



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106310249 A

(43) 申请公布日 2017. 01. 11

(21) 申请号 201510332905. 3

(22) 申请日 2015. 06. 14

(71) 申请人 黑龙江省百洲生物工程有限公司

地址 151100 黑龙江省肇东市经济开发区肇
昌路 12 公里处黑龙江省百洲生物工程
有限公司

(72) 发明人 李山峰 张越 尹鹏 侯立立
许翔 杨艳坤 马金花 陈彦峰
尹建丽

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61K 9/107(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种油乳剂灭活苗新型佐剂的制备及应用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种油乳剂灭活苗新型佐剂的制备方法及其在油乳剂灭活苗中的应用方法,属于兽用油乳剂灭活疫苗的制备及应用技术领域。本发明公开了一种油乳剂灭活苗新型佐剂的制备方法,包括以下步骤:取转移因子稀释液过滤除菌,按比例添加吐温-80,制备成水相;取注射用白油与司本-80按比例制备成油相;水相与油相按照1:2~1:3比例在15~35℃下进行乳化,转速为2500rpm~3500rpm,时间为15~30min。本发明公开了一种利用该佐剂制备油乳剂灭活苗的方法,包括以下步骤:将以上佐剂与常规疫苗按照1:3~1:4的比例进行乳化混匀制备成新型佐剂疫苗。本发明制备出的新型佐剂疫苗免疫效果明显优于常规疫苗,免疫空白期短,免疫抗体水平均匀且高于常规疫苗。

1. 一种兽用油乳剂疫苗新型佐剂的应用方法,其特征在于,由体积比 1 : 3 ~ 1 : 4 将新型佐剂与常规油乳剂疫苗进行乳化混合,其中主要成分为转移因子稀释液、吐温 -80、疫苗抗原、司本 -80、注射用白油、硬脂酸铝。

2. 如权利要求 1 所述的新型佐剂,其特征在于,水相与油相比为 1 : 2 ~ 1 : 3。

3. 如权利要求 1 所述的新型佐剂的应用方法,其特征在于,新型佐剂与常规油乳剂疫苗体积比为 1 : 3 ~ 1 : 4。

4. 如权利要求 1 所述的新型佐剂制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

取转移因子稀释液经过 0.22um 过滤除菌,按上述比例添加吐温 -80,37℃ 摇匀,孵育 1 ~ 2h,制备成水相,油相按照比例进行熬制,121℃ 灭菌 30 分钟。在 15 ~ 35℃ 下进行乳化,转速为 2500rpm ~ 3500rpm,时间为 15 ~ 30min。

5. 如权利要求 1 所述的转移因子稀释液,其特征在于,所述的转移因子稀释液需要经过 0.22um 除菌过滤,多肽含量为 2.5 ~ 4.5mg/ml,核糖含量为 30-100ug/ml,转移因子生产原料来源为肉鸡脾、蛋鸡脾、猪脾中的一种或者多种。

6. 如权利要求 1 所述新型佐剂,其特征为的原料组成如下

水相:

转移因子 94% ~ 96%

吐温 -80 4% ~ 6%

油相:

司本 -80 5% ~ 6%

注射用白油 95% ~ 94%

硬脂酸铝 0.5% ~ 2%。

一种油乳剂灭活苗新型佐剂的制备及应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种油乳剂灭活苗新型佐剂的制备,以及该佐剂在油乳剂灭活苗中的应用方法,该发明可以实现增强灭活苗免疫效果的技术要求。

背景技术

[0002] 我国养殖环境复杂,动物疫病和农药、兽药药残对肉食品出口造成严重损失。减少动物疾病,避免长期应用抗生素,发展优质、无公害肉食品,才能保证我国养殖业的持续健康发展。

[0003] 目前,预防和控制动物传染病除安全措施外,主要依靠疫苗免疫,特别是通过油乳剂疫苗的免疫预防。对于油乳剂灭活苗,通常情况在免疫 14 天后能够产生抗体,如何能够在更短的时间激起免疫,提高免疫效果,需要添加佐剂以增强它们诱导免疫反应的能力。

[0004] 在灭活苗中,佐剂与抗原同时应用,能够增强集体针对抗原的免疫应答能力,或改变免疫反应类型。其功能主要有:使用部位招揽免疫细胞和免疫分子,增强免疫应答;增强疫苗抗原传递;增进免疫接触,增强弱抗原的免疫原性和免疫记忆,改变抗原的构型;改变体液抗体的种类、IgG 亚型和抗体的亲和性,以及细胞免疫和黏膜免疫效应。理想的佐剂不仅没有免疫原性并能增强机体的免疫应答,能够使机体获得最佳的保护性免疫和免疫记忆。有关免疫增强剂方面的研究,目前还是比较多的,主要集中在中药多糖、细胞因子、干扰素、聚肌胞等,另外还有一种被普遍认可免疫增强剂——转移因子,目前兽药行业已经有多家在批量生产。转移因子(Transfer Factor,简称 TF)是人或动物致敏白细胞释放的多种因子中的一种能够转移致敏信息的低分子物质。自从 1995 年 Lawrence 发现转移因子(Transfer factor)以来。人们对转移因子的研究越来越多。由于其分子量小、无毒、无抗原性、不引起过敏反应、不产生中和抗体且可超越种系界限应用等优点,并且在治疗免疫缺陷、恶性肿瘤、各种感染性疾病等方面的试验上均取得一定的疗效,因此转移因子在临床应用上具有广阔的前景。

[0005] 转移因子具有可透析性,能与抗原结合而本身却无抗原性。转移因子带有致敏淋巴细胞的特异性免疫信息,能够特异的将供者所具有的抗原性及其敏锐的特异性转移给一个免疫反应阴性的受者,同时受者产生一迟发型超敏反应能力。转移因子具有传递免疫信息、激发免疫细胞活性、调节免疫功能、增强机体非特异性免疫功能等作用,被誉为 T 细胞活性的触发剂,细胞免疫的增强剂、细胞免疫调节剂及干扰素产生启动剂。

[0006] 转移因子溶液配合弱毒疫苗使用,已经被证实可提高疫苗的免疫效果,但尚未有报道将转移因子作为油乳剂灭活苗佐剂的研究报道。

发明内容

[0007] 本发明为灭活疫苗提供了一种新的免疫佐剂——转移因子,以及利用该佐剂制备灭活疫苗的新方法。该疫苗不但能够缩短油乳剂灭活苗的空白期,也能提高灭活苗的抗体滴度,对提高疫苗保护力具有明显效果。

[0008] 本发明是通过如下技术方案实现：

[0009] 本发明佐剂的原料组成为：

[0010] 水相：

[0011] 转移因子 94%~96%

[0012] 吐温-80 4%~6%

[0013] 油相：

[0014] 司本-80 5%~6%

[0015] 注射用白油 95%~94%

[0016] 硬脂酸铝 0.5%~2%

[0017] 其中所述的原料百分比为体积比；

[0018] 其中转移因子的多肽含量为 2.5~5.5mg/ml,核糖含量为 50~100ug/ml,转移因子来源为肉鸡脾、蛋鸡脾、或者猪脾。

[0019] 其中水相与油相的比例为 1 : 2 ~ 1 : 3。

[0020] 制备完成的佐剂与常规疫苗按照 1 : 3 ~ 1 : 4 比例混合乳化制备而成。

[0021] 取上述原料,按照如下工艺制备成疫苗佐剂

[0022] 本发明疫苗佐剂的制备方法为：

[0023] 取转移因子稀释液经过 0.22um 过滤除菌,按上述比例添加吐温-80,37℃摇匀,孵育 1~2h,制备成水相,油相按照上述比例进行熬制,121℃灭菌 30 分钟。在 15~35℃下进行乳化,转速为 2500rpm~3500rpm,时间为 15~30min。乳化完成后,与常规疫苗按照 1 : 3 ~ 1 : 4 的比例混合,继续乳化 10~15min,乳化转速为 2500rpm~3500rpm,待疫苗剂型及稳定性达到要求即可。

[0024] 本发明制作的油乳剂疫苗,将转移因子作为免疫增强剂加入到疫苗中,可以有效提高免疫细胞的应答,加快抗原的递呈,进而缩短了抗原的免疫空白期,提高了抗体水平,能够激活免疫系统,消除免疫抑制。

具体实施方式

[0025] 实施例 1：

[0026] 1. 佐剂制备

[0027] 1.1. 将转移因子稀释液经过 0.22um 聚醚砜材质滤芯过滤,取样做无菌、多肽含量、核糖含量检测,无菌检验全部阴性,多肽含量为 2.8mg/ml,核糖含量为 58ug/ml。

[0028] 1.2. 将 4 份灭菌吐温-80 加入到 96 份转移因子稀释液中,混匀,37℃条件下摇匀 1h,取出放于室温。

[0029] 1.3. 将 1 份硬脂酸铝加入到 94 份白油中,加热待白油透亮后加入司本-806 份,121℃灭菌 30min。

[0030] 1.4. 将油相与水相按照 3 : 1 比例进行乳化,乳化温度为 20℃,乳化转速为 3000rpm,乳化 20min。

[0031] 2. 常规疫苗制备

[0032] 2.1. 取 HA 效价为 1 : 1024 的新城疫以及 HA 效价为 1 : 1024 的禽流感 (H9 亚型) 病毒液分别加入甲醛溶液进行灭活,两种灭活液分别为 48 份。

[0033] 2.2. 取 4 份吐温 -80 放于灭菌柜中,121℃灭菌 30min 后冷却至室温,将吐温 -80 加到新城疫与禽流感灭活液中,每种加入 2 份。

[0034] 2.3 将 1 份硬脂酸铝加入到 94 份白油中,加热待白油透亮后加入司本 -806 份,121℃灭菌 30min。

[0035] 2.4 将油相与水相按照 3 : 1 比例进行乳化,乳化温度为 20℃,乳化转速为 3000rpm,乳化 20min。

[0036] 3. 含佐剂疫苗制备

[0037] 将佐剂与常规疫苗按照 2 : 7 比例混合,乳化 10min,乳化转速为 3000rpm。

[0038] 对照例 1

[0039] 以常规疫苗为对照案例,制备工艺同“实施案例 1 中‘2. 常规疫苗制备’”。

[0040] 对照例 2

[0041] 1. 空白油乳剂制备

[0042] 1.2. 将 4 份灭菌吐温 -80 加入到 96 份灭菌生理盐水中,混匀,37℃条件下摇匀 1h,取出放于室温。

[0043] 1.3. 将 1 份硬脂酸铝加入到 94 份白油中,加热待白油透亮后加入司本 -80 6 份,121℃灭菌 30min。

[0044] 1.4. 将油相与水相按照 3 : 1 比例进行乳化,乳化温度为 20℃,乳化转速为 3000rpm,乳化 20min。

[0045] 2. 常规疫苗制备

[0046] 2.1. 取 HA 效价为 1 : 1024 的新城疫以及 HA 效价为 1 : 1024 的禽流感 (H9 亚型) 病毒液分别加入甲醛溶液进行灭活,两种灭活液分别为 48 份。

[0047] 2.2. 取 4 份吐温 -80 放于灭菌柜中,121℃灭菌 30min 后冷却至室温,将吐温 -80 加到新城疫与禽流感灭活液中,每种加入 2 份。

[0048] 2.3 将 1 份硬脂酸铝加入到 94 份白油中,加热待白油透亮后加入司本 -806 份,121℃灭菌 30min。

[0049] 2.4 将油相与水相按照 3 : 1 比例进行乳化,乳化温度为 20℃,乳化转速为 3000rpm,乳化 20min。

[0050] 3. 空白对照样疫苗制备

[0051] 将空白油乳剂与常规疫苗按照 2 : 7 比例混合,乳化 10min,乳化转速为 3000rpm。

[0052] 比较实施案例 1、对照例 1、对照例 2 质量效果

[0053] 1 形状

[0054] 1.1 外观 :三者均为乳白色乳剂。

[0055] 1.2 剂型 :三者均呈油包水型。在盛有纯化水的平皿中,滴两滴乳剂,观察其形态,是否分散,以及分散开的时间。结果显示两者形态均为规则圆形、不扩散。

[0056] 1.3 黏度 :用数字粘度计进行检测。结果可以看出,本发明与常规疫苗的黏度无明显差别。结果见表 1。

[0057] 1.4 稳定性 :

[0058] (1) 取 10ml 疫苗置于离心管中以 3000r/min 离心 15min,管底析出的水相均小于

0.5ml。

[0059] (2) 取疫苗在 37℃左右放置 21d,结果显示不分层,没有破乳现象。

[0060] 2 无菌检验

[0061] 按《中华人民共和国兽药典》2010 版附录的相关规定进行检验,完全符合,均无细菌生长。

[0062] 3 安全性检验

[0063] 用 21 日龄 SPF 鸡,每种疫苗免疫 10 只,每只肌肉注射疫苗 1ml,另设空白对照 5 只。每天观察,接种后 14 天剖检,观察局部及全身反应以及观察局部疫苗吸收情况。结果表明,本发明疫苗与常规疫苗相比,均没有出现不良反应。结果见表 1

[0064] 表 1 三种疫苗物理形状及安全检验对比

[0065]

案例	黏度 (cp)	稳定性		安全性检验
		3000r/min 离心 15min	37℃, 21d	
实施案例	45	无水相析出	无分层	完全吸收, 无不良反应
对照例 1	49	无水相析出	无分层	完全吸收, 无不良反应
对照例 2	42	无水相析出	无分层	完全吸收, 无不良反应

[0066] 4 效力检验

[0067] 4.1 新城疫部分

[0068] 血清学方法:用 30-60 日龄 SPF 鸡,每种疫苗免疫 10 只鸡,每只皮下或肌肉注射 20ul,空白对照 5 只。接种后 7、14、21、28 日进行采血,分离血清,进行 HI 抗体效价测定。结果显示本发明疫苗比常规疫苗 HI 抗体要高出 1 个滴度左右,常规疫苗在 7 天很难激起体液免疫,产生免疫保护,而本发明在 7 天有明显的免疫抗体产生,比对照例高出 0.9 个滴度,另外抗体离散度也明显低于对照例,表明本发明疫苗保护力明显优于常规疫苗。结果见表 2。

[0069] 表 2 三种疫苗新城疫部分效力检验结果对比

[0070]

检测项目	采血时间(接种 后计算)	实施案例 (log ₂)	对照例 1	对照例 2	空白对照
	14 天	5.6	4.7	4.3	1.8
	21 天	6.7	5.7	5.8	1.8
	28 天	7.7	6.5	6.1	2.0
抗体离散度 (标准差计算)	7 天	0.57	0.42	0.52	0.55
	14 天	0.7	1.06	0.82	0.45
	21 天	0.82	1.16	1.23	0.45
	28 天	0.82	1.08	1.20	-

[0071] 4.2 禽流感部分

[0072] 血清学方法：用 3～4 周龄 SPF 鸡，每种疫苗免疫 10 只鸡，每只皮下或肌肉注射 0.3ml，空白对照 5 只。接种后 7、14、21、28 日进行采血，分离血清，进行 HI 抗体效价测定。结果显示本发明疫苗比常规疫苗 HI 抗体要高出 1 个滴度左右，而且抗体离散度较低，表明本发明疫苗保护力明显高于常规疫苗。评价结果见表 3。

[0073] 表 3 三种疫苗禽流感部分效力检验结果对比表

[0074]

检测项目	采血时间(接种 后计算)	实施案例	对照例 1	对照例 2	空白对照
抗体几何平均值 (log ₂)	7 天	3.6	2.9	3.0	1.7
	14 天	8.6	7.4	7.6	1.9
	21 天	9.8	8.6	8.3	2.0
	28 天	10.2	9.1	8.9	1.9
抗体离散度 (标准差计算)	7 天	0.52	0.57	0.47	0.48
	14 天	0.97	1.17	1.58	0.32
	21 天	0.92	1.26	1.49	-
	28 天	0.92	0.99	1.37	0.32

[0075]

[0076] 上述结果清楚的表明，本发明新型佐剂疫苗所显示的免疫作用与常规疫苗相比具有三点优势：一是抗体起到快，免疫空白期短；二是抗体滴度高，比常规疫苗高出 1 个滴度左右；三是抗体离散度低，抗体水平比较均匀。

[0077] 综合评价，本发明新型佐剂对传统疫苗的免疫增强作用明显，对提高疫苗质量，对保护动物健康，对保证我国养殖业的持续健康发展有重要意义。

[0078] 上述详细说明系针对本发明之一可行实施例之具体说明，惟该实施案例并非以限制本发明之专利范围，凡未脱离本发明技艺精神所为之等效实施或变更，均包含于本案例之专利范围中。