



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118450904 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202280084857.9

(22) 申请日 2022.12.23

(30) 优先权数据

21217746.3 2021.12.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/087692 2022.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/118553 EN 2023.06.29

(71) 申请人 英特维特国际股份有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 M·皮埃斯特 M·蒂伦

F·G·A·曼德斯

M·H·威特夫莱特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/075 (2006.01)

A61K 31/085 (2006.01)

A61K 31/01 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书34页 附图5页

(54) 发明名称

抗原的稳定乳剂

(57) 摘要

本发明涉及疫苗学领域,更具体地说是兽医疫苗学领域。具体而言,本发明涉及一种佐剂组合物,其包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯、和作为乳化剂的聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚。所述佐剂组合物可用于配制包含细菌、寄生虫或病毒抗原的疫苗,特别是乳剂疫苗。所得疫苗组合物可用于保护人或动物目标免受由病原体引起的(特别是由细菌、寄生虫或病毒引起的)感染和/或疾病的方法中。本发明还涉及制备此类佐剂组合物和制造此类疫苗组合物的方法。

1. 一种佐剂组合物,其包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯、和聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚。

2. 根据权利要求1所述的佐剂组合物,其中所述聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚选自聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、聚乙氧基乙烯20鲸蜡硬脂基醚和聚乙氧基乙烯30鲸蜡硬脂基醚。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的佐剂组合物,其中所述聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚是聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其中生育酚的药学上可接受的酯是 α -生育酚乙酸酯。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其还包含角鲨烷。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其不含脂肪酸的酯。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其还包含非矿物油,优选地合成油。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其中所述佐剂组合物是水包油乳剂。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其中所述聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚的以基于所述佐剂组合物体积的约1至约9重量%的量存在。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其中生育酚或其药学上可接受的酯以基于所述佐剂组合物体积的约1至约20重量%的量存在。

11. 根据权利要求5-10中任一项所述的佐剂组合物,其中角鲨烷以基于所述佐剂组合物体积的约5至约20重量%的量存在。

12. 根据权利要求6-11中任一项所述的佐剂组合物,其中所述矿物油以基于所述佐剂组合物体积的约5至约40重量%的量存在。

13. 根据权利要求6-12中任一项所述的佐剂组合物,其中所述非矿物油以基于所述佐剂组合物体积的约5至约40重量%的量存在。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其还包含二氧化硅。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物,其包含颗粒大小D50为约80至约200nm、优选地约40至约100nm的乳剂颗粒。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的佐剂组合物用于配制乳剂疫苗、优选地水包油乳剂疫苗的用途。

17. 一种疫苗组合物,其包含根据权利要求1至15中任一项所述的佐剂组合物以及抗原。

18. 根据权利要求17所述的疫苗组合物,其中所述抗原包含粗抗原。

19. 根据权利要求17或权利要求18所述的疫苗组合物,其中所述抗原包含酯酶、优选地脂肪酶。

20. 根据权利要求17-19中任一项所述的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物包含选自细菌、寄生虫和病毒的非活抗原的一种或多种抗原。

21. 根据权利要求20所述的疫苗组合物,其中所述非活抗原来自猪圆环病毒2型、猪肺炎支原体和/或口蹄疫病毒。

22. 根据权利要求17-21中任一项所述的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物是乳剂疫

苗。

23. 根据权利要求22所述的疫苗组合物,其中所述乳剂疫苗是水包油乳剂疫苗。

24. 一种用于制备根据权利要求17-23中任一项所述的疫苗组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

-制备包含抗原的水相,和

-将所述水相与根据权利要求1-15中任一项所述的佐剂组合物混合。

25. 根据权利要求17-23中任一项所述的疫苗组合物,其用于保护人或动物目标免受病原体引起的感染和/或疾病的方法中。

26. 根据权利要求25使用的疫苗组合物,其中所述动物目标是猪或反刍动物。

27. 根据权利要求25或权利要求26使用的疫苗组合物,其中所述病原体选自细菌、寄生虫和病毒。

28. 根据权利要求25至27中任一项使用的疫苗组合物,其中所述病原体选自猪圆环病毒2型、猪肺炎支原体和口蹄疫病毒中的一种或多种。

29. 根据权利要求25-28中任一项使用的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物通过皮内或肌肉途径施用。

30. 根据权利要求17至23中任一项所述的疫苗组合物,其用于对人或动物目标进行疫苗接种以对抗由病原体引起的感染和/或疾病。

31. 根据权利要求1至15中任一项所述的佐剂组合物在制备用于保护人或动物目标免受由病原体引起的感染和/或疾病的疫苗组合物中的用途。

32. 一种对人或动物目标进行疫苗接种以对抗由病原体引起的感染和/或疾病的方法,所述方法包括向所述目标施用根据权利要求17-23中任一项所述的疫苗组合物。

33. 一种部件的试剂盒,其包含至少两个容器,一个容器包含根据权利要求1至15中任一项所述的佐剂组合物,以及一个容器包含抗原。

34. 根据权利要求33所述的部件的试剂盒,其中所述抗原是冻干的活PRRSV,或非活细胞内劳森氏菌的冻干制剂。

抗原的稳定乳剂

发明领域

[0001] 本发明涉及疫苗学领域,更具体地说是兽医疫苗学领域。具体而言,本发明涉及一种佐剂组合物,其包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯、和作为乳化剂的聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚。所述佐剂组合物可用于配制疫苗,特别是乳剂疫苗,包括细菌、寄生虫和/或病毒抗原。所得疫苗组合物可用于保护人或动物目标免受由病原体引起的(特别是由细菌、寄生虫或病毒引起的)感染和/或疾病的方法中。本发明还涉及用于制备此类佐剂组合物和制备此类疫苗组合物的方法。

[0002] 简介

[0003] 自文明开始以来就已经知道病原体细菌、寄生虫或病毒感染及其引起的疾病,它们影响人类和动物,对健康和福祉造成严重影响。

[0004] 自20世纪中叶以来,细菌感染可以用抗生素药物有效治疗,尽管耐药性的累积是一个持续的威胁。农业部门畜牧业使用抗生素的情况很特殊:一方面,由于动物饲养方式和条件导致感染压力高,迫切需要治疗。另一方面,普遍的非治疗性抗生素使用(例如在动物饲料中使用)现在被认为是细菌耐药性增加的原因之一,这也与人类健康有关。因此,这种普遍使用的抗生素正在越来越多的国家逐步淘汰。

[0005] 预防性使用抗寄生虫药物的情况也类似。

[0006] 在病毒感染的情况下,情况更具挑战性,因为使用抗病毒药物对于兽医来说通常过于昂贵。

[0007] 除了改进农场管理之外,以可持续的方式对抗病原体感染和疾病的最佳选择是接种疫苗。细菌、寄生虫和病毒疫苗(无论是用于人还是动物)已为人所知超过一个世纪,并且有多种形式。

[0008] 此类疫苗可以是活的,即含有复制性(减毒)细菌、寄生虫或病毒,也可以是非活的,即包含灭活的细菌、寄生虫或病毒,或其组分中的一种或多种。

[0009] 包含非活(即非复制)抗原的疫苗通常需要佐剂来为非活抗原提供免疫刺激。在兽医疫苗中,可以使用多种化合物作为佐剂,例如:矿物油,例如Bayol™或Markol™、Montanide™或石蜡油;非矿物油,例如鲨烯、角鲨烯或植物油,例如油酸乙酯;铝盐,例如氢氧化铝或磷酸铝;肽,例如二甲基甘氨酸或tuftsin;细菌细胞壁组分,例如脂质A和胞壁酰二肽;(合成)聚合物,例如pluronic、右旋糖酐、carbomeres、吡喃或皂苷;细胞因子;和Toll样受体刺激剂,例如包含非甲基化CpG基团的免疫刺激性寡脱氧核苷酸;等。

[0010] 为了便于施用和增强佐剂效果,油佐剂可以用水相中的抗原乳化以形成乳剂,该乳剂又可用于制备疫苗。在这种乳剂中,一个液相分散在另一个液相中,通常是油包水(W/O)或水包油(O/W)型乳剂。选择一种或另一种类型的乳剂可以基于例如所需的免疫反应类型。

[0011] 要产生并维持这种乳剂需要输入机械能和化学能:在适当的装置中,使用一定水平的剪切力、压力和温度将单独的液体混合,以将一个相分散到另一个相中。化学能的输入是通过使用乳化剂(也称为表面活性剂)提供的,乳化剂通过占据水和油的界面来稳定分散

相。疫苗乳剂可以由一种或多种佐剂与一种或多种乳化剂组成。

[0012] 可用于乳剂疫苗中的乳化剂种类繁多,而且还在不断开发更多的乳化剂。

[0013] 商业兽医疫苗中使用的佐剂和乳化剂组合的实例有: **Amphigen®** (Zoetis), 其包含轻质矿物油和卵磷脂作为乳化剂; **Xsolve®** (以前称为: **Microsol-Diluvac Forte®**, MSD Animal health), 其包含佐剂轻质矿物油和维生素E醋酸酯的组合, 以及乳化剂 **Tween®** 80 (聚山梨酯80或聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯); 以及 **MetaStim®** (Zoetis), 其包含角鲨烷、**Pluronic®** (聚氧乙烯和聚氧丙烯嵌段的非离子三嵌段共聚物) 和 **Tween 80**; **Fortasol®** (又名 **Diluvac Forte®**), 包含维生素E醋酸酯和 **Tween 80**; **SP-oil™** (**Pluronic™**、角鲨烷和 **Tween**); 以及 **AS03™** (GSK), 其包含2.1%w/v角鲨烯和2.4%w/v维生素E, 以及1.0%w/v **Tween 80** 作为乳化剂。

[0014] 用作疫苗的乳剂应是稳定的且不会“破裂”, 这意味着分散相的液滴类型、大小和数量不应随时间发生太大变化, 否则最终会导致分散性降低, 并最终导致完全相分离。

[0015] 保持乳剂的稳定性对于保证乳剂疫苗在其注册保质期内的使用和有效性非常重要。重力随时间的影响(例如沉淀或乳化)是无害的, 可以通过用手摇晃轻松逆转。然而, 乳剂的实际破裂是不可逆的, 由此导致的相分布不理想可能导致剂量不正确、安全问题, 并可能影响疫苗抗原的免疫效力。

[0016] 除了对疫苗安全性和有效性的首要要求外, 畜牧业中使用的疫苗还有一些特殊要求。这些涉及易用性方面, 尤其是成本方面。这是因为动物蛋白的生产通常是一个高产量、低利润的企业。出于这些原因, 兽医疫苗通常会同时针对几种疾病或病原体, 通过在单一疫苗制剂中包含几种不同的抗原。这有利于减少目标动物因需要重复治疗而产生的压力, 并减少施用的人工成本。

[0017] 目前, 市场上有针对大量病原体和所有主要动物目标群体(猪、牛、羊、家禽、伴侣动物(例如猫、狗、马)和鱼)的含有细菌、寄生虫和/或病毒抗原的油佐剂乳剂疫苗。

[0018] 然而, 并非所有所需的抗原选择都可以配制成稳定的乳剂疫苗。这是因为需要用于农业的疫苗价格合理, 即: 这种疫苗通常不含有昂贵的纯组分(例如重组表达的亚单位), 并且不能使用复杂的纯化技术(例如柱色谱法)生产。实际上, 这意味着此类疫苗中包含的非活抗原通常相对不纯, 且成分有些不明确。与市场价值更高的疫苗产品(例如用于伴侣动物(猫、狗和马)或甚至用于人的疫苗产品)中更纯化的疫苗抗原相比, 情况尤其如此。或者, 特定的保护性抗原可能不为人所知, 因此粗抗原制剂是包含必要抗原的唯一方法。

[0019] 因此, 用于农业的非活体细菌、寄生虫或病毒疫苗通常包含少量纯化抗原, 这些抗原源自例如灭活的细菌、寄生虫或病毒培养物, 或源自此类培养物的提取物或级分。这种相当粗制的抗原可以基于灭活的细菌或寄生虫或灭活的病毒, 可能经过一次清洗或浓缩; 或基于细菌、寄生虫或病毒级分的抗原, 例如裂解或破坏的细菌细胞、寄生虫或病毒。因此, 这些粗制抗原制剂可能含有未定义或非预期的杂质, 这些杂质可能会影响(组合)疫苗的安全性、有效性或稳定性。这就是为什么疫苗作为其开发过程的一部分, 必须经过严格的安全性、有效性和稳定性测试, 然后才能获得政府或监管机构的营销授权, 将此类疫苗作为商业产品投放市场。

[0020] 非活抗原制剂中的未指定成分不一定是需要的, 因为它们可以充当其他佐剂,

从而为免疫反应提供非特异性增强。此外,在制备非活细菌、寄生虫或病毒抗原的过程中,预计潜在的生物干扰因素将被灭活。然而,在开发包含粗抗原制剂的乳剂型疫苗的过程中,可以观察到对疫苗安全性、有效性或稳定性的不良影响。

[0021] 在制造佐剂疫苗时要克服的另一个障碍是防止各种疫苗成分之间的相互作用,这种相互作用会对免疫反应或疫苗的安全性或稳定性产生负面影响。这种相互作用可能发生在抗原本身之间,例如因为有些是相当粗糙的产品。此外,佐剂可能会干扰甚至破坏疫苗抗原。因此,很难开发一种能诱导针对一种或多种抗原的有效免疫反应的佐剂疫苗,尤其是对于与多种病原体抗原相关的复杂组合。

[0022] 此外,佐剂疫苗在动物身上使用时应是安全的,即不会产生明显的副作用,如发烧、局部肿胀、食欲不振等。此外,还有更实用的特性:理想情况下,乳剂疫苗应能够经济地生产,在配制和储存过程中足够稳定,并允许在存在其他抗原的情况下对每种抗原进行效力测试。

[0023] 从幼年起影响猪的一些最突出的疾病是由细菌引起的,例如:肺炎支原体和细胞内劳森氏菌;以及由病毒引起的,例如猪圆环病毒2型(PCV2)和猪生殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)。

[0024] 猪肺炎支原体(Mhyo)是导致(猪)地方性肺炎的主要病原体,这是一种全球范围内发生的猪慢性呼吸道疾病。尤其是幼猪仔容易感染这种高度传染性的疾病。这种细菌相对较小,没有细胞壁,属于柔膜菌属。这些细菌以寄生方式寄生在宿主细胞上或细胞内。

[0025] 由Mhyo引起的肺部疾病主要是免疫介导的病理,导致合并性肺炎。这种细菌定植并破坏肺部纤毛上皮,导致纤毛活动丧失。根据饲养条件 and 环境压力,这种疾病最严重的后果是它容易导致猪呼吸系统的不同继发感染,例如由其他细菌和病毒病原体引起的感染。这导致了所谓的猪呼吸道疾病综合症(PRDC),表现出严重的肺部病变。除了给动物带来不适之外,地方性肺炎和PRDC还会因生长率和饲料转化率下降以及兽医护理和抗生素使用成本增加而给养猪业造成重大经济损失。

[0026] 细胞内劳森氏菌可引起增生性肠病,也称为回肠炎,这是世界各地断奶后猪常见的肠道疾病。特征性病变是回肠肠隐窝中未成熟肠细胞的增生,这些细胞含有病原体细菌。从肠细胞中清除细菌可消除相关的增生性病变。通过在肠细胞中以及肠道巨噬细胞内观察1.5-2.5 μ m长的弧菌状细菌,可以确认组织学病变为劳森氏菌阳性。在临床或亚临床病例中可通过PCR检测细菌。临床病例通常出现在生长育肥期。

[0027] *L.intracellularis*细菌是专性细胞内、非运动性革兰氏阴性杆菌,来自脱硫弧菌科。

[0028] 猪圆环病毒2型(PCV2)与幼猪断奶后多系统萎缩综合征(PMWS)有关。临床症状和病理学于1996年发表,包括进行性萎缩、呼吸困难、呼吸急促,偶尔出现黄疸和黄疸。这种新病原体被称为PCV2,因为它不同于已知的PCV,后者是PK-15细胞的天然污染物。

[0029] PCV2是圆环病毒属的非常小的无包膜病毒。它包含一个带有两个主要基因的环状单链DNA基因组。ORF2基因编码约233个氨基酸的病毒衣壳蛋白。重组表达的PCV2 ORF2蛋白形成病毒样颗粒,其作为亚单位疫苗高度有效。

[0030] 猪生殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)于1987年首次报道,并在20世纪90年代初成为流行病。它是包含单链正义RNA基因组的动脉炎病毒属的小型包膜RNA病毒。该病毒因生殖

障碍和生长迟缓而给养猪业造成重大损失。与Mhyo一样,PRRSV在多因素PRDC中起着重要作用。临床症状是流产和死胎或木乃伊胎,以及耳朵和外阴发绀。在新生猪中,该病毒会引起呼吸窘迫,并且更容易患上继发性呼吸道感染,例如格拉泽氏病(由副猪嗜血杆菌引起)。然而,亚临床感染也很常见。该病毒变化很大:除了欧洲变种(1型)和北美变种(2型)外,现在还有第三种基因型:一种高致病性变种,于2000年在中国出现,目前在亚洲引起猪的严重疾病。

[0031] 存在针对这些病原体中的每一种的商业疫苗。

[0032] 为了限制动物的压力以及饲养员的成本和劳动力,一些猪疫苗已被制备成组合疫苗。

[0033] WO 2018/115435描述了一种猪组合疫苗,其包含PCV2的非活抗原和活PRRSV。该疫苗是水包油乳剂,其包含角鲨烷和维生素E醋酸酯。

[0034] WO 2021/048338描述了一种用于保护猪免受PCV2和Mhyo病原体感染的组合疫苗,其包含PCV2的非活免疫原和Mhyo的非活免疫原。该疫苗是水包油乳剂,其包含角鲨烷、维生素E醋酸酯和二氧化硅。

[0035] 兽医疫苗学领域仍然对有效疫苗感兴趣,特别是对跨物种安全有效的有效疫苗。

[0036] 口蹄疫是全球偶蹄动物的一种高度传染性和破坏性的疾病,具有重大的经济影响。该病的特征是发烧、跛足、淋巴细胞减少以及口腔、舌头、鼻子、脚和乳头出现水泡病变,可通过抑制易感动物运动、屠宰受感染动物和接种疫苗来控制。在大多数国家,动物使用灭活全病毒疫苗进行免疫,以控制口蹄疫病毒(FMDV)的传播。然而,所使用的疫苗技术存在功效问题,特别是在细胞介导免疫方面。为了解决这些问题,目前正在开发替代疫苗,例如重组蛋白和肽疫苗、空衣壳疫苗和基因工程化灭活疫苗。已经研究了多种疫苗佐剂促进FMDV疫苗免疫反应的效力。这些佐剂包括矿物油、皂苷(Quil-A)、Toll样受体(TLR)配体、细胞因子、脂质体等(Y.Cao, 2014, Expert Rev. Vaccines, 第13卷, 第1377-1385页)。

[0037] 为了解决这个问题,目前致力于开发有效的疫苗,将保护性抗原的应用与寻找有效的佐剂相结合,以最大限度地提高免疫原性,从而实现所需的免疫反应。

[0038] Cao(同上)对口蹄疫疫苗的传统佐剂和目前正在开发的佐剂的作用机制和免疫刺激作用进行了综述。下面简要讨论了一些最有希望的方法。

[0039] 传统的口蹄疫灭活全病毒疫苗通常在水性A1(OH)₃和皂苷中配制,或在油基佐剂中配制。其中,基于A1(OH)₃/皂苷的疫苗不适合用于猪,因为它们对这种物种的保护效力较低。

[0040] 与之相反,基于Montanide ISA-206油佐剂(包含十八烯酸和脱水甘露醇酯的油性溶液的矿物油基佐剂)和灭活抗原的W/O/W乳剂疫苗是预防口蹄疫的首选,因为它们可用于保护所有易感物种,是紧急疫苗接种的理想选择。此外,油佐剂疫苗比A1(OH)₃佐剂疫苗产生更高、更持久的免疫反应。建议使用新开发的矿物油基佐剂Montanide ISA-201作为替代品,因为与ISA-206相比,它似乎可以在牛中诱导更早、更高的中和抗体反应、更高的细胞免疫力和保护效力。

[0041] 口蹄疫疫苗的真正挑战是找到一种跨物种起作用的佐剂。对于反刍动物,大多数佐剂疫苗使用W/O乳剂,而对于猪,通常使用O/W乳剂。目前FMDV疫苗的黄金标准是基于Montanide ISA-206的W/O/W乳剂疫苗。然而,这只能为跨物种FMDV疫苗组合物问题提供部

分而复杂的解决方案:作为“双重乳剂”,或者更准确地说:可逆乳剂,它们有几个缺点。一个重要的缺点是乳剂在32℃以上会逆转,这意味着疫苗应尽可能冷藏,并且应避免32℃或以上的温度。在无法始终保持“冷链”物流的国家,这可能是一个挑战。另一个使用缺点是,由于其成分,这种乳剂难以注射(注射性差)。另一个令人担忧的问题是配方对高抗原有效载荷的敏感性,这可能发生在含有多种FMDV抗原的疫苗中。虽然可能有必要覆盖现场传播的所有菌株,但据观察,这会破坏基于Montanide ISA-206乳剂的多价FMDV疫苗组合物。

[0042] 作为另一种选择,已经描述了由皂苷(例如Quil-A)、胆固醇、磷脂和抗原组成的免疫刺激复合物(ISCOM)。研究表明,ISCOM能够引发高滴度持久抗体和强大的辅助和细胞毒性T淋巴细胞反应。ISCOM已被描述为FMD重组蛋白(VP1蛋白的C端的一半)疫苗的佐剂;研究发现,ISCOM中的重组蛋白与Montanide ISA-206的组合可以在豚鼠中实现早期保护滴度和更持久的免疫力;在ISCOM中配制的FMD疫苗是否会在目标物种中同样成功还有待观察。此外,这项技术相当昂贵。

[0043] 还评估了合成胞苷-磷酸-鸟苷(CpG)寡脱氧核苷酸(ODN)对FMD疫苗的佐剂作用。研究表明,CpG ODN与ISA-206的组合可促进重组FMDV疫苗A7(包含多个B细胞和T细胞表位)在小鼠和牛中诱导强烈且持久的特异性抗体反应。然而,CpG与FMD灭活疫苗的组合并未促进保护作用(Cao,同上)。(Alves等,2009,Pigs.Clin.Vaccine Immunol.,第16卷,第1151-1157页)。

[0044] 鉴于上述情况,我们仍然需要口蹄疫疫苗佐剂,以诱导所需的免疫增强作用,如强效和持久的体液和细胞免疫,同时满足安全性、稳定性和易用性方面的一般要求,以克服目前口蹄疫乳剂疫苗中可用佐剂的缺点。

[0045] 然而,由于疫苗开发是一个高度经验性的过程,需要不同类型的反应来预防口蹄疫,因此几乎没有理由断定某种佐剂会比其他可用替代品更有用(Cao,上文,第1381页,右栏)。

[0046] 鉴于上述情况,兽医疫苗学领域仍然需要提供负担得起的方法和材料,以配制包含细菌、寄生虫和/或病毒抗原的安全、稳定和有效的佐剂疫苗。

[0047] 因此,本发明的目的是克服现有技术中的缺点,并通过提供可用作有效疫苗的稳定的细菌、寄生虫和/或病毒抗原佐剂乳剂来适应该领域的这种需求。

发明内容

[0048] 本发明提供了一种佐剂组合物,其包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯和作为乳化剂的聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚。佐剂组合物可有利地用于配制乳剂疫苗。

[0049] 本发明还提供了一种包含所述佐剂组合物和抗原的疫苗组合物。

[0050] 本发明还提供了一种用于制备包含所要求保护的佐剂组合物和抗原的疫苗组合物的方法,其包括以下步骤:

[0051] a) 制备包含抗原的水相,和

[0052] b) 将所述水相与所要求保护的佐剂组合物混合。

[0053] 此外,本发明提供了所要求保护的疫苗组合物,其用于保护人或动物目标免受病原体引起的感染和/或疾病的方法中。

[0054] 下面将描述根据本发明所述的佐剂组合物和用其配制的疫苗组合物的细节和偏

好。

[0055] 图例

[0056] 图1:

[0057] 样品IP.1 (水相中的Eumulgin) 在 $t=0$ (图1A)、 37°C 下10天后 (图1B) 和 37°C 下3周后 (图1C) 的显微镜视图。

[0058] 样品IP.2 (油相中的Eumulgin) 在 $t=0$ (图1D)、 37°C 下10天后 (图1E) 和 37°C 下3周后 (图1F) 的显微镜视图。

[0059] 样品IP.3 (水相中的聚山梨酯80) 在 $t=0$ (图1G)、 37°C 下10天后 (图1H) 和 37°C 下3周后 (图1I) 的显微镜视图。

[0060] 图2:

[0061] 使用Asial/Shamir SVEA-E/FMDV疫苗组合物对牛进行疫苗接种,发现病毒中和滴度较高 (图2A),并且还提供了针对FMDV攻击感染的完全保护 (图2B)。详情见实施例8。

[0062] 图3:

[0063] 使用SVEA-E佐剂FMD疫苗组合物与0/TUR/5/2009抗原作为初免和加强接种在牛中进行免疫研究的持续时间,并与相应的Montanide ISA206佐剂疫苗组合物进行比较。

[0064] 图4:

[0065] 使用SVEA-E佐剂FMD疫苗组合物与0/TUR/5/2009抗原作为单次免疫接种在猪中进行免疫研究的持续时间,并与相应的Montanide ISA206佐剂疫苗组合物进行比较。

[0066] 图5:

[0067] 使用SVEA-E佐剂FMD疫苗组合物与0/TUR/5/2009抗原作为单次免疫接种在山羊中进行免疫研究的持续时间,并与相应的Montanide ISA206佐剂疫苗组合物进行比较。

[0068] 图6:

[0069] FMDV衣壳当包含在用SVEA-E佐剂配制的疫苗组合物中时在 4°C 下随时间变化的稳定性测试。详情见实施例8。

[0070] 图7:

[0071] 实施例4中每个样品IP.1、IP.2和IP.3 (从上到下) 的粒度分析仪 (Mastersizer) 结果的图形表示,在 37°C 下10天后测量。

具体实施方式

[0072] 在研究具有多种细菌抗原的油佐剂乳剂疫苗时,发明人观察到乳剂的稳定性偶尔会失效。在稳定性测试中,几周后乳剂就破裂 (即分散性丧失,相分离增加),导致疫苗无效。显然,可能的原因包括所用矿物油或所用乳化剂 (聚山梨酯80 [Tween] 和山梨醇单油酸酯 [Span]) 的批次质量差,但这些原因很快就被排除,问题仍未得到解决。在没有任何线索的情况下,开始了对观察到的乳化破坏的长期调查:既要调查受影响的因素,也要调查导致这种影响的因素。

[0073] 令人惊讶的是,发现通过包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯和聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚的佐剂组合物,可以达到目的,从而克服现有技术的一个或多个缺点。发现即使在复杂混合物中,甚至在使用相对粗糙的抗原制剂时,这也可以解决乳化不稳定的发生。

[0074] 这一发现对于基于水和油乳剂的疫苗的开发非常有益。尤其是因为它克服了需要改变这种乳剂疫苗中使用的非活细菌、寄生虫和/或病毒抗原的质量或组成的需要,从而允许在乳剂疫苗中使用相对不纯的非活细菌、寄生虫和/或病毒抗原制剂。事实上,现在甚至可以在疫苗中以比以前更低的纯度和/或更高的浓度使用抗原,而不需要确定杂质的水平:现在只需使用常规技能,就可以将所有纯度水平的抗原配制成本发明的稳定乳剂疫苗。

[0075] 目前尚不清楚特别包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯以及作为乳化剂的聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚的佐剂组合物如何为包含非活抗原的油水乳剂提供稳定性。尽管发明人不想受任何可能解释这些发现的理论或模型的束缚,但他们推测现有技术中使用的基于山梨醇的乳化剂,特别是聚山梨酯,会随着时间的推移而降解,导致乳化能力丧失,随后乳剂破裂。他们还推测,降解现有技术乳化剂的因素是存在于非活抗原粗制剂中的酶。在存在的各种酶(蛋白酶、酯酶、碳水化合物酶和核酸酶)中,酯酶可能是降解乳化剂的原因,因为可以观察到游离脂肪酸水平的增加与现有技术乳化剂浓度的降低相关,在出现破裂的乳剂中。

[0076] 此类酯酶由许多已知的细菌和寄生虫属产生,并且在体内可作为毒力因子和/或动员营养成分。所有主要的细菌家族,包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,以及良性或病原体菌株,例如:芽孢杆菌、葡萄球菌、假单胞菌、沙门氏菌等。因此,原则上,此类酶可以存在于任何非活细菌抗原制剂中。类似的考虑适用于非活寄生虫抗原的粗制剂。

[0077] 鉴于上述情况,特别令人惊讶的是,在众多可能替代现有技术中使用的基于山梨醇的乳化剂(例如聚山梨酯)的乳化剂中,本发明的特定佐剂组合物(包含生育酚或其药学上可接受的酯和聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚)可用作有效的乳化剂,并且发现其对酯酶的影响不敏感。

[0078] 从现有技术的任何公开内容来看,这一点根本不明显,因为乳剂疫苗是一种具有多种生物和化学化合物的复杂制剂,因此,在观察到乳剂不稳定时,很难确定哪个因素受到影响,以及组合物中的哪个成分是原因。

[0079] 典型的乳剂疫苗中含有大量潜在成分,包括非活细菌、寄生虫和/或病毒抗原,其中一种或多种成分可能会对其他成分产生负面影响,例如:

[0080] -用于培养细菌的培养基成分:例如动物血清、动物组织肉汤或提取物、动物或植物来源的蛋白胨或水解产物、脂质、糖、氨基酸、维生素和矿物质、消泡剂、抗真菌剂等。

[0081] - (痕量) 灭活剂:例如硫柳汞、苯扎氯铵、甲醛、 β -丙内酯或洗涤剂。

[0082] - 稳定剂:葡聚糖、甘油、明胶、氨基酸、缓冲剂等。

[0083] - 防腐剂:硫柳汞、苯氧乙醇、甲醛、抗生素(例如庆大霉素)

[0084] - 微生物成分:细胞壁碎片、细胞内细胞器、核酸;细菌外细胞器,如:菌毛、菌毛或鞭毛;细菌蛋白质、脂质和碳水化合物,如:毒素、脂多糖、各种酶等。

[0085] - 一种或多种佐剂、乳化剂及其微量元素或杂质。

[0086] 此外,乳剂的稳定性可能受到疫苗制备、纯化、配制、乳化、灌装、运输和储存过程中的一种或多种物理因素的影响。

[0087] 最后,发明人对选择合适的聚山梨酯乳化剂替代品毫无头绪,尤其是因为替代乳化剂必须在乳剂疫苗的各种其他成分(例如油性佐剂和所用抗原)的背景下为乳剂提供所需的稳定性。

[0088] 因此,在第一方面中,本发明涉及一种佐剂组合物,其包含水乳剂、生育酚或其药学上可接受的酯、和聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚。

[0089] 在所述组合物中,生育酚或其药学上可接受的酯用作油性佐剂,聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚用作乳化剂。

[0090] 用于本发明的佐剂组合物的水优选为高纯度水,并且为药学质量级并且适合肠外注射;这种优质水通常是无菌的,并且基本上不含热原,例如:(多)蒸馏水、反渗透水或注射用水(WFI)。

[0091] “佐剂”是一种增加或调节免疫反应的物质,例如对疫苗的免疫反应。具体而言,佐剂为抗原(特别是非活抗原)提供免疫刺激,否则抗原将没有足够的免疫原性。这将触发免疫系统的不同途径,但该过程的基本机制尚不清楚。

[0092] “乳剂”是至少两种不混溶液体的混合物,其中一种分散在另一种中。通常,分散相的液滴非常小,直径为几微米或更小。

[0093] 本发明的乳化剂是具有两亲性质的分子,具有疏水性和亲水性。本领域已知许多乳化剂具有各种特性。大多数产品均可在市场上买到,且纯度不同。

[0094] 本文所用的术语“聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚”是指一类亲水性非离子乳化剂,用于制造各种O/W乳剂。在本申请中,该术语与术语“聚氧乙烯鲸蜡硬脂基醚”可互换使用。

[0095] 聚氧乙烯鲸蜡硬脂基醚是鲸蜡硬脂醇的醚。鲸蜡硬脂醇(Cetostearyl alcohol、cetearyl alcohol或cetylstearyl alcohol)是脂肪醇的混合物,主要由鲸蜡基(16C)和硬脂基醇(18C)组成,被归类为脂肪醇。在本申请中,术语“聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚”与“由聚乙氧基乙烯鲸蜡基醚和聚乙氧基乙烯硬脂基醚组成的混合物”具有相同的含义。

[0096] 具体实例包括聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚(INCI:Ceteareth-12,CAS号:68439-49-6,Ph.Eur.:Macrogol鲸蜡硬脂基醚12)、聚乙氧基乙烯20鲸蜡硬脂基醚(Ceteareth-20,CAS号:68439-49-6,Macrogol鲸蜡硬脂基醚20)和聚乙氧基乙烯30鲸蜡硬脂基醚(Ceteareth-30,CAS号:68439-49-6)。

[0097] 聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚的HLB(亲水亲油平衡)值为14,且是以下组分的混合物:

[0098] • 聚乙氧基乙烯12鲸蜡基醚(鲸蜡基=C16):



[0100] 其 $n=12$ 。

[0101] • 聚乙氧基乙烯12硬脂基醚(硬脂基=C18):



[0103] 其 $n=12$ 。

[0104] 聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚有多种商业名称,例如Eumulgin® B 1、Kolliphor® CS12、Volpo® CS12、Cremophor® A25、Simulsol™或Brij CS12®。

[0105] 聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚可用于止汗剂和除臭剂,防晒产品(晒后、美黑、防晒),身体、染色和面部护理产品。它还用于婴儿护理和清洁、面部清洁、染发和调理配方。它还用作药用水包油乳剂的温和非离子乳化剂;在产品应用过程中提供良好的感官特性。

[0106] 聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚是佐剂AF03的组分,该佐剂包含:角鲨烯(注意:因此不是角鲨烷)、**Eumulgin®**B1(聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚)、Montane™ 80(山梨醇油酸酯)、甘露醇和磷酸盐缓冲盐水。

[0107] 本文中使用的“生育酚”是指具有维生素E活性的一类有机化合物。生育酚包括 α -生育酚(CAS号:10191-41-0)、 β -生育酚(CAS号:148-03-8)、 γ -生育酚(CAS号:54-28-4)和 δ -生育酚(CAS号:119-13-1)。

[0108] 生育酚(维生素E)的药学上可接受的酯类特别包括 α -生育酚乙酸酯,其也称为生育酚乙酸酯或维生素E乙酸酯,CAS号为58-95-7。 α -生育酚乙酸酯可从植物材料(例如种子、坚果、水果或叶子)或肥肉中提取,但也可以合成生产。因此,维生素E乙酸酯的定义包括天然、合成或半合成形式,或它们的混合物。维生素E乙酸酯是市售的,具有不同的纯度。

[0109] 根据本发明所述的佐剂组合物的 α -生育酚乙酸酯优选为DL- α -生育酚乙酸酯,其是CAS号为7695-91-2的化学品的的外消旋体。

[0110] 本文使用的术语“包含(comprising)”(及其变体例如“comprise”、“comprises”和“comprised”)是指被使用该术语的文本部分、段落、权利要求等所涵盖或包括在其中的本发明可以想到的所有元素以及任何可能的组合,即使这些元素或组合没有明确列出;并不表示排除任何此类元素或组合。因此,任何此类文本部分、段落、权利要求等也可以涉及一个或多个实施方式,其中术语“包含(comprises)”(或其变体)被诸如“由……组成(consist of/consisting of)”或“基本上由……组成”等术语所取代。

[0111] 佐剂组合物还可以包含药学上可接受的载剂。

[0112] 佐剂组合物可以与本文所述的疫苗组合物相同,但缺少抗原。

[0113] 本发明的“药学上可接受的载剂”是高纯度且优选无菌的水性液体,例如:水、生理盐水或磷酸盐缓冲盐溶液。载剂可包含其他添加剂,例如稳定剂或防腐剂。

[0114] 在本发明的佐剂组合物的优选实施方式中,所述聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚选自聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、聚乙氧基乙烯20鲸蜡硬脂基醚和聚乙氧基乙烯30鲸蜡硬脂基醚。更优选地,所述聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚为聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚。

[0115] 在本发明的佐剂组合物的另一实施方式中,所述药学上可接受的生育酚酯为 α -生育酚乙酸酯。

[0116] 在优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚和 α -生育酚乙酸酯。

[0117] 在优选实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物不含酯类表面活性剂,例如脂肪酸酯,特别是由糖醇或其衍生物和脂肪酸形成的酯,例如山梨醇酯或甘露醇酯。此类酯通常用作油基佐剂组合物中的表面活性剂。山梨醇酯也称为聚山梨酯、Tweens或Spans。酯的具体实例包括聚氧乙烯山梨醇单油酸酯(聚山梨酯80或**Tween®**80)、山梨醇单硬脂酸酯(Span 60)、山梨醇三硬脂酸酯(Span 65)、山梨醇单月桂酸酯(Span20)。其他实例包括十八烷酸和脱水甘露醇的酯(包含在Montanide ISA-206中)。

[0118] 优选地,根据本发明所述的疫苗组合物也不含脂肪酸酯。

[0119] 在另一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物还包含角鲨烷。

[0120] “角鲨烷”是一种众所周知的化合物,优选指具有CAS号111-01-3的化合物。一些替代名称是:氢化鲨鱼肝油、六甲基四烷或全氢化角鲨烯。不要将其与角鲨烯(CAS号111-02-

4) 混淆,角鲨烯是一种多不饱和C30油,可代谢为胆固醇途径的化合物。然而,角鲨烷是角鲨烯的完全氢化形式,因此不易氧化。因此,虽然角鲨烷是一种非矿物油,并且从注射部位运输,但它是不可代谢的。

[0121] 角鲨烷的前体最初是从鲨鱼肝脏中获得的,但出于环保考虑,它已转向其他天然来源,例如橄榄油,或化学合成。因此,角鲨烷的定义包括天然、合成或半合成形式,或它们的混合物。市售的角鲨烷有多种纯度,例如:来自植物来源,来自Worlee (Squalane,植物) 或Croda (Pripure Squalane);或合成,例如来自Kuraray (Squalane-PE)。对于本发明,优选高纯度的角鲨烷:优选纯度超过75%,更优选纯度超过80%、90%或甚至超过95%,按该优先顺序排列。

[0122] 在一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物还包含矿物油。

[0123] 适用于佐剂组合物的矿物油的实例包括,例如,Bayol™或Markol™、Montanide™或浅色(或白色)液体石蜡油,例如**Marcol®** 52 (Exxon Mobile) 或**Drakeol®** 6VR (Penreco) 或**Klearol®** (Sonneborn)。

[0124] 在一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物还包含非矿物油。

[0125] 非矿物油可以是合成的、动物的或植物来源的。对于用于本发明的佐剂组合物,非矿物油优选是可生物降解的(可代谢的)和生物相容的。适用于佐剂组合物的合成油的实例包括,例如,Shell **Ondina®**油,例如Shell Ondina X420。适用于佐剂组合物的动物油的实例包括,例如,鱼油。适合用于佐剂组合物的植物油的实例包括源自坚果、种子和谷物的油,例如花生油、大豆油、椰子油和橄榄油;荷荷巴油;红花油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油;玉米油,或其他谷物的油,例如小麦、燕麦、黑麦、大米、苔麸和小黑麦。

[0126] 在特别优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、 α -生育酚乙酸酯和角鲨烷。

[0127] 在另一个特别优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、 α -生育酚乙酸酯和非矿物油。优选地,非矿物油是合成油,例如基于Shell Ondina X GTL的药用白油。

[0128] 在另一个特别优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、 α -生育酚乙酸酯和矿物油。优选地,矿物油为轻质液体石蜡油。

[0129] 在一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物是水包油乳剂。

[0130] “水包油乳剂”是众所周知的组合物,其包含外部水相,所述外部水相包含内部分散的油相;对于本发明,分散相由油性佐剂(生育酚或其药学上可接受的酯)的液滴形成。

[0131] 通过选择适当种类和浓度的乳化剂,可以形成这样的乳剂。用于制备用作疫苗的水包油乳剂或油包水乳剂的程序和设备是本领域众所周知的,并且在本领域技术人员已知的手册中进行了描述。

[0132] “油相(oily phase)”(或“油相(oily phase)”)是基于油的液体。“油”在此处以其常见含义使用,是指疏水性和亲脂性、具有高碳氢化合物含量的非极性化学物质。油可以是矿物来源的,也可以是非矿物来源的,例如合成的、动物的或植物的。一些非矿物油是可代谢的。

[0133] 油相可以含有赋形剂,例如乳化剂。对于本发明,油相是分散相,这是O/W乳剂的典型特征。当配制成疫苗时,油相用作佐剂。兽医疫苗中常用的矿物油佐剂是轻质液体石蜡

油,例如**Marcol®** (Exxon Mobile)或**Drakeol®** (Penreco)。常见的非矿物油佐剂是角鲨烯和角鲨烷(鲨鱼肝油)以及生育酚(维生素E)。

[0134] “水相”是基于水的液体。水相可以包含例如缓冲液或盐水,以及一种或多种赋形剂,例如乳化剂或稳定剂。

[0135] 本发明佐剂组合物的分散相的颗粒大小优选非常小。当分散相的颗粒的平均直径低于约1微米时,这种乳剂通常称为“亚微米乳剂”。

[0136] 在本发明佐剂组合物的O/W乳剂的实施方式中,乳剂是亚微米乳剂。

[0137] 通常有测量1微米或更小的颗粒大小的设备,例如通过激光衍射测量。通常,颗粒大小以纳米(nm)表示,并且以平均颗粒大小(也称为中值直径)表示,以累积颗粒大小分布的D50表示。

[0138] 对于本发明,颗粒大小以D50的nm表示,使用Mastersizer™ (Malvern Instruments)确定。可以在构成佐剂组合物或疫苗组合物的(浓缩)油性乳剂中进行颗粒大小测量;本发明的油相的颗粒折射率为1.48。Malvern Mastersizer尺寸分析报告将D50显示为D(0.50)。

[0139] 有许多方法可以生产这种亚微米乳剂,通常使用高能乳化工艺,例如使用:高压均质机、转子-定子装置、搅拌器、超声波、微孔膜或微通道装置。

[0140] 用于制备根据本发明所述的佐剂组合物的高能乳化优选工艺是使用高压均质机,优选Microfluidiser™ (Microfluidics)。通常在500-1500bar(即7000-22000psi)的压力下进行1-3次就足够了。

[0141] 以这种方式制备的乳剂通常具有D50为500nm或更小的分散相颗粒,并且具有窄的尺寸分布。这种乳剂称为纳米乳剂。

[0142] 通常,具有这种非常细小的分散相颗粒的乳剂是在几个连续的步骤中制备的。这样,通过低能混合制备初始相对粗的油性乳剂,随后进行一次或多次高能处理以进一步减小颗粒大小。

[0143] 接下来,将包含水中佐剂和乳化剂的“微流化”油性乳剂与含有或不含有抗原的水相组合,以制备佐剂组合物,分别是根据本发明所述的疫苗组合物。

[0144] 因此,在根据本发明所述的佐剂组合物或疫苗组合物的水包亚微米油乳剂的实施方式中,油滴,即(乳剂)颗粒的D50为500nm或更小;优选地D50为250nm或更小。更优选地:D50为150nm或更小。特别优选地,乳剂颗粒的颗粒大小D50为约80至约200nm,更优选地为约40至约100nm。

[0145] 出于产品一致性和质量的原因,不仅可以监测和控制中值颗粒直径,还可以监测和控制颗粒大小分布,也称为大小分布。根据本发明所述的佐剂组合物或疫苗组合物的水包亚微米油乳剂中的油滴大小分布最好相对较窄。颗粒大小分布的指标是累积颗粒大小分布的D90。

[0146] 因此,在根据本发明所述的佐剂组合物或疫苗组合物的水包亚微米油乳剂的实施方式中,油滴的D90低于900nm,更优选地,D90低于500nm、400nm或甚至低于300nm,按该优先顺序排列。最优选的是:D90等于或小于约250nm。

[0147] 具有如此小的颗粒大小和分布的乳剂的优点之一是,可以通过过滤对其进行灭菌,而不会造成材料显著损失。这是因为典型的灭菌过滤器的孔大小约为0.2微米。这种过

滤灭菌克服了对可能损害油性乳剂成分质量的其他灭菌方法的需求,例如:加热、化学品或辐射。

[0148] 因此,在一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物或疫苗组合物包含颗粒大小D50为约80至约200nm、优选约40至约100nm的乳剂颗粒。

[0149] 在根据本发明所述的佐剂组合物中,聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚乳化剂以基于佐剂组合物重量的约1至约9重量%(w/w)的量存在。优选地,聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚以佐剂组合物的约2至约7重量%的量存在。

[0150] 在特别优选的实施方式中,聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚以佐剂组合物的约6至约7重量%的量存在。

[0151] 在另一个特别优选的实施方式中,聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚以佐剂组合物的约2至约4重量%的量存在。

[0152] 对于本发明,“约”表示数字可以在其显示值 $\pm 25\%$ 之间变化。优选地,“约”表示在其值 $\pm 20\%$ 之间变化,更优选地,“约”表示在其值 $\pm 15\%$ 、 12% 、 10% 、 8% 、 6% 、 5% 、 4% 、 3% 、 2% 之间变化,或者甚至“约”表示在其值 $\pm 1\%$ 之间变化,按该优先顺序排列。

[0153] 在根据本发明所述的佐剂组合物中,生育酚或其药学上可接受的酯以佐剂组合物重量的约1%至约20%的量存在。优选地,生育酚或其药学上可接受的酯以佐剂组合物的约6%至约16%w/w的量存在。

[0154] 在特别优选的实施方式中,生育酚或其药学上可接受的酯以佐剂组合物的约14%至约16%w/w的量存在。

[0155] 在另一个特别优选的实施方式中,生育酚或其药学上可接受的酯以佐剂组合物的约2至约8%w/w的量存在。最优选的是:生育酚或其药学上可接受的酯特别是 α -生育酚乙酸酯以佐剂组合物的约15%w/w的量存在。

[0156] 在根据本发明所述的佐剂组合物中,角鲨烷以基于佐剂组合物重量的约5至约20%重量的量存在。优选地,角鲨烷以佐剂组合物的约6至约15%w/w的量存在。在特别优选的实施方式中,角鲨烷以佐剂组合物的约13至约14%w/w的量存在。

[0157] 在根据本发明所述的佐剂组合物中,矿物油以佐剂组合物重量的约5至约40重量%的量存在。在特别优选的实施方式中,矿物油以佐剂组合物重量的约6至约7重量%的量存在。

[0158] 在另一个特别优选的实施方式中,矿物油以佐剂组合物重量的约30至约40重量%的量存在,优选地以佐剂组合物重量的约35重量%的量存在。

[0159] 在根据本发明所述的佐剂组合物中,非矿物油以佐剂组合物重量的约5至约40重量%的量存在。在特别优选的实施方式中,非矿物油以佐剂组合物重量的约6至约7重量%的量存在。

[0160] 在另一个特别优选的实施方式中,非矿物油以佐剂组合物的约30至约40%w/v、优选地约35%w/v的量存在。

[0161] 根据本发明所述的佐剂组合物可以制备成浓缩物。所述浓缩物可以是例如2x w/v浓缩物,这意味着浓缩物占疫苗最终体积的50%。类似地,如果浓缩物是例如4x w/w浓缩物,则这意味着浓缩物占最终疫苗重量的25%,依此类推。

[0162] 在特别优选的实施方式中,佐剂组合物包含约5至约7%w/w、优选地约6%w/w的聚

乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚,以及约14至约16%w/w、优选地约15%w/w的 α -生育酚乙酸酯。本文中,该佐剂组合物称为Fortasol-E。Fortasol-E是最终疫苗的2x w/v浓缩物,这意味着浓缩物占最终疫苗体积的50%。Fortasol-E制剂是纳米乳剂。

[0163] 在特别优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含约6至约7%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约15至约16%w/w的 α -生育酚乙酸酯和约13至约14%w/w的角鲨烷。本文中,该佐剂组合物称为SVEA-E。SVEA-E是4x w/v浓缩物,占最终疫苗体积的25%。SVEA-E佐剂组合物是纳米乳剂。

[0164] 在另一优选实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含约3至约4%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约7至约8%w/w的 α -生育酚乙酸酯和约6至约7%w/w的非矿物油。本文中,该佐剂组合物称为EV0420。EV0420是2x w/v浓缩物,占最终疫苗体积的50%。EV0420佐剂组合物是纳米乳剂。

[0165] 令人惊讶的是,根据本发明所述的包含SVEA-E佐剂组合物并且还包含PCV2的0rf2抗原和Mhyo的粗制菌苗抗原的疫苗组合物即使在4℃下27个月后仍保持稳定。发现具有SVEA-E并且包含FMDV空衣壳作为抗原的类似疫苗组合物在4℃下可稳定长达8个月。

[0166] 在实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物还包含二氧化硅。

[0167] 优选地,二氧化硅是“气相二氧化硅”;更优选地,气相二氧化硅以佐剂组合物的约0.3%w/w至约0.5%w/w的量存在,更优选地,气相二氧化硅以佐剂组合物的约0.4%w/w的量存在。

[0168] 本文使用的“气相二氧化硅”是指平均颗粒大小为约6至约13nm的二氧化硅。气相二氧化硅的商品名为Aerosil 380(平均颗粒大小为7nm)。药用级气相二氧化硅的商品名为Aerosil 300(平均颗粒大小为7nm,与Aerosil 380相比,表面积较小)或Aerosil 200(平均颗粒大小为12nm)。

[0169] 在另一优选实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含约6至约7%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约15至约17%w/w的 α -生育酚乙酸酯、约13至约14%w/w的角鲨烷以及约0.3至0.5%w/w的气相二氧化硅。本文中,该佐剂组合物称为SVEA-E double plus。SVEA-E double plus是2x w/w浓缩物,占最终疫苗重量的50%。SVEA-E double plus佐剂组合物是纳米乳剂。

[0170] 在另一优选实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物仅包含SVEA-E组合物的乳化剂量的三分之一,即约2至约2.3%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚。在此,该佐剂组合物被称为microSVEA-E。microSVEA-E佐剂组合物具有微米范围内的乳化颗粒,因此代表微乳剂。

[0171] 类似地,microSVEA-E double plus仅包含SVEA-E double plus组合物的乳化剂量的三分之一,即约2至约2.3%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚。在此,该佐剂组合物被称为microSVEA-E double plus。microSVEA-E double plus佐剂组合物具有微米范围内的乳化颗粒,因此代表微乳剂。

[0172] 在一个特别优选的实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物包含约2至约3%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚,约2至约3%w/w的 α -生育酚乙酸酯,和约30至约40%w/v、优选地约35%的非矿物油。本文中,该佐剂组合物称为Xsolve2.0。Xsolve2.0佐剂组合物是纳米乳剂。

[0173] 根据本发明所述的佐剂组合物可用于配制乳剂疫苗,例如本发明的疫苗组合物。

[0174] 对于本发明,“配制”是指通过将包含一种或多种本文所述抗原的水相与根据本发明所述的佐剂组合物混合来制备本发明的疫苗组合物。

[0175] 本发明的佐剂组合物可用于配制非活疫苗,例如本发明的疫苗组合物包含本文所述的非活抗原。

[0176] 在一个实施方式中,根据本发明所述的佐剂组合物不包含(即不含)易受本发明所定义的粗细菌或寄生虫抗原降解的乳化剂;优选易受本文所定义的酯酶或脂肪酶降解的乳化剂。更优选地,乳剂不包含基于山梨酸酯的乳化剂,或甚至:不包含聚山梨酸酯;甚至更优选:不包含聚山梨酸酯和脱水山梨醇单油酸酯。

[0177] 在另一方面,本发明涉及一种疫苗组合物,其包含根据本发明所述的佐剂组合物和抗原。

[0178] “抗原”是能够在目标人或动物中诱导免疫反应的物质,可能借助于免疫刺激化合物,例如佐剂。抗原可以合成制备,也可以来自生物来源,例如它们可以是微生物(可复制或不可复制),也可以是其一部分,例如蛋白质、脂质、碳水化合物或核酸,或它们的组合,例如:肽聚糖、脂聚糖、脂肽或脂多糖等。

[0179] 对于本发明,非活(非复制)抗原涉及分子,例如蛋白质、碳水化合物、脂质或核酸,或它们的复杂组合,纯度或多或少。当由微生物制备时,非活抗原可以指已杀死的(即非复制性)微生物,或者可以是其一部分,例如提取物、级分、匀浆或超声处理物。非活抗原也可以是基于核酸的或重组产物,例如表达载体或表达的蛋白质,或体外表达系统的产物。所有这些都是本领域众所周知的。

[0180] “活”抗原是指适合用作疫苗成分的活的(即复制性)细菌、寄生虫或病毒,即具有降低的病原性水平,也称为减毒或改良活体。

[0181] 如本文所用,“减毒”定义为引起较低水平的病变和/或具有降低的感染率或复制率。与未改良或“野生型”细菌、寄生虫或病毒相比,所有这些。

[0182] 微生物的减毒可在体外实现,例如通过实验动物传代或细胞培养和选择,或通过重组DNA技术,这些技术在本领域中都是众所周知的。

[0183] 虽然将病毒称为“活的”在生物学上是不正确的,但这是指可复制且未灭活的病毒的常用方式。因此,对于本发明而言,与病毒相关的术语“活的”是指能够在适当条件下复制的病毒,例如在合适的宿主细胞或动物中。

[0184] 根据本发明所述的疫苗组合物包含细菌、寄生虫和/或病毒的抗原。抗原优选为非活抗原。可选地,疫苗组合物可以包含一种或多种其他抗原,例如来自细菌、寄生虫、病毒、真菌、外寄生虫等。其他抗原可以是活的或非活的。

[0185] 因此,在根据本发明所述的疫苗组合物的优选实施方式中,疫苗组合物包含一种或多种抗原,所述抗原选自细菌、寄生虫和病毒的非活抗原。优选地,疫苗组合物包含多个(两个或更多个)抗原,更优选地两个或更多个细菌抗原。

[0186] “细菌抗原”是衍生自、基于或从细菌获得的抗原。对于本发明,细菌是目前分类为细菌超界的原核微生物。

[0187] “寄生虫抗原”是衍生自、基于或从寄生虫获得的抗原。对于本发明,寄生虫是真核微生物;例如目前分类为顶复门或线虫门。

[0188] 外寄生虫是例如苍蝇、跳蚤、螨虫或蜱虫。

[0189] 真菌是例如曲霉菌。

[0190] “病毒抗原”是源自、基于或从病毒获得的抗原。本发明疫苗组合物中包含的抗原源自对疫苗要保护免受感染和/或疾病的目标物种具有病原性的微生物。

[0191] 对猪动物具有病原性的微生物的实例有：

[0192] 病毒：猪圆环病毒2型、猪细小病毒、非洲猪瘟病毒、猪流感病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪巨细胞病毒、猪轮状病毒、猪痘病毒、猪生殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪流感病毒、口蹄疫病毒、猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒和水泡性口炎病毒。

[0193] 细菌：支原体、劳森氏菌、大肠杆菌、短螺旋体、链球菌、沙门氏菌、梭状芽孢杆菌、放线杆菌、巴氏杆菌、嗜血杆菌、丹毒丝菌、钩端螺旋体、伯克霍尔德氏菌、肠球菌、分枝杆菌和博德特氏菌。

[0194] 寄生虫：弓形虫、等孢子虫和旋毛虫。

[0195] 对反刍动物有病原性的微生物实例有：

[0196] 对于牛：新孢子虫、网尾丝虫、隐孢子虫、奥斯特氏线虫、牛轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛冠状病毒、传染性牛鼻气管炎病毒 (牛疱疹病毒1型)、牛副粘液病毒、牛副流感病毒、牛呼吸道合胞病毒、狂犬病毒、蓝舌病病毒、大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌、链球菌、分枝杆菌、布鲁氏菌、梭状芽孢杆菌、巴氏杆菌、曼氏耶尔森菌、嗜血杆菌、钩端螺旋体、芽孢杆菌、莫拉氏菌、弗朗西斯氏菌、嗜组织杆菌、真隐孢子虫、梭杆菌。放线菌、柯克斯体、弯曲杆菌、丹毒丝菌、李斯特菌、伯克霍尔德菌、诺卡氏菌、支原体、拟杆菌和衣原体。

[0197] 对于绵羊和山羊：弓形虫、小反刍动物瘟疫病毒、蓝舌病病毒、施马伦贝格病毒、分枝杆菌、布鲁氏菌、梭状芽孢杆菌、柯克斯体、大肠杆菌、衣原体、梭状芽孢杆菌、巴氏杆菌和曼海姆氏菌。

[0198] 对于鹿：流行性出血病病毒、蓝舌病病毒、乳头瘤病毒、伯氏疏螺旋体、牛分枝杆菌和化脓性隐孢子虫。

[0199] 特别有利的是，根据本发明所述的疫苗组合物可以包含细菌或寄生虫抗原的粗制剂。由于本发明的佐剂组合物的成分具有乳化稳定作用，因此不需要复杂且昂贵的细菌和/或寄生虫抗原纯化。

[0200] 术语“粗”是指本文所用的细菌、寄生虫或病毒的抗原，其制备无需太多 (或任何) 进一步纯化，从体外培养物中收获，并灭活和/或裂解或破坏。此类粗抗原制剂仍含有未定义或非预期的杂质，这些杂质会影响基于油和水乳剂的疫苗的稳定性的。

[0201] 根据本发明所述的疫苗组合物中所含的抗原通常包含在液体中，例如水性缓冲液。

[0202] 如所述，本发明的有利效果特别适用于将此类疫苗组合物用于农业领域。

[0203] 根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中，抗原是非活细菌抗原；优选地，非活细菌抗原是在灭活的全细菌培养物 (即菌苗)，或为此类培养物的一部分。

[0204] 优选地，灭活的全细菌培养物的部分选自：沉淀物、上清液、浓缩物、透析液、提取物、超声处理物、裂解物、和这种培养物的级分。

[0205] “细菌培养物”或“其一部分”的构成对本领域技术人员来说是众所周知的，并在手

册和指南(例如“Veterinary vaccinology”(同上))中进行了描述。对于本发明,灭活的细菌培养物要么作为整体使用,即作为特定培养容器的完整内容物,要么作为其一部分使用。

[0206] 制备这种灭活培养物或制备其一部分的方法和材料通常是已知的,并且可以以任何规模获得。例如:可以使用化学或物理方法灭活细菌;物理方法例如加热、辐射或非常高的压力;化学方法例如与硫柳汞、福尔马林、二乙胺、二元乙烯胺、 β -丙内酯、苯扎氯铵或戊二醛一起孵育。

[0207] 可以通过离心制备上清液或沉淀物。

[0208] 可以通过例如交叉流过滤方法制备浓缩物或透析液。

[0209] 提取物可以通过例如用溶剂或洗涤剂溶液洗涤或孵育来制备;溶剂可以是液体或气体,液体可以是例如水性的,例如水或缓冲液;有机溶剂,例如酒精、丙酮或乙醚;或者可以是超临界液体等。提取物是随溶剂去除的部分,通常在后续过程中从该溶剂中回收。

[0210] 可以使用超声处理装置(例如流通式超声处理单元)制备超声产物。

[0211] 可以通过物理或(生物)化学方法制备裂解物,例如使用法式压榨机或使用酶处理。

[0212] 级分是从其余部分纯化的整体的一部分,例如滤液或沉淀物,其中级分是滞留物。

[0213] 最常用于农业用途的细菌疫苗是一种非活细菌抗原,其包含灭活的细菌细胞。通常,这种灭活细菌细胞的抗原制剂称为菌苗。

[0214] 灭活的细菌细胞可以是任何形式,可以是完整的,也可以是受损的。灭活的细菌细胞可以是任何纯度的,例如可以带有发酵时的细菌培养基,也可以不带有培养基,例如通过沉淀、离心或浓缩而得到。

[0215] 因此,在根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中,非活细菌抗原包含灭活细菌细胞。

[0216] 制备非活抗原的细菌可以是任何与人类医学和/或兽医相关的细菌,例如任何作为原发性或次级(机会性)病原体的(潜在)病原体的细菌。

[0217] 例如,合适的细菌抗原包括胸膜肺炎放线杆菌、猪肺炎支原体(Mhyo)、细胞内劳森氏菌、猪红斑丹毒丝菌和钩端螺旋体,或其中任何一种的一部分,单独或以任何组合形式。

[0218] 显然,也可以制备和使用来自两种或多种细菌的非活细菌抗原的组合。此外,需要与来自病毒或寄生虫病原体的抗原的组合。

[0219] 细菌抗原优选为如本文所述的粗抗原;更优选地,粗细菌抗原是来自Mhyo或L.intracellularis的菌苗。

[0220] 对于本发明,病毒抗原优选源自病毒和宿主细胞的体外培养物;病毒可以从培养上清液、沉淀物中获得,或者可以包含在宿主细胞中。已知多种致病病毒与兽医学相关。

[0221] 示例性病毒抗原包括PCV2、PRRSV和FMDV,或其中任何一种的一部分,单独或以任何组合形式。

[0222] 根据本发明所述的抗原还可以通过重组载体包含在本发明的疫苗组合物中;这种载体可以是核酸或复制子颗粒(RP);核酸优选为真核表达质粒或RNA分子;RP优选为甲病毒RP。

[0223] 根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中,抗原包含病毒抗原。优选的是,病毒抗原包含FMDV,优选为FMDV的非活抗原,例如重组表达的FMDV病毒样颗粒。FMDV抗原特别优

选是重组表达的FMDV空衣壳。

[0224] 根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中,非活抗原选自猪圆环病毒2型、肺炎支原体和口蹄疫病毒中的一种或多种。优选地,可以包含一种或多种其他非活抗原,所述其他非活抗原选自PRRSV或细胞内劳森氏菌。

[0225] “疫苗”是一种具有医疗效果的公知组合物,且包含免疫活性成分和药学上可接受的载剂。本发明的“载剂”由水相或本发明的佐剂组合物本身组成。本发明的“免疫活性成分”是来自细菌、寄生虫或病毒的抗原,或来自一种或多种微生物的抗原的组合。

[0226] 根据本发明所述的疫苗组合物刺激目标人或动物的免疫系统,并诱导保护性免疫反应。该反应可能源自目标的先天和/或后天免疫系统,可能是细胞和/或体液类型。

[0227] 疫苗通过降低接种疫苗对象的感染严重程度来提供“针对感染和/或疾病”的保护,例如通过减少病原体的数量,或缩短病原体在对象体内复制的持续时间,以及减少由病原体感染引起的病变的数量、强度或严重程度。此外,或因此,疫苗可有效减少或改善由此类感染或复制引起的疾病的(临床)症状,或由目标对该感染或复制的反应引起的疾病。此类疾病和临床症状的参考文献是:“*The Merck veterinary manual*”(同上)。这种疫苗通俗地称为:针对特定病原体的疫苗,例如“Mhyo疫苗”或“FMDV疫苗”。

[0228] 为了具有免疫学效果,疫苗需要含有足够量的抗原。抗原的含量,要么已经从相关疫苗中得知,要么可以很容易地确定,例如通过监测接种疫苗后的免疫反应和(在动物目标的情况下)攻击感染,例如通过监测目标的疾病迹象、临床评分或通过重新分离病原体,并将这些结果与在模拟接种动物中观察到的疫苗攻击反应进行比较。

[0229] 根据本发明所述的疫苗组合物的细菌、寄生虫或病毒抗原的量可以以不同的方式表示,这取决于所用抗原的类型。例如,抗原剂量可以表示为细菌细胞、寄生虫或病毒体的数量,在它们灭活之前计数。或者,可以通过血清学或生物化学测试(例如ELISA或AlphaLisa™)对抗原进行量化,并以相对单位表示,与适当的参照标准进行比较。所有这些都是本领域众所周知的。

[0230] 根据本发明所述的疫苗组合物可用作预防性、后预防性或治疗性治疗。

[0231] 根据本发明所述的疫苗组合物可用作有效的初次接种疫苗,随后可采用相同或不同的疫苗进行加强接种并加以放大。

[0232] 根据本发明所述的疫苗组合物还可包含其他化合物,例如额外的抗原或微生物、细胞因子或包含未甲基化CpG的免疫刺激性核酸等。或者,根据本发明所述的疫苗组合物本身可添加到疫苗中。

[0233] 如上所述,根据本发明所述的疫苗组合物在畜牧业领域具有特别的意义。

[0234] 因此,对于不同的动物目标组,根据本发明所述的非活细菌抗原源自细菌家族,例如:

[0235] -对于反刍动物的疫苗接种,细菌选自以下之一:巴氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、耶尔森氏菌、葡萄球菌、链球菌、分枝杆菌、莫拉氏菌、芽孢杆菌、布鲁氏菌、梭状芽孢杆菌、曼海姆氏菌、嗜血杆菌、弗朗西斯氏菌、梭杆菌、嗜组织杆菌、梭杆菌、隐秘杆菌(隐秘杆菌)、放线菌、梭状芽孢杆菌、柯克斯体、弯曲杆菌、丹毒丝菌、钩端螺旋体、李斯特菌、伯克霍尔德菌、诺卡氏菌、支原体、拟杆菌和衣原体。

[0236] -对于猪的疫苗接种,细菌选自以下之一:支原体、劳森氏菌、大肠杆菌、短螺旋体、

链球菌、沙门氏菌、梭菌、放线杆菌、巴氏杆菌、嗜血杆菌、丹毒丝菌、钩端螺旋体、伯克霍尔德菌、肠球菌、分枝杆菌和博德特氏菌。

[0237] 在根据本发明所述的疫苗组合物的甚至更优选的实施方式中,非活抗原来自猪圆环病毒2型、猪肺炎支原体和/或口蹄疫病毒。

[0238] 本领域技术人员完全可以进一步优化根据本发明所述的疫苗组合物。通常,这涉及对疫苗的效力进行微调以进一步改善其提供的免疫保护。这可以通过调整疫苗的剂量、体积、佐剂或抗原含量,或通过不同的途径、方法或方案应用来实现。这些均在本发明的保护范围内。

[0239] 在根据本发明所述的疫苗组合物中,乳化剂以疫苗组合物体积的约1至约5% (w/v) 的量存在。优选地,乳化剂以疫苗组合物的约1至约4% w/v 的量存在。在特别优选的实施方式中,乳化剂以疫苗组合物的约1至约2% w/v 的量存在。在另一个特别优选的实施方式中,乳化剂以疫苗组合物的约2至约3% w/v 的量存在。在另一个特别优选的实施方式中,乳化剂以疫苗组合物的约3至约4% w/v 的量存在。在另一个特别优选的实施方式中,乳化剂以疫苗组合物的约0.3至约1.2% w/v 的量存在。

[0240] 在根据本发明所述的疫苗组合物中,生育酚或其药学上可接受的酯以疫苗组合物体积的约2至约9重量% 的量存在。优选地,生育酚或其药学上可接受的酯以疫苗组合物的约3至约8重量% 的量存在。在特别优选的实施方式中,生育酚或其药学上可接受的酯以疫苗组合物的约2至约3重量% 的量存在。在另一个特别优选的实施方式中,生育酚或其药学上可接受的酯以疫苗组合物的约3至约4重量% 的量存在。在另一个特别优选的实施方式中,生育酚或其药学上可接受的酯以疫苗组合物的约7至约8重量% 的量存在。

[0241] 在根据本发明所述的疫苗组合物中,角鲨烷以疫苗组合物体积的约3至约7重量% 的量存在。优选地,角鲨烷以疫苗组合物的约3至约4% w/v 的量存在。还优选地,角鲨烷以疫苗组合物的约6至约7% w/v 的量存在。

[0242] 在根据本发明所述的疫苗组合物中,矿物油以疫苗组合物体积的约3至约40% (重量) 的量存在。在优选的实施方式中,矿物油以疫苗组合物的约3至约4% (重量) 的量存在。在另一优选的实施方式中,矿物油以疫苗组合物的约30至约40% (重量)、优选地疫苗组合物的约35% (重量) 的量存在。

[0243] 在根据本发明所述的疫苗组合物中,非矿物油以疫苗组合物体积的约3至约40% (重量) 的量存在。在优选的实施方式中,非矿物油以疫苗组合物的约3至约4% (重量) 的量存在。在另一个优选的实施方式中,非矿物油以疫苗组合物的约30% 至约40% w/v、优选地疫苗组合物的约35% w/v 的量存在。

[0244] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于Fortasol-E佐剂组合物,并且包含约5至约7% w/v、优选约6% w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚,以及约14至约16% w/v、优选约15% w/v的 α -生育酚乙酸酯。基于Fortasol-E佐剂组合物的疫苗组合物的密度为约0.9至约1.1g/ml、优选约0.9至约1.0g/ml。

[0245] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于SVEA-E佐剂组合物,并且包含约1至约2% w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约3至约4% w/v的 α -生育酚乙酸酯和约3至约4% w/v的角鲨烷。基于SVEA-E佐剂组合物的疫苗组合物的密度约为0.9至约1.1g/ml,优选约为0.9至约1.0g/ml。

[0246] 基于SVEA-E double plus佐剂组合物的疫苗特别适合皮内施用,例如通过IDAL®装置,特别是用于对猪进行皮内施用。

[0247] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于EV0420佐剂组合物,并且包含约1至约2%w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约3至约4%w/v的 α -生育酚乙酸酯和约3至约4%w/v的角鲨烷。基于EV0420佐剂组合物的疫苗组合物的密度约为0.9至约1.1g/ml,优选约为0.9至约1.0g/ml。

[0248] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于SVEA-E double plus佐剂组合物,并且包含约3至约4%w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约7至约8%w/v的 α -生育酚乙酸酯、约6至约7%w/v的角鲨烷和约0.1至0.3%w/v的气相二氧化硅。基于SVEA-E double plus佐剂组合物的疫苗组合物的密度为约0.9至约1.1g/ml,优选约0.9至约1.0g/ml。

[0249] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于microSVEA-E佐剂组合物,包含约0.3至约0.7%w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约3至约4%w/v的 α -生育酚乙酸酯和约3至约4%w/v的角鲨烷。基于microSVEA-E佐剂组合物的疫苗组合物的密度为约0.9至约1.1g/ml,优选约0.9至约1.0g/ml。

[0250] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于microSVEA-E double plus佐剂组合物,并且包含约0.8至约1.2%w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚、约7至约8%w/v的 α -生育酚乙酸酯、约6至约7%w/v的角鲨烷和约0.1至0.3%w/v的气相二氧化硅。基于microSVEA-E double plus佐剂组合物的疫苗组合物的密度为约0.9至约1.1g/ml,优选约0.9至约1.0g/ml。

[0251] 基于microSVEA-E或microSVEA-E double plus作为根据本发明所述的佐剂组合物的根据本发明所述的疫苗组合物特别适合肌内施用。

[0252] 因此,基于microSVEA-E或microSVEA-E double plus的疫苗组合物均为微乳剂,因此这些疫苗组合物在乳剂中具有微米范围内的分散颗粒。然而,令人惊讶的是,这些疫苗组合物没有表现出任何稳定性问题,例如乳剂破裂。因此,使用microSVEA-E或microSVEA-E double微乳剂佐剂组合物可以获得具有微米范围内的较大乳剂颗粒的疫苗组合物,但其安全性良好且没有稳定性问题。这可以有利地用于预防某些病原体 and 疾病,因为与纳米乳剂疫苗相比,分散颗粒较大的疫苗可以诱导不同(即更少Th1导向)类型的免疫反应

[0253] 在特别优选的实施方式中,疫苗组合物基于Xsolve2.0佐剂组合物,并且包含约2至约3%w/w的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚,约2至约3%w/w的 α -生育酚乙酸酯,和约30至约40%w/v、优选约35%的非矿物油。基于Xsolve 2.0佐剂组合物的疫苗组合物的密度为约0.9至约1.1g/ml,优选约0.9至约1.0g/ml。

[0254] 在实施方式中,疫苗组合物具有高有效载荷抗原。总抗原浓度优选占疫苗组合物的至少20%v/v,优选至少25%v/v,更优选至少30%v/v。

[0255] 根据本发明所述的疫苗组合物优选是乳剂疫苗。

[0256] 根据本发明所述的疫苗组合物在制备成水包油乳剂时被发现非常有效、安全和稳定。

[0257] 因此,在优选实施方式中,根据本发明所述的疫苗组合物是水包油乳剂疫苗。

[0258] 如果根据本发明所述的疫苗组合物是水包油乳剂疫苗,则可以使用低剪切混合技术将水性抗原与佐剂组合物组合,因为佐剂组合物本身已经乳化,可能涉及高剪切混合。

[0259] 优选的是,外部水相包含药学上可接受的载剂中的抗原;油相包含 α -生育酚乙酸酯和可选的角鲨烷作为油性佐剂。

[0260] 根据本发明所述的O/W乳剂本身可用于配制另一种乳剂,例如W/O/W或O/W/O乳剂。这可能需要使用额外的乳化剂。选择和优化此类条件属于本领域技术人员的能力范围。

[0261] 如上所述,令人惊讶地发现,根据本发明所述的佐剂组合物适用于配制包含粗抗原的疫苗,即来自例如灭活的细菌或寄生虫培养物或来自此类培养物的提取物或级分的少量纯化抗原。

[0262] 因此,根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中,抗原包含粗抗原。

[0263] 由于不需要对细菌和/或寄生虫抗原进行复杂且昂贵的纯化,因此根据本发明所述的疫苗组合物具有成本效益。此外,观察到批次间差异减少,以及根据本发明所述的组合物适合大规模生产。

[0264] 此外,由于根据本发明所述的佐剂组合物的特性,它特别适用于与抗原结合,特别是非活细菌或寄生虫抗原,这些抗原含有具有酯酶活性的酶;此类抗原可使现有技术的油相和水相乳剂中使用的乳化剂变质,导致乳剂破裂。

[0265] 因此,根据本发明所述的疫苗组合物的实施方式中,抗原包括酯酶,优选脂肪酶。

[0266] 如本文所用,术语“酯酶”是指具有酯酶活性的酶,具体指酯酶和脂肪酶。此类酶在IUBMB(International Union of Biochemistry and Molecular Biology)酶分类系统中分别以EC 3.1.1.1或EC 3.1.1.3为特征。

[0267] 对于本发明而言,确定抗原是否“包含酯酶”的测试是指酯酶活性测试,其存在于各种形式和类型的测定中,并且可商购获得。

[0268] 酯酶活性的直接检测是通过分光光度测定,通过检测活性酯酶从对硝基苯酯中释放硝基苯酚时产生的黄色着色。De Yan等的论文(2013,Biotechn.&Appl.Biochem.,第60卷,第343-347页)在其参考文献2-16中列出了此类测定的几种变体。所有这些都是De Caro等(1986,Eur.J.of Biochem.,第158卷,第601-607页)描述的基本测定的变体。

[0269] 对于本发明,为了确定抗原是否包含酯酶,根据De Caro等(同上)进行检测测试,使用对硝基苯丁酸酯作为底物。技术人员完全有能力设置和执行此类测试。

[0270] 抗原中任何水平的酯酶活性都可能对现有技术乳剂的稳定性造成损害,尤其是在长期储存时。因此,基于适当的正参照标准和负参照标准,任何可检测水平的酯酶活性的存在都使抗原有资格成为本发明的“含有酯酶”。

[0271] 根据本发明所述的佐剂组合物,特别是包含所述佐剂组合物与抗原组合的疫苗组合物,令人惊讶地表现出几个进一步的好处。

[0272] 特别是,虽然很难找到一种在各个物种中都有效的佐剂,但根据本发明所述的佐剂组合物和疫苗组合物都成功地用于猪和反刍动物;优选用于猪、牛、绵羊和山羊。

[0273] 此外,佐剂组合物和由此衍生的疫苗组合物相对容易施用,因为与现有技术的佐剂组合物相比,其密度较低。优选地,佐剂的密度为约0.9至约1.1g/ml,优选约0.9至约1.0g/ml。

[0274] 此外,佐剂组合物和由此得到的疫苗组合物是安全的,因为没有观察到严重的不良事件。

[0275] 作为O/W乳剂的有利特征,可以测定本发明疫苗组合物中的抗原含量,而无需在

ELISA板中直接破坏疫苗组合物。

[0276] 与现有技术组合物相比,包含高抗原量的疫苗组合物(例如多价疫苗或组合疫苗)要稳定得多。

[0277] 与现有技术组合物(例如在32℃以上发生相变的Montanide ISA206)相比,佐剂组合物和由此得到的疫苗组合物可以耐受更高的温度。

[0278] 非常令人惊讶的是,根据本发明所述的疫苗组合物提供了快速的免疫起效(00I)。

[0279] 更令人惊讶的是,根据本发明所述的疫苗组合物提供了更长的免疫持续时间(DOI)。

[0280] 可以使用众所周知的方法和材料制备本发明的疫苗组合物。这些程序的细节将取决于要制备的乳剂的类型。例如,作为O/W乳剂,油相和水相(不含抗原)的乳化可以单独进行(例如,以构成根据本发明所述的佐剂组合物),然后混合抗原以制备根据本发明所述的乳剂疫苗。

[0281] 有时,在制备佐剂组合物期间可能需要加热,例如加热至70-90℃,以使乳化剂完全溶解。需要时,可以在油相和/或水相中包含其他乳化剂。通常,可以使用合适的设备(例如通过超声波或转子-定子型混合)乳化水相和油相。

[0282] 发明人还发现,根据本发明所述的佐剂组合物的聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚出人意料地溶解在油相中。对于高HLB值的乳化剂(例如聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚的HLB为14),这是出乎意料的,尤其是因为具有几乎相同HLB值(15)的聚山梨酯80不能很好地溶解在油相中。

[0283] 现在,这允许采用需要较低剪切和较少功率输入的乳化方法,从而带来各种节约和操作优势。

[0284] 或者,为了制造O/W型乳剂,其中抗原通常在油相、乳化剂 and 水的初始乳化过程中不存在,使用高浓度的水和油相乳化仍然是另一种选择,例如通过使用微流化。

[0285] 因此,在另一方面,本发明涉及一种用于制备根据本发明所述的疫苗组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0286] a) 制备包含抗原的水相,和

[0287] b) 将所述水相与根据本发明所述的佐剂组合物混合。

[0288] 对于根据本发明所述的用于制备疫苗的方法,水相、油相、佐剂组合物和抗原中的每一个如本文所定义。

[0289] 在替代实施方式中,可以制备包含抗原和乳化剂(即聚乙氧基乙烯鲸蜡硬脂基醚)的水相。单独地制备油相(包含生育酚或其药学上可接受的酯,以及可选地角鲨烷、矿物油和/或非矿物油),然后将两相混合以获得根据本发明所述的疫苗组合物。

[0290] 优选地,以允许疫苗组合物用于医疗用途的方式进行根据本发明所述的制备方法。通常,这涉及使用药学上可接受的设备和赋形剂,并遵守质量法规,例如良好生产规范标准。所有这些都是技术人员所熟知的,并且在政府法规(例如药典(Pharmacopoeia))和手册(例如:Remington和Pastoret(均同上))中规定。通常,这种制造是在无菌条件下进行的。

[0291] 如上所述,根据本发明所述的疫苗组合物在用作针对细菌、寄生虫和/或病毒疾病的疫苗时特别有利,所有这些都如本文所述。

[0292] 因此,在另一方面,本发明涉及根据本发明所述地疫苗组合物,其用于保护人或动

物目标免受病原体引起的感染和/或疾病的方法中。

[0293] 根据本发明所述的保护方法的目标的选择主要取决于要保护的病原体的宿主范围：针对人、针对动物或针对两者。或者，病原体可能对人具有病原性，但对携带病原体的动物则无病原性。在这种情况下，应用动物疫苗接种可能仍然有意义，以防止食用受感染的动物产品（例如肉或牛奶）的人的人畜共患感染和食源性疾病。

[0294] 要接种疫苗的目标的年龄、体重、性别、免疫状态和其他参数并不重要，但显然最好给健康、未感染的目标接种疫苗，并尽早接种疫苗。

[0295] 根据本发明所述的“动物”是任何与兽医相关的动物，例如牛、猪、山羊、绵羊、鹿、犬科动物、猫科动物、马、鸟类、鱼或虾。

[0296] 根据本发明所述的用于保护方法中的疫苗组合物的实施方式中，动物目标是猪或反刍动物。

[0297] 术语“猪”是指猪科动物，优选是指猪属动物，也被称为猪。例如：野猪或家猪、猪、野猪、鹿豚或疣猪。这还包括用任意名称表示的猪，例如指其性别或年龄，例如：母猪 (sow/queen)、野猪、barrow、阉公猪 (hog)、小母猪 (gilt)、断奶猪 (weaner) 或仔猪。此外，术语“猪”是指任何类型的猪动物，例如繁殖或育肥类型的猪，以及任何这些类型的亲本系。

[0298] 术语“反刍动物”是指大型有蹄类食草或食草哺乳动物，它们能够通过消化前在专门的胃中发酵植物性食物来从植物性食物中获取营养，这主要通过微生物作用实现。反刍哺乳动物包括牛、所有家养和野生牛、山羊、绵羊、长颈鹿、鹿、瞪羚和羚羊。

[0299] 在用于保护动物目标的方法中的疫苗组合物的优选实施方式中，其中目标是反刍动物，反刍动物选自农业牲畜，特别是牛、牛科动物、绵羊和山羊。

[0300] 在用于保护动物目标的方法中的疫苗组合物的特别优选实施方式中，其中目标是猪，猪是母猪或幼猪。

[0301] 本发明的“幼猪”是指年龄小于6个月的猪，优选小于5、4、3、2或甚至小于1个月，按该优先顺序排列。

[0302] 在用于根据本发明所述的保护方法中的疫苗组合物的实施方式中，病原体选自细菌、寄生虫和病毒，均如本文所述。

[0303] 优选地，病原体选自猪圆环病毒2型、肺炎支原体和口蹄疫病毒中的一种或多种。

[0304] 在用于根据本发明所述的保护方法中的疫苗组合物的实施方式中，疫苗组合物通过皮内或肌肉途径施用。

[0305] 在另一方面，本发明涉及根据本发明所述的疫苗组合物，其用于对人或动物目标进行疫苗接种以对抗由病原体引起的感染和/或疾病。

[0306] 在用于根据本发明所述的疫苗接种的疫苗组合物的实施方式中，动物目标是反刍动物或猪，和/或病原体是细菌、寄生虫或病毒，如本文所述。

[0307] 正如本领域技术人员所熟知的，根据本发明所述的疫苗组合物可以以不同的方式应用于“保护方法”或“用于疫苗接种”。例如，疫苗组合物本身可以用作疫苗。或者，疫苗组合物可以用作进一步加工的成分，例如制成W/O/W或O/W/O乳剂，然后可以将其用作疫苗。此外，用作疫苗可能涉及混合或包括某些其他成分，例如稳定剂或防腐剂。防腐剂例如是硫柳汞、苯氧乙醇、福尔马林、抗生素（例如庆大霉素）。稳定剂例如是葡聚糖、甘油、明胶、氨基酸或缓冲剂。根据乳剂的类型，可以在制备根据本发明所述的疫苗组合物期间或之后添加其

他成分。

[0308] 另一方面,本发明涉及根据本发明所述的佐剂组合物在制备用于保护人或动物目标免受病原体引起的感染和/或疾病的疫苗组合物中的用途。

[0309] 在根据本发明所述的用途的实施方式中,动物目标是反刍动物或猪,和/或病原体是细菌、寄生虫或病毒,如本文所述。

[0310] 根据本发明所述的疫苗组合物需要施用于人或动物目标,以实现其有益的免疫原性作用。

[0311] 因此,在另一方面,本发明涉及一种用于对人或动物目标进行疫苗接种以对抗由病原体引起的感染和/或疾病的方法,所述方法包括向所述目标施用根据本发明所述的疫苗组合物。

[0312] 在根据本发明所述的疫苗接种方法的实施方式中,动物目标是反刍动物或猪,和/或病原体是细菌、寄生虫或病毒,如本文所述。

[0313] 可以使用任何可行的方法和途径将根据本发明所述的疫苗组合物“施用”于人或动物目标。通常,最佳的施用途径和方法将由所应用的疫苗的类型以及目标和其旨在预防的疾病的特征决定。可以应用不同的施用技术。例如,作为O/W乳剂,本发明的疫苗组合物具有水性,因此可以通过肠内或粘膜途径施用,即通过滴眼剂、滴鼻剂、口服、肠内、口鼻滴剂、喷雾剂。其他可能性是通过大量施用的方法,例如通过饮用水、粗喷雾、雾化、饲喂等。技术人员完全能够选择和优化此类施用途径和方法。

[0314] 根据本发明所述的疫苗接种方法的优选施用方式是通过肠胃外途径。

[0315] “肠胃外”是指通过皮肤施用,例如通过肌内、腹膜内、皮内、粘膜下或皮下途径。

[0316] 在本发明的疫苗接种方法的实施方式中,疫苗组合物通过皮内或肌内途径给药。

[0317] 根据本发明所述的疫苗组合物的剂量体积,例如当通过肠胃外途径施用时,剂量是目标人或动物可接受的体积,例如可以是约0.1至约10ml。优选一个剂量的体积在0.1至5ml之间,更优选一个剂量在0.2至3ml之间。

[0318] 当通过肌内途径施用时,一剂的体积优选在约0.5至约3ml之间,更优选在1至2ml之间。

[0319] 当通过皮内途径施用时,一剂的体积优选在约0.1至约0.5ml之间,更优选为约0.2ml。

[0320] 根据本发明所述的疫苗组合物的施用方法、时间和体积优选整合到目标人或动物可能需要的其他疫苗的现有疫苗接种计划中,以减少对目标的压力并降低劳动力成本。这些其他疫苗可以以与其注册用途兼容的方式同时、并发或顺序施用。

[0321] 根据本发明所述的佐剂组合物可以作为独立产品销售。这使得合格人员可以在施用前不久使用它来制备具有优选抗原的O/W乳剂疫苗。这种现场制备也称为现场混合,并且允许灵活地选择和组合混合的抗原。然而,以这种方式制备的疫苗组合物不具有在注册制造商的制药厂制备的预混合疫苗组合物所提供的数量、质量和无菌性的保证特性。

[0322] 另一种方法是以部件的试剂盒的形式提供根据本发明所述的佐剂组合物。这种部件的试剂盒通常是包含2个或更多个容器的包装,其中的内容物可以在施用前不久混合以制备根据本发明所述的疫苗组合物。对于本发明,部件的试剂盒可以包含一个装有本发明的佐剂组合物的容器,以及一个或多个装有一种或多种抗原的另外的容器。一种或多种另

外的抗原可以是液体形式。

[0323] 或者,有利的是,一种或多种另外的抗原可以是干燥或冻干形式。这利用了根据本发明所述的佐剂组合物作为O/W乳剂的有利特性:由于其表现为水性组合物,因此可以用作稀释剂来重构干燥或冻干的抗原。冻干抗原可以是活的或死的微生物,例如可以是活的PRRSV的冻干制剂,或者可以是非活的细胞内劳森氏菌的冻干制剂。

[0324] 因此,在另一方面,本发明涉及一种部件的试剂盒,该部件的试剂盒包含至少两个容器,一个容器包含根据本发明所述的佐剂组合物,一个容器包含抗原。

[0325] 在根据本发明所述的部件的试剂盒的实施方式中,抗原是冻干活体PRRSV,或为非活体*L.intracellularis*冻干制剂。

[0326] 根据本发明所述的部件的试剂盒可以包含带有所述两个或更多个容器的盒子,并且可以包含使用说明。所述说明可以例如写在包含试剂盒成分的盒子上;可以存在于该盒子内或盒子上或盒子带有的说明书上;或者可以在该试剂盒的制造商或经销商的互联网网站上查看或下载,等等。

[0327] 现在将通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0328] 实施例

[0329] 实施例1:Fortasol-E

[0330] Fortasol-E是2x w/v浓缩物。作为参考,制备了类似的组合物,其中聚山梨酯80(PS80)代替Eumulgin B1作为乳化剂。

[0331] 每100g组成:

[0332] 油相

[0333] DL- α -生育酚乙酸酯 15.00g

[0334] Eumulgin B1 6.00g

[0335] 水相

[0336] WFI 79.00g

[0337] 制备:

[0338] -将油相和水相加热至75-85°C

[0339] -慢慢将油相加入水相中,同时搅拌并产生可见的涡流

[0340] -加入后继续搅拌1分钟

[0341] -通过0.2 μ m过滤器过滤

[0342] -与Mhyo抗原按1:1比例混合,在37°C下保持稳定

[0343] 所用的Mhyo抗原是使用猪血作为培养基的Mhyo菌苗的粗抗原制剂。

[0344] 结果:

[0345] -具有Eumulgin B1的油相清澈,具有聚山梨酯80的油相浑浊

[0346] -两种佐剂组合物都可以通过0.2 μ m尼龙过滤器轻松过滤

[0347] -具有Eumulgin的佐剂组合物显示出可见颗粒的轻微聚集

[0348] -从宏观上看,两种佐剂组合物都呈纳米乳剂状,并发出蓝光粒度分析仪结果(μ m):

[0349]

佐剂组成	乳化剂	0.2 μm 过滤	d (0.10)	d (0.50)	d (0.90)	d (0.99)	d (1.00)
	Eumulgin	无	0.07	0.13	0.23	0.66	1.18

[0350]

浓缩物	B1						
	聚山梨酯 80	无	0.08	0.13	0.22	2.10	8.45
	Eumulgin B1	有	0.08	0.14	0.23	0.68	1.03
	聚山梨酯 80	有	0.08	0.13	0.22	0.74	1.18
浓缩物 +Mhyo 1:1	Eumulgin B1	有: t=0	0.08	0.14	0.23	0.69	1.03
		55 天, 37 °C 下	0.08	0.14	0.23	0.67	1.18
	聚山梨酯 80	有: t=0	0.07	0.12	0.21	0.81	1.37
		55 天, 37 °C 下	0.20	0.33	0.71	123.74	236.38

[0351] 总结:

[0352] -可以用Eumulgin B1代替聚山梨酯80作为乳化剂,制备Fortasol 2x浓缩物。

[0353] -Fortasol-E与Mhyo抗原以1:1的比例稳定存在,即使在37°C下放置55天后,具有聚山梨酯80的参照物出现破裂和颗粒大小变大

[0354] 实施例2:SVEA-E

[0355] SVEA-E是4x w/v浓缩物。浓缩物占最终疫苗的25%w/v。

[0356] 最终疫苗包含以下组分和浓度:

[0357] -Eumulgin B1(0.941gr/ml):1.62%w/v

[0358] -角鲨烷(d=0.81gr/ml):3.375%w/v

[0359] -维生素E醋酸酯(0.953gr/ml):3.97%w/v

[0360] 最终疫苗密度=0.9892gr/ml

[0361] O/W乳剂制备为4x w/v浓缩物。WFI用作水相。使用高压均质。4x w/v浓缩物组成:

[0362] 每100g(104.36ml)

[0363] 油相

[0364] Eumulgin B1 6.48g

[0365] 角鲨烷-PE(Kuraray) 13.50g

[0366] DI- α 生育酚乙酸酯 15.88g(纯度校正)

- [0367] 水相
- [0368] WFI ad 100.00g
- [0369] 制备:
- [0370] 油相
- [0371] 1.称量角鲨烷(Squalane)。
- [0372] 2.加入适量的维生素E醋酸酯并均质化直至混合物澄清。
- [0373] 3.加入适量的Eumulgin B1并在70℃下均质化。出现澄清混合物。
- [0374] 4.在70℃的温度下,使用0.2μm膜过滤器在配有双层夹套的过滤室内过滤该混合物以在过滤过程中保持温度在70℃下,从而对该混合物进行过滤灭菌。
- [0375] 5.冷却至55-65℃
- [0376] 水相
- [0377] 6.使用灭菌(高压灭菌)注射用水。加热至55-65℃最终产品
- [0378] 7.通过将油相添加到水相中制备预混物,同时使用磁力搅拌器或顶置式搅拌器以900rpm的速度混合
- [0379] 8.继续混合5分钟
- [0380] 9.处理预混物,在800bar(温度55-75℃)下通过(灭菌)微流化床3次
- [0381] SVEA-E 4x浓缩物在显微镜下显示为O/W可溶物,其中有一些1至5μm之间的液滴。
- [0382] 实施例3:SVEA-E Double Plus
- [0383] SVEA-E Double Plus是2x w/w浓缩物。
- [0384] 浓缩物和最终疫苗的密度已测量:
- [0385] 浓缩物密度=0.965g/ml
- [0386] 最终疫苗密度=0.986g/ml
- [0387] 最终疫苗包含以下组分和浓度:
- [0388] -角鲨烷(d=0.81g/ml):6.77%w/v
- [0389] -维生素E醋酸酯(0.953g/ml):7.97%w/v
- [0390] -Macrogol鲸蜡硬脂基醚NS(0.941g/ml):3.25%w/v
- [0391] -Aerosil 300pharma:0.20%w/v
- [0392] 组成:
- [0393] 每100g浓缩物(=最终疫苗的50%w/w)
- | | |
|------------------------|-------------|
| 角鲨烷 | 13.74 g |
| 维生素 E 醋酸盐(纯度校正) | 16.17 g |
| [0394] 聚乙二醇十六烷基醚 12 NS | 6.59 g |
| Aerosil 300 医药级 | 0.41 g |
| 注射用水 | ad 100.00 g |
- [0395] 制备:
- [0396] 1.称量WFI、Aerosil 300和Eumulgin B1(=水相),在40-50℃下均质化直至Eumulgin B1溶解。在121℃下搅拌灭菌20分钟
- [0397] 2.称量角鲨烷和维生素E醋酸盐(=油相),均质化直至出现澄清的成分。在70℃下

通过0.2 μ m过滤灭菌

[0398] 3.在55-65℃下用磁力搅拌器搅拌的同时将油相添加到水相中,可见涡流

[0399] 4.在55-65℃下继续搅拌5分钟

[0400] 5.在55-75℃下用微流化器在800bar下处理预混物3次

[0401] 实施例4:SVEA-E Double Plus中的Mhyo抗原

[0402] 最终疫苗中包含的SVEA-E double plus组合物:3.25%w/v的聚乙氧基乙烯12鲸蜡硬脂基醚;7.97%w/v的 α -生育酚乙酸酯;6.77%w/v的角鲨烷;和0.20%w/v的气相二氧化硅。

[0403] 最终疫苗中包含的SVEA double plus参照组合物:3.24%w/v的聚山梨酯80;7.94%w/v的 α -生育酚乙酸酯;6.75%w/v的角鲨烷;和0.20%w/v的气相二氧化硅。

[0404] 组合物:

[0405]	IP	佐剂	乳化剂	Mhyo 抗原
	1	SVEA-E Double Plus	水相中的 Eumulgin B1	全水相
	2		Eumulgin B1 油相	
	3	SVEA Double Plus (参照)	水相中的聚山梨酯 80	

[0406] 结果:

[0407] 37℃下10天后外观

[0408]	IP.1:	无破裂
	IP.2:	无破裂
	IP.3:	破裂

[0409] 图1显示了样品IP.1、IP.2和IP.3的显微镜视图,分别为t=0、37℃下10天后以及37℃下3周后。

[0410] 粒度分析仪结果:

[0411]	IP	d()	t = 0	37 °C 下 10 天	37 °C 下 3 周
	1	0.1	0.07	0.07	0.07
		0.5	0.11	0.11	0.11
		0.9	0.16	0.16	0.16
		0.99	0.21	0.22	0.21
		1.00	0.27	0.28	0.27
	2	0.1	0.07	0.07	0.07

[0412]		0.5	0.11	0.11	0.11
		0.9	0.16	0.16	0.16
		0.99	0.22	0.21	0.21
		1.00	0.29	0.27	0.27
	3	0.1	0.08	0.13	0.15
		0.5	0.13	6.48	10.54
		0.9	0.19	24.68	37.65
		0.99	0.24	51.35	60.80
		1.00	0.30	230.27	74.34

[0413] 图7显示了三个样品在37℃下放置10天后的粒度分析仪结果。

[0414] 测试样品的结果显示,参照佐剂组合物IP.3在37℃下放置10天后破裂,图7显示出现了一个以10μm为中心的大峰。另一方面,佐剂组合物IP.1和IP.2 (均包含SVEA-E double plus佐剂) 随着时间的推移保持完整的乳剂。

[0415] 结论:

[0416] 包含粗Mhyo抗原制剂和包含以Eumulgin B1作为乳化剂的佐剂组合物的乳剂疫苗明显比具有相同抗原但以聚山梨酯80作为乳化剂的参照乳剂疫苗更稳定。参照在37℃下10天内破裂,而Eumulgin乳剂即使在37℃下放置3周后也没有出现乳剂质量下降。

[0417] 实施例5:EV0420

[0418] EV0420是2x w/v浓缩物,包含维生素E醋酸盐、Shell Ondina X420和Eumulgin B1。密度等于SVEA。

[0419] 最终疫苗包含以下组分和浓度:

[0420] -Eumulgin B1:1.62%w/v

[0421] -Ondina X420 (d=0.81gr/ml) :3.375%w/v

[0422] -维生素E醋酸盐 (0.953gr/ml) :3.97%w/v

[0423] 最终疫苗密度=0.9913g/ml

[0424] O/W乳剂制备为2x浓缩物。WFI用作水相。使用高压均质。

[0425] 2x浓缩物组成:

[0426] 每100g (101.73ml) :

[0427] 油相

[0428] Eumulgin B1 3.24gr

[0429] Ondina X420 (Shell) 6.75gr

[0430] DL-α生育酚乙酸酯 7.94gr (纯度校正)

[0431] 水相

[0432] WFI ad 100.00gr

[0433] 制备:

[0434] 油相

[0435] 1.称量Ondina X420。

[0436] 2.加入适量的维生素E醋酸酯并均质化直至混合物呈透明状。

- [0437] 3.加入适量的Eumulgin B1并在70℃下均质化,出现透明溶液。
- [0438] 4.将此混合物加热至70℃。
- [0439] 5.在70℃的温度下,使用Nylon66或PVDF 0.2μm膜过滤器在配有双层夹套的过滤室内过滤,以在过滤过程中将温度保持在70℃,从而对混合物进行过滤灭菌。
- [0440] 6.冷却至55-65℃
- [0441] 水相
- [0442] 7.使用灭菌(高压灭菌)WFI,加热至55-65℃。
- [0443] 最终产品
- [0444] 8.在高剪切混合下将油相添加到水相中,制备预混料。
- [0445] 9.继续混合5分钟。
- [0446] 处理预混物,在800bar(温度55-75℃)下通过(灭菌)微流化床3次。
- [0447] 在显微镜下,EV0420 2x w/v浓缩物呈现为O/W纳米乳剂,其中有一些液滴在1μm和5μm之间。
- [0448] 实施例6:Xsolve2.0
- [0449] 浓缩物以Xsolve辅料为基础,不同之处在于体积上用Shell Ondina X GTL基药用白油代替矿物油,重量上用Eumulgin B1代替聚山梨酯80
- [0450] Xsolve2.0中Microsol-E浓缩物:Fortasol-E浓缩物=5:1v/v
- [0451] 1.Microsol-E和Shell Ondina X GTL基药用白油浓缩物:
- [0452] 每100ml制剂(计算密度=0.8925g/ml):
- [0453] -Shell Ondina X GTL基药用白油39.25g
- [0454] -Eumulgin B1 2.00g
- [0455] -WFI 48.00g
- [0456] 制备:
- [0457] 水相
- [0458] 1.称量适量的WFI
- [0459] 2.加入适量的Eumulgin B1,并在50℃下均质化,澄清溶液出现
- [0460] 3.在高压灭菌器中以121℃的温度灭菌20分钟
- [0461] 4.冷却至55-65℃
- [0462] 油相
- [0463] 5.使用已灭菌(0.2μm过滤)的Shell Ondina X GTL药用白油。加热至55-65℃
- [0464] 最终产品
- [0465] 6.在高剪切混合下将油相添加到水相中,制备预混料
- [0466] 7.继续混合5分钟
- [0467] 8.处理预混料,在800bar(温度45-55℃)下通过(已灭菌)微流化床3次
- [0468] 应出现具有油滴(其99%<1μm)的微乳剂
- [0469] 在显微镜下,Microsol-E/Shell Ondina X GTL基药用白油佐剂组合物呈现为均匀的O/W乳剂,其中有一些液滴在1μm至5μm之间。2.Fortasol-E浓缩物2x:
- [0470] 每100ml制剂(密度=1.00g/ml)
- [0471] -DL-α-生育酚乙酸酯 15.00g(纯度校正)

- [0472] -Eumulgin B1 6.00g
- [0473] -WFI ad 100.00g
- [0474] 制备:
- [0475] 油相
- [0476] 1. 称量DL- α -生育酚乙酸酯
- [0477] 2. 加入Eumulgin B1并在50°C下均质化,出现澄清溶液
- [0478] 3. 在50°C下通过0.2 μ m过滤对混合物进行灭菌
- [0479] 4. 加热至75-85°C
- [0480] 水相
- [0481] 5. 使用无菌(高压灭菌)注射用水,
- [0482] 6. 加热至75-85°C
- [0483] 最终产品:
- [0484] 1. 在75-85°C下将油相缓慢加入水相中,同时搅拌,并观察可见涡旋
- [0485] 2. 添加后,继续搅拌1分钟
- [0486] 3. 检查显微镜视图,应出现带有少量可见颗粒的纳米乳剂
- [0487] 显微镜下,Fortasol-E浓缩物呈现为均匀的O/W乳剂,其中有一些液滴在1 μ m和5 μ m之间。
- [0488] 最终疫苗的配方和计算密度:
- [0489] Xsolve50 2.0/100ml (0.9552g/ml)
- [0490] Microsol Eumulgin B1/Shell Ondina X GTL药用白油浓缩物:37.19g
- [0491] Fortasol-E浓缩物2x:8.33g
- [0492] 抗原+缓冲剂50.00g
- [0493] Xsolve30 2.0/100ml (0.9731g/ml)
- [0494] Microsol Eumulgin B1/Shell Ondina X GTL药用白油浓缩物:22.31g
- [0495] Fortasol-E浓缩物2x:5.00g
- [0496] 抗原+缓冲剂70.00g
- [0497] Xsolve12 2.0/100ml (0.9893g/ml)
- [0498] Microsol Eumulgin B1/Shell Ondina X GTL药用白油浓缩物:8.93g
- [0499] Fortasol-E浓缩物2x:2.00g
- [0500] 抗原+缓冲剂88.00g
- [0501] 实施例7:使用Xsolve2.0(Eumulgin B1/Marcol 52)进行稳定性研究
- [0502] 在商用Xsolve水包油浓缩物中,用Eumulgin B1替换聚山梨酯80的重量,得到Xsolve2.0,其包含:

	制剂	Microsol 浓度	Fortasol-E 浓度	Mhyo 抗原
[0503]	1	聚山梨酯 80/Marcol 52	聚山梨酯 80	50 % v/v
	2	Eumulgin B1/Marcol 52	Eumulgin B1	

- [0504] 注意:为了进行这些比较实验,这些疫苗组合物包含粗制Mhyo菌苗抗原,但其含量

远远超过任何同类商业Mhyo 0/W疫苗中的含量；这是为了强制显示粗制抗原对PS80乳化剂的影响，并相应地影响乳剂的稳定性。

[0505] 对上述佐剂组合物进行稳定性研究，其中确定了外观（通过光学显微镜观察）和粒度（通过粒度分析仪测量）。

[0506] 在37℃下放置1周后，Xsolve2.0 (Eumulgin B1/Marcol 52) 的外观是均匀的。与此相反，在参照佐剂组合物（聚山梨酯80/矿物油）中观察到了破裂。

[0507] 在37℃下放置1周后的粒度分析仪结果 (μm)：

佐剂组合物	D	t = 0	T = 37 °C 下 1 周
[0508] PS80/矿物油 (参照)	0.1	0.17	0.20
	0.5	0.32	0.45
	0.9	0.60	47.60
	0.99	0.85	116.76
	1.00	1.02	176.08
Eumulgin B1/矿物油	0.1	0.17	0.17
	0.5	0.31	0.31
	0.9	0.58	0.58
	0.99	0.81	0.82
	1.00	0.99	1.00

[0509] 结论：

[0510] • 聚山梨酯80可用Eumulgin B1代替

[0511] • 使用Eumulgin B1可得到稳定的乳剂，而使用聚山梨酯80的乳剂会破裂。

[0512] 实施例8：SVEA-E/FMD疫苗组合物的功效、安全性和稳定性 疫苗接种-攻击实验

[0513] 在牛身上进行了动物试验，以比较基于SVEA-E佐剂并以FMD病毒样颗粒作为抗原的FMD疫苗组合物（称为SVEA-E/FMD疫苗）与使用Montanide ISA206配制的经典FMD疫苗。为了能够看到组间差异，两种疫苗均含有剂量次优但相同（即每剂5μg）的FMDV Asial/Shamir/ISR/89VLP抗原。

[0514] 牛在颈部左侧肌内 (IM) 接种2ml疫苗。接种疫苗三周后，所有动物均通过舌内皮内 (IDL) 疫苗接种FMDV Asial/Shamir/ISR/89株进行攻击。在接种疫苗和攻击后的几个时间点采集血液样本，以测量研究期间的血清学反应。攻击后，在麻醉下检查动物是否有FMD特异性病变

[0515] 使用SVEA-E/FMD疫苗组合物，发现病毒中和滴度与典型FMD疫苗诱导的病毒中和滴度相同 (图2A)。SVEA-E/FMD疫苗提供了对攻击的完全保护，而对于典型FMD疫苗，观察到80%的保护 (图2B)。与对照动物和典型ISA206组相比，SVEA-E/FMD组在攻击后未观察到与FMDV相关的病毒血症。

[0516] 接种疫苗后，两个接种组均未观察到局部反应。

[0517] 牛、猪和山羊的免疫持续时间 (DOI)

[0518] 使用二价口蹄疫疫苗对动物进行免疫,该疫苗包含两种口蹄疫抗原:0/TUR/5/2009型和Asia1/Shamir/ISR/89型VLP。仅测定了针对0/TUR/5/2009组分的病毒中和滴度。

[0519] 使用SVEA-E佐剂口蹄疫疫苗组合物对牛(图3)、猪(图4)和山羊(图5)进行的免疫持续时间与使用相应的典型Montanide ISA206佐剂疫苗组合物进行疫苗接种时观察到的DOI相当。

[0520] 高抗原负载SVEA-E与Montanide ISA206的稳定性

[0521] 组合物:

[0522] 具有0/TUR/05/2009和Asia1/Shamir/ISR/89Shm病

[0523] 毒样颗粒(1:1v/v)的混合物的疫苗组合物

[0524] 最终疫苗的15和30% (v/v) 的抗原溶液

[0525] 抗原溶液的密度为1g/ml,因此抗原量以重量换算。

[0526] 加速稳定性研究:4和37℃下目视检查3周稳定性

[0527]

IP	抗原	佐剂	乳化剂	油相 (w/w)	抗原混合物浓 度 (v/v)	4℃ 下	37℃ 下
1	O/TUR05 + Asia/Shm	W/O 乳化剂 佐剂, 以 Marcol52 为 液体石蜡, 水/油比为	Span80/ Tween80	70 %	15 %	沉积的	沉积的
2					30 %	沉积的	沉积的

[0528]

		45/55 w/w, 粘度小于 200 mPa.s					
3		GNE	Span80/ EumulginB1	55 %	15 %	沉积的	沉积的
4					30 %	沉积的	沉积的
7		SVEA	-		15 %	稳定的	稳定的
8					30 %	稳定的	稳定的
9		SVEA-E			15 %	稳定的	稳定的
10					30 %	稳定的	乳状的
11		微型 SVEA-E			15 %	乳状的	稳定的
12					30 %	乳状的	乳状的
		ISA206	-	50 %	15 %	破裂的	破裂的
13					30 %	破裂的	破裂的
14							

[0529] 从这些数据可以得出结论,具有高抗原有效载荷的疫苗组合物当基于SVEA-E乳剂时是稳定的,但当基于Montanide ISA206乳剂时则不稳定。

[0530] 注意:本实验中使用的0/TUR/05/2009和Asia1/Shamir/ISR/89Shm VLP衣壳抗原是开发前的质量,因此与未来完全开发和优化的商业产品质量的FMD VLP抗原相比,它们相对粗糙。这只会使稳定性结果更加令人印象深刻。

[0531] 抗原质量ELISA可用于量化疫苗组合物中的VLP,而不会破坏乳剂,而基于Montanide ISA206的制剂则无法做到这一点。疫苗中的VLP是稳定的。

[0532] • 疫苗组分基于使用VHH-ELISA对灭活FMDV 0/TUR/5/2009VLP量化

[0533] • 用SVEA-E佐剂组合物配制的疫苗

[0534] • 在初次接种(0dpv)和42天后的加强接种后,牛体内产生强烈的免疫反应(见下表中的结果)

[0535] • 疫苗配制后:与配制前相同的量化(VHH ELISA)

[0536] • 无需根据SVEA-E打破乳剂疫苗

[0537] • 疫苗稳定性监测:在4℃下可稳定保存>9个月(见图6)

[0538]

VN 滴度		0 DPV	7 DPV	14 DPV	21 DPV	28 DPV	42 DPV	49 DPV
疫苗	动物 ID	Log10	Log10	Log10	Log10	Log10	Log10	Log10
O/TUR/5/2009 VLP ($\cong 8 \mu\text{g}$)	1	n/a	2.11	2.11	2.55	2.71	1.95	2.85
	2	n/a	2.41	2.41	3.01	2.85	2.41	3.15
	3	n/a	2.11	1.81	2.55	2.55	2.25	2.85
	4	n/a	2.41	2.25	2.41	2.55	2.25	2.85
	5	n/a	1.81	2.41	2.11	2.25	1.81	2.85

[0539] 抗原信息:

[0540] Asial/Shamir/ISR/89

[0541] Asial/Shamir/ISR/89VLP (在VP2蛋白中包含衣壳稳定化突变S093C和K190N) 是通过杆状病毒表达系统产生的。在2升生物反应器中, Tnao38昆虫细胞以MOI 0.1感染相应的重组杆状病毒。通过离心以5dpi收获细胞培养上清液, 用二元乙烯亚胺 (BEI) 处理以灭活重组杆状病毒, 然后通过过滤浓缩。疫苗采用SVEA-E佐剂组合物配制。使用M332F抗体通过ELISA测定完整VLP的浓度 (Harmsen等, 2017, Front. Immunol., 第8卷, 第960页)。将连续稀释的样品置于微量滴定板上, 在4℃下用M332F抗体包被过夜, 在37℃下孵育1小时。取出样品并用PBS-Tween清洗三次后, 将固定量的生物素化M332F添加到板中, 在37℃下孵育1小时。取出生物素化抗体, 用PBS-Tween清洗板三次, 然后将过氧化物酶偶联的链霉亲和素添加到板中, 然后进行发色检测。

[0542] O/TUR/5/2009病毒样颗粒

[0543] 类似地, O/TUR/5/2009VLP (在VP2蛋白中包含衣壳稳定化突变S093C) 是在包含Tnao38昆虫细胞的2升生物反应器中产生的, 所述昆虫细胞以1m.o.i. 被感染。以200xg的速度离心, 以5dpi收获细胞培养上清液。使用VHH C1通过ELISA确定完整VLP的浓度 (Wang等, 2015, BMC Veterinary Research 11:120, DOI 10.1186/s12917-015-0437-2)。为此, 将连续稀释的样品在37℃下孵育1小时, 在用C1包被的微量滴定板上过夜, 温度为4℃。取出样品并用PBS-Tween清洗三次后, 将固定量的生物素化C1添加到板中并在37℃下孵育1小时。取出生物素化抗体并用PBS-Tween清洗板三次, 然后将过氧化物酶偶联的链霉亲和素添加到板中, 然后进行发色检测。

[0544] 结论

[0545] 这些结果中特别令人惊讶的是以下发现:

[0546] 1. O/W乳剂型疫苗组合物可用作FMD疫苗,

[0547] 2. 针对FMDV攻击感染的疫苗效力甚至优于使用类似剂量抗原但以FMDV黄金标准类型疫苗的方式配制的疫苗: 典型ISO206 W/O/W乳剂疫苗,

[0548] 3. 这些疫苗对跨物种有效, 并且

[0549] 4. 除了比目前的标准类型FMD疫苗更有效之外, 根据本发明所述的疫苗组合物还具有几个重要的进一步优势, 最显著的是乳剂的稳定性, 以及处理和加工方面的优势。

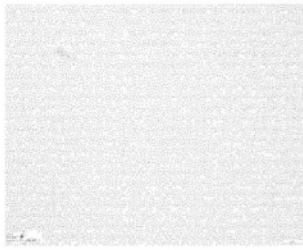
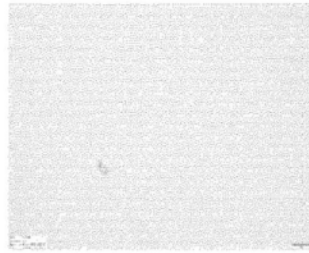
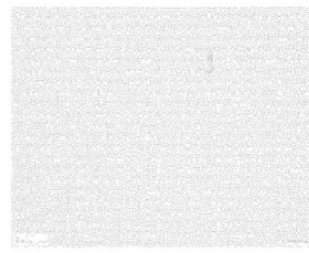
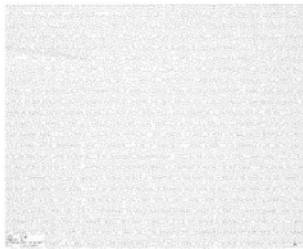
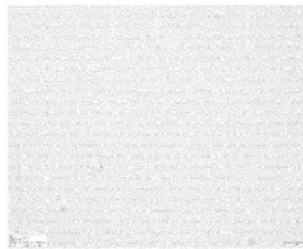
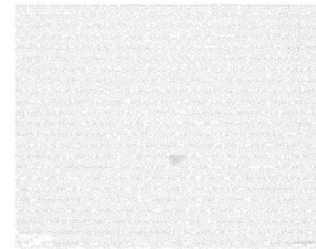
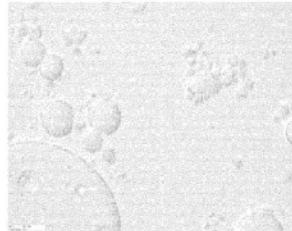
A IP.1, $t = 0$ **B** IP.1, 10 天 37°C**C** IP.1, 3 周 37°C**D** IP.2, $t = 0$ **E** IP.2, 10 天 37°C**F** IP.2, 3 周 37°C**G** IP.3, $t = 0$ **H** IP.3, 10 天 37°C**I** IP.3, 3 周 37°C

图1

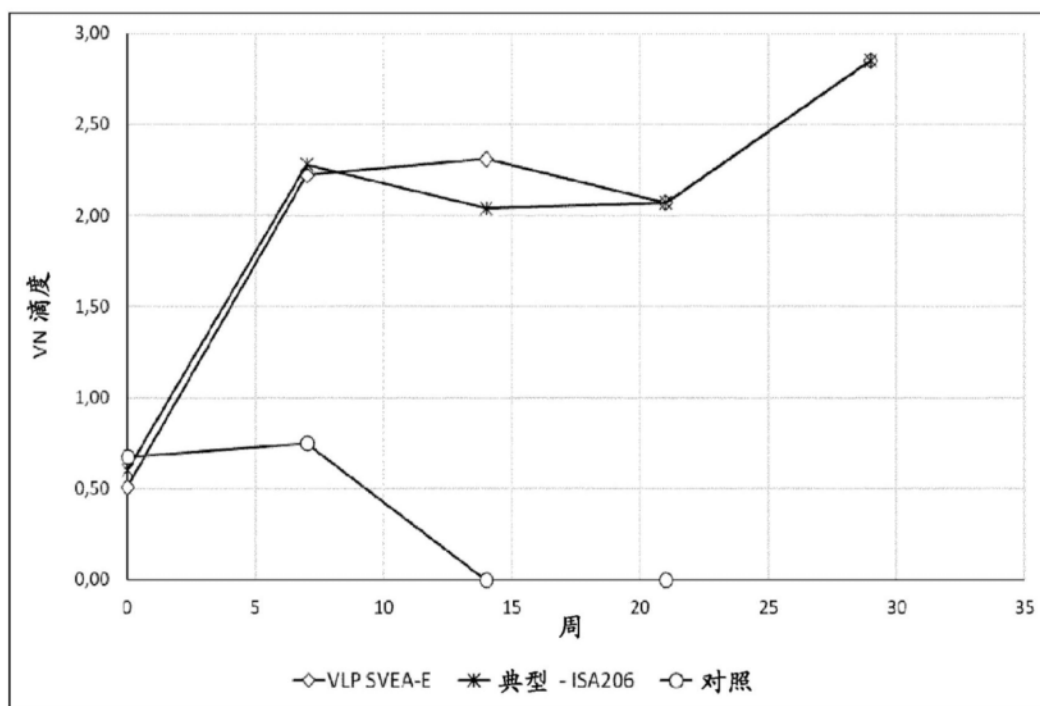
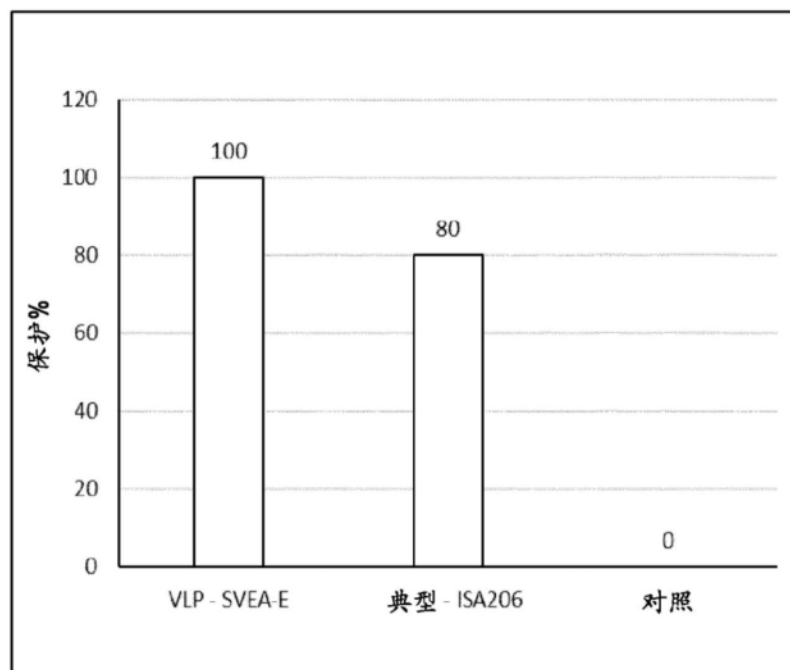
A**B**

图2

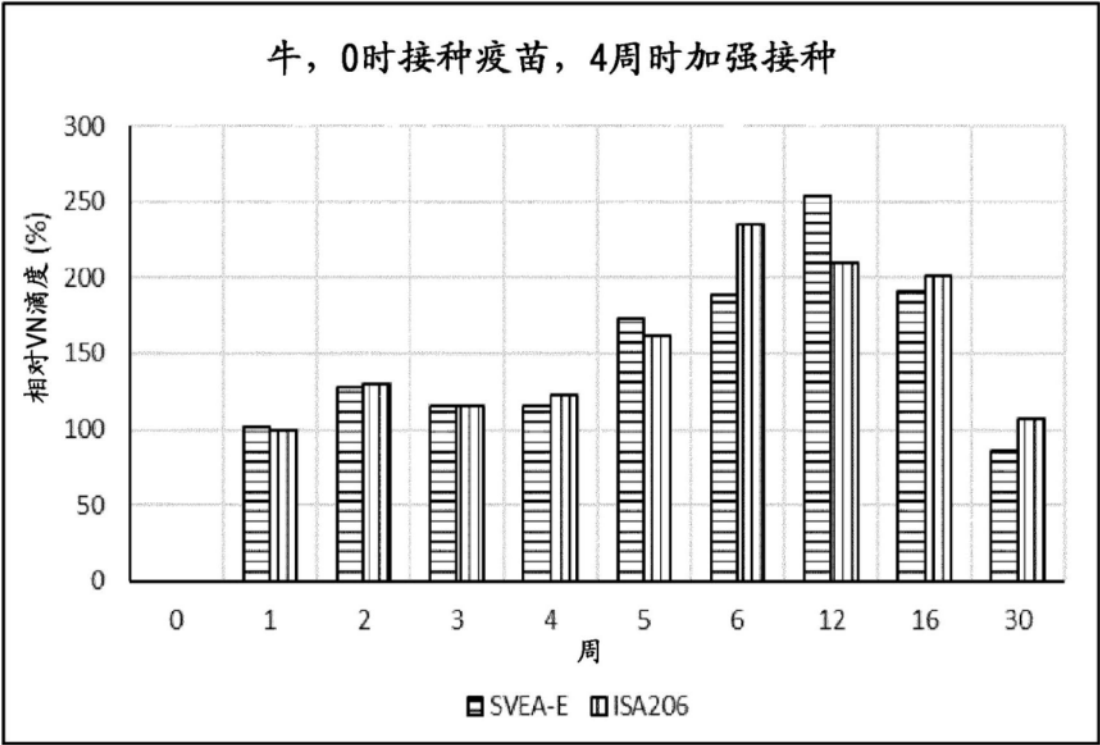


图3

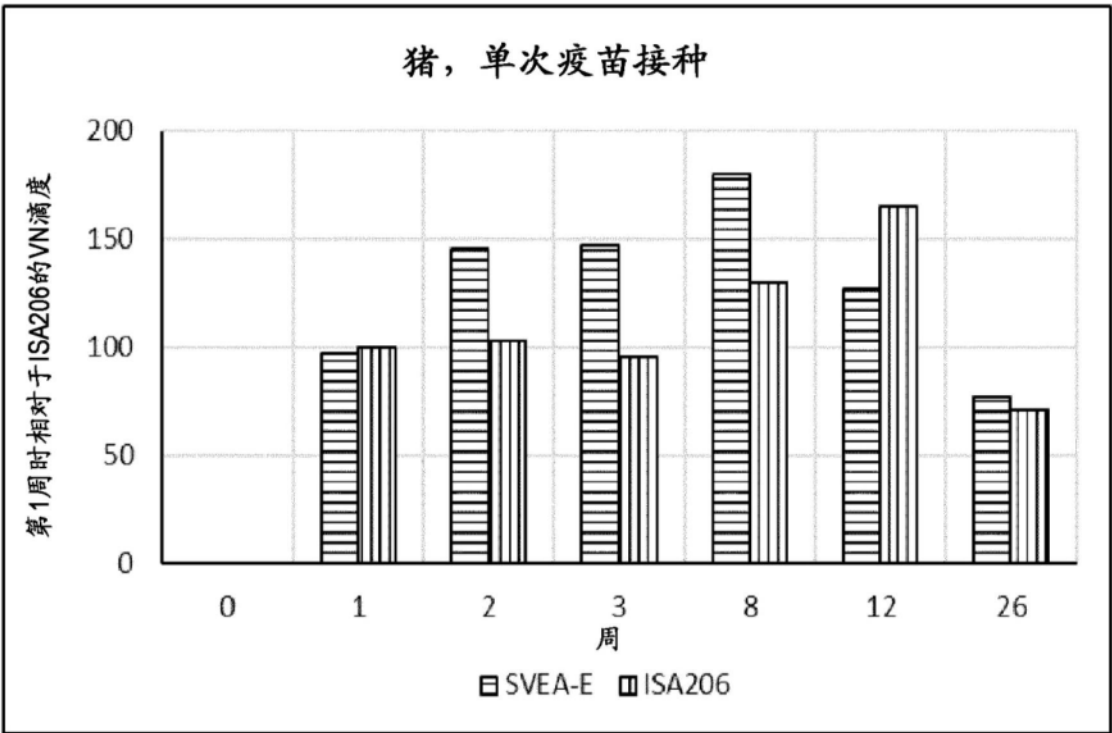


图4

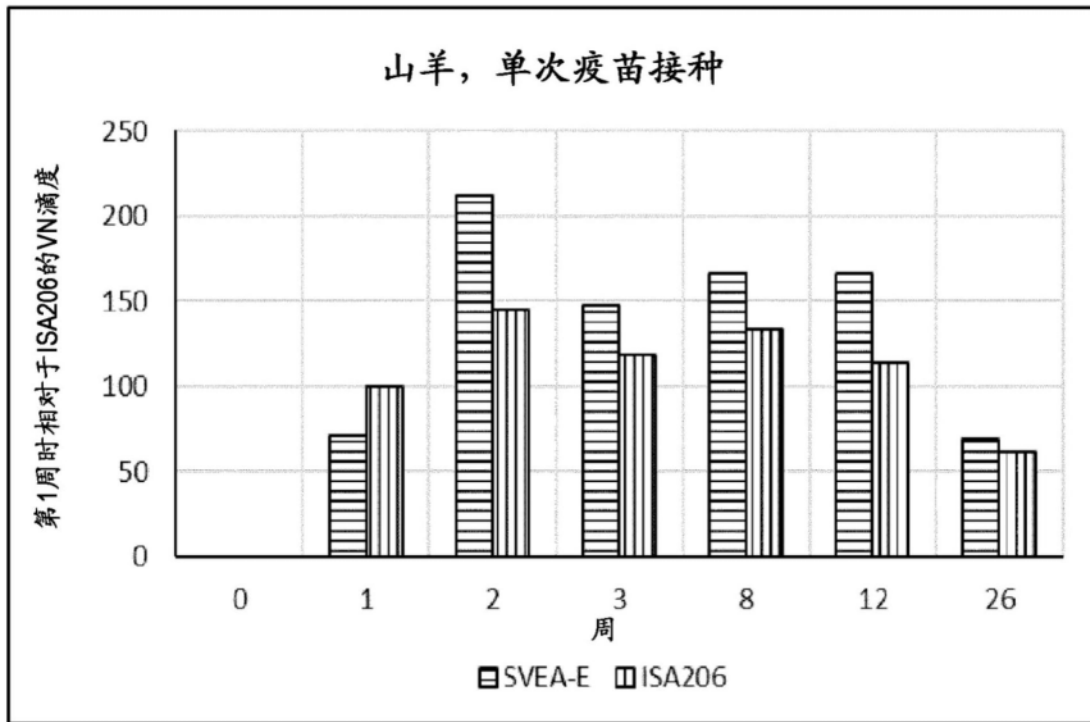


图5

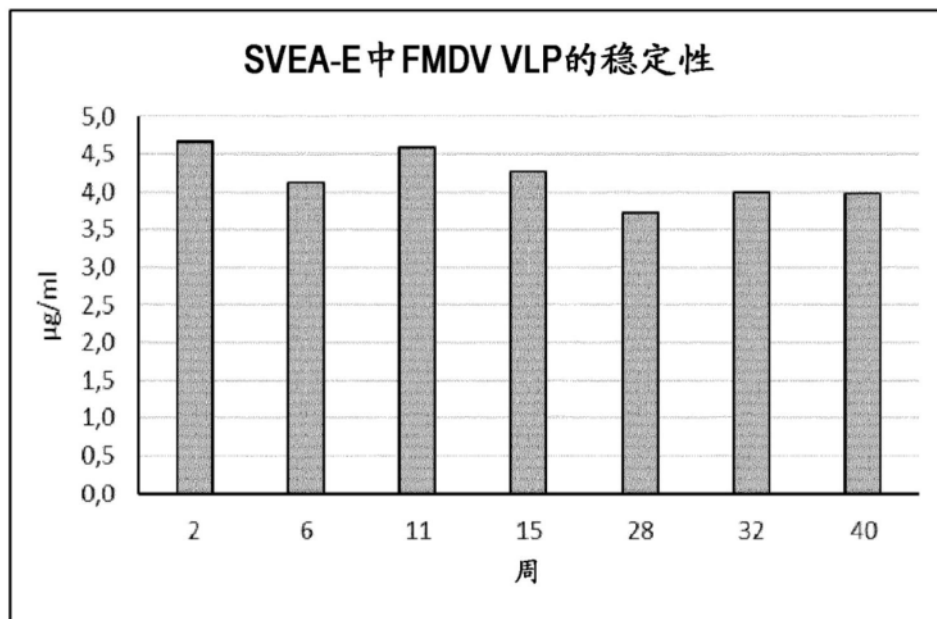


图6

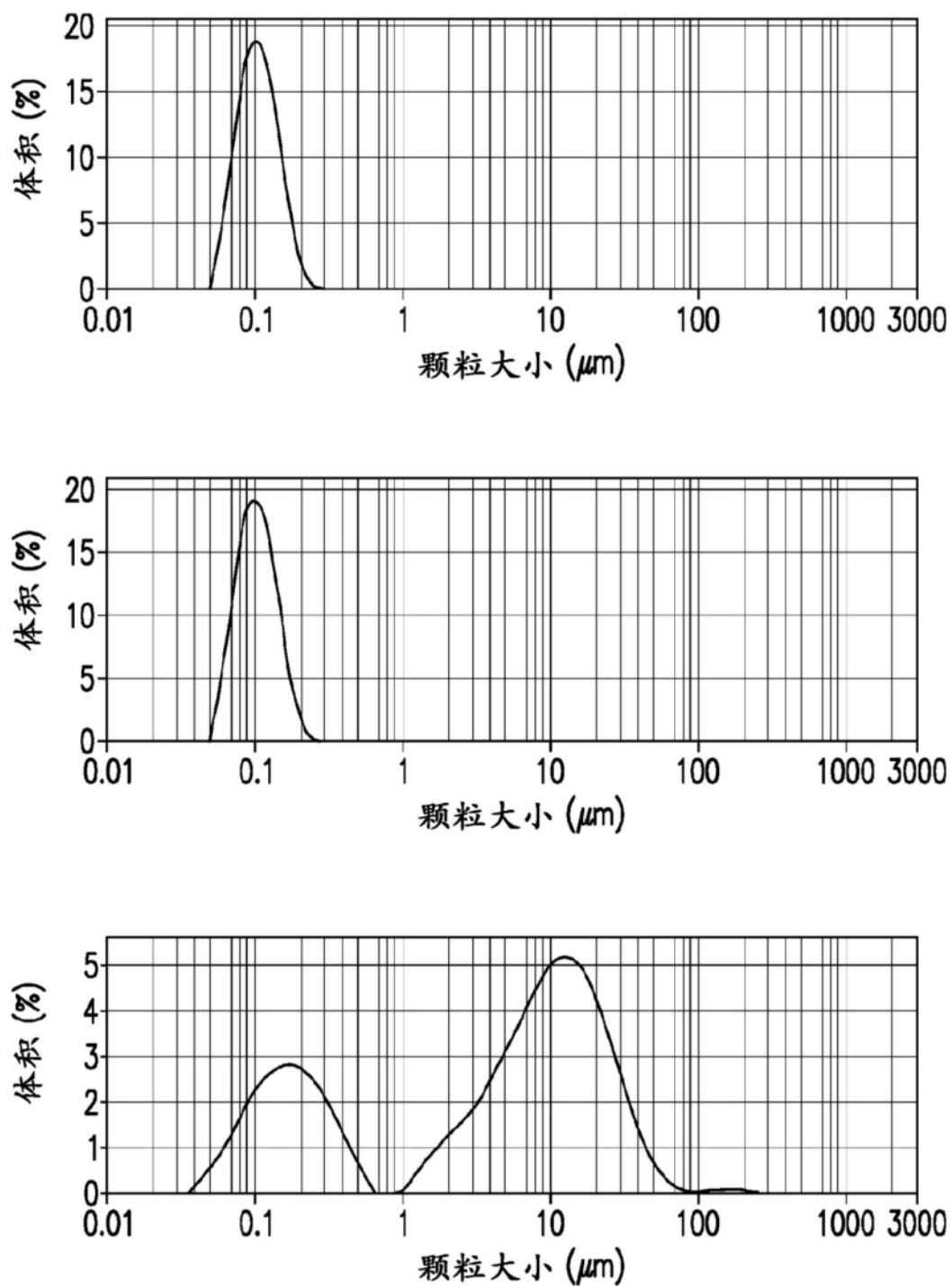


图7