 实施例 4

[0049] 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂, 该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分, 其中所述油相由以下成分组成: 注射级白油 84.5% (w/w), span808% (w/w), 吐温 807.5% (w/w); 所述 ISCOM 基质中包括以下成分: QuilA 2.2mg/ml, 胆固醇 1mg/ml, 左旋咪唑 6mg/ml。

[0050] 所述佐剂是通过以下方法制备的:

[0051] 1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

[0052] 2) 取配方量的注射级白油, 灭菌后向其中加入配方量的 span80 和吐温 80, 乳化后即得到油相。

[0053] 实施例 5

[0054] 一种用于呼肠孤灭活疫苗的佐剂,该佐剂分为油相和 ISCOM 基质两部分,其中所述油相由以下成分组成:注射级白油 85% (w/w), span80 8% (w/w),吐温 807% (w/w);所述 ISCOM 基质中包括以下成分:QuilA 1mg/ml,胆固醇 2.3mg/ml,左旋咪唑 5mg/ml。

[0055] 所述佐剂是通过以下方法制备的:

[0056] 1) 取配方量的 QuilA、左旋咪唑、胆固醇溶于 PBS 缓冲液中得到 ISCOM 基质;

[0057] 2) 取配方量的注射级白油,灭菌后向其中加入配方量的 span80,以 80r/min 的转速搅拌 5min,然后在搅拌状态下向其中加入吐温 80,以 80r/min 的转速搅拌 5min,即得到油相。

[0058] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。