202033181

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202033181 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：108139740　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl.：　*A61K9/107　(2006.01)*　*A61P35/00　(2006.01)*

(30)優先權：2018/11/02　日本　2018-207779

(71)申請人：日商大鵬藥品工業股份有限公司 (日本) TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：土井祐輔 DOI, YUSUKE (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：19 項　圖式數：5　共 63 頁

(54)名稱

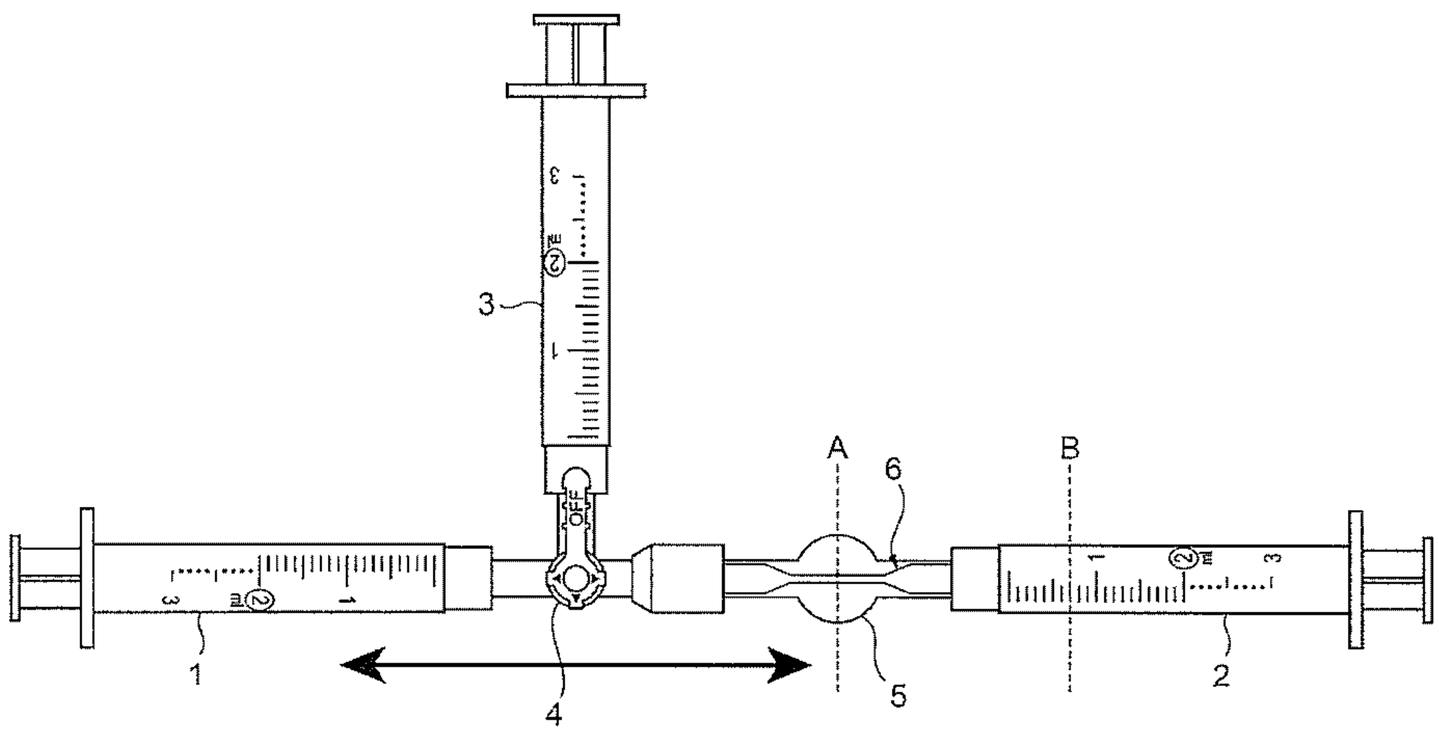
乳化物製劑及其調製方法

(57)摘要

本發明提供一種穩定含有 3 種 CTL 表位 4 連結肽之油中水型(w/o)乳化物製劑。又，本發明提供一種高效地調製上述含有 3 種 CTL 表位 4 連結肽之 w/o 乳化物製劑之方法。

本發明提供一種穩定含有 3 種 CTL 表位 4 連結肽之 w/o 乳化物製劑，且提供一種高效地調製該 w/o 乳化物製劑之方法。又，本發明提供一種用於調製上述製劑之經改良之方法及裝置。

指定代表圖：



【圖1】

符號簡單說明：

1:第 1 注射器

2:第 2 注射器

3:第 3 注射器

4:三通閥

5:注射器連接器

6:注射器連接器端部

A:虛線

B:虛線

202033181

【發明摘要】

【中文發明名稱】

乳化物製劑及其調製方法

【中文】

本發明提供一種穩定含有3種CTL表位4連結肽之油中水型(w/o)乳化物製劑。又，本發明提供一種高效地調製上述含有3種CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑之方法。

本發明提供一種穩定含有3種CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑，且提供一種高效地調製該w/o乳化物製劑之方法。又，本發明提供一種用於調製上述製劑之經改良之方法及裝置。

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

1　第1注射器

2　第2注射器

3　第3注射器

4　三通閥

5　注射器連接器

6　注射器連接器端部

A　虛線

B　虛線

【發明說明書】

【中文發明名稱】

乳化物製劑及其調製方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種肽之乳化物製劑及調製該製劑之方法。更具體而言，本發明係關於一種含有CTL(cytotoxic T lymphocyte，細胞毒殺性T淋巴球)表位肽及油性佐劑之油中水型(w/o)乳化物製劑及其調製方法。

【先前技術】

【0002】 近年受到關注之癌症肽疫苗療法係藉由表位特異性細胞毒殺性T淋巴球(CTL)之細胞受體(TCR)識別呈現所投予之抗原肽之癌細胞表面之主要組織相容性基因複合體(MHC)，並由CTL毒殺癌細胞而發揮效果。人類之MHC稱為人類白血球抗原(HLA)，已知HLA型十分呈現多型性。

【0003】 有效之癌症肽根據投予對象之人類之HLA型而不同，因此，每個癌症肽疫苗作為對象之HLA型受限，報告有一種CTL表位4連結肽，其係將對HLA-A2、HLA-A24、HLA-A26或者HLA-A3超型之任1個或複數個HLA型顯示CTL誘導能力之各種CTL表位肽連結而成(專利文獻1)。

【0004】 另一方面，油性佐劑作為用於提高癌症肽疫苗之效果之佐劑為人所知。於使用油性佐劑將肽特別是製成癌症肽疫苗之情形時，一般製成油中水型(w/o)乳化物製劑。於乳化物製劑之情形時，由於擔心產生經時性分離、凝集等問題，故較佳為即時調製，提出一種用於此之調製方

法及裝置(專利文獻2及3)。

先前技術文獻

專利文獻

【0005】 專利文獻1：國際公開第2015/060235號

專利文獻2：國際公開第2007/083763號

專利文獻3：日本專利第5629882號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】 國際公開第2015/060235號所揭示之CTL表位4連結肽之乳化物製劑之調製記載於該公報，但該等係關於1種CTL表位4連結肽之乳化物製劑之調製之內容，並未揭示本發明之包含3種CTL表位4連結肽之乳化物製劑。因此，本發明之第1課題在於提供一種穩定含有3種CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑。

【0007】 又，於利用標準乳化物調製法調製本發明之包含3種CTL表位4連結肽之乳化物製劑之情形時，亦不知調製不僅花時間而且亦會失敗，進行即時調製之醫院等現場之負擔過大的課題。本發明人等藉由使用標準乳化物調製法調製本發明之包含3種CTL表位4連結肽之乳化物製劑而發現了上述課題。因此，本發明之第2課題在於提供一種高效地調製上述w/o乳化物製劑之方法。

[解決問題之技術手段]

【0008】 本發明人等為了解決上述課題而反覆進行銳意研究，其結果，發現藉由於包含油性佐劑之油相中階段性地混合含有CTL表位4連結肽之水相，可短時間且高效地調製乳化物製劑，藉此，成功調製含有3種

CTL表位4連結肽之穩定之w/o乳化物製劑，從而完成本發明。

【0009】 本發明提供以下[1]～[13]。

[1]一種油中水型(w/o)乳化物製劑，其係於水相中含有包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽者，且含有3種CTL表位4連結肽。

[2]如上述[1]所記載之油中水型乳化物製劑，其含有3種CTL表位4連結肽及油性佐劑。

[3]一種乳化物製劑，其係將含有CTL表位4連結肽之水相與含有油性佐劑之油相混合並乳化而得之如上述[1]或[2]所記載之油中水型乳化物製劑，該含有CTL表位4連結肽之水相係含有分別包含下述通式(I)所表示之1種肽、(II)所表示之1種肽、及(III)所表示之1種肽之3種CTL表位4連結肽的溶液：

A-(L)-B-(L)-C-(L)-PEP2　　(I)、

D-(L)-E-(L)-F-(L)-PEP4　　(II)、及

G-(L)-H-(L)-I-(L)-PEP10　　(III)

(通式(I)、(II)及(III)中，

(L)表示連接子，

PEP2表示序列編號2所表示之CTL表位肽，

PEP4表示序列編號4所表示之CTL表位肽，

PEP10表示序列編號10所表示之CTL表位肽，

A、B、C、D、E、F、G、H及I分別相互不同地選自由序列編號1所表示之CTL表位肽(PEP1)、序列編號5所表示之CTL表位肽(PEP5)、序列編號6所表示之CTL表位肽(PEP6)、序列編號7所表示之CTL表位肽

(PEP7)、序列編號8所表示之CTL表位肽(PEP8)、序列編號9所表示之CTL表位肽(PEP9)、序列編號13所表示之CTL表位肽(PEP13)、序列編號15所表示之CTL表位肽(PEP15)及序列編號18所表示之CTL表位肽(PEP18)所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合除外)，且

通式(I)、(II)及(III)所表示之CTL表位4連結肽可具有包含親水性胺基酸之肽序列)。

[4]如上述[3]所記載之乳化物製劑，其中於上述通式(I)、(II)及(III)中，(L)表示連接子，A、B及C分別相互不同地選自由PEP7、PEP8及PEP13所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合除外)，D、E及F分別相互不同地選自由PEP5、PEP6及PEP9所組成之群，G、H及I分別相互不同地選自由PEP1、PEP15及PEP18所組成之群，且通式(I)所表示之肽可具有包含親水性胺基酸之肽序列。

[5]如上述[3]或[4]所記載之乳化物製劑，其中上述通式(I)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；及
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；

上述通式(II)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4；

・PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

・PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4；及

・PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

上述通式(III)所表示之肽選自由以下所組成之群：

・PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；

・PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；

・PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10；

・PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10；

・PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10；及

・PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10；且

通式(I)所表示之肽可於N末端具有包含親水性胺基酸之肽序列。

[6]如上述[3]至[5]中任一項所記載之乳化物製劑，其中於上述通式(I)、(II)及(III)中，(L)為精胺酸二聚物，包含親水性胺基酸之肽序列為精胺酸四聚物。

[7]如上述[3]至[6]中任一項所記載之乳化物製劑，其中上述通式(I)、(II)及(III)所表示之3種CTL表位4連結肽為RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2(序列編號19)、PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4(序列編號25)、及PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10(序列編號33)。

[8]一種調製如上述[1]至[7]中任一項所記載之乳化物製劑之方法，其特徵在於包括以下(i)及(ii)之步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，獲得包含上述油相及上述水相總量之乳化物製劑。

[9]如上述[8]之方法，其中上述水相之一部分相對於具有油性佐劑之油相為1/10～1/2倍量(v/v)。

[10]一種調製含有肽之油中水型乳化物製劑之裝置，其包括：

第2注射器2、

與該第2注射器2連結之注射器連接器5、

與該注射器連接器5連結之三通閥4、及

與該三通閥4進而連結之第1注射器1及第3注射器3，且

藉由於填充於該第1注射器1或該第2注射器2之內部之油相中添加填充於該第3注射器3之內部之水相，使所得之混合液經由該注射器連接器5於該第1注射器1及該第2注射器2之間往復移動，能夠製造油中水型乳化物製劑。

[11]如上述[10]所記載之裝置，其中上述第1、第2及第3注射器之容量分別為3 mL以下。

[12]如上述[10]或[11]所記載之裝置，其中使上述混合液通過之上述注射器連接器5之內徑為0.8～1.7 mm之範圍。

[13]一種含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物之調製用套組，其包括：包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽、油性佐劑、及如上述[10]至[12]中任一項所記載之裝置。

【0010】 本發明亦關於以下態樣。

[14]一種患者之腫瘤之治療方法，其包括向患者投予如上述[1]至[7]

中任一項所記載之油中水型(w/o)乳化物製劑。

[15]如上述[1]至[7]中任一項所記載之油中水型(w/o)乳化物製劑，其用於治療腫瘤。

[16]一種CTL表位4連結肽溶液之用途，其用於製造如上述[1]至[7]中任一項所記載之油中水型(w/o)乳化物製劑。

[17]如上述[10]至[12]中任一項所記載之裝置、或如上述[13]所記載之套組，其用以即時調製用於治療腫瘤之油中水型(w/o)乳化物製劑。

[18]如上述[10]至[12]中任一項所記載之裝置、或如上述[13]所記載之套組，其中油中水型(w/o)乳化物製劑為如上述[1]至[7]中任一項所記載之製劑。

[19]一種患者之腫瘤之治療方法，其包括：

(a)包括以下(i)及(ii)之步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，調製包含上述油相及上述水相總量之如上述[1]至[7]中任一項之乳化物製劑；及

(b)向具有腫瘤之患者投予所得之乳化物製劑。

本說明書包含成為本案之優先權之基礎之日本專利申請號2018-207779號之揭示內容。

[發明之效果]

【0011】 根據本發明之方法，藉由將CTL表位4連結肽與油性佐劑階段性地混合，可短時間且高效地調製穩定之w/o乳化物製劑。

【圖式簡單說明】

【0012】

圖1模式性地表示可良好地用於調製本發明之乳化物製劑之裝置，係使液體可於第1注射器1、注射器連接器5及第2注射器2之間移動、與第3注射器3之間無液體之移動之狀態。箭頭表示液體通過方向。

圖2模式性地表示可良好地用於調製本發明之乳化物製劑之裝置，係使液體可於第1注射器1及第3注射器3之間移動、與第2注射器2及注射器連接器5之間無液體之移動之狀態。箭頭表示液體通過方向。

圖3表示藉由分批調製法製造乳化物製劑之情形時之正式乳化時之注射器之往復次數(A：0次；B：10次；C：20次；D：30次；E：60次)與所得之乳化物之粒徑之關係。

圖4表示藉由使用三通閥之乳化物調製法製造乳化物製劑之情形時之正式乳化時之注射器之往復次數與所得之乳化物之粒徑之關係。

圖5表示藉由本發明之方法而得之w/o乳化物製劑之粒徑之均勻性。

【實施方式】

【0013】

＜油中水型(w/o)乳化物製劑＞

本發明提供一種油中水型(w/o)乳化物製劑，其係於水相中含有包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽者，且含有3種CTL表位4連結肽。更具體而言，本發明提供一種w/o乳化物製劑，其係含有包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽及油性佐劑者，且含有3種CTL表位4連結肽。

【0014】 於本發明中，CTL表位4連結肽意指將選自來自同一及/或

不同腫瘤抗原分子之CTL表位肽中之4個肽經由連接子直鏈狀連結而製成1分子所得的肽。

【0015】 於本發明中，上述乳化物製劑可藉由將CTL表位4連結肽溶液與油性佐劑混合並乳化而獲得。發現本發明之乳化物製劑可作為穩定之w/o乳化物製劑使用。

【0016】 作為來自腫瘤抗原分子之CTL表位肽，例如已知以下。

KLVERLGAA(序列編號1、於本說明書中記載為「PEP1」、例如國際公開第2001/011044號)；

ASLDSDPWV(序列編號2、於本說明書中記載為「PEP2」、例如國際公開第2002/010369號)；

ALVEFEDVL(序列編號3、於本說明書中記載為「PEP3」、例如國際公開第2002/010369號)；

LLQAEAPRL(序列編號4、於本說明書中記載為「PEP4」、例如國際公開第2000/12701號)；

DYSARWNEI(序列編號5、於本說明書中記載為「PEP5」、例如日本專利特開平11-318455號)；

VYDYNCHVDL(序列編號6、於本說明書中記載為「PEP6」、例如國際公開第2000/12701號)；

LYAWEPSFL(序列編號7、於本說明書中記載為「PEP7」、例如日本專利特開2003-000270號)；

DYLRSVLEDF(序列編號8、於本說明書中記載為「PEP8」、例如國際公開第2001/011044號)；

QIRPIFSNR(序列編號9、於本說明書中記載為「PEP9」、例如國際

公開第2008/007711號)；

ILEQSGEWWK(序列編號10、於本說明書中記載為「PEP10」、例如國際公開第2009/022652號)；

VIQNLERGYR(序列編號11、於本說明書中記載為「PEP11」、例如國際公開第2009/022652號)；

KLKHYGPGWV(序列編號12、於本說明書中記載為「PEP12」、例如國際公開第1999/067288號)；

RLQEWCSVI(序列編號13、於本說明書中記載為「PEP13」、例如國際公開第2002/010369號)；

ILGELREKV(序列編號14、於本說明書中記載為「PEP14」、例如國際公開第2002/010369號；

DYVREHKDNI(序列編號15、於本說明書中記載為「PEP15」、例如國際公開第2005/071075號)；

HYTNASDGL(序列編號16、於本說明書中記載為「PEP16」、例如國際公開第2001/011044號)；

NYSVRYRPGL(序列編號17、於本說明書中記載為「PEP17」、例如日本專利特開2003-000270號)；

RYLTQETNKV(序列編號18、於本說明書中記載為「PEP18」、例如國際公開第2005/116056號)

【0017】將成為CTL表位肽PEP1～PEP18之來源之蛋白質之資訊記載於下述表1中。報告該等蛋白質於腫瘤組織中高表現。

【0018】 [表1]

肽	來源	胺基酸序列	序列編號
PEP1	Lck-246	KLVERLGAA	序列編號1
PEP2	WHSC2-103	ASLDSDPWV	序列編號2
PEP3	HNRPL-140	ALVEFEDVL	序列編號3
PEP4	SART3-302	LLQAEAPRL	序列編號4
PEP5	SART2-93	DYSARWNEI	序列編號5
PEP6	SART3-109	VYDYNCHVDL	序列編號6
PEP7	MRP3-503	LYAWEPSFL	序列編號7
PEP8	Lck-488	DYLRSVLEDF	序列編號8
PEP9	SART3-734	QIRPIFSNR	序列編號9
PEP10	Lck-90	ILEQSGEWWK	序列編號10
PEP11	Lck-449	VIQNLERGYR	序列編號11
PEP12	CypB-129	KLKHYGPGWV	序列編號12
PEP13	UBE2V-43	RLQEWCSVI	序列編號13
PEP14	WHSC2-141	ILGELREKV	序列編號14
PEP15	EGFR-800	DYVREHKDNI	序列編號15
PEP16	Lck-208	HYTNASDGL	序列編號16
PEP17	MRP3-1293	NYSVRYRPGL	序列編號17
PEP18	PTHr-102	RYLTQETNKV	序列編號18

【0019】於本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽係選自上述CTL表位肽之中特定之13種(序列編號1所表示之肽「PEP1」、序列編號2所表示之肽「PEP2」、序列編號4所表示之肽「PEP4」、序列編號5所表示之肽「PEP5」、序列編號6所表示之肽「PEP6」、序列編號7所表示之肽「PEP7」、序列編號8所表示之肽「PEP8」、序列編號9所表示之肽「PEP9」、序列編號10所表示之肽「PEP10」、序列編號13所表示之肽「PEP13」、序列編號15所表示之肽「PEP15」、序列編號17所表示之肽「PEP17」及序列編號18所表示之肽「PEP18」)之4種CTL表位肽經由連接子直鏈狀連結而成之肽，可誘導及/或活化3種以上各CTL表位肽特異性之CTL。再者，即便不直接評價CTL表位肽特異性之誘導，亦可藉由利用免疫蛋白酶體之切斷實驗(國際公開第2015/060235號等)判斷該表位肽特

異性CTL誘導之有無。

【0020】於本發明中，具有於PEP1、PEP2、PEP4、PEP5、PEP6、PEP7、PEP8、PEP9、PEP10、PEP13、PEP15、PEP17、及PEP18之各胺基酸序列中置換、插入、缺失、及/或附加一個或複數個胺基酸而成之胺基酸序列，且具有與原本之肽同等或其以上之CTL誘導能力及/或免疫球蛋白產生誘導能力的肽亦可用作「CTL表位肽」。此處，「複數個」為2～3個，較佳為2個。作為此種肽，例如，可列舉經具有與原本之胺基酸類似之特性之胺基酸置換(即，藉由保守性胺基酸置換而獲得)之肽。

【0021】是否為「具有與原本之肽同等或其以上之CTL誘導能力及/或免疫球蛋白產生誘導能力之肽」例如可依據國際公開第2015/060235號說明書所記載之方法評價。於使用上述方法進行評價之情形時，CTL誘導能力係於孔中添加來自預先投予過具有置換、插入、缺失、及/或附加一個或複數個胺基酸而成之胺基酸序列之試驗肽之小鼠的細胞、來自同系小鼠之抗原呈現細胞及試驗肽，將孔中之IFN-γ(Interferon-γ，干擾素-γ)產生細胞之數量作為指標，若所得之Δ值之判定結果(陽性($10 \leqq \Delta < 100$)、中陽性($100 \leqq \Delta < 200$)、強陽性($200 \leqq \Delta$))同等或為其以上，則可判斷為具有與原本之肽同等或其以上之CTL誘導能力之肽。於該情形時，若原本之肽為「陽性」，且具有置換、插入、缺失、及/或附加一個或複數個胺基酸而成之胺基酸序列之肽亦為「陽性」，則判斷為同等。又，免疫球蛋白產生誘導能力係將投予過試驗肽之小鼠血清中之CTL表位特異性IgG(Immunoglobulin G，免疫球蛋白G)抗體效價作為指標，若所得之IgG抗體效價之增加(fold，倍數)之測定結果(2＜倍數＜10、10≦倍數＜

100、100≦倍數)同等或為其以上，則可判斷為具有同等或其以上之免疫球蛋白產生誘導能力之肽。於該情形時，若原本之肽之測定結果為「2＜倍數＜10」之範圍內，且具有置換、插入、缺失、及/或附加一個或複數個胺基酸而成之胺基酸序列之肽之測定結果亦為「2＜倍數＜10」之範圍內，則判斷為同等。

【0022】於本發明中，連接子只要將CTL表位4連結肽投予至活體時被切斷而可將連結之CTL表位肽分離成單個即可，例如可列舉酯鍵、醚鍵、醯胺鍵、糖鏈連接子、聚乙二醇連接子、胺基酸連接子等。作為用作胺基酸連接子之胺基酸序列，可例示精胺酸二聚物(RR)、精胺酸三聚物(RRR)、精胺酸四聚物(RRRR)、離胺酸二聚物(KK)、離胺酸三聚物(KKK)、離胺酸四聚物(KKKK)、甘胺酸二聚物(GG)、甘胺酸三聚物(GGG)、甘胺酸四聚物(GGGG)、甘胺酸五聚物(GGGGG)、甘胺酸六聚物(GGGGGG)、丙胺酸-丙胺酸-酪胺酸(AAY)、異白胺酸-白胺酸-丙胺酸(ILA)、精胺酸-纈胺酸-離胺酸-精胺酸(RVKR)等，較佳為精胺酸二聚物(RR)或精胺酸三聚物(RRR)，更佳為精胺酸二聚物(RR)。表位連結肽所使用之連接子於該領域中屬已知，業者可適當選擇使用。

【0023】本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽可進而具有包含親水性胺基酸之肽序列。包含親水性胺基酸之肽序列可附加於CTL表位4連結肽之N末端及/或C末端，較佳為附加於N末端。包含親水性胺基酸之肽序列可選擇包含選自由精胺酸、組胺酸、離胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、絲胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、天冬胺酸、及麩胺酸所組成之群中之1～15個、較佳為2～10個、進而較佳為3～5個親水性胺基酸者。例如，作為包含親水性胺基酸之肽序列，可列舉精胺酸三聚物(RRR)、精胺酸四聚物

(RRRR)、離胺酸三聚物(KKK)、離胺酸四聚物(KKKK)、組胺酸三聚物(HHH)、組胺酸四聚物(HHHH)等，較佳為精胺酸三聚物(RRR)或精胺酸四聚物(RRRR)，更佳為精胺酸四聚物(RRRR)。

【0024】本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽係選自由序列編號1所表示之肽「PEP1」、序列編號2所表示之肽「PEP2」、序列編號4所表示之肽「PEP4」、序列編號5所表示之肽「PEP5」、序列編號6所表示之肽「PEP6」、序列編號7所表示之肽「PEP7」、序列編號8所表示之肽「PEP8」、序列編號9所表示之肽「PEP9」、序列編號10所表示之肽「PEP10」、序列編號13所表示之肽「PEP13」、序列編號15所表示之肽「PEP15」、序列編號17所表示之肽「PEP17」及序列編號18所表示之肽「PEP18」所組成之群中之4個肽經由連接子分別連結而成，可具有包含親水性胺基酸之肽序列，且具有選自以下(1)～(3)之任一個特徵：

(1)C末端為PEP2(其中，於N末端自N末端側起經由連接子相鄰地依序包含PEP7及PEP8者除外)；

(2)C末端為PEP4；

(3)C末端為PEP10。

【0025】作為本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽，較佳為選自由序列編號1所表示之肽「PEP1」、序列編號2所表示之肽「PEP2」、序列編號4所表示之肽「PEP4」、序列編號5所表示之肽「PEP5」、序列編號6所表示之肽「PEP6」、序列編號7所表示之肽「PEP7」、序列編號8所表示之肽「PEP8」、序列編號9所表示之肽「PEP9」、序列編號10所表示之肽「PEP10」、序列編號13所表示之肽「PEP13」、序列編號15所表示之肽「PEP15」、序列編號17所表示之肽「PEP17」及序列編號18所表示之肽

「PEP18」所組成之群之不重複之4個肽經由連接子分別連結而成，可具有包含親水性胺基酸之肽序列，且具有選自以下(1)～(3)之任一個特徵：

(1)包含選自PEP1、PEP7、PEP8及PEP13之3個CTL表位肽，C末端為PEP2(其中，於N末端自N末端側起經由連接子相鄰地依序包含PEP7及PEP8者除外)；

(2)包含PEP5、PEP6及PEP9之3個CTL表位肽，C末端為PEP4；

(3)包含選自PEP1、PEP13、PEP15、PEP17及PEP18之3個CTL表位肽，C末端為PEP10。

【0026】作為本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽，更佳為包含選自以下之序列，且可具有包含親水性胺基酸之肽序列：

- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2；
- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4；

- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4；
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4；
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4；
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10；
- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10；
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10；
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10；
- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10；

(式中，「(L)」表示連接子)。

【0027】作為本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽，更佳為上

述序列中「L」所表示之連接子為胺基酸連接子，且可具有包含親水性胺基酸之肽序列。

【0028】作為本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽，更佳為上述序列中「L」所表示之連接子為將2個或3個精胺酸連結而成之精胺酸二聚物或精胺酸三聚物，且可具有包含親水性胺基酸之肽序列。

【0029】作為本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽，更佳為上述序列中「L」所表示之連接子為將2個或3個精胺酸連結而成之精胺酸二聚物或精胺酸三聚物，且可於N末端具有包含連結3個作為親水性胺基酸之精胺酸而成之精胺酸三聚物或連結4個精胺酸而成之精胺酸四聚物之肽序列。

【0030】再者，本發明中良好地使用之CTL表位4連結肽例如可依據國際公開第2015/060235號說明書所記載之方法合成。

【0031】於本發明中，用於調製乳化物製劑之CTL表位4連結肽溶液為包含3種CTL表位4連結肽之溶液。

【0032】於本發明中，於乳化物製劑中含有3種CTL表位4連結肽之情形時，3種CTL表位4連結肽較佳為分別包含下述通式(I)所表示之1種肽、(II)所表示之1種肽、及(III)所表示之1種肽，且可具有包含親水性胺基酸之肽序列：

A-(L)-B-(L)-C-(L)-PEP2　　(I)

D-(L)-E-(L)-F-(L)-PEP4　　(II)

G-(L)-H-(L)-I-(L)-PEP10　　(III)

(L)表示連接子，A、B、C、D、E、F、G、H及I分別相互不同地選自由PEP1、PEP5、PEP6、PEP7、PEP8、PEP9、PEP13、PEP15及

PEP18所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合除外)。

【0033】 於本發明中，良好地使用之3種CTL表位4連結肽更佳為包含上述通式(I)所表示之1種肽、上述通式(II)所表示之1種肽、及上述通式(III)所表示之1種肽，(L)表示連接子，上述通式(I)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；及
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；

上述通式(II)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4；
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4；及
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

上述通式(III)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10；及

・PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10。

再者，通式(I)所表示之肽為可於N末端及/或C末端具有包含親水性胺基酸之肽序列。

【0034】本發明中良好地使用之3種CTL表位4連結肽更佳為如下CTL表位4連結肽之組合：包含上述通式(I)所表示之1種肽、上述通式(II)所表示之1種肽、及上述通式(III)所表示之1種肽，(L)表示連接子，上述通式(I)所表示之肽選自由以下所組成之群：

・PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2；

・PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2；

・PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2；

・PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；及

・PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；

上述通式(II)所表示之肽選自由以下所組成之群：

・PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4；

・PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4；

・PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4；

・PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

・PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4；及

・PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

上述通式(III)所表示之肽選自由以下所組成之群：

・PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；

・PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；

・PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10；

- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10；及
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10；且

通式(I)所表示之肽於N末端具有作為包含親水性胺基酸之肽序列之精胺酸三聚物或精胺酸四聚物。

【0035】本發明中良好地使用之3種CTL表位4連結肽更佳為RRRR-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2、PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4、及PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10、(L)表示連接子的CTL表位4連結肽之組合。

【0036】本發明中良好地使用之3種CTL表位4連結肽最佳為RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2(序列編號19)、PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4(序列編號25)、及PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10(序列編號33)之CTL表位4連結肽之組合。

【0037】於本發明之1個態樣中，3種CTL表位4連結肽為如下CTL表位4連結肽之組合：包含下述通式(I')：

A-RR-B-RR-C-RR-PEP2　　(I')

所表示之1種肽、下述通式(II')：

D-RR-E-RR-F-RR-PEP4　　(II')

所表示之1種肽、及下述通式(III')：

G-RR-H-RR-I-RR-PEP10　　(III')

所表示之1種肽，RR表示精胺酸二聚物，A、B、C、D、E、F、G、H及I分別相互不同地選自由PEP1、PEP5、PEP6、PEP7、PEP8、PEP9、PEP13、PEP15及PEP18所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合

除外)，通式(I')、(II')及(III')所表示之CTL表位4連結肽之任1個於N末端具有精胺酸四聚物。

【0038】 作為本發明中良好地使用之3種CTL表位4連結肽，更佳為如下CTL表位4連結肽之組合：包含上述通式(I')所表示之1種肽、上述通式(II')所表示之1種肽、及上述通式(III')所表示之1種肽，上述通式(I')所表示之肽選自由以下所組成之群：

- RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2(序列編號19)；
- RRRR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP2(序列編號20)；
- RRRR-PEP8-RR-PEP13-RR-PEP7-RR-PEP2(序列編號21)；
- RRRR-PEP13-RR-PEP7-RR-PEP8-RR-PEP2(序列編號22)；及
- RRRR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP2(序列編號23)；

上述通式(II')所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP5-RR-PEP6-RR-PEP9-RR-PEP4(序列編號24)；
- PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4(序列編號25)；
- PEP6-RR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP4(序列編號26)；
- PEP6-RR-PEP9-RR-PEP5-RR-PEP4(序列編號27)；
- PEP9-RR-PEP5-RR-PEP6-RR-PEP4(序列編號28)；及
- PEP9-RR-PEP6-RR-PEP5-RR-PEP4(序列編號29)；

上述通式(III')所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP1-RR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP10(序列編號30)；
- PEP1-RR-PEP18-RR-PEP15-RR-PEP10(序列編號31)；
- PEP15-RR-PEP1-RR-PEP18-RR-PEP10(序列編號32)；
- PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10(序列編號33)；

・PEP18-RR-PEP1-RR-PEP15-RR-PEP10(序列編號34)；及

・PEP18-RR-PEP15-RR-PEP1-RR-PEP10(序列編號35)；且

RR表示精胺酸二聚物，RRRR表示精胺酸四聚物。

【0039】 於本發明中，作為含有CTL表位4連結肽之水相，可使用利用溶解液將經冷凍乾燥之3種CTL表位4連結肽溶解而得之溶液。於對CTL表位4連結肽進行冷凍乾燥時，可包含海藻糖等作為添加劑。因此，作為含有CTL表位4連結肽之水相，可為包含作為添加劑之海藻糖等者。上述溶解液可使用注射劑用之溶解液，例如，可列舉注射用水或生理鹽水，特佳為注射用水。又，水相中之CTL表位4連結肽之濃度以3種之合計量計較佳為3～27 mg/mL，更佳為6～18 mg/mL，更佳為7～12 mg/mL，更佳為9 mg/mL。

【0040】 又，本發明之於水相中含有表位4連結肽之油中水型(w/o)乳化物製劑中，CTL表位4連結肽以3種之合計量計每單位用量中較佳為含有3～27 mg，更佳為含有6～18 mg，更佳為含有7～12 mg，更佳為含有9 mg。

【0041】 本發明之於水相中含有表位4連結肽之油中水型(w/o)乳化物製劑之粒徑較佳為平均粒徑為1～3 μm。更適宜地，較佳為平均粒徑為1～3 μm，且較佳為90%以上、更佳為95%以上、進而較佳為99%以上之乳化物製劑存在於粒徑1～3 μm之範圍內。

【0042】 本發明之於水相中含有表位4連結肽之油中水型(w/o)乳化物製劑之黏度無特別限定，較佳為200～400 mPa・S。

【0043】 於本發明中，油性佐劑只要為於與水相混合並乳化時形成w/o乳化物、能以乳化物之形態投予且促進免疫應答之油性免疫佐劑，則

無特別限定。作為油性佐劑，包括僅由油性成分所構成之單獨佐劑、及除油性成分以外含有界面活性劑者。作為本發明中良好地使用之油性佐劑，例如可列舉液態石蠟、羊毛脂、角鯊烯、不完全弗氏佐劑、完全弗氏佐劑、NH_2(Cancer Sci., 101 (10): 2110 - 2114, 2010)、Montanide ISA 720 VG、Montanide ISA 51 VG等。於本發明中，特佳之油性佐劑為Montanide ISA 51 VG，其例如可自SEPPIC公司獲得。

【0044】 油性佐劑可單獨用作用於調製乳化物之油相，亦可以與其他油性成分及/或界面活性劑之混合物之狀態作為油相。例如，上述Montanide ISA 51 VG可單獨用作用於調製w/o乳化物製劑之油相。

【0045】 藉由調製w/o乳化物，可使溶解於水相之抗原長期停留於投予部位，又，抗原藉由受到油相保護，而亦可被保護而免遭酵素分解。又，藉由使抗原內封於一定以上之粒子尺寸之水滴中，較單獨之抗原易受到免疫細胞之吞噬，可提高免疫原性。此種性質為o/w乳化物無法實現之特性，於本發明之形態之癌症疫苗中，調製w/o乳化物極其重要。

【0046】 於本發明中，調製乳化物製劑時之含有油性佐劑之油相之量相對於含有CTL表位4連結肽之水相較佳為0.5～2倍量(v/v)，更佳為等量。

【0047】

＜w/o乳化物之調製方法＞

本發明亦提供一種調製上述本發明之乳化物製劑之方法，其特徵在於包括以下(i)及(ii)之步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，獲得包含上述油相及上述水相總量之乳化物製劑。

【0048】 本發明中之「一部分」係指相對於具有油性佐劑之油相，較佳為1/10～1/2倍量(v/v)，更佳為1/10～2/5倍量(v/v)，進而較佳為1/10～1/5倍量(v/v)，最佳為1/5倍量(v/v)。例如，於油性佐劑之量為1 mL之情形時，「含有CTL表位4連結肽之水相」之「一部分」較佳為0.1～0.4 mL，更佳為0.1～0.2 mL，最佳為0.2 mL。

【0049】 再者，於本說明書中，「正式乳化」表示分別混合全部之油相與水相後進行之乳化作業，「預乳化」表示每次對全部油相分批地混合水相時進行之乳化作業。再者，對全部油相分批地混合水相之最後操作後之乳化由於係分別混合了全部油相與水相之狀態，故成為「正式乳化」。

【0050】 本發明之乳化物製劑例如可利用國際公開第2007/083763號所記載之方法製造。然而，於先前所知之標準乳化物調製法中，由於預乳化只可利用振盪注射器之方法實施，故更佳為本發明之乳化物製劑最佳為利用下述所記載之本發明之裝置並藉由本發明之方法進行調製。

【0051】 具體而言，本發明之乳化物製劑可藉由使含有油性佐劑之油相與含有CTL表位4連結肽之水相之混合液例如於經由具有內徑0.8～1.7 mm之範圍之狹窄流路之注射器連接器而連結之2根注射器間進行往復移動而乳化(預乳化及正式乳化)，藉此調製。作為此種注射器連接器，例如，已知GP注射器連接器(Nipro)。

【0052】 於本發明中，於預乳化及正式乳化時，使含有油性佐劑之

油相與含有CTL表位4連結肽之水相之混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動之次數例如可設為往復10次以上、往復20次以上、往復30次以上、往復40次以上、往復50次以上、或往復60次。預乳化時之往復次數自作業效率之觀點而言，較佳為往復10～20次，更佳為10次。又，正式乳化時之往復次數較佳為往復10～20次。

【0053】 於本發明中，作為調製含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑之方法，包括以下步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動。

【0054】 例如，上述方法之特徵在於包括以下(i)及(ii)之步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，獲得包含上述油相及上述水相總量之乳化物製劑。

【0055】 於該情形時，上述水相之一部分相對於具有油性佐劑之油相，較佳可為1/10～1/2倍量(v/v)，更佳可為1/10～2/5倍量(v/v)，進而較佳可為1/10～1/5倍量(v/v)，最佳可為1/5倍量(v/v)。

【0056】 又，將上述(i)及(ii)之步驟反覆進行2次～10次，較佳可反覆進行3～7次，更佳可反覆進行5次。

【0057】 又，調製含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑之方法較佳為包括以下(i)及(ii)之步驟。

(i)於含有油性佐劑之油相中，相對於油相以每次1/5倍量(v/v)階段性地注入含有CTL表位4連結肽之水相共計5次，調製混合液；及

(ii)每次進行上述注入時，使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動。

【0058】 調製含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑之方法更佳為包括以下(i)～(iii)之步驟。

(i)於含有油性佐劑之油相中，相對於油相以1/5倍量(v/v)注入含有CTL表位4連結肽之水相，調製混合液；

(ii)於上述注入後，使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動10次以上；

(iii)進而反覆進行4次上述(i)及(ii)之步驟；及

(iv)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動10次以上。

【0059】 調製含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑之方法更佳為包括以下(i)～(iii)之步驟。

(i)於Montanide ISA 51 VG中，相對於Montanide ISA 51 VG以1/5倍量(v/v)注入CTL表位4連結肽溶液，調製混合液；

(ii)於注入後，使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動10次以上；

(iii)進而反覆進行4次上述(i)及(ii)之步驟；及

(iv)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動10次以上。

【0060】 上述調製CTL表位4連結肽之乳化物製劑之方法較佳為進

而包括藉由滴落測試對所得之乳化物之類型進行確認之步驟。於本發明中，滴落測試為將1滴所得之乳化物滴加於水面上並確認乳化物之分散之有無之測試。於該滴落測試中，於乳化物不立刻分散於水之情形時，可判斷為「油中水(w/o，water in oil)乳化物」，於乳化物立刻分散於水之情形時，可判斷為「水中油(o/w，oil in water)乳化物」。於本發明中，需要獲得w/o乳化物。

【0061】

＜裝置＞

於本發明中，可良好地用於調製CTL表位4連結肽之乳化物製劑之裝置例如為於三通閥上連結2根注射器及1個注射器連接器、於連結於三通閥之注射器連接器上連結注射器而得之裝置。

【0062】 如上所述，乳化物製劑由於係即時調製，且投予量較少，故不適合大量生產，因此，較佳為使用注射用注射器等容量為數mL之注射器調製。為了調製此種乳化物製劑，先前，已知使用2根注射器經由連接器連結而成之裝置之方法(國際公開第2007/083763號；日本專利第5629882號)。

【0063】 本發明之乳化物製劑亦可使用上述先前之裝置而調製。然而，於先前之裝置中，預乳化只可藉由振盪注射器而進行，因此，其結果易視振盪方式或振盪力度而改變。因此，難以利用時間管理預乳化是否經充分振盪，進而，預乳化狀態是否充分之判斷由調製者主觀決定。因此，發現調製者間產生差異，且即便為同一調製者，每次調製亦產生差異之問題。

【0064】 又，於使用先前之裝置之情形時，發現由於調製花時間，

且亦存在穩定之w/o乳化物之調製失敗之情況，故進行即時調製之醫院等現場之負擔過大，期望改良。

為了解決上述問題點，本發明人等發現，為了進行乳化物製劑之即時調製，藉由於連結之2根注射器上利用三通閥連結第3注射器，可簡便地實現上述本發明之方法。

【0065】本發明之方法中可良好地使用之裝置具有如圖1所示，經由注射器連接器5而連結第1注射器1與第2注射器2，進而經由三通閥4而連結第3注射器3而成的構成。

【0066】即，本發明提供一種調製含有肽之w/o乳化物製劑之裝置，其包括：

第2注射器2、

與該第2注射器2連結之注射器連接器5、

與該注射器連接器連結之三通閥4、及

與該三通閥4進而連結之第1注射器1及第3注射器3，

藉由於填充於該第1注射器1或該第2注射器2之內部之油相中添加填充於該第3注射器3之內部之水相，使所得之混合液經由該注射器連接器5於該第1注射器1及該第2注射器2之間往復移動，能夠製造w/o乳化物製劑。

【0067】上述第1、第2及第3注射器之容量無特別限定，例如為了調製時操作簡便，較佳為分別設為3 mL以下。如上所述，本發明之w/o乳化物製劑由於一般即時調製，故投予前應調製之量較少，大量生產之必要性較低。

又，於上述本發明之裝置中，使上述混合液通過之上述注射器連接

器5之內徑較佳為0.8～1.7 mm之範圍。

【0068】使用此種裝置之調製方法可獲得以下效果：

(1)於先前之乳化物調製法中，預乳化藉由振盪注射器之操作而進行，故調製間水相與油相之混合狀態易產生不均，但於使用此種裝置之調製方法中，不僅正式乳化時、而且預乳化時藉由通過內徑較細之注射器連接器，從而剪力發揮作用，調製間水相與油相之混合狀態之不均變小；

(2)由於導入三通閥而可實現流路之切換，故藉由將水相之溶液分批推入油相，可實現富油之條件，並可利用注射器柱塞之往復移動實現預乳化。

【0069】上述本發明之裝置中所用之注射器筒部內部之截面積(圖1及2中之虛線B部分)較佳為注射器連接器內流路之截面積(圖1及2中之虛線A部分)之2～150倍，更佳為2～50倍。注射器筒部內部之截面積若未達注射器連接器內流路之截面積之2倍，則存在無法充分發揮上述效果之情況，另一方面，若超過150倍，則有施加於注射器或裝置等之負擔變得過大之虞。

【0070】更具體而言，注射器之筒部內部之截面積設為50～500 mm^2左右即可，注射器連接器內流路之截面積設為0.5～30 mm^2左右即可。再者，注射器筒部或注射器連接器之截面之形狀無特別限制，為了防止局部施加負擔，較佳為圓形或橢圓形、或者多邊形之大致圓形，特佳為圓形。又，該規定中之截面積設為注射器之筒部內部之截面積、及形成於注射器連接器內之流路之中最細部分之截面積。

【0071】本發明中所用之注射器連接器由於需要於端部與注射器密接，故如圖1及2所示，注射器連接器端部6可設為截面積自中央部之流路

起圓錐狀變大之構成。

【0072】於將注射器連接器之流路之截面形狀設為圓形之情形時，較佳為將該流路之內徑設為0.8～1.7 mm，更佳為設為0.9 mm～1.5 mm。再者，於該流路之粗細不均勻之情形時，流路之內徑係指最細部分之內徑。又，注射器連接器之流路之長度較佳為10～15 mm。作為此種注射器連接器，例如，可列舉GP注射器連接器(Nipro)。

【0073】上述裝置例如可於乳化物製劑之投予前藉由醫務人員手動操作。或者，上述裝置亦可利用日本專利第5629882號等所揭示之該領域中之技術，製成以具備固定第1、第2及第3注射器之機構、用於分別推壓第1、第2及第3注射器之柱塞之第1、第2及第3推壓機構、及控制該等推壓機構之機構之方式構成的自動化裝置。

【0074】又，作為其他態樣，本發明可提供一種含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物之調製用套組，其包括：包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽、油性佐劑、及上述裝置。

【0075】投予本發明之乳化物製劑之患者中成為治療之對象之腫瘤只要為發揮抗腫瘤效果之增強效果之範圍內，則無特別限制，較佳為CTL表位4連結肽發揮抗腫瘤效果之腫瘤，更佳為Lck、WHSC2、SART2、SART3、MRP3、UBE2V、EGFR、或PTHrP陽性之惡性腫瘤。

【0076】作為成為使用本發明之乳化物製劑治療之對象的腫瘤，具體而言，可列舉腦腫瘤、頭頸癌、消化系統癌(食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臟癌、膽道癌(膽囊/膽管癌等)、胰腺癌、小腸癌、大腸癌(結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌等)、消化道間質腫瘤等)、肺癌(非小細胞肺癌、小細胞肺癌)、乳癌、卵巢癌、子宮癌(子宮頸癌、子宮體癌等)、腎癌、

尿路上皮癌(膀胱癌、腎盂癌、尿管癌)、前列腺癌、皮膚癌、原發不明癌等。再者，此處癌不僅包含原發病灶，亦包含轉移至其他器官(肝臟等)之癌。其中，自抗腫瘤效果之觀點而言，較佳為頭頸癌、消化系統癌、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、皮膚癌，更佳為消化系統癌、肺癌、尿路上皮癌、皮膚癌，特佳為肺癌、尿路上皮癌。又，本發明之抗腫瘤藥可用於為了外科地摘除腫瘤後防止復發而進行之術後輔助化學療法，亦可用於為了外科地摘除腫瘤而預先進行之術前輔助化學療法。

【0077】 又，於本發明中，含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑除作為有效成分之CTL表位4連結肽以外，可根據需要調配藥學載體，可製成注射劑而投予。

【0078】 作為藥學載體，可列舉於通常之藥劑中通用之各種藥學載體，例如賦形劑、溶劑、增溶劑、懸浮劑、等張劑、pH值調節劑、緩衝劑、穩定劑、鎮痛劑等。又，亦可根據需要使用防腐劑、抗氧化劑、著色劑、矯味/矯臭劑等製劑添加物。

【0079】 作為賦形劑，可列舉乳糖、白糖、D-甘露醇、海藻糖等。

【0080】 作為溶劑，可列舉水、丙二醇、生理鹽液等。

【0081】 作為增溶劑，可列舉聚乙二醇、乙醇、α-環糊精、聚乙二醇400、聚山梨醇酯80等。

【0082】 作為懸浮劑，可列舉聚氧乙烯氫化蓖麻油等。

【0083】 作為等張劑，可列舉氯化鈉、甘油、氯化鉀等。

【0084】 作為pH值調節劑，可列舉檸檬酸鈉、氫氧化鈉、鹽酸等。

【0085】 作為緩衝劑，可列舉磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉等。

【0086】 作為抗氧化劑，可列舉亞硫酸鈉、抗壞血酸、天然維生素

E、甲硫胺酸等。

【0087】 本發明之乳化物製劑就注射而言，較佳為以靜脈內注射進行投予。投予單位形態中所應調配之CTL表位4連結肽之量較佳為每1種CTL表位4連結肽為1～9 mg，更佳為2～4.5 mg，最佳為3 mg。

【0088】 具有上述投予形態之每1種CTL表位4連結肽之每1天之投予量根據患者之症狀、體重、年齡、性別等而不同，無法一概決定，較佳為1～27 mg/body，更佳為2～12 mg/body，更佳為3～9 mg/body，較佳為將其1天1次或分成2～3次左右進行投予。

【0089】 本發明之CTL表位4連結肽之投予排程可根據癌症種類或病期等而適當選擇。

該投予排程較佳為將1週投予1次之步驟反覆進行3次(於第1天、第8天、第15天1天投予1次)，將總計21天作為1個週期。又，第3個週期以後，投予排程較佳為第1天投予，停藥20天(3週投予1次之方法)，將總計21天作為1個週期。

實施例

【0090】 以下，列舉實施例對本發明更具體地進行說明，但下述實施例為使用特定構成之裝置進行者，本發明不受該等任何限定。

【0091】 再者，於以下實施例中，若無特別記載，則CTL表位4連結肽溶液為分別以3 mg/mL含有包含序列編號19、序列編號25及序列編號33之3種肽作為CTL表位4連結肽之溶液。

【0092】

[實施例1 預乳化中之水相與油相之混合時之分批次數之研究]

使用GP注射器連接器(內徑：1.0 mm、流路之長度：15 mm、Nipro

股份有限公司)調製w/o乳化物。調製係使用GP注射器連接器之操作說明書所記載之標準乳化物調製法。

【0093】 具體而言，準備分別填充有1 mL之CTL表位4連結肽溶液及Montanide ISA 51 VG(SEPPIC)之注射器(Injekt Syringe 2 mL Luer Lock，B Braun)，以不混入空氣之方式藉由GP注射器連接器連接並進行調製操作。將CTL表位4連結肽溶液(水相)之總量(無分批)推入至Montanide ISA 51 VG(油相)側之注射器，劇烈振盪注射器(5～10分鐘左右)而進行預乳化。預乳化之終點設為液體中未確認到明顯之水滴、油滴，變成均勻之白濁液之時點。

【0094】 其後，作為正式乳化，交替推壓注射器之柱塞往復60次，藉此調製w/o乳化物。乳化物之調製進行5次，藉由滴落測試對獲得w/o乳化物之比率進行判定。於所調製之乳化物不易分散於水之情形時，判定獲得「w/o乳化物」，於所調製之乳化物易於分散於水之情形時，判定獲得「o/w乳化物」。

【0095】 其結果，如表2所示，於標準乳化物調製法中，獲得CTL表位4連結肽溶液之w/o乳化物之比率為0%，發現於標準乳化物調製法中，CTL表位4連結肽溶液之w/o乳化物之調製明顯困難。

【0096】 為了解決上述課題，而對將CTL表位4連結肽溶液(水相)與Montanide ISA 51 VG(油相)混合時將水相分批混合之方法(分批調製法)進行研究。具體而言，於上述標準乳化物調製法中，將CTL表位4連結肽溶液(水相)分為3份或分為5份推入至Montanide ISA 51 VG(油相)側之注射器，劇烈振盪注射器而進行預乳化。預乳化之終點設為液體中未確認到明顯之水滴、油滴，液體變成均勻之白濁液之時點(每1次預乳化之劇烈振

盪注射器之時間為5～10分鐘左右)。

【0097】 其後，作為正式乳化，交替推壓注射器之柱塞往復60次，藉此調製w/o乳化物。乳化物之調製進行5次，藉由滴落測試對獲得w/o乳化物之比率進行判定。

【0098】 [表2]

分批之有無	無分批	分為3份	分為5份
每1次之水相向油相之推入量(mL)	1	0.33	0.2
獲得w/o乳化物之比率(%)	0	20	100

【0099】 如表2所示，藉由於預乳化時將CTL表位4連結肽溶液(水相)分為3份進行調製，與無分批之情形時相比，獲得w/o乳化物之比率提高，藉由分為5份進行調製，獲得w/o乳化物之比率顯著提高。顯示為了獲得w/o乳化物，理想的是增加水相之分批次數而注入於油相中，即於富油之條件下調製。

【0100】

[實施例2 利用CTL表位4連結肽溶液之分批注入之乳化物調製]

於上述實施例1中所得之將CTL表位4連結肽溶液分為5份注入於油相中之方法中，增加乳化物之調製者及實施次數，對獲得w/o乳化物之比率進行研究。又，為了降低預乳化時之調製間之差異，使用YS-8D(YAYOI)進行劇烈振盪注射器而預乳化之操作。其結果，如表3所示，於增加調製者並手動進行預乳化之情形時，以74%之比率獲得w/o乳化物，於利用機械進行預乳化之情形時，以63%之比率獲得w/o乳化物。作為增加乳化物之調製者及實施次數時無法以一定之比率獲得w/o乳化物之原因，認為一個原因在於預乳化時之劇烈振盪注射器之操作以「變成均勻之白濁液之時點」作為終點，該判斷由調製者主觀決定，因此，所得之乳化物視調製者

之振盪方式或振盪力度而產生差異。

【0101】 [表3]

	實施次數(次)	獲得w/o乳化物之次數(次)	獲得w/o乳化物之比率(%)
手動預乳化	19	14	74
自動預乳化	43	27	63

【0102】

[實施例3 使用三通閥之乳化物調製法]

如實施例1所示，預乳化理想的是於富油之條件下調製。於標準乳化物調製法或分批調製法中，即便創造富油之狀況，由於預乳化僅藉由振盪注射器而進行，故如上文所述，其結果亦易視振盪方式或振盪力度而改變。又，可確認於分批調製法中，即便於利用機械自動進行預乳化之情形時，獲得w/o乳化物之比率亦為60%左右，期待進行進一步改善。

為了解決上述之問題點，提高獲得w/o乳化物之比率，而想出使用三通閥之乳化物調製法。

【0103】 使用三通閥之乳化物調製法係準備空的第1注射器1、填充有1 mL之Montanide ISA 51 VG之第2注射器2、及填充有1 mL之CTL表位4連結肽溶液之第3注射器3(均使用Injekt Syringe 2 mL Luer Lock，B Braun)，且使用如下裝置：其如圖1所示，於三通閥4(TS-TR2K，泰爾茂)之水平方向連接空的第1注射器1，同樣於水平方向經由注射器連接器5(GP注射器連接器，Nipro股份有限公司)直接連接填充有Montanide ISA 51 VG之第2注射器2，使第2注射器2之Montanide ISA 51 VG向第1注射器1移動，於垂直方向連接填充有CTL表位4連結肽溶液之第3注射器3。

【0104】 預乳化係將三通閥4之旋塞如圖2所示地操作，成為液體可於第1注射器1及第3注射器3間移動之狀態，將填充於第3注射器3之CTL

表位4連結肽溶液0.2 mL推入至填充有Montanide ISA 51 VG之第1注射器1內。

【0105】 其次，將旋塞操作成圖1之狀態，成為液體可於第1注射器1及第2注射器2之間移動之狀態，進行交替推入第1注射器1及第2注射器2之柱塞，使0.2 mL之CTL表位4連結肽溶液與1 mL之Montanide ISA 51 VG之混合液經由注射器連接器5於第1注射器1與第2注射器2之間於水平方向上往復移動的操作(預乳化)。為了進行預乳化，混合液之注射器間之往復移動設為往復20次。

【0106】 自第3注射器3每次追加0.2 mL之CTL表位4連結肽溶液並推入至第1注射器1內，進而反覆進行3次上述操作。自第3注射器3每次追加0.2 mL之CTL表位4連結肽溶液並推入至第1注射器1內之第5次操作之後，往復進行60次使CTL表位4連結肽溶液與1 mL之Montanide ISA 51 VG之混合液經由注射器連接器5於第1注射器1與第2注射器2之間於水平方向上往復移動的操作(正式乳化)。w/o乳化物之調製成否係藉由滴落測試而判斷。所得之乳化物藉由滴落測試確認為w/o乳化物。

【0107】

[實施例4 預乳化時之注射器往復次數之研究]

為了對使用三通閥之乳化物調製法進行進一步之最佳化，首先對預乳化之混合次數進行研究。使用三通閥之乳化物調製法係使用與實施例3相同之裝置，除預乳化時使注射器往復之次數以外，藉由與實施例3相同之方法實施。

【0108】 於上述方法中，將每1次預乳化之使注射器往復之次數設為往復10次、15次或20次而進行乳化物調製。

【0109】 預乳化時使注射器往復之次數於往復10～20次之範圍內，乳化物不易分散於水，獲得w/o乳化物。由以上之結果可確認，與於標準乳化物調製法中藉由劇烈振盪注射器而進行之預乳化相比，藉由使用三通閥並於預乳化時使注射器往復，作業效率改善。

【0110】

[實施例5 正式乳化時之注射器往復次數之研究]

於實施例4中將預乳化往復進行10次之條件下，對正式乳化時使注射器往復之次數進行研究。即，將正式乳化時使注射器往復之次數設為往復10次、20次或30次而進行研究。又，為了比較，亦對分批調製法(於實施例1中將預乳化時之分批次數分為5次之條件下實施)之正式乳化時使注射器往復之次數進行研究。

w/o乳化物之調製可否係藉由進行滴落測試而判斷。又，利用濕式/幹式粒度分佈測定裝置(雷射繞射散射法)LS 13 320(貝克曼庫爾特股份有限公司)測定各混合次數下調製之乳化物之粒徑。

【0111】 將測定條件表示於以下。

使用模組：通用液體模組(濕式粒度分佈測定)

分散介質：輕質白礦油(Mineral Oil Light White)

分散介質折射率：1.45

超音波分散：無

測定試樣調製法：將1滴乳化物一次分散於10 mL之輕質白礦油中。

【0112】 於使用三通閥之乳化物調製法中，無論正式乳化時使注射器往復之次數是多少，均不易分散於水，獲得w/o乳化物。又，於分批調製法中，僅正式乳化時使注射器往復之次數進行往復60次之方法進行滴落

測試確認獲得w/o乳化物。

【0113】 所得之乳化物之粒徑如圖3所示，確認於分批調製法中，於正式乳化時使注射器往復之次數為往復20次以下之情形時，粒徑可見不均，與此相對，於使注射器往復之次數為往復30次以上時，粒徑均勻且成為相同程度。另一方面，如圖4所示，於使用三通閥之乳化物調製法中，往復10次以上時，粒徑均勻且成為相同程度。

【0114】

[實施例6 使用三通閥之乳化物調製法之再現性研究]

於實施例5之使用三通閥之乳化物調製法中，於將正式乳化時之注射器之往復次數設定為往復20次之條件下，進行乳化物調製，對所得之乳化物之粒徑及黏性進行測定，對調間之再現性進行研究。

【0115】 粒徑之測定法係藉由與實施例5相同之方法實施，黏度之測定係於以下之條件下實施。

使用設備：E型黏度計(東京計器)

錐度：1°34'

樣品量：約1 mL

測定溫度：30℃

轉數：10 rpm

【0116】 如圖5所示，於3次實施中所得之乳化物之粒徑均勻且為相同程度，粒徑為1～3 μm之範圍內。又，如表4所示，3次實施中所得之乳化物之黏度亦不見大差異。

【0117】 [表4]

	第1次	第2次	第3次	平均	S.D.
黏度(mPa・s)	305.4	276.2	357.1	312.9	41.0

【0118】

[實施例7 使用三通閥之乳化物調製法]

於實施例6之條件下，增加乳化物之調製者及調製次數，對獲得w/o乳化物之比率進行研究。其結果，如表5所示，以98%之比率獲得w/o乳化物。

【0119】 [表5]

實施次數(次)	獲得w/o乳化物之次數(次)	獲得w/o乳化物之比率(%)
52	51	98

【0120】 由以上之結果顯示，於標準乳化物調製法中，明顯難以獲得本發明之包含3種CTL表位4連結肽之w/o乳化物製劑，與此相對，藉由於混合CTL表位4連結肽溶液(水相)與含有油性佐劑之油相時將水相分批注入(分批調製法)，可獲得w/o乳化物。進而顯示，藉由使用三通閥之乳化物調製法，可以更高之比率獲得w/o乳化物，進而與標準乳化物調製法或分批調製法相比，可以較少之勞力且於短時間內獲得w/o乳化物。

【0121】 本說明書中引用之所有刊物、專利及專利申請係直接藉由引用而併入本說明書中。

【符號說明】

【0122】

1 第1注射器

2 第2注射器

3 第3注射器

4 三通閥

5 注射器連接器

6 注射器連接器端部

A　　虛線

B　　虛線

【序列表】

<110> 日商大鵬藥品工業股份有限公司(TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 乳化物製劑及其調製方法

<130> PH-8112-PCT

<150> JP 2018-207779

<151> 2018-11-02

<160> 35

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Ala Leu Val Glu Phe Glu Asp Val Leu
1 5

<210> 4
<211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
1 5 10

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe

1 5 10

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Val Ile Gln Asn Leu Glu Arg Gly Tyr Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Ile Leu Gly Glu Leu Arg Glu Lys Val
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile
1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val
1 5 10

<210> 19
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val
20 25 30

Leu Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40 45

<210> 20
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Arg Arg Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp

20 25 30

Cys Ser Val Ile Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40 45

<210> 21
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 21

Arg Arg Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg
1 5 10 15

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu
20 25 30

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40 45

<210> 22
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Arg Arg Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu
1 5 10 15

Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val
20 25 30

Leu Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40 45

<210> 23
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Arg Arg Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp
1 5 10 15

Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu
20 25 30

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val
35 40 45

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn
1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 25
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile
1 5 10 15

Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 26
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 27
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 27

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro

1 5 10 15

Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 28
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 28

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg
1 5 10 15

Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 29
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn
1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu
35 40

<210> 30
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 30

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu
1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 31
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 31

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln
1 5 10 15

Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 32

<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 32

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu
1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys
20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 33
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 33

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala
20 25 30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 34
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 34

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu
1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

<210> 35
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成肽

<400> 35

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg
1 5 10 15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala
20 25 30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys
35 40 45

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種油中水型(w/o)乳化物製劑，其係於水相中含有包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽者，且含有3種CTL表位4連結肽。

【第2項】

如請求項1之油中水型乳化物製劑，其含有3種CTL表位4連結肽及油性佐劑。

【第3項】

如請求項1或2之油中水型乳化物製劑，其係將含有CTL表位4連結肽之水相與含有油性佐劑之油相混合並乳化而得，該含有CTL表位4連結肽之水相係含有分別包含下述通式(I)所表示之1種肽、(II)所表示之1種肽、及(III)所表示之1種肽之3種CTL表位4連結肽的溶液：

A-(L)-B-(L)-C-(L)-PEP2　　(I)、

D-(L)-E-(L)-F-(L)-PEP4　　(II)、及

G-(L)-H-(L)-I-(L)-PEP10　　(III)

(通式(I)、(II)及(III)中，

(L)表示連接子，

PEP2表示序列編號2所表示之CTL表位肽，

PEP4表示序列編號4所表示之CTL表位肽，

PEP10表示序列編號10所表示之CTL表位肽，

A、B、C、D、E、F、G、H及I分別相互不同地選自由序列編號1所表示之CTL表位肽(PEP1)、序列編號5所表示之CTL表位肽(PEP5)、序列

編號6所表示之CTL表位肽(PEP6)、序列編號7所表示之CTL表位肽(PEP7)、序列編號8所表示之CTL表位肽(PEP8)、序列編號9所表示之CTL表位肽(PEP9)、序列編號13所表示之CTL表位肽(PEP13)、序列編號15所表示之CTL表位肽(PEP15)及序列編號18所表示之CTL表位肽(PEP18)所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合除外)，且

通式(I)、(II)及(III)所表示之CTL表位4連結肽可具有包含親水性胺基酸之肽序列)。

【第4項】

如請求項3之乳化物製劑，其中於上述通式(I)、(II)及(III)中，(L)表示連接子，A、B及C分別相互不同地選自由PEP7、PEP8及PEP13所組成之群(A為PEP7且B為PEP8之組合除外)，D、E及F分別相互不同地選自由PEP5、PEP6及PEP9所組成之群，G、H及I分別相互不同地選自由PEP1、PEP15及PEP18所組成之群，且通式(I)所表示之肽可具有包含親水性胺基酸之肽序列。

【第5項】

如請求項3或4之乳化物製劑，其中上述通式(I)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2；
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2；
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2；及
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2；

上述通式(II)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4；
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4；
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4；及
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4；

上述通式(III)所表示之肽選自由以下所組成之群：

- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10；
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10；
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10；及
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10；且

通式(I)所表示之肽可於N末端具有包含親水性胺基酸之肽序列。

【第6項】

如請求項3至5中任一項之乳化物製劑，其中於上述通式(I)、(II)及(III)中，(L)為精胺酸二聚物，包含親水性胺基酸之肽序列為精胺酸四聚物。

【第7項】

如請求項3至6中任一項之乳化物製劑，其中上述通式(I)、(II)及(III)所表示之3種CTL表位4連結肽為RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2(序列編號19)、PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4(序列編號25)、及PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10(序列編號33)。

【第8項】

一種調製如請求項1至7中任一項之乳化物製劑之方法，其特徵在於包括以下(i)及(ii)之步驟：

(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，獲得包含上述油相及上述水相總量之乳化物製劑。

【第9項】

如請求項8之方法，其中上述水相之一部分相對於具有油性佐劑之油相為1/10～1/2倍量(v/v)。

【第10項】

一種調製含有肽之油中水型乳化物製劑之裝置，其包括：

第2注射器(2)、

與該第2注射器(2)連結之注射器連接器(5)、

與該注射器連接器(5)連結之三通閥(4)、及

與該三通閥(4)進而連結之第1注射器(1)及第3注射器(3)，且

藉由於填充於該第1注射器(1)或該第2注射器(2)之內部之油相中添加填充於該第3注射器(3)之內部之水相，使所得之混合液經由該注射器連接器(5)於該第1注射器(1)及該第2注射器(2)之間往復移動，能夠製造油中水型乳化物製劑。

【第11項】

如請求項10之裝置，其中上述第1、第2及第3注射器之容量分別為3

mL以下。

【第12項】

如請求項10或11之裝置，其中使上述混合液通過之上述注射器連接器(5)之內徑為0.8～1.7 mm之範圍。

【第13項】

一種含有CTL表位4連結肽之w/o乳化物之調製用套組，其包括：包含經由連接子而連結之4個CTL表位肽之CTL表位4連結肽、油性佐劑、及如請求項10至12中任一項之裝置。

【第14項】

一種患者之腫瘤之治療方法，其包括向患者投予如請求項1至7中任一項之油中水型(w/o)乳化物製劑。

【第15項】

如請求項1至7中任一項之油中水型(w/o)乳化物製劑，其用於治療腫瘤。

【第16項】

一種CTL表位4連結肽溶液之用途，其用於製造如請求項1至7中任一項之油中水型(w/o)乳化物製劑。

【第17項】

如請求項10至12中任一項之裝置、或如請求項13之套組，其用以即時調製用於治療腫瘤之油中水型(w/o)乳化物製劑。

【第18項】

如請求項10至12中任一項之裝置、或如請求項13之套組，其中油中水型(w/o)乳化物製劑為如請求項1至7中任一項之製劑。

【第19項】

一種患者之腫瘤之治療方法，其包括：

(a)包括以下(i)及(ii)之步驟：

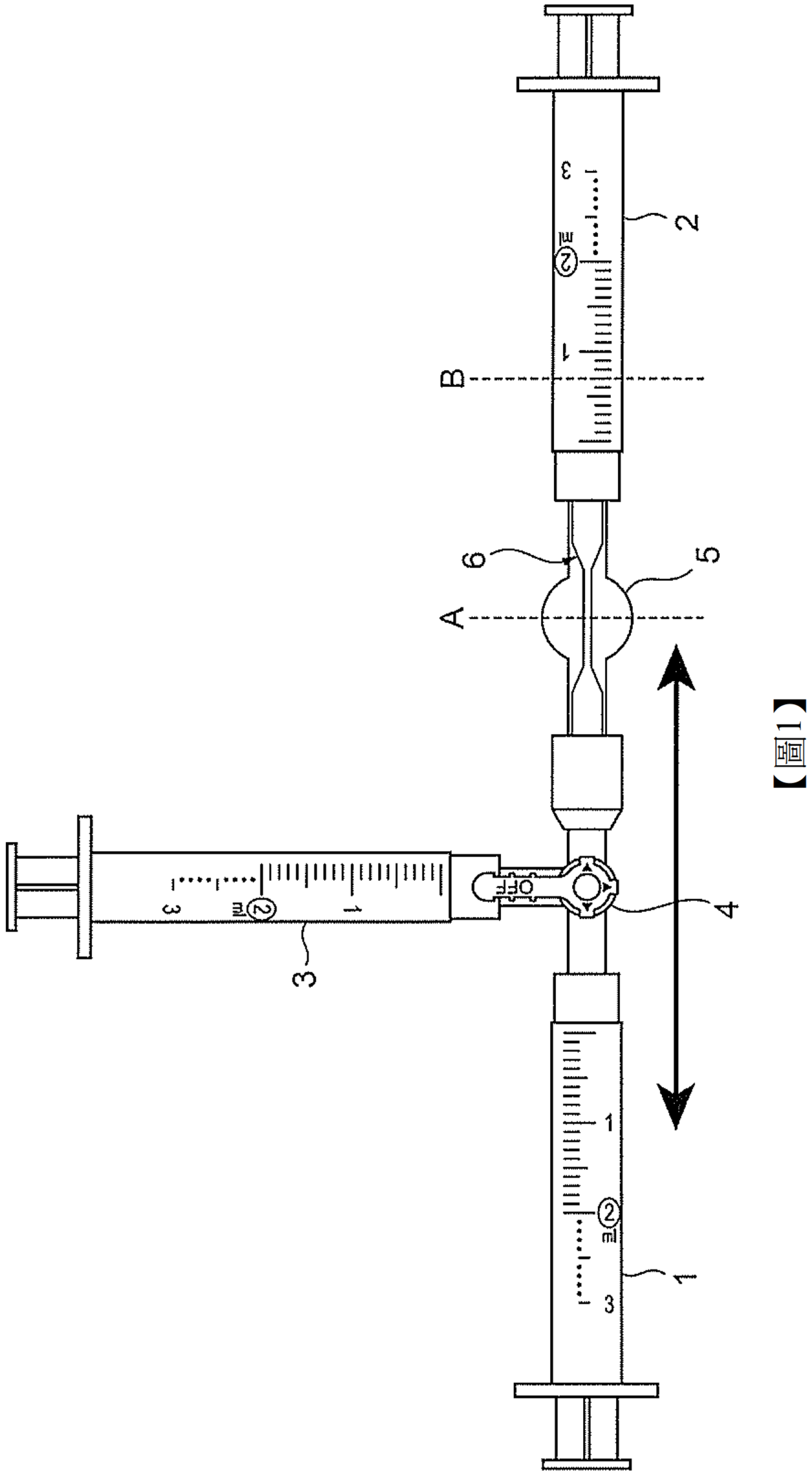
(i)於含有油性佐劑之油相中注入含有CTL表位4連結肽之水相之一部分而調製混合液、及

(ii)使該混合液於經由注射器連接器而連結之注射器間往復移動，且

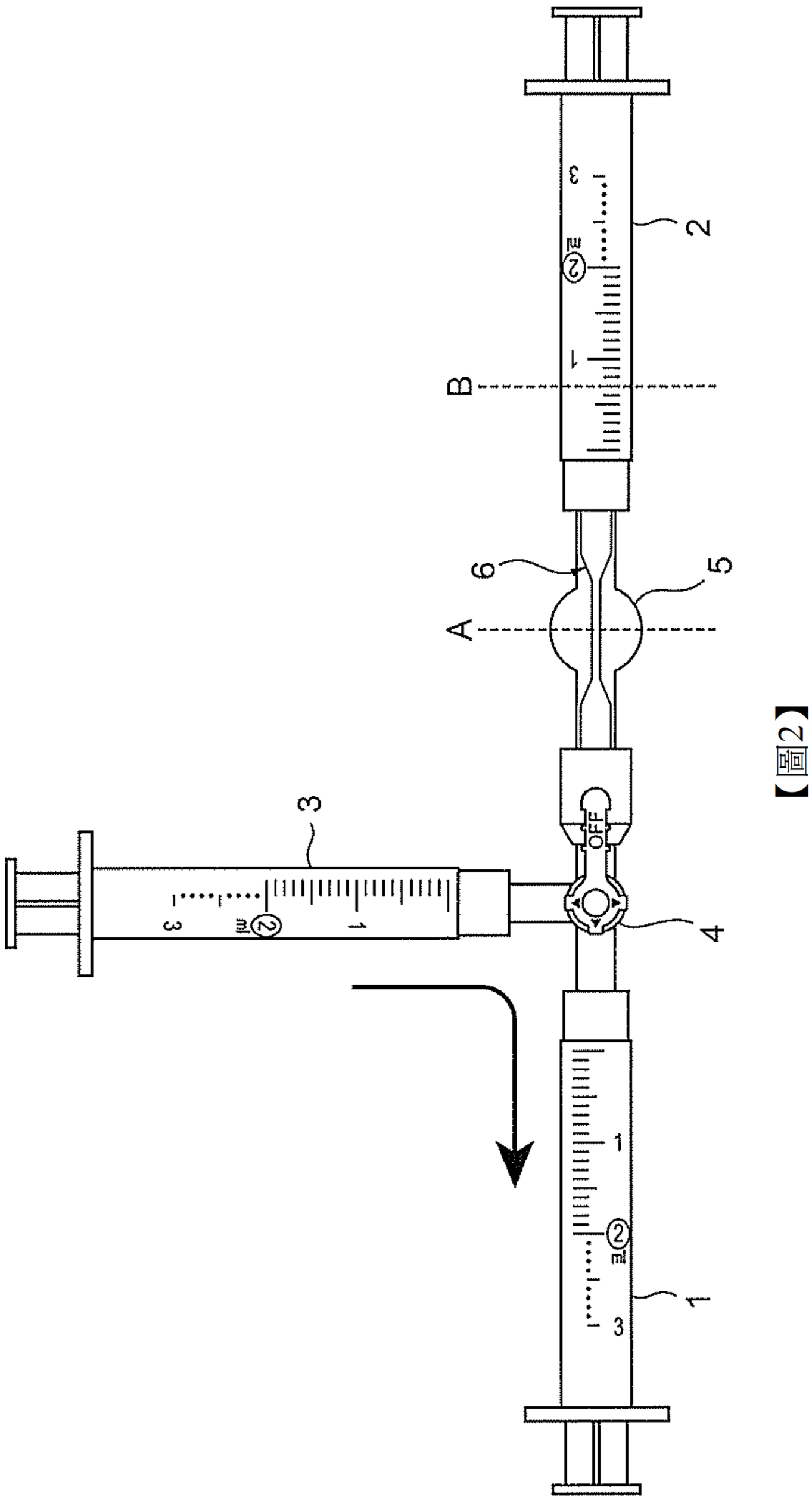
反覆進行上述(i)及(ii)之步驟，調製包含上述油相及上述水相總量之如請求項1至7中任一項之乳化物製劑；及

(b)向具有腫瘤之患者投予所得之乳化物製劑。

【發明圖式】

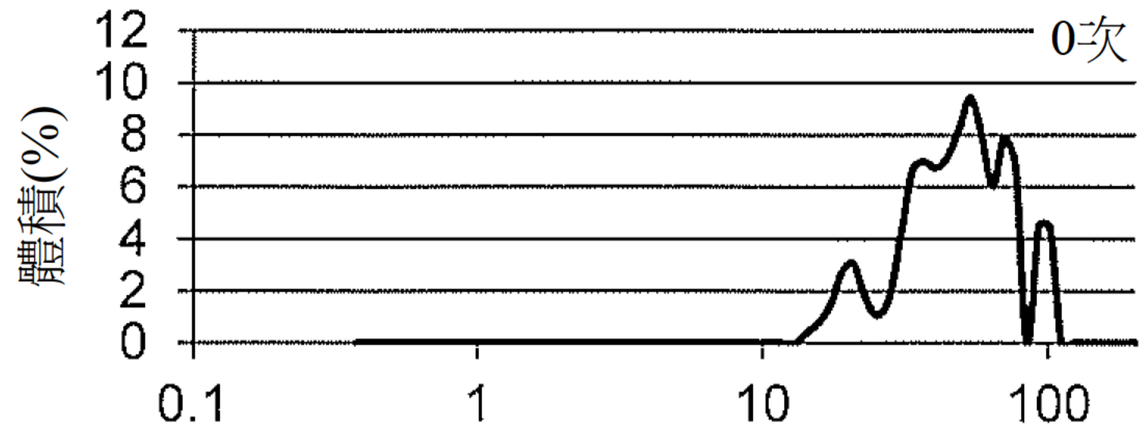


【圖1】

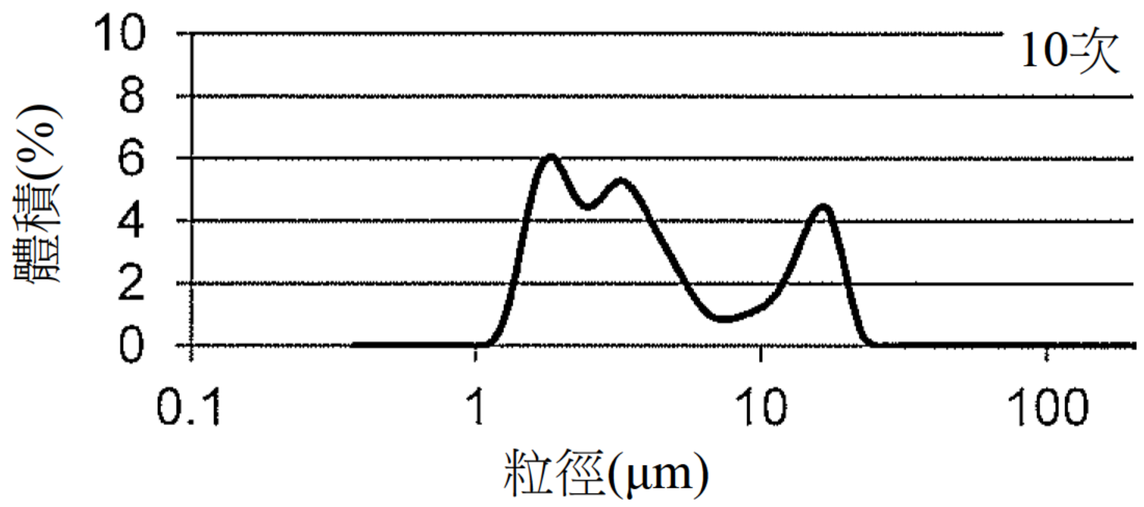


【圖2】

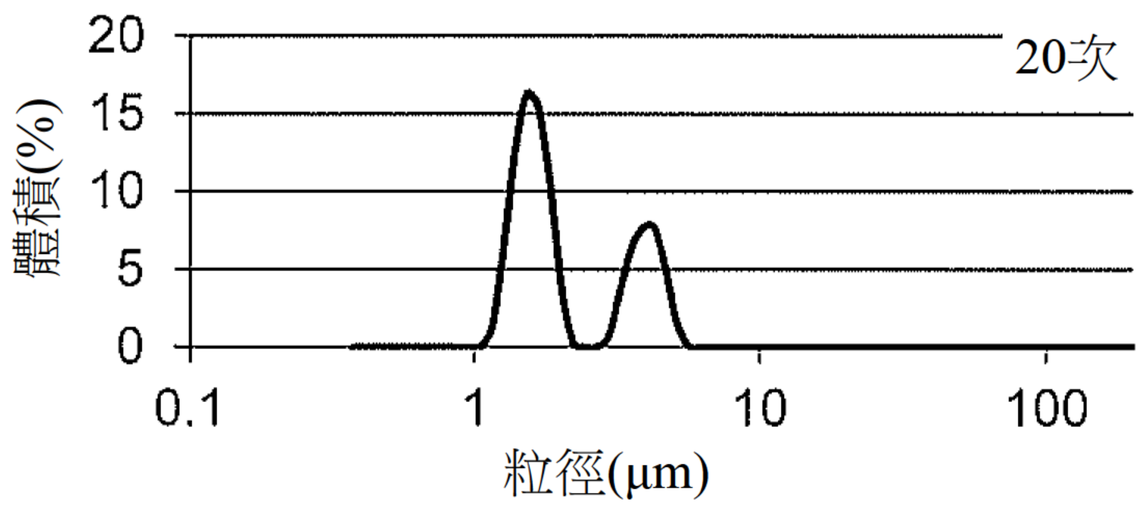
A


12
10
8
6
4
2
0
體積(%)
0次
0.1
1
10
100
粒徑(μm)

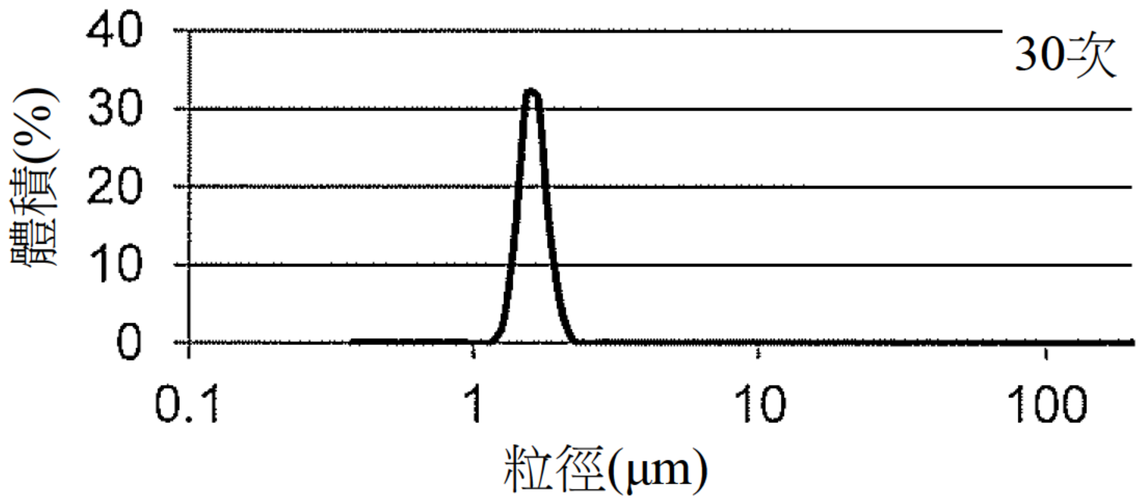
B


10
8
6
4
2
0
體積(%)
10次
0.1
1
10
100
粒徑(μm)

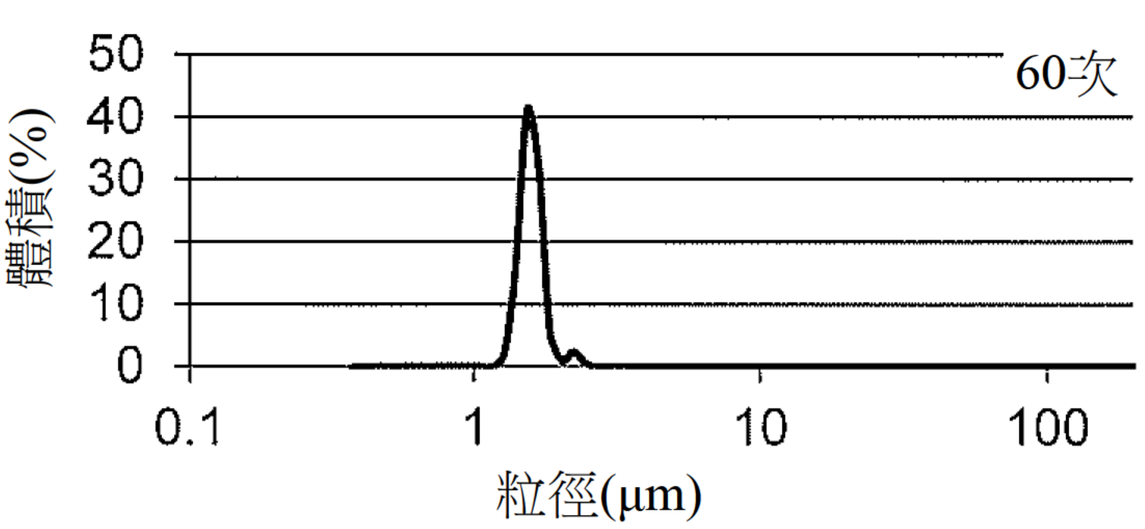
C


20
15
10
5
0
體積(%)
20次
0.1
1
10
100
粒徑(μm)

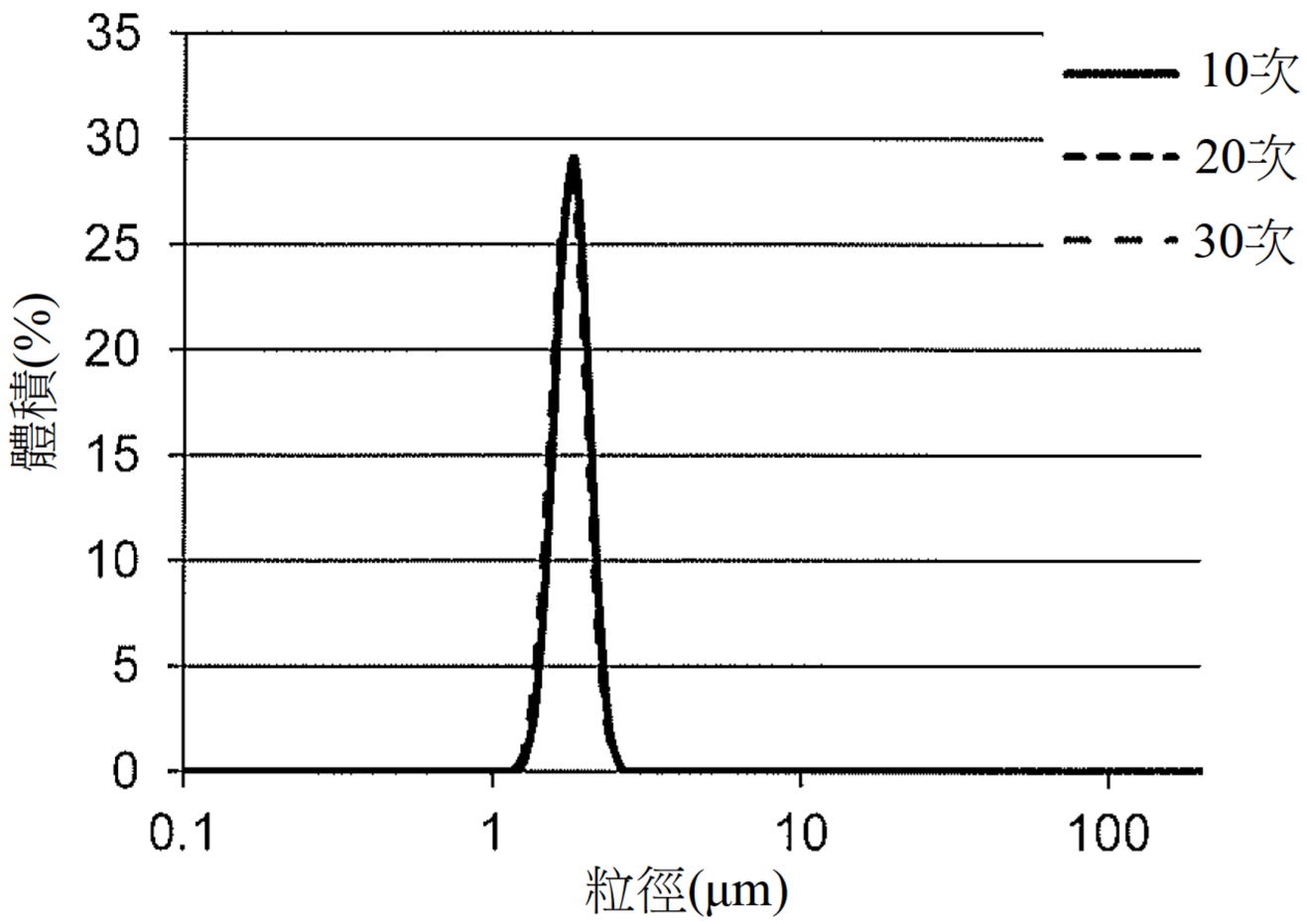
D


40
30
20
10
0
體積(%)
30次
0.1
1
10
100
粒徑(μm)

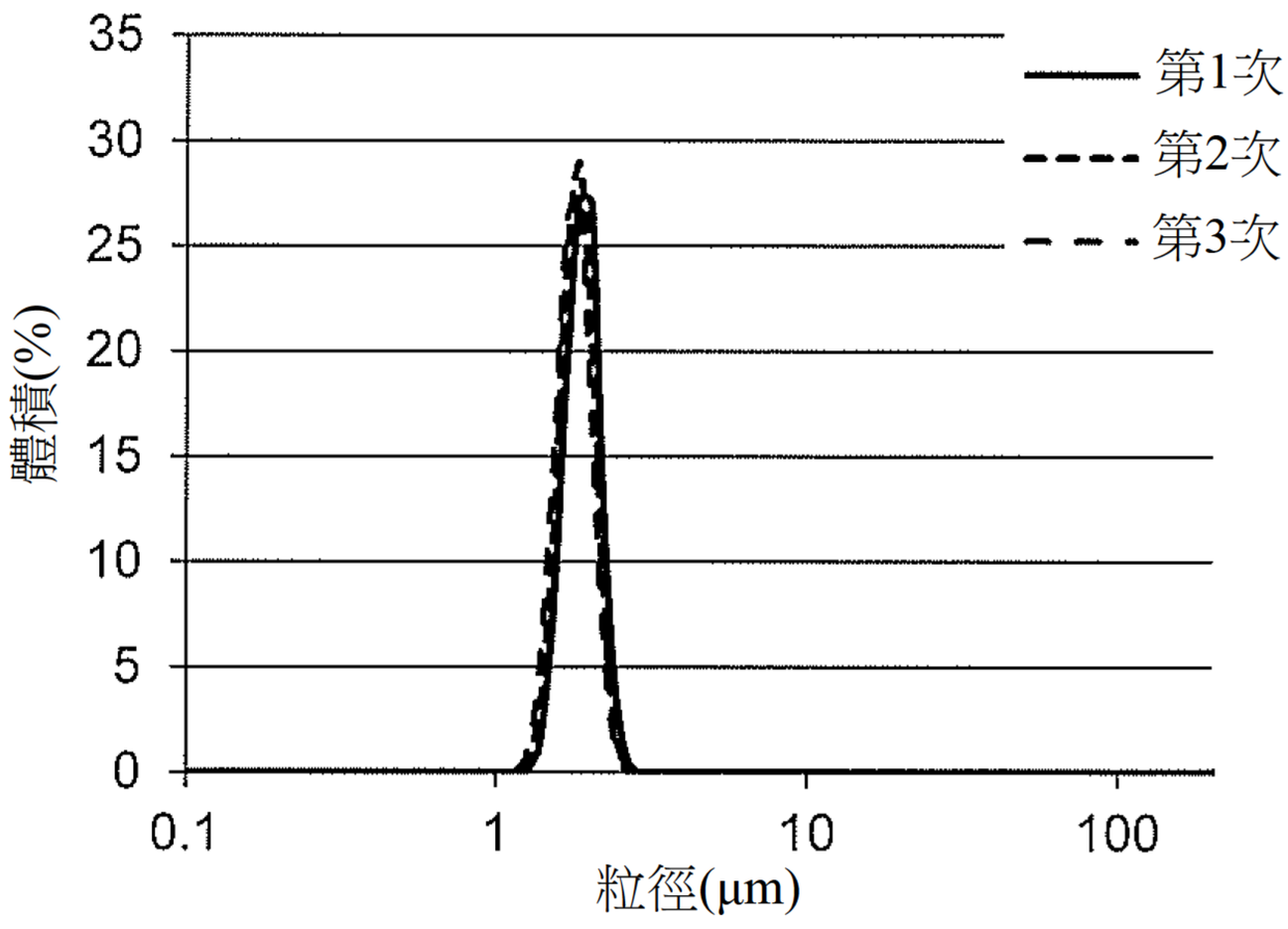
E


50
40
30
20
10
0
體積(%)
60次
0.1
1
10
100
粒徑(μm)

【圖3】


35
30
25
20
15
10
5
0
體積(%)
0.1
1
10
100
粒徑(μm)
10次
20次
30次

【圖4】


35
30
25
20
15
10
5
0
體積(%)
0.1
1
10
100
粒徑(μm)
第1次
第2次
第3次

【圖5】