公告本

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號： 95113705

※ 申請日期： 95.4.17 ※IPC 分類：A61K 39/00, 39/12 (2006.1)

一、發明名稱：（中文/英文）

新穎疫苗調配劑

NOVEL VACCINE FORMULATIONS

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

美商龍馬躍公司

MERIAL LIMITED

代表人：（中文）

豪拉斯 D 納利

NALLE, HORACE D.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國喬治亞州都拉斯市賽圖利特大道3239號

3239 SATELLITE BLVD. DULUTH, GEORGIA 30096, U.S.A.

國 籍：（中文/英文）

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓　名：(中文/英文)

1. 雅利克斯　蓋　安得烈　巴力梭特
   PARISOT, ALEXIS GUY ANDRE
2. 史蒂芬妮　瑪莉-凱瑟琳　笛思古林司-布雷奇特
   DESGOUILLES-BLECHET, STEPHANIE MARIE-CATHERINE
3. 凱瑟琳　恰瑞依瑞
   CHARREYRE, CATHERINE
4. 克勞笛　珍　瑪莉　羅列特
   ROULET, CLAUDE JEAN MARIE

國　籍：(中文/英文)

1. 法國 FRANCE
2. 法國 FRANCE
3. 法國 FRANCE
4. 法國 FRANCE

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2005年04月15日；11/107,000

2. 專利合作條約；2006年04月13日；PCT/US06/13936

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於水中油滴型乳液，其作為佐劑之用途，及包含其之醫藥上、免疫學上、或疫苗組合物。

【先前技術】

疫苗中佐劑之用途為已熟知。佐劑為當與疫苗免疫原合併時可增加對疫苗免疫原的免疫反應之化合物。在促進蛋白質的免疫抗原性(Immunogenicity)之策略之中，醣蛋白或胜肽為可乳化疫苗免疫原者(Nossal, 1999於：Fundamental Immunology. Paul(編著)，Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; **Vogel及Powell,** 1995，於：Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach. **Powell及Newman**(編著)，Plenum Press, NY, N.Y.第141頁)。因為佐劑在改善疫苗抗原的免疫抗原性上扮演重要的角色，在疫苗調配中佐劑之使用事實上已甚為普遍(**Nossal**, 1999，同前；**Vogel及Powell**, 1995，同前；將其教導以引用的方式併於本文中)。技藝中已熟知的習見佐劑本質上有許多變化。例如，其可由不溶於水的無機鹽、微脂粒、微胞(micelles)或乳液組成，即佛氏佐劑(Freund's adjuvant)。其他佐劑可見於上文所提之**Vogel及Powell**, 1995。雖然佐劑作用沒有單一機制，基本的特徵為：相較於僅由疫苗抗原單獨引發的反應，其能夠顯著地增加對疫苗抗原的免疫反應(**Nossal**, 1999，同前；**Vogel及Powell**, 1995，同前)。就這一點而言，一些佐劑在增加體液免疫

反應更有效；其他佐劑在增加經細胞調節的免疫反應更有效(**Vogel及Powell**, 1995，同前)；而再另一類佐劑能同時增加對疫苗抗原之體液及經細胞調節的免疫反應(**Vogel及Powell**, 1995，同前)。

一般而言，用於疫苗調配劑中的乳液包含油、水溶液及界面活性劑之混合物。一些乳液加入親油性界面活性劑如Span 80®及親水性界面活性劑如Tween 80®。此等乳液也可含有已知具有離子界面活性劑性質之化合物如卵磷脂或皂素(Saponin)。

然而，作為疫苗佐劑之乳液已觀察到有安定性的問題，特別是在儲存或運送期間。在免疫原溶液或懸浮液中存在的解脂酵素(lipase)或酯酶(esterase)酵素活性會水解乳液的界面活性劑及會導致佐劑缺乏安定性。解脂酵素或酯酶可能來自例如用來生長病毒的細胞培養或來自細菌。當此等組合物含有濃縮的免疫原時，特別是未經純化的濃縮免疫原時特別是如此。典型而言，用於去活化(殺死的)疫苗之佐劑即屬此種情況。此問題於多價疫苗組合物更加顯著，因為免疫原在相同稀釋體積中更為濃縮。

使用佐劑的另一個問題係關於副作用危險，例如在注射位置的毒性或局部發炎。例如，注射後可能造成局部發炎反應及/或肉芽腫。為了限制此類不良反應，可將乳液中界面活性劑或其他成分減少；然而，減少後可能即造成疫苗組合物穩定性的降低。所以，有需要具有較高安全性及安定性之一種新穎佐劑及含有此佐劑之疫苗組合物。

就本申請案中引用或標示之任何文獻而言，並非認可此文獻對本發明構成先前技藝。

【發明內容】

於第一個具體實施例中，本發明提供一種新穎水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其在細菌、寄生蟲或病毒懸浮液存在下具有增加的安定性，特別是該等濃縮及未經純化或稍做純化者。

本發明的另一個具體實施例提供一種穩定、且易於投藥的(特別是可注射的)O/W乳液，其作用為用以傳遞包含至少一種活性成分(更明確地說，可為免疫原)之醫藥組合物的媒介。

本發明的再另一個具體實施例提供一種穩定、安全及可注射的O/W乳液，其作用為增加由免疫原引發的免疫反應之佐劑。特別是，本發明提供一種新穎的佐劑，當用於含有免疫原的疫苗組合物中，可增加注射疫苗對免疫原的細胞免疫反應、體液免疫反應或更佳的是兩者同時。

本發明的再另一個具體實施例提供一種穩定、安全及免疫抗原性組合物或疫苗，其包含O/W乳液。

本發明的再另一個具體實施例提供利用本發明的佐劑製造疫苗的方法；如此得到的疫苗；及使用其的方法。

本發明的再另一個具體實施例提供一個組件，其包含免疫原或其他醫藥產品於第一個小瓶中，而根據本發明製造的佐劑於第二個小瓶中，其中將佐劑設計為使用前與免疫原或其他疫苗產品混合。

於一個具體實施例中，本發明提供一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其可包含：

(1) 含有免疫原的水溶液；

(2) 礦油；

(3) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(4) 由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物或其任何組合組成的族群選出之非離子親水性界面活性劑。

於另一個具體實施例中，本發明提供一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其可包含：

(1)含有免疫原之水溶液；

(2)由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物或其任何組合組成的族群選出之非離子親油性界面活性劑；

(3)礦油；

(4)非離子親水性乙氧基化脂肪醇。

根據本發明製作的乳液係基於至少兩種界面活性劑之組合，其由兩組不同界面活性劑族群(親油性及親水性界面活性劑)之成員中選出，且可使用屬於各族群之一或多種界面活性劑。

於再另一個較佳具體實施例中，本發明提供一種疫苗組合物，其包含一種新穎乳液，其可含有至少一種適於在注射疫苗中引發免疫抗原性反應的免疫原。本發明更提供此組合物，其中乳液作用為佐劑以增加由免疫原引發的免疫

反應，特別是增加細胞反應、體液反應或較佳的是兩者。

於較佳的具體實施例中，抗原或免疫原為或衍生自黴漿菌(Mycoplasma)，較佳的是豬肺炎黴漿菌(Mycoplasma hyopneumoniae)、豬環狀病毒(porcine circovirus)，較佳的是豬環狀病毒2或螺桿菌(Helicobacter)，較佳的是Helicobacter cerdo或幽門螺旋桿菌(Helicobacter pylori)。

於另一個較佳具體實施例中，本發明提供製造疫苗組合物之方法，其中將免疫原(特別是以凍乾形式或水溶液的免疫原)與根據本發明的佐劑混合。免疫原可由下列組成的族群選出：去活化的病原體、減弱的病原體、次單元抗原、包括質體之重組表現載體等。病原體可為細菌、病毒、寄生蟲或黴菌起源或免疫原可為一種類毒素。

於另一個較佳具體實施例中，本發明提供在對抗病原體之注射疫苗中引發免疫反應的方法，其包含給予注射疫苗本發明的疫苗組合物。

於另一個較佳具體實施例中，本發明提供包含有至少兩個小瓶之組件，於第一個小瓶中有免疫原(特別是以凍乾形式或於水性介質中的溶液中之免疫原)，而第二個小瓶有根據本發明的佐劑或乳液。

應注意於本揭示中，特別是於專利申請範圍中，用詞如「包含」等具有如美國專利法中此用詞的意義，如其可意指「包括」等；及用詞如「主要由…組成」具有美國專利法中此用詞的意義，如其允許未明白詳述的元件，但不包括見於先前技藝的元件或影響發明的基本或新穎特性的元

件。

將此等及其他具體實施例揭示或由下列詳細說明明顯可見或包含。

【實施方式】

為了方便，將專利說明書、實例、及隨附的專利申請範圍中使用的某些用詞收集於此。

如本文中使用，用詞「動物」包括包含人類之所有脊椎動物。其也包括在所有發育階段的個別動物，包括胚胎階段。特別是，用詞「脊椎動物」包括(但不限於)人類、犬類(如狗)、貓科(如貓)；馬科(如馬)、牛科(如牛)、豬科(如豬)，以及鳥類。如本文中使用的用詞「鳥類」意指分類學鳥綱之任何種或亞種，如(但不限於)雞(種雞、肉雞及蛋雞)、火雞、鴨、鵝、鵪鶉、雉雞、鸚鵡、雀類、鷹、烏鴉及包括鴕鳥、鴯苗鳥(Emu)及食火雞之走禽類。

如本文中使用，用詞「豬」或「小豬」意指豬科來源的動物，而「雌豬」意指有生殖力的年齡及能力之雌性。

如本文中使用，用詞「毒性」意指保持傳染動物宿主之能力的分離株。

如本文中使用，用詞「去活化的疫苗」意指含有不能夠再複製或生長之傳染性生物體或病原體的疫苗組合物。病原體可為細菌、病毒、原生蟲、寄生蟲或黴菌起源。藉由許多方法包括高壓、化學處理(例如用硫柳汞(thimerosal)或福馬林處理)、超音波震盪(sonication)、輻射、加熱或任何足以避免生物體的複製或生長同時保持其免疫抗原性

之其他習見方式，可達到去活化。

如本文中使用，用詞「免疫抗原性」意指能夠於宿主動物中對於抗原產生免疫反應。此免疫反應形成由疫苗引發對抗特定傳染性生物體的保護免疫力之基礎。

如本文中使用，用詞「免疫反應」意指於動物中引發的反應。免疫反應可意指細胞免疫力(CMI, cellular immunity)；體液免疫力或可包含兩者。本發明也考慮限於免疫系統一部份的反應。例如，本發明的疫苗組合物可明確地引發增加的γ干擾素反應。

如本文中使用，用詞「抗原」或「免疫原」意指在宿主動物中引發特定免疫反應的物質。抗原可包含完整生物體(殺死的、減弱的或活的)；生物體的次單元或部分；含有具有免疫抗原性質插入體之重組載體；在呈現於宿主動物時能夠引發免疫反應之一段DNA或其片段；蛋白質、醣蛋白、脂蛋白、多胜肽、胜肽、抗原決定位、半抗原(hapten)、或其任何組合。或者，免疫原或抗原可包含毒素或抗毒素。

如本文中使用，用詞「多價」意指含有超過一個抗原之疫苗，無論來自相同種類(即豬肺炎黴漿菌的不同分離株)、來自不同種類(即來自溶血性巴斯德桿菌(Pasteurella hemolytica)及敗血性巴斯德桿菌(Pasteurella multocida)兩者之分離株)，或含有來自不同屬的抗原組合之疫苗(例如含有來自敗血性巴氏桿菌、沙門氏菌、大腸桿菌、昏睡嗜血桿菌(Haemophilus somnus)及梭狀芽孢桿菌(Clostridium)

抗原之疫苗)。

如本文中使用，用詞「佐劑」意指添加至疫苗以增加疫苗的免疫抗原性之物質。佐劑如何運作的機制尚未完全了解。吾人認為一些佐劑藉由減慢抗原釋放而增強免疫反應，而其他佐劑藉由下列任一機制可調控其作用：增加細胞滲透、發炎、及至注射位置的運輸，特別是對於抗原呈現細胞(APC, antigen presenting cell)；藉由向上調節共同刺激訊號(costimulatory signal)或主要組織相容複體(MHC, major histocompatibility complex)表現而促進APCs的活化狀態；增加抗原呈現；或引發細胞激素為間接作用釋放。對一特定疫苗免疫原的最適當佐劑主要將視保護免疫力所需的免疫反應類型而定。佐劑之選擇可能有點靠經驗。已知的疫苗佐劑包括(但不限於)油及水乳液(例如，完全佛氏佐劑及不完全佛氏佐劑)，特別是水中油滴型乳液、油中水滴型乳液、水中油滴中水滴型乳液。其也包括例如皂素、氫氧化鋁、硫酸葡聚糖(dextran sulfate)、高分子膠(Carbomer)、藻酸鈉、「AVRIDINE」(N,N-二十八烷基-N',N'-雙(2-羥乙基)-丙二胺)、石蠟油、胞壁醯二肽(MDP, Muramyl dipeptide)、陽離子基脂質(如DMRIE、DOPE及其組合)等。

如本文中使用，用詞「醫藥上可接受的載體」及「醫藥上可接受的媒介」為可交換的，意指用以含有疫苗免疫原的流體媒介，可將其注射入宿主而無顯著副作用。技藝中已知的適當醫藥上可接受的載體包括(但不限於)無菌水、

鹽水、葡萄糖、或緩衝溶液。載體可包括輔助劑，包括(但不限於)稀釋劑、安定劑(即糖及胺基酸)、防腐劑、濕潤劑、乳化劑、pH緩衝劑、增黏添加劑、顏料等。醫藥上或獸醫上可接受的載體或媒介或賦形劑對熟悉本技藝者為已熟知。例如，醫藥上或獸醫上可接受的載體或媒介或賦形劑可為0.9% NaCl(如鹽)溶液或磷酸緩衝液。劑量及劑量體積於本文中一般說明中討論且可由熟悉本技藝者自本揭示中所讀及與技藝中的知識一起而決定，而無需任何額外實驗。

如本文中使用，用詞「疫苗組合物」包括至少一種抗原或免疫原於醫藥上可接受的媒介中，其有用於引發宿主的免疫反應。可將疫苗組合物以劑量及藉由熟悉醫藥及獸醫技藝者已熟知的技術給予，考慮因素如年齡、性別、體重、種族及接受動物的狀況，及給予途徑。給予的途徑可為經皮、經由黏膜給予(如口、鼻、肛門、陰道)或經由非經腸胃的途徑(皮膚內、肌肉內、皮下)。對於非經腸胃給予產品至宿主，可使用具有針頭的針筒或無針頭注射器。可將疫苗組合物單獨給予，或可與其他治療或療法一起給予或相繼給予。給予之形式可包括非經腸胃的、皮下、皮膚內或肌肉內給予(如可注射的給予)用的懸浮液或配製品如無菌懸浮液或乳液。可將疫苗組合物呈噴霧給予或混合於食物及/或水中或與適當載體、稀釋劑或賦形劑如無菌水、生理食鹽水、葡萄糖等混合傳遞。組合物可含有輔助物質如濕潤或乳化劑、pH緩衝劑、佐劑、膠化或增黏添加

劑、防腐劑、調味劑、顏料等，視給予的途徑及所需的配製品而定。可查閱標準醫藥課本，如「Remington's Pharmaceutical Sciences」1990來製備適當的配製品而不需額外的實驗。

本發明於一個具體實施例中提供一種新穎的水中油滴型(O/W, oil in water)佐劑或乳液，其可包含：

(1) 含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3) 礦油；

(4) 由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物或其任何組合組成的族群選出之非離子親水性界面活性劑。

本發明於另一個具體實施例中提供一種新穎的水中油滴型(O/W, oil in water)佐劑或乳液，其可包含：

(1)含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2)由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物或其任何組合組成的族群選出之非離子親油性界面活性劑；

(3)礦油；

(4)非離子親水性乙氧基化脂肪醇。

根據本發明製作的乳液係基於至少兩種界面活性劑之組合，其由兩組不同界面活性劑族群(親油性及親水性界面

活性劑)之成員中選出，且可使用屬於各族群之一或多種界面活性劑。

親油性乙氧基化脂肪醇可為一種乙氧基化脂肪醇，其可包含分子量的43重量%或以下之環氧乙烷(EO, Ethylene oxide)。親油性聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物(POE-POP烯嵌段共聚物)為一種共聚物，其可包含約35重量%或以下之環氧乙烷。

親水性乙氧基化脂肪醇可為一種乙氧基化脂肪醇，其包含分子量的43重量%或以上之環氧乙烷(EO, Ethylene oxide)。親水性POE-POP烯嵌段共聚物為一種共聚物，其包含約55重量%或以上之環氧乙烷。

對於非離子親水性界面活性劑，脂肪醇可為C9至C22脂肪醇及較佳的是由油醇、鯨蠟醇、硬脂醇、異硬脂醇、月桂醇，及其組合組成的族群選出，較佳的是油醇及更佳的是具有5至21個EO的油醇。POE-POP嵌段共聚物具有分子量約3000至約16000。

非離子親水性界面活性劑之族群包括(但不限於)乙氧基化脂肪醇：Brij®76 [硬脂醇醚-10]、Brij®56[鯨蠟醇醚-10]、Brij®96/97[油醇醚-10]、Brij®98[油醇醚-20]、Brij®721[硬脂醇醚-21]、Brij®58[鯨蠟醇醚-20]、Brij®35[月桂醇醚-23]、Brij®78[硬脂醇醚-20](Uniqema)、Volpo®N5[油醇醚-5]、Volpo®CS6[鯨蠟硬脂醇醚-6]、Volpo®CS12[鯨蠟硬脂醇醚-12]、Volpo®CS20[鯨蠟硬脂醇醚-20]、Volpo®CS25[鯨蠟硬脂醇

醚-25]、Volpo®CS23[鯨蠟硬脂醇醚-23](Croda)、BL9-EX[月桂醇醚-9]、BC-7[鯨蠟醇醚-7]、BT-5[C12-14棕櫚油醚-5]、BT-7[C12-14棕櫚油醚-7]、BT-9[C12-14棕櫚油醚-9]、BT-12[C12-14棕櫚油醚-12]、BD-10[C12-15棕櫚油醚-10]、BO-7V[油醇醚-7]、BC5.5[鯨蠟醇醚-6]、BL-21[月桂醇醚-21]、BL-25[月桂醇醚-25]、BC-15TX[鯨蠟醇醚-15]、BC-23[鯨蠟醇醚-23]、BC-25TX[鯨蠟醇醚-25]、BO-15V[油醇醚-15]、BO-50V[油醇醚-50]、BB-20[二十二醇醚-20](Nikko Chemicals)、及其組合、POE-POP嵌段共聚物：Lutrol®F127[Poloxamer 407]、Lutrol®F68[Poloxamer 188]、Lutrol®F108[Poloxamer 338]、Lutrol®F98[Poloxamer 278]、Lutrol®F87[Poloxamer 227]、Lutrol®F88[Poloxamer 228]、Lutrol®F77[Poloxamer 207]、Lutrol®F38[Poloxamer 108](BASF)、Tetronics®T1307、Tetronics®1107、Tetronics®908(BASF)、及其組合。

對於非離子親油性界面活性劑，脂肪醇為C9至C22脂肪醇及較佳的是由油醇、鯨蠟醇、硬脂醇、異硬脂醇、月桂醇，及其組合組成的族群選出，較佳的是油醇及更佳的是具有1至4個EO的乙氧基化油醇。POE-POP嵌段共聚物具有分子量約1000至約8000。

非離子親油性界面活性劑之族群包括(但不限於)乙氧基化脂肪醇：Brij®30[月桂醇醚-4]、Brij®92/93[油醇醚-2]、Brij®72[硬脂醇醚-2]、Brij®52[鯨蠟醇醚-2](Uniqema)、Volpo®L3[C12-13棕櫚油醚-3]、Volpo®N3[油

醇醚-3]、Volpo®L4[C12-13棕櫚油醚-4](Croda)、BS-4[硬脂醇醚-4]、BD-2[C12-15棕櫚油醚-2]、BD-4[C12-15棕櫚油醚-4]、BT-3[C12-14棕櫚油醚-3](Nikko Chemicals)及其組合、POE-POP嵌段共聚物：Pluronic®L121[Poloxamer 401]、Pluronic®L101[Poloxamer 331]、Pluronic®L81[Poloxamer 221]、Pluronic®L62[Poloxamer 182]、Pluronic®L43[Poloxamer 123]、Pluronic®L103[Poloxamer 333]、Pluronic®L123[Poloxamer 403]、Lutrol®L63[Poloxamer 183]、Lutrol®L122[Poloxamer 402]、Lutrol®L92[Poloxamer 272]、Lutrol®L72[Poloxamer 202]、Lutrol®L42[Poloxamer 122]、Lutrol®L61[Poloxamer 181](BASF)、Tetronics®T1301、Tetronics®701、Tetronics®901(BASF)、及其組合。

本發明之界面活性劑可具有來自動物或植物來源之脂肪醇。僅於乳液的調配劑中做少許調整可將一個來源變更成另一個來源。

根據本發明之乳液可具有界面活性劑之整體濃度為約0.2%至約6.5%(重量/乳液體積)，特別是約1%至約6%，較佳的是約1.5%至約5%，更佳的是約2%至約3%。

一些乳液具有低黏度及為可被輕易注射。

於一個較佳具體實施例中，本發明提供水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其可包含：

(1) 含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3) 礦油；

(4) 非離子親水性乙氧基化脂肪醇，其包含多於約43%及少於約71%(w/w)之環氧乙烷；

(5) 非離子親水性乙氧基化脂肪醇，其包含約71%或以上(w/w)之環氧乙烷。

包含有多於約43%及少於約71%(w/w)環氧乙烷之乙氧基化脂肪醇較佳為具有5至14個EO之乙氧基化油醇。包含約71%或以上(w/w)環氧乙烷之脂肪醇較佳為具有15個EO或以上之乙氧基化油醇。

於此較佳具體實施例中，非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度一般為約1.0%至約5.0%，特別是約1.5%至約4.5%，更佳的是約2.0%至約3.5%，表示為每體積乳液之重量百分率(w/v)。對於非離子高度親水性乙氧基化脂肪醇，濃度一般為約0.01%至約3.0%，特別是約0.05%至約2.5%，更佳的是約0.1%至約2.0%(w/v)。非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度一般為約0.1%至約2.5%，特別是約0.2%至約2.0%，較佳的是約0.2%至約1.5%，更佳的是約0.2%至約1.2%(w/v)。

於一個較佳具體實施例中，本發明提供水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其可包含：

(1) 含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3) 礦油；

(4) 非離子親水性乙氧基化脂肪醇；

(5) 非離子親水性聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物。

親水性乙氧基化脂肪醇較佳為包含多於約43%及少於約71%(w/w)環氧乙烷之脂肪醇，更佳的是具有5至14個EO之乙氧基化油醇。非離子POE-POP嵌段共聚物較佳可包含70%(w/w)或以上之環氧乙烷。

於此較佳具體實施例中，非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度一般為約1.0%至約5.0%，特別是約1.5%至約4.5%，更佳的是約2.0%至約3.5%，表示為每體積乳液之重量百分率(w/v)。對於非離子POE-POP嵌段共聚物，濃度一般為約0.01%至約2.0%，特別是約0.1%至約1.5%(w/v)。非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度一般為約0.1%至約2.5%，特別是約0.2%至約2.0%，較佳的是約0.2%至約1.5%，更佳的是約0.2%至約1.2%(w/v)。

一般而言，根據本發明之乳液可具有相倒轉溫度(PIT, phase inversion temperature)，其為≧25℃，特別是範圍為約28℃至約65℃，更特別的是約33℃至約60℃。

PIT為油中水滴型乳液改變成水中油滴型乳液或分相(打破乳化及2相分離)之溫度。藉由許多方式可測量PIT值，例如藉由視覺外觀或藉由導電率。將乳液置於低於乳液PIT的溫度，例如於約25℃水浴中。將溫度逐漸增加。相較於控制組乳液，觀察到乳液視覺外觀改變，特別是流動性、黏度、分離成兩相、由於油相移動至表面而改變表面

外觀。觀察到視覺外觀的此變化之溫度為乳液之PIT值。或者，對於生理食鹽水作為水相，由放入乳液靠近其表面的探針測量，藉由自導電率值約5-15 毫西門子(millisiemens)/公分(mS/cm)(水中油滴型乳液)快速通過到值約0 mS/cm(油中水滴型乳液)決定PIT。觀察到此轉變的溫度為乳液的PIT值。普通熟悉本技藝者將能夠決定界面活性劑及油的組合，包括其個別濃度，以便製造根據本發明的乳液，特別是具有PIT值於上述定義的範圍內之乳液而無需額外的實驗。

一般而言，根據本發明的乳液可含有約2%至約50%包括油及界面活性劑之油相(單位為每體積乳液之體積v/v)，特別是約4%至約40%，較佳的是約8%至約35%，及更佳的是約15%至約30%油相。按照定義說，除非另外指明，於本說明書中數值範圍總是包括範圍之界限。

使用的油可為礦油，包括(但不限於)石蠟油如異石蠟油及/或環烷烴油(Naphthenic oil)、鯊烷、鯊烯(squalene)、降植烷(pristane)、聚異丁烯油、氫化聚異丁烯、聚葵烯、聚異戊二烯(polyisoprene)、聚異丙烯等。用於本發明較佳的礦油可包括含有具碳原子數目大於15(較佳的是15至32)之直鏈或支鏈碳鏈之油，且無芳香族化合物。例如，此油可為以商品名MARCOL®52 或 MARCOL®82(Esso) 或"DRAKEOL®6VR"(Penreco)上市者。

油也可為油的混合物，其包含於本文中所述之油中選出之至少2種油，及以任何比例。油的混合物也可包含由上

述的油中選出的至少一種油及至少一種植物油，而此植物油代表約0.1%至約33%之油相，較佳的是約5%至約15% v/v。此等植物油為富含油酸知不飽和油，其為生物可分解的且較佳於儲存溫度(約+4℃)為液體或至少在此溫度能夠產生為液體的乳液。例如，植物油可為落花生油、堅果油、葵花油、紅花油、大豆油、月見草油(Evening primrose oil)等。

一般而言，本發明希望利用包含適當的獸醫或醫藥上可接受的媒介、賦形劑、或稀釋劑之水溶液，包括(但不限於)無菌水、生理食鹽水、葡萄糖、緩衝液等。媒介、賦形劑或稀釋劑也可包括多元醇、糖精(glucid)或pH緩衝劑。例如，媒介、賦形劑或稀釋劑也可包括胺基酸、胜肽、抗氧化劑、殺菌劑、抑菌化合物。將水溶液加至油及界面活性劑而得到根據本發明乳液體積100%之量。

本發明考慮一種乳液，其包含有石蠟油；具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑；具有5-6個EO的乙氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑；及具有大約70至80% EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物作為非離子親水性界面活性劑。特別是，石蠟油濃度為約5%至約50%及較佳的是約15%至約30%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.1%至1.5%，較佳的是0.1%至1.2%(w/v)；具有5-6個EO的乙氧基化油醇濃度為1%至5%，較佳的是1%至4%(w/v)；及具有大約70至80% EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物濃

度為0.01%至2%，較佳的是0.05%至1.5%(w/v)。

於根據本發明的第二個具體實施例中，乳液包含石蠟油、具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑；具有10個EO的乙氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑；及具有大約70至80% EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物作為非離子親水性界面活性劑。特別是，石蠟油濃度為5%至50%，較佳的是15%至30%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.2%至3%，較佳的是0.5%至3%(w/v)；具有10個EO的乙氧基化油醇濃度為0.2%至3%，較佳的是0.5%至3%(w/v)；及具有大約70至80% EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物濃度為0.01%至2%，較佳的是0.05%至1.5%(w/v)。

於根據本發明的第三個具體實施例中，乳液包含石蠟油、具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑及具有5-6個EO的乙氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑。特別是，石蠟油濃度為5%至50%，較佳的是15%至約35%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.1%至3%，較佳的是0.5%至2%(w/v)；具有5-6個EO的乙氧基化油醇濃度為1%至5%，較佳的是2.0%至4.5%(w/v)。

視情況可將其他化合物加入乳液作為共同佐劑，包括(但不限於)鋁；CpG寡核苷酸(ODN, oligonucleotide)，特別是ODN 2006、2007、 2059、或2135 (**Pontarollo R. A 等人**，Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84: 43-59; **Wernette C. M. 等人**，Vet. Immunol. Immunopath, 2002,

84: 223-236; **Mutwiri G.**等人Vet. Immunol. Immunopath, 2003, 91: 89-103; Kerkmann M.等人，J. Immunol., 2003, 170:4465-4474);聚A-聚U ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach"，由Michael F. Powell及Mark J. Newman編著，Pharmaceutical Biotechnology, 6: 03)；溴化二甲基二十八烷基銨(DDA, dimethyldioctadecylammonium bromide) ("Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach",由Michael F. Powell 及Mark J. Newman編著，Pharmaceutical Biotechnology, volume 6: 157), N,N-二十八烷基-N',N'-雙(2-羥乙基)丙二胺(如Avridine®) (同前，p. 148)，高分子膠(Carbomer)、聚葡萄胺糖(chitosan)(例如見美國專利第5,980.912號)。

本發明也提供製造疫苗組合物或免疫組合物的方法，其包含至少一種抗原或免疫原及根據本發明製作的佐劑或乳液。於乳液形成期間可將免疫原加入，或於另外的具體實施例中，可將免疫原在之後加入乳液，例如使用前。

使用的水溶液之全部量可存在於乳液最先產生時。或僅使用此水溶液的一部份來形成乳液，而將水溶液的剩餘量在併入免疫原時加入。免疫原或抗原可為凍乾形式，或以某其他適當固體形式存在，及而後與乳液混合，或者抗原可於溶液中，特別是於水溶液中，及將此溶液與乳液混合。

較佳根據其溶解度將界面活性劑加至油或水溶液中。例如，根據本發明將非離子親油性界面活性劑加至油而將非

離子親水性界面活性劑加至水溶液。

根據普通熟悉本技藝者已知的習見方法可製備乳化。例如，於本發明的一個具體實施例中，可製備乳液於低於乳液的PIT之溫度，特別是在室溫，如約30℃。藉由機械攪拌，如用能夠產生高剪力的具有轉子-定子之葉輪將水相及油相混合在一起。較佳的是，攪拌以低旋轉速度開始，隨著一般逐漸將水溶液加入於油中而緩慢增加。較佳的是將水溶液逐漸加入至油中。可調整油/水溶液的比例以得到油中水滴型(W/O, water in oil)乳液，例如，以約40%至約55%油(v/v)之濃度。當停止攪拌，乳液逐漸轉變為O/W乳液，同時於室溫冷卻(相倒轉)。倒轉後視需要，藉由加入水溶液將乳液稀釋以得到油於最終乳液中的理想濃度。可將乳液儲存於約5℃。

於另一個具體實施例中，可於高於乳液的PIT之溫度製備乳液。於第一個步驟中，在高於乳液的PIT之溫度將水相及油相混合在一起。較佳的是，將水溶液逐漸加入至油中。可調整油/水溶液的比例以得到油中水滴型(W/O, water in oil)乳液，例如，以約40%至約55%油(v/v)之濃度。藉由低或無剪力的攪拌，如用靜態混合器(static mixer)或螺旋槳或用非常低轉速的葉輪，可完成乳化。得到的乳液為油中水滴型(W/O, water in oil)乳液。於第二個步驟中，將乳液逐漸冷卻低於PIT。於此步驟期間，乳液轉變為O/W乳液(相倒轉)。倒轉後視需要，藉由加入水溶液將乳液稀釋以得到油於最終乳液中的理想濃度。可將乳

液儲存於約5℃。

乳液中油滴的大小可為約100奈米至約500奈米。例如，可使用乳液作為佐劑以調配疫苗組合物或醫藥組合物。也可使用乳液作為溶劑以溶解乾燥的產物，特別是含有例如減弱的微生物或活重組載體之凍乾產物。

於一個特別的具體實施例中，僅用水溶液的一部份產生預乳液。可藉由加入活性成分如藥物或免疫原(較佳的是免疫原)之懸浮液將此預乳液稀釋而得到最終組合物。或者，可將預乳液用水溶液稀釋及用來溶解乾燥的產物如凍乾產物。

適用於本發明的免疫原或抗原可由下列組成的族群選出：去活化的病原體、減弱的病原體、免疫原次單元(如蛋白質、多胜肽、胜肽、抗原決定位、半抗原)、或重組表現載體，包括具有免疫原插入體之質體。於本發明的一個具體實施例中，免疫原為去活化的或殺死的微生物。於本發明的另一個具體實施例中，疫苗組合物包含由鳥病原體之族群選出的免疫原，包括(但不限於)鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)、腸炎沙門氏菌(Salmonella enteritidis)、傳染性支氣管炎病毒(IBV, Infectious Bronchitis virus)、新城病病毒(NDV, Newcastle Disease virus)、產蛋率下降症候群病毒(EDS, egg drop syndrome virus)、或傳染性華氏囊病毒(IBDV, Infectious Bursal Disease Virus)、禽流感病毒等，及其組合。

或者，疫苗組合物包含由貓科病原體選出的免疫原，如

(但不限於)貓疱疹病毒(FHV, Feline Herpesvirus)、貓卡里西病毒(FCV, Feline Calicivirus)、貓白血病毒(FeLV, Feline Leukemia Virus)、貓免疫不全病毒(FIV, feline immunodeficiency virus)、狂犬病病毒等，及其組合。

於再另一個具體實施例中，本發明的疫苗組合物包含由犬病原體選出的免疫原，包括(但不限於)狂犬病病毒、犬疱疹病毒(CHV, canine herpesvirus)、犬小病毒(CPV, Canine Parvovirus)、犬冠狀病毒(Canine coronavirus)、鉤端螺旋體(Leptospira canicola)、出血性黃疸鉤端螺旋體(Leptospira icterohaemorragiae)、感冒傷寒性鉤端螺旋體(Leptospira grippotyphosa)、伯氏疏螺旋體菌(Borrelia burgdorferi)、支氣管敗血性博德氏桿菌(Bordetella bronchiseptica)等，及其組合。

於本發明的再另一個具體實施例中，組合物包含由馬病原體選出的免疫原，如馬疱疹病毒(第1型或第4型)、馬流感病毒、破傷風、西尼羅河熱病毒(west nile virus)等及/或其組合。

於本發明的再另一個具體實施例中，組合物包含由牛病原體選出的免疫原，如狂犬病病毒、牛輪狀病毒、牛副流感病毒第3型(bPIV-3, bovine parainfluenza virus type 3)、牛冠狀病毒、牛病毒性下痢病毒(BVDV, bovine viral diarrhea virus)、口蹄疫病毒(FMDV, foot and mouth disease virus)、牛融合性呼吸道病毒(BRSV, Bovine respiratory sryncytial virus)、牛傳染性鼻氣管炎(IBR, Infectious bovine

rhinotracheitis)、大腸桿菌、敗血性巴斯德桿菌(Pasteurella multocida)、溶血性巴斯德桿菌(Pasteurella haemolytica)等及其組合。

於本發明的再另一個具體實施例中，組合物包含由豬病原體選出的免疫原，如(但不限於)豬流感病毒(SIV, swine influenza virus)、豬環狀病毒第2型(PCV-2, porcine circovirus type 2)、豬生殖與呼吸道綜合症病毒(PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome virus)、假性狂犬病毒(PRV, pseudorabies virus)、豬小病毒(PPV, Porcine parvovirus)、FMDV、熱霍亂(HCV, hot cholera)、豬肺炎黴漿菌、紅斑丹毒絲菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)、敗血性巴斯德桿菌、支氣管敗血性博德氏桿菌、大腸桿菌、Helicobacter cerdo、幽門螺旋桿菌等及其組合。

本發明的一個較佳具體實施例提供疫苗組合物，其包含至少一種免疫原及乳液於醫藥上可接受的媒介中。藉由試管中培養方法，利用適當的培養基或宿主細胞株及普通熟悉本技藝者已熟知的習見方法可製造包含病毒、細菌、真菌等之免疫原。例如，可將PRRS於適當細胞株如MA-104細胞株中培養(見美國專利第5,587,164；5,866,401；5,840,563；6,251,404號等)。以類似的方式，利用PK-15細胞株可培養PCV-2(見美國專利第6,391,314號)；及可將豬肺炎黴漿菌培養於適當的培養基中 (美國專利第5,968,525號；美國專利第5,338,543號；**Ross R. F.等人**，Am. J. Vet. Res., 1984, 45: 1899-1905)。

為了得到去活化的免疫原或疫苗組合物，較佳在收成後將病原體去活化，及視需要藉由化學處理，利用例如福馬林或甲醛、β-丙內酯(Beta-Propiolactone)、伸乙亞胺(Ethyleneimine)、二元伸乙亞胺(BEI, binary ethyleneimine)、硫柳汞等，及/或物理處理(如加熱處理或超音波震盪)而經過淨化。去活化之方法對熟悉本技藝者為已熟知。例如，藉由β-丙內酯處理(**Plana-Duran等人**，Vet. Microbiol., 1997, 55: 361-370) 或藉由BEI處理(美國專利第5,587,164號)可將PRRS病毒去活化；利用伸乙亞胺處理或藉由β-丙內酯處理可完成PCV-2病毒的去活化(美國專利第6,391,314號)；利用清潔劑如Triton或用甲醛處理可將豬流感病毒去活化(美國專利第6,048,537號)；藉由甲醛處理(**Ross R. F.** 同前)、藉由伸乙亞胺或BEI處理(見世界專利WO 91/18627)、或藉由硫柳汞處理(美國專利第5,968,525及5,338,543號)可將豬肺炎黴漿菌去活化。

藉由習見濃縮技術，特別是藉由超過濾，可將去活化的病原體濃縮，及/或藉由藉由習見純化方式，特別是利用層析技術包括(但不限於)凝膠過濾、於蔗糖梯度上超高速離心、或選擇性沉澱，特別是在聚乙二醇(PEG, polyethylene glycol)的存在中純化。

有用於根據本發明的疫苗組合物之免疫原也包括表現載體。「載體」意指重組DNA或RNA質體或病毒，如痘病毒(poxvirus)、腺病毒、疱疹病毒，其包含欲於試管內或活體內傳遞至目標細胞的異源聚核苷酸。此異源聚核苷酸可

包含治療目的有興趣的序列，及可視情況為表現卡筴(Expression cassette) 的形式。如本文中使用，載體不一定需要於最終目標細胞或對象中能夠複製。此用詞包括用以轉譯聚核苷酸編碼序列之選殖載體。也包括病毒載體。

用詞「重組」意指於天然不存在或以自然中未曾發現的排列方式連接至另一個聚核苷酸之基因組cDNA、半合成或合成起源之聚核苷酸。

根據本發明的另一個具體實施例，表現載體為用於在適當細胞系統中試管內表現蛋白質之表現載體。被表現的蛋白質可在或不在分泌後(若無分泌，通常發生或進行細胞分解)於或自培養上層清液中收穫，視情況藉由濃縮方法如超過濾濃縮及/或藉純化方式如親合力、離子交換或凝膠過濾型層析法純化及調配於根據本發明的乳液中。

本發明也包含多價免疫學組合物或組合疫苗組合物的調配。例如根據本發明製作的組合牛死菌苗(bacterin)中有用的抗原包括(但不限於)牛黴漿菌(Mycoplasma bovis)、巴斯德桿菌屬，特別是敗血性巴斯德桿菌及溶血性巴斯德桿菌、嗜血桿菌屬，特別是昏睡嗜血桿菌、梭狀芽孢桿菌屬、沙門氏菌、棒狀桿菌(Corynebacterium)、鏈球菌、葡萄球菌、莫氏桿菌(Moraxella)、大腸桿菌等。

本發明更提供用以在宿主(如動物)中引發免疫反應的方法，其包含給予宿主根據本發明之免疫組合物或疫苗組合物。以此方式引發的免疫反應明顯是抗體及/或細胞免疫反應，且尤其是γ-干擾素反應。

尤其是，本發明提供接種對抗、或預防或降低由病原體生物感染動物而引起的症狀之方法(例如，由病毒、細菌、真菌、或原生動物寄生蟲之感染)。本發明的方法有用於脊椎動物，其包括(但不限於)人類、犬(如狗)、貓科動物(如貓)；馬(如馬)、牛(如牛)、綿羊(如綿羊)、山羊(如山羊)、豬動物(如豬)及兔子，以及鳥類包括(但不限於)雞、火雞、鴨子、鵝，鵪鶉、雉雞、鸚鵡、雀、鷹、烏鴉和走禽類(鴕鳥、鴯苗鳥、食火雞等)。

在本發明的一個特別的觀點中，此等方法係由藉由給予根據本發明製作的疫苗組合物於分娩前懷孕女性之疫苗注射組成。此等方法更包含藉由疫苗注射步驟引發的保護性抗體之引發及從接種的懷孕女性轉移此等保護性抗體到他們的子女。此等母親抗體的轉移隨後保護子女免於疾病。

根據本發明製作的疫苗組合物之劑量將視種族、品種、年齡、大小、接種疫苗歷史、以及被接種的動物的健康狀態而定。其他因素如抗原濃度、其他疫苗成分、及給予途徑(即皮下、皮內、口服、或肌肉內給予)也將影響有效的劑量。基於抗原濃度、給予途徑、及被接種的動物的年齡和狀態能夠輕易地決定給予疫苗的劑量。或者，可使用不同劑量的方法學免疫抗原性試驗，以及LD_{50}研究及其他篩選程序來決定根據本發明疫苗組合物的有效劑量而無需過度的實驗。由以下呈現的實例，將輕易地顯示用於使用本文中所述的疫苗組合物適當之大約劑量及大約體積。關鍵因素是劑量對自然感染提供至少一部分保護效應，如由與

自然感染相關的死亡率及發病率降低而證明。普通熟悉本技藝者同樣容易確定適當的體積。例如，於鳥類種類中，劑量的體積可為約0.1毫升至約0.5毫升及較佳的是約0.3毫升至約0.5毫升。對於貓、狗和馬種類，劑量的體積可為約0.2毫升至約0.3毫升，較佳的是約0.3毫升至約2.0毫升，及更佳的是約0.5毫升至約1.0毫升。對於牛和豬種類，劑量的體積可能從約0.2毫升到約5.0毫升，較佳的是從大約0.3毫升到大約3.0毫升，及更佳的是從0.5毫升到大約2.0毫升。

重複的接種疫苗可能較佳在定期時間間隔以便在一開始或者自從最後劑量已經經過一段長時間後增強免疫反應。於本發明的一個具體實施例中，給予疫苗組合物為非經腸胃的注射(即皮下、皮內、或肌肉內)。可將組合物以一次劑量給予，或於另一個具體實施例中，以約二至約五次劑量之重複劑量在約二至約六週(較佳的是約二至約五週)的間隔給予。然而，熟悉本技藝者將知劑量數目及疫苗接種之間的時間間隔將視許多因素決定，包括(但不限於)接種的動物的年齡；動物的狀態，特別是母親抗體的存在；接種的途徑；每劑量可提供的抗原數量；等。 對於最初接種疫苗來說，時期一般比一週長，較佳的是於二至約五週之間。對於以前接種的動物來說，在懷孕之前或期間可進行約年度間隔之補強注射疫苗。

本發明也考慮給予一種疫苗組合物，其利用無針頭注射器如(但不限於)Pigjet®、Avijet®、Dermojet®、或

Biojector®(Bioject，美國，俄勒岡州)。普通熟悉本技藝者能夠視需要對於因素如被接種的動物種類；動物的年齡和體重等調整注射器的規格而不需過度的實驗。

於本發明的一個具體實施例中，方法包含單一次給予用根據本發明之乳液調配的疫苗組合物。例如，於一個具體實施例中，疫苗組合物為去活化的豬肺炎黴漿菌疫苗，而另一個具體實施例提供一種疫苗，其包含去活化的PCV2病毒組合物。其它免疫組合物或疫苗為可適用於單一投藥療法者包括(但不限於)去活化的PRRS及SIV。也可將疫苗在預先存在的抗體存在下給予。

本發明更關於治療宿主(如動物)之方法，其包含給予宿主根據本發明製造的醫藥組合物及其包含由蛋白質或胜肽、抗體、過敏原、CpG ODN、生長因子、細胞激素、或抗生素，特別是CpG ODN或細胞激素。可使用此等醫藥組合物來改善動物如雞、豬、或牛的生長表現。

本發明更關於一種組件，其包含含有一個成分如免疫原或醫藥組合物的第一個小瓶，及根據本發明製造的乳液於第二個小瓶中。免疫原可為凍乾形式、乾燥的形式或於水溶液中，如本文中所述。

現在將本發明藉由下列非限制性實例說明。

實例

實例1：乳液製造方法

如下述將乳液於兩步驟中製造：

第一步：使用高剪力轉子-定子Silverson乳化機(具有直

徑10毫米的破碎頭之L4RT類型)來製造調配劑。為了製造乳液，將一體積油相與一體積水相#1於35℃乳化。攪拌下，5000 rpm(每分鐘轉次)1分鐘將水相加入至油相。於1分鐘期間將轉速逐漸隨體積增加而增加至8300 rpm。於此步驟期間，乳液為油中水滴型乳液。最終LR4乳液為含20%油相的O/W。對於LR4乳液，相組合物為如下：

油相(72毫升)：

-油醇醚-2(Brij®92)　：1.8%w/v，

-油醇醚-5(Volpo®N5)　：8.2%w/v，

-石蠟油(Marcol 82®)　：87.5v/v，

-防腐劑　：2.5%v/v

水相#1(108毫升)：

- Poloxamer 407(Lutrol®F127)：0.58%w/v，

- 含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02 M(pH 7.8)之等張緩衝液：適量至100.0%v/v

使用於與疫苗相同的緩衝液中，例如於含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02 M(pH 7.8)之等張緩衝液中之5%(w/v) Lutrol®F127溶液來製備水相#1。

當攪拌停止，乳液改變成水中油滴型乳液。將乳液置於5℃冷房中至少4小時。於此階段，乳液為含有40%油相的預乳液。

第二步：用180毫升二鈉及單鉀磷酸鹽0.02 M等張緩衝液(pH 7.8)與免疫原(去活化的豬肺炎黴漿菌或PCV-2免疫原，如以下所述)製備水相#2。將第一步中製備的預乳液

冷卻至約5℃，藉加入相同體積相同溫度之水相#2稀釋，及藉由磁棒旋轉1分鐘而混合。LR4乳液中最終界面活性劑濃度為2.18%(w/v)。

如本文中製備，LR4疫苗於5℃至少穩定一年。

利用相同的製備方法，如下述可得到其他乳液：

LR3乳液

第一步：

最終LR3乳液為含33%油相的O/W乳液。

油相(120毫升)：

-油醇醚-2(Brij®92)　：6.24%w/v，

-油醇醚-10(Brij®96)　：2.76%w/v，

-石蠟油(Marcol 82®)　：89.50v/v，

-防腐劑　：1.50%v/v

水相#1(120毫升)：

-Poloxamer 407(Lutrol®F127)：1.20%w/v，

-含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02M(pH 7.8)之等張緩衝液：適量至100.0%v/v

使用於與疫苗相同的緩衝液中，例如於含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02 M(pH 7.8)之等張緩衝液中之5%(w/v) Lutrol®F127溶液來製備水相#1。

當攪拌停止，乳液改變成水中油滴型乳液。將乳液置於5℃冷房中至少4小時。於此階段，乳液為含有50%油相的預乳液。

第二步：用含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02 M (pH 7.8)之等

張緩衝液與免疫原構成製備水相#2(120毫升)。將第一步中製備的預乳液冷卻至約5℃，藉加入一半體積相同溫度之水相#2稀釋，及藉由磁棒旋轉1分鐘而混合。LR3乳液中最終界面活性劑濃度為3.40%(w/v)。

如本文中製備，LR3疫苗於5℃至少穩定一年。

BE1乳液最終BE1乳液為含33%油相的O/W乳液。

油相(120毫升)：

-油醇醚-2(Brij®92)	：3.0%w/v，
-油醇醚-5(Volpo®N5)	：9.1%w/v，
-石蠟油(Marcol 82®)	：86.4v/v，
-防腐劑	：1.5%v/v

水相#1(240毫升)：

-含有二鈉及單鉀磷酸鹽0.02M(pH 7.8)之等張緩衝液：適量至100.0%v/v

水相#1含有含二鈉及單鉀磷酸鹽0.02M(pH 7.8)之等張緩衝液98.5%(v/v) 及免疫原。使用前才稀釋BE1乳液。BE1乳液中最終界面活性劑濃度為4%(w/v)。

實例2：乳液之安定性

即使在濃縮的免疫原存在下LR4及LR3組合物於21℃安定至少9個月。乳液之顆粒大小分佈於此時期間不會改變。

實例3：豬肺炎黴漿菌及PCV-2合併的疫苗—組合物及於小豬中的安全性

材料及方法：如實例1中製備兩種疫苗，每劑量含有

LR3或LR4乳液、12抗原單位之去活化豬肺炎黴漿菌及2.4 log_{10}(抗原單位)之去活化豬環狀病毒第2型。將二十四隻三週大小豬隨機分配成兩組。將第2組十二隻小豬以肌肉內途徑在第0天用4毫升LR3疫苗組合物接種，而第3組十二隻小豬以肌肉內途徑在第0天用4毫升LR4疫苗組合物接種。第1組相當於未接種的控制組。將小豬每天監測。注射後兩週觀察注射位置及局部損害。

處理	休克& 一般反應	體溫上升 ℃	相對平均每日 重量增加	局部反應之大小 (cm^3)
第1組(控制組)	無反應	-0.1±0.3*	6.5±1.9	0.0±0.0
第2組(LR3)	無反應	0.6±0.5	6.3±1.3	1.8±2.8
第3組(LR4)	無反應	0.1±0.2	6.4±1.7	8.4±11.4

*平均值±標準偏差

結果：LR3及LR4佐劑已顯示良好安全性質。

實例4：給予一劑用LR4乳液為佐劑的PCV-2疫苗後之血清學結果

材料及方法：如實例1中製備一種疫苗，每劑量含有LR4乳液、CpG ODN #2216 50微克、1.5抗原單位之去活化豬肺炎黴漿菌及1.5 log_{10}(抗原單位)之去活化豬環狀病毒第2型。將四十隻三週大具有先前存在高母親抗體之小豬隨機分配成兩組。將第2組二十隻小豬以皮內途徑用無針頭注射器在第0天用0.5毫升LR4疫苗組合物接種。第1組相當於未接種的控制組。在疫苗注射後於D0、D21、D41、D63、D84、D126、D153及D180採取血液樣本用ELISA滴定PCV-2 ORF2抗體。

處理	D0	D21	D41	D63	D84	D126	D153	D180
第1組	3.08±0.58*	2.57±0.50	2.51±0.58	< 1.51±0.48	< 1.51±0.17	< 1.51±0.17	< 1.51±0.05	< 1.51±0.02
第2組	2.91±0.52	2.35±0.52	2.44±0.35	2.67±0.50	2.60±0.49	2.40±0.49	2.48±0.54	2.43±0.54

*平均值±標準偏差(log_{10}單位)

結果：如上述表格證實，即使在接種時存在母親抗體，接種後7至180天所有疫苗注射顯示顯著的抗-PCV-2 ORF2抗體反應。

實例5：製備螺桿菌的方法

培養：由甘油母液生長細菌培養，利用5-10%接種體至補充10%胎牛血清(FBS, Fetal Bovine Serum)的布氏肉湯(Brucella Broth)中。將培養菌生長於三重氣體培養箱(85% N_2、10% CO_2、5% O_2)的透氣蓋瓶中並於37℃以約70 rpm搖動。在接種之時，也劃TSA+5%羊血(SB, Sheep's Blood)盤作為診斷測試以決定樣品純度。菌落形態為點狀及清晰。置於培養箱中3-4天可見到一些溶血於盤上。培養菌花費24-36小時成長至OD_{600}>1。也將生長的培養菌劃於TSA+5% SB盤上，並用來測試過氧化氫酶及尿素酶(Urease)製造(Helicobacter cerdo對兩者為陽性)。

離心：將成長至OD_{600}>1的培養菌分裝入無菌離心瓶內並用J10貝克曼轉子於7500 rpm以大約8600 g離心20分鐘。將上層清液丟棄，將細胞沉澱物用1x磷酸緩衝鹽水(PBS, phosphate-buffered saline)清洗。將沉澱重新懸浮於PBS中並分裝入10毫升疫苗瓶中。

凍乾：將抗原製品凍乾36小時，不添加安定劑或防腐

劑。觀察到形態良好的塊狀物。

胃蛋白酶(pepsin)消化：將胃蛋白酶溶液(0.1%)製備於10 mM HCl中並用0.2微米過濾器無菌過濾兩次。將經凍乾的抗原製品於37℃及溫和搖擺下用胃蛋白酶消化(每毫克乾燥的細胞質量加入1微克胃蛋白酶)25小時。在18及25小時時將100微升樣品散佈於TSA+5%SB盤(於三重氣體微好氣菌(Microaerophilic)培養箱中37℃培養)；96小時後不見有生長，顯示胃蛋白酶消化有去活化作用。

PBS中和：胃蛋白酶消化後，抗原製品具有約2.0之pH，故將其用2：1體積PBS中和。PH中和後，pH約為7.0。

實例6：由用胃蛋白酶或福馬林處理的Helicobacter cerdo所製備的抗原製品之調配劑

如表1中所示，藉由溶解凍乾的細菌於每小瓶10毫升LR2佐劑，即時調配疫苗。數值反應調配後各成分的濃度。LR2乳液相當於實例1中所述的LR4乳液。於LR2乳液中，Lutrol F127之最終濃度為0.20%(w/v)而非0.175%(w/v)。

表1：疫苗調配劑

組成	成分	組成量 毫克/毫升	組成量 毫克/劑量(2毫升)
PBS			
	NaCl	2	4
	KCl	0.05	0.1
	Na_2HPO_4	0.2875	0.575
	KH_2PO_4	0.05	0.1
	去離子H_2O		
胃蛋白酶(溶液)		3.5微克	7.0微克
	HCl	0.042	0.084
螺桿菌細胞		3.5	7.0

實例7：用H. cerdo基疫苗接種的動物及方法

用於此研究的動物為無PRRSV及無豬肺炎黴漿菌的特定常見的豬。選擇常見的小豬以及其母親。紀錄所有的豬重量。將豬分成兩組，每組至少5隻，並由體重、性別及仔豬來源而分層。檢查所有豬隻以確認健康狀態。只有臨床上健康的動物包含於試驗中。識別所有豬隻。將豬於年齡第1週及第2週與其母親一起注射疫苗。將一組豬接種疫苗，留下另一組為未接種的控制組。接受疫苗注射的動物經由肌肉內途徑接受1劑(每劑2毫升)，於各肩及屁股各0.5毫升。未接受疫苗注射的控制組未接受任何注射。

在3週大時，將所有豬斷奶並刺激。將各組養於獨立的設施中的不同欄柵內。於刺激後大約28天時將豬驗屍。於最終驗屍日期檢驗負控制組豬。將實驗設計摘要於表2中。

表2：實驗設計

處理說明	螺桿菌刺激	無刺激
接種組	5隻豬	
負控制組		5隻豬

刺激程序及評估：若嚴重臨床疾病，可給予對於動物健康所需有用的治療。將紀錄各動物的耳標籤數目、疾病日期、據以推定的診斷、治療方法、及動物的處置。刺激後不給予處理。將垂死或受傷的動物安樂死。不健康的動物(臨床上生病或受傷)可退出研究。

血清學及皮膚測試：在接種前、刺激前及在驗屍時由前

腔靜脈收集血液。決定螺桿菌抗體濃度。進行皮膚測試。

製造參數：在出生之時、接種之前、刺激之前及在各驗屍之時將豬秤種以評估可能的體重增加或損失。

驗屍：在適應螺桿菌刺激的28 DPI時將豬驗屍。

實例8：螺桿菌單離

藉由微好氣菌培養及passageon Skirrow's培養基盤自豬胃黏膜取出兩個細菌分離株(2662及1268)。

基於胃的位置(貴門及胃竇)、形態(格藍氏陰性、短弧狀海鷗翅膀狀桿)、尿素酶活性、與兔抗Hp抗體的反應性，基於SDS-PAGE及西方墨點分布將兩個分離株指定為螺桿菌屬，發現分離株2662類似於幽門螺旋桿菌及給予名稱「Helicobacter cerdo」。分離株1268具有與2662不同的特殊分布。

實例9：由尿素酶活性測量細菌含量

表3：由尿素酶活性測量細菌含量

組別	於胃黏膜中尿素酶活性			
	無	弱	中	強
接種組	4*	0	2	-
感染組	-	1	3	3

*Gross lesions pars esophagea

實例10：胃發炎反應

將胃發炎反應(表4)對濾泡及淋巴細胞浸潤至胃黏膜下固有層(lamina propria)「評分」為0-無；1-輕微；2-中等；及3-嚴重。計算各豬的總發炎分數為在胃貴門及胃竇中的組織學分數總合。由此計算組平均分數。

表4：胃發炎反應

組數	平均總分
接種組	3.6
控制組	4.4

實例11：血清學反應

表5：血清學反應

組別	第6天	第一次接種	第14天	第二次接種	第24天	第40天
接種組	1.0		1.3		81.0	86.5
感染控制組	1.0		0.8		1.3	4.5
Suivaxyn 豬肺炎黴漿菌 +H. cerdo	6.9		11.8		99.9	97.3
控制組	9.4		6.6		9.1	9.0

基於尿素酶活性的強度、組織切片的盲組織學評估及強血清學反應，H. cerdo疫苗提供保護免疫性之良好指示。包含Suivaxyn、豬肺炎黴漿菌及H. cerdo的組合疫苗給予類似的抗體反應。

***

將本發明進一步用下列編號的段落說明：

1. 一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其包含：

(1) 含有能夠於宿主中引發免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3) 礦油；

(4) 由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌

段共聚物(POE-POP嵌段共聚物)及/或其任何組合組成的族群選出之非離子親水性界面活性劑。

2. 一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其可包含：

(1) 含有能夠於宿主中引發免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 由乙氧基化脂肪醇、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物(POE-POP嵌段共聚物)及/或其任何組合組成的族群選出之非離子親油性界面活性劑；

(3) 礦油；

(4) 非離子親水性乙氧基化脂肪醇。

3. 段落1或2之乳液，其中親油性乙氧基化脂肪醇包含約43%分子量(w/w)或以下之環氧乙烷(EO, ethylene oxide)。

4. 段落2之乳液，其中親油性POE-POP嵌段共聚物包含約35%(w/w)或以下之環氧乙烷。

5. 段落2之乳液，其中親水性乙氧基化脂肪醇包含多於約43%(w/w)之環氧乙烷(EO, ethylene oxide)。

6. 段落1之乳液，其中親水性POE-POP嵌段共聚物包含約55%(w/w)或以上之環氧乙烷。

7. 段落3之乳液，其中乙氧基化脂肪醇為C9至C22脂肪醇及較佳由油醇、鯨蠟醇、硬脂醇、異硬脂醇、月桂

醇，及其組合組成的族群選出，較佳的是油醇及更佳的是具有1至4個EO的乙氧基化油醇。

8. 段落5之乳液，其中乙氧基化脂肪醇為C9至C22脂肪醇及較佳由油醇、鯨蠟醇、硬脂醇、異硬脂醇、月桂醇，及其組合組成的族群選出，較佳的是油醇及更佳的是具有5至21個EO的乙氧基化油醇。

9. 段落4之乳液，其中POE-POP嵌段共聚物具有分子量約1000至約8000。

10. 段落6之乳液，其中POE-POP嵌段共聚物具有分子量約3000至約16000。

11. 段落1至10任一項之乳液，其中非離子親水性界面活性劑為乙氧基化脂肪醇。

12. 段落11之乳液，其中乙氧基化脂肪醇為Brij®76、Brij®56、Brij®96/97、Brij®98、Brij®721、Brij®58、Brij®35、Brij®78(Uniqema)、Volpo®N5、Volpo®CS6、Volpo®CS12、Volpo®CS20、Volpo®CS25、Volpo®CS23(Croda)、BL9-EX、BC-7、BT-5、BT-7、BT-9、BT-12、BD-10、BO-7V、BC5.5、BT-5、BL-21、BL-25、BC-15TX、BC-23、BC-25TX、BO-15V、BO-50V、BB-20(Nikko Chemicals)或其任何組合。

13. 段落1至12任一項之乳液，其中非離子親水性界面活性劑為POE-POP嵌段共聚物。

14. 段落13之乳液，其中POE-POP嵌段共聚物為Lutrol®F127[Poloxamer 407]、Lutrol®F68[Poloxamer 188]、Lutrol®F108[Poloxamer 338]、Lutrol®F98[Poloxamer 278]、

Lutrol®F87[Poloxamer 227]、Lutrol®F88[Poloxamer 228]、Lutrol®F77[Poloxamer 207]、Lutrol®F38[Poloxamer 108](BASF)、Tetronics®T1307、Tetronics® T1107、Tetronics®908(BASF)或其任何組合。

15. 段落1至14任一項之乳液，其中非離子親油性界面活性劑為乙氧基化脂肪醇。

16. 段落15之乳液，其中乙氧基化脂肪醇為Brij®30、Brij®92/93、Brij®72、Brij®52(Uniqema)、Volpo®L3、Volpo®N3、Volpo®L4(Croda)、BS-4、BD-2、BD-4、BT-3(Nikko Chemicals)或其任何組合。

17. 段落1至16任一項之乳液，其中非離子親油性界面活性劑為POE-POP嵌段共聚物。

18. 段落17之乳液，其中POE-POP嵌段共聚物為Pluronic®L121[Poloxamer 401]、Pluronic®L101[Poloxamer 331]、Pluronic®L81[Poloxamer 221]、Pluronic®L62[Poloxamer 182]、Pluronic®L43[Poloxamer 123]、Pluronic®L103 [Poloxamer 333]、Pluronic®L123[Poloxamer 403]、Lutrol®L63[Poloxamer 183]、Lutrol®L122[Poloxamer 402]、Lutrol®L92[Poloxamer 272]、Lutrol®L72[Poloxamer 202]、Lutrol®L42[Poloxamer 122]、Lutrol®L61[Poloxamer 181](BASF)、Tetronics®T1301、Tetronics® T701、Tetronics® T901(BASF)或其任何組合。

19. 段落1至18任一項之乳液，其中界面活性劑的總濃度(每體積乳液之重量)為約0.2%至約6.5%，特別是約1%至約6%，較佳的是約1.5%至約5%，更佳的是約2%至

約3%。

20. 一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其包含：

(1)含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2)非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3)礦油；

(4)非離子親水性乙氧基化脂肪醇，其包含多於約43%及少於約71%(w/w)之環氧乙烷(EO)；

(5)非離子親水性乙氧基化脂肪醇，其包含約71%或以上(w/w)之環氧乙烷(EO, ethylene oxide)。

21. 段落20之乳液，其中包含有多於約43%及少於約71%(w/w)環氧乙烷(EO, ethylene oxide)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇為具有5至14個EO之乙氧基化油醇。

22. 段落20或21之乳液，其中包含約71%或以上(w/w)環氧乙烷(EO, ethylene oxide)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇為具有15個EO或以上之乙氧基化油醇。

23. 段落20至22任一項之乳液，其中包含有多於約43%及少於約71%(w/w)環氧乙烷之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為約1.0%至約5.0%，特別是約1.5%至約4.5%，更佳的是約2.0%至約3.5%，表示為每體積乳液之重量百分率(w/v)。

24. 段落20至23任一項之乳液，其中包含有約71%或以上(w/w)環氧乙烷之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之

濃度為約0.01%至約3.0%，特別是約0.05%至約2.5%，更佳的是約0.1%至約2.0%(w/v)。

25. 段落20至24任一項之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為約0.1%至約2.5%，特別是約0.2%至約2.0%，較佳的是約0.2%至約1.5%，更佳的是約0.2%至約1.2%(w/v)。

26. 一種水中油滴型(O/W, oil in water)乳液，其包含：

(1)含有能夠引發宿主免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2)非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3)礦油；

(4)非離子親水性乙氧基化脂肪醇；

(5)非離子親水性聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物。

27. 段落26之乳液，其中親水性乙氧基化脂肪醇較佳為包含多於約43%及少於約71%(w/w)環氧乙烷之乙氧基化脂肪醇。

28. 段落27之乳液，其中脂肪醇為具有5至14個EO之乙氧基化油醇。

29. 段落26至28任一項之乳液，其中非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為約1.0%至約5.0%，特別是約1.5%至約4.5%，更佳的是約2.0%至約3.5%，表示為每體積乳液之重量百分率(w/v)。

30. 段落26至29任一項之乳液，其中非離子親水性聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物之濃度為約0.01%至約2.0%，特別是約0.1%至約1.5%(w/v)。

31. 段落26至30任一項之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為約0.1%至約2.5%，特別是約0.2%至約2.0%，較佳的是約0.2%至約1.5%，更佳的是約0.2%至約1.2%(w/v)。

32. 段落1至31任一項之乳液，其中乳液具有相倒轉溫度(PIT, phase inversion temperature)大於或等於25℃。

33. 段落32之乳液，其中PIT為約28℃至約65℃，更特別的是約33℃至約60℃。

34. 段落1至33任一項之乳液，其中乳液包含(單位為每體積乳液之體積v/v)包括油及界面活性劑之約2%至約50%油相，特別是約4%至約40%，較佳的是約8%至約35%，及更佳的是約15%至約30%油相。

35. 段落34之乳液，其中油為礦油。

36. 段落35之乳液，其中礦油為石蠟油如異石蠟油及/或環烷烴油、鯊烷、鯊烯、降植烷、聚異丁烯油、氫化聚異丁烯、聚葵烯、聚異戊二烯、聚異丙烯等。

37. 段落34或35之乳液，其中礦油包括含有具碳原子數目大於15(較佳的是15至32)之直鏈或支鏈碳鏈，且無芳香族化合物之礦油。

38. 段落37之乳液，其中油為以商品名MARCOL®52

或 MARCOL®82(Esso) 或 "DRAKEOL®6VR"(Penreco) 上市者。

39. 段落34至38任一項之乳液，其中油為包含至少兩種油以任何比例之油混合物。

40. 段落39之乳液，其中油混合物包含至少一種植物油。

41. 段落40之乳液，其中植物油代表約0.1%至約33%之油相，較佳的是約5%至約15%v/v。

42. 段落40或41之乳液，其中植物油為落花生油、堅果油、葵花油、紅花油、大豆油、月見草油等。

43. 一種乳液包含石蠟油；具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑；具有5-6個EO的乙氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑；及具有大約70至80%EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物作為非離子親水性界面活性劑。

44. 段落43之乳液，其中石蠟油濃度為約5%至約50%及較佳的是約15%至約30%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.1%至1.5%，較佳的是0.1%至1.2%(w/v)；具有5-6個EO的乙氧基化油醇濃度為1%至5%，較佳的是1%至4%(w/v)；及具有大約70至80%EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物濃度為0.01%至2%，較佳的是0.05%至1.5%(w/v)。

45. 一種乳液包含石蠟油、具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑；具有10個EO的乙

氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑；及具有大約70至80%EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物作為非離子親水性界面活性劑。

46. 段落45之乳液，其中石蠟油濃度為5%至50%，較佳的是15%至30%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.2%至3%，較佳的是0.5%至3%(w/v)；具有10個EO的乙氧基化油醇濃度為0.2%至3%，較佳的是0.5%至3%(w/v)；及具有大約70至80%EO及分子量約9800至16000之POE-POP嵌段共聚物濃度為0.01%至2%，較佳的是0.05%至1.5%(w/v)。

47. 一種乳液包含石蠟油、具有2-3個EO的乙氧基化油醇作為非離子親油性界面活性劑及具有5-6個EO的乙氧基化油醇作為非離子親水性界面活性劑。

48. 段落47之乳液，其中石蠟油濃度為5%至50%，較佳的是15%至約35%(v/v)；具有2-3個EO的乙氧基化油醇濃度為0.1%至3%，較佳的是0.5%至2%(w/v)；具有5-6個EO的乙氧基化油醇濃度為1%至5%，較佳的是2.0%至4.5%(w/v)。

49. 一種製造疫苗組合物的方法，其包含混合能夠於宿主中引發免疫反應的疫苗抗原或免疫原及段落1至48任一項之乳液。

50. 一種於宿主中引發免疫反應的方法，其包含給予宿主段落1至48任一項之乳液或段落49之疫苗組合物。

51. 一種用以執行段落49或50之方法的套件，其包含

段落1至48任一項之乳液或段落49之疫苗組合物及執行方法的使用說明。

已詳細說明本發明的較佳具體實施例，應知由上述段落界定的本發明不限於上述提出的特定細節，因此可能做許多明顯的變化而不離本發明的精神或範圍。

五、中文發明摘要：

本發明係關於水中油滴型(oil in water)乳液，其作為佐劑之用途，及可包含其之醫藥上、免疫學上、或疫苗組合物。於一具體實施例中，水中油滴型(O/W)乳液可包含含有免疫原之水溶液、礦油、非離子親油性乙氧基化脂肪醇及非離子親水性界面活性劑。於另一具體實施例中，水中油滴型乳液可包含含有免疫原之水溶液、非離子親油性界面活性劑、礦油、及非離子親水性乙氧基化脂肪醇。本發明也包含利用本發明佐劑製造疫苗組合物之方法、如此得到的疫苗組合物及其使用方法。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

公告本

十、申請專利範圍：

年 月 日修正本
101. 9. 13

1. 一種水中油滴型(O/W)乳液，其包含：

(1) 含有能夠於宿主中引發免疫反應之疫苗抗原或免疫原的水溶液；

(2) 非離子親油性乙氧基化脂肪醇；

(3) 礦油；

(4) 非離子親水性界面活性劑，其係乙氧基化脂肪醇。

2. 如請求項1之乳液，其中：

(a) 親油性乙氧基化脂肪醇包含43%分子量(w/w)或以下之環氧乙烷(EO)；或

(b) 親油性乙氧基化脂肪醇包含43%分子量(w/w)或以下之環氧乙烷(EO)且乙氧基化脂肪醇為C9至C22脂肪醇；或

(c) 親水性乙氧基化脂肪醇包含多於約43%(w/w)之環氧乙烷；或

(d) 親水性乙氧基化脂肪醇包含多於約43%(w/w)之環氧乙烷且乙氧基化脂肪醇為C9至C22脂肪醇；或

(e) 非離子親水性乙氧基化脂肪醇為Steareth-10、Ceteth-10、Oleth-10、Oleth-20、Steareth-21、Ceteth-20、Laureth-23、Steareth-20、Oleth-5、Ceteareth-6、Ceteareth-12、Ceteareth-20、Ceteareth-25、Ceteareth-23、Laureth-9、Ceteth-7、C12-14 Pareth-5、C12-14 Pareth-7、C12-14 Pareth-9、C12-14 Pareth-12、C12-14

Pareth-10、Oleth-7、Ceteth-6、Laureth-21、Laureth-25、Ceteth-15、Ceteth-23、Ceteth-25、Oleth-15、Oleth-50、Beheneth-20或其任何組合；或

(f)非離子親油性乙氧基化脂肪醇為Laureth-4、Oleth-2、Steareth-2、Ceteth-2、C12-13 Pareth-3、Oleth-3、C12-13 Pareth-4、Steareth-4、C12-15 Pareth-2、C12-15 Pareth-4、C12-15 Pareth-3或其任何組合；或

(g) 界面活性劑的總濃度(每體積乳液之重量)為0.2%至6.5%。

3. 如請求項2之乳液，其中C9至C22脂肪醇係選自由油醇、鯨蠟醇、硬脂醇、異硬脂醇、月桂醇及其組合所組成之群。

4. 如請求項3之乳液，其中該C9至C22脂肪醇為油醇。

5. 如請求項2之乳液，其中(b)中之C9至C22脂肪醇為具有1至4個EO的乙氧基化油醇。

6. 如請求項2之乳液，其中(d)中之C9至C22脂肪醇為具有5至21個EO的乙氧基化油醇。

7. 如請求項2之乳液，其中(g)中之界面活性劑總濃度為1%至6%。

8. 如請求項7之乳液，其中(g)中之界面活性劑總濃度為1.5%至5%。

9. 如請求項8之乳液，其中(g)中之界面活性劑總濃度為2%至3%。

10. 如請求項1之乳液，其中非離子親水性界面活性劑包含

含有多於43%及少於71%(w/w)環氧乙烷(EO)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇及含有71%或以上(w/w)環氧乙烷(EO)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇。

11. 如請求項10之乳液，其中：

(a) 含有多於43%及少於71%(w/w)環氧乙烷(EO)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇為具有5至14個EO之乙氧基化油醇；或

(b) 含有71%或以上(w/w)環氧乙烷(EO)之非離子親水性乙氧基化脂肪醇為具有15個EO或以上之乙氧基化油醇；或

(c) 含有多於43%及少於71%(w/w)環氧乙烷之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為1.0%至5.0%，以每體積乳液之重量百分率(w/v)表示；或

(d) 含有71%或以上(w/w)環氧乙烷之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.01%至3.0%。

12. 如請求項10之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.1%至2.5% (w/v)。

13. 如請求項11之乳液，其中(c)中之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為1.5%至4.5%(w/v)。

14. 如請求項13之乳液，其中非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為2.0%至3.5%(w/v)。

15. 如請求項11之乳液，其中(d)中之非離子親水性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.05%至2.5%(w/v)。

16. 如請求項15之乳液，其中非離子親水性乙氧基化脂肪醇

之濃度為0.1%至2.0%(w/v)。

17. 如請求項12之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.2%至2.0%(w/v)。

18. 如請求項17之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.2%至1.5%(w/v)。

19. 如請求項18之乳液，其中非離子親油性乙氧基化脂肪醇之濃度為0.2%至1.2%(w/v)。

20. 如請求項1之乳液，其中：

(a) 該乳液具有相倒轉溫度(PIT)大於或等於25℃；或

(b) 該乳液具有PIT為28℃至65℃。

21. 如請求項20之乳液，其中該乳液具有PIT為33℃至60℃。

22. 如請求項1之乳液，其中：

(a) 該乳液包含2%至50%(單位為每體積乳液之體積v/v)之包括油及界面活性劑之油相；或

(b) 該乳液包含2%至50%(單位為每體積乳液之體積v/v)之包括油及界面活性劑之油相，且其中油為礦油；或

(c) 該乳液包含2%至50%(單位為每體積乳液之體積v/v)之包括油及界面活性劑之油相，且

其中油為礦油，且其中礦油為石蠟油及/或環烷烴油、鯊烷、鯊烯、降植烷、聚異丁烯油、氫化聚異丁烯、聚葵烯、聚異戊二烯、聚異丙烯等；或

(d) 該乳液包含2%至50%(單位為每體積乳液之體積

v/v)之包括油及界面活性劑之油相，且其中油為礦油，且

其中礦油包括含有具碳原子數目大於15之直鏈或支鏈碳鏈且無芳香族化合物之礦油；或

(e)該油為包含至少兩種油以任何比例之油混合物；或

(f)該油為包含至少兩種油以任何比例之油混合物，且其中油混合物包含至少一種植物油；或

(g)該油為包含至少兩種油以任何比例之油混合物，且

其中油混合物包含至少一種植物油，且

其中植物油相當於0.1%至33%之油相；或

(h)該油為包含至少兩種油以任何比例之油混合物，且

其中油混合物包含至少一種植物油，且

其中植物油為落花生油、堅果油、葵花油、紅花油、大豆油、月見草油等。

23. 如請求項22之乳液，其中該乳液包含(單位為每體積乳液之體積v/v)4%至40%之油相。

24. 如請求項23之乳液，其中該乳液包含(單位為每體積乳液之體積v/v)8%至35%之油相。

25. 如請求項24之乳液，其中該乳液包含(單位為每體積乳液之體積v/v)15%至30%之油相。

26. 如請求項22之乳液，其中(c)中之石蠟油為異石蠟油。

27. 如請求項22之乳液，其中(d)中之直鏈或支鏈碳鏈具有15至32之碳原子數。

28. 如請求項22之乳液，其中(g)中之植物油相當於5%至15%之油相。

29. 如請求項1之乳液，其中該疫苗抗原或免疫原為豬肺炎黴漿菌、豬環狀病毒2或幽門螺旋桿菌。

30. 如請求項1之乳液，其進一步包括非離子親水性聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物。