

为什么乳佐MF59粒径控制在160nm？

编辑:Jessie Date: 2023.2

均一性与稳定性控制

佐剂（Adjuvant）又称免疫调节剂或免疫增强剂（Immunopotentiator），是作为疫苗的一种添加剂，当它先于抗原或与抗原混合注入机体后，能够增强机体对抗原的免疫应答或者改变免疫反应的类型，属于非特异性的免疫增强剂，而其本身无抗原性。理想的佐剂不仅能够增强免疫反应，而且能使机体获得最佳的保护性免疫。乳佐的均一性和稳定性是非常重要的两个考察项，而与此直接相关的是粒度的控制¹。

最近发布在Nature的文章表明，对MF59而言，平均粒径在160nm（MF59）左右效果比较佳²，粒径过大及过小效果都欠佳。此外，小颗粒浓度（如<100nm）及大颗粒浓度（如>1.2μm）过高均影响最后的药效且带来副作用危害。因此，除对**平均粒径控制**外，“**过大**”，“**过小**”**颗粒浓度控制**也非常重要。值得注意的是，在实际应用中，产品**稳定性指标**是一个非常重要的考察项，用于快速筛选配方及优化工艺。

GSK研究团队着眼于**更好的理解物理特性如乳佐粒径和液滴组成对体内药效的影响**。进一步向液滴大小的影响问题发起挑战，即较大的乳状液液滴(160nm)比较小的乳状液液滴(20nm和90nm)更有效，并了解原因。评估了液滴大小是否足以导致不同的免疫结果，或者其他生物物理属性(例如。油:表面活性剂比)也有贡献。评估了相同成分但不同滴尺寸的配方，以及相同液滴尺寸但成分不同的配方的免疫效果。

样品制备

通过自乳化和微射流均质工艺制备不同尺寸粒径的佐剂疫苗，详情见表1

Formulation	Adjuvant Effect	Droplet Size (nm)	Composition (%v/v)		
			Squalene	Span85	Tween80
SEA20	+	20	1.49	0.49	3.48
MFA90	++	90	1.49	0.49	3.48
MFA160	+++	160	1.49	0.49	3.48
SEA160 (diluted)	++++	160	1.49	0.32	0.32
SEA160	++++	160	3.5	0.75	0.75
MF59	++++	160	4.3	0.5	0.5

表1 对照乳剂，用于比较液滴大小的影响(相同成分但不同液滴大小的配方)。

通过ELISA和HI滴度检测不同佐剂TIV抗原的体液反应

不同佐剂疫苗接种诱导的抗流感抗原抗体。三价灭活流感病毒抗原:H1N1 A/California/7/09, H3N2 A/Texas/50/2012和B/ Massachusetts/2/2012，每三周注射一次0.1 ug。动物被分为每组10只，分别给予PBS、无佐剂TIV和佐剂SEA20、MFA90、MFA160、SEA160、MF59、稀释SEA160和稀释MF59的TIV。用ELISA (A)分析2wp2的血清，分别检测每种抗原的IgG。单因素方差分析(One-way ANOVA)和Dunnett多重比较(multiple comparison)的事后分析(post hoc analysis)显示，滴度为160 nm的佐剂，尤其是SEA160、稀释后的SEA160和稀释后的MF59与MF59无统计学差异。Kruskall Wallis使用PBS进行的多重比较显示，160 nm佐剂组——SEA160、稀释SEA160、MF59和稀释MF59在统计学上高于PBS。(B)分别分析每种抗原的功能性血凝抑制(HI)滴度。采用Dunnett多重比较的单因素方差

分析和事后分析显示，对于滴度为160 nm的HIN1和B/Massachusetts佐剂，特别是SEA160，稀释后的SEA160和稀释后的MF59与MF59无统计学差异。Kruskall Wallis使用PBS进行的多重比较显示，对于HIN1和H3N2抗原，160 nm佐剂组- SEA160、稀释SEA160、MF59和稀释MF59在统计学上高于PBS。结果如图1所示。

乳剂液体尺寸的影响

对于一组不同的抗原和小鼠品系，乳剂的液滴尺寸越大，佐剂效价就越大，SEA20 <MFA90 <MFA160(原文Figure1)。

乳剂组合位置影响

对于一组不同的抗原和小鼠品系，乳剂的液滴尺寸越大，佐剂效价就越大，SEA20 <MFA90 <MFA160(原文Figure1)。

油含量和/或液滴数量影响

将SEA160和MF59稀释到与MFA160相同的角鲨烯含量。但这两种稀释配方的效价与未稀释的对照品相似，这表明单个液滴组成似乎对效价有影响，而不是含油量或液滴数量。

表面活性剂比例

SEA160和MF59的表面活性剂Span85和Tween80比例相同，而SEA20、MFA90或MFA160的表面活性剂比例不同(Tween80高;与无佐剂抗原相比，只有SEA160和MF59(稀释或未稀释)诱导的IgG滴度在统计学上更高(原文Figure1A)，而SEA160诱导的滴度与MF59无统计学差异。

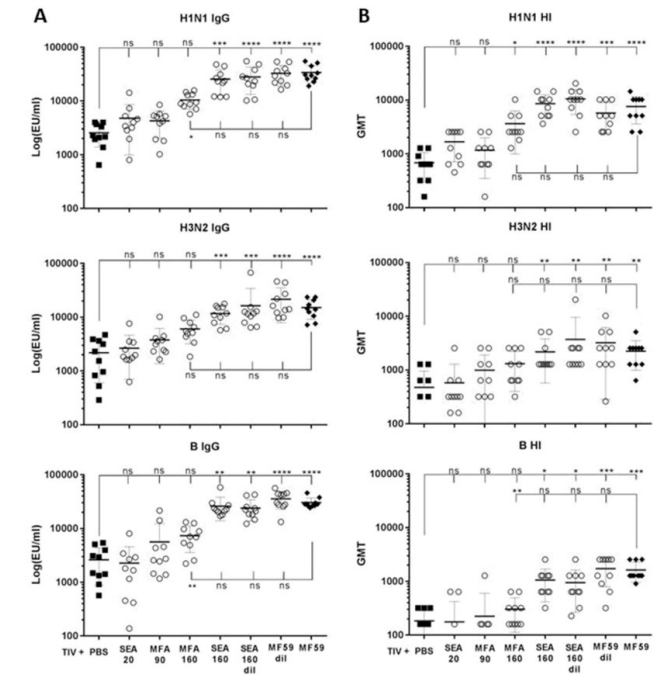


图1 过ELISA和HI滴度检测不同佐剂TIV抗原的体液反应结果

使用TIV抗原，评估了新型乳液佐剂的效价，并将其与已认证的基准产品MF59水包油角鲨烯乳液进行了比较。有趣的是，证实了乳状液液滴大小依赖于佐剂的影响，160 nm >90nm >20 nm。由此，建立一个合理的假设，即乳液佐剂的有效免疫激活可能是由液滴上表面活性剂的存在所介导的，除了液滴的大小之外，表面活性剂也可以在效力中发挥主要作用。佐剂主要通过激活先天免疫来增强免疫反应。

乳佐粒度控制和稳定性分析解决方案



乳佐的常规制备方法为：制备水相、油相，经过混合、剪切步骤形成初乳，初乳经微射流均质机均质，而后除菌过滤得到乳佐。初乳、均质后乳液、除菌过滤后乳液通过PSS的Nicomp粒度分析仪测试平均粒径、AccuSizer颗粒计数器测试过大颗粒浓度、Lum稳定性分析仪快速筛选乳佐配方稳定性。另通过Lumispoc检测过小颗粒浓度。

高压微射流均质机

PSI-20高压微射流均质机（小试兼中试型）采用固定结构的均质腔，通过电液传动的增压器使物料在高压作用下以极大的速度流经交互容腔的微管通道，物料流在此过程中受到**高剪切力、高碰撞力、空穴效应**等物理作用，使得平均粒径降低、体系均一稳定，由此获得理想的均质、分散或乳化结果。



Nicomp纳米激光粒度仪系列

Nicomp系列纳米激光粒度仪采用动态光散射原理检测分析样品的粒度分布，基于多普勒电泳光散射原理检测ZETA电位。



AccuSizer颗粒计数器系列

AccuSizer系列在检测液体中颗粒数量的同时精确检测颗粒的粒度及粒度分布，通过搭配不同传感器、进样器，适配不同的样本的测试需求，能快速而准确地测量颗粒粒径以及颗粒数量/浓度。



LumiSpoc单粒子颗粒计数器

LumiSpoc采用单粒子光散射技术（SPLS），通过在光学流通池中进行流体动力聚焦，将单个粒子排列成一条直线。通过调整流动条件来调整样品浓度，从而避免浓度峰值的影响。当单个纳米或者微米颗粒经过特殊光束截面的激光束时，记录其正向和侧向散射的光强。根据米氏理论，将分类强度转换为粒度分布密度。通过软件分析显示计数分布、颗粒浓度。在辉瑞撰写的疫苗佐剂章节中也推荐了lumispoc用于颗粒浓度的监测。



LUM稳定性分析仪

Lum稳定性分析仪可以直接测量整个样品的分散体的稳定性，检测和区分各种不稳定现象，如上浮、絮凝、聚集、聚结、沉降等，通过测量结果可用来开发新的配方和优化现有的配方及工艺。



上海奥法美嘉科技有限公司

上海市 闵行区 浦江镇 浦江高科技园F区
新骏环路 588 号 23 幢 402 室

Customer Service
Tel: 400-829-3090
Email: info@Alpharmaca.com



官方公众号



官方服务号

www.Alpharmaca.com