



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109364244 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 201811276098.8

A61K 39/012 (2006.01)

(22) 申请日 2013.10.29

A61K 39/07 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/145 (2006.01)

申请公布号 CN 109364244 A

A61P 37/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.02.22

## (56) 对比文件

CN 1655826 A, 2005.08.17

(30) 优先权数据

CN 104884069 B, 2018.11.27

61/719,713 2012.10.29 US

Xianfeng Zhou等. Controlled release of PEI/DNA complexes from mannose-bearing chitosan microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HBV DNA vaccine.《Journal of Controlled Release》.2007, 第121卷

(62) 分案原申请数据

Pramila Chaubey等. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis.《Carbohydrate Polymers》.2013, 第101卷

201380068777.5 2013.10.29

Hu-Lin Jiang等. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization.《Biomaterials》.2008, 第29卷

(73) 专利权人 阿肯色大学评议会

审查员 冯晓亮

地址 美国阿肯色州

(72) 发明人 B·M·哈吉斯 N·R·普姆弗德

权利要求书1页 说明书11页 附图14页

M·穆尔甘 S·西瓦拉尔玛艾哈  
G·特列斯 A·沃尔芬登

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int.Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

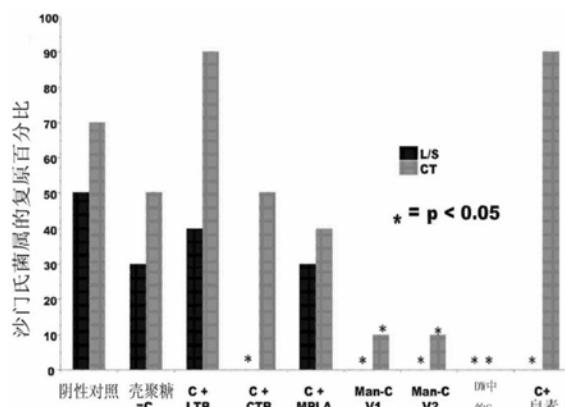
(54) 发明名称

黏膜佐剂和递送系统

(57) 摘要

本发明涉及一种黏膜佐剂和递送系统。具体地，本文提供佐剂，其包含与醛交联的壳聚糖或甘露糖化的壳聚糖。还提供制备所述佐剂的方法以及将佐剂与抗原组合或连接的方法。所述佐剂抗原组合可用在疫苗制剂中，以及在接种动物的方法中可使用所述疫苗制剂以针对抗原的来源或提高受试者中的免疫应答。

CN 109364244 B



1. 一种佐剂组合物，其包含连接至壳聚糖的碳水化合物以形成希夫碱，其中所述碳水化合物是开环甘露糖。
2. 根据权利要求1所述的佐剂组合物，其中所述希夫碱是非还原的。
3. 根据权利要求1所述的佐剂组合物，其中所述希夫碱是还原的。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的佐剂组合物，其中所述佐剂组合物配制用于黏膜施用。
5. 根据权利要求1-3中任一项所述的佐剂组合物，其进一步包含增强分子。
6. 根据权利要求5所述的佐剂组合物，其中所述增强分子是皂素、钟样受体、细菌毒素的B亚基、细菌毒素、CpG基序、脂质体或单磷酰基脂质A。
7. 根据权利要求5所述的佐剂组合物，其中所述增强分子是破伤风类毒素、霍乱毒素B亚基、热不稳定肠毒素B亚基、或三聚磷酸盐。
8. 一种疫苗制剂，其包含权利要求1-3中任一项所述的佐剂组合物。
9. 根据权利要求8所述的疫苗制剂，其中所述疫苗制剂包含抗原。
10. 根据权利要求9所述的疫苗制剂，其中所述抗原是蛋白质。
11. 根据权利要求9所述的疫苗制剂，其中所述抗原是微生物抗原。
12. 根据权利要求11所述的疫苗制剂，其中所述微生物被失活或灭活。
13. 根据权利要求11所述的疫苗制剂，其中所述微生物是使用甲醛、戊二醛或福尔马林被失活或灭活的。
14. 根据权利要求11所述的疫苗制剂，其中所述微生物是沙门氏菌属 (*Salmonella*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、博德特氏菌属 (*Bordetella*)、梭菌属 (*Clostridium*)、支原体 (*Mycoplasma*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、流感 (*Influenza*)、或艾美球虫属 (*Eimeria*)。
15. 根据权利要求8-14中任一项所述的疫苗制剂，其中所述疫苗制剂用于黏膜施用。
16. 根据权利要求8-15中任一项所述的疫苗制剂在制备用于增强受试者对抗原免疫应答的药物中的用途。
17. 根据权利要求16所述的用途，其中所述免疫应答包括与施用无佐剂的疫苗相比增强的抗体应答。
18. 根据权利要求16所述的用途，其中所述受试者是哺乳动物或家禽。
19. 根据权利要求16所述的用途，其中施用途径是皮下或口服。

## 黏膜佐剂和递送系统

[0001] 本申请是申请号为201380068777.5,申请日为2013年10月29日,发明名称为“新的黏膜佐剂和递送系统”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请要求提交日为2012年10月29日的美国临时专利申请号61/719,713 的优先权的权益,其以全文引用并入本文。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及黏膜佐剂和递送系统的技术领域。

### 背景技术

[0005] 佐剂是改变其它试剂例如药物或疫苗效果的药理学或免疫学试剂。佐剂通常包含在疫苗中以增强受体对所提供的抗原的免疫应答,同时将注入的异物保持在最低限度。

[0006] 佐剂自身并不赋予免疫性。佐剂可以以不同方式作用以提呈抗原至免疫系统。佐剂可以作为抗原的仓库(depot),在很长一段时间内提呈抗原,从而在身体清除抗原之前使免疫应答最大化。仓库型佐剂的实例是油乳化剂,如弗氏佐剂。佐剂也可以作为导致身体招募并扩大其免疫应答的刺激物。例如,含有每种靶细菌所产生的微量毒素的破伤风、白喉和百日咳疫苗还含有氢氧化铝。铝盐是美国销售疫苗中的常见佐剂,而且在疫苗中已经使用超过70年。

[0007] 壳聚糖是由随机分布的 $\beta$ - (1-4) -连接的D-葡萄糖胺(脱乙酰化单元) 和N-乙酰基-D-葡萄糖胺(乙酰化单元) 组成的线性多糖。它通过用碱性氢氧化钠处理虾和其它甲壳类壳制成。壳聚糖在用作口服和皮下疫苗载体上取得一些成功。在这里,我们提供新的基于壳聚糖的佐剂制剂,已证明其作为佐剂比传统使用的明矾佐剂表现更佳。具体地,本文提供的基于壳聚糖的佐剂有效刺激IgA应答。

### 发明内容

[0008] 本文提供佐剂、包含所述佐剂的疫苗制剂、制备所述佐剂的方法以及使用所述佐剂和疫苗制剂的方法。具体地,壳聚糖和抗原可以通过使用醛进行交联。在一方面,提供包含0.5%至2%的醛交联的壳聚糖以及抗原的组合物。在疫苗组合物中醛的终浓度不高于0.5%。

[0009] 在另一方面,提供佐剂组合物,其包括连接至壳聚糖的碳水化合物以形成希夫碱。所述佐剂可以与抗原组合。所述碳水化合物可以是甘露糖。

[0010] 在又一方面,提供疫苗制剂。疫苗制剂可包括本文提供的佐剂和抗原。所述抗原可以是蛋白或自然中的微生物,合适的微生物包括细菌、酵母、或其它真菌、真核寄生虫以及病毒,其可被减毒、重组、失活(killed)或者灭活(inactivated)。

[0011] 在还一方面,本文提供制备佐剂和疫苗组合物的方法。在乙酸溶液中溶解壳聚糖以及添加抗原至溶解的壳聚糖。最后,使用醛将抗原和壳聚糖组合起来以使醛的终浓度在

0.02%和0.5%之间。可向佐剂加入Tris来淬灭游离醛以产生更稳定的佐剂。

[0012] 在再一方面,还提供增强受试者对抗原免疫应答的方法。所述方法包括向受试者施用本文所公开的包含抗原和基于壳聚糖的佐剂的疫苗制剂。所述基于壳聚糖的佐剂可以是醛交联的壳聚糖或碳水化合物连接的壳聚糖。

## 附图说明

[0013] 图1显示在使用所述疫苗佐剂制剂初次接种疫苗以及加强后在火鸡中的抗 $\beta$ -半乳糖苷酶IgG抗体应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0014] 图2显示在一次加强后针对败血梭状芽孢杆菌(CS)的抗体水平,其显示在使用所述疫苗佐剂制剂初次接种疫苗以及加强后在火鸡中的败血梭状芽孢杆菌(Clostridium septicum) IgG抗体应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0015] 图3A和图3B是一组图,其显示在使用所述芽孢杆菌属(Bacillus)载体的禽流感疫苗佐剂制剂进行接种疫苗和加强之后在各个时间点上在鸡中的IgG(图3A) 和IgA(图3B) 抗体应答。其中,图3A和图3B显示M2e IgG抗体应答。

[0016] 图4显示在使用所述疫苗佐剂制剂初次接种疫苗以及加强后使用竞争性ELISA测量的针对沙门氏菌属(Salmonella)的IgG抗体水平。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0017] 图5显示在使用所述疫苗佐剂制剂初次接种疫苗以及加强后使用竞争性ELISA测量的针对沙门氏菌属的IgA抗体水平。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0018] 图6A和图6B是一组图,其显示在使用所述疫苗佐剂制剂初次接种疫苗以及加强后使用竞争性ELISA测量的针对沙门氏菌属的IgG(图6A) 和IgA(图6B) 抗体水平。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。其中,图6A显示在第22天1 次接种疫苗之后针对血清IgG的竞争性ELISA;图6B显示在第22天1次接种疫苗之后针对回肠sIgA的竞争性ELISA。

[0019] 图7显示在初次接种疫苗之后第22天(攻击后第3天)在肝和脾(L/S)或盲肠扁桃体(CT)中的沙门氏菌属的复原(recovery)百分比。接种疫苗操作规程与图6A-图6B所用相同,以及\*表示  $p < 0.05$ 。

[0020] 图8显示在用所述疫苗佐剂制剂经由所述施用途径初次接种疫苗以及加强(第12天)之后第22天,使用竞争性ELISA测量的针对沙门氏菌属的IgA抗体水平。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0021] 图9显示使用所述疫苗佐剂制剂对雏鸡进行接种疫苗之后,通过竞争性ELISA 测量的针对沙门氏菌属的IgG免疫应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0022] 图10显示使用所述疫苗佐剂制剂对雏鸡进行接种疫苗之后,通过竞争性ELISA 测量的针对沙门氏菌属的IgA免疫应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0023] 图11显示使用所述疫苗佐剂制剂对火鸡进行单次肠胃外接种疫苗之后,针对鸟博德特氏菌(Bordetella avium)的IgG免疫应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

[0024] 图12显示使用所述疫苗佐剂制剂对孵化当日的火鸡进皮下接种疫苗之后,接着在第14天通过饮用水施用相同疫苗佐剂组合之后,针对鸟博德特氏菌的IgG免疫应答。在第21天测量应答。不同的字母表示显著性差异 ( $p \leq 0.05$ )。

## 具体实施方式

[0025] 本文提供包含壳聚糖的佐剂、包含所述佐剂的疫苗制剂、制备所述佐剂的方法以及使用所述佐剂和疫苗制剂的方法。总之，本文描述一种新颖的佐剂系统，其可以与其它佐剂(如用于肠胃外(注射)的那些)类似的方法使用。基底分子包括壳聚糖，其是几丁质的脱乙酰形式，是许多无脊椎动物(虾、蟹、昆虫等)的外骨骼。壳聚糖视为公认安全(GRAS)的化合物，用于减轻体重、降低胆固醇、失眠和肾功能改善。壳聚糖也用作佐剂与各种黏膜疫苗一起使用(Jabbal-Gill等人，2012)，但是如实施例所示，本文所述的壳聚糖是新的而且比传统壳聚糖功能更佳。

[0026] 交联甲醛的壳聚糖-蛋白质和碳水化合物连接的壳聚糖提供用于疫苗抗原口服或肠胃外递送的独特佐剂。壳聚糖已用作口服和皮下疫苗的载体。在一些制剂中，通过甲醛处理将抗原共价结合到壳聚糖。在其它情况下，通过加入连接到壳聚糖的碳水化合物(甘露糖、岩藻糖和半乳糖)来改进佐剂系统，以使得靶向抗原提呈细胞上的甘露糖受体上，从而增强针对壳聚糖-抗原复合物的免疫应答。与灭活疫苗不同的是，无论是交联甲醛的壳聚糖-蛋白质还是甘露糖化的壳聚糖蛋白复合物通过肠胃外和口服(或其它黏膜)递送途径都能给出稳健的免疫应答。

[0027] 在一方面，提供佐剂组合物，其包含连接到壳聚糖的碳水化合物连以形成希夫碱。所述佐剂可与抗原组合。所述碳水化合物可以是甘露糖、甘露二糖、葡萄糖、半乳糖或果糖。也可以使用其它合适的碳水化合物。不局限于理论，将所述碳水化合物添加到壳聚糖是为了将壳聚糖靶向抗原提呈细胞的表面上针对这些碳水化合物的受体。

[0028] 在以下实施例中更全面地描述制备本文所用的碳水化合物壳聚糖。我们的方法是根据Jayasree (Jayasree等人，2011)的使用具有可用羰基的开环碳水化合物，所述羰基与壳聚糖上的氨基反应形成希夫碱。通过使用氰基硼氢化钠(NaC<sub>6</sub>NH<sub>5</sub>)还原可以稳定所述希夫碱。在图6A-6B中还原形式的壳聚糖(Man-C V1)与非还原形式的壳聚糖(Man-C V2)相比较，我们证明还原对免疫增强是非必须的。非还原形式产生最佳的IgA应答，因而两种形式都可以使用。此外，非还原形式的甘露糖化的壳聚糖不需要添加有毒化学物(NaC<sub>6</sub>NH<sub>5</sub>)。简言之，将碳水化合物(合适地为甘露糖(10μM))溶解在pH 4.0的0.1M乙酸钠中在60℃进行2小时以及将壳聚糖(0.2-2%)溶解在1.5%的乙酸中。然后，将溶解的甘露糖和溶解的壳聚糖组合，并在室温下孵育，以允许壳聚糖的胺基团与糖上的羰基反应以产生希夫碱。没必要为佐剂起作用而还原希夫碱，事实上实施例显示在非还原的希夫碱是更好的佐剂(参见图6A-6B)。在其它实施方案中，希夫碱可以是还原的。

[0029] 在另一个实施方案中，可使用醛交联壳聚糖和抗原。在一方面，组合物含有0.5%至2%的醛交联的壳聚糖以及抗原。合适地，最终疫苗制剂含有0.5%至1.5%壳聚糖。佐剂可含有0.5%至3%的壳聚糖，合适地0.5%至2%的壳聚糖，合适地0.5%至1.5%的壳聚糖，合适地0.5%至1.2%的壳聚糖。在疫苗组合物中醛的终浓度合适地小于0.5%。醛的最大浓度是基于疫苗所允许的残留醛的最大水平。更高水平的醛可用于交联壳聚糖，但最终的疫苗制剂合适地含有小于0.5%的醛。在实施例中，甲醛用作醛来交联壳聚糖。也可以使用其它醛如福尔马林、戊二醛、乙醛、丙醛或丁醛。醛将壳聚糖氨基与其它壳聚糖分子上或抗原上的氨基交联。

[0030] 本文还提供制备包含醛交联的壳聚糖和抗原的疫苗制剂的方法。所述方法包括在

乙酸溶液中溶解壳聚糖。碳水化合物连接的壳聚糖也可以用作本方法的壳聚糖。合适地,以在水中1.5%的终浓度来使用乙酸或者将15ml的乙酸溶解在1L水中。合适地,壳聚糖的量在0.5%和2%之间,合适地在0.5%和1.5%之间。抗原在适当的水平加入到溶解的壳聚糖中。可以由本领域的技术人员来确定在疫苗制剂中所使用的抗原的量和形式。最后,将抗原和壳聚糖与醛组合,使得醛的终浓度在0.02%和0.5%之间。醛能够将壳聚糖化学交联至其它壳聚糖分子以及将壳聚糖化学交联至抗原。可以加入Tris-HCl以淬灭游离醛。可以加入Tris至0.5g/L的终浓度。

[0031] 本文公开的任何佐剂组合物可与增强分子组合,所述增强分子包括但不限于皂素、钟样受体(toll-like receptor)、细菌毒素中的B亚基、细菌毒素、破伤风类毒素、CpG基序、脂质体或单磷酰基脂质A。合适地,所述增强分子用于免疫系统的进一步刺激剂并增强将疫苗制剂向受试者施用后产生的免疫应答。

[0032] 本文中所提供的疫苗制剂包含本文所述的基于壳聚糖的佐剂和抗原。所述抗原可以是本领域技术人员可获得的任何抗原。在疫苗中可以使用抗原,如蛋白质、合成肽、缀合至载体(carrier)的肽、或微生物。微生物包括细菌、酵母、寄生虫、真菌、病毒,蠕虫(helminthes)或其它致病生物。微生物包括活的、死的、减毒的、重组的、或灭活的生物。微生物的实例包括但不限于沙门氏菌属,埃希氏菌属(Escherichia)、志贺氏菌属(Shigella)、博德特氏菌属(Bordetella)、梭菌属(Clostridium)、支原体(Mycoplasma)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、芽孢杆菌属(Bacillus)、流感(Influenza)以及艾美球虫属(Eimeria)。可使用热、甲醇或其它固定剂如甲醛或其它醛在使用之前灭活或失活微生物。可以通过随后加入Tris-HCl至0.5g/L的终浓度以淬灭醛。合适的抗原还可以包括肽抗原,例如流感M2e、血凝素、神经氨酸酶、或核蛋白;艾美球虫属TRAP或MPP;梭菌唾液酸酶、SagA、 $\alpha$ 毒素、NetB毒素、或铁转运蛋白。其它肽抗原的实例至少可见于美国申请号12/441,851;12/740,631;12/740,608; 13/574,504;以及13/702,827,所有这些以其整体引用并入本文。基于壳聚糖的佐剂可用于增加针对已经可获得的疫苗或新开发的疫苗或自体疫苗的免疫应答。

[0033] 对与此工作相关的接种疫苗有两个显著改进。首先,当修饰的壳聚糖与灭活的疫苗通过肠胃外途径共同施用时,我们注意到免疫应答优于使用其它佐剂如明矾所观察到的免疫应答,并具有最小的注射部位反应。许多佐剂通过在注射部位引起炎症反应、或者推迟从注射部位吸收、或者通过两者起作用。传统佐剂的缺点之一是它们往往会引起一些反应、疼痛,以及在某些情况下它们会导致持久性病变使得产肉动物在屠宰时等级降低(downgrade)或消瘦(trim)。修饰的壳聚糖可以减少这些与其它疫苗佐剂相关问题。它是生产成本低易于制作成商业疫苗。

[0034] 此外,当通过灌胃或通过添加在饮用水中来口服地共同提呈失活的抗原时,产生稳健的免疫应答。这对于驯养动物,特别是家禽真的很重要,因为处理肠胃外注射的劳动强度非常大并且对鸟或其它动物造成威胁。唯一例外的是孵化场,由于施用成本太昂贵一般不在家禽中使用灭活疫苗。口服递送疫苗的能力改变了我们能够接种动物的方式。大规模施用活疫苗(称为活的改性疫苗或减毒疫苗)有两个主要优点。首先,您可以通过饮用水或喷施应用来大规模应用。其次,这些活疫苗也在局部黏膜(大多数病原体感染的呼吸道和肠道)产生免疫力。正因为如此,无论是失活的或活的疫苗都能保护免受疾病,但历史上活疫

苗在预防实际感染上更加有效因而是优选的。

[0035] 失活的疫苗具有巨大的优势,因为能够迅速生产它们,同时在引起感染和疾病上具有非常低的风险,它们在遗传上不能变回成致病亲本类型,并且因为这些原因它们具有较低的监管问题。此外,还有一个庞大并且数量在日益增多的孤儿疾病,其通常不足以使疫苗公司为之开发监管/许可的疫苗,美国(和许多其它国家)的法律中有条款用来规定生产尤其是从感兴趣的失活病原体制备的并且用在源群集(source flock)(或动物或人类群体)中的“自体”疫苗。在发展中国家,孤儿疾病发生需要疫苗,而疫苗无法负担得起,或者在技术上是不可能本地生产的或者不能足够快地生产应对疫情(outbreak)。本文提供的佐剂是负担得起的,并且在技术上直接用于生产。它们可容易与失活或灭活的微生物组合以产生疫苗。

[0036] 可用于本文所描述技术的几个潜在应用。通过并入作为注射用佐剂的修饰的壳聚糖可以改进对失活疫苗的全身应答。我们可以使用这种佐剂平台通过口服施用失活的疫苗来预防一些疾病。当口服施用时,这种佐剂平台可以靶向刺激全身和/或黏膜应答-这意味着它具有许多活疫苗的优点,但避免了上述活疫苗的问题。

[0037] 本文所述的佐剂和疫苗制剂可与其它药学上可接受的载体组合。药学上可接受的载体是任何适合于体内施用的载体。适合用于所述组合物的药学上可接受的载体的实例包括但不限于水、缓冲溶液、葡萄糖溶液、油基的或细菌培养液。组合物的额外成分可合适地包括例如赋形剂,例如稳定剂、防腐剂、稀释剂、乳化剂和润滑剂。药学上可接受的载体或稀释剂的实例包括稳定剂如碳水化合物(如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、葡萄糖、葡聚糖)、蛋白质如白蛋白或酪蛋白、含蛋白剂如牛血清或脱脂乳、和缓冲液(如磷酸盐缓冲液)。特别地,当向组合物添加这样的稳定剂时,组合物适合于冷冻干燥或喷雾干燥。所述组合物还可被乳化。

[0038] 本文所述的组合物还可以和其它药物组合物组合,以及这些组合物可以在相同时间或作为单一组合物的部分以任何顺序施用。施用这两种组合物以使得一种组合物在另一种之前施用,其中施用时间差为1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、16小时、20小时、1天、2天、4天、7天、2周、4周或更久。

[0039] 本文所用的疫苗制剂的有效量或治疗有效量是指这样的组合物的量,当向受试者施用用于增强受试者针对靶疾病的免疫应答时,所述组合物的量能够增加免疫应答,如细胞介导或抗体介导的免疫应答以限制与感染或暴露至靶疾病相关的发病率或死亡率。合适地,所述免疫应答增强到这样的水平以使得施用足以实现治疗或阻断疾病相关的发病率或死亡率。治疗有效量将取决于疫苗、制剂或组合物,疾病及其严重性和受试者的年龄、体重、身体状况和反应性(responsiveness)。例如,相比施用无佐剂的相同抗原或明矾作为佐剂的相同抗原,通过加入本文所述的佐剂在接种疫苗应答时产生的抗体水平可以增加2倍、3倍、4倍或更高。增加的免疫应答可以是IgA应答,或者IgG应答。所述佐剂也可能导致与继发感染相关的发病率或死亡率的降低。如实施例所示,与使用抗原单独接种疫苗或使用抗原和不同的佐剂接种疫苗相比,使用与抗原结合的本文所述的佐剂可能导致继发感染微生物的比率降低或继发感染微生物严重性的降低,其中所述抗原引发针对所述微生物的免疫应答。可通过微生物侵入引入位点之外的组织的能力、在生物体内随着时间的推移复制和/或存留(persist)的能力,或导致发病率或死亡率的能力来测量感染的严重程度。可随后使用

病原体感染接种疫苗的动物。在这种情况下,与施用对照的受试者相比,在攻击后在施用所述疫苗的受试者中病原体的生长降低至少 $1\log_{10}$ 、 $2\log_{10}$ 或甚至 $3\log_{10}$ 。

[0040] 本文所述的组合物可通过本领域技术人员已知的任何方法施用,包括但不限于口服、鼻内、腹膜内、肠胃外、静脉内、肌内、皮下、鼻咽,或经黏膜吸收。因此,所述化合物可以配制成可摄取、可喷雾或可注射的制剂。例如,口服施用可能必须添加至饮用水中,喷施在食物上,喷施至动物(如鸡或火鸡,当其在梳理羽毛将会摄取在喷雾中的疫苗)。受试者可以是哺乳动物,包括人、牛、猪、猫、狗或其它驯养动物或非哺乳动物,例如家禽、即鸡或火鸡。

[0041] 可以理解,在任何给定情况下施用的具体剂型和施用的时间(即初次接种疫苗和加强)将根据以下进行调整:待施用的制剂、靶向的疾病、暴露的风险、受试者的状况、和可改变受试者的应答的其它相关医疗因素或向受试者提供制剂的可行性。例如,对受试者的具体剂型取决于受试者类型、年龄、体重、健康的一般状态、饮食、施用的时间和方式、排泄速率、在组合中使用的药物以及疫苗所靶向的具体病症的严重程度。初始接种疫苗和加强可以由不同的方式来施用。例如,通过皮下途径的初始接种疫苗可以通过在饮用水或食物中加入佐剂-抗原复合物来加强。壳聚糖在疫苗制剂中的百分比通常在0.2和2%之间,合适地0.5-1.5%。施用的壳聚糖总量可以从每接种疫苗少于1mg到100mg,合适地2、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、25、50、75或100mg的壳聚糖。在实施例中,每剂量使用2-5mg的壳聚糖。当组合使用微生物抗原时,可以包括每剂量 $1\times 10^6$ 至 $1\times 10^9$ 之间的微生物。在实施例中,每剂量使用 $1\times 10^7$ 至 $1\times 10^8$ 微生物。每剂量可包括10 $\mu\text{g}$  至10mg的抗原。在实施例中,每剂量使用100 $\mu\text{g}$ 。

[0042] 以下的实施例仅仅是示例性的,并不意味着限制本发明或所附权利要求的范围。本文引用的所有参考文献通过引用其全文并入本文。

#### [0043] 实施例

##### [0044] 实施例I:在初次接种疫苗和加强之后对β半乳糖苷酶的免疫应答

[0045] 我们的第一个实验来测试使用甲醛交联的壳聚糖-蛋白疫苗,其使用经典的蛋白β半乳糖苷酶(β-Gal)作为模型蛋白。如下表1所述,使用六个处理组和一个对照,利用β-Gal接种火鸡幼禽。使用盐水,或使用在盐水中、15%明矾中、1%甲醛交联的壳聚糖(Form) (3组)中、或1.5%不交联甲醛的壳聚糖中的100 $\mu\text{g}$ β-Gal (0.25ml)在孵化当天通过肠胃外皮下注射(sq)来接种幼禽。除了两个1%壳聚糖组之外,所有的组都在第14天和第25天使用相同制剂sq进行加强,而对于两个1%壳聚糖组,对其中一组使用1%壳聚糖-β-Gal通过口服灌胃进行加强,另一组通过喷施1%的壳聚糖-β-Gal (2ml)进行加强。

[0046] 对于β半乳糖苷酶,在ELISA中使用血清来确定对β半乳糖苷酶的免疫应答,结果示于图1。免疫应答的水平报告为在间接ELISA中样品对阳性对照吸光度的比率。更高的S/P比率表示更高的抗β半乳糖苷酶抗体滴度。在使用来自盐水接种火鸡的血清的ELISA中很少有交叉反应,当使用盐水中的β-Gal接种时只有适度的数值增加。目前使用的常见商品佐剂是15%的明矾,当使用它时具有良好的免疫应答。使用我们的壳聚糖免疫刺激和甲醛交联的疫苗系统(标记为1%壳聚糖),对模型抗原β-Gal的免疫应答具有显著增加。即使在1.5%的更高浓度下单独使用壳聚糖也有显著降低的免疫应答。此外,当使用1%壳聚糖-甲醛处理的佐剂通过喷施或口服处理来加强抗原时,与标准佐剂15%明矾的皮下施用相比有可比较的应答。

[0047] 表1:处理组

[0048]

组	免疫原	孵化当天初次 VX(100μg/0.25ml)	在孵化后第 14 天 加强
盐水	无	SQ	SQ (100μg/0.5ml)
盐水中的 βG	β-半乳糖苷酶	SQ	SQ (100μg/0.5ml)
15% 明矾	β-半乳糖苷酶	SQ	SQ (100μg/0.5ml)
1%壳聚糖	β-半乳糖苷酶	SQ	SQ (100μg/0.5ml)
无 Form 的 1.5% 壳聚糖	β-半乳糖苷酶	SQ	SQ (100μg/0.5ml)
1%壳聚糖, 第二 次口服	β-半乳糖苷酶	SQ	口服灌胃 (100μg/0.5ml)
1%壳聚糖, 第二 次喷施	β-半乳糖苷酶	SQ	喷施(100μg/ml ) 在 20 sq. ft 室中每 20 只鸟雾化喷施 50ml

[0049] 实施例II:在使用各种佐剂接种疫苗后对梭菌属的免疫应答

[0050] 通过施用明矾或福尔马林交联的壳聚糖中的 $4 \times 10^8$ cfu/ml的败血梭状芽孢杆菌苗 (CS) 进行与上述相似的实验,通过单独施用皮下施用 (0.25ml) 或者与12%明矾或0.5%福尔马林交联的壳聚糖组合皮下施用 (0.25ml),以使得在孵化当日火鸡幼禽的每鸟终剂量是 $1 \times 10^8$ cfu每鸟。在第14天用相同疫苗通过相同途径对所有鸟进行加强。通过间接ELISA试验测量所得免疫应答的水平并报告为样品相对阳性对照吸光度 (S/P) 比率。更高的S/P比率说明更高的抗CS抗体。

[0051] 在图2中显示接受无佐剂疫苗的鸟产生S/P比率为0.16的ELISA可检测的抗体应答。这种抗体水平与使用明矾为佐剂的CS的相比无统计学差异。在一次加强 (初次接种后14天) 之后,使用以0.5%福尔马林交联壳聚糖为佐剂的CS菌苗接种的幼禽显示出的IgG水平(以S/P比率为结果)是没有佐剂的CS菌苗的大约两倍,两者分别为0.4和0.16。通过S/P比率进行比较,带有氢氧化铝佐剂的CS菌苗所诱导的IgG水平比带有壳聚糖的CS所诱导的IgG水平低约30%,两者分别为0.27和0.4(参见图2)。重要的是,由于壳聚糖的施用,在72小时的时候(或之后)注射部位的病变不那么明显,而明矾总是产生局部炎症和肉芽肿,往往进展到结痂(encapsulated)的疤痕组织。

[0052] 实施例III:禽流感接种疫苗实验

[0053] 禽流感 (AI) 对全球商业家禽业而言是重要的公共卫生问题和严重的经济威胁。我们以前的数据表明,表达与CD154相关的M2e的以沙门氏菌属为载体的疫苗有效预防AI。测试了新的构建体,其使用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为载体以及使用带有免疫刺激分子的M2e表位。在孵化后的第11、15和21天,用 ELISA来确定M2e特异性血清IgG和黏膜IgA抗体水平。在孵化当天,通过口服灌胃或皮下注射,采用如下来接种雏鸡:芽孢杆菌属野生型 (BSBB)、以芽孢杆菌属为载体的禽流感疫苗 (BSAI) 作为活疫苗、经福尔马林灭活后

的BSAI、经福尔马林灭活、冻干和用盐水重建后的BSAI、或经福尔马林灭活后与1%壳聚糖交联的BSAI。以0.25ml或0.25ml盐水中的 $10^6$ cfu/雏鸡施用每种疫苗。在孵化后第10天,对两组(活BSAI、灭活和冻干的BSAI)的雏鸡分别给予与在其第0天接受的处理相同的加强接种疫苗,而所有其它组不用接受第二次疫苗剂量。

[0054] 然后在孵化后的第11、15和21天,从所有组的鸟中获得血清IgG和黏膜IgA样品,并用于抗体捕获ELISA。使用缀合至BSA的M2e (10 $\mu$ g/ml)包被板(plate)、封闭、使用来自每个处理组的以1:50稀释在2%FBS/PBS中的血清来孵育、接着用1:7,500稀释的HRP缀合的二级抗体来孵育,并使用TMB底物来显色。结果以平均S/P比率(样本平均值-阴性对照平均值)/(阳性对照平均值-阴性对照平均值) $\pm$ SEM(n=20)来表示。

[0055] 当与芽孢杆菌属骨干对照(BSBB)相比,在每个接种疫苗组在每个测试时间点上对M2e特异性IgG抗体应答都有显著增加。然而,在六个接种疫苗组的任意之间在每个时间点上都没有观察到在增加IgG抗体应答中的差异(参见图3A)。当查看黏膜IgA特异性抗体应答时,在免疫应答中的真正差异是显而易见的(参见图3B)。在全部三个取样的时间点上,当与对照或其它五个接受接种疫苗处理组相比时,BSAI+1%壳聚糖显示出特异性IgA抗体应答上的显著增加。

[0056] 总之,在使用交联壳聚糖的实验中,我们以上已经证明,通过肠胃外和口服途径两者,这种壳聚糖修饰都是比氢氧化铝更好的佐剂(图1和2)。使用甲醛作为交联剂处理过的壳聚糖证明比无甲醛处理的壳聚糖更有效(图1)。当口服使用时,壳聚糖提高IgA的产生(图3B),优于IgG(图3A)。

#### [0057] 实施例IV:壳聚糖佐剂的增强

[0058] 经由旨在改进基于壳聚糖的佐剂的一系列实验,通过加入潜在增强分子或替代递送策略来进一步增强佐剂。免疫刺激化合物与佐剂一起使用时能潜在地改进应答,之前已经研究过若干;参见综述(Guy, 2007; Mutwiri等人, 2011)。潜在佐剂包括皂素、细菌成分、与固有免疫系统相互作用的化合物如钟样受体、核酸如CpG基序、病毒、乳化剂包括脂质体、或任何这些成分的组合。与固有免疫系统相互作用的一些更有前途的免疫刺激分子是破伤风类毒素(TT)、不耐热肠毒素B亚基(LTB)、以及霍乱毒素B亚基(CTB)。经验证明通过固有化学性质来增强免疫系统的其它化合物包括皂素和单磷酰基脂质A(MPLA)。使用甘露糖或其它糖靶向结合巨噬细胞受体可增强免疫功能。不同佐剂的组合可以与例如IL-12或其它细胞因子协同作用以刺激免疫应答。

[0059] 为相较于甲醛交联的壳聚糖佐剂而言改进佐剂所进行的第一个实验,使用甲醛产生上图1-3A和3B中所示的数据,所述甲醛交联的壳聚糖佐剂由与0.5%壳聚糖交联的兴趣抗原所组成。然后,这种佐剂系统用作对照或基线以筛选所选择的候选免疫增强分子的最佳组合。测试免疫原是生长到 $10^8$ cfu/ml再用甲醛灭活的肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) (SE) 菌苗。为确定交联的壳聚糖佐剂是否可进一步改进,测试免疫原(带有壳聚糖的沙门氏菌属菌苗是 $4 \times 10^7$ cfu/ml,终剂量为每只鸟 $1 \times 10^7$ cfu)以2:1的比率与交联壳聚糖单独混合或使用以下进行增强:破伤风类毒素(TT)、不耐热肠毒素B亚基(LTB)、或甘露糖化的壳聚糖,并在饮用水或饲料中施用。结果显示于图4。

[0060] TT可能是潜在的免疫增强分子,并已被广泛用于疫苗开发。来自大肠杆菌的不耐热肠毒素已被证明是强大的免疫刺激分子但是非常毒,因此不适合作为佐剂。不耐热肠毒

素由两个亚基组成：中央核心LTA和五个LTB亚基（da Hora等人，2011）。LTB亚基保留了免疫佐剂特性并且是无毒的。因此，其为安全的潜在佐剂成分。甘露糖和某些其它碳水化合物（例如半乳糖和岩藻糖）是激活巨噬细胞的受体的配体。通过Yalpani和Hall（1980和1985）以及Jayasree等人（2011）之前描述的不添加锌的类似方法制备甘露糖化的壳聚糖。简言之，将在一份体积的0.1M乙酸钠中的两摩尔当量甘露糖在60°C加热两小时。然后将溶液加入到两倍体积的在0.15%乙酸中的一摩尔当量2%壳聚糖中，并使其在室温下反应10分钟以产生1.5%的甘露糖化的壳聚糖。然后，以二比一的比率将SE菌苗加入到1.5%甘露糖化的壳聚糖中。然后，使用氰基硼氢化钠（NaCNBH<sub>4</sub>）来还原形成的希夫碱。

[0061] 此外，如上所述也研究针对免疫增强分子的不同递送系统。在家禽业中使用的典型的饮用水递送系统将药物或化合物以1:128稀释至水中。在图1-3A和3B中使用的原始壳聚糖制剂以1:128稀释在作为潜在递送系统的饮用水中。最后测试组为通过甲醛与SE菌苗交联的0.5%壳聚糖（原始壳聚糖制剂），其通过逐滴加入三聚磷酸盐（TPP）以包囊（encapsulate），然后干燥并研磨成粉末用于以0.5%（wt/wt）的比率添加到饲料中。

[0062] 如上所述，对孵化当日的肉雏鸡使用0.25ml所述制剂在皮下进行初次免疫。这些组与仅使用壳聚糖的组进行相同的初次免疫。除饮用水和TPP组以外，雏鸡在12日龄通过口服灌胃法进行加强，饮用水组以1:128的水进行加强，TPP组在饲料中以0.5%（wt/wt）加强8小时。用竞争性ELISA试剂盒（IDEXX）确定在第22天的在血清中的抗体水平（IgG）以及回肠黏膜中的抗体水平（IgA）。吸光度水平或样品相对对照比率下降，说明识别SE鞭毛蛋白包被板的抗体水平更高。

[0063] 如在上图1和2所示，壳聚糖佐剂在产生稳健的免疫应答上优于明矾。本文每个基于壳聚糖的佐剂都能产生针对SE菌苗的稳健免疫应答，其与单独皮下施用壳聚糖相比具有显著更高的IgG和IgA水平（分别在图4和图5中）。与使用壳聚糖佐剂sq加强的sq初次免疫者相比，在TT和干粉TPP组具有显著更高的免疫应答（图4和5）。其它三组（带有LTB的壳聚糖、甘露糖化的壳聚糖、以及在饮用水中的壳聚糖加强）在抗体产生上一致地优于皮下单独施用的壳聚糖（图4和5）。

[0064] 在下一组实验中，随着阴性对照（盐水）和基准对照（针对初次和加强接种，通过sq施用0.5%甲醛交联的壳聚糖）一起，重复进行来自前述实验的三个最佳组（LTB、在DW中的壳聚糖加强、以及还原的甘露糖化的壳聚糖），其中所述的基准对照之前证明是优于明矾。在这个实验中，我们增加了采用0.5%甲醛交联的壳聚糖作为基准对照的三个新处理组，三个组使用霍乱毒素B亚基（CTB）、来自沙门氏菌属的脂质A（MPLA）、或皂素进行免疫增强。在这个实验还添加了另一个处理组，其与甘露糖化的壳聚糖处理组相似，甘露糖化的壳聚糖处理组在先前实验被证明是优良佐剂（甘露糖化的壳聚糖版本1，Man-C V1），而这组不使用NaCNBH<sub>4</sub>进行还原（Man-C V2）。

[0065] SE鞭毛蛋白竞争性ELISA再次表明使用0.5%的壳聚糖（C）皮下进行初次和加强接种疫苗的鸟在血清中具有更高水平的免疫球蛋白（图6A）。使用带有CTB的0.5%壳聚糖（C+CTB）、Man-C V2以及带有皂素的壳聚糖（C+皂素）接种疫苗的鸟，获得最佳IgG应答（图6A）。Man-C V2具有数值最好的IgA应答（图6B）。所有这三个处理组都与基准组（对初次和加强都使用0.5%壳聚糖sq接种疫苗）显著不同（图6A-6B）。

[0066] 此外，在第19日使用活的沙门氏菌属以 $5 \times 10^7$ cfu/雏鸡来攻击鸟。攻击后三天，培

养在鸟的盲肠扁桃体(CT)和肝/脾(L/S)中的沙门氏菌属。与阴性对照(盐水接种疫苗)相比,带有CTB的壳聚糖、甘露糖化的壳聚糖的两个版本、在饮用水中加强的壳聚糖以及带有皂素的壳聚糖在肝/脾(L/S)中显著将沙门氏菌属降低至可检测限度以下(图7;P<0.05)。在肠道(CT)中,使用甘露糖化的壳聚糖的两个版本、以及在使用以1:128稀释于饮用水的0.5%壳聚糖加强的组中显著降低沙门氏菌属的水平。在甘露糖化的壳聚糖组的显著减少表明直接靶向巨噬细胞(其带有针对甘露糖受体的配体)增加壳聚糖佐剂的效力。此外,很重要的是,甘露糖化的壳聚糖的非还原希夫碱制剂与NaCNBH<sub>4</sub>还原的甘露糖化的壳聚糖一样有效,后者未添加潜在有害的化合物。另一非常出人意料之处是与仅肠胃外接种疫苗相比,用于加强的以1:128稀释于饮用水的0.5%壳聚糖在降低沙门氏菌属的菌落(colonization)上具有更优良的结果(图7)。

[0067] 实施例V:接种疫苗的施用途径

[0068] 研究用于接种疫苗的最好途径和佐剂组合。如图8所示,向孵化当天的雏鸡施用0.25ml的盐水或具有各个佐剂混合物的疫苗。可比较的佐剂包括甲醛交联的壳聚糖、还原的甘露糖化的壳聚糖(Man C V1)、非还原的甘露糖化的壳聚糖(Man C V2),并且每个佐剂与抗原组合,并在孵化当天皮下或在饮用水中施用。使用相同佐剂抗原组合通过皮下或在饮用水中或经由口服灌胃第二次施用来对鸟进行加强。在饮用水中进行接种疫苗的组(DW)是以1:128稀释于饮用水。那些通过口服灌胃法加强的是施予0.25ml。如上所述使用竞争性SE鞭毛蛋白ELISA试验(IDEXX)测量黏膜IgA应答。虽然在图8的后五个处理组没有显著不同,但是数值最低组是在初次接种疫苗时以sq递送并1:128稀释于DW中用于加强的甘露糖化的壳聚糖V2。与sq初次接种疫苗并以sq或DW加强的0.5%壳聚糖相比,这组在回肠中具有显著更高水平的IgA。在还原和非还原形式的甘露糖化的壳聚糖之间、或者在通过饮用水或口服灌胃给予加强时,没有观察到显著差异。

[0069] 实施例VI:与矿物油基的佐剂相比

[0070] 然后将甘露糖化的壳聚糖与市场上可获得的矿物油基的佐剂进行比较并与其组合。生长至10<sup>8</sup>cfu/ml然后用甲醛灭活的肠炎沙门氏菌(SE)菌苗来用作抗原。沙门氏菌菌苗以4×10<sup>7</sup>cfu/ml以2:1的比率与壳聚糖、甘露糖化的壳聚糖、矿物油佐剂、壳聚糖与矿物油佐剂的组合、或PBS混合,最终剂量为1×10<sup>7</sup>cfu每鸟。如上概述,孵化当天的肉雏鸡使用0.25ml所述制剂皮下进行初次接种疫苗。雏鸡在12日龄通过口服灌胃法进行加强,用竞争性ELISA试剂盒(IDEXX)确定在第22天在血清中的抗体水平(IgG)以及回肠黏膜中的抗体水平(IgA),结果分别显示在图9和图10中。样品相对对照吸光度水平比率的下降说明识别SE鞭毛蛋白包被板的抗体水平更高。相比于其它各组,甘露糖化的壳聚糖接种疫苗和加强方案产生显著增加的IgG和IgA水平。

[0071] 实施例VII:单次施用后IgG应答

[0072] 为调查单次肠胃外接种疫苗后的IgG免疫应答,使用与盐水、普通壳聚糖或甘露糖化的壳聚糖组合的鸟博德特氏菌(*Bordetella avium*)菌苗(2.5×10<sup>8</sup>cfu/幼禽)对孵化当天的雏鸡进行皮下接种疫苗。在第14天收集血清,并通过ELISA测量博德特氏菌属的特异性IgG。结果示于图11,并显示对所述处理而言样品相对阳性对照吸光度的比率。更高的吸光度水平指示特异性IgG增加。与博德特氏菌属抗原组合的甘露糖化的壳聚糖产生最高水平的IgG。

[0073] 实施例VIII:在饮用水中加强之后的IgG应答

[0074] 为调查IgG免疫应答,在鸟博德特氏菌菌苗皮下施用之后,接着在第14天进行饮用水加强。使用与盐水、普通壳聚糖或甘露糖化的壳聚糖组合的鸟博德特氏菌菌苗( $2.5 \times 10^8$ cfu/幼禽)对孵化当天的雏鸡进行皮下接种疫苗。在第14天,  $7.8 \times 10^6$ cfu/mL的鸟博德特氏菌菌苗放入在饮用水中作为对接种疫苗的加强。在第 21天(加强后第7天)收集血清,并通过ELISA测量特异性IgG应答。结果示于图12,并显示对于所述处理而言样品相对阳性对照吸光度的比率。更高的吸光度水平指示特异性IgG增加。与对照或未修饰的壳聚糖相比,与博德特氏菌属抗原组合的甘露糖化的壳聚糖产生显著更高水平的IgG。

[0075] 佐剂制备方法:

[0076] 制备甲醛交联的壳聚糖-蛋白疫苗:

[0077] 不含甘露糖的壳聚糖的终产物在疫苗制剂中范围可以从0.5%壳聚糖的最小终浓度至2%壳聚糖的最大终浓度。壳聚糖以适当浓度溶解在每升去离子水中含有 15mL冰乙酸的溶液中(水中1.5%乙酸)。通常,对于肉汤培养而言将2体积培养物与1体积的1.5%壳聚糖混合(在终疫苗制剂中为0.5%壳聚糖)。为达到1.5%壳聚糖的终浓度,以尽可能最少地稀释其它抗原。然后,添加甲醛至抗原溶解的壳聚糖混合中以使得终浓度为0.2%甲醛或0.008M甲醛。在上述实施例中,使用 37%甲醛溶液。可以加入Tris-HCl至0.5g/L的终浓度。

[0078] 制备甘露糖化的壳聚糖:

[0079] 将在一份体积的0.1M乙酸钠(pH4.0)中的两摩尔当量甘露糖在60°C加热两小时。然后将溶液加入到两倍体积的在0.15%乙酸中一摩尔当量的2%壳聚糖中,并使其在室温下反应10分钟以产生1.5%的甘露糖化的壳聚糖溶液。然后,可将其与肉汤培养物混合,以使得2体积培养物与1体积的1.5%甘露糖化的壳聚糖混合。尽可能最少地或需要时,稀释浓缩的抗原。可以加入Tris-HCl至0.5g/L的终浓度。

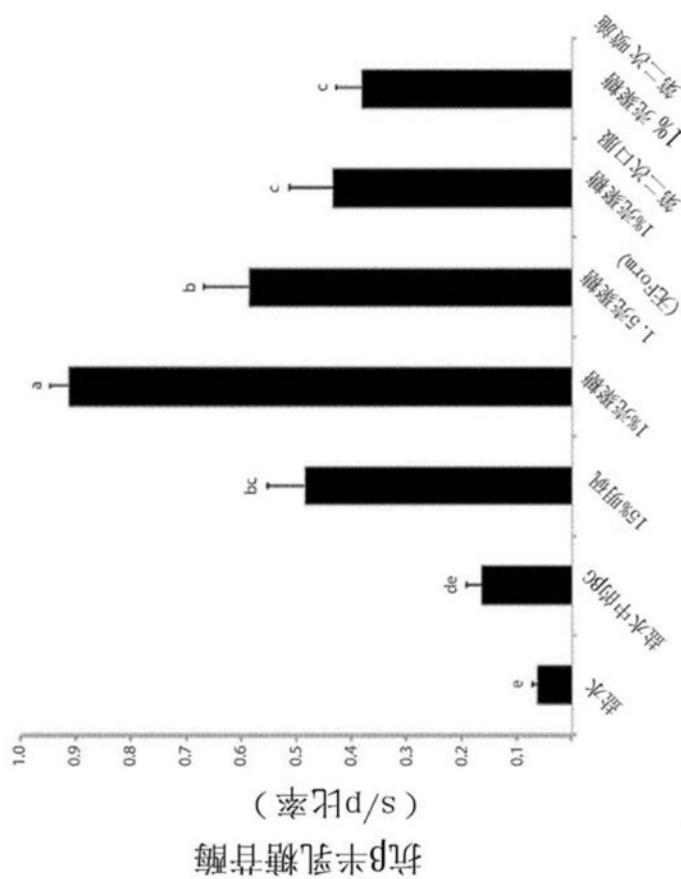


图1

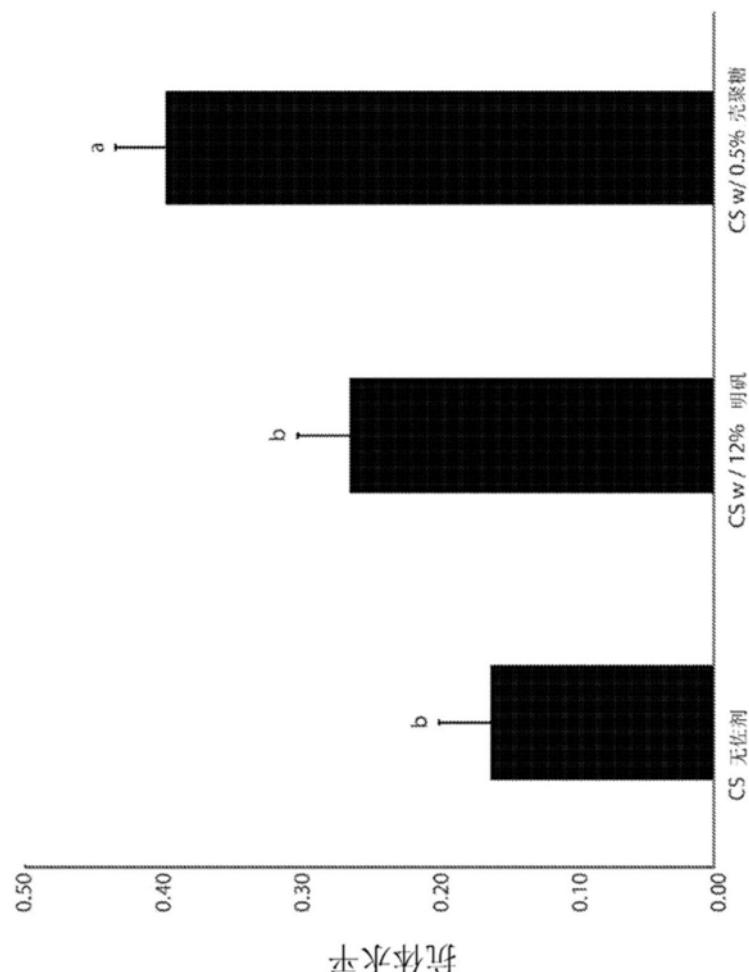


图2

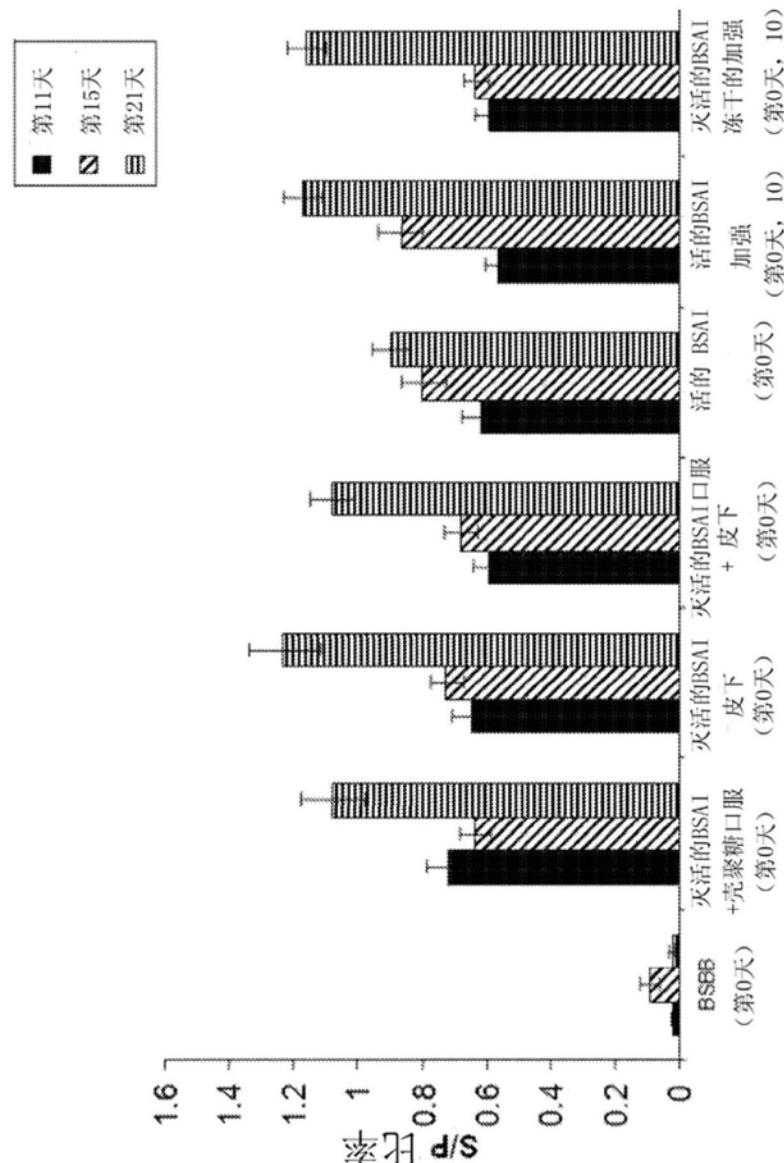


图3A

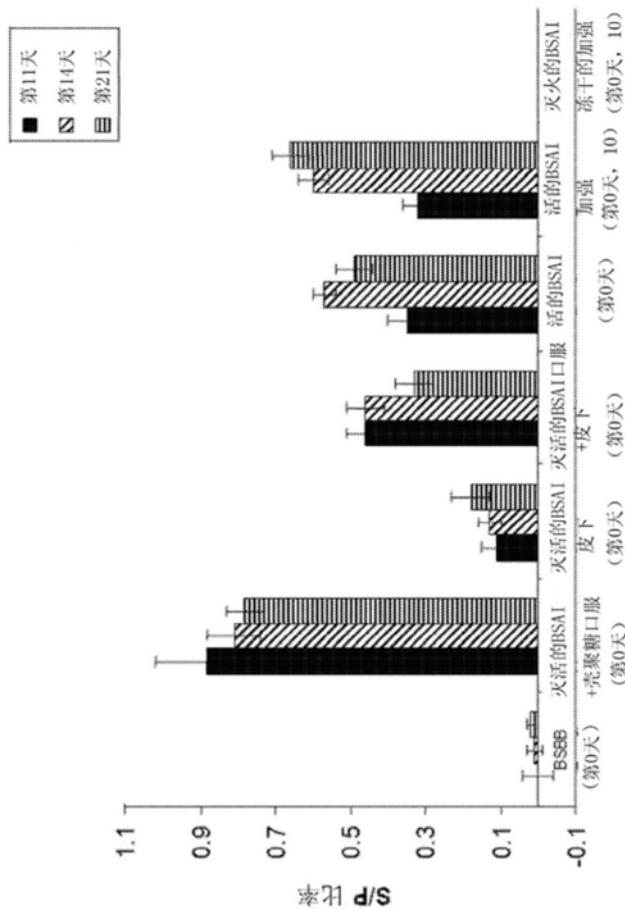


图3B

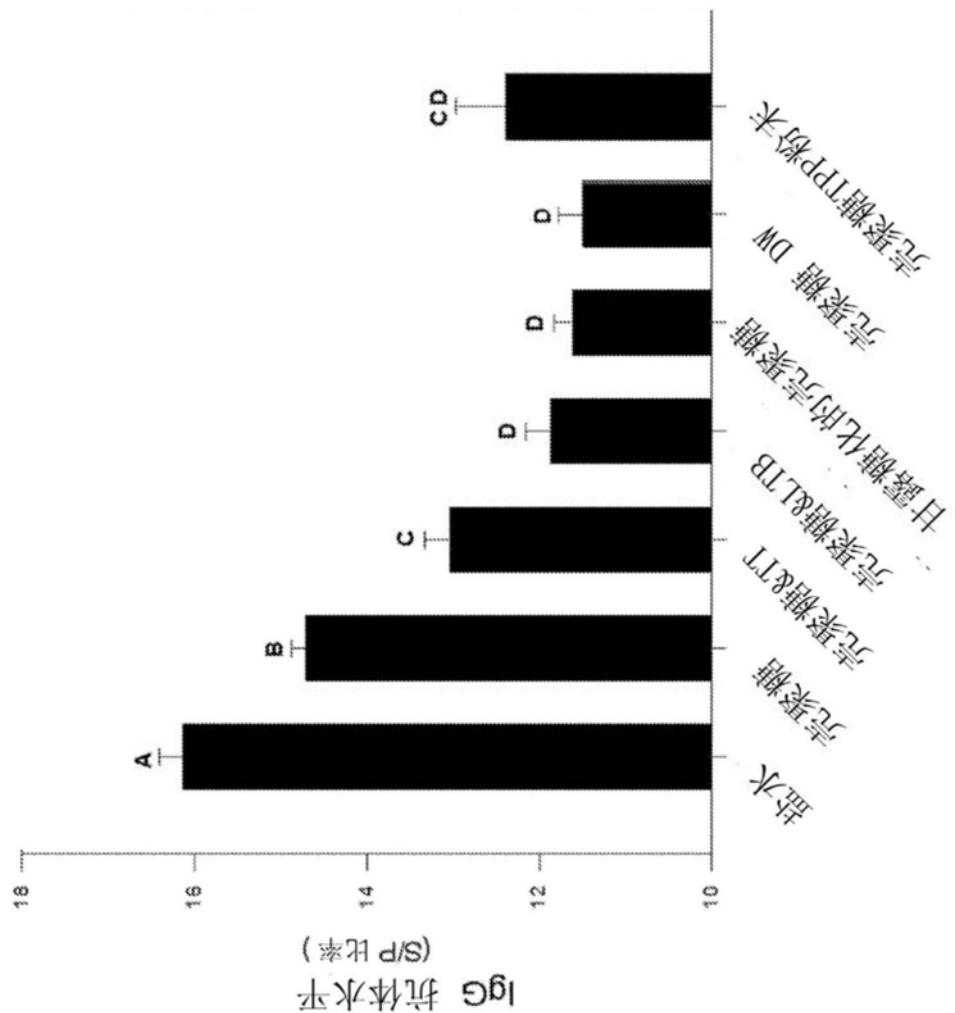


图4

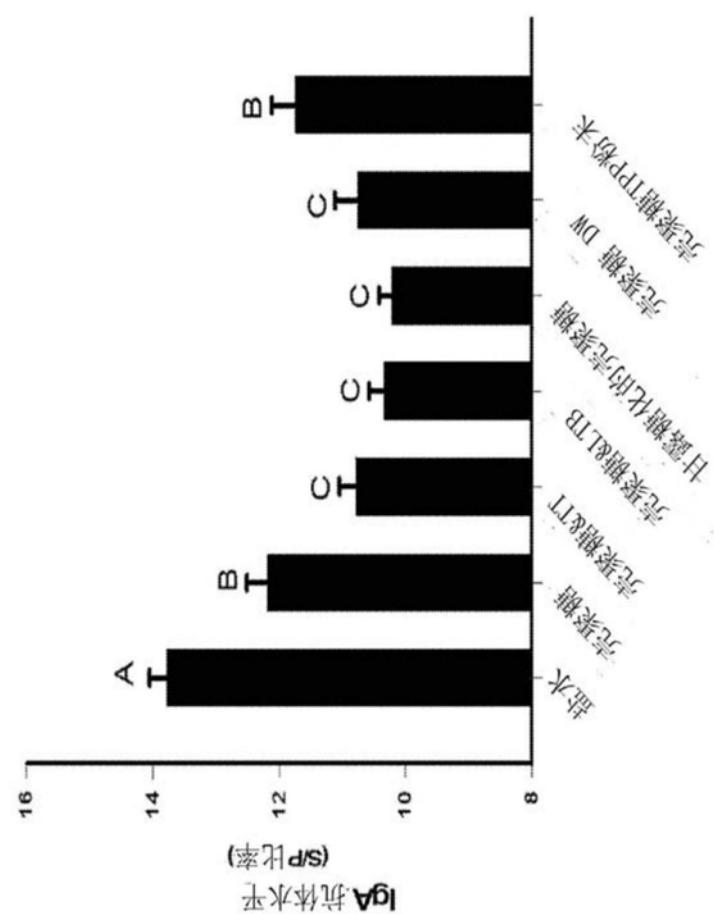


图5

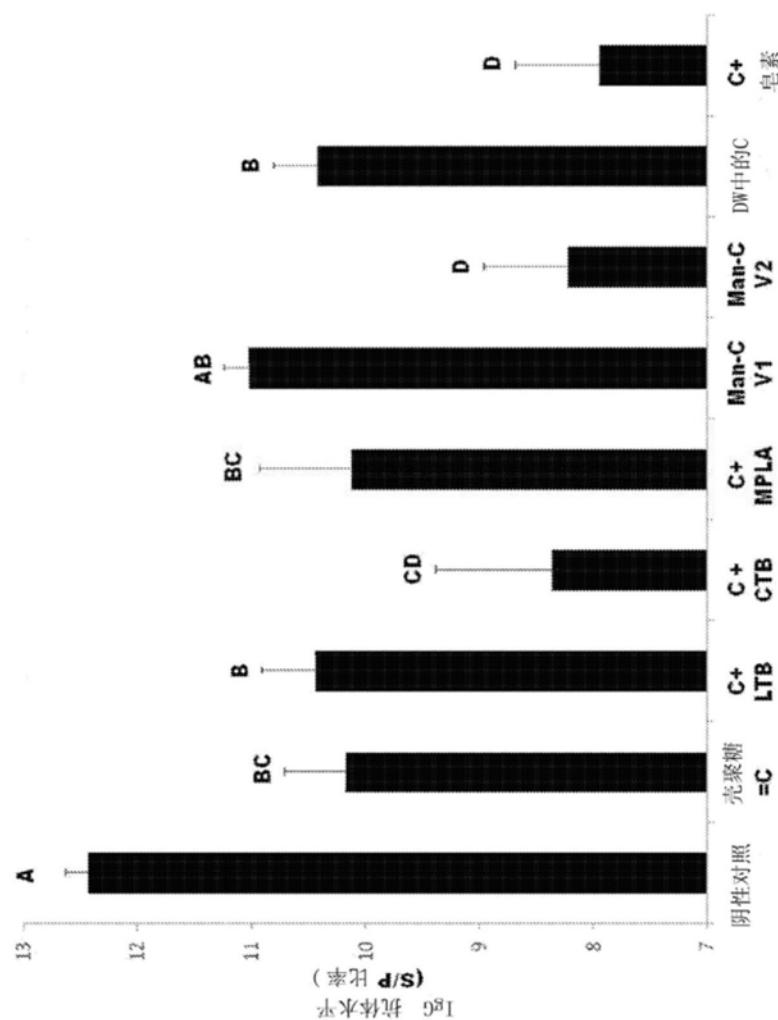


图6A

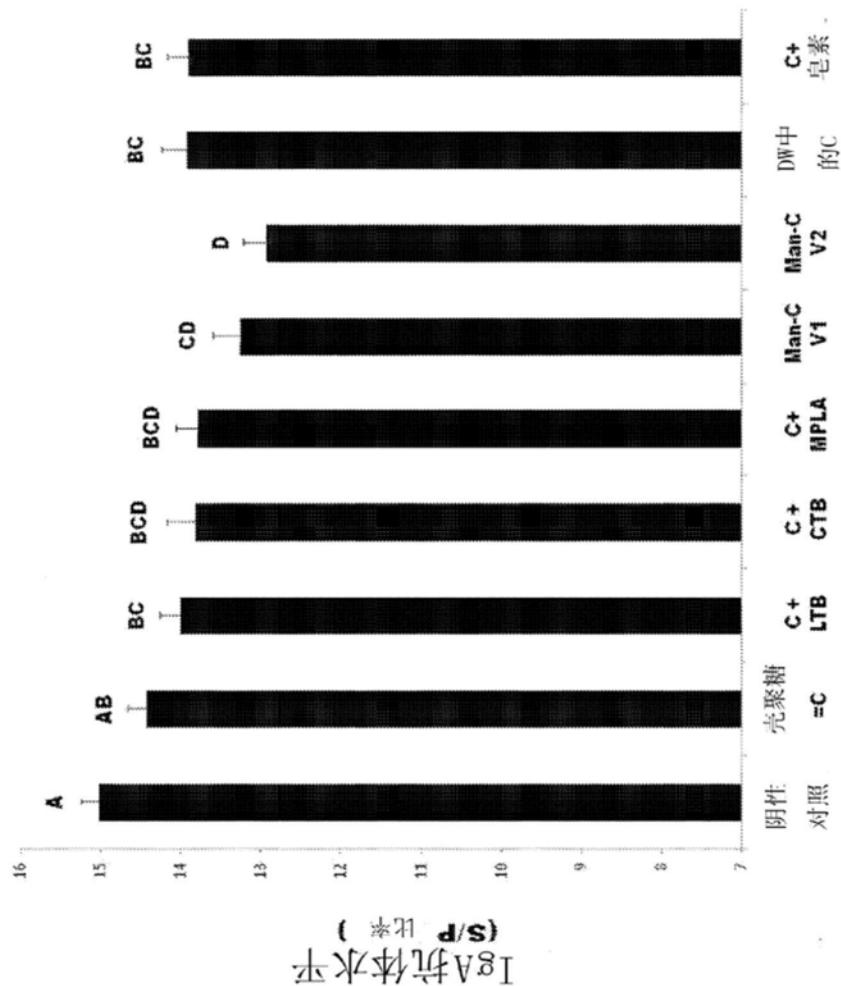


图6B

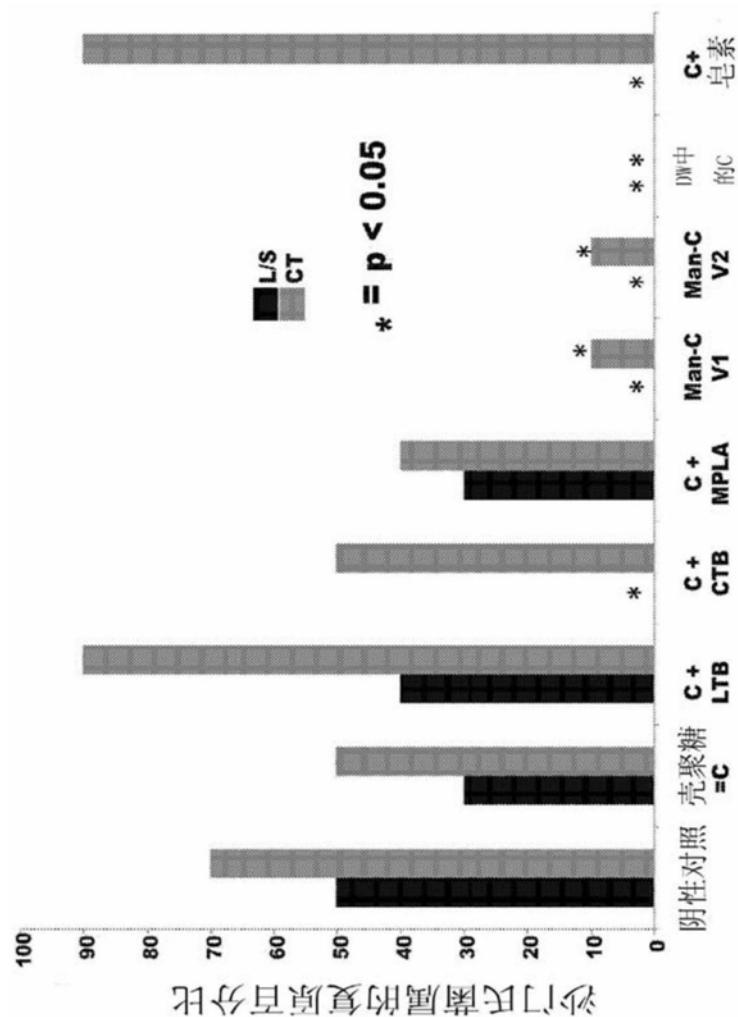


图7

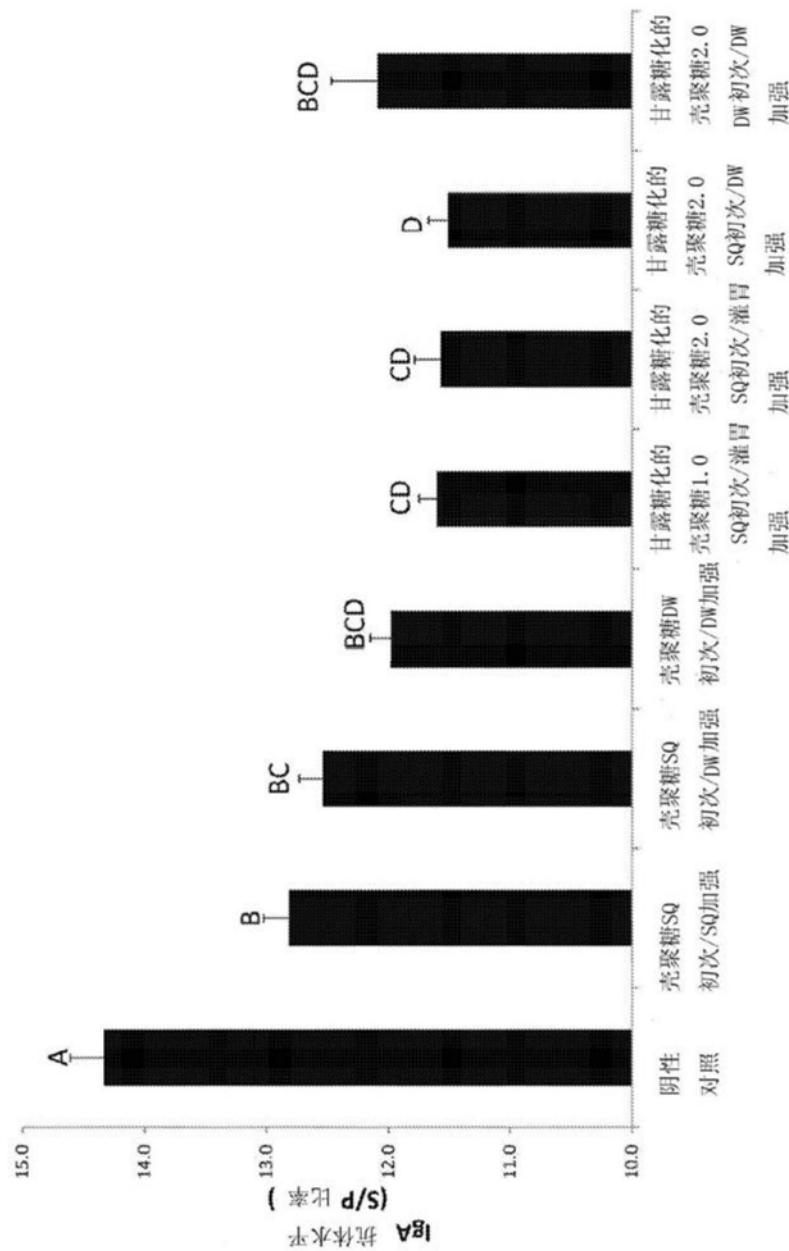


图8

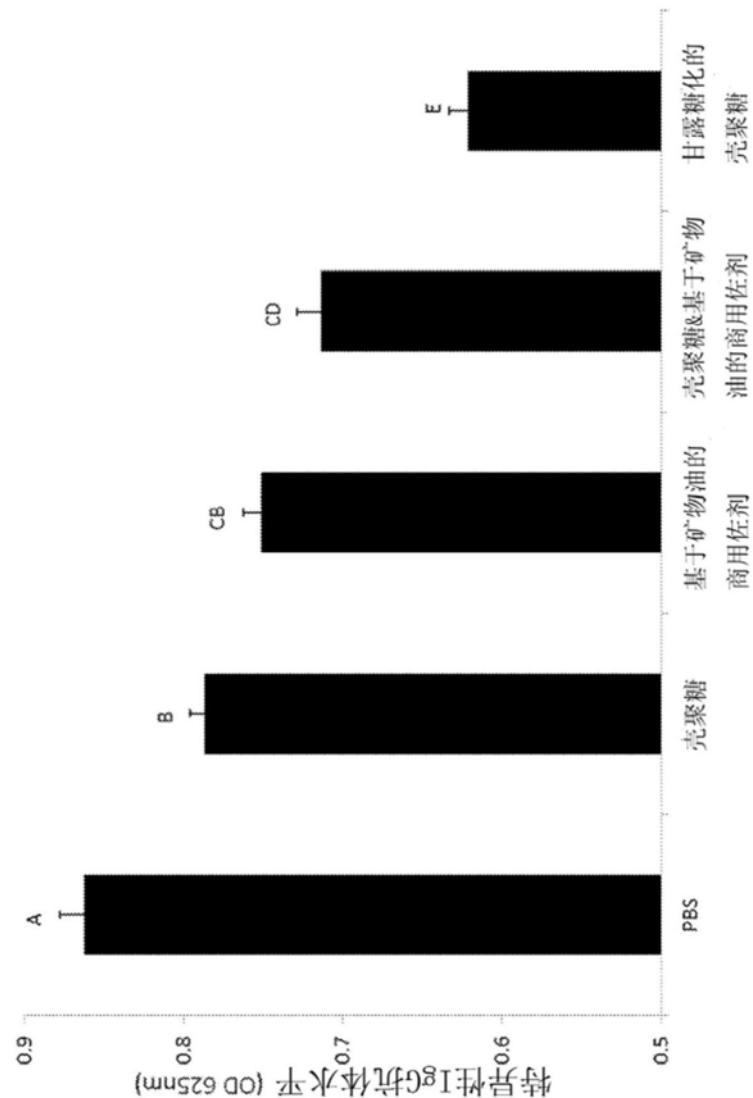


图9

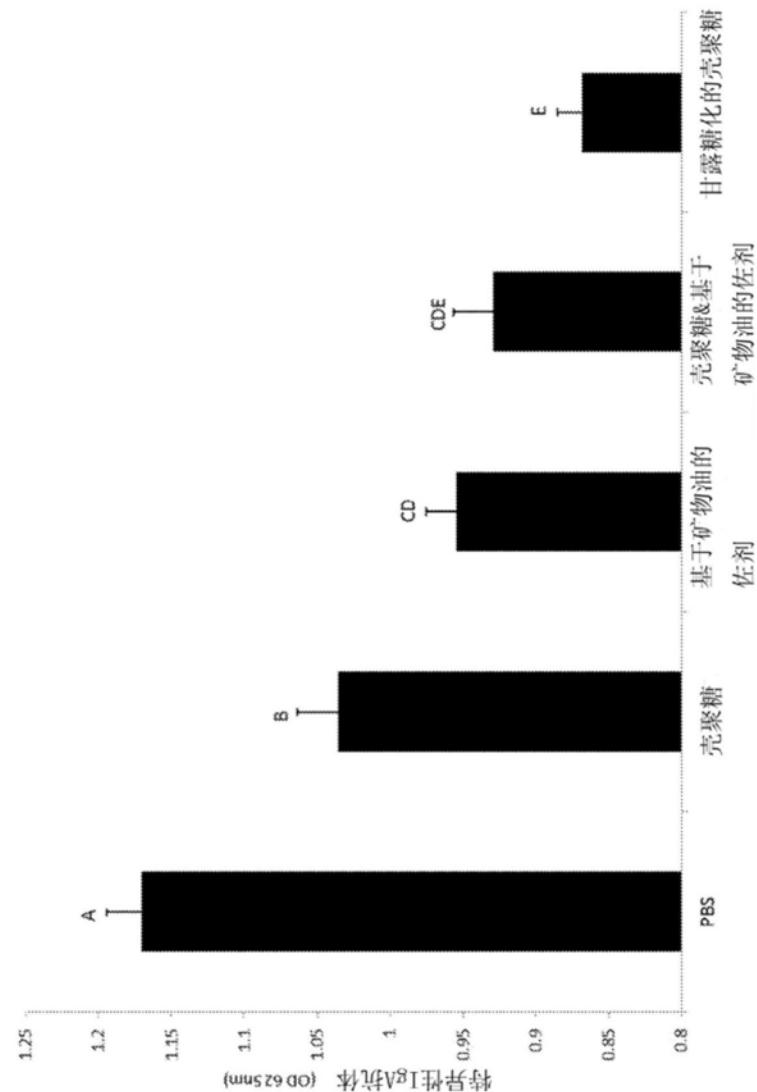


图10

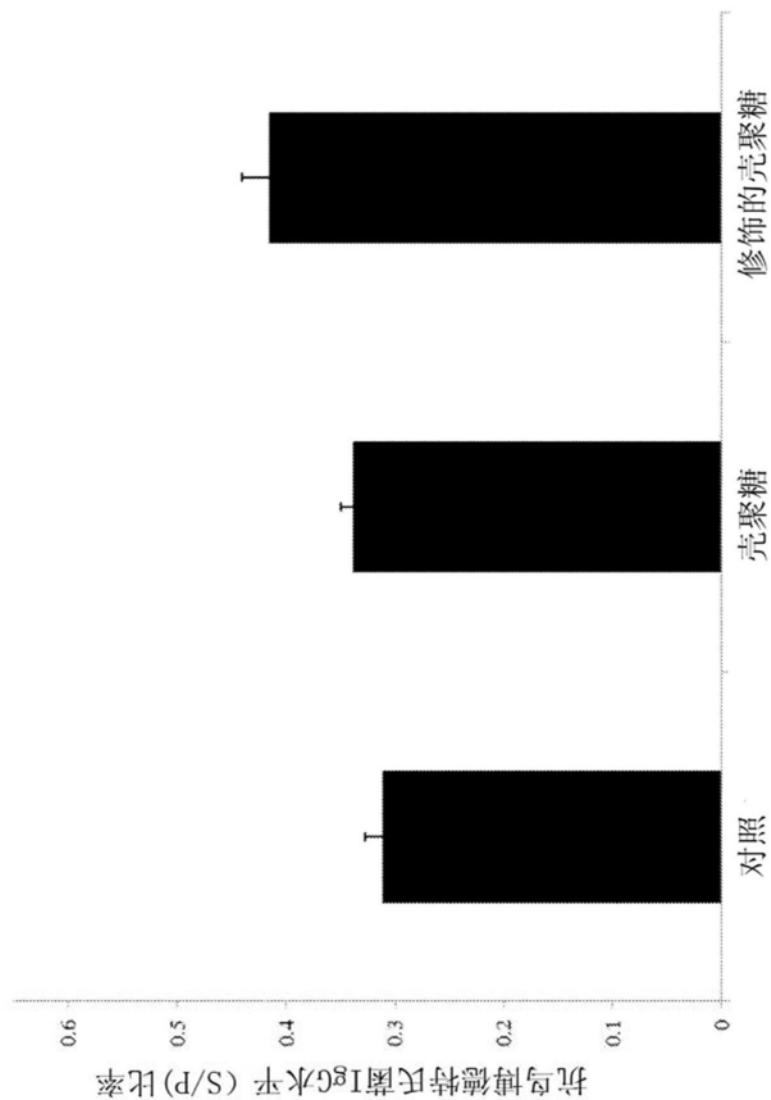


图11

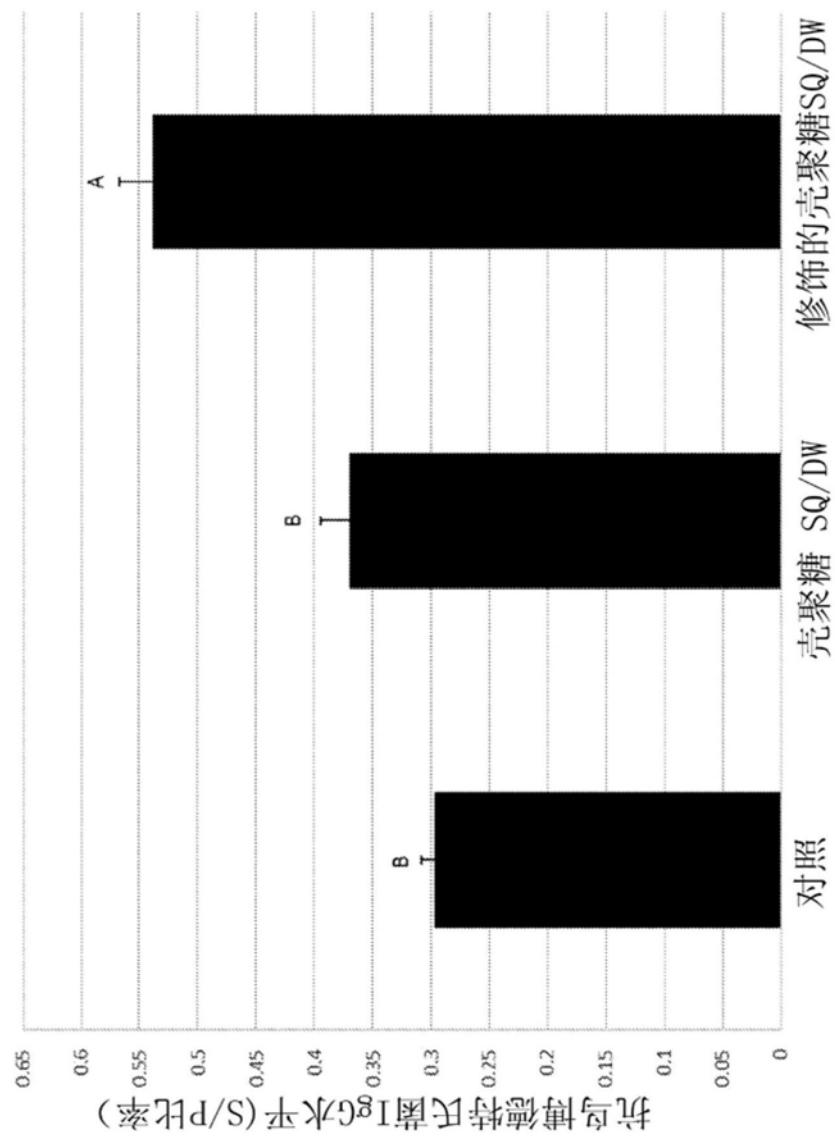


图12