

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-527191

(P2019-527191A)

(43) 公表日 令和1年9月26日(2019.9.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/135 (2006.01)	A 6 1 K 39/135	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-529165 (P2018-529165)	(71) 出願人	516158068
(86) (22) 出願日	平成29年7月28日 (2017.7.28)		江▲蘇▼省▲農▼▲業▼科学院
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月4日 (2018.6.4)		J I A N G S U A C A D E M Y O F
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/094856		A G R I C U L T U R A L S C I E N C
(87) 国際公開番号	W02018/227728		E S
(87) 国際公開日	平成30年12月20日 (2018.12.20)		中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江▲蘇▼
(31) 優先権主張番号	201710441094.X		省南京市玄武区▲鍾▼▲靈▼街50号
(32) 優先日	平成29年6月13日 (2017.6.13)	(74) 代理人	100095407
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		弁理士 木村 満
		(74) 代理人	100109449
			弁理士 毛受 隆典
		(74) 代理人	100132883
			弁理士 森川 泰司
		(74) 代理人	100148633
			弁理士 桜田 圭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫増強剤、口蹄疫不活化ワクチンおよびその製造方法

(57) 【要約】

本願は複数成分配合免疫増強剤およびその応用を開示する。本発明は複数成分配合免疫増強剤の製造および豚口蹄疫ワクチンへの応用に関する。本発明は豚口蹄疫ワクチンを研究の主体として、これをもとに、数種類の著しく免疫増強作用を有する免疫増強剤を選択して複数成分配合免疫増強剤に使用して、抗原/ワクチンと免疫増強剤を混合した後、ワクチン免疫豚を作製した。動物実験の結果から、本発明は著しく免疫増強作用を有し、複数成分配合免疫増強剤を含むワクチンを1回接種した後、抗体生成のウィンドウピリオドを7日間に短縮し、液相ブロッキングE L I S A抗体力価が著しく高くなり、抗体の合格率が著しく上昇し、抗体持続期間を少なくとも7ヶ月まで延ばすことができ、かつ安全で、明らかな免疫副反応が認められなかった。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

5 ~ 520  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のモノホスホリルリピド A と、10 ~ 520  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のムラミルジペプチドと、1 ~ 520  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $\alpha$ -グルカンと、0.05 ~ 5.2  $\text{mg}/\text{mL}$  のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、複数成分配合免疫増強剤。

## 【請求項 2】

5 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のモノホスホリルリピド A と、10 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のムラミルジペプチドと、1 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $\alpha$ -グルカンと、0.05 ~ 5.0  $\text{mg}/\text{mL}$  のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の複数成分配合免疫増強剤。

10

## 【請求項 3】

100 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のモノホスホリルリピド A と、100 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のムラミルジペプチドと、50 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $\alpha$ -グルカンと、1 ~ 5.0  $\text{mg}/\text{mL}$  のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の複数成分配合免疫増強剤。

## 【請求項 4】

モノホスホリルリピド A、ムラミルジペプチド、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類を含む溶液を調製し、ツイーン 80 と混合し、水相溶液を得るステップ 1 と、

ホワイトオイルとスパン 80 を混合し、油相溶液を得るステップ 2 と、

前記水相溶液と前記油相溶液を混合して乳化した後、複数成分配合免疫増強剤を含むシヤペロンワクチンを得るステップ 3 と、

20

を含むことを特徴とする、請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載の複数成分配合免疫増強剤の製造方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載の免疫増強剤のワクチン製造への応用。

## 【請求項 6】

請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載の複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチン。

## 【請求項 7】

不活化抗原溶液をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

30

## 【請求項 8】

前記不活化抗原溶液と前記複数成分配合免疫増強剤との体積比は 9 : 1 ~ 8 : 1 であることを特徴とする、請求項 7 に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

## 【請求項 9】

前記不活化抗原溶液は O、A、亜 I 型口蹄疫不活性化抗原、ポリペプチドあるいはその他の遺伝子工学発現産物の一種あるいは数種を含むことを特徴とする、請求項 7 に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

## 【請求項 10】

複数成分配合免疫増強剤と不活化抗原溶液を混合した後、さらにツイーン 80 と充分混合して水相溶液を得るステップ 1 と、

40

ホワイトオイルとスパン 80 を混合して、油相溶液を得るステップ 2 と、

前記水相溶液と前記油相溶液を充分混合して複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンを得るステップ 3 と、

を含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は生物製薬領域に関し、特に免疫増強剤、口蹄疫不活化ワクチンおよびその製造

50

方法に関する。

【背景技術】

【0002】

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease、FMD) は口蹄疫ウイルス (Foot-and-mouth disease virus、FMDV) によって引き起こされる急性、熱性、高度接触感染性の伝染病である。口蹄疫ウイルスはmiRNAウイルス科 (Picornaviridae)、口蹄疫ウイルス属 (Aphthovirus) に属し、A、O、C、SAT1、SAT2、SAT3およびAsiA1型の7つの血清型がある。また、それぞれの血清型にはいくつかの亜型が含まれる。当該ウイルスは各型間に交叉免疫性がないだけでなく、同一血清型の各亜型間にもわずかに一部しか交叉免疫性がない。2012年、国務院弁公庁は国家中長期動物疫病予防と治療計画 (2012 - 2020年) を頒布し、口蹄疫を優先的に予防および治療する病気の一つに認定している。

10

【0003】

我が国 (中国) では、口蹄疫ワクチンが強制免疫ワクチンに属しており、現在使用されている主なワクチンは不活化ワクチンであるが、抗体の生成が遅く、免疫期が短く、抗原スペクトルが狭く、不活化が不十分などの短所があった。現在、多くの研究者は不活化ワクチンの改善と新規開発、例えば新型流行ウイルス株、製造プロセスなどの研究に従事し、抗原を更に純化し、免疫効果をもっと良くし、アジュバントを更に有効にし、不活化の信頼性を更に高めるなどの研究が行われているが、それぞれのプロセスの研究期間と検証期間が長い。通常豚口蹄疫ワクチンの接種回数として普通2~3回が必要であるにもかかわらず、抗体持続期間はわずか3~4ヶ月で、接種後の防御を高めても効力がわずか70~80%しかない。そのため、口蹄疫ワクチンの品質を高める余地が大きく残されており、免疫増強剤の改善は実用可能な技術の一つである。

20

【0004】

ゲンゲ属多糖類 (Astragalus polysacharin) には非特異免疫機能と体液性免疫機能を著しく強める効果がある。ゲンゲ属多糖類は有機体を誘導してインターフェロンを発生させることができ、有機体内でのウイルスの複製を阻害し、有機体の免疫機能を高めるとともに、リンパ細胞と網状内皮層細胞の生成を刺激および強化し、網状内皮層細胞とマクロファージの貪食機能を強めることができ、かつ体液、粘膜と細胞免疫に対して優れた促進および調節効果を有する。飼料添加剤として動物の養殖に応用した場合、動物の成長を促進し、有機体の抵抗力を高めるなどの効果がある。天然産物であるため原料が豊富で、価格が安く、長期にわたって使用しても組織細胞に対する毒性などの副作用が少なく、残留量も低い。しかし、飼料あるいは飲用水に添加する場合、基本使用量が少なくとも1グラム/日で多くの量が必要であるため、大量に消費し、かつ免疫増強効果が不確実で、評価しにくいなどの短所があった。

30

【0005】

Toll様受容体 (TLR) は哺乳動物の免疫細胞に存在する膜貫通タンパク質で、その主な免疫学機能として各種の異なる病原微生物の関連分子 (TLRアゴニスト) を監視および識別し、先天性免疫反応を迅速に誘発し、抗原特異性獲得性免疫反応の基礎を築く。TLRアゴニストの動物用ワクチンへの応用はほとんど実験室研究の段階に留まっており、大量の研究結果からTLRアゴニストはワクチンの免疫増強剤として用いることができることが明らかになっている。ワクチンにTLRアゴニスト、例えばCpG、poly (I:C)、イミキモドなどを添加した場合、明らかな免疫増強効果があった。そのうち、TLR4アゴニストはすでに2009年にB型肝炎とヒト乳頭腫ウイルスワクチンへの応用が認められている。

40

【0006】

現在、応用における主なボトルネックとして数多くのTLRアゴニストの製造にとっても高いコストがかかる問題がある。

【発明の概要】

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明が解決しようとする技術的課題は複数成分配合免疫増強剤を提供することである。本発明の目的は複数成分配合免疫増強剤を提供し、微量のTLRアゴニストを使って、微量の漢方薬免疫増強剤であるゲンゲ属多糖類を配合することによって相乗増強効果をもたらし、免疫増強剤としてTLRアゴニストを単独で使用するよりもコストを下げるうえ免疫効力を高める。口蹄疫ワクチンの免疫効果をさらに高めることによって、子豚の出荷までに1回の接種で済むと同時に、抗体生成のウィンドウペリオドを7日間に短縮し、抗体の持続期間を7ヶ月以上に延ばすことで養豚コストを著しく低減することができる。

## 【0008】

本発明がもう一つ解決しようとする技術的課題は複数成分配合免疫増強剤の製造方法を提供することである。

## 【0009】

本発明がさらに解決しようとする技術的課題は複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンを提供することである。

## 【0010】

本発明が最後に解決しようとする技術的課題は複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンの製造方法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0011】

上述の問題を解決するために、本発明の解決手段として複数成分配合免疫増強剤を提供する。前記複数成分配合免疫増強剤は5～520 $\mu$ g/mLのモノホスホリルリピドA、10～520 $\mu$ g/mLのムラミルジペプチド、1～520 $\mu$ g/mLの $\alpha$ -グルカンおよび0.05～5.2mg/mLのゲンゲ属多糖類を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【0012】

好ましくは、前記免疫増強剤は5～500 $\mu$ g/mLのモノホスホリルリピドA、10～500 $\mu$ g/mLのムラミルジペプチド、1～500 $\mu$ g/mLの $\alpha$ -グルカンおよび0.05～5.0mg/mLのゲンゲ属多糖類を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【0013】

好ましくは、前記免疫増強剤は100～500 $\mu$ g/mLのモノホスホリルリピドA、100～500 $\mu$ g/mLのムラミルジペプチド、50～500 $\mu$ g/mLの $\alpha$ -グルカンおよび1～5.0mg/mLのゲンゲ属多糖類を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【0014】

本発明の内容は前記免疫増強剤の製造方法をさらに提供し、当該製造方法は、モノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類を含む溶液を調製し、ツイーン80と混合して、水相溶液を得るステップ1と、ホワイトオイルとスパン80を混合し、油相溶液を得るステップ2と、前記水相溶液と油相溶液を十分に混合して乳化した後、複数成分配合免疫増強剤のシャペロンワクチンを得るステップ3と、を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【0015】

また、本発明の内容は前記免疫増強剤のワクチン製造への応用を含む。

## 【0016】

また、本発明の内容は前記複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンを含む。

## 【0017】

ここで、前記口蹄疫不活化ワクチンはまた不活化抗原溶液を含むが、それらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

## 【0018】

ここで、前記口蹄疫不活化ワクチンの不活化抗原溶液と複数成分配合免疫増強剤の体積比は9：1～8：1である。

## 【0019】

ここで、前記不活化抗原溶液はO、A、垂I型口蹄疫不活化抗原、ポリペプチドあるいはその他の遺伝子工学発現産物の一種あるいは数種類を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【0020】

本発明の内容は、前記複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンの製造方法をさらに提供し、当該製造方法は、複数成分配合免疫増強剤と不活化抗原溶液を混合し、さらにツイーン80と混合して水相溶液を得るステップ1、ホワイトオイルとスパン80を混合し、油相溶液を得るステップ2と、油相と水相溶液を充分混合して複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンを得るステップ3と、を含むが、それらに限定されるものではない。

## 【発明の効果】

## 【0021】

本発明は既存の技術に比べて、以下の長所がある。

## 【0022】

1．本発明は複数成分配合免疫増強剤を開発する。それを口蹄疫不活化ワクチンと混合して使用するとワクチンの効力を効果的に高めることができ、抗体の合格率と平均抗体レベルを高めることができるだけでなく、抗体生成のウィンドウピリオドを7日間に短縮することができると同時に、抗体持続期間を7ヶ月以上に延ばすことができる。

## 【0023】

2．ゲンゲ属多糖類の原料が豊富で、価格が安く、長期にわたって使用しても組織細胞に対する毒性などの副作用が少なく、残留量が低い。少量のゲンゲ属多糖類を添加してもその他の3種類のTOLL様受容体アゴニストの使用量を著しく減らすことができ、生産コストを90%低減することができるにもかかわらず、免疫効果が低下しない。

## 【0024】

3．本発明の複数成分配合免疫増強剤を口蹄疫不活化ワクチンとともに使用することによって、ワクチンの免疫効力を著しく高め、養豚場は自身の状況に応じてワクチンの免疫回数を減らすことができるため、養殖コストを減らし、豚のストレスを低減させることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0025】

【図1】複数成分配合免疫増強剤を含むワクチンを接種した後の平均抗体レベルと抗体持続期間である。具体的には各グループの異なる複数成分配合免疫増強剤を含むO型FMD不活化ワクチンの子豚に接種した後の異なる時点での平均液相ブロッキングELISA抗体レベルを示している。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0026】

次に図面に合わせて本発明をさらに説明する。

## 【0027】

(実施例1) 複数成分配合免疫増強剤、口蹄疫ワクチンの調製

## 1．実験材料

モノホスホリルリピドA、MPLと略す。

ムラミルジペプチド、MDPと略す。

MPL、MDPおよび - グルカンはすべてInvivoGen社製のものを使用した。

ゲンゲ属多糖類は陝西正大生物科学技術有限公司製のものを使用した。

ISA206は賽百克社製、ホワイトオイル、スパン、ツイーンは市販のものを使用し

10

20

30

40

50

た。

【0028】

不活性した豚O型口蹄疫ウイルス毒液（豚O型口蹄疫ウイルスミヤマ98株）は、ピロールによる不活性化処理を行い、146s含有量は5.87 $\mu$ g/mLで、内モンゴル金宇集団のご厚意によるものである。

市販の口蹄疫O、A、亜I三価ワクチンは内モンゴル金宇集団製のものを使用した。

6～7週齢の健康で感染しやすい子豚、液相ブロッキングELISA抗体力価 1：8

【0029】

本発明では口蹄疫液相競合ELISA・サンドイッチ法試薬キット（蘭州獣医研究所）を用いて液相ブロッキングELISA抗体の力価を測定した。

【0030】

1. 免疫増強剤の調製

免疫増強剤の主な成分は、モノホスホリルリピドA（MPL）、ムラミルジペプチド（MDP）、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類である。その製造方法としては各成分をpH8.0の0.1M Tris-HClに溶かした。

【0031】

複数成分配合免疫増強剤1：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mLおよび0.05mg/mLとなるように調製した。

【0032】

複数成分配合免疫増強剤2：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ100 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mLおよび1mg/mLとなるように調製した。

【0033】

複数成分配合免疫増強剤3：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ500 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mLおよび5mg/mLとなるように調製した。

【0034】

複数成分配合免疫増強剤4：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mLおよび20mg/mLとなるように調製した。

【0035】

複数成分配合免疫増強剤5：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ500 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mLおよび20mg/mLとなるように調製した。

【0036】

免疫増強剤6：ゲンゲ属多糖類の最終濃度を20mg/mLとなるように調製した。

【0037】

免疫増強剤7：ゲンゲ属多糖類の最終濃度を5mg/mLとなるように調製した。

【0038】

免疫増強剤8：MPL、MDPおよび $\alpha$ -グルカンの最終濃度をそれぞれ2mg/mL、40mg/mLおよび0.2mg/mLとなるように調製した。

【0039】

調製済みの複数成分配合免疫増強剤をろ過（0.22 $\mu$ m濾過器）して除菌した後、それぞれ薬瓶に入れて4℃で保存した。

【0040】

口蹄疫ワクチンの調製方法

方法1：複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン、すなわち複数成分配合免疫増強剤とツイーンを体積比96：4の割合で調製し、均一に混合して水相とし、ホワイトオイ

10

20

30

40

50

ルとスパンを体積比 96 : 4 の割合で混合して油相とし、水相 : 油相の体積比を 1 : 2 の割合でワクチンを調製し、調製したワクチンを複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンとした。複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンを使用する前に体積比 1 : 9 の割合で市販のワクチンと充分混合した。

【0041】

方法 2 : 複数成分配合免疫増強剤と不活性化した豚 O 型口蹄疫ウイルス毒液を体積比 1 : 9 の割合で充分混合して、水相溶液を調製した。まず ISA 206 と水相溶液をそれぞれ室温で約 30 分間放置した。ISA 206 を乳化缶に入れて、200 回転 / 分の条件で、水相溶液を乳化缶に加えて、均一に攪拌した。2000 回転 / 分で 10 分間攪拌して、ワクチンを得て、そのうち、水相と ISA 206 の体積比は 46 : 54 であった。

10

【0042】

前記 2 つの方法を用いて調製したワクチンは、複数成分配合免疫増強剤の最終濃度が同じであれば、免疫効果も基本的に同じであるが、単に需要の異なるユーザーに便宜を図るためである。

【0043】

当該実施例において、複数成分配合免疫増強剤の各組成に関して、指定された範囲内で柔軟に配合比を調整することができるが、ここではその詳細を省略する。

【0044】

( 実施例 2 ) 複数成分配合免疫増強剤の口蹄疫不活化ワクチンに対する免疫効力の評価  
1 . ワクチンの調製

20

当該実施例は実施例 1 の第 2 の方法に基づいて口蹄疫ワクチンを調製した。

複数成分配合免疫増強剤 1 と不活化抗原を 1 : 9 の割合で混合して水相溶液とし、ISA 206 を乳化缶に入れて、200 回転 / 分の条件で、水相溶液を乳化缶に加えて、均一に攪拌して、2000 回転 / 分で 10 分間攪拌した。得られた口蹄疫不活化ワクチンを、複数成分配合免疫増強剤を含む FMD 不活化ワクチン 1 と称し、FMD 1 と略す。

複数成分配合免疫増強剤 2、3、4、5、6、7 のワクチン製造方法は複数成分配合免疫増強剤 1 と同じで、複数成分配合免疫増強剤を含む FMD 不活化ワクチン 2、3、4、5、6、7 を調製して、FMD 2、3、4、5、6、7 と略す。

【0045】

免疫増強剤 8 と不活化抗原を 1 : 1 の割合で混合して、得られた口蹄疫不活化ワクチンを、複数成分配合免疫増強剤を含む FMD 不活化ワクチン 8 と称し、FMD 8 と略す。( 中国特許第 ZL 2013 1004 2983 . 0 号明細書に基づいてワクチンの製造を行い、免疫増強剤と不活性化した豚口蹄疫ウイルスの毒液を体積比 1 : 1 の割合で混合して、水相溶液を得た。ISA 206 と水相溶液をそれぞれ室温に約 30 分を放置した。ISA 206 を乳化缶に入れて、200 回転 / 分の条件で、水相溶液を乳化缶に加えて、均一に攪拌して、2000 回転 / 分で 10 分間攪拌して、ワクチンを得た。 )

30

【0046】

0 . 1 M pH 8 . 0 の Tris - HCl と不活化抗原を 1 : 9 の割合で混合して水相溶液とし、ISA 206 を乳化缶に入れて、200 回転 / 分の条件で、水相溶液を乳化缶に加えて、均一に攪拌して、2000 回転 / 分で 10 分間攪拌した。得られた口蹄疫不活化ワクチンを FMD 対照ワクチンと称する。

40

【0047】

2 . グループ分け、免疫と抗体の測定

実験のグループ分けと接種 : 健康で感染しやすい子豚を無作為にグループに分けて、1 つのグループを 10 頭ずつにし、全部で 6 グループとした。各グループのワクチンをそれぞれ 1 つのグループの健康で感染しやすい子豚に、分量 2 mL で接種した。

【0048】

接種後採血 :

接種後の抗体の生成状況を観察測定し、接種後 7 日、14 日、21 日および 28 日目に、各グループの健康で感染しやすい子豚から採血して、血清を分離して、蘭州獣医研究所

50

の液相競合ELISA・サンドイッチ法抗体試薬キットを用いて、ワクチン接種後の抗体の生成状況とウィンドウピリオドを観察測定した。

【0049】

接種後の豚に対する抗体持続期間の観察測定を行い、それぞれ接種後28日、60日、90日、120日、150日、180日および210日目にそれぞれ採血し、蘭州獣医研究所の液相競合ELISA・サンドイッチ法抗体試薬キットを用いて、ワクチン接種後の抗体の生成状況を観察測定した。

(液相ブロッキングELISA抗体の力価が $2^6$ 以上で合格とした。)

【0050】

接種後の抗体の合格率を表1及び表2に示した。

接種後の平均抗体レベルを図1に示した。

10

【0051】

【表1】

各グループの子豚の接種後の抗体合格率

記号	ワクチン種類	7 dpv	14 dpv	21 dpv	28 dpv
1	FMD1	8/10	9/10	9/10	10/10
2	FMD2	8/10	9/10	10/10	10/10
3	FMD3	9/10	10/10	10/10	10/10
4	FMD4	4/10	4/10	5/10	5/10
5	FMD5	4/10	4/10	5/10	5/10
6	FMD6	4/10	4/10	5/10	5/10
7	FMD7	2/10	2/10	3/10	3/10
8	FMD8	5/10	9/10	10/10	10/10
9	FMD対照ワクチン	2/10	3/10	3/10	3/10

20

備考：表1の7 dpv、14 dpv、21 dpv、28 dpvはそれぞれ接種後7日、接種後14日、接種後21日、接種後28日を表し、上/下の数字はそれぞれ抗体が合格ラインに達した豚の頭数/接種した豚の頭数を表す。

30

【0052】

表1から、FMD対照ワクチンを接種した子豚は、接種後7日目に接種した10頭の豚のうち抗体がわずか2頭しか免疫合格ラインに達しておらず、合格率は2/10であった。ゲンゲ属多糖類のみを添加した免疫増強剤グループFMD6で、高い分量で一定の免疫増強効果はあったが、理想的ではなく、FMD1/FMD2/FMD3グループに比べると明らかに劣る(合格率は8/10、8/10および9/10)。単独で低い分量のゲンゲ属多糖類グループ(FMD7)の免疫増強効果が更に悪く、高い分量のゲンゲ属多糖類を異なる分量のMPL、MDPおよび $\alpha$ -グルカンと配合した(FMD4/FMD5)場合、明らかな免疫増強効果が認められなかった。さらに低い分量のゲンゲ属多糖類を低い分量のMPL、MDPおよび $\alpha$ -グルカンと配合した(FMD1/FMD2/FMD3)場合、抗体のウィンドウピリオドを7日間に短縮し、7日間で80%以上の抗体が合格ライン以上(液相ブロッキングELISA抗体が $2^6$ より大きい)に達し、かつ抗体の合格率(FMD8と比較)が低下しないことが明らかになった。FMD6グループも、明らかな免疫増強効果があったが、抗体生成のウィンドウピリオドにおいてFMD1/FMD2/FMD3より7日間遅れており、接種後14日目の抗体合格率は複数成分配合免疫増強剤1/2/3(FMD1/FMD2/FMD3)と同じレベルで、接種後14日目の抗体合格率は対応する複数成分配合免疫増強剤1、2、3(FMD1/FMD2/FMD3)グループ接種後7日目の合格率と同じレベルであった。

40

50

## 【 0 0 5 3 】

## 【表 2】

各グループの子豚の接種後の抗体持続期間内の抗体合格率

記号	ワクチン種類	28 dpv	60 dpv	90 dpv	120 dpv	150 dpv	180 dpv	210 dpv
1	FMD1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
2	FMD2	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
3	FMD3	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
4	FMD4	5/10	5/10	4/10	4/10	3/10	3/10	3/10
5	FMD5	5/10	5/10	5/10	4/10	4/10	4/10	4/10
6	FMD6	5/10	5/10	5/10	4/10	4/10	3/10	3/10
7	FMD7	3/10	3/10	3/10	3/10	2/10	2/10	2/10
8	FMD8	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	8/10
9	FMD対照ワクチン	3/10	3/10	3/10	2/10	2/10	2/10	2/10

10

## 【 0 0 5 4 】

表 2 から、複数成分配合免疫増強剤処方 1、2、3、つまり FMD 1 / FMD 2 / FMD 3 の 3 つのグループにおいて接種後にワクチンの抗体持続期間が明らかに長くなっており、接種後 7 ヶ月間を観察測定し続けたが、抗体の合格率が明らかに低下することなく、10 / 10 に維持していた。FMD 対照ワクチンの最大合格率はほとんど 3 / 10 程度で、ゲンゲ属多糖類グループ (FMD 6 / FMD 7) は単独でも一定の免疫増強効果があったが、効果が明らかではなく、FMD 対照ワクチンと明らかな相違が認められなかった。

20

## 【 0 0 5 5 】

図 1 から、複数成分配合免疫増強剤 1、2、3 (FMD 1 / FMD 2 / FMD 3) グループと免疫増強剤 8 (FMD 8) グループは FMD ワクチンの免疫効力を著しく向上させ、抗体生成のウィンドウピリオドを短縮することができた。そのうち、複数成分配合免疫増強剤 1、2、3 (FMD 1 / FMD 2 / FMD 3) グループは接種後 7 日目で、平均液相プロッキング ELISA の抗体レベルがすでに 2<sup>6</sup> より高く、対照ワクチングループの 2<sup>3</sup> よりはるかに高く、平均抗体レベルと抗体持続期間が著しく向上した。ゲンゲ属多糖類 (FMD 6 / FMD 7) 単独と高い分量のゲンゲ属多糖類を MPL、MDP および - グルカンを配合したグループ (FMD 4 / FMD 5) には明らかな免疫増強の効果は認められなかった。

30

## 【 0 0 5 6 】

そのため、複数成分配合免疫増強剤に添加した一定量のゲンゲ属多糖類と MPL、MDP および - グルカンの相乗効果によって、子豚の抗原に対する免疫応答を著しく向上させ、抗体の合格率を高め、抗体の生成時間を早めることができる。これにより、ワクチン抗体を生成するためのウィンドウピリオドを接種後 7 日間に短縮し、ワクチンの免疫効果を高めることができた。

## 【 0 0 5 7 】

当該実施例において、免疫増強剤の各組成の配合比を指定された範囲内で柔軟に調整することができるが、ここではその詳細を省略する。

40

## 【 0 0 5 8 】

(実施例 3) 複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンの調製

## 1. 複数成分配合免疫増強剤の調製

複数成分配合免疫増強剤の主な成分は、モノホスホリルリポド A、ムラミルジペプチド、- グルカンおよびゲンゲ属多糖類である。その製造方法として、主な成分をそれぞれ pH 8.0 の 0.1 M Tris-HCl に溶かした。

## 【 0 0 5 9 】

複数成分配合免疫増強剤 9 : MPL、MDP、- グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ 5.2 μg/mL、10.4 μg/mL、1.04 μg/mL と 0.0

50

52 mg / mL となるように調製した。

【0060】

複数成分配合免疫増強剤10：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ104  $\mu$ g / mL、104  $\mu$ g / mL、52  $\mu$ g / mLと1.04 mg / mLとなるように調製した。

【0061】

複数成分配合免疫増強剤11：MPL、MDP、 $\alpha$ -グルカンおよびゲンゲ属多糖類の最終濃度をそれぞれ520  $\mu$ g / mL、520  $\mu$ g / mL、520  $\mu$ g / mLと5.2 mg / mLとなるように調製した。

【0062】

調製した複数成分配合免疫増強剤をろ過(0.22  $\mu$ m濾過器)して除菌した後、それぞれ薬瓶に入れて4℃で保存した。

【0063】

2. 複数成分配合免疫増強剤のシャペロンワクチンの調製

(1) 複数成分配合免疫増強剤とツイーンを96：4の割合で均一に混合して、水相を調製した。

(2) ホワイトオイルとスパンを96：4の割合で均一に混合した。

(3) 水相と油相を体積比1：2の割合で充分混合して複合免疫増強剤を含むシャペロンワクチンを調製した。

【0064】

この方法で調製した複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンはそれぞれ複数成分配合免疫増強剤9、10、11に因んで複数成分配合免疫増強剤シャペロン9、10、11と命名した。

【0065】

3. 使用方法

複数成分配合免疫増強剤を含むシャペロンワクチン300  $\mu$ Lと1頭分のワクチンを充分混合した後接種する。

【0066】

当該実施例において、複数成分配合免疫増強剤の各組成の配合比を指定された範囲内で柔軟に調整することが可能で、使用体積も実際の需要に応じて調整することができるが、ここではその詳細を省略する。

【0067】

(実施例4) 複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンの市販O、A、亜I三価ワクチンに対する免疫効力の評価

1. ワクチンの調製

複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンは実施例3で調製した3種類のシャペロンワクチンを用いた。

【0068】

三価ワクチンはO、A、亜I三価不活化ワクチン(規格品ワクチン)で、ロット番号は5235039、20151224である。

【0069】

2. グループ分け、接種と抗体の観察測定

実験のグループ分けおよび接種：健康で感染しやすい子豚を無作為にグループに分けて、各グループに10頭ずつ、全部で4つのグループとした。

各グループのワクチンを1つのグループに含まれる健康で感染しやすい子豚に接種した。

【0070】

10

20

30

40

## 【表 3】

ワクチンの接種とグループ分け

グループ	ワクチンの種類	接種頭数
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+三価ワクチン	10
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+三価ワクチン	10
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+三価ワクチン	10
4	三価ワクチン	10

10

## 【0071】

接種後採血：

接種後の抗体の生成状況に対する観察測定：接種後7日、14日、21日と28日目において、各グループの健康で感染しやすい子豚から採血し、血清を分離して、蘭州獣医研究所の液相競合ELISA・サンドイッチ法抗体試薬キットを用いてワクチン接種後の抗体の生成状況とウィンドウピリオドを観察測定した。

## 【0072】

接種後免疫増強効果の良かった複数成分配合免疫増強剤グループに対する抗体持続期間を観察測定し、接種後28日、60日、90日、120日、150日、180日および210日目にそれぞれ採血し、蘭州獣医研究所の液相競合ELISA・サンドイッチ法抗体試薬キットを用いてワクチン接種後の抗体の生成状況を観察測定した。

20

(O型液相ブロッキングELISA抗体力価が $2^6$ 以上であれば抗体を合格とし、Aと亜I型液相ブロッキングELISA抗体力価が $2^7$ 以上であれば抗体を合格とした。)

## 【0073】

接種後の抗体合格率は表4と5に示した通りである。

## 【0074】

## 【表 4】

各グループの子豚の接種後の抗体合格率

記号	ワクチンの種類	7 dpv	14 dpv	21 dpv
		O/A/亜I (合格頭数)	O/A/亜I (合格頭数)	O/A/亜I (合格頭数)
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+三価ワクチン	7/8/5	8/9/5	9/9/6
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+三価ワクチン	7/8/5	8/8/6	8/9/6
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+三価ワクチン	8/9/6	9/9/7	9/9/7
4	三価ワクチン	2/3/1	3/4/2	5/4/2

30

## 【0075】

表4から、三価ワクチンを接種した子豚は、接種後7日目の3つの血清型の抗体の合格率はわずか20%、30%と10%であったが、複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9/10/11+三価格ワクチンを接種した子豚は、接種後7日目の合格率はすでに70~90%に達し、ウィンドウピリオドが著しく短縮され、液相ブロッキングELISA抗体の合格率も著しく向上したことがわかった。

40

## 【0076】

## 【表 5】

各グループの子豚の接種後の抗体持続期間内の抗体合格率

記号	ワクチンの種類	28 dpv	60 dpv	90 dpv	120 dpv	150 dpv	180 dpv	210 dpv
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+三価ワクチン	9/9/6	9/9/6	9/9/6	9/9/6	9/9/6	9/9/6	9/9/6
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+三価ワクチン	8/9/7	8/9/7	9/9/7	9/9/7	8/9/7	8/9/7	8/9/7
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+三価ワクチン	9/9/7	9/9/8	9/9/8	9/9/8	9/9/8	9/9/8	9/9/7
4	三価ワクチン	5/4/2	5/4/2	4/4/2	4/4/2	4/3/2	4/3/2	3/3/2

50

【 0 0 7 7 】

表 5 から、三価ワクチンを接種した子豚の抗体は接種後 9 0 日齢から緩やかに下がり始めたが、複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン 9 / 1 0 / 1 1 + 三価ワクチンを接種した子豚は、接種 2 8 日後の抗体レベルがほぼ安定し、7 ヶ月まで持続しても明らかな低下傾向が認められなかった。複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンを添加した免疫グループは、ワクチンの抗体持続期間が著しく長くなった。

【 0 0 7 8 】

以上のように、複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンは O、A、垂 I 三価口蹄疫不活化ワクチンの免疫力価に著しく増強効果があることがわかった。O、A、垂 I の 3 種類の血清型の抗体に明らかな免疫増強効果があるだけでなく、ワクチン抗体生成のウィンドウピリオドも 7 日間に短縮し、ワクチンの抗体持続期間を高めることができることが明らかになった。

10

【 0 0 7 9 】

( 実施例 5 ) 複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンの市販ポリペプチドワクチンに対する免疫効力の評価

1 . ワクチンの調製

複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンには実施例 3 で調整した 3 種類のシャペロンワクチンを用いた。

ポリペプチドワクチンのロット番号 : ( 2 0 1 4 ) 0 9 0 2 9 7 5 2 2

【 0 0 8 0 】

2 . グループ分け、接種と抗体の観察測定

実験のグループ分けと接種 : 健康で感染しやすい子豚を無作為にグループに分けて、各グループに 1 0 頭ずつ、全部で 4 グループとした。

各グループのワクチンを 1 つのグループに含まれる健康で感染しやすい子豚に接種した。

20

【 0 0 8 1 】

【 表 6 】

ワクチンの接種およびグループ分け

グループ	ワクチンの種類	接種頭数
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+ポリペプチドワクチン	10
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+ポリペプチドワクチン	10
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+ポリペプチドワクチン	10
4	ポリペプチドワクチン	10

30

【 0 0 8 2 】

接種後採血 :

接種後の抗体の生成状況を観察測定し、接種後 7 日、1 4 日、2 1 日および 2 8 日目に、各グループの健康で感染しやすい子豚から採血し、血清を分離して、蘭獣研の液相競合 E L I S A ・サンドイッチ法抗体試薬キットおよび豚口蹄疫ウイルス V P I 構造たんぱく質抗体検出 E L I S A キット ( ポリペプチド抗体の観察測定キットは上海申聯社のものを使用した ) を用いて、ワクチン接種後の抗体の生成状況をそれぞれ観察測定した。

40

【 0 0 8 3 】

接種後の免疫増強効果のよかった複数成分配合免疫増強剤グループに対する抗体持続期間を観察測定し、接種後 2 8 日、6 0 日、9 0 日、1 2 0 日、1 5 0 日、1 8 0 日および 2 1 0 日目にそれぞれ採血して、蘭州獣医研究所の液相競合 E L I S A ・サンドイッチ法抗体試薬キットを用いて、ワクチン接種後の血清抗体の生成状況を観察測定した。

( 液相ブロッキング E L I S A 抗体の力価が 2<sup>6</sup> 以上であれば抗体を合格とし、ポリペプチド抗体の観察測定は試薬キットの基準を用いて陰・陽性を判定した。 )

【 0 0 8 4 】

50

接種後の2種類の試薬キットで測定した抗体の合格率は表7と表8に示した通りである。

【0085】

【表7】

各グループの子豚の接種後の抗体合格率

記号	ワクチンの種類	7 dpv (液相ELISA合格頭数/ポリペプチド抗体合格頭数)	14 dpv	21 dpv
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+ポリペプチドワクチン	5/8	6/9	6/10
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+ポリペプチドワクチン	5/8	6/9	6/10
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+ポリペプチドワクチン	6/9	7/10	7/10
4	市販ワクチン	0/4	0/5	1/7

10

【0086】

表7から、ポリペプチドワクチンを接種した子豚は、接種してから7日後のポリペプチド抗体の合格率は4/10であったが、液相ブロッキングELISA抗体の合格率は0であった。複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9/10/11+ポリペプチドを接種した子豚は、接種後7日目のポリペプチドワクチンの抗体合格率は8/10あるいは9/10で、液相ブロッキングELISA抗体の合格率も5/10あるいは6/10程度に向上した。蘭州獣医研究所の液相競合ELISA・サンドイッチ法抗体試薬キットの説明によると、液相ブロッキングELISA抗体レベルは防御保護と一定の関連があり、特に抗体のレベルが高ければ高いほど、保護効力がよい。複数成分配合免疫増強剤シャペロン

20

【0087】

【表8】

各グループの子豚の接種後の抗体持続期間内の抗体合格率

記号	ワクチン	28 dpv	60 dpv	90 dpv	120 dpv	150 dpv	180 dpv	210 dpv
1	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン9+ポリペプチドワクチン	6/10	7/10	7/10	6/10	6/10	6/9	6/9
2	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン10+ポリペプチドワクチン	6/10	7/10	7/10	7/10	7/10	6/10	6/10
3	複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチン11+ポリペプチドワクチン	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10
4	ポリペプチドワクチン	1/7	1/7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

30

【0088】

表8から、ポリペプチドを接種した子豚の抗体は接種後90日齢から緩やかに低下しはじめたが、複数成分配合増強剤シャペロンワクチン9/10/11+ポリペプチドワクチンを接種した子豚は、接種から21日後に抗体レベルがほぼ安定しており、7ヶ月まで持続し、明らかな低下傾向が認められなかった。複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンを添加した免疫グループにおいては、ワクチンの抗体持続期間が著しく長くなることが明らかになった。

【0089】

以上のように、複数成分配合免疫増強剤シャペロンワクチンは口蹄疫ポリペプチドワクチンの免疫効力の向上に明らかな促進作用があり、かつ液相ブロッキングELISA抗体の合格率を著しく向上させ、ワクチン抗体生成のウィンドウピリオドを著しく短縮し、ワクチンの抗体持続期間を延ばすことができることがわかった。

40

【0090】

以上に記述した本発明の好ましい実施手段は、当該分野の普通の技術者にとって、本発明の原理を逸脱していない範囲で若干の補正や変更を加えることが可能であるが、これらの補正や変更も本発明の限定範囲と見なすべきであることが理解されたい。

【0091】

(付記)

(付記1)

5 ~ 520 μg / mL のモノホスホリルリピドAと、10 ~ 520 μg / mL のムラミ

50

ルジペプチドと、 $1 \sim 520 \mu\text{g}/\text{mL}$ の - グルカンと、 $0.05 \sim 5.2 \text{mg}/\text{mL}$ のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、複数成分配合免疫増強剤。

【0092】

(付記2)

$5 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のモノホスホリルリピドAと、 $10 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のムラミルジペプチドと、 $1 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ の - グルカンと、 $0.05 \sim 5.0 \text{mg}/\text{mL}$ のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、付記1に記載の複数成分配合免疫増強剤。

【0093】

(付記3)

$100 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のモノホスホリルリピドAと、 $100 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のムラミルジペプチドと、 $50 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ の - グルカンと、 $1 \sim 5.0 \text{mg}/\text{mL}$ のゲンゲ属多糖類と、を含むことを特徴とする、付記1に記載の複数成分配合免疫増強剤。

10

【0094】

(付記4)

モノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド、 - グルカンおよびゲンゲ属多糖類を含む溶液を調製し、ツイーン80と混合し、水相溶液を得るステップ1と、  
ホワイトオイルとスパン80を混合し、油相溶液を得るステップ2と、  
前記水相溶液と前記油相溶液を混合して乳化した後、複数成分配合免疫増強剤を含むシヤペロンワクチンを得るステップ3と、  
を含むことを特徴とする、付記1ないし付記3のいずれか1つに記載の複数成分配合免疫増強剤の製造方法。

20

【0095】

(付記5)

付記1ないし付記3のいずれか1つに記載の免疫増強剤のワクチン製造への応用。

【0096】

(付記6)

付記1ないし付記3のいずれか1つに記載の複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチン。

30

【0097】

(付記7)

不活化抗原溶液をさらに含むことを特徴とする、付記6に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

【0098】

(付記8)

前記不活化抗原溶液と前記複数成分配合免疫増強剤との体積比は $9:1 \sim 8:1$ であることを特徴とする、付記7に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

【0099】

(付記9)

前記不活化抗原溶液はO、A、垂I型口蹄疫不活性化抗原、ポリペプチドあるいはその他の遺伝子工学発現産物の一種あるいは数種を含むことを特徴とする、付記7に記載の口蹄疫不活化ワクチン。

40

【0100】

(付記10)

複数成分配合免疫増強剤と不活化抗原溶液を混合した後、さらにツイーン80と充分混合して水相溶液を得るステップ1と、  
ホワイトオイルとスパン80を混合して、油相溶液を得るステップ2と、  
前記水相溶液と前記油相溶液を充分混合して複数成分配合免疫増強剤を含む口蹄疫不活化ワクチンを得るステップ3と、

50



## 【 国际调查报告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CN2017/094856
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 39/39 (2006.01) i; A61K 39/135 (2006.01) i; A61P 31/14 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, SGABS, ILABS, FRABS, LEXIS, CNKI, WANFANG, ISI web of Knowledge: 免疫增强剂, 佐剂, toll 样受体, 激动剂, 单磷酸酯 A, 单磷酸脂质 A, 单磷酸酯 A, 单磷酸酯 A, 胞壁酰二肽, 胞壁酸二肽, β-葡聚糖, 黄芪多糖, 口蹄疫, immunopotentiator, immunoenhancement, immunoenhancer, adjuvant, toll-like receptor, toll like receptor, TLR, TLRs, TLR4, TLR-4, agonist, monophosphoryl lipid, MPL, MLA, muramyl dipeptide, MDP, glucan, glucosan, dextran, astragalus polysaccharide, APS, astragalus, astragalus polysaccharin, foot- and-mouth disease, FMD, FMDV, aphthavirus, aftosa		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103083663 A (JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 08 May 2013 (08.05.2013), see claims 1-10	1-10
Y	CN 101554476 A (BEIJING UNIVERSITY OF AGRICULTURE; BAODING JIZHONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 14 October 2009 (14.10.2009), see abstract	1-10
A	CN 105193721 A (TIANJIN RINGPU BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.), 30 December 2015 (30.12.2015), see entire document	1-10
A	CN 104667272 A (SUQIAN HENGRUI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 03 June 2015 (03.06.2015), see entire document	1-10
A	CN 106578377 A (ZHEJIANG OCEAN UNIVERSITY), 26 April 2017 (26.04.2017), see entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 26 February 2018	Date of mailing of the international search report 15 March 2018	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer  XING, Ying  Telephone No. (86-10) 62411044	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational application No.  
PCT/CN2017/094856

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103083663 A	08 May 2013	CN 103083663 B	10 December 2014
CN 101554476 A	14 October 2009	CN 101554476 B	09 May 2012
CN 105193721 A	30 December 2015	None	
CN 104667272 A	03 June 2015	None	
CN 106578377 A	26 April 2017	None	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2017/094856
<b>A. 主题的分类</b> A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/135(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, SGABS, ILABS, FRABS, LEXIS, CNKI, 万方, ISI web of Knowledge: 免疫增强剂, 佐剂, toll样受体, 激动剂, 单磷酸脂A, 单磷酸脂A, 单磷酸脂A, 单磷酸脂A, 胞壁酰二肽, 胞壁酰二肽, β-葡聚糖, 黄芪多糖, 口蹄疫, immunopotentiator, immunoenhancement, immunoenhancer, adjuvant, toll-like receptor, toll like receptor, TLR, TLR5, TLR4, TLR-4, agonist, monophosphoryl lipid, MPL, MLA, muramyl dipeptide, MDP, glucan, glucosan, dextran, astragalus polysaccharide, APS, astragalan, astragalus polysaccharin, foot-and-mouth disease, FMD, FMDV, aphthavirus, aftosa		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103083663 A (江苏省农业科学院) 2013年 5月 8日 (2013-05-08) 参见权利要求1-10	1-10
Y	CN 101554476 A (北京农学院 保定冀中药业有限公司) 2009年 10月 14日 (2009-10-14) 参见摘要	1-10
A	CN 105193721 A (天津瑞普生物技术股份有限公司) 2015年 12月 30日 (2015-12-30) 参见全文	1-10
A	CN 104667272 A (宿迁恒瑞生物科技有限公司) 2015年 6月 3日 (2015-06-03) 参见全文	1-10
A	CN 106657837 A (浙江海洋大学) 2017年 4月 26日 (2017-04-26) 参见全文	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 2月 26日		国际检索报告邮寄日期 2018年 3月 15日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 幸颖 电话号码 (86-10)62411044

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/094856

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103083663	A	2013年 5月 8日	CN	103083663	B	2014年 12月 10日
CN	101554476	A	2009年 10月 14日	CN	101554476	B	2012年 5月 9日
CN	105193721	A	2015年 12月 30日	无			
CN	104667272	A	2015年 6月 3日	无			
CN	106576377	A	2017年 4月 26日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K</b>	<b>9/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	9/10
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/26</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/26

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100147924

弁理士 美恵 英樹

(72)発明者 陳 瑾

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 于 曉明

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 鄭 其升

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 侯 立 ティン

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 王 義偉

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 張 元鵬

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 喬 緒穩

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

(72)発明者 侯 繼波

中華人民共和国 2 1 0 0 1 4 江蘇省南京市玄武区鐘靈街50号

Fターム(参考) 4C076 AA16 CC06 DD09F DD46F EE23F FF16 FF43 GG41

4C085 AA03 AA04 AA38 BA54 BB11 CC08 CC21 DD86 EE03 EE06

FF14 FF18