



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105288614 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510065536. 6

A61P 37/04(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 18

(62) 分案原申请数据

201410272698. 2 2014. 06. 18

(71) 申请人 潘皓

地址 210000 江苏省南京市秦淮区永乐路
11号丽景华庭6幢1102室

申请人 谢小虎 张岳智

(72) 发明人 潘皓 谢小虎 张岳智

(74) 专利代理机构 杭州裕阳专利事务所(普通
合伙) 33221

代理人 冯燕青

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61K 9/107(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种疫苗组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种疫苗组合物及其制备方法,包括抗原和纳米乳疫苗辅剂,其中纳米乳疫苗辅剂以角鲨烯为油相,与两种表面活性剂混合,加入缓冲液为水相,整个体系中,HLB值为8-12,表面活性剂总量范围为8%-20%,水油比例为0.2-0.8;将上述混合物在低于相转变温度下,快速混合搅拌进行初步乳化;然后在一定搅拌速度下进行预加热进一步乳化;将混合物加热至高于相转变温度后进行降温,水相完全包裹油相,最终形成一种颗粒均匀的纳米级疫苗辅剂。该疫苗组合物中的纳米乳疫苗辅剂颗粒分布均匀,稳定性优良,免疫增效性优良,使得疫苗组合物较无辅剂或其他普通辅剂的疫苗免疫效果更好。

1. 一种疫苗组合物,其特征在于,包括一种纳米乳疫苗辅剂和抗原,其中所述疫苗辅剂通过以下步骤制得:以角鲨烯为油相,与两种表面活性剂混合,加入缓冲液为水相,整个体系中,HLB值为8-12,表面活性剂总量范围为8%-20%,水油比例为0.2-0.8;将上述混合物在低于相转变温度下,快速混合搅拌进行初步乳化;然后在一定搅拌速度下进行预加热进一步乳化;将混合物加热至高于相转变温度后进行降温,水相完全包裹油相,最终形成一种颗粒均匀的纳米级疫苗辅剂。

2. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述两种表面活性剂分别为吐温和司盘。

3. 根据权利要求2所述的疫苗组合物,其特征在于,所述两种表面活性剂分别为吐温80和司盘80。

4. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述HLB值为9.5。

5. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述表面活性剂总量的范围为11%。

6. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述水油比例范围为0.4。

7. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述水相的缓冲液pH值为中性。

8. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其特征在于,所述抗原为出血热抗原。

9. 一种如权利要求1所述的疫苗组合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

a. 粗乳制备:混合角鲨烯,表面活性剂和辅助表面活性剂在缓冲液中,快速混合搅拌进行初步乳化;

b. 进一步乳化:将步骤a制得的粗乳在一定搅拌速度下进行加热,以进一步乳化;

c. 相转变和纳米乳的形成:将步骤b中的混合物加热至相转变温度以上,然后进行降温,形成纳米级乳液,得到纳米乳疫苗辅剂;

d. 向抗原中添加步骤c制得的纳米乳疫苗辅剂,制得疫苗组合物。

一种疫苗组合物及其制备方法

[0001] 本发明专利申请是申请日为 2014 年 6 月 18 日、申请号为 201410272698. 2、名称为纳米乳疫苗辅剂的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物医药领域,涉及一种疫苗组合物,特别涉及一种包含新型纳米乳疫苗辅剂的疫苗组合物及其制备方法。

背景技术

[0003] 疫苗辅剂又称免疫佐剂 (Adjuvant),是一类单独使用时一般无免疫原性,但与抗原物质合并使用时能增强抗原物质免疫原性,增强机体免疫应答,或改变机体免疫应答类型的物质。辅剂本质上是一类非特异性免疫增强剂,临床上常在疫苗免疫前单独接种或与疫苗混合后同时接种。辅剂使用在二次免疫后,其免疫的增强作用更加明显。实践证明,疫苗与辅剂的联合应用,不仅可以显著提高疫苗的免疫效果,还可以减低动物机体的免疫耐受性。

[0004] 现在商业生产上主要有以下几种辅剂,铝盐,改进的微生物产物,脂质体和乳剂。其中铝辅剂主要有氢氧化铝,磷酸铝等,是全世界应用最广泛的辅剂。但该辅剂有很多局限性,如吸附效果低下,需要的量大等。随着现代生物工程基因工程的迅速发展,传统的灭活或活体疫苗的重要性已逐渐降低,然而由基因工程重组抗原或化学合成多肽组成的现代疫苗普遍存在免疫原性弱等问题,因此迫切需要安全又有强活性的辅剂来增强其效力。为改变这种免疫辅剂研究发展的落后局面,在许多发达国家已经开始进行新型辅剂的研究,其中就包含某些纳米乳辅剂的研发。市面上现有的乳剂佐剂以 MF59, AS04 等为代表,是一类油包水或水包油型乳化剂。对乳剂辅剂的研究表明这是一种不亚于铝辅剂的新型辅剂,其在几个临床前开发和临床试验中表现得甚至更加优异,乙肝、丙肝及 HIV 亚单位抗原等也在应用新型佐剂进行了大规模的临床实验,比如 AS04 作为乙肝疫苗佐剂,在欧盟已经取得了上市许可。特别是基于 MF59 乳剂辅剂的流感疫苗 Fludax® 已经上市 10 年,这是一种利用超高压压力匀化作用制备的疫苗辅剂,但这种高能的工艺有很多缺陷,主要表现在:需要特殊的设备进行纳米化如高压均质机,较长的工艺操作时间,大量能量需求和高成本。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种免疫效果好的疫苗组合物,其中所用疫苗辅剂性能优良且成本低的,以克服上述缺点。

[0006] 本发明通过相转变温度 (phase inversion temperature (PIT)) 法制备新型纳米乳疫苗辅剂,关键因素需要确定合适的表面活性剂和合适的 HLB 值,这样才能在油表面形成支架结构,由水相包裹,形成均匀的纳米级 (130 ~ 165nm 范围) 的水油颗粒,并且结构稳定;其次表面活性剂总量需要控制,否则会影响产品的安全性;最后必须有合适的水和油的比例,这样才能确保合适的水油的包裹。最后通过实验设计找到一种合适的相转变温度

表面活性剂,确定合适的相转变温度法工艺流程,确定纳米乳化疫苗辅剂的主要质控项目和标准。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取下述技术方案来实现:

[0008] 一种疫苗组合物,包括一种纳米乳疫苗辅剂和抗原,其中所述疫苗辅剂通过以下步骤制得:以角鲨烯为油相,与两种表面活性剂混合,加入缓冲液为水相,整个体系中,HLB 值为 8-12,表面活性剂总量范围为 8% -20%,水油比例为 0.2-0.8;将上述混合物在低于相转变温度下,快速混合搅拌进行初步乳化;然后在一定搅拌速度下进行预加热进一步乳化;将混合物加热至高于相转变温度后进行降温,水相完全包裹油相,最终形成一种颗粒均匀的纳米级疫苗辅剂。

[0009] 进一步,所述两种表面活性剂分别为吐温和司盘。

[0010] 优选的,所述两种表面活性剂分别为吐温 80 和司盘 80。

[0011] 优选的,所述 HLB 值为 9.5。

[0012] 优选的,所述表面活性剂总量的范围为 11%

[0013] 优选的,所述水油比例范围为 0.4。

[0014] 优选的,所述水相的缓冲液 pH 值为中性。

[0015] 作为其中一个实施例,所述抗原为出血热抗原。

[0016] 其中本发明的核心技术为纳米乳疫苗辅剂的制备方法,具体包括:

[0017] 1、表面活性剂的选择

[0018] 通过预测试发现纳米乳剂可以使用相转变温度法得以实现,本发明可以使用不同的 Tween (20, 40, 60, 65, 80 and 85) 和不同的 Span (20, 40, 60, 65, 80 and 85),使用不同的组合,用相转变温度法均可制备出纳米辅剂,但 Tween 80 和 Span 80 作为表面活性剂效果最好,因此使用 Tween 80 和 Span 80 作为首选表面活性剂,但并不局限于 Tween80 和 Span 80。

[0019] 2、HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance, 亲水亲油平衡性) 的选择

[0020] 当确定一种油相(如角鲨烯)后,乳剂的类型和稳定性将取决于表面活性剂与油和水的相互作用。亲水表面活性剂与水相相互作用较强,倾向于形成水包油型乳剂;反之亦然。在温度高于相转变温度时,表面活性剂与水的氢键断裂脱水,就导致了表面活性剂变得更亲脂,于是乳剂的相转变就发生了。根据 Tween 和 Span 家族的结构和 HLB 值,经过设计试验,找到一个形成乳剂的最优 HLB 值。对于角鲨烯这种油相,最终确定 8-12 均可制备纳米乳辅剂,HLB 值大约在 9.5 左右时可得到最小粒径的乳剂。

[0021] 3、表面活性剂最低比例的确定

[0022] 通过设计试验,找到能够形成均一粒径的最低表面活性剂比例,确定形成均一粒径的最低表面活性剂比例为 8%。当高于 8% 时,表面活性剂浓度越高,粒径就越小,有利于提高其生物利用率,制剂的均匀性,分散性和吸收性。但表面活性剂比例越小,对疫苗辅剂来说意味着更安全。综合考量最终确定表面活性剂总量范围为 8-20%。

[0023] 最终本发明成功的用 PIT 法制备了一种以角鲨烯为油相的纳米乳剂,在方法开发的过程中,我们确认 PIT 表面活性剂和辅助表面活性剂的选择是方法成败的关键。同时本发明也定义了 HLB 值和油/水比例的最佳操作边界。对另外一些参数,包括表面活性剂比例,水相和冷却方法也进行了优化。

- [0024] 具体的,水油比例为 0.2-0.8,优选的,所述水油比例范围为 0.4。
- [0025] 优选的,所述水相的缓冲液 pH 值为中性。
- [0026] 本发明的另一个发明目的是提供一种简单快捷制备前述疫苗组合物的方法。
- [0027] 为实现该目的,本发明采用的技术方案为:
- [0028] 一种前述纳米乳疫苗辅剂的制备方法,包括以下步骤:
- [0029] a. 粗乳制备:混合角鲨烯,表面活性剂和辅助表面活性剂在缓冲液中,快速混合搅拌进行初步乳化;
- [0030] b. 进一步乳化:将步骤 a 制得的粗乳在一定搅拌速度下进行加热,以进一步乳化;
- [0031] c. 相转变和纳米乳的形成:将步骤 b 中的混合物加热至相转变温度以上,然后进行降温,形成纳米级乳液,得到纳米乳疫苗辅剂;
- [0032] d. 向抗原中添加步骤 c 制得的纳米乳疫苗辅剂,制得疫苗组合物。
- [0033] 其中具体工艺参数和流程为:以角鲨烯为油相,与吐温和司盘两种表面活性剂混合,另加入 pH 约为中性的缓冲剂 (PBS, Tris, Citric, 或 Acetate 等) 为水相。整个体系中,HLB 范围在 8-12,表面活性剂总量范围为 8-20%,水油比例范围在 0.2-0.8,搅拌 15-20 分钟同时加热至 55-70°C。将温度保持在 55-70°C,继续搅拌 5-10 分钟后将热的乳剂迅速转移至 4-8°C 的大量前述缓冲剂 (为起始体积的 5-10 倍) 中稀释,同时不停搅拌。继续搅拌 10-30 分钟得到纳米乳疫苗辅剂。反应结束时测得所得物的电导率接近于 WFI 的电导率,表明制得的纳米乳水相完全包裹油相。将获得的纳米乳疫苗辅剂分装保存于 2-8°C 冷库中。
- [0034] 本发明制得的纳米乳疫苗辅剂颗粒均匀,稳定性优良,免疫增效性优良,可用于各种疫苗的生产,尤其是人用疫苗的生产。
- [0035] 总之,本发明的有益效果为:
- [0036] 本发明首次开发出利用相转变温度 (phase inversion temperature (PIT)) 法制备新型纳米乳疫苗辅剂的工艺。本发明所阐述的相转变温度法是基于温度能改变 PIT 表面活性剂的亲水亲油平衡性。在温度低于相转变温度时,表面活性剂正向卷曲,形成水包油型乳剂;而当温度高于相转变温度时,表面活性剂则反向卷曲,形成油包水型乳剂。快速的降温使得表面活性剂迅速变为亲水,从而使之迅速而自发的从油相向水相转移。这种迅速的转移产生很高的内部紊流能,于是乳滴就被这种能量分散成了纳米级别。因此采用 PIT 法不需要使用复杂的仪器设备,不需要高能输入,不需要高浓度的表面活性剂,也不需要有机溶剂,使用该方法,纳米乳可以用一台加热器,在一个容器内完成制备,是一种简单快捷的先进工艺方法。
- [0037] 本发明主要完成 PIT 表面活性剂和辅助表面活性剂的选择,油水相优化,表面活性剂的比例以及水相的优化,最终形成一种制备纳米乳疫苗辅剂的工艺,该工艺制备的新型疫苗辅剂颗粒大小分布在 140nm 左右 (与其它纳米辅剂相比具有更小的颗粒分布),颗粒分布更均匀,稳定性优良,免疫增效性优良。本发明的疫苗组合物包括该新型纳米乳疫苗辅剂,免疫效果好,还可以减低动物机体的免疫耐受性,对疫苗的发展将起到重要的影响和作用。

附图说明

[0038] 图 1 是本发明实施例 1 纳米乳疫苗辅剂 PIT 法制备中温度, 粒径和电导率的示意图。

[0039] 图 2 是实施例 3 中免疫增强试验的中和荧光效价示意图。

[0040] 图 3 是实施例 4 中免疫增强试验的血凝抑制效价示意图。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施例和附图对本发明进行详细描述。

[0042] 实施例 1

[0043] 纳米乳疫苗辅剂的制备

[0044] 1) 粗乳制备: 以角鲨烯为油相, 与吐温 80 和司盘 80 混合。另加入 pH 约为中性的缓冲剂 PBS 为水相。HLB 为 9.5, 表面活性剂总量范围为 11%, 水油比例范围在 0.4, 搅拌 15-20 分钟同时加热至 55-70°C。(2) 相转变以及纳米乳的形成: 将温度保持在 55-70°C, 继续搅拌 5-10 分钟后将热的乳剂迅速转移至 4-8°C 的大量 (5 倍起始总量) PBS 缓冲剂中稀释, 同时不停搅拌。继续搅拌 10-30 分钟, 制得纳米乳疫苗辅剂产物。将产物分装保存于 2-8°C 冷库中。

[0045] 图 1 是本实施例纳米乳疫苗辅剂 PIT 法制备中温度, 粒径和电导率的示意图, 如图 1 所示, 反应开始后温度低于相转变温度, 表面活性剂正向卷曲, 形成水包油型乳剂, 乳剂的粒径较大, 且不均匀; 当反应继续进行, 温度达到或高于相转变温度时, 表面活性剂则反向卷曲, 形成油包水型乳剂, 粒径变小, 颗粒仍不均匀; 反应最后, 快速的降温使得表面活性剂迅速变为亲水, 从而使之迅速而自发的从油相向水相转移; 这种迅速的转移产生很高的内部紊流能, 于是乳滴就被这种能量分散成了纳米级别; 且颗粒分布均匀。

[0046] 根据上述工艺制备六批产物, 初步结果分别如表 1 所示。表 1 为纳米乳粒子大小和大颗粒的数量, 其中平均颗粒大小为 125-165nm, 大颗粒的数量: 大于 1.2 μm 的颗粒数量小于 1×10^7 个 /ml。从上述实验数据可知, 本实施例制得的纳米乳疫苗辅剂具有更小的颗粒分布, 且颗粒分布更均匀。

[0047] 表 1 纳米乳粒子大小和大颗粒的数量

[0048]

Batch number	Particle size Mean	Large particle (particles/ml)
2013 1-1	135.2	8.78E+05
2013 1-2	137.7	6.94E+05
2013 2-1	137.6	6.08E+05
2013 2-2	137.7	9.75E+05
2013 3-1	137.4	5.41E+05
2013 3-2	136.6	6.95E+05

[0049] 实施例 2

[0050] 产品稳定性测试

[0051] 稳定性为疫苗辅剂的一个重要指标,表 2 为实施例 1 中六批纳米乳疫苗辅剂在

25℃条件下放置 12 个月的稳定性数据。从表 2 可知,该纳米乳疫苗辅剂在 12 个月内粒径(最主要的稳定性指标)无显著改变,产品质量稳定。

[0052] 表 2 纳米乳疫苗辅剂 12 个月的粒径

[0053]

Batch	Initial	1	3	6	9	12
-------	---------	---	---	---	---	----

[0054]

number		month	month	month	month	month
1-1	135.2	136.1	138.3	135.3	135.8	136.5
1-2	137.7	138.2	141.9	141	137.5	136
2-1	137.6	139.6	138.5	138.5	138.1	137.8
2-2	137.7	136.2	138.6	140	145.1	135.4
3-1	137.4	136.6	139	135.7	132.1	140.1
3-2	136.6	138.7	138.6	160.6	140.2	138.1

[0055] 实施例 3

[0056] 疫苗组合物的制备及其疫苗辅剂的增敏性。

[0057] 采用家兔实验验证本发明疫苗组合物相比无疫苗辅剂添加或普通疫苗辅剂的免疫效果更好,即本发明中疫苗组合物中的疫苗辅剂具有增敏性。其中对照组为常规无辅剂的出血热疫苗(I 型抗原量为 1 : 32,II 型为 1 : 16),实验组选取同样的出血热抗原并最终添加实施例 1 中制得的疫苗辅剂,配置流程和常规无佐剂疫苗流程相同。I 型抗原量滴度为 1 : 32、1 : 16、1 : 8,II 型抗原量滴度为 1 : 16、1 : 8。初免后第 7 天加强一针,初次免疫后 21 天采血进行中和荧光效价测定。结果如图 2 所示,从中可以看出,添加了本发明辅剂的疫苗(I 型和 II 型 HA 滴度为 1 : 8)其免疫后的荧光抗体水平与常规配制的疫苗(I 型和 II 型 HA 滴度分别为 1 : 32 和 1 : 16)比较,仍具有较高的荧光效价,该辅剂刺激免疫应答作用明显。

[0058] 实施例 4

[0059] 本发明疫苗组合物与添加传统铝盐辅剂的疫苗组合物的免疫效果比较

[0060] 为进一步比较本发明疫苗组合物与添加传统铝盐辅剂的疫苗组合物的免疫效果,我们进行了另一组动物实验。I 型出血热原液(血凝效价 1 : 64)被分别配制为终浓度为 1 : 32、1 : 16 和 1 : 8 的各三组疫苗,分别添加实施例 1 制得的辅剂和传统铝盐辅剂,初免后第 7 天加强一针,初次免疫后 21 天采血测血凝抑制效价,结果如图 3 所示,表明本发明疫苗组合物的免疫效果优于添加传统铝盐佐剂的疫苗组合物。

[0061] 从上述实施例 3 和 4 中的免疫结果初步可以判定:本发明提供的疫苗组合物中的纳米乳疫苗辅剂不仅具有明显的增敏效果,而且和传统铝盐佐剂相比较,增敏效果有显著优势。

[0062] 综上所述,本发明首次研发出包括利用相转变温度法制备新型纳米乳疫苗辅剂的疫苗组合。该新型疫苗辅剂颗粒大小分布在 140nm 左右(与其它纳米辅剂相比具有更小的颗粒分布),颗粒分布更均匀,稳定性优良,免疫增效性优良;因此利用本疫苗辅剂制备的疫苗组合物具有免疫效果好,过敏性降低,稳定性好的特点。

[0063] 本发明虽然已以较佳实施例公开如上,但其并不是用来限定本发明。

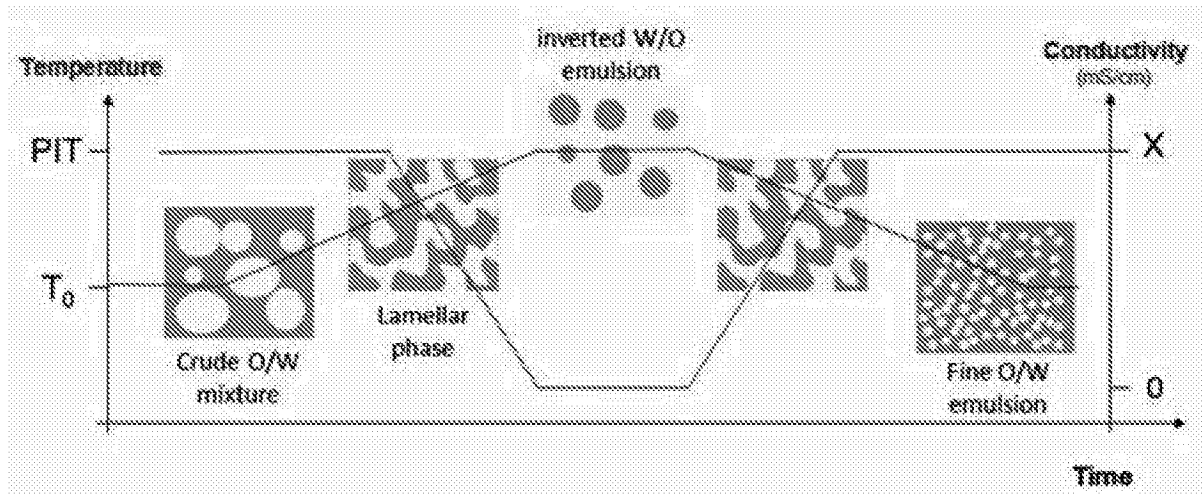


图 1

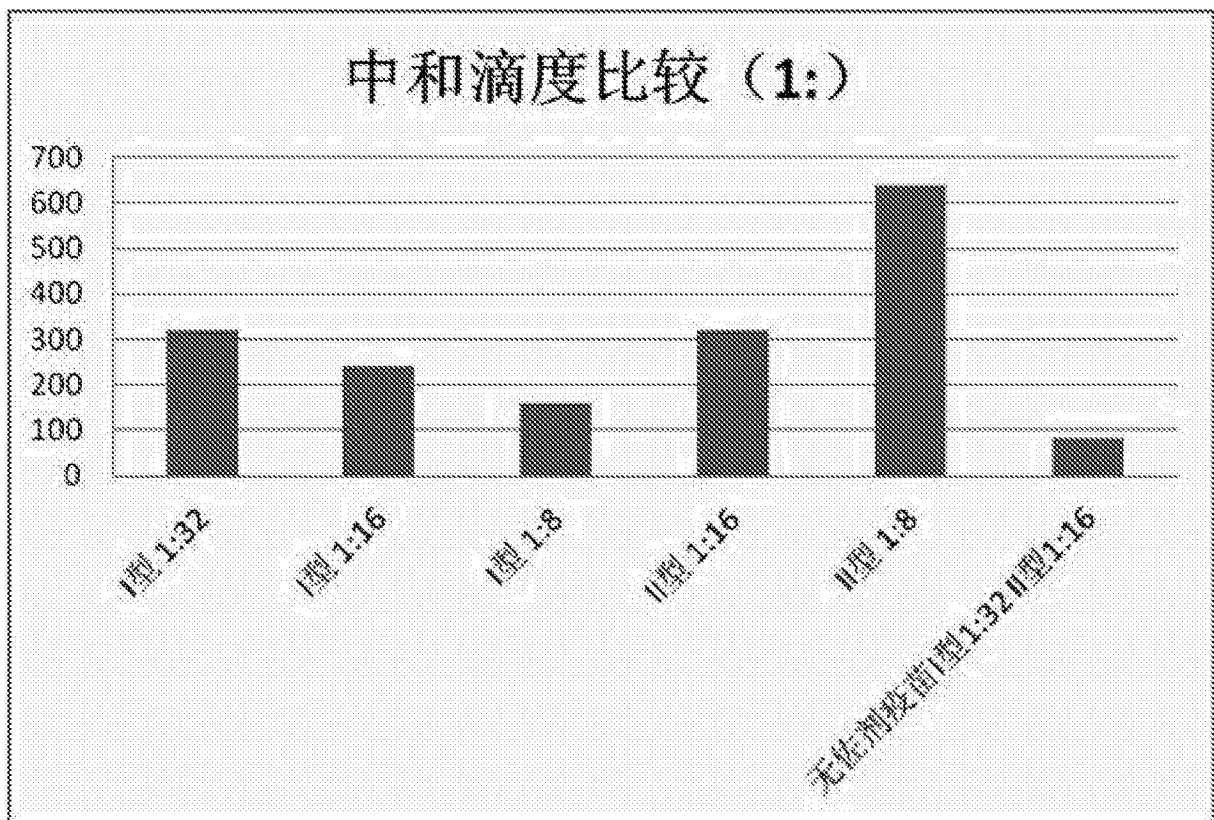


图 2

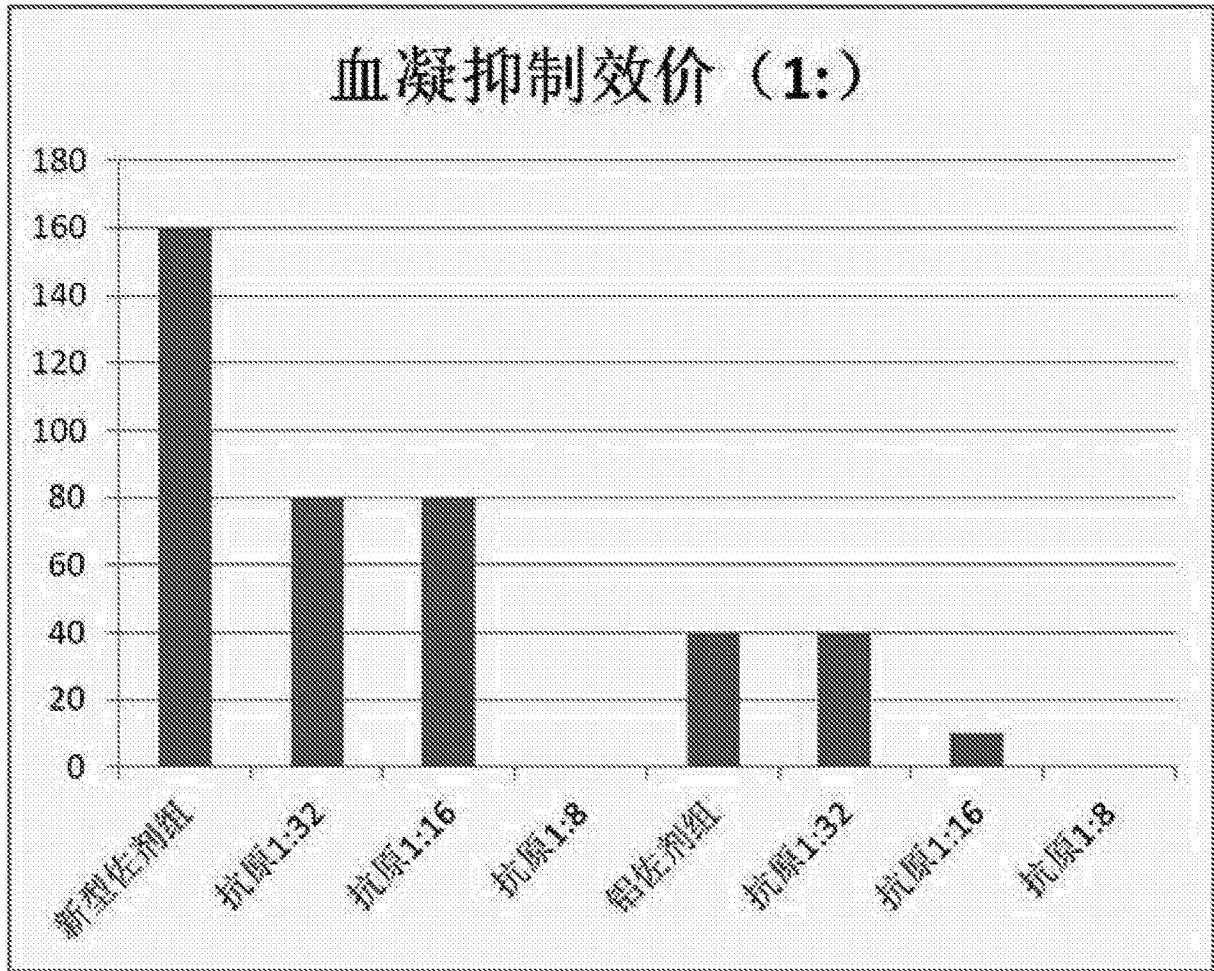


图 3