



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118078765 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202311484401.4

A61K 9/08 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.08

A61K 9/10 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 39/39 (2006.01)

202211388445.2 2022.11.08 CN

A61K 39/12 (2006.01)

202310886776.7 2023.07.18 CN

A61K 39/02 (2006.01)

202310884566.4 2023.07.18 CN

A61P 37/04 (2006.01)

202310881092.8 2023.07.18 CN

(71) 申请人 江苏瑞科生物技术股份有限公司

地址 225300 江苏省泰州市医药高新区药城大道888号

申请人 北京安百胜生物科技有限公司

(72) 发明人 姚文荣 袁楚晓 吴双 班靖洋

刘娟 洪坤学 刘勇

(51) Int. Cl.

A61K 9/19 (2006.01)

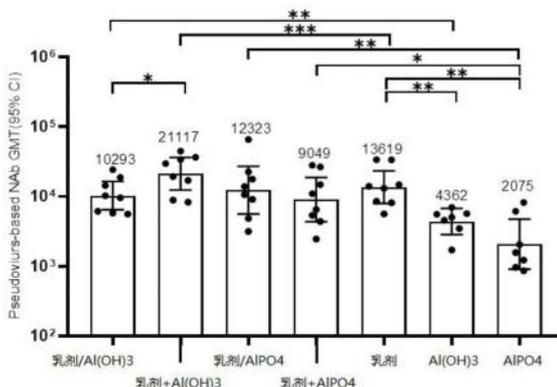
权利要求书1页 说明书23页 附图9页

(54) 发明名称

一种佐剂赋能的疫苗组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种佐剂赋能的疫苗组合物,其包含独立包装的第一组分和第二组分,所述第一组分包含抗原性物质,所述第二组分为赋能佐剂,所述赋能佐剂包含水包油乳剂佐剂,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。本发明的疫苗组合物在制备时不需要将两种组分配制为成品制剂,两种组分可以独立包装,安全性高,稳定性好,同时可以达到有效改善免疫应答,快速刺激抗体产生的技术效果。



1. 一种疫苗组合物,其特征在于,包含独立包装的第一组分和第二组分,所述第一组分为包含抗原性物质的含或不含佐剂的疫苗成品制剂;所述第二组分为包含水包油乳剂佐剂的赋能佐剂,其中,所述水包油乳剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。

2. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述第一组分为减毒活疫苗、灭活疫苗、类毒素疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗、基因工程疫苗或核酸疫苗成品制剂。

3. 根据权利要求2所述的疫苗组合物,其特征在于,所述第一组分中的抗原性物质包含人乳头瘤病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、百日咳杆菌抗原、白喉杆菌抗原、破伤风杆菌抗原、甲型肝炎抗原、乙型肝炎抗原、狂犬病毒抗原、炭疽杆菌抗原、b型流感嗜血杆菌抗原、肺炎链球菌抗原以及脑膜炎球菌抗原中的一种或多种。

4. 根据权利要求2所述的疫苗组合物,其特征在于,所述第一组分包含铝佐剂,所述铝佐剂选自氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝和明矾中的至少一种。

5. 根据权利要求4所述的疫苗组合物,其特征在于,所述铝佐剂的含量在10-1000 $\mu$ g之间,优选在50-800 $\mu$ g之间,更优选在100-600 $\mu$ g之间。

6. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述第一组分是冻干制剂、溶液或混悬液。

7. 根据权利要求6所述的疫苗组合物,其特征在于,所述溶液或混悬液的体积为0.2-1.0ml,优选为0.5ml或1.0ml。

8. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述水包油乳剂佐剂包含5-15mg角鲨烯、5-15mg  $\alpha$ -生育酚和2-10mg吐温80,优选地,所述水包油乳剂佐剂包含10.69mg角鲨烯、11.86mg  $\alpha$ -生育酚和4.86mg吐温80。

9. 根据权利要求8所述的疫苗组合物,其特征在于,所述水包油乳剂佐剂的体积为0.2-1.0ml,优选为0.5ml。

10. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述水包油乳剂佐剂进一步包含MPL、皂苷、poly I:C和CpG中的一种或多种。

11. 一种权利要求1-10中任一项所述疫苗组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 制备包含抗原性物质和铝佐剂的第一组分;

(ii) 制备包含水包油乳剂佐剂的第二组分;

(iii) 将所述第一组分与第二组分分别独立包装后组合,制得佐剂赋能的疫苗组合物,其中步骤(i)和(ii)可以以任一顺序进行,包括先后进行、同时进行或分场地进行。

12. 权利要求1-10中任一项所述的疫苗组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

13. 一种包含权利要求1-10中任一项所述疫苗组合物的试剂盒,其特征在于,包含独立包装的第一组分和第二组分,所述第一组分包含抗原性物质和铝佐剂,所述第二组分包含水包油乳剂佐剂,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80,所述第一组分和第二组分装在小瓶中。

14. 一种包含权利要求1-10中任一项所述疫苗组合物的多室注射器,其特征在于,包含第一隔室和第二隔室,所述第一隔室装有第一组分,所述第一组分包含抗原性物质和铝佐剂;第二隔室装有第二组分,所述第二组分包含水包油乳剂佐剂,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。

## 一种佐剂赋能的疫苗组合物

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药工程领域,特别涉及一种佐剂赋能的疫苗组合物及其制备方法和其在免疫治疗及预防领域的应用。

### 背景技术

[0002] 传统疫苗包括减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、基因重组蛋白疫苗等,多由单一活性成分构成,多采用单一品种佐剂的配方技术,其疫苗制备技术均采用疫苗活性成分制备就绪后,最后添加某一种佐剂方式制成疫苗成品。如灭活病毒疫苗、亚单位疫苗和重组基因工程蛋白疫苗,如果疫苗成分中只有抗原组分,其免疫原性往往较弱,通常需要联合应用佐剂来增强抗原的免疫原性或改变免疫的反应类型,才能起到足够的保护作用。佐剂的选择通常需要结合病原体的特点和免疫保护需要的免疫反应类型来决定,因此,选择适当且对疫苗的免疫原性有增强效用的佐剂对于疫苗的有效性尤其重要。虽然目前铝盐、MF59、AS04、AS01等佐剂已批准上市用于人用预防性疫苗中,但我国佐剂使用较单一,目前绝大部分含佐剂的疫苗产品中所使用的仍为传统的铝佐剂。铝佐剂作为免疫佐剂已经使用了很长的时间,其安全性与免疫增强作用早已被人们所证实。但也存在一些缺陷,比如在与免疫原性较差的蛋白小分子共同使用时无法产生足够的抗体应答,且细胞免疫方面存在缺陷等。

[0003] 乳剂型佐剂(包括水包油乳剂、油包水乳剂等)是新型佐剂的一个重要分支,乳剂可联合多种弱抗原(重组蛋白、多肽等)使用,并诱发高滴度的抗原特异性抗体。乳剂型佐剂通常包含油相成分、水相成分和乳化剂。其中,水包油乳剂以水相成分为主,人体耐受性较高,且与多数疫苗抗原的相容性较好。

[0004] 尽管乳剂型佐剂和铝佐剂都已经被广泛使用,但不同的组合或制剂方式、施用方式带来的免疫效果可能存在差异。因此,仍然需要有新的免疫制剂和免疫方法,以提供更加安全有效的,方便配制的,成本低廉的,能够快速诱导高效免疫应答的疫苗制剂。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种安全性和免疫刺激活性好,方便配制的,成本低廉的,能够快速诱导高效免疫应答的佐剂赋能的疫苗组合物。同时,本发明提供简便的制备方法和具有广阔前景的应用。

[0006] 为了达到上述目的,本发明一方面提供一种佐剂赋能的疫苗组合物,包含独立包装的第一组分和第二组分,所述第一组分为包含抗原性物质的含或不含佐剂的疫苗成品制剂;所述第二组分为包含水包油乳剂佐剂的赋能佐剂,其中,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。

[0007] 在一些实施方式中,所述疫苗组合物的第一组分是不含佐剂的疫苗成品制剂。

[0008] 在一些实施方式中,所述疫苗组合物的第一组分是含有佐剂的疫苗成品制剂。

[0009] 在一些实施方式中,本发明所述第一组分指的疫苗成品制剂为包含各种抗原性物质的减毒活疫苗、灭活疫苗、类毒素疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗、基因工程疫苗或核酸疫苗

的成品制剂。

[0010] 本文所述的减毒活疫苗是指将病原体经过减毒后,仍然保留其抗原性的疫苗,接种减毒活疫苗后相当于一次隐性感染过程。

[0011] 本文所述的灭活疫苗是对病毒或细菌进行培养,然后用高温处理或化学灭活剂将其灭活,而制备出的疫苗。

[0012] 本文所述的类毒素疫苗是指用丧失毒性而保留免疫原性的毒素所制成的疫苗,例如破伤风类毒素疫苗、白喉类毒素疫苗等。

[0013] 本文所述的亚单位疫苗是通过化学分解或有控制性的蛋白质水解方法,提取细菌、病毒的特殊蛋白质结构,筛选出的具有免疫活性的片段制成的疫苗,也称为组分疫苗。

[0014] 本文所述的载体疫苗是指以减毒活病毒或减毒活细菌为载体,将编码特定病原体免疫原性蛋白的基因插入载体,作为疫苗输入机体可预防特定病原体。

[0015] 本文所述的核酸疫苗分为DNA疫苗和mRNA疫苗两种。DNA疫苗是将重组的DNA直接注射到机体内,使其在活体内表达出蛋白抗原,激发机体产生保护性免疫应答。mRNA疫苗是指编码抗原蛋白的mRNA进入细胞质即可实现靶抗原的表达。

[0016] 本文所述的基因工程疫苗是指利用DNA重组技术,把目的基因插入载体DNA分子中,然后导入原核或真核细胞表达系统,纯化抗原而制成的疫苗。如目前广泛使用的乙肝基因重组疫苗、HPV疫苗、流感疫苗等。

[0017] 在一些实施方式中,所述第一组分中的抗原性物质可以衍生自病毒,诸如流感病毒、猫白血病毒、猫免疫缺陷病毒、人HIV-1、HIV-2、2型单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒或戊型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒、人乳头瘤病毒、狂犬病病毒、麻疹病毒、或口蹄疫病毒;也可以衍生自细菌,诸如炭疽、白喉、莱姆病、疟疾、结核病、利什曼病、克氏锥虫(*T. cruzi*)、埃利希氏体属(*Ehrlichia*)、假丝酵母属(*Candida*)等,或衍生自原生动植物诸如牛巴贝虫(*Babesia bovis*)或疟原虫(*Plasmodium*)。抗原性物质将通常由天然或合成的氨基酸构成,例如呈肽、多肽或蛋白的形式,可以由多糖构成,或者可以是其混合物。抗原可以从天然来源分离,借助固相合成法合成,或者可以通过重组DNA技术获得。作为人用疫苗的应用,包括但不限于预防以下疾病的疫苗中,例如流感,霍乱,破伤风,白喉,百日咳,甲肝,乙肝,b型流感嗜血杆菌(HIB)感染,流脑(A,B,C,Y,W135型),肺炎,狂犬病,日本脑炎,轮状病毒感染,炭疽,脊髓灰质炎,HPV感染,金黄色葡萄球菌感染,带状疱疹,新型冠状病毒感染等。

[0018] 在一些实施方式中,所述第一组分中的抗原性物质包含人乳头瘤病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、百日咳杆菌抗原、白喉杆菌抗原、破伤风杆菌抗原、甲型肝炎抗原、乙型肝炎抗原、狂犬病病毒抗原、炭疽杆菌抗原、b型流感嗜血杆菌抗原、肺炎链球菌抗原以及脑膜炎球菌抗原中的一种或多种。

[0019] 在一些实施方式中,所述第一组分是人乳头瘤病毒疫苗成品制剂,例如市售的二价、四价、九价或更高价次的HPV疫苗。

[0020] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是人乳头瘤病毒抗原。人乳头瘤病毒的衣壳由主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2组成。已上市疫苗都是基于HPV L1病毒样颗粒(Virus-like particle,VLP)为抗原的疫苗,通过基因重组表达的L1蛋白可在一定条件下形成类似病毒的颗粒,有着较好的免疫原性。

[0021] 来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原可以为各型别HPV的L1蛋白和/或L2蛋白。在本发明的实施方式中,HPV可以为低危型HPV (例如HPV6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81、89),中等风险型HPV (例如HPV26、53、66、73、82),或者高危型HPV (例如HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)。在优选的实施方式中,所述抗原包含HPV6型、11型、16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型及59型中的一种或多种的L1蛋白和/或L2蛋白。

[0022] 在优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV6型、11型、16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型及59型中的一种或多种的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0023] 在一个优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV 6型和11型的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0024] 在一个优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV16型和18型的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0025] 在一个优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV 6型、11型、16型和18型的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0026] 在一个优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV6型、11型、16型、18型、31型、33型、45型、52型及58型的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0027] 在一个优选的实施方式中,来源于人乳头瘤病毒 (HPV) 的抗原包含由HPV6型、11型、16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型及59型中的一种或多种的L1蛋白和/或L2蛋白组装而成的HPV病毒样颗粒。

[0028] 本发明中的HPV抗原可以利用任何的现有技术来制备。制备的HPV抗原可以进一步与铝佐剂混合,制得本发明中的第一组分。

[0029] 在NCBI数据库中,已有许多现有的HPV各型L1蛋白 (HPV 6L1、11L1、16L1、18L1、31L1、33L1、45L1、52L1及58L1) 序列可供本领域技术人员进行选择,这些序列均可以作为抗原蛋白的理想选择基础。在本发明的一些实施方式中,采用了具有高度的保守性的序列,具体情况如下:HPV 6L1的氨基酸序列已于1995年在NCBI数据库中收录,登录号为AAA74218; HPV 11L1的氨基酸序列已于1994年在NCBI数据库中收录,登录号为AAA46935; HPV 16L1的氨基酸序列已于1998年在NCBI数据库中收录,登录号为AAC09292.1; HPV 18L1蛋白的氨基酸序列已于2003年在NCBI数据库中收录,登录号为AAQ92369.1; HPV 31L1蛋白的氨基酸序列已于1994年在NCBI数据库中收录,登录号为AAA46956; HPV 33L1蛋白的氨基酸序列已于2009年在NCBI数据库中收录,登录号为ACL12333.1; HPV 45L1蛋白的氨基酸序列已于2009年在NCBI数据库中收录,登录号为ABP99831.1 (截短了N端26个氨基酸,上述26个氨基酸为疏水区,疏水区可能影响L1蛋白形成VLP,故而截短); HPV52 L1蛋白的氨基酸序列已于2005年在NCBI数据库中收录,登录号为CAA52590.1 (截短了N端27个氨基酸,上述27个氨基酸为疏水区,疏水区可能影响L1蛋白形成VLP,故而截短); HPV 58L1蛋白的氨基酸序列已于2009年在NCBI数据库中收录,登录号为CAX48979.1。需要说明的是,本发明中的抗原并不限于具有上述氨基酸序列的L1蛋白,可以是具有免疫原性的其它L1蛋白,包括已上市疫苗所采用的L1蛋白。

[0030] 在优选的实施方式中,本发明的第一组分还可以是市售的HPV疫苗成品制剂,例如,默沙东公司的四价人乳头瘤病毒疫苗(酿酒酵母)-佳达修(GARDASIL)和九价人乳头瘤病毒疫苗(酿酒酵母)-佳达修9(GARDASIL 9),GSK的双价人乳头瘤病毒吸附疫苗-希瑞适(CERVARIX)、厦门万泰沧海生物技术有限公司的双价人乳头瘤病毒疫苗(大肠杆菌)-馨可宁(Cecolin)、玉溪泽润生物技术有限公司的双价人乳头瘤病毒疫苗(毕赤酵母)-沃泽惠等。

[0031] 在一些实施方式中,所述第一组分是肝炎疫苗成品制剂,例如市售的甲型肝炎灭活疫苗、重组乙型肝炎疫苗(酿酒酵母)、重组乙型肝炎疫苗(汉逊酵母)或重组乙型肝炎疫苗(CHO细胞)。

[0032] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是甲肝病毒抗原。将甲型肝炎病毒(目前一般采取HM175病毒株)接种人二倍体细胞,经培养、收获病毒,再经超滤、离子交换层析及分级离心等方法纯化病毒,最后甲醛灭活处理病毒。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝盐佐剂的情况下,第一组分中的甲型肝炎灭活病毒优选地被吸附(更优选地完全吸附)在该盐上,优选被吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0033] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是乙肝表面抗原。乙型肝炎病毒(HBV)结构由外壳和核心组成,外壳所含的乙肝表面抗原(HBsAg)又包含S抗原,pre S1和pre S2抗原,作为病毒识别和侵入宿主细胞的主要结合蛋白,乙肝表面抗原是目前HBV疫苗研发针对的主要靶点。所述乙肝表面抗原可以通过重组酵母(酿酒酵母、汉逊酵母)或重组CHO细胞制造的。HBsAg不含有病毒遗传物质,不具备感染性和致病性,但保留了免疫原性。基因工程乙肝疫苗通常先构建含有乙肝表面抗原(HBsAg)基因重组质粒,然后转染相应的宿主细胞,如酿酒酵母、汉逊酵母或CHO细胞,生产乙肝表面抗原蛋白。

[0034] 本文使用的“乙肝表面抗原”或“HBsAg”包括任意HBsAg抗原或表现出HBV表面抗原性的任何HBsAg抗原或其片段,而不是来源于乙型肝炎病人血浆的乙型肝炎表面抗原。由酵母菌或CHO细胞表达的基因工程表面抗原通常是一种分子量约为24kDa的226个氨基酸的多肽。如需要,本文中所描述的HBsAg还可包括全部或部分pre-s序列。本发明范围内的HBsAg也可以包括pre S1-pre S2-S多肽或其类似物。本文所说的HBsAg也可指突变体,例如申请号PCT/GB1991/000444等的专利申请中描述的“逃逸突变体”,特别是其145位以精氨酸取代甘氨酸的HBsAg。乙肝表面抗原(HBsAg)的制备文献上有较多记载,参见如Harford等在Develop.Biol.Standard 54,125页(1983)上的文章、Gregg等在Biotechnology5,479页(1987)上的文章、EP-A-0,226,846、EP-A-0,299,108和在其中的参考资料。或者也可以按照现行《中国生物制品规程》中《重组(CHO细胞)乙型肝炎疫苗制造及检定规程》制备、或参考中国专利申请CN201910996063.X中公开的一种大规模培养CHO细胞以制备乙型肝炎疫苗的方法等。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝盐佐剂的情况下,第一组分中的乙肝表面抗原优选地被吸附(更优选地完全吸附)在该盐上,优选被吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0035] 在一些实施方式中,本发明的第一组分还可以是任何可选的市售乙型肝炎疫苗成品制剂。例如,北京生物制品研究所有限责任公司、深圳康泰生物制品股份有限公司的重组乙型肝炎疫苗(酿酒酵母);华兰生物疫苗股份有限公司、艾美诚信生物制药有限公司的重组乙型肝炎疫苗(汉逊酵母);华北制药金坦生物技术股份有限公司、兰州生物制品研究所有限责任公司、北京亚东生物制药(安国)有限公司、武汉生物制品研究所有限责任公司的

重组乙型肝炎疫苗 (CHO细胞); GlaxoSmithKline Biologicals SA的重组乙型肝炎疫苗 (酿酒酵母): Engerix® (安在时®) 以及 Fendrix®。

[0036] 在一些实施方式中, 所述第一组分是脊髓灰质炎疫苗成品制剂, 例如市售的 I 型脊髓灰质炎灭活疫苗、II 型脊髓灰质炎灭活疫苗和/或 III 型脊髓灰质炎灭活疫苗。灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV) 的量通常是用“DU”单位, 每次人用剂量为 0.5ml, 含有脊髓灰质炎病毒抗原 I 型 15DU、II 型 45DU、III 型 45DU, 或者每剂量含病毒抗原量应不低于: I 型 30DU、II 型 32DU、III 型 45DU。

[0037] 根据上述实施方式, 所述第一组分中的抗原性物质是灭活的脊髓灰质炎病毒抗原 (IPV)。脊髓灰质炎可以由三种类型的脊髓灰质炎病毒中的一种引起。这三种类型是相似的并且引起相同的症状, 但它们的抗原性差异很大, 被一种类型病毒感染后不能防止免受其它类型病毒的感染。因此, 本发明采用的三种脊髓灰质炎病毒抗原可以来自于 I 型脊髓灰质炎病毒 (如 Mahoney 毒株)、II 型脊髓灰质炎病毒 (如 MEF-1 毒株) 和/或 III 型脊髓灰质炎病毒 (如 Saukett 毒株)。作为这些毒株的替代, 还可以使用 I 型-III 型的 Sabin 毒株。

[0038] 脊髓灰质炎病毒可以在细胞培养物中生长, 优选的培养物是 Vero 细胞系, 它是从猴肾中得到的连续细胞系。Vero 细胞可方便地培养成为微载体。在病毒感染前和感染期间 Vero 细胞的培养可涉及使用来源于牛的材料 (例如小牛血清)、和乳球蛋白水解产物 (例如由乳球蛋白酶降解得到的产物)。这些来源于牛的材料应从不患有 BSE 或其它 TSE 的来源获取。在病毒生长后可用诸如超滤、渗滤和层析等技术来纯化病毒颗粒。在给予患者之前, 必须将脊髓灰质炎病毒灭活, 这可以通过在把病毒用于本发明方法之前用甲醛处理而实现。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝盐佐剂的情况下, 在配制之前脊髓灰质炎病毒优选不被吸附于任意佐剂上, 但在配制之后脊髓灰质炎病毒可变为被吸附在第一组分中的任何铝佐剂上。

[0039] 可选地, 市售的脊髓灰质炎疫苗成品制剂例如: 北京科兴生物制品有限公司、中国医学科学院医学生物学研究所、北京生物制品研究所有限责任公司的 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (Vero 细胞) 等。

[0040] 在一些实施方式中, 所述第一组分是百日咳疫苗成品制剂, 例如市售的吸附无细胞百日咳疫苗。

[0041] 根据上述实施方式, 所述第一组分中的抗原性物质是百日咳抗原。百日咳博德特氏菌引起百日咳。疫苗中的百日咳抗原是全细胞, 采用灭活的百日咳博德特氏菌形式 (wP) 或者无细胞形式 (aP)。对于细胞百日咳抗原的制备有详细记载, 例如其能通过热灭活百日咳博德特氏菌的 I 期培养物而得到。在使用细胞抗原的情况下, 还包含以下抗原中的 1 种、2 种或 (优选地) 3 种: (1) 脱毒的百日咳毒素 (百日咳类毒素或 PT); (2) 丝状血细胞凝集素 (FHA); (3) 百日咳杆菌粘附素 (也称为“69 千道尔顿外膜蛋白”)。可以从在改良的 Stainer-Scholte 液体培养基中生长的百日咳博德特氏菌培养物中分离制备这三种抗原。从发酵肉汤中分离 PT 和 FHA (例如通过吸附在羟基磷灰石凝胶上), 通过加热处理和絮凝 (例如用氯化钡) 从细胞中提取百日咳杆菌粘附素。用连续的色谱和/或沉淀步骤纯化抗原。可以通过疏水层析法、亲和层析法和尺寸排阻层析法纯化 PT 和 FHA。可通过离子交换层析法、疏水层析法和尺寸排阻层析法或者通过 IMAC 来纯化百日咳杆菌粘附素。

[0042] 本发明可以使用含 PT 的 wP 抗原, 或者优选地使用含 PT 的 aP 抗原。当使用 aP 抗原时,

本发明抗原性物质通常除了PT以外还将包含FHA以及任选地百日咳杆菌粘附素。本发明抗原性物质可以任选地包含2型和3型凝集原。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝盐佐剂的情况下,第一组分中的百日咳类毒素优选地被吸附(有时完全被吸附)在该盐上,优选地被吸附在氢氧化铝佐剂上。任何FHA也可以被吸附在氢氧化铝佐剂上。任何百日咳杆菌粘附素也可以被吸附在磷酸铝佐剂上。

[0043] 可选地,市售百日咳疫苗成品制剂例如:兰州生物制品研究所有限责任公司的吸附无细胞百日咳疫苗。

[0044] 在一些实施方式中,所述第一组分是白喉疫苗成品制剂,例如市售的吸附白喉疫苗。通常可用国际单位(IU)表示白喉类毒素的量,每1次人用剂量0.5ml,含白喉类毒素效价不低于30IU。

[0045] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是白喉杆菌抗原。白喉是由白喉棒状杆菌所引起。该生物体表达原噬菌体编码的ADP-核糖基化外毒素(白喉毒素),对该外毒素进行处理(例如用甲醛)而得到不再有毒性但保留抗原性的类毒素并且可以在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。优选的白喉类毒素是通过甲醛处理而制备。使白喉棒状杆菌在可补充牛提取物的生长培养基(如Fenton培养基、或者Linggoud和Fenton培养基)中生长,接着进行甲醛处理、超滤和沉淀,由此获得白喉类毒素。通过包括无菌过滤和/或透析的方法来处理该类毒素物质。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝盐佐剂的情况下,第一组分中的白喉类毒素优选地被吸附(更优选地完全吸附)在该盐上,优选被吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0046] 可选地,市售的白喉疫苗成品制剂例如:成都生物制品研究所有限责任公司、兰州生物制品研究所有限责任公司、北京生物制品研究所有限责任公司、武汉生物制品研究所有限责任公司的吸附白喉疫苗等。

[0047] 在一些实施方式中,所述第一组分是破伤风疫苗成品制剂,例如市售的吸附破伤风疫苗。通常可用国际单位(IU)表示破伤风类毒素的量,每1次人用剂量0.5ml,含破伤风类毒素效价不低于40IU。

[0048] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是破伤风杆菌抗原。破伤风是由破伤风梭菌引起。该生物体表达内肽酶(破伤风毒素),经处理后得到不再有毒性但保留抗原性并且可以在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。优选的破伤风类毒素是通过甲醛处理而制造的类毒素。用生长培养基(如来源于牛酪蛋白的Latham培养基)培养破伤风梭菌,接着进行甲醛处理、超滤和沉淀,由此可以获得破伤风类毒素。然后通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理此物质。在本发明疫苗组合物中的第一组分包含铝佐剂的情况下,第一组分中的破伤风类毒素优选地被吸附(有时被完全吸附)在该铝佐剂上,优选地被吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0049] 可选地,市售的破伤风疫苗成品制剂例如:武汉生物制品研究所有限责任公司、成都生物制品研究所有限责任公司、兰州生物制品研究所有限责任公司、成都欧林生物科技股份有限公司、北京生物制品研究所有限责任公司的吸附破伤风疫苗等。

[0050] 在一些实施方式中,所述第一组分还可以选自吸附无细胞百白破联合疫苗、吸附百白破联合疫苗、b型流感嗜血杆菌结合疫苗、无细胞百白破b型流感嗜血杆菌联合疫苗的成品制剂。

[0051] 可选地,市售的一些联合疫苗,例如:玉溪沃森生物技术有限公司、兰州生物制品研究所有限责任公司的吸附无细胞百白破联合疫苗;北京民海生物科技有限公司的无细胞百白破b型流感嗜血杆菌联合疫苗;武汉生物制品研究所有限责任公司、兰州生物制品研究所有限责任公司的吸附百白破联合疫苗等。

[0052] 在一些实施方式中,所述第一组分中的抗原性物质是流感病毒抗原。

[0053] 可选地,市售的流感病疫苗成品制剂例如:北京科兴生物制品有限公司、长春生物制品研究所有限责任公司、大连雅立峰生物制药有限公司、华兰生物疫苗有限公司、深圳赛诺菲巴斯德生物制品有限公司的三价灭活流感疫苗;北京科兴生物制品有限公司、长春生物制品研究所有限责任公司、国光生物科技股份有限公司、华兰生物疫苗有限公司、江苏金迪克生物技术股份有限公司、上海生物制品研究所有限责任公司、武汉生物制品研究所有限责任公司的四价灭活流感疫苗;长春百克生物科技股份公司的三价减毒活疫苗;中逸安科生物技术股份有限公司的三价亚单位流感疫苗等。

[0054] 在一些实施方式中,所述第一组分是狂犬病疫苗成品制剂,例如市售的冻干形式或液体形式的人用狂犬病疫苗。经过长期的技术改进,目前应用最广泛的包括地鼠肾细胞疫苗、Vero细胞疫苗、人二倍体疫苗三种灭活疫苗。

[0055] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是狂犬病病毒抗原。狂犬病病毒是一种包膜病毒,其含有编码五种结构蛋白的单链RNA基因。除非另有说明,任意可获得的狂犬病抗原可以被用于制备本实施方式中所述的第一组分。WHO批准了数个用于疫苗生产的狂犬病病毒株,包括但不限于:毕特曼-摩尔株(PM)、巴斯德病毒株(PV)、攻毒标准病毒株(CVS)、来自Flury鸡胚胎适应(chick embryo-adapted)株的少代鸡胚传代(LEP)或者多代鸡胚传代(HEP)株、Street-Alabama-Dufferin(SAD)病毒的Evelyn Rokitniki Abelseth(ERA)株和不同的SAD变体。这些经批准的病毒株适应于脑组织培养、鸡胚或鸭胚、原代细胞系(例如地鼠肾细胞系)、人二倍体细胞、或者连续细胞系(例如Vero细胞系)中。以上病毒株在灭活和纯化后能够用于制造疫苗。在一些实施方案中,灭活纯化的狂犬病病毒(IPRV)选自:CTN株、aG株、毕特曼-摩尔(PM)株以及巴斯德病毒(PV)株。例如,在一些实施方案中,IPRV在Vero细胞或者原代仓鼠肾(PHK)细胞中制备。IPRV通过繁殖混合至Vero细胞或PHK细胞中的病毒株而产生。在收集培养介质的上清液后,作为抗原收集、浓缩、灭活、纯化并存储病毒。

[0056] 可选地,市售的狂犬病疫苗成品制剂例如:长春生物制品研究所有限责任公司、辽宁成大生物股份有限公司、宁波荣安生物药业有限公司、辽宁依生生物制药有限公司的冻干人用狂犬病疫苗(Vero细胞);武汉生物制品研究所有限责任公司、辽宁成大生物股份有限公司、大连雅立峰生物制药有限公司的人用狂犬病疫苗(Vero细胞);艾美诚信生物制药有限公司、河南远大生物制药有限公司的人用狂犬病疫苗(地鼠肾细胞)等。

[0057] 在一些实施方式中,所述第一组分是肺炎疫苗成品制剂,例如市售的13价、23价肺炎球菌多糖疫苗。

[0058] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是肺炎链球菌抗原。肺炎链球菌引起细菌性脑膜炎,现有的疫苗是基于肺炎球菌荚膜多糖。因此本发明疫苗组合物中的第一组分可以包含至少一种与载体蛋白偶联的肺炎球菌荚膜多糖。第一组分中可以包括来源于一种或多种不同肺炎球菌血清型的荚膜多糖。在包含来源于超过1种血清型的多糖抗

原的情况下,这些抗原优选地单独制备,单独结合,然后加以合并。本领域中已知纯化肺炎球菌荚膜多糖的方法,并且早已知道以来源于23种不同血清型的纯化多糖为基础的疫苗。

[0059] 肺炎球菌荚膜多糖通常是选自以下血清型:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和/或33F。因此,第一组分通常可包含来源于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23种或更多不同血清型的荚膜多糖。可选地,13价组合物包括来源于血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19(或19A)、19F和23F的荚膜多糖。

[0060] 可选地,市售的肺炎疫苗成品制剂例如:北京民海生物科技有限公司、北京科兴生物制品有限公司、玉溪沃森生物技术有限公司、成都生物制品研究所有限责任公司的23价肺炎球菌多糖疫苗;玉溪沃森生物技术有限公司的13价肺炎球菌多糖结合疫苗等。

[0061] 在一些实施方式中,所述第一组分是脑膜炎疫苗成品制剂,例如市售的A群脑膜炎球菌多糖疫苗、A群C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗。

[0062] 根据上述实施方式,所述第一组分中的抗原性物质是脑膜炎球菌抗原。这些抗原可来源于脑膜炎奈瑟球菌(血清群A、B、C、W135和/或Y中的一种或多种)。在第一组分包含脑膜炎奈瑟球菌荚膜多糖偶联物的情况下,可以存在一种或多于一种的这种偶联物,包括血清群A、C、W135和Y中2、3或4种,通常例如是A+C、A+W135、A+Y、C+W135、C+Y、W135+Y、A+C+W135、A+C+Y、A+W135+Y、A+C+W135+Y等。

[0063] 可选地,市售的脑膜炎疫苗成品制剂例如:北京智飞绿竹生物制药有限公司、成都欧林生物科技股份有限公司、玉溪沃森生物技术有限公司的A群C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗;玉溪沃森生物技术有限公司、北京智飞绿竹生物制药有限公司、艾美卫信生物药业(浙江)有限公司的ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗;武汉生物制品研究所有限责任公司、兰州生物制品研究所有限责任公司的A群脑膜炎球菌多糖疫苗;康希诺生物股份公司的ACYW135群脑膜炎球菌多糖结合疫苗(CRM197载体)等。

[0064] 在一些实施方式中,所述抗原性物质的含量在1-100 $\mu$ g之间,优选在5-50 $\mu$ g之间,例如10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g或40 $\mu$ g。

[0065] 根据本发明的一些实施方式,第一组分中的抗原性物质是HPV各型L1 VLP蛋白,其含量在1-100 $\mu$ g之间,更优选在5-50 $\mu$ g之间,例如10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、30 $\mu$ g或40 $\mu$ g。

[0066] 在一些实施方式中,所述第一组分包含铝佐剂,所述铝佐剂选自氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝和明矾中的至少一种。铝佐剂可以利用任何的现有技术来制备,也可以采用市售的铝佐剂,例如CRODA的氢氧化铝佐剂ALHYDROGEL。

[0067] 在一些实施方式中,所述铝佐剂的含量在10-1000 $\mu$ g之间,优选在50-800 $\mu$ g之间,更优选在100-600 $\mu$ g之间,例如200 $\mu$ g、300 $\mu$ g、400 $\mu$ g或500 $\mu$ g。

[0068] 在一些实施方式中,所述第一组分是冻干制剂、溶液或混悬液。

[0069] 在一些实施方式中,所述第一组分中的溶液或混悬液的体积为0.2-1.0ml,优选为0.5ml或1.0ml。

[0070] 在本发明中,作为第二组分的水包油乳剂佐剂包含水相、油相和表面活性剂。其中,水相可以为选自磷酸盐缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液、醋酸盐缓冲液或柠檬酸-磷酸缓冲液的缓冲溶液。油相包含可代谢油,优选为角鲨烯,并优选进一步包含 $\alpha$ -生育酚。表面活性剂包含聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯(吐温)、失水山梨糖醇脂肪酸酯

(司盘)、辛苯聚醇-9(曲拉通X-100)或聚乙二醇辛基苯基醚以及卵磷脂中的一种或多种。例如,水包油乳剂佐剂可以包含角鲨烯、司盘85和吐温80,更优选地,水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。

[0071] 在一些实施方式中,所述水包油乳剂佐剂包含5-15mg角鲨烯、5-15mg $\alpha$ -生育酚和2-10mg吐温80,优选地,所述水包油乳剂佐剂包含10.69mg角鲨烯、11.86mg $\alpha$ -生育酚和4.86mg吐温80。

[0072] 在一些实施方式中,所述水包油乳剂佐剂的体积为0.2-1.0ml,优选为0.5ml。

[0073] 在一些实施方式中,所述水包油乳剂佐剂进一步包含MPL、皂苷、poly I:C和CpG中的一种或多种。

[0074] 本发明另一方面提供一种上述疫苗组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0075] (i) 制备包含抗原性物质和铝佐剂的第一组分;

[0076] (ii) 制备包含水包油乳剂佐剂的第二组分;

[0077] (iii) 将所述第一组分与第二组分分别独立包装后组合,制得佐剂赋能的疫苗组合物,

[0078] 其中步骤(i)和(ii)可以以任一顺序进行,包括先后进行、同时进行或分场地进行。

[0079] 根据本发明的实施方式,制备第一组分时,本发明所提供的制备方法为将可选的抗原性物质吸附至铝佐剂上,以保持所述抗原的稳定性和增强其免疫原性。

[0080] 根据本发明的实施方式,制备第二组分的方法包括:首先将角鲨烯和 $\alpha$ -生育酚混合作为油相,然后加入作为水相的含有吐温80的磷酸盐缓冲液,通过搅拌进行乳化,最后进行均质得到水包油乳剂佐剂。

[0081] 本发明还提供上述的疫苗组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

[0082] 本发明第四方面提供一种包含上述疫苗组合物的试剂盒,其包含独立包装的第一组分和第二组分,所述第一组分包含抗原性物质和铝佐剂,所述第二组分包含水包油乳剂佐剂,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80,所述第一组分和第二组分装在小瓶中。

[0083] 本发明第五方面提供一种包含上述疫苗组合物的多室注射器,其包含第一隔室和第二隔室,所述第一隔室装有第一组分,所述第一组分包含抗原性物质和铝佐剂;第二隔室装有第二组分,所述第二组分包含水包油乳剂佐剂,所述水包油乳剂佐剂包含角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温80。

[0084] 本发明第六方面提供一种利用所述疫苗组合物诱导免疫应答的方法,其将第一组分和第二组分有时间间隔地施用于受试者,包括以下步骤:

[0085] (i) 向受试者施用所述第一组分;

[0086] (ii) 向受试者施用所述第二组分;

[0087] 其中,上述步骤可以以任一顺序进行,所述的时间间隔至少应为1h,例如,该间隔时间为2h。

[0088] 当两个组分的施用间隔较短时,例如在1min之内,优选在30s内,可认为属于同时施用。

[0089] 根据上述实施方式,所述第一组分和第二组分施用于受试者的同一部位,或者所

述第一组分和第二组分分别施用于受试者的不同部位。

[0090] 本发明还提供另一种利用所述疫苗组合物诱导免疫应答的方法,其将第一组分和第二组分同时施用于受试者,包括以下步骤:

[0091] (i) 将所述第一组分和所述第二组分混合;

[0092] (ii) 向受试者施用步骤(i)获得的混合物。

[0093] 本发明还提供一种利用所述疫苗组合物改善CD4+T细胞免疫应答和/或改善B记忆细胞应答的方法,包括向受试者有时间间隔地施用所述第一组分和所述第二组分,或者将所述第一组分和所述第二组分混合后施用于受试者。

[0094] 相比于仅含铝佐剂,不含其他额外佐剂的第一组分获得的CD4+T细胞免疫应答,本发明所述“改善的CD4+T细胞免疫应答”是指在给予本发明提供的疫苗组合物之后,在人机体中获得的CD4+T细胞免疫应答高于前者。

[0095] 改善的CD4+T细胞免疫应答可以通过检测产生任何以下细胞因子的细胞数来评价:

[0096] 产生至少两种不同细胞因子(CD40L、IL-2、IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ )的细胞;

[0097] 产生至少CD40L和另一种细胞因子(IL-2、TNF $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ )的细胞;

[0098] 产生至少IL-2和另一种细胞因子(CD40L、TNF $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ )的细胞;

[0099] 产生至少IFN  $\gamma$ 和另一种细胞因子(IL-2、TNF $\alpha$ 、CD40L)的细胞;

[0100] 产生至少TNF $\alpha$ 和另一种细胞因子(IL-2、CD40L、IFN  $\gamma$ )的细胞。

[0101] 当和给予第一组分相比,在给予疫苗组合物后产生任何以上细胞因子的细胞量较高时,将存在改善的CD4+T细胞免疫应答。通常,上文提及的5种状况中的至少一种、优选两种将被实现。

[0102] 在一些实施方式中,所述疫苗组合物、试剂盒或多室注射器可用于单独免疫或作为序贯免疫加强针使用。

[0103] 相比现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0104] 本发明在包含抗原性物质和铝佐剂的免疫成分的基础上进一步增加了乳剂佐剂,两种组分可以分开施用或共同施用并能基本上达到与传统制剂形式一致甚至更优的协同佐剂效果,可以有效改善免疫应答,快速刺激抗体的产生。

[0105] 相比于使用传统铝佐剂,本发明提供的疫苗组合物可以提高阳转率和保护率,能够更加快速、长效、安全地刺激机体产生高水平的免疫应答,特别是对无免疫应答人群。本发明的疫苗组合物有望减少疫苗接种剂次或剂量,从而缩短接种周期,提高接种完成率。

[0106] 另一方面,本发明的疫苗组合物在制备时不需要将包含抗原性物质和铝佐剂的免疫成分与乳剂佐剂配制为成品制剂,乳剂佐剂和包含抗原性物质及铝佐剂的免疫成分可以独立包装,从而可以避免抗原性物质或/铝佐剂与乳剂佐剂之间的相互影响,铝佐剂可以吸附抗原性物质,起到保护抗原的作用,同时,铝佐剂与抗原性物质形成整体,与乳剂混合时,抗原性物质无论是被铝佐剂吸附或被乳剂携带,均能同时发挥铝佐剂和乳剂的双重佐剂效果,因此,本发明的疫苗组合物可以达到更加高效、更加安全、同时更加稳定的技术效果。

## 附图说明

[0107] 以下附图仅旨在于对本发明做示意性说明和解释,并不限定本发明的范围。其中:

- [0108] 图1为本发明实施例3中氢氧化铝佐剂的透射电镜照片；
- [0109] 图2为本发明实施例3中抗原吸附于铝佐剂的示意图；
- [0110] 图3为本发明实施例3中乳剂佐剂的透射电镜照片；
- [0111] 图4为本发明对比例2中制备的佐剂系统的分层现象；
- [0112] 图5为本发明对比例3中制备的佐剂系统的分层现象；
- [0113] 图6为本发明对比例4中由铝佐剂、水包油乳剂和抗原组成的疫苗复合物的示意图；
- [0114] 图7为本发明实施例4的4.1部分中HPV 45型抗原联合不同佐剂免疫小鼠后针对HPV45型假病毒的中和抗体滴度；
- [0115] 图8为本发明实施例4的4.2部分中HPV 45型抗原联合不同佐剂免疫小鼠后针对HPV45型假病毒的中和抗体滴度；
- [0116] 图9为本发明实施例5中九价HPV抗原联合不同佐剂免疫小鼠后针对HPV31型假病毒的中和抗体滴度；
- [0117] 图10为本发明实施例5中九价HPV抗原联合不同佐剂免疫小鼠后针对HPV6型、45型和58型假病毒的中和抗体滴度；
- [0118] 图11为本发明实施例6中HPV疫苗与乳剂佐剂在不同时间、不同部位免疫小鼠后的中和抗体滴度，
- [0119] 其中，注射1表示在同部位注射乳剂佐剂后马上注射吸附于氢氧化铝佐剂的抗原；
- [0120] 注射2表示在同部位注射乳剂佐剂2小时后注射吸附于氢氧化铝佐剂的抗原；
- [0121] 注射3表示在不同部位注射乳剂佐剂后马上注射吸附于氢氧化铝佐剂的抗原；
- [0122] 图12为本发明实施例8中采用不同免疫方案时末次免疫14天后的中和抗体滴度；
- [0123] 图13为本发明实施例12中采用不同免疫方案时中和抗体滴度随时间变化情况；
- [0124] 图14为本发明实施例12中采用不同免疫方案时末次免疫14天后的中和抗体滴度；
- [0125] 图15为本发明实施例17中针对H1N1型流感病毒的血凝抑制抗体滴度；
- [0126] 图16为本发明实施例17中针对H3N2型流感病毒的血凝抑制抗体滴度；
- [0127] 图17为本发明实施例17中针对B/V型流感病毒的血凝抑制抗体滴度；
- [0128] 图18为本发明实施例17中针对B/Y型流感病毒的血凝抑制抗体滴度。

### 具体实施方式

[0129] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白，以下结合具体实施例，并参照附图，对本发明作进一步的详细说明。除非特别说明，本说明书中所使用的所有技术和科学用语均和本案所属技术领域的技术人员所普遍明了的意义相同。与本说明书中所述方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可用以实施或测试本发明。下述实验方法如无特别说明，均为常规方法或产品说明书所描述的方法，所使用的实验材料如无特别说明，均可容易地从商业公司获取。

[0130] 实施例1制备包含乳剂佐剂和吸附于铝佐剂的HPV抗原的双组分疫苗组合物

[0131] 第一组分的制备：将HPV各型L1 VLP的抗原原液与氢氧化铝佐剂（ALHYDROGEL，CRODA，下同）或磷酸铝佐剂混合，在15℃，100rpm下震荡10h，使VLP吸附到氢氧化铝或磷酸铝佐剂上，得到吸附于铝佐剂的HPV抗原作为第一组分。

[0132] 第二组分的制备:首先将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的磷酸盐缓冲液混合后,在15℃下以8000rpm搅拌15min,在15℃下以80MPa的压力进行狭缝式均质后,再以100MPa的压力进行微射流均质,均质2个循环后粒径即可降至160.5nm,PDI为0.077,停止均质,用0.22 $\mu$ m的过滤器进行过滤,得到水包油乳剂。

[0133] 实施例2制备包含乳剂佐剂和吸附于铝佐剂的HPV抗原的双组分疫苗组合物

[0134] 第一组分的制备:将HPV各型L1 VLP的抗原原液与氢氧化铝佐剂或磷酸铝佐剂混合,在15℃,100rpm下震荡10h,使VLP吸附到氢氧化铝或磷酸铝佐剂上,得到吸附于铝佐剂的HPV抗原作为第一组分。

[0135] 第二组分的制备:称取2.47g吐温80溶解于柠檬酸缓冲液中,调节pH至6.5,定容至500ml作为水相。称取3.90g角鲨烯和0.47g司盘85,混合均匀,作为油相。室温下,向4.37g的油相中加入水相至100ml,混合均匀后,10000rpm高速剪切15min,制备得到初乳。

[0136] 在20℃下,以50MPa的压力进行狭缝式均质后,再以120MPa的压力进行微射流均质,均质2个循环后粒径即可降至165.3nm,PDI为0.062,停止均质,用0.22 $\mu$ m的过滤器进行过滤,得到水包油乳剂。

[0137] 对比例1制备包含复合佐剂和抗原的HPV疫苗组合物

[0138] 称取4.29g角鲨烯、4.74g $\alpha$ -生育酚、1.94g吐温80,混合作为油相。将10ml氢氧化铝佐剂加入80ml磷酸盐缓冲液,得到呈白色碎絮状、乳状液体。20℃,8000rpm分散10min,经1bar前级阀、120MPa微射流阀均质8循环,获得油性乳剂。将27 $\mu$ l HPV抗原,加873 $\mu$ l磷酸盐缓冲液,混合作为水相,将油性乳剂和水相等体积混合,得到疫苗组合物。

[0139] 对比例2制备包含复合佐剂和抗原的HPV疫苗组合物

[0140] 称取1.28g角鲨烯、1.43g $\alpha$ -生育酚、0.58g吐温80,混合作为油相。将360 $\mu$ l氢氧化铝佐剂、108 $\mu$ l HPV抗原加入到132 $\mu$ l磷酸盐缓冲液中,混合作为水相。将500 $\mu$ l水相加入约2.5ml油相中,超声乳化(300W,4min,5s/5s),得到油包水乳剂,最后加入相同体积的磷酸盐缓冲液稀释。

[0141] 对比例3制备包含复合佐剂和抗原的HPV疫苗组合物

[0142] 称取1.29g角鲨烯和1.43g $\alpha$ -生育酚,混合作为油相。将400 $\mu$ l氢氧化铝纳米颗粒加入3080 $\mu$ l磷酸盐缓冲液,加120 $\mu$ l HPV抗原原液,混合为水相。取300 $\mu$ l油相和2.7ml水相混合,超声乳化(300W,4min,5s/5s),获得Pickering乳液,取相同体积的Pickering乳液与磷酸盐缓冲液混合,得到疫苗组合物,离心后样品明显分层。

[0143] 对比例4制备包含铝佐剂、乳剂佐剂和抗原的HPV疫苗组合物

[0144] 首先将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的磷酸盐缓冲液混合后,在15℃下以8000rpm搅拌15min,在15℃下以80MPa的压力进行狭缝式均质后,再以100MPa的压力进行微射流均质,均质2个循环后粒径即可降至160.5nm,PDI为0.077,停止均质,用0.22 $\mu$ m的过滤器进行过滤,得到水包油乳剂。

[0145] 将铝含量为10mg/ml的400 $\mu$ l氢氧化铝或磷酸铝佐剂和上述4ml水包油乳剂加入离心管中,用涡旋震荡仪,震荡1min,混合均匀。将60 $\mu$ l HPV抗原加入到1740 $\mu$ l磷酸盐缓冲液,混合作为抗原溶液。在1.1ml佐剂混合物中添加900 $\mu$ l抗原溶液,然后在15℃,100rpm下震荡10h,制得疫苗组合物。

[0146] 实施例3 HPV疫苗组合物性质分析

[0147] 氢氧化铝佐剂实际上是 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 的不完全脱水产物,即纤维状结晶形态的偏氢氧化铝 $\text{AlO}(\text{OH})$ ,如图1所示。在实施例1和2中,当氢氧化铝佐剂与作为抗原的HPV VLP混合时,HPV VLP被吸附到氢氧化铝佐剂上,如图2所示。

[0148] 实施例1和2中的水包油乳剂的油相和表面活性剂形成的液滴均匀分布在水中,如图3所示。实施例1和2中的吸附于铝佐剂的HPV抗原和水包油乳剂的稳定性均较高,由于两个组分相互独立,互不影响,因此制备的双组分疫苗组合物的稳定性也较高。

[0149] 在对比例1中,由于形成的复合佐剂为油性乳剂,将其与包含抗原的水相混合后并经长时间放置发现有分层现象。类似地,对比例2中复合佐剂为油包水乳剂,经磷酸盐缓冲溶液稀释、静置后发现有白絮状、沉淀和分层现象,如图4所示。在对比例3中制备的Pickering乳液是一种由固体颗粒代替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油水界面,形成固体颗粒单层或多层结构,从而使乳液稳定。但该技术对制备工艺条件要求较高,且乳液稳定性较差,发明人发现长时间放置或者离心后有分层现象,如图5所示。

[0150] 对比例4中将铝佐剂、水包油乳剂和抗原三种组分先后混合,油相和表面活性剂形成的液滴以及抗原先后被吸附到铝佐剂上,如图6所示。油相和表面活性剂形成的液滴和铝佐剂之间的吸附会与抗原和铝佐剂之间的吸附形成竞争,铝佐剂难以有效吸附和保护抗原,另一方面,铝佐剂会破坏乳剂的水油界面的平衡,从而破坏乳剂的形态,与抗原混合后,难以发挥乳剂自身的优势。

[0151] 实施例4单价HPV疫苗小鼠免疫实验

[0152] 4.1双组分疫苗与包含复合佐剂和抗原的疫苗组合物的比较

[0153] 利用实施例1和对比例1-3中的疫苗组合物免疫BALB/c小鼠,设置 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 对照组,每组10只,肌肉免疫,HPV抗原包含HPV45 L1 VLP  $5\mu\text{g}$ ,佐剂用量如表1所示。分别在第0和14天免疫小鼠,第二次免疫7天后杀鼠并分离血清,通过基于HPV假病毒的方法进行血清中和抗体检测。

[0154] 表1

[0155]

组别	疫苗组分			免疫体积
----	------	--	--	------

	第一组分	第二组分	铝佐剂 剂量	乳剂佐剂 剂量	
1	Al(OH) <sub>3</sub> +HPV 抗原 (实施例 1)	乳剂佐剂 (包括角鲨烯、生育酚和吐温 80) (实施例 1)	50μg	50μl	100μl
2	Al(OH) <sub>3</sub> /乳剂 (包括角鲨烯、生育酚和吐温 80) 复合佐剂+HPV 抗原 (对比例 1)	--	50μg	50μl	100μl
3	Al(OH) <sub>3</sub> /乳剂 (包括角鲨烯、生育酚和吐温 80) 复合佐剂+HPV 抗原 (对比例 2)	--	50μg	50μl	100μl
4	Al(OH) <sub>3</sub> /乳剂 (包括角鲨烯、生育酚和吐温 80) 复合佐剂+HPV 抗原 (对比例 3)	--	50μg	50μl	100μl
5	Al(OH) <sub>3</sub> +HPV 抗原	--	50μg	--	50μl

[0156]

[0157] 检测结果如图7所示。可以发现,实施例1和对比例1中制备的免疫组合物诱导产生的中和抗体滴度均高于Al(OH)<sub>3</sub>对照组,但两组之间没有显著性差异。对比例2和3中制备的免疫组合物诱导产生的中和抗体滴度低于Al(OH)<sub>3</sub>对照组,这可能是由于一方面这两个对比例中的免疫组合物稳定性较差所致,另一方面,抗原和铝佐剂作为水相与油相一起乳化,形成乳剂的过程会对抗原产生很大的破坏作用,可能会影响抗原的免疫效果。

[0158] 综合来看,本发明中采用独立包装的双组分疫苗组合物,一方面可以避免将铝佐剂和乳剂佐剂混合时导致的稳定性问题,另一方面还可以显著提高抗原的免疫效果。

#### [0159] 4.2双组分疫苗与包含佐剂混合物和抗原的疫苗组合物的比较

[0160] 分别按照实施例1和对比例4的方法制备疫苗组合物。其中,在按照对比例4的方法制备疫苗组合物时,分别于免疫前14天、7天、3天和当天配制氢氧化铝和水包油乳剂的佐剂混合物,免疫当天将佐剂混合物与HPV45 L1抗原混合,对应的疫苗组合物分别记为H-14、H-7、H-3和H-0,实施例1中的双组分疫苗在免疫当天混合。

[0161] 利用实施例1和对比例4制备的疫苗组合物免疫BALB/c小鼠,每组9只,肌肉免疫,HPV抗原包含HPV45 L1 VLP 2μg,乳剂佐剂用量均为25μl,Al(OH)<sub>3</sub>佐剂用量均为50μg。分别于第0和21天免疫小鼠,第二次免疫14天后杀鼠并分离血清,通过基于HPV假病毒的方法进行血清中和抗体检测。

[0162] 由图8可以看出,按照对比例4的方法制备疫苗组合物时,佐剂混合物的放置时间

可能对免疫效果产生影响,即佐剂混合物在放置至少3天以后,所制备的疫苗组合物的免疫效果才逐渐增强。这可能是在将氢氧化铝和水包油乳剂混合后的初始阶段,由于氢氧化铝的吸附作用,佐剂混合物并不稳定,不能充分提高抗原的免疫效果,而在放置一段时间后,整个体系变得更加稳定和均匀,从而能够充分发挥佐剂效应。而将实施例1中的双组分疫苗组合物在混合后进行免疫,即可获得较好的免疫效果,这可能是由于第一组分中的抗原吸附于氢氧化铝,将水包油乳剂与其混合后立即接种,整个体系的稳定性不会受到明显影响。

[0163] 实施例5九价HPV疫苗小鼠免疫实验

[0164] 利用制备的疫苗组合物免疫BALB/c小鼠,每组8只,肌肉免疫,HPV抗原包含HPV6 L1 3 $\mu$ g、HPV11 L1 4 $\mu$ g、HPV16 L1 6 $\mu$ g、HPV18 L1 4 $\mu$ g、HPV31 L1 2 $\mu$ g、HPV33 L1 2 $\mu$ g、HPV45 L1 2 $\mu$ g、HPV52 L1 2 $\mu$ g及HPV58 L1 2 $\mu$ g,佐剂用量如表2所示。分别在第0和14天免疫小鼠,第二次免疫7天后杀鼠并分离血清,通过基于HPV假病毒的方法进行血清中和抗体检测。

[0165] 表2

组别	疫苗组分		铝佐剂 剂量	乳剂佐剂 剂量	免疫体积
	第一组分	第二组分			
[0166] 1	Al(OH) <sub>3</sub> /乳剂(包括角鲨烯、生育酚和吐温 80)复合佐剂+HPV 抗原	--	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
2	Al(OH) <sub>3</sub> +HPV 抗原	乳剂佐剂(包括角鲨烯、生育酚和吐温 80)	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
3	AlPO <sub>4</sub> /乳剂(包括角鲨烯、生育酚和吐温 80)复合佐剂+HPV 抗原	--	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
[0167] 4	AlPO <sub>4</sub> +HPV 抗原	乳剂佐剂(包括角鲨烯、生育酚和吐温 80)	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
5	乳剂(包括角鲨烯、生育酚和吐温 80)+HPV 抗原	--	--	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
6	Al(OH) <sub>3</sub> +HPV 抗原	--	50 $\mu$ g	--	50 $\mu$ l
7	AlPO <sub>4</sub> +HPV 抗原	--	50 $\mu$ g	--	50 $\mu$ l

[0168] 第1组和第3组是按照对比例1的方法制备的包含Al(OH)<sub>3</sub>/乳剂或AlPO<sub>4</sub>/乳剂复合佐剂和HPV抗原的疫苗组合物,第2组和第4组是按照实施例1或2的方法制备的双组分疫苗组合物(HPV抗原吸附在Al(OH)<sub>3</sub>或AlPO<sub>4</sub>上作为第一组分,乳剂作为第二组分),两种组分在

施用前混合,第5组是将乳剂与HPV抗原的混合物作为疫苗组合物,不包含铝佐剂,第6组和第7组是将HPV抗原吸附在 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 $\text{AlPO}_4$ 上作为疫苗组合物,不包含乳剂佐剂。

[0169] 针对HPV31型假病毒的中和抗体检测结果如图9所示。可以看出,在使用单一佐剂的情况下,使用乳剂佐剂时诱导产生的中和抗体滴度最高,使用 $\text{AlPO}_4$ 佐剂时的中和抗体滴度最低。而在使用乳剂与 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 $\text{AlPO}_4$ 两种佐剂时,第2组(标记为“乳剂+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ”)诱导产生的中和抗体滴度显著高于使用任何单一佐剂情况下的中和抗体滴度,说明包含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂的疫苗联合乳剂佐剂可以显著增强免疫效果,而第4组(标记为“乳剂+ $\text{AlPO}_4$ ”)以及第1组和第3组(标记为“乳剂/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ”和“乳剂/ $\text{AlPO}_4$ ”)诱导产生的中和抗体滴度略低于单独使用乳剂佐剂时的中和抗体滴度,但显著高于单独使用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 $\text{AlPO}_4$ 时的中和抗体滴度。

[0170] 针对HPV6型、45型和58型假病毒的中和抗体检测结果如图10所示。结果同样显示,第2组(标记为“乳剂+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ”)或第4组(标记为“乳剂+ $\text{AlPO}_4$ ”)诱导产生的中和抗体滴度显著高于单独使用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 $\text{AlPO}_4$ 佐剂情况下的中和抗体滴度,且大于第1组(标记为“乳剂/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ”)诱导产生的中和抗体滴度,说明包含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 $\text{AlPO}_4$ 佐剂的疫苗联合乳剂佐剂可以显著增强免疫效果,且优于成分相近但制备方法截然不同的疫苗组合物“抗原+乳剂/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ 复合佐剂”。

[0171] 以上结果表明,乳剂佐剂可以明显增强HPV抗原的免疫原性,在现有的含铝佐剂的HPV疫苗的基础上简单地增加乳剂佐剂,即可获得更佳的免疫效果。

[0172] 实施例6乳剂佐剂和吸附于铝佐剂的HPV抗原的注射部位和施用顺序对免疫效果的影响

[0173] 本发明实施例1中的疫苗组合物包含独立的两个组分,本发明研究了两个组分的注射部位以及施用顺序对免疫效果的影响,探索多种注射部位和施用顺序的组合,以期筛选出能够获得最佳免疫效果的施用方式。

[0174] 在同时施用时,可以将吸附于铝佐剂的抗原、和乳剂佐剂两个组分混合后施用,或者用两个注射器分别施用两个组分。两个组分的施用间隔较短时(例如在1min之内,优选在30s内),仍可认为属于同时施用。

[0175] 在不同时施用时,吸附于铝佐剂的抗原和乳剂佐剂两个组分的施用间隔应至少1h,该实施例中间隔时间为2h。分组情况如表3所示。各组抗原的剂量与实施例5相同。

[0176] 表3

组别	注射部位	施用顺序	铝佐剂 剂量	乳剂佐剂 剂量	免疫体积
[0177]	在同侧后肢 肌肉注射	同时施用	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
		施用吸附于铝佐剂的 HPV 抗原 2h 后, 再施用乳剂佐剂	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l+50 $\mu$ l
		施用乳剂佐剂 2h 后, 再施用吸附于铝佐剂的 HPV 抗原	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l+50 $\mu$ l
	在两侧后肢 肌肉注射	同时施用	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
		施用吸附于铝佐剂的 HPV 抗原 2h 后, 再施用乳剂佐剂	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l+50 $\mu$ l
		施用乳剂佐剂 2h 后, 再施用吸附于铝佐剂的 HPV 抗原	50 $\mu$ g	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l+50 $\mu$ l

[0178] 如图11所示,两种组分无论是先后施用,还是在不同部位施用,疫苗组合物诱导产生的中和抗体滴度均低于将两种组分混合后在同一部位施用时的中和抗体滴度,在不同部位施用时的中和抗体滴度最低。因此,研究结果发现最优的方式是将两种组分混合后施用、其次是将两种组分先后在同一部位使用。

[0179] 实施例7乙肝疫苗组合物的制备

[0180] 原料及来源:

[0181] 乙型肝炎疫苗:重组乙型肝炎疫苗(汉逊酵母)为艾美诚信生物制药有限公司产品,每支(0.5ml)含乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)10 $\mu$ g和铝佐剂。

[0182] 水包油佐剂的制备:

[0183] 将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的磷酸盐缓冲液混合后,在20 $^{\circ}$ C搅拌温度条件下,以12000rpm搅拌20min,然后进行均质。均质温度20 $^{\circ}$ C、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环,制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0184] 制剂:人用剂量的佐剂瓶为0.5ml,成分包括10.69mg的角鲨烯,11.86mg的 $\alpha$ -生育酚,4.86mg的吐温80,3.53mg的NaCl,0.09mg的KCl,0.51mg的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.09mg的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和灭菌注射用水。

[0185] 将重组乙型肝炎疫苗(汉逊酵母)和水包油佐剂分别包装,获得疫苗组合物。

[0186] 实施例8乙肝疫苗小鼠免疫实验

[0187] 利用实施例7中的疫苗组合物免疫BALB/c小鼠,每组10只,后肢肌肉免疫,乙肝疫苗剂量和佐剂剂量为人用剂量的1/10(即乙肝疫苗50 $\mu$ L,乳剂佐剂50 $\mu$ L),各组的佐剂、免疫途径和免疫程序如表4所示。在第42天采集血清,进行血清中和抗体检测。

[0188] 表4

组别	乙肝疫苗剂量	佐剂	免疫途径	免疫程序(天)
[0189] Gr1	1/10HD	—	后肢肌肉注射	0/14/28
Gr2	1/10HD	—	后肢肌肉注射	0/28
Gr3	1/10HD	乳剂佐剂	后肢肌肉注射	0/14/28
Gr4	1/10HD	乳剂佐剂	后肢肌肉注射	0/28

[0190] 末次免疫14天后(即第42天),各组小鼠的中和抗体滴度如表5和图12所示。

[0191] 表5

组别	Gr1	Gr2	Gr3	Gr4
佐剂	—	—	乳剂佐剂	乳剂佐剂
免疫程序(天)	0/14/28	0/28	0/14/28	0/28
[0192] 各小鼠中和抗体滴度	800000	400000	1600000	3200000
	1600000	400000	400000	3200000
	400000	3200000	-	6400000
	1600000	1600000	6400000	1600000
	800000	800000	3200000	3200000
	800000	800000	800000	3200000
	800000	800000	1600000	3200000
	1600000	800000	3200000	3200000
	800000	800000	1600000	3200000
	800000	1600000	3200000	3200000
GMT	918959	918959	1866446	3200000

[0193] 可以发现,在单独接种乙肝疫苗的情况下,接种3针或2针的中和抗体滴度GMT均为918959,二者不存在显著性差异。在联合接种乙肝疫苗和乳剂佐剂的情况下,接种3针的中和抗体滴度GMT为1866446,接种2针的中和抗体滴度GMT为3200000,高于接种3针的中和抗体滴度GMT,但二者不存在显著性差异。这可能是因为在接种3针的情况下,由于接种时间间隔较短,无法发挥加强免疫的效果,而采用2针免疫程序的接种方案即可达到与3针免疫程序相当甚至更优的免疫效果。

[0194] 在联合接种乙肝疫苗和乳剂佐剂的情况下,接种3针或2针的中和抗体滴度GMT均显著高于单独接种3针或2针的乙肝疫苗的中和抗体滴度GMT。因此,联合接种乙肝疫苗和乳剂佐剂可以显著提高乙肝疫苗的免疫应答,尤其是联合接种乙肝疫苗和乳剂佐剂且间隔28天接种2针的免疫方案,中和抗体滴度GMT为所有免疫方案中的最大值。因此,本发明的实验结果表明联合接种乙肝疫苗和乳剂佐剂2次即可以显著提高免疫效果。

[0195] 实施例9制备包含乳剂佐剂和狂犬病毒抗原的双组分狂犬疫苗组合物

[0196] 第一组分的制备:在生物反应器中培养Vero细胞至 $1-1.5 \times 10^7$  cells/ml,对培养的Vero细胞按照1/500-1/100MOI进行狂犬病毒接种,进行连续灌流培养,培养条件:温度32-36℃,pH7.2-7.6,溶氧40%-80%,搅拌速度80-120转/分钟;病毒接种后2-3天开始收获病毒液,连续收获5-20天,病毒液经0.65 $\mu$ m滤芯粗滤后通过300-500kD膜包进行15-30倍浓缩。在浓缩后的病毒收获液中按1:4000的体积比加入 $\beta$ -丙内酯,置于4℃至少24小时灭活狂犬病毒;然后在37℃下放置2-3小时,以水解 $\beta$ -丙内酯。将灭活后的病毒液采用柱色谱法进行纯化,色谱介质为琼脂糖凝胶Sepharose 4FF,采用0.01mol/L磷酸盐缓冲液洗脱,上样

量为层析柱体积的5~10%；检测器为紫外检测器，检测波长为280nm，收集第一个色谱峰得到狂犬病疫苗原液，稀释后得到人用狂犬疫苗，人用剂量为0.5mL，效价为5IU。

[0197] 第二组分的制备：将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合，然后加入45ml含有5wt.%吐温80的磷酸盐缓冲液混合后，在20℃搅拌温度条件下，以12000rpm搅拌20min，然后进行均质。均质温度20℃、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环，制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0198] 制剂：人用剂量的佐剂瓶为0.5ml，成分包括10.69mg的角鲨烯，11.86mg的 $\alpha$ -生育酚，4.86mg的吐温80，3.53mg的NaCl，0.09mg的KCl，0.51mg的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，0.09mg的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和灭菌注射用水。

[0199] 实施例10制备包含乳剂佐剂和吸附于铝佐剂的狂犬病毒抗原的双组分狂犬疫苗组合物

[0200] 第一组分的制备：按照实施例9的方法制备狂犬病毒疫苗原液，将狂犬病毒疫苗原液与氢氧化铝佐剂(ALHYDROGEL, CRODA, 下同)或磷酸铝佐剂混合，在15℃, 100rpm下震荡10h，使狂犬病毒吸附到氢氧化铝或磷酸铝佐剂上，得到吸附于铝佐剂的狂犬病毒疫苗。

[0201] 第二组分的制备：按照实施例9的方法制备第二组分。

[0202] 实施例11制备包含乳剂佐剂和抗原的狂犬疫苗组合物

[0203] 按照实施例9的方法分别制备第一组分和第二组分，将第一组分和第二组分混合得到疫苗组合物。

[0204] 实施例12狂犬疫苗小鼠免疫实验

[0205] 分别利用不含佐剂的狂犬疫苗和实施例9中的狂犬疫苗组合物免疫BALB/c小鼠，每组10只，腹腔免疫，狂犬病毒疫苗剂量和佐剂剂量为人用剂量的1/25(即狂犬病毒疫苗20 $\mu\text{L}$ ，乳剂佐剂20 $\mu\text{L}$ )，各组的佐剂、免疫途径和免疫程序如表6所示。分别在第3、7、14、28和42天采集血清，进行血清中和抗体检测。

[0206] 表6

组别	狂犬病毒疫苗剂量	佐剂	免疫途径	免疫程序(天)
Gr1	1/25HD	—	腹腔注射	0/3/7/14/28
Gr2	1/25HD	—	腹腔注射	0/14/28
Gr3	1/25HD	—	腹腔注射	0/28
Gr4	1/25HD	乳剂佐剂	腹腔注射	0/3/7/14/28
Gr5	1/25HD	乳剂佐剂	腹腔注射	0/14/28
Gr6	1/25HD	乳剂佐剂	腹腔注射	0/28

[0208] 在第3天各组均未检测到中和抗体，第1、4和6组在第7、14、28和42天的中和抗体滴度GMT如表7和图13所示。

[0209] 表7

组别	中和抗体滴度 GMT			
	第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
Gr1	42973	334605	606287	933223
Gr4	56569	428709	1392881	2111213
Gr6	13929	56569	80000	2962799

[0211] 可见,在采用传统的5针免疫程序时,单独接种狂犬疫苗时产生的中和抗体滴度GMT虽连续提高,但提高速度比较平缓,在联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂时,中和抗体滴度GMT明显提高,但提高速度与单独接种狂犬疫苗时比较相似,即在第14天,中和抗体滴度GMT提高至第7天时的近8倍,在第28天和第42天,中和抗体滴度GMT提高至前次检测值的2-3倍和1.5倍。

[0212] 而在采用2针免疫程序时,联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂产生的中和抗体滴度GMT在前期比较平缓,但在接种第二针进行加强免疫(第28天)的2周后(第42天)的中和抗体滴度GMT迅速增长至加强免疫(第28天)时中和抗体滴度GMT的37倍。可见,传统接种程序虽可诱导持续提高的中和抗体滴度,但由于接种时间间隔较短,无法发挥加强免疫的效果,从而导致第42天的中和抗体滴度GMT尚不及采用2针免疫程序的接种方案。

[0213] 末次免疫14天后(即第42天),各组小鼠的中和抗体滴度GMT如图14所示。可以发现,在单独接种狂犬疫苗的情况下,按照传统接种程序接种5针的中和抗体滴度GMT为933223,而按照设定程序接种三针和两针的中和抗体滴度GMT为492458和696440,均低于传统接种程序时的中和抗体滴度GMT。

[0214] 在联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂的情况下,按照传统接种程序接种5针的中和抗体滴度GMT显著提高到2111213,而按照设定程序接种三针和两针的中和抗体滴度GMT为800000和2962799。

[0215] 因此,联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂可以显著提高狂犬疫苗的免疫应答,在接种三针或两针的情况下可以达到与传统接种程序接种5针相当甚至更佳的效果,尤其是联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂且间隔28天接种2针的免疫方案,中和抗体滴度GMT显著高于单独接种狂犬疫苗的三种免疫方案以及联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂且接种3针的免疫方案。因此,本发明的实验结果表明联合接种狂犬疫苗和乳剂佐剂可以将免疫次数降低至2次。

[0216] 实施例13制备包含乳剂佐剂和流感病毒抗原的双组分流感疫苗

[0217] 原料及来源:

[0218] 流感病毒疫苗:四价流感病毒裂解疫苗为江苏金迪克生物技术股份有限公司产品,包含等量的A1(A/California/7/2009,H1N1)、A3(A/HongKong/4801/2014,H3N2)、B1(B/Brisbane/60/2008,B/Victoria,简称B/V)和B2(B/Phuket/3073/2013,B/Yamagata,简称B/Y)四种流感病毒株。

[0219] 水包油佐剂的制备:

[0220] 将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的磷酸盐缓冲液混合后,在20℃搅拌温度条件下,以12000rpm搅拌20min,然后进行均质。均质温度20℃、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环,制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0221] 制剂:人用剂量的佐剂瓶为0.5ml,成分包括10.69mg的角鲨烯,11.86mg的 $\alpha$ -生育酚,4.86mg的吐温80,3.53mg的NaCl,0.09mg的KCl,0.51mg的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,0.09mg的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和灭菌注射用水。

[0222] 经检测,乳剂的平均粒径为粒径160nm,PDI为0.088。

[0223] 为了考察缓冲体系对佐剂免疫效果的影响,本发明还分别利用柠檬酸盐缓冲液(pH 6.49 $\pm$ 0.5)、醋酸盐缓冲液(pH 5.65 $\pm$ 0.5)和碳酸盐缓冲液(pH 10.63 $\pm$ 0.5)代替磷酸盐缓冲液(pH 7.20 $\pm$ 0.5)制备水包油佐剂。

[0224] 实施例14制备包含乳剂佐剂和流感病毒抗原的双组分流感疫苗

[0225] 原料及来源:

[0226] 流感病毒疫苗:四价流感病毒裂解疫苗为江苏金迪克生物技术股份有限公司产品,包含等量的A1(A/California/7/2009,H1N1)、A3(A/HongKong/4801/2014,H3N2)、B1(B/Brisbane/60/2008,B/Victoria,简称B/V)和B2(B/Phuket/3073/2013,B/Yamagata,简称B/Y)四种流感病毒株。

[0227] 水包油佐剂的制备:

[0228] 将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的柠檬盐缓冲液混合后,在20℃搅拌温度条件下,以12000rpm搅拌20min,然后进行均质。均质温度20℃、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环,制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0229] 制剂:人用剂量的佐剂瓶为0.5ml,成分包括10.69mg的角鲨烯,11.86mg的 $\alpha$ -生育酚,4.86mg的吐温80,1.25mg的柠檬酸钠,0.08mg的柠檬酸和灭菌注射用水。

[0230] 经检测,乳剂的平均粒径为粒径152.3nm,PDI为0.092。

[0231] 实施例15制备包含乳剂佐剂和流感病毒抗原的双组分流感疫苗

[0232] 原料及来源:

[0233] 流感病毒疫苗:四价流感病毒裂解疫苗为江苏金迪克生物技术股份有限公司产品,包含等量的A1(A/California/7/2009,H1N1)、A3(A/HongKong/4801/2014,H3N2)、B1(B/Brisbane/60/2008,B/Victoria,简称B/V)和B2(B/Phuket/3073/2013,B/Yamagata,简称B/Y)四种流感病毒株。

[0234] 水包油佐剂的制备:

[0235] 将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的醋酸盐缓冲液混合后,在20℃搅拌温度条件下,以12000rpm搅拌20min,然后进行均质。均质温度20℃、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环,制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0236] 制剂:人用剂量的佐剂瓶为0.5ml,成分包括10.69mg的角鲨烯,11.86mg的 $\alpha$ -生育酚,4.86mg的吐温80,6.72mg的无水醋酸钠,0.49mg的醋酸和灭菌注射用水。

[0237] 经检测,乳剂的平均粒径为粒径157.7nm,PDI为0.079。

[0238] 实施例16制备包含乳剂佐剂和流感病毒抗原的双组分流感疫苗

[0239] 原料及来源:

[0240] 流感病毒疫苗:四价流感病毒裂解疫苗为江苏金迪克生物技术股份有限公司产品,包含等量的A1(A/California/7/2009,H1N1)、A3(A/HongKong/4801/2014,H3N2)、B1(B/Brisbane/60/2008,B/Victoria,简称B/V)和B2(B/Phuket/3073/2013,B/Yamagata,简称B/Y)四种流感病毒株。

[0241] 水包油佐剂的制备:

[0242] 将2.14g角鲨烯和2.37g $\alpha$ -生育酚混合,然后加入45ml含有5wt.%吐温80的碳酸盐缓冲液混合后,在20℃搅拌温度条件下,以12000rpm搅拌20min,然后进行均质。均质温度20℃、均质压力80~120MPa下进行2-4个循环,制备获得粒径小于160nm的水包油佐剂。

[0243] 制剂:人用剂量的佐剂瓶为0.5ml,成分包括10.69mg的角鲨烯,11.86mg的 $\alpha$ -生育酚,4.86mg的吐温80,0.47mg的碳酸氢钠,4.18mg的碳酸钠和灭菌注射用水。

[0244] 经检测,乳剂的平均粒径为粒径157.0nm,PDI为0.084。

[0245] 实施例17流感疫苗小鼠免疫实验

[0246] 该实施例研究了乳剂佐剂联合独立包装的四价流感病毒裂解疫苗的免疫原性,并设置传统A1(OH)<sub>3</sub>佐剂以及不加佐剂组作为对照。同时,该实施例还考察在抗原中添加表面活性剂后的免疫效果。

[0247] 将不同佐剂分别与四价流感病毒裂解疫苗联合免疫C57BL/6小鼠,抗原免疫剂量为1.5 $\mu$ g\*4/只(H1N1、H3N2、B/V和B/Y各1.5 $\mu$ g,合计6 $\mu$ g/只),乳剂佐剂用量为50 $\mu$ l/只,A1(OH)<sub>3</sub>佐剂用量为50 $\mu$ g/只,每组6只小鼠,分组情况如表8所示。采用一针免疫程序,免疫后28天采集血液分离血清,通过检测血清中血凝抑制抗体滴度评价各组免疫效果。

[0248] 表8

分组	成分
Gr1	流感疫苗+乳剂佐剂(磷酸盐缓冲液)
Gr2	流感疫苗+乳剂佐剂(柠檬酸盐缓冲液)
Gr3	流感疫苗+乳剂佐剂(醋酸盐缓冲液)
Gr4	流感疫苗+乳剂佐剂(碳酸盐缓冲液)
Gr5	流感疫苗(添加曲拉通和吐温80)+乳剂佐剂(磷酸盐缓冲液)
Gr6	流感疫苗(添加曲拉通和吐温80)+乳剂佐剂(柠檬酸盐缓冲液)
Gr7	流感疫苗(添加曲拉通和吐温80)+乳剂佐剂(醋酸盐缓冲液)
Gr8	流感疫苗(添加曲拉通和吐温80)+乳剂佐剂(碳酸盐缓冲液)
Gr9	流感疫苗对照
Gr10	流感疫苗+铝佐剂

[0250] 注:添加的吐温80的最终浓度为0.3 $\mu$ l/ml,曲拉通(Triton X-100)的最终浓度为0.03 $\mu$ l/ml。

[0251] 由图15-18可以看出,针对不同亚型的血凝抑制抗体滴度检测结果显示,乳剂佐剂组的血凝抑制抗体滴度均显著高于不加佐剂组,并且除H1N1亚型外,乳剂佐剂组的血凝抑制抗体滴度均显著高于A1(OH)<sub>3</sub>佐剂组。可见,本发明的实验结果表明联合接种流感疫苗和乳剂佐剂可以显著提高免疫效果。

[0252] 同时,在使用不同缓冲体系时,针对不同亚型的血凝抑制抗体滴度检测结果存在差异,针对不同抗原组,适合不同的缓冲体系。

[0253] 对于H1N1抗原的血凝抑制抗体滴度检测结果显示添加表面活性剂曲拉通和吐温80后滴度检测结果在磷酸盐缓冲液体系是高于同缓冲体系下直接混合的疫苗+乳剂佐剂组(Gr5组是283,而Gr1组是126),在碳酸盐缓冲液体系下添加表面活性剂曲拉通和吐温80后滴度检测结果低于直接混合的独立包装的疫苗成品+乳剂佐剂组(Gr8组是178,而Gr4组是200),同时参考制剂工艺的稳定性,在避免增加制剂工序和表面活性剂环节,综合平衡最优的缓冲体系是Gr4组。

[0254] 对于H3N2抗原的血凝抑制抗体滴度检测结果显示添加表面活性剂曲拉通和吐温80后滴度检测结果在磷酸盐缓冲液体系和醋酸盐缓冲液体系是低于同缓冲体系下直接混合的疫苗+乳剂佐剂组,同时参考制剂工艺的稳定性,在避免增加制剂工序和表面活性剂环节,综合平衡最优的缓冲体系是Gr3组(Gr3组是763,而Gr7组是449)。

[0255] 对于B/V抗原的血凝抑制抗体滴度检测结果显示添加表面活性剂曲拉通和吐温80

后滴度检测结果在醋酸盐缓冲液体系和碳酸盐缓冲液体系是低于同缓冲体系下直接混合的疫苗+乳剂佐剂组,同时参考制剂工艺的稳定性,在避免增加制剂工序和表面活性剂环节,综合平衡最优的缓冲体系是Gr3组(Gr3组是2851,而Gr7组是2308)和Gr4组(Gr4组是2263,而Gr8组是2016)。

[0256] 对于B/Y抗原的血凝抑制抗体滴度检测结果显示添加表面活性剂曲拉通和吐温80后滴度检测结果在醋酸盐缓冲液体系是低于同缓冲体系下直接混合的疫苗+乳剂佐剂组,同时参考制剂工艺的稳定性,在避免增加制剂工序和表面活性剂环节,综合平衡最优的缓冲体系是Gr3组(Gr3组是2411,而Gr7组是1425)。

[0257] 综合上述流感的四价不同抗原,结合血凝抑制抗体滴度检测结果,最优组是Gr3组,即在醋酸盐缓冲液体系直接混合独立包括的疫苗成品+乳剂佐剂组。

[0258] 在抗原中添加表面活性剂后的血凝抑制抗体滴度检测结果与不添加表面活性剂的检测结果也无显著差异,说明缓冲体系和表面活性剂对免疫效果无明显影响。

[0259] 可以看出,本发明的组合物包含独立包装的水包油佐剂和疫苗成品,能够更加快速、长效、安全地刺激机体产生高水平的免疫应答,并且还可以减少疫苗接种剂次。

[0260] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

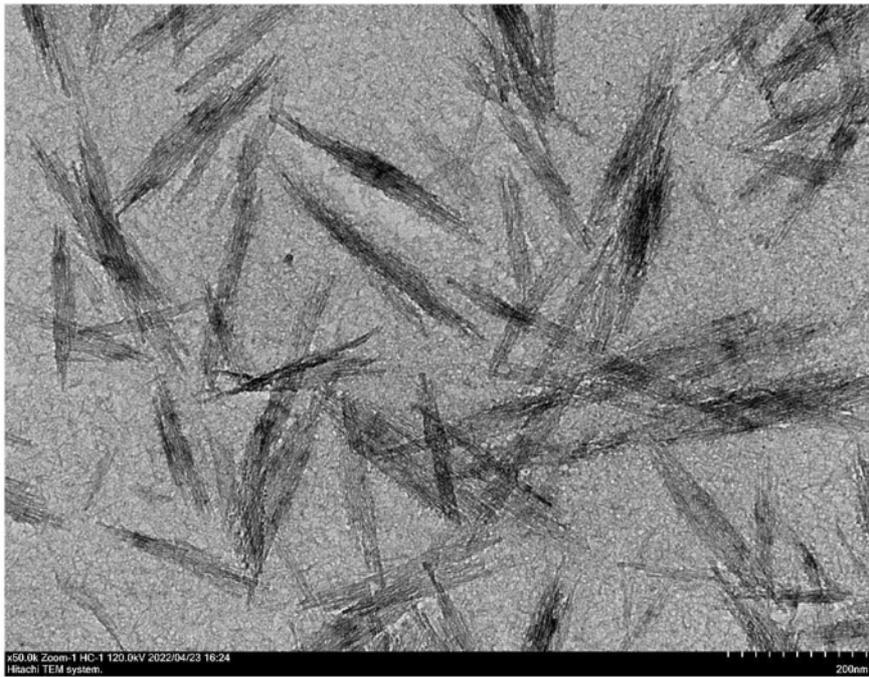


图1



图2

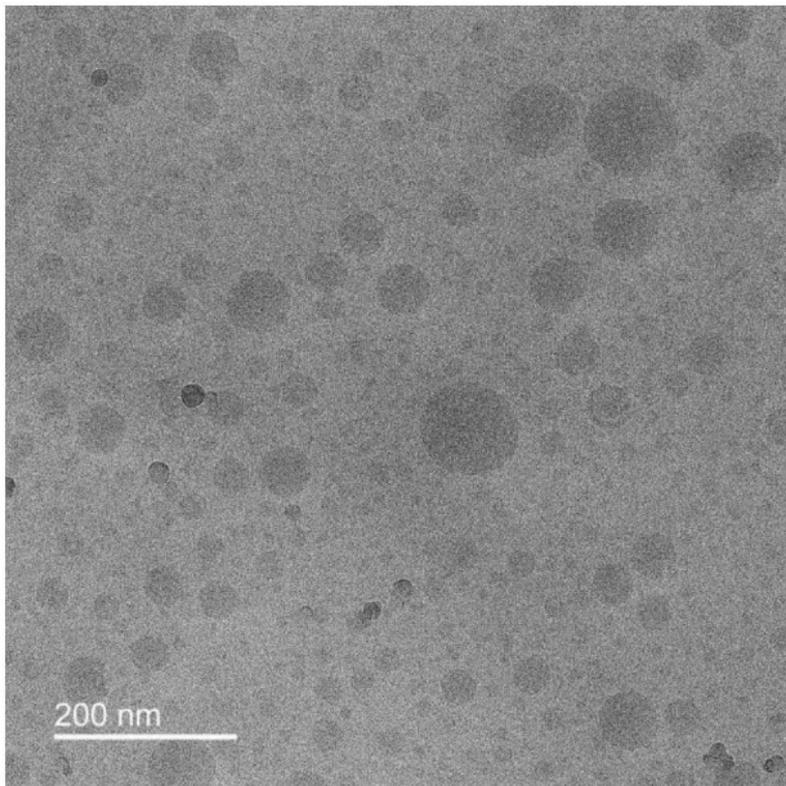


图3

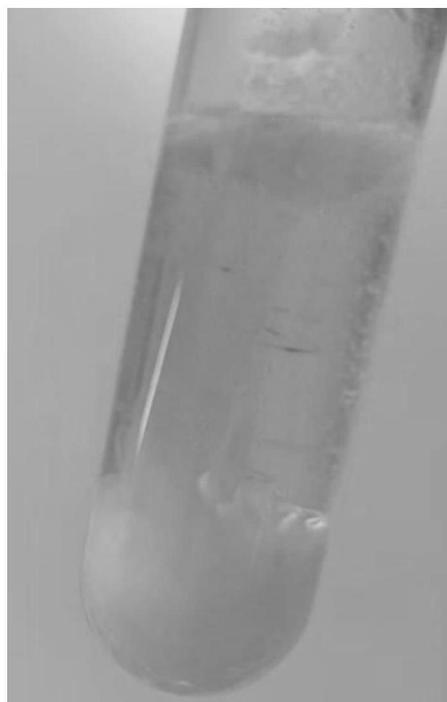


图4

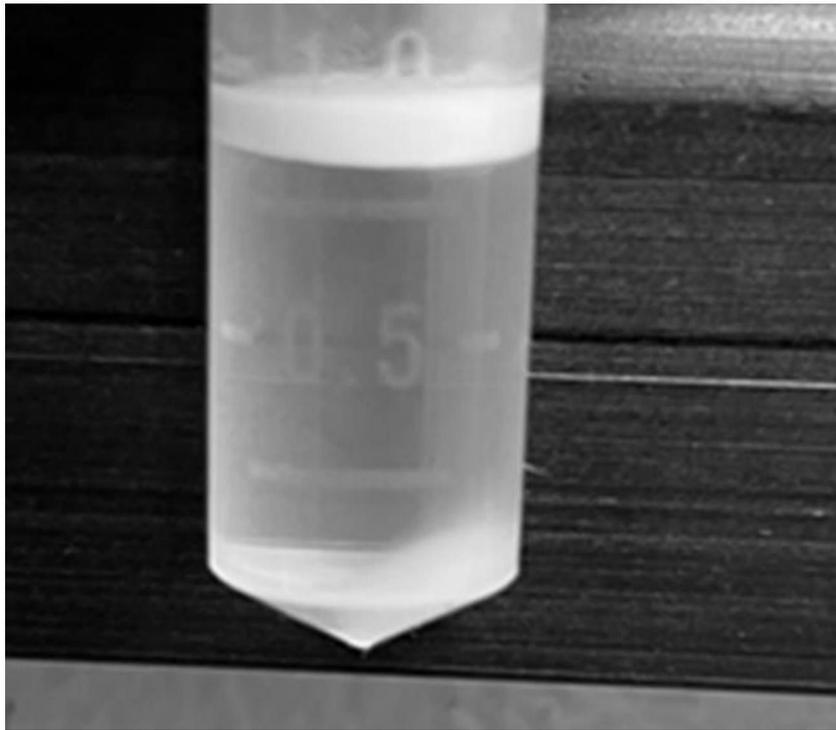


图5

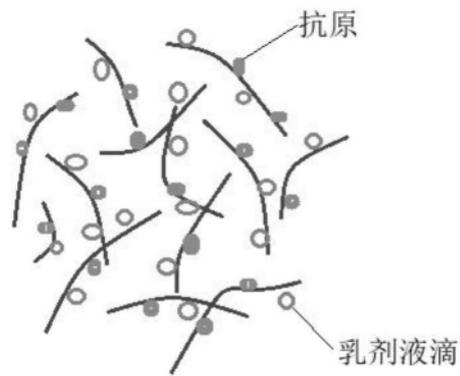


图6

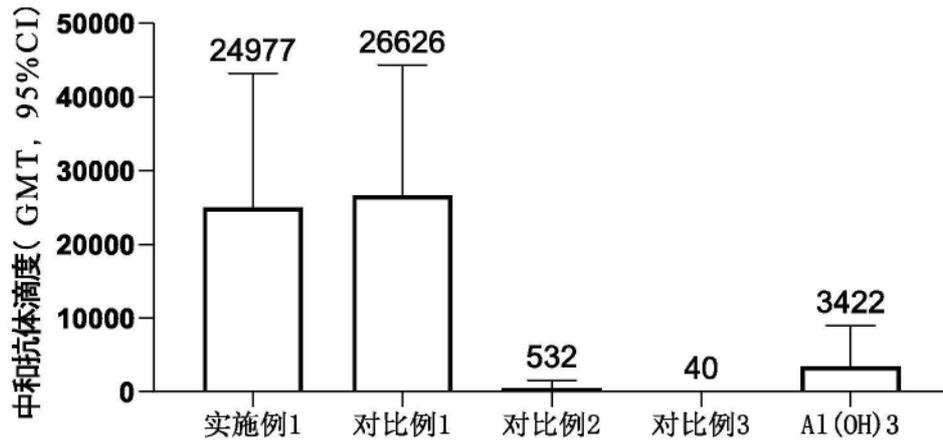


图7

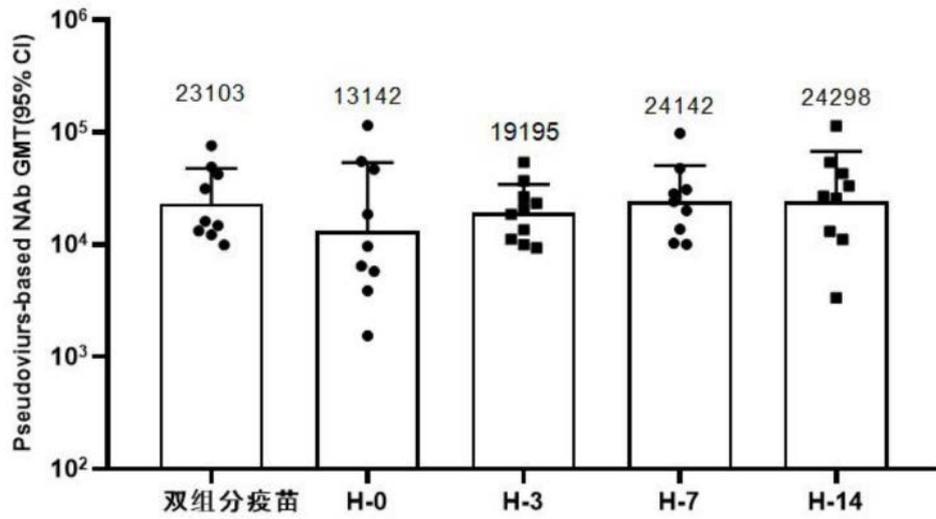


图8

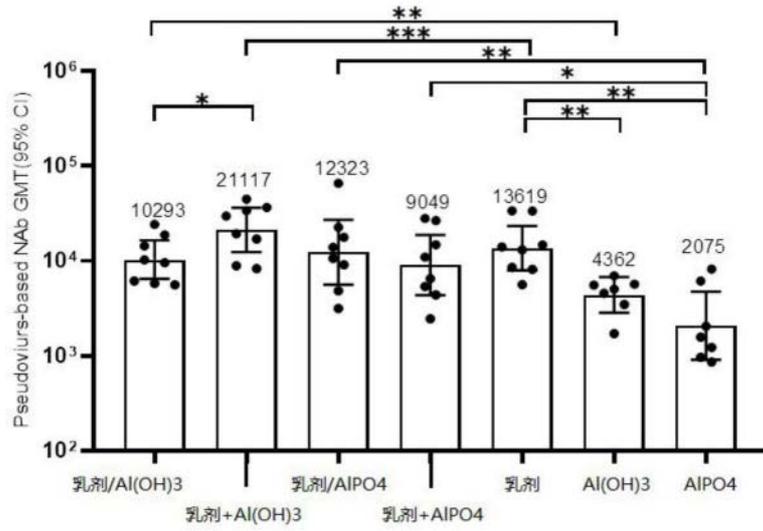


图9

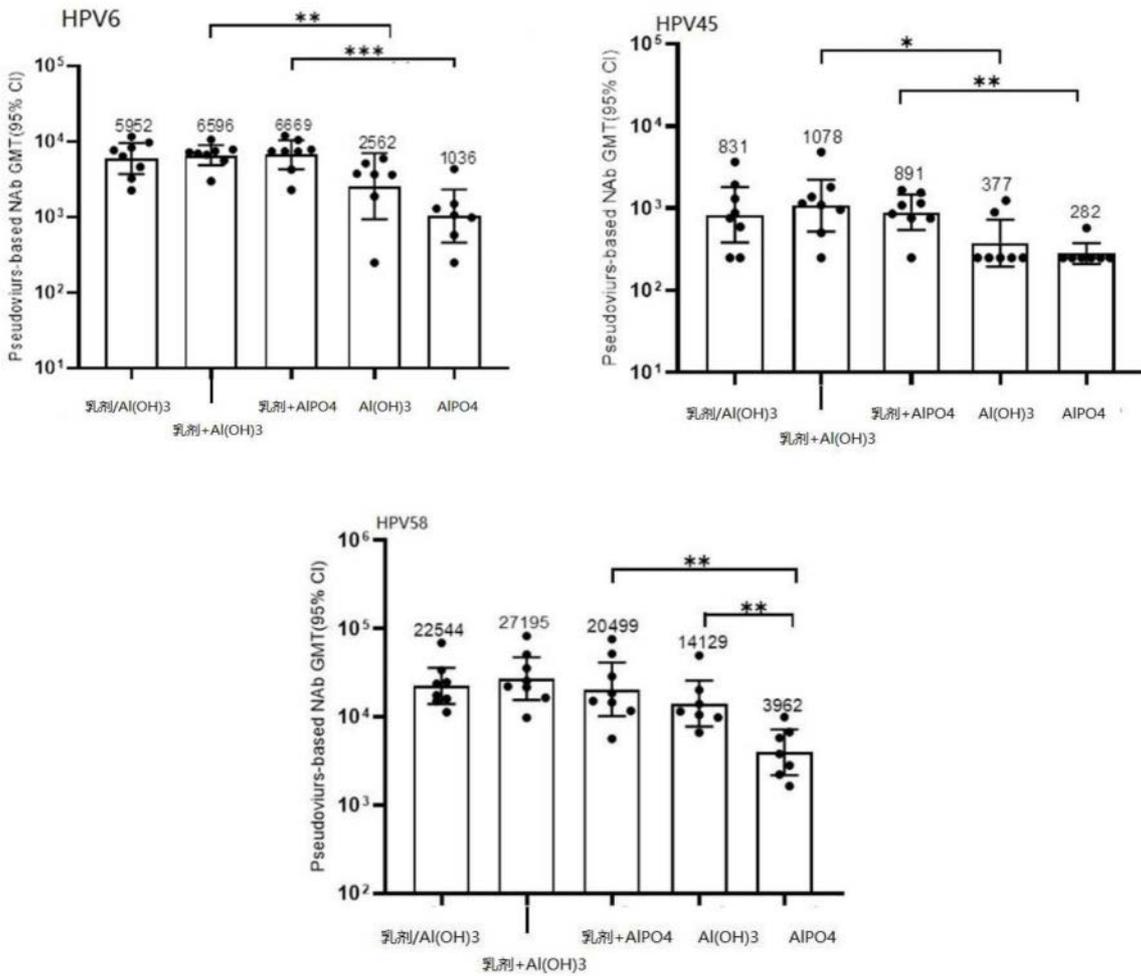


图10

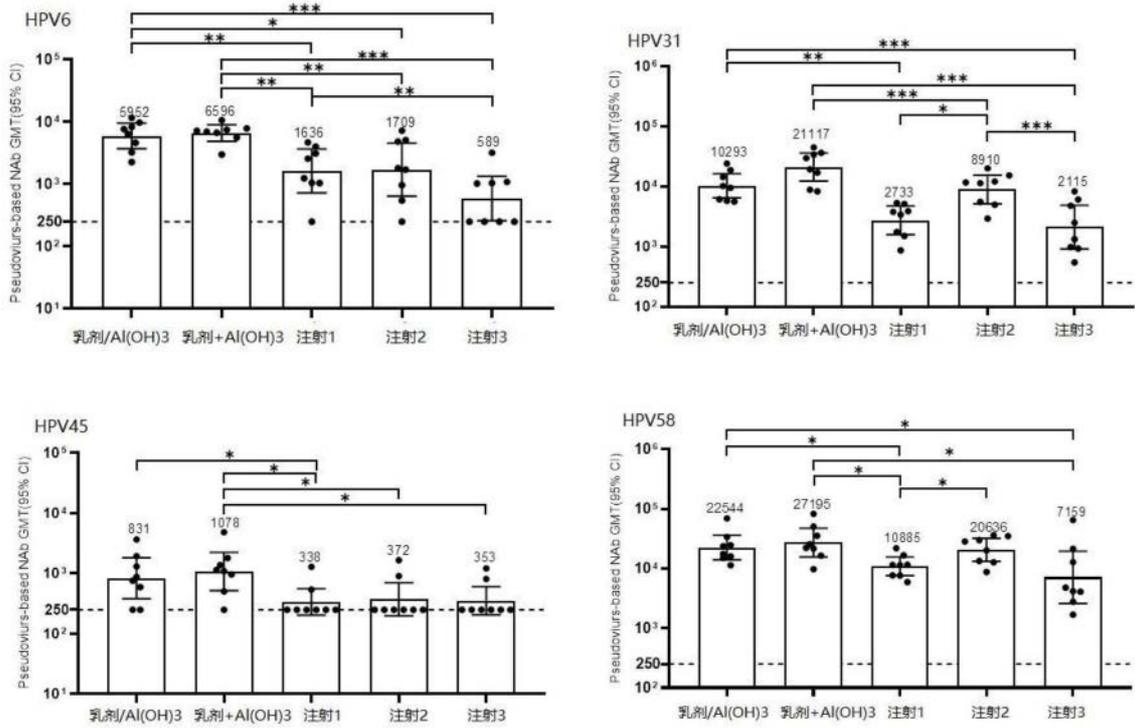


图11

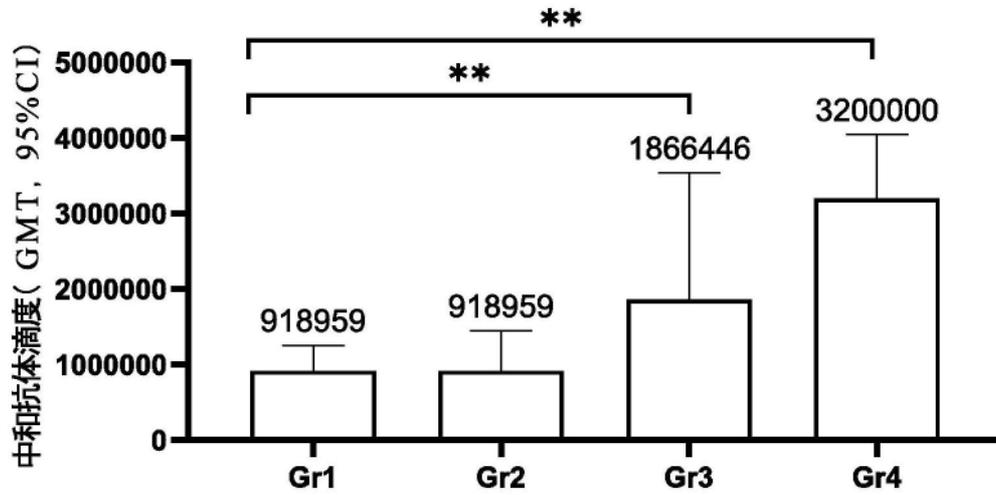


图12

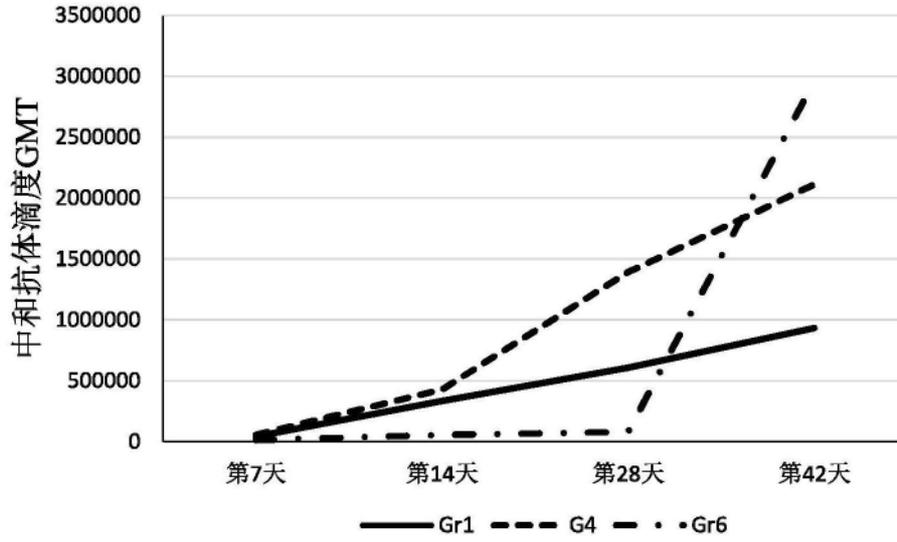


图13

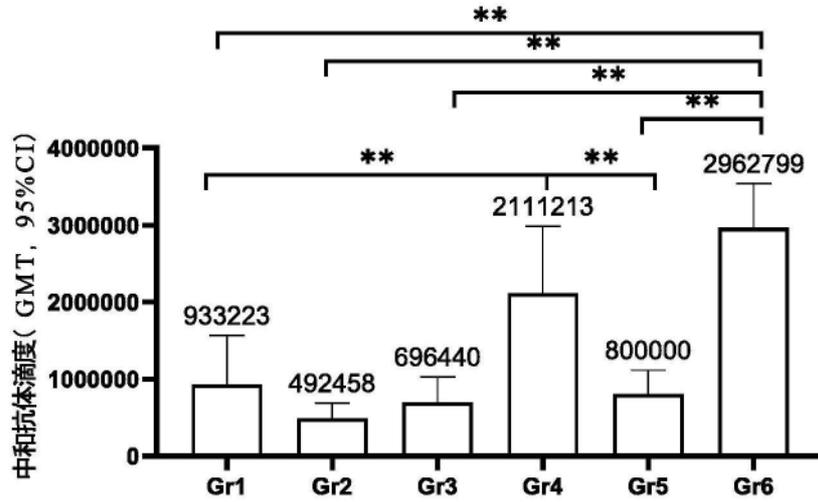


图14

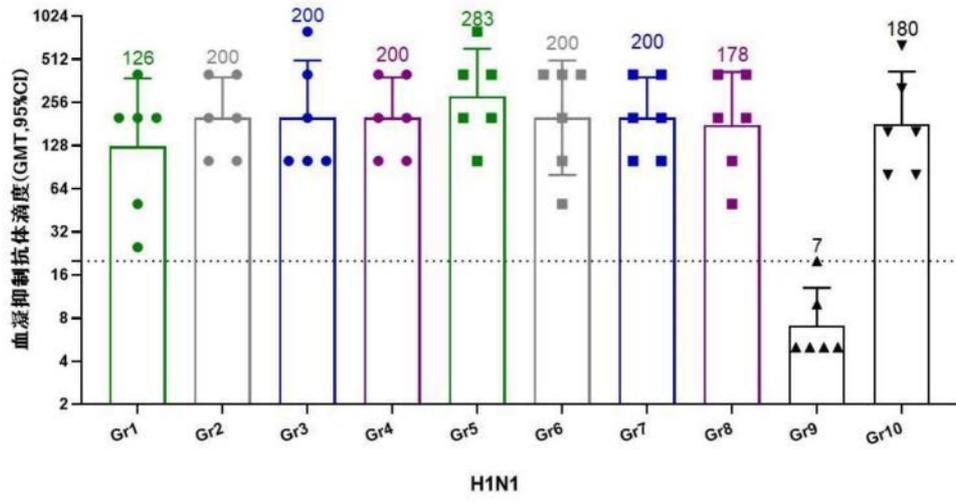


图15

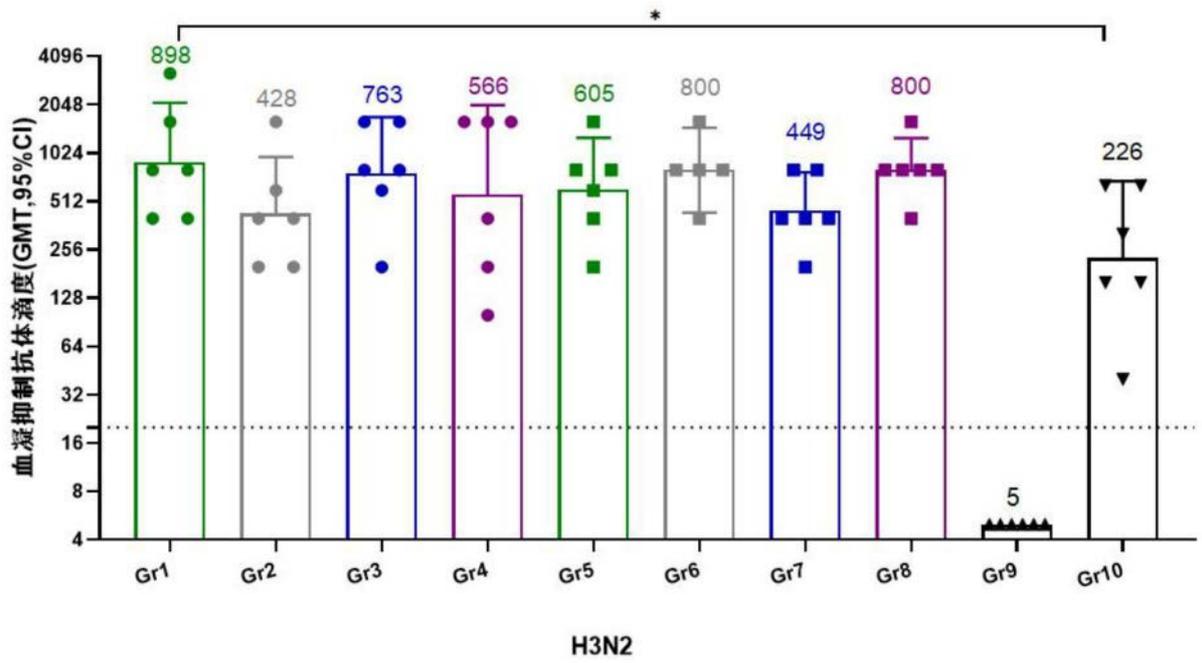


图16

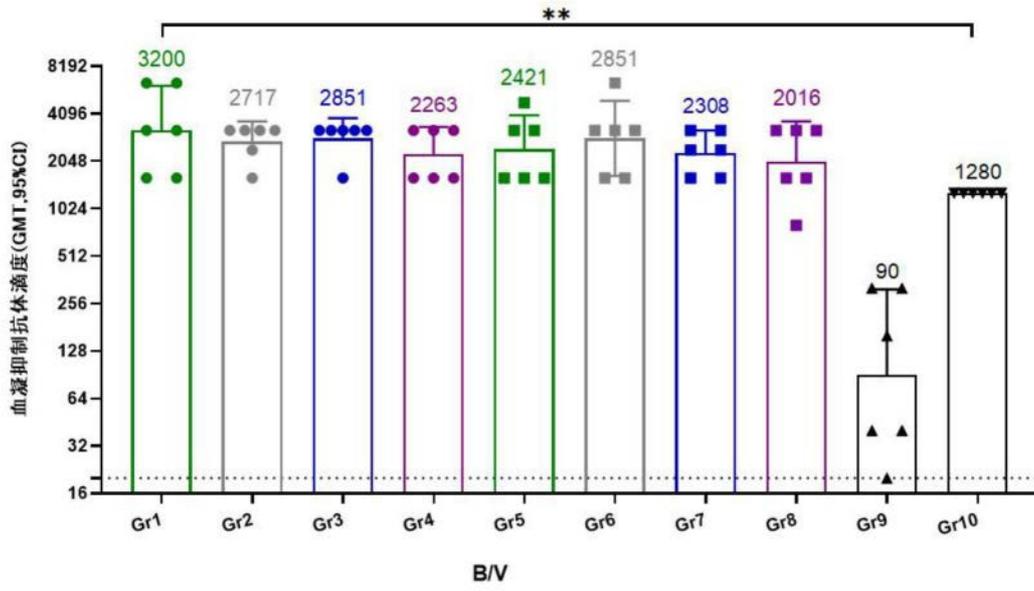


图17

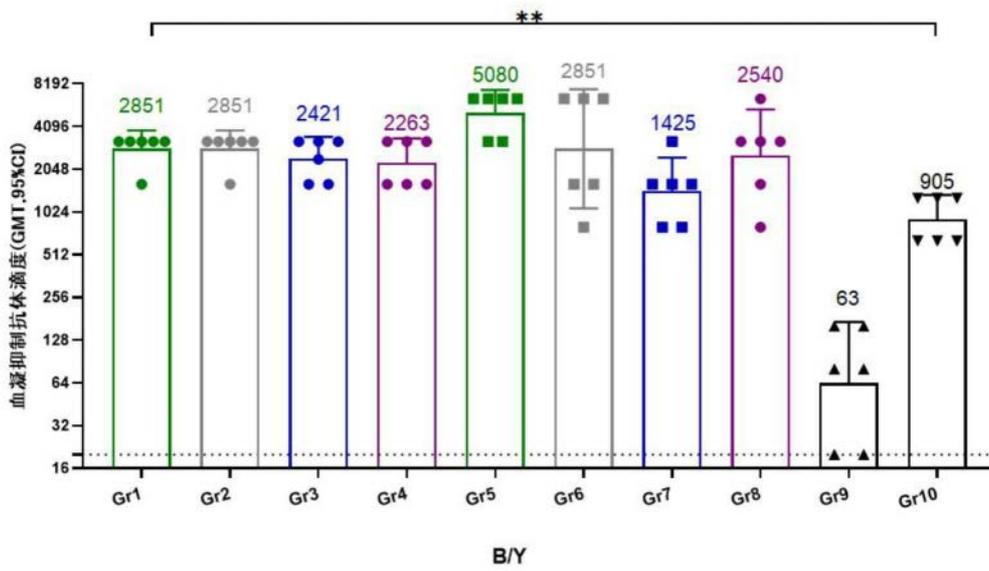


图18