(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5226534号
(P5226534)

(45)発行日　平成25年7月3日(2013.7.3)　(24)登録日　平成25年3月22日(2013.3.22)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39
A61K 47/06	(2006.01)	A61K	47/06
A61K 47/34	(2006.01)	A61K	47/34
A61K 9/107	(2006.01)	A61K	9/107
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10

請求項の数 36　(全 36 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-549901 (P2008-549901)
(86)(22)出願日　平成19年1月9日(2007.1.9)
(65)公表番号　特表2009-523158 (P2009-523158A)
(43)公表日　平成21年6月18日(2009.6.18)
(86)国際出願番号　PCT/FR2007/000030
(87)国際公開番号　WO2007/080308
(87)国際公開日　平成19年7月19日(2007.7.19)
審査請求日　平成22年1月7日(2010.1.7)
(31)優先権主張番号　0600309
(32)優先日　平成18年1月13日(2006.1.13)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(73)特許権者　592055820
サノフィ・パスツール
ＳＡＮＯＦＩ　ＰＡＳＴＥＵＲ
フランス６９３６７リヨン・セデックスＯ７、アヴニュ・ポン・パストゥール２番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(72)発明者　マリー－フランソワーズ・クリュッケ
フランス、エフ－６９３００カリュイール・エ・キュイール、アヴニュ・ジャン・モネ５５２番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】熱可逆性水中油滴型エマルション

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）遊離酸形または塩形であるＥＲ８０４０５７、
ｉｉ）スクアレン、
ｉｉｉ）水性溶媒、
ｉｖ）ポリオキシエチレンアルキルエーテルである非イオン性親水性界面活性剤、
ｖ）非イオン性疎水性界面活性剤
を含む、熱可逆性の水中油滴（Ｏ／Ｗ）型エマルション。
【請求項２】
油滴の少なくとも９０容量％が≦２００ｎｍの大きさである、請求項１記載のエマルション。
【請求項３】
油滴の少なくとも５０容量％が≦１１０ｎｍの大きさである、請求項１または２記載のエマルション。
【請求項４】
転相が４５℃～８０℃の温度で生じる、請求項１～３いずれか１項記載のエマルション。
【請求項５】
転相が５０℃～６５℃の温度で生じる、請求項４記載のエマルション。
【請求項６】

さらに少なくとも１つのアルジトールを含む、請求項１～５いずれか１項記載のエマルション。
【請求項７】
アルジトールがソルビトール、マンニトール、グリセロール、キシリトールまたはエリスリトールである、請求項６記載のエマルション。
【請求項８】
水性相が緩衝生理食塩溶液である、請求項１～７いずれか１項記載のエマルション。
【請求項９】
非イオン性親水性および疎水性界面活性剤の総量に対するＥＲ８０４０５７の量の比（重量／重量）が０．０１×１０$^{-2}$～５×１０$^{-2}$である、請求項１～８いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１０】
ポリオキシエチレンアルキルエーテルが、ポリオキシエチレン（１２）セトステアリルエーテル（セテアレス－１２）、ポリオキシエチレン（２０）セトステアリルエーテル（セテアレス－２０）、ポリオキシエチレン（２１）ステアリルエーテル（ステアレス－２１）、ポリオキシエチレン（２０）セチルエーテル（セテス－２０）、ポリオキシエチレン（１０）セチルエーテル（セテス－１０）、ポリオキシエチレン（１０）ステアリルエーテル（ステアレス－１０）、ポリオキシエチレン（２０）ステアリルエーテル（ステアレス－２０）、ポリオキシエチレン（１０）オレイルエーテル（オレス－１０）およびポリオキシエチレン（２０）オレイルエーテル（オレス－２０）からなる群から選択される、請求項１～９いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１１】
疎水性界面活性剤がソルビタンエステルまたはマンニドエステルである、請求項１～１０いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１２】
疎水性界面活性剤がモノオレイン酸マンニドである、請求項１１記載のエマルション。
【請求項１３】
疎水性界面活性剤がモノオレイン酸ソルビタンである、請求項１１記載のエマルション。
【請求項１４】
親水性および疎水性界面活性剤の量が界面活性剤の全体ＨＬＢが８．５～１０となるような量である、請求項１～１３いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１５】
スクアレンの量がエマルションの総重量の５％～４５％である、請求項１～１４いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１６】
界面活性剤の量に対するスクアレンの量の比が２．０～４．０である、請求項１～１５いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１７】
非イオン性親水性界面活性剤がポリオキシエチレン（１２）セトステアリルエーテル（セテアレス－１２）であり、非イオン性疎水性界面活性剤がモノオレイン酸ソルビタンであり、水性溶媒がリン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液である、請求項１～１６いずれか１項記載のエマルション。
【請求項１８】
ａ．スクアレンの量がエマルションの総重量の５％～４５％（重量／重量）であり、
ｂ．ポリオキシエチレン（１２）セトステアリルエーテル（セテアレス－１２）およびモノオレイン酸ソルビタンの総量に対するスクアレンの量の比が２．０～４．０であり、
ｃ．セテアレス－１２およびモノオレイン酸ソルビタンの量が、ＨＬＢが８．５～１０となるような量であり、
ｄ．ポリオキシエチレン（１２）セトステアリルエーテル（セテアレス－１２）および

モノオレイン酸ソルビタンの総量に対するＥＲ８０４０５７の量の比が０．０１×１０$^{-2}$～２×１０$^{-2}$である、
請求項１７記載のエマルション。
【請求項１９】
さらにマンニトールを含み、その量がエマルションの総重量の０．１～１０％である、請求項１８記載のエマルション。
【請求項２０】
さらに凍結乾燥基質を含む、請求項１～１９いずれか１項記載のエマルション。
【請求項２１】
凍結乾燥基質がシュークロース、マンニトールおよびドデシルマルトシドの水性溶液である、請求項２０記載のエマルション。
【請求項２２】
ワクチン組成物を調製するための請求項１～２１いずれか１項記載のエマルションの使用。
【請求項２３】
ワクチン抗原として少なくとも１つのインフルエンザウイルス赤血球凝集素を含むワクチン組成物を調製するための請求項１～２１いずれか１項記載のエマルションの使用。
【請求項２４】
ワクチン抗原としてサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）外被抗原を含むワクチン組成物を製造するための請求項１～２１いずれか１項記載のエマルションの使用。
【請求項２５】
ＣＭＶ外被抗原が、ＣＭＶのｇＢタンパク質、または少なくとも１つの中和エピトープを含むその誘導体である、請求項２４記載のエマルションの使用。
【請求項２６】
ＣＭＶ外被抗原が、膜貫通領域が欠失しており、開裂部位が無効である、ｇＢタンパク質である、請求項２５記載のエマルションの使用。
【請求項２７】
温度を上げることによりＷ／Ｏ型逆エマルションが得られる工程および温度を下げることによりこのＷ／Ｏ型逆エマルションがＯ／Ｗ型エマルションに転換される工程を含む、請求項１～２１いずれか１項記載のＯ／Ｗ型エマルションの製造方法。
【請求項２８】
Ｗ／Ｏ型エマルションが、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびＥＲ８０４０５７を含む水性相をスクアレンおよび非イオン性疎水性界面活性剤を含む油性相と混合してＯ／Ｗ型エマルションが得られる第１工程、ならびにＯ／Ｗ型エマルションを少なくとも該エマルションの転相温度である温度に加熱する第２工程を行うことにより得られる、請求項２７記載の方法。
【請求項２９】
Ｗ／Ｏ型エマルションが、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびＥＲ８０４０５７を含む水性相ならびにスクアレンおよび非イオン性疎水性界面活性剤を含む油性相を別々に少なくとも該エマルションの転相温度である温度に加熱し、次いで、混合物の温度を少なくとも該転相温度である温度に維持しながら水性相と油性相を混合することにより得られる、請求項２７記載の方法。
【請求項３０】
ＥＲ８０４０５７が水性相の代わりに油性相にある、請求項２８または２９記載の方法。
【請求項３１】
水性相がさらにアルジトールを含む、請求項２８～３０いずれか１項記載の方法。
【請求項３２】
転相温度が４５℃～８０℃である、請求項２８～３１いずれか１項記載の方法。
【請求項３３】

少なくとも１つのワクチン抗原を、化学構造が糖環を含まないＥＲ８０４０５７を含有するＯ／Ｗ型エマルションと混合する、ワクチン組成物の製造方法であって、ＥＲ８０４０５７を含有するＯ／Ｗ型エマルションが、温度を上げることによりエマルションがＷ／Ｏ型逆エマルションの形態で得られる工程および温度を下げることにより該Ｗ／Ｏ型エマルションがＯ／Ｗ型エマルションに転換される工程を含む転相方法に従って製造されることを特徴とする、方法。

【請求項３４】

Ｏ／Ｗ型エマルションが

ａ）ＥＲ８０４０５７

ｂ）スクアレン、

ｃ）水性溶媒、

ｄ）ポリオキシエチレンアルキルエーテルである非イオン性親水性界面活性剤、および

ｅ）非イオン性疎水性界面活性剤

を含む、請求項３３記載の方法。

【請求項３５】

さらに凍結乾燥工程を含む、請求項２７～３４いずれか１項記載の方法。

【請求項３６】

ワクチン抗原、ＥＲ８０４０５７、スクアレン、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである非イオン性親水性界面活性剤および非イオン性疎水性界面活性剤を含む、熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの形態のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＴＬＲ４アゴニスト（ＴＬＡ４と称する）を含む熱可逆性水中油滴（Ｏ／Ｗ）型エマルションの形態の免疫賦活性組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】

ＴＬＲ４（Ｔｏｌｌ様受容体タイプ４）は、免疫系の抗原提示細胞により発現される受容体である；それは、グラム細菌感染症に対する早期防御メカニズムに関与している。グラム細菌のリポ多糖（ＬＰＳ）は、ＴＬＲ４に対する天然リガンドである；それは、該受容体を活性化し、生化学的事象、特に、Ｎｆ－κＢ転写因子の活性化、および炎症誘発性サイトカインの産生のカスケードを引き起こす。ＬＰＳの加水分解により得られるモノホスホリルリピドＡもまたＴＬＲ４に対するリガンドであり、ＬＰＳよりも毒性が低いという利点を有する。

【０００３】

特許文献１には、リン脂質アジュバントを含有するＯ／Ｗ型エマルションの形態の製剤が記載されている。サブミクロンサイズの該エマルションは高圧ホモジナイザー（マイクロフルイダイザー）により得られる。この製造方法は、油滴のサイズを小さくするのに十分に大きな剪断力を得るために、高い機械的エネルギーを使用する。この技術によれば、得られたエマルションは、約５００ｎｍの大きさの小滴を含有する。

【特許文献１】ＷＯ ２００４／０６０３９６

【発明の開示】

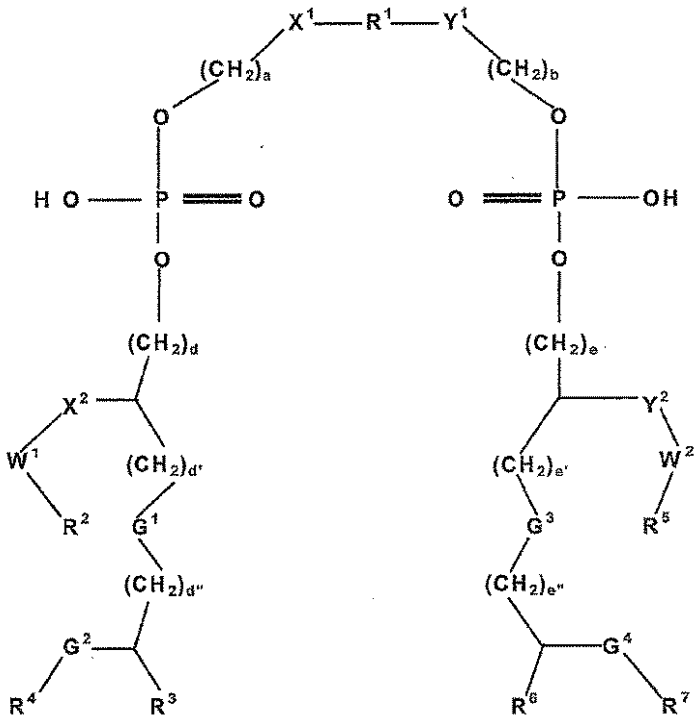
【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

その特許出願において提案されたものの代替製剤、特に、大規模にて再現性、信頼性および利用性があると共に、低エネルギーを含む簡単な方法（特定の剪断技法を必要としない）により得ることができるものを得ることが望まれている；さらにまた、アジュバント製剤は、全く安全な投与を阻害する毒性の徴候を示さないと同時に抗原に対する免疫応答を亢進させることによりワクチンの有効性を改良することができなければならない。

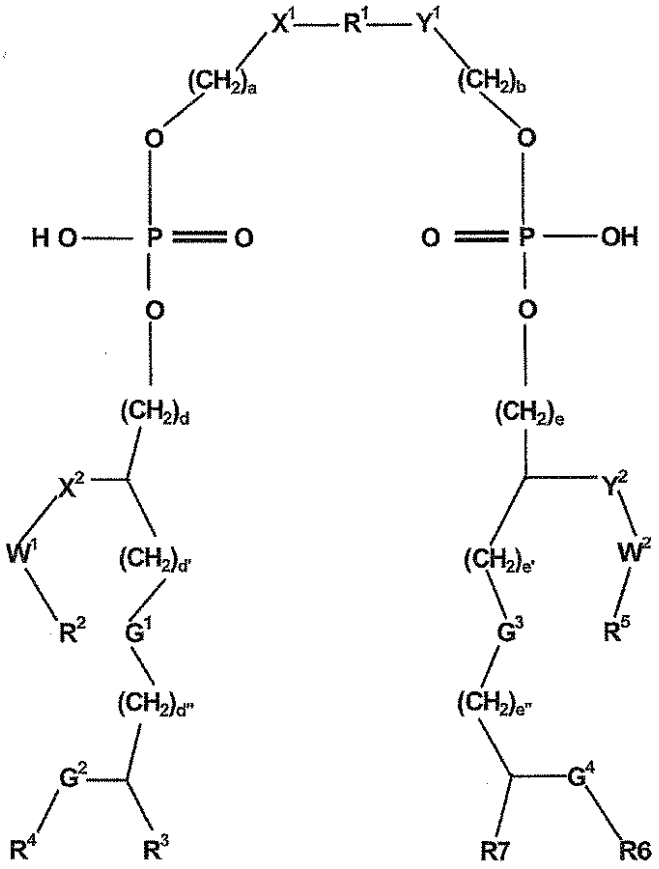
【課題を解決するための手段】

【０００５】
この趣旨で、本発明の主題は、
ｉ）化学構造が糖環を含まないＴＬＲ４アゴニスト（ＴＬＡ４と称する）、
ｉｉ）スクアレン、
ｉｉｉ）水性溶媒、
ｉｖ）ポリオキシエチレンアルキルエーテルである非イオン性親水性界面活性剤、
ｖ）非イオン性疎水性界面活性剤
を含む、熱可逆性の水中油滴（Ｏ／Ｗ）型エマルションである。
【０００６】
本発明のエマルション中に含まれるＴＬＲ４アゴニストは、リピドＡまたはリピドＡの誘導体またはリピドＡの構造を摸倣する分子ではない。
【０００７】
典型的には、ＴＬＡ４は、式Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩまたはＩＶで示される化合物または式Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩまたはＩＶで示される化合物の医薬上許容される塩である：
【０００８】
式Ｉで示される化合物：
【化１】



【０００９】
式ＩＩで示される化合物：

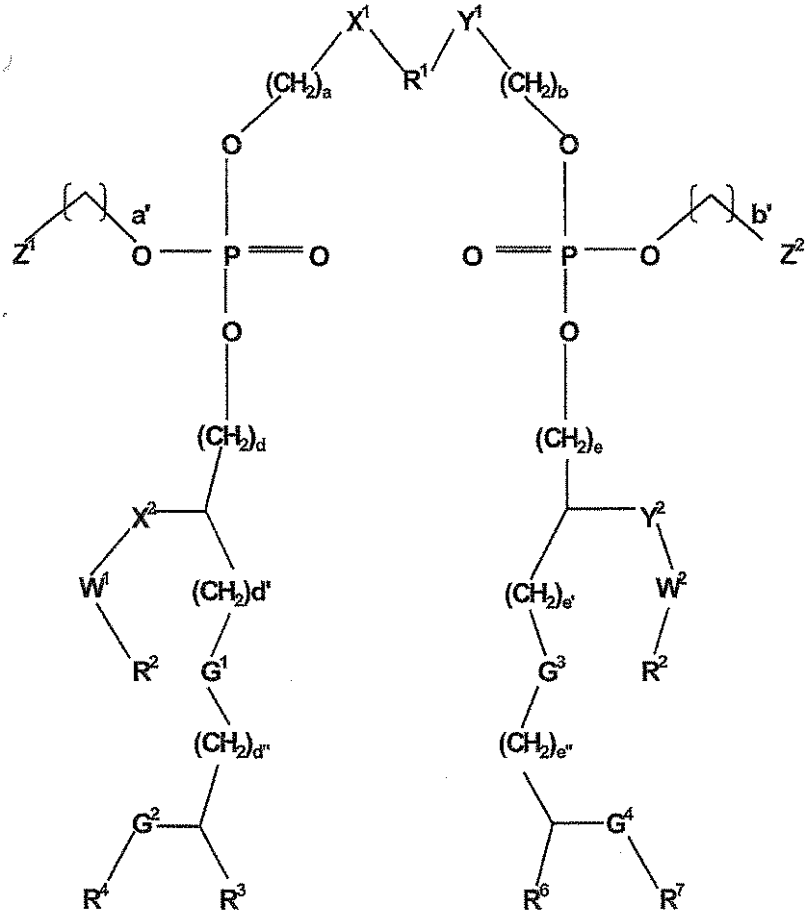
【化２】



【００１０】

式ＩＩＩで示される化合物：

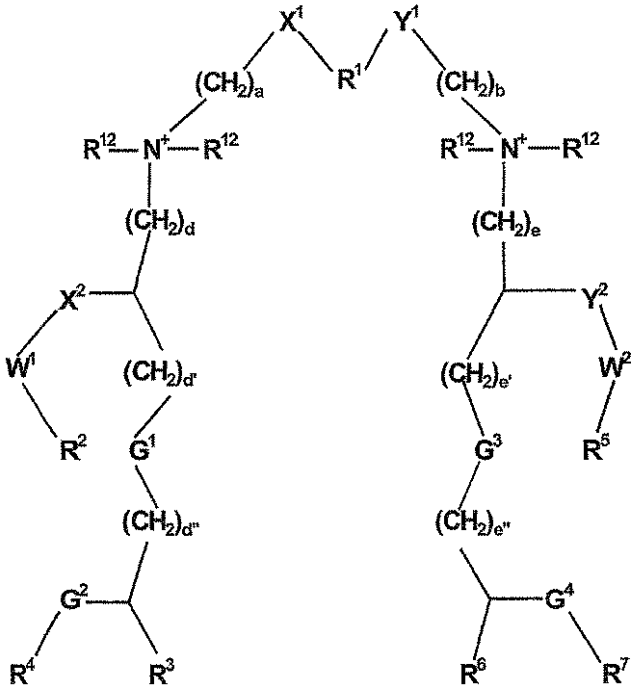
【化３】



【００１１】

式ＩＶで示される化合物：

【化４】



【００１２】

ここで、式Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩまたはＩＶの各々について、R^1は、

ａ）Ｃ(Ｏ)；

ｂ）Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_1$－Ｃ$_{14}$アルキル)－Ｃ(Ｏ)（ここで、Ｃ$_1$－Ｃ$_{14}$アルキルは、ヒドロキシル、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシ、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキレンジオキシ、(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノまたは(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アリールで置換されていてもよく、ここで、(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アリールのアリール部分は、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシ、(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノ、(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシ)アミノ、(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノ(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシ)、－Ｏ－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノ(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシ)、－Ｏ－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノ－Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)－Ｃ(Ｏ)ＯＨ、または－Ｏ－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)アミノ－Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル)－Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_1$－Ｃ$_5$)アルキルで置換されていてもよい）；

ｃ）ヒドロキシルまたはアルコキシで置換されていてもよいＣ$_2$－Ｃ$_{15}$直鎖または分枝鎖を含むアルキル；

ｄ）－Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_6$－Ｃ$_{12}$アリーレン)－Ｃ(Ｏ)－（ここで、アリーレンは、ヒドロキシル、ハロゲン、ニトロまたはアミノで置換されていてもよい）

からなる群から選択され；

ａおよびｂは、独立して、０、１、２、３または４であり；

ｄ、ｄ'、ｄ''、ｅ、ｅ'およびｅ''は、独立して、０、１、２、３または４であり；

X^1、X^2、Y^1およびY^2は、独立して、不在、酸素、ＮＨおよびＮ(Ｃ(Ｏ)(Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル))、およびＮ(Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル)からなる群から選択され；

W^1およびW^2は、独立して、カルボニル、メチレン、スルホンおよびスルホキシドからなる群から選択され；

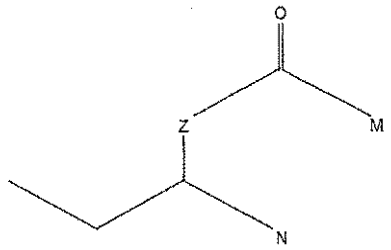
R^2およびR^5は、独立して、

ａ）オキソ、ヒドロキシルまたはアルコキシで置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルキル；

ｂ）オキソ、ヒドロキシルまたはアルコキシで置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルケニルまたはジアルケニル；

ｃ）オキソ、ヒドロキシルまたはアルコキシで置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖ま

たは分枝鎖アルコキシ；
ｄ）ＮＨ－(Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルキル)（ここで、アルキル基は、オキソ、ヒドロキシまたはアルコキシで置換されていてもよい）；および
ｅ）
【化５】



（ここで、Ｚは、ＯおよびＮＨからなる群から選択され、ＭおよびＮは、独立して、Ｃ$_2$－Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖を含むアルキル、アルケニル、アルコキシ、アシルオキシ、アルキルアミノおよびアシルアミノからなる群から選択される）
からなる群から選択され；
Ｒ^{3}およびＲ^{6}は、独立して、オキソまたはフルオロで置換されていてもよい、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルキルまたはアルケニルからなる群から選択され；
Ｒ^{4}およびＲ^{7}は、独立して、Ｃ(Ｏ)－(Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルキルまたはアルケニル)、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルキル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルコキシ、およびＣ$_2$～Ｃ$_{20}$直鎖または分枝鎖アルケニルからなる群から選択され（ここで、アルキル、アルケニルまたはアルコキシ基は、独立して、ヒドロキシル、フルオロまたはＣ$_1$－Ｃ$_5$アルコキシで置換されていてもよい）；
Ｇ^1、Ｇ^2、Ｇ^{3}およびＧ^{4}は、独立して、酸素、メチレン、アミノ、チオール、－Ｃ(Ｏ)ＮＨ－、－ＮＨＣ(Ｏ)－、および－Ｎ(Ｃ(Ｏ)(Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル))－からなる群から選択されるか；または
Ｇ^{2}Ｒ^{4}またはＧ^{4}Ｒ^{7}は一緒なって水素原子またはヒドロキシルであり得；
ここで、式ＩＩＩについては：
ａ'およびｂ'は、独立して、２、３、４、５、６、７または８、好ましくは２であり；
Ｚ^{1}は、－ＯＰ(Ｏ)(ＯＨ)$_2$、－Ｐ(Ｏ)(ＯＨ)$_2$、－ＯＰ(Ｏ)(ＯＲ^8)(ＯＨ)（ここで、Ｒ^{8}は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル鎖である）、－ＯＳ(Ｏ)$_2$ＯＨ、－Ｓ(Ｏ)$_2$ＯＨ、－ＣＯ$_2$Ｈ、－ＯＢ(ＯＨ)$_2$、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$、－ＮＨ$_2$および－ＮＲ^9$_3$（ここで、Ｒ^{9}は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル鎖である）からなる群から選択され；
Ｚ^{2}は、－ＯＰ(Ｏ)(ＯＨ)$_2$、－Ｐ(Ｏ)(ＯＨ)$_2$、－ＯＰ(Ｏ)(ＯＲ^{10})(ＯＨ)（ここで、Ｒ^{10}は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル鎖である）、－ＯＳ(Ｏ)$_2$ＯＨ、－Ｓ(Ｏ)$_2$ＯＨ、－ＣＯ$_2$Ｈ、－ＯＢ(ＯＨ)$_2$、－ＯＨ、－ＣＨ$_3$、－ＮＨ$_2$および－ＮＲ^{11}（ここで、Ｒ^{11}は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル鎖である）からなる群から選択され；
ここで、式ＩＶについては：
Ｒ^{12}は、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_4$アルキル鎖である。
【００１３】
本発明のエマルションは熱可逆性であり、これは、少なくとも「転相温度」と等しい温度に加熱した場合にＯ／Ｗ型エマルションの状態からＷ／Ｏ型エマルションの状態に変化することを意味する。顕微鏡スケールで、転相温度は、油性相に向けられる曲率から水性相に向けられる曲率への遷移を反映し、この移行は、必ず平均曲率０の相を通過することを意味する（そこで、系は、ラメラ相またはマイクロエマルションのいずれかに関連している）。
【００１４】
本発明のエマルションは、容易に制御することができて多量生産に適応することができるので工業的な観点から非常に有利な温度変化転相法により得ることができる。かかる方

法は、製薬業に必要な安全性および費用効果を保証する。加えて、この方法によって小滴サイズが小さい単分散エマルションを得ることができ、該エマルションは、カットオフが２００ｎｍの滅菌用フィルターを用いることにより容易に濾過することができる。

【００１５】

有利には、本発明のエマルションの油滴の少なくとも９０容量％が≦２００ｎｍの大きさである。一般に、これらのエマルションの油滴の少なくとも５０容量％が≦１１０ｎｍの大きさである。一の特異的な特徴によれば、油滴の少なくとも９０容量％が≦１８０ｎｍの大きさであり、該油滴の少なくとも５０容量％が≦１１０ｎｍの大きさである。

【００１６】

一般に、本発明の熱可逆性エマルションは均質である。「均質なエマルション」なる用語は、油滴のサイズ分布のグラフ表示（「グラニュログラム（granulogram）」）が単峰形であるエマルションを意味するものである。典型的には、このグラフ表示は、「ガウス」型である。

【００１７】

ｄ）小滴のサイズは、様々な手段で、特にＬＳ系のＢｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ装置（特に、ＬＳ２３０）またはＭａｓｔｅｒｓｉｚｅｒ系のＭａｌｖｅｒｎ装置（特に、Ｍａｓｔｅｒｓｉｚｅｒ ２０００）のようなレーザー回折粒径分析器を使用して測定することができる。これらの装置の測定原理は、試料にレーザー光線を照射した場合に粒子により散乱する光の強度を角度の関数として分析することに基づく（大角、中角および小角の検出器）。この分析は、使用した物質の大きさおよび性質にしたがって選択される数学的モデルによって行われる。サブミクロン粒子の大きさの測定の場合、油性相の屈折率（この場合、スクアレンについては１.４９５）および水性相の屈折率（例えば、水については１.３３２である）を考慮して、特定の光学モデル（Ｍｉｅ理論）を適用することが必要である；以下のものを用いて分析を最適化することを必要とする非常に微細な粒子によって発せられた弱い強度を検出することができることも必要である：

・大角局在化強度示差散乱測定用のさらなる検出セル（CoulterからのＰＩＤＳシステム、４０ｎｍから測定することができる）、

・Malvernからの青色光および赤色光の２つの波長を合わせる検出システム。広角散乱および後方散乱検出器に連結している短い波長の青色光の光源はサブミクロン範囲の分析の性能レベルを高める。

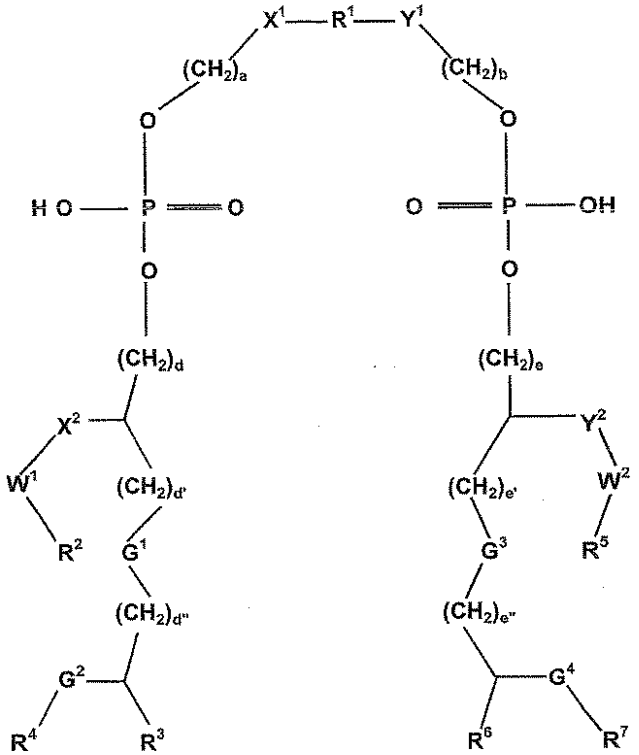
【００１８】

使用する装置に依存して、装置の構成要素および使用したデータ処理用ソフトウェアに応じて測定値が僅かに変わり得る。

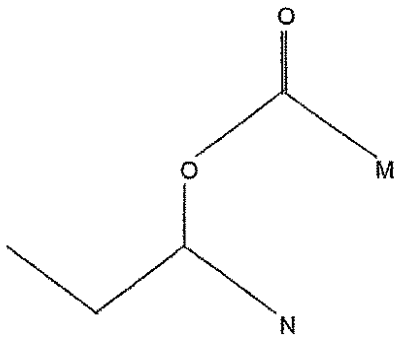
【００１９】

本発明の熱可逆性エマルションの転相温度は、各エマルションに対して特異的な特徴であり、その構成成分の性質およびそれらに関連する濃度に応じて変わる。有利には、本発明のエマルションの組成物は、転相が４５℃～８０℃の温度、好ましくは、５０～６５℃の温度で生じるように選択される。この温度範囲は、比較的高い温度（約３７℃）で貯蔵した場合にエマルション状態変化の危険性がないので有利である。さらにまた、該熱可逆性エマルションの製造方法における場合、成分の加熱は８０℃を超えない。これは、成分（特に、ＴＬＡ４）の構造および保全性の維持に寄与する。該エマルションの転相温度が高い場合には、特に、８０℃付近またはそれ以上である場合には、該エマルションの組成物に、通常ソルビトール、マンニトール、グリセロール、キシリトールまたはエリスリトールから選択されるアルジトールを加えることによってそれを低下させるのが有用である。アルジトールを０.１～１０％（ｗ／ｗ）の濃度範囲、好ましくは１～１０％（ｗ／ｗ）の濃度範囲、特に２～７％（ｗ／ｗ）の濃度範囲で使用する場合、エマルションの転相温度を約１０℃低下させることができる。水だけからなる水性相に代えて緩衝生理食塩水水性相を用いることによってもエマルションの転相温度を低下させることができる。通常、ＴＲＩＳ緩衝液、ＰＢＳのようなリン酸緩衝液、Ca^{2+}またはMg^{2+}を含まないＤｕｌｂｅｃｃｏ ＰＢＳ緩衝液、またはクエン酸緩衝液が使用される。

【００２０】
式Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩまたはＩＶで示される化合物は、特に、米国特許出願公開２００３／０１５３５３２または米国特許出願公開２００５／０１６４９８８に記載された方法に従った合成法により得られる。
【００２１】
特に、本発明のＴＬＡ４は、式Ｉ：
【化６】



で示される化合物またはこの化合物の医薬上許容される塩である。
【００２２】
好ましくは、
R^1は、C(O)またはC(O)－$(CH_2)_n$－C(O)であり（ここで、ｎは１、２、３または４である）、
ａ、ｂ、ｄ、ｄ'、ｄ''、ｅ、ｅ'およびｅ''は、独立して、１または２であり、
X^1、X^2、Y^1およびY^2は、ＮＨであり、
W^1およびW^2は、C(O)であり、
R^2およびR^5は、独立して、オキソで置換されていてもよいC_{10}－C_{15}直鎖アルキル、ＮＨ(C_{10}－C_{15}直鎖アルキル)、および
【化７】



（ここで、ＭおよびＮは、独立して、C_2～C_{20}直鎖アルキルまたはアルケニルである）からなる群から選択され、

R^3およびR^6は、C_5－C_{10}直鎖アルキルであり、
R^4およびR^7は、水素、C(O)－(C_8－C_{12}直鎖アルキル)またはC(O)(C_8－C_{12}直鎖アルケニル)からなる群から選択され、
G^1およびG^3は、酸素または－NH(CO)－であり、
G^2およびG^4は、酸素である。

【００２３】

ＴＬＡ４は、インビトロおよび／またはインビボで免疫賦活活性を発揮する。インビトロ免疫賦活活性は、特に、
１） ヒト全血の細胞によるＴＮＦαの生産の増加を測定すること、または
２） ＴＮＦαプロモーターの制御下でアルカリホスファターゼ遺伝子を形質移入されたＴＨＰ－１系によるアルカリホスファターゼの生産の増加を測定すること、または
３） ネズミ脾細胞によるＩＬ－１０およびインターフェロンγのようなサイトカインの生産の増加を測定すること、または
４） ネズミマクロファージ系ＲＡＷ２６４によるＴＮＦαの生産の増加を測定すること、または
５） Ｕ３７３ヒト星状細胞腫によるＩＬ－６の生産の増加を測定すること、または
６） フローサイトメトリーによりＣＤ２５、ＣＤ８０／ＣＤ８３のような活性化マーカーの発現に基づいてヒト単球由来の樹状細胞の活性化／成熟の増加を測定することによって評価される。これらの測定アッセイは全て当業者に周知であり、特に、米国特許出願公開２００３／０１５３５３２の実施例７またはJournal of Biological Chemistry, (2001), vol 276/3, page 1873-1880に記載されている。

【００２４】

インビボ免疫賦活活性は、体液性応答および／または特定の細胞応答の増加によって示される。体液性応答を評価するために、抗原に対する特異的抗体の生産を測定する。一例として、この応答の評価について米国特許出願公開２００３／０１５３５３２の実施例８に記載されているアッセイを参照することができる。ＴＬＡ４関連抗原の注射後に観察される特異的抗体（全免疫グロブリンの形態または特異的アイソタイプの形態内）の生産が同量の抗原単独の投与後に観察されるものよりも多い場合、ＴＬＡ４は、インビボ免疫賦活活性を発揮すると考えられる。ＴＬＡ４の免疫賦活活性は、当業者に周知の特異的な細胞性応答を測定するためのアッセイを使用して、例えば細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の活性またはリンパ球増殖を測定することによって、評価することもできる。

【００２５】

好ましくは、ＴＬＡ４は、ＥＲ８０３０２２、ＥＲ８０３０５８、ＥＲ８０３７３２、ＥＲ８０３７８９、ＥＲ８０４０５３、ＥＲ８０４０５７、ＥＲ８０４０５８、ＥＲ８０４０５９、ＥＲ８０４４４２、ＥＲ８０４７６４、ＥＲ１１１２３２、ＥＲ１１２０２２、ＥＲ１１２０４８、ＥＲ１１２０６５、ＥＲ１１２０６６、ＥＲ１１３６５１、ＥＲ１１８９８９、ＥＲ１１９３２７およびＥＲ１１９３２８の名称の下に米国特許出願公開２００３／０１５３５３２において同定され記載された化合物からなる群から選択される。

【００２６】

当該化合物は、化学構造がいくつかの不斉炭素を含む場合には、ジアステレオ異性体）の形態またはラセミ体（ジアステレオ異性体の混合物で存在し得る。例えば、４個の不斉炭素を有するＥＲ８０４０５７およびＥＲ８０４０５３は、ラセミ体であるＥＲ１１２０６６のジアステレオ異性体である。ＥＲ８０４０５７は、(R,R,R,R)型異性体配置のものであり、一方、ＥＲ８０４０５３は、(R,S,S,R)型配置のものである。同様に、(R,R,R,R)型異性体配置のものであるＥＲ８０４０５８および(R,S,S,R)型異性体配置のものであるＥＲ８０４０５９は、ラセミ体であるＥＲ１１３６５１のジアステレオ異性体である。(R,R,R,R)型配置のものであるＥＲ８０３０２２、(R,S,S,R)配置のものであるＥＲ８０３７３２、および(R,R,S,R)配置のものであるＥＲ８０３７８９もまた、１つの同一化学分子のジアステレオ異性体である。一般的に他の形態よりも活性であるR,R,R,R型配置を有するジアステレオ異性体が好ましく使用される。これら

のうち、ＥＲ８０４０５７が特に好ましい。それは、ドデカン酸(１Ｒ,６Ｒ,２２Ｒ,２７Ｒ)－１,２７－ジヘプチル－９,１９－ジヒドロキシ－９,１９－ジオキシド－１４－オキソ－６,２２－ビス[(１,３－ジオキソテトラデシル)アミノ]－４,８,１０,１８,２０,２４－ヘキサオキサ－１３,１５－ジアザ－９,１９－ジホスファヘプタコサン－１,２７－ジイルエステルである；それは、遊離酸の形態または塩の形態である。遊離酸形態の分子量は１５７９であり、二ナトリウム塩の分子量は１６２４である。二ナトリウム塩の実験式は$C_{83}H_{158}N_4Na_2O_{19}P_2$である。

【００２７】

構造上の観点から、本発明の主題であるＴＬＲ４アゴニストは、両親媒性分子である。両親媒性分子は、親水性および疎水性の両方の挙動性を有し、経時的に沈殿する傾向がある。それらは、しばしば、有機溶媒または水性溶媒に不完全に溶解し、しばしば、不安定な溶液または再現が困難な溶液の原因となる。これらの分子の製剤化の改良が必要とされている。本発明に記載されているエマルションは、経時的に安定なエマルションを提供することによってこの要求を満足する。＋４℃で６ヶ月間貯蔵される本発明のエマルションは、まず、実施例ＩＩに示すように、油滴のサイズ分布が実質的に変化しないこと；本発明の乳濁した流動性かつ均質な態様が保存されること；そして、明らかに、ＴＬＡ４の構造的完全性が損なわれないことという特徴を保存する。本発明のエマルションは、油滴サイズ分布に関して顕著な変化が観察されずに－２℃の温度で少なくとも４８時間貯蔵することができることも指摘される。さらにまた、本発明のエマルションは、ある種のＴＬＲ４アゴニストの発熱能を低下させる。

【００２８】

エマルションの親水性界面活性剤および疎水性界面活性剤の総量に対するＴＬＡ４の量の比は、通常、０.０１×１０^{-2}～５×１０^{-2}、好ましくは、０.１×１０^{-2}～２×１０^{-2}である。この比の範囲では、ＴＬＡ４の量は、界面活性剤の乳化能に対して影響を及ぼさないように十分に少ないが、インビトロおよび／またはインビボで免疫賦活活性を発揮するのに十分な量である。

【００２９】

本発明の親水性界面活性剤は、≧１０のＨＬＢ（親水性／親油性バランス）を有するものであり、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（ＰＡＥ）化学基（ポリオキシエチレン化脂肪アルコールエーテルとも称される）に属する。これらの非イオン性界面活性剤は、脂肪アルコールとエチレンオキシドとの間での化学的縮合により得られる。それらは、$R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$型の一般的な化学式を有する（ここで、基Ｒは、通常、飽和または不飽和アルキル基を示し、ｎは、エチレンオキシド単位の数を示す）。本発明の主題によると、Ｒは、１～５０個の炭素原子、好ましくは、４～２０個の炭素原子、特に好ましくは、１０～２０個の炭素原子を含有する。ｎは、≧２、一般的に、４～５０である。本発明のエマルションは、通常、単一の親水性ＰＡＥを含む。全体ＨＬＢが≧１０であることを条件として数種類のＰＡＥの混合物もまた適している。

【００３０】

本発明の主題に適しているポリオキシエチレン化脂肪アルコールエーテルは、周囲温度で液体または固体の形態であり得る。固体化合物では、水性相に直接溶解するかまたは実質的な加熱を要しないものが好ましい。

【００３１】

エチレンオキシド単位の数が十分である限りにおいて、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、および／またはステアリルアルコールのポリオキシエレチン化エーテルが本発明の目的に特に適している。それらは、特に、Ｂｒｉｊ（登録商標）、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ（登録商標）またはＳｉｍｕｌｓｏｌ（登録商標）の商標名の下に知られている一連の製品に見ることができる。

【００３２】

特に好ましい本発明のエマルションは、非イオン性親水性界面活性剤として、ポリオキシエチレン（１２）セトステアリルエーテル（セテアレス－１２）（Ｅｕｍｕｌｇｉｎ（

登録商標）Ｂ１なる名称の下の販売されている）、ポリオキシエチレン（２０）セトステアリルエーテル（セテアレス－２０）（Ｅｕｍｕｌｇｉｎ（登録商標）Ｂ２）、ポリオキシエチレン（２１）ステアリルエーテル（ステアレス－２１）（Ｅｕｍｕｌｇｉｎ（登録商標）Ｓ２１）、ポリオキシエチレン（２０）セチルエーテル（セテス－２０）（Ｓｉｍｕｌｓｏｌ（登録商標）５８またはＢｒｉｊ（登録商標）５８）、ポリオキシエチレン（１０）セチルエーテル（セテス－１０）（Ｂｒｉｊ（登録商標）５６）、ポリオキシエチレン（１０）ステアリルエーテル（ステアレス－１０）（Ｂｒｉｊ（登録商標）７６）、ポリオキシエチレン（２０）ステアリルエーテル（ステアレス－２０）（Ｂｒｉｊ（登録商標）７８）、ポリオキシエチレン（１０）オレイルエーテル（オレス－１０）（Ｂｒｉｊ（登録商標）９６またはＢｒｉｊ（登録商標）９７）およびポリオキシエチレン（２０）オレイルエーテル（オレス－２０）（Ｂｒｉｊ（登録商標）９８またはＢｒｉｊ（登録商標）９９）からなる群から選択されるポリオキシエチレンアルキルエーテルを含有する。各化学名の次に表示されている数字は化学式におけるエチレンオキシド単位の数に対応する。

【００３３】

半合成起源のゆえに特に好適な化合物は、Cognis社によって提供されるＥｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（セテアレス－１２）である。

【００３４】

本発明のエマルションは、ＨＬＢが≦６の非イオン性疎水性界面活性剤をも含有する。該エマルションは、通常、単一の非イオン性疎水性界面活性剤を含む。全体ＨＬＢが≦６であることを条件として数種類の非イオン性疎水性界面活性剤の混合物もまた適している。典型的には、疎水性ソルビタンエステルまたは疎水性マンニドエステルを含む。ソルビタンエステルは、通常、脂肪酸とソルビトール、ソルビトール・一無水物またはソルビトール・二無水物との間のエステル化反応によって得られる。マンニドエステルは、通常、脂肪酸とマンニトール・一無水物または二無水物との間のエステル化反応により得られる。好ましくは、モノオレイン酸マンニド（Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ８０™の名称の下にSigma社によって販売されているかまたはSeppic社によって供給されている）またはモノオレイン酸ソルビタン（Ｓｐａｎ（登録商標）８０、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯ™（Cognis）またはＭｏｎｔａｎｅ ８０™（Seppic）の下に販売されている）が挙げられる。

【００３５】

このたび、エマルションの製造のために従来技術において提案されている全ての界面活性剤のうちのこれらの特定の界面活性剤の選択によって、実行が容易な転相法を使用してアジュバントＯ／Ｗ型エマルションを非常に有利に製造することができることが見出された。

【００３６】

親水性および疎水性界面活性剤の各濃度が、該混合物のＨＬＢ（HLB_m）が８．５～１０、特に、８．６～９．６となるようなものである場合、該エマルションは、一般に均質であり、しばしば、油滴の少なくとも９０容量％が≦０．２μｍの大きさである。さらにまた、これらのエマルションは、特に安定である。スクアレンエマルション中の親水性および疎水性界面活性剤の量は、好ましくは、HLB_mが８．５～１０であるように、より好ましくは、HLB_mが８．６～９．６であるように調整される。エマルションの組成物中の親水性および疎水性界面活性剤の各濃度を決定するために、下記式を使用する：

$$HLB_m = HLB_e \times M + HLB_{pae} \times (1-M)$$

式中、

HLB_mは、混合物のＨＬＢに対応し、好ましくは、８．５～１０、より好ましくは、８．６～９．６である。

HLB_eは、疎水性界面活性剤のＨＬＢに対応する。

Ｍは、疎水性界面活性剤およびＰＡＥから調製される混合物中の疎水性界面活性剤の重量％に対応する。

HLB_{pae}は、ＰＡＥのＨＬＢに対応する。

【００３７】
エマルションの油性相であるスクアレンは、実験化学式$C_{30}H_{50}$を有し、６個の二重結合を含む。この油は、代謝可能であり、注射用医薬品において使用するのに必要な性質を有する。それは、サメの肝臓（動物起源）に由来するものであるが、オリーブ油（植物起源）から抽出することもできる。特に、Fluka社により提供される動物起源のスクアレンを使用して優れた結果が得られた。一般に、スクアレンの量は、エマルションの総重量の５～４５％である。
【００３８】
本発明のエマルション中の界面活性剤の総量に対するスクアレンの量の質量比は、通常、２．０～４．０、好ましくは、２．５～３．５である。
【００３９】
特に好ましい本発明のエマルションの組成物は、
スクアレン、
水性溶媒としてのリン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液、
ＴＬＲ４アゴニストとしての化合物ＥＲ８０４０５７、
親水性界面活性剤としてのセテアレス－１２（Ｅｕｍｕｌｇｉｎ（登録商標）Ｂ１）、
疎水性界面活性剤としてのモノオレイン酸ソルビタン
を含む。
【００４０】
スクアレンの量は、エマルションの総重量の５～４５％である。化合物ＥＲ８０４０５７の量は、通常、２種類の界面活性剤の重量の０．０５％～２％である。好ましくは、セテアレス－１２の量およびモノオレイン酸ソルビタンの量は、この２種類の界面活性剤の混合物のＨＬＢが８．５～１０、特に、８．６～９．６となるような量である。セテアレス－１２およびモノオレイン酸ソルビタンの総量に対するスクアレンの量の比は、２．０～４．０、好ましくは、２．５～３．５である。さらにまた、この組成物は、マンニトールを含有することができ、その量は、通常、エマルションの総重量の０．１％～１０％である。
【００４１】
本発明のエマルションの水性相はまた、１種類またはそれ以上の凍結保護剤を含有する凍結乾燥基質を含有することもできる。凍結保護剤は、通常、シュークロースのような糖、マンニトールもしくはソルビトールのようなポリアルコール、またはアルキルポリグリコシド（例えば、デシル－Ｄ－ガラクトシドウロン酸ナトリウムもしくはドデシルβ－マルトシド）のような糖誘導体から選択される。通常、シュークロース、マンニトールおよびドデシルβ－マルトシドを混合物として含有する凍結乾燥基質が使用される。そこで、本発明のエマルションは、凍結乾燥させることができ、凍結乾燥品の形態で保存することができる。しかしながら、水性相に溶解すると再び、凍結乾燥前に存在していたものと同様の油滴サイズ分布を有する乳濁した安定かつ流動性の熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションとなるので、その特性の全てを保存している。
【００４２】
本発明のエマルションはまた、抗原に対する免疫応答のアジュバントの役割も果たす。本発明の目的のために、「抗原」なる用語は、生きているか、弱毒化されたか、もしくは死滅させられた全微生物、微生物の抽出物またはサブユニット形態であるかに関係なく、ワクチンに使用することができるいずれもの抗原を意味するものとする。サブユニット形態である場合、抗原の性質はあまり重要ではない；それは、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、糖脂質、リポペプチドまたは核酸であり得る。本発明の主題に適している抗原としては、クロストリジウム・テタニ（Clostridium tetani）、クロストリジウム・ジフテリエ（Clostridium diphtheriae）、百日咳菌（Bordetella pertussis）、ヘモフィルス・インフルエンゼ（Haemophilus influenzae）タイプｂ、肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、赤痢菌（Shigella sp.）、サルモネラ・ティフィ（Salmonella typhi）、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureu

s）もしくは表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）、結核菌（Mycobacterium tuberculosis）、クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）もしくは連鎖球菌（Streptococcus sp）由来の細菌抗原、Ａ型、Ｂ型もしくはＣ型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器多核体ウイルス、ウエストナイルウイルス、狂犬病ウイルス、ポリオウイルス、ＨＩＶウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス、サイトメガロウイルスもしくはヘルペスウイルス由来のウイルス抗原、特にマラリア原虫（Plasmodium sp.）由来の寄生虫抗原、または腫瘍抗原が挙げられる。これらの抗原は、当業者に周知の遺伝子組換え法または抽出法を用いて得ることができる。本発明のエマルションは、特異的抗体の生産を増加させることによって体液性免疫に対して作用し、および／または、特にＴリンパ球増殖、特異的細胞溶解性応答（ＣＴＬ応答）の発生および／または活性化されたリンパ球により生産されるサイトカイン、ケモカインおよび増殖因子の生産を促進することによって特異的細胞性免疫に対して作用する。

【００４３】

この理由のために、本発明の主題は、ワクチン組成物を調製するための本発明のエマルションの使用でもある。得られるワクチン組成物は、例えば、該組成物が体液型であろうとおよび／または細胞型であろうと大きな特異的免疫応答を誘発するので、または、同一の強度および同等の期間の免疫応答を得るために少量の抗原しか必要ではないので、より免疫原性であることがわかる。本発明のエマルションから得られるワクチン組成物は、ワクチンについて通常用いられるか推奨される経路（非経口、皮内、皮下、筋肉内、または経粘膜）によって投与することができ、様々な剤形、特に、液体または凍結乾燥品であり得る。それは、筋肉注射、皮下注射または皮内注射のための注射器もしくは無針注入器により、または鼻腔スプレーにより投与することができる。

【００４４】

ワクチン組成物は、一般に、抗原と本発明のエマルションとの混合物の形態である。即時調合剤の剤形であってもよい。この場合、抗原およびエマルションは、ワクチン組成物の投与直前または投与時に接触させる。例えば、抗原を凍結乾燥させ、投与直前にエマルションで溶解することができるか、または、それとは逆に、エマルションが凍結乾燥形態であり、抗原の溶液で溶解することができる。ワクチン組成物はまた、抗原とエマルションを混合することが望ましくない場合には「バイパス」シリンジのような特定の注射器具に入れることもできる。

【００４５】

ワクチン組成物が抗原溶液による本発明のエマルションの希釈によって得られる混合物の形態である場合、それは、通常、スクアレンの量が一般的に組成物の総重量の０．５～５重量％であるＯ／Ｗ型エマルションの形態である。ワクチン組成物中のスクアレンの量が５％（ｗ／ｗ）に達するかまたは５％（ｗ／ｗ）を超える場合、それは、熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの形態でもあり得る。ワクチン組成物が熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションである場合、それは、特に、油滴の少なくとも９０容量％が≦０．２μｍの大きさである形態であり得る。

【００４６】

驚くべきことに、本発明のエマルションは、マイクロフルイダイゼーションにより得られる従来技術のＯ／Ｗ型エマルション（その組成はスクアレン、ポリオキシエチレンモノオレイン酸ソルビタン（Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０）およびトリオレイン酸ソルビタン（Ｓｐａｎ（登録商標）８５）（従来技術のＯ／Ｗ型エマルション）を含有している）よりも中和抗体を誘発する能力が大きい。

【００４７】

中和抗体は、感染微生物に関連もしくは由来する抗原で免疫化した個体またはこの微生物と接触した個体により産生される感染微生物に対する機能的抗体であり、これはこの微生物による細胞の感染を予防する。それらは、細胞内微生物、特にウイルスおよび単細胞寄生虫、特にマラリア原虫により引き起こされる感染症の予防または治療において非常に重要な役割を果たす。熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）の「スポロゾイト

」形態由来の抗原（例えば、スポロゾイトの主要表面タンパク質（スポロゾイト周囲タンパク質）、ＬＳＡ３、またはＰｆｓ １６抗原）、および熱帯熱マラリア原虫の「メロゾイト」形態由来の抗原（例えば、ＭＳＰ１、ＭＳＰ２、ＭＳＰ３、ＥＢＡ－１７５、Ｒｈｏｐ－１、Ｒｈｏｐ－２、Ｒｈｏｐ－３、ＲＡＰ－１、ＲＡＰ－２、ＲＡＰ－３、Ｐｆ１５５／ＲＥＳＡまたはＡＭＡ－１抗原）は、中和抗体を誘発する。熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトまたはメロゾイト由来の抗原の１種類またはそれ以上を含有するワクチン組成物を製造するための本発明のエマルションの使用は、中和免疫応答を増幅するために適応される。本発明のエマルションは、特に、ワクチン抗原として熱帯熱マラリア原虫ＬＳＡ３タンパク質を含むワクチン組成物を調製するために使用することができる。このタンパク質をコードする遺伝子は、Gardner et al., Science (1998), 282, 1126-1132によって同定されており、熱帯熱マラリア原虫（３Ｄ７株）の第２染色体にある。該遺伝子の完全配列は、１２２４０塩基対長であり、１５５８アミノ酸タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列およびタンパク質配列は、ＥＭＢＬデータバンクにおいて受入番号ＡＥ００１４２４およびユニプロット番号０９６２７５－ＰＬＡＦ７の下に記載されている。記載されたタンパク質全体、ペプチド、またはこのタンパク質のフラグメント（例えば、ＷＯ０２／３８１７６に記載されているもの）は、ワクチン抗原として使用することができる。通常、タンパク質全体（熱帯熱マラリア原虫の株間に存在する差異を考慮するために１つまたはそれ以上の点変異を含むことができる）またはこのタンパク質のフラグメント（そのアミノ酸配列は、ユニプロット０９６２７５－ＰＬＡＦ７に記載されている配列全体に関して少なくとも８０％の同一性を有する）が使用される。場合によっては、ある種の抗ウイルスワクチンの効力は、それらが誘発する中和抗体の力価に基づいて評価される。これは、インフルエンザワクチンの場合であり、その効力は、赤血球凝集阻止（ＨＡＩ）抗体の力価と関連している。

【００４８】

本発明のエマルションは、インフルエンザウイルスに関連するヒトまたは動物（トリ、ウマ）における感染性疾患の治療用または予防用のワクチン組成物を製造するために使用される。インフルエンザワクチンの性質に依存して、当該ワクチン組成物は、様々な形態であり得る：

インフルエンザワクチンが１種類またはそれ以上の不活化完全または「スプリット」ウイルス株を含有するか、または１種類またはそれ以上のウイルス株からの精製赤血球凝集素を含有するサブユニットワクチンの形態もしくはビロソームの形態（Ｂｅｒｎａワクチン）である場合、該ワクチン組成物は、通常、混合物、Ｏ／Ｗ型エマルションまたは熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの形態である。

インフルエンザワクチンが１種類またはそれ以上の生きている弱毒化生ウイルス株を含有する場合、該ワクチン組成物は、好ましくは、該生ウイルスがエマルションと直接接触しないようなバイパスシリンジ型のデバイスに入れられている。ウイルス懸濁液および本発明のエマルションは、シリンジの２つの別々のコンパートメントに入っている。

【００４９】

インフルエンザワクチンは、当業者に周知の方法に従って卵または細胞中で培養されたインフルエンザウイルスから製造され、いずれも必須成分として１種類またはそれ以上のウイルス株の赤血球凝集素を含む。

【００５０】

したがって、本発明の主題は、ワクチン抗原として１種類またはそれ以上のインフルエンザウイルス赤血球凝集素を含むワクチン組成物を製造するための本発明のエマルションの使用でもある。このワクチン組成物は、

１）インフルエンザウイルスに関して血清陰性の個体集団（これらは、インフルエンザウイルスもしくはその免疫原性成分と接触したことがないかまたは該成分で感作されたことがない個体、またはパンデミックの原因となる新種のインフルエンザウイルスと接触したことがない個体である）；

２）インフルエンザウイルスに関して血清陽性の個体集団（これらは、既にインフルエ

ンザウイルスもしくはその免疫原性成分と接触したかまたは該成分で感作された個体である）；
３）一般的に細胞性および／または体液性免疫の機能障害（特にインフルエンザウイルスに関して観察される）を示す高齢個体集団
を免疫化するために使用することができる。

【００５１】

本発明のエマルションはまた、ヘルペスウイルス（ＨＳＶ１、ＨＳＶ２、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ））により引き起こされる感染性疾患の治療用または予防用のワクチン組成物を製造するのに使用される。ウイルス外被抗原は、ワクチン組成物において一般に使用される。ＣＭＶ感染症において、ウイルス外被タンパク質、主に、糖タンパク質Ｂ（ｇＢ）および糖タンパク質Ｈ（ｇＨ）に対する抗体であって、ウイルス感染を中和する抗体は、防御免疫の発生に非常に重要な役割を果たす。ＣＭＶ外被タンパク質を含有するワクチン組成物の製造における本発明のエマルションの使用は、中和抗体の生産を増加させる効果を有する。

【００５２】

したがって、本発明の主題は、ワクチン抗原としてＣＭＶ外被抗原を含むワクチン組成物の製造のための本発明のエマルションの使用である。典型的には、該抗原は、ｇＢ糖タンパク質および／またはｇＨ糖タンパク質である。それは、１種類またはそれ以上の中和エピトープを含む、ｇＢおよび／またはｇＨから誘導されるペプチドまたはポリペプチドであってもよい。

【００５３】

ＣＭＶのＵＬ５５遺伝子によりコードされる天然形態のｇＢ（ｇｐ１３０）は、ＡＤ１６９株が関与しているかＴｏｗｎｅ株が関与しているかに依存して９０６個または９０７個のアミノ酸の糖タンパク質である。この２種類の株のタンパク質配列は、米国特許公開２００２／０１０２５６２（図２）に記載されている。ｇＢの天然形態は、シグナル配列、続いて、アルギニン残基４６０とセリン残基４６１との間に細胞内タンパク質分解性開裂部位を含有する細胞外領域、続いて、膜貫通領域、続いて、細胞内領域を含有する。中和抗体を誘発するいくつかの抗原領域が記載されている。これは、特に、ｇｐ１３０のアミノ酸残基４６１から６８０までの間にある領域に関与しており、この領域は、残基４６１から６１９までの間の領域および残基６２０から６８０までの間の領域の２つの不連続領域に細分される（米国特許第５，５４７，８３４号）。また、アミノ酸残基５５２から６３５までの間にあるＡＤ－１領域またはアミノ酸残基５０から７７までの間にあるＡＤ－２領域も含む（Journal of General Virology (1999), 80, 2183 2191；Journal of Virology (2005), 79, 4066-4079）。結果として、アミノ酸配列において記載された領域のうちの１つと相同の配列を含むポリペプチドは、本発明の主題に適している。典型的には、該ポリペプチドは、アミノ酸配列においてｇｐ１３０の残基４６１から６８０までの間にあるもの、さらに詳しくは残基５５２から６３５までの間にあるものと相同の配列を含む。「相同配列」なる用語は、ＴｏｗｎｅまたはＡＤ１６９株のｇｐ１３０にある考慮中の抗原性領域のアミノ酸配列（米国特許公開２００２／０１０２５６２に記載されている）と少なくとも８０％の同一性を有するいずれものアミノ酸配列を意味するものである。典型的には、配列相同性は、少なくとも９０％の同一性に基づき、特に、配列相同性は、１００％の配列相同性に基づく。

【００５４】

本発明の主題に適しているｇＢ誘導ペプチドまたはポリペプチドとして、特に米国特許第５，５４７，８３４号に記載のｇｐ５５が挙げられる。それは細胞内タンパク質分解性開裂部位でのｇＢの開裂により誘導される；そのアミノ酸配列は、セリン残基４６１からＣ末端までの間のものに対応している。米国特許第５，５４７，８３４号に記載されている、膜貫通配列の全部もしくは一部または細胞内Ｃ末端領域の全部もしくは一部を欠いているｇｐ５５（例えば、残基４６１から６４６までの間のｇｐ１３０のアミノ酸配列と相同の配列を有するペプチド）または細胞内Ｃ末端領域の全部または一部を欠いているｇｐ５５

（例えば、残基４６１から６８０までの間のｇｐ１３０のアミノ酸配列と相同の配列を有するペプチド）のようなｇｐ５５の切断型を使用することもできる。細胞内タンパク質分解性開裂部位が無力になるような細胞内タンパク質分解性開裂部位での１つまたはそれ以上の変異を担持する変異形態のｇＢを使用することもできる。変異は、ｇｐ１３０の配列の残基４５７から４６０までの間にあり、特に、アルギニン４６０および／またはリシン４５９および／またはアルギニン４５７にある。本発明の主題に特に適しているＣＭＶ外被抗原は、Ｃ末端領域の全部または一部を欠いているかまたは膜貫通配列の全部または一部を欠いている切断型のｇＢであり、ここで、開裂部位は無力である。特に好ましい切断形態のｇＢは、ｇＢｄＴＭと称される、米国特許第６,１００,０６４号に記載されているものに対応する；それは、細胞外領域が細胞質領域と直接連結するような、開裂部位での３つの変異およびアミノ酸残基バリン６７７からアルギニン７５２までの間の膜貫通領域における欠失を担持する。

【００５５】

ｇＢタンパク質またはそれから誘導されるペプチドもしくはポリペプチドは、遺伝子組換え法によって得られ、当業者に周知の方法に従って精製される。特に、米国特許第６,１００,０６４号および米国特許公開２００２／０１０２５６２に記載されている方法（出典明示により本明細書の一部を構成する）を使用することができる。それらの免疫原性を増加させるため、それらは、二次的にキャリアタンパク質と抱合され得るかまたは他のタンパク質（特に、Ｂ型肝炎表面抗原（ＨｂＳ）のような粒子形成タンパク質）と融合され得る。ｇＢタンパク質またはそれから誘導されるペプチドはまた、組換えウイルスにより、特に組換えアデノウイルスまたは組換えポックスウイルスにより発現され得る。ｇＢまたは誘導ペプチドを発現するこれらの組換えベクターを調製するために、特に米国特許第６,１６２,６２０号、第５,８６６,３８３号、第５,５５２,１４３号、第６,１８３,７５０号もしくは第５,３３８,６８３号またはＷＯ ９２１５６７２もしくはＷＯ ９６３９４９１に記載されている方法が使用される。ｇＢはまた、細胞培養物での連続継代により弱毒化されたＣＭＶの株、特にワクチン目的のために既に試験されているＴｏｗｎｅ株から得ることもできる。

【００５６】

ｇＨタンパク質は、ＣＭＶのＵＬ７５遺伝子によりコードされる。それは、株がＴｏｗｎｅ株であるかＡＤ１６９株であるかに依存して７４２個または７４３個のアミノ酸の糖タンパク質である。該配列は、米国特許第５,４７４,９１４号（図１）および米国特許第６,６１０,２９５号（図５（ａ））に記載されている。ヌクレオチド配列から推定されるｇＨのタンパク質配列は、シグナル配列、続いて、細胞内タンパク質分解性開裂部位を有しない細胞外領域、続いて、膜貫通領域、続いて、Ｃ末端細胞質領域を含有する。中和エピトープは、細胞外領域中、主に、この領域のＮ末端部分、詳しくは天然ｇＨのタンパク質配列のアミノ酸残基１５から１４２までの間、さらに詳しくはアミノ酸残基３３から１４２までの間にある。ＡＤ１６９株の主な中和エピトープは同定されており、ｇＨの配列の残基３３から４３までの間にあり、配列ＬＤＰＨＡＦＨＬＬＬを有する（Urban M et al.: J. Virol (1992, vol 66/3, p1303-1311)）。結果として、アミノ酸配列において、該配列ＬＤＰＨＡＦＨＬＬＬと相同の配列、またはｇＨのタンパク質配列の残基１５から１４２までの間もしくは残基３３から１４２までの間の配列と相同の配列を含むポリペプチドは、本発明の主題に適している。「相同配列」なる用語は、ＡＤ１６９株のｇＨのタンパク質配列の残基１５から１４２までの間もしくは残基３３から１４２までの間のアミノ酸配列または配列ＬＤＰＨＡＦＨＬＬＬと少なくとも８０％同一性を有するアミノ酸配列を意味するものである。さらに詳しくは、配列相同性は、少なくとも９０％の同一性に基づいており、特に、配列相同性は１００％の配列同一性に基づく。

【００５７】

本発明の主題に適しているｇＨ誘導ペプチドまたはポリペプチドとして、膜貫通領域の全部または一部を欠いており、および／または細胞質領域の全部または一部を欠いているｇＨが挙げられる。典型的には、これは、少なくとも５個のＣ末端残基、好ましくは、少

なくとも１０個のＣ末端残基、さらに好ましくは、アミノ酸配列のＣ末端の２０～３４個の残基が欠失しているｇＨタンパク質に対応している。

【００５８】

ｇＨタンパク質およびそれから誘導されるポリペプチドまたはペプチドは、遺伝子組換え法により得られ、当業者に周知の方法、特に米国特許第５,４７４,９１４号または米国特許第５,３１４,８００号に記載の方法（出典明示により本明細書の一部を構成する）に従って精製される。それらの免疫原性を増大させるために、それらは、二次的にキャリアタンパク質と抱合され得る。それらはまた、J. Virol, 1992, vol 66/3, p1303-1311に記載されるように融合タンパク質の形態で製造され得る。ｇＨタンパク質およびそれから誘導されるポリペプチドまたはペプチドは、組換えウイルス、特に組換えアデノウイルスまたは組換えポックスウイルスによって発現され得る。ｇＨまたは誘導形態を発現するこれらの組換えベクターを調製するために、特に米国特許第６,１６２,６２０号、米国特許第５,８６６,３８３号もしくは米国特許第５,５５２,１４３号、またはＷＯ ９６３９４９１に記載されている方法が使用される。ｇＨタンパク質は、細胞培養物での連続継代により弱毒化されたＣＭＶの株、特にワクチン目的で既に試験されているＴｏｗｎｅ株から得ることもできる。

【００５９】

ワクチン抗原として、ｇＢ糖タンパク質またはｇＨ糖タンパク質（または該糖タンパク質の切断型）とＨＳＶ１またはＨＳＶ２の膜タンパク質（またはその切断型）との融合により得られるタンパク質を使用することもできる。一例として、ＥＰ ０７５９９９５に記載の融合タンパク質、特に、ＣＭＶ ｇＢ糖タンパク質の一部とＨＳＶ ｇＤ糖タンパク質の一部との融合により得られるｇＢ６８５*およびｇＢ６８５**が挙げられる。

【００６０】

ＣＭＶ抗原の性質に依存して、ワクチン組成物は、様々な形態であり得る：

抗原がタンパク質またはペプチドである場合、ワクチン組成物は、混合物、Ｏ／Ｗ型エマルションまたは熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの形態であり得る。それは、投与直前に調製される即時調合剤の剤形であってもよい。ワクチン組成物はまた、抗原とエマルションとを物理的に分ける「バイパス」シリンジのようなデバイス内にあってもよい。

ＣＭＶ抗原が組換えウイルス発現性ｇＢもしくはｇＨまたはｇＢもしくはｇＨから誘導されるペプチドの形態である場合、または、ＣＭＶの弱毒株の形態である場合、抗原と本発明のエマルションとは、通常、ワクチン組成物中で直接接触しない。抗原とエマルションは、「バイパス」シリンジのようなそれらを物理的に分けるデバイス内にあってよいが、それらは、同一の投与部位に同時に投与される。

【００６１】

本発明のエマルションはまた、ＭＨＣクラスＩＩ構成において提示される抗原に応答して、Ｔｈ１サイトカイン（ＩＬ２、ＩＦＮ－γなど）の生産を促進することにより、および／またはＴｈ２サイトカイン（ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ１０など）の生産を低下させることにより、特異的ＣＤ４＋ Ｔ細胞応答をＴｈ１プロフィールに向かわせる。この効果は、インビボ免疫化のために使用されたものに関連する抗原によるインビトロでの再刺激後に生産されるＩＦＮ－γおよびＩＬ５の量を測定し、ＩＦＮ－γ／ＩＬ５比を決定することによって評価される。この比が高いほど、ＣＤ４＋応答がＴｈ１タイプに向かう傾向が強くなる。ＣＤ４＋ Ｔ細胞応答プロフィールはまた、本発明のワクチン組成物でマウスを免疫化した後に得られる特異的Ｉｇ２ａ／特異的ＩｇＧ１の力価の比を測定することによって直接評価することもできる。

【００６２】

したがって、本発明のエマルションは、免疫不全または免疫系障害を示すある種の個体集団において観察されるＣＤ４＋ Ｔ細胞応答における不均衡を修正するために使用することができる。これらは、特に、細胞内微生物に由来する抗原、特にインフルエンザ抗原によるインビトロ刺激後にＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ２の生産の不全を示す高齢個体（Ouyang et al.(Mechanisms of ageing and development), 2000, vol. 121, 131-137）

である。

【００６３】

したがって、本発明の主題は、ＣＤ４＋ Ｔ細胞応答における不均衡を示す個体集団用のワクチン組成物の製造のための本発明のエマルションの使用である。

【００６４】

本発明の主題はまた、温度を上げることによりＷ／Ｏ型逆エマルションが得られる工程および温度を下げることにより該Ｗ／Ｏ型逆エマルションがＯ／Ｗ型エマルションに転換される工程を含む、本発明のＯ／Ｗ型エマルションの製造方法である。この転換は、得られたＷ／Ｏ型エマルションがこのエマルションの転相温度以下の温度に低下した場合に生じる。

【００６５】

当該方法の一の実施態様によると、Ｗ／Ｏ型エマルションは、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびＴＬＲ４アゴニストを含む水性相とスクアレンおよび非イオン性疎水性界面活性剤を含む油性相とを混合してＯ／Ｗ型エマルションを得る第一工程、および該Ｏ／Ｗ型エマルションを少なくともエマルションの転相温度である温度に加熱する第二工程を行うことにより得られる。

【００６６】

水性溶液（通常、緩衝溶液）、ＴＬＲ４アゴニスト（油性相にない場合）および非イオン性親水性界面活性剤を含む水性相がスクアレンおよび非イオン性疎水性界面活性剤を含む油性相に取り込まれるか、または、それとは逆に、油性相が水性相に取り込まれる。この取り込みは、機械的撹拌により行われる。未調整の不安定な粗いＯ／Ｗ型エマルションが得られる（プレエマルション）。このプレエマルションを機械的撹拌しながら、転相が得られるまで、すなわち、Ｗ／Ｏ型エマルションが得られるまで、加熱する。転相または遷移は、伝導度測定によって追跡することができる。１つのタイプのエマルションから別のものへの変化を反映する曲率変化が生じる温度が転相温度である。実際は、この温度は、非常に特異的な点というよりも温度範囲である；実際、エマルション全体が転相現象を受けるように、この温度は１度または２度変化することができると考えられる。エマルションがＷ／Ｏ型エマルションの形態である場合、電導度の急激な低下が見られる。加熱を止め、混合物を冷却する。冷却は、単純に温度を自然に周囲温度へ戻すことにより受動的に、または例えば該エマルションを氷浴中に浸すことにより能動的に行うことができる。温度低下の間に、Ｗ／Ｏ型エマルションは、転相温度で再度逆になって再度Ｏ／Ｗ型エマルションが得られるであろう。エマルションは、ワクチン抗原を含む溶液による希釈を待つ間、そのまま貯蔵することができる。それは熱可逆性であり、再度少なくとも転相温度と同じ温度にした場合に再度Ｗ／Ｏ型エマルションとなることを意味する。転相温度は、通常、４５～８０℃、典型的には、５０～６５℃である。かくして、エマルションの成分、特にＴＬＲ４アゴニストは、水性相の蒸発または成分の化学的分解を防止する適度な加熱を受ける。

【００６７】

別の実施態様によると、Ｗ／Ｏ型エマルションは、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびＴＬＲ４アゴニストを含む水性相ならびにスクアレンおよび非イオン性疎水性界面活性剤を含む油性相を別々に少なくともエマルションの転相温度と同じ温度で加熱し、次いで、混合物の温度を少なくとも転相温度と同じ温度に維持しながら水性相と油性相を混合することによりえられる。

【００６８】

この場合、水性相および油性相を別々に転相温度よりもわずかに高い温度に加熱した後、それらを混合してＷ／Ｏ型逆エマルションを得、次いで、サブミクロンのＯ／Ｗ型エマルションが得られるまで冷却する。これらの操作は、バッチ調製のために別々の容器中で行うことができる。

【００６９】

オンライン製造法を使用することもできる。この方法は、加熱条件下で別々に調製した

水性相および油性相の２つの相をサーモスタット付き静的ミキサーで混合し、次いで、該静的ミキサーの排出口に連結した冷蔵機能を備えた熱交換器でオンライン冷却し、次いで、適当な容器（フラスコまたは反応器）への本発明のエマルションの最終回収を行うことからなる。交差翼が導入される管の軸に対して傾斜している交差翼からなる混合要素の連続からなる静的ミキサーが成功裏に使用された。混合に必要なエネルギーは、流体を運搬するポンプにより供給され、混合は、パーツを動かさずに、混合物の構成成分の連続的な分離、置換および配合により混合要素を介して行われる。

【００７０】

オンライン製造法は、以下のように行われる：上記のように水性相および油性相を２つのフラスコまたは反応器中で別々に調製する。２つの相を撹拌しながら転相温度よりも僅かに高い温度に加熱する。次いで、本発明のエマルションの組成物が得られるように流速を調整した２つのポンプにより２つの相をサーモスタット付き静的ミキサー中に導入する。２つの相が静的ミキサーを通過する間にＷ／Ｏ型逆エマルションが得られる。次いで、この逆エマルションを、静的ミキサーの排出口で連結した冷蔵機能を備えた熱交換器を介するオンライン通過により冷却する。次いで、該冷蔵機能を備えた熱交換器を介してＷ／Ｏ型エマルションを逆転させてＯ／Ｗ型エマルションを得、フラスコまたは反応器に回収する。その特性は、バッチ法により得られるエマルションの特性と同一である。

【００７１】

上記方法の実施態様の代替法がある；ＴＬＲ４アゴニストの性質が親水性よりも疎水性である場合、水性相よりもむしろ油性相に導入される。ＴＬＲ４アゴニストは、油性相および水性相の混合が行われた後またはエマルションが加熱されてしまってＷ／Ｏ型エマルション形態である場合に導入することもできる。水性相はまた、アルジトールを含有することもできる。最後に、本発明のエマルションを調製する方法は、いくつかの連続した熱逆転サイクルを含むことができる。

【００７２】

本発明の主題は、少なくとも１つワクチン抗原を、化学構造が糖環を含まないＴＬＲ４アゴニストを含有するＯ／Ｗ型エマルションと混合する、ワクチン組成物の製造方法であって、ＴＬＲ４アゴニストを含有するＯ／Ｗ型エマルションが、温度を上げることによりエマルションがＷ／Ｏ型逆エマルションの形態で得られる工程および温度を下げることにより該Ｗ／Ｏ型エマルションがＯ／Ｗ型エマルションに転換される工程を含む転相方法に従って製造されることを特徴とする、方法でもある。

【００７３】

簡単な実施態様は、上記実施態様の１つに従って得られる熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルション中にワクチン抗原の水性溶液を混合することを含む。得られるワクチン組成物は、スクアレンの量がワクチン組成物の総重量の少なくとも５重量％である場合、Ｏ／Ｗ型エマルションの形態または熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの形態である。別法として、エマルションを調製する前に抗原を水性相または油性相と混合することができる。この方法で処理を行うことは、もちろん、これらが熱逆転法に適合する抗原であることを意味する。該抗原溶液は、無機塩および１種類またはそれ以上の緩衝液、ならびにワクチンに通常使用されるいずれもの他の化合物、例えば、安定剤、保存剤、または場合によっては他のアジュバントを含有することもできる。指標として、水性溶液中の抗原濃度は、一般に、１μｇ／ｍｌ～１ｍｇ／ｍｌである。

【００７４】

本発明の方法は、凍結乾燥工程を含むこともできる。まず、上記のようにではあるが好ましくは水性溶液として緩衝化溶液よりもむしろ水を選択して、濃縮液体エマルションを調製する。次いで、このエマルションを、アルジトール、糖およびアルキルポリグリコシドを含む凍結乾燥基質で希釈する。通常使用される凍結乾燥基質は、マンニトール、シュークロースおよびドデシルマルトシドを含む。次いで、希釈したエマルションを複数の試料（たとえば、０．５ｍｌ）に分け、以下のように行うことができる凍結乾燥サイクルを受けさせる：

＋４℃での試料の添加、
－４５℃の設定温度で約２時間の冷凍、
０℃の設定温度で１４～１９時間の一次乾燥、
＋２５℃の設定温度で３時間３０分の二次乾燥。
得られた凍結乾燥品は、一般に、１種類またはそれ以上のワクチン抗原と混合するまで約＋４℃の温度で保存される。かくして、本発明のワクチン組成物は、凍結乾燥エマルションを抗原の水性溶液に溶解することにより調製することができ、次いで、そのまま（すなわち、液体状態で）保存することができるか、または、抗原の性質が許せば凍結乾燥品の形態で保存するためにさらに凍結乾燥サイクルを受けさせることができる。別法として、ワクチン抗原ならびにアルジトール、糖およびアルキルポリグリコシドを含む水性溶液で該濃縮エマルションを直接希釈し、次いで、得られた組成物を凍結乾燥させることもできる。当該方法を行う方法は、もちろん、抗原が凍結乾燥プロセスに適合することを意味する。

【００７５】

以下の実施例は、本発明の様々な実施態様を非限定的に例示する。

【実施例】

【００７６】

実施例Ｉ： スクアレンを３２.４％（ｗ／ｗ）含有する濃縮熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの製造

４０℃で機械的撹拌しながらリン酸緩衝液中１８％（ｗ／ｗ）のマンニトールの溶液を調製した。この溶液０.４５４ｇにＥｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.０９３ｇ）を添加し、４０℃で５分間機械的撹拌しながら均質化した。

５０ｍＭ Ｔｒｉｓ緩衝液中に１０００μｇ／ｍｌの化合物ＥＲ８０４０５７を含有する貯蔵懸濁液を調製した。Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１／マンニトール混合物にＥＲ８０４０５７の貯蔵懸濁液３９０μｌを添加した。

別の容器中で、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.０７３ｇをスクアレン０.４８４ｇと混合し、該混合物を３０℃で５分間機械的撹拌により均質化した。

次いで、ＥＲ８０４０５７を含有する水性相の内容物を、約３０℃で撹拌しながら、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ／スクアレン混合物を含有する油性相中に取り込んだ。

得られた粗エマルションを機械的撹拌しながら温度が６０℃に達するまで加熱した。この温度は、この組成物の転相温度に相当する。この時、エマルションは逆エマルション（Ｗ／Ｏ型エマルション）の形態である。

次いで、加熱を止めたが、撹拌は、温度が研究室の周囲温度（約２０℃）に達するまで維持した。エマルションは、Ｏ／Ｗ型エマルションの形態に戻る。

かくして、均質な熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションが得られた。これは、油滴の９０容量％以上が≦２００ｎｍの大きさであり、重量による組成は以下のとおりである：

スクアレン ３２.４％、
セテアレス－１２（Ｅｍｕｌｇｉｎ Ｂ１） ６.２％、
モノオレイン酸ソルビタン（Ｄｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯ） ４.９％、
マンニトール ５.５％
ＥＲ８０４０５７ ０.０２６％。

したがって、このアジュバントエマルション中のスクアレンの量は、エマルションの総重量の３２.４％である。

【００７７】

別の形態では、リン酸緩衝液５０.５ｇ、マンニトール６ｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（６.１８ｇ）およびＥＲ８０４０５７（０.０２６ｇ）を含有する混合物をビーカー中にて調製した。この混合物を約４０℃で撹拌し続けた。別の容器中にてスクアレン３２.５ｇとＤｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯ ４.８ｇを、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯが完全に溶解してしまうまで撹拌しながら混合することにより油性相を調製した。これらの均質な相を得た後、水性相の油性相への取り込み、および温度を上げる工程、次いで、温度を下げる工程を

上記のとおり行った。均質な熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションを得た。これは油滴の９０容量％以上が≦２００ｎｍの大きさであり、重量による組成は以下のとおりである：

スクアレン　３２.５％、
セテアレス－１２（Ｅｕｍｕｌｇｉｎ Ｂ１）　６.２％、
モノオレイン酸ソルビタン（Ｄｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯ）　４.８％、
マンニトール　６％、
ＥＲ８０４０５７　０.０２６％、
ＰＢＳ　５０.５％。

【００７８】

該方法の別の形態では、ＰＢＳ緩衝液の代わりに、０.８３ｍＭのクエン酸・一水和物と９.１４ｍＭのクエン酸ナトリウムとを混合することにより調製したクエン酸緩衝液（ｐＨ６.０４）を使用した。

【００７９】

この濃縮スクアレンエマルションを「貯蔵」エマルションとして使用し、これをリン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液またはクエン酸緩衝液で希釈することにより希熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションを得、次いで、濾過滅菌した（実施例ＩＩを参照）。次いで、これらの希Ｏ／Ｗ型エマルションを１種類またはそれ以上のワクチン抗原と混合する（実施例ＩＩＩ、ＩＶおよびＶを参照）。

【００８０】

実施例ＩＩ：　スクアレンを５％（ｗ／ｗ）含有する希熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの安定性試験

実施例Ｉの濃縮エマルションを９.６ｍＭのリン酸緩衝液（ｐＨ＝７.４）で希釈して、希エマルションを得た。これはスクアレンの量がエマルションの総重量の５％である。５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７と称されるこの希エマルションの組成は以下のとおりであった：

スクアレン：５０ｍｇ／ｍｌ
セテアレス－１２（Ｅｍｕｌｇｉｎ Ｂ１）：９.５ｍｇ／ｍｌ
モノオレイン酸ソルビタン（Ｄｅｈｙｍｕｌｓ ＳＭＯ）：７.４ｍｇ／ｍｌ
マンニトール：９ｍｇ／ｍｌ
ＥＲ８０４０５７：４０μｇ／ｍｌ

＋４℃の温度で６ヶ月間貯蔵した後のこの熱可逆性エマルションの安定性を、エマルション中のＥＲ８０４０５７含有量およびエマルションのサイズ分布を確認することにより評価した。ＥＲ８０４０５７を評価するために、エマルションからのＥＲ８０４０５７の選択的抽出を行い、次いで、ダイオードアレイ検出器（ＵＶ検出）と連結している高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分析した。５～２５μｇ／ｍｌのＥＲ８０４０５７を含有する標準レンジを使用して、確認されるべきエマルションのＥＲ８０４０５７含有量を決定した。抽出収量のバリエーションを補償するために、化学構造がＥＲ８０４０５７のものと非常に類似する内部標準の一定量をアッセイされるべき各試料（標準レンジの試料を含む）に導入した。この内部標準はＥＲ８０３０２２と称される化学分子である。

標準レンジは、ＥＲ８０４０５７を含有しなかったこと以外は５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルション（実施例ＩＩを参照）と同様に調製した同一組成を有する熱可逆性エマルションから調製し（５％ＰＩＴエマルション）、それにメタノール１容量当たり２容量のクロロホルムを含有する混合物（ＣＭ２：１混合物）１ｍｌ当たり０.１ｍｇのＥＲ８０４０５７の貯蔵溶液から取り出した様々な量のＥＲ８０４０５７、およびＣＭ２：１混合物１ｍｌ当たり０.１ｍｇの内部標準の貯蔵溶液から取り出した一定量の内部標準（１０μｇ）を添加し、必要に応じてそれを注射製剤用の水で希釈した。

【００８１】

５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションのアリコートを取り出し、これに内部標準１０μｇを添加し、注射製剤用水で希釈することによって、５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５

７のアッセイ試料を調製した。

【００８２】

標準レンジの試料または５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７の試料からのＥＲ８０４０５７の抽出を以下のように行った：試料をＣＭ２：１で可溶化した。得られた二相系は、主としてＥＲ８０４０５７を含有するクロロホルム相およびエマルションの他の化合物を含有する水性相からなっている。クロロホルム相を回収し、窒素流下にて高温条件下で蒸発させる。得られた乾燥抽出物を取り、再度ＣＭ２：１混合物に可溶化した。該混合物をＣＭ２：１混合物で予備平衡化した陰イオン交換カートリッジに負荷した。負に荷電されたＥＲ８０４０５７および内部標準を選択的に保持し、一方、荷電されていないエマルションの他の成分を除去した。１ＭのＮａＣｌの１容量当たり２容量のクロロホルムおよび３容量のメタノールを含有する混合物によりＥＲ８０４０５７および内部標準を溶離した。次いで、溶出液を窒素流下にて高温条件下で乾燥させた。最後に、水およびＣＭ２：１を用いて最終抽出を行って、残留する塩を除去し、クロロホルム相中のＥＲ８０４０５７および内部標準を回収し、最後に窒素流下にて高温条件下で蒸発させた。各試料からの乾燥抽出物をＨＰＬＣにより分析するまで－２０℃で保存した。

【００８３】

各試料の乾燥抽出物をＣＭ４：１（５０μｌ）に溶解し、次いで、メタノールで１／２に希釈し、次いで、３０％アセトニトリル－注射製剤用水の混合物で１／１０に希釈した。希釈液２０μｌを、相Ａ（注射製剤用水／２％のH_3PO_4を含有するエタノール（５０／５０））８０％および相Ｂ（２％のH_3PO_4を含有するエタノール）２０％からなる移動相で予備平衡化したＷａｔｅｒｓ ＸＴｅｒｒａ™ ＲＰ８カラムを含む液体クロマトグラフィー装置（Ｍｅｒｃｋ Ｈｉｔａｃｈｉ ＨＰＬＣ、Ｌａｃｈｒｏｍシリーズ７０００）中に注入した。２％のH_3PO_4を含有するエタノールの勾配液を使用してＥＲ８０４０５７および内部標準を溶離した。ＨＰＬＣの排出口で溶出液がダイオードアレイ検出器に到達し、該分子を２１５ｎｍの波長で検出した。得られたクロマトグラムについて、２つのピーク（分析物および参照試料）の表面積を積分し、相互関係を示した。試料の調製に関するバリエーションを修正するために、ＥＲ８０４０５７（定量分子）およびＥＲ８０３０２２（内部標準）カップルに対応するピークの表面積の比とＥＲ８０４０５７およびＥＲ８０３０２２（内部標準）に対応する濃度の比との間で標準曲線を確立した。該曲線を確立した後、ＥＲ８０４０５７／内部標準ピークの表面積の比を測定し、標準曲線と比較することにより、５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルション中に存在するＥＲ８０４０５７の量を決定した。

【００８４】

【表１】

	＋４℃で１ヶ月	＋４℃で３ヶ月	＋４℃で６ヶ月
ＥＲ８０４０５７ （理論的濃度４０μｇ／ｍｌ）	３８μｇ／ｍｌ	３７μｇ／ｍｌ	４２μｇ／ｍｌ

【００８５】

上記表に記載した結果は、エマルションを＋４℃で６ヶ月間保存した後、ＥＲ８０４０５７がその構造完全性を保存することおよび５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルション中のその濃度が実質的に変わらないことを示している。

【００８６】

エマルションを１／１００に希釈した後、以下のパラメーターを使用してＭａｓｔｅｒｓｉｚｅｒ ２０００を用いてサイズ分布分析を行った：ＩＲ粒子＝１．４９５；ＩＲ培地＝１．３３２；吸収値＝０；不明瞭さの下限＝４％；不明瞭さの上限＝７％；「汎用」分析モデル。各サイズ分布分析について、以下のパラメーターを評価した：ｄ１０、ｄ５０およびｄ９０、これらは、それぞれ、油滴の１０容量％、５０容量％および９０容量％が見られる平均粒径の値である。

【００８７】
【表２】

	Ｔ＝０	Ｔ＝３ヶ月	Ｔ＝６ヶ月
ｄ１０	７１ｎｍ	７０ｎｍ	７０ｎｍ
ｄ５０	１０３ｎｍ	１００ｎｍ	１０１ｎｍ
ｄ９０	１５５ｎｍ	１５２ｎｍ	１５３ｎｍ

【００８８】
これらの結果は、エマルションのサイズ分布が少なくとも６ヶ月の期間にわたって＋４℃で安定であることを示している。
【００８９】
実施例ＩＩＩ： 本発明のＯ／Ｗ型エマルションから調製した、サイトメガロウイルス感染症に対するワクチン組成物
ワクチン抗原としてＣＭＶのｇＢ糖タンパク質から誘導される組換えタンパク質を含むワクチン組成物を調製した。この組換えタンパク質は、修飾ｇＢ遺伝子を含有するｐＰＲｇＢ２７ｃｌｖ４と称されるプラスミドを形質移入された組換えＣＨＯ系により生産された。ＣＨＯ系によるこの組換えタンパク質の生産を促進するために、ｇＢ遺伝子（その配列は米国特許第５,８３４,３０７号に記載されている）を、バリン６７７からアルギニン７５２までの間のアミノ酸配列に対応するｇＢタンパク質の膜貫通領域をコードする遺伝子の一部を欠失させ、開裂部位で３つの点変異を導入することにより予め修飾した。ｇＢｄＴＭと称されるＣＨＯ系により生産されるタンパク質は、開裂部位および膜貫通領域を欠いている切断型ｇＢタンパク質に対応する。
【００９０】
プラスミドｐＰＲｇＢ２７ｃｌｖ４の構築、および組換えＣＨＯ系による切断型ｇＢタンパク質（ｇＢｄＴＭ）の生産は、米国特許第６,１００,０６４号に記載されている。次いで、培養培地中で生産されたｇＢｄＴＭタンパク質を、Rasmussen L et al., J. Virol. (1985) 55: 274-280に記載されているモノクローナル抗体１５Ｄ８を使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製タンパク質を、リン酸緩衝液中０.９７５ｍｇ／ｍｌのｇＢｄＴＭを含有する貯蔵溶液の形態で貯蔵した。
【００９１】
Ｏ／Ｗ型エマルションの種々の組成物または水酸化アルミニウムの懸濁液で処方されたｇＢｄＴＭの免疫賦活性組成物を調製した。
組成物Ｎｏ.１は、ｐＨ６のクエン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇを含有した（ｇＢグループ）。
組成物Ｎｏ.２は、ｐＨ６のクエン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇ、スクアレン１.０７５ｍｇ、トリオレイン酸ソルビタン（Ｍｏｎｔａｎｅ™ ＶＧ ８５）０.１３３ｍｇおよびＴｗｅｅｎ™ ８０（０.１２５ｍｇ）を含有した（ｇＢ＋Ｏ／Ｗ型エマルショングループ）。この組成物は、ｇＢの溶液とマイクロフルイダイゼーションによって得られた従来技術のＯ／Ｗ型エマルションとを少しずつ混合することにより得られた。
組成物Ｎｏ.３は、リン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇおよび水酸化アルミニウム６０μｇを含有した（ｇＢ＋ＡＬグループ）。
組成物Ｎｏ.４は、ｐＨ７.４のＰＢＳ緩衝液５０μ中にｇＢ ２μｇ、スクアレン１.２５ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.１８７ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.２３７ｍｇ）およびマンニトール０.２２５ｍｇを含有した。この組成物は、ｇＢの溶液とスクアレンを５％含有する熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションとを少しずつ混合することにより得られた（ｇＢ＋ＰＩＴグループ）。この組成物を調製するために使用した熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションは、水性相がＥＲ８０４０５７を全く含有しないこと以外は実施例Ｉに記載した方法と同様の方法を使用して調製したスクアレン３２.５％（ｗ／ｗ）を含有する濃縮熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションの希釈により得られた。

組成物Ｎｏ.５は、ｐＨ６のクエン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇおよびＥＲ８０４０５７（１μｇ）を含有した（ｇＢ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。

組成物Ｎｏ.６は、ｐＨ６のクエン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇ、スクアレン１.２５ｍｇ、Ｍｏｎｔａｎｅ™ ＶＧ ８５（０.１４５ｍｇ）、Ｔｗｅｅｎ™ ８０（０.１４７ｍｇ）およびＥＲ８０４０５７（１μｇ）を含有した（ｇＢ＋Ｏ／Ｗ型エマルション＋ＥＲ８０４０５７グループ）。この組成物は、ｇＢの溶液と、ＥＲ８０４０５７を添加したマイクロフルイダイゼーションにより得られた従来技術のＯ／Ｗ型エマルションとを少しずつ混合することにより得られた。

組成物Ｎｏ.７は、リン酸緩衝液５０μ中にｇＢｄＴＭ ２μｇ、ＥＲ８０４０５７（１μｇ）および水酸化アルミニウム６０μｇを含有した（ｇＢ＋Ａｌ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。

組成物Ｎｏ.８は、ｐＨ７.４のＰＢＳ緩衝液５０μ中にｇＢ ２μｇ、スクアレン１.２５ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.１８９ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.２４０ｍｇ）、マンニトール０.２１１ｍｇおよびＥＲ８０４０５７（１μｇ）を含有した。この組成物は、ｇＢの溶液と、実施例Ｉの貯蔵エマルションの希釈により得られたスクアレンの５％ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションとを少しずつ混合することにより得られた（ｇＢ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。

【００９２】

８週齢雌性非近交系ＯＦ１マウス１０匹ずつの８つのグループをＤ０およびＤ２１の日に上記組成物で皮下免疫化した（各グループのマウスには同一の組成物を２回注射した）。

Ｄ２０およびＤ３４に後眼窩から血液試料を採取し、ｇＢｄＴＭ特異的ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａ抗体濃度を決定するために使用した。これらのアッセイは、ｐＨ９.６の０.０５Ｍの炭酸緩衝液中ｇＢｄＴＭ１００ｎｇ（１００μｌ）でＤｙｎｅｘ９６ウェルマイクロプレートのウェルを被覆することにより、＋４℃で一夜ＥＬＩＳＡにより行った。

中和抗体を測定するために、Gonczol E. et al. in J. Virological Methods, 14: 37-41 (1986)に記載されたプロトコールを使用した。

１０％ウシ胎仔血清を含有するＭＥＭ培地中で培養した２８～３８継代のＭＲＣ５細胞をマイクロ中和分析のために使用した。感染株として、約2×10^{6}ＰＦＵ／ｍｌの力価を有する、精製され、ＭＲＣ５細胞上で増殖されるＴｏｗｎｅ ＣＭＶ株（Wistar Institute、米国フィラデルフィア）を使用した。Virion Ltd Institute（スイス国）からのマウスの血清から得られた補体源も使用した。１：１２８で力価を有するヒト血清の混合物を陽性対照として使用した。これは、各マイクロ中和アッセイに含まれる。

被験血清を５６℃で３０分間加熱することにより不活性化した。平底９６ウェル培養プレート中にて各不活化血清の１５μｌアリコートに培養培地（ＭＥＭ＋１０％ウシ胎仔血清）１０５μｌを添加した（１／８希釈）。次いで、段階２倍希釈液を調製した。同様の方法で対照血清を試験した。各ウェルに３０００ＰＦＵを含有するウイルス懸濁液６０μｌおよびマウス補体５μｌを添加した。CO_2下にて３７℃で１時間インキュベートした後、各ウェルに培養培地１５０μｌ中３～4×10^{4}個のＭＲＣ５細胞を添加した。該マイクロ培養液を４日間培養した。血清を全く含有していなかったウェル中で、ウイルスの細胞変性活性は１００％であった。他方、中和血清を含有していたウェル中で、ウイルスの細胞変性活性の阻害が観察された。血清の中和抗体力価は、ウイルスの細胞変性活性を９０％以上阻害する希釈の逆数に対応する。

【００９３】

各グループのマウスについて得られた結果を下記の表に示す：

【表３】

マウスのグループ	D20のIgG1	D20のIgG2a	D34のIgG1	D34のIgG2a	D34のIgG1/IgG2a比
gBグループ	2.47*	2.09	3.80	2.94	137
gB+O/W型エマルショングループ	4.06	2.98	5.49	4.18	143
gB+ALグループ	3.06	1.85	4.90	3.33	357
gB+PITグループ	4.61	3.91	5.61	4.85	14
gB+ER804057グループ	3.09	3.12	4.43	4.16	6
gB+PIT+ER804057グループ	4.78	4.58	5.83	5.74	3

＊：血清の希釈液の平均力価（log_{10}で表される）

【００９４】

「ｇＢ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７」グループのマウスにおいて得られた特異的ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａ力価は、「ｇＢ＋ＡＬ」グループまたは「ｇＢ＋Ｏ／Ｗ型エマルション」グループのマウスにおいて得られたものより有意に高いので、これらの結果は、ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションが他のアジュバントよりも大きい免疫賦活能を有することを示している。本発明のエマルションの免疫賦活能は、熱可逆性エマルション（ＰＩＴエマルション）だけまたはＴＬＡ４アゴニストだけによるものではなく、２つの生成物の組合せによるものである。「ｇＢ＋ＰＩＴ」グループおよび「ｇＢ＋ＥＲ８０４０５７」グループにおいて得られた特異的ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａ力価は、実際、「ｇＢ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７」グループにおいて得られたものよりも有意に低い。

【００９５】

中和抗体生産を表にまとめる。

【表４】

マウスのグループ	平均中和抗体力価
ｇＢグループ	１６**
ｇＢ＋Ｏ／Ｗ型エマルショングループ	３２
ｇＢ＋ＡＬグループ	３２
ｇＢ＋ＰＩＴグループ	４８
ｇＢ＋ＥＲ８０４０５７グループ	１６
ｇＢ＋Ｏ／Ｗ型エマルション＋ＥＲ８０４０５７グループ	３２
ｇＢ＋ＡＬ＋ＥＲ８０４０５７グループ	３２
ｇＢ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７グループ	１２８

**：ウイルスの細胞変性効果を９０％以上阻害する血清希釈液の平均の逆数

【００９６】

これらの結果は、ＣＭＶ外被抗原と本発明のＴＬＲ４アゴニストを含有する熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションとの混合により得られる免疫賦活性組成物が、マウスにおいて最も高い中和抗体力価を誘発するものであることを示している。ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションは、中和抗体の生産を刺激する能力が、試験した他のアジュバント組成物よりも高い。ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションは、これまでＣＭＶタンパク質の補助のための基準アジュバントであると考えられてきたＭＦ５９エマルションと同一の成分を含有する従来技術のスクアレンベースＯ／Ｗ型エマルションよりも有効である（中和抗体生産を刺激する能力の観点で）ことが分かる。従来技術のＯ／Ｗ型エマルションへのＴＬＲ４アゴニストの添加はこのエマルションの効果を高めない（中和抗体力価は同じままである）が、熱可逆性エマルション（ＰＩＴ）の効果は、ＴＬＲ４アゴニストを含有する場合には増加する（中和抗体力価が増大する）ことも示される。

【００９７】
実施例ＩＶ： 本発明のＯ／W型エマルションから調製されたインフルエンザに対するワクチン組成物
Ｏ／W型エマルションの種々の組成物または水酸化アルミニウムの懸濁液で処方された、２００４キャンペーンの３種類のワクチン株（Ａ／Ｎｅｗ Ｃａｌｅｄｏｎｉａ（Ｈ１Ｎ１）株、Ａ／Ｗｙｏｍｉｎｇ（Ｈ３Ｎ２）株およびＢ／Ｊｉａｎｇｓｕ株）を含む抗インフルエンザワクチン組成物から免疫賦活性組成物を調製した。
組成物Ｎｏ．１は、ＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０．３μｇを含有した（ＨＡ ０．３μｇグループ）。
組成物Ｎｏ．２は、ＰＢＳ ３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）６．３μｇを含有した（ＨＡ ６．３μｇグループ）。
組成物Ｎｏ．３は、ＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０．３μｇ、スクアレン０．６５ｍｇ、トリオレイン酸ソルビタン（Ｓｐａｎ™ ８５）０．０７５ｍｇおよびＴｗｅｅｎ™ ８０（０．０７５ｍｇ）を含有した（ＨＡ ０．３μｇ＋Ｏ／W型エマルショングループ）。この組成物は、抗インフルエンザワクチン組成物をマイクロフルイダイゼーションにより得られた従来技術のＯ／W型エマルションと混合することにより得られた。
組成物Ｎｏ．４は、ｐＨ７．４のＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０．３μｇ、スクアレン０．７５ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０．１１ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０．１４３ｍｇ）およびマンニトール０．１３８ｍｇおよびＥＲ８０４０５７（０．６μｇ）を含有した（ＨＡ ０．３μｇ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。この組成物は、抗インフルエンザワクチン組成物を、予めＰＢＳ緩衝液で希釈した実施例１に記載の熱可逆性エマルションと混合することにより得られた。
【００９８】
８週齢雌性ＢＡＬＢ／ｃマウス８匹ずつの４つのグループをＤ０に上記免疫賦活性組成物の１つの３０μｌの皮内投与（耳の内面）により免疫化した。
Ｄ２１に後眼窩から血液試料を採取し、各グループの免疫化マウスにおいて得られた各ウイルス株に対して特異的な中和抗体（赤血球凝集阻害性（ＨＡＩ）抗体）の力価を決定するために使用した。このアッセイの原理は、インフルエンザウイルスの赤血球凝集能に基づくが、一方、該ウイルスのＨＡに対して特異的な中和抗体を含有する血清は、該ウイルスの「赤血球凝集」活性を阻害する。まず、Sigmaによりイー提供されるＲＤＥ酵素（受容体破壊酵素）で血清を処理し、次いで、それをニワトリ赤血球の１０％溶液と接触させることにより、血清中に含まれる非特異的阻害物質を除去した。非特異的阻害物質を取り除き、１／１０に希釈した血清に対応する上清を得た。次いで、リン酸緩衝液での上清の段階２倍希釈液を調製し、次いで、各希釈液５０μｌをＶ底マイクロプレートのウェルに入れた。４赤血球凝集単位（４ＨＡＵ）で滴定した浄化尿膜腔液由来のウイルス懸濁液５０μｌを各ウェルに添加した。該プレートを実験室温度で１時間インキュベートした後、各ウェルにニワトリまたはシチメンチョウ赤血球の溶液５０μｌを添加した。該プレートを＋４℃で１時間放置した後、アッセイを読み取った。赤血球凝集阻害の存在は、マイクロウェルの底の赤いスポットの存在により示され、一方、赤血球凝集の存在は、マイクロウェル中のピンク色がかったハローの存在により示された。ＨＡＩ抗体力価は、赤血球凝集がマイクロウェル中で観察されない最終希釈度の逆数によって表される。
【００９９】
得られた結果を下記の表に示す：

【表５】

マウスのグループ	A/New Caledonia (H1N1)に対するＨＡＩ	A/Wyoming (H3N2)に対するＨＡＩ	B/Jiangsuに対するＨＡＩ
ＨＡ ０.３μｇ	２６***	１７４	８
ＨＡ ６.３μｇ	２４７	９０７	７３
ＨＡ ０.３μｇ＋Ｏ／Ｗ型エマルション	１３５	９８７	５７
ＨＡ ０.３μｇ＋ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７	２９０	１５２２	９８

***：各グループのマウスの８つの血清について得られたＨＡＩの平均値

【０１００】

これらの結果は、インフルエンザワクチンを、ＴＬＲ４アゴニストを含有する熱可逆性Ｏ／Ｗ型エマルションと混合することにより得られたワクチン組成物が他のワクチン組成物と比べて、被験ワクチン株と関係のないマウスにおいて最も高い中和抗体力価を誘発することを示している。ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションは、ＭＦ５９と類似の組成の従来技術のＯ／Ｗ型エマルションよりもわずかに有効である（中和抗体生産を刺激する能力の観点で）ことが分かる。ＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションと混合した赤血球凝集素０.３μｇを用いて得られた結果が２０倍多い量の赤血球凝集素を用いて得られたものよりも優れているので、このエマルションの利点は、抗原の量が非常に減少し得ることにもある。

【０１０１】

別のアッセイでは、２００４キャンペーンからの同一ワクチンから調製した種々の免疫賦活性組成物を用いて免疫化したマウスのグループにおいて経時的な赤血球凝集素阻害抗体力価の変化を追跡した。

【０１０２】

組成物Ｎｏ.１は、ＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０.３μｇを含有した（ＨＡ ０.３μｇグループ）。

組成物Ｎｏ.２は、ＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）６.３μｇを含有した（ＨＡ ６.３μｇグループ）。

組成物Ｎｏ.３は、水性緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０.３μｇおよびＥＲ８０４０５７（０.６μｇ）を含有した（ＨＡ ０.３μｇ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。

組成物Ｎｏ.４は、ｐＨ７.４のＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０.３μｇ、スクアレン０.３０ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.０４４ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.０５７ｍｇ）およびマンニトール０.０５５ｍｇを含有した（ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴグループ）。

組成物Ｎｏ.５は、ｐＨ７.４のＰＢＳ緩衝液３０μｌ中に各ウイルス株の赤血球凝集素（ＨＡ）０.３μｇ、スクアレン０.３０ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.０４４ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.０５７ｍｇ）、マンニトール０.０５５ｍｇおよびＥＲ８０４０５７（０.６μｇ）を含有した（ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７グループ）。

【０１０３】

８週齢雌性ＢＡＬＢ／ｃマウス５匹ずつの５つのグループをＤ０に上記免疫賦活性組成物の１つの３０μｌの皮内投与（耳の内面）により免疫化した。

Ｄ２３、Ｄ５１およびＤ７９に後眼窩から血液試料を採取し、各グループの免疫化マウスにおいて得られたＨ１Ｎ１株に対して特異的な中和抗体（赤血球凝集阻害（ＨＡＩ）抗体）の力価を決定するために使用した。得られた結果を下記の表に示す。

【０１０４】
【表６】

マウスのグループ	Ｄ２３	Ｄ５１	Ｄ７９
ＨＡ ０.３μｇグループ	３５***	５３	８０
ＨＡ ６.３μｇグループ	２３５	２４３	２７９
ＨＡ ０.３μｇ＋ＥＲ８０４０５７グループ	６５	２１１	２４３
ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴグループ	２２６	５５７	７３５
ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴ＋ＥＲ８０４０５７グループ	２２６	９７０	８４４

***：各グループのマウスの５つの血清について得られたＨＡＩ力価の平均値。

【０１０５】
インフルエンザウイルス赤血球凝集阻害抗体（防御抗体）を生産する能力の観点でのＰＩＴ－ＥＲ８０４０５７エマルションの有効性は、エマルションおよびＴＬＲ４アゴニストの合わせた作用の結果である；ＰＩＴエマルション単独またはＥＲ８０４０５７単独はあまり有効ではなかった。
【０１０６】
実施例Ｖ： インフルエンザウイルスに感作された若年または高齢マウスの集団において試験した、本発明のエマルションから調製したインフルエンザに対するワクチン組成物
インフルエンザウイルスと既に接触したことがあるためまたはインフルエンザワクチンで既にワクチン接種されたためにインフルエンザウイルスに既に感作されている個体に投与するインフルエンザに対するワクチンの場合の本発明のエマルションの有効性を試験した。
この種の評価を行うために、Potter et al. (Vaccine, 2003, 21:940-945）に従って、インフルエンザに対してナイーブではない動物モデルとして三価ワクチンで筋肉内（ＩＭ）予備免疫化したマウスを使用した。
８～１０週齢のＣ５７Ｂｌ／６マウス１０匹ずつの５つのグループにＡ／Ｎｅｗ Ｃａｌｅｄｏｎｉａ／２０／９９（Ｈ１Ｎ１）株、Ａ／Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ／５５／０４（Ｈ３Ｎ２）株およびＢ／Ｍａｌａｙｓｉａ／２５０６／０４株の各々のＨＡ１.５μｇを含有する三価ワクチンをＩＭ注射した。
Ｄ２８に、ＰＢＳ緩衝液を注射した１つグループ（ＰＢＳグループ）を除いて、残りの全てのグループのマウスに、一次免疫化に使用したものとは異なる三価ワクチン（Ａ／Ｎｅｗ Ｃａｌｅｄｏｎｉａ／２０／９９（Ｈ１Ｎ１）、Ａ／Ｗｅｌｌｉｎｇｔｏｎ／０１／０４（Ｈ３Ｎ２）およびＢ／Ｊｉａｎｇｓｕ／１０／０３）を含有する種々のワクチン組成物３０μｌを皮内投与した。
【０１０７】
１つのグループには、ＰＢＳ緩衝液中に各株のＨＡ ０.３μｇを含有する組成物を投与した（ＨＡ ０.３μｇグループ）。
別のグループには、ＰＢＳ緩衝液中に各株のＨＡ ６.３μｇを含有する組成物を投与した（ＨＡ ６.３μｇグループ）。
別のグループには、ＰＢＳ緩衝液中にスクアレン０.３ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ ＳＭＯ ０.０４４ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.０５７ｍｇ）およびマンニトール０.０５５ｍｇを含有するスクアレン１％のＯ／Ｗ型エマルション中の、ＰＢＳ緩衝液中に各株のＨＡ ０.３μｇを含有する組成物を投与した。１％スクアレンを含有するこの組成物は、インフルエンザワクチンを、水性相がＥＲ８０４０５７を含有しなかったこと以外は実施例Ｉに記載した方法と同様の方法に従って調製した濃縮熱可逆性貯蔵溶液を希釈することにより得られたＯ／Ｗ型エマルションと混合することにより調製した（ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴグループ）。
最後のグループには、ＰＢＳ緩衝液中にスクアレン０.３ｍｇ、Ｄｅｈｙｍｕｌｓ™ Ｓ

ＭＯ ０.４４ｍｇ、Ｅｕｍｕｌｇｉｎ™ Ｂ１（０.０５７ｍｇ）およびマンニトール０.０５５ｍｇを含有するスクアレン１％のＯ／Ｗ型エマルションおよびＥＲ８０４０５７（０.６μｇ）中の、ＰＢＳ緩衝液中に各株のＨＡ ０.３μｇを含有する組成物を投与した。１％のスクアレンおよびＥＲ８０４０５７（０.６μｇ）を含有するこの組成物は、インフルエンザワクチンを、実施例Ｉに記載した方法と同様の方法に従って調製した濃縮熱可逆性貯蔵溶液を希釈することにより得られたＯ／Ｗ型エマルションと混合することにより調製された（ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７グループ）。

【０１０８】

Ｄ５０に、血液試料の回収および脾臓試料の採取のために、マウスを安楽死により屠殺した。

各血液試料に対してＡ／Ｎｅｗ Ｃａｌｄｅｄｏｎｉａ／２０／９９（Ｈ１Ｎ１）株、Ａ／Ｗｅｌｌｉｎｇｔｏｎ／０１／０４（Ｈ３Ｎ２）株およびＢ／Ｊｉａｎｇｓｕ／１０／０３株に関するＨＡＩのアッセイを行った。得られた結果を下記の表に示す：

【表７】

マウスのグループ	A/New Caledonia（H1N1）に対するＨＡＩ	A/Wellington (H3N2）に対するＨＡＩ	B/Jiangsuに対するＨＡＩ
ＰＢＳグループ	５２*	４８	１３
ＨＡ ０.３μｇグループ	９５	２２６	５７
ＨＡ ６.３μｇグループ	１９０	６４０	２２６
ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴグループ	４３１	６４０	２９０
ＨＡ ０.３μｇ＋１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７グループ	６９８	２３４８	６４０

*は各グループのマウスからの１０個の血清について得られたＨＡＩ力価の平均値を表す。

【０１０９】

これらの結果は、低用量のスクアレン（１％）およびＴＬＲ４アゴニストを含有する「ＨＡ＋１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７」ワクチン組成物（ＥＲ８０４０５７（０.６μｇ）を含有する）で免疫化したマウスのグループにおける平均ＨＡＩ力価が等量のＨＡのアジュバント未処理インフルエンザワクチン（ＨＡ ０.３μｇグループ）または２０倍高い量のＨＡのアジュバント未処理インフルエンザワクチン（ＨＡ ６.３μｇグループ）でマウスを免疫化した後に得られた力価よりも有意に高いことを示している。各株のインフルエンザ抗原の量を２０のファクター減少させることができ、同時に３種類のウイルス株に関して高い防御抗体力価が得られるので、これらの結果は、インフルエンザウイルスに既に感作されている集団内であっても、１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７エマルションの利点を示している。

【０１１０】

特異的刺激の後に脾細胞により生産されるインターフェロン－γおよびＩＬ５をアッセイするためにＥＬＩＳＰＯＴ技法およびＣＢＡ（Ｃｙｔｏｍｅｔｒｉｃ Ｂｅａｄ Ａｒｒａｙ）技法を使用して各脾臓試料について特異的な細胞性免疫応答を分析した。

【０１１１】

ＥＬＩＳＰＯＴ技法に関しては、ラット抗マウスＩＦＮγ抗体（Pharmingen ref：５５１２１６）またはラット抗マウスＩＬ５抗体（Pharmingen ref：５５４３９３）で予備感作されたニトロセルロースマイクロプレートのウェルに培養培地（ＲＰＭＩ １６４０、１０％のウシ胎児血清、２ｍＭのグルタミン、５０ｍＭのβ－メルカプトエタノール）２

００μｌ中２×１０^{5}個の脾細胞を入れた。ネズミＩＬ－２（Bohringer）（１０Ｕ／ｍｌ）および１μｇ／ｍｌの濃度の種々のインフルエンザ抗原の存在下、３７℃で一夜、脾細胞をインキュベートした。ＣＤ８＋細胞応答の分析のために、Ｈ－２ｋｄ構成で認識されたインフルエンザＮＰペプチド（ＴＹＱＲＴＲＡＬＶ）を使用した。ＣＤ４＋細胞応答の分析について、インフルエンザ抗原は、Ａ／Ｎｅｗ Ｃａｌｅｄｏｎｉａ／２０／９９（Ｈ１Ｎ１）株、Ａ／Ｗｅｌｌｉｎｇｔｏｎ／０１／０４（Ｈ３Ｎ２）株およびＢ／Ｊｉａｎｇｓｕ／１０／０３株を含有する三価不活性スプリットワクチンによって提示される。次いで、マイクロプレートを洗浄し、ビオチン化ラット抗マウスＩＦＮγ抗体（Pharmingen ref：５５４４１０）またはビオチン化ラット抗マウスＩＬ５抗体（Pharmingen ref：５５４３９３）によって、そして、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Southern Biotechnology ref：７１００－０５）によって、ＩＦＮγまたはＩＬ５を分泌した脾細胞を検出した。３－アミノ－９－エチルカルバゾールを使用して顕色した後、自動ＥＬＩＳＰＯＴリーダーによってＩＦＮγまたはＩＬ５を分泌した脾細胞に対応するスポットをカウントした。結果は、脾細胞１０^{6}個当たりのＩＦＮγまたはＩＬ５を分泌する細胞の数として表した。正の検出閾値は、脾細胞１０^{6}個につきスポット２０個である。

【０１１２】

ＣＢＡ技法に関しては、培養マイクロプレートのウェルに培養培地（ＲＰＭＩ １６４０、１０％のウシ胎仔血清、２mMのグルタミン、５０mMのβ－メルカプトエタノール）２００μｌ中４×１０^{5}個の脾細胞を入れた。三価ワクチン（１μｇ／ｍｌ）の存在下で、またはサイトカインの非特異的生産を評価するために賦活剤の不在下（培地対照）で、３７℃で５日間、脾細胞をインキュベートした。次いで、ネズミＴｈ１／Ｔｈ２ ＣＢＡキット（Becton Dickinson - ref：５５１２８７）を使用してフローサイトメトリーにより培養上清のＩＦＮγ含有量およびＩＬ５含有量をアッセイした。正の検出閾値は、ＩＦＮγについては２.５ｐｇ／ｍｌであり、ＩＬ５については５ｐｇ／ｍｌであった。各脾臓試料について、非特異的に生産されるＩＦＮγまたはＩＬ５の量を結果から差し引くことによりＩＦＮγまたはＩＬ５の特異的濃度を算出した。

【０１１３】

細胞性応答分析の結果を下記の表に示す：

【表８】

マウスのグループ	ＩＦＮγを分泌する脾細胞の数	ＩＬ５を分泌する脾細胞の数	培養上清中のＩＦＮγの量	培養上清中のＩＬ５の量	ＩＦＮγ／ＩＬ５比
ＰＢＳ	１９*	２３*	１４８**	３５５**	2.1***
ＨＡ 0.3μｇ	１７	６６	２９５	４００	1.3
ＨＡ 6.3μｇ	３０	１３	７８０	５２３	
ＨＡ 0.3μｇ＋１％ＰＩＴ	３１	７４	６９１	１３０１	0.6
ＨＡ 0.3μｇ＋１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７	６６	２２	１４９９	６４０	4.1

*は、三価ワクチンでの刺激後の脾細胞10^6個当たりのＩＬ５またはＩＦＮγを分泌する脾細胞の数の平均値を表す。平均値は、マウス１グループにつき１０個の脾臓試料について得られたＥＬＩＳＰＯＴ結果に基づいて算出される。

**は、ＣＢＡ技法を使用してマウス１グループにつき１０個の脾臓試料について得られた結果に基づいて算出したＩＬ５またはＩＦＮγの平均値（ｐｇ／ｍｌ）を表す。

***：比は、各グループにおけるＩＦＮγ／ＩＬ５比の相加平均を表す。ＩＦＮγ／ＩＬ５比は、脾細胞を培養した後にＣＢＡ法に従って得られたＩＦＮγまたはＩＬ５の特異的濃度の値に基づいて各試料について決定し、次いで、マウスの各グループについて１０個の比の相加平均を算出した。

【０１１４】

これらの結果は、１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７エマルションがインフルエンザワクチンにより細胞を特異的に再刺激した後にＣＤ４＋細胞性応答をＩＦＮγの生産に強く向けることを示している。このエマルションを投与したマウスのグループにおいて最も明白なＴｈ１応答（最も高いＩＦＮγ／ＩＬ５比）が観察された。Ｔｈ１応答は、実際、２０倍多い用量を含有するインフルエンザワクチンを投与したマウスのグループ（６．３μｇグループ）において観察されるものよりも強い。したがって、このエマルションは、特に高齢個体において、インフルエンザワクチン接種の後のＴｈ１応答が乏しい個体集団に推奨される。

【０１１５】

１７ヶ月齢雄性Ｃ５７Ｂｌ６マウスを使用して同実験プロトコールを再現し、Ａ／Ｗｅｌｌｉｎｇｔｏｎ（Ｈ３Ｎ２）に対するＨＡＩの力価を測定した。得られた結果を下記の表に示す：

【０１１６】

【表９】

マウスのグループ	Ａ／Ｗｅｌｌｉｎｇｔｏｎ（Ｈ３Ｎ２）に対するＨＡＩ
ＨＡ 6.3μｇグループ	１０４*
ＨＡ 0.3μｇ＋１％ＰＩＴグループ	２４７
ＨＡ 0.3μｇ＋１％ＰＩＴ／ＥＲ８０４０５７グループ	４７６

*は、各グループのマウスからの１０個の血清について得られたＨＡＩ力価の平均値を表す。

【０１１７】
各株のインフルエンザ抗原の量を２０のファクター減少させることができ、同時に３種類のウイルス株に関して高い防御抗体力価を有するので、これらの結果は、インフルエンザウイルスに既に感作されている高齢個体集団にワクチン接種するために低用量のスクアレン（１％）およびＴＬＲ４アゴニスト（ＥＲ８０４０５７（０.６μｇ））を含有するＯ／Ｗ型エマルション中でインフルエンザワクチンを混合することにより得られたワクチン組成物の利点を示している。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 47/14	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/14	
A61K 39/145	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/145	
A61P 31/12	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12	
A61K 39/245	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/245	
A61P 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１

(72)発明者　ジャン・エンスレ
フランス、エフ－６９２９０グルジュ・ラ・バレンヌ、アレ・デュ・パルク１５番
(72)発明者　パトリシア・プロベック－ケレック
フランス、エフ－６９００２リヨン、リュ・メルシエール９４番
(72)発明者　パスカル・ショー
フランス、エフ－６９２１０ビュリー、ル・コトー・デザルエット、シュマン・ドゥ・ブローニュ

審査官　渡邊　倫子

(56)参考文献　国際公開第０４／０９０３９６（WO，Ａ１）
国際公開第０５／０１１９５８（WO，Ａ１）
国際公開第０７／０５２０５６（WO，Ａ１）
国際公開第０６／１００１１０（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３９／００
Ａ６１Ｋ　　９／００
ＣＡ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＣＡ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ