發明專利說明書 200423956

（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： P3105710

※ 申請日期： P3.3.4 ※IPC 分類： A61K 39/04

壹、發明名稱：（中文/英文）

佐劑化牛疫苗

ADJUVANTED BOVINE VACCINES

貳、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

惠氏公司

WYETH

代表人：（中文/英文）

威廉 T.金/KING, WILLIAM T.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國紐澤西州 07940-0874 曼迪森 5 吉拉德農場

Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940-0874, U.S.A.

國 籍：（中文/英文）

美國/U.S.A.

參、發明人：（共 2 人）

姓 名：（中文/英文）

1.楚憲覺/CHU, HSIEN-JUE

2.黎武敏/LI, WUMIN

住居所地址：（中文/英文）

1.美國愛阿華州 50501 佛多齊路易斯崗 1955 號

1955 Louise Ridge, Fort Dodge, Iowa 50501, U.S.A.

2.美國愛阿華州 50501 佛多齊丘頂道 1519 號

1519 Knollcrest Drive, Fort Dodge, Iowa 50501, U.S.A.

國　籍：(中文/英文)

1.～2.美國/U.S.A.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為：　年　月　日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☑ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數　順序註記】

1. 美國　2003.03.12　60/454,182
2.
3.
4.
5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數　順序註記】

1.
2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼　順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼　順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

國　籍：(中文/英文)

1.～2.美國/U.S.A.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為：　年　月　日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☑ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數　順序註記】

1. 美國　2003.03.12　60/454,182
2.
3.
4.
5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數　順序註記】

1.
2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼　順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼　順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

(一)發明所屬之技術領域

本發明係關於用以在動物〔特別是牛〕身上降低出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕移生之佐劑化疫苗，其製備方法，以及將同樣的東西對動物〔特別是牛〕給藥的方法，以預防其由此排出。

(二)先前技術

出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕是一種有毒力的常見食源性病原體，因此，*E. Coli* O157:H7 在人類健康方面是個非常重要的感染源。自 1982 年起，人類與 *E. Coli* O157:H7 感染有關的疾病報告越來越頻繁，*E. Coli* O157:H7 自美國、加拿大和其他國家的農場和飼育場中取得的大小牛隻糞便中分離出來，這個結果支持人類疾病與牛類產品消費之間的流行病學連結。人類感染的主要來源是來自感染牛肉或其他肉類產品的攝取，而非人與人之間的傳布。

E. Coli O157:H7 移生在反芻動物和其他動物的小腸裡，通常不會在這些動物身上引起明顯的病徵。這些有病菌移生的動物會將 *E. Coli* O157:H7 排到糞便當中，成爲 *E. Coli* O157:H7 的人類感染源。因此撲滅或降低動物〔特別是牛〕身上 *E. Coli* O157:H7 的移生及排出，對預防人類感染是很重要的。現已證明，爲小牛口服接種 *E. Coli* O157:H7 會引發刺激並持續增加血清中對 LPS 的抗體，及對類志賀毒素的中和抗體。也有人試圖以將飼料從穀物換成乾草一段短時間來減低牛隻大腸菌的排出，然而這種更換飼料的

方法無法完全消滅環境中的糞便污染，因爲美國的牛隻不大可能只吃乾草。

因爲屠宰牛隻的大量加工，而要感染一個人類，所需的 *E. Coli* O157:H7 菌數很少〔10-100〕，因此 *E. Coli* O157:H7 仍是個嚴重的健康問題。研究已針對下列方法進行改良：偵測的方法、之後在屠宰時殺死 *E. Coli* O157:H7 的方法、改變牛隻的飲食來降低小腸中 *E. Coli* O157:H7 的數目的方法、及使動物免疫來預防 *E. Coli* O157:H7 排出的方法。但仍有 *E. Coli* O157:H7 溜過這道羅網，再加上人類的疏失〔不當的烹調或交叉感染〕，而造成經濟與公衛方面的災難，災情慘重。近幾年來，科學家、牛隻生產者、記者、協會成員、政府代表和包裝廠表示，有條法令用以規範農場/牧場主人，他們必須負起主動嘗試預防〔或至少將之減到最小〕宰殺牛隻把食源性病原體帶到包裝廠的風險，不管這些病原體是在宰殺牛隻上還是在牛的身體裡。這是基於以下假設：(a)較乾淨的動物會減少病原體出現在宰殺後動物體、肉塊和牛肉終產品的機會，(b)「好的管理實行」和「好的製造實行」有助於提供較乾淨的待宰動物，(c)應研究其所選定之干涉和管理實行方法在將宰殺動物上或其身體內之食源性病原體減到最低一事的影響力。

德州養牛者協會〔The Texas Cattle Feeders Association〕報告過一種叫做 Tasco™ 的產品，係以北大西洋的一種褐色海草製成，在宰殺前十四天摻入食物中，可將牛隻體內的 *E. Coli* O157:H7 降低 300%。小牛新聞〔CALF

News, 2002〕報告有種新的飼料成分，內含益生菌或所謂「好菌」〔事實上是嗜酸性乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* 的菌株〕，可降低 *E. Coli* O157:H7 在活體牛隻中的出現，根據美國肉品協會基金會〔American Meat Institute Foundation〕所資助的研究顯示，這個方法可將菌降低 50% 之多。Zhao 等人在 1998 年報告的結果顯示，在牛隻暴露於 *E. Coli* O157:H7 之前給牠們這些選定的益生菌〔包括非出血性大腸桿菌和奇異變形桿菌 *Proteus mirabilis*〕，能降低大多數動物身上 *E. Coli* O157:H7 的量。L-Pharma, Inc. 現已根據那項研究將一種牛的益生菌商品化。

儘管如此，要製造出一種疫苗來有效預防 *E. Coli* O157:H7 在反芻動物〔特別是牛〕體內移生、以免這些菌從宰殺後動物體跑到人類食物當中，仍然是一項重大的挑戰。

(三)發明內容

發明概述

本發明提供一疫苗組成物，其含有一免疫活性成分〔其係選自由活性減毒 *E. Coli* O157:H7 或其死菌之整體，或抗原的一部份〕，並與一可代謝油及氫氧化鋁佐劑結合。

本疫苗組成物中所用之可代謝油爲一免疫刺激量，連同其他習用的疫苗賦形劑一起。

在本發明之進一步具體例中，疫苗組成物含有至少每單位劑量 1×10^9 個活性減毒 *E. Coli* O157:H7 或其成分，及約 5%至 10%〔體積/體積〕之佐劑，該佐劑係由約 3-8%〔較佳爲 5%〕之可代謝油與約 10-25%〔較佳爲 15%〕之氫氧化

鋁組成。本發明之特佳具體例爲一用於小牛的疫苗組成物，內含至少兩劑量單位之死菌或活性減毒 *E. Coli* O157:H7，其中每該劑量單位含有約至少 1×10^9 個菌苗及約 5 至 25%〔體積/體積〕的佐劑，該佐劑含有至少一種可代謝油和氫氧化鋁，且該劑量單位進一步含有一種藥理可接受載體。

進一步說，本發明的標的和特徵將在下列詳細描述及申請專利範圍中變得十分顯明。

發明之詳細描述

一般而言，新疫苗的設計問題在於活菌疫苗對接受疫苗的標的宿主來說安全性可能有所不足，而死菌或活性減毒疫苗可能無法刺激一足量的免疫反應。一般來說，疫苗組成物中與死菌或活性減毒細菌共用的佐劑或免疫刺激化合物，就是用來取得可接受的效度。然而，標的宿主的安全常因佐劑的加入而受到危害。舉例來說，懷孕的動物在接受含有佐劑之死菌或活體減毒細菌疫苗後，已有許多流產率明顯提高的例子。此外，在食用動物方面，我們很想要將注射位置反應〔injection site reaction〕減到最小，這些反應會對販售作食品消費之動物肉品品質造成負面的影響。

現已發現，當一適合的佐劑〔如可代謝油〕用以和此處描述的免疫活性成分共同使用，則所得之 *E. Coli* O157:H7 疫苗組成物之危險降低可以使用，且特別適用於牛隻。因此，本發明達到有效免疫作用及安全這兩項目標，同時將可能對肉品品質造成危害的注射位置反應降到最低。

一種安全有效的疫苗組成物包括一種選自活性減毒 *E. Coli* O157:H7 或其死菌之整體或其部分的免疫活性成分，及一適合的佐劑。這樣的疫苗將可有效地預防反芻動物的移生問題，從而減少或消除牠們將 *E. Coli* O157:H7 排出、進入人類食物供應當中的可能性。

此處「免疫活性」一詞指的是刺激免疫反應的能力，如刺激抗體生成〔特別是體液抗體〕，或刺激細胞免疫反應。有效並可達到免疫作用之免疫活性成分量多寡不一，爲任何足以喚起一種免疫反應、提供免疫保護、以抵抗 *E. Coli* O157:H7 移生的量額。每劑量單位免疫活性成分的量，較佳爲至少約 1×10^9 菌數，這些量適用於活性減毒菌或其死菌之整體，或其抗原的一部分。

免疫活性成分可能是 *E. Coli* O157:H7 的整體或一部份，而該菌係由以習知技術自移生的動物身上分離出來。這些菌也可能是取自 *E. Coli* O157:H7 爲數眾多可用分離株中的任何一株，如取自那些存有有機體〔如 *E. Coli* O157:H7〕分離株的國家或國際培養收藏中心。舉例來說，在美國菌種庫〔American Type Culture Collection, ATCC〕儲存的 *E. Coli* O157:H7，尤其是 ATCC Nos. 35150、43888、43889、43890、43894 和 43895；在委內瑞拉中央大學菌種庫〔Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, Instituto de Biologia Experimental, Universidad Central de Venezuela〕儲存的 *E. Coli* O157:H7 則爲 CVCM815；在巴斯德研究所菌種庫〔Collection de L'Institut Pasteur,

Institut Pasteur〕儲存的 *E. Coli* O157:H7 則爲 CIP759；在食品工業研究發展研究所的生物資源收集研究中心〔Bioresource Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute〕儲存的 *E. Coli* O157:H7 則爲 BCRC59。同時，PCT WO 00/04922 描述了 *E. Coli* O157:H7 抗原的特殊部分，係由 *E. Coli* O157:H7 的 O-特異多醣製備而來。

在此被視爲一個接種計畫〔vaccination regimen〕者至少爲每種動物一個劑量單位，兩個以上的劑量單位可能會更加有用。一個劑量單位通常可能有約 1 到 2 ml，其中每個劑量單位都含有前述量的細菌或細菌成分。熟習該項技術者將可察知，只要菌苗或其成分能引發免疫作用之有效量被送入動物體內，則每劑量單位之特定疫苗組成物量、以及每個接種計畫之總劑量數都能受到充分的利用。

本發明之 *E. Coli* O157:H7 疫苗組成物包含一合適的佐劑，其最佳者係含有一可代謝油做爲其中的一種成分。「佐劑」一詞在此指的是任何一種可以改善身體對疫苗或免疫體原反應的成分。佐劑通常包含本發明疫苗配方之約 0.1 至 50%〔體積/體積〕，其中較佳爲疫苗的約 1 至 50%，更佳爲約 1 至 20%，最佳爲 1 至 10%。其中又以約 5 至 15%〔體積/體積〕更好。

疫苗組成物中使用的佐劑包含至少一種可被標的物種代謝的免疫刺激油。適用於本發明組成物的可代謝油包括油乳劑，如 SP 油〔下詳〕、Emulsigen〔MPV Laboratories，

Ralston，NZ〕、和 Montanide 264,266,26〔Seppic SA，法國巴黎〕，此外還有花生油和其他蔬菜底油、鯊烯〔鯊魚肝油〕、或其他適合用於獸醫疫苗實行方法之佐劑的可代謝油。

較佳的佐劑組成物除了可代謝油，還包含一種以上的溼潤劑或分散劑，其量爲佐劑體積之約 0.1 至 25%，較佳爲約 1 至 10%，更加爲約 1 至 3%。特佳的溼潤劑或分散劑爲非離子界面活性劑，佐劑的其他成分可能包括苄醇福馬林和硫柳汞〔thimerosal〕，其量至多爲佐劑之約 1%〔體積/體積〕。

一種特佳的佐劑爲一可代謝油如 SP 油，「SP 油」一詞在本描述及申請專利範圍中指的是一種油乳劑，其內含有聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物、鯊烯、聚氧化乙烯山梨糖醇酐單油酸酯和一種緩衝鹽溶液。一般來說，SP 油乳劑含有約 1 至 3%〔體積/體積〕的嵌段共聚物，約 2 至 6%〔體積/體積〕鯊烯〔特佳爲約 3 至 6%〕，及約 0.1 至 0.5%〔體積/體積〕聚氧化乙烯山梨糖醇酐單油酸酯，剩下的部分則爲緩衝鹽溶液。

本發明之極佳疫苗組成物中，可將可代謝油與氫氧化鋁凝膠結合在一起，其較佳量爲約 10-20%〔體積/體積〕，最佳量則爲約 15%〔體積/體積〕。在接種疫苗的反芻動物身上引發的全身及部分免疫反應中，SP 油與氫氧化鋁的結合提供了一種特別有用的疫苗。另一個令人驚訝的特徵是，這些佐劑的結合在一些實例中，與某些抗原形式在安全性

上有明顯的改良。

使用時，在本發明疫苗組成物做爲佐劑之 SP 油的免疫刺激量可能會隨著下列因子改變：免疫活性成分、可能的感染暴露程度、給予疫苗組成物的方法、牛隻的年紀和體型等。一般來說，適用的量在疫苗組成物之約 1%至 50%〔體積/體積〕，較佳爲約 4%至 10%〔體積/體積〕，更佳爲約 4%到 5%〔體積/體積〕。

適用於本發明之疫苗組成物的醫藥〔或藥理〕可接受載體可能爲任何適用於獸醫醫藥組成物之習知液態載體，較佳者爲適用於組織培養基的平衡鹽溶液或其他水溶液。也可使用其他可用載體。

根據下列所述之具體例，適用該項技藝的添加賦形劑可能也包括在疫苗組成物內。如 pH 改質劑可能就有使用。

如下所述，本發明疫苗組成物之成分〔包括載體〕可能以可用的技術將之結合在一起。

E. Coli O157:H7 之免疫活性成分如下所述，爲一活性成分，此外也預期本發明之疫苗組成物可能含有其他活性成分，如直接抗都柏林沙門桿菌〔*Salmonella dublin*〕或鼠傷寒沙門氏菌〔*Salmonella typhimurium*〕等之抗病原成分或其結合物。一種以上這些細菌的量可由有效文獻來決定，或以可用的技術來決定。

在本發明之一個具體例中，本發明之免疫活性成分可能與適合的生物性化合物結合，該生物性化合物如多醣、肽類和蛋白質等，或其結合物。

在本發明之較佳實施例中，發明疫苗組成物可能如前述，在劑量單位形式上配製，以使給藥便利，並確保劑量的統一。可用技術〔如那些適用於乳劑製備者〕的使用可能會影響配方。

發明疫苗組成物可能是以非經口方式給藥，如肌肉注射、皮下注射、腹膜腔注射、皮內注射等，其中以皮下注射爲佳。

(四)實施方式

在實際運用上，本發明之疫苗組成物是以非經口、皮下注射或其他可行的方式給藥，以非經口爲佳，又以皮下爲更佳；而其有效量則依照其預設可能暴露在 *E. Coli* O157:H7 帶原者的時間所排定的時間表來決定。這樣一來，注射後的動物可能就有時間在自然暴露之前建立免疫力。在未限定的例子中，典型的處理行程或給藥計畫可能包括非經口給藥，其中又以在可能暴露之前至少約 2-8 週以皮下注射一個劑量單位爲佳。給藥兩次爲佳，如一次在可能暴露菌苗之前八週注射一個劑量單位，之後在可能暴露經處理動物之 3-5 週前投以第二劑。如前所述，一個劑量單位典型會落在 0.1 至 10ml 的疫苗組成物內，該疫苗組成物中活性物的量、佐劑和非活性物的比例如前述。一單位劑量以落在約 0.5 至 5ml 的範圍內或許較佳，其中又以約 1 至 2ml 特佳。

爲更清楚地了解本發明，以下爲其實施例。這些實施例僅用於描述，須了解其在任一方面非爲限制本發明之範

圍，亦不爲其基礎原則。確實，對熟知此項技藝者來說，本發明除了此中所顯示者之外的許多改質型會透過下列實施例及描述變得更加顯明。這樣的改質亦落在所附申請專利範圍之內。

實施例

實施例 1：疫苗製備

SP 油配方

成分描述	體積
聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物〔Pluronic® L121, BASF, Mt. Olive, NJ〕	20.0m
鯊烯〔Kodak, Rochester, NY〕	40.0m

這些成分混合並均質化，直到形成一穩定的團塊或乳劑。在均質化之前，這些成分或混合物可能接受滅菌處理，乳劑可能進一步過濾使之無菌。

疫苗配方：牛 *E. Coli* O157:H7 菌苗

劑量體積：每劑 2ML

成分	儲存濃度	量/ml	量/劑	儲存體積/ml 疫苗	總體積/15 15,000ml
E. Coli O157:H7 ATCC 43889	3.86×10^9 菌數/ml〔1×〕	5×10^8 菌數	1×10^9 菌數	0.129	1,943ml
ALOH 〔滅菌凝膠〕	N/A	15% v/v	15% v/v	0.15	2,250ml
*SP 油 〔含硫柳汞〕	N/A	5% v/v	5% v/v	0.05	750ml
5% 硫柳汞	N/A	1:2500	1:2500	N/A	5.25ml
0.01M PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	10,051.75ml
					總數 15,000ml

自發酵收取 13.8 公升，濃度 3.86× 10^9 菌數/ml

*750ml SP 油含有 0.75ml 的 5% 硫柳汞

〔750ml×0.001=0.75ml〕

6ml－ 0.75ml＝ 5.25ml 所需之額外量。

混合順序：

1. 在 150-200rpm 混合活性減毒細菌至少 30 分鐘，確定充分混合。
2. 取出 3,000ml 混合菌液，在 10,000rpm 離心 30 分鐘〔剩下抗原儲存保持在 4℃〕。
3. 收集沉澱，將之重新懸浮在 0.01M PBS，QS 至 3,000ml 並充分混合。

4. 取出 971.5ml 重新懸浮的菌，加入 2,028.5ml 的 0.01M PBS，以使總體積達到 3,000ml。此爲部分 A。
5. 另外取出 971.5ml 重新懸浮的菌，加入 2,028.5ml 的 0.01M PBS，以使總體積達到 3,000ml。此爲部分 B。
6. 加入 2,250ml ALOH 凝膠到部分 A，將此結合物在 150-200rpm 混合一小時。
7. 加入 750ml SP 油到部分 B，將此結合物在 150-200rpm 混合一小時。
8. 將上述部分 A 與部分 B 混合，將此結合物在 150-200rpm 混合一小時。
9. 加入 5.25ml 的 5%硫柳汞，以 0.01M PBS 將體積 QS 到 14,800ml。
10. 將疫苗在 150-200rpm 混合至少三十分鐘。
11. 確認 pH 值，如有需要，將 pH 值調到 7(+0.2)。
12. 在 pH 值調整過後，以 0.01M PBS 將體積 QS 到 15,000ml，並混合至少另外 30 分鐘。
13. 裝填疫苗並貼上標籤。

實施例 2：以含佐劑或不含佐劑之 *E. Coli* O157:H7 疫苗對牛隻接種，並進行疫苗安全測試，繼之測量牛隻血清反應。

本研究使用了二十四隻商業購入的健康混合飼育牛隻，公牛和母牛都有，在年齡介於 6-12 個月時第一次接種。牛隻群飼於一合乎動物福祉規定的房舍，水及食物可隨意取用。在與研究主持人諮商過後，所有動物都由指定獸醫進行必要的處置。研究進行之前及之中所做的處理都有文

件記錄，需要抗生素或可能需要免疫抑制藥物的動物自本研究中移除。

配製疫苗組成物並進行無菌測試及實驗動物安全測試，如於 9 CFR§§113.26 及 113.33 中載明者。疫苗儲存於 2-7℃，小牛隨機分成一組六隻，第六組以習知佐劑化疫苗進行接種，第七組以同本發明進行佐劑化之疫苗進行接種，第五組則保持爲無接種的控制組。小牛以皮下注射方式接種 2ml 合適的疫苗。第二劑在 3-4 週內進行，第三劑則再隔 3-4 週。小牛在第一及第二次接種時抽血，此後每週抽一次血，直到第三次接種後四週爲止。每個血清樣本均進行抗體反應的評估。

以統計方法進行血清分析，以決定抗體反應之間的差異。用 ELISA〔酶標記免疫吸附測定法〕之價數來評估疫苗反應，將結果平均。

每次接種後，對注射位置進行爲期三天的觀察。若發現任何注射位置反應，則牛隻接種後的觀察需進行多至 14 天，或到該反應消失爲止。對注射位置反應進行三維測量〔長、寬、高〕。每日反應值是以長×寬×高來計算，總反應值是用 Mann Whitnry Rank Sum 進行分析，顯著水準設定在 $p<0.05$。

結果如下：

血清學：ELISA 價數

控制組：第五組

標準佐劑：第六組

發明 SP 油/氫氧化鋁佐劑：第七組

疫苗組	小牛編號	第一次接種後 0 天	第三次接種後 14 天
5	283	640	1280
5	291	640	640
5	367	640	640
5	368	640	640
5	369	640	640
		640	735
6	389	640	640
6	277	640	640
6	292	2560	2560
6	379	320	640
		735	868
7	390	640	1280
7	384	1280	2560
7	294	320	1280
		573	1184

結果：根據第三次接種後 14 天之 ELISA 價數等級，第七組的動物呈現較控制組及第六組強的免疫反應。

評估注射位置反應之反應值

	-1dpv2	0dpv2	1dpv2	2dpv2	3dpv2	4dpv2	5dpv2
控制組	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
習知組	0	0	68.4	58.0	31.9	30.8	19.0
發明佐劑組	0	0	25.4	61.5	43.3	52.1	61.3

	6dpv2	7dpv2	10dpv2	11dpv2
控制組	0.0	0.0	0.0	0.0
習知組	9.8	10.1	6.6	1.5
發明佐劑組	24.9	15.3	1.2	2.8

-1dpv2=第二次接種前一天的注射位置評估

0dpv2=第二次接種當天的注射位置評估

1dpv2=第二次接種後一天的注射位置評估

2dpv2=第二次接種後二天的注射位置評估

3dpv2=第二次接種後三天的注射位置評估

4dpv2=第二次接種後四天的注射位置評估

5dpv2=第二次接種後五天的注射位置評估

6dpv2=第二次接種後六天的注射位置評估

7dpv2=第二次接種後七天的注射位置評估

10dpv2=第二次接種後十天的注射位置評估

11dpv2=第二次接種後十一天的注射位置評估

結果顯示，以本發明佐劑化之疫苗有相似的反應位置反應率，同時其免疫反應明顯較高。

實施例 3：田野研究

將實施例 1 的疫苗組成物拿到商業飼育場進行爲期兩個月的研究，評估並比對多種干涉因子降低 *E. Coli* O157 在飼牛中流行的效度。實施例 1 中的大腸菌在研究中施打兩次，其間間隔一個月。最後一次接種三十天後，USDA-FSIS 允許屠宰施打疫苗的動物。該疫苗會刺激宿主的免疫系統，特別是對 T 及 B 細胞兩者，以引出體液抗體及一些 CMI 因子。

收集送往屠宰中心 48 小時內每欄 25 隻牛的牛皮及糞便樣本，收集之後，樣本被送到實驗室進行分析。*E. Coli* O157 分析的資料報告百分比形式，其係爲病原體測試爲正反應的牛皮、糞便、及牛皮或糞便樣本，除以每欄收集總樣本數。由於牛皮和糞便兩者的樣本都來自相同的動物，因此研究人員分析數據時，只要牛皮或糞便中任一項爲正，則判定該動物爲正。各種處理正樣本的百分比差異，是以卡方檢定的適合度測試來決定〔SAS Inc., Cary, NC〕。吾人發現，疫苗在牛皮樣本中能降低病原體 20.3%的流行，在糞便樣本中則可降低 31.1%。當與其他干涉策略〔如以嗜酸性乳酸菌處理，或在食物供應中加入新黴素〕結合時，該疫苗能將抗原排出的情形壓得更低。

(五)圖式簡單說明：無

伍、中文發明摘要：

本發明提供一安全有效之疫苗組成物來防止出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕之排出。免疫疫苗配方爲一免疫活性成分出血性大腸桿菌、一佐劑如可代謝油及一醫藥可接受載體。本發明也提供一種用來預防並改進出血性大腸桿菌排出的方法。

陸、英文發明摘要：

The present invention provides a safe and effective vaccine composition against *E. coli* O157:H7 shedding. An immunogenically active component *E. coli* O157:H7, an adjuvant such as a metabolizable oil, and a pharmacologically acceptable carrier are formulated into an immunizing vaccine. The invention also provides a method for the prevention or amelioration of *E. coli* O157:H7 shedding.

拾、申請專利範圍：

1.一種疫苗組成物，包括：一種免疫活性成分，其係選自活性減毒出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕或其死菌之整體或部分，或其混合物；一種可代謝油佐劑；及一選擇性之醫藥可接受載體。

2.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中免疫活性成分爲活性減毒出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕之整體或部分。

3.如申請專利範圍第 1 或第 2 項之組成物，其中免疫活性成分爲活性減毒出血性大腸桿菌〔*E. Coli* O157:H7〕之整體。

4.如申請專利範圍第 1 或第 2 項之組成物，其中佐劑占疫苗組成物之 0.1 至 50%〔體積/體積〕。

5.如先前申請專利範圍中任一項之組成物，其中佐劑包含一可代謝油和氫氧化鋁凝膠。

6.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中佐劑包含從 1 至 50%〔體積/體積〕的可代謝油。

7.如申請專利範圍第 5 或第 6 項之組成物，其中可代謝油是鯊烯。

8.如申請專利範圍第 5 到第 7 項之組成物，其中佐劑進一步包含一種以上的浸濕劑及/或分散劑。

9.如申請專利範圍第 8 項之組成物，其中浸濕劑及/或分散劑占佐劑之從 0.1 至 25%〔體積/體積〕。

10.如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中該浸濕劑及/或分

散劑係選自非離子介面活性劑所構成之組群。

11.如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該非離子介面活性劑係選自聚氧化乙烯/聚氧化丙烯嵌段共聚物和聚氧化乙烯酯所構成之組群。

12.如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該免疫活性成分的量足以提供至少每單位劑量 1×10^{9} 菌數。

13.一種用以降低動物排出 *E. Coli* O157 的方法，其中包括以如申請專利範圍第 1 項之組成物來對動物進行處理。

14.如申請專利範圍第 13 項之方法，其中進一步包括以嗜酸性乳酸菌〔*Lactobacillus acidophilus*〕來處理動物，或在食料中加入新黴素。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明:

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。