

A4
C4

申請日期	88.11.3
案 號	88123170
類 別	A41X 4766

(以上各欄由本局填註)

581682

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	油性佐劑疫苗
	英 文	OIL ADJUVANT VACCINE
二、發明 創作人	姓 名	1. 齋藤晃一 2. 岸本洋子 3. 宮原德治 4. 高瀬公三
	國 籍	日本國
	住、居所	1. 日本國兵庫縣尼崎市南塚口町 2-20-8-101 2. 日本國兵庫縣明石市魚住町錦之丘 1-7-8 3. 日本國熊本縣菊池郡合志町幾久富 1866-1445 4. 日本國熊本縣菊池郡大津町杉水 3410-30
三、申請人	姓 名 (名稱)	1. 日本油脂股份有限公司 2. 財團法人化學及血清療法研究所
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	1. 日本國東京都澀谷區惠比壽四丁目 20 番 3 號 2. 日本國熊本縣熊本市大窪一丁目 6 番 1 號
	代 表 人 姓 名	1. 宇野允恭 2. 內野矜自

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國（地區） 申請專利，申請日期： 案號：，☒有 ☐無主張優先權
1999 年 11 月 5 日 特願平 11-316121(主張優先權)

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝訂線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

1. 技術領域

本發明關於一種油性佐劑疫苗。更具體言之，本發明為關於一種具優良佐劑效果及製劑安定性之 W/O/W 型油性佐劑疫苗。

2. 背景技術

油性佐劑疫苗長久以來即已知可有效地增強免疫力。特別是胡氏(Freund's)佐劑當使用去活化之抗原可以表現極為優良之免疫增強效果，且為動物試驗中廣泛使用之代表性佐劑。然而，該佐劑因會引起極大之副作用，例如嚴重之腫脹及肉芽腫，因此只應用在實驗室中。

因此，許多人曾嘗試減少此種副作用以使油性佐劑可應用於一般用途中。油性佐劑有各種劑型，例如 W/O 型者如胡氏佐劑、安全性佳之 O/W 型及複雜之 W/O/W 型等。

例如：JP-B-6-81731 揭示 W/O 型油性佐劑，其含無水甘露醇油酸酯之界面活性劑及液體石蠟之油性成份；WO91/00107(PCT 公開之日本專利申請第 4-506521 號公告)揭示一種組合可代謝性油脂例如蔬菜油以及不可代謝性油脂例如礦物油作為油性成份之低黏性 W/O 型油性佐劑。

此外，WO90/14837 揭示一種含次微米油滴乳液之 O/W 型佐劑之佐劑製劑；另外在 EP-A-315153 揭示 O/W 型疫苗佐劑，含有 POP-POE 嵌段聚合物及醣胜肽作為免疫刺激劑。

在該種佐劑中，雖然 W/O 型油性佐劑可表現高免疫增強效果，但由於製劑之連續油相故易於停留於注射部位。

五、發明說明（²）

另外亦有不少例子則是在接種部位附近發生非感染性腫脹及肉芽腫，亦有的在接種後快速發生疼痛。因此，此類油性佐劑作為直接接種在人體之醫藥製劑受到限制。O/W 型油性佐劑顯示在注射部位之輕微局部反應且安全性優良。然而，由於抗原含於連續相中，因此注射後會在注射部位快速擴散，而難以發揮完全之效果，而常需配合特別的免疫刺激劑。

鑑於上述情形，近年來大多探討一種新穎之油性佐劑 W/O/W 型油性佐劑。

例如 WO91/00106 揭示一種 W/O/W 型複相型乳液，可在注射入動物體後在體溫下轉變為 W/O 型。但此技術仍無法完全解決一般 W/O 型油性佐劑所有之問題，如因局部反應等等問題，其原因是油性佐劑在體內呈 W/O 型佐劑形態。

由於 W/O/W 型油性佐劑為複合型乳液，因此與 W/O 型及 O/W 型油性佐劑比較，不易維持製劑安定性。因此，目前期望可以有一種同時具有 W/O 型展現之優良佐劑性質以及 O/W 型之優異安全性之特點的 W/O/W 型油性佐劑，但在開發此種可將該兩型特點良好地平衡之油性佐劑前卻有許多問題點亟待解決。

本發明人等在 USP5,814,321 揭示一種安全性優良且製劑安定性佳之 W/O 型油性佐劑，並將該 W/O 型疫苗分散於水相中製備成 W/O/W 型油性佐劑疫苗。

然而，W/O/W 型油性佐劑疫苗在以一般方法製備時因

五、發明說明(3)

配方及製備方法，性質將會有極大差異。所產生之問題為抗原成份有時黏度急速增加，而與 W/O 型油性佐劑比較，較無法安定導入免疫力。

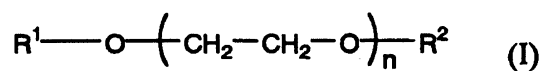
3. 發明概要：

因此本發明之目的在提供一種可改善製劑之貯存安定性及注射時部位之局部反應，且具有高免疫力效果的 W/O/W 型油性佐劑疫苗。

依據，本發明，提供一種 W/O/W 型油性佐劑疫苗，在外水相層含有特定量之具特定分子量聚乙二醇衍生物，該疫苗具有高製劑安定性、在局部反應等具優異安全性、及高免疫增強效果。

因此，本發明包括下列各種。

(1) 一種 W/O/W 型油性佐劑疫苗，含有由 0.5 至 20 重量 % 的分子量 400 至 20,000 且由下式(I)所示之聚乙二醇衍生物構成之外水相層，



式中 R^1 與 R^2 可為相同或不同且各為氫原子或含 1 至 4 個碳原子的烷基及 n 表示聚合度；及含有生物上容許之有效量之抗原內水相層。

(2) 如上述項目(1)之油性佐劑疫苗，其中式(I)所示之聚乙二醇衍生物之分子量為 1,000 至 10,000。

(3) 如上述項目(1)之油性佐劑疫苗，其中外水相層包含 1 至 10 重量 % 之式(I)所示之聚乙二醇衍生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

(4)如上述項目(1)之油性佐劑疫苗，係由室溫下為液態之油脂成份(A)、乳化劑(B)、及含生物性容許之有效劑量之抗原之水相成份(C)製成之 W/O 型乳液分散或乳化於含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體中而製備之 W/O/W 型油相佐劑疫苗，其中液體含 0.5 至 20 重量%之式(I)所示分子量為 400 至 20,000 的聚乙二醇衍生物。

(5)如上述項目(1)之油性佐劑疫苗，係由含室溫下為液態之油脂成份(A)、乳化劑(B)及含生物性容許的有效劑量之抗原的水相成份(C)製成之 W/O 型乳液分散或乳化於含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體中，於外水相中再添加式(I)所示之分子量為 400 至 20,000 之聚乙二醇衍生物成 0.5 至 20 重量%濃度而製備之 W/O/W 型油相佐劑疫苗。

(6)如上述項目(4)或(5)之油性佐劑疫苗，其中室溫下為液態之油脂成份(A)含有不少於油相之 20 重量%的脂肪酸酯及/或三十碳六烯酸。

(7)如上述(4)或(5)項之油性佐劑疫苗，其中乳化劑(B)之 HLB 值低於 10。

(8)如上述(7)項之油性佐劑疫苗，其中乳化劑(B)含有選自多元醇與脂肪酸部份酯化之酯及含聚氧乙烯鏈之非離子性界面活性劑之至少一種。

(9)如上述(4)或(5)之油性佐劑疫苗，其中乳化劑(D)之 HLB 值低於 10。

(10)如上述(9)項之油性佐劑疫苗，其中乳化劑(D)含聚氧乙烯鏈之非離子性界面活性劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

4.發明詳細說明

本發明之油性佐劑疫苗係將由室溫下為液態之油脂成份(A)、乳化劑(B)及包含生物性容許之有效劑量之抗原之水相成分(C)所製備成的 W/O 型乳液(步驟 1)分散或乳化(步驟 2)在含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體中，使最終之 W/O/W 型油性佐劑疫苗的外水相層中含特定量之特定分子量聚乙二醇衍生物。

在室溫下為液相之油脂成份(A)構成步驟(1)製備的 W/O 乳液之連續相，並構成步驟(2)中形成之 W/O/W 型油性佐劑疫苗中形成分散相之油相。本發明中油相意指在本 W/O/W 型油性佐劑疫苗中之油相。本說明書中所謂之“室溫”意指 15 至 25℃ 範圍之溫度。在室溫下為液態之油脂成份(A)，可自一般食品、藥物、化粧品及使用之在室溫下呈液態之油脂及非油脂油性基質中選擇使用。

室溫下呈液態之非酯油基劑，可例舉如：烴，如輕質液體石蠟、三十碳六烯、六甲基廿四烷、聚丁烯等，脂肪酸，如飽和中鏈脂肪酸(例如：辛酸、癸酸等)，長鏈不飽和脂肪酸(例如油酸、亞油酸、亞麻油酸等)，中鏈或長鏈脂肪醇等。室溫下呈液態之酯油性基劑包括各種由飽和中鏈脂肪酸，如辛酸及癸酸，或由不飽和長鏈脂肪酸，如油酸及亞油酸及醇形成之各種脂肪酸酯，以及天然脂肪酸酯，例如：液態蔬菜油(例如：花生油、橄欖油、紅花油、葵花油、荷荷葩油等)，動物來源之液態油脂，例如：粗橘油等。

五、發明說明(6)

油性成份(A)可使用上述例中之一種，亦或用上述例中之二種或多種混合使用。該些油性成份中，油脂如脂肪酸酯、蔬菜油及三十碳六烯具有相當高之抗氧化性及對人體之高親和力。因此，本發明油性佐劑疫苗之油性成份較好選自此些油脂中之一種或多種使用。尤其，由 16 至 22 碳原子構成之順- Δ 9-不飽和脂肪酸(亦為生物脂質之構成分)與 1 至 3 碳原子之醇之酯化化合物製成之油性基劑較佳。

此外，於油相中含至少不少於 20 重量%比例之脂肪酸脂及/或三十碳六烯，進一步降低最終油性佐劑疫苗之副作用如局部反應等並可提高安全性。脂肪酸酯若與三十碳六烯同時使用，則其總量至少不少於油相之 20 重量%。

本發明中，可選擇及使用一般藥劑或食品使用之對人體具有高安全性之一種或多種界面活性劑作為構成油性佐劑疫苗中之乳化劑(B)及乳化劑(D)。

乳化劑(B)在步驟 1 使用以製備由含抗原子之水相成份(C)與油相成份(A)構成之 W/O 型乳液。

考慮最後 W/O/W 型油性佐劑疫苗之安定性，作為乳化劑(B)之界面活性劑較好為親脂性。亦即，較好具有相當低之 HLB(親水-親油平衡值)，以 HLB 低於 10 者較佳。乳化劑(B)可用一種或由 2 種或多種配合使用。在本發明中，乳化劑(B)較好選擇為總 HLB 低於 10。

更詳言之，可使用多元醇與脂肪酸酯之部份酯，可例舉如：山梨聚糖脂肪酸酯(例如：山梨聚糖單油酸酯、山梨聚糖二油酸酯、山梨聚糖倍半油酸酯等)、甘油脂肪酸酯(例

五、發明說明(7)

如：甘油醇單油酸酯等)、聚甘油脂肪酸酯(例如：二甘油單油酸酯、二甘油醇二油酸酯等)等，分子內含聚氧乙烯鏈之非離子性界面活性劑，例如：聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯(聚山梨酸酯)[例如：聚氧乙烯(20)山梨聚糖單油酸酯等]、聚氧乙烯氫化蓖麻油、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇等。亦可使用含天然卵磷脂之甘油磷脂質。

其中特別可組合使用分子內含3至10個羥基之多元醇，例如：山梨聚糖、甘油及聚甘油，與含12至20個碳原子之脂肪酸之部份酯，及含聚氧乙烯鏈之羥基脂肪酸三甘油酯，如聚氧乙烯氫化蓖麻油，使乳化劑(B)之總HLB值低於10。依此方法可獲得具更優異製劑安定性之W/O/W型油性佐劑疫苗。

本說明書中，HLB值係根據W. C. Griffin [W. C. Griffin, J. Soc. Cosmetic. Chemists, 1, 311 (1949)] 之公式計算。

製備本發明之油性佐劑疫苗中，乳化劑成份作為構成含抗原之W/O乳液的成份，即先將胺基酸或其鹽混合入含非還原性糖或含其分子內至少含5個羥基之糖醇以及一至少有3或更多個羥基之多元醇與脂肪酸部份酯(其為室溫下為液態之非離子性界面活性劑)水溶液中，再加入上述乳化劑(B)以提高油性佐劑疫苗之效果及製劑安定性。水溶液態中使用之胺基酸或其鹽，以及糖類或糖醇可選擇一般食品或醫藥品使用者，例如日本藥局(Japanese Pharmacopoeia)及日本常用藥物手冊 (Japanese Pharmaceutical Codex

五、發明說明(8)

drugs)中所列者。在此使用之抗體溶液只要為液體即可，可如溶液、浮液等。例如胺基酸或其鹽可為甘胺酸、丙胺酸、精胺酸鹽酸鹽、組胺酸、苯丙胺酸、天門冬胺酸鈉、天門冬胺酸鉀、麩酸鈉、麩酸鉀或其水合物，其中糖類及糖醇較好選自海藻糖、木糖醇、小梨糖醇、甘露糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇等。

上述乳化劑組成物之製備為將含上述胺基酸或其鹽及上述糖類或糖醇之水溶液與重量比例 10:1 至 1:1(水溶液:界面活性劑)之上述非離子界面活性劑混合攪拌而成水溶液。該乳化劑組成物之使用量為含抗原溶液之 W/O 乳液之約 1 至 20 重量%為佳，約 2 至 10 重量%更佳。

乳化劑(D)在步驟 2 中用以分散或乳化上述 W/O 乳液於含乳化劑(D)及水相成份(E)之液體中。

由最後 W/O/W 型油性佐劑疫苗之安定性觀之，作為乳化劑(D)之界面活性劑較好為親水性且具相當高之 HLB 值，最好不低於 10。該乳化劑(D)可單獨使用或依需要組合使用。此時，該乳化劑(D)最好調整為總 HLB 值不低於 10。

詳言之，使用分子內含聚氧乙烯鏈且其 HLB 值不低於 10 之非離子性界面活性劑，例如：聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、聚氧乙烯氫化蓖麻油、聚氧乙烯聚氧丙烯二醇等。此類界面活性劑可與多元醇與脂肪酸之部份酯，例如：山梨聚糖脂肪酸酯、甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯等，及包括天然磷脂質之甘油磷酸酯配合使用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

其中，單獨使用聚氧乙烯聚氧丙烯二醇或與其他界面活性劑配合時，W/O/W型油性佐劑疫苗具有良好之製劑安定性。

作為乳化劑(B)或乳化劑(D)之甘油磷脂質，可舉例如：天然磷脂質，例如自蛋黃及大豆之萃取及純化之磷脂質及經氫化加成物，以及各種合成之其中鹼基部份和鹽基部份組成經控制的磷脂質及脫脂酸磷脂質。

本發明之W/O/W型油性佐劑疫苗中，水性成份(C)構成水相，即步驟1中製成之W/O乳液之分散相、及最終W/O/W型油性佐劑疫苗中分散相之油相中之內水相層。該水相成份(C)包括各種抗原。

包含於水相部份(C)之抗原可為多種種類及多種形態。具體言之，可使用例如：去活性細胞、去活性之病毒顆粒，去活性之一般微漿菌，及抗病原性感染因子，例如：吸附蛋白質，包封抗原等製成次單元體疫苗者。其中去活性細胞可舉：格蘭氏陰性細菌，例如：放線菌(Actinobacillus Pleuropneumoniae)，埃氏大腸菌(Escherichia coli)等等，格蘭氏陽性細菌，例如：豬丹毒丹毒絲菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)等。去活性之病毒顆粒，包括例如：日本B型腦炎病毒等。去活性之微漿菌可例舉如：豬及雞之微漿菌。抗病原性感染因子可例舉如：新城雞瘟病毒之F蛋白。亦可使用含複數抗體之疫苗。

本發明之油性佐劑疫苗中，除抗原外，亦可包含抗原以外之其他有效成份，例如：抗生素。抗生素之例可舉如：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

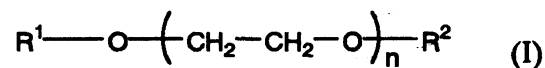
卡那黴素硫酸鹽、羥四環素鹽酸鹽等等。

水性成份(C)所含生物容許性之有效量抗原可依其目的及使用之抗體種類適當選擇。

本發明中，上述抗原含於內水相層中。但即使部份抗原在製備本發明之 W/O/W 油性佐劑疫苗時溢出外水相層中，亦無損於本發明之效力。

本發明中，水相成份(E)構成本 W/O/W 油性佐劑疫苗之外水相層。更具體者，該水性成份(E)是選擇使最終之佐劑疫苗對人體能有適當之安定性及安全性者。例如使用生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水等。

依據本發明，本油性佐劑疫苗中所含之聚乙二醇衍生物係由下式(I)表示：



式中 R^1 與 R^2 可相同或相異且為氫原子或 1 至 4 個碳原子之烷基而 n 為聚合度。

上式(I)中， R^1 及 R^2 之含 1 至 4 個碳原子之烷基可為直鏈或支鏈，可例舉如：甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、二級丁基及三級丁基。適宜之 R^1 及 R^2 為氫原子、甲基及乙基，最好是氫原子。 R^1 與 R^2 之組合有氫原子與氫原子、氫原子與甲基、氫原子與乙基、甲基與甲基等。其中氫原子與氫原子之組合尤佳。 n 為使分子量 400 至 20,000 範圍時之聚合度。

上式(I)所示之聚乙二醇衍生物以分子量 400 至 20,000

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(11)

為佳，1,000 至 10,000 則更佳，3,000 至 9,000 又更佳。在外水相層所含之比例為 0.5 至 20 重量%較好，1 至 10 重量%，以 1 至 5 重量%更佳。

聚乙二醇衍生物之分子量低於 400 或其含量少於 0.5 重量%時，則無法達到充份之降低黏度效果。此外，佐劑之效果亦會降低。聚乙二醇衍生物之分子量超過 20,000 時，外水相層本身黏度會增加，因此反而會提高油性佐劑疫苗整體之黏度，而無法有充份之降低黏度效果。當含量超過 20 重量%時，內水相層及外水相層顯現完全不同之滲透壓。結果無法獲得安定之 W/O/W 型乳液，因此導致無法得到安定之油性佐劑疫苗。

本發明中，上述聚乙二醇衍生物之高分子量導致外水相層黏度較高，結果油性佐劑疫苗有較高之黏度。因此，最好依照聚乙二醇分子量調整其含量在上述範圍內。

本發明中，分子量在 400 至 20,000 範圍之聚乙二醇衍生物可以單獨或使用不同分子量之二種或多種而配合使用。

由最終油性佐劑疫苗之製劑安定性及佐劑效果觀之，聚乙二醇衍生物分子量較好在 1,000 至 10,000，且含於外水相層中之比例為該相之 1 至 10 重量%，以 1 至 5 重量%更佳。

本發明製備之油性佐劑疫苗具有之特徵為優異之佐劑效果及低黏度，而此均係因其外水相層中存在聚乙二醇衍生物。一般之 W/O/W 型乳液由於內水相層內所含之物質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（12）

效果，內層水相層及外層水相層內含不同之成份的結果常有黏度增高及凝集而成 W/O 粒之情形。尤其是油性佐劑疫苗中所用之抗原溶液可含高濃度之各種成份，例如：細胞成份及培養基成份。因此作為 W/O/W 型油性佐劑疫苗，具有相同組成之 W/O/W 型乳液在黏度與安定性上會形成急劇之差異，此係由於所用抗原溶液中其他成分影響之故。如此將造成種種問題，特別是在疫苗內混合多種抗原時，因此在製造及控制疫苗時更須以各種方法避免。但本發明中，外水相層使用聚乙二醇衍生物，無論內水相層之組成或成份如何，均可降低其黏度，相對地即可克服此種問題。若油性佐劑疫苗黏度高，則在投藥於人體時操作性將不良，相對地造成體內之擴散不良及不良效應，例如局部反應，及在注射部位上殘留疫苗。藉於外水相層中加入聚乙二醇時，此些問題均可改善。

影響 W/O/W 型油性佐劑疫苗性質之主要因素之一為水相層所含 W/O 乳液的粒度。一般在外水相層中所含 W/O 乳液的粒度大時，在接種時 W/O/W 型油性佐劑會顯現如 W/O 型油性佐劑般之行為。亦即佐劑效果增大，但副作用例如局部反應亦會變強。此外，粒子亦易於凝聚，因此降低製劑之安定性。相對地，若 W/O 乳液包含相當較小之粒子，製劑具有較高之安定性，降低之副作用，但佐劑效果亦較低。本發明之 W/O/W 型油性佐劑疫苗即使在 W/O 乳液粒子相當小仍可有高免疫加強效果。因此，本發明疫苗顯現優異之製劑安定性，及較少副作用而效力亦佳。由製

五、發明說明(13)

劑之安定性及減少副作用之觀點觀之，構成 W/O/W 型油性佐劑疫苗之 W/O 乳液粒子較好粒度不超過 $50\mu\text{m}$ 及平均粒度不超過 $20\mu\text{m}$ 。

本發明油性佐劑疫苗之製造方法，可用一般所知之方法，並無特別限定。本發明油性佐劑疫苗在製造時，步驟 1 製造之 W/O 乳液較好含油性成份(A)之比例為相對於該 W/O 乳液之 30 至 90 重量%，40 至 80 重量%更佳；而乳化劑(B)之比例為 1 至 20 重量%，以 2 至 15 重量%更佳；而含抗原之水性成份(C)為 5 至 75 重量%，15 至 60 重量%更佳。步驟 2 中乳化劑(D)之使用比例為乳化劑(D)水性成份(E)及聚乙二醇衍生物合計之 0.1 至 20 重量%，0.5 至 10 重量%更佳。

步驟 2 中，W/O 乳液(步驟 1 製造者)與含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體之混合比例係依照目的或選擇之抗原種類而適當決定。該重量比例以 W/O 乳液：含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體=2：1 至 1：10 為佳，2：1 至 1：5 更佳。

本發明中，聚乙二醇衍生物係事先在上述含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體中，水相層部份內部份或整體添加上式(I)所示分子量為 400 至 20,000 之聚乙二醇衍生物於外水相層中或者，製備 W/O/W 型油性佐劑，及添加可分別溶於水、生理食鹽水或緩衝溶液中之聚乙二醇衍生物。欲添加之乙二醇衍生物之量如上述。

當製造含多種抗原之油相佐劑疫苗時，製備於內水相

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

層中之含各種抗原之 W/O 乳液、混合、及分散於如後述含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體內。或者，可如後述，可製造任意種抗原的 W/O/W 型油性佐劑疫苗後混合。

本發明油性佐劑疫苗作為醫藥製劑可含不直接涉及佐劑活性之各種添加物，例如：緩衝劑、防腐劑、滲透壓控制劑等等。

本發明油性佐劑疫苗製劑可使用各種可乳化之裝置製造內水相層中含抗原之 W/O 乳液(步驟 1)，及將該 W/O 乳液分散或乳化於含乳化劑(D)及水性成份(E)之液體內(步驟 2)，可使用一般之乳化裝置(例如：均質混合機、均質粉碎機、CLEARMIX (M TECHNIQUE 公司製造)等等)、使用多孔膜之膜乳化裝置、高壓噴射乳化裝置等等。必要時，構成本發明油性佐劑疫苗之 W/O 乳液須通過濾網膜以使粒子大小在一定程度以下。

此外，在製造疫苗時，使用之各成份可事先經過滅菌處理，視性質而定，如：加熱滅菌及過濾滅菌。

本發明之油性佐劑疫苗若使用於人體，則可經過由適當路徑投藥，可例舉如：皮下、肌肉內及腹膜內注射，或經由鼻腔之黏膜及腸腔投藥。投藥之劑量及次數則需係依據相關領域所用之標準方法測定達到期望之免疫反應所需之適當量。

以下例中將再詳細說明本發明。但本發明並不限定於此些例。

下面各例中，使用乙二醇(以下將簡稱為 PEG 或

五、發明說明 (15)

Macrogol)作為聚乙二醇衍生物。

[油性佐劑疫苗之製造]

以下各例中之油性佐劑疫苗是以 CLEARMIX CLM-0.8S (M TECHNIQUE) 經以下方法製造。乳化操作是在室溫進行且必要時使用冷水。下述組成物中之各成份經適當之滅菌方法滅菌。攪拌操作、乳化等均在無菌環境下進行。各例中所指之“份”意指“重量份”。

下述油性佐劑疫苗製備中所謂之“外水相層”意指欲與製成 W/O/W 型油性佐劑疫苗之 W/O 乳液混合之液體。

<<實施例 1：疫苗 1 之製造>>

依照表 1 之 W/O-1 組成，將抗原懸浮液以外之各成份稱重後放入燒杯內。另外，使用前先將聚氧乙烯氫化蓖麻油加熱至 50℃ 溶解備用。之後將重量比例為 1/1 之麩酸鈉及山梨糖醇溶液與山梨聚糖倍半油酸鹽一面攪拌一面加入並混合。其餘之山梨聚糖倍半油酸鹽就此加入。之後，再於常溫下，經 CLEARMIX CLM-0.8S(M TECHNIQUE)以 12,000rpm 一面攪拌一面加入抗原懸浮液混合 5 分鐘成 W/O 型乳液(W/O-1)。

依據表 3 所示之外水相層 1 之組成，將各成份溶解於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS, pH7.4)(為外水相層 1)內。再將上述 W/O-1(1 份)及外水相層 1(1 份)秤入燒杯內，經 CLEARMIX CLM-0.8S 以 9,000rpm 攪拌 5 分鐘混合成油性佐劑疫苗 1。以下各實施例及比較例中，除非特別指明，否則在製造疫苗時 W/O 乳液及外水相層之混合均如實施

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

例 1 之條件操作。

<<實施例 2：疫苗 2 之製造>>

稱取如實施例 1 製造之 W/O 型乳液(W/O-1，1 份)及如表 3 外水相層 2 之組成製備之外水相層 2(1 份)，製造成油性佐劑疫苗 2。

<<實施例 3：疫苗 3 之製造>>

將表 1 中所示之 W/O-2 組成，將除抗原懸浮液以外的成份稱入燒杯中。另外，使用前先將聚氧乙烯氫化蓖麻油加熱至 50℃ 溶解備用。日本藥典 Macrogol 6000 則先均勻地溶解於抗原懸浮液內。再依實施例 1 之相同條件製造 W/O 型乳液(W/O-2)。

其次，稱取 W/O-2(3 份)及依照表 3 所示之外水相層 3 組成製造的外水相層 3(2 份)，製造成油性佐劑疫苗 3。

<<實施例 4：疫苗 4 之製造>>

依照表 3 之外水相層 4 之組成，稱取各成份。各成份再加熱至約 60℃、混合，分散及冷卻至室溫，使用作為外水相層 4。其次，稱取實施例 3 製造之 W/O 型乳液(W/O-2，1 份)及外水相層 4(3 份)，製造成油性佐劑疫苗 4。

<<實施例 5：疫苗 5 之製造>>

依據表 1 所示 W/O-3 組成，將抗原溶液以外之各成份稱入燒杯內。接著依照實施例 1 相同之方法，逐漸添加抗原懸浮液及攪拌混合物，以實施例 1 相同方式 W/O 型乳液(W/O-3)。

其次，稱取該 W/O 型乳液(W/O-3，2 份)及外水相層

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

2(3 份)於燒杯中，製造成油性佐劑疫苗 5。

<<實施例 6：疫苗 6 之製造>>

稱取實施例 5 製造之 W/O 型乳液(W/O-3, 2 份)及表 4 所示之外水相層 5 之組成製造的外水相層 5(2 份)，再經 CLEARMIX CLM-0.8S，以 9,000rpm 混合 5 分鐘成乳液。日本藥典 Macrogol 6000 則先溶解於 PBS 中成 10 重量%濃度，再添加該最終溶液 1 份。該混合液經輕緩攪拌即成油性佐劑疫苗 6。

<<實施例 7：疫苗 7 之製造>>

依據表 2 之 W/O-4 之組成，稱取除抗原懸浮液以外之各成份於燒杯中。再以實施例 1 同法，經 CLEARMIX CLM-0.8S，製造成 W/O 型乳液(W/O-4)。

其次，稱取 W/O-4(1 份)及表 3 外水相層 4 之組成製造之外水相層 4，製造成油性佐劑疫苗 7。

<<實施例 8：疫苗 8 之製造>>

依據表 2 之 W/O-5 組成，稱取除抗原懸浮液以外之各成份於燒杯中。另外，將聚氧乙烯氫化蓖麻油加熱至 60℃ 溶解備用。接著依照實施例 1 相同之方法將抗原懸浮液緩緩加入並攪拌製成 W/O 型乳液(W/O-5)。

其次，稱取 W/O-5(1 份)及外水相層 2(1 份)製造成油性佐劑疫苗 8。

<<實施例 9：疫苗 9 之製造>>

依據表 2 之 W/O-6 之組成，稱取除抗原懸浮液以外之各成份於燒杯中。另外，將蛋黃卵磷脂均勻地溶解於油相

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(18)

中，及聚氧乙烯氫化蓖麻油加熱至 60℃ 溶解備用。如實施例 1 相同之方法，將抗原懸浮液緩緩加入並攪拌，製成 W/O 型乳液(W/O-6)。

其次，稱取 W/O-6(3 份)及外水相層 3(2 份)，製造油性佐劑疫苗 9。

<<比較例 1：疫苗 10 之製造>>

稱取實施例 1 中製造之 W/O-1(1 份)及表 4 所示之外水相層 5(1 份)，製造油性佐劑疫苗 10。

<<比較例 2：疫苗 11 之製造>>

稱取實施例 1 中製造之 W/O-1(1 份)及表 4 所示之外水相層 6(1 份)，製造油性佐劑疫苗 11。

<<比較例 3：疫苗 12 之製造>>

稱取實施例 3 中製造之 W/O-2(3 份)及表 4 所示之外水相層 7(2 份)，製造油性佐劑疫苗 12。

<<比較例 4：疫苗 13 之製造>>

稱取實施例 5 中製造之 W/O-3(2 份)及表 4 所示之外水相層 5(3 份)，製造油性佐劑疫苗 13。

<<比較例 5：疫苗 14 之製造>>

稱取實施例 7 中製造之 W/O-4(1 份)及表 4 所示之外水相層 8(1 份)，製造油性佐劑疫苗 14。

<<比較例 6：疫苗 15 之製造>>

稱取實施例 8 中製造之 W/O-5(1 份)及表 4 所示之外水相層 6(1 份)，製造油性佐劑疫苗 15。

<<比較例 7：疫苗 16 之製造>>

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

稱取實施例 9 中製造之 W/O-6(3 份)及表 4 所示之外水相層 7(2 份)，製造油性佐劑疫苗 16。

各實施例及比較例中使用之 W/O 乳液的組成如表 1 及表 2 所示，各外水相層之組成如表 3 及表 4 所示，各疫苗中 W/O 乳液及外水相層之混合比例則如表 5 所示。

表 1：W/O 乳液-1 組成

添加成份	混合比例(重量%)		
	W/O-1	W/O-2	W/O-3
化合物			
油酸乙酯	40	-	-
三十碳六烯	-	55	20
純大豆油	-	-	15
山梨聚糖倍半油酸酯	10	10	10
聚氧乙烯(20)氫化蓖麻油 ^{*1)}	-	-	5
聚氧乙烯(40)氫化蓖麻油 ^{*1)}	5	3	-
聚氧乙烯(20)山梨聚糖單油酸酯 ^{*1)}	-	2	-
麩酸鈉及山梨糖醇水溶液 ^{*2)}	5	-	-
抗原懸浮液	40	29	50
日本藥典 Macrogol 6000 ^{*3)}	-	1	-
總量	100	100	100

*1) 括弧內數字表示所含環氧乙烷之平均莫耳數。

*2) 麩酸鈉單水和物(25g)及山梨糖醇(10g)溶解於蒸餾水之溶液(100mL)。

*3) Macrogol 先溶解於抗原懸浮液中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

表 2：W/O 乳液-2 之組成

添加成份	混合比例(重量%)		
	W/O-4	W/O-5	W/O-6
化合物			
油酸油酯	40	-	30
三十碳六烯	-	-	20
十四烷酸異丙酯	-	60	-
純蛋黃磷脂質	-	-	2
甘油醇單油酸酯	15	10	8
聚氧乙烯(10)氫化蓖麻油 ^{*1)}	5	5	-
聚氧乙烯(60)氫化蓖麻油 ^{*1)}	-	5	5
抗原懸浮液	40	20	35
總量	100	100	100

*1) 括弧內數字表示所含環氧乙烷之平均莫耳數。

表 3：油性佐劑疫苗-1 外水相層之組成

添加成份	混合比例(%)			
	外水 相層-1	外水 相層-2	外水 相層-3	外水 相層-4
化合物				
聚氧乙烯(60)氫化蓖麻油 ^{*1)}	2	-	-	2
聚氧乙烯(20)山梨聚糖單油酸酯 ^{*1)}	-	-	2	-
聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)甘油醇 ^{*1)}	1	3	-	-
純蛋黃磷脂質	-	-	-	2
Macrogol 1000 ^{*2)}	-	-	-	1
日本藥典 Macrogol 4000	-	4	1	-
日本藥典 Macrogol 6000	3	-	1	-
磷酸緩衝食鹽水(PBS)	94	93	96	95
總量	100	100	100	100

*1) 括弧內數字表示所含環氧乙烷之平均莫耳數。

*2) 日本藥物賦型劑許可物質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

表 4：油性佐劑疫苗-2 外水相層之組成

添加成份	混合比例(%)			
	外水相層-5	外水相層-6	外水相層-7	外水相層-8
化合物				
聚氧乙烯(60)氫化蓖麻油 ^{*1)}	2	-	-	2
聚氧乙烯(20)山梨聚糖單油酸酯 ^{*1)}	-	-	2	-
聚氧乙烯(196)聚氧丙烯(67)甘油醇 ^{*1)}	1	3	-	-
純蛋黃磷脂質	-	-	-	2
磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)	97	97	98	96
總量	100	100	100	100

*1) 括弧內數字表示所含環氧乙烷之平均莫耳數。

表 5：各疫苗製劑中使用之 W/O 乳液及外水相層及添加量

疫苗編號	W/O 乳液	外水相層
實施例	疫苗 1	W/O-1(1 份)
	疫苗 2	W/O-1(1 份)
	疫苗 3	W/O-2(3 份)
	疫苗 4	W/O-2(1 份)
	疫苗 5	W/O-3(2 份)
	疫苗 6	W/O-3(2 份)
	疫苗 7	W/O-4(1 份)
	疫苗 8	W/O-5(1 份)
	疫苗 9	W/O-6(3 份)
比較例	疫苗 10	W/O-1(1 份)
	疫苗 11	W/O-1(1 份)
	疫苗 12	W/O-2(3 份)
	疫苗 13	W/O-3(2 份)
	疫苗 14	W/O-4(1 份)
	疫苗 15	W/O-5(1 份)
	疫苗 16	W/O-6(3 份)

*1) 詳細之製造方法參考本說明書中實施例 6。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(22)

[免疫性測定]

油性佐劑疫苗內所含之各種抗原均經免疫性測定。各實施例中所用疫苗之記號均與上述實施例及比較例中所示者相同。

<<實驗例 1：去活性豬丹毒絲菌(Erysipelothrix rhusiopathiae) (Er)疫苗>>

將培養於含 5%牛血清及腦心臟灌注培養液(BHIB)之培養基內之豬丹毒絲菌 SE-9 菌株(美國標準菌株中心)以福馬林處理去除活性製備成抗原。再以此抗原製造疫苗 1、3、5、7、10、12 及 14。在製劑時，各疫苗中以磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)調抗原之濃度為 $5.0 \times 10^8 \cdot \text{CFU/ml}$ 。各疫苗並另以 PBS 取代抗原製成空白液。各疫苗再以相對之空白液 5 倍連續稀釋。另外，控制組則包含胡氏不完全佐劑(IFA)；及另一佐劑(IFA-PFG)其中 IFA 內水相層中添加內水相層之 5%比例的 PEG1000、以及含氧化鋁膠體為佐劑之疫苗。

將各疫苗(或稀釋之疫苗)皮下接種(0.25ml/尾)入 5 週齡大之無菌飼養老鼠(每群 5 隻)的內股內。在免疫 3 週後，再將 Er Fujisawa 株(日本獸醫生物協會(JAVB))皮下注射($2.2 \times 10^6 \text{CFU}/0.1\text{ml}/\text{尾}$)入老鼠之內股內。注射後觀察老鼠 10 日，計算 50%老鼠殘存之稀釋倍率，即為 PD_{50} 。在免疫 2 週後，再以未稀釋之疫苗及 5 倍稀釋之疫苗接種於老鼠(各配方為 10 隻)，並以觸診測定注射部位形成硬塊程度。硬塊之程度分為 5 等級(0：無，1：輕度-4：重度)，並計

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

算各配方之平均值。

同時，W/O/W 型油性佐劑疫苗製劑另以雷射繞射粒度分析儀 SALD-2100(SHIMADZU CORPORATION)測定其平均粒徑。

各效力(PD₅₀)之測定結果列於表 6。

表 6：豬丹毒-老鼠免疫試驗之結果(實驗例 1)

	試驗結果(生存老鼠/試驗老鼠)							PD ₅₀
	未稀釋 疫苗	× 5	× 25	× 125	× 625	× 3125	× 15625	(倍)
[免疫群]								
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
[比較免疫群]								
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	1397.1
鋁凝膠	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	77.1

表中所示之結果為以各種稀釋疫苗(或未稀釋之疫苗)接種後殘存老鼠之數目及 PD₅₀ 值。亦即 PD₅₀ 值越高代表使用之疫苗效力越強。其中，免疫群中疫苗 1、3、5、7 之接種群 PD₅₀ 值均不低於 1300，顯示有較 IFA 優良之效力。相對地，對照之免疫群(即以疫苗 10、12、14 及鋁凝膠佐劑之群)的 PD₅₀ 值分別為 532.1、385.7、279.5 及 77.1。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

因此可證明本發明之疫苗製劑具有明顯之高 PD₅₀ 值。此些結果顯示本發明疫苗之製劑具有高效力。

其次，另以觸診測定注射部位發生硬塊之程度。
W/O/W 型油性佐劑疫苗之粒度及其發生硬塊程度示於表 7。

表 7：豬丹毒-老鼠注射部位副反應(實驗例 1)

	注射部位副反應 (平均值)	平均粒徑 (μ m)
[免疫群]		
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
[比較免疫群]		
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	-
鋁凝膠	0	-

注射部位局部反應程度(0：無，1：輕度-4：重度)

實驗之免疫群顯示在注射部位只有極微之局部反應，證明在注射時其安全性高，同時其平均粒度亦不超過 7.2 至 8.1 或 20 μ m。相對地，對照之免疫群顯示幾乎與 W/O/W 型油性佐劑疫苗有同程度之粒度，而在注射部位之反應除 IFA 及 IFA-PEG 外各對照之免疫群均小。然而 IFA 及 IFA-PEG 注射群老鼠卻在注射部位有嚴重硬塊發生，同時有 3/4 或以上接種 IFA 或 IFA-PEG 的老鼠呈現不同之變化步調。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(25)

由上述結果顯示本發明之油性佐劑疫苗具有優良之效力，且在注射部位之局部反應不似鋁凝膠疫苗，而極為輕微。因此，本發明之疫苗極為安全。

<<實驗例 2：去活性豬肺枝原體疫苗>>

疫苗 2、4、6、11 及 13 係以經添加豬血清之 BHL 培養基培養再以福馬林去活性之豬肺炎枝原體(Mycoplasma hyopneumoniae)92-28 株(為分離自農場豬隻之菌株；Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute)所製造。在製造時，各疫苗內抗體以磷酸緩衝食鹽水(PBS)稀釋成 8.0×10^8 ccu/ml。另外，同時以氧化鋁凝膠(ALHYDROGEL 85, Superfos, 鋁轉換量為 9mg/ml)為佐劑製成疫苗(疫苗 AL)，又以日本藥典 Macrogol 4000 加入氧化鋁凝膠調成終濃度為 4%而含同濃度抗體的疫苗(疫苗 AL-PEG)。

各疫苗(2ml/隻)以間隔 2 週 2 次注射於 SPF[無特異致病病原(Specific Pathogen Free)]豬(8 隻/群，初次免疫時為 4 週齡大)之頸肌肉內。在第 2 次免疫後一週時，將取自經豬肺炎枝原體 92-28 株(為分離自農場豬隻之菌株，Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute)感染豬隻之肺均質細胞移植在氣管內。在移植經 4 週後，即將豬隻犧牲，並觀察形成之肺障礙。測定各發生之肺障礙程度，並計算相對於無免疫控制組的肺障礙減少(%)程度。

該結果如表 8 所示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

表 8：豬肺枝原體感染-老鼠免疫測驗結果(實驗例 2)

	免疫群			比較免疫群				無免疫 對照組
	疫苗 2	疫苗 4	疫苗 6	疫苗 11	疫苗 13	疫苗 AL	疫苗 AL-PEG	
障礙程度 (各個體)	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
障礙減少 程度(%)	72.3	60.5	64.3	39.8	26.0	0.3	-2.0	-

以疫苗 2、4 及 6 接種之免疫群可減少 60%或更高之障礙症狀，顯示具有優良之效力。疫苗 6 為第二次乳化後添加 PEG 者，顯示與其他免疫群幾乎有相同之效力。相對地，以疫苗 11 及 13 投藥之比較免疫群之障礙症狀減少程度各為 39.8%及 26.0%，同時，鋁凝膠疫苗顯示無論 PEG 存在與否均未因疫苗而有減輕該障礙症狀之效力。

由上述效力顯示本發明油性佐劑疫苗即使以肺枝原體為抗原亦具有優良之效力。同時，該結果亦顯示無論在第二次乳化之前或之後，在外水相層中添加 PEG 均有效果。

[乳液黏度之測定]

製成之 W/O/W 型油性佐劑疫苗另再測定其黏度。亦即測定上述實驗例 1 中製造之豬丹毒丹毒絲菌疫苗(即疫苗 1、3、5、7、10、12、14)，及分別依疫苗 2、4、6、8、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(27)

9、11、13、15 及 16 之配方以豬丹毒丹毒絲菌為抗原製造之疫苗，以比較相同配方下之抗原懸浮液。在各疫苗製造後一週，在 25℃ 下，以 E 型旋轉黏度計(TOKI SANGYO CO., LTD., RE105H 型)測定其黏度。結果如表 9 所示。

表 9：疫苗製劑黏度

疫苗編號	黏度(mPa·s, 25℃)	
實施例	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
比較例	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，各實施例在 25℃ 下之黏度均不超過 50mPa·s。因此，其黏度極低而有利於注射。相對地，在比較例中疫苗之黏度均不低於 150 mPa·s，因此在注射時須施加相當之外力且耗時。

上述之結果亦即意味著本發明之 W/O/W 型油性佐劑疫苗內之外水相層內所含之聚-乙二醇衍生物可大幅降低其黏度，因此本發明之疫苗在投藥時可減少大量之勞力。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(28)

[乳液包容率之測定]

製成之 W/O/W 型油性佐劑疫苗另再測定其包容率。亦即測定上述實驗例 2 內使用之豬肺枝原體疫苗(即疫苗 2、4、6、11、13)，及各依照疫苗 1、3、5、7、8、9、10、12、14、15 及 16 以上述肺枝原體為抗原製造之疫苗，以比較相同配方下之抗原懸浮液。製成之疫苗先以 PBS 稀釋，再離心使乳液與外水相層分離。再收集而測定外水相層所含之蛋白質量。為計算包含在內水相層之蛋白質量，製造 W/O 乳液時添加之抗原懸浮液(即構成內水相層部份)所含之蛋白質量再減去該外水相層中之蛋白質量，因此，包容率可以下列公式計算。

包容率(%)=[(添加之抗原溶液內之蛋白質量)-(外水相層內之蛋白質量)]/添加之抗原懸浮液內蛋白質量。

疫苗在製造後先存放於 4℃ 下，再於疫苗製造之次日及三個月後測定其包容率。

包容率之測定結果如表 10 所示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(29)

表 10：疫苗製劑包容率

		包容率(%)	
		製造後次日	製造後3個月
實施例	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
比較例	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

於實施例及比較例中，製造後次日及三個月後包容率均在 70%以上，顯示其安定性優良。特別是各實施例，同時在表 9 中顯示有極低之黏度又有優良之蛋白質包容率。

由上述結果，顯示本發明之 W/O/W 型油性佐劑疫苗有極低之黏度且安定性高。

由表 6 至表 10 之結果，證明本發明之油性佐劑疫苗在具有優良效力特性之 W/O 型油性佐劑及具有優良安全性特性之 O/W 型油性佐劑間可維持極佳之平衡。因此，本發明中 W/O/W 型油性佐劑疫苗之外水相層中所含之特定聚乙二醇衍生物，使其不致受內水相層成份影響，製成安定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明⁽³⁰⁾

且亦因可減低其黏度而在注射於人體時具有容易操作之性質的有用油性佐劑疫苗。

因此，本發明 W/O/W 型油性佐劑疫苗具有高佐劑效力且製劑安定性佳，局部反應之副作用亦少。

本申請案係根據日本專利申請號 316121/1999 號，其內容亦合併在此供參考。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要（發明之名稱：油性佐劑疫苗）

本發明提供一種 W/O/W 型油性佐劑疫苗，其含有包含 0.5 至 20 重量%之分子量 400 至 20,000 之聚乙二醇衍生物構成的外水相層，以及包含生物上容許之有效量抗原之內水相層。本發明之組成因外水相層含有特定分子量聚乙二醇衍生物，因此可製備具有高佐劑效果之 W/O/W 型油性佐劑疫苗，減少例如局部反應之副作用，優異之製劑安定性及優異操作性且又因其低黏度而易於製成注射劑。

英文發明摘要（發明之名稱：OIL ADJUVANT VACCINE）

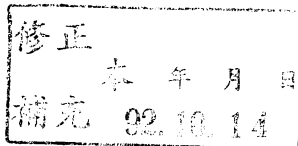
The present invention provides a W/O/W type oil adjuvant vaccine containing an outer aqueous phase containing 0.5 wt% - 20 wt% of a polyethylene glycol derivative having a molecular weight of 400 - 20,000, and an inner aqueous phase containing a biologically acceptable and effective amount of an antigen. The constitution of the present invention that a polyethylene glycol derivative having a specific molecular weight is contained in the outer aqueous phase enables preparation of a W/O/W type oil adjuvant vaccine showing a high adjuvant effect, reduced side effects such as topical response, superior preparation stability and superior workability to allow a person to give an injection easily due to the lowered viscosity.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線



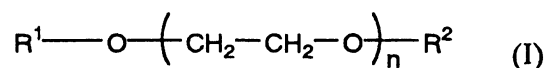
附
件

第 89123170 號專利申請案

申請專利範圍修正本

(92 年 10 月 14 日)

1. 一種 W/O/W 型油性佐劑疫苗，包括含有 1 至 10 重量 % 之分子量為 1,000 至 10,000 之下式(I)所示之聚乙二醇之外水相層，



其中 R^1 與 R^2 各為氫原子， n 表聚合度；及含生物上容許之有效量之抗原之內水相層。

2. 如申請專利範圍第 1 項之油性佐劑疫苗，係經下述步驟製造之 W/O/W 型油性佐劑疫苗：(a)製造含室溫下為液體且包括比例不少於油相之 20 重量 % 的脂肪酸酯或三十碳六烯或脂肪酸酯及三十碳六烯的油性成份(A)、HLB 值不低於 10 且包括選自多元醇與脂肪酸之部份酯及含聚氧乙烯鏈非離子性界面活性劑之至少一種的乳化劑(B)及含生物性容許的有效量之抗原之水相成份(C)所成的 W/O 乳液，及

(b)將該 W/O 乳液分散或乳化在含乳化劑(D)及液相成份(E)之液體內，其中液體內含有 1 至 10 重量 % 之分子量為 1,000 至 10,000 之式(I)所示之聚乙二醇。

3. 如申請專利範圍第 1 項之油性佐劑疫苗，係經下述步驟製造之 W/O/W 型油相佐劑疫苗：(a)製造含室溫下為液體且包括比例不少於油相之 20 重量 % 的脂肪酸酯或三

十碳六烯或脂肪酸酯及三十碳六烯的油性成份(A)、
HLB 值不低於 10 且包括選自多元醇與脂肪酸之部份酯
及含聚氧乙烯鏈非離子性界面活性劑之至少一種的乳
化劑(B)及含生物性容許的有效量之抗原之水相成份(C)
所成的 W/O 乳液，及

(b)將該 W/O 乳液分散或乳化在含乳化劑(D)及液
相成份(E)之液體內，及

(c)在外水相層中加入 1 至 10 重量%濃度之分子量
1,000 至 10,000 之式(I)所示聚乙二醇。

4. 如申請專利範圍第 2 項或第 3 項之油性佐劑疫苗，其中
乳化劑(D)之 HLB 值不低於 10。

5. 如申請專利範圍第 4 項之油性佐劑疫苗，其中乳化劑(D)
包括含聚氧乙烯鏈之非離子性界面活性劑。