



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104096229 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410313922.8

(22)申请日 2014.07.03

(73)专利权人 中国医学科学院医学生物学研究所

地址 650118 云南省昆明市茭菱路379号

(72)发明人 陈振普 王海漩 胡凝珠 孙静
李建芳 施建东 乌美妮 李彦涵
胡云章

(74)专利代理机构 昆明正原专利商标代理有限公司 53100

代理人 徐玲菊

(51)Int.Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 1519227 A,2004.08.11,

CN 101058782 A,2007.10.24,

CN 102627585 A,2012.08.08,

审查员 张蕾

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

甘氨酸锌佐剂及含甘氨酸锌佐剂的疫苗

(57)摘要

本发明提供一种甘氨酸锌佐剂及含有甘氨酸锌佐剂的疫苗,即每单份疫苗剂中含有用pH=6~8的PBS溶解的0.1~1mg的甘氨酸锌佐剂。本发明提供的甘氨酸锌佐剂是药用辅料,是锌营养强化剂,毒副作用小,在免疫剂量范围内使用是安全可靠的,能够有效诱导抗原特异性的体液免疫应答,且所诱导的体液免疫应答效果优于无佐剂组,甘氨酸锌佐剂原料易得,为市售产品,制备工艺简单,成本低,性能稳定,生物学效价较高、无毒害作用,可添加于多种传统疫苗和基因工程疫苗中作为疫苗佐剂。

1. 一种含有甘氨酸锌佐剂的疫苗,其特征在于每200 μ L疫苗液中含有0.1~1mg的甘氨酸锌佐剂;并经过下列方法制备:按每单份疫苗剂加入0.1~1mg甘氨酸锌的量,在疫苗剂中加入用pH=6~8的PBS溶解的甘氨酸锌,再加生理盐水至200 μ L,按常规混合均匀,即得含有甘氨酸锌佐剂的疫苗。

2. 如权利要求1所述的含有甘氨酸锌佐剂的疫苗,其特征在于所述甘氨酸锌为氨基酸螯合物,分子式为 $Zn(NH_2CH_2COO)_2$, 分子量为213.5, 锌含量为:29.0~30.6wt%。

甘氨酸锌佐剂及含甘氨酸锌佐剂的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种甘氨酸锌佐剂及含该佐剂的疫苗,属于免疫学技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,随着疫苗研究的不断深入,特别是分子生物技术的迅速发展,研制出的新型基因工程疫苗纯度高、特异性强,但分子小,免疫原性相对较弱,难以产生有效的免疫应答。因此应用佐剂来增强其免疫原性就显得尤为重要。

[0003] 目前,已认证应用于人类的佐剂仍寥寥无几,铝盐佐剂就是其中之一。铝盐佐剂在提高抗体水平和安全方面已获得长期的实践证实,但由于其可引起过敏、诱导退行性神经病变等缺点,迫切需要开发新型疫苗佐剂以克服这些缺陷,更好的为人类服务。

[0004] 甘氨酸锌(Glycine zinc)是微量元素氨基酸螯合物,氨基酸螯合锌是一类以二价锌离子与氨基酸中给电子的氨基氮原子形成配位键,又与给电子的羰基氧原子形成五元或六元环络合物。它集氨基酸与锌元素于一体,是一种类似动物体内吸收形式和生物功能形式的锌源添加剂,具有适口性好、生物效价高、稳定性好及能提高机体免疫力等特点。

[0005] 锌是动物生长和生命活动所必需的微量元素之一,在动物机体内发挥着重要的生理生化功能,它是体内多种酶的组成成分或激活剂,具有加速人体的生长发育、改善味觉、提高智力、增强性功能、调节机体免疫、预防感染和促进伤口愈合等作用。锌作为直接参与免疫功能的重要生命元素,是免疫器官生长发育和免疫应答所必需的营养因子。锌能增强肝脏的合成能力和细胞对病毒的敏感性并参与解毒,从而改善机体的防御能力。锌参与补体反应,它可以促进补体的级联放大,起到补助和加强吞噬细胞及抗体的防御能力的作用。甘氨酸是分子量最小的氨基酸,其与微量元素反应生成的螯合物也是分子量最小的氨基酸微量元素螯合物,能更好的被肌体吸收、利用。由于氨基酸与锌都具有一定的杀菌作用,又具有相当的营养作用,两者有很好的配伍性。而氨基酸与锌的螯合结构使甘氨酸锌有良好的化学稳定性与热稳定性,具有抗干扰与缓解矿物质之间的拮抗作用、入血快、生物利用率高显著优点,已经由国家有关卫生检测部门鉴定,并确认为食品营养强化剂。有关文献表明一定浓度的甘氨酸锌对外周血淋巴细胞核酸合成呈明显激活作用,氨基酸螯合锌具有增强抗菌能力、提高免疫应答反应、促进动物细胞和体液免疫力的功效,它主要通过提高动物初次免疫应答和再次免疫应答的主要体液免疫物质含量来提高动物免疫反应,由此可推测甘氨酸锌具有免疫增强作用,可以作为疫苗佐剂应用于多种疫苗。

发明内容

[0006] 为解决现有疫苗佐剂存在的毒副作用、价格昂贵等问题,本发明提供一种安全、有效、稳定、经济的甘氨酸锌佐剂以及含有甘氨酸锌佐剂的疫苗。

[0007] 本发明所述甘氨酸锌在制备疫苗佐剂中的应用。

[0008] 所述甘氨酸锌为市购医用产品,为氨基酸螯合物,分子式为 $Zn(NH_2CH_2COO)_2$, 分子量为213.5,锌含量为29.0~30.6wt%,结构式如图1所示。

- [0009] 本发明提供的含有甘氨酸锌的疫苗,其特征在于每单份疫苗剂中含有0.1~1mg甘氨酸锌。
- [0010] 所述甘氨酸锌是用pH=6~8的PBS溶解的甘氨酸锌。
- [0011] 所述甘氨酸锌佐剂在人体中推荐剂量为:每200 μ L疫苗液中,甘氨酸锌用量不超过1mg。
- [0012] 本发明提供的含有甘氨酸锌佐剂的疫苗经过下列方法制备:
- [0013] 按每单份疫苗剂加入0.1~1mg甘氨酸锌的量,在疫苗剂中加入用pH=6~8的PBS溶解的甘氨酸锌,再加生理盐水至200 μ L,按常规混合均匀,即得含有甘氨酸锌佐剂的疫苗。
- [0014] 所述每单份疫苗剂为临床或者动物实验中使用的常规单次注射参考量。
- [0015] 所述疫苗为常规甲肝抗原、乙肝抗原、狂犬病毒抗原中的一种。
- [0016] 甘氨酸锌佐剂能显著增强抗原特异性的体液免疫反应。
- [0017] 本发明与现有技术相比具有下列优点和效果:(1)甘氨酸锌佐剂是药用辅料,是锌营养强化剂,毒副作用小,在免疫剂量范围内使用是安全可靠的;(2)甘氨酸锌佐剂能够有效的诱导抗原特异性的体液免疫应答,且其所诱导的体液免疫应答效果优于无佐剂组;(3)甘氨酸锌佐剂原料易得,为市售产品,制备工艺简单,成本低,性能稳定,生物学效价较高、无毒害作用,可添加于多种传统疫苗和基因工程疫苗中作为疫苗佐剂;(4)甘氨酸锌佐剂与疫苗联合应用能有效增强疫苗体液免疫应答,免疫效果优于无佐剂的疫苗。

附图说明

- [0018] 图1为甘氨酸锌分子结构式。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围,下列实施例中未注明具体条件的实验方法,均按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。文中所述的较佳条件实施方法仅作示范之用。

[0020] 实施例1

[0021] 本例提供的含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗是:将0.1mg甘氨酸锌溶于pH=6.5的PBS中,再与每单份HAV抗原(即动物实验使用的单次注射剂量)按常规混合均匀,得含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗。

[0022] 其中,甘氨酸锌为市购产品,为氨基酸螯合物,分子式为 $Zn(NH_2CH_2COO)_2$,分子量为213.5,锌含量为29.0~30.6wt%,购自上海金穗生物科技有限公司;HAV抗原为市购的滴度为256EU/ml的18EU HAV抗原液,购自中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所。

[0023] 实施例1所得含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗的免疫试验和效果如下:

[0024] A、免疫

[0025] 将6~8周龄、18~22g的清洁级ICR小鼠随机分为甘氨酸锌佐剂组、氢氧化铝佐剂组、无佐剂组和空白组,共四组,每组8只;所用氢氧化铝为常用的氢氧化铝胶体佐剂,其制法参照《中国药典(三部)》,(国家药典委员会.北京:人民卫生出版社.2005:118-119),在人体中的剂量为1.8~2.7mg。

[0026] 对甘氨酸锌佐剂组:注射实施例1的含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗至小鼠体内,注射剂量为每只小鼠200 μ L,其中200 μ L疫苗中含有甘氨酸锌0.5mg,甲肝抗原18EU。

[0027] 对氢氧化铝佐剂组:将氢氧化铝0.5mg与甲肝抗原18EU混合后加生理盐水至200 μ L,经腹腔皮下多点注射到小鼠体内,注射剂量为每只小鼠200 μ L。

[0028] 对无佐剂组:将甲肝抗原18EU与生理盐水混合至200 μ L,再经腹腔皮下多点注射到小鼠体内,注射剂量为每只小鼠200 μ L。

[0029] 对空白组:仅注射生理盐水,注射剂量为每只小鼠200 μ L。

[0030] 免疫方案:在第0周经腹腔皮下多点注射到小鼠体内,免疫次数为一次。

[0031] B、ELISA检测血清抗-HAV IgG水平

[0032] 在免疫后的第4、8、12、16周,采集小鼠尾静脉血,分离血清,ELISA检测血清抗-HAV IgG水平,按KPL公司生产的小鼠IgG ELISA试剂盒说明书进行检测操作。

[0033] C、数据分析

[0034] 对所获得的实验数据以SPSS16.0统计软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异的统计学意义。

[0035] 表1为使用实施例1提供的佐剂后,24周内,各实验组小鼠血清抗-HAV IgG水平(抗体效价值)。

[0036] 表1

[0037]

| 时间(周) | 甘氨酸锌佐剂组 | 氢氧化铝佐剂组 | 无佐剂组 | 空白组 |
|-------|---------|---------|--------|-----|
| 4 | 1: 376 | 1: 436 | 1: 202 | 0 |
| 8 | 1: 543 | 1: 738 | 1: 326 | 0 |
| 12 | 1: 853 | 1: 953 | 1: 524 | 0 |
| 16 | 1: 1122 | 1: 1414 | 1: 805 | 0 |
| 20 | 1: 864 | 1: 1044 | 1: 603 | 0 |
| 24 | 1: 508 | 1: 670 | 1: 300 | 0 |

[0038] 通过数据分析可以看出,从免疫后第4周开始,除空白组外各实验组都能产生抗-HAV IgG抗体,并普遍于第16周达到峰值,其中铝佐剂组所取得的免疫效果最佳,24周之内抗体都显著高于无佐剂疫苗组, $P < 0.05$,且能够维持较高的水平。甘氨酸锌0.5mg佐剂组产生抗体水平平均显著高于无佐剂疫苗组,但低于铝佐剂组,说明甘氨酸锌0.5mg剂量具有体液免疫增强作用,其体液免疫增强效果接近铝佐剂。

[0039] 实施例2

[0040] 本例提供的含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗是:将1mg甘氨酸锌溶于pH=7.5的PBS中,再与每单份HAV抗原(即动物实验中使用的单次注射剂量)按常规混合,得含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗,其中,甘氨酸锌、HAV抗原同实施例1;

[0041] 本例所得含有甘氨酸锌佐剂的甲肝疫苗的免疫试验同实施例1,结果见表2。

[0042] 表2为使用实施例2提供的佐剂后,24周内,各实验组小鼠血清抗-HAV IgG抗体水

平。

[0043] 表2

[0044]

| 时间(周) | 甘氨酸锌佐剂组 | 氢氧化铝佐剂组 | 无佐剂组 | 空白组 |
|-------|---------|---------|--------|-----|
| 4 | 1: 324 | 1: 436 | 1: 202 | 0 |
| 8 | 1: 603 | 1: 738 | 1: 326 | 0 |
| 12 | 1: 789 | 1: 953 | 1: 524 | 0 |
| 16 | 1: 1280 | 1: 1414 | 1: 805 | 0 |
| 20 | 1: 916 | 1: 1044 | 1: 603 | 0 |
| 24 | 1: 780 | 1: 870 | 1: 300 | 0 |

[0045] 通过数据分析可以看出,从免疫后第4周开始,除空白组外各实验组都能产生抗-HAV IgG抗体,并普遍于第16周达到峰值,其中铝佐剂组所取得的免疫效果最佳,24周之内抗体水平都显著高于无佐剂疫苗组, $P < 0.05$,且能够维持较高的水平。甘氨酸锌佐剂组的抗体水平也显著高于无佐剂组。但从表2中也可以看出,在24周时,甘氨酸锌1mg佐剂组的抗体水平与同期的铝佐剂组抗体水平接近,但两者间的差异不具有统计学意义($P < 0.05$),表明1mg甘氨酸锌佐剂组能有效增强体液免疫反应并且这种效应可持续较长时间。

[0046] 实施例3

[0047] 本例提供的含有甘氨酸锌佐剂的乙肝疫苗是:将0.5mg甘氨酸锌溶于pH=7.5的PBS中,再与每单份乙肝表面抗原(即动物实验中使用的单次注射剂量)按常规混合,得含有甘氨酸锌佐剂的乙肝疫苗。

[0048] 其中,甘氨酸锌同实施例1,乙肝表面抗原为常规的含乙肝表面抗原 $1\mu\text{g}$ 的市购产品,购自中国医学科学院医学生物学研究所。

[0049] 本例所得含有甘氨酸锌佐剂的乙肝疫苗的免疫试验同实施例1,效果见表3。

[0050] 表3为使用实施例3提供的佐剂后,24周内,各实验组小鼠血清抗-乙肝表面抗原IgG抗体水平。

[0051] 表3

[0052]

| 时间(周) | 甘氨酸锌佐剂组 | 氢氧化铝佐剂组 | 无佐剂组 | 空白组 |
|-------|---------|---------|--------|-----|
| 4 | 1: 308 | 1: 424 | 1: 215 | 0 |
| 8 | 1: 587 | 1: 726 | 1: 306 | 0 |
| 12 | 1: 770 | 1: 946 | 1: 544 | 0 |
| 16 | 1: 1265 | 1: 1374 | 1: 786 | 0 |
| 20 | 1: 905 | 1: 1214 | 1: 586 | 0 |
| 24 | 1: 774 | 1: 654 | 1: 286 | 0 |

[0053] 通过数据分析可以看出,从免疫后第4周开始,除空白组外各实验组都能产生抗-乙肝表面抗原 IgG 抗体,并普遍于第16周达到峰值,其中铝佐剂组所取得的免疫效果最佳,24周之内抗体水平都显著高于无佐剂疫苗组, $P < 0.05$,且能够维持较高的水平。甘氨酸锌佐剂组的抗体水平也显著高于无佐剂组。但从表3中也可以看出,在24周时,甘氨酸锌1mg佐剂组的抗体水平略高于同期的铝佐剂组抗体水平,但两者间的差异不具有统计学意义($P < 0.05$),表明0.5mg甘氨酸锌佐剂组能有效增强体液免疫反应并且这种效应可持续较长时间。

[0054] 实施例4

[0055] 本发明提供的含有甘氨酸锌佐剂的疫苗是:将1mg甘氨酸锌溶于pH=8的PBS中,再与每单份狂犬病毒抗原(即动物实验中使用的单次注射剂量)按常规混合,得含有甘氨酸锌佐剂的狂犬疫苗。

[0056] 其中,甘氨酸锌同实施例1;狂犬病毒抗原为常规的含狂犬病毒抗原0.125IU的市购产品,购自大连汉信生物制药有限公司。

[0057] 本例所得含有甘氨酸锌佐剂的狂犬疫苗的免疫试验同实施例1,效果见表4。

[0058] 表4为使用实施例4提供的佐剂后,24周内,各实验组小鼠血清抗狂犬病毒IgG抗体水平。

[0059] 表4

[0060]

| 时间 (周) | 甘氨酸锌 1mg 佐剂 组 | 氢氧化铝佐剂组 | 无佐剂组 | 空白组 |
|-----------|------------------|---------|--------|-----|
| 4 | 1: 306 | 1: 431 | 1: 205 | 0 |
| 8 | 1: 579 | 1: 730 | 1: 317 | 0 |
| 12 | 1: 759 | 1: 950 | 1: 539 | 0 |
| 16 | 1: 1255 | 1: 1299 | 1: 777 | 0 |
| 20 | 1: 896 | 1: 1208 | 1: 595 | 0 |
| 24 | 1: 769 | 1: 649 | 1: 279 | 0 |

[0061] 通过数据分析可以看出,从免疫后第4周开始,除空白组外各实验组都能产生抗狂犬病毒 IgG抗体,并普遍于第16周达到峰值,其中铝佐剂组所取得的免疫效果最佳,24周内抗体水平都显著高于无佐剂疫苗组, $P < 0.05$,且能够维持较高的水平。甘氨酸锌佐剂组的抗体水平也显著高于无佐剂组。但从表4中也可以看出,在24周时,甘氨酸锌1mg佐剂组的抗体水平与同期的铝佐剂组抗体水平接近,但两者间的差异不具有统计学意义($P < 0.05$),表明1mg甘氨酸锌佐剂组能有效增强体液免疫反应并且这种效应可持续较长时间。

[0062] 实施例5

[0063] 本发明提供的含有甘氨酸锌佐剂的疫苗是:将0.8mg甘氨酸锌溶于pH=6的PBS中,再与每单份狂犬病毒抗原(即动物实验中使用的单次注射剂量)按常规混合,得含有甘氨酸锌佐剂的狂犬疫苗。

[0064] 其中,甘氨酸锌同实施例1;狂犬病毒抗原为常规的含狂犬病毒抗原0.125IU的市购产品,购自大连汉信生物制药有限公司。

[0065] 本例所得含有甘氨酸锌佐剂的狂犬疫苗的免疫试验同实施例1,效果见表5。

[0066] 表5为使用实施例5提供的佐剂后,24周内,各实验组小鼠血清抗狂犬病毒IgG抗体水平。

[0067] 表5

[0068]

| 时间 (周) | 甘氨酸锌1mg佐剂 组 | 氢氧化铝佐剂组 | 无佐剂组 | 空白组 |
|-----------|----------------|---------|--------|-----|
| 4 | 1: 306 | 1: 431 | 1: 205 | 0 |
| 8 | 1: 579 | 1: 730 | 1: 317 | 0 |
| 12 | 1: 759 | 1: 950 | 1: 539 | 0 |
| 16 | 1: 1255 | 1: 1299 | 1: 777 | 0 |
| 20 | 1: 895 | 1: 1209 | 1: 595 | 0 |
| 24 | 1: 766 | 1: 648 | 1: 279 | 0 |

[0069] 通过数据分析可以看出,从免疫后第4周开始,除空白组外各实验组都能产生抗-狂犬病毒 IgG抗体,并普遍于第16周达到峰值,其中铝佐剂组所取得的免疫效果最佳,24周之内抗体都显著高于无佐剂疫苗组, $P < 0.05$,且能够维持较高的水平。甘氨酸锌1mg佐剂组产生抗体水平平均显著高于无佐剂疫苗组,但低于铝佐剂组,说明甘氨酸锌1mg剂量具有体液免疫增强作用,其体液免疫增强效果接近铝佐剂。

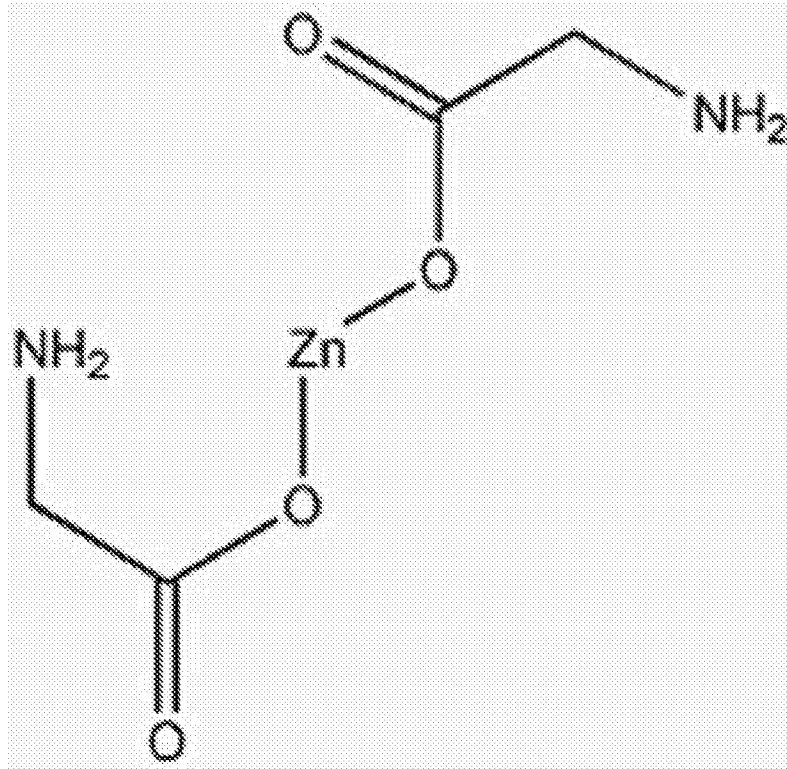


图1