

# 《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》

## 团体标准编制说明

### （一）工作简况（包括任务来源、协作单位、主要工作过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等）

#### 1. 概述

随着我国养殖业的迅速发展，国内外畜禽贸易日益频繁，疾病传播机会增加，疫苗接种仍然是防控重大疫病的重要手段之一；免疫佐剂、增强剂具有提高机体免疫系统功能、增强机体抗病力、减少疾病发生等特点，逐渐引起了养殖界的关注和重视，成为近年来十分活跃的研究领域。目前我国在动物疫苗方面使用的佐剂主要集中在铝佐剂、油乳佐剂、蜂胶佐剂等，并取得了一定的成效，但仍与发达国家存在一定的差距，如不能很好的起到抗原仓库和载体效应，并引起一系列副作用。近些年我国每年有近 50% 的动物疫苗佐剂需要进口，所以亟需开发新型疫苗佐剂来替代传统疫苗佐剂和进口佐剂。

制定本标准的目的是为动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂建立质量控制标准，动物疫苗佐剂可通过改变抗原物理性状，延长抗原在机体内的存在时间和保持对免疫系统的持续激活作用，有利于抗原在体内缓慢释放，延缓抗原在体内降解，从而更有效地刺激免疫系统，使抗原易被巨噬细胞吞噬，刺激单核巨噬细胞系统，增强其对抗原的处理和呈递抗原的能力，促进淋巴细胞的增殖、分化，从而扩大和增强机体的免疫应答的效应等作用。壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂可提高黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫等多种免疫途径的免疫应答水平，并具有成本低、给药方便，避免交叉感染、毒性小，流动性好，对机体刺激性小等优点，因此尽早建立动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂质量控制标准对其开发应用到动物疫苗中具有重要意义。同时，建立动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂质量控制标准对保证动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂具有良好的高黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫等多种免疫途径的免疫应答水平和更低的副作用以及良好的质量保证具有重要意义。在过去几年中，全球兽医疫苗佐剂市场发展迅速，平均增长率为 26.2%。兽医疫苗佐剂广泛销售牲畜疫苗，伴侣动物疫苗。大部分兽医疫苗佐剂用于牲畜疫苗，消费比例约为 88.4%，欧洲是最大的消费地，消费市场份额接近 43.3%，继欧洲之后，北美是第二大消费地，消费市场份额为 26%，中国也是兽医疫苗佐剂的重要销售区域。国内各企业力图建立兽医疫苗佐剂开发生产，此时建立规范性的动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂质量控制标准对保证我国新型疫苗佐剂规范化开发生产是必要

的。目前动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的研究开发工作日益完善，但是标准化工作还没有相应的国家标准或行业标准，因此亟待建立动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂质量控制标准。

目前该产品已具有一定的生产规模，已完成动物免疫试验，为保证这一创新产品能够在养殖领域得到健康推广应用、有规可依，特申请制定该产品的团体标准。

## 2. 任务来源

《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》团体标准制订，是根据中国兽药学会文件下达的工作任务，由黑龙江凯正利华生物化工有限公司负责，与台州学院、哈药集团生物疫苗有限公司、哈尔滨国生生物科技股份有限公司等单位组成《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》团体标准起草组，共同完成标准制定任务。

## 3. 工作过程

为了更好地完成标准制订任务，并使标准适应市场需要。先期就《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》标准方案所涉及的范围、分类、质量要求的内容、标签、包装和储存等方面，进行了行业调研，并收集许多宝贵的意见和建议。

随后，起草组多次与行业专家进行沟通及吸纳我国佐剂生产企业和相关领域的专家学者的意见和建议，结合我国十三五期间动物绿色健康养殖的新要求，在借鉴现有《中国兽药典（2020年版）》、《兽药标签和说明书管理办法》和《兽药质量监督抽样规定》的有关规定和要求的基础上，形成了标准的《征求意见稿》初稿，在业内征询意见和建议，起草组采纳了合理的意见和建议，形成《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》送审材料。

## （二）国家标准编制原则和确定国家标准主要内容

### 1. 编制原则

本标准的编写规则是按照 GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写规则》的要求进行。

### 2. 主要内容

根据动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的原料及加工方法，对其进行了分类和定义等；对标准中质量要求项目参考了相关国家、行业标准；并对质量指标中相关项目和指标值作了调整。

动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂团体标准主要包括：

- (1) 封面
- (2) 前言
- (3) 本标准规定了动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的要求、试验方法、检验规则及产品的标签、包装、运输、贮存和保质期要求。

本标准适用于加工、销售、储存和使用的动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂。

## 2.1 关于术语和定义

本标准的术语和定义参照了《中国兽药典（2020年版）》三部“凡例”，以及其它的有关要求，确定了本标准所涉及到的术语和定义。

## 2.2 质量要求

本标准中第4章“要求”中“基本要求”和“技术指标要求”是根据产品性质设置的质量指标。

### 2.2.1 基本要求

生产和检定用设施、原材料及辅料、水、器具等应符合《中国兽药典（2020年版）》三部“凡例”的有关要求。

### 2.2.2 动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的基本组成和主要物理参数

动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的主要成分是壳聚糖及其衍生物，《中国兽药典（2020年版）》规定的质量标准。

### 2.2.3 纳米粒油乳佐剂的质量指标

动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂“质量指标”共设8个项目，包括：感官性状、剂型、Zeta电位和粒径分布测定、黏度测定、炽灼残渣测定、重金属含量、砷含量测定。该产品目前没有国家标准。

## 2.3 检验规则

检验规则包括抽样方法、判定规则、型式检验、出厂检验四项内容，对其都作了具体说明。

## 2.4 检验方法

检验方法是保证国家标准正确实施的重要手段，也是为监督部门提供的有力工具。本标准对所有指标的检验方法都作了明确规定。

## 2.5 标签和标识

本标准制订强调了标签的重要性，除应遵循《兽药标签和说明书管理办法》（2017年修订版）农业部令第22号的规定外，以维护消费者的知情权和选择权。

## 2.6 包装、储存、运输和销售

为了保证动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂的品质安全，要求“动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂在零售终端不得脱离原包装进行散装销售”，以防掺杂使假的现象发生。

## 3. 新旧标准的总体对比

动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂团体标准为首次制定。

### （三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

接种疫苗作为迄今为止较为成功的一种公共卫生干预措施，对有效预防传染病及其传播起到了重要的作用。要增强疫苗抗原在机体内的免疫应答能力，延长其存在时间，提高抗原的免疫效力，就必须同抗原一起或预先注射佐剂。佐剂可以作为免疫增强剂来增强抗原的免疫应答反应，也可以作为载体来递送抗原到相应的免疫细胞，降低抗原的降解，由此增强机体的免疫保护。在疫苗的研发应用中，佐剂是必不可少的。油乳佐剂可以使多种抗原产生高滴度抗体，被广泛应用于新城疫、禽流感等疫苗，是动物疫苗中应用最广泛的佐剂之一。乳状液在注射部位的贮库效应能延长抗原在体内的存留时间，缓慢释放抗原，从而持续刺激机体，提高抗原的免疫原性；同时，乳剂能够包裹抗原，保护其不被体液中的酶迅速分解，延长抗原刺激机体的时间；另外乳剂会在注射部位引起细胞浸润，促使抗原呈递细胞（APC）如巨噬细胞、淋巴细胞等聚集和增殖从而提高免疫应答水平；此外，油乳佐剂还可以刺激各种细胞因子如 IL-2、IL-6 等的分泌，促进抗体产生。乳剂的活性与其物理性质密切相关，包括乳状液类型、黏度、稳定性等。不同类型乳状液释放抗原的动力学行为各不相同：水包油型乳剂（o/w）最快，油包水型（w/o）较慢，水包油包水型（w/o/w）介于两者之间。黏度和稳定性的差异也会导致佐剂活性的不同。影响这两者的因素很多，包括表面活性剂的结构、浓度和亲水亲油平衡（HLB）值、油水相比、乳化工工艺等。

壳聚糖是天然阳离子多糖，其在体内可被机体消化吸收，具有生物可降解性、黏膜粘附性、生物相容性和低毒性等优良特性，并能够增强 APCs 摄取抗原；同时，壳聚糖作为递送载体能够保护抗原免受降解，并能在接种位点形成抗原库，延长抗原在体内的滞留时

间。壳聚糖做为疫苗佐剂及递送系统具有诸多优点，所以其在药物和疫苗递送系统领域应用前景广泛。但壳聚糖化学性质稳定，只能溶于稀酸，几乎不溶于水和有机溶剂，这使其既难以形成纳米粒子，也不利于在碱性肠道环境中吸收，极大程度地限制了其被广泛应用。由此可见，在制备壳聚糖纳米载药粒子设计中，如何对壳聚糖进行化学改性，提高其溶解性，是扩大其用途的必由之路。修饰壳聚糖的羟基或氨基能够合成不同的壳聚糖衍生物，对壳聚糖进行了铵盐化和羧甲基化修饰，合成水溶性和黏膜粘附性更好的壳聚糖季铵盐 N-2-羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖和 N, O-羧甲基壳聚糖等壳聚糖水溶性衍生物，可解决壳聚糖仅在酸性条件下具有水溶性的问题，同时采用壳聚糖或壳聚糖衍生物制备纳米粒，可进一步提高对疫苗的保护和缓释，有效提高巨噬细胞摄取，并通过增加同黏膜和细胞膜黏附作用提供疫苗的免疫效果。

壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂适用于油乳型疫苗，在该应用领域具有广阔的应用前景，对于开发我国疫苗佐剂产品，解决国外卡脖子问题至关重要，大量开发生产势在必行，该类产品的开发将带动兽用疫苗产业的技术进步及产品更新换代，对解决和推动疫苗持续缓慢释放和黏膜免疫等关键技术具有重要的意义。而目前我国及国外尚未有相关产品的标准，因此亟需建立该产品的团体标准。

组别	1组-纳米粒油乳佐剂 灭活疫苗组	2组-MONTANIDE™ ISA 78 VG	3组-VSP70 免疫增强 佐剂	4-不免疫对照组
免疫后（日）	抗体效价平均值 (log2)	抗体效价平均值 (log2)	抗体效价平均值 (log2)	抗体效价平均值 (log2)
0	0	0	0	0
7	7.8	6.8	2.2	0
14	10.8	10.4	2.4	0
21	11.0	9.6	2.8	0
28	11.0	10	3	0
35	11.8	9.8	6	0

从测试结果可以看出，相比其他试验组，纳米粒油乳佐剂灭活疫苗组具有更高的综合免疫值。

### 纳米粒油乳佐剂的毒性评价

#### (1) 体外细胞毒性评价

用 CCK-8 试剂盒检测纳米粒油乳佐剂对 PK 细胞的细胞毒性。具体操作如下：

1) 将 PK 细胞接种在 96 孔板中，每孔  $5 \times 10^4$  cells，培养板在 5%CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 过夜培养；

2) 向培养板中加入 10 $\mu$ L 不同浓度 (0、31.25、62.5、125、250、500、1000 $\mu$ g/mL) 纳米粒油乳佐剂, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 24h;

3) 向培养板中每孔加入 10 $\mu$ L CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 1h;

4) 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度, 用公式 (2-8) 计算细胞活力 (%)。

$$\text{细胞活力 (\%)} = \frac{[A_s - A_b]}{[A_c - A_b]} \times 100\%$$

式中: A<sub>s</sub> 为具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度; A<sub>b</sub> 为具有培养液和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度; A<sub>c</sub> 为具有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度。

不同浓度纳米粒油乳佐剂对 PK-15 细胞的细胞毒性结果见图 2。当纳米粒油乳佐剂浓度为 31.25、62.5、125 和 250 $\mu$ g/mL 时, 细胞存活率均达到 90% 以上, 与对照组相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 且当纳米粒油乳佐剂浓度为 31.25 和 62.5 $\mu$ g/mL 时, PK-15 细胞存活率均超过对照组, 说明纳米粒油乳佐剂在适宜的浓度范围内能够促进 PK-15 细胞生长。但是, 当纳米粒油乳佐剂浓度达到 500 $\mu$ g/mL 时, 与对照组相比相比, 细胞存活率差异显著 ( $p < 0.05$ ), 此时 PK-15 细胞存活率仍为 (86.48 $\pm$ 3.41)%, 毒性较低; 当纳米粒油乳佐剂浓度达到 1000 $\mu$ g/mL 时, 与对照组相比相比, 细胞存活率差异极显著 ( $p < 0.01$ ), 但此时细胞存活率为 (82.02 $\pm$ 4.13)%, 毒性仍较低。上述结果表明, 纳米粒油乳佐剂对 PK-15 细胞存活率影响较小, 生物安全性较好。

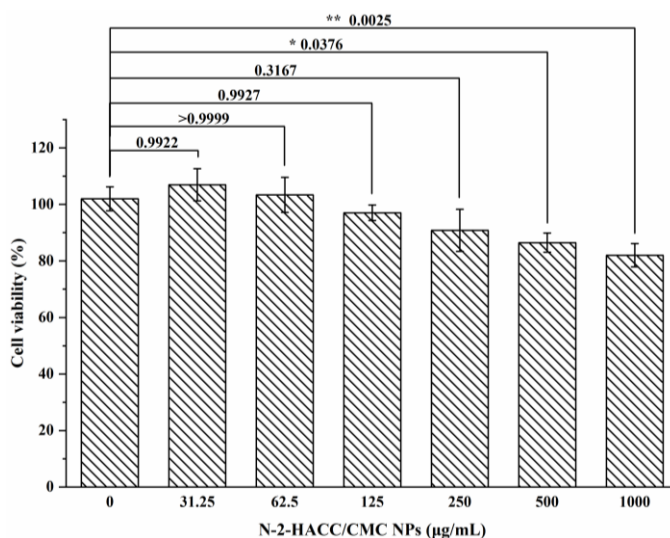


图 1 纳米粒油乳佐剂对 PK-15 细胞存活率的影响. \*代表  $p < 0.05$ , \*\*代表  $p < 0.01$ .

表 2 纳米粒油乳佐剂处理 PK 细胞 24h 后的细胞存活率

样品浓度 ( $\mu$ g/mL)	细胞存活率 (%)
	N-2-HACC/CMC NPs
0	102.00 $\pm$ 4.21

31.25	106.97±5.68
62.5	103.36±6.2
125	97.07±2.77
250	90.83±7.44
500	86.48±3.41*
1000	82.02±4.13**

注：\* $p < 0.05$  为显著；\*\* $p < 0.01$  为高度显著。

## (2) 动物体内毒性评价

### 1) 急性毒性试验

将 5 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 84 只（雌雄各半）随机分为 7 组，每组 12 只，每组雌雄各半。N-2-HACC/CMC NPs 设置 6 个剂量 5、15、30、55、110 和 280mg/kg，对照组为 0.9% NaCl 注射液。小鼠股部肌肉单次注射给药，0.1mL/只，连续观察 14d，观察指标包括摄食量、饮水、死亡等情况。

分别在给药前 0d、给药后第 1d、7d 和 14d 测量动物体重。同时，在试验过程中，及对死亡动物进行剖检，未死亡动物在观察期结束后处死并剖检。详细记录脏器的颜色、质地、体积、质量等变化，并进行组织病理学检查。不同剂量组动物的体重数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间进行成组“ $t$ ”检验。毒性效果评价以最大耐受剂量 (Maximum tolerated dose, MTD) 来表示，如未见动物死亡，则 MTD 大于等于该给药剂量。

急性毒性试验通过观察单次给药后动物所产生的急性中毒反应和死亡情况，可预测临床使用该制剂或药物时的不良反应。纳米粒油乳佐剂经肌肉注射后，即使在最大给药浓度下 (280mg/kg)，雌雄小鼠被毛光滑，摄食、饮水、运动、反射、排便和排尿等都正常。

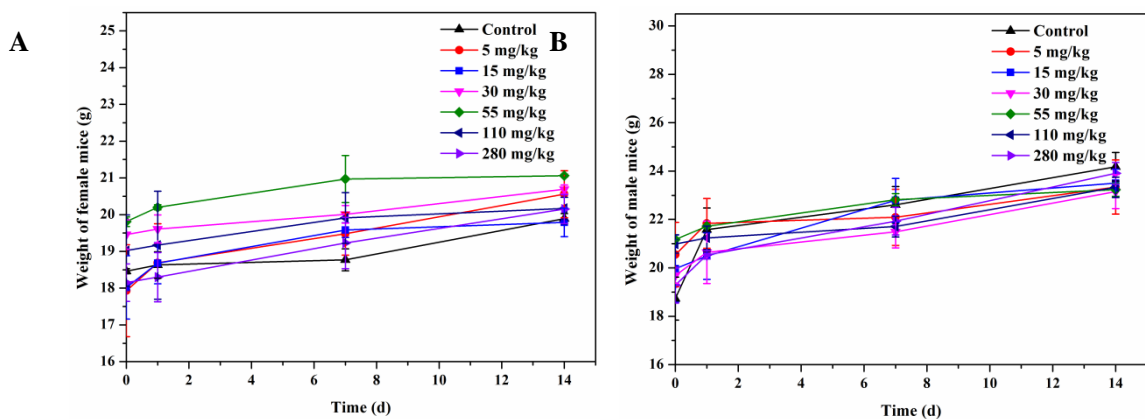


图 2 急性毒性试验小鼠体重变化. A: 雄性小鼠; B: 雌性小鼠.

从图 2 可以看出，在 0-14d 内，各组雌雄小鼠的体重均增长，未出现减轻的现象，也

未出现死亡。因此，在当前给药剂量下，纳米粒油乳佐剂未出现急性毒性作用，且纳米粒油乳佐剂的 MTD  $\geq 280\text{mg/kg}$ 。

试验结束后，解剖小鼠，从图 3 可以看出，各剂量组雄性小鼠和雌性小鼠的组织器官的颜色和质地与对照组一致，未观察到有明显的病理变化。

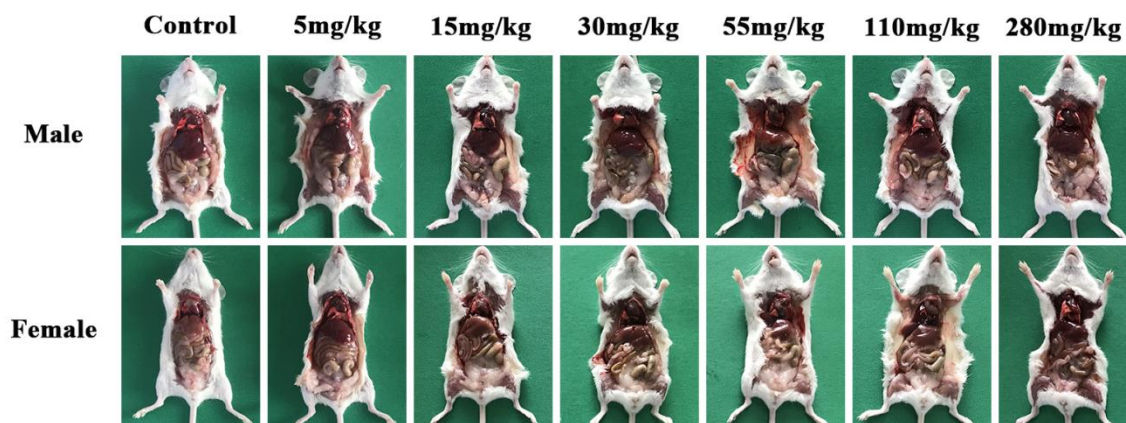


图 3 急性毒性试验小鼠解剖图

## 2) 重复毒性试验

疫苗通常需要多次注射才能达到有效的保护和治疗效果。为了更全面的反应和预测纳米粒油乳佐剂的重复毒性，将 5 周龄 SD 大鼠 36 只（雌雄各半）随机分为 3 组，每组 12 只，每组雌雄各半。纳米粒油乳佐剂设置中剂量（ $55\text{mg/kg}$ ）和高剂量（ $280\text{mg/kg}$ ）两个处理组，对照组为 0.9% NaCl 注射液。分别在第 1d 和第 22d 对大鼠股部肌肉重复注射给药， $0.5\text{mL/只/次}$ ，连续观察 42d，观察大鼠死亡、精神状态、食欲、饮水、生长状况、体重、摄食量等情况。

由图 4 可知，在 0d 到 43d 内，各剂量组雌雄 SD 大鼠体重均呈上升趋势，生长状况均良好。

纳米粒油乳佐剂注射给药剂量  $55\text{mg/kg}$  和  $280\text{mg/kg}$  雌雄 SD 大鼠的总增重、总食物摄取和食物利用率（表 3）与对照组相比均无明显差异（ $p > 0.05$ ）。



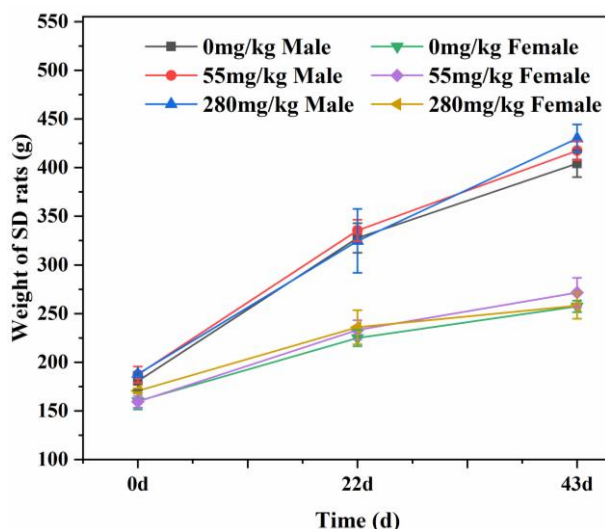


图 4 重复毒性试验 SD 大鼠体重变化

表 3 重复毒性试验中 SD 大鼠总增重及摄食情况 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

性别	给药剂量 (mg/kg)	总增重 (g)	总食物摄取 (g)	食物利用率 (%)
雄	0	223.44±7.13	3931.08	5.7
	55	230.03±5.84	4014.73	5.7
	280	242.04±11.99	3853.41	6.3
雌	0	98.05±6.89	2926.43	3.3
	55	112.04±10.04	2978.79	3.8
	280	87.55±11.69	3039.40	2.9

本试验制备的动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂冷冻干燥后呈乳白色，疏松海绵状。经 20℃、4℃和-20℃放置 3 周末有明显变化，37℃放置 3 周时稍有萎缩。试验结果表明了本试验制备的动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂具有较好的贮藏稳定性。

研究制定《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》团体标准符合我国“十三五”期间绿色健康养殖的发展趋势，开展新型疫苗佐剂研发与产业化，不仅可减少对进口佐剂的依赖，而且对于促进我国养殖业的健康发展具有重要意义。

#### (四) 采用国际标准和国外先进标准的程度

目前，未查询到可参考的国际标准和国外先进标准。

#### (五) 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准的制订，符合《中国兽药典（2020年版）》三部“凡例”等有关要求。

## **（六）重大分歧意见的处理经过和依据**

在《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》团体标准制定过程中和征求意见中未收到重大分歧意见。

## **（七）贯彻团体标准的要求和措施建议**

1. 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，推广国产产品，替代进口。
2. 本次制订，不仅与动物疫苗佐剂生产企业有关，而且与疫苗生产企业和广大养殖企业和养殖户有关。
3. 实施的过渡期宜定为6个月。

《动物疫苗壳聚糖及其衍生物纳米粒油乳佐剂》团体标准起草组

2021年8月20日