

發明專利說明書公告本

(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：96133683

A61K³⁹/02 (2006.01)

※ 申請日期：96.9.10

※IPC 分類：

A61L²/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經熱處理之菌苗以及自此等經熱處理之菌苗所製備之乳化疫苗

HEAT TREATED BACTERINS, AND EMULSION VACCINES PREPARED FROM SUCH HEAT TREATED BACTERINS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

輝瑞產品公司 / PFIZER PRODUCTS INC.

代表人：(中文/英文)

伍德 大衛 J. / WOOD, DAVID JOHN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國康乃狄格州格羅頓市東方角路

Eastern Point Road, Groton, CT 06340, 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. 古德葉 馬克 D. / GOODYEAR, MARK DAVIS
2. 胡瑟 麥克 J. / HUETHER, MICHAEL JOHN
3. 曼南 拉瑪莎麥 M. / MANNAN, RAMASAMY MANNAR
4. 歐伊恩 南西 L. / OIEN, NANCEE LOIS

國籍：(中文/英文)

1.-4. 美國 / U. S. A.

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：。

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、 2006/09/11、 60/843,665

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

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】

發明領域

本發明通常係關於疫苗的領域以及安定乳化疫苗的方法。明確而言，本發明係關於經熱處理菌苗、製備經熱處理菌苗的方法，以及自此等經熱處理菌苗所製備的乳化疫苗。

【先前技術】

發明背景

疫苗接種逐漸被用於控制動物的傳染性疾病。佐劑由於能增加體液及/或細胞免疫的抗原反應而經常被用於疫苗。由於乳劑可作為佐劑及具有在注射部位作為保留該抗原之儲器的特性，因此疫苗經常被配製成乳劑。乳化劑通常被用於乳化疫苗內。除了利用乳化劑之外，亦可藉由機械方法縮小液滴尺寸而達到安定乳化疫苗的目的。

美國專利案5,084,269係關於含結合礦物油之卵磷脂的佐劑配方，其在動物宿主體內產生較小的刺激以及同時可誘發增加全身性免疫反應。根據美國專利案5,084,269的市售組成物為輝瑞公司的商品Amphigen®。

通常，細菌性抗原經加熱後極不安定以及甚至暴露於稍高的溫度下即會降低抗原的活性。例如目前的炭疽菌苗在37°C下48小時之後會喪失其全部的生物活性(S. Sing, N. Ahuja, V. Chauhan, E. Rajasekaran, W.S. Mohsin, R. Bhat, 和R. Bhatnagar; *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 2002年9月6

液的不安定及分解，其包括一或多種乳液分解酵素例如酯酶、脂肪酶和磷脂酶。這些酵素、酯酶、脂肪酶和磷脂酶統稱為脂解酶。可利用稱為鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯 (C-POM) 的合成基質測定菌苗的脂解酶活性。脂解酶的活性為測定脂解酶的水解速率。藉由增加之脂解酶活性產物的螢光強度監控反應中脂解酶所產生的水解速率。該反應速率視所選擇的精確水解測試條件而定，因而比較脂解酶活性以測定水解速率時必需使用在相同試驗條件下所產生的數據。其方法被揭示於許多文獻中，包括 Kurioka S. 和 Matsuda M. (1976) *Ana. Biochem.* 75 : 281~289 ; De Silva NS 和 Quinn PA. (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25 : 729~731 ; 以及 Grau, A. 和 Ortiz, A. (1998) *Chem. Phys. Of Lipids* 91 : 109~118。

在乳化疫苗中，乳液的分解會導致其成分的相分離。此可被理解，因為當相分離時取自容器的個別劑量可能含有不同濃度的疫苗成分。此外，喪失乳化性可能導致失去乳化劑的佐劑活性以及降低疫苗的抗原性。

疫苗內通常含有伴隨菌苗的減毒活病毒。此類疫苗極為有用，因為一次接種中可使用單一疫苗產生對不同疾病的免疫力。若菌苗內存在脂解酶活性時，其將導致從乳液釋出乳化劑。在無乳化劑之下該活疫苗病毒可能被裂解及不活化，因而使病毒喪失感染力。

藉由培養目標細菌形成用於疫苗的菌苗，然後殺死細菌以產生含各種細菌成分包括細胞壁的菌苗。可藉由各種

螺旋體、傷寒性鉤端螺旋體、細鉤端螺旋體的菌苗而言，有一種用於抗原活性的法制化測試方法(9CFR§113.101、§113.102、§113.103、§113.104和§113.105)。這些菌種的可接受抗原活性指可誘發經免疫倉鼠之保護性免疫反應的能力，因而當以同源活菌刺激時經免疫倉鼠的存活率為至少75%以及未免疫倉鼠的死亡率為至少80%。在L. hardjo的抗原實例中，可接受抗原活性指該疫苗可誘發接種含有L. hardjo細菌性抗原疫苗之犢牛 ≥ 40 對抗L. hardjo之血清凝集幾何平均力價的能力。其他菌苗的可接受抗原活性指誘發經接種動物對抗同源活菌或通過法制化效力試驗之保護性免疫反應的能力。

可在一溫度範圍及長短不一的時間進行該熱處理。通常，該熱處理可在約35至約80°C的溫度下處理約20分鐘至約24小時。當該菌苗被加熱至例如約75至約80°C的較高溫度時，則其可使用較短的加熱時間。當以較低溫度進行熱處理時，則需加熱較長的時間。另一種溫度和時間的組合為在約60至約70°C的溫度下加熱約9至約10小時。另一種溫度和時間的組合為在約65至約70°C的溫度下加熱約5至約8小時。另一種溫度和時間的組合為在約65至約70°C的溫度下加熱約1小時。另一種溫度和時間的組合為在約55至約65°C的溫度下加熱約5至約8小時。

熱處理後的菌苗具有比新鮮製備菌苗較低的脂解酶活性，否則需以相同的方法配製新鮮的菌苗。於是，該經熱處理菌苗藉由一般製造疫苗的方法被併入疫苗內。這些方

法已為技術中所習知。

藉由將所欲菌苗混合一油相及一乳化劑或各種乳化劑而形成乳化疫苗。然後將組合物激烈攪拌而形成乳液。適當的攪拌方法包括均質化及接著進行微噴射乳化。在乳化
5 之前該組合物內可加入防腐劑和賦形劑。

疫苗可兼含有菌苗和病毒抗原。在製備含有菌苗和病毒抗原的疫苗中，將含有乳化劑或各種乳化劑及視需要的防腐劑和賦形劑的菌苗、任何病毒抗原混合一油相，然後進行乳化。在形成乳液之後，可利用NaOH或HCl溶液將配
10 方的酸鹼度調整至適當的pH。在使用疫苗時，其酸鹼度通常需接近中性以避免注射部位的刺激。其酸鹼度通常約7.0至約7.3。

用於乳化疫苗配方的適合油相包括非代謝油及可代謝油。非代謝油包括礦物油例如白礦物油和輕礦物油。可代
15 謝油包括植物油、魚油和合成脂肪酸甘油酯。

可用於製備本發明之乳化疫苗的乳化劑實例包括一般常見的疫苗乳化劑如磷脂、山梨糖醇酯、聚乙氧基化山梨糖醇酯，以及甘露糖醇衍生物。磷脂乳化劑包括卵磷脂、
20 磷脂醯乙醇胺、磷醯肌醇、磷醯絲胺酸，以及卵磷脂(舉例如，Amphigen[®])。山梨糖醇酯乳化劑包括山梨糖醇單月桂酸酯(例如，Span[®] 20和Arlacel[®] 20)、山梨糖醇單油酸酯(例如，Span[®] 80和Arlacel[®] 80)、山梨糖醇單棕櫚酸酯(例如，Span[®] 40和Arlacel[®] 40)、山梨糖醇單硬脂酸酯(例如，Span[®] 60和Arlacel[®] 60)。聚乙氧基化山梨糖醇酯包括聚乙

氧基山梨糖醇單月桂酸酯(例如，Tween[®] 20和Tween[®] 21)、
聚乙氧基山梨糖醇單油酸酯(例如，Tween[®] 80)、聚乙氧基
山梨糖醇單棕櫚酸酯(例如，Tween[®] 40)，以及聚乙氧基山
梨糖醇單硬脂酸酯(例如，Tween[®] 60)。甘露糖醇衍生物乳
5 化劑包括甘露糖醇十八烷酸醚。Span[®]、Arlacel[®]和Tween[®]
為ICI Americas公司的商標名稱。Amphigen[®]為輝瑞公司的
商標名稱。通常，疫苗被配製成一般的水包油乳液，但其
亦可被製備成反相的油包水乳液。

疫苗內可使用各種的佐劑例如Quil A、膽固醇、磷酸鋁
10 和氫氧化鋁，以及防腐劑例如硫柳酸汞。Quil A為萃取自南
美洲皂皮樹(*Quillaja Saponaria Molina*)之樹皮的皂皮樹純
化混合物。Quil A直接作用於免疫系統而啟動全身性敏感度
狀態。此時，其將誘發體液及細胞性免疫反應。抗原和佐
劑的親水性鏈開始相互作用而被輸送入細胞溶質以進行內
15 源徑路的處理。由於適量的膽固醇可消除不良的副作用，
因此Quil A通常共用膽固醇。當膽固醇結合Quil A時膽固醇
與Quil A可形成螺旋狀構造的不溶性複合物，因此使該分子
暴露出有助於刺激免疫反應的糖單位。

病毒性抗原通常被加入含菌苗的疫苗。此方法的其中
20 一項優點為可使用一疫苗產生對數種疾病的免疫性而不需
投與數種不同的疫苗以達到相同的結果。疫苗內可使用死
毒和減弱活病毒。可被使用的病毒為禽皰疹病毒、牛皰疹
病毒、犬皰疹病毒、馬皰疹病毒、貓病毒性鼻氣管炎病毒、
馬立克病毒、羊皰疹病毒、豬皰疹病毒、假性狂犬病毒、

禽副黏液病毒、牛呼吸道融合病毒、犬瘟熱病毒、犬副感冒病毒、牛副感冒病毒³、羊副感冒病毒³、牛瘟病毒、邊界病(border disease)病毒、牛病毒性腹瀉(BVD)病毒、豬瘟病毒、禽白血病病毒、牛免疫缺陷病毒、牛白血病病毒、

5 馬傳染性貧血病毒、貓免疫缺陷病毒、貓白血病病毒、綿羊進行性肺炎病毒、綿羊肺腺癌病毒、犬冠狀病毒、牛冠狀病毒、貓腸內冠狀病毒、貓傳染性腹膜炎病毒、豬流行性腹瀉病毒、豬血球凝集性腦脊髓炎病毒、豬小病毒、傳染性胃腸炎病毒、火雞冠狀病毒、牛流行熱病毒、狂犬病

10 病毒、水疱性口炎病毒、禽流行性感感冒病毒、馬流行性感感冒病毒、豬流行性感感冒病毒、犬流行性感感冒病毒、美國東部馬腦炎(EEE)病毒、委內瑞拉馬腦炎(VEE)病毒，以及美國西部馬腦炎病毒。

若菌苗內存在脂解酶活性，其將導致乳液釋出乳化

15 劑。此游離乳化劑將破壞活病毒包膜以及不活化該活疫苗病毒因而導致喪失病毒感染力。因此，菌苗的熱處理可安定該液液和保留其佐劑效應，以及保留病毒的感染力。

下列實例係提供作為進一步說明之目的而非擬用於限制本發明申請專利範圍附件內的範圍。

20 程序

程序1 濁度的測定

藉由光散射法測定其濁度單位(NU)的濁度。在確定條件下比較樣本的散射光強度和標準參考懸浮液的散射光強度。散射光的強度越強則樣本的濁度越高。引導一光源進

入該樣本以及在光源的90°方向測定其散射光。藉由測定甲臍(formazin)懸浮液的散射光校正該儀器。

濁度計的校正

藉由蒸餾水過濾通過具有0.2微米孔徑的薄膜過濾器製備超過濾水。藉由在超濾水內溶解1.00克硫酸脲、 $(\text{NH}_2)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ 製備第一溶液，然後在計量燒瓶內以超濾水稀釋至100毫升。藉由在超濾水內溶解10.00克六亞甲基四胺製備第二溶液，然後在計量燒瓶內以超濾水稀釋至100毫升。藉由混合5.0毫升的第一溶液及5.0毫升的第二溶液製備甲臍懸浮液。使混合物在約24°C靜置24小時。以超濾水將該混合物稀釋至100毫升而形成具有400NU濁度的儲備混濁懸浮液。藉由超濾水將10.00毫升之儲備混濁懸浮液稀釋至100毫升製備40NU的甲臍混濁懸浮液。藉由稀釋該儲備溶液製備其他的校正溶液。

15 濁度的測定

以超濾水稀釋待測定的樣本而使其濁度落於濁度計的校正範圍內。測定該濁度以及利用下列方程式計算其原始濁度：

$$\text{原始濁度 NU} = \frac{M \times (D + O)}{O}$$

20 該M為稀釋樣本的NU濁度

D為稀釋水的毫升體積

O為原始樣本的毫升體積

程序2 脂解酶的分析

利用鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯 (O-pivaloxymethyl umbelliferone) 作為螢光底物測定脂解酶活性。非螢光底物的脂解酶催化水解可產生在含水條件下不安定的羥甲基醚。該不安定羥甲基醚的分解可產生甲醛和傘形花內酯的
5 螢光產物。監控所產生之傘形花內酯的螢光強度作為時間函數可提供脂解酶酵素活性的敏感性動能測定。

在純 DMSO 內製備 5 毫克分子之儲備濃度的鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯 (Molecular Probes 公司產品編號 P35901) 溶液；將未使用溶液貯存於 -20°C 並避免陽光照射。利用 58
10 毫克分子 TRIS-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 將 5 毫克分子之鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯溶液稀釋至 750 微克分子，然後將獲得的溶液預熱至 37°C 。在室溫的 6500X 重力下將鈎端螺旋體樣本或對照緩衝液/介質離心 10 分鐘以形成團粒及上清液。在小
15 體積 96 孔平板 (Corning 3393, 暗聚乙烯非結合表面, 半區) 的檢測孔內藉由混合 15 微升之 100 毫克分子 TRIS-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 和 15 微升之在室溫下取自鈎端螺旋體樣本或對照緩衝液/介質的上清液以進行反應；在 37°C 下預培養 10 分鐘；然後藉由加入 20 微升之 750 微克分子鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯或對照緩衝液/介質開始進行反應。獲得的反應混
20 合物含有 53 毫克分子 TRIS-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 以及 0 或 300 微克分子的鄰特戊醯氧甲基傘形花內酯。在一小時期間每隔 30~45 秒測定其螢光強度 (Spectramax Gemini XS, 37°C , $\lambda_{\text{ex}}=360$ 奈米, $\lambda_{\text{em}}=460$ 奈米, PMT 敏感度設定在"中等", 每孔讀取 6 次)。從獲得之進度曲線的斜率判定其反應速率。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

實例1 藉由熱處理降低脂解酶活性

製備含有犬鈎端螺旋體、出血性黃疸鈎端螺旋體、傷寒性鈎端螺旋體、L. hardjo和細鈎端螺旋體等菌種的硫柳酸汞殺死鈎端螺旋體溶液以形成一菌苗。將六件菌苗樣本分別在4°C、37°C、45°C、56°C、65°C和80°C下貯存隔夜。貯存於4°C的樣本作為未處理對照。在37°C、45°C、56°C、65°C和80°C下貯存12小時的樣本為經熱處理樣本。貯存之後，根據程序2的方法測定水解於各菌苗之受測基質內的速率。樣本的水解速率除以貯存於4°C之樣本的水解速率再乘以100即為貯存後各菌苗保留的原始脂解酶活性百分比。下表顯示其貯存溫度及貯存後保留原始脂解酶活性的百分比。

貯存溫度 (12小時)	4°C	37°C	45°C	56°C	65°C	80°C
原始脂解酶 活性百分比	100%	55.4%	32.5%	15.7%	10.8%	8.4%

15

實例2 實驗性疫苗配方的製備

培養犬鈎端螺旋體、出血性黃疸鈎端螺旋體、傷寒性鈎端螺旋體、L. hardjo和細鈎端螺旋體的培養基。以濁度單位(NU)測定各培養基的濁度。以硫柳酸汞殺死細菌形成菌苗。各菌苗在65°C熱處理8小時以降低其脂解酶活性。結合該菌苗然後混合Amphigen[®]、佐劑、防腐劑和稀釋緩衝液而使各5毫升劑量的疫苗含有下表中說明的成分。

抗原的濃度

成分	成分濃度/每劑量
犬鉤端螺旋體	1200 NU/5毫升劑量
出血性黃疸鉤端螺旋體	1200 NU/5毫升劑量
傷寒性鉤端螺旋體	1200 NU/5毫升劑量
L. hardjo	2400 NU/5毫升劑量
細鉤端螺旋體	1200 NU/5毫升劑量

利用 Silverson 均質機均質化配方以及利用微噴均質機從微流體進行微流體化。在均質及微流體化之後，將配方的酸鹼度調整至 pH 7.0 至 7.3。

實例3 在倉鼠及母牛內的效力檢測

利用標準實驗室和宿主動物模式將實例2的疫苗投與至倉鼠和母牛以測定其效力。然後以一劑量的犬鉤端螺旋體、出血性黃疸鉤端螺旋體、傷寒性鉤端螺旋體、L. hardjo 或細鉤端螺旋體刺激受測倉鼠以測定疫苗的效力。以測定的存活數證明其效力。測定對抗 L. hardjo 的牛顯微凝集力價以證明該疫苗在母牛體內的效力。下表顯示製備自熱處理之鉤端螺旋體菌苗的疫苗能產生通過效價標準的抗原性反應。

鉤端螺旋體 熱處理條件	倉鼠存活數				牛血清型
	犬	黃疸	傷寒	細	hardjo
65°C (8小時)	10/10	10/10	10/10	10/10	合格
未處理	10/10	10/10	10/10	10/10	合格

- 測對照(VAC)進行殺病毒活性檢測。以各劑量體積再水合兩種單價殺病毒檢測對照。混合該兩種再水合單價VACs然後在定力價及培養至TCID₅₀(50%組織培養感染劑量)之活病毒力價的細胞之前在20~25°C下培養2小時。其無法使病毒力價的喪失大於0.7 TCID₅₀/毫升。

此殺病毒檢測之病毒力價喪失的結果示於下表：

鈎端螺旋體加熱條件	病毒力價喪失(TCID ₅₀)		
	BHV-1	PI3	BRSV
65°C下8小時	0.1	0.0	0.4
未處理	1.0	≥ 1.2	≥ 1.3

- 以未經處理之鈎端螺旋體菌苗製成的疫苗顯示具有較高的殺病毒活性。以經處理之鈎端螺旋體菌苗製成的疫苗顯示不具有殺病毒活性。

【圖式簡單說明】

(無)

【主要元件符號說明】

(無)

五、中文發明摘要：

揭示一種經熱處理菌苗，製備經熱處理菌苗的方法，以及製備自該等經熱處理菌苗的乳化疫苗。

六、英文發明摘要：

Heat treated bacterins, a method of producing heat treated bacterins, and emulsion vaccines prepared from such heat treated bacterins are disclosed.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(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)

日；295(5)：1058~62)。

修正
補充
年 月 日

【發明內容】

發明之摘要

本發明係關於經熱處理之菌苗、製備經熱處理菌苗的方法，以及自此等經熱處理菌苗所製備的乳化疫苗。本方法包含加熱該菌苗至約35至約80°C的溫度而形成經熱處理菌苗。

發明之詳細說明

定義

10 可接受抗原活性—“可接受抗原活性”一詞指經同源活生物體刺激或法制化效力試驗之後經接種動物所誘發保護性免疫反應的能力。

菌苗—“菌苗”一詞指可用作為疫苗成分的死菌懸浮液。

15 乳化劑—“乳化劑”一詞指用於製造更安定之乳劑的物質。

乳劑—“乳劑”一詞指一液體的小液滴懸浮於其他連續相液體內之兩種不可混合液體的組成物。

20 經熱處理菌苗—“經熱處理菌苗”一詞指具有脂解酶活性與熱處理前脂解酶活性相比為50%或更低且具有可接受抗原活性的經熱處理菌苗。

反相乳劑—“反相乳劑”一詞指油包水乳液。

脂解酶—“脂解酶”一詞指可導致乳化疫苗內乳化劑分解的酵素、酯酶、脂肪酶和磷脂酶。

常規乳液—“常規乳液”一詞指水包油乳液。

水包油乳液—“水包油乳液”一詞指其油之小液滴懸浮於一連續水相中的乳液。

修正
年 月 日
補充

室溫—“室溫”一詞指從 18 至 25°C 的溫度。

油包水乳液—“油包水乳液”一詞指其水液滴懸浮於一
5 連續油相中的乳液。

說明

本發明係關於降低脂解酶活性的菌苗、從此等菌苗所製備之疫苗，以及降低菌苗之脂解酶活性的方法。除了抗原成分之外，一些菌苗具有脂解酶活性。當具有脂解酶活
10 性之菌苗被併入乳液內時，該脂解酶可分解用於形成乳液的乳化劑。含高脂解酶活性之菌苗的乳化疫苗易造成乳液的不安定，反之含低濃度脂解酶的菌苗則較安定。殺滅時會產生具有脂解酶活性之菌苗的實例細菌包括不動桿菌(*A. calcoaceticus*)、醋酸桿菌(*A. pascuarius*)、產氣單胞菌(*A.*
15 *hydrophila*)、脂環桿菌(*A. acidocaldarius*)、古丸菌(*A. fulgidus*)、短小芽孢桿菌(*B. pumilus*)、嗜熱脂肪芽孢桿菌(*B. stearothermophilus*)、枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)、熱鏈狀桿菌(*B. thermocatenulatus*)、洋蔥伯克氏菌(*B. cepacia*)、莢殼伯克氏菌(*B. glumae*)、結腸彎曲桿菌(*C. coli*)、空腸彎曲桿
20 菌(*C. jejuni*)、豚腸彎曲桿菌(*C. hyointestinalis*)、披衣菌(*C. trachomatis*)、色桿菌(*C. viscosum*)、豬丹毒桿菌(*E. rhusiopathiae*)、李斯特菌(*L. monocytogenes*)、大腸桿菌(*E. coli*)、嗜血桿菌(*H. influenzae*)、細胞內奈瑟氏球菌(*L. intracellularis*)、嗜肺性退伍軍人桿菌(*L. pneumophila*)、摩

拉克氏菌 (*Moraxella* sp.)、豬肺炎微漿菌 (*M. hyopneumoniae*)、絲狀微漿菌亞種 (*M. mycoides* subsp.)、產氣莢膜梭狀桿菌 (*C. perfringens*)、發光光桿狀菌 (*P. luminescens*)、痤瘡桿菌 (*P. acnes*)、變形桿菌 (*P. vulgaris*)、

5 假單胞菌 (*P. wisconsinensis*)、綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*)、螢光性假單胞菌 (*P. fluorescens* C9)、螢光性假單胞菌 (*P. fluorescens* SIKW1)、脆假單胞菌 (*P. fragi*)、淺黃假單胞菌 (*P. luteola*)、食油假單胞菌 (*P. oleovorans*)、假單胞菌屬 B11-1、真養產鹼桿菌 (*A. eutrophus*)、嗜冷桿菌 (*P.*

10 *immobilis*)、普氏立克次體 (*R. prowazekii*)、鼠傷寒沙門氏桿菌 (*S. typhimurium*)、黏質沙雷氏菌 (*S. marcescens*)、螺旋藻 (*S. platensis*)、金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、豬葡萄球菌 (*S. hyicus*)、白色鏈黴菌 (*S. albus*)、桂皮鏈黴菌 (*S. cinnamomeus*)、exfoliates 鏈黴菌、瘡

15 痂病鏈黴菌 (*S. scabies*)、嗜酸熱硫化葉菌 (*S. acidocaldarius*)、*Syechocystis* sp.、霍亂弧菌、伯氏疏螺旋菌 (*B. burgdorferi*)、齒垢密螺旋體 (*T. denticola*)、微螺旋體 (*T. minutum*)、潰蝕齒密螺旋體 (*T. phagedenis*)、*Treponema refringens*、文氏密螺旋體 (*T. vincentii*)、蒼白密螺旋體 (*T.*

20 *palladium*)，以及鈎端螺旋體例如已知的病原菌為犬鈎端螺旋體 (*L. canicola*)、傷寒性鈎端螺旋體 (*L. grippityposa*)、*L. hardjo*、出血性黃疸鈎端螺旋體 (*L. icterohaemorrhagiae*) 和細鈎端螺旋體 (*L. pomona*)。

因此可分解用於形成乳液之乳化劑的脂解酶會導致乳

方法殺死細菌包括將其暴露於化合物例如硫柳酸汞 (merthiolate)、福馬林、甲醛、二乙胺、二元乙烯胺(BEI)、 β -丙內酯(BPL)，及戊二醛(glutaraldehyde)。亦可使用這些化合物的組合。此外，亦可利用滅菌性輻射線殺死細菌。

- 5 目前已發現具有脂解酶活性之菌苗可藉由熱處理降低其脂解酶活性。明確而言，藉由約35至約80°C的溫度加熱該菌苗以形成具有可接受抗原活性之經熱處理菌苗時可降低菌苗的脂解酶活性。該熱處理的時間足以使經熱處理菌苗的脂解酶活性與熱處理前之菌苗中所發現者相比為50%或更
- 10 低。對良好安定性的乳化疫苗而言不必然需將脂解酶活性降低至零的程度。已發現可從具有脂解酶活性程度與熱處理前之脂解酶活性程度相比為50%或更低的經熱處理菌苗製備具有良好保存期限的疫苗。

- 當使用受測基質之水解速率測定一菌苗的脂解酶活性
- 15 時，則可比較熱處理前受測基質的水解速率及熱處理後的水解速率。該熱處理可將水解速率降低至新鮮菌苗所觀察之水解速率的50%或更低。

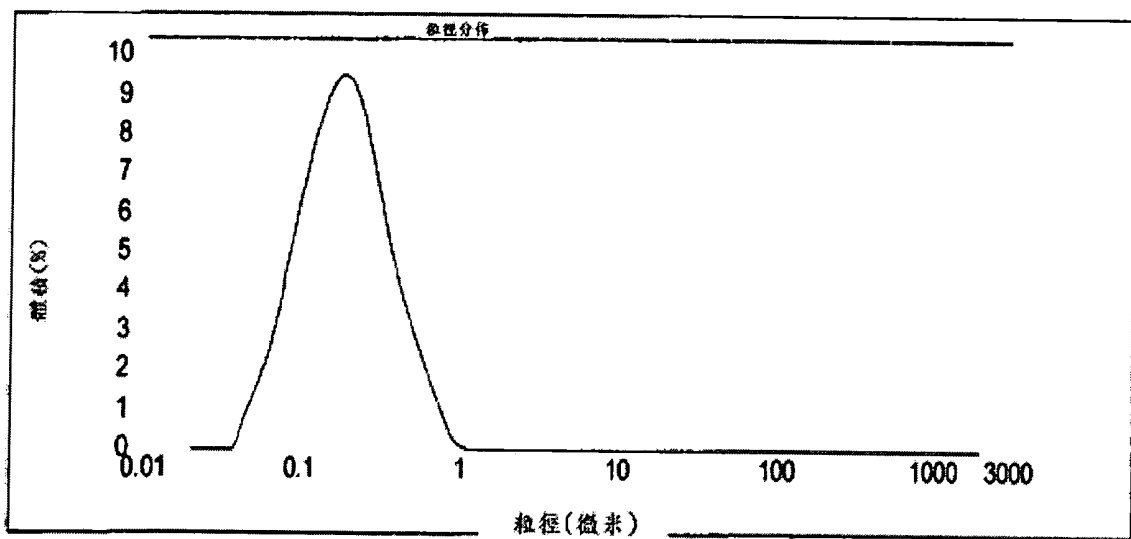
- 只要使用相同方法測定熱處理之前和之後的活性則使用何種方法測定脂解酶活性並不重要。例如，若利用一基
- 20 質測定一受測基質的水解速率，則不同的基質可能產生不同的速率。然而，若最初之活性測定及處理後之活性測定係使用相同基質時，則其相對速率仍將可顯示出熱處理的效應。

對包含一或多種下列犬鉤端螺旋體、出血性黃疸鉤端

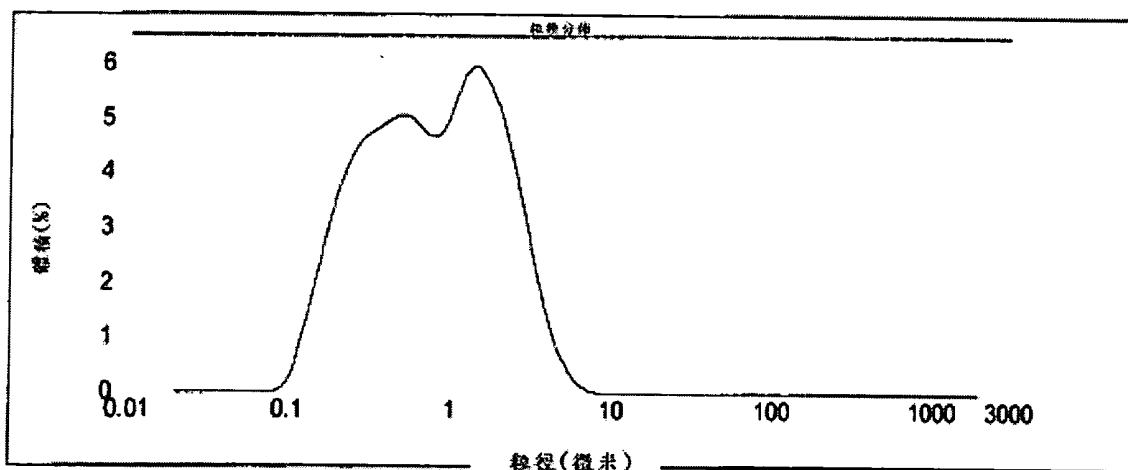
實例4 疫苗的物理化學檢測

根據實例2的方法從熱處理鈎端螺旋體菌苗製備疫苗。根據實例2的方法從未經熱處理的鈎端螺旋體菌苗製備類似的疫苗。將此兩種疫苗配方在4°C下貯存60天。利用雷射衍射儀製備的疫苗在第0天及第60天進行粒徑分析。

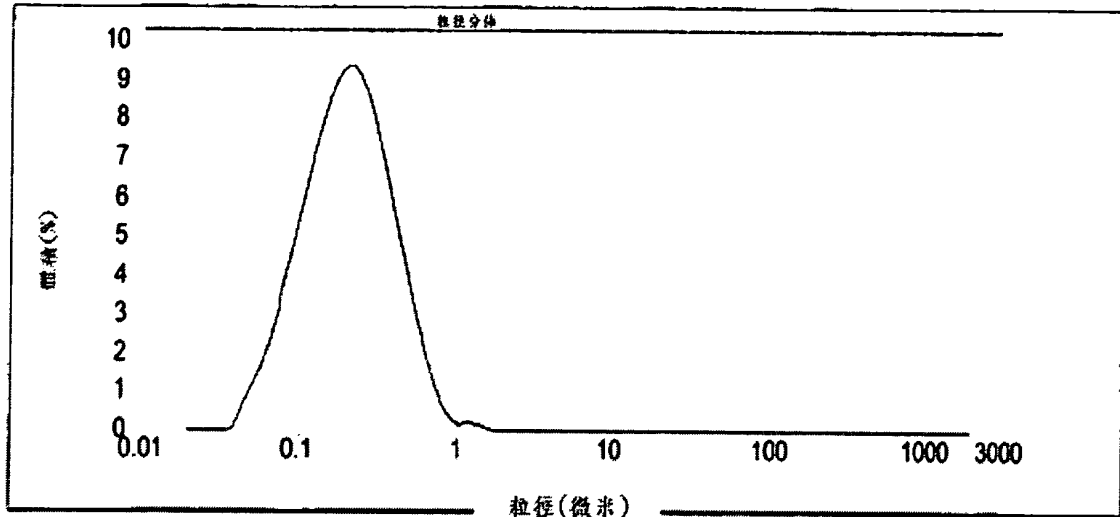
下表顯示各疫苗在第0天及貯存60天後的粒徑分佈。



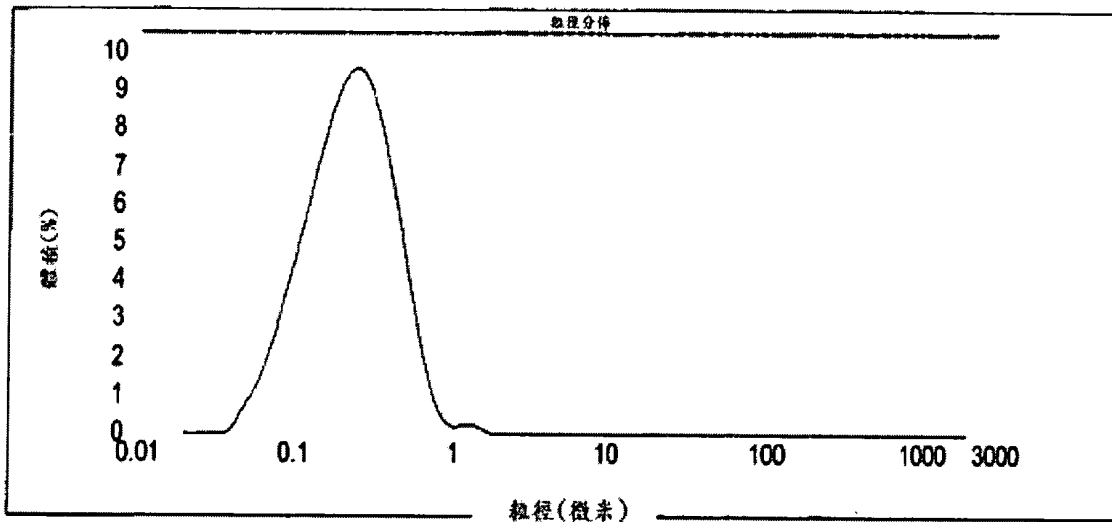
含未經熱處理鈎端螺旋體菌苗之新鮮製備疫苗在第0天的粒徑分析



含未經熱處理鈎端螺旋體菌苗之疫苗在第60天的粒徑分析



含經熱處理鈎端螺旋體菌苗之新鮮製備疫苗在第 0 天的粒徑分析



含經熱處理鈎端螺旋體菌苗之疫苗在第 60 天的粒徑分析

- 製備自經熱處理鈎端螺旋體菌苗的疫苗顯示代表乳液安定性的粒徑保留。製備自未經熱處理之鈎端螺旋體菌苗的疫苗顯示代表乳液分解之粒徑增加。

實例 5 殺病毒檢測

依照實例 2 的方法從未經熱處理鈎端螺旋體菌苗及經熱處理鈎端螺旋體菌苗製備疫苗。在 5 至 6 個月的老化之後，測定該疫苗對 BHV-1 病毒、PI3 病毒和 BRSV 病毒的殺病毒活性。藉由含受測之稀釋佐劑的再水合單價殺病毒檢

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種疫苗，其包含： a) 一包含一油及一或多種乳化劑之乳液；以及 b) 一包含一鈎端螺旋體死菌懸浮液之經熱處理鈎端螺旋體菌苗，其中該菌苗具有脂解酶活性與熱處理前菌苗之脂解酶活性相比為 50% 或更低且具有可接受之抗原活性。
5
2. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗，其中該鈎端螺旋體死菌為選自由犬鈎端螺旋體、傷寒性鈎端螺旋體、L. hardjo、出血性黃疸鈎端螺旋體和細鈎端螺旋體所構成之群組的一至五種鈎端螺旋體。
10
3. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗，其進一步包含活病毒。
4. 如申請專利範圍第 2 項之疫苗，其進一步包含活病毒。
5. 如申請專利範圍第 3 項之疫苗，其中該活病毒係選自由牛鼻氣管炎 (IBR) 病毒、副感冒 3 (PI3) 病毒及牛呼吸道融合病毒 (BRSV) 所構成之群組的一至三種病毒。
15
6. 如申請專利範圍第 4 項之疫苗，其中該活病毒係選自由牛鼻氣管炎 (IBR) 病毒、副感冒 3 (PI3) 病毒及牛呼吸道融合病毒 (BRSV) 所構成之群組的一至三種病毒。
7. 如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項之疫苗，其進一步包含死病毒。
20
8. 如申請專利範圍第 7 項之疫苗，其中該死病毒係選自由第 1 型牛病毒性腹瀉 (BVD) 病毒和第 2 型牛病毒性腹瀉 (BVD) 病毒所構成之群組的一或兩種病毒。
9. 如申請專利範圍第 1 至 6 項任一項之疫苗，其進一步包含

卵磷脂製劑、Quil A 和膽固醇。

10. 如申請專利範圍第 7 項之疫苗，其進一步包含卵磷脂製劑、Quil A 和膽固醇。

11. 如申請專利範圍第 8 項之疫苗，其進一步包含卵磷脂製劑、Quil A 和膽固醇。

12. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之疫苗之經熱處理鈎端螺旋體菌苗的方法，其包含以下步驟：

(a) 測定該菌苗的脂解酶活性；

(b) 將該菌苗加熱至 60 至 70°C 的溫度達 9 至 10 小時，至 65 至 70°C 的溫度達 5 至 8 小時，至 65 至 70°C 的溫度達 1 小時，至 55 至 65°C 的溫度達 5 至 8 小時，或至 55 至 70°C 的溫度達 5 至 8 小時；

(c) 在熱處理之後測定該菌苗的脂解酶活性；

(d) 比較加熱前菌苗之脂解酶活性與加熱後菌苗之脂解酶活性；及

(e) 選取一經熱處理的菌苗，其中該熱處理後的脂解酶活性為熱處理前菌苗之脂解酶活性的 50% 或更低。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該菌苗係加熱至 55 至 70°C 的溫度達 5 至 8 小時。

14. 一種製造如申請專利範圍第 1 至 11 項任一項之疫苗的方法，該方法包含以下步驟：

a) 製備一包含一油及一或多種乳化劑之乳液；

b) 製備一經熱處理鈎端螺旋體菌苗，該經熱處理鈎端螺旋體菌苗包含具有脂解酶活性與熱處理前菌苗之脂

解酶活性相比為 50% 或更低且具有可接受抗原活性之
鈎端螺旋體死菌的懸浮液；以及

c) 組合步驟 a) 之乳液與步驟 b) 之經熱處理的菌苗。