

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/113 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00137481.8

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100384473C

[22] 申请日 2000.11.5 [21] 申请号 00137481.8

[30] 优先权

[32] 1999.11.5 [33] JP [31] 316121/99

[73] 专利权人 日油株式会社

地址 日本东京都

共同专利权人 财团法人化学及血清疗法研究所

[72] 发明人 斋藤晃一 岸本洋子 宫原德治

高濑公三

[56] 参考文献

JPA11106351 1999.4.20

审查员 王慧梅

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 24 页

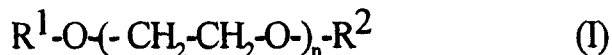
[54] 发明名称

油佐剂疫苗

[57] 摘要

本发明提供 W/O/W 型油佐剂疫苗, 含有外层含水相和内层含水相, 外层含水相含有 0.5 - 20% (重量) 的分子量 400 - 20,000 的聚乙二醇衍生物, 内层含水相含有生物学可接受的和有效量的抗原。本发明的构成(其中外层含水相中含有特定分子量的聚乙二醇衍生物)能够制备 W/O/W 型油佐剂疫苗, 这种油佐剂疫苗显示高佐剂作用、降低的副作用(如局部反应)、优越的制剂稳定性和优越的可使用性, 使得注射由于降低了粘度而变得容易。

1、一种W/O/W型油佐剂疫苗，含有外层含水相和内层含水相，外层含水相含有重量百分比为0.5-20%的、分子量为400-10,000的、用下式 I 表示的聚乙二醇衍生物，



式中 R^1 和 R^2 可以相同或不同，并且每一个可以是氢原子或1-4个碳原子的烷基， n 是聚合度，内层含水相含有生物学可接受的、有效量的抗原。

2、权利要求1的油佐剂疫苗，其中，式 I 的聚乙二醇衍生物的分子量为1,000-10,000。

3、权利要求1的油佐剂疫苗，其中，外层含水相含有重量百分比为1-10%的式 I 的聚乙二醇衍生物。

4、权利要求1的油佐剂疫苗，其是一种W/O/W型油佐剂疫苗，通过下列步骤制备：

(a)制备含有在室温下变为液体的油成分A、乳化剂B和含有生物学可接受、有效量的抗原的含水组分C的W/O乳剂，和

(b)在含有乳化剂D和含水组分E的液体中分散或乳化这种W/O乳剂，其中的液体含有重量百分比为0.5-20%的分子量为400-10,000的式I所示的聚乙二醇衍生物。

5、权利要求1的油佐剂疫苗，它是一种通过以下步骤制备的W/O/W型油佐剂：

(a)制备含有在室温下变为液体的油成分A、乳化剂B和含有生物学可接受和有效量的抗原的含水组分C的W/O乳剂，

(b)在含有乳化剂D和含水组分E的液体中分散或乳化这种W/O乳剂，和

(c)往外水相中加入分子量为400-10,000的、式I所示的聚乙二醇衍生物至浓度达到重量百分比为0.5-20%。

6、权利要求4或5的油佐剂疫苗，其中，在室温下变为液体的油成分A含有比例为不小于油相的重量百分比20%的脂肪酸酯或角鲨烯，或脂肪酸酯和角鲨烯。

7、权利要求4或5的油佐剂疫苗，其中，乳化剂B的HLB小于10。

8、权利要求7的油佐剂疫苗，其中，乳化剂B含有至少一种选自下列的成分：多元醇与脂肪酸的偏酯和带有聚氧乙烯链的非离子表面活性剂。

9、权利要求4或5的油佐剂疫苗，其中，乳化剂D的HLB不小于10。

10、权利要求9的油佐剂疫苗，其中，乳化剂D含有带有聚氧乙烯链的非离子表面活性剂。

油佐剂疫苗

本发明涉及油佐剂疫苗。更具体地说，本发明涉及作为制剂在佐剂作用和稳定性方面优越的W/O/W(水/油/水)型油佐剂疫苗。

长期以来都知道油佐剂疫苗可以有效地增强免疫性。尤其是弗氏佐剂，当使用灭活抗原时表现出特别优越的免疫加强作用，是一种动物试验中广泛使用的有代表性的佐剂。但是由于这种佐剂也引起强副作用如严重的脓肿和肉芽肿，它仅在试验室中使用。

因此，已经做出很多努力以降低这类副作用以便在一般的应用中使用油佐剂。油佐剂有各种制剂类型，诸如W/O油型(如弗氏佐剂)、O/W型(安全性优越)、复合的W/O/W型等。

例如，JP-B-6-81731讲述了一种W/O型油佐剂，含有作为表面活性剂的无水甘露糖醇油酸酯和作为油组分的石蜡油，WO 91/00107(以Kohyo No. 4-506521在PCT公开的日本专利申请)讲述了低粘度W/O型油佐剂，含有可代谢的油如植物油和不可代谢的油如矿物油结合在一起作为油组分。

此外，WO 90/14837公开了一种含有亚微米油滴乳剂的作为佐剂制剂的O/W型佐剂，而EP-A-315153公开了一种含有POP-POE嵌段聚合物和作为免疫刺激剂的糖肽的乳化剂的O/W型疫苗佐剂。

在这些佐剂中，W/O型油佐剂显示高免疫增强作用，但由于这种制剂的连续油相而在注射部位有驻留的倾向。在不少的情形中，这种W/O型油佐剂在接种部位附近产生无菌脓肿和肉芽肿，并且在接种期间可能引起剧烈的疼痛。因此，这种类型的油佐剂在作为允许直接给身体接种的制剂使用时有局限性。O/W型油佐剂在注射部位显现轻的局部反应并且稳定性优越。然而，因为抗原是包含在连续相中的，它很快在注射部位分散，难以提供充分的疗效，常常需要特殊的免疫刺激剂。

鉴于上述情形，近年来一直研究新型油佐剂—W/O/W型油佐剂。

例如，WO 91/00106公开了W/O/W型多相乳剂，在注射后接触动物体温时变成W/O油型。这个技术不能解决所有与传统W/O型油佐剂相关的问题，例如

局部反应等，因为油佐剂在体内以W/O型佐剂的形式存在。

因为W/O/W型油佐剂呈复合乳剂的形式，当与W/O型和O/W型油佐剂比较时，作为制剂的稳定性不容易保持。因此，期待W/O/W型油佐剂疫苗同时表现出W/O型所具备的优越的佐剂性和O/W型优越的安全性的特征，在能够开发出一种可以展现这两种类型的良好平衡特征的油佐剂之前，有许多待解决的问题。

在专利US 5 814 321中，本发明人曾经指出一种安全性和制剂稳定性优越的W/O型油佐剂疫苗和一种通过在含水相中分散W/O疫苗获得的W/O/W型油佐剂疫苗。

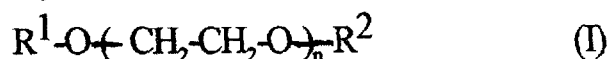
但是，用传统技术制备的W/O/W型油佐剂疫苗，根据配方和制备方法，表现出巨大的性能差异。与这些问题相关的是，抗原成分有时候惊人地增加粘度而免疫性的稳定传入作用却不如W/O型油佐剂。

因此，本发明的目的是提供作为制剂的贮存稳定性和注射部位局部反应性改善的W/O/W型油型佐剂疫苗，它显现高的免疫作用。

根据本发明，提供W/O/W型油型佐剂疫苗，它在外层含水相中含有特定量的特定分子量的聚乙二醇衍生物，这种疫苗表现出作为制剂的高稳定性、在局部反应等方面安全性优越，以及高的免疫增强作用。

因此，本发明提供以下各项：

(1)一种含有外层含水相和内层含水相的W/O/W型油佐剂疫苗，外层含水相含有0.5-20(重量)%的分子量400-20,000的用下式 (I)表示的聚乙二醇衍生物，



式中 R^1 和 R^2 可以相同或不同，并且每一个可以是氢原子或1-4个碳原子的烷基， n 是聚合度，内层含水相含有生物学可接受的和有效量的抗原。

(2)上述(1)的油佐剂疫苗，其中式(I)聚乙二醇衍生物的分子量为1,000-10,000。

(3)上述(1)的油佐剂疫苗，其中外水相含有1-10 (重量)%的式(I)的聚乙二醇衍生物。

(4)上述(1)的油佐剂疫苗，这是一种通过分散或乳化W/O乳剂制备的W/O/W型油佐剂疫苗，W/O乳剂通过在含有乳化剂(D)和含水组分(E)的液体中分散或乳化在室温下变为液体的油成分(A)、乳化剂(B)和含有生物学可接受和有效量的抗原的含水组分(C)来制备，其中的液体含有0.5-20%(重量)的分子量400-20,000的

式(I)的聚乙二醇衍生物。

(5)上述(1)的油佐剂疫苗,这是一种W/O/W型油佐剂,通过在含有乳化剂(D)和含水组分(E)的液体中分散或乳化在室温下变为液体的油成分(A)、乳化剂(B)和含有生物学可接受和有效量的抗原的含水组分(C)来制备,然后往外水相加入分子量400-20,000的式(I)的聚乙二醇衍生物,浓度达到0.5-20(重量)%。

(6)上述(4)或(5)的油佐剂疫苗,其中在室温下变为液体的油成分(A)含有比例不小于油相20(重量)%的脂肪酸酯和/或角鲨烯。

(7)上述(4)或(5)的油佐剂疫苗,其中乳化剂(B)的HLB小于10。

(8)上述(7)的油佐剂疫苗,其中乳化剂(B)含有至少一种选自下列的成分:多元醇与脂肪酸的偏酯和带有聚氧乙烯链的非离子表面活性剂。

(9)上述(4)或(5)的油佐剂疫苗,其中乳化剂(D)的HLB不小于10。

(10) 上述(9)的油佐剂疫苗,其中乳化剂(D)含有带有聚氧乙烯链的非离子表面活性剂。

本发明的油佐剂疫苗通过在含有乳化剂(D)和含水组分(E)的液体中分散或乳化(步骤2)用在室温下变成液体的油组分(A)、乳化剂(B)和含有生物学可接受的有效量的抗原的含水组分(C)制备(步骤1)的W/O乳剂,其中最终获得的W/O/W型油佐剂疫苗的外层含水相含有特定量的具有特定分子量的聚乙二醇衍生物。

室温下变成液体的油成分(A)构成在步骤1中制备的W/O乳剂的连续相,并构成一种油相,这种油相变成在步骤2中获得的W/O/W型油佐剂疫苗的分散相。在本发明中,油相是指在这种W/O/W型油佐剂疫苗中的油相。在本说明书中,“在室温下”是指15-25℃范围的温度。室温下变成液体的油成分(A)可以选用食品、药物、化妆品等常规使用的酯和非酯油基,它们在室温下变成液体。

在室温下变成液体的非酯油基可以是,诸如轻石蜡油、角鲨烯、角鲨烷、聚丁烯等的烃类;诸如饱和中链脂肪酸(如辛酸、癸酸等)之类的脂肪酸;长链不饱和脂肪酸(如油酸、亚油酸、亚麻酸等);中链或长链脂肪醇等。室温下变成液体的酯油基的例子包括由饱和中链脂肪酸如辛酸和癸酸衍生的各种脂肪酸酯,或不饱和长链脂肪酸如油酸和亚油酸和醇,以及天然的脂肪酸酯,如液体植物油(如花生油、橄榄油、红花油、向日葵油、西蒙得木油等),来自动物的液体油,如orange roughy油等。

作为油成分(A), 可以使用上述例子中的一个, 或者将上述例子中的二个或多个混合使用。这些油成分中, 如脂肪酸酯、植物油和角鲨烯之类的油, 从作用方面看具有较高的抗氧化作用和较高的身体亲和力。因此, 作为用于本发明的油佐剂疫苗的油成分, 优选这些油中的一种或多种。具体的说, 作为脂肪酸酯, 优选也是生物脂质构成成分的16-22个碳原子的顺- Δ^9 -不饱和脂肪酸和有1-3个碳原子的醇的酯化化合物构成的油基。

此外, 通过使油相中脂肪酸酯和/或角鲨烯含量的比例至少不小于20(重量)%, 最终的油佐剂疫苗还可以进一步降低副作用如局部反应等并提高安全性。当脂肪酸酯与角鲨烯共同使用时, 其总量应该至少不小于油相的20(重量)%。

在本发明中, 可以选用常规用于药品和食品的对身体显示高安全性的一种或多种表面活性剂, 作为构成油佐剂疫苗的乳化剂(B)和乳化剂(D)。

在步骤1中使用乳化剂(B), 用于制备由含有抗原和油成分(A)的含水组分(C)组成的W/O乳剂。

考虑到最终W/O/W型油佐剂疫苗的稳定性, 作为乳化剂(B)使用的表面活性剂优选是亲油的。即, 优选比较小的HLB(Hydrophilic-Lipophile Balance亲水-亲油平衡), 尤其优选HLB小于10。乳化剂(B)可以是单一种类的或二种或多种混合的。对于这种情形, 乳化剂(B)优选使总的HLB小于10。

更具体的说, 使用多元醇与脂肪酸的偏酯, 例如脱水山梨醇脂肪酸酯(如一油酸脱水山梨醇酯、二油酸脱水山梨醇酯、倍半油酸脱水山梨醇酯等), 甘油脂肪酸酯(如甘油一油酸酯等), 聚甘油脂肪酸酯(如二甘油一油酸酯、二甘油二油酸酯等)等, 在分子中带有聚氧乙烯链的非离子表面活性剂, 如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(聚山梨醇酯)[如, 聚氧乙烯(20)脱水山梨醇一油酸酯等], 聚氧乙烯氢化蓖麻油, 聚氧乙烯聚氧化丙烯乙二醇等。也可以使用含有天然卵磷脂的甘油磷脂(glycerophospholipid)。

其中, 分子中有3-10个羟基的多元醇, 如脱水山梨醇、甘油和聚甘油, 与有12-20个碳原子的脂肪酸的偏酯, 与加入聚氧乙烯链的羟基脂肪酸三甘油酯(其代表是聚氧乙烯氢化蓖麻油), 尤其可以结合使用, 使乳化剂(B)的总HLB小于10。以这种方式, 可以得到作为制剂稳定性更加优越的W/O/W型油佐剂疫苗。

在本发明的说明书中,HLB按照由W.C.Griffin[W.C.Griffin,《化妆品、药剂师会志》(J. Soc. Cosmetic. Chemists), 1, 311(1949)]提议的公式确定。

为了制备本发明的油佐剂疫苗,将乳化剂组合物作为构成W/O乳剂的一种组分与上述乳化剂(B)一起使用以增大油佐剂的效力和制剂的稳定性,W/O乳剂含有抗原溶液(抗原溶液通过先将氨基酸或其盐与含有非还原糖或分子中至少有5个羟基的糖醇的水溶液混合来制备),和有3个或多个羟基的多元醇与脂肪酸的偏酯(这是一种在室温下变成液体的非离子表面活性剂)。氨基酸或其盐,和所用的呈水溶液形式的糖或糖醇,可以从在日本药典和日本药典药物(Japanese Pharmacopoeia and Japanese Pharmaceutical Codex)中所列的食品、药品中常规使用的那些中选择。这里所使用的抗原溶液可以呈任何形式,只要它是液态的,而例子有溶液、悬浮液等。例如,氨基酸或其盐可以是甘氨酸、丙氨酸、精氨酸盐酸盐、组氨酸、苯丙氨酸、门冬氨酸钠、门冬氨酸钾、谷氨酸钠、谷氨酸钾或它们的水合物,其中糖和糖醇优选选自海藻糖、木糖醇、山梨醇、甘露糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇等。

上述乳化剂组合物是通过制备含有上述氨基酸或其盐和上述糖或糖醇的水溶液,并将这种水溶液与上述非离子表面活性剂以10:1 - 1:1(水溶液:表面活性剂)的重量比混合和搅拌得到的。该乳化剂组合物用量比例是含有抗原溶液的W/O乳液的约1-20(重量)%,优选约2-10(重量)%。

乳化剂(D)在步骤(2)中用于将上述W/O乳剂在含有乳化剂(D)和含水组分(E)的液体中分散或乳化。

考虑到最终的W/O/W型油佐剂疫苗的稳定性,作为乳化剂(D)使用的表面活性剂优选亲水的和具有较高HLB值的,尤其优选HLB至少不小于10。这种乳化剂(D)可以单独使用或按照需要混合使用。在此情形中,乳化剂(D)优选使总HLB不小于10。

更具体的说,使用分子中有聚氧乙烯链的和HLB不小于10的非离子表面活性剂,例如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚氧乙烯聚氧化丙烯二醇等。这些表面活性剂可以与多元醇和脂肪酸的偏酯结合使用,例如脱水山梨醇脂肪酸酯、甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯等,以及含有天然的卵磷脂的甘油磷脂。其中,尤其是聚氧乙烯聚氧化丙烯二醇单独使用或与其它表面活性剂的结合使用能够使W/O/W型油佐剂疫苗具有优越的

制剂稳定性。

作为乳化剂(B)或乳化剂(D)使用的甘油磷脂可以是,例如天然的磷脂,如从蛋黄和大豆提取和纯化的磷脂以及它们的氢化加成化合物,和各种合成的磷脂和其中酰基部分和碱基部分已经被调节的溶血磷脂。

在本发明的W/O/W型油佐剂疫苗中,含水组分(C)构成含水相,含水相是在步骤(1)中制备的W/O乳剂中的分散相并且构成分散于油相中的内层含水相,油相是在最终W/O/W型油佐剂疫苗中分散相。含水组分(C)含有各种抗原。

包含在含水组分(C)中的抗原可以是各种类型的并可以呈各种形式。更具体的说,常规使用的灭活细胞、灭活病毒颗粒、灭活支原菌,以及病原体感染预防因子,如用于亚单元疫苗的附着蛋白、包膜抗原等,都可以使用。灭活的细胞可以是革兰氏阴性菌如大叶性肺炎放线杆菌、大肠杆菌等,革兰氏阳性菌如猪丹毒丝菌等。灭活的病毒颗粒的病毒包括,例如日本脑炎病毒等。灭活支原菌属的支原菌属的例子有猪或鸡的支原菌属。作为病原体感染预防因子,例子有纽卡斯尔病病毒的F蛋白。也可以使用含有多个抗原的复合疫苗。

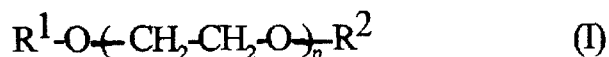
除了抗原之外,本发明的油性佐剂疫苗可以含有非抗原的有效成分,如抗生素。抗生素的例子包括硫酸卡那霉素,盐酸氧四环素等。

在含水组分(C)中生物学可接受的和有效量的抗原由所使用的抗原的目的和种类适当地确定。

在本发明中,上述抗原是包含在内层含水相中的。在本发明的W/O/W型油佐剂疫苗的制备过程期间,即使有一部分抗原漏出进入外层含水相,本发明的疗效也不减少。

在本发明中,含水组分(E)构成W/O/W型油佐剂疫苗的外层含水相。更具体的说,含水组分(E)适当地考虑最终佐剂疫苗的稳定性和对身体的安全性来选择。例如使用生理盐水、磷酸盐缓冲的生理盐水等。

根据本发明,在油佐剂疫苗的外层含水相中所含的聚乙二醇衍生物用下式(I)表示:



式中 R^1 和 R^2 可以相同或不同,并且每一个可以是氢原子或1-4个碳原子的烷基, n 是聚合度。

在上述式(I)中,在 R^1 和 R^2 处的有1-4个碳原子的烷基可以是直链或支链的,

例子有甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。合适的 R^1 和 R^2 是氢原子、甲基和乙基，其中氢原子特别适用。 R^1 和 R^2 合适的组合是氢原子与氢原子、氢原子与甲基、氢原子与乙基、甲基与甲基等。氢原子与氢原子的组合特别适用。 n 是使分子量在400-20,000范围内的聚合度。

上述式(I)的聚乙二醇衍生物的分子量为400-20,000，优选1,000-10,000，特别优选3,000-9,000。它在外层含水相中的含量是该相的0.5-20(重量)%，优选1-10(重量)%，更优选1-5(重量)%。

当聚乙二醇衍生物的分子量小于400或含量小于0.5(重量)%时，不能获得足够的粘度降低作用。此外，作为佐剂的作用会消弱。当聚乙二醇衍生物的分子量超过20,000时，外层含水相本身的粘度增加，这本身又增大了油佐剂疫苗整体的粘度，从而提供不了充分降低粘度的作用。当含量超过20(重量)%时，内层含水相和外层含水相表现出完全不同的渗透压。因此不能提供稳定的W/O/W型乳剂，这反而可能使稳定的油佐剂疫苗的制剂无法获得。

在本发明中，较高分子量的上述聚乙二醇衍生物导致较高粘度的外层含水相，其结果是油佐剂疫苗具有较高的粘度。需要按照聚乙二醇衍生物的分子量将其含量调节至上述范围内。

根据本发明，上述列举的分子量在400-20,000范围内的聚乙二醇衍生物，可以单独使用或者将具有不同分子量的二种或多种衍生物联合使用。

考虑到作为制剂的稳定性和最终油佐剂疫苗的佐剂作用，聚乙二醇衍生物优选分子量为1,000-10,000并且在外层含水相中的含量比为该相的1-10(重量)%，优选1-5(重量)%。

根据本发明所制备的油佐剂疫苗的特征在于，优良的佐剂作用和较低的粘度，这归功于聚乙二醇衍生物是存在于外层含水相中。一般说来，由于在内层含水相中所含物质的作用，由于在内层含水相与外层含水相中含有不同的物质，W/O/W型乳剂常常表现出快速增长的粘性和水/油颗粒的结团作用。具体地讲，用于油佐剂疫苗的抗原溶液可以含有各种高浓度的组分，例如细胞成分和介质成分。因此，对于作为W/O/W型油佐剂疫苗的使用，具有相同组成的W/O/W型乳剂可以表现太另人惊异的粘度和稳定性的不同等级，这是归咎于在抗原溶液中所使用的其它成分的作用。这提出了一个严重的问题，尤其当将多种抗原混合制作作疫苗时，因而需要在疫苗生产和调节时采用一切手段避免

之。但是，在本发明中，聚乙二醇衍生物是包含在外层含水相中以减低粘度的，与内层含水相的组成和成分无关，这本身即克服了这些问题。当一种油佐剂疫苗具有高粘度时，在给身体施药时其可使用性便成了问题，这又造成在身体中扩散性降低并引起不利的后果，例如局部反应，以及在注射部位残留疫苗。通过将聚乙二醇衍生物加入到外层含水相中，这些方面也可以获得改善。

影响水/油/水型油佐剂性能的一个主要因素是在外层含水相中所含W/O乳剂的粒度。一般的说，在外层含水相中所含水/油乳剂的粒度大的时候，这种W/O/W型油佐剂接种后表现出W/O型油佐剂的性能。这意味着佐剂的作用变得很大但副作用如局部反应也变得很强。此外，颗粒有结团的倾向从而降低了作为制剂的稳定性。相反，当W/O乳剂含有比较小的颗粒时，制剂有较高的稳定性、减低的副作用和较弱的佐剂作用。即使当W/O乳剂颗粒比较小时本发明制备的W/O/W型油佐剂疫苗仍表现出高免疫增强作用。因此，本发明的疫苗表现出作为制剂的较高的稳定性、较少和较低水平的副作用和优越的效力。从作为制剂的稳定性和副作用的降低方面看，构成W/O/W型油佐剂疫苗的基本上所有的W/O乳剂颗粒的尺寸优选不大于50微米而平均粒度不大于20微米。

本发明的油佐剂疫苗的制备方法没有特别的限制，并且可以是已知的方法。当制备本发明的油佐剂疫苗时，在步骤1中制备的W/O乳剂优选含有一种油成分(A)，比例为30-90(重量)%，优选40-80(重量)%，一种乳化剂(B)，比例为1-20(重量)%，优选2-15(重量)%，和一种含有抗原的含水组分(C)，比例为5-75(重量)%，优选15-60(重量)%，都相对W/O乳剂计。乳化剂(D)在步骤2中使用，比例为0.1-20(重量)%，优选0.5-10(重量)%，以乳化剂(D)、含水组分(E)和聚乙二醇衍生物的总重量计。

W/O乳剂(在步骤1中制备)与含有乳化剂(D)以及在步骤2中的含水组分(E)的液体的混合比按照目标或选定的抗原种类确定。重量比优选为，W/O乳剂 : 含有乳化剂(D)和含水组分(E)的液体 = 2 : 1 - 1 : 10，优选 2 : 1 - 1 : 5。

根据本发明，通过部分或全部将上述分子量400-20,000的式(I)的聚乙二醇衍生物先加入到上述含乳化剂(D)和含水组分(E)之中，将聚乙二醇衍生物加入到外层含水相中。另一种方法是，制备W/O/W型油佐剂并将分别溶于水、生理盐水或缓冲液中的聚乙二醇衍生物加入。聚乙二醇衍生物的加入量如上述。

当制备含有多种抗原的油佐剂疫苗时，制备在内含水相含有每一种抗原的

水/油乳剂，混合之并分散于含乳化剂(D)和含水组分(E)的液体中，如后所示。另一种方法是，制备任何数量的抗原W/O/W型油佐剂并混合之，如后所述。

本发明的油佐剂疫苗作为药品可以含有在佐剂活性中不直接相关的各种添加剂，如缓冲剂、防腐剂、渗透压调节剂等。

为了制备本发明的油佐剂疫苗，可以使用任何能够进行乳化的装置，用来制备在内层含水相中含有抗原的W/O乳剂(步骤1)和用来分散或乳化在含有乳化剂(D)和含水相(E)的液体中的W/O乳剂(步骤2)，可以使用典型的乳化装置(例如，均化器、均质器CLEARMIX(M TECHNIQUE制造)等)、使用多孔膜的薄膜乳化装置、高压喷射乳化装置等。必要时，将构成本发明的油佐剂疫苗的W/O乳剂通过膜过滤器使颗粒的尺寸小于某一水平。

不过，在制备疫苗时，待使用的每一组成都可以先进行消毒处理，例如，依照其性质通过加热消毒或通过过滤消毒。

当本发明制备的油佐剂疫苗施用到身体上时，采用适当的施药途径，例如皮下、肌内和腹膜内注射，以及通过鼻腔粘膜和肠内腔给药。剂量和施药频率按照有关领域中通常所使用的方法确定以获得希望的免疫效果。

本发明通过参照说明性的例子进行详细解释。无论怎样本发明不受这些例子的限制。

在以下的例子中，使用聚乙二醇(下文也称之为PEG或Macrogol)作为聚乙二醇衍生物。

[油佐剂疫苗的制备]

下面每一实施例中所使用的油佐剂疫苗通过使用CLEARMIX CLM-0.8S(M TECHNIQUE)用下述方法制备。乳化作用在室温下完成并且在必要时使用冷却水。下列组合物中的每一种组成采用适当的消毒方法进行消毒处理。搅拌、乳化等每一种操作在无菌环境下完成。在实施例中，“份”是指“重量份”。

在下面的油佐剂疫苗的制备中，“外层含水相”是指要与W/O乳剂混合用于制备W/O/W型油佐剂疫苗的液体。

《实施例1：疫苗1的制备》

按照在表1中W/O-1的组成，将除了抗原悬浮体之外的每种组分称重并放置在烧杯中。在使用前将聚氧乙烯氢化蓖麻油加热到50℃并溶解。将谷氨酸钠和山梨醇的水溶液与脱水山梨醇倍半油酸酯以重量比1/1进行混合、搅拌并且加

入。将剩余的脱水山梨醇倍半油酸酯加入。伴随搅拌逐渐将抗原悬浮体加入并在常温下在CLEARMIX CLM-0.8S (M TECHNIQUE)中,以12,000 rpm搅拌混合5分钟以获得W/O型乳剂(W/O-1)。

按照在表3中外层含水相1的组成,将每种组分溶于磷酸盐缓冲的盐水(BPS, pH 7.4)中(外层含水相1)。将上述W/O-1(1份)和外层含水相1(1份)在烧瓶中称重并使用CLEARMIX CLM-0.8S以9,000 rpm混合5分钟以获得油佐剂疫苗1。在下面的实施例和对比例中,除非另有说明,W/O乳剂和外层含水相是在与实施例1疫苗制备相同的条件下进行混合。

《实施例2: 疫苗2的制备》

称重在实施例1中制备的W/O型乳剂(W/O-1, 1份)和按照在表3中外层含水相2的组成制备的外层含水相2(1份)并制备油佐剂疫苗2。

《实施例3: 疫苗3的制备》

按照在表1中W/O-2的组成,将除了抗原悬浮体之外的每种组分在烧杯中称重。在使用前将聚氧乙烯氢化蓖麻油加热到50℃并溶解。将日本药典Macrogol 6000先均匀地溶于抗原悬浮体中。在与实施例1中相同的条件下制备W/O型乳剂(W/O-2)。

然后,称重W/O-2(3份)和按照在表3中外层含水相3的组成制备的外层含水相3(2份)并制备油佐剂疫苗3。

《实施例4: 疫苗4的制备》

按照在表3中外层含水相4的组成,称重每种组分。将各组分加热到约60℃,充分混合、分散并冷却到室温以用作外层含水相4。然后,称重在实施例3中制备的W/O型乳剂(W/O-2, 1份)和外层含水相4(3份),并制备油佐剂疫苗4。

《实施例5: 疫苗5的制备》

按照在表1中W/O-3的组成,将除了抗原溶液之外的每种组分在烧杯中称重。以与实施例1相同的方式,将抗原悬浮体逐渐加入并同时搅拌混合物并以与实施例1相同的方式制备W/O型乳剂(W/O-3)。

然后,在烧瓶中称重这种W/O型乳剂(W/O-3, 2份)和外层含水相2(3份)并制备油佐剂疫苗5。

《实施例6: 疫苗6的制备》

将按照实施例5制备的W/O型乳剂(W/O-3, 2份)和按照在表4中外层含水

相5的组成制备的外层含水相5(2份)称重, 并使用CLEARMIX CLM-0.8S以9,000 rpm混合5分钟以获得一种乳剂。将日本药典Macrogol 6000溶于PBS中, 达到10(重量)%的浓度, 并将制成的溶液(1份)加入。将混合物轻轻搅拌以得到油佐剂疫苗6。

《实施例7: 疫苗7的制备》

按照在表2中W/O-4的组成, 将除了抗原悬浮体之外的每种组分在烧杯中称重。以与实施例1相同的方式, 使用CLEARMIX CLM-0.8S, 制备W/O型乳剂(W/O-4)。

然后, 称重W/O-4(1份)和按照表3中外层含水相4的组成制备外层含水相4(1份)并制备油佐剂疫苗7。

《实施例8: 疫苗8的制备》

按照在表2中W/O-5的组成, 将除了抗原悬浮体之外的每种组分在烧杯中称重。在使用前将聚氧乙烯氢化蓖麻油加热到60℃并溶解。伴随搅拌将抗原悬浮体逐渐加入并以与实施例1相同的方式制备W/O型乳剂(W/O-5)。

然后, 称重W/O-5(1份)和外层含水相2(1份)并制备油佐剂疫苗8。

《实施例9: 疫苗9的制备》

按照在表2中W/O-6的组成, 将除了抗原悬浮体之外的每种组分在烧杯中称重。将蛋黄卵磷脂均匀地溶于油相中并且在使用前将聚氧乙烯氢化蓖麻油加热到60℃并溶解。伴随搅拌将抗原悬浮体逐渐加入并以与实施例1相同的方式制备W/O型乳剂(W/O-6)。

然后, 称重W/O-6(3份)和外层含水相3(2份)并制备油佐剂疫苗9。

《对比实施例1: 疫苗10的制备》

称重在实施例1中制备的W/O-1(1份)和在表4所示的外层含水相5(1份)并制备油佐剂疫苗10。

《对比实施例2: 疫苗11的制备》

称重在实施例1中制备的W/O-1(1份)和在表4所示的外层含水相6(1份)并制备油佐剂疫苗11。

《对比实施例3: 疫苗12的制备》

称重在实施例3中制备的W/O-2(3份)和在表4所示的外层含水相7(2份)并制备油佐剂疫苗12。

《对比实施例4：疫苗13的制备》

称重 in 实施例5中制备的W/O-3(2份)和在表4所示的外层含水相5(3份)并制备油佐剂疫苗13。

《对比实施例5：疫苗14的制备》

称重 in 实施例7中制备的W/O-4(1份)和在表4所示的外层含水相8(1份)并制备油佐剂疫苗14。

《对比实施例6：疫苗15的制备》

称重 in 实施例8中制备的W/O-5(1份)和在表4所示的外层含水相6(1份)并制备油佐剂疫苗15。

《对比实施例7：疫苗16的制备》

称重 in 实施例9中制备的W/O-6(3份)和在表4所示的外层含水相7(2份)并制备油佐剂疫苗16。

用于各实施例和对比实施例的疫苗所用的W/O乳剂的成分列于表1和2中，外层含水相的成分列于表3和4中，各疫苗的W/O乳剂与外层含水相的混合比列于表5中。

表1: W/O乳剂1的成分

加入的组分	混合比(重量%)		
	W/O-1	W/O-2	W/O-2
化合物			
油酸乙酯	40	-	-
角鲨烯	-	55	20
纯化的大豆油	-	-	15
脱水山梨醇倍半油酸酯	10	10	10
聚氧乙烯(20)氢化蓖麻油 ^{*1)}	-	-	5
聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油 ^{*1)}	5	3	-
聚氧乙烯(20)氢化蓖麻油 ^{*1)}	-	2	-
谷氨酸钠和山梨醇的水溶液 ^{*2)}	5	-	-
抗原悬浮体	40	29	50
日本药典Macrogol 6000 ^{*3)}	-	1	-
总计	100	100	100

*1)圆括号中的数字表示加入的氧化乙烯的平均摩尔数。

*2)通过将谷氨酸钠一水合物(25克)和山梨醇(10克)溶于蒸馏水中制备的水溶液(100 毫升)。

*3)Mcrogol先溶于抗原悬浮体中。

表2: W/O乳剂-2的成分

加入的组分	混合比(重量%)		
	W/O-4	W/O-5	W/O-6
油酸油醇酯	40	-	30
角鲨烯	-	-	20
肉豆蔻酸异丙基酯	-	60	-
纯化的蛋黄卵磷脂	-	-	2
甘油一油酸酯	15	10	8
聚氧乙烯(10)氢化蓖麻油 ^{*1)}	5	5	-
聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油 ^{*1)}	-	5	5
抗原悬浮体	40	20	35
总计	100	100	100

*1)圆括号中的数字表示加入的氧化乙烯的平均摩尔数。

表3：油佐剂疫苗1的外层含水相的成分

加入的成分	混合比(重量%)			
	外层含水相1	外层含水相2	外层含水相3	外层含水相4
聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油 ^{*1)}	2	-	-	2
聚氧乙烯(20)脱水山梨醇一油酸酯 ^{*1)}	-	-	2	-
聚氧乙烯(196)聚氧化丙烯(67)二醇 ^{*1)}	1	3	-	-
纯化的蛋黄卵磷脂	-	-	-	2
Macrogol 1000 ^{*2)}	-	-	-	1
日本药典Macrogol 4000	-	4	1	-
日本药典Macrogol 6000	3	-	1	-
磷酸盐缓冲盐水(PBS)	94	93	96	95
总计	100	100	100	100

*1)圆括号中的数字表示加入的氧化乙烯的平均摩尔数。

*2)日本药物赋形剂认可的产品。

表4：油佐剂疫苗2的外层含水相的成分

加入的成分	混合比(重量%)			
	外层含水相5	外层含水相6	外层含水相7	外层含水相8
聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油*1)	2	-	-	2
聚氧乙烯(20)脱水山梨醇一油酸酯*1)	-	-	2	-
聚氧乙烯(196)聚氧化丙烯(67)二醇*1)	1	3	-	-
纯化的蛋黄卵磷脂	-	-	-	2
磷酸盐缓冲盐水(PBS)	97	97	98	96
总计	100	100	100	100

*1)圆括号中的数字表示加入的氧化乙烯的平均摩尔数。

表5: 用于每一种疫苗制剂的W/O乳剂和外层含水相

以及所加入的量 疫苗序号		W/O乳剂	外层含水相
实施例	疫苗1	W/O-1(1份)	外层含水相1(1份)
	疫苗2	W/O-1(1份)	外层含水相2(1份)
	疫苗3	W/O-2(3份)	外层含水相3(2份)
	疫苗4	W/O-2(1份)	外层含水相4(3份)
	疫苗5	W/O-3(2份)	外层含水相2(3份)
	疫苗6	W/O-3(2份)	外层含水相5(2份)Macrogol溶液(1份)*1)
	疫苗7	W/O-4(1份)	外层含水相4(1份)
	疫苗8	W/O-5(1份)	外层含水相2(1份)
	疫苗9	W/O-6(3份)	外层含水相3(2份)
对比 实施 例	疫苗10	W/O-1(1份)	外层含水相5(1份)
	疫苗11	W/O-1(1份)	外层含水相6(1份)
	疫苗12	W/O-2(3份)	外层含水相7(2份)
	疫苗13	W/O-3(2份)	外层含水相5(3份)
	疫苗14	W/O-4(1份)	外层含水相8(1份)
	疫苗15	W/O-5(1份)	外层含水相6(1份)
	疫苗16	W/O-6(3份)	外层含水相7(2份)

*1)制备方法的详情见说明书中的实施例6。

[免疫性实验]

将含有各种抗原的油佐剂疫苗进行免疫性实验。在各个实验实施例中所使用的疫苗的符号与在上述实施例和对比例中所使用的那些相对应。

《实验实施例1: 猪丹毒丝菌(Er) 灭活的疫苗》

在含有5%牛血清和脑心浸渍肉汤(BHIB)的培养基中, 将猪丹毒丝菌SE-9菌株[美国菌种保藏中心]的培养物用福尔马林灭活制备抗原。使用这种抗原制备疫苗1、3、5、7、10、12和14。为了做制剂, 用磷酸盐缓冲的盐水(PBS)将每一种疫苗的抗原浓度调节到 5.0×10^8 CFU/ml。对每一种疫苗制备含有用PBS代替抗原溶液的安慰剂。每一种疫苗用相应的安慰剂稀释得到5倍系列稀释物。作为对照, 制备不完全弗氏佐剂(IFA), 其中往IFA的内层含水相中以5%的

IFA内层含水相的比例加入PEG 1000的佐剂(IFA-PEG), 和含有作为佐剂的氢氧化铝凝胶的疫苗。

将每一种疫苗(或稀释的疫苗) 皮下接种到5周大的未染病的小鼠(每组5只)的内股(0.25毫升/小鼠)。免疫接种后3周, 每一只小鼠的内股皮下注射(2.2×10^6 CFU/0.1毫升/小鼠)Er Fujisawa菌株[Japanese Association of Veterinary Biologics (JAVB)]。注射后, 对小鼠的存活监视10天, 并计算50%存活疫苗稀释物倍数, 用PD50表示。免疫处理2周后, 给小鼠接种未稀释的疫苗和5倍稀释的疫苗(每一种配方10只鼠)并用触诊检查注射部位以确定硬结的程度。硬结的程度用5级(0: 无, 1: 轻-4严重)记分并且对每一种配方计算平均值。

将这个时候制备的W/O/W型油佐剂疫苗用激光衍射粒度分析仪SALD-2100(SHIMADZU CORPORATION)测量平均粒度。

效力(PD50)汇总于表6中。

表6: 猪丹毒 -小鼠免疫试验结果(实验实施例1)

	实验结果(存活鼠/试验鼠)							PD50
	未稀释 疫苗	×	×	×	×	×	×	(倍数)
		5	25	125	625	3125	15625	
(免疫组)								
疫苗1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	2660. 4
疫苗3	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	1397. 5
疫苗5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	1928. 2
疫苗7	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397. 5
[对比免疫组]								
疫苗10	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	532.1
疫苗12	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	1/5	0/5	385.7
疫苗14	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	279.5
IFA	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3670.7
IFA-PEG	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
铝凝胶	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	77.1

结果用接种稀释疫苗(或未稀释的疫苗)的存活小鼠的数目和其PD50值表

示。在此使用时，PD₅₀值越大表示效力越高。在免疫组中，疫苗1、3、5、7接种组显示PD₅₀值不小于1300，与IFA相比，表现出优越的效力。相反，免疫对比组(施用疫苗10、12、14和铝凝胶佐剂)显示PD₅₀值为532.1、385.7、279.5和77.1。显然，本发明制备的疫苗显示出值得注意的高PD₅₀值。这些结果证实本发明制备的疫苗具有高效力。

然后，用触诊检查注射部位以确定硬结的程度。W/O/W型油佐剂疫苗的平均粒度与硬结的程度示于表7中。

表7：猪丹毒—小鼠注射部位的局部反应(试验实施例1)

	注射部位的局部反应(平均值)	平均粒度(微米)
[免疫组]		
疫苗1	0.1	6.8
疫苗3	0.2	8.1
疫苗5	0	7.2
疫苗7	0.2	7.9
[对比免疫组]		
疫苗10	0.3	7.5
疫苗12	0.2	8.5
疫苗14	0.8	8.8
IFA	3.8	-
IFA-PEG	3.2	-
铝凝胶	0	-

注射部位局部反应的记分(0：无，1：轻—4严重)

免疫组几乎不显出注射部位的反应，从而表现出高的注射安全性，而且平均粒度不大于7.2 - 8.1或20微米。比较起来，对比免疫组显示几乎相同等级的W/O/W型油佐剂疫苗的平均粒度，而对比免疫组注射部位处的反应除了IFA和IFA-PEG外都较小。但是，在IFA和IFA-PEG注射组中的小鼠生长出严重的硬结，使反应记分非常高，其中，约3/4或更多的接种IFA或IFA-PEG的小鼠受到步态混乱之苦。

上述结果证实本发明的油佐剂疫苗令人惊异地显示出优越的效力并且与铝凝胶一样在注射部位的反应极轻。本发明的疫苗是高度安全的。

《实验实施例2：猪支原体灭活的疫苗》

疫苗2、4、6、11和13用猪肺炎支原体92-28菌株(从野生猪分离的菌株; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute)在用猪血清补充的BHL培养基中培养并且用福尔马林灭活制备。为了做制剂,每一种疫苗的抗原含量用磷酸盐缓冲的盐水(PBS)调节到抗原浓度 8.0×10^8 CCU/ml。把用氢氧化铝凝胶(ALHYDROGEL 85, Superfos, 铝转化9 mg/ml)作为佐剂的一种疫苗(疫苗AL), 和通过将日本药典Macrogol 4000加入到氢氧化铝凝胶中最终浓度达到4%的一种疫苗(疫苗AL-PEG), 调节到相同抗原浓度。

每一种疫苗(2 毫升/猪)给SPF(没有特种病原体)的猪(8只猪/组, 在第一次免疫处理时4周大) 颈肌接种, 间隔2周。第二次免疫处理一周后, 将从感染猪肺炎支原体92-28菌株(从野生猪分离的菌株; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) 的猪得到的肺匀浆施入气管。施药4周后, 给猪做尸体解剖, 并观察肺损害。将各个肺损害记分, 并计算相对于未免疫处理的对照猪由各疫苗引起的损害的降低(%)。

结果示于表8中。

表8: 猪支原体属感染—小鼠免疫实验结果(实施实施例2)

	免疫组			对比免疫组				
	疫苗2	疫苗4	疫苗6	疫苗11	疫苗13	疫苗AL	疫苗AL-PEG	
损害记分 (每一个体)	0	0	0	15.2	16.4	23.6	50.2	5.5
	1.5	2.0	0	0.5	5.5	15.2	16.5	11.8
	0.5	9.6	3.6	9.1	22.0	5.5	22.1	14.5
	16.2	30.2	5.8	4.5	4.58	19.6	25.9	32.7
	2.6	5.5	18.6	14.2	19.5	56.3	30.6	15.9
	9.2	16.3	20.6	23.0	23.3	12.4	11.1	40.2
	3.5	1.5	9.6	38.6	36.2	28.4	9.1	25.5
	19.6	10.5	10.2	10.2	14.4	30	30	45.5
平均值	6.6	9.5	8.6	14.4	17.7	23.9	24.4	24.0
损害降低%	72.3	60.5	64.3	39.8	26.0	0.3	-2.0	-

用疫苗2、4和6接种的免疫组显示损害降低60%或更高, 证实优越的效力。

第二次乳化后加入PEG的疫苗6显示与其它免疫组几乎相同的效果。相反，施用疫苗11和13的对比免疫组显示损害分别降低39.8%和26.0%，而铝凝胶疫苗全然不显示疫苗的损害降低的效果，与PEG的加入与否无关。

上述效果证实即使在使用支原体属作为抗原时，本发明的油佐剂疫苗仍显示出优越的效力。此外，这些结果证实，往外层含水相加入PEG是有效的，不论在第二次乳化之前或之后。

[乳剂粘度的测量]

测量制备好的W/O/W型油佐剂疫苗的粘度。对在上述实验实施例1中制备的猪丹毒丝菌疫苗(疫苗1、3、5、7、10、12、14)，以及按照疫苗2、4、6、8、9、11、13、15和16的配方并使用猪丹毒丝菌属作为抗原制备的各个疫苗进行测量，以便能够在抗原悬浮体相同配方的条件下作比较。粘度在疫苗制备一周后测量，在25℃用E型旋转粘度计(TOKI SANGYO CO., Ltd., RE105H型)。结果示于表9中。

表9：疫苗制剂的粘度

疫苗序号		粘度(mPa · s, 25℃)
实施例	疫苗1	33
	疫苗2	28
	疫苗3	42
	疫苗4	35
	疫苗5	31
	疫苗6	32
	疫苗7	38
	疫苗8	45
	疫苗9	29
对比实施例	疫苗10	153
	疫苗11	161
	疫苗12	206
	疫苗13	187
	疫苗14	470
	疫苗15	396
	疫苗16	315

如表9所示, 实施例的疫苗全都显示在25℃的粘度不大于50 mPa·s。粘度非常低便于注射。相反, 对比实施例的疫苗的粘度不小于150 mPa·s, 迫使注射需要可观的力量和时间。

上述结果表明本发明的W/O/W型油佐剂疫苗由于在外层含水相含有聚氧乙烯衍生物可以具有显著降低的粘度, 由此表明施用本发明的疫苗可以在很大程度上减低操作强度。

[乳剂的包涵率的测量]

测量制备好的W/O/W型油佐剂疫苗的包涵率。对在上述实验实施例2中使用的猪支原体疫苗(疫苗2、4、6、11、13), 以及按照疫苗1、3、5、7、8、9、10、12、14、15和16的配方并且使用上述支原体作为抗原制备的各个疫苗进行测量, 以便能够在相同的抗原悬浮体配方下进行对比。将制备好的疫苗用PBS稀释, 从外层含水相离心分离乳剂部分。收集后测量外层含水相中的蛋白量。从在制备W/O乳剂期间加入的抗原悬浮体(构成内层含水相)中的蛋白减去在外层含水相中的蛋白量, 以确定留在内层含水相的蛋白量, 以此为基础用下式计算包涵率。

包涵率(%) = [(加入的抗原溶液中的蛋白量) - (外层含水相中的蛋白量)] / 加入抗原悬浮体中的蛋白量

疫苗在制成后在4℃储存, 并且在疫苗制成的第二天和3个月后测量包涵率。

包涵率的结果示于表10中。

表10: 制成的疫苗的包涵率

		包涵率(%)	
		制成后第二天	制成后3个月
实施例	疫苗1	98	97
	疫苗2	98	98
	疫苗3	93	90
	疫苗4	94	92
	疫苗5	93	93
	疫苗6	92	90
	疫苗7	94	92
	疫苗8	97	97
	疫苗9	92	89
对比实施例	疫苗10	97	95
	疫苗11	98	98
	疫苗12	81	71
	疫苗13	91	90
	疫苗14	96	96
	疫苗15	94	94
	疫苗16	87	85

在实施例和对比实施例中,在制成后第二天和制成后3个月都观察到了不小于70%的包涵率,因此,表现出优越的稳定性。尤其是实施例的疫苗显示如表9所示的极低的粘度和优越的蛋白包涵率。

上述结果证实,具有另人注目的低粘度的本发明的W/O/W型油佐剂疫苗具有高稳定性。

从表6-10中的结果清楚地表明,本发明的油佐剂疫苗表现出良好平衡的W/O型油佐剂优越的效力特性和O/W型油佐剂优越的安全性。本发明的构成(其中在W/O/W型油佐剂疫苗的外层含水相中含有特定的聚乙二醇衍生物)能够制备有用的油性佐剂疫苗,这种油性佐剂疫苗不受在内层含水相中所含成分的影响,并且制剂稳定性和可使用性优越,使得注射由于降低了粘度而变得容易。

本发明的W/O/W型油佐剂疫苗提供了高的佐剂作用并表现出优越的制剂

稳定性和较少的副作用(如局部反应)。

本申请是以日本专利申请No.316121/1999为基础，其内容本文引用作为参考。