



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102257149 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 25

(21) 申请号 200980139111. 8

审查员 王佳妹

(22) 申请日 2009. 08. 28

(30) 优先权数据

61/190, 486 2008. 08. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/006825 2009. 08. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02010/023551 EN 2010. 03. 04

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·布鲁克

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

C12P 5/02 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

由超产酵母生产角鲨烯

(57) 摘要

一种制备纯化酵母的方法, 其中, 超量生产角鲨烯的酵母是角鲨烯源。角鲨烯是一种有用的制药原料。例如, 它可用来制备水包油乳液, 而这样的乳液尤其适合用作免疫佐剂。

1. 一种制备水包油乳液佐剂的方法,包括以下步骤:
 - (a) 从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化角鲨烯,其中,在不含动物来源产物的调配培养基中培养所述酵母;和
 - (b) 将步骤(a)纯化的角鲨烯与水性组分组合形成水包油乳液佐剂。
2. 一种制备水包油乳液佐剂的方法,包括以下步骤:
 - (a) 获取业已从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化的角鲨烯,其中,在不含动物来源产物的调配培养基中培养所述酵母;和
 - (b) 将步骤(a)所得角鲨烯与水性组分组合形成水包油乳液佐剂。
3. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述酵母生产角鲨烯的产率为 $\geq 5\%$ 细胞干重。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母是酿酒酵母属的(*Saccharomyces*)。
5. 如权利要求4所述的方法,所述酵母是酿酒酵母(*S. cerevisiae*)。
6. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母表达聚集于胞浆的截短HMGR酶。
7. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母是经过改造的菌株,其相比未经改造的亲本株超表达HMGR。
8. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母是经过改造的菌株,其相比未经改造的亲本株低表达酵母甾醇-24-甲基转移酶和/或麦角甾-5,7,24(28)-三烯甘油酯-22-脱氢酶。
9. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母表达突变氧化鲨烯环化酶。
10. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述酵母具有被破坏的角鲨烯环氧酶。
11. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在能够提高培养期间角鲨烯产率的因子存在下培养所述酵母。
12. 如权利要求11所述的方法,其中,所述因子是烯丙胺,伏力康唑,6-氨基-2-正-戊基硫代苯并噻唑,硫胺或硫代氨基甲酸酯或盐。
13. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在角鲨烯纯化之前,在部分无氧或完全无氧的条件下培养所述酵母。
14. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述角鲨烯纯度高于97%(重量)。
15. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述水包油乳液含亚微米直径的油滴。
16. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述水包油乳液是微流化的乳液。
17. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述水包油乳液含角鲨烯和聚山梨醇酯80。
18. 一种制备人用非胃肠给药免疫原性组合物的方法,包括:按照权利要求1至17中任一项所述的方法制备水包油乳液佐剂,将所得水包油乳液佐剂与免疫原混合。
19. 一种制备用于制备免疫原性组合物的试剂盒的方法,包括:按照权利要求1至17中任一项所述的方法制备水包油乳液,将所得乳液装入第一容器,将该第一容器与含有免疫原的第二容器组合成试剂盒。

由超产酵母生产角鲨烯

[0001] 本申请要求基于美国临时申请 61/190,486 的全部权利,并将其全部内容通过引用纳入本申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及角鲨烯的生产,角鲨烯可以用于,例如,水包油乳液。

背景技术

[0003] 鲨鱼肝油含有一种称为角鲨烯的支链、不饱和类萜,2,6,10,15,19,23- 六甲基-2,6,10,14,18,22- 二十四碳己烯。角鲨烯被用于人用疫苗的水包油乳液,例如用作流感疫苗佐剂的 MF59 乳液。角鲨烯还可用于其他药品(例如膏剂、栓剂等)和化妆品。

[0004] 目前角鲨烯的来源主要是鱼油,尤其是鲨鱼肝油。采用提取自鲨鱼肝油的角鲨烯会有一些问题,尤其是,如果没有坚持严格的生产标准(例如诺华(Novartis)在 MF59 生产过程中采用的标准)。例如,鲨鱼会被某些病原体感染,而这些病原体可能同样会感染人或产生某些对人有害的物质,还可能有 TSE 或 TSE 样鲨源物质存在[参考文献 1-3]。并且,鲨鱼可能含有对人有害的毒素,例如毒素 carchatoxin。因此,低价、低端的角鲨烯源不适合用于制造人用药。当角鲨烯是免疫佐剂的组成部分时,这些有害风险可能更严重,因为,根据佐剂的定义,它可能诱导针对杂质的强烈的副反应。

[0005] 所以,药用角鲨烯(例如用于制造 MF59)不能采用低价、低端鲨鱼角鲨烯,而需采用高级别的原材料,但这些高质角鲨烯十分昂贵,且来源有限。如此昂贵的来源是不适用的,例如对发展中国家而言。

[0006] 需要找到一种既能满足药用高标准又不那么贵的角鲨烯来源。所以,需要新的角鲨烯来源,尤其是对于非胃肠给药人用药使用的角鲨烯和/或用于免疫佐剂的角鲨烯而言。低廉的药用级角鲨烯来源对于某些发展中国家来说特别有用,这些国家或者鲨鱼资源有限,或者无法承担目前所用(例如诺华所用)昂贵的药用级原材料。

发明内容

[0007] 本发明涉及由超量生产角鲨烯的酵母生产角鲨烯的方法。酵母是 GRAS(通常认为安全的)微生物,因此适合用作药用角鲨烯的来源。并且,由此制备角鲨烯可避免病原体、朊病毒和环境毒素的污染,例如,已知酵母是不含汞的。由于疫苗领域已经在使用酵母(例如用于乙肝表面抗原的重组表达),所以不会产生特别的规则问题,换言之,来自酵母的角鲨烯特别适合用于制备免疫佐剂。最后,酵母培养技术广为人知,非常容易进行技术转用。

[0008] 基于此,本发明提供了一种制备纯角鲨烯的方法,包括以下步骤:(a) 培养在培养期间高产率生产角鲨烯的酵母;和(b) 从步骤(a) 培养的酵母中纯化角鲨烯。纯化得到的角鲨烯可用于制备药物、食品、食品添加剂和化妆品等。

[0009] 本发明还提供一种制备含角鲨烯产品的方法,包括以下步骤:(a) 获取业已从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化的角鲨烯;和(b) 将步骤(a) 的角鲨烯与非角鲨烯

组分组合形成含角鲨烯的产品。

[0010] 本发明还提供培养期间高产率生产角鲨烯的酵母用于制备纯化角鲨烯的用途。本发明还提供一种制备纯化角鲨烯的方法,包括以下步骤:

[0011] (a) 在能使酵母高产率地生产角鲨烯的条件下培养酵母;

[0012] (b) 从培养的酵母中纯化角鲨烯,得到纯度 $\geq 97\text{wt}\%$ 的角鲨烯。

[0013] 本发明还提供一种制备水包油乳液的方法,包括以下步骤:(a) 从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化角鲨烯;和(b) 将步骤(a)中纯化的角鲨烯与水性组分组合形成水包油乳液。

[0014] 本发明还提供一种制备水包油乳液的方法,包括以下步骤:(a) 获取业已从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化的角鲨烯;和(b) 将步骤(a)的角鲨烯与水性组分组合形成水包油乳液。

[0015] 本发明还提供一种制备免疫原性组合物(例如疫苗)的方法,包括:如上所述制备水包油乳液,将所得乳液与免疫原混合。

[0016] 本发明还提供一种制备试剂盒的方法,所述试剂盒是用于按照本发明方法制备免疫原性组合物的,所述制备试剂盒的方法包括:如上所述制备水包油乳液,将所得乳液装入第一容器,将该第一容器与含有免疫原的第二容器组合成试剂盒。所述免疫原可以是无水形式的,或者是含水形式的。

[0017] 本发明还提供一种增强动物(例如哺乳动物)免疫应答的方法,包括给予动物按照本发明方法制备的免疫原性组合物。

[0018] 本发明还提供用于制造增强哺乳动物免疫应答的药物的角鲨烯,所述角鲨烯是(i) 从培养期间高产率生产角鲨烯的酵母中纯化的,并且,(ii) 与水性组分组合形成水包油乳液,该水包油乳液将包含在所述药物中。

[0019] 本发明提供一种制备水包油乳液的方法,包括以下步骤:(a) 在能使酵母高产率地生产角鲨烯的条件下培养酵母;(b) 从培养的酵母中纯化角鲨烯;和(c) 将步骤(b)纯化的角鲨烯与水性组分组合形成水包油乳液。

[0020] 在角鲨烯的使用中,本发明的改进之一在于采用了纯化自培养期间能高产率生产角鲨烯的酵母的角鲨烯。

[0021] 在酵母中生产角鲨烯

[0022] 本发明采用纯化自酵母的角鲨烯。所述酵母可以是筛选得到的角鲨烯高产天然株或突变株,但通常它们会是基因工程株,经遗传改造从而高产率地生产角鲨烯。另一种可能是在存在提高角鲨烯产率的因子的条件下培养天然、突变或工程酵母菌。

[0023] 角鲨烯的产率可表示为占特定酵母细胞干重(cdw)的百分比(%)。普通野生型解脂耶罗威亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)生产角鲨烯的产率一般约为 $0.5\% \text{ cdw}$,而普通 *Saccharomyces uvarum* 酿酒酵母则约为 $1.4\% \text{ cdw}$ [4]。“高产率”地生产角鲨烯的酵母指这样的酵母,其角鲨烯产率至少为 $2\% \text{ cdw}$,例如 $\geq 3\%$ 、 $\geq 4\%$ 、 $\geq 5\%$ 、 $\geq 6\%$ 、 $\geq 7\%$ 、 $\geq 8\%$ 、 $\geq 9\%$ 、 $\geq 10\%$ 、 $\geq 11\%$ 、 $\geq 12\%$ 、 $\geq 13\%$ 、 $\geq 14\%$ 、 $\geq 15\% \text{ cdw}$ 或更高。

[0024] 角鲨烯产率也可以表示为占特定酵母内总脂质的百分比(%)。普通 *S. uvarum* 酿酒酵母生产的角鲨烯占总脂质的 33% [4]。“高产率”地生产角鲨烯的酵母生产的角鲨烯可达到总脂质的 $\geq 40\%$,例如 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 等。

[0025] 所得角鲨烯的优点之一在于至少 95% 为反式（天然异构体），例如 > 96%，> 97%，> 98%，> 99% 或 100% 为反式。

[0026] 属于天然突变株的角鲨烯高产酵母菌是本领域已知的，例如参考文献 5 所述的德尔布有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)。可以用常规诱变法（随机诱变或定向诱变）获得突变株，例如参考文献 6 和 7 所述，然后从诱变细胞中筛选角鲨烯高产菌株。参考文献 8 描述了一类酵母菌，其具有 4- α -羧基甾醇-3-脱氢酶 (4- α -carboxysterol-3-dehydrogenase) (ERG26) 温敏突变，因此能在以合适温度培养时形成角鲨烯累积。

[0027] 通常，本发明会采用基因改造过的酵母。有多种方法可以来提高起始菌株的角鲨烯产率。可通过调控甾醇代谢来提高角鲨烯产率，例如提高角鲨烯合成代谢和 / 或降低角鲨烯分解代谢（包括其降解和 / 或自然转化为麦角甾醇）。参与角鲨烯生物合成的基因包括：甲羟戊酸激酶，磷酸甲羟戊酸激酶，焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶，异戊烯焦磷酸异构酶，HMGR (3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶) 和角鲨烯合成酶。参与角鲨烯向麦角甾醇转化的基因包括：角鲨烯环氧酶 (ERG1)，羊毛醇合成酶，C14-二甲基酶 (C14-dimethylase)，d14-还原酶 (d14-reductase)，C4-甲基氧化酶 (C4-methyloxidase)，C4-脱羧酶 (C4-decarboxylase) (ERG26)，3-酮还原酶 (3-ketoreductase)，C24-甲基转移酶，C8-异构酶，C5-去饱和酶，d22-去饱和酶和 d24-还原酶。其它代谢酶包括：LEU2 (β -异丙基苹果酸脱氢酶)，氧化鲨烯环化酶，酵母甾醇-24-甲基转移酶和麦角甾醇-5,7,24(28)-三烯甘油酯-22-脱氢酶。相关调控是已知的，例如参考文献 9 中所述。

[0028] 可用各种合适的方法提高或降低相关酶的活性水平，通常采用基因改造的方法。可用标准方法对酵母进行基因改造，包括参考文献 7 和 10 中所述的方法。可用各种方法将基因导入酵母，例如用质粒，或通过染色体整合。酵母内基因敲除技术也已相当成熟。

[0029] 提高酶活的方法包括但不限于：提高菌株内自有酶的拷贝数，例如增加一个或更多个基因，通常是加载于质粒上；提高自有酶的表达水平（超表达），例如采用强启动子；增加异源酶，即并非菌株自有的酶；降低或避免阻抑或抑制因子的表达；改变自有酶的序列从而提高稳定性、去除引起抑制的氨基酸残基、改变蛋白质的转运和胞内聚集等等。例如，已知将酶的序列截短可将其由膜蛋白转变为胞浆蛋白，并由此形成角鲨烯积累。

[0030] 降低酶活的方法包括但不限于：消除菌株内的自有酶；降低自有酶的表达水平，例如采用弱启动子；提高阻抑或抑制因子的表达；改变自有酶的序列从而降低稳定性、改变诱导酶活的氨基酸残基、删除功能域、改变蛋白质的转运和胞内聚集等等。

[0031] 弱表达或过表达水平以及活性提高或降低通过与不含相应改造的野生型菌株的比较来表示。

[0032] 现有技术中已有不少关于酵母内适宜基因操作的报道。例如，参考文献 11 记载了一种酵母，由于 HMGR 超表达且酵母甾醇-24-甲基转移酶和 / 或麦角甾醇-5,7,24(28)-三烯甘油酯-22-脱氢酶表达降低，由此提高了角鲨烯积累。参考文献 12 记载了一种酵母，表达膜结合区缺失的截短 HMGR (HMG1 异构酶)，使之成为胞浆酶，由此获得角鲨烯积累。破坏角鲨烯环氧酶导致角鲨烯积累 [13]。参考文献 14 对解脂耶罗威亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 进行了改造，抑制乙酰辅酶 A 脱羧酶而超表达 HMGR，结果，采用廉价的碳源，例如乳酪乳清 (cheese whey) 或甘蔗，该酵母菌能够以 2% cdw 的产率生产角鲨烯。氧化鲨烯环化酶 (ERG7) 突变也能导致角鲨烯积累 [8]。已知，没有胆甾醇则无法在 3-酮甾醇上生

长的麦角甾醇营养缺陷型酵母能积累角鲨烯 [15]。血红素合成不良的酵母能积累角鲨烯 [16]。

[0033] 可将多种方法联用,例如表达胞浆型截短 HMG1 并且敲除角鲨烯环氧酶基因。

[0034] 优选表达截短 HMG1 的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*),例如参考文献 12 所述的那些。表达可溶性非膜结合形式的 HMG1,最好是在组成型启动子(例如 ADH1 启动子)调控下表达,可获得高水平的角鲨烯积累(40×野生型)。该截短蛋白可能含有 HMG1p 的部分间隔区和 C-末端催化域,但缺失了 N-末端的跨膜区。一株菌株可表达一份或多拷贝的该基因。

[0035] 可在存在能够提高角鲨烯产率的因子的条件下培养酵母(天然、突变或工程菌)。例如,烯丙胺类抗真菌剂(例如特比萘芬(terbinafine)、萘替芬(naftifine))能抑制角鲨烯环氧酶,造成麦角甾醇缺乏和角鲨烯胞内积累[17]。如果存在非致死水平的角鲨烯环氧酶抑制剂或者采用耐受型菌株等,培养物的角鲨烯产率可得到提高。据参考文献 18 记载,特比萘芬(terbinafine)存在下,角鲨烯产率可提高约 100-倍。不同假丝酵母(*Candida* sp.)内角鲨烯环氧酶对特比萘芬(terbinafine)敏感度的差异因数约为 10,所以,可能需要对特定目标酵母菌进行因子浓度优化。能够引起角鲨烯积累的其它抗真菌剂包括但不限于:伏立康唑(voriconazole)[19]、6-氨基-2-正-戊基硫代苯并噻唑[20]和硫代氨基甲酸酯(盐)类(thiocarbamate)抗真菌剂(例如托萘酯(tolnaftate)和托西拉酯(tolciclate))[21]。硫胺存在下培养也能提高角鲨烯产率[22]。

[0036] 合适的酵母包括各种产角鲨烯或经调控后生产角鲨烯的酵母。例如以下各属:子囊酵母(*Arthroascus*),双极酵母(*Arxiozyma*),*Arxula*,布勒掷孢酵母(*Bullera*),假丝酵母(*Candida*),德巴利氏酵母(*Debaryomyces*),德克氏酵母(*Dekkera*),*Dipodascopsis*,内孢酵母(*Endomyces*),阿氏假囊酵母(*Eremothecium*),地霉菌属(*Geotrichum*),有孢汉生酵母(*Hanseniaspora*),汉逊酵母(*Hansenula*),*Hormoascus*,伊萨酵母(*Issatchenkia*),克勒克氏酵母(*Kloeckera*),克鲁维酵母(*Kluyveromyces*),油脂酵母(*Lipomyces*),娄德酵母(*Lodderomyces*),***Metschnikowia***,囊酵母(*Pachysolen*),特地厚边孢酵母(*Pachytichospora*),毕赤酵母(*Pichia*),球红冬孢酵母(*Rhodospiridium*),红酵母(*Rhodotorula*),酿酒酵母(*Saccharomyces*),*Saccharomycodes*,裂芽酵母孢子属(*Schizoblastosporion*),裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*),*Schwaniomyces*,掷孢酵母(*Sporobolomyces*),梗孢酵母(*Sterigmatomyces*),合轴酵母(*Sympodiomyces*),外囊属(*Taphrina*),圆酵母(*Torula*),有孢圆酵母(*Torulaspora*),球拟酵母(*Torulopsis*),丝孢酵母(*Trichosporon*),耶氏酵母(*Yarrowia*),接合汉氏酵母(*Zygothansensula*)和小椭圆结合酵母(*Zygosaccharomyces*)。本发明用的是酿酒酵母(*Saccharomyces*)和有孢圆酵母(*Torulaspora*)。本发明优选的是戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*),最好是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0037] 可通过大规模酵母发酵来生产角鲨烯,这样,角鲨烯的产量几乎没有上限,并可由此降低单位生产成本。可用各种已知的培养系统或发酵系统来培养酵母。适用于本发明的酵母发酵系统包括分批发酵(batch)系统和连续发酵系统。也可采用两阶段培养系统。可以先在有氧条件下培养酵母从而提高生物量,然后转入(至少部分)无氧发酵阶段来提高角鲨烯生产。两阶段培养系统能将角鲨烯积累与生长期分开。可通过无氧条件下培养酵母来提高角鲨烯产率[23-25],碳源对此可能也有影响。

[0038] 因为酵母能用调配培养基来培养,由此可确保培养物不含致病物质、环境毒素或其他污染物。合适的培养基取决于酵母种类和发酵系统。合适的培养基包括含有或不含补充成分的富营养培养基或基本培养基。例如,可用以下培养基来培养酵母:MM, EMM, YPD, YPDS, YPG, YPGS, YT, YAPD, YEPD, YPL, YEP, YNBD 和 SD。理想的是不含任何动物来源产物(例如乳清)的培养基。如果细胞培养需用到动物(尤其是牛)材料,它们必须是来自无海绵状脑病(TSEs)尤其是牛海绵状脑病(BSE)的来源。

[0039] 由于对培养条件的控制,本发明纯化自酵母的角鲨烯不受病原体、病原体代谢物、毒素及其它有害物质的污染,并且不含来自致 TSE 物质(酵母中不存在此类物质)的朊蛋白。从酵母中分离角鲨烯的方法是本领域已知的,包括例如层析,液-液溶剂萃取,临界气相萃取[26]和采用例如 CO₂ 的超临界液相萃取(可以通过冷冻干燥进行),氯仿-甲醇溶剂萃取[5, 23, 27]。理想的是,纯化角鲨烯的纯度高于 97% 纯(重量),更好的是,高于 98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%,甚至 100% 纯。理想的是,纯化角鲨烯中的 PCB/二恶英含量低于每克角鲨烯 6153pg,此为毒性当量(TEQ)。TEQ 能用一个数字来表示 PCB 类/二恶英混合物的毒性。每种 PCB(多氯联苯)的毒性表示为相对于 2,3,7,8-TCDD 二恶英毒性(设为参比值 1)的分数(毒性当量因子,TEF;WHO 2005)。要计算一个混合物的总 TEQ,将每一 PCB 的质量乘以其 TEF,然后将所得值加和得到 TEQ。例如,角鲨烯中的二恶英/PCB 含量低于 5000pg/g、4000pg/g、3000pg/g、2000pg/g、1000pg/g、500pg/g、100pg/g、50pg/g(TEQ)。

[0040] 由酵母中纯化得到角鲨烯后,其可用于制造药物、水包油乳液佐剂等下游产品。

[0041] 水包油乳液

[0042] 水包油乳液尤其适合用作疫苗的佐剂。本发明制备的乳液除包含水性组分之外还含有角鲨烯和至少一种表面活性剂。本发明乳液还可含有其它油类。理想的是,所述油类和表面活性剂是可生物降解(代谢)且生物相容的。

[0043] 可采用角鲨烯与生育酚的油性组合物。对于含生育酚的组合物, α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 或 ξ 生育酚均可使用,优选的是 α -生育酚。生育酚可以是多种形式的,例如不同的盐和/或异构体。所述盐包括有机盐,例如琥珀酸盐、乙酸盐、烟酸盐等。D- α -生育酚和 DL- α -生育酚均可采用。优选的 α -生育酚是 DL- α -生育酚。

[0044] 油含量一般为 2-20% 体积)。

[0045] 乳液中油滴的直径一般小于 5 μ m,甚至可以是亚微米的,用微流化机即可达到如此小的粒径并获得稳定的乳液。优选小于 220nm 的油滴,因为它们能够通过除菌过滤。

[0046] 表面活性剂可根据其‘HLB’(亲水性/亲脂性平衡)来分类。本发明优选表面活性剂的 HLB 至少为 10,优选至少 15,至少 16 更好。本发明可用的表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯山梨糖醇酐酯类表面活性剂(通常称为 Tweens),具体例如聚山梨醇酯 20(polysorbate 20)和聚山梨醇酯 80(polysorbate 80);环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚醚,商品名为 DOWFAX™,例如线性 EO/PO 嵌段共聚醚;辛基聚醇,乙氧基(氧-1,2-乙二基)重复数各自不同,重要的有辛基聚醇-9(Triton X-100,或异辛基苯基聚氧乙烯醚);辛基苯基聚氧乙烯醚(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂类,例如磷脂胆碱(卵磷脂);壬基苯酚乙氧基化物,例如 Tergitol™ NP 系列;月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的脂肪醇聚氧乙烯醚(即 Brij 表面活性剂),例如三聚乙二醇单月桂醚(Brij 30);脱水山梨酸酯(即 SPANs),例如脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)和山梨醇酐单月桂酸酯。优

选非离子表面活性剂。本发明乳液中的表面活性剂最好是聚山梨醇酯 80 (聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯; Tween 80)。

[0047] 可以采用表面活性剂混合物, 例如 Tween 80/ Span 85 混合物。适合的还有聚氧乙烯山梨醇酐酯与辛苯聚醇组合。另一个有用的组合含月桂醇聚醚-9 (laureth 9) 加聚氧乙烯山梨醇酐酯和 / 或辛苯聚醇。

[0048] 表面活性剂 (% 重量) 优选含量是: 聚氧乙烯山梨糖醇酐酯 (例如 Tween 80), 0.01-2%; 辛基或壬基苯基聚氧乙烯醚 (例如 Triton X-100 或其它 Triton 系列除垢剂), 0.001-0.1%; 聚氧乙烯醚 (例如桂醇聚醚-9), 0.1-20%。

[0049] 优选含有聚山梨醇酯 80 的含角鲨烯水包油乳液。可用本发明纯化的角鲨烯制备的具体的水包油乳液佐剂包括但不限于:

[0050] • 角鲨烯, 聚山梨醇酯 80 和脱水山梨糖醇三油酸酯的亚微米乳液。按体积计, 该组合可含约 5% 角鲨烯, 约 0.5% 聚山梨醇酯 80 和约 0.5% Span 85。按重量计则为 4.3% 角鲨烯, 0.5% 聚山梨醇酯 80 和 0.48% Span 85。该佐剂称为 'MF59' [28-30], 参考文献 31 第 10 章和参考文献 32 第 12 章对其有详细描述。较好的是, MF59 乳液含有柠檬酸根离子, 例如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0051] • 角鲨烯, 生育酚和聚山梨醇酯 80 的亚微米乳液。此类乳液含 2-10% 角鲨烯, 2-10% 生育酚和 0.3-3% 聚山梨醇酯 80, 角鲨烯: 生育酚的重量比 ≤ 1 (例如 0.90) 为宜, 这样, 乳液更稳定。角鲨烯与聚山梨醇酯 80 的体积比可以是约 5 : 2, 重量比约 11 : 5。此类乳液可如下制备: 将 Tween 80 溶于 PBS 制成 2% 溶液, 将 90ml 该溶液与 (5g DL- α -生育酚和 5ml 角鲨烯) 混合物混合, 然后将该混合物微流化。所得乳液含亚微米油滴, 例如平均直径 100-250nm 之间, 约 180nm 为佳。该乳液还可包含 3-脱氧-乙酰单磷酸酯 A (3d-MPL)。另一种有用的此型乳液包含, 按每次人用剂量计, 0.5-10mg 角鲨烯, 0.5-11mg 生育酚和 0.1-4mg 聚山梨醇酯 80 [33]。

[0052] • 角鲨烯, 生育酚和 Triton 除垢剂 (例如 Triton X-100) 的乳液。该乳液还可包含 3d-MPL (见下文)。该乳液可含磷酸盐缓冲液。

[0053] • 包含角鲨烯, 水性溶剂, 聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子表面活性剂 (例如聚氧乙烯 (12) 鲸蜡醇醚) 和疏水性非离子表面活性剂 (例如脱水山梨醇酯或二缩甘露醇酯, 例如山梨醇酐单油酸酯或 'Span 80') 的乳液。较好的是, 该乳液是热可逆型的, 并且 / 或者, 至少 90% (体积) 的油滴小于 200nm [34]。该乳液还可包含一种或多种以下物质: 醛醇, 冷冻保护剂 (例如糖, 例如十二烷基麦芽糖苷 (dodecylmaltoside) 和 / 或蔗糖), 和 / 或烷基多糖苷。该乳液可包括 TLR4 激动剂 [35]。该乳液可冷冻干燥。

[0054] • 角鲨烯, 泊洛沙姆 105 (poloxamer 105) 和 Abil-Care [36] 的乳液。在含佐剂疫苗中, 这些组分的最终浓度 (重量) 为: 5% 角鲨烯, 4% 泊洛沙姆 105 (复合多元醇 (pluronic polyol)) 和 2% Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 聚二甲基硅氧烷; 辛酸 / 癸酸三酸甘油酯)。

[0055] 可以在给药时或者在疫苗生产过程中现场将本发明乳液与含抗原组分混合。如果这两种组分都是液体, 两者的体积比是可变的, 例如可以是 5 : 1 至 1 : 5, 但通常约为 1 : 1。

[0056] 因此, 本发明的方法还可以包括将本发明乳液与免疫原混合的步骤。本发明的方

法还可包括包装乳液或乳液 / 免疫原混合物的步骤。可将按照本发明制备的乳液装入试剂盒内的第一容器内,该试剂盒还包括装有免疫原的第二容器。可将这两个容器内的物质混合后给予受主(例如人),也可以分开的方式联合给药。

[0057] 总则

[0058] “包含”涵盖“包括”以及“由... 构成”,例如某组合物“包含”X 表示该组合物可能仅由 X 构成,或者还含有其他物质,例如 X+Y。

[0059] 就数值而言,“约”是可选的,表示,例如, x+10%。

[0060] 本发明的实施方式

[0061] 用基因工程技术制备了多种突变酵母菌。这些突变株或者过表达或者低表达参与角鲨烯代谢的酶。其中之一是酵母菌株 ATC1551,见参考文献 11,该菌株在适宜培养条件下的角鲨烯产率可高达 16% cdw。

[0062] 培养完成后,收集培养的细胞,用玻璃珠研磨机破碎细胞。用(2 : 1) 氯仿 - 甲醇溶剂萃取来纯化角鲨烯,或者,为了提高产率,可以采用参考文献 5 的方法,冷冻干燥后进行超临界二氧化碳萃取。由此得到高纯度(> 95%)的角鲨烯。

[0063] 将所得纯化角鲨烯与 Tween 80 与 Span 85 表面活性剂的混合物以及柠檬酸盐缓冲液混合,制成含 5%角鲨烯、0.5% Tween 80 和 0.5% Span 85(体积)的混合物。将该混合物微流化,制成平均液滴小于 500nm 的乳液。该乳液即 ‘MF59’,可用作疫苗佐剂。

[0064] 以上所说仅是举例,本发明的范围和主旨包含各种修改和调整。

[0065] 参考文献

[0066] [1]Borucinska & Frasca(2002)J Fish Diseases(鱼类疾病杂志)25 :287-98

[0067] [2]Bertone 等 (1996)J Fish Diseases(鱼类疾病杂志)19 :429-34

[0068] [3]Briones 等 (1998)J Vet Med B(兽医系列杂志 B 系列)45 :443-5

[0069] [4]Blagovic 等, (2001)Food technol Biotechnol(食品技术与生物技术),39 : 175-81

[0070] [5]Bhattacharjee 等 (2003)World Journal of Micorbiology 和 Biotechnology(世界微生物与生物技术杂志),19 :605-608

[0071] [6]Boeke 等, (1984)Mol. Gen. Genet. (分子. 基因. 遗传),197 :345-346

[0072] [7]Sherman 等, (1986)Methods 和 Yeast Genetics(方法和酵母遗传学), Cold Spring Harbor Laboratory, 美国纽约

[0073] [8]Germann 等 (2005)J Biol Chem(生物化学杂志)280 :35904-13

[0074] [9]Veen 等 (2003)FEMS Yeast Research(FEMS 酵母研究)4 :87-95

[0075] [10]Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T(1989), Molecular cloning :a laboratory manual(分子克隆手册), Cold Spring Harbor 出版社, Cold Spring Harbor

[0076] [11] 美国专利 5460949

[0077] [12]Polakowski 等 (1998)Appl Microbiol Biotechnol(应用微生物学会生物技术)49(1) :66-71

[0078] [13]Pasrija 等 (2005)J Antimicrob Chemother(抗生素和化疗药杂志)55(6) : 905-13

[0079] [14]Performance of the Third 50 Completed ATP Projects(第三次 50 完全

ATP 计划结果) (2006)NIST SP 950-4, pages 59-62

[0080] [15]Gachotte 等 (1999)PNAS USA 96 :12655-60

[0081] [16]Ness 等 (1998)J Bacteriol(细菌学杂志). 180(7) :1913-9

[0082] [17]Ryder 等 (1985)Biochem J. (生物化学杂志)230 :765-770

[0083] [18]Leber 等 (2001)European Journal of Biochemistiy(欧洲生物化学杂志)268 :914-924

[0084] [19]Sanati 等 (1997)Antimicrob Agents Chemother(抗生素和化疗药杂志). 41(11) :2492-6

[0085] [20]Kuchta 等 (1997)FEMS Microbiol Lett(FEMS 微生物学杂志)150 :43-7

[0086] [21]Ryder 等 (1986)Antimicrob Agents Chemother(抗生素和化疗药杂志)20 : 858-60

[0087] [22]Nishikawa 等 (1978)Biochim Biophys Acta(生物化学和生物物理学学报)531(1) :86-95

[0088] [23]Bhattacharjee 等, (2001)World Journal of Micorbiology 和 Biotechnology(世界微生物与生物技术杂志),17 :811-816

[0089] [24]Jahnke & Klein(1983)J Bacteroil 155 :488-92

[0090] [25]Valero 等 (2001)J Bioscience Bioengin(生命科学和生物工程杂志)92 : 33-8

[0091] [26]W094/26683

[0092] [27]Foch 等, (1957)Journal of Biological Chemistry(生物化学杂志),226 : 497-509

[0093] [28]W090/14837

[0094] [29]Podda & Del Giudice(2003)Expert Rev Vaccines(疫苗专家评述)2 : 197-203

[0095] [30]Podda(2001)Vaccine(疫苗)19 :2673-2680

[0096] [31]Vaccine Design:The Subunit 和 Adjuvant Approach(疫苗设计:亚基与佐剂)(eds. Powell & Newman)Plenum 出版社 1995(ISBN 0-306-44867-X)

[0097] [32]Vaccine Adjuvants:Preparation Methods 和 Research Protocols(疫苗佐剂:制备方法和研究规程)(Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series(分子药理学方法系列第 42 卷)) ISBN :1-59259-083-7. Ed. 0' Hagan

[0098] [33]W02008/043774

[0099] [34]US-2007/0014805

[0100] [35]US-2007/0191314

[0101] [36]SuLi 等 (2004)Vaccine(疫苗)22(25-26) :3464-9