

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年9月18日(18.09.2014)

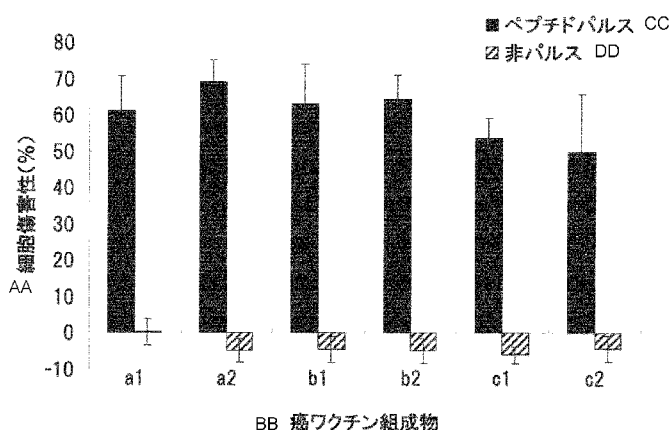


(10) 国際公開番号  
WO 2014/142102 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 38/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/056273
  - (22) 国際出願日: 2014年3月11日(11.03.2014)
  - (25) 国際出願の言語: 日本語
  - (26) 国際公開の言語: 日本語
  - (30) 優先権データ:  
61/777,423 2013年3月12日(12.03.2013) US
  - (71) 出願人: 大日本住友製薬株式会社 (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 Osaka (JP).
  - (72) 発明者: 中谷 朋美 (NAKATANI, Tomomi); 〒5670878 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP). 齋藤 晃一 (SAITO, Koichi); 〒5670878 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP).
  - (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
  - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
  - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))  
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: LIQUID AQUEOUS COMPOSITION

(54) 発明の名称: 液体水性組成物



AA Cytotoxicity (%)  
 BB Cancer vaccine composition  
 CC Peptide pulsed  
 DD Not pulsed

(57) Abstract: A liquid aqueous composition comprising a cancer antigen peptide derived from WT1 protein and additive(s) and having a pH value of 3-6, wherein the peptide is stabilized. In the liquid aqueous composition: the peptide is selected from the group consisting of (A) and (B) (A) a peptide that comprises an amino acid sequence represented by Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (SEQ ID NO:1), and (B) a peptide which has an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 by deletion, substitution and/or addition of 1 to 3 amino acids, and is capable of inducing cytotoxic T cells; and the additive(s) are one or more members selected from the group consisting of (C), (D) and (E) (C) glycolic acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid, citric acid and pharmacologically acceptable salts thereof, (D) malonic acid, succinic acid, glutaric acid, maleic acid and pharmacologically acceptable salts thereof, and (E) methionine.

(57) 要約: WT1タンパク質由来癌抗原ペプチドおよび添加剤を含み、かつpHが3~6である、該ペプチドは、以下の(A)および(B)からなる

ドが安定化された液体水性組成物: ここにおいて、該ペプチドは、以下の(A)および(B)からなる群から選択され、

[続葉有]

WO 2014/142102 A1



---

(A) Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、  
(B) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1～3 個のアミノ酸が欠失、置換および/または付  
加され、かつ細胞傷害性 T 細胞の誘導能を有するペプチド；かつ、該添加剤は、以下の (C)、(D)  
および (E) からなる群から 1 種以上選択される、(C) グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、ク  
エン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩、(D) マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン  
酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩、(E) メチオニン。

## 明 細 書

発明の名称：液体水性組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、癌免疫療法の分野に属し、細胞傷害性T細胞誘導活性を有するWT1タンパク質由来癌抗原ペプチドを含有する液体水性組成物に関するものであり、該組成物の薬物安定化に関する。

### 背景技術

[0002] 一般にWT1タンパク質由来癌抗原ペプチドとは、449個のアミノ酸からなるヒトのWT1タンパク質（配列番号：2）由来の部分ペプチドであり、具体的にはアミノ酸数8～12のペプチドまたはそのダイマーであり、主要組織適合抗原（Major Histocompatibility Complex、MHC）クラスI抗原に提示されかつ細胞傷害性T細胞（細胞傷害性Tリンパ球、Cytotoxic T-lymphocyte、Cytotoxic T-cell。以下、CTLと称する）により抗原認識されるペプチドを含有するものである。MHCは、ヒトではヒト白血球型抗原（HLA）と呼ばれる。

[0003] WT1タンパク質由来の部分ペプチドの内、9つのアミノ酸からなるWT1<sub>126-134</sub>ペプチドArg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（配列番号：1）の配列で表される部分ペプチドおよび該ペプチドの一部のアミノ酸が改変された改変体（改変型ペプチド）がHLAに結合しCTLを誘導するペプチドとして有用であることが報告されている（特許文献1～3参照、非特許文献1参照）。

[0004] 一般に癌ワクチンに用いられる癌抗原タンパク質や癌抗原ペプチドは、CTLをより効率的に誘導する目的で、多くの場合、アジュバント（免疫増強剤）と共に投与される。

[0005] しかし、これらのタンパク質やペプチドについては、製剤化した際の安定性、特に水中での安定性を保つことが困難である場合が多い。そのため、一

一般的には凍結乾燥等の水分を除去した製剤的工夫がなされるが、凍結乾燥製剤は製造面やコスト面でデメリットがある上、使用時に復水等の作業が必要となる。

そのため、癌抗原タンパク質や癌抗原ペプチドを目的に応じてさまざまなアジュバントと容易に組み合わせることが可能でありかつ安定な液体水性組成物を開発することは有意義である。

[0006] 液剤の安定化としては、ゴナドトロピンの安定化剤としてクエン酸またはメチオニンを含有する凍結乾燥製剤（特許文献4参照）、G-CSFの安定化剤としてメチオニンを含有する製剤（特許文献5参照）、G-CSFの安定化剤としてコハク酸または酒石酸を含有するpH4以下の製剤（特許文献6参照）が開示されている。

[0007] さらに、修飾第VII因子ポリペプチドの液体組成物の安定化剤として、（1）pHを約4.0～約8.0の範囲にする試薬、（2）酸化防止剤、（3）カルシウム塩、マグネシウム塩を含有する製剤（特許文献7参照）が開示されている。また、生理学的に活性な薬剤とメチオニンと新規の赤血球生産刺激たんぱく質とを含有する改善された安定性を含む製剤（特許文献8参照）が開示されている。

[0008] しかしながら、本発明が目的とする配列番号1で表される配列を持つ部分ペプチドおよび該ペプチドの改変型ペプチドを含有する安定な液体水性組成物については、これまで知られていなかった。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0009] 特許文献1：国際公開第00/06602号  
特許文献2：国際公開第00/18795号  
特許文献3：国際公開第2009/072610号  
特許文献4：特開平10-203997号公報  
特許文献5：特開2000-247903号公報  
特許文献6：国際公開第2005/39620号

特許文献7：国際公開第03／55511号

特許文献8：国際公開第03／20299号

### 非特許文献

[0010] 非特許文献1：欧州特許1127068の審査における意見書

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、配列番号1で表される配列を持つ部分ペプチドおよび該ペプチドの改変型ペプチドを含有する癌ワクチン製剤の調製に用いることが可能な、上記ペプチドの安定性を改善した液体水性組成物を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、配列番号1で表される配列を持つ部分ペプチドおよび該ペプチドの改変型ペプチド（以下、単に本発明のペプチドということがある）を含有する液体水性組成物においては、主な分解物がペプチドに含まれるメチオニン残基の酸化であることを見出した。さらに、安定化剤として特定の添加剤を含有させることにより、本発明のペプチドのメチオニン残基の酸化が抑制され、また、特定のpHに調整することにより、製剤安定性に優れた液体水性組成物を得ることを見出し、本発明を完成した。

[0013] すなわち、本発明は、以下のものに関する。

[0014] 項1. ペプチドおよび添加剤を含み、かつpHが3～6である、液体水性組成物：

ここにおいて、

該ペプチドは、以下の（A）および（B）からなる群から選択され、

（A）Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（配列番号：1）で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、

（B）配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が欠

失、置換および／または付加され、かつ細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド；かつ、

該添加剤は、以下の（C）、（D）および（E）からなる群から1種以上選択される、

（C）グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、

（D）マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、

（E）メチオニン。

[0015] 項2. 添加剤が、以下の（C）、（D）および（E）からなる群から1種以上選択される、項1に記載の液体水性組成物：

（C）グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、

（D）コハク酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、

（E）メチオニン。

[0016] 項3. （B）がPhe-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（F M F P N A P Y L）（配列番号：3）、Arg-Met-Met-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（R M M P N A P Y L）（配列番号：4）、Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Val（R M F P N A P Y V）（配列番号：5）、Tyr-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（Y M F P N A P Y L）（配列番号：6）またはAla-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（A R M F P N A P Y L）（配列番号：7）である、項1または2に記載の液体水性組成物。

[0017] 項4. ペプチドが、（A）Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（配列番号：1）で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、項1または2に記載の液体水性組成物。

[0018] 項5. 添加剤として（C）および（E）の両者を含有する、項1～4のいずれ

れか一項に記載の液体水性組成物。

- [0019] 項 6. 添加剤として (C) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (C) が、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 1～5 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0020] 項 7. 添加剤として (C) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (C) が、グリコール酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 1～6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0021] 項 8. 添加剤として (C) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (C) が、乳酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 1～6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0022] 項 9. 添加剤として (C) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (C) が、リンゴ酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 1～6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0023] 項 10. 添加剤として (C) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (C) が、酒石酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 1～6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0024] 項 11. 添加剤として (D) および (E) の両者を含有する、項 1～4 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [0025] 項 12. 添加剤として (D) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (D) が、コハク酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、項 1、2、3、4 または 11 に記載の液体水性組成物。
- [0026] 項 13. 添加剤として (D) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (

D) が、マレイン酸、およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、項 1、2、3、4 または 11 に記載の液体水性組成物。

[0027] 項 14. 添加剤として (C)、(D) および (E) のすべてを含有する、項 1~4 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。

[0028] 項 15. 添加剤として (C)、(D) および (E) のすべてを含有し、ここにおいて (C) が、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸であり、(D) がコハク酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、項 1、2、3、4 または 14 に記載の液体水性組成物。

[0029] 項 16. アルファヒドロキシ酸の体積あたりの含有量が 1~100 mM またはジカルボン酸の体積あたりの含有量が 10~100 mM である、項 1~15 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。

[0030] 項 17. メチオニンの体積あたりの含有量が 1~300 mM である、項 1~16 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。

[0031] 項 18. pH が 4~5 である、項 1~17 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。

[0032] 項 19. 添加剤を添加することにより、液体水性組成物中におけるペプチドの安定性を向上させる方法：

ここにおいて、

該ペプチドは、以下の (A) および (B) からなる群から選択され、

(A) Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、

(B) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1~3 個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加され、かつ細胞傷害性 T 細胞の誘導能を有するペプチド；かつ、

該添加剤は、以下の (C)、(D) および (E) からなる群から 1 種以上選

択される、

(C) グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、

(D) マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、

(E) メチオニン。

[0033] 項20. 添加剤が、以下の(C)、(D)および(E)からなる群から1種以上選択される、項19に記載の方法：

(C) グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、

(D) コハク酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、

(E) メチオニン。

[0034] 項21. (B) がPhe-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (FMFPNAPYL) (配列番号：3)、Arg-Met-Met-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (RMMPNAPYL) (配列番号：4)、Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Val (RMFPNAPYV) (配列番号：5)、Tyr-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (YMFNAPYL) (配列番号：6) またはAla-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (ARMFPNAPYL) (配列番号：7) である、項19または20に記載の方法。

[0035] 項22. ペプチドが、(A) Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、項19または20に記載の方法。

[0036] 項23. 添加剤として(C)および(E)の両者を添加する、項19～22のいずれか一項に記載の方法。

[0037] 項24. 添加剤として(C)および(E)の両者を添加し、ここにおいて(C)が、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的

に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、項 19～23 のいずれか一項に記載の方法。

[0038] 項 25. 添加剤として (D) および (E) の両者を添加する、項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

[0039] 項 26. 添加剤として (D) および (E) の両者を添加し、ここにおいて (D) が、コハク酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、項 19、20、21、22 または 25 に記載の方法。

[0040] 項 27. 添加剤として (C)、(D) および (E) のすべてを含有する、項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

[0041] 項 28. 添加剤として (C)、(D) および (E) のすべてを含有し、ここにおいて (C) が、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸であり、(D) がコハク酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、項 19、20、21、22 または 27 に記載の方法。

### 発明の効果

[0042] 本発明の液体水性組成物を用いることにより、細胞傷害性 T 細胞誘導活性を有する本発明のペプチドを安定に含有する液体水性組成物を製造することができ、製剤安定性に優れた癌ワクチンを調製することができる。

### 図面の簡単な説明

[0043] [図1]図 1 は、試験例 5 において CTL 誘導活性を求めた試験結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0044] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0045] 本明細書において、各例示の好ましい態様は、他の例示の好ましい態様と組み合わせてもよく、上述の項 1～項 28 に記載される対応する例示に組み込んでもよい。

- [0046] 本発明における「液体水性組成物」とは、主たる溶媒が水であり、さまざまなアジュバントと混合することが可能な、癌ワクチンを調製するための液剤である。溶媒は通常水を使用するが、発明の効果に影響されない範囲で、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等の薬理学的に許容された溶媒を水の一部混合することができる。好ましくは水のみを溶媒とする。
- [0047] 本発明における「ペプチド」とは、癌ワクチンを調製するための癌抗原ペプチドであり、(A)「Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) の配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」と( B)「配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加され、かつ細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド」からなる群より選択されるペプチドのことである。好ましくは(A)のArg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。
- [0048] 「Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」とはウィルムス腫瘍の癌抑制遺伝子WT1の遺伝子産物であるタンパク質であり、具体的には、449個のアミノ酸からなるヒトのWT1タンパク質(配列番号：2)由来の部分ペプチドのうち、9個のアミノ酸からなるArg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号：1) の配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド(WT1<sub>126-134</sub>ペプチド)である。当該ペプチドは、MHCクラスI抗原に提示されかつCTLにより抗原認識されるペプチドである。該ペプチドの製造方法は公知の方法で製造することができる(特許文献1、2、3等参照)。
- [0049] 「配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加され、かつ細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド」としては、前記の部分ペプチドのアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、HLAに結合しCTLを誘導する改変型ペプチドが挙げられる。置換される

アミノ酸の数は好ましくは1又は2であり、より好ましくは1である。好ましい置換位置としては1位、3位及び9位が挙げられる。付加（挿入も包含される）されるアミノ酸の数は好ましくは1又は2であり、より好ましくは1である。好ましい付加位置としては1位が挙げられる。欠失するアミノ酸の数は好ましくは1である。改変において、付加されるアミノ酸または置換されるアミノ酸は、遺伝子によりコードされる20種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。

改変型ペプチドにおいてシステイン残基が少なくとも1つ存在する場合には、2つのペプチド（モノマー）が相互にジスルフィド結合により結合してダイマーを形成していてもよい。

改変型ペプチドは、当該技術分野において通常用いられる方法によって製造され得る。例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善（株）、1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成、廣川書店、1991などに記載されているペプチド合成方法によって合成することができる。

改変型ペプチドとして、例えば、次のような改変体が挙げられる。

Phe-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (FMFPNAPYL) (配列番号 : 3) 、

Arg-Met-Met-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (RMMPNAPYL) (配列番号 : 4) 、

Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Val (RMFPNAPYV) (配列番号 : 5) 、

Tyr-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (YMFPNAPYL) (配列番号 : 6) または

Ala-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (ARMFPNAPYL) (配列番号 : 7) 。

これらの改変体については、HLAに結合しCTLを誘導する改変型ペプ

チドであることが明らかであり、公知の方法で製造することができる（特許文献1～3および非特許文献1参照）。

[0050] また、本発明において有効成分であるペプチドとして、配列番号1で示されるWT 1<sub>126-134</sub>ペプチドまたはその改変型ペプチドの誘導体も用いることができる。例えば、各ペプチドのアミノ酸配列のN末端および／またはC末端に、種々の物質を結合させたものなどが挙げられる。例えば、アミノ酸、ペプチド、それらのアナログ等を結合させてもよい。配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその改変型ペプチドにこのような物質が結合している場合、これらの物質が、例えば、生体内酵素などにより、あるいは細胞内プロセッシングなどの過程により処理され、最終的に細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチドを生じ、WT 1特異的CTL反応を引き出すことができる。

[0051] 本発明の液体水性組成物において、「ペプチド」の体積あたりの含有量は特に規定されず、薬理的または物性的に許容される体積あたりの含有量であればよい。「ペプチド」のうち、例えば、配列番号1で示されるWT 1<sub>126-134</sub>ペプチド（RMFPNAPYL）の好ましい含量としては、液体水性組成物中0.01mg/mL～200mg/mL、さらに好ましくは、0.1mg/mL～100mg/mLを挙げることができ、目的に応じて選択すればよい。

[0052] 本明細書において、上記のペプチドは左側がN末端であり、各アミノ酸記号はそれぞれ以下のアミノ酸残基であることを示している。

AlaまたはA：アラニン残基

ArgまたはR：アルギニン残基

AsnまたはN：アスパラギン残基

AspまたはD：アスパラギン酸残基

CysまたはC：システイン残基

GlnまたはQ：グルタミン残基

GluまたはE：グルタミン酸残基

GlyまたはG：グリシン残基

HisまたはH：ヒスチジン残基

IleまたはI：イソロイシン残基

LeuまたはL：ロイシン残基

LysまたはK：リジン残基

MetまたはM：メチオニン残基

PheまたはF：フェニルアラニン残基

ProまたはP：プロリン残基

SerまたはS：セリン残基

ThrまたはT：スレオニン残基

TrpまたはW：トリプトファン残基

TyrまたはY：チロシン残基

ValまたはV：バリン残基

Abu：2-アミノ酪酸残基（ $\alpha$ -アミノ酪酸残基とも言う）

Orn：オルニチン残基

Cit：シトルリン残基

[0053] 一般に「添加剤」とは、製剤に用いられる有効成分以外の成分を表す。本発明における「添加剤」（以下、便宜上、「本発明の添加剤」と称することもある。）としては、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、フマル酸およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、ならびにメチオニンが挙げられる。

一般に「アルファヒドロキシ酸」とは、カルボキシ基が結合している炭素にヒドロキシ基も結合しているカルボン酸を表す。本発明における「アルファヒドロキシ酸」としてはグリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩が挙げられる。薬理的に許容し得る塩としては、塩基付加塩が挙げられる。塩基付加塩としてはアルミニ

ウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。例えば、乳酸アルミニウム、乳酸カルシウム、乳酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、リンゴ酸二ナトリウム、酒石酸水素カリウム、酒石酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられるが、これに限定されない。2つ以上カルボキシ基がある場合、カルボキシ基毎に異なる塩基が付加されても良い。例えば、酒石酸ナトリウムカリウム等が挙げられるが、これに限定されない。さらに、水和物であってもよい。例えば、乳酸カルシウム水和物、リンゴ酸ナトリウム1/2水和物、リンゴ酸二ナトリウム一水和物、酒石酸ナトリウム二水和物、酒石酸ナトリウムカリウム4水和物、クエン酸水和物、クエン酸ナトリウム水和物等が挙げられるが、これに限定されない。グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸を用いることにより、本発明のペプチドを含有する液体水性組成物が安定化する。これらは1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。本発明で用いられるアルファヒドロキシ酸として、好ましくはグリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸またはそれらの薬理的に許容し得る塩である。さらに好ましくは酒石酸またはその薬理的に許容し得る塩である。また、乳酸、リンゴ酸、酒石酸には光学異性体があるが、光学活性体、ラセミ体であっても、本発明の効果に影響はない。酒石酸は医薬品に多くの添加物としての使用前例があり、かつ日本薬局方（第16改正）に記載されているL-（+）酒石酸が好ましい。

[0054] 本発明の液体水性組成物において、「アルファヒドロキシ酸」の体積あたりの含有量は特に規定はないが、好ましくは1~100mMであり、さらに好ましくは1~50mM、最も好ましくは1~25mMである。

[0055] 一般に「ジカルボン酸」とは、分子内にカルボキシ基を2個有するカルボン酸を表す。本発明における「ジカルボン酸」としてはマロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、フマル酸およびそれらの薬理的に許容し得る塩が挙げられる。薬理的に許容し得る塩としては、塩基付加塩が挙げられる。塩基付加塩としてはナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。例えば、マロン酸二ナトリウム、コハク酸ナトリウム、グルタル酸ナトリウム、フ

マル酸二ナトリウム等が挙げられるが、これに限定されない。さらに、水和物であってもよい。例えば、マロン酸二ナトリウム一水和物、コハク酸ナトリウム六水和物、マレイン酸一ナトリウム三水和物等が挙げられるが、これに限定されない。マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、フマル酸を用いることにより、本発明のペプチドを含有する液体水性組成物が安定化する。これらは1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。本発明で用いられるジカルボン酸として、好ましくはコハク酸、マレイン酸、フマル酸またはそれらの薬理的に許容し得る塩である。

[0056] 本発明の液体水性組成物において、「ジカルボン酸」の体積あたりの含有量は特に規定はないが、好ましくは10～100 mMであり、さらに好ましくは25～100 mM、最も好ましくは50～100 mMである。

[0057] 本発明の「メチオニン」は必須アミノ酸のひとつで、側鎖に硫黄原子を含んだ疎水性のアミノ酸である。「メチオニン」には光学異性体が存在し、D体、L体またはDL体があるが、これらのうちのどれを使用しても本発明の効果に影響はない。医薬品に多くの添加物としての使用前例があり、日本薬局方（第16改正）に記載されているL体が好ましい。本発明の液体水性組成物において、メチオニンの体積あたりの含有量は特に規定はないが、好ましくは1～300 mMである。

[0058] 「アルファヒドロキシ酸」、「ジカルボン酸」および「メチオニン」はそれぞれ単独でも本発明の液体水性組成物を安定化させる効果は認められるが、「メチオニン」を「アルファヒドロキシ酸」および／または「ジカルボン酸」と組み合わせて含有することによりさらなる安定性を期待できる。このとき、「メチオニン」と組み合わせる酸は、好ましくはグリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸またはフマル酸であり、さらに好ましくはリンゴ酸または酒石酸であり、最も好ましくは酒石酸である。

[0059] 本発明の液体水性組成物のpHは3～6であるが、製造時に目的のpHでない場合は通常pH調整剤を使用し、調製することができる。安定性の観点から好ましいpHは3～6であり、さらに好ましいのは4～5である。pH

が3未満、または、pHが6を超えると、製造中または保存中に本発明のペプチドのメチオニン残基の酸化体等の類縁物質が増えやすくなり、その結果、本発明のペプチドの液体水性組成物中における含量が低下するおそれがあるため、好ましくない。

[0060] pH調整剤としては、一般に医薬品製剤に用いられるpH調整剤から適宜選択して使用する。具体的には、塩酸、リン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸三ナトリウム等が挙げられる。

[0061] また、本発明の液体水性組成物には、上記の添加剤のほか、本発明の効果に影響を与えない範囲で適宜、安定剤、可溶化剤、緩衝剤、等張化剤、溶解補助剤等、医薬品製剤に一般に用いられる添加剤を使用することができる。

[0062] 本発明の液体水性組成物は、医薬品製造等で一般的に用いられる方法で製造することができる。具体的には、例えば、5～25℃の一定温度に維持された環境下で、適当な容器に注射用水を仕込み、緩やかに攪拌しながら、あらかじめ秤量されたペプチドおよび添加剤を加え、最終的に所望のpHに調整することにより調製することができ、調製後にフィルターろ過等により滅菌し、ガラス製バイアル等の容器に充填し、ゴム栓等で密封すればよい。

[0063] 本発明の液体水性組成物を用いて癌ワクチンを調製する方法は特に限定されないが、例えば、適切なアジュバンドと混合し、癌ワクチンを調製する方法；予め適切なアジュバンドと混合した後、さらに凍結乾燥等により癌ワクチン製剤を調製する方法；本発明の液体水性組成物を用時調製により種々のアジュバンドと混合し、癌ワクチンとする方法等が挙げられる。アジュバンドとしては、例えば、フロイントアジュバンド；水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル；リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質；ならびにBCG（カルメットーゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルヴムのようなヒトアジュバンド等が挙げられる。

[0064] 本発明の液体水性組成物を用いて調製される癌ワクチンは、WT 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫等の血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。

[0065] 本発明の液体水性組成物は、有効成分である癌抗原ペプチドを安定に保持できることから、種々の投与形態を選択することができる。具体的には、経口、経鼻、経肺、経皮、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内等が挙げられ、上記の方法により、目的に応じて癌ワクチンを調製すればよい。一般に、癌ワクチンとして、免疫賦活するのに好ましい投与経路としては非経口投与が知られており、例えば、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与のほか、経鼻投与や経皮投与等が挙げられる。このうち、好ましくは皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、筋肉内投与等の注射的投与が挙げられる。

### 実施例

[0066] 以下に、実施例、比較例、試験例等を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されない。なお、以下の実施例等において「%」とあるのは、特に記載のない限り「重量%」を意味する。

[0067] グリコール酸として「グリコール酸（結晶）（ナカライテスク社製）」を用い、乳酸として「乳酸（ナカライテスク社製）」を用い、リンゴ酸として「DL-りんご酸（ナカライテスク社製）」を用い、酒石酸として「L (+) -Tartaric acid, powder（メルク社製）」を用い、クエン酸として「くえん酸一水和物（ナカライテスク社製）」を用いた。マロン酸として、「マロン酸（ナカライテスク社製）」を用い、コハク酸として「こはく酸（ナカライテスク社製）」を用い、グルタル酸として「グルタル酸（ナカライテスク社製）」を用い、マレイン酸として「マレイン酸（ナカライテスク社製）」を用い、メチオニンとして「L-メチオニン（協和発酵バイオ社製）」を用いた。pH調整用として、塩酸としては「1mol

／ $\text{I}$ -塩酸（ナカライテスク社製）」を用い、水酸化ナトリウムとしては「 $1\text{mol}$ ／ $\text{I}$ -水酸化ナトリウム溶液（ナカライテスク社製）」を用いた。

[0068] 比較例において、リン酸二水素ナトリウムとして「リン酸二水素ナトリウム二水和物（ナカライテスク社製）」を用い、酢酸ナトリウムとして「酢酸ナトリウム三水和物（ナカライテスク社製）」を用い、チオグリコール酸ナトリウムとして「チオグリコール酸ナトリウム（ナカライテスク社製）」を用い、ピロ亜硫酸ナトリウムとして「ピロ亜硫酸ナトリウム（ナカライテスク社製）」を用い、アスコルビン酸として「 $\text{L}$ （+）-アスコルビン酸（ナカライテスク社製）」を用い、アラニンとして「 $\text{L}$ - $\alpha$ -アラニン（ナカライテスク社製）」を用い、グリシンとして「グリシン（ナカライテスク社製）」を用い、アルギニンとして「 $\text{L}$ -アルギニン塩酸塩（ナカライテスク社製）」を用いた。

[0069] フロイント不完全アジュバントとして「 $\text{IFA}$ （和光純薬工業社製）」を用い、オレイン酸エチルとして「 $\text{NOFABLE EO-85S}$ （日油社製）」を用い、モノオレイン酸ソルビタンとして「 $\text{NOFABLE SO-991}$ （日油社製）」を用い、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 $10$ として「 $\text{NIKKOL HCO-10}$ （日光ケミカルズ社製）」を用い、濃グリセリンとして「日本薬局方濃グリセリン（日油社製）」を用いた。ミリスチン酸オクチルドデシルとして「 $\text{NIKKOL ODM-100}$ （日光ケミカルズ社製）」を用い、モノオレイン酸グリセリンとして「 $\text{NOFABLE GO-991}$ （日油社製）」を用い、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 $20$ として「 $\text{NIKKOL HCO-20}$ （日光ケミカルズ社製）」を用いた。

[0070] [液体水性組成物の調製]

[実施例1]

ペプチドとしてペプチド（ $\text{A}$ ）である配列番号 $1$ （ $\text{RMFPNAPYL}$ ）で示されるペプチド（以下、ペプチド（ $1$ ））、添加剤として添加剤（ $\text{C}$ ）であるグリコール酸を表 $1$ に記載の量となるよう注射用水に溶解させ、塩酸および／または水酸化ナトリウムで $\text{pH}$ を $4.5$ に調整した。 $0.2\ \mu\text{m}$ の

滅菌フィルターを通してろ過した後、ガラス製バイアルに1 mLずつ充填し、ブチルゴム栓で密封した。これにより、液体水性組成物1を得た。

[0071] [実施例2~38]

実施例1と同様に、ペプチド(A)であるペプチド(1)、添加剤(C)、(D)および/または(E)としてアルファヒドロキシ酸、ジカルボン酸および/またはメチオニンを表1~9に記載の量で調製し、バイアルに充填し、ブチルゴム栓で密封することにより液体水性組成物2~38を得た。

[0072] [比較例1~23]

実施例1と同様に、表10~14に記載の量で調製し、バイアルに充填し、ブチルゴム栓で密封することにより、液体水性組成物39~61を得た。

[0073] [表1]

液体水性組成物番号	実施例				
	1	2	3	4	5
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
グリコール酸 [mM]	10	—	—	—	—
乳酸 [mM]	—	10	—	—	—
リンゴ酸 [mM]	—	—	10	—	—
酒石酸 [mM]	—	—	—	10	—
クエン酸 [mM]	—	—	—	—	10
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.6	4.6	4.6

[0074] [表2]

液体水性組成物番号	実施例			
	6	7	8	9
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2
マロン酸 [mM]	25	—	—	—
コハク酸 [mM]	—	25	—	—
グルタル酸 [mM]	—	—	25	—
マレイン酸 [mM]	—	—	—	25
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5

[0075] [表3]

液体水性組成物番号	実施例			
	10	11	12	13
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2
リンゴ酸 [mM]	1	25	50	100
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量
pH	4.6	4.5	4.5	4.5

[0076] [表4]

	実施例		
	14	15	16
液体水性組成物番号	14	15	16
ペプチド (1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2
コハク酸 [mM]	10	50	100
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5

[0077] [表5]

	実施例				
	17	18	19	20	21
液体水性組成物番号	17	18	19	20	21
ペプチド (1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
メチオニン [mM]	1	50	100	200	300
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

[0078] [表6]

	実施例				
	22	23	24	25	26
液体水性組成物番号	22	23	24	25	26
ペプチド (1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酒石酸 [mM]	1	1	—	—	10
グルタル酸 [mM]	—	—	50	—	—
コハク酸 [mM]	—	—	—	50	25
メチオニン [mM]	—	1	1	1	1
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

[0079] [表7]

	実施例						
	27	28	29	30	31	32	33
液体水性組成物番号	27	28	29	30	31	32	33
ペプチド (1) [mg/mL]	0.2	1.7	2	5	16.7	50	100
酒石酸 [mM]	10	10	10	10	10	10	10
メチオニン [mM]	200	200	200	200	200	200	200
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

[0080] [表8]

	実施例	
	34	35
液体水性組成物番号	34	35
ペプチド (1) [mg/mL]	0.01	50
リンゴ酸 [mM]	1	—
酒石酸 [mM]	—	10
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量
pH	4.5	4.5

[0081]

[表9]

	実施例		
	36	37	38
液体水性組成物番号	36	37	38
ペプチド(1) [mg/mL]	20	20	20
酒石酸 [mM]	10	—	10
メチオニン [mM]	50	200	200
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5

[0082] [表10]

	比較例					
	1	2	3	4	5	6
液体水性組成物番号	39	40	41	42	43	44
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
リン酸二水素ナトリウム [mM]	—	1	—	—	—	—
酢酸ナトリウム [mM]	—	—	1	—	—	—
アラニン [mM]	—	—	—	1	—	—
グリシン [mM]	—	—	—	—	1	—
アルギニン [mM]	—	—	—	—	—	1
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

[0083] [表11]

	比較例				
	7	8	9	10	11
液体水性組成物番号	45	46	47	48	49
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
リン酸二水素ナトリウム [mM]	50	—	—	—	—
酢酸ナトリウム [mM]	—	50	—	—	—
アラニン [mM]	—	—	50	—	—
グリシン [mM]	—	—	—	50	—
アルギニン [mM]	—	—	—	—	50
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	4.6

[0084] [表12]

	比較例		
	12	13	14
液体水性組成物番号	50	51	52
ペプチド(1) [mg/mL]	0.2	0.2	0.2
アラニン [mM]	200	—	—
グリシン [mM]	—	200	—
アルギニン [mM]	—	—	200
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
pH	4.5	4.5	4.5

[0085]

[表13]

	液体水性組成物番号	比較例			
		1 5	1 6	1 7	1 8
		5 3	5 4	5 5	5 6
ペプチド (1) [mg/mL]		0. 0 1	0. 0 1	5 0	5 0
リン酸二水素ナトリウム [mM]		—	1	—	1 0
塩酸/水酸化ナトリウム		適量	適量	適量	適量
pH		4. 5	4. 5	4. 5	4. 5

[0086] [表14]

	液体水性組成物番号	比較例				
		1 9	2 0	2 1	2 2	2 3
		5 7	5 8	5 9	6 0	6 1
ペプチド (1) [mg/mL]		2 0	2 0	2 0	2 0	2 0
アスコルビン酸 [%]		—	—	0. 1	—	—
チオグリコール酸ナトリウム [%]		—	—	—	0. 1	—
ピロ亜硫酸ナトリウム [%]		—	—	—	—	0. 1
塩酸/水酸化ナトリウム		適量	適量	適量	適量	適量
pH		4. 5	4. 6	4. 7	4. 7	4. 6

[0087] [試験例 1] 安定性評価 (1)

調製した液体水性組成物を 6 0 °C の恒温庫内で 2 週間保存後、ペプチド (1) に含まれるメチオニン残基が酸化したペプチド (ペプチド酸化体) の含量 (ペプチド酸化体含量) を下記の方法に基づき測定した。

C 1 8 逆相カラム (4. 6 mm × 1 5 0 mm、3. 5 μm) を用い、純水、アセトニトリル、メタノール、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりペプチド酸化体含量を測定した。ペプチド (1) として 1 0 μg 相当量を注入し、2 2 0 nm の波長で分光学的に検出した。本法で測定したピーク面積を用い、ペプチド酸化体含量 (%) を以下の式で算出した。

ペプチド酸化体含量 (%) = ペプチド酸化体のピーク面積 / 類縁物質を含むペプチドの総ピーク面積 × 1 0 0

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 1 ~ 6 に記載の実施例 1 ~ 2 2、および表 1 0 ~ 1 2 に記載の比較例 1 ~ 1 4 を 6 0 °C で 2 週間保存した後のペプチド酸化体含量 (%) を表 1 5 および 1 6 に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

酸化体抑制率 (%) = { (対照となる試料 (比較例 1) のペプチド酸化体

含量) - (表15および表16に記載の実施例または比較例のペプチド酸化体含量) } × 100 / (対照となる試料 (比較例1) のペプチド酸化体含量)

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチド(1)の安定化効果が高いことを示す。

[0088] [表15]

	液体水性 組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	60℃、2週間後	
				ペプチド 酸化体含量	酸化体 抑制率
比較例1 (対照)	39	0.2mg/mL	なし	1.39%	—
実施例1	1	0.2mg/mL	10mMグリコール酸	0.56%	60%
実施例2	2	0.2mg/mL	10mM乳酸	0.62%	55%
実施例3	3	0.2mg/mL	10mMリンゴ酸	0.41%	71%
実施例4	4	0.2mg/mL	10mM酒石酸	0.64%	54%
実施例5	5	0.2mg/mL	10mMクエン酸	1.13%	19%
実施例6	6	0.2mg/mL	25mMマロン酸	1.03%	26%
実施例7	7	0.2mg/mL	25mMコハク酸	0.67%	52%
実施例8	8	0.2mg/mL	25mMグルタル酸	1.00%	28%
実施例9	9	0.2mg/mL	25mMマレイン酸	0.17%	88%
実施例10	10	0.2mg/mL	1mMリンゴ酸	0.45%	68%
実施例11	11	0.2mg/mL	25mMリンゴ酸	0.42%	70%
実施例12	12	0.2mg/mL	50mMリンゴ酸	0.55%	60%
実施例13	13	0.2mg/mL	100mMリンゴ酸	0.70%	50%
実施例14	14	0.2mg/mL	10mMコハク酸	0.96%	31%
実施例15	15	0.2mg/mL	50mMコハク酸	0.37%	73%
実施例16	16	0.2mg/mL	100mMコハク酸	0.33%	76%
実施例17	17	0.2mg/mL	1mMメチオニン	0.39%	72%
実施例18	18	0.2mg/mL	50mMメチオニン	0.13%	91%
実施例19	19	0.2mg/mL	100mMメチオニン	0.13%	91%
実施例20	20	0.2mg/mL	200mMメチオニン	0.14%	90%
実施例21	21	0.2mg/mL	300mMメチオニン	0.15%	89%
実施例22	22	0.2mg/mL	1mM酒石酸	0.49%	65%

[0089] [表16]

	液体水性 組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	60℃、2週間後	
				ペプチド 酸化体含量	酸化体 抑制率
比較例1 (対照)	39	0.2mg/mL	なし	1.39%	—
比較例2	40	0.2mg/mL	1mM リン酸二水素ナトリウム	1.43%	-3%
比較例3	41	0.2mg/mL	1mM酢酸ナトリウム	1.43%	-3%
比較例4	42	0.2mg/mL	1mMアラニン	1.30%	6%
比較例5	43	0.2mg/mL	1mMグリシン	1.27%	9%
比較例6	44	0.2mg/mL	1mMアルギニン	1.32%	5%
比較例7	45	0.2mg/mL	50mM リン酸二水素ナトリウム	1.76%	-27%
比較例8	46	0.2mg/mL	50mM酢酸ナトリウム	1.31%	6%
比較例9	47	0.2mg/mL	50mMアラニン	1.33%	4%
比較例10	48	0.2mg/mL	50mMグリシン	1.83%	-32%
比較例11	49	0.2mg/mL	50mMアルギニン	1.28%	8%
比較例12	50	0.2mg/mL	200mMアラニン	1.30%	6%
比較例13	51	0.2mg/mL	200mMグリシン	2.80%	-101%
比較例14	52	0.2mg/mL	200mMアルギニン	1.94%	-40%

[0090] 比較例として一般的な酸またはアミノ酸を添加剤として添加してペプチド（１）の酸化抑制効果を検討したところ、ほとんど酸化抑制効果が認められない（１０％未満）か逆にペプチド酸化体含量が増加する結果となった。これに対し、本発明の添加剤を添加した場合には、いずれも酸化抑制効果が認められた。また、表１５によれば、酸化抑制効果は、本発明の添加剤の体積あたりの含有量の影響をほとんど受けないことが確認された。

[0091] 〔試験例２〕 安定性評価（２）

調製した液体水性組成物を６０℃の恒温庫内で２週間保存後、安定性評価（１）と同様の方法を用いて、メチオニン残基が酸化したペプチド（ペプチド酸化体）の含量（ペプチド酸化体含量）を測定した。

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表６および７に記載の実施例２３～２７および表１０に記載の比較例１を６０℃で２週間保存した後のペプチド酸化体含量（％）を表１７に示す。表中の酸化体抑制率は安定性評価（１）と同様に算出した。

[0092] [表17]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	60℃、2週間後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例 1 (対照)	39	0.2 mg/mL	なし	1.39%	—
実施例 23	23	0.2 mg/mL	1 mM酒石酸 + 1 mMメチオニン	0.31%	78%
実施例 24	24	0.2 mg/mL	50 mMグルタル酸 + 1 mMメチオニン	0.29%	79%
実施例 25	25	0.2 mg/mL	50 mMコハク酸 + 1 mMメチオニン	0.21%	85%
実施例 26	26	0.2 mg/mL	10 mM酒石酸 + 25 mMコハク酸 + 1 mMメチオニン	0.28%	80%
実施例 27	27	0.2 mg/mL	10 mM酒石酸 + 200 mMメチオニン	0.13%	91%

[0093] 表１７によれば、本発明の添加剤を２種類以上組み合わせて使用することにより、対照と比較して高い酸化抑制効果が得られることが確認できた。

[0094] 〔試験例３〕 安定性評価（３）

調製した液体水性組成物を６０℃の恒温庫内で２週間保存後、安定性評価（１）と同様の方法を用いて、メチオニン残基が酸化したペプチド（ペプチド酸化体）の含量（ペプチド酸化体含量）を測定した。

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 14 に記載の比較例 19、表 9 に記載の実施例 37 を 60℃ で 2 週間保存した後のペプチド酸化体含量 (%) を表 18 に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

$$\text{酸化体抑制率 (\%)} = \{ (\text{対照となる試料 (比較例 19) のペプチド酸化体含量}) - (\text{表 18 に記載の実施例 37 のペプチド酸化体含量}) \} \times 100 / (\text{対照となる試料 (比較例 19) のペプチド酸化体含量})$$

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチド (1) の安定化効果が高いことを示す。

[0095] [表18]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	60℃、2週間後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例 19 (対照)	57	20 mg/mL	なし	1.07%	—
実施例 37	37	20 mg/mL	200 mMメチオニン	0.23%	79%

[0096] 表 15 および表 18 によれば、本発明の添加剤は、液体水性組成物中のペプチド濃度によらず、酸化抑制効果を示すことが確認できた。

[0097] [試験例 4] 安定性評価 (4)

調製した液体水性組成物を 40℃ の恒温庫内で 4 週間保存後、安定性評価 (1) と同様の方法を用いて、メチオニン残基が酸化したペプチド (ペプチド酸化体) の含量 (ペプチド酸化体含量) を測定した。ただし、C18 逆相カラム (4.6 mm × 150 mm、5 μm) を用い、移動相として純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を用いた。

比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 14 に記載の比較例 20 ~ 23 を 40℃ で 4 週間保存した後のペプチド酸化体含量 (%) を表 19 に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

$$\text{酸化体抑制率 (\%)} = \{ (\text{対照となる試料 (比較例 20) のペプチド酸化体含量}) - (\text{表 19 に記載の比較例のペプチド酸化体含量}) \} \times 100 / (\text{対照となる試料 (比較例 20) のペプチド酸化体含量})$$

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチ

ド（１）の安定化効果が高いことを示す。

[0098] [表19]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	40℃、4週間後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例20 (対照)	58	20mg/mL	なし	0.47%	—
比較例21	59	20mg/mL	0.1%アスコルビン酸	3.11%	-562%
比較例22	60	20mg/mL	0.1%チオグリコール酸 ナトリウム	0.73%	-55%
比較例23	61	20mg/mL	0.1%ピロ亜硫酸 ナトリウム	8.57%	-1723%

[0099] 表19に示されるように、一般に液剤において使用される抗酸化剤であるアスコルビン酸、チオグリコール酸ナトリウムまたはピロ亜硫酸ナトリウムの添加は、対照と比較してペプチド（１）を不安定化し、酸化体の生成を促進することが確認された。

[0100] [試験例5] 特異的CTL誘導活性の確認

液体水性組成物36、37、38を用いて、アジュバントと混合することにより癌ワクチン組成物を調製した。

[0101] 1) 癌ワクチン組成物a1、a2の調製

アジュバントaとしてフロイント不完全アジュバントを用いた。液体水性組成物36をペプチドを含まない10mM酒石酸+50mMメチオニン溶液を用いて1.7倍に希釈した。そのうち450μLをガラスシリンジ（トップ）に採取し、450μLのアジュバントaを採取した別のガラスシリンジとジョイントで連結した。双方のガラスシリンジの内筒を交互に30回以上押し込むことによって乳化し、癌ワクチン組成物a1を得た。

また、同様に、液体水性組成物38をペプチドを含まない10mM酒石酸+200mMメチオニン溶液を用いて1.7倍に希釈し、アジュバントaを用いて、同様の条件で調製することにより、癌ワクチン組成物a2を得た。

[0102] 2) 癌ワクチン組成物b1、b2の調製

あらかじめ、オレイン酸エチル（96.5g）と、モノオレイン酸ソルビタン（17.5g）と、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10（4.5g）と、濃グリセリン（1.5g）と、25mMリン酸二水素ナトリウム水溶液

(20.0 g) とを 300 mL ガラス製トールビーカーに取り、CLEAMIX CLM-1.5 (エムテック) を用いて、10000 rpm で 5 分間攪拌することにより、アジュバント b を得た。

次いで、400  $\mu$ L の液体水性組成物 37 と、930  $\mu$ L のアジュバント b とを試験管ミキサー (タッチミキサー MT-51、ヤマト科学) を用いて混合することにより、癌ワクチン組成物 b1 を得た。

また、液体水性組成物 38 とアジュバント b を用いて、同様の条件で調製することにより、癌ワクチン組成物 b2 を得た。

[0103] 3) 癌ワクチン組成物 c1、c2 の調製

あらかじめ、オレイン酸エチル (49.0 g) と、ミリスチン酸オクチルドデシル (49.0 g) と、モノオレイン酸ソルビタン (7.0 g) と、モノオレイン酸グリセリン (9.8 g) と、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 20 (1.4 g) と、濃グリセリン (1.4 g) と、25 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (22.4 g) とを 300 mL ガラス製トールビーカーに取り、CLEAMIX CLM-1.5 (エムテック) を用いて、10000 rpm で 5 分間攪拌することにより、アジュバント c を得た。

次いで、400  $\mu$ L の液体水性組成物 36 と、930  $\mu$ L のアジュバント c とを試験管ミキサー (タッチミキサー MT-51、ヤマト科学) を用いて混合することにより、癌ワクチン組成物 c1 を得た。

また、液体水性組成物 38 とアジュバント c を用いて、同様の条件で調製することにより、癌ワクチン組成物 c2 を得た。

[0104] 4) CTL 誘導活性評価

上記 1) から 3) にて調製した癌ワクチン組成物 6 種 (a1~c2) の特異的 CTL 誘導能を HLA-A\*0201 トランスジェニックマウス (Eur. J. Immunol. : 34, 3060, 2004) を用いて評価した。

各癌ワクチン組成物 100  $\mu$ L (それぞれペプチド投与量 600  $\mu$ g) を HLA-A\*0201 トランスジェニックマウスの尾根部皮内に投与した。マウスは各群 3 匹を用いた。投与 7 日後に脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。

脾細胞の一部を $100\mu\text{mol/L}$ のペプチド(1)で1時間パルスした。パルスとは、ペプチド(1)を脾細胞に添加し、細胞表面上のHLAに抗原ペプチドを結合させることを言う。ペプチド(1)をパルスしていない脾細胞および上記のペプチドをパルスした脾細胞を混合し、24穴プレートに $7.8 \times 10^6$ 個/wellで播種して培養した。培養液には、RPMI 1640培地に10%FCS、10mM HEPES、20mM L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1% MEMビタミン、 $55\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを含ませ、5日間培養した。培養した脾細胞中の投与ペプチド特異的なCTLの活性を $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ(J. Immunol. : 159, 4753, 1997)により測定した。HLA-A\*0201とH-2D<sup>b</sup>のキメラのMHCクラスI分子を安定的に発現するように、パスツール研究所においてマウスリンパ腫由来細胞株に遺伝子導入して作製された細胞株EL4-HHD細胞(J. Exp. Med. : 185, 2043, 1997)を用いた。標的細胞は $3.7\text{MBq}/5 \times 10^5$ 個で1時間 $^{51}\text{Cr}$ ラベル後、前記ペプチドを $167\mu\text{mol/L}$ になるように添加して更に1時間パルスした。また前記ペプチドをパルスしない(非パルスの)標的細胞を2時間 $^{51}\text{Cr}$ ラベルしてコントロール標的細胞とした。これらのラベルされた標的細胞と先に調製された脾細胞を1:20の割合で混合して4時間培養し、傷害を受けた標的細胞の割合よりCTL誘導活性(すなわち細胞傷害性)を求めた。結果を図1に示す。細胞傷害性は各投与群3匹のマウスの平均値で表している。

図1に示すように、本発明の液体水性組成物を用いて調製した癌ワクチン組成物を投与した群では、前記ペプチドをパルスした標的細胞を強く傷害したが、コントロールの前記ペプチドをパルスしていない標的細胞に対する傷害性は弱かったことから、ペプチド特異的CTLが誘導されていることが明らかとなった。この結果から、本発明の液体水性組成物は、種々のアジュバントと組み合わせることにより、癌抗原に特異的なCTLの誘導を活性化することがわかる。

## [0105] [液体水性組成物の調製]

[実施例39～44]、[比較例24]

ペプチドとしてペプチド(A)であるペプチド(1)、添加剤として添加剤(C)である酒石酸および添加剤(E)であるメチオニンを表20に記載の量となるよう注射用水に溶解させ、塩酸または／および水酸化ナトリウムで表20に記載のpHになるように調整した。0.2μmの滅菌フィルターを通してろ過した後、ガラス製バイアルに1mLずつ充填し、ブチルゴム栓で密封した。これにより、液体水性組成物62～68を得た。

## [0106] [表20]

	実施例						比較例
	39	40	41	42	43	44	
液体水性組成物番号	62	63	64	65	66	67	68
ペプチド(1) [mg/mL]	50	50	50	50	50	50	50
酒石酸 [mM]	10	10	10	10	10	10	10
メチオニン [mM]	200	200	200	200	200	200	200
塩酸／水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
pH	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.1

## [0107] [試験例6] 安定性評価(5)

調製した液体水性組成物を40℃の恒温庫内で1ヶ月保存後、ペプチド(1)の含量(以下、ペプチド含量)を下記の方法に基づき測定した。

C18逆相カラム(4.6mm×150mm、3.5μm)を用い、純水、アセトニトリル、メタノール、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりペプチド含量を測定した。ペプチド(1)として10μg相当量を注入し、220nmの波長で分光学的に検出した。本法で測定したピーク面積を用い、ペプチド含量(%)を以下の式で算出した。

ペプチド含量(%) = ペプチド(1)のピーク面積 / 類縁物質を含むペプチドの総ピーク面積 × 100

保存前のペプチド含量(イニシャル)(%)を同様に測定し、ペプチド残存率(%)を以下の式で算出した。

ペプチド残存率(%) = ペプチド含量(%) / ペプチド含量(イニシャル)(%) × 100

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 20 に記載の実施例 39～44 および比較例 24 を 40℃ で 1 ヶ月間保存した後のペプチド残存率 (%) を表 21 に示す。

[0108] [表21]

	液体水性 組成物番号	p H	40℃、1ヶ月後
			ペプチド残存率
実施例 39	62	3.0	97.4%
実施例 40	63	4.0	99.0%
実施例 41	64	4.5	99.2%
実施例 42	65	5.0	99.0%
実施例 43	66	5.5	98.5%
実施例 44	67	6.0	97.4%
比較例 24	68	7.1	92.5%

[0109] 表 21 に示されるように、pH が 3～6 の範囲では、液体水性組成物中のペプチド残存率が 97% 以上を示す安定性の高い液体水性組成物が得られた。一方、pH が 7.1 では、ペプチド残存率は低下が認められた。

[0110] [試験例 7] 安定性評価 (6)

調製した液体水性組成物を 40℃ の恒温庫内で 4 週間保存後、安定性評価 (1) と同様の方法を用いて、ペプチド酸化体含量を測定した。

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 8 に記載の実施例 34、表 13 に記載の比較例 15、16 を 40℃ で 4 週間保存した後のペプチド酸化体含量 (%) を表 22 に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

酸化体抑制率 (%) = { (対照となる試料 (比較例 15) のペプチド酸化体含量) - (表 8 に記載の実施例 34 または表 13 に記載の比較例 16 のペプチド酸化体含量) } × 100 / (対照となる試料 (比較例 15) のペプチド酸化体含量)

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチド (1) の安定化効果が高いことを示す。

[0111]

[表22]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	40℃、4週間後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例15 (対照)	53	0.01mg/mL	なし	2.37%	—
実施例34	34	0.01mg/mL	1mMリンゴ酸	0.90%	62%
比較例16	54	0.01mg/mL	1mM リン酸二水素ナトリウム	2.15%	9%

[0112] 表22に示されるように、本発明の添加剤は、液体水性組成物中のペプチド濃度が低い場合でも、酸化抑制効果を示すことが確認できた。

[0113] [液体水性組成物の調製]

[実施例45]、[比較例25]

実施例1と同様に、表23に記載の量で調製し、バイアルに充填し、ブチルゴム栓で密封することにより、液体水性組成物69および70を得た。

[0114] [表23]

	実施例	比較例
	45	25
液体水性組成物番号	69	70
ペプチド(1) [mg/mL]	50	50
酒石酸 [mM]	100	—
リン酸二水素ナトリウム [mM]	—	100
塩酸/水酸化ナトリウム	適量	適量
pH	4.5	4.5

[0115] [試験例8] 安定性評価(7)

調製した液体水性組成物1mLに0.3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水を100μL添加し簡単に振り混ぜた後、直ちにメチオニン残基が酸化したペプチド(ペプチド酸化体)の含量(ペプチド酸化体含量)を測定した。ペプチド酸化体含量の測定は、安定性評価(1)と同様の方法を用いて行った。

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表13に記載の比較例17、18、表23に記載の実施例45および比較例25、表8に記載の実施例35の液体水性組成物1mLに0.3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水を100μL添加した後のペプチド酸化体含量(%)を表24に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

酸化体抑制率(%) = { (対照となる試料(比較例17)のペプチド酸化体含量) - (表13、表23および表8に記載の実施例または比較例のペプチド酸化体含量) } / (比較例17のペプチド酸化体含量) × 100

ド酸化体含量) } × 100 / (対照となる試料 (比較例 17) のペプチド酸化体含量)

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチド (1) の安定化効果が高いことを示す。

[0116] [表24]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	過酸化水素添加後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例 17 (対照)	55	50 mg/mL	なし	6.59%	—
実施例 35	35	50 mg/mL	10 mM 酒石酸	5.07%	23%
実施例 45	69	50 mg/mL	100 mM 酒石酸	5.43%	18%
比較例 18	56	50 mg/mL	10 mM リン酸二水素ナトリウム	6.20%	5.9%
比較例 25	70	50 mg/mL	100 mM リン酸二水素ナトリウム	6.89%	-4.6%

[0117] 表 24 に示されるように、本発明の添加剤は、液体水性組成物中のペプチド濃度が高い場合でも、酸化抑制効果を示すことが確認できた。

[0118] [試験例 9] 安定性評価 (8)

調製した液体水性組成物のうち、表 14 に記載の比較例 20、表 9 に記載の実施例 36、37 および 38 の液体水性組成物 1 mL に 0.3% の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水を 100 μL 添加し簡単に振り混ぜた後、直ちにメチオニン残基が酸化したペプチド (ペプチド酸化体) の含量 (ペプチド酸化体含量) を測定した。ペプチド酸化体含量の測定は、安定性評価 (1) と同様の方法を用いて行った。

実施例および比較例で得られた液体水性組成物のうち、表 14 に記載の比較例 20、表 9 に記載の実施例 36、37 および 38 の液体水性組成物 1 mL に 0.3% の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水を 100 μL 添加した後のペプチド酸化体含量 (%) を表 25 に示す。表中の酸化体抑制率は下記式で算出した。

酸化体抑制率 (%) = { (対照となる試料 (比較例 20) のペプチド酸化体含量) - (表 9 に記載の実施例のペプチド酸化体含量) } × 100 / (対照となる試料 (比較例 20) のペプチド酸化体含量)

酸化体抑制率の数値が高いほど酸化抑制効果が高く、添加剤によるペプチド (1) の安定化効果が高いことを示す。

## [0119] [表25]

	液体水性組成物番号	ペプチド濃度	添加剤	過酸化水素添加後	
				ペプチド酸化体含量	酸化体抑制率
比較例 20 (対照)	58	20 mg/mL	なし	5.08%	—
実施例 36	36	20 mg/mL	10 mM 酒石酸 + 50 mM メチオニン	3.63%	29%
実施例 37	37	20 mg/mL	200 mM メチオニン	2.28%	55%
実施例 38	38	20 mg/mL	10 mM 酒石酸 + 200 mM メチオニン	1.41%	72%

[0120] 表 25 に示されるように、試験例 5 で CTL 誘導活性が確認された実施例 36、37 および 38 の液体水性組成物は、酸化抑制効果を示すことが確認できた。

### 産業上の利用可能性

[0121] 本発明により、WT 1 タンパク質由来癌抗原ペプチドを含有する安定性の高い液体水性組成物を提供することが可能になり、当該ペプチドを目的に応じてさまざまなアジュバントと容易に組み合わせることが可能となる。

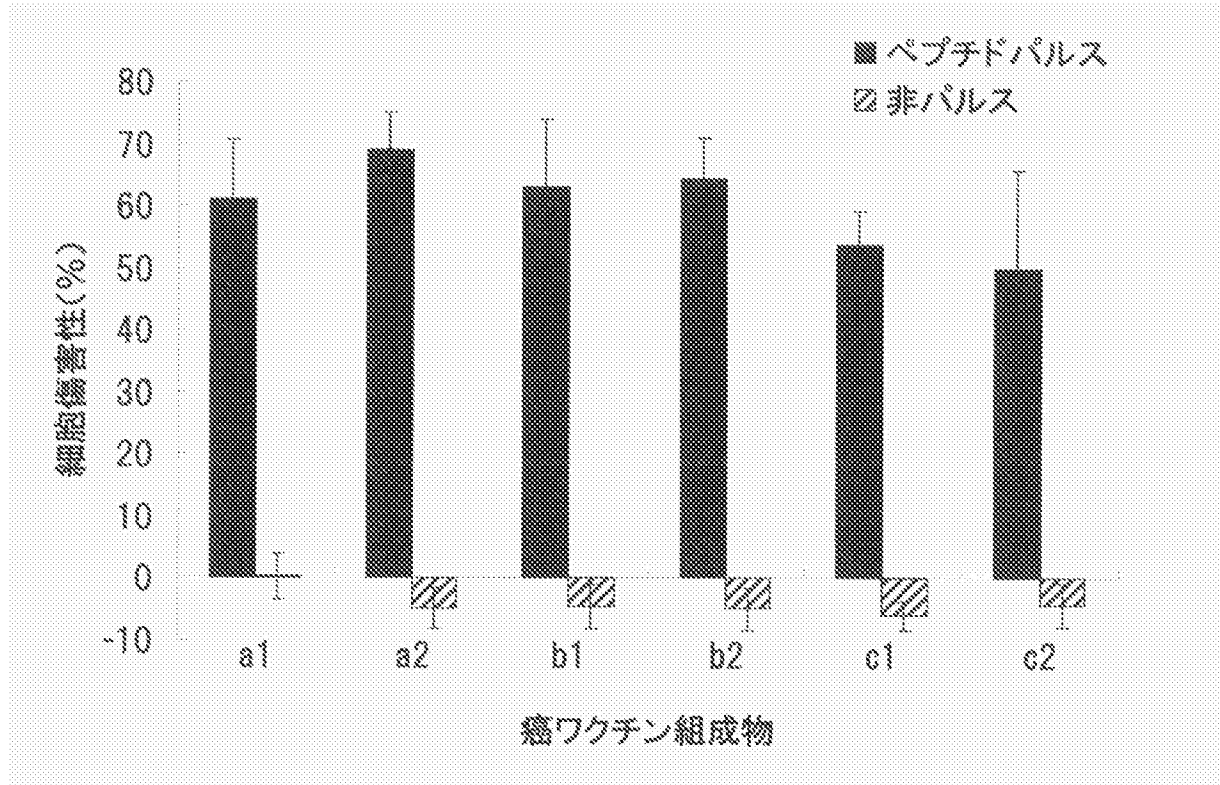
## 請求の範囲

- [請求項1] ペプチドおよび添加剤を含み、かつpHが3～6である、液体水性組成物：  
ここにおいて、  
該ペプチドは、以下の（A）および（B）からなる群から選択され、  
（A）Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（配列番号：1）で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、  
（B）配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸が欠失、置換および／または付加され、かつ細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド；かつ、  
該添加剤は、以下の（C）、（D）および（E）からなる群から1種以上選択される、  
（C）グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、  
（D）マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるジカルボン酸、  
（E）メチオニン。
- [請求項2] ペプチドが、（A）Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu（配列番号：1）で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項1に記載の液体水性組成物。
- [請求項3] 添加剤として（C）および（E）の両者を含有する、請求項1または2に記載の液体水性組成物。
- [請求項4] 添加剤として（C）および（E）の両者を含有し、ここにおいて（C）が、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より1種以上選択されるアルファヒドロキシ酸である、請求項1～3のいずれか一項に記載の液体水性組成物。

成物。

- [請求項5] 添加剤として (D) および (E) の両者を含有する、請求項 1 または 2 に記載の液体水性組成物。
- [請求項6] 添加剤として (D) および (E) の両者を含有し、ここにおいて (D) が、コハク酸およびその薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸である、請求項 1、2 または 5 に記載の液体水性組成物。
- [請求項7] アルファヒドロキシ酸の体積あたりの含有量が 1 ~ 100 mM またはジカルボン酸の体積あたりの含有量が 10 ~ 100 mM である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [請求項8] メチオニンの体積あたりの含有量が 1 ~ 300 mM である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の液体水性組成物。
- [請求項9] 添加剤を添加することにより、液体水性組成物中における Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (配列番号: 1) で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの安定性を向上させる方法：  
ここにおいて該添加剤は、以下の (C)、(D) および (E) からなる群から 1 種以上選択される、  
(C) グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるアルファヒドロキシ酸、  
(D) マロン酸、コハク酸、グルタル酸、マレイン酸、およびそれらの薬理的に許容し得る塩からなる群より 1 種以上選択されるジカルボン酸、  
(E) メチオニン。

[図1]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/056273

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K38/00, A61P35/00, C07K7/06, C07K14/82

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/072610 A1 (International Institute of Cancer Immunology, Inc.), 11 June 2009 (11.06.2009), examples & US 2011/0070251 A1 & EP 2228072 A1 & AU 2008332278 A & CA 2706907 A & CN 101888852 A & MX 2010006070 A & KR 10-2010-0090710 A & TW 200930402 A & RU 2010127298 A	1-9
Y	JP 2007-509101 A (Hexal Biotech Forschungs GmbH), 12 April 2007 (12.04.2007), claims; examples; table 8 & US 2008/0026046 A1 & EP 1677818 A1 & WO 2005/039620 A1 & DE 10348550 A & AT 535251 T & PL 1677818 T	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 May, 2014 (20.05.14)	Date of mailing of the international search report 03 June, 2014 (03.06.14)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/056273

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/090305 A2 (HANMI HOLDINGS CO., LTD.), 28 July 2011 (28.07.2011), claims; examples & JP 2013-517324 A                      & US 2012/0294829 A1 & EP 2525787 A2                         & AU 2011207915 A & CA 2787648 A                         & CN 102740840 A & MX 2012008454 A                    & KR 10-2011-0085917 A & AR 80427 A	1-9
Y	JP 6-284886 A (Amano Enzyme Inc.), 11 October 1994 (11.10.1994), examples (Family: none)	1-9
Y	JP 2000-53584 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 22 February 2000 (22.02.2000), examples & EP 969089 A1                         & BR 9903286 A & AU 760737 B                         & CA 2273408 A & KR 10-2000-0006528 A             & CN 1320112 C	1-9
Y	JP 2010-515713 A (Arecor Ltd.), 13 May 2010 (13.05.2010), claims; examples & US 2010/0028372 A1                & GB 700523 D & EP 2114456 A2                       & WO 2008/084237 A2 & CA 2674765 A	1-9
Y	JP 2004-10511 A (Asahi Kasei Corp.), 15 January 2004 (15.01.2004), claims; examples (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. A61K38/00, A61P35/00, C07K7/06, C07K14/82

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2014年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2014年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/072610 A1 (株式会社癌免疫研究所) 2009.06.11, 実施例等 & US 2011/0070251 A1 & EP 2228072 A1 & AU 2008332278 A & CA 2706907 A & CN 101888852 A & MX 2010006070 A & KR 10-2010-0090710 A & TW 200930402 A & RU 2010127298 A	1-9
Y	JP 2007-509101 A (ヘキサル バイオテック フォルシュング ゲ ーエムペーハー) 2007.04.12, 請求項、実施例、表 8 等 & US 2008/0026046 A1 & EP 1677818 A1 & WO 2005/039620 A1 & DE 10348550 A & AT 535251 T & PL 1677818 T	1-9

C 欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 20.05.2014	国際調査報告の発送日 03.06.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安藤 公祐 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U 4496

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/090305 A2 (HANMI HOLDINGS CO., LTD) 2011.07.28, 請求項、実施例等 & JP 2013-517324 A & US 2012/0294829 A1 & EP 2525787 A2 & AU 2011207915 A & CA 2787648 A & CN 102740840 A & MX 2012008454 A & KR 10-2011-0085917 A & AR 80427 A	1-9
Y	JP 6-284886 A (天野製薬株式会社) 1994.10.11, 実施例等 (ファミリーなし)	1-9
Y	JP 2000-53584 A (エフ・ホフマンーラ ロシユ アーゲー) 2000.02.22, 実施例等 & EP 969089 A1 & BR 9903286 A & AU 760737 B & CA 2273408 A & KR 10-2000-0006528 A & CN 1320112 C	1-9
Y	JP 2010-515713 A (アレコー・リミテッド) 2010.05.13, 請求項、 実施例等 & US 2010/0028372 A1 & GB 700523 D & EP 2114456 A2 & WO 2008/084237 A2 & CA 2674765 A	1-9
Y	JP 2004-10511 A (旭化成株式会社) 2004.01.15, 請求項、実施例等 (ファミリーなし)	1-9