



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101808619 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200880109596. 1

A61K 47/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0758542 2007. 10. 24 FR

US 2004170640 A, 2004. 09. 02, 摘要.

WO 9817310 A, 1998. 04. 30, 摘要.

US 2001028884 A1, 2001. 10. 11, 摘要.

WO 03024354 A, 2003. 03. 27, 摘要.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 30

审查员 刘启明

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2008/051807 2008. 10. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02009/053601 FR 2009. 04. 30

(73) 专利权人 化工产品开发公司 SEPPIC

地址 法国巴黎

(72) 发明人 L·迪皮伊 J·戈舍龙 O·布朗

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隋晓平

(51) Int. Cl.

A61K 9/00 (2006. 01)

A61K 9/127 (2006. 01)

A61K 47/32 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

制备含有至少一种抗原和至少一种辅助剂的
疫苗组合物的方法

(57) 摘要

本发明公开制备疫苗的方法, 该方法包括下列步骤: 步骤 a) 将至少一种反相胶乳或将所述反相胶乳雾化获得的聚合物粉末分散到生理学可接受的水溶液中, 制备辅助剂组合物; 步骤 b) 将步骤 a) 中获得的组合物与抗原介质混合, 形成疫苗组合物。

1. 制备疫苗的方法,该方法包括:

步骤 a) 将至少一种反相胶乳或将所述反相胶乳雾化获得的聚合物粉末分散到生理学可接受的水溶液中,制备辅助剂组合物;

步骤 b) 将步骤 a) 中获得的组合物与抗原介质混合,形成疫苗组合物。

2. 权利要求 1 中所定义的制备疫苗的方法,其特征在于所述至少一种反相胶乳含有至少一种支链或交联的阴离子聚合电解质,该电解质选自全部或部分成盐的丙烯酸均聚物、部分或全部成盐的甲基丙烯酸均聚物、丙烯酸 /2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸共聚物、丙烯酰胺 /2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸共聚物和 2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸 / (2- 羟基乙基) 丙烯酸酯共聚物。

3. 权利要求 1 所定义的制备疫苗的方法,其特征在于所述通过反相乳剂聚合产生反相胶乳所获得的支链或交联的阴离子聚合电解质为全部或部分成盐的丙烯酸均聚物。

4. 权利要求 1-3 中任一项所定义的制备疫苗的方法,其特征在于在步骤 a) 中加入至少一种免疫刺激物。

5. 权利要求 1-3 中任一项所定义的制备疫苗的方法,该方法至少包括下列步骤:

将 10% -20% 的步骤 a) 中所获得的制品与 80% -90% 的抗原介质混合。

6. 权利要求 1-3 中任一项所定义的制备疫苗的方法,该方法还包括,在步骤 b) 中:

加入至少一种免疫刺激剂,该刺激剂选自皂苷类、动物和 / 或植物和 / 或矿物和 / 或合成油类、表面活性剂、氢氧化铝。

7. 根据权利要求 6 的制备疫苗的方法,其中所述表面活性剂为卵磷脂或卵磷脂衍生物。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的方法的步骤 a) 中获得的辅助剂组合物在制备疫苗组合物中的用途。

9. 至少一种反相胶乳或由所述反相胶乳雾化所获得的聚合物粉末在制备疫苗中的用途。

制备含有至少一种抗原和至少一种辅助剂的疫苗组合物的方法

[0001] 本发明涉及制备疫苗组合物的方法,该组合物含有至少一种抗原和至少一种辅助剂,所述抗原特别是病毒、细菌或寄生虫源抗原。

[0002] 灭活疫苗或含有纯化抗原的疫苗的研发日趋重要,因为它能够避免个体治疗中的副作用。然而,抗原性能的改良能够使得所述抗原的免疫原性受到损害。这是它们为何与免疫辅助剂组合应用的原因。

[0003] 免疫辅助剂是当其在病毒、细菌或合成源抗原存在下给药时能够增加免疫系统反应性的产品。它们在注射部位使得巨噬细胞大量产生,然后在淋巴结大量产生,使得特异性免疫球蛋白即抗体产生增加,并刺激与免疫防御机制有关的多种细胞大量产生。

[0004] 这些辅助剂具有各种特性。它们可以例如由乳剂构成,这些乳剂可以是油包水型 W/O 乳剂或水包油型 O/W 乳剂,或水包油油包水型 W/O/W 乳剂或油包水水包油型 O/W/O 乳剂。

[0005] 弗氏 (Freund) 辅助剂是非常有效的;它们是由矿物油和甘露醇酯组合获得的,还可以任选含有被杀灭的分枝杆菌。通过将相等份额的弗氏佐剂与含水抗原介质混合制备疫苗仍然被全世界实验室研究所参考。它们为油包水型 W/O 乳剂,即连续相由油或油混合物构成并且分散相为水相的乳剂,所述水相可以含有增溶赋形剂,例如甘油或二甲基亚砷。活性成分通常位于水相中,所述水相通常为被缓冲的盐溶液。水相为被油膜彼此分离的水滴形式。该制剂使其能够在一定时间内获得持久的被增强的生物学响应。

[0006] 然而,该 W/O 型乳剂通常非常粘稠,因此难以注射。它们通常需要使用大号针头注射器,在注射期间引起疼痛并在注射部位导致创伤。

[0007] 可注射 W/O 乳剂水相含量按重量计约为 100% 乳剂总重量的 30% -40%。曾经使用的按重量计的最大含量为 50%。然而,该限量对于特别是多价疫苗(由多种抗原组成)的研发而言具有一定的缺陷,因为它更适合水相含量按重量计大于 50% 的 W/O 乳剂。

[0008] 然而,在水相含量降低(按重量计至多约 20%) 的 W/O 乳剂中,乳剂的粘度与油的粘度非常接近。水相重量比的增加使其粘度增加。因此,当水含量增加至重量比为 50% 时含有重量比为 20% 水的乳剂(粘度为 100mPa.s,采用配备 2 号轴(spindle)并以每分钟 60 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定)可能变成乳膏,它难以注射。

[0009] 某些商业油性辅助剂(为 W/O 型乳剂,例如 Montanide™ ISA 70)使其能够获得注射用 W/O 乳剂,含有约 30% 重量比的水相和 70% 重量比的油相,粘度在 50-100mPa.s 级数之间,采用配备 2 号轴并以每分钟 60 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定。其它辅助剂(例如 Montanide™ ISA50V2)使其能够获得注射用 W/O 乳剂,含有约 50% 重量比的水相和 50% 重量比的油相,粘度小于 250mPa.s,采用配备 2 号轴并以每分钟 60 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定。

[0010] 以 W099/20305 公布的国际专利申请公开了含有矿物油的基于甘露醇油酸酯的表面活性剂(例如 Marcol™ 52)的用途,用于制备“流体”乳剂,其粘度为 500mPa.s,采用配备 2 号轴并以每分钟 60 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定。

[0011] 流体乳剂的概念主要取决于申请的领域。对于注射用乳剂而言,流体乳剂的粘度上限根据参比 W/O 乳剂(含有 50%重量比的水相和 50%重量比的不完全弗氏佐剂(IFA))的粘度而定义;该粘度(采用配备 3 号轴并以每分钟 30 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定)约为 2000mPa. s。该乳剂被认为是非常粘稠的。

[0012] 如果其粘度小于该参比乳剂的四分之一,即于 25℃ 小于 500mPa. s(采用配备 2 号轴并以每分钟 30 转的速度旋转的 Brookfield LVT 粘度计测定),则该 W/O 乳剂可以说是流体乳剂。

[0013] 然而,与更粘稠的乳剂相比,流体乳剂通常更不稳定,因为仅仅在所述乳剂制备后的数天内于室温下就可以观察到相分离。

[0014] 粉末形式的水相增稠聚合物以其钠盐形式或丙烯酸和其酯的共聚物形式存在,例如丙烯酸均聚物。例如,Novon 公司以商标 Carbopol™ 和 Pemulen™ 出售的聚合物。它们公开于特别是美国专利 US5,373,044 和 US2,798,053 以及欧洲专利 EP0301532。这些聚合物最初开发为增稠剂,主要用于化妆品制剂的增稠,它们已经被公开并使用了多年。这些聚合物获自单聚体,例如丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸酯或丙烯酸甲酯在有机溶剂相中的溶液。在聚合反应过程中,在特定温度和压力条件下通过加入各种催化剂获得的聚合物在最初的溶剂相中不溶,而是沉淀在反应器的底部。该过程被称为“沉淀聚合”。

[0015] 如此获得的聚合物(其众所周知的级别为 **Carbopols®**)是非常有效的增稠剂,广泛用于化妆品工业。这些聚合物也用于各种制药应用:

- [0016] • 缓释聚合物基质的制备,
- [0017] • 聚合物凝胶的制备和所述聚合物与蛋白络合物的制备,
- [0018] • 聚合物膜的制备,该膜在与生物体液接触期间产生保护作用,
- [0019] • 生物粘附制剂的制备,该制剂在应用于粘膜的过程中提供了较长时间的留存,
- [0020] • 疫苗辅助剂的制备。

[0021] 最终聚合物含量重量比为“1%”的疫苗辅助剂以易于注射的、半透明的、液体疫苗形式使用。

[0022] 合成物质的辅助剂特性与其给药时的物理形式密切相关。因此,用于引发大辅助剂效果的粒子大小是控制免疫活性细胞摄取可能性的重要因素。另外,粒子大小的控制使得对抗体产生的响应(体液响应)具有定向性也成为可能,或者对刺激特异性免疫系统细胞的响应(细胞响应)具有定向性成为可能。在溶剂相中以分散体形式存在的各种聚合物的微球的合成广泛描述于文献中,它能够包封生物学活性成分(在疫苗的情况下它可以是抗原),或者用作吸附载体,它可以通过或强或弱的相互作用用于携带和提供与微球外表面结合的活性成分。

[0023] 辅助剂粒子大小的控制始终都是一个挑战,因为它决定了这些辅助剂粒子在一定时间内的稳定性。特别是在储存或相分离期间对于避免聚集而言它是非常重要的。粒子大小的控制也决定了组合物的稳定性,注射进生物体后,它特别与 pH 的变化、酶的存在、温度的变化有关。

[0024] 为此,本申请人寻求研发一种独创技术,用于合成能够控制聚合物(或“微胶”)的聚集物大小从而提供良好辅助剂特性的聚合物。为此,油包水 W/O 乳剂或反相乳液的聚合技术用于制备这些聚合物。具体而言,通过采用适合于 W/O 乳剂技术的油包水型乳化表面

活性剂系统可以控制单聚体溶液液滴大小。一般来讲,它涉及亲脂性乳化表面活性剂(例如 HLB 在 2-7 之间)与亲水性乳化表面活性剂(例如 HLB 在 10-15 之间)的偶合,其加权平均值能够提供均质的 W/O 乳剂。在适合于完成单聚体反应从而形成聚合物的 pH 和温度条件下,通过加入常规浓度的催化剂和其它交联成分使得单聚物聚合。

[0025] 辅助剂粒子大小对含有它们的制剂的免疫特性具有直接影响。另外,粒子的最佳大小取决于待接种疫苗的种属和特定疫苗的种类。根据乳剂制剂的诀窍(HLB 的最佳化,表面活性剂的特性,浓度,方法),在反相乳液的合成过程中,有可能控制乳剂液滴大小的分布,从而控制聚集物的平均大小和粒子大小的分布。根据表面活性剂的含量和乳化步骤期间提供的剪切能量,术语“分散体”应当是指混合体系,它可以是:

[0026] • 混悬液,

[0027] • 乳剂,

[0028] • 微乳。

[0029] 这些各种分散形式能够控制 50nm-100 μ m 范围内的微胶的大小分布。

[0030] 合成聚合物的化学条件(单聚体类型、催化剂、启动剂(initiators))能够控制所获得的聚合物的单一特性(平均摩尔质量、交联、阴离子特性)。

[0031] 如此获得的辅助剂为“聚合物油滴”形式或“反相胶乳(inverse latex)”乳剂形式。当该乳剂分散在含有生理学缓冲液的抗原水溶液中时,它反转并分散从而获得聚合物微胶在水中的半透明液体分散体。例如,聚(丙烯酸钠)微胶的液滴的平均大小在 0.5-5 微米之间,例如约 2 微米。

[0032] 本发明的目的是采用反相胶乳制备疫苗的方法。更特别的是,本发明的目的是制备疫苗的方法,该方法包括:

[0033] 步骤 a) 将至少一种反相胶乳或将所述反相胶乳雾化获得的聚合

[0034] 物粉末分散到生理学可接受的水溶液中,制备辅助剂组合物;

[0035] 步骤 b) 将步骤 a) 中获得的组合物与抗原介质混合,形成疫苗组合物。

[0036] 术语“反相胶乳”是指聚合物的油包水乳剂,其中分散在连续油相中的水相含有所述聚合物。因此,获自反相乳剂聚合的反相胶乳为液体乳剂形式。如果必须或者如果需要,可以将该反相胶乳随后雾化从而形成所述聚合物粉末。所述雾化例如公开于欧洲专利申请 EP1496081。

[0037] 在本发明的范围内,术语“生理学上可接受的水溶液”是指能够在疫苗制备中使用的水溶液,它包括例如符合药典要求的水,特别是欧洲或美国药典,例如生理盐水或盐水和/或(如果适当的话)符合所述药典要求的水-醇溶液。

[0038] 术语“辅助剂组合物”是指作为免疫辅助剂的组合物。

[0039] 在步骤 a) 进行之前,也可以加入至少一种亲水性表面活性剂,以便于提高此类分散体在一定时间内的稳定性。

[0040] 术语“亲水性表面活性剂”是指具有足够高的 HLB 值(10-15 之间)从而可以获得稳定的水包油型乳剂的乳化表面活性剂,例如乙氧基化的甘露醇酞酯(mannitan esters)或乙氧基化的脱水山梨醇酞酯,例如采用 20ml 环氧乙烷乙氧基化的脱水山梨醇油酞酯,它由 SEPPIC 公司以商品名 MontanoxTM80 出售。

[0041] 术语“抗原介质”是指含有至少一种抗原或至少一种包含氨基酸序列的化合物的

体内生成剂(generator)的介质。表述“抗原或至少一种包含氨基酸序列的化合物的体内生成剂”是指被杀灭的微生物(例如病毒、细菌或寄生虫)或这些微生物的纯化部分或者致病性已经减弱的活的微生物。作为构成本发明抗原的病毒的实例,它们包括狂犬病病毒、疱疹病毒(例如奥耶斯基氏(Aujeszky)病病毒)、正粘液病毒(orthomixoviruses)(例如流感病毒)、微小核糖核酸病毒(picornaviruses)(例如手足口病病毒)或逆转录病毒(例如HIVs)。作为构成本发明抗原的细菌类微生物的实例,可以提及的包括大肠杆菌(E. coli)以及巴斯德菌(Pasteurella)、疳病菌(Furunculosis)、弧菌(Vibriosis)、葡萄球菌和链球菌属微生物。作为寄生虫的实例,可以提及的包括锥虫属(Trypanosoma)、疟原虫属(Plasmodium)和利什曼虫属(Leishmania)。还可以提及的包括重组病毒,特别是非包膜病毒,例如腺病毒、牛痘病毒、金丝雀痘病毒、疱疹病毒或杆状病毒。也包括活的、非包膜的、重组的病毒载体,其基因组含有能够编码抗原亚单位的序列,该序列优选插入对于相应的包膜病毒而言并非必不可少的部分,所述抗原亚单位能够诱导抗体合成和/或诱导对抗上述包膜病毒或致病性微生物的防护作用;这些抗原亚单位可以例如是蛋白、糖蛋白、肽或肽组分的一部分和/或对抗活的微生物例如包膜病毒、细菌或寄生虫的感染。插入微生物的外源性基因可以例如源自奥耶斯基氏病病毒或HIV病毒。

[0042] 可以特别述及的还包括由核苷酸序列组成的重组质粒,其中嵌有源自致病性微生物或病毒的外源性核苷酸序列。后一核苷酸序列的目的是为了包含氨基酸序列的化合物的表达,该化合物自身的目的是引发宿主有机体中的免疫反应。

[0043] 表述含有氨基酸序列的化合物的“体内”生成剂是指能够在引入所述体内生成剂的宿主有机体内表达所述化合物的完整的生物学产品。含有氨基酸序列的化合物可以是蛋白、肽或糖蛋白。这些体内生成剂通常通过遗传工程学的方法获得。更特别的是,它们可以由活的微生物(通常为病毒)组成,它们在重组载体中起作用,其中插入了核苷酸序列,特别是外源性基因。这些化合物自身是已知的,特别用作重组亚单位疫苗。就这方面而言,可以参考下列报道:M. Eloit等,Journal of virology(1990)71,2925-2431以及公开的国际专利申请WO-A-91/00107和WO-A-94/16681。本发明的体内生成剂也可以由包含外源性核苷酸序列的重组质粒组成,它能够在宿主有机体内表达含有氨基酸序列的化合物。此类重组质粒及其给予宿主有机体的方法描述于:Lin等,1990年的Circulation 82:2217,2221;Cox等,J. of Virol, Sept. 1993,67,9,5664-5667和公开的国际专利申请W095/25542。根据包含在体内生成剂中的核苷酸序列的性质,在宿主有机体中表达的含有氨基酸序列的化合物可以:

[0044] (i) 是抗原并能够引发免疫反应,

[0045] (ii) 对疾病具有治疗作用,主要是功能性疾病,这些疾病在宿主有机体中已经发生。在此情况下,体内生成剂使得对宿主的基因疗法类的治疗成为可能。

[0046] 举例来说,体内生成剂的此类治疗作用可以包括细胞活素类的合成,例如白介素(特别是白介素-2)的合成。这些白介素能够引发或加强靶向选择性消除癌细胞的免疫反应。

[0047] 如上文所定义的疫苗组合物含有的抗原的浓度取决于该抗原的特性和待治疗个体的种类。然而,特别值得注意的是,本发明的辅助剂能够显著减少通常所需要的抗原的剂量。适合的抗原浓度可以由本领域技术人员按常规测定。通常,该剂量约为 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ - $1\text{g}/$

cm^3 ,更通常在 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ – $100\text{mg}/\text{cm}^3$ 之间。所述体内生成剂在本发明组合物中的浓度还取决于所述生成剂的特性以及给予所述生成剂的宿主。该浓度可以根据常规实验方法由本领域技术人员容易地测定。作为说明而言,当体内生成剂为重组微生物时,其在本发明组合物中的浓度通常在 10^2 – 10^{15} 个微生物/ cm^3 之间,优选在 10^5 – 10^{12} 个微生物/ cm^3 之间。当体内生成剂为重组质粒时,其在组合物(根据本发明目的的方法获得的)中的浓度可以在 $0.01\text{g}/\text{dm}^3$ – $100\text{g}/\text{dm}^3$ 。如上文所定义的疫苗可以通过将辅助剂相与抗原相混合制备,还可以任选加入水或可药用稀释介质。

[0048] 在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中使用的反相胶乳制备中采用的油连续相可以包含一或多种选自下列的化合物:矿物油、植物油或动物油,所述油的烷基酯,脂肪酸的烷基酯或脂肪酸的烷基醚,多元醇的脂肪酸酯或多元醇的脂肪醇醚以及合成的油类。

[0049] 也可以采用商业矿物油,即含有饱和烃类的商业矿物油,例如石蜡、异链烷烃类或环烷烃类,其室温下的密度在 0.7–0.9 之间,沸点为 180°C 以上,例如,Exxon Chemical 公司以商品名 Exxsol™ D 100S 或 Marcol™ 52 出售的产品异十六烷或异十二烷,或者数种这些油类的混合物。

[0050] 根据本发明一个优选的方面,油相由 Marcol™ 52 或异十六烷组成;异十六烷(化学文摘 (Chemical Abstracts) 中由 RN 号 = 93685–80–4 鉴定)是 C_{12} 、 C_{16} 和 C_{20} 异链烷烃类的混合物,它含有至少 97% 的 C_{16} 异链烷烃类,其中主要成分为 2,2,4,4,6,8,8–七甲基壬烷 (RN = 4390–04–9)。在法国由 Bayer 公司出售。Marcol™ 52 为商业油,相当于 French Codex 定义的液体凡士林。根据 FDA 规定 CFR 172.878 和 CFR 178.3620(a),它是白色矿物油,列示于美国药典 US XXIII (1995) 和欧洲药典 (1993)。

[0051] 对于植物来源的油类的实例而言,可以提及的包括落花生油、橄榄油、芝麻油、大豆油、小麦胚芽油、葡萄籽油、葵花籽油、蓖麻油、亚麻油、玉米油、椰子油、棕榈油、胡桃油、榛子油或油菜籽油,或者还有法国 Sophim 公司以商品名 Phytosqualan™ 出售的植物来源的角鲨烯或角鲨烷(化学文摘中以 RN 号 = 111–01–3 鉴定),它由烃类混合物组成,该烃含有重量比超过 80% 的 2,6,10,15,19,23–六甲基二十四烷。

[0052] 对于动物来源的油类的实例而言,可以提及的包括鲸油、牛油、自鱼肝中提取的角鲨烷或角鲨烯。

[0053] 对于油类的烷基酯类的实例而言,可以提及的包括所述油类的甲基、乙基、直链或支链丙基或者直链或支链丁基酯。

[0054] 对于适合于制备上述酯类的脂肪酸而言,可以提及的更特别地包括那些含有 12–22 个碳原子的脂肪酸,例如,肉豆蔻酸、棕榈酸、油酸、蓖麻酸或异硬脂酸,最好为在 20°C 为液体状态的脂肪酸。

[0055] 对于脂肪酸酯或脂肪酸醚的实例而言,可以提及的包括脂肪酸的烷基酯,例如油酸乙酯、油酸甲酯、豆蔻酸异丙基酯或棕榈酸辛基酯;多元醇的脂肪酸酯或多元醇的脂肪醇醚,例如脂肪酸单甘油酯、脂肪酸二甘油酯、脂肪酸三甘油酯;脂肪酸与聚甘油的酯或丙二醇的脂肪酸酯,更特别的是脂肪酸与环己六醇 (hexol) (例如山梨醇或甘露醇) 的酯以及脂肪酸与环己六醇酸酐 (hexol anhydride) (例如脱水山梨醇或一缩甘露醇) 的酯。

[0056] 对于合成油类的实例而言,可以提及的包括氢化聚癸烯或氢化聚异丁烯,由法国 Ets B. Rossow and Cie 公司以商品名 Parleam–Polysynlane™ 出售,引述于 Michel 和 Irene

Ash, "Thesaurus of Chemical Products", Chemical Publishing Co, Inc. 1986 第 I 卷, 第 211 页 (ISBN 0 7131 3603 0)。

[0057] 在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中在反相胶乳制备中采用的油连续相可以只包含上述化合物之一或者数种上述化合物的混合物。

[0058] 油相在反相胶乳中的比例按重量比计为反相胶乳总重量的 10% -50%, 优选为 15% -25%。

[0059] 反相乳剂聚合导致反相胶乳形成, 这是本发明目的的方法步骤 a) 中制备辅助剂组合物的基础, 在反相乳剂聚合中获得的所述至少一种聚合物选自: 支链或交联阴离子聚合电解质, 它选自丙烯酸 /- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸 (AMPS) 共聚物, 丙烯酰胺 /2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸共聚物, 2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸 / (2- 羟基乙基) 丙烯酸酯共聚物, 部分或全部成盐的 2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸均聚物, 部分或全部成盐的丙烯酸均聚物, 部分或全部成盐的甲基丙烯酸均聚物, 丙烯酰基乙基三甲基氯化铵 / 丙烯酰胺共聚物, AMPS/ 乙烯基吡咯烷酮共聚物, AMPS/N- 甲基丙烯酰胺共聚物, AMPS/N, N- 二甲基丙烯酰胺共聚物, AMPS/ 甲基丙烯酰胺共聚物, AMPS/N- 异丙基丙烯酰胺共聚物, AMPS/N-[2- 羟基 -1, 1- 二 (羟基甲基) 乙基] 丙烯酰胺 [或三 (羟基甲基) 丙烯酰胺甲烷或 N- 三 (羟基甲基) 甲基丙烯酰胺, 也称为 THAM] 共聚物, 丙烯酸 / 丙烯酰胺共聚物, 丙烯酸 /N- 甲基丙烯酰胺共聚物, 丙烯酸 /N, N- 二甲基丙烯酰胺共聚物, 丙烯酸 / 甲基丙烯酰胺共聚物, 丙烯酸 /N- 异丙基丙烯酰胺共聚物, 丙烯酸 /N-[2- 羟基 -1, 1- 二 (羟基甲基) 乙基] 丙烯酰胺 [或三 (羟基甲基) 丙烯酰胺甲烷或 N- 三 (羟基甲基) 甲基丙烯酰胺, 也称为 THAM] 共聚物, 丙烯酸和丙烯酸烷基酯的共聚物 (其中碳链含有 10-30 个碳原子) 以及 AMPS 和丙烯酸烷基酯的共聚物 (其中碳链含有 10-30 个碳原子)。

[0060] 术语“支链聚合物”是指非线性聚合物, 它具有支链从而获得较高度的缠结, 当该聚合物溶于水时, 导致其在低剪切率下具有非常高的粘度。

[0061] 术语“交联聚合物”是指具有三维网状形式的非线性聚合物, 它不溶于水但是可以在水中膨胀, 从而获得化学凝胶。

[0062] 当该聚合电解质交联时, 更特别的是它与二乙烯或聚乙烯化合物以 0.005% -1% 的摩尔比 (以相当于使用的单聚体表示) 交联, 优选摩尔比为 0.01% -0.2%, 更特别优选 0.01% -0.1%。优选交联剂和 / 或支链剂选自乙二醇二甲基丙烯酸酯、乙二醇二丙烯酸酯、二烯丙氧基乙酸钠、乙二醇二丙烯酸酯、二烯丙基脒、三烯丙基胺、三甲基醇 (trimethylol) 丙烷三丙烯酸酯或亚甲基二 (丙烯酰胺) 和烯丙基蔗糖。

[0063] 当在作为本发明目的的方法步骤 a) 中制备的辅助剂组合物的制备步骤中采用反相胶乳时, 它通常含有 1% -5% 重量比的油包水型 (W/O) 乳化系统。

[0064] 在上面定义中的术语“油包水型 (W/O) 乳化系统”是指单一表面活性剂或表面活性剂混合物, 条件是所述混合物的 HLB 值足够低, 能够诱导油包水乳剂的生成。对于油包水乳化剂而言, 可以提及的实例包括例如脱水山梨醇酯, 例如脱水山梨醇油酸酯, 例如 SEPPIC 公司以商品名 MontaneTM80 出售的产品; 脱水山梨醇异硬脂酸酯, 例如 SEPPIC 公司以商品名 MontaneTM70 出售的产品; 或脱水山梨醇倍半油酸酯, 例如 SEPPIC 公司以商品名 MontaneTM83 出售的产品。也可以包括某些聚乙氧基化的脱水山梨醇酯, 例如五乙氧基化的脱水山梨

醇单油酸酯,例如 SEPPIC 公司以商品名 Montanox™ 81 出售的产品,或五乙氧基化的脱水山梨醇异硬脂酸酯,例如 SEPPIC 公司以商品名 Montanox™ 71 出售的产品。还包括二乙氧基化的十四烷醇 (oleocetyl alcohol),例如 SEPPIC 公司以商品名 Simulsol™ OC 72 出售的产品,其分子量在 1000-3000 之间的聚酯,由聚(异丁烯基)琥珀酸或其酸酐与二乙醇胺缩合生产;例如 UNIQEMA 公司出售的 Hypermer™ 2296;最后还包括分子量在 2500-3500 之间的嵌段共聚物,例如 UNIQEMA 公司出售的 Hypermer™ B246 或 SEPPIC 公司出售的 Simaline™ IE 200。

[0065] 当在作为本发明目的的方法步骤 a) 中制备的辅助剂组合物的制备步骤中采用反相胶乳时,它通常含有 2% -8% 重量比的水包油型 (O/W) 乳化系统。

[0066] 在上面定义中的术语“水包油型 (O/W) 乳化系统”是指单一表面活性剂或表面活性剂混合物,条件是所述混合物的 HLB 值足够高,能够诱导水包油乳剂的生成。对于水包油乳化剂而言,可以提及的实例包括例如乙氧基化的脱水山梨醇酯,例如采用 20mol 氧乙烯聚乙氧基化的脱水山梨醇油酸酯, SEPPIC 公司以商品名 Montanox™ 80 出售的产品;采用 20mol 氧乙烯聚乙氧基化的脱水山梨醇月桂酸酯, SEPPIC 公司以商品名 Montanox™ 20 出售的产品;采用 40mol 氧乙烯聚乙氧基化的蓖麻油,以商品名 Simulsol™ OL50 出售;十乙氧基化的十二烷醇 (oleodecyl alcohol), SEPPIC 公司以商品名 Simulsol™ OC 710 出售;七乙氧基化的月桂醇,以商品名 Simulsol™ P7 出售;或采用 20mol 氧乙烯聚乙氧基化的脱水山梨醇单硬脂酸酯, SEPPIC 公司以商品名 Montanox™ 60 出售。

[0067] 乳剂聚合导致反相胶乳形成,这是本发明目的的方法步骤 a) 中制备辅助剂组合物的基础,在乳剂聚合中获得的聚合物最好采用选自下列的成分:全部或部分成盐的丙烯酸均聚物,部分或全部成盐的甲基丙烯酸均聚物,丙烯酸 /2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸共聚物,丙烯酰胺 /2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸共聚物,2- 甲基 -[(1- 氧代 -2- 丙烯基) 氨基] -1- 丙烷磺酸 / (2- 羟基乙基) 丙烯酸酯共聚物,更优选聚(丙烯酸钠)。

[0068] 所述在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中制备的辅助剂组合物中的至少一种反相胶乳的重量比为辅助剂组合物总重量的 0.5% -30%, 优选为辅助剂组合物总重量的 5% -15%。

[0069] 在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中,可以加入免疫刺激物。所述免疫刺激物为例如选自一或多个常规免疫刺激剂,例如 Avridine™, N, N- 二十八烷基 -N', N' - 二(2- 羟基乙基) 丙烷二胺, MDP(胞壁二肽) 衍生物,特别是苏氨酸基 -MDP、分枝菌酸衍生物或脂质 A 衍生物。此类物质更特别为离子化物质。该离子化物质为例如选自一或多个水溶性金属阳离子有机盐,例如,葡萄糖酸钙、葡萄糖酸镁、水杨酸铝或可溶性乙酸铝。当本发明的辅助剂组合物含有可药用盐时,该盐的浓度为 0.02-3000mg/cm³, 优选 0.1-1000mg/cm³, 更优选 0.1-150mg/cm³。也可以采用通常用作免疫辅助剂的不溶性盐,例如氢氧化铝或磷酸钙。

[0070] 根据本发明的一个方面,在步骤 a) 中,可以加入至少一种具有亲水性的表面活性剂,用于稳定乳剂。所述至少一种具有亲水性的表面活性剂的 HLB 为 10-15 之间。

[0071] 步骤 a) 中制备的组合物含有 0.1% -15% 的所述至少一种表面活性剂,优选 0.1% -5% 的所述至少一种表面活性剂。

[0072] 为了实施本发明,采用公式 $HLB = 20(1 - I_s/I_a)$ 计算表面活性剂的 HLB 数值,其中

I_s 代表皂化指数, I_a 代表用于制备所述表面活性剂的脂肪酸的酸指数。在表面活性剂混合物的情况下, 混合物的 HLB 为各个表面活性剂的 HLB 的加权和。这两个指数 (皂化指数和酸指数) 可以根据欧洲药典中所述方法测定。

[0073] 根据本发明的另一特定方面, 在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中获得的组合物的油相含量按重量计为在作为本发明目的的方法的步骤 a) 中获得的组合物总重量的 0.1% -5%, 优选按重量计为 0.2% -1%。

[0074] 使用的亲水性表面活性剂通常选自改良的脂肪物质。

[0075] 本发明中使用的改良的脂肪物质可以是矿物、植物或动物来源的。对于矿物来源的改良脂肪物质而言, 可以采用石油来源的油类。

[0076] 对于植物来源的改良脂肪物质而言, 可以包括改良的植物油类, 例如改良的落花生油、橄榄油、芝麻油、大豆油、小麦胚芽油、葡萄籽油、葵花籽油、蓖麻油、亚麻油、玉米油、椰子油、棕榈油、胡桃油、榛子油或油菜籽油。

[0077] 对于动物来源的改良脂肪物质而言, 可以包括例如改良的角鲨烷、改良的角鲨烯、改良的鲸油或改良的牛油。

[0078] 术语“改良的脂肪物质”特别是指脂肪物质的烷氧基化的衍生物, 更特别是油类的烷氧基化的衍生物或油类的烷基酯类的烷氧基化的衍生物, 更特别是油类的乙氧基化的和 / 或丙氧基化的衍生物或者是所述油类的甲基、乙基、直链或支链丙基或直链或支链丁基酯的乙氧基化的和 / 或丙氧基化的衍生物。本发明的目的更具体为如上文所定义的组合物, 其中改良的脂肪物质选自油类的乙氧基化的衍生物, 所述油类中氧乙烯的摩尔数为 1-10 之间。

[0079] 术语“改良的脂肪物质”也是指多元醇的脂肪酸酯或多元醇的脂肪醇醚, 更特别是脂肪酸与环己六醇 (hexol) (例如山梨醇或甘露醇) 的酯, 或脂肪酸与环己六醇酸酐 (hexol anhydride) (例如脱水山梨醇或一缩甘露醇) 的酯; 多元醇脂肪酸酯的烷氧基化的衍生物或多元醇脂肪醇醚的烷氧基化的衍生物, 例如烷氧基化的脂肪酸三甘油酯, 烷氧基化的聚甘油脂肪酸酯, 更特别是烷氧基化的脂肪酸与环己六醇 (例如山梨醇或甘露醇) 的酯, 或烷氧基化的脂肪酸与环己六醇酸酐 (例如脱水山梨醇或一缩甘露醇) 的酯, 其氧乙烯摩尔数为 1-20 之间。

[0080] 本发明上下文中的术语“多元醇脂肪酸酯”是指多元醇的脂肪酸单酯或多元醇的脂肪酸多酯, 例如多元醇的脂肪酸二酯或多元醇的脂肪酸三酯。对于所述酯的多烷氧基化衍生物同样适用。

[0081] 本发明中的术语“多元醇脂肪醇醚”是指多元醇的脂肪酸单醚或多元醇的脂肪酸多醚, 例如多元醇的脂肪酸二醚或多元醇的脂肪酸三醚。对于所述醚的多烷氧基化衍生物同样适用。

[0082] 改良脂肪物质可以选自多元醇脂肪酸酯的乙氧基化衍生物或多元醇脂肪醇醚的乙氧基化衍生物, 更特别是乙氧基化的脂肪酸与环己六醇 (例如山梨醇或甘露醇) 的酯, 或乙氧基化的脂肪酸与环己六醇酸酐 (例如脱水山梨醇或一缩甘露醇) 的酯, 其氧乙烯摩尔数为 5-10 之间。

[0083] 对于适合于制备上述改良脂肪物质的脂肪酸而言, 包括那些含有平均 12-22 个碳原子的脂肪酸 (例如那些含有 16-18 个碳原子的脂肪酸), 例如油酸、蓖麻酸或异硬脂酸, 最

好是于 20℃ 为液体状态的脂肪酸。

[0084] 根据本发明的一个方面,在步骤 b) 中,可以加入至少一种选自皂苷类、动物和 / 或植物和 / 或矿物和 / 或合成的油类、表面活性剂、氢氧化铝、卵磷脂和卵磷脂衍生物的免疫刺激剂。

[0085] 根据本发明的一个特殊方面,步骤 b) 中获得的疫苗包含 10% -20% 的步骤 a) 中获得的制品和 80% -90% 的抗原介质。

[0086] 本发明的一个目的也为疫苗组合物,它包含 10% -20% 的根据上述方法的步骤 a) 中所获得的制品和 80% -90% 的抗原介质。

[0087] 上述疫苗组合物可以用作预防或治疗药物。根据抗原的特性或体内生成剂的特性,本发明的组合物可以给药于鱼、贝类 (例如虾)、家禽 (特别是鹅、火鸡、鸽子和鸡)、犬科动物 (如狗)、猫科动物 (如猫)、猪、灵长类、牛类、羊家族成员、马、啮齿类 (如鼠)、兔类 (如兔)、羊亚科 (如山羊) 和大型哺乳动物 (如象)。本发明组合物也可以给药于人类。

[0088] 组合物可以通过胃肠外途径常规给药,特别是通过皮下、肌肉内或腹膜内注射。它也可以通过口服、鼻腔给药,通过浸泡或入浴给药。

[0089] 最后,本发明的目的为根据上述方法的步骤 a) 中获得的辅助剂组合物在制备疫苗组合物中的用途。

[0090] 本申请中使用的百分比以重量比表示。

[0091] 非常令人惊讶的是,通过对反相胶乳分散体的辅助剂特性与具有相同化学组成但是是通过溶剂相合成随后通过沉淀获得的聚合物进行比较,结果表明前者对体液响应 (图 1) 和细胞响应均具有更好的辅助剂效果,并且具有高度的无害性 (图 2)。

[0092] 下列实施例阐述了本发明,但并非对其加以限定。

[0093] 实施例 1:在矿物油包水溶剂中获得的聚 (丙烯酸钠) 基辅助剂组合物采用液体矿物油 “**Marcol[®] 52**”,由 Exxon 提供。聚合后获得的聚合物乳剂为粘稠的、白色、油性凝胶形式。其组成为 30% 矿物油 (连续相)、5% 表面活性剂 (用于稳定乳剂)、25% 聚 (丙烯酸钠) 和 40% 水。与抗原水溶液 (于 pH 7 缓冲,浓度 3%) 接触,使得油包聚合物的乳剂反转,从而获得含有痕量油的聚合物的液体分散体。

[0094] 实施例 2:通过乳剂聚合获得的聚 (丙烯酸钠) 基疫苗辅助剂

[0095] 采用充分的机械搅拌制备含有 10% 实施例 1 中所述聚合物的水分散体。通过加入惰性离子化物质 (盐) (例如氯化钠) 或免疫刺激物 (例如葡糖酸镁) 调节粘度。该即可使用 (ready-to-use) 的凝胶可以按需要的浓度再分散于预计的抗原介质中。也可以向该凝胶中加入补充的表面活性剂,用于稳定水包油分散体。

[0096] 实施例 3:通过乳剂聚合获得的含有聚 (丙烯酸钠) 的疫苗

[0097] 疫苗含有 85% 的抗原介质,向其中加入 15% 的实施例 2 中所述制品。也可以加入其它免疫刺激剂,例如皂苷类、动物和 / 或植物和 / 或矿物和 / 或合成油类、表面活性剂、氢氧化铝、卵磷脂和卵磷脂衍生物。

免疫学结果/在乳剂中获得的微胶与在溶剂相(carbopol® 974)中获得的聚丙烯酸酯的比较

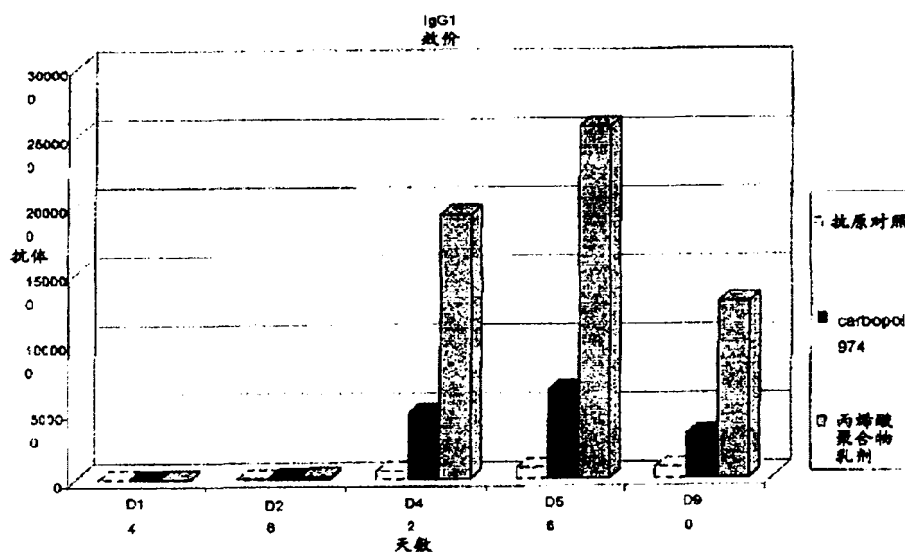


图 1

无害性结果/在乳剂中获得的微胶与在溶剂相(carbopol® 974)中获得的聚丙烯酸酯的比较/局部反应阳性对照: W/O 乳剂

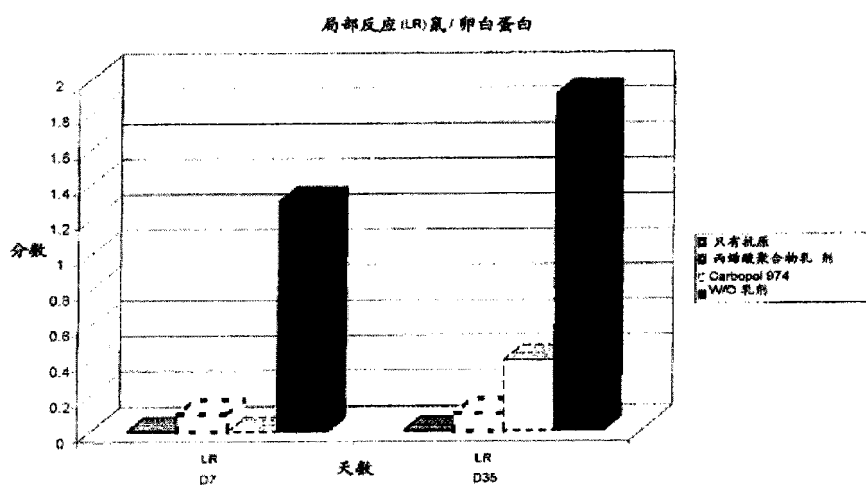


图 2