

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94116155.2

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

A61K 39/39

[43]公开日 1995年9月20日

[22]申请日 94.7.25

[30]优先权

[32]93.7.26 [33]EP[31]93202206.4

[71]申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72]发明人 P·M·阿耀德 A·H·诺兰德  
D·H·纳普考戈

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 唐伟杰

A61K 39/02 A61K 39/106

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 油基和水基佐剂混合物

[57]摘要

本发明涉及含有抗原物质和两种佐剂混合物的疫苗，其中的一种佐剂为油基，而另一种佐剂为水基。

## 权 利 要 求 书

---

1. 含有抗原物质和佐剂的疫苗,其特征在于所说的佐剂是油包水乳剂与免疫刺激性葡聚糖的组合物。

2. 根据权利要求1的疫苗,其特征在于所说的葡聚糖是 $\beta$ -葡聚糖。

3. 根据权利要求1或2的疫苗,其特征在于所说的葡聚糖是来自啤酒酵母细胞壁的 $\beta$ -1,3-和 $\beta$ -1,6-连接的葡聚糖。

4. 根据权利要求1-3的疫苗,其特征在于所说的油是动物油,植物油或合成油。

5. 根据权利要求1-4的疫苗,其特征在于乳剂中水与油的比例是约30/70 (W/W)。

6. 根据权利要求1-5的疫苗,其特征在于所说的抗原物质衍生于鱼的病原体。

7. 根据权利要求6的疫苗,其特征在于鱼的病原体选自鳗弧菌、杀鲑弧菌、杀鲑气单胞菌、salmoninarum 肾细胞和红色耶尔森氏菌。

8. 含油包水乳剂和免疫刺激性葡聚糖的佐剂组合物。

9. 制备含有抗原物质和佐剂的疫苗的方法,其特征在于在乳化剂存在的条件下用油乳化抗原物质和免疫刺激性葡聚糖,如此得到油包水乳剂。

## 油基和水基佐剂混合物

本发明涉及含有抗原物质和佐剂的疫苗、制备所说疫苗的方法和佐剂组合物。

水产养殖中的许多疾病是由条件病原菌,即在鱼或虾在虚弱或应激状态下能使之致病的细菌所致。这是实际养殖条件下常常存在的情形。

对商业性水产养殖具有威胁性的细菌如红色耶尔森低菌—肠道石鲈病的致病原;鳗弧菌—古典型弧菌病的致病原;杀鲑弧菌—引起冷水弧菌病;杀鲑气单胞菌—引起疔疮病,Salmoniarum肾细菌—细菌性肾病的致病原。

疫苗和抗菌素的应用是两种保护养殖鱼不致病的可行性方法。但在水产养殖中必须大大减少抗菌素的应用以避免环境公害和产生抗菌素抗性的危险。

已经有人报道应用(实验性)一疫苗抵抗某些鱼的细菌性病原菌,(Holm,K.O. et al,J.Fish Diseases 11,389-396,1987;RØrstad, G.et al,Conference on Diseases in Asian Aquaculture, Nov.1990 Indonesia)。

然而,有必要进一步提高抗某些上述病原菌疫苗的效力。而且,目前仍无抗如鲑科鱼的疔疮病和细菌性肾病这类商业上重要的疾病和抗病毒性疾病的有效疫苗。例如,杀鲑气单胞菌代表了对商业

水产生养殖的威胁。用死细菌针对上述病原菌接种反产生微弱的保护作用,这可能是由于灭活菌抗原的不良免疫性之故。

因此,应用这灭活的疫苗迫切需要增强抗原的免疫原性,例如,借助于佐剂来达到上述目的。

目前,在挪威已有数种油性佐剂疫苗商售,其中有两种是三价疫苗(Apoject 3-Fural, Apothekernes Laboratorium A.S.; Biojec 1900, Biomed Inc)。这些三价疫苗包括灭活的完整细菌,用于防止鲑的弧菌病、冷水弧菌病和疖疡病。

这些疫苗的不足之处在于其相对弱的抗疖疡病效力和不良的物理特性,尤其是乳剂的粘滞度或稳定性。

抗所说疾病更进一步的疫苗含有一种水基佐剂,即不含油,可从商业途径得自NorBio A/S(Norvax Trippel)。所说疫苗中的水基佐剂是啤酒酵母的 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,6连接的葡聚糖(MacroGard, 可从KS Biotech Mackzymal, Troms $\emptyset$ , Norway购买)。

酵母和丝状真菌的葡聚糖代表了一组水基佐剂(DiLuzio, N.R., Springer Seminars in Immunopathology 8, 387-400, 1985)。这些葡聚糖是真菌细胞壁普遍具有的最重要结构成分之一 (Rosenberger, R.F., The Cell wall. In: The Filamentous Fungi, Vol. 2, eds.: Smith & Berry 328-334, 1976)。

特别是,已经证实啤酒酵母细胞壁的 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,6连接的葡聚糖和它的真菌 $\beta$ -葡聚糖能增强鱼类对细菌感染的抵抗力(R $\emptyset$ rstad, G. et al., Fish & Shellfish Immunology 3, 179-190, 1993; Yano, T. et al., J. Fish Diseases 14, 577-582, 1991)。

本发明提供了含有抗原物质和佐剂的疫苗,其特征在于所说的

佐剂是油包水乳剂与免疫刺激性葡聚糖的结合物。

现有技术已经知道,油包水乳剂(W/O)的佐剂效果部分在于其缓释作用,即存在于被分散水相中的抗原物质从连续的油相中缓慢地释出,因为油相逐步破散,藉此在接种后马上产生对免疫系统较理想的刺激作用。

与此相反,为启动免疫应答可直接应用水基免疫刺激性葡聚糖。可以预料,将水基免疫刺激性葡聚糖掺入被分散的油包水乳剂的水相将导致该佐剂成分退出免疫系统。

令人感到意外地是,已发现包含上述佐剂组合物的疫苗能在接种后很短的时间内诱导高度的保护性免疫应答。

术语免疫刺激性葡聚糖意指由D葡萄糖型的重现单糖单位构成的一种多糖,其葡聚糖与抗原结合施用时能够增加在动物中诱发的抗抗原物质的免疫应答,超过了未加用葡聚糖时所观察到的免疫应答。

本文优选 $\beta$ -葡聚糖,尤其是得自真菌细胞壁的 $\beta$ -葡聚糖用作佐剂成分。已知这些葡聚糖以非特异性和特异性方式成为免疫系统的强力刺激剂(Czop, J.K. et al., *J Immunol.* 135, 3388-3393, 1985; Ross, G.D. et al., *Complement* 4, 61-74, 1987; DiLuzio, 1985, 出处同上)。这类 $\beta$ -葡聚糖的例子有分别来自群交裂褶菌、葡聚糖小核菌和香菇的Schizofiran、scleroglucan和香菇糖(Yano et al., *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1815-1819, 1989)。

特别优选的 $\beta$ -葡聚糖是得自啤酒酵母细胞壁的葡聚糖,尤其是 $\beta$ -1,3-1,6连接的葡聚糖(DiLuzio et al., *Int. J. Cancer*

24,773-779,1979;RØrstad,G. et al.,1993,出处同上),例如, M-葡聚糖(MacroGard 佐剂,得自KS BiotecMackzymal,TromsØ, Norway)。

根据本发明,疫苗中葡聚糖的含量取决于所选用的葡聚糖的类型和疫苗中所用的油包水乳剂及特异性抗原,但选优的是在每剂疫苗含大约1~1000ug范围的葡聚糖,特别是每剂约50~600ug。最优选的是每剂用300ug。

用于本发明中的油包水乳剂中的各个成分都是常规的,并为本领域的技术人员熟知。

油性成分包括如Bayol<sup>(R)</sup>和Drakeol<sup>(R)</sup>一类的矿物油,但是可以代谢的、非毒性油类,优选地是含有6-30个碳原子,包括但不限于烷烃、烯烃、炔烃及其相应的酸和醇;醚及其酯;以及它们的混合物。所说的油可以是菜油、鱼油、动物油或经合成制备的油,它们能被将施予佐剂的机体所代谢,并且对施用对象无毒。所说的对象是动物,典型地是哺乳动物、鸟类或鱼类。

任何可代谢的油类,特别是动物、鱼、蔬菜来源的可代谢油类可用于本发明。

菜油的来源包括坚果类、种子和谷类。最常用的花生油、豆油、椰子油和橄榄油是坚果油的例证。种子油包括红花油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油等。玉米油在谷类中是最容易得到的,但也可以使用其它谷类植物的油,如小麦、燕麦、黑麦、大米、埃塞俄比亚画眉草,黑小麦等等。

大多数的鱼都含有易于被回收的可代谢油。例如,鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和鲸油(如鲸蜡)是数种可用于本发明的鱼油的例子。大

量支链油是以5碳异戊二烯单位经生物化学途径合成的，并通常被称为类萜烯化合物。鲨鱼肝油含有称为角鲨烯，2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯的支链，不饱和的类萜烯化合物。角鲨烯的饱和类似物角鲨烷也是优选的油。包括角鲨烯和角鲨烷在内的鱼油易于由商业来源或可从本领域已知的方法得到。

本发明疫苗配方的油性成分含量为40-90% (W/W)，特别是含60-80% (W/W)，最优选的用量为70% (W/W)。

正如已经熟知的，油包水乳剂的配方包括适当地选择乳化剂，这要求同时考虑到油和水相的相对比例及其确切的性质。乳化剂的比例是允许改变的，但最好是对其类型进行选择，并以各种浓度加以应用以使最终的亲疏平衡 (HLB) 数小于6。

用于举证说明实施本发明思想的乳化剂例子包括Span 80, Span 85, Arlacel 85和Arlacel 83。

特别适于制备掺入到本发明疫苗中的油包水型乳剂的，是曾在PCT专利申请WO 91/00107中被描述过的油性乳化剂组合物，包括可代谢的油和一种二缩甘露醇一油酸族的乳化剂。

在本发明的疫苗中，佐剂组合物与抗原混合。抗原一词指任何物质，包括完整的病毒或细菌(活的或天活的)、其分离部分或其提取物，或是亚单位(如用重组技术生产的)例如，一种纯化的蛋白质、蛋白质-多糖、蛋白质-脂多糖、脂多糖等，当它对于动物的血液呈外源性时，便刺激免疫系统形成特异性调节物，如B细胞、T细胞或巨噬细胞。

抗原可用本领域已知的方法生产、或是购自商业来源。

本发明疫苗的配方中将应用有效量的抗原,即所用抗原的量能引起接种动物的,产生特异性的和足够的免疫应答,以使得在随后暴露于所说免疫的病原过程中能产生保护作用。所需要的抗原有效量取决于经免疫而寻求预防的病原类型和所用抗原类型。确定所说的抗原用量是在本领域技术人员已知的范围的。

抗原可以是例如病毒、细菌或寄生虫。如果需要的话,这些病原体可通过化学或物理手段致死。在本说明书中,致死意味着灭活,例如,通过遗传物质和/或其它致命性成分的改变使得对之有免疫力的病原体不再能复制而灭活。杀死病原体的适宜化学剂例如甲醛、戊二醛、 $\beta$ -丙醇酸内酯、吡丙啶及衍生物,或者是能与属于所说病原体的反应性种类发生双功能或多功能性反应的其它化合物。杀死病原体的物理剂例如UV辐射、 $\gamma$ -辐射、“热休克”和X-辐射。

本发明的疫苗可用于使鸟类、哺乳动物和鱼对病原体引起疾病有免疫力,所说的病原体包括但不限于鳃弧菌、杀鲑弧菌、杀鲑气单胞菌、Salmoninarum肾细菌、红色耶尔森氏菌和经遗传学上修饰的鱼病原体、传染性支气管炎病毒,新城疫病毒、传染性粘液囊病毒、伪狂犬病病毒、胸膜肺炎放线杆菌和大肠杆菌。

特别地,本发明的疫苗适于使鱼类是具有抗一种或多种病原体的免疫力,所说的病原体如杀鲑气单胞菌,杀鲑弧菌,鳃弧菌和红色耶尔森氏菌。

上述疫苗乳剂可用本领域已知的方法生产,为此特别可参见Herbert等人的描述(Herbert,W.J., in: Handbook of Experimental Immunology Vol. 3, ed.: D.M. Weir, 3th



edition,1979; Pharmaceutical Dosage Forms Vol. 1, eds: Lieberman, H.A., Rieger, M.M. and Banker, G.S., 199-284, 1988)。

例如,将含有乳化剂的油相和进一步含有葡聚糖的抗原水相在借助如Silverson L2R拌搅器或Ultra Turrax T25 进行搅拌的条件下缓慢混合。另外,可以首先将油、乳化剂和水基葡聚糖乳化,然后再与抗原水相混合。

### 实施例1

#### 制备疫苗

将一种含有Macrogard葡聚糖作佐剂并进一步含有经福尔马林灭活的鳎弧菌01、鳎弧菌02、杀鲑弧菌和杀鲑气单胞菌salm.变种的完整菌细胞疫苗Norvax Trippel(购自NorBio A/S Bergen, Norway)与一种含有油性成分和来自二缩甘露醇一油酸族的乳化剂的油性组合物Montanide<sup>(R)</sup> ISA 715(购自Seppic Pharma Division, Paris, France)以30/70(W/W)的比例混合,并用Ultra Turrax乳化。

#### 接种试验

标准试验条件:

鱼的大小:15-20g(大西洋鲑-Salmo salar L)

罐的体积:150升(0.6×0.6m)

水温:11°C

禁食情况:在处理前2天禁食。在接种操作后12小时开始进食。

接种或免疫性试验前的麻醉过程:

于每升水中应用1ml30%氯丁醇。鱼被麻醉后尽快接种。将鱼放入水中使之恢复原状。

#### 细菌的重新分离:

通过血琼脂平皿上的平皿培养法重新从肾中分离杀鲑气单胞菌salm.变种,于15-18°C培养3天。用显微镜检查形成的菌落,根据形态学鉴定细菌。

#### 疫苗:

含上述佐剂混合物的Norvax Trippel。

含有油基佐剂和与Norvax Trippel 相同抗原的Aproject 3-Fural (Apothekernes Laboratorium A/S)。

含油基佐剂和与Norvax Trippel相同抗原的Biojec 1900 (Biomed Inc.)。

#### 接种方法:

给40条鱼经腹膜内注射0.2ml 经ISA 715 乳化的 Norvax Trippel。40只于脂鳍 (fatfin) 系有标记的鱼注射0.2ml-1.2%NaCl 作为对照。对于Aproject 3-fural和Biojec 1900也用同样的方法接种。

#### 免疫学试验方法:

在接种后11、22和27周进行免疫学试验。接种组和对照组在相同的罐中进行感染。用下述群居的方法经注射杀鲑气单胞菌salm.变种来进行免疫学试验:给5条鱼中的每一条都经腹膜内注射0.1ml  $2 \times 10^4$  细菌,然后将这些鱼放入每个装有接种鱼和对照鱼的罐中。该共居的鱼通常在5-8天内死亡。在35天期间内对上述鱼进行观察,记录死亡数。中止免疫性试验,5天后不再发生死亡计算存

活相对百分数RPS。

相对百分存活率(RPS)的计算:

$$\%RPS=100\% \left(1 - \frac{\% \text{死亡的接种鱼}}{\% \text{死亡的对照鱼}}\right)$$

结果:

如果对于杀鲑气单胞菌salm. 变种的RPS至少为60%，则表明疫苗有足够的保护力。第一次免疫性试验后Norvax Trippel ISA 715, Apoject 3-fural 和Biojec 1900的死亡率图分别示于图1- 3中。计算出的RPS值分别为83.5%、62.2%和54.3%。在图4中，这些RPS值以线图表示，并增加了22和27周免疫性试验后的RPS值。在所有的情况下，Norvax Trippel ISA 715都产生了最高的存活率。

## 实施例2

### 疫苗的制备

制备了4种试验性疫苗，它们由下列抗原、葡聚糖和油的不同组合组成:

- (1) 抗原
- (2) 抗原+葡聚糖
- (3) 抗原+油
- (4) 抗原+葡聚糖/油

所用的抗原同实施例1。所用的葡聚糖是自酵母真菌啤酒酵母(Biotech Makzymal)的细胞壁中提取的b-1, -3葡聚糖，所用的油是Montanide ISA 715(Seppic)。用如实施例1描述的方法制备疫

苗。

### 饲养条件

在第一阶段, 剪去实验用鱼(未成熟的大西洋鲑鱼(*Salmo salar* L.))的鳍, 置于分隔的室内罐中( $0.6\text{m}^3$ )。为了复制一个自然的生殖周期在小鲑鱼入海期间(5-7月), 上述鱼逐渐适应了海水条件。在10月, 所有组的鱼都移至一个大的室外罐中( $20\text{m}^3$ )。将鱼贴上标签以区别不同的实验组。给鱼过量地喂以商售干燥的鱼料。鱼食由自动进料器分发。将鱼保持在季节性变化的水温和光照条件下。

### 接种方法

参见实施例1, 用标准条件进行接种。

### 免疫学试验方法

将各接种组的30条鱼于接种后的18周和31周进行免疫学试验。向每个实验组加入等量的对照鱼, 在4个不同的罐中进行免疫学试验, 每个罐中喂养一个实验组和一个对照组。

经过在同一空间共居而用杀鲑气单胞菌salm. 变种感染鱼。在用接触病原体所进行免疫学试验后的30-45天期间内每天记录鱼的死亡数。在不发生死亡的5天后中止免疫学试验, 并计算RPS。

### 免疫学测定

接种后0、4、8、18、31、54和61周收集血样。在由尾静脉放血之前, 鱼禁食并被麻醉。血样于 $4^{\circ}\text{C}$ 凝固12-24小时, 以 $1000\text{g}$ 离心5分钟, 收集血清部分, 分成等份贮于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

根据标准的操作过程, 借助ELISA技术检测针对杀鲑气单胞菌salm. 变种抗原的特异性抗体的存在。简言之, 用碳酸盐/碳酸氢盐

缓冲液稀释抗原至终浓度为 $3 \cdot 10^8$ 细菌/ml,并用于包被96孔免疫平板(Nunc Maxi Sorb),与鲑血清(经1:50-1:51400倍稀释(于15°C温育18小时,与兔抗鲑Ig( $\Phi$ 451,1:6000)于20°C温育1小时,与羊抗兔Ig(Bio-Rad,1:3000)于20°C温育小时。最后加入邻-苯二胺二氢氯化物(Sigma)作底物。用分光光度计法于492nm 检测抗体的结合情况。

## 结果

### 生长及死亡

鱼在室内罐中喂养时的生长情况在所有的实验组中都相似(参见图5)。在移至室外罐中后,观察到了生长速度的差别,这可能是缘于对各组不相同的操作处理。所有的接种组都加上标签,而对照组则不用标签。

在试验过程中,所有实验组中的全部死亡数一律都低。

### 抗体对杀鲑气单胞菌的反应

用ELISA分析来自接种组和对照组的血清样品。接种后的不同时间取自不同实验的血清样品中的抗体滴度曲线示于图6和图7中。在头18周中,1:400的稀释度最适合区别抗体滴度值,而在18-61周期间,用油基疫苗接种的组的抗体水平出现如此高的反应,以致相比而言此时选择的稀释度是1:3200。

### 保护作用

免疫学试验的结果示于表1中。在第二个试验中,鱼的重量约为200g。对于这一体重的鱼而言,发现共居喂养的免疫学试验模型并非可行。尽管将共居喂养的鱼数翻倍,但对照组的死亡数仍低。为了计算存活的相对百分数,对照组的死亡率最小需达到60%。

由上述实验可得出一个结论,双佐剂疫苗的特征在于迅速地触发抗体反应,该反应在整个实验期间保持高水平上。在实验过程中,单一的油性疫苗绝不可能达到与双佐剂疫苗相同的抗体滴度水平。在生长速度方面未观察到差别。

对感染的保护作用似与抗体滴度相关。

附图说明:

图1-3表示用Norvax Trippel ISA 715(1)、Apoject 3-fural(2)和Biojec 1900(3)接种11周后的免疫学试验。接种的鱼用-----表示,对照的鱼用----表示。

图4表示存活11、22和27周后的存活相对百分数。

图5表示不同实验组中的平均重量。

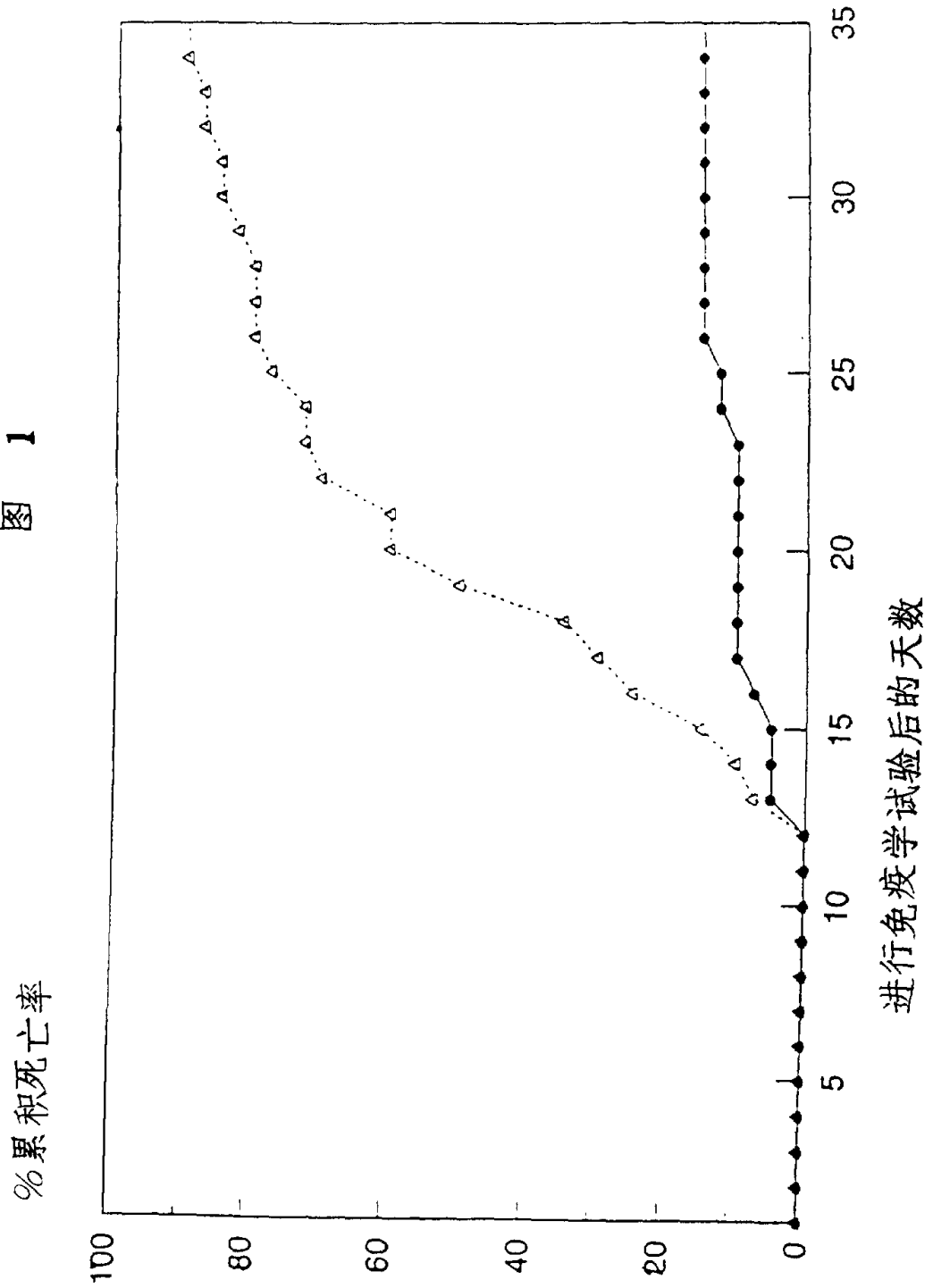
图6表示用ELISA以1:400测试各实验组的各个免疫血清。

图7表示用ELISA以1:3200测试各实验组的各个免疫血清。

表I 接种后两个不同时间间隔的两个免疫学试验中不同实验组的累计死亡数和估算的RPS。用共居喂养完成用接触传染性病原体进行的免疫学试验。

接种后 周数	接种组	鱼的死亡数	累计的死亡	存活的相
		鱼的总数	率(%)	对百分数
18周	Ag	16/25	64	0
	Ag+葡聚糖	11/25	44	27
	Ag+油	1/25	4	93
	Ag+油/葡聚糖	0/25	0	100
	对照	15/25	60	-
31周	Ag	2/25	8	-
	Ag+葡聚糖	0/25	0	-
	Ag+油	0/25	0	-
	Ag+油/葡聚糖	0/25	0	-
	对照	4/25	16	-

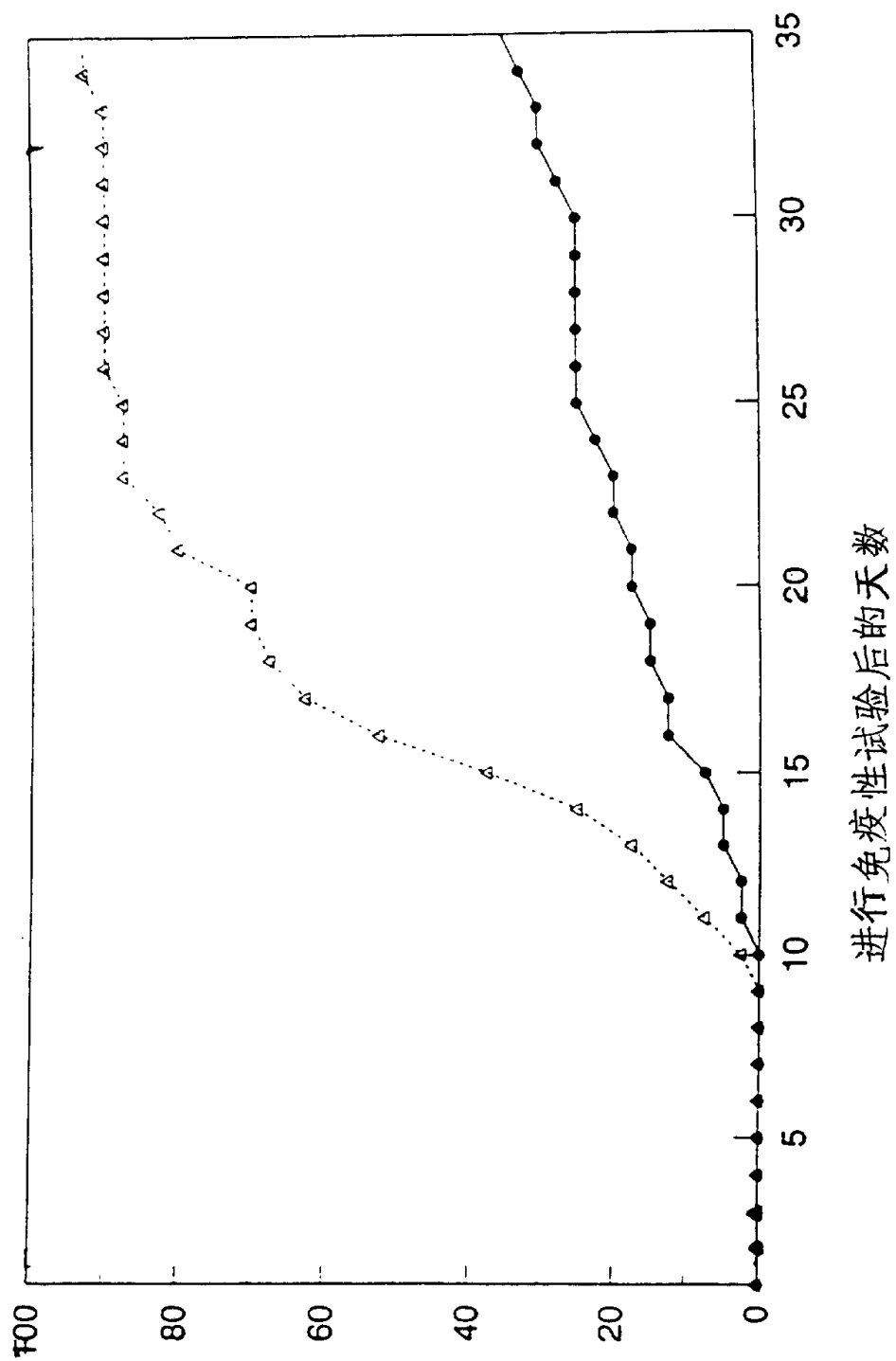
图 1





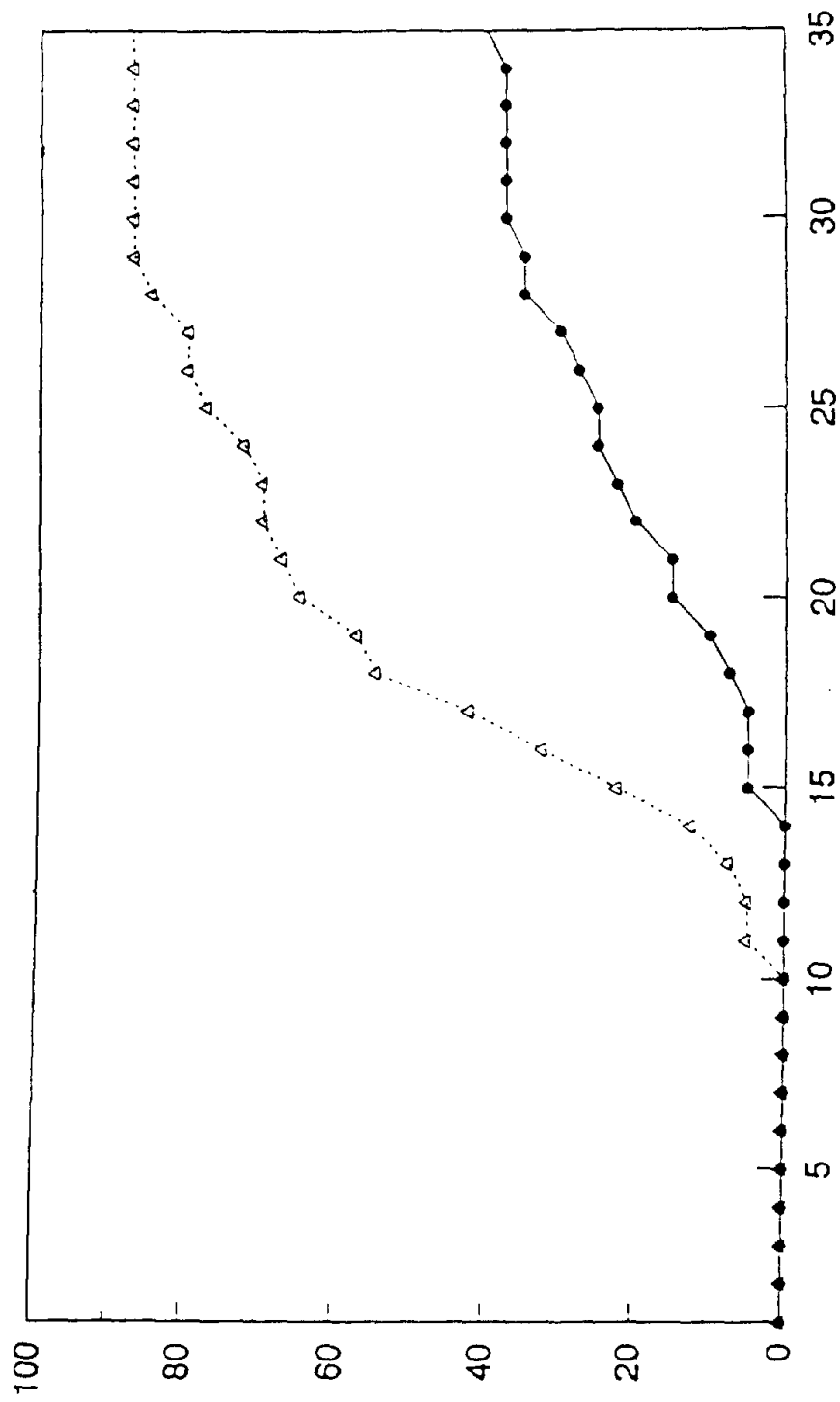
%累积死亡率

图 2



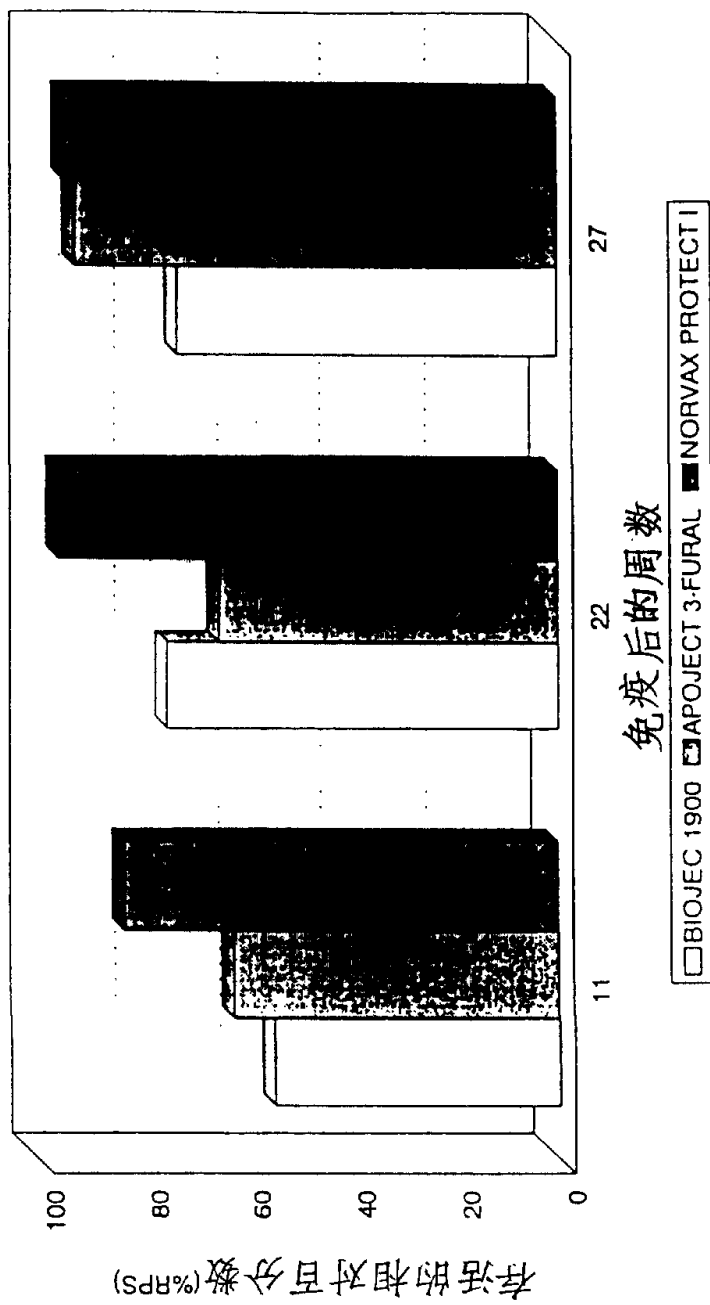
% 累积死亡率

图 3



进行免疫性试验后的天数

图 4



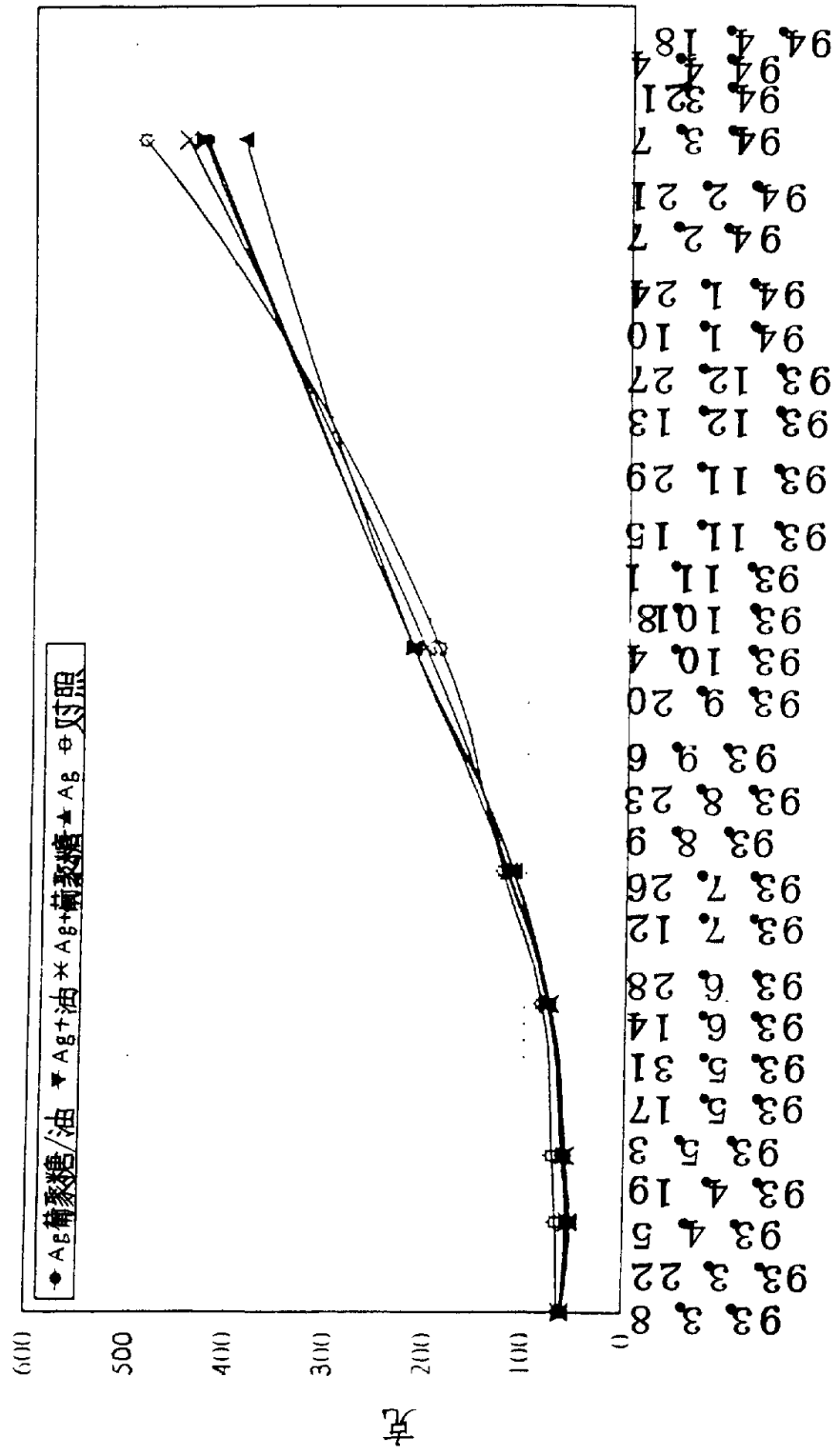
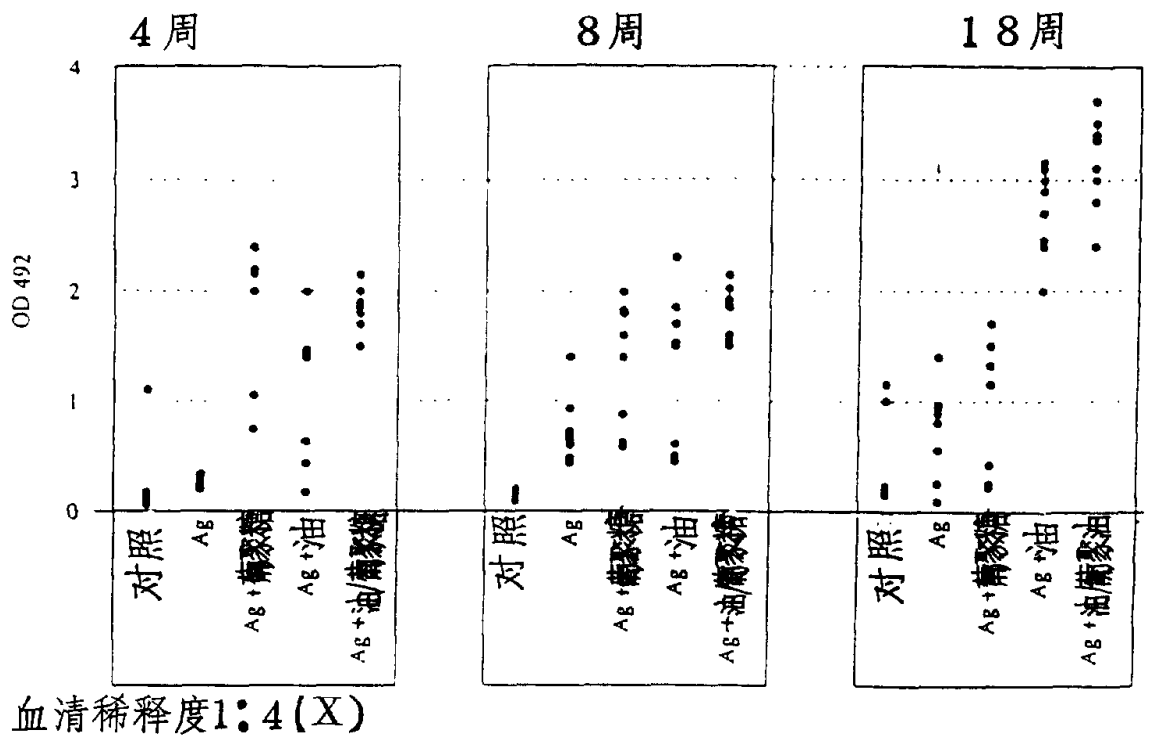
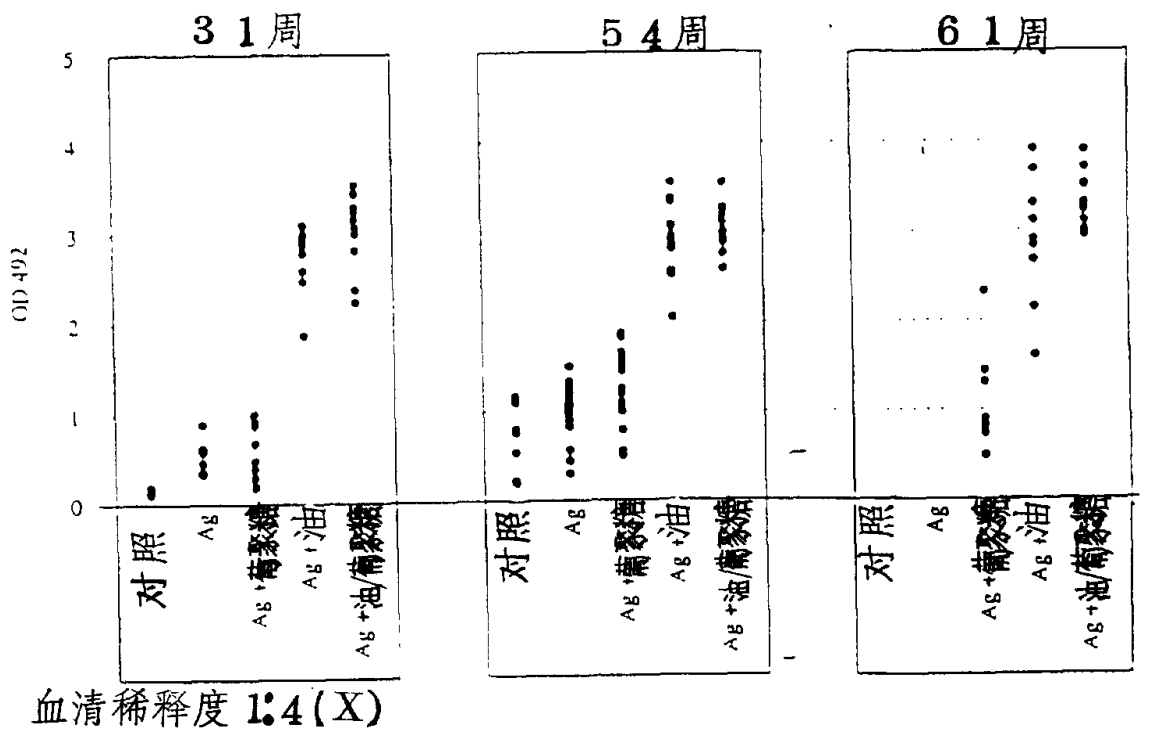


图 5

图 6

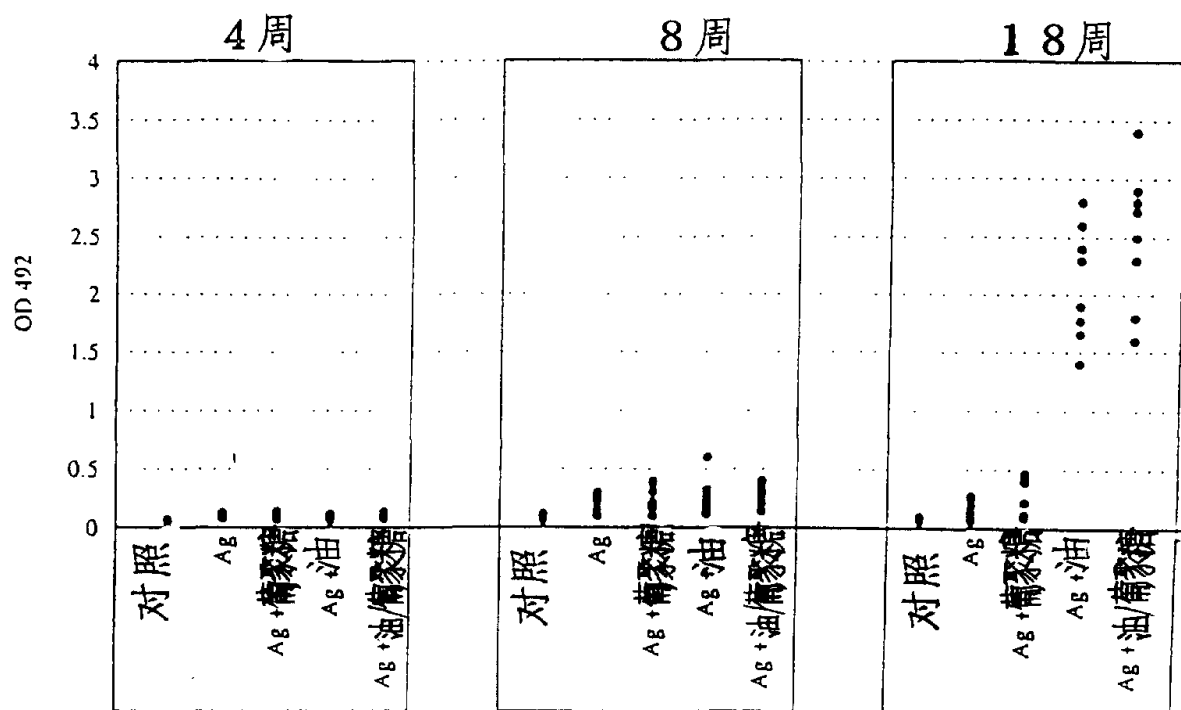


血清稀释度1:4(X)

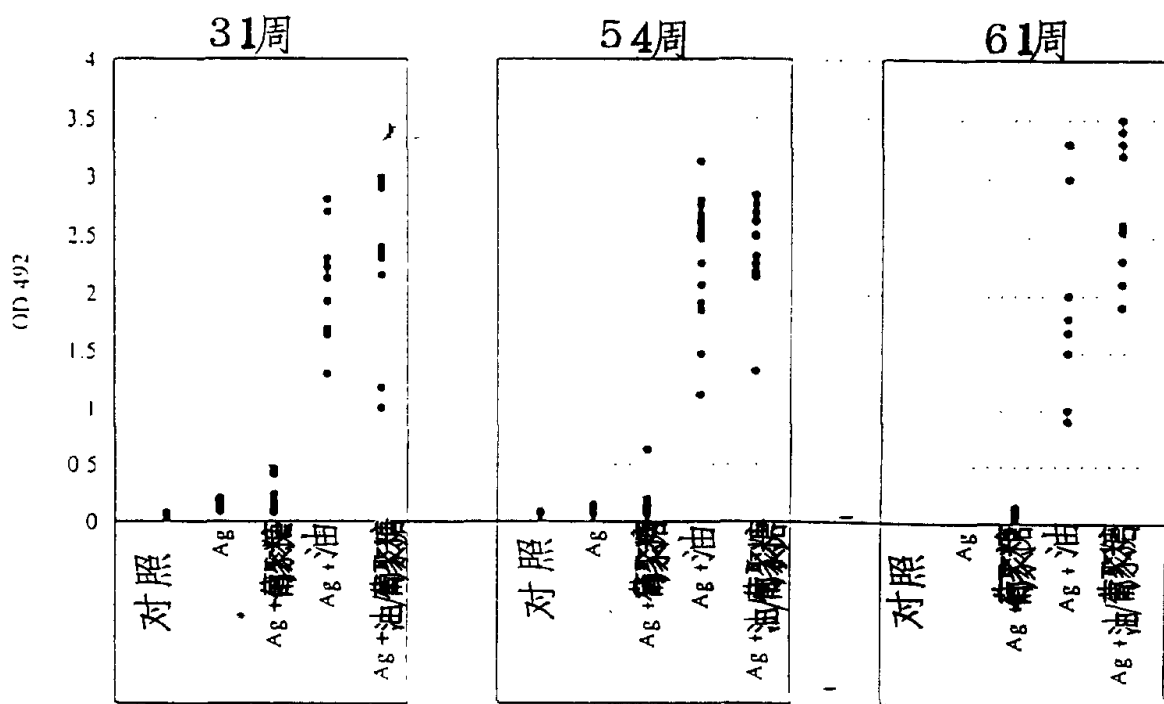


血清稀释度 1:4(X)

图 7



血清稀释度 1: 32 (X)



血清稀释度 1: 32 (X)