

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2017 年 5 月 18 日 (18.05.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/080098 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号:

PCT/CN2016/000544

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(22) 国际申请日:

2016 年 9 月 26 日 (26.09.2016)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201510756742.1 2015 年 11 月 10 日 (10.11.2015) CN

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 林海祥 (LIN, Haixiang) [CN/CN]; 中国北京市丰台区海户西里 32 号 3 号楼 1501, Beijing 100068 (CN)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): 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, JP, KE, KG, 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,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括经修改的权利要求(条约第 19 条(1))。

(54) Title: POLYINOSINIC CELL-AMINO COMPOUND-CALCIUM CHLORIDE ADJUVANT AND VACCINE CONTAINING POLYINOSINIC CELL-AMINO COMPOUND-CALCIUM CHLORIDE ADJUVANT

(54) 发明名称: 皮氨钙佐剂及含有皮氨钙佐剂的疫苗

(57) Abstract: Provided are a vaccine adjuvant and a vaccine containing the adjuvant, the adjuvant containing a polyinosinic cell-amino compound-calcium chloride, and the adjuvant itself also being a non-specific immunopotentiator.

(57) 摘要: 提供了一种疫苗佐剂及含有该佐剂的疫苗, 所述佐剂含有聚肌胞-氨基化合物-氯化钙, 且该佐剂本身也是非特异性免疫促进剂。



WO 2017/080098 A1

皮氨钙佐剂及含有皮氨钙佐剂的疫苗

[0001] 本发明涉及医学免疫学和生物学领域,特别是涉及疫苗佐剂及含有该佐剂的疫苗。本发明的新佐剂的组成:聚肌胞-氨基化合物-氯化钙,简称皮氨钙佐剂以及含有皮氨钙佐剂的疫苗。

[0002] 皮氨钙佐剂属双链 RNA 佐剂,目前双链 RNA 佐剂包括 PIC(polyriboinosinic polyribo-cytidylic acid 聚肌苷酸聚胞苷酸)、PICLC(PIC with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose 聚肌苷酸聚胞苷酸-羧甲基纤维素-赖氨酸)、PIC12U(PIC with uridylic acid in specific interval, PIC12 尿嘧啶商品名 Ampligen)、PICKCa(PIC-kanmycin-CaCl₂, 聚肌苷酸聚胞苷酸-卡那霉素-氯化钙佐剂)几种。由于灵长目以上动物血清核酸酶的水解作用,使 PIC 人体应用效果很差;PICLC 人体应用有效但副作用大, PIC12U 经过大量研究和临床试验还是在 2012 年被美国食品药品监督管理局(FDA)否决了。我原专利《聚肌胞复合物免疫佐剂及其疫苗》及《包含基于聚肌苷酸-聚胞苷酸的佐剂免疫物质》、《含基于聚肌苷酸-聚胞苷酸的佐剂粘膜免疫物质》专利都含有氨基抗生素类物质,尽管弥补了 PIC、PICLC 和 PIC12U 的不足,灵长类动物应用安全有效,但其中致命缺点——含有抗生素成分是有国家药品监督管理局不允许的:1. 规定在每剂人用疫苗中允许抗生素含量为 50ng,而皮卡佐剂疫苗每剂可检测游离抗生素如卡那霉素达 500ng 以上。2. 氨基抗生素副作用的耳毒性包括前庭功能损害和对听神经的损伤。3. 由于氨基抗生素物质如卡那霉素分子含有 2 个氨基,与聚肌胞的氢键结合并不稳固,因此大部分是游离状态,影响在人体的佐剂效果并可能产生副作用。

[0003] 本发明主要解决的问题和我的原发明专利《聚肌胞复合物免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗》的不同是去掉原佐剂中氨基抗生素物质如卡那霉素成分换成非抗生素类氨基化合物,其它成分不变。非抗生素氨基化合物,如:精胺、亚精胺、甲壳素(己丁糖)、壳聚糖等非抗生素含有多氨基化合物代替卡那霉素类抗生素物质,因含有更多氨基,其中的正离子与聚肌胞双链核糖核酸中的羧基负离子结合更能稳定聚肌胞的双链结构并去掉上述氨基类抗生素的副作用。

[0004] 为此本发明提供的技术方案是:

[0005] 1. 一种含氨基化合物(除外氨基类抗生素)和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸(聚肌胞)在制备免疫佐剂中的应用。该佐剂简称:皮氨钙佐剂。成分中文简写为:聚肌胞-氨基化合物-CaCl₂。

[0006] 2. 根据 1 所述的一种含有皮氨钙佐剂的疫苗。包括细胞内感染(病毒和细胞内感染的细菌、寄生虫等)疫苗和肿瘤疫苗用于预防和治疗。其特征在于所述的佐剂在于含有氨基化合物(除外氨基类抗生素)和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸(聚肌胞)。

[0007] 3. 一种含氨基化合物(除外氨基类抗生素)和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸(聚肌胞)的免疫佐剂在制备用于哺乳动物或人的预防性和治疗性疫苗中的应用。

[0008] 4. 根据 1 所述用含有皮氨钙佐剂的免疫刺激物体外刺激免疫细胞,回输体内,已达到增强免疫抗肿瘤、抗细胞内感染效果的应用。其特征在于所述的佐剂在于含有氨基化合物(除外氨基类抗生素)和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸(聚肌胞)。

[0009] 5. 根据 1 所述用皮氨钙佐剂为免疫增强剂, 非特异促进机体免疫力的应用。其特征在于所述的佐剂在于含有氨基化合物(除外氨基类抗生素)和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸(聚肌胞)。

[0010] 本发明的机制和效果是: PIC(聚肌胞)是大分子的聚阴离子, 皮氨钙佐剂中含有的氨基化合物是多氨基物质, 带正电荷, 与 PIC 聚阴离子结合, 形成了氢键形式的结合, 稳定了 PIC 的双链结构, 可以在一定程度上抵抗核酸酶的降解, 而使人体应用有效。我们选择非抗生素氨基化合物, 如: 精氨、亚精氨、甲壳素(己丁糖)、壳聚糖等稳定 PIC 的双链结构并去掉氨基抗生素的副作用。因此皮氨钙佐剂不仅进一步增加了佐剂效果并且更加安全, 也符合有关当局在疫苗、菌苗中几乎不能含有抗生素的规定。

[0011] 氨基化合物(氨基甙类抗生素除外), 包括如: 含氧基氨基化合物, 无环单氨、多氨及其衍生物和盐, 磺酸类氨基化合物, 环烷氨、芳香单氨、芳香多氨及其衍生物和盐, 酰氨类化合物。具体如精氨、亚精氨、甲壳素(己丁糖)、壳聚糖、氨基葡萄糖等。

[0012] 下面以甲壳素(己丁糖)、壳聚糖为例, 阐述非抗生素类氨基化合物性质、作用和作为新佐剂成分应用的可行性, 目的是结合实例说明本发明作用机理、可行性及其人用的安全性, 并非仅限定这两种非抗生素氨基化合物, 而在帮助理解, 对本发明的保护范围作出更清楚的界定。

[0013] 一、非抗生素氨基化合物举例:

[0014] 1. 甲壳素

[0015] 一般通称: 甲壳质, 甲壳素, (经脱乙酰化后称为) 壳聚糖。

[0016] 英文名称: Chitin.

[0017] 中文学名: 几丁质、甲壳素 [2]

[0018] 化学名称: β -(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖

[0019] 别名: 壳多糖、几丁质、甲壳质、明角质、聚乙酰氨基葡萄糖

[0020] 分子式: $(C_8H_{13}NO_5)_n$

[0021] 性状: 外观为类白色无定形物质, 无臭、无味。

[0022] 甲壳素是地球上存量极为丰富的一种自然资源, 也是自然界中迄今为止被发现的唯一带正电荷的动物纤维素。由于它的分子结构中带有不饱和的阳离子基团, 因而对带负电荷的各类有害物质具有强大的吸附作用。同样它也能清除人体内的“垃圾”, 达到预防疾病、延年益寿的目的。由于甲壳素具有这种独特功能, 它被欧美科学家誉为和蛋白质、脂肪、糖类、维生素、矿物质同等重要的人体第六生命要素。

[0023] 分子量甲壳质是高分子量物质, 其分子量可达 100 万以上。分子量越高吸附能力越强, 适合工业、环保领域应用。低分子量容易被人体吸收。分子量为 7000 左右的几丁聚糖, 大约含 30 个左右的葡萄糖胺残基。

[0024] 脱乙酰基纯度几丁质经过脱乙酰基成为几丁聚糖。几丁质因为不溶于酸碱也不溶于水而不能被身体利用。脱乙酰基后可增加其溶解性因此可被身体吸收。N-乙酰基脱去 55% 以上的则称为壳聚糖。

[0025] 甲壳素功用:

[0026] 研究发现, 肿瘤细胞表面比正常细胞表面具有更多的阴电荷, 造成细胞表面电荷不平衡, 于是使细胞之间粘附力下降, 组织破坏。带阳电荷的聚阳离子电解质能吸附到肿

瘤细胞的表面并使电荷中和,从而抑制了肿瘤细胞的生长和转移。

[0027] 附图 1. 甲壳素抗癌医学图

[0028] 这两种特定性代谢物: "己-葡萄糖氨" 和 "己-乙醚葡萄糖氨" 均是分子量约 1,000 的六体,确知是抗癌瘤的关键因素。日本治疗癌应用"几丁聚糖" 静脉注射药物,效果超过一般抗癌药物达 5 倍之多,即获取来自"几丁聚糖" 的水溶性衍生物寡,它们是属于分子量约 1,000 的低分子量物质,科学界称之为"低分子免疫赋活剂"!

[0029] 因此,在上述癌细胞溶液中加入同样浓度的甲壳素,24 小时后癌细胞的存活率达 94%。这是体外试验的情况,在体内试验,就可见到甲壳素发挥的作用。试验是在鼠的腹腔内移植个艾氏腹水癌细胞或肿瘤细胞,在移植癌细胞或肿瘤细胞前的第 6、第 4 和第 2 的三天,投喂精制甲壳素或卡介苗。共观察 60 天。试验结果表明,每天按每千克体重投喂 50mg 甲壳质,病鼠的治愈率都是 67%,对照组却全都死亡,体内试验,甲壳素即能显示出对癌细胞或肿瘤细胞的治疗效果。在体外试验中却没有,这就说明了甲壳素不带阳电荷。对癌细胞或肿瘤细胞不起聚集粘附作用和电荷中和作用,所以不能直接抑制这些细胞,但能通过活性免疫系统达到抑制癌细胞的目的。

[0030] 可见,通过对甲壳素的不断认识和研究,它会发挥重大作用,对人类的生命延续起到积极的作用。

[0031] 甲壳素作为新佐剂成分的可行性:

[0032] 由于甲壳素是地球上唯一带正电荷的动物纤维素。由于它的分子结构中带有不饱和的阳离子基团,因而对带负电荷的各类有害物质具有强大的吸附作用。第三代"几丁聚糖"(甲壳素)就属于最新的低分子免疫赋活剂。在使用安全性方面,以老鼠为例,每公斤体重需服入 18 公斤"几丁聚糖"方可致死,可见"几丁聚糖"(甲壳素)比食用砂糖更安全。甲壳素不能直接抑制癌细胞,而是通过活化免疫系统显示抑制癌细胞的作用。因此,在皮氨钙新佐剂中以甲壳素取代卡那霉素可以: 1. 甲壳素带多个正电荷胺基,与 PIC 是大分子的聚阴离子结合,形成较卡那霉素更稳定 PIC 双链 RNA 结构,在灵长类和人体中更有效。2. 安全性高,又去到了抗生素副作用。3. 可口服,可注射。4. 与佐剂性质相似,具有增强免疫,抗肿瘤功效。

[0033] 2. 壳聚糖

[0034] 外文名: chitosan 又称: 脱乙酰甲壳素 化学名: 聚葡萄糖胺 (1-4)-2-氨基 -B-D

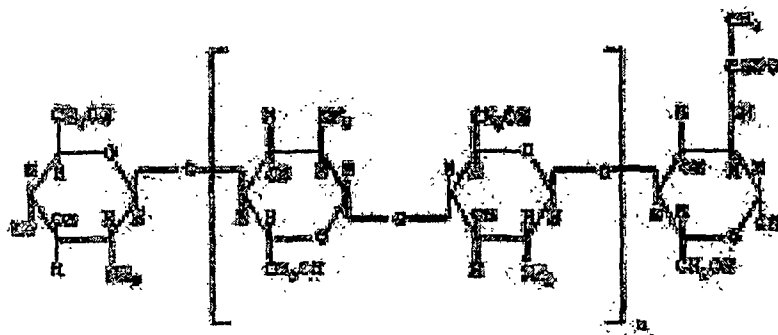
[0035] 化学名: β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-氨基 -2-脱氧 -D-葡萄糖

[0036] 分子式: $(C_6H_{11}NO_4)_n$

[0037] 单元体的分子量为: 161.2

[0038] 结构式如下式

[0039]



[0040] 应用：医药、食品、化工、化妆品

[0041] 壳聚糖是甲壳素脱 N-乙酰基的产物，壳聚糖样品通过比较简单的特性粘度测量，即可计算其平均分子量。商品壳聚糖视其用途不同有三种不同的粘度，即高粘度产品为 $0.7 \sim 1\text{Pa} \cdot \text{s}$ 、中粘度产品为 $0.25 \sim 0.65\text{Pa} \cdot \text{s}$ 、低粘度产品 $< 0.25\text{Pa} \cdot \text{s}$ 。

[0042] 壳聚糖大分子中有活泼的羟基和氨基，它们具有较强的化学反应能力。壳聚糖分子中带有游离氨基，在酸性溶液中易成盐，呈阳离子性质。壳聚糖随其分子中含氨基数量的增多，其氨基特性越显著，这正是其独特性质的所在，由此奠定了壳聚糖的许多生物学特性及加工特性的基础 [1]。

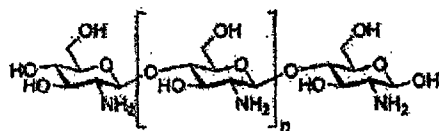
[0043] 壳聚糖能降血脂、降血糖、预防和控制高血压，能直接抑制肿瘤细胞，在含有癌细胞的溶液中，加入 0.5mg/ml 壳聚糖溶液，24 小时后癌细胞全部死亡。能抑制细菌活性：壳聚糖在弱酸溶剂中易于溶解，特别值得指出的是溶解后的溶液中含有氨基 (NH_2^+)，这些氨基通过结合负电子来抑制细菌。壳聚糖的抑制细菌活性，使其在医药、纺织和食品等领域有着广泛的应用。壳聚糖及其衍生物有较好的抗菌活性，能抑制一些真菌、细菌、和病毒的生长繁殖。截止到 2013 年认为其可能的机制有三：一是由于壳聚糖的多聚阳离子，易于真菌细胞表面带负电荷的基团作用，从而改变病原菌细胞膜的流动性和通透性；二是干扰 DNA 的复制与转录；三是阻断病原菌代谢。2010 年以来，有许多研究者提出壳聚糖通过诱导病程相关蛋白，积累次生代谢产物和信号传导等方式来达到抗菌的目的的观点。水溶性壳聚糖如壳聚糖乳酸盐、壳聚糖谷氨酸盐和壳聚糖氢化谷氨酸盐对不同细菌培植的影响。结果发现，壳聚糖乳酸盐和壳聚糖谷氨酸盐对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有较高的抗菌作用。

[0044] 具有免疫调节活性

[0045] 壳聚糖具有激活机体系统、介导机体系统的系列生物学效应，提高吞噬细胞的系统功能。巨噬细胞表面存在着细菌多糖的受体，而壳聚糖作为细菌多糖的类似物，能刺激巨噬细胞活化，产生如下反应：促进其吞噬功能，增强它在其它免疫应答中的协同效应，从而实现机体对 T 细胞、NK 细胞和 B 细胞的调节，介导机体的细胞免疫应答和体液免疫应答。因此，壳聚糖具有对机体的免疫调节作用。

[0046] 癌症患者服用壳聚糖后，可激活体内具有免疫功能的淋巴细胞，使其能分辨正常细胞和癌细胞，并杀死癌细胞。壳聚糖能调节体内的 pH 值到弱碱性，提高胰岛素的利用率，有利于防治糖尿病。此外，它还具有调节内分泌系统的功能，使胰岛素分泌正常，抑制血糖升高，降低血脂。

[0047]



[0048] 壳聚糖或其衍生物作为新佐剂成分的可行性：

[0049] 在皮氨钙新佐剂中以壳聚糖或其衍生物取代卡那霉素可以：1. 从上述结构式可以看到壳聚糖或其衍生物带多个正电荷氨基，与 PIC 是大分子的聚阴离子结合，形成较卡那霉素更稳定 PIC 双链 RNA 结构，在灵长类和人体中更有效。2. 安全性高，又去到了抗生素副作用。3. 可口服，可注射。4. 与佐剂性质相似，具有增强免疫，抗肿瘤功效。

[0050] 二、皮氨钙佐剂配方

[0051] 结合上述举例非抗生素类氨基化合物性质、安全性，写出皮氨钙佐剂配方，检定内容，意在说明在皮氨钙佐剂中以非胺基抗生素类氨基化合物取代卡那霉素的具体技术方案，说明实施的可行性，但并不限定不可更改。

[0052] 原料：

[0053] 聚胞苷酸 (Poly C)：可购买。

[0054] 聚肌苷酸 (Poly I)：可购买。

[0055] 非抗生素类氨基化合物：可购买

[0056] 氯化钙：可购买

[0057] 制备：按聚肌胞 (PIC) 1.25mg/ml 制备

[0058] 1、0.006M PBS 50 000ml pH8.4

[0059] 0.85% NaCl：425g 溶解在 50 000ml 注射用水中。

[0060] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ：107.44g 溶解在 49 000ml 0.85% NaCl 中。

[0061] $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.936g：107.44g 溶解在 1 000ml 0.85% NaCl 中。

[0062] 2、皮氨钙佐剂 (20080701) 配制：40 000ml，按 40400ml 投料（另加 200ml CaCl_2 ，并调 pH）。

[0063] 原料比例批号理论用量含量实际用量 PBS (ml)

[0064]

PI	1	080514	25.048g	90.5%	27.68g	18 000
PC	1.04	080317	26.0499g	87.8%	29.67g	18 000

[0065] 非抗生素氨基化合物待定 1000

[0066] 补充 PBS 至 40 000ml，另加：0.1M CaCl_2 （衢州巨化试剂有限公司 20060401）：2.222g 200ml 注射用水，用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 约 100ml 调 pH 至 7.2。所有溶质分别溶解，45 摄氏度 30 分，滴加 0.1M CaCl_2 ，调 pH，0.22um 滤膜过滤，分装。

[0067] 三、检定

[0068] 举例写出皮氨钙佐剂需检定的内容，意在表明实施的可行性，但并不限定不可更改。

[0069] 1、皮氨钙佐剂成品检定：检验依据：国家聚肌胞注射液检定标准 WS1-XG-050-2000

[0070] 皮氨钙佐剂成品检定项目

【性状】应为无色澄明液体为无色澄明液体

【鉴别】

荧光反应 荧光增强 荧光增强

光吸收 在 $266 \pm 2\text{nm}$ 波长处有最大吸收

在 228nm 波长处有最小吸收

【检查】

pH 值应为 $6.0 \sim 8.0$

增色效应 $> 55\%$

溶液的透光度 $> 98.0\%$

含量测定应为标示量的 $90\% \sim 110\%$

(标示量: 1.25mg/ml , 含量 1.29mg/ml)

【其它】

异常毒性应符合规定

分子量 (1mg/ml) $30 \sim 55$ 万

内毒素 $< 100\text{EU/ml}$

无菌应符合规定

[0072] 结论:皮氨钙佐剂各项检定结果必须符合 WS1-XG-050-2000 及含有该佐剂疫苗相关检定的规定。

[0073] 2. 小白鼠重复毒性检定:为进一步检定毒性,需要在小白鼠重复注射 5-6 针,观察。不能死亡,并应体重增加。小白鼠变态反应实验。

[0074] 3. 猴体试验:包括安全性、有效性。

[0075] 五、皮氨钙佐剂疫苗的制备

[0076] 根据上述皮氨钙佐剂的制备,举例写出皮氨钙佐剂狂犬病疫苗制备、检定方案,意在使人们更加理解制备皮氨钙佐剂疫苗实施的可行性,绝不是仅限于皮氨钙佐剂狂犬病疫苗。皮氨钙佐剂疫苗包括所有含有该佐剂的疫苗,特别是细胞内感染疫苗和肿瘤疫苗。

[0077] 皮氨钙佐剂狂犬病纯化疫苗(地鼠肾细胞)

[0078] 原料:

[0079] 1. 皮氨钙佐剂:总量:7200ml。

[0080] 2. 狂犬病纯化疫苗原液(地鼠肾细胞):

[0081] 由生产厂家提供浓缩纯化疫苗原液 1800ml(已加 20%人白蛋白 37.5ml, 0.5%硫柳汞 1.8ml。

[0082] 制造方法

[0083] 皮氨钙佐剂狂犬病纯化疫苗的制备

[0084] 1. 取 1800ml 浓缩的人用狂犬病纯化疫苗原液与皮氨钙佐剂 7200ml 复合。

[0085] 2. 按 0.3-0.4% 加 20%人白蛋白 100ml, 加 5%硫柳汞 7.2ml, 加谷胺酸钠

(10%) 90ml。

[0086] 3. 分装:按 1ml/ 安瓶 / 剂量分装,可制备出皮氨钙狂犬病纯化疫苗 1600 人份。

[0087] 3. 狂犬病纯化疫苗纯化后原液的制备 (供检定用)

[0088] 取 2ml 不含白蛋白的狂犬病纯化疫苗浓缩液与 8ml PBS 混合,按该比例共配制 30ml。

[0089] 4. 狂犬病纯化疫苗纯化后原液刺激抗原的制备 (供细胞免疫检定用)

[0090] 取 2ml 不含人白蛋白和硫柳汞的狂犬病纯化疫苗浓缩液 30ml,蛋白含量约 120ug, 0.5ml/Apendouf50 管,低温保存。

[0091] 检定结果

[0092] 检验依据:国家药典狂犬病纯化疫苗制造检定审定规程以及皮氨钙佐剂疫苗特殊检定要求 (待定)

[0093] 皮氨钙佐剂狂犬病纯化疫苗检定报告单

[0094]

检验项目标准规定检验结果

蛋白质含量 $\leq 80 \mu\text{g/ml}$

pH 值应为 7.2~8.0

效力测定

4℃

37℃

含量测定应为标示量的 100%~130%

牛血清白蛋白 $< 50\text{ng/ml}$

硫柳汞 0.02~0.08 mg/ml

干扰素 ≥ 80

分子量 30~55 万

内毒素 $< 100\text{EU/ml}$

无菌试验应符合规定

异常毒性试验

小白鼠应符合规定

豚鼠应符合规定

物理检查应为无色澄明液体

[0095] 各项检定结果应完全符合各项规定,合格。

[0096] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明举例说明非抗生素胺基类化合物及皮氨钙佐剂配方、检定内容和皮氨钙佐剂疫苗、检定内容所作的的数据或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种含氨基化合物（除外氨基类抗生素）和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸（聚肌胞）在制备免疫佐剂中的应用。该佐剂简称：皮氨钙佐剂。成分中文简写为：聚肌胞-氨基化合物-CaCl₂。
2. 根据权利 1 所述的一种含有皮氨钙佐剂的疫苗。包括细胞内感染（病毒和细胞内感染的细菌、寄生虫等）疫苗和肿瘤疫苗用于预防和治疗。其特征在于所述的佐剂含有氨基化合物（除外氨基类抗生素）和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸（聚肌胞）。
3. 一种含氨基化合物（除外氨基类抗生素）和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸（聚肌胞）的免疫佐剂在制备用于哺乳动物或人的预防性和治疗性疫苗中的应用。
4. 根据权利 1 所述用含有皮氨钙佐剂的免疫刺激物用于体外刺激免疫细胞，回输体内，以达到增强免疫抗肿瘤、抗细胞内感染效果的应用。其特征在于所述的免疫刺激物含有氨基化合物（除外氨基类抗生素）和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸（聚肌胞）。
5. 根据权利 1 所述用皮氨钙佐剂为免疫增强剂，非特异促进机体免疫力的应用。其特征在于所述的免疫增强剂含有氨基化合物（除外氨基类抗生素）和钙离子的聚肌苷酸聚胞苷酸（聚肌胞）。

国际局收到日：02.3月2017(02.03.2017)

1. 一种含聚肌苷酸-聚胞苷酸（聚肌胞）、钙离子和除氨基类抗生素之外的氨基化合物及其接枝物和/或聚乙二醇等交联剂在制备免疫佐剂中形成纳米颗粒有机整体的应用。该佐剂简称：皮氨钙佐剂。成分中文简写为：聚肌胞-氨基化合物-CaCl₂。

2. 根据权利 1 所述的一种含有皮氨钙佐剂的疫苗。包括细胞内感染（病毒和细胞内感染的细菌、寄生虫等）疫苗和肿瘤疫苗用于预防和治疗。其特征在于所述的佐剂是一种含聚肌苷酸-聚胞苷酸（聚肌胞）、钙离子和除氨基类抗生素之外的氨基化合物及其接枝物和/或聚乙二醇等交联剂在制备免疫佐剂中形成纳米颗粒有机整体的应用。

3. 一种含聚肌苷酸-聚胞苷酸（聚肌胞）、钙离子和除氨基类抗生素之外的氨基化合物及其接枝物和/或聚乙二醇等交联剂在制备免疫佐剂中形成纳米颗粒有机整体的应用在制备用于哺乳动物或人的预防性和治疗性疫苗中的应用。

4. 根据权利 1 所述用含有皮氨钙纳米颗粒佐剂的免疫刺激物用于体外刺激免疫细胞（如 DC-CIK 细胞、CRA-T 细胞和 TCR 细胞），回输体内，以达到增强免疫抗肿瘤、抗细胞内感染效果的应用。其特征在于所述的佐剂是一种含聚肌苷酸-聚胞苷酸（聚肌胞）、钙离子和除氨基类抗生素之外的氨基化合物及其接枝物和/或聚乙二醇等交联剂在制备免疫佐剂中形成纳米颗粒有机整体的应用。

5. 根据权利 1 所述用皮氨钙佐剂本身为免疫增强剂，非特异促进机体免疫力的应用，包括制备成固体、半固体、液体和气体剂型的应用。其特征在于所述的佐剂是一种含聚肌苷酸-聚胞苷酸（聚肌胞）、钙离子和除氨基类抗生素之外的氨基化合物及其接枝物和/或聚乙二醇等交联剂在制备免疫佐剂中形成纳米颗粒有机整体的应用。

修改页（条约第19条）

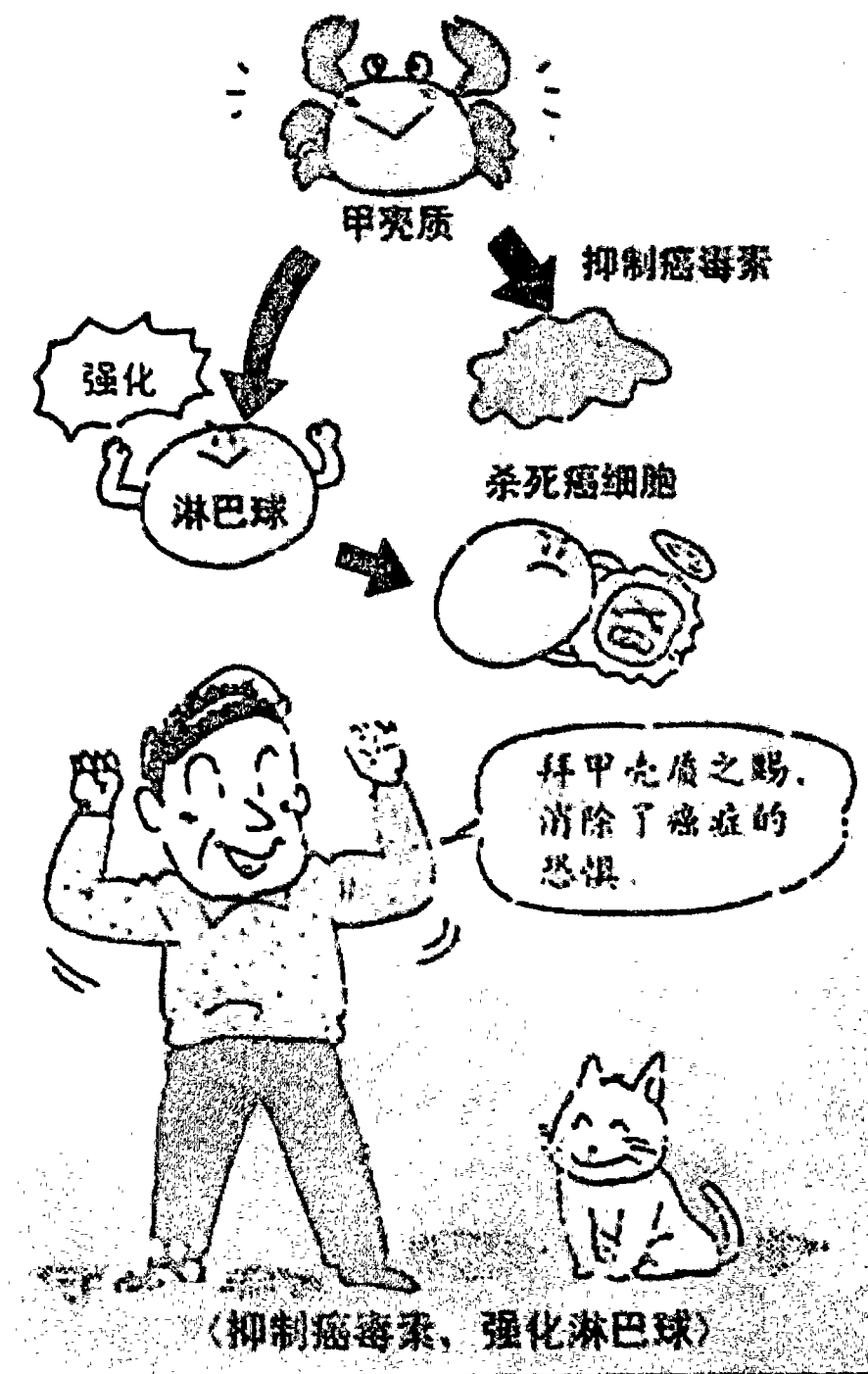


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/000544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39 (2006.01) i; A61K 39/205 (2006.01) i; A61P 31/14 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

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)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: calcium, PICKCa, polyriboinosine-polyribocytidylic, chitosan, polycytidylic acid, pikca, chitin, Polyinosinic polycytidylic Acid, polyriboinosine polyribocytidylic, polyI:C, polyI-polyC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105396130 A (LIN, Haixiang), 16 March 2016 (16.03.2016), see claims 1-3	1-3
Y	CN 101166559 A (NEWBIOMED PIKA PTE. LTD.), 23 April 2008 (23.04.2008), see the abstract, and claims 1-21	1-3
Y	CN 101124014 A (NEWBIOMED PIKA PTE. LTD.), 13 February 2008 (13.02.2008), see the abstract, and claims 1-18	1-3
Y	CN 104971346 A (QINGDAO AGRICULTURAL UNIVERSITY), 14 October 2015 (14.10.2015), see claims 1-7	1-3
Y	CN 1095951 A (LIN, Haixiang), 07 December 1994 (07.12.1994), see the abstract, and claims 1-3	1-3
Y	CN 103405762 A (YISHENG BIOPHARMA SINGAPORE PTE. LTD.), 27 November 2013 (27.11.2013), see abstract, and claims 1-27	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 December 2016 (22.12.2015)	Date of mailing of the international search report 10 January 2017 (10.01.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 WANG, Qiyang Telephone No.: (86-10) 62088409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/000544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU, Na; "Research Advance of Strategies for Enhancing the CpG Immunostimulatory", CHINESE MEDICINAL BIOTECHNOLOGY, vol. 7, no. 2, 30 April 2012 (30.04.2012) ISSN: 1673-713x, see page 145, left-hand column, paragraph 2 and right-hand column paragraph 2	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/000544

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:4 and 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] a method for treatment of a human or animal body by a surgery or therapy, and a method for diagnosing diseases on a human or animal body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/000544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105396130 A	16 March 2016	None	
CN 101166559 A	23 April 2008	ZA 200806339 B	31 March 2010
		MY 150706 A	28 February 2014
		JP 2009523721 A	25 June 2009
		US 2009175902 A1	09 July 2009
		CA 2632415 A1	19 July 2007
		AU 2006335367 A1	19 July 2007
		TW 200800258 A	01 January 2008
		US 2013115244 A1	09 May 2013
		BR PI0621181 A2	22 November 2011
		CN 101166559 B	22 August 2012
		US 2011212123 A1	01 September 2011
		US 8303966 B2	06 November 2012
		AU 2006335367 B2	30 August 2012
		RU 2462264 C2	27 September 2012
		US 2007166800 A1	19 July 2007
		CU 23810 A3	15 April 2012
		NZ 570379 A	27 July 2012
		WO 2007081287 A1	19 July 2007
		TW I503125 B	11 October 2015
		EP 1971402 A4	14 July 2010
		HK 1112863 A1	15 March 2013
		IL 192746 D0	11 February 2009
		RU 2008133217 A	20 February 2010
		ZA 200806339 A	31 March 2010
		EP 1971402 A1	24 September 2008
		WO 2007081287 A9	21 December 2007
		KR 20080091106 A	09 October 2008
		AU 2006335368 A1	19 July 2007
		TW 200803891 A	16 January 2008
		US 2009311334 A1	17 December 2009
		MY 143347 A	29 April 2011
		TW I421091 B	01 January 2014
		NZ 570380 A	12 January 2012
		AU 2006335368 B2	28 February 2013
		KR 101312308 B1	30 September 2013
		RU 2008133216 A	20 February 2010
		US 2007166239 A1	19 July 2007
		WO 2007081288 A1	19 July 2007
		CN 101124014 B	22 May 2013
		JP 2009523722 A	25 June 2009
		EP 1971403 A4	09 June 2010
		ZA 200806340 A	26 May 2010
		CA 2632418 C	08 December 2015
		CU 23819 A3	21 June 2012
		IL 192747 D0	11 February 2009
		ZA 200806340 B	26 May 2010
		HK 1112864 A1	14 February 2014
		WO 2007081288 A9	21 December 2007
		EP 1971403 A1	24 September 2008
CN 101124014 A	13 February 2008		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/000544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CA 2632418 A1	19 July 2007
		BR PI0621185 A2	06 December 2011
		KR 20080091124 A	09 October 2008
CN 104971346 A	14 October 2015	None	
CN 1095951 A	07 December 1994	CN 1056315 C	13 September 2000
CN 103405762 A	27 November 2013	None	

A. 主题的分类 A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/205(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. 检索领域 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)) CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge:聚肌胞卡钙, 钙, 聚肌胞, 壳聚糖, 甲壳素, 几丁质, calcium, PICKCa, polyriboinosine-polyribocytidylic, chitosan, polycytidylic acid, pikca, chitin, Polyinosinic-polycytidylic Acid, polyriboinosine polyribocytidylic, polyI:C, polyI-polyC																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105396130 A (林海祥) 2016年 3月 16日 (2016 - 03 - 16) 参见权利要求1-3</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101166559 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23) 参见摘要和权利要求1-21</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101124014 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 2月 13日 (2008 - 02 - 13) 参见摘要和权利要求1-18</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104971346 A (青岛农业大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见权利要求1-7</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1095951 A (林海祥) 1994年 12月 7日 (1994 - 12 - 07) 参见摘要和权利要求1-3</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103405762 A (依生生物制药新加坡私人有限公司) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 参见摘要和权利要求1-27</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 105396130 A (林海祥) 2016年 3月 16日 (2016 - 03 - 16) 参见权利要求1-3	1-3	Y	CN 101166559 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23) 参见摘要和权利要求1-21	1-3	Y	CN 101124014 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 2月 13日 (2008 - 02 - 13) 参见摘要和权利要求1-18	1-3	Y	CN 104971346 A (青岛农业大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见权利要求1-7	1-3	Y	CN 1095951 A (林海祥) 1994年 12月 7日 (1994 - 12 - 07) 参见摘要和权利要求1-3	1-3	Y	CN 103405762 A (依生生物制药新加坡私人有限公司) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 参见摘要和权利要求1-27	1-3
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 105396130 A (林海祥) 2016年 3月 16日 (2016 - 03 - 16) 参见权利要求1-3	1-3																					
Y	CN 101166559 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23) 参见摘要和权利要求1-21	1-3																					
Y	CN 101124014 A (申益皮卡生物技术有限公司) 2008年 2月 13日 (2008 - 02 - 13) 参见摘要和权利要求1-18	1-3																					
Y	CN 104971346 A (青岛农业大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见权利要求1-7	1-3																					
Y	CN 1095951 A (林海祥) 1994年 12月 7日 (1994 - 12 - 07) 参见摘要和权利要求1-3	1-3																					
Y	CN 103405762 A (依生生物制药新加坡私人有限公司) 2013年 11月 27日 (2013 - 11 - 27) 参见摘要和权利要求1-27	1-3																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 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 2016年 12月 22日		国际检索报告邮寄日期 2017年 1月 10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		授权官员 王启扬 电话号码 (86-10)62088409																					

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	徐娜. “增强CpG 免疫刺激作用途径的研究进展” 中国医药生物技术, 第7卷, 第2期, 2012年 4月 30日 (2012 - 04 - 30), ISSN: 1673-713x, 参见第145页左栏第二段和右栏第二段	1-3

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 4, 5
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/000544

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	105396130	A	2016年 3月 16日	无			
CN	101166559	A	2008年 4月 23日	ZA	200806339	B	2010年 3月 31日
				MY	150706	A	2014年 2月 28日
				JP	2009523721	A	2009年 6月 25日
				US	2009175902	A1	2009年 7月 9日
				CA	2632415	A1	2007年 7月 19日
				AU	2006335367	A1	2007年 7月 19日
				TW	200800258	A	2008年 1月 1日
				US	2013115244	A1	2013年 5月 9日
				BR	PI0621181	A2	2011年 11月 22日
				CN	101166559	B	2012年 8月 22日
				US	2011212123	A1	2011年 9月 1日
				US	8303966	B2	2012年 11月 6日
				AU	2006335367	B2	2012年 8月 30日
				RU	2462264	C2	2012年 9月 27日
				US	2007166800	A1	2007年 7月 19日
				CU	23810	A3	2012年 4月 15日
				NZ	570379	A	2012年 7月 27日
				WO	2007081287	A1	2007年 7月 19日
				TW	1503125	B	2015年 10月 11日
				EP	1971402	A4	2010年 7月 14日
				HK	1112863	A1	2013年 3月 15日
				IL	192746	D0	2009年 2月 11日
				RU	2008133217	A	2010年 2月 20日
				ZA	200806339	A	2010年 3月 31日
				EP	1971402	A1	2008年 9月 24日
				WO	2007081287	A9	2007年 12月 21日
				KR	20080091106	A	2008年 10月 9日
CN	101124014	A	2008年 2月 13日	AU	2006335368	A1	2007年 7月 19日
				TW	200803891	A	2008年 1月 16日
				US	2009311334	A1	2009年 12月 17日
				MY	143347	A	2011年 4月 29日
				TW	1421091	B	2014年 1月 1日
				NZ	570380	A	2012年 1月 12日
				AU	2006335368	B2	2013年 2月 28日
				KR	101312308	B1	2013年 9月 30日
				RU	2008133216	A	2010年 2月 20日
				US	2007166239	A1	2007年 7月 19日
				WO	2007081288	A1	2007年 7月 19日
				CN	101124014	B	2013年 5月 22日
				JP	2009523722	A	2009年 6月 25日
				EP	1971403	A4	2010年 6月 9日
				ZA	200806340	A	2010年 5月 26日
				CA	2632418	C	2015年 12月 8日
				CU	23819	A3	2012年 6月 21日
				IL	192747	D0	2009年 2月 11日
				ZA	200806340	B	2010年 5月 26日
				HK	1112864	A1	2014年 2月 14日
				WO	2007081288	A9	2007年 12月 21日
				EP	1971403	A1	2008年 9月 24日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (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/CN2016/000544

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)	
				CA	2632418	A1	2007年 7月 19日		
				BR	PI0621185	A2	2011年 12月 6日		
				KR	20080091124	A	2008年 10月 9日		
CN	104971346	A	2015年 10月 14日	无					
CN	1095951	A	1994年 12月 7日	CN	1056315	C	2000年 9月 13日		
CN	103405762	A	2013年 11月 27日	无					