



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104013955 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201410272743. 4

A61P 37/02(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 18

(71) 申请人 中国科学院过程工程研究所

地址 100190 北京市海淀区中关村北二条 1 号

(72) 发明人 马光辉 吴颀 杨柳青 夏宇飞  
齐峰 范清泽

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋 杨晞

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61K 47/44(2006. 01)

A61K 47/14(2006. 01)

A61K 47/22(2006. 01)

A61K 47/06(2006. 01)

A61K 9/107(2006. 01)

权利要求书3页 说明书31页 附图3页

(54) 发明名称

一种不含表面活性剂的水包油乳液及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种不含表面活性剂的水包油乳液,所述乳液包括可代谢的油相、水相以及分散在水相中的具有生物相容性的油水两亲性的固体颗粒,其中,所述油相包括角鲨烯或 / 和母育酚,所述水相为纯化水、注射用水、甘油水溶液、缓冲盐水溶液或临床上可用输液中的任意一种或者至少两种的组合,所述固体颗粒的平均粒径在纳米到微米级别。本发明提供的乳液可作为疫苗佐剂、药物递送或缓控释载体应用,乳液性质可控调控,所得乳液稳定,避免了表面活性剂的使用,能够降低对人体的毒害和环境污染。

1. 一种不含表面活性剂的水包油乳液,其特征在于,所述乳液包括可代谢的油相、水相以及分散在水相中的具有生物相容性的油水两亲性的固体颗粒,其中,所述油相包括角鲨烯或 / 和母育酚,所述水相为纯化水、注射用水、甘油水溶液、缓冲盐水溶液或临床上可用输液中的任意一种或者至少两种的组合,所述固体颗粒的平均粒径在纳米到微米级别。

2. 如权利要求 1 所述的水包油乳液,其特征在于,所述母育酚是  $\alpha$ -生育酚或其衍生物;

优选地,所述油相还包括任何对受体无毒并可通过代谢作用转化的植物油、鱼油、动物油或合成油,优选自大豆油、米格列醇、中链油、鱼油、维生素 E、维生素 E 琥珀酸酯、维生素 E 醋酸酯、红花油、玉米油、沙棘油、亚麻子油、花生油、茶油、葵花籽油、杏仁油、薏仁油、月见草油、芝麻油、棉籽油、蓖麻油、低芥酸菜子油、油酸乙酯、油酸、亚油酸乙酯、月桂酸异丙酯、内豆蔻酸异丙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯、辛酸甘油三酯或癸酸甘油三酯中的任意一种或者至少两种的组合。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的水包油乳液,其特征在于,所述水相为注射用水、磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液或 Tris 缓冲液中的任意一种或者至少两种的组合;

优选地,所述磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液或 Tris 缓冲液的 pH 值独立地为 5.0 ~ 8.1,优选为 6.0 ~ 8.0。

4. 如权利要求 1-3 之一所述的水包油乳液,其特征在于,所述水相中含有单价或多价抗原,所述抗原选自人类抗原、非人类动物抗原、植物抗原、细菌抗原、真菌抗原、病毒抗原、寄生虫抗原或肿瘤抗原中的任意一种或者至少两种的组合;

优选地,所述抗原来自鸡胚培养、细胞培养、携带者体液、器官或组织中纯化分离所得、重组基因表达或化学合成所得,优选所述抗原选自减毒疫苗、灭活疫苗、裂解疫苗、亚单位疫苗、多糖结合疫苗、重组疫苗或 DNA 疫苗等中的任意一种或者至少两种的组合;

优选地,所述抗原为包含来自至少三种流感季节性株的病毒抗原或抗原性制剂,并且任选包含至少一种与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜能的流感病毒株的病毒抗原或抗原性制剂,其中,与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜能的流感病毒株选自:

人类流感病毒中 A、B、C 型,包含 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N3, H10N7;

猪型流感病毒 H1N1, H1N2, H3N1, H3N2;

狗或马型流感病毒 H7N7, H3N8;

或禽流感病毒 H5N1, H7N2, H1N7, H7N3, H13N6, H5N9, H11N6, H3N8, H9N2, H5N2, H4N8, H10N7, H2N2, H8N4, H14N5, H6N5 和 H12N5 中的一种或一种以上的流感病毒组合;

优选地,所述水相中还包括药用辅助物质,优选 pH 调节剂或 / 和缓冲剂,进一步优选自乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、人血清清蛋白、必需氨基酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖、无水 D-海藻糖、甘露醇、甘露糖、淀粉或明胶中的任意一种或者至少两种的组合。

5. 如权利要求 1-4 之一所述的水包油乳液,其特征在于,所述固体颗粒选自铝盐、钙盐、多糖、多糖衍生物或高分子聚合物中的任意一种或者至少两种的混合物;

优选地,所述铝盐为氢氧化铝或 / 和磷酸铝;

优选地,所述钙盐为磷酸钙或 / 和碳酸钙;

优选地,所述多糖选自壳聚糖、海藻酸、明胶、淀粉、葡聚糖、魔芋葡甘聚糖、肝素、果胶类多糖、透明质酸、硫酸软骨素、壳聚糖盐、海藻酸盐、明胶盐、葡萄糖盐、魔芋葡甘聚糖盐、肝素盐、果胶类多糖盐、透明质酸盐或硫酸软骨素盐中的任意一种或者至少两种的组合,优选壳聚糖、海藻酸盐、明胶、淀粉或葡聚糖中的任意一种或者至少两种的组合;

优选地,所述多糖衍生物为对多糖进行季铵化、羧甲基化、羟甲基化、烷基化、酰基化、磺化、硝化或卤化等衍生反应后所得的多糖衍生物,优选为对壳聚糖、海藻酸、明胶、淀粉或葡聚糖中的任意一种或者至少两种的组合进行季铵化、羧甲基化、羟甲基化、烷基化、酰基化、磺化、硝化或卤化等衍生反应后所得的多糖衍生物;

优选地,所述高分子聚合物包括聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酞或聚氰基丙烯酸酯及其共聚物,所述共聚物的共聚单体优选聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酞或聚氰基丙烯酸酯中的任意一种或者至少两种的组合。

优选地,所述高分子聚合物是聚( $\alpha$ -羟酸)及其共聚物,优选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)或聚(丙交酯-共-乙交酯),最优选聚(丙交酯-共-乙交酯);

优选地,在聚(丙交酯-共-乙交酯)中,丙交酯与乙交酯的链段摩尔比为10:90-90:10;

优选地,所述固体颗粒选自氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、碳酸钙、壳聚糖、海藻酸盐、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚乙二醇-乳酸共聚物中的任意一种或者至少两种的混合物,进一步优选自氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚乙二醇-乳酸共聚物中的任意一种或者至少两种的混合物,最优选聚乳酸-羟基乙酸共聚物。

6. 如权利要求1-5之一所述的水包油乳液,其特征在于,对固体颗粒的表面进行亲水修饰、疏水修饰、覆层或接枝改性;

优选地,所述固体颗粒的表面或内部吸附、偶联或包埋靶向物质、荧光标记物、同位素标记物、环境响应物质、细胞因子、抗体或免疫调节剂;

优选地,所述环境响应物质选自带有pH敏感、热敏感或生物活性物质敏感的基团;

优选地,所述固体颗粒的表面或内部吸附、偶联或包埋抗原;

优选地,所述固体颗粒的平均粒径在1nm~10 $\mu$ m之间,优选10nm~5 $\mu$ m之间;

优选地,所述固体颗粒粒径分布系数span值低于1.0;

优选地,固体颗粒在水相中的质量浓度在0.1~20wt%,优选为0.5~10wt%,进一步优选为1~8wt%。

7. 如权利要求1-6之一所述的水包油乳液,其特征在于,所述乳液包括可代谢的油相、水相以及分散在水相中的具有生物相容性的油水两亲性的固体颗粒,其中,所述油相为角鲨烯,所述水相为纯化水、注射用水、甘油水溶液、缓冲盐水溶液或临床上可用输液中的任意一种或者至少两种的组合,所述固体颗粒为PLGA,其平均粒径在纳米到微米级别;

优选地,所述水包油乳液的油水两相体积比为1:100~9:1,优选为1:50~1:2;

优选地,所述水包油乳液中乳滴的平均粒径在50nm~300 $\mu$ m之间,优选在100nm~100 $\mu$ m之间;

优选地,所述水包油乳液中还包含药用添加剂,所述药用添加剂包括稀释剂、稳定剂或防腐剂中的任意一种或者至少两种的组合。

8. 一种不含表面活性剂的免疫原性组合物,其特征在于,其包含:(1) 抗原或抗原组合

物,和(2)佐剂组合物,所述佐剂组合物由如权利要求1-7之一所述的水包油乳液组成。

9. 一种如权利要求1-7之一所述的水包油乳液作为疫苗佐剂、药物递送或缓控释载体的用途。

10. 如权利要求9所述的用途,其特征在于,免疫接种或给药方式包括静脉注射、椎腔注射、肌内注射、皮下注射、皮内注射、经呼吸道喷入或吸入、腹腔注射、经鼻给药、经眼给药、经口给药、直肠给药、阴道给药、局部给药或透皮给药。

## 一种不含表面活性剂的水包油乳液及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物制品,特别是涉及一种可以用于人或其他动物体内的水包油乳液,特别重要的是本发明所述水包油乳液不含表面活性剂,采用固体颗粒作为乳液稳定剂,可作为疫苗佐剂或药物递送或缓控释载体,属于生物医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 随着现代生物技术的迅速发展和社会对于减毒疫苗所导致的不良反应的日益重视,裂解疫苗、重组亚单位疫苗、抗独特型抗体疫苗、核酸疫苗及合成肽疫苗等得到开发。这些疫苗抗原纯度高,相对分子量小,疫苗的不良反低,然而这些抗原的免疫原性和免疫保护性普遍较弱,为了提高抗原的有效性,必须在抗原中添加佐剂以增强它们诱导免疫反应的能力。

[0003] 佐剂与抗原的同时应用或协同应用(在较短的间隔时间内(通常为1小时或更短时间)先后接种到同一或邻近部位),能增强机体针对抗原的免疫应答能力,或改变免疫反应类型。其功能主要包括:在使用部位募集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,如高度纯化的抗原或重组抗原;减少抗原接种剂量和接种次数;促进疫苗在免疫应答能力弱的群体中的免疫效果;加快免疫应答的速度和延长持续时间;改变抗原的构型;增加抗体类型的多样性,实现对易变异病原体的交叉防护(如流感病毒);改变体液抗体的种类、IgG亚类和抗体的亲和性,以及激发细胞免疫和黏膜免疫效应等。

[0004] 铝佐剂是目前普遍被批准用于人类疫苗的主要佐剂,自1926年Glenny首先应用铝盐吸附白喉类毒素开始,至今已有磷酸铝和氢氧化铝两种铝盐佐剂广泛应用于多种疫苗。但是铝佐剂以体液免疫应答为主,不能诱导细胞免疫和黏膜免疫应答效应,特别是近几年发现多次接种含铝佐剂的疫苗可能出现免疫抑制和累积中毒而使其使用,并且铝佐剂对一些疫苗抗原的免疫增强效果不佳,注射部位偶有严重的局部反应,包括出现红斑、皮下结节、接触性过敏和肉芽肿性炎症,因此寻找新的疫苗佐剂成为疫苗学的重大现实问题。

[0005] 近年来油乳佐剂备受关注,多家企业或科研机构开展了油乳佐剂方面的研究,其中部分上市及临床的油乳佐剂如表1所示。

[0006] 表1部分上市及临床的油乳佐剂

[0007]

名称	研究机构	类型	成分	乳滴平均 粒径 (nm)	制备方 法	免疫途 径	所处状 态
MF59	Novartis	水包油 (o/w)	Squalene, polysorbate 80, sorbitan trioleate, citrate buffer	165	微流化	肌肉注 射	获得上 市许可
AS03	GSK	水包油 (o/w)	Squalene, $\alpha$ -tocopherol, polysorbate 80, phosphate-buffered	150	微流化	肌肉注 射	获得上 市许可

[0008]

			saline				
AS02	GSK	水包油 (o/w)	AS03 plus MPL and QS21	150	微流化	肌肉注 射	临床 III 期
AF03	Sanofi Pasteur	水包油 (o/w)	Squalene, polyoxyethylene cetyl-stearylether, sorbitan oleate, mannitol, phosphate-buffered saline	100	相反转 乳化	肌肉注 射	临床 III 期
SE、 MPL-SE、 GLA-SE	IDRI/Immune Design	水包油 (o/w)	Squalene, phosphatidylcholine, poloxamer 188, glycerol, ammonium phosphate buffer, MPL or GLA may be incorporated	120	微流化	肌肉注 射	临床 I/II 期
W805EC	NanoBio	水包油 (o/w)	Soybean oil, polysorbate 80, cethylpyridinium chloride, ethanol	~400	高速乳 化	喷鼻	临床 I 期
CoVaccine HTM	BTG	水包油 (o/w)	Squalene, polysorbate 80, phosphate-buffered saline, sucrose fatty acid sulfate esters	135	微流化	肌肉注 射	临床 II 期
Montanide® ISA 720	Seppic	油包水 (w/o)	Squalene, mannide monooleate	~1000-1500	注射器 双推乳 化	肌肉或 皮下注 射	临床 I 期
Montanide® ISA 51	Seppic	油包水 (w/o)	Mineral oil, mannide monooleate	~1000-1500	注射器 双推乳 化	肌肉或 皮下注 射	获得上 市许可
NH2	Kurume University (Japan)	油包水 (w/o)	Mineral oil, sorbitan monooleate	~1000	注射器 双推乳 化	皮下	临床 I 期

[0009] 这些油乳佐剂通常由油水两相组成, 包含至少一种表面活性剂, 常用的表面活性剂包括聚氧乙烯失水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温)、失水山梨糖醇酯(通常称为司盘)、辛苯聚醇-9(曲通 X-100 或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)以及卵磷脂等, 特别是吐温 80(聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)、司盘 85(失水山梨糖醇三油酸酯)和曲通 X-100 的应用较多。表面活性剂在制剂中所起的作用主要是稳定乳液, 避免破乳。为实现这一目的, 需要使用至少一种表面活性剂, 并且为保持乳液稳定, 表面活性剂在乳液中的含量需超

过乳化所需量,从而导致水相或油相或二者中存在游离表面活性剂。而且,虽然油乳佐剂中所使用的表面活性剂通常是生物可降解(可代谢)和生物相容的,但表面活性剂的使用还可能带来一些其他的不利影响。例如,油乳佐剂中往往存在脂肪族组分。如, MF59 佐剂包含角鲨烯, MPL™ 包含带有多个脂肪酸链连接于二葡糖胺主链的脱酰基化形式的单磷酸基脂质 A。有研究发现疫苗组合物中的脂肪族佐剂可能与含有表面活性剂组分的抗原不相容(CN101267835A)。同时, MF59 和 AS03 中使用的表面活性剂司盘 85 和吐温 80, 虽然已被长久使用于食品、化妆品或作为体内注射使用,但其本身并不是免疫佐剂,无法起到刺激免疫细胞的作用(CN102293743B),反而会增加机体的代谢负担。此外,抗原中的膜糖蛋白如长期与游离表面活性剂接触,可能导致其发生变性作用(CN101365485A)。同时对于表面活性剂的加入量必须严格控制,加入较多量的表面活性剂,可能导致溶血现象。

[0010] 与传统的采用表面活性剂作为稳定剂的乳液不同, Pickering 乳液是一种由固体颗粒代替传统表面活性剂的乳液体系。乳液的稳定机理主要是通过固体颗粒吸附在水油界面,形成固体颗粒单层或多层结构,从而使乳液稳定。与传统含有表面活性剂的乳液比较,它具有突出的优势:(1) 对人体的毒副作用小;(2) 降低环境污染;(3) 乳液稳定性强,甚至可以制备高内相的乳液。然而,目前文献中所报道的 Pickering 乳液普遍采用不具有生物相容性的固体颗粒或油相制备,因此其在生物医药领域的应用受到限制。例如,文献(Zhuo Ao, Zhi Yang, Jianfang Wang, Guangzhao Zhang, To Ngai, Emulsion-Templated Liquid Core-Polymer Shell Microcapsule Formation, *Langmuir*, 2009, 25:2572-2574) 提出了采用聚苯乙烯胶体颗粒制备水包油型(o/w) Pickering 乳液,并在乳滴表面沉淀一层聚(丙交酯-共-乙交酯)(也可称作乙交酯丙交酯共聚物或聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物,其英文名称为 Poly(lactic-co-glycolic acid),英文缩写为 PLG 或 PLGA)壳层,形成微囊结构。所用的油相为辛醇和乙酸乙酯的混合液,不能用于药物体系,并且聚苯乙烯也不能生物降解。文献(Catherine P. Whitby, Li Hui Lim, Nasrin Ghouchi Eskandar, Spomenka Simovic, Clive A. Prestidge, Poly(lactic-co-glycolic acid) as a particulate emulsifier, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 375:142-147) 报道,直接采用生物降解性和生物相容性良好的高分子材料 PLGA(丙交酯与乙交酯的聚合比例为 50:50,分子量 40-75kDa) 纳米颗粒制备 Pickering 乳液。该文献中考察的油相包括十二烷(dodecane)、聚二甲硅氧烷(polydimethylsiloxane)、甲苯(toluene)、十四酸异丙酯(isopropyl myristate),其中 PLGA 纳米颗粒可以稳定油相为十二烷和聚二甲硅氧烷的水包油型(o/w)乳液,但上述油相并不能作为药用辅料应用,因此也无法作为疫苗佐剂应用。文献(Zengjiang Wei, Chaoyang Wang, Hao Liu, Shengwen Zou, Zhen Tong, Facile fabrication of biocompatible PLGA drug-carrying microspheres by O/W pickering emulsions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 91:97-105) 采用二氧化硅纳米粒作为固体颗粒,含有 PLGA 的二氯甲烷作为油相,制备了二氧化硅纳米粒覆层的 PLGA 微球,但该体系中的二氧化硅和二氯甲烷在临床应用上都受到限制,该 Pickering 乳液无法直接在生物医药领域应用。并且,目前已知的文献或专利中均没有关于作为疫苗佐剂的 Pickering 乳液的研究,已知的 Pickering 乳液体系也没有根据疫苗制剂的需求来进行设计、优化。



## 发明内容

[0011] 针对已有技术的问题,本发明的目的之一在于提供一种不含表面活性剂的水包油乳液,其可以作为疫苗佐剂。

[0012] 为了达到上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0013] 一种不含表面活性剂的水包油乳液,所述乳液包括可代谢的油相、水相以及分散在水相中的具有生物相容性的油水两亲性的固体颗粒,其中,所述油相包括角鲨烯或/和生育酚,所述水相为纯化水、注射用水、甘油水溶液、缓冲盐水溶液或临床上可用输液中的任意一种或者至少两种的组合,所述固体颗粒的平均粒径在纳米到微米级别。

[0014] 在本发明中,固体颗粒具有油水两亲性,可被吸附到所述水相和所述油相之间的液-液界面之上,起到稳定乳滴的作用,固体颗粒的平均粒径在纳米到微米级别。

[0015] 在本发明中,纳微粒径的固体颗粒可发挥免疫佐剂的作用,其佐剂作用机制可主要归因于以下几个方面:1) 纳微颗粒能够特异性激活抗原提呈细胞,增加其摄取量;2) 用纳微颗粒包埋、吸附或偶联抗原,可持续释放抗原,延长细胞吸收和抗原表达时间;3) 部分纳微颗粒(如带有正电荷的壳聚糖纳微颗粒),可以通过质子泵效应等实现抗原的溶酶体逃逸,实现抗原的交叉提呈,可促进机体细胞免疫反应;4) 部分纳微颗粒还可募集炎症细胞,从而增强抗原与抗原呈递细胞之间的作用。

[0016] 因此,采用固体颗粒替代表面活性剂制备如上所述的不含表面活性剂的水包油乳液,不仅可以避免表面活性剂对疫苗制剂的负面影响,而且可以通过固体颗粒和水包油乳液的免疫协同作用,获得更为全面、显著、持久的免疫保护效果。该水包油乳液中不含表面活性剂,避免了表面活性剂对抗原的影响,产品具有良好的安全性和稳定性,并可用于疫苗的不同接种途径。

[0017] 此外,采用固体颗粒作为乳液稳定剂制备水包油型乳液,除可以发挥水包油乳液的佐剂作用外,固体颗粒本身也能起到免疫佐剂的作用。通过将固体颗粒与水包油乳液结合,可协同发挥二者的免疫增强及调节作用,降低抗原用量,提高抗体水平,同时还可增加抗体类型的多样性,产生范围更为广泛的针对不同类型抗原的抗体。

[0018] 油相优选角鲨烯和生育酚中的一种或两种的混合物。所述角鲨烯是一种三萜类化合物,其英文名称是 Squalene,分子结构为三十碳五十氢的异戊二烯,分子式为:2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,CAS:111-02-4,分子量:410.72,可来源于动物、植物提取或化学合成。角鲨烯是一种可代谢的油,因为它是胆固醇的生物合成的中间产物(Merck索引,第10版本,登记号8619)。这是一种所有高等生物,包括在人类身上(皮脂中可以找到)自然分泌的油脂。含有角鲨烯的乳液(含表面活性剂)在动物实验和临床实验上表现出优异的免疫增强作用。

[0019] 所述生育酚是 $\alpha$ -生育酚或其衍生物如 $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯(也称作维生素E琥珀酸酯)。 $\alpha$ -生育酚在针对老年患者(如年龄大于60岁或更大的患者)的疫苗中,可以起到增强免疫应答的作用。存在的生育酚包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 等多种生育酚,优选 $\alpha$ -生育酚,尤其是DL- $\alpha$ -生育酚。优选地,所述油相与水相互不相溶,还可以包括其他可代谢的油。

[0020] 为了使所述水包油乳液适合于疫苗或药物制剂,本发明中所述水包油乳液的油相为可代谢的油。术语“代谢的油”意思已为本领域所熟知。“可代谢的”可被定义为“能够通

过代谢作用转变” (Dorland 的医学词典解释, W. B. Sanders 公司, 第 25 版本 (1974))。

[0021] 示例性的可代谢的油可以是任何对受体无毒并可通过代谢作用转化的植物油、鱼油、动物油或合成油, 包括但不限于大豆油、米格列醇 (Miglyol1812)、中链油、鱼油、维生素 E、维生素 E 琥珀酸酯、维生素 E 醋酸酯、红花油、玉米油、沙棘油、亚麻子油、花生油、茶油、葵花籽油、杏仁油、薏仁油、月见草油、芝麻油、棉籽油、蓖麻油、低芥酸菜子油、油酸乙酯、油酸、亚油酸乙酯、月桂酸异丙酯、内豆蔻酸异丙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯、辛酸甘油三酯或癸酸甘油三酯中的任意一种或者至少两种的组合。坚果、种子和谷物是常见的植物油来源。

[0022] 本发明中所述水包油乳液的水相优选为注射用水、磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液或 Tris 缓冲液中的任意一种或者至少两种的组合。所述组合例如注射用水和磷酸盐缓冲液的组合, 柠檬酸缓冲液和 Tris 缓冲液的组合, 注射用水、磷酸盐缓冲液和柠檬酸缓冲液的组合, Tris 缓冲液、注射用水、磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液和 Tris 缓冲液的组合。

[0023] 优选地, 所述磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液或 Tris 缓冲液的 pH 值独立地为 5.0 ~ 8.1, 例如 5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8 或 8.0, 优选为 6.0 ~ 8.0。

[0024] 本发明中所述水包油乳液的水相中可含有单价或多价抗原, 所述抗原包括但不限于人类抗原、非人类动物抗原、植物抗原、细菌抗原、真菌抗原、病毒抗原、寄生虫抗原或肿瘤抗原中的任意一种或者至少两种的组合。所述组合例如人类抗原和非人类动物抗原的组合, 植物抗原和细菌抗原的混合物, 真菌抗原、病毒抗原和寄生虫抗原的组合, 肿瘤抗原、人类抗原、非人类动物抗原、植物抗原、细菌抗原和真菌抗原的组合, 病毒抗原、寄生虫抗原、肿瘤抗原、人类抗原、非人类动物抗原和植物抗原的组合, 细菌抗原、真菌抗原、病毒抗原、寄生虫抗原和肿瘤抗原的组合。

[0025] 所述抗原可以来自但不限于鸡胚培养、细胞培养、携带者体液、器官或组织中纯化分离所得、重组基因表达或化学合成所得, 优选所述抗原包括但不限于减毒疫苗、灭活疫苗、裂解疫苗、亚单位疫苗、多糖结合疫苗、重组疫苗或 DNA 疫苗等中的任意一种或者至少两种的组合。所述组合例如减毒疫苗和灭活疫苗的组合, 裂解疫苗和亚单位疫苗的组合, 多糖结合疫苗、重组疫苗的组合, DNA 疫苗和减毒疫苗的组合, 灭活疫苗和裂解疫苗的组合, 亚单位疫苗、多糖结合疫苗、重组疫苗和 DNA 疫苗的组合。

[0026] 所述抗原可为包含来自至少三种流感季节性 (大流行间) 株的病毒抗原或抗原性制剂, 并且任选包含至少一种与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜能的流感病毒株的病毒抗原或抗原性制剂, 其中, 与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜能的流感病毒株选自: 人类流感病毒中 A、B、C 型, 包含 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N3, H10N7; 猪型流感病毒 H1N1, H1N2, H3N1, H3N2; 狗或马型流感病毒 H7N7, H3N8; 或禽流感病毒 H5N1, H7N2, H1N7, H7N3, H13N6, H5N9, H11N6, H3N8, H9N2, H5N2, H4N8, H10N7, H2N2, H8N4, H14N5, H6N5 和 H12N5 中的一种或一种以上的流感病毒组合。

[0027] 本发明中所述水相中还包括药用辅助物质, 如 pH 调节剂或 / 和缓冲剂等, 优选自乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、人血清清蛋白、必需氨基酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖、无水 D-海藻糖、甘露醇、甘露糖、淀粉或明胶中的任意一种或者至少两种的组合。所述组合例如乙酸钠和乳酸钠的组合, 氯化钠和氯化钾的组合, 氯化钙、人血清清蛋白和必需氨基酸的组合, 非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖和无水 D-海藻糖的组

合,甘露醇、甘露糖、淀粉和明胶的组合,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和人血清清蛋白的组合,必需氨基酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖、无水 D-海藻糖、甘露醇、甘露糖、淀粉和明胶的组合。

[0028] 本发明中所述水包油乳液中含有至少一种固体颗粒。本发明中所述水包油乳液中的固体颗粒具有生物相容性,选自铝盐、钙盐、多糖、多糖衍生物或高分子聚合物中的任意一种或者至少两种的混合物。

[0029] 优选地,所述铝盐为氢氧化铝或 / 和磷酸铝。优选地,所述钙盐为磷酸钙或 / 和碳酸钙。

[0030] 优选地,所述多糖选自壳聚糖、海藻酸、明胶、淀粉、葡聚糖、魔芋葡甘聚糖、肝素、果胶类多糖、透明质酸、硫酸软骨素、壳聚糖盐、海藻酸盐、明胶盐、葡萄糖盐、魔芋葡甘聚糖盐、肝素盐、果胶类多糖盐、透明质酸盐或硫酸软骨素盐中的任意一种或者至少两种的组合,优选壳聚糖、海藻酸盐、明胶、淀粉或葡聚糖中的任意一种或者至少两种的组合。

[0031] 优选地,所述多糖衍生物为对多糖进行季铵化、羧甲基化、羟甲基化、烷基化、酰基化、磺化、硝化或卤化等衍生反应后所得的多糖衍生物,优选为对壳聚糖、海藻酸、明胶、淀粉或葡聚糖中的任意一种或者至少两种的组合进行季铵化、羧甲基化、羟甲基化、烷基化、酰基化、磺化、硝化或卤化等衍生反应后所得的多糖衍生物。

[0032] 在本发明中,根据所用抗原的大小、所需的释放速率等影响因素确定合适分子量。对于壳聚糖,例如合适的分子量是约 5 万 -90 万道尔顿,优选为 10 万 -80 万道尔顿。

[0033] 优选地,所述高分子聚合物包括聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酞或聚氰基丙烯酸酯及其共聚物,所述共聚物的共聚单体优选聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酞或聚氰基丙烯酸酯中的任意一种或者至少两种的组合。所述组合例如聚( $\alpha$ -羟酸)和聚羟基丁酸的组合,聚己酸内酯、聚原酸酯和聚酞的组合,聚氰基丙烯酸酯、聚( $\alpha$ -羟酸)、聚羟基丁酸、聚己酸内酯和聚原酸酯的组合,聚酞、聚氰基丙烯酸酯和聚( $\alpha$ -羟酸)的组合,聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酞和聚氰基丙烯酸酯的组合。

[0034] 优选地,所述高分子聚合物是聚( $\alpha$ -羟酸)及其共聚物,优选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)或聚(丙交酯-共-乙交酯),最优的聚合物是称为“PLG”或“PLGA”的聚(丙交酯-共-乙交酯)(也可称作乙交酯丙交酯共聚物或聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物,其英文名称为 Poly(lactic-co-glycolic acid),英文缩写为 PLG 或 PLGA)。

[0035] 优选地,在聚(丙交酯-共-乙交酯)中,丙交酯与乙交酯的链段摩尔比为 10:90-90:10。不同的链段摩尔比会影响材料的亲疏水性以及降解速度,例如含有 50% D,L-丙交酯和 50% 乙交酯的 50:50PLGA 聚合物的降解较快,而因为丙交酯分量增加,75:25PLGA 降解较慢。

[0036] 示例性的一种不含表面活性剂的水包油乳液,所述乳液包括可代谢的油相、水相以及分散在水相中的具有生物相容性的油水两亲性的固体颗粒,其中,所述油相为角鲨烯,所述水相为纯化水、注射用水、甘油水溶液、缓冲盐水溶液或临床上可用输液中的任意一种或者至少两种的组合,所述固体颗粒为 PLGA,其平均粒径在纳米到微米级别。

[0037] 采用已知工艺可获得各种分子量的这些聚合物,可以根据所用抗原的大小、所需

的释放速率等影响因素确定合适分子量。对于聚(L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯),例如合适的分子量是约2000-5000道尔顿级别的。对于PLGA,合适的分子量通常是约10000-约200000道尔顿,优选约13000-约150000道尔顿。

[0038] 优选地,所述固体颗粒选自氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、碳酸钙、壳聚糖、海藻酸盐、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚乙二醇-乳酸共聚物中的任意一种或者至少两种的混合物,进一步优选自氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物或聚乙二醇-乳酸共聚物中的任意一种或者至少两种的混合物,最优选聚乳酸-羟基乙酸共聚物。

[0039] 称为“氢氧化铝”的一般是羟基氧化铝盐,其通常至少部分结晶。羟基氧化铝以分子式 $AlO(OH)$ 表示,与其它铝化合物,例如氢氧化铝 $Al(OH)_3$ 的区别在于红外(IR)光谱,特别是在 $1070\text{cm}^{-1}$ 处存在吸收带和在 $3090-3100\text{cm}^{-1}$ 处存在强烈的肩峰。氢氧化铝呈典型的纤维形态,氢氧化铝佐剂的pI通常约11,即在生理pH下佐剂本身具有表面正电荷。pH7.4时,氢氧化铝的吸附能力在每 $\text{mg Al}^{3+}$ 1.8-2.6 $\text{mg}$ 蛋白质之间。由于商业氢氧化铝的不同生产批次之间存在一定的差异,目前以丹麦生产的Alhydrogel<sup>®</sup>为公认标准,其胶体颗粒大小为 $3.07\ \mu\text{m}$ 。称为“磷酸铝”的一般是羟基磷酸铝,其也常含有少量硫酸根(即,羟基磷酸硫酸铝)。可通过沉淀获得这些佐剂。磷酸铝通常是颗粒状的。这些颗粒在吸附任何抗原后的典型直径是 $0.5-20\ \mu\text{m}$ (例如,约 $5-10\ \mu\text{m}$ )。pH7.4时,磷酸铝的吸附能力在每 $\text{mg Al}^{3+}$ 0.7-1.5 $\text{mg}$ 蛋白质之间。

[0040] 在各种钙盐中,首选磷酸钙作为本发明的固体颗粒。现已报道了磷酸钙的各种佐剂形式,本发明可用任何这些形式。佐剂可以形成尺寸约 $10\text{nm}\times 150\text{nm}$ 的针状颗粒以及直径约 $20-30\text{nm}$ 的不规则形状的片。还有文献披露了颗粒磷酸钙(“CAP”),其中所述颗粒的直径为 $300-4000\text{nm}$ (纳米颗粒),形状为球形,表面平滑。上述磷酸钙均可实现本发明。本发明中所述固体颗粒的形状可以是球形、棒状、纺锤状、盘状、立方体、花生形状或无定形等多种形状,固体颗粒的形貌可以为表面光滑、表面多孔、内部多腔室、中空或单眼等多种形貌,本领域技术人员可以根据所用的油水相及抗原性质通过有限的工艺进行优化筛选以得到满足应用需求的水包油乳液。

[0041] 本发明中所述水包油乳液中的固体颗粒具有油水两亲性,可稳定分散于油水两相界面,起到稳定乳液的作用。针对不同的油水体系,可选择具有不同亲疏水性的固体颗粒以稳定乳液,也可对固体颗粒的表面可以进行亲水或疏水修饰、覆层或接枝改性等,以获得适宜的亲疏水性(或颗粒可润湿性(particle wettability,一般用 $\text{oil-water-solid contact angle } \theta_{ow}$ 表示))。

[0042] 优选地,所述固体颗粒的表面或内部还可吸附、偶联或包埋靶向物质、荧光标记物、同位素标记物、环境响应物质、细胞因子、抗体或免疫调节剂等功能物质。所述环境响应物质选自带有pH敏感、热敏感或生物活性物质敏感等的基团。

[0043] 所述固体颗粒的表面或内部还可吸附、偶联或包埋抗原,作为抗原的输送系统,可提高抗原稳定性,促进抗原提呈细胞对抗原的摄取,增强免疫应答。

[0044] 所述固体颗粒可采用多种方法制备。例如,对于聚(丙交酯-共-乙交酯)固体颗粒,可以采用溶剂蒸发法、溶剂萃取法、沉淀法等多种方法制备。对于壳聚糖固体颗粒,可以采用单乳法(形成油包水乳液)结合化学交联法(如采用溶解在油相中的戊二醛交联)制备,也可以采用喷雾干燥或沉淀法制备。

[0045] 制备后,可将固体微粒保存在水溶液或缓冲溶液中,也可冻干待用。

[0046] 优选地,所述固体颗粒的平均粒径在 1nm ~ 10 μm 之间,例如 5nm、10nm、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1 μm、2 μm、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm 或 9 μm,优选 10nm ~ 5 μm 之间。

[0047] 优选地,所述固体颗粒粒径分布系数 span 值低于 1.0。

[0048] 优选地,固体颗粒在水相中的质量浓度在 0.1 ~ 20wt%,例如为 0.5wt%、1wt%、2wt%、3wt%、4wt%、5wt%、6wt%、7wt%、8wt%、9wt%、10wt%、11wt%、12wt%、13wt%、14wt%、15wt%、16wt%、17wt%、18wt% 或 19wt%,优选为 0.5 ~ 10wt%,进一步优选为 1 ~ 8wt%。所述固体颗粒在水相中的质量浓度为固体颗粒的质量除以固体颗粒和水相质量和的比值。

[0049] 优选地,本发明中所述水包油乳液的油水两相体积比为 1:100 ~ 9:1,例如 1:90、1:80、1:70、1:60、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1 或 8:1,优选为 1:50 ~ 1:2。

[0050] 优选地,所述水包油乳液中乳滴的平均粒径在 50nm ~ 300 μm 之间,例如 100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、800nm、1 μm、10 μm、30 μm、50 μm、80 μm、110 μm、140 μm、170 μm、200 μm、230 μm、260 μm 或 290 μm,优选在 100nm ~ 100 μm 之间。

[0051] 本发明中所述水包油乳液中还可以包含药用添加剂,所述药用添加剂包括例如稀释剂、稳定剂或防腐剂中的任意一种或者至少两种的组合。

[0052] 本发明中所述水包油乳液中还可以包括以下佐剂但不限于:模式识别受体(例如 Toll 样受体、RIG-1 和 NOD 样受体(NLR)的刺激剂,如含 CpG 基序的寡核苷酸或双链 RNA 或含回文系列的寡核苷酸或含聚(dG)序列的寡核苷酸)、矿物盐(例如明矾,与肠细菌(例如大肠杆菌、明尼苏达沙门菌、鼠伤寒沙门菌、或弗氏志贺菌)的单磷酸脂质(monophosphoryllipid, MPL)A 结合的明矾或分别与 **MPL**<sup>®</sup>(AS04)、以上提到的细菌 MPLA 特异性结合的明矾)、MPL、皂苷(如 QS-21、Quil-A, iscoMs, iscomatrix<sup>™</sup>)、脂质体和脂质体配制品(如 AS01)、合成的或特别制备的微颗粒和微载体(如淋病奈瑟球菌(N. gonorrhoeae)、沙眼衣原体和其他细菌的源于细菌的外膜泡(OMV))、多糖(如壳聚糖)、特异性修饰或制备的肽(例如胞壁酰二肽)、氨基烷基氨基葡萄糖苷 4-磷酸酯(如 RC529)、或蛋白质(如细菌类毒素或毒素片段)、可选择的病原相关分子模式(PAMPS)、小分子免疫增强剂(SMIP)、细胞因子和趋化因子。细胞因子包括但不限于粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素(如干扰素-α(IFN-α)、干扰素-β(IFN-β)、干扰素-γ(IFN-γ等)、白细胞介素(如白细胞介素-1α(IL-1α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-7(IL-7)、白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-15(IL-15)、白细胞介素-18(IL-18))、胎儿肝酪氨酸激酶 3 配体(FIt3L)或肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等。

[0053] 本发明中所述水包油乳液可采用多种方法制备。具体地,本发明中所述水包油乳液可采用下述方法制备,但不受下述制备方法的限制。

[0054] 本发明中所述水包油乳液可采用先将固体颗粒分散在水相中,然后将油相和水相混合制备。固体颗粒的分散方式可以选择振荡、搅拌、超声(Ultrasonic dispersion)等多种方式,以实现固体颗粒在水相中的良好分散。只要能实现颗粒在水相中的良好分散,所采

用的分散方式不会对水包油乳液的性质造成明显影响,可根据所用水相及固体颗粒性质及自身的实验设备条件选择合适的分散方式及具体操作参数。油相和水相的混合可以选择微流控 (Microfluidization)、均质 (Homogenization)、超声、注射器双推乳化 (Two-syringe emulsification)、喷雾、微射流、微通道 (Microchannel emulsification)、膜乳化 (Membrane emulsification)、搅拌、振荡、倒转或手摇混合等多种方式。根据不同的需求,混合方式可以优选微流控、微通道或膜乳化等可以获得均一粒径分布乳液的方式,也可以优选微射流、注射器双推乳化、均质、搅拌或振荡等便于规模化制备的混合方式。应该明确的是,不同的油水相混合方式必然影响所得乳液中乳滴的粒径大小、乳液稳定性等,也将影响到最终的免疫或给药效果。如本发明中的一个实施例所提到的与机械搅拌相比较,采用膜乳化方式可以得到粒径分布更为均一、乳滴更小的乳液,可以获得更高的抗体水平。因此,应根据所用水相及固体颗粒性质、所需制备的乳滴粒径范围等影响因素确定合适的混合方式及具体操作参数。

[0055] 本发明中所述水包油乳液中的固体颗粒、油相、水相可以分别独立包装,在应用前根据前述制备方法临时混合,也可以根据前述制备方法事先混合其中的两种或三种。

[0056] 本发明中所述水包油乳液的灭菌方式可以采用湿热灭菌或过滤除菌,当所用颗粒的粒径小于 220nm 时,优选采用过滤除菌的方式。

[0057] 当水包油乳液中含有抗原时,所述水包油乳液可以和抗原独立包装,在免疫接种前临时混合或在较短的时间间隔内(通常为 1 小时以内,包含 1 小时)接种到同一部位,也可预先根据前述制备方法先混合后包装,在免疫接种时可以直接应用。

[0058] 本发明的另一目的在于提供一种不含表面活性剂的免疫原性组合物,其包含:(1) 抗原或抗原组合物,和(2) 佐剂组合物,所述佐剂组合物由如上所述的水包油乳液组成。

[0059] 本发明的另一目的在于提供上述水包油乳液作为疫苗佐剂、药物递送或缓控释载体的用途。在本发明中,免疫接种或给药方式包括静脉注射、脊椎腔注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、经呼吸道喷入或吸入、腹腔注射、经鼻给药、经眼给药、经口给药、直肠给药、阴道给药、局部给药或透皮给药。所述水包油乳液作为疫苗佐剂可用于人类、畜类、禽类及水产类。

[0060] 与已有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0061] 本发明首次将固体颗粒与油乳制剂(水包油乳液)结合制备不需表面活性剂的水包油乳液,应用于疫苗佐剂的开发领域。固体颗粒的加入,不仅可以提高制剂的生物相容性,避免表面活性剂对人体、动物或疫苗带来的不良影响,并且能够更加有效地刺激免疫细胞,激发免疫调节功能;同时,固体颗粒的性质便于调控,可以对其进行表面修饰或覆层,或者选择不同性质(如组成、形貌、结构、粒径等)的固体颗粒,发挥不同的免疫增强机制,以及对抗原进行包埋、吸附或偶联,作为抗原的运送载体,利用其抗原控制释放的能力来调节免疫应答,还可以应用于多种免疫接种方式。

[0062] 本发明中水包油乳液的主要免疫增强机制包括:

[0063] (1) 如所用颗粒对抗原进行吸附或包埋,则该水包油乳液可起到延缓抗原释放速度,保护抗原不被水解,延长抗原在体内滞留时间,有利于高亲和力抗体的产生;(2) 颗粒可以活化巨噬细胞并促进巨噬细胞与 T 和  $\beta$  细胞的相互作用,从而对淋巴细胞有特异性加强刺激的作用;(3) 如所用颗粒对抗原进行吸附或包埋,可增加抗原的表面积,使抗原易于

被巨噬细胞吞噬；(4) 水包油乳液还可在注射部位引起轻微的炎症反应，募集炎症细胞，刺激炎症因子的分泌，激活免疫反应；(5) 某些特殊颗粒，如具有 pH 敏感性的壳聚糖颗粒，吸附或包埋抗原后，可实现抗原的溶酶体逃逸，增强细胞免疫应答。

[0064] 此外，本发明中水包油乳液还可用于药物递送或缓控释载体，通过将脂溶性的药物、荧光标记物或其他生物活性物质分散在油相中，或将药物、荧光标记物或其他生物活性物质包埋或吸附在颗粒表面，实现药物的缓控释放。通过在颗粒表面或内部偶联或包埋靶向物质（如 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、叶酸、甘露糖等），还可将包含有该种颗粒的水包油乳液用于药物、荧光标记物或其他生物活性物质的靶向递送。

[0065] 因此，本发明中公开的水包油乳液既可作为疫苗的免疫佐剂，又可作为药物或其他生物活性物质的递送或缓控释载体。

### 附图说明

[0066] 图 1 水包油型 Pickering 乳液示意图；

[0067] 图 2 实施例 1 中制备 PLGA 颗粒的粒径分布图；

[0068] 图 3 实施例 1 中制备 PLGA 颗粒的扫描电镜照片；

[0069] 图 4 实施例 1 中制备 Pickering 乳液的光镜照片（放大 20 倍）；

[0070] 图 5 实施例 1 中制备 Pickering 乳液在离心前后的照片（1 为离心前，2 为离心后）；

[0071] 图 6 实施例 2 中制备氢氧化铝颗粒的粒径分布图；

[0072] 图 7 实施例 2 中制备 Pickering 乳液的光镜照片（放大 20 倍）；

[0073] 图 8 实施例 4 中制备 Pickering 乳液的照片。

### 具体实施方式

[0074] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。

[0075] 本发明可以通过以下实施例实现，但不受以下实施例中原料、仪器、比例、组成、方法、步骤的限制。应该理解，这里讨论的实施例和实施方案只是为了说明，对熟悉该领域的人可以提出各种改进和变化，这些改进和变化将包括在本申请的精神实质和范围以及所附的权利要求范围内。

[0076] 原料列表：

[0077]

名称	规格	生产厂家
PLGA	LA:GA 包括 (90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20: 80, 10:90); 分子量包括 1 万 3 千道尔顿, 5 万 9 千道尔顿, 7 万 8 千道尔顿, 11 万 9 千道尔顿, 13 万 4 千道尔顿, 15 万道尔顿, 20 万道尔顿	济南岱罡生物工程有限公司
PLA	分子量为 7 万 3 千道尔顿	济南岱罡生物工程有限公司
丙酮	分析纯	北京化工厂
石油醚	分析纯	北京化工厂
乙腈	分析纯	西陇化工股份有限公司
无水乙醇	分析纯	北京化工厂
聚乙烯醇 (PVA)	粘度 5.0 mPa·s, 醇解度 99%	山西三维集团股份有限公司
角鲨烯	纯度≥98%	Sigma Aldrich

[0078]



$\alpha$ -生育酚	色谱纯	Sigma Aldrich
Triton X-100	化学纯	北京化学试剂公司
正丁醇	分析纯	北京化工厂
环己烷	分析纯	北京化工厂
氨水	化学纯	国药集团化学试剂有限公司
$AlCl_3$	分析纯	北京化学试剂公司
Tween 80	分析纯	北京化学试剂公司
PEG 6000	分析纯	Sigma Aldrich
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	分析纯	Sigma Aldrich
浓盐酸	分析纯	北京化学试剂公司
氯化钙	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化镁	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
Span 80	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
单甲氧基聚乙二醇 - 乳酸共聚物 (PELA)	mPEG:PLA 的摩尔比为 1:19, 平均分子量 40 kDa	济南岱罡生物工程有限公司
十二烷基硫酸钠 (SDS)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
壳聚糖	分子量包括 5 万道尔顿, 10 万道尔顿, 50 万道尔顿, 80 万道尔顿, 90 万道尔顿; 脱乙酰度包括 80%, 85%.	浙江金壳药业有限公司

[0079]

	90%，95%	
海藻酸	分子量 45-55 万道尔顿	Acros Organics
甘油磷酸盐	医药级	Sigma Aldrich
PO-500	食品级	Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd
二氯甲烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
醋酸钙	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸三钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
碳酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甘油	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

[0080] 仪器

[0081]

名称	规格	厂家
电子天平	TB-214	北京赛多利斯仪器系统有限公司
注射器推进泵	PDH-2000	Harvard Apparatus
离心机	Avanti-J-E	Beckman-Coulter
超声波清洗机	25-12	宁波新芝生物科技股份有限公司
磁力搅拌器	Color Squid	IKA
冻干机	Alpha 2-4 LD	CHRIRT
扫描电镜	JSM-6700F	JEOL
冰箱	MDF-382E(N)	SANYO
光学显微镜	Olympus BX51	Olympus

[0082]

均质机	T18 Basic	IKA
移液枪	200 $\mu$ L、1 mL、5 mL、10 mL	Eppendorf
激光粒度仪	Mastersizer 2000E	Malvern
Zeta 电位及粒度分析仪	ZetaPlus	Brookhaven Instruments Corporation
超声波细胞破碎仪	S-450D	Branson Inc.
漩涡振荡器	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.
酶标仪	Infinite M200	Tecan

[0083] 性质表征：

[0084] 颗粒或乳滴的粒径分布测定：

[0085] 微米级颗粒或乳滴的粒径分布采用激光粒度仪进行测定，具体测定步骤为：将 5mg 微米级颗粒加入到 50mL 的去离子水中，超声 5min 使其均匀分散，或取 50mL 乳液，将颗粒悬浮液或乳液加入到样品池中，采用激光粒度仪 (Malvern Instruments, United Kingdom Coulter Co., USA) 进行测定。

[0086] 纳米级颗粒或乳滴的粒径分布采用 Zeta 电位及粒度分析仪进行测定，具体测定步骤为：将 1mg 纳米级颗粒，加入 10mL 去离子水中，超声 5min 使其均匀分散，或取 2mL 乳液，将颗粒悬浮液或乳液加入到样品池中，放入 Zeta 电位仪 (Zeta Potential Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation) 中进行测定。

[0087] 颗粒或乳滴的均一性由粒径分布系数 (Span) 值表示。Span 计算公式如下，其值越小表明颗粒粒径越均一。

[0088] 
$$\text{Span} = (d_{90} - d_{10}) / d_{50} \quad (1)$$

[0089] 式(1)中,  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  和  $d_{90}$  分别为颗粒累计体积为 10%, 50%, 90% 时的粒径。

[0090] 颗粒的形貌观察采用扫描电镜观察:称量 1mg 颗粒,加入 10mL 去离子水中,超声 5min 使其均匀分散。吸取 1mL 悬浮液,将其滴在铝箔上,使其在铝箔上均匀摊开,自然晾干。将铝箔用导电胶贴于样品台上,在真空条件下喷金(根据样品性质选取合适的喷金条件)后,用扫描电子显微镜进行观察。

[0091] 乳滴的形貌观察采用光学显微镜:吸取少量水包油乳液,滴于载玻片上,置于光学显微镜下观察。

[0092] 乳液的稳定性采用离心法检测:取 5mL 水包油乳液,加入 15mL 离心管中,在 2000g 离心力作用下离心 10min 后,观察分层情况。

[0093] 颗粒中抗原或药物包埋率及载量的测定:

[0094] 准确称量 10mg 载药颗粒冻干粉,采用适当的方法使微球完全降解(例如,对于聚乳酸类微球,可采用加入 NaOH 溶液或乙腈的方法使微球降解;对于壳聚糖类微球,可采用加入稀盐酸的方法使微球降解)。待颗粒完全降解后,用 NaOH 或盐酸中和降解液,使其 pH = 7,再定容至 2mL。抗原或药物含量采用 BCA 试剂盒或 micro-BCA 试剂盒或其他适宜的检测方法测定。抗原或药物包埋率按以下公式计算:

[0095] 包埋率 = (实测颗粒中抗原或药物量 / 实际制备时抗原或药物加入量) × 100%

[0096] 抗原或药物在颗粒上的载量按以下公式计算:

[0097] 载量 = (实测颗粒中抗原或药物量 / 所测颗粒的质量)

[0098] 颗粒上吸附抗原或药物的吸附率及载量的测定:

[0099] 取出吸附抗原或药物后的颗粒悬浮液,离心取上清(根据颗粒的大小和密度选择合适的离心条件),测量上清中抗原或药物浓度,从而间接计算出吸附到颗粒表面的抗原或药物的量。抗原或药物含量采用 BCA 或 micro-BCA 试剂盒或其他适宜的检测方法测定。抗原或药物吸附率按以下公式计算:

[0100] 吸附率 = (吸附前抗原或药物浓度 - 吸附后上清中抗原或药物浓度) / 吸附前抗原或药物浓度 × 100%

[0101] 抗原或药物在颗粒上的载量按以下公式计算:

[0102] 载量 = (实测颗粒上抗原或药物量 / 所测颗粒的质量)

[0103] 动物实验测定:

[0104] 实验所采用的 Ba1b/c 小鼠由维通利华公司提供。免疫步骤基本如下为:先将小鼠随机分组,每组采用 6 只以上的小鼠进行实验,根据实施例的具体说明对小鼠进行分组和免疫接种。在接种前,先取血 200  $\mu$  L,立即在 12000rpm 下离心 5min,分离出血清,测定 IgG 抗体水平,以此时的 IgG 抗体水平作为初始值,然后对小鼠进行免疫。免疫后,定时从小鼠眼周或尾尖取血,每次取血 200  $\mu$  L,并测定 IgG 抗体水平。两周后进行二次免疫,35 天处死小鼠,取血,测定 IgG 抗体水平(对于流感疫苗,还要测定血凝滴度(HI))。取小鼠脾细胞进行培养,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠脾细胞培养液上清中的 IL-4 和 IFN- $\gamma$  细胞因子的分泌情况。

[0105] 实施例 1:采用聚 PLGA 颗粒制备水包油乳液

[0106] 采用纳米沉淀法制备 PLGA 颗粒:

[0107] 采用电子天平准确称取 0.30g 的 PLGA(LA:GA 为 50:50,分子量为 11 万道尔顿),溶

于 1mL 的丙酮中,将该溶液用 9 号针头以每秒 1 滴的速度滴加到 20mL 水溶液 (含有 1wt. % 的 PVA (醇解度为 99%,粘度为 5.0mPa·s),磁力搅拌,转速为 500rpm) 中,25℃ 下搅拌过夜,20000g 下离心 20min,弃去上清,向沉淀中加入 5mL 去离子水,超声分散,20000g 下离心 5min,弃去上清后,将沉淀冻干得到 PLGA 颗粒,置于冰箱中 4℃ 保存。所制备 PLGA 颗粒的平均粒径为 226nm,Span 为 0.535。扫描电镜观察所制备颗粒的表面光滑,球形规整。颗粒的粒径分布图如图 2 所示,形貌如图 3 所示。

[0108] 水包油乳液制备:

[0109] 采用电子天平准确称取 0.50g PLGA 颗粒,加入到 40mL 去离子水中,超声 1min 使其分散均匀,得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 6.5。用移液枪吸取 1mL 角鲨烯加入到上述水相悬浮液中,采用均质 (15000rpm,3min) 乳化的方法,制备水包油乳液。乳滴分散性良好,球形规整。乳滴的平均粒径为 18.9 $\mu$ m,Span 为 0.895。乳液的稳定性采用离心法检测,所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异,上层无油相析出。乳液的光镜照片如图 4 所示,乳液在离心前后的照片如图 5 所示。

[0110] 还可采用其他 PLA 类颗粒制备水包油乳液,其制备步骤与实施例 1 类似,具体工艺参数及结果如表 1 所示。

[0111] 表 1

[0112]

配方										制备工艺		结果			
固体颗粒					水相			油相		油相与水相的体积比	颗粒在水相中的质量浓度 (wt.%)	颗粒在水相中的分散方式	水相与油相的混合方式	乳液性质	
材料	LA: GA	分子量 (道尔顿)	粒径 (nm)	Span	成分	pH 值	其他添加物	成分	其他添加物					平均粒径 (μm)	Span
P L G A	10:90	1万3千	202	0.81	去离子水	6.7	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	0.01 mg/mL 维甲酸	1:10	1	磁力搅拌 (250 rpm, 2 min)	均质 (600 rpm, 3 min)	30.2	0.892
	20:80	1万3千	5320	0.92	去离子水	6.7	0.1 mol/L KCl	角鲨烯	大豆油 (与角鲨烯的体积比为 1:1)	1:5	0.1	超声分散 (200 W, 30 s)	注射器双推乳 化	297	0.769
	30:70	5万9千	10	0.65	Tris 缓冲液	7.3	0.05 mol/L NaCl	α-生育酚	花生油 (与α-生育酚的体积比为 1:1)	1:100	0.5	机械搅拌 (250 rpm, 2 min)	微射流均质 (12000 psi)	0.102	0.532
	40:60	7万8千	1.5	0.44	PBS 缓冲液	7.4	0.01 mol/L 蔗糖 +150	α-生育酚	玉米油 (与α-生育酚的体积比	1:50	10	均质 (2500 rpm, 50 s)	快速膜乳 化 (膜孔径	0.051	0.362

[0113]

						μg/mL H5N1 禽流感 裂解疫 苗		为 1:2)				为 1.4 μm, 过膜 压力 为 3 MPa, 过膜 5 次)		
50: 50	1 万 3 千	205	0.7 9	去离 子水	6.7	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	-	1:10	1	磁力搅 拌(250 rpm, 2 min)	均质 (600 0 rpm, 3 min)	10.5	0.68 2
60: 40	11 万 9 千	70	0.6 4	去离 子水	6.7	0.01 mol/L 皂苷	角鲨烯 与α-生 育酚混 合物 (体积 比 1: 1)	0.01 mg/mL 维甲酸	1:10	20	机械搅 拌(150 rpm, 3 min)	机械 搅拌 (500 rpm, 5 min)	24.5	0.83 1
70: 30	13 万 4 千	7000	0.3 2	柠檬 酸缓 冲液	6.0	-	角鲨烯 与α-生 育酚混 合物 (体积 比 2: 1)	0.01 mg/mL 紫杉醇	9:1	15	漩涡振 荡(3 min)	均质 (200 0 rpm, 3 min)	264. 3	0.76 5
75: 25	1 万 3 千	220	0.7 7	去离 子水	6.7	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	-	1:10	1	磁力搅 拌(250 rpm, 2 min)	均质 (600 0 rpm, 3 min)	32.4	0.54 3
80: 20	15 万	916	0.9 2	去离 子水	6.7	200 μg/mL H1N1	角鲨烯	-	1:2	3	垂直混 合(180 rpm, 2	微流 控(T 型通	197. 6	0.23 1

[0114]

						甲型流感 病毒灭活 疫苗					min)	道,分 散相 管口 直径 50 μm, 连续 相管 口直 径0.4 mm, 分散 相流 速 0.03 mL/m in,连 续相 流速 9.4 mL/m in )			
	90: 10	20万	220	0.1 5	去离 子水	6.7	0.001 mol/L 明胶	角鲨烯	-	5:1	5	超声 (60 W, 30 s)	磁力 搅拌 (500 rpm, 5 min)	5.4	
P L A	-	7万3千	9954	0.6 8	PBS 缓冲 液	7.4	0.001μ g/mL MPL	角鲨烯	-	4:1	7	磁力搅 拌(250 rpm, 2 min)	漩涡 振荡 (10 min)	267. 2	0.82 5

[0115] 实施例 2: 采用氢氧化铝颗粒制备水包油乳液

[0116] 采用微乳液法制备氢氧化铝颗粒:

[0117] 将 Triton X-100、正丁醇与环己烷按照 1:0.5:20 的体积比混合并磁力搅拌 (800rpm, 5min) 混合得到油相。采用注射器推进泵以 2mL/min 的速率向磁力搅拌 (500rpm)



下的油相 (20mL) 中滴加 1mol/L 的  $\text{AlCl}_3$  溶液 (2mL), 得到氯化铝的反相微乳液。采用注射器推进泵将氨水以 0.5mL/min 的滴加速率滴加到上述反相微乳液中, 保持反应体系的 pH 值高于 10.0, 反应 2h 后, 加入 10mL 丙酮破乳, 离心 (15000g, 5min) 后弃去上清液, 用无水乙醇反复洗涤 3 次, 去离子水洗涤 1 次, 最后经冻干得到氢氧化铝颗粒, 置于冰箱中 4℃ 保存。颗粒的平均粒径为 120.5nm, Span 为 0.486。所制备颗粒的形貌接近球体。颗粒的粒径分布图如图 6 所示。

[0118] 水包油乳液制备:

[0119] 采用电子天平准确称取 0.72g 氢氧化铝颗粒, 加入到 40mL 磷酸盐缓冲溶液中, 超声 1min 使其分散均匀, 得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 7.4。用移液枪吸取 2mL 角鲨烯加入到上述水相悬浮液中, 采用均质 (20000rpm, 5min) 乳化的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为 7.4  $\mu\text{m}$ , Span 为 0.696。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异, 上层无油相析出。乳液的光镜照片如图 7 所示。

[0120] 实施例 3: 采用磷酸钙颗粒制备水包油乳液

[0121] 采用模板法制备中空磷酸钙颗粒:

[0122] 将 3.0g Tween80, 0.25g PEG6000, 3.0mL 0.5mol/L 的 Tris-HCl (pH8.0) 和 1.5mL 去离子水混合搅拌均匀后, 超声 20min (10W) 形成非离子表面活性剂囊泡, 滴入 3.55mL  $\text{CaCl}_2$  (0.175mol/L) 溶液, 搅拌 0.5h 后, 再加入 3.55mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.175mol/L) 溶液可得到磷酸钠颗粒的悬浮液, 加入 0.83mL  $\text{MgCl}_2$  溶液 (0.075mmol/L) 来稳定刚形成的磷酸钙颗粒, 继续搅拌 2h 后离心洗涤, 真空干燥后得到中空磷酸钙颗粒。颗粒的平均粒径为 210nm, 壳层厚度为 30-40nm, 颗粒的 Span 为 0.349。所制备颗粒为中空球体。

[0123] 水包油乳液制备:

[0124] 采用电子天平准确称取 1.00g 中空磷酸钙颗粒, 加入到 20mL 柠檬酸缓冲溶液中, 超声 2min 使其分散均匀, 得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 6.0。用移液枪吸取 2mL 角鲨烯加入到上述水相悬浮液中, 采用磁力搅拌 (500rpm, 10min) 乳化的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为 10.2  $\mu\text{m}$ , Span 为 0.696。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异, 上层无油相析出。

[0125] 实施例 4: 采用壳聚糖覆层的海藻酸颗粒制备水包油乳液

[0126] 采用快速膜乳化技术制备壳聚糖覆层的海藻酸颗粒:

[0127] 首先将石油醚 (沸程为 60-90℃) 和液体石蜡以体积比为 2:1 混合, 并向混合有机相中加入质量分数为 4wt. % 的乳化剂 Span80, 上述混合物作为油相, 水相为海藻酸钠水溶液 (1.0wt. %)。将 2mL 水相与 60mL 油相在均质 (3600rpm, 1min) 的作用下乳化形成预乳液, 接着将预乳液加入到快速膜乳化储罐中, 在氮气压力下 (1MPa), 预乳液通过 SPG 膜 (膜孔径为 1.4  $\mu\text{m}$ ), 循环 5 次, 就得到了较为均一的乳液。 $\text{CaCl}_2$  溶液 (5mol/L, 12mL) 作为固化剂, 在超声 (120W, 1min) 的作用下分散到油相 (24mL) 中形成细乳。将该细乳与上面得到的均一的乳液混合后在 37℃ 水浴中搅拌 5h (250rpm) 使乳液固化得到胶体颗粒, 用石油醚、乙醇、水各分别洗涤三次, 就得到了海藻酸颗粒。

[0128] 海藻酸颗粒的壳聚糖覆层步骤包括: 首先将 1g 海藻酸颗粒分散到 0.7wt. % 的壳聚糖乙酸溶液 (20mL, 壳聚糖分子量为 80 万道尔顿, 脱乙酰度为 90%) 中, 搅拌 1h (200rpm) 后, 将颗粒用乙酸缓冲溶液 (pH4 和 pH5.5) 以及去离子水洗涤干净, 获得壳聚糖覆层的海藻酸颗粒。

藻酸颗粒。还可对颗粒进行多次镀层,步骤为:将已覆层的胶体颗粒(1g)分散到0.5wt%的海藻酸钠水溶液(20mL)中,搅拌1h(200rpm),用去离子水洗涤一次后,再将颗粒分散到0.7wt%的壳聚糖乙酸溶液(20mL)中,并搅拌1h(200rpm)。然后将颗粒用乙酸缓冲溶液(pH4和pH5.5)和去离子水洗涤后,就得到了双层覆层的壳聚糖-海藻酸颗粒。按上述步骤重复多次,可获得壳聚糖多次覆层的海藻酸颗粒。本发明中对海藻酸颗粒进行三次覆层,颗粒的平均粒径为457nm,颗粒的Span为0.839。所制备颗粒表面粗糙,球形规整。

[0129] 水包油乳液制备:

[0130] 采用电子天平准确称取1.22g壳聚糖覆层海藻酸颗粒,加入到10mL磷酸盐缓冲溶液中,超声1min使其分散均匀,得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相pH值为8.0。用移液枪吸取2mL角鲨烯加入到上述水相悬浮液中,采用漩涡振荡(10min)乳化的方法,制备水包油乳液。乳滴分散性良好,球形规整。乳滴的平均粒径为10.2 $\mu$ m,Span为0.741。所制备水包油乳液离心后,上层析出1cm左右的油相。乳液的照片如图8所示。

[0131] 实施例5:采用单甲氧基聚乙二醇-乳酸共聚物(PELA)多孔颗粒制备水包油乳液

[0132] 采用相分离-溶剂去除法制备PELA多孔颗粒:

[0133] 将100mgPELA(mPEG:PLA摩尔比为1:19,平均分子量为40kDa)溶于7.5mL丙酮中,加入7.5mL无水乙醇溶液,将上述溶液滴入(1滴/s)快速搅拌(750rpm)下的去离子水(90mL,含10g/LSDS)中,滴加完毕后,继续搅拌24h(750rpm)。用去离子水离心洗涤5次后,将沉淀悬浮在10mL去离子水中保存,为PELA颗粒悬浮液。

[0134] 向3mL去离子水中加入200 $\mu$ L二氯甲烷,置于超声波细胞破碎机(400W,60s)中混合均匀作为溶胀剂。取上述2mLPELA颗粒悬浮液加入到溶剂剂中,维持磁力搅拌(250rpm)溶胀30min,静置1h后快速放入液氮中使其迅速冷冻,保存在-20 $^{\circ}$ C中使有机溶剂挥发得到具有多孔结构的PELA颗粒,颗粒的平均粒径为78.55nm,Span为0.331,颗粒为表面多孔的球形结构。

[0135] 水包油乳液制备:

[0136] 采用电子天平准确称取0.351gPELA颗粒,加入到10mL注射用水中,超声1min使其分散均匀,得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相pH值为7.0。油相为2mL $\alpha$ -生育酚,采用顺锥微流控乳化的方法(锥形端口直径范围为20-40 $\mu$ m,油相流速范围为500-600 $\mu$ L/h,水相流速范围为1000-1200 $\mu$ L/h),制备水包油乳液。乳滴分散性良好,球形规整。乳滴的平均粒径为70 $\mu$ m,Span为0.096。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异,上层无油相析出。

[0137] 实施例6:采用花生状的碳酸钙颗粒制备水包油乳液

[0138] 采用液相直接混合沉淀法制备花生状的碳酸钙颗粒:

[0139] 用电子天平称取醋酸钙和柠檬酸三钠溶解在200mL蒸馏水中(柠檬酸三钠的质量浓度分别为10wt.%和30wt.%),向该溶液中加入10wt.%的碳酸钠水溶液(50mL),搅拌(300rpm)下反应3h,过滤,用蒸馏水及无水乙醇分别洗涤沉淀三次后,在70 $^{\circ}$ C下烘干,得到花生状的碳酸钙颗粒。颗粒的长度为7.2 $\mu$ m,长短轴比为2:1,所制备颗粒的形貌为花生状。

[0140] 水包油乳液制备:

[0141] 采用电子天平准确称取3.15g碳酸钙颗粒,加入到40mL磷酸盐缓冲溶液中,超声1min使其分散均匀,得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相pH值为7.4。用移液枪吸取

2mL 角鲨烯加入到上述水相悬浮液中,采用快速膜乳化 (Shirasu Porous Glass (SPG) 微孔膜孔径为  $50.2\ \mu\text{m}$ , 过膜压力为 200KPa, 过膜三次) 的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为  $45.10\ \mu\text{m}$ , Span 为 0.726。所制备水包油乳液离心后, 上层析出 0.5cm 的油相。

[0142] 实施例 7: 采用包埋有抗原的聚乳酸 (PLA) 颗粒制备水包油乳液

[0143] 采用快速膜乳化结合复乳溶剂去除法制备包埋有乙肝抗原 (HBsAg) 的 PLA 颗粒:

[0144] 将 200mg 的 PLA 溶于 4.0mL 的乙酸乙酯中, 加入 0.4mL 的 5% (w/v) 的 HBsAg, 用超声波细胞破碎仪在冰水浴条件下进行初乳化 (功率 12%, 时间为 15s), 然后将初乳液倒入 200mL 的含 1.0wt. % PVA 的水溶液 (外水相) 中以磁力搅拌进行预复乳化 (300rpm, 50s)。预复乳化后将预复乳液倒入快速膜乳化装置的储存罐里, 以压力为 300KPa 的氮气把预复乳液压过 SPG 膜 (膜孔径为  $5.2\ \mu\text{m}$ ) 得到复乳液。将复乳液倒入 800mL 0.9wt. % NaCl 水溶液 (固化溶液) 中 500rpm 磁力搅拌 10min, 以固化微球。固化后的微球用去离子水离心 (4000r/min, 5min) 洗涤 3 次, 最后冷冻干燥制成成品。颗粒的平均粒径为  $2.32\ \mu\text{m}$ , Span 为 0.496, 颗粒为表面光滑的球形结构。抗原的包埋率为 90%, 颗粒的载抗原量为 0.09mg 抗原/g 微球。

[0145] 水包油乳液制备:

[0146] 采用电子天平准确称取 7.22g PLA 颗粒, 加入到 40mL 可注射用水中, 漩涡振荡 5min 使其分散均匀, 得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 7.0。用移液枪吸取 2mL  $\alpha$ -生育酚加入到上述水相悬浮液中, 采用微射流乳化 (12000psi) 的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为  $42.39\ \mu\text{m}$ , Span 为 0.742。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异, 上层无油相析出。

[0147] 实施例 8: 采用壳聚糖颗粒制备水包油乳液

[0148] 采用快速膜乳化结合温度固化法制备壳聚糖颗粒:

[0149] 水相配制: 准确称取一定量的壳聚糖 (分子量为 5 万道尔顿, 脱乙酰度为 80%) 溶于 9mL 醋酸溶液 (0.1mol/L) 中, 磁力搅拌下使其充分溶解得到壳聚糖醋酸溶液; 另将一定量的甘油磷酸钠溶解于 1mL 去离子水中。将壳聚糖醋酸溶液及甘油磷酸钠溶液分别在 4°C 下保温 10min 后, 将甘油磷酸钠溶液缓慢滴加至壳聚糖醋酸溶液中, 磁力搅拌 (300rpm, 10min) 将其混合均匀。将此溶液在 20000rpm 下离心除去不溶性杂质, 保留上清液作为水相备用。壳聚糖在水相中的浓度为 3.5wt. %, 甘油磷酸钠在水相中的浓度为 10.0wt. %。

[0150] 油相制备: 将油性乳化剂 PO-500 加入到 60mL 的液体石蜡和石油醚 (石油醚沸程为 60-90°C) 的混合物 (体积比为 5:7) 中, PO-500 在油相中的浓度为 4wt. %, 搅拌至完全溶解, 在 4°C 下保温 10min 作为油相。

[0151] 乳液制备: 在 4°C 下, 将 2mL 的水相与 50mL 的油相混合并用均质乳化器在 6000rpm 下乳化 1min, 形成预乳液。将所得预乳液迅速倒入快速膜乳化装置的预乳液储存器中, 在 5.0MPa 的氮气压力下, 使其快速通过 SPG 微孔膜 (膜孔径为  $2.8\ \mu\text{m}$ ), 得到粒径比较均一的 W/O 型乳液, 将所得乳液作为预乳液在 5.0MPa 的氮气压力下再次通过 SPG 微孔膜, 反复乳化五次, 最终得到粒径均一的 W/O 型乳液; 乳化过程耗时约 10min, 乳化完毕后, 将 W/O 型乳液放入 35°C 的水浴中, 机械搅拌 (200rpm) 下固化 1h。固化反应结束后, 在 10000rpm 下离心, 依次用石油醚、乙醇和去离子水洗涤, 得到壳聚糖颗粒。颗粒的平均直径为 870nm, Span 值

为 0.487, 颗粒为表面疏松多孔的球状结构。

[0152] 水包油乳液制备:

[0153] 采用电子天平准确称取 1.00g 壳聚糖颗粒, 加入到 20mL PBS 缓冲溶液中, 超声 1min 使其分散均匀, 得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 8.1。用移液枪吸取 2mL  $\alpha$ -生育酚加入到上述水相悬浮液中, 采用漩涡振荡 (10min) 的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为 18.10  $\mu\text{m}$ , Span 为 0.935。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异, 上层无油相析出。

[0154] 还可采用其他壳聚糖材料制备颗粒以及随之的水包油乳液, 其制备步骤与实施例 8 类似, 区别在于采用不同分子量及脱乙酰度的壳聚糖及改变油水相组成和制备工艺, 具体工艺参数及结果如表 2 所示。在同样的脱乙酰度条件下, 分子量越小, 其粘度越低, 用同样的膜乳化条件制备的颗粒粒径越小, 所制备乳液的粒径也越小。在同样的分子量条件下, 脱乙酰度越高, 其粘度越低, 用同样的膜乳化条件制备的颗粒粒径越小, 所制备乳液的粒径也越小。

[0155] 表 2

[0156]

配方											制备工艺		结果		
固体颗粒					水相			油相		油相与水相的体积比	颗粒在水相中的质量浓度 (wt.%)	颗粒在水相中的分散方式	水相与油相的混合方式	乳液性质	
材料	脱乙酰度	分子量(道尔顿)	粒径 (nm)	Span	成分	pH 值	其他添加物	成分	其他添加物					平均粒径 (μm)	Span
壳聚糖	80%	5万	870	0.487	PBS 缓冲液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	-	1:10	5	磁力搅拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	14.3	0.689
	80%	10万	932	0.458	PBS 缓冲液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	-	1:10	5	磁力搅拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	18.5	0.771
	80%	50万	1125	0.532	PBS 缓冲液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角鲨烯	-	1:10	5	磁力搅拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	21.2	0.835

[0157]

												min)	min)		
80%	80万	1354	0.443	PBS 缓冲 液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角 鲨 烯	-	1:10	5	磁力搅 拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	30.3	0.989	
80%	90万	1578	0.546	PBS 缓冲 液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角 鲨 烯	-	1:10	5	磁力搅 拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	34.2	0.996	
85%	80万	1277	0.654	PBS 缓冲 液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角 鲨 烯	-	1:10	5	磁力搅 拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	25.6	0.768	
90%	80万	982	0.435	PBS 缓冲 液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角 鲨 烯	-	1:10	5	磁力搅 拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	20.3	0.641	
95%	80万	964	0.335	PBS 缓冲 液	7.4	0.1 mol/L NaCl	角 鲨 烯	-	1:10	5	磁力搅 拌 (250 rpm, 5 min)	均质 (6000 rpm, 3 min)	17.9	0.632	

[0158] 实施例 9 :采用吸附有抗原的壳聚糖颗粒制备水包油乳液

[0159] 颗粒的制备方法同实施例 8, 区别在于壳聚糖颗粒吸附 H5N1 禽流感裂解疫苗 :

[0160] 准确称取 1g 制备得到的壳聚糖颗粒, 加入 10mL 含有 H5N1 禽流感裂解疫苗 (HA 浓度为  $150 \mu\text{g/mL}$ ) 的 PBS 缓冲液中,  $4^{\circ}\text{C}$  下振荡 (120rpm, 24h), 10000rpm 下离心, 用去离子水洗涤三次, 得到吸附有 H5N1 禽流感裂解疫苗的壳聚糖颗粒。抗原的吸附率为 60%, 颗粒上的抗原载量为  $900 \mu\text{gHA/g}$  颗粒。

[0161] 水包油乳液制备 :

[0162] 采用电子天平准确称取 1.00g 吸附有抗原的壳聚糖颗粒, 加入到 20mLPBS 缓冲溶液中, 超声 1min 使其分散均匀, 得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 8.1。用移液枪吸取 2mL  $\alpha$ -生育酚加入到上述水相悬浮液中, 采用漩涡振荡 (10min) 的方法, 制备水包油乳液。乳滴分散性良好, 球形规整。乳滴的平均粒径为  $19.70 \mu\text{m}$ , Span 为 0.941。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异, 上层无油相析出。

[0163] 实施例 10 :水包油乳液的安全性评价

[0164] 1. 血管刺激性试验

[0165] 将实施例 1 和实施例 2 分别于家兔耳静脉注射给药, 每日一次, 连续给药 3 天。结果 : 家兔耳静脉给药部位肉眼观察无明显变化 ; 组织病理切片显微镜检显示距注射部位

1cm 处血管、5cm 处血管内皮连续、完整,未见增生、肿胀;血管周围组织未见炎性细胞浸润及坏死;管腔内无血栓形成。显示本品对家兔耳静脉血管未见明显刺激作用。

[0166] 2. 溶血与凝聚试验

[0167] 采用常规体外试管法(肉眼观察法),将实施例 1 和实施例 2 分别与 2% 红细胞混悬液混合,3 小时内未见溶血与红细胞凝聚现象。

[0168] 3. 肌肉刺激性试验

[0169] 将实施例 1 和实施例 2 分别用于家兔股四头肌注射给药,每侧给药 1 mL。48 小时后取给药部位肉眼观察并作病理组织学检查。结果表明,本品对家兔股四头肌无刺激性。

[0170] 实施例 11 :水包油乳液中水相与油相的混合方式对产生抗体滴度的影响

[0171] 按照实施例 1 中方法制备 PLGA 颗粒。

[0172] 水包油乳液制备:

[0173] 采用电子天平准确称取 2g PLGA 颗粒,加入到 40mL 柠檬酸缓冲溶液中,超声 5min 使其分散均匀,得到分散有颗粒的水相悬浮液。其中水相 pH 值为 6.0。用移液枪吸取 2mL 角鲨烯加入到上述水相悬浮液中,将上述混合液平均分为两份,分别采用快速膜乳化(膜孔径为 40.2  $\mu\text{m}$ ,过膜压力为 500KPa,过膜三次)和机械搅拌(500rpm,5min)的方法进行乳化,制备水包油乳液。所制备乳液的乳滴均分散性良好,球形规整。其中快速膜乳化所制备乳液中乳滴的平均粒径为 32.20  $\mu\text{m}$ ,Span 为 0.372;机械搅拌所制备乳液中乳滴的平均粒径为 45.32  $\mu\text{m}$ ,Span 为 0.839。所制备水包油乳液的外观与未离心乳液无差异,上层无油相析出。

[0174] 将上述制得的水包油乳液分别与 H5N1 禽流感裂解疫苗(血凝素(HA)含量均为 4.5  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ )混合(乳液与疫苗的混合体积比为 1:1,超声(10W,3min)混合),另取同样血凝素含量的裂解疫苗作为对照。对 Balb/c 小鼠左后腿肌肉注射后,两周后进行二次免疫,35 天处死小鼠,结果如表 3 所示,与机械搅拌组相比,快速膜乳化组能发挥良好的佐剂效应,实验动物体内产生高水平的 IgG、HI 滴度,佐剂组均与单抗原注射组间存在着显著性差异。

[0175] 表 3

[0176]

抗原种类	佐剂种类	乳液制备方式	血清 IgG 水平	HI 水平
裂解疫苗	实施例 1	快速膜乳化	480000	2560
裂解疫苗	实施例 1	机械搅拌	320000	640
裂解疫苗	无	无	62000	32

[0177] 实施例 12 :水包油乳液与抗原的混合方式对产生抗体滴度的影响

[0178] 将按照实施例 11 中方法制得的水包油乳液分别与 H5N1 禽流感灭活全病毒疫苗和裂解疫苗(血凝素(HA)含量均为 4.5  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ )混合(乳液与疫苗的混合体积比为 1:1,采用不同的混合方式,包括振荡(5min)、超声(10W,3min)、均质(10000rpm,1min)),对 Balb/c 小鼠左后腿肌肉注射后,两周后进行二次免疫,35 天处死小鼠,结果如表 4 所示,水包油乳液均能发挥良好的佐剂效应,实验动物体内产生高水平的 IgG、HI 滴度,与单抗原注

射组间存在着显著性差异,其中均质法混合的水包油乳液注射组具有更高的抗体水平。

[0179] 表 4

[0180]

抗原种类	佐剂种类	混合方式	血清 IgG 水平	HI 水平
灭活全病毒疫苗	实施例 1	振荡	320000	720
灭活全病毒疫苗	实施例 1	超声	510000	2580
灭活全病毒疫苗	实施例 1	均质	600000	3600
灭活全病毒疫苗	无	无	80000	64
裂解疫苗	实施例 1	振荡	300000	640
裂解疫苗	实施例 1	超声	480000	2560
裂解疫苗	实施例 1	均质	580000	3200
裂解疫苗	无	无	62000	32

[0181] 实施例 13 :水包油乳液与抗原接种方式对佐剂作用的影响

[0182] 将按照实施例 11 中方法制得的水包油乳液分别与乙肝表面抗原重组疫苗(重组汉逊酵母疫苗,抗原浓度为 1.9mg/mL)混合(乳液与疫苗的混合体积比为 1:1,采用均质(10000rpm,1min)混合),将上述疫苗组合物对 Balb/c 小鼠分别进行肌肉、皮下和腹腔注射,两周后进行二次免疫,35 天处死小鼠,结果如表 5 所示,肌肉注射组表现出较高的体液抗体水平(IgG)及细胞因子分泌水平(IL-4 及 IFN- $\gamma$ )。

[0183] 表 5

[0184]

抗原种类	佐剂种类	接种方式	血清 IgG 水平	IL-4	IFN- $\gamma$
乙肝疫苗	实施例 1	肌肉注射	256000	32	11240
乙肝疫苗	实施例 1	皮下注射	184000	28	10020
乙肝疫苗	实施例 1	腹腔注射	102400	18	8000
乙肝疫苗	无	肌肉注射	20480	5	2000
乙肝疫苗	无	皮下注射	14560	4	1540
乙肝疫苗	无	腹腔注射	10240	2	1000

[0185] 实施例 14 :水包油乳液与铝佐剂、MF59 佐剂的佐剂作用比较

[0186] 将实施例 11 中水包油乳液、氢氧化铝佐剂及 MF59 分别与 H1N1 甲型流感灭活全



病毒疫苗按照体积比 1:1 的比例混合制成疫苗佐剂组合物,组合物中血凝素浓度为 15  $\mu$ g/mL,每剂 0.5mL。另取血凝素浓度 15  $\mu$ g/mL 的灭活全病毒疫苗作为对照。分别将等体积上述三种疫苗佐剂组合物及对照疫苗对 Balb/c 小鼠进行肌肉注射免疫接种,两周后进行二次免疫,35 天处死小鼠,免疫结果如表 6 所示。结果表明,本发明的水包油乳液可以显著提高机体对流感灭活全病毒疫苗的体液免疫应答水平及细胞免疫水平。水包油乳液在体液免疫方面的增强效果与 MF59 相当,高于氢氧化铝佐剂,三者均高于不加佐剂的疫苗;在细胞免疫方面,水包油乳液组优于 MF59 及氢氧化铝佐剂组,这主要是由于水包油乳液中的颗粒可促进抗原被抗原提呈细胞吞噬,并激活淋巴细胞,刺激其分化并分泌细胞因子。

[0187] 表 6

[0188]

抗原种类	佐剂种类	血清 IgG 水平	HI 水平	IL-4	IFN- $\gamma$
H1N1 甲型流感 灭活全病毒疫苗	实施例 1	512000	2560	30	12000
H1N1 甲型流感 灭活全病毒疫苗	MF59	501200	1280	20	8000
H1N1 甲型流感 灭活全病毒疫苗	氢氧化铝佐剂	242400	640	15	4000
H1N1 甲型流感 灭活全病毒疫苗	无	92400	64	3	1000

[0189] 实施例 15:水包油乳液加入量对免疫效果的影响

[0190] 将按照实施例 11 中方法制得的水包油乳液与 EV71 手足口灭活病毒疫苗以 2:1、1:1、1:2、1:4 等不同比例混合组成疫苗佐剂组合物,其中抗原浓度均为 0.05mg/mL,每剂 0.2mL。以上述疫苗佐剂组合物对 Balb/c 小鼠进行肌肉注射接种,两周后进行二次免疫。结果见表 7。结果表明,提高疫苗佐剂组合物中佐剂量,可以增强定量抗原产生的免疫应答水平,佐剂剂量与佐剂作用强度正相关。

[0191] 表 7

[0192]

抗原种类	佐剂种类	佐剂与抗原混合比例	血清 IgG 水平
EV71 手足口灭活病毒疫苗	实施例 1	2:1	204800
EV71 手足口灭活病毒疫苗	实施例 1	1:1	145000
EV71 手足口灭活病毒疫苗	实施例 1	1:2	81400
EV71 手足口灭活病毒疫苗	实施例 1	1:4	51200
EV71 手足口灭活病毒疫苗	无	无	10240

[0193] 实施例 16 :不同抗原浓度的疫苗对免疫效果的影响

[0194] 将按照实施例 11 中方法制得的水包油乳液与 H5N1 流感灭活全病毒疫苗组成血凝素浓度为 37.5  $\mu$ g/mL、75  $\mu$ g/mL、150  $\mu$ g/mL 的疫苗佐剂组合物,每剂均为 0.1mL。以上述两种疫苗佐剂组合物及同样血凝素浓度的两种不含佐剂疫苗经肌肉接种免疫 Balb/c 小鼠,两周后二次免疫,35 天处死小鼠,结果见表 8。结果表明,本发明的水包油乳液对 H5N1 流感灭活全病毒疫苗具有良好的佐剂作用,与相同血凝素浓度的不含佐剂疫苗相比,佐剂疫苗能够明显提高小鼠体内免疫应答强度。

[0195] 表 8

[0196]

抗原种类	佐剂种类	抗原浓度	28 天血清 IgG 水平	35 天血清 IgG 水平	HI 水平
H5N1 流感灭活全病毒疫苗	实施例 1	37.5 $\mu$ g/mL	514200	543800	3400

[0197]

H5N1 流感灭活全病毒疫苗	实施例 1	75 $\mu$ g/mL	620000	640200	3600
H5N1 流感灭活全病毒疫苗	实施例 1	150 $\mu$ g/mL	624800	640200	3600
H5N1 流感灭活全病毒疫苗	无	37.5 $\mu$ g/mL	72240	80480	100
H5N1 流感灭活全病毒疫苗	无	75 $\mu$ g/mL	78560	84600	120
H5N1 流感灭活全病毒疫苗	无	150 $\mu$ g/mL	78600	85000	120

[0198] 实施例 17 :水包油乳液用于鼻腔粘膜免疫接种的佐剂效果

[0199] 将按照实施例 11 中方法制得的水包油乳液与 H7N9 流感裂解疫苗组成血凝素浓度为 150  $\mu$ g/mL 的疫苗佐剂组合物,每剂均为 0.03mL。以上述疫苗佐剂组合物及同样血凝素浓度的不含佐剂疫苗经鼻腔滴鼻接种免疫 Balb/c 小鼠,两周后二次免疫,35 天处死小鼠,免疫结果见表 9。结果表明,本发明的水包油乳液对 H7N9 流感裂解疫苗具有良好的佐剂作用,与相同血凝素浓度的不含佐剂疫苗相比,佐剂疫苗能够明显提高小鼠血清及粘膜处的免疫应答强度。

[0200] 表 9

[0201]

抗原种类	佐剂种类	28天血清 IgG 水平	35天血清 IgG 水平	HI 水平	鼻粘膜灌洗液中的 IgA 水平
H7N9 流感裂解疫苗	实施例 1	204800	102400	100	2024
H7N9 流感裂解疫苗	无	8400	7000	16	128

[0202] 实施例 18 :水包油乳液作为免疫佐剂的部分增强机理 (局部致炎作用)

[0203] 为观察 MF59、AS03 与本发明的水包油乳液 (按照实施例 11 制备) 这三种不同乳剂型疫苗佐剂所引发的免疫反应, 将鸡卵白蛋白 (OVA) 作为抗原与三种乳剂型疫苗佐剂混合制成佐剂疫苗组合物。将上述佐剂疫苗组合物经 Balb/c 小鼠右后腿肌肉注射接种免疫, 不同时间处死小鼠, 将小鼠注射部位组织切片, 以 H&E、TUNEL 两种方法对切片组织进行染色, 观察三种乳剂型疫苗佐剂在体内引起的炎症反应。局部组织切片观察显示, 三种乳剂型疫苗佐剂均能同时造成一定的炎症反应, 募集炎症细胞, 但炎症程度较轻, 七天后炎症反应消退, 具有良好的生物相容性。

[0204] 实施例 19 :水包油乳液作为免疫佐剂的部分增强机理 (促进细胞吞噬作用)

[0205] 以小鼠的巨噬细胞株 RAW264.7 作为抗原递呈细胞, 以 OVA 作为抗原与水包油乳液混合制成佐剂疫苗组合物。进行体外细胞实验, 考察水包油乳液 (按照实施例 11 制备) 对抗原递呈细胞吞噬抗原量的影响, 结果表明佐剂组可以显著增加 RAW264.7 细胞吞噬抗原的量。

[0206] 实施例 20 :水包油乳液作为药物释放载体

[0207] 按照实施例 4 制备水包油乳液, 区别在于油相中加入质量浓度为 0.5wt. % 的紫杉醇。

[0208] 实施例 21 :水包油乳液作为药物释放载体

[0209] 按照实施例 5 制备水包油乳液, 区别在于 PELA 颗粒中包埋有质量浓度为 1wt. % 的胰岛素。

[0210] 申请人声明, 本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法, 但本发明并不局限于上述详细方法, 即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了, 对本发明的任何改进, 对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等, 均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

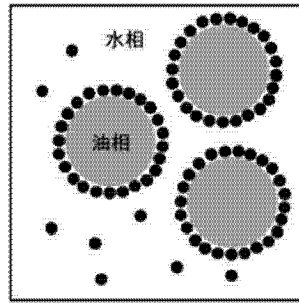


图 1

颗粒体积粒径分布

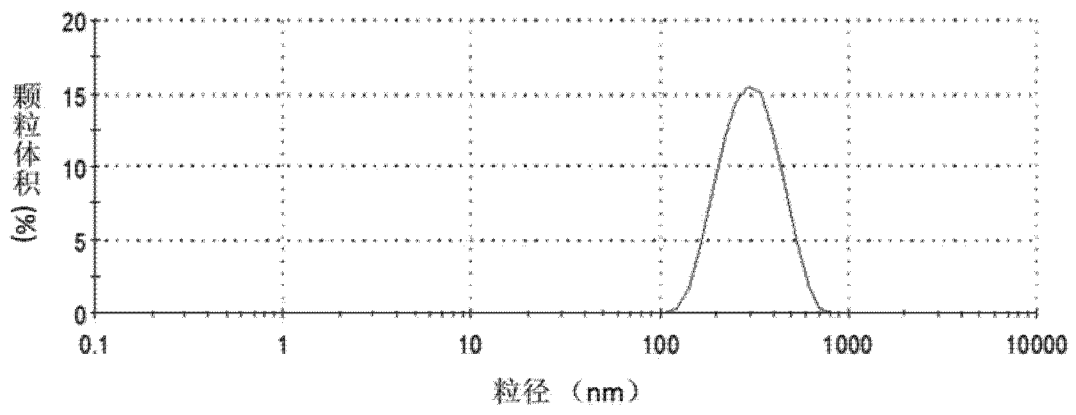


图 2

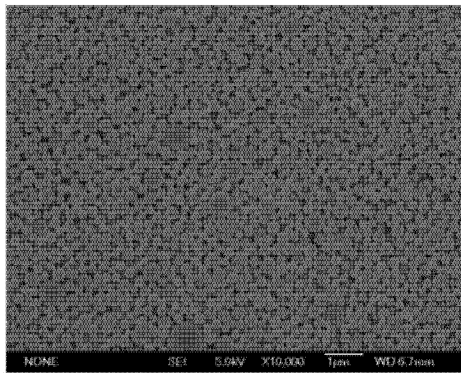


图 3

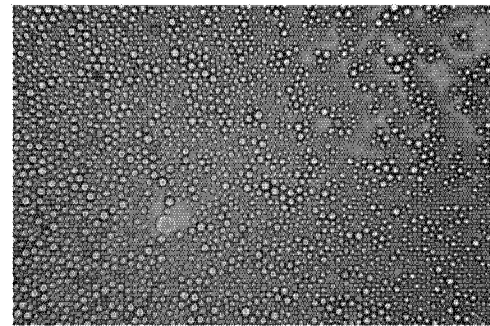


图 4

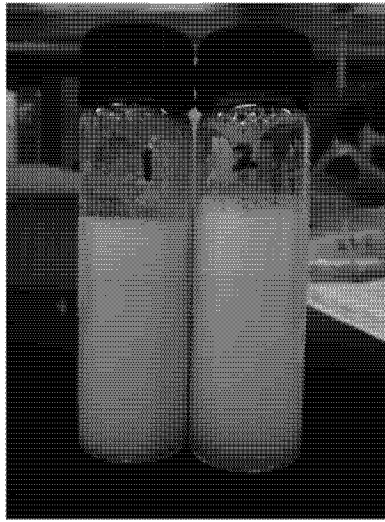


图 5

颗粒体积粒径分布

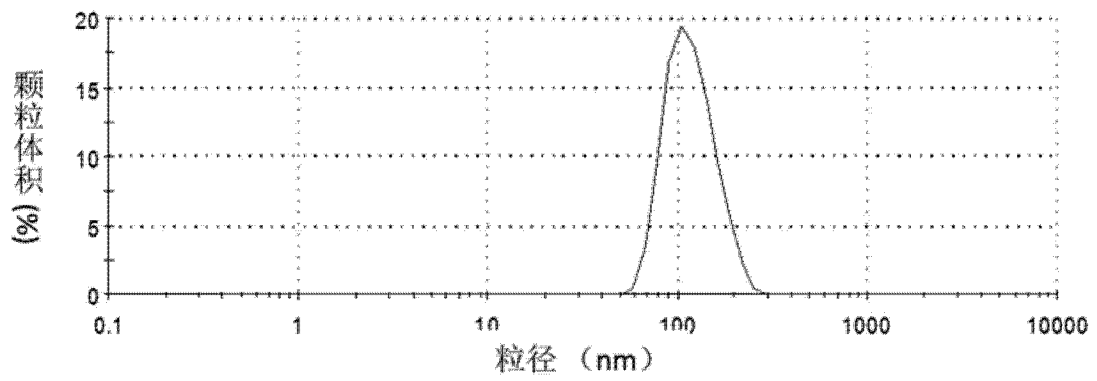


图 6

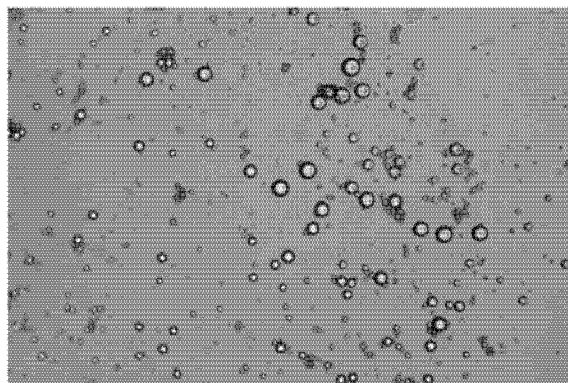


图 7



图 8