(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7296644号
(P7296644)

(45)発行日　令和5年6月23日(2023.6.23)

(24)登録日　令和5年6月15日(2023.6.15)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　31/7115(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7115
Ａ６１Ｐ　37/04　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	37/04
Ａ６１Ｋ　47/02　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/02
Ａ６１Ｋ　47/26　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/26
Ａ６１Ｋ　47/36　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/36

ＦＩ

請求項の数　28　（全70頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-573468(P2020-573468)
(86)(22)出願日　令和1年6月28日(2019.6.28)
(65)公表番号　特表2021-529787(P2021-529787A)
(43)公表日　令和3年11月4日(2021.11.4)
(86)国際出願番号　PCT/CN2019/093607
(87)国際公開番号　WO2020/001596
(87)国際公開日　令和2年1月2日(2020.1.2)
審査請求日　令和3年2月26日(2021.2.26)
(31)優先権主張番号　201810698033.6
(32)優先日　平成30年6月29日(2018.6.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(31)優先権主張番号　201810700708.6
(32)優先日　平成30年6月29日(2018.6.29)
最終頁に続く

(73)特許権者　520513255
信福（北京）医▲薬▼科技有限公司
中華人民共和国１００００００北京市▲海▼淀区▲開▼拓路５号５▲層▼５１７室
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　林 ▲海▼祥
中華人民共和国１００００００北京市海澱區開拓路５號５層５１７室
(72)発明者　▲劉▼ 芳
中華人民共和国１００００００北京市海澱
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫応答を強化するための複合物の調製方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

免疫応答を強化するための複合物の調製方法であって、

ポリイノシン酸－ポリシチジル酸、少なくとも１種のカチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩を液体反応系中に接触させるステップを含み、

接触反応を行う前、前記ポリイノシン酸－ポリシチジル酸を８０℃～９９℃で７０～１２０ｍｉｎ加熱し、並びに、

前記カチオン安定剤は、分子量≦５ｋＤａのキトサンオリゴ糖、又は前記キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種とで形成されるグラフト物である、免疫応答を強化するための複合物の調製方法。

【請求項２】

前記カチオン安定剤は、前記キトサンオリゴ糖、前記キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルのグラフト物、及び前記キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルとポリエチレンイミンのグラフト物から選ばれる、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記グラフト物の分子量は≦５０ｋＤａである、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

前記液体反応系中、前記ポリイノシン酸－ポリシチジル酸の濃度が０．１～１０ｍｇ／

ｍｌであり、選択的に、前記液体反応系中、前記ポリイノシン酸－ポリシチジル酸の濃度が０．５～５ｍｇ／ｍｌである、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記液体反応系中、前記カチオン安定剤の濃度が０．５～５１．２ｍｇ／ｍｌであり、選択的に、前記液体反応系中、前記カチオン安定剤の濃度が０．８～２５．６ｍｇ／ｍｌである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記液体反応系中、前記可溶性カルシウム塩中、カルシウムイオンの濃度が０．１～１ｍＭである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記キトサンオリゴ糖の脱アセチル化度が７０％以上である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記可溶性カルシウム塩は、$CaCl_2$及び／又は$Ca(NO_3)_2$から選ばれる、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記ポリイノシン酸－ポリシチジル酸は、ポリシチジル酸及びポリイノシン酸が塩基ペアリング反応を経て得られるものである、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ポリシチジル酸、及びポリイノシン酸の分子量が２．３万ダルトンよりも大きく、選択的に、前記ポリシチジル酸の分子量の範囲が、６．６万ダルトン～６６万ダルトンであり、選択的に、前記ポリイノシン酸の分子量の範囲が、６．６万ダルトン～６６万ダルトンである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記塩基ペアリング反応は、４０℃～５０℃の温度で行われる、請求項９又は１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記塩基ペアリング反応は、ｐＨ＝６．８～７．６で行われる、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
接触反応を行う前、前記ポリイノシン酸－ポリシチジル酸を８８℃～９２℃で７０～１２０ｍｉｎ加熱する、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記液体反応系の温度は４０℃～５０℃である、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記グラフト物の調製方法は、
まず、カルボニルジイミダゾールを用いてポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種を活性化させ、次に、活性化済みの産物を用いて、イオン液体［ｂｍｉｍ］Ｃｌ中に前記キトサンオリゴ糖とグラフト反応を行うステップを含み、
選択的に、前記グラフト物は、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルのグラフト物であり、まず、カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）を用いてポリエチレングリコールモノメチルエーテル（ＭＰＥＧ）を活性化させ、次に、活性化済みのＭＰＥＧを用いて、イオン液体［ｂｍｉｍ］Ｃｌ中にキトサンオリゴ糖（ＣＯＳ）とグラフト反応を行い、
選択的に、前記グラフト反応は、６０℃～８０℃、非酸化性雰囲気下で反応する、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記方法は、

架橋剤溶液を撹拌条件下で１滴ずつ、製造して得た複合物に加えて、反応系中にチンダル現象が現れることを観察すると、滴下を停止し、撹拌してナノ粒子を得るステップをさらに含み、

前記架橋剤は、トリポリリン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、フェニルボロン酸、及びカテコールのうちから選ばれる少なくとも１種であり、

選択的に、前記架橋剤溶液中には免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な塩又は賦形剤のうちの１種又は複数種がさらに含有され、

選択的に、前記方法は、前記複合物又は前記ナノ粒子を、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な塩又は賦形剤のうちの１種又は複数種と共インキュベートするステップをさらに含み、

選択的に、前記抗原はすべてタンパク質又はポリペプチド抗原であり、

選択的に、前記抗原はすべて、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原を含み、

選択的に、前記腫瘍は、骨、骨接合部、筋肉、肺、気管、咽頭、鼻、心臓、脾臓、動脈、静脈、血液、毛細血管、リンパ節、リンパ管、リンパ液、口腔、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸、肛門、虫垂、肝臓、胆、膵臓、耳下腺、舌下腺、泌尿腎臓、尿管、膀胱、尿道、卵巣、卵管、子宮、膣、外陰部、陰嚢、精巣、輸精管、陰茎、眼、耳、鼻、舌、皮膚、脳、脳幹、延髄、脊髄、脳脊液、神経、甲状腺、副甲状腺、副腎、下垂体、松果腺、膵島、胸腺、生殖腺、舌下腺、及び耳下腺のうちのいずれかが病変して生成した腫瘍を含み、

選択的に、前記細菌は、ブドウ球菌属、連鎖球菌属、リステリア菌属、エリジペロトリックス属、レニバクテリウム属、バシラス属、クロストリジウム属、マイコバクテリア属、放線菌属、ノカルディア属、コリネバクテリウム属、ロドコッカス属、炭疽菌、エリシペラス、破傷風菌、リステリア菌、気腫疽菌、結核菌、大腸菌、プロテウス、赤痢菌、肺炎桿菌、ブルセラ、ウェルシュ菌、インフルエンザ菌、パラインフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリス、アシネトバクター属、エルシニア属、レジオネラ・ニューモフィラ、百日咳菌、パラ百日咳菌、志賀赤痢菌属、パスツレラ属、コレラ菌、及びビブリオ・パラヘモリティカスのうちの１種又は複数種を含み、

選択的に、前記寄生虫は、消化管内寄生虫、腔内寄生虫、肝内寄生虫、肺寄生虫、脳組織寄生虫、血管内寄生虫、リンパ管内寄生虫、筋肉組織寄生虫、細胞内寄生虫、骨組織寄生虫、及び眼内寄生虫のうちの１種又は複数種を含み、

選択的に、前記ウイルスは、アデノウイルス（ａｄｅｎｉｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス（ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、アストロウイルス（ａｓｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス（ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、カリシウイルス（ｃｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）、フラビウイルス（ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）、Ｄ型肝炎ウイルス（ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｄｅｌｔａ ｖｉｒｕｓ）、肝炎ウイルス（ｈｅｐｅｖｉｒｉｄａｅ）、モノネガウイルス（ｍｏｎｏｎｅｇａｖｉｒａｌｅｓ）、ニドウイルス（ｎｉｄｏｖｉｒａｌｅｓ）、小ＲＮＡウイルス（ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス（ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、パピローマウイルス（ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、パルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）、ポリオーマウイルス（ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、ポックスウイルス（ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス（ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）又はトガウイルス（ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）のうちの１種又は複数種を含み、

選択的に、前記真菌は、コクシジオイデス・イミチス、コクシジオイデス・ポサダシ、アジェロミセス・カプスラーツス、ヒストプラズマ・ズボアジ、ロボ真菌、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、ブラストマイセス・デルマチチジス、スポロトリックス・シェンキィ、ペニシリウム・マルネッフェイ、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・グラブラタ、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ルシタニアエ、ニューモシスチス・カリニ、アスペルギルス、エクソフィアラ・ジャンセルメイ、フォンセカエア・ペドロソイ、フ

ォンセカ・コンパクタ、フィアロフォラ・ベルコーサ、エクソフィアラ・デルマチチヂス、ジェオトリクム・カンディデュム、シュードアレシェリア・ボイジイ、クリプトコックス・ネオフォルマンス、トリコスポロン、リゾプス・オリーゼ、ムコール・インディカス、アブシディア・コリムビフェラ、ハリサシカビモドキ、藻菌類、コニディオボルス・コロナトゥス、コニディオボルス・インコングルス、エンテロシトゾーン・ビエヌーシ、脳炎性胞子虫、リノスポリジウム・セーベリ、無色菌糸、及び黒色菌糸のうちの１種又は複数種を含み、

選択的に、前記免疫細胞治療薬は、腫瘍浸潤リンパ球、樹枝状細胞、サイトカイン誘導キラー細胞、樹枝状細胞－サイトカイン誘導キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、γδＴ細胞、ＣＤ３ＡＫ、ＣＡＲ－Ｔ、及びＴＣＲ－Ｔのうちから選ばれる１種又は複数種であり、

選択的に、前記抗体治療薬は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤＬ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＣＤ抗原抗体から選ばれ、

選択的に、前記化学薬物は、アルキル化剤、抗代謝薬、抗腫瘍抗生物質、植物類抗腫瘍薬、ホルモン薬、及びその他の薬物のうちから選ばれる１種又は複数種であり、

前記その他の薬物は、Ｌ－アスパラギナーゼ、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン類薬物、又は上記薬物の誘導体から選ばれ、

選択的に、前記粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質は、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、特殊界面活性剤、キレート化剤、粘着剤、ポリ乳酸－グリコール酸コポリマー、デキストラン、及び多糖類のうちから選ばれる１種又は複数種であり、

選択的に、前記免疫調整剤は、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞成長因子、リンパ性毒素、造血因子、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、インターフェロン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、インターロイキン（ＩＬ）、顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、及び幹細胞成長因子のうちから選ばれる１種又は複数種であり、

選択的に、前記パターン認識受容体のリガンドは、ＴＬＲ受容体のリガンド、ＲＬＲ受容体のリガンド、ＣＬＲ受容体のリガンド、及びＮＬＲ受容体のリガンドから選ばれる、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１７】

請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の、抗体、ワクチン製剤又はワクチン組成物の調製における使用。

【請求項１８】

免疫細胞活性強化のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。

【請求項１９】

腫瘍治療及び／又は予防のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。

【請求項２０】

抗ウイルス、抗細菌、抗真菌、抗寄生虫のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。

【請求項２１】

化学療法の副作用軽減のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。

【請求項２２】

抗疲労又は免疫力向上のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。

【請求項２３】

宿主疼痛緩和のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法に

より調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。
【請求項２４】
抗原に対する宿主の免疫応答の促進のための医薬の調製のための請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物の使用。
【請求項２５】
抗原に対する宿主体内の免疫応答促進の方法であって、
前記方法は、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物及び少なくとも１種の抗原を含むワクチン組成物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物を含む薬物組成物を該宿主に与えるステップを含み、
前記薬物組成物は、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、病原体抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な賦形剤のうちの１種又は複数種をさらに含み、
前記宿主がヒトでない、方法。
【請求項２６】
宿主の免疫細胞活性の調整強化のための方法であって、
前記方法は、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物及び少なくとも１種の抗原を含むワクチン組成物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物を含む薬物組成物を該宿主に与えるステップを含み、
前記薬物組成物は、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、病原体抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な賦形剤のうちの１種又は複数種をさらに含み、
前記宿主がヒトでない、方法。
【請求項２７】
宿主の疲労低減補助の方法であって、
前記方法は、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物及び少なくとも１種の抗原を含むワクチン組成物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物を含む薬物組成物を該宿主に与えるステップを含み、
前記薬物組成物は、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、病原体抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な賦形剤のうちの１種又は複数種をさらに含み、
前記宿主がヒトでない、方法。
【請求項２８】
宿主疼痛軽減のための方法であって、
前記方法は、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物及び少なくとも１種の抗原を含むワクチン組成物、又は請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により調製された免疫応答を強化するための複合物を含む薬物組成物を該宿主に与えるステップを含み、
前記薬物組成物は、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、病原体抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な賦形剤のうちの１種又は複数種をさらに含み、
前記宿主がヒトでない、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１８年０６月２９日に中国特許庁に提出された、出願番号が２０１８１０６９８０３３．６、名称が「免疫応答を強化するための複合物の調製方法」である中国特許出願、及び２０１８年０６月２９日に中国特許局に提出された、出願番号が２０１８１０７００７０８．６、名称が「免疫応答を強化するための複合物」である中国特許出願の優先権を主張しており、その全内容が援用により本出願に組み込まれている。
【０００２】
本開示は、生物医学の分野に関し、具体的には、免疫応答を強化するための複合物の調製方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）アジュバントは、現在、一般的には、ＰＩＣ（ｐｏｌｙｒｉｂｏｉｎｏｓｉｎｉｃ－ｐｏｌｙｒｉｂｏｃｙｔｏｉｄｙｌｉｃ ａｃｉｄ）、ＰＩＣＬＣ（ＰＩＣ ｗｉｔｈ ｐｏｌｙ－Ｌ－ｌｙｓｉｎｅ ａｎｄ ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌｃｅｌｌｕｌｏｓｅ）、$PIC_{12}U$（ＰＩＣ ｗｉｔｈ ｕｒｉｄｙｌｉｃ ａｃｉｄ ｉｎ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｎｔｅｒｖａｌ、商品名Ａｍｐｌｉｇｅｎ）、及びＰＩＣＫＣａ（（ＰＩＣ－ｋａｎａｍｙｃｉｎ－$CaCl_2$）を含むと考えられており、複数種のパターン認識受容体（ＰＲＲｓ）のリガンドであり、一方、免疫反応を強化させ、他方、免疫タイプを変えることにより、予防的ワクチンが治療的ワクチンとなることを可能にする。
【０００４】
ＰＩＣ（ポリイノシン）は、前世紀６０年代に米国のメルク社により開発されたものである。ハツカネズミにおいて、ＰＩＣはＩＦＮ－αインデューサであり、抗ウイルス活性を有する。ＰＩＣは、ハツカネズミの鼻腔及び肺を致命的な感染から保護することができる。しかしながら、ＰＩＣに対する霊長類動物及びヒト血清ヌクレアーゼの分解のため、ＰＩＣ構造の安定性を低減させ、極めて少量のＩＦＮ－αだけを産生し、抗腫瘍活性も有さない。
【０００５】
ＰＩＣＬＣ（ポリイノシン＋リジン＋カルボキシメチルセルロース）は、Ｌｅｖｙ ＨＢらが前世紀７０年代に開発されたものであり、即ち、ＰＩＣとポリリジン（ＰｏｌｙＬ－ｌｙｓｉｎｅ、相対分子質量２７ ０００）とカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ、相対分子質量７００ ０００）とのコンジュゲートであり、相対分子質量を大きく増大しており、ＰＩＣよりも霊長目動物のヌクレアーゼによる加水分解を５－１０倍抵抗することができ、且つ、猿体内で顕著なインターフェロン（１５）を産生する。ＰＩＣＬＣについての予備臨床研究から明らかなように、治療用量だけで中度から重度の反応を引き起こし、熱が出ること（１００％）、筋肉痛（５０％）、低血圧（５０％）、白血球の大幅な減少などがある。これは、分子量が大きいと毒性が大きいという誤解の原因となる。
【０００６】
$PIC_{12}U$は前世紀７０年代半ばに米国のジョンズホプキンス大学で開発されたものであり、ＰＩＣ鎖の一定の位置にウラシルヌクレオチドを挿入したものである。効力がＰＩＣと類似するものの、毒性が比較的少ない。２０１２年８月にＨｅｍｉｓｐｈｅｒｘ生物薬品公司は、さらなるオリジナルの臨床研究資料を提出したが、安全性及び有効性についての資料が不足することにより、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）により承認されていない。
【０００７】
ＰＩＣＫＣａは、抗生物質であるカナマイシンを含有し、カナマイシンは耳毒性を有し、且つワクチン中の含有量が国立薬局方により規定された基準を超える。
【０００８】
このことからわかるように、単なるＰＩＣは、ヒトを含む霊長類以上の動物に利用できず、一方、$PIC_{12}U$は、効果が低いことにより米国ＦＤＡにより承認されておらず、

実際には、ＰＩＣＬＣは極めて高い副作用を有する。
【０００９】
以上に鑑み、特に本開示を提案している。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本開示は、新規複合物に関し、且つ該複合物の調製、応用などの点について研究する。
【００１１】
発明者の以前の研究では、ＰＩＣ、カナマイシン、塩化カルシウムを採用してワクチンアジュバント（商品名はピカアジュバント又はＰＩＫＡアジュバントと呼ばれる）を調製している。カナマイシンを使用することは、それに含有する４個のアミノ基がＰＩＣ中のリン酸基と結合してその構造を安定化させるためであり、しかし、該商品は抗生物質を含有するのでワクチンにおける応用が制限されてしまう。
【００１２】
さらに、発明者は、カナマイシンの代わりとしてキトサン（塩酸塩）を使用しても、同様にカチオン安定剤の作用を果たせることを見出したが、しかしながら、キトサン（塩酸塩）の分子量が大きく、人体により吸収されにくく、このため、満足のいく薬効を取得しにくい。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
したがって、本開示は、免疫応答を強化するための複合物を提供する。該複合物は、少なくとも以下の成分から適切な条件下で調製して得る：ポリイノシン、少なくとも１種のカチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩。
【００１４】
該複合物は、少なくとも以下の成分から適切な条件下で調製して得る：ポリイノシン、少なくとも１種のカチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩又は／及びマンガン塩。
【００１５】
ここで、前記カチオン安定剤は、分子量≦５ｋＤａの水溶性非抗生物質アミノ化合物、又は前記水溶性非抗生物質アミノ化合物とポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種とで形成されるグラフト物である。
【発明の効果】
【００１６】
従来技術に比べて、該複合物は、粘度及び分子質量が適当であり、簡便に製薬でき、化学的性質が安定的であり、長期間保管しても分解しにくく、安全に使用でき、該化合物は単独で使用するだけで、生体の非特異的免疫反応を顕著に向上させ、疾患を予防・治療する目的を達成させることができ、他の薬物と併用すると、より良好な抗腫瘍、抗ウイルス及び抗（スーパー）バクテリアの機能・効果を有し、患者により吸収されやすい。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
本開示の具体的な実施形態又は従来技術の技術案をより明確に説明するために、以下、具体的な実施形態又は従来技術の記述中に使用を必要とする図面について簡単な説明を行うが、明らかなように、以下の記述における図面は、本開示のいくつかの実施形態であり、当業者であれば、創造的な努力を必要とせずに、これらの図面に基づいて他の図面を取得することができる。
【図１】パミカ複合物の構造模式図である。Ａ：ＰｏｌｙＩ：Ｃ－ＣＯＳ－Ｃａ$^{2+}$の複合物の構造模式図；Ｂ：抗原（Ａｇ）＋複合物粒子の構造模式図；Ｃ：ＰｏｌｙＩ：Ｃ－ＣＯＳ－Ｃａ$^{2+}$＋Ａｇの複合物の構造模式図。
【図２】異なる時間加熱された後のＰＩＣの分子量電気泳動図である。
【図３】本開示の一実施例におけるパミカ複合物の酵素分解曲線である。

【図４】本開示の一実施例におけるパミカ複合物の融解曲線である。
【図５】本開示の一実施例における２４０－２６０ｎｍでの各物質の走査吸収スペクトルである。
【図６】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$複合物の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝５００ｎｍである。
【図７】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$複合物の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝２００ｎｍである。
【図８】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ－ＣａＣｌ$_2$複合物の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝２００ｎｍである。
【図９】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ－ＣａＣｌ$_2$複合物の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝１００ｎｍである。
【図１０】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$複合物とＴＰＰで形成されるナノ粒子の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝１０００ｎｍである。
【図１１】本開示の一実施例におけるＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$複合物とＴＰＰで形成されるナノ粒子の透過型電子顕微鏡像であり、ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝２００ｎｍである。
【図１２】本開示の一実施例においてアルミニウムアジュバント／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、ＡＤＶ２０／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、パミカ／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）をそれぞれ用いてハツカネズミを免疫してから２１日後、Ｅｌｉｓａ法により検出したマウス血清中のＩｇＧ抗体の検出図である。
【図１３】本開示の一実施例においてアルミニウムアジュバント／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、ＡＤＶ２０／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、パミカ／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）をそれぞれ用いてハツカネズミを免疫してから２１日後の体液免疫の状況であり、縦座標は足蹠腫脹：増加したミリ数（ｆｏｏｔｐａｄ　ｓｗｅａｌｌｉｎｇ：ｍｍ　ｉｎｃｒｅａｓｅ）である。
【図１４】本開示の一実施例におけるパミカ複合物及び完全フロイントアジュバントの、ＭＹＯ抗原対応抗体の調製における効果の比較である。
【図１５】本開示の一実施例におけるパミカ複合物及び完全フロイントアジュバントの、ＭＹＯ抗原対応抗体の調製における効果の比較である。
【図１６】本開示の一実施例におけるパミカ群によるマクロファージ貪食機能刺激の実験例の画像である。
【図１７】本開示の一実施例におけるＰＢＳ対照群のマクロファージ貪食機能刺激なしの実験例の画像である。
【図１８】異なる薬物による処理の場合の腫瘍体積の変化曲線である。図１８～２１は本開示の一実施例におけるパミカ粘膜免疫製剤の、担癌ハツカネズミＬＬ２肺癌モデルに対する抗癌作用の実験結果である。
【図１９】異なる薬物による処理の場合の腫瘍重量（投与後１４日の溶媒対照群の腫瘍体積は２２０１．０９±６８．０１ｍｍ^{3}に達し、投与後の１４日目に実験は終了する）。
【図２０】Ａ：溶媒対照、点鼻、２日に１回；Ｂ：シスプラチン（５ｍｇ／ｋｇ）、尾静脈注射、１週間に１回；Ｃ：Ｐａｍｉｃａ－１（即ちパミカ）、２００μｇ／匹、点鼻、２日に１回；Ｄ：Ｐａｍｉｃａ－１、２００μｇ／匹、点鼻（接種直後投与）、２日に１回；Ｅ：Ｐａｍｉｃａ－１、１５０μｇ／匹、点鼻、２日に１回；Ｆ：Ｐａｍｉｃａ－１、２００μｇ／匹、筋肉内注射、２日に１回；Ｇ：Ｐａｍｉｃａ－１＋シスプラチン、２００μｇ／匹＋５ｍｇ／ｋｇ、点鼻＋尾静脈注射、２日に１回＋１週間に１回；ｓｃａｌｅ　ｂａｒ＝１ｃｍである。
【図２１】マウス由来ＰＤ－１抗体の腫瘍抑制率である。
【図２２】腫瘍体積の変化曲線である。図２２～３５は、本開示の一実施例において４Ｔ１－ｌｕｃマウス乳腺上皮内癌モデルに対するパミカの生体内抗腫瘍効果である。
【図２３】マウスの体重の変化曲線である。
【図２４】異なる薬物による処理の、腫瘍重量に対する影響である。
【図２５】異なる薬物の影響を受けた腫瘍の写真である。

【図２６】異なる薬物による処理の、脾臓重量に対する影響である。
【図２７】異なる薬物の影響を受けた肺の正面の写真である。
【図２８】異なる薬物の影響を受けた肺の裏面の写真である。
【図２９】パミカ７日前群マウスの生物発光である。図２９～３５は、小動物イメージャーに表示された腫瘍部位、及び転移性病巣の生物発光強度の写真である。
【図３０】パミカ０日目群マウスの生物発光である。
【図３１】溶媒群マウスの生物発光である。
【図３２】２００μｇ／匹パミカ点鼻群マウスの生物発光である。
【図３３】３００μｇ／匹パミカ点鼻群マウスの生物発光である。
【図３４】２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群マウスの生物発光である。
【図３５】３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群マウスの生物発光である。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
本開示は、後で本開示のいくつかの実施態様の記述及びそれに含まれる実施例の詳細な内容からより容易に理解できる。
【００１９】
さらに本開示を叙述する前に、本開示は前記特定実施態様に制限されることはなく、これらの実施態様は必然的にさまざまであるためであることを理解すべきである。また、本明細書に使用されている用語は特定実施態様を説明するために過ぎず、制限するものとして機能するのではなく、本開示の範囲が添付の請求項にのみ制限されるためであることも理解すべきである。
【００２０】
用語の定義
本開示の詳細な内容を記述する前に、本明細書に使用されている複数の用語を理解すべきである。
【００２１】
「パミカ」という用語は、一般的には、ポリイノシン、カチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩（カルシウムイオン）を用いて調製して得る複合物を指し、該複合物の特定の物理及び免疫原性と無関係である。
【００２２】
「ポリイノシン」はポリイノシン酸、ポリイノシン酸ポリシチジル酸、ポリイノシン酸シチジル酸、ポリイノシン酸－ポリシチジル酸、ＰＩＣ又はＰｏｌｙＩ：Ｃとも呼ばれる。
【００２３】
本明細書で使用されている「免疫応答強化」という用語は、抗原物質に対する宿主の免疫反応を誘導又は強化する、もしくは免疫細胞の機能を強化する、又は免疫細胞による炎症性因子又はサイトカインの放出を促進する、又は病原性物質に対する宿主の抵抗力を向上させることを指す。
【００２４】
「免疫反応誘導」という用語は１つの免疫反応を刺激、開始又は誘導することを指す。
【００２５】
「免疫反応強化（ｐｏｔｅｎｔｉａｔｉｎｇ）」とは、既存の１つの免疫反応が改善、助長、補充、拡大、促進、増加又は延長されることを指す。
【００２６】
「免疫反応強化」という表現方式又は類似する表現方式の意味は、以前の免疫反応状態に比べて、免疫反応が向上、改善又は上昇することであり、宿主にとって有利であり、前記以前の免疫反応状態は、たとえば本開示の免疫原組成物を与える前の免疫反応状態である。
【００２７】
「個体」という用語は、ここで、「宿主」、「主体」及び「動物」と交換して使用され、ヒト及びすべての畜養（たとえば家畜やペット）や野生の動物及び禽鳥を含み、それは

、牛、馬、乳牛、豚、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、犬、猫、ウサギ、ラクダ、ロバ、鹿、貂、鶏、カモ、ガチョウ、七面鳥、及び軍鶏等を非限定的に含む。

【００２８】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及びこれらの抗体の抗原化合物結合断片を含み、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、二重特異性抗体、抗体最小認識単位、及びこれらの抗体と断片の一本鎖誘導体を含む。抗体のタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、及びＩｇＤを選択できる。さらに、「抗体」という用語は天然に発生する抗体及び非天然に発生する抗体を含み、たとえばキメラ型（ｃｈｉｍｅｒｉｃ）、二機能型（ｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）、ヒト化（ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体、及び関連する合成異性体形態（ｉｓｏｆｏｒｍｓ）を含む。「抗体」という用語は「免疫球タンパク質」と交換して使用され得る。

【００２９】

本明細書で使用されているように、「抗原化合物」という用語は、適切な場合に、免疫系により識別可能な（たとえば抗体に結合される、又は加工されることにより、細胞免疫反応を誘導する）任意の物質を指す。

【００３０】

本明細書で使用されているように、「抗原」は、細胞、細胞抽出物、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、核タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖、多糖抱合体、多糖のペプチドシミュレータ、脂肪、糖脂質、糖類、ウイルス、ウイルス抽出物、細菌、細菌抽出物、真菌、真菌抽出物、多細胞生物たとえば寄生虫、及びアレルゲンを含むが、これらに制限されない。抗原は、外因性（たとえば、該抗原を与えられる個体以外の他の由来、たとえば１つの異なる物種に由来する）又は内因性（たとえば、宿主の体内、たとえば体の疾患因子、癌抗原、ウイルス感染細胞により産生する抗原などに由来する）であってもよい。抗原は、天然型（たとえば天然に産生する）、合成型又は組換え型であってもよい。抗原は細胞抽出物、完全な細胞及び精製抗原を含み、ここで、「精製」という用語は、該抗原が、抗原が通常存在する環境及び／又は粗抽出物（たとえば抗原の培養形式）よりも豊富な形態を示すことを指す。

【００３１】

本明細書で使用されている「ワクチン組成物」という用語は、２つ又はより複数種の物質（たとえば抗原及びアジュバント）からなる組み合わせを指し、これらの物質が宿主に与えられるときに、共同で免疫反応を惹起する。

【００３２】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「オリゴペプチド」及び「タンパク質」などの用語は、本明細書において交換して使用可能であり、これらの意味は、任意の長さのアミノ酸ポリマーの形式であり、該ポリマー形式は、コード及び非コード性アミノ酸、化学又は生化学的に修飾された又は誘導されたアミノ酸及び修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドを含むことができる。

【００３３】

「免疫反応」という用語は、脊椎動物個体の免疫系の、抗原性又は免疫原性化合物に対する任意の反応を指す。典型的な免疫反応は、局所的及び全身的な細胞及び体液免疫反応を含むが、これらに制限されず、たとえば、ＣＤ８＋ＣＴＬｓの抗原特異的誘導作用を含める細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）反応、Ｔ－細胞増殖反応とサイトカイン放出作用を含めるヘルパーＴ－細胞反応、及び抗体反応を含めるＢ－細胞免疫反応を含む。

【００３４】

ここに使用される「アジュバント」という用語は、抗原化合物に対する宿主の免疫反応を増加又は変化する任意の物質又は物質の混合物を指す。

【００３５】

本明細書で使用されている「治療」という用語は、一般的には、所望の薬理及び／又は生理学的効果を得ることを指す。該効果は、疾患又は他の症状を完全及び／又は部分的に防止するという点から見ると、予防的なのものに属してもよく、及び／又は該効果は、疾

患及び／又は疾患により引き起こされる悪い効果を完全及び／又は部分的に安定化又は治癒するという点から見ると、治療的なものに属してもよい。本明細書で使用されている「治療」という用語は、個体（特に哺乳動物個体、より特にヒト）体内の疾患に対する任意の処理をカバーし、且つ（ａ）疾患に罹患する傾向の可能性があるが、疾患に罹患したと診断されていない個体に疾患又は症状が発生することを予防すること、（ｂ）疾患の症状を抑え、たとえば該疾患症状の進行を阻止し、又は疾患の症状を緩和させ、たとえば該疾患又は症状を解消すること、（ｃ）疾患感染性物質により産生する産物のレベル（たとえば毒素、抗原等）を低下させること、及び（ｄ）疾患感染性物質に対する不利な生理学的反応（たとえば熱が出ること、組織浮腫等）を低下させることを含む。

【００３６】

「薬学的に許容可能な塩」の化学物とは、該塩が薬用として許容可能であり、且つ親化合物の所望の薬理学的活性を有することを意味する。これらの塩は、以下を含む。（１）塩を合成する酸、たとえば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸と共同で形成する塩；又は、たとえば酢酸、プロピオン酸、カプロン酸、シクロペンタンプロパン酸、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、３－（４－ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、１，２－エタンジスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、４－クロロベンゼンスルホン酸、２－ナフタレンスルホン酸、４－トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、グルコヘプトン酸、４，４′－メチレンビス－（３－ヒドロキシ－２－エン－１－カルボン酸）、３－フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、第三級ブチル乳酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸などの有機酸等と共同で形成する塩；又は、（２）親化合物に存在する酸性質子がたとえばアルカリ金属の金属イオン、アルカリ土類の金属イオン又はアルミニウムイオンなどの金属イオンで置換される、又はたとえばエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、メチルグルカミン（Ｎ－ｍｅｔｈｙｌｇｌｕｃａｍｉｎｅ）等が配位した有機アルカリであるときに、形成される塩。

【００３７】

本開示の例示的な実施態様

本開示の一局面は、免疫応答を強化するための組み合わせ製品に関し、それは、ポリイノシン、少なくとも１種のカチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩を含み、

前記カチオン安定剤は、分子量≦５ｋＤａの水溶性非抗生物質アミノ化合物、又は前記水溶性非抗生物質アミノ化合物とポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種とで形成されるグラフト物である。

【００３８】

１つの重要な利点は、パミカを単独で使用するだけで、生体の非特異的免疫反応を強化させることができ、さらに特異的体液免疫反応及び細胞免疫反応を効果的に引き起こすことができ、それにより保護免疫力を高め、抗原物質と併用すると、より良好な効果を達成できることにある。

【００３９】

１つの重要な利点は、パミカが『中国薬局方』２０１５版四部「１１４１異常毒性の検査法」に合格でき、人体に安全に応用できることにある。未加熱処理の分子量のＰＩＣで調製される複合物（たとえばポリイノシン－アミノ化合物－塩化カルシウムアジュバント又はポリイノシン－アミノ化合物－塩化カルシウムアジュバントワクチン）は異常毒性の検出に合格できない。

【００４０】

１つの重要な利点は、パミカがより優れた化学及び／又は物理学的安定性を有し、このためより簡便に保存できることにある。

【００４１】

１つの重要な利点は、パミカがシグナル伝達経路を介して腫瘍細胞アポトーシスを促進することができ、免疫細胞を刺激して複数種のサイトカインを発現させ、且つ腫瘍細胞の微小環境を変化させ、免疫細胞が腫瘍細胞、ウイルス、細菌などの病原性物質を攻撃するようにすることもできることにある。

【００４２】

１つの重要な利点は、パミカが宿主により吸収されやすく、又は宿主細胞により貪食されやすいことにある。さらに、抗原をより多く細胞に組み込むことで、タンパク質及びポリペプチドにより引き起こされる免疫応答を強化することができる。

【００４３】

１つの重要な利点は、癌痛患者に対してパミカの鎮痛効果が顕著であることにある。

【００４４】

１つの重要な利点は、パミカがＨＰＶ感染者のウイルス力価を強陽性から陰性にすることができることにある。

【００４５】

１つの重要な利点は、不活性化ワクチンに対してパミカ＋ブルセラの保護効果が極めて良好であることにある。

【００４６】

なお、パミカは、単なる組成物ではなく、本開示の明細書の記載によれば、それは、新規構造の複合物である。

【００４７】

いくつかの実施形態では、前記カチオン安定剤の分子量は、また、４ｋＤａ、４．５ｋＤａ、３ｋＤａ、３．５ｋＤａ、２．５ｋＤａ、２ｋＤａ、１．５ｋＤａ、１ｋＤａ、５００Ｄａ、４００Ｄａ、３００Ｄａ、２００Ｄａ、及び１００Ｄａを選択してもよい。

【００４８】

いくつかの実施形態では、前記水溶性非抗生物質アミノ化合物は、キトサンオリゴ糖、キトオリゴ糖、グルコサミン、カチオン性リポソーム、ＤＥＡＥ－グルカン、ポリアクリルアミド、ポリアミン、テトラアミノフルベン、及びポリエチレンイミンのうちから選ばれる１種又は複数種である。

【００４９】

いくつかの実施形態では、前記カチオン安定剤は、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ）、キトサン塩酸塩とポリエチレングリコールのグラフト物（ＰＥＧ－ｇ－ＣＳ）、葉酸とキトサン塩酸塩のグラフト物（ＦＡ－ｇ－ＣＳ）、ガラクトースとポリエチレングリコールとポリエチレンイミンのグラフト物（ＧＡＬ－ｇ－ＰＥＧ－ｇ－ＰＥＩ）、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルとポリエチレンイミンのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ－ｇ－ＰＥＩ）、キトサンとポリエチレングリコールモノメチルエーテルとポリエチレンイミンのグラフト物（ＣＳ－ｇ－ＰＥＧ－ｇ－ＰＥＩ）、ポリエチレングリコールとポリエチレンイミンのグラフト物（ＰＥＩ－ｇ－ＰＥＧ）、キトサンオリゴ糖とポリエチレンイミンのグラフト物（ＰＥＩ－ｇ－ＣＯＳ）、キトサン塩酸塩とポリエチレンイミンのグラフト物（ＰＥＩ－ｇ－ＣＳ）、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＰＥＧ）、及びキトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールとポリエチレンイミンのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＰＥＧ－ｇ－ＰＥＩ）から選ばれる。

【００５０】

いくつかの実施形態では、前記カチオン安定剤は、キトサンオリゴ糖（ＣＯＳ）、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ）、及びキトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルとポリエチレンイミンのグラフト物（ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ－ｇ－ＰＥＩ）から選ばれる。

【００５１】

いくつかの実施形態では、前記グラフト物の分子量は≦５０ｋＤａである。

【００５２】

いくつかの実施形態では、前記グラフト物の分子量は、また、４５ｋＤａ、４０ｋＤａ、３５ｋＤａ、３０ｋＤａ、２５ｋＤａ、２０ｋＤａ、１５ｋＤａ、１０ｋＤａ、９ｋＤａ、８ｋＤａ、７ｋＤａ、８ｋＤａ、５ｋＤａ、４ｋＤａ、３ｋＤａ、２ｋＤａ、１ｋＤａ、５００Ｄａ、４００Ｄａ、３００Ｄａ、２００Ｄａ、及び１００Ｄａを選択してもよい。

【００５３】

いくつかの実施形態では、前記キトサンオリゴ糖の脱アセチル化度は≧７０％であり、また８０％、８５％、９０％又は９５％、好ましくは９０％～１００％を選択してもよい。

【００５４】

いくつかの実施形態では、キトサンオリゴ糖は、モノマー分子量が１６１、重合度が２－２０であり、使用される分子量の範囲が３２２－３２２０である。

【００５５】

いくつかの実施形態では、キトサンオリゴ糖、キトオリゴ糖、及びグルコサミンの分子量は≦３２００である。

【００５６】

いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、及びポリエチレンイミンの分子量は≦４００００であり、また３００００、２００００、１５０００、１００００、８０００、６０００、４０００、２０００、１５００、１０００又は５００を選択してもよい。

【００５７】

いくつかの実施形態では、前記可溶性カルシウム塩は$CaCl_2$及び／又は$CaNO_3$から選ばれる。

【００５８】

いくつかの実施形態では、前記ポリイノシンの分子量は１００ｂｐ～３０００ｂｐである。

【００５９】

いくつかの実施形態では、前記ポリイノシンの分子量は１００ｂｐ～１５００ｂｐである。

【００６０】

いくつかの実施形態では、前記組み合わせ製品は、ｐＨ調整剤、トリポリリン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、フェニルボロン酸、カテコール、緩衝塩／試薬及び水のうちの１種又は複数種をさらに含む。

【００６１】

いくつかの実施形態では、前記組み合わせ製品中の各成分は単独して包装し、

いくつかの実施形態では、前記組み合わせ製品中の少なくとも２種の成分は混合して一体に包装し、たとえば陽イオンと水及び／又は緩衝塩は一体に包装し、

いくつかの実施形態では、ポリイノシンは、その原料の形式、たとえばイノシン酸（ＰＩ）及びシチジル酸（ＰＣ）で包装する。

【００６２】

本開示の一局面によれば、本開示は、また、免疫応答を強化するための複合物に関し、それは、前記のような組み合わせ製品中の試薬から調製して得る。

【００６３】

いくつかの実施形態では、前記調製は溶液系にて行われ、且つ前記試薬中、前記ポリイノシンの濃度が０．１～１０ｍｇ／ｍｌであり、

ポリイノシンの濃度はグラフトの方式により溶解度を高めることができ、理論的には、より高濃度になることが可能であり、

いくつかの実施形態では、前記調製は溶液系にて行われ、且つ前記試薬中、前記ポリイノシンの濃度が０．５～５ｍｇ／ｍｌであり、また１ｍｇ／ｍｌ、２ｍｇ／ｍｌ、３ｍｇ／ｍｌ、４ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、６ｍｇ／ｍｌ、６．４ｍｇ／ｍｌ、７ｍｇ／ｍｌ、８ｍｇ／ｍｌ又は９ｍｇ／ｍｌを選択してもよい。

【００６４】
いくつかの実施形態では、前記調製は溶液系にて行われ、且つ前記試薬中、前記カチオン安定剤の濃度が０．５～５１．２ｍｇ／ｍｌであり、
いくつかの実施形態では、前記カチオン安定剤の濃度が０．８～２５．６ｍｇ／ｍｌであり、また１ｍｇ／ｍｌ、２ｍｇ／ｍｌ、３ｍｇ／ｍｌ、４ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、１５ｍｇ／ｍｌ又は２０ｍｇ／ｍｌを選択してもよい。
【００６５】
いくつかの実施形態では、前記調製は溶液系にて行われ、且つ前記試薬中、前記ポリイノシンと前記カチオン安定剤との質量比が１：０．８～２５．６であり、また、１：６．４又は１：１２．８を選択してもよい。
【００６６】
いくつかの実施形態では、前記調製は溶液系にて行われ、且つ前記試薬中、前記可溶性カルシウム塩中のカルシウムイオンの濃度が０．１～１ｍＭであり、また０．２ｍＭ、０．３ｍＭ、０．４ｍＭ、０．５ｍＭ、０．６ｍＭ、０．７ｍＭ、０．８ｍＭ又は０．９ｍＭを選択してもよい。
【００６７】
いくつかの実施形態では、前記複合物は溶液中に保存している。
前記溶液は、好ましくは緩衝溶液である。
【００６８】
いくつかの実施形態では、前記溶液はｐＨ＝５．０～７．２である。
【００６９】
いくつかの実施形態では、前記溶液はｐＨ＝５．９～６．９であり、また６．０、６．２、６．４、６．８、７．０、７．２、７．４、７．６又は７．８を選択してもよい。
【００７０】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、前記のような複合物の、免疫アジュバントとしての非治療的用途に関する。
【００７１】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、前記のような複合物の、抗体、ワクチン製剤又はワクチン組成物調製用の用途、又はワクチン補助材料又はワクチンアジュバント調製用の用途に関する。
【００７２】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、ワクチン組成物に関し、それは、前記のような複合物及び少なくとも１種の抗原を含有する。
【００７３】
いくつかの実施形態では、前記抗原は、ウイルス、細菌、タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸又は小分子－タンパク質結合物である。
【００７４】
いくつかの実施形態では、前記ワクチン組成物は、たとえば弱毒化ワクチン（たとえばウイルス又は細菌の弱毒化ワクチン）、不活性化ワクチン（たとえばウイルス又は細菌の不活性化ワクチン）、タンパク質ワクチン、多糖ワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、キメラベクターワクチン、ＤＮＡワクチン、ＲＮＡワクチン、ポリペプチドワクチン又は小分子－タンパク質結合物ワクチンである。
【００７５】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、前記のような複合物の、免疫細胞活性調整における応用に関し、前記応用は生体内又は生体外で行われる。
【００７６】
いくつかの実施形態では、前記免疫細胞活性調整は、具体的には、免疫細胞活性強化である。
【００７７】
いくつかの実施形態では、前記免疫細胞は、マクロファージ、リンパ球、及び樹枝状細

胞から選ばれる。
【００７８】
いくつかの実施形態では、前記免疫細胞活性調整強化は、前記免疫細胞による炎症性因子の放出を促進することである。
【００７９】
いくつかの実施形態では、前記炎症性因子は、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１２ｐ４０、ＩＬ－１８、ＩＬ－２２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αを含む。
【００８０】
いくつかの実施形態では、前記炎症性因子は、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αを含む。
【００８１】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、前記のような複合物の、腫瘍治療及び／又は予防、抗ウイルス、抗細菌、抗真菌、抗寄生虫、化学療法の副作用軽減、抗疲労又は免疫力向上、宿主疼痛緩和、抗原に対する宿主の免疫反応の促進のための薬物の調製における応用に関する。
【００８２】
いくつかの実施形態では、前記薬物は、注射投与剤型、呼吸器投与剤型、点鼻剤、皮膚投与剤型、粘膜投与剤型又は腔道投与剤型である。
【００８３】
いくつかの実施形態では、注射投与剤型は、たとえば、注射剤（静脈注射、筋肉内注射、皮下注射、及び皮内注射の複数種の注射経路を含む）から選ばれる。
【００８４】
いくつかの実施形態では、呼吸器投与剤型は、たとえば、噴霧剤、エアロゾル剤、及び粉末噴霧剤等から選ばれる。
【００８５】
いくつかの実施形態では、皮膚投与剤型は、たとえば、外用溶液剤、洗剤、塗り剤、軟膏剤、硬膏剤、ペースト剤、及び貼付剤等から選ばれ、投与後、局所的な作用を果たす、又は経皮的に吸収されて全身的な作用を発揮できる。
【００８６】
いくつかの実施形態では、粘膜投与剤型は、たとえば点眼剤、点鼻剤、眼用軟膏剤、含嗽剤、及び舌下錠剤等から選ばれ、粘膜投与は、局所的な作用を果たすか、又は粘膜を介して吸収されて全身的な作用を発揮できる。腔道投与剤型：たとえば座剤、及びエアロゾル剤等が挙げられ、直腸、膣、尿道、鼻腔、耳管等に用いられ、腔道投与は、局所的な作用を果たす、又は吸収されて全身的な作用を発揮できる。
【００８７】
いくつかの実施形態では、前記抗原は、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原を含む。
【００８８】
いくつかの実施形態では、前記宿主は哺乳動物である。
【００８９】
いくつかの実施形態では、前記宿主は霊長類動物である。
【００９０】
いくつかの実施形態では、前記宿主はヒトである。
【００９１】
いくつかの実施形態では、前記抗原がウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原である場合、前記薬物の１ドースあたりの薬物含有量が１～８ｍｇである。
【００９２】
いくつかの実施形態では、前記抗原が腫瘍抗原である場合、前記薬物の１ドースあたりの薬物含有量が１～１０ｍｇである。
【００９３】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、薬物組成物に関し、前記薬物組成物は前記

のような複合物を含み、前記薬物組成物は、免疫細胞治療薬、抗体治療薬、化学薬物、粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質、免疫調整剤、病原体抗原、パターン認識受容体のリガンド、及び薬学的に許容可能な賦形剤のうちの１種又は複数種をさらに含む。

【００９４】

いくつかの実施形態では、前記免疫細胞治療薬は、腫瘍浸潤リンパ球（ｔｕｍｏｒ ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ，ＴＩＬ）、樹枝状細胞（ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ，ＤＣ）、サイトカイン誘導キラー細胞（ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｉｎｄｕｃｅｄ ｋｉｌｌｅｒ，ＣＩＫ）、樹枝状細胞－サイトカイン誘導キラー細胞（ＤＣ－ＣＩＫ）、ナチュラルキラー細胞（ｎａｔｕｒａｌ ｋｉｌｌｅｒ ｃｅｌｌ、ＮＫ）、γδＴ細胞、ＣＤ３ＡＫ、ＣＡＲ－Ｔ、及びＴＣＲ－Ｔのうちから選ばれる１種又は複数種である。

【００９５】

いくつかの実施形態では、前記抗体治療薬は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤＬ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＣＤ抗原抗体から選ばれる。

【００９６】

いくつかの実施形態では、前記化学薬物は、アルキル化剤、抗代謝薬、抗腫瘍抗生物質、植物類抗腫瘍薬、ホルモン薬、およびその他の薬物のうちから選ばれる１種又は複数種であり、

ここで前記その他の薬物は、Ｌ－アスパラギナーゼ、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン類薬物、又は上記薬物の誘導体から選ばれる。

【００９７】

いくつかの実施形態では、前記アルキル化剤は、シクロホスファミド、ブスルファン、ダカルバジン、シスプラチン、メクロレタミン、メルファラン、ニトロソウレア、及び上記薬物の誘導体から選ばれ、

いくつかの実施形態では、前記抗代謝薬は、５－フルオロウラシル、メトトレキサート、シタラビン、アンシタビン、ヒドロキシ尿素、及び上記薬物の誘導体から選ばれ、

いくつかの実施形態では、前記抗腫瘍抗生物質は、アクチノマイシン、マイトマイシン、ビリルビン、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、及び上記薬物の誘導体から選ばれ、

いくつかの実施形態では、前記ホルモン薬は、性ホルモン、グルココルチコイド、及び上記薬物の誘導体から選ばれる。

【００９８】

いくつかの実施形態では、前記粘膜免疫吸収又は粘膜粘着を促進する物質は、アニオン界面活性剤（たとえばカルボン酸塩類、スルホン酸塩類、硫酸エステル類、及びリン酸エステル類等）、カチオン界面活性剤（たとえばアミン塩類、四級アンモニウム塩類、複素環類、及びオニウム塩類等）、両性イオン界面活性剤（たとえばカルボン酸塩型、スルホン酸塩型、リン酸エステル型、ベタイン型、イミダゾリン型、及びアミノ酸型等）、非イオン界面活性剤（たとえば、アルキルポリグリコシド型、ポリオキシエチレン型、ポリオール型、アルカノールアミド型、及びブロックポリエーテル型）、特殊界面活性剤（たとえばフッ素含有型、シリコン含有型、ホウ素含有型、及び高分子型等）、キレート化剤（たとえば、ポリリン酸塩、アミノカルボン酸、１，３－ジオン、ヒドロキシカルボン酸、及びポリアミン等）、粘着剤［水溶型粘着剤（たとえば、澱粉、デキストリン、ポリビニルアルコール、及びカルボキシメチルセルロース等）、ホットメルト型粘着剤（たとえばポリウレタン、ポリスチレン、ポリアクリレート、及びエチレン－酢酸ビニルコポリマー等）、溶剤型粘着剤（たとえばシェラック、及びブチルゴム等）、乳液型粘着剤（たとえば酢酸ビニル樹脂、アクリル樹脂、及び塩化ゴム等）、無溶剤液体粘着剤（たとえばエポキシ樹脂等）］、ポリ乳酸－グリコール酸コポリマー、デキストラン、及び多糖類のうちから選ばれる１種又は複数種である。

【００９９】

いくつかの実施形態では、前記免疫調整剤は、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞成長因子、リンパ性毒素、造血因子、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、インターフェロン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、インターロイキン（ＩＬ）、顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、及び幹細胞成長因子のうちから選ばれる１種又は複数種である。

【０１００】

いくつかの実施形態では、前記病原体抗原は、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原から選ばれる。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、前記腫瘍は、骨、骨接合部、筋肉、肺、気管、咽頭、鼻、心臓、脾臓、動脈、静脈、血液、毛細血管、リンパ節、リンパ管、リンパ液、口腔、咽頭、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸、肛門、虫垂、肝臓、胆、膵臓、耳下腺、舌下腺、泌尿腎臓、尿管、膀胱、尿道、卵巣、卵管、子宮、膣、外陰部、陰嚢、精巣、輸精管、陰茎、眼、耳、鼻、舌、皮膚、脳、脳幹、延髄、脊髄、脳脊液、神経、甲状腺、副甲状腺、副腎、下垂体、松果腺、膵島、胸腺、生殖腺、舌下腺、及び耳下腺のうちのいずれかが病変して生成した腫瘍を含む。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、前記細菌は、ブドウ球菌属、連鎖球菌属、リステリア菌属、エリジペロトリックス属、レニバクテリウム属、バシラス属、クロストリジウム属、マイコバクテリア属、放線菌属、ノカルディア属、コリネバクテリウム属、ロドコッカス属、炭疽菌、エリシペラス、破傷風菌、リステリア菌、気腫疽菌、結核菌、大腸菌、プロテウス、赤痢菌、肺炎桿菌、ブルセラ、ウェルシュ菌、インフルエンザ菌、パラインフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリス、アシネトバクター属、エルシニア属、レジオネラ・ニューモフィラ、百日咳菌、パラ百日咳菌、志賀赤痢菌属、パスツレラ属、コレラ菌、及びビブリオ・パラヘモリティカスのうちの１種又は複数種を含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、前記寄生虫は、消化管内寄生虫（たとえば回虫、カギムシ、サナダムシ、赤痢アメーバやランブル鞭毛虫等）、腔内寄生虫（たとえば膣トリコモナス）、肝内寄生虫（たとえば肝吸虫、エキノコックス）、肺寄生虫（たとえばウェステルマン肺吸虫）、脳組織寄生虫（たとえば有鉤嚢虫、トキソプラズマ）、血管内寄生虫（たとえば住血吸虫）、リンパ管内寄生虫（たとえば糸状虫）、筋肉組織寄生虫（たとえば旋毛虫幼虫）、細細胞内寄生虫（たとえばマラリア原虫、リーシュマニア原虫）、骨組織寄生虫（たとえば包虫；皮膚寄生虫、たとえばヒゼンダニ、ニキビダニ）、及び眼内寄生虫（たとえばテラジア種、有鉤嚢尾虫）のうちの１種又は複数種を含む。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、前記ウイルスは、アデノウイルス（ａｄｅｎｉｖｉｒｉｄａｅ）、アレナウイルス（ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、アストロウイルス（ａｓｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス（ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、カリシウイルス（ｃｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）、フラビウイルス（ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）、Ｄ型肝炎ウイルス（ｈｅｐａｔｉｔｉｓ　ｄｅｌｔａ　ｖｉｒｕｓ）、肝炎ウイルス（ｈｅｐｅｖｉｒｉｄａｅ）、モノネガウイルス（ｍｏｎｏｎｅｇａｖｉｒａｌｅｓ）、ニドウイルス（ｎｉｄｏｖｉｒａｌｅｓ）、小ＲＮＡウイルス（ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス（ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、パピローマウイルス（ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、パルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）、ポリオーマウイルス（ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｉｄａｅ）、ポックスウイルス（ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス（ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）又はトガウイルス（ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）のうちの１種又は複数種を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、前記ウイルスは、ヒトパピローマウイルス（Ｈｕｍａｎ　ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ）である。

【０１０６】
いくつかの実施形態では、前記真菌は、コクシジオイデス・イミチス、コクシジオイデス・ポサダシ、アジェロミセス・カプスラーツス、ヒストプラズマ・ズボアジ、ロボ真菌、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、ブラストマイセス・デルマチチジス、スポロトリックス・シェンキィ、ペニシリウム・マルネッフェイ、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・グラブラタ、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ルシタニアエ、ニューモシスチス・カリニ、アスペルギルス、エクソフィアラ・ジャンセルメイ、フォンセカエア・ペドロソイ、フォンセカ・コンパクタ、フィアロフォラ・ベルコーサ、エクソフィアラ・デルマチチヂス、ジェオトリクム・カンディデュム、シュードアレシェリア・ボイジイ、クリプトコックス・ネオフォルマンス、トリコスポロン、リゾプス・オリーゼ、ムコール・インディカス、アブシディア・コリムビフェラ、ハリサシカビモドキ、藻菌類、コニディオボルス・コロナトゥス、コニディオボルス・インコングルス、エンテロシトゾーン・ビエヌーシ、脳炎性胞子虫、リノスポリジウム・セーベリ、無色菌糸、及び黒色菌糸のうちの１種又は複数種を含む。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、前記パターン認識受容体のリガンドは、ＴＬＲ受容体のリガンド、ＲＬＲ受容体のリガンド、ＣＬＲ受容体のリガンド、及びＮＬＲ受容体のリガンドから選ばれる。
【０１０８】
いくつかの実施形態では、ＴＬＲ受容体と組み合わせるリガンドは、たとえば、ペプチドグリカン、ジグリカン、マンノビオース、リポペプチド、糖脂質、非定型リポ多糖、血清アミロイド、ＣＰＧ　ＤＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｓｓＲＮＡ、ＬＰＳ、ＰＧＮ、飽和脂肪酸、リポタイコ酸、レジスチン、ラクトフェリン、表面活性タンパク質、フラジェリン、ヒアルロン酸、ＲＮＡ関連抗原、及びＰｒｏｆｉｌｉｎ様分子等がある。
【０１０９】
いくつかの実施形態では、ＲＬＲ受容体と組み合わせるリガンドは、たとえば、ＲＮＡ、ＰＩＣ、ＰＩＣＬＣ、及びＰＩＣ１２ｕ等がある。
【０１１０】
いくつかの実施形態では、ＣＬＲ受容体と組み合わせるリガンドは、たとえば、真菌細胞壁表面でのマンノーズ、及びβ－グルカン等がある。
【０１１１】
いくつかの実施形態では、ＮＬＲ受容体と組み合わせるリガンドは、たとえば、ＭＤＰ、及びＭｅｓθ　ＤＡＰ等がある。
【０１１２】
本開示の一局面によれば、本開示は、また、免疫応答を強化するための複合物の調製方法をさらに開示し、
ポリイノシン、少なくとも１種のカチオン安定剤及び可溶性カルシウム塩を液体反応系中に接触させることを含み、
前記カチオン安定剤は、分子量≦５ｋＤａの水溶性非抗生物質アミノ化合物、又は前記水溶性非抗生物質アミノ化合物とポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種とで形成されるグラフト物である。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、前記ポリイノシンは、ポリシチジル酸及びポリイノシン酸が塩基ペアリング反応を経て得られるものである。
【０１１４】
いくつかの実施形態では、前記ポリシチジル酸、及びポリイノシン酸の分子量が、２．３万ダルトンよりも大きい。
【０１１５】
いくつかの実施形態では、前記ポリシチジル酸の分子量の範囲が、６．６万ダルトン～

６６万ダルトンである。
【０１１６】
いくつかの実施形態では、前記ポリイノシン酸の分子量の範囲が、６．６万ダルトン～６６万ダルトンである。
【０１１７】
いくつかの実施形態では、前記塩基ペアリング反応は、４０℃～５０℃の温度で行われ、また４１℃、４２℃、４３℃、４４℃、４５℃、４６℃、４７℃、４８℃又は４９℃を選択してもよい。
【０１１８】
いくつかの実施形態では、前記塩基ペアリング反応はｐＨ＝６．８～７．６で行われ、また７．０、７．２、又は７．４を選択してもよい。
【０１１９】
いくつかの実施形態では、接触反応を行う前、前記ポリイノシンを８０℃～９９℃で７０～１２０ｍｉｎ加熱し、
いくつかの実施形態では、温度は、また８２℃、８４℃、８６℃、８８℃、９０℃、９２℃、９４℃、９６℃又は９８℃を選択してもよく、
いくつかの実施形態では、加熱時間は、また、８０ｍｉｎ、９０ｍｉｎ、１００ｍｉｎ又は１１０ｍｉｎを選択してもよい。
【０１２０】
いくつかの実施形態では、前記液体反応系の温度は４０℃～５０℃であり、また４１℃、４２℃、４３℃、４４℃、４５℃、４６℃、４７℃、４８℃又は４９℃を選択してもよい。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、前記グラフト物の調製方法は、
まず、カルボニルジイミダゾールを用いてポリエチレングリコールモノメチルエーテル、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、葉酸、及びガラクトースのうちの１種又は複数種を活性化させ、次に、活性化済みの産物を用いて、イオン液体［ｂｍｉｍ］Ｃｌ中に前記水溶性非抗生物質アミノ化合物とグラフト反応を行うことを含む。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、前記グラフト物は、キトサンオリゴ糖とポリエチレングリコールモノメチルエーテルのグラフト物であり、まず、カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）を用いてポリエチレングリコールモノメチルエーテル（ＭＰＥＧ）を活性化させ、次に、活性化済みのＭＰＥＧを用いて、イオン液体［ｂｍｉｍ］Ｃｌ中にキトサンオリゴ糖（ＣＯＳ）とグラフト反応を行う。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、前記グラフト反応は、６０℃～８０℃、非酸化性雰囲気下で反応する。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、前記方法は、
架橋剤溶液を撹拌条件下で１滴ずつ、製造して得た複合物に加えて、反応系中にチンダル現象が現れることを観察すると、滴下を停止し、撹拌してナノ粒子を得ることをさらに含み、
前記架橋剤は、トリポリリン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、フェニルボロン酸、及びカテコールのうちから選ばれる少なくとも１種である。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、前記架橋剤溶液中に（病原体）抗原が含有される。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、前記方法は、前記複合物又は前記ナノ粒子を抗原と共インキュベートすることをさらに含む。
【０１２７】

いくつかの実施形態では、前記抗原はタンパク質又はポリペプチド抗原である。

【０１２８】

本開示の一局面によれば、本開示は、また、抗原に対する宿主体内の免疫反応促進、又は宿主免疫細胞活性の調整強化、又は宿主疲労軽減補助、又は宿主疼痛軽減のための方法に関し、該方法は、前記のような複合物、又は前記のようなワクチン組成物、又は前記のような薬物組成物を該宿主に与えることを含む。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、該宿主は、伝染病に罹患しており、且つ該抗原化合物を与えられることにより免疫反応を惹起され、それにより、該伝染病を引き起こす病原体に抵抗する。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、前記投与は、非経口注射、筋肉内注射、腹腔内注射、静脈注射、皮下注射、局所的投与、経皮投与又は皮内投与により行われる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、該宿主は、手術、化学療法や放射線療法又は免疫療法が失敗した、又は医療機関により治療を放棄されている腫瘍患者、ウイルス感染患者、細菌感染患者、寄生虫感染患者又は鼻炎患者である。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、前記方法は、手術、放射線療法、化学療法及び各種の免疫療法と併用することができ、又はウイルス感染患者、細菌感染患者、及び寄生虫感染患者の場合、従来の治療法と併用することもできる。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、前記疼痛は、微生物又は寄生虫感染により引き起こされる疼痛、癌により引き起こされる疼痛患者又は神経的な原因により引き起こされる疼痛である。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、前記抗原がウイルス、細菌、真菌又は寄生虫抗原である場合、前記薬物は１回あたり１～８ｍｇ／ｋｇ投与され、好ましくは、毎日又は１日又は２日又は３日おきに１回投与され、

前記抗原が腫瘍抗原である場合、前記薬物は、１回あたり１～１０ｍｇ／ｋｇ投与され、好ましくは、投与周期は、少なくとも３６０日、又は少なくとも１８０日、又は少なくとも６０日、又は少なくとも３０日である。

【０１３５】

本開示は、本開示に記載の方法により調製された、免疫応答を強化させるための複合物を提供する。

【０１３６】

本開示は、本開示に記載の方法により調製された、免疫応答を強化させるための複合物の、抗体、ワクチン製剤又はワクチン組成物の調製、免疫細胞活性強化、腫瘍治療及び／又は予防、抗ウイルス、抗細菌、抗真菌、抗寄生虫、化学療法の副作用軽減、抗疲労又は免疫力向上、宿主疼痛緩和、抗原に対する宿主の免疫反応の促進における応用を提供する。

【０１３７】

以下、実施例と組み合わせて本開示の実施態様を詳細に記述するが、当業者が理解できるように、以下の実施例は本開示を説明することにのみ用いられ、本開示の範囲を制限するものとみなすべきではない。実施例において、具体的な条件が明記されていない場合、一般的な条件又はメーカーにより推薦される条件に従って行う。使用する試薬又は器具は、製造者が明記されていない場合、すべて市販品として一般的な製品を得ることができる。

【０１３８】

実施例１　パミカの調製

一、パミカ複合物の調製

１、ＰＢＳ溶液（ｐＨ７．２）の調製

１．１　塩化ナトリウム溶液（０．８５％、１５００ｍｌ）の調製：塩化ナトリウム１

２．７５ｇを秤量し、２０００ｍｌメスシリンダーに入れて、水を注入することにより１５００ｍｌに定容した。

１．２　リン酸水素二ナトリウム溶液（０．００６ｍｏｌ／Ｌ、５００ｍｌ）の調製：リン酸水素二ナトリウム０．００６×０．５×１４１．９６＝０．４２５９ｇを秤量し、５００ｍｌメスフラスコに入れて、０．８５％生理食塩水を用いて５００ｍｌに定容した。

１．３　リン酸二水素ナトリウム溶液（０．００６ｍｏｌ／Ｌ、５００ｍｌ）の調製：リン酸二水素ナトリウム０．００６×０．５×１３７．９９＝０．４１４０ｇを秤量し、５００ｍｌメスフラスコに入れて、０．８５％生理食塩水を用いて５００ｍｌに定容した。

１．４　ｐＨ値が７．２のＰＢＳ溶液の調製：「１．２液」２７３．６ｍｌ＋「１．３液」１２６．４ｍｌを取った。

２、ＰＩＣ液（２．０ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｌ）の調製

２．１　ＰＩ　２．０ｍｇ／ｍｌ＊１００ｍｌ＊［１．０４／（１．０４＋１）］／９１．５％／（１－２．７％）＝１１４．５ｍｇを秤取して、２５０ｍｌ三角フラスコに入れ、５０ｍｌのＰＢＳ溶液を加えて溶解し、且つ４０－６０℃水浴を用いて平衡化した。

２．２　ＰＣ　２．０ｍｇ／ｍｌ＊１００ｍｌ＊［１／（１．０４＋１）］／９０．４％／（１－４．２％）＝１１３．２ｍｇを秤取して、２５０ｍｌ三角フラスコに入れ、５０ｍｌのＰＢＳ溶液を加えて溶解し、且つ４０－６０℃水浴を用いて平衡化した。

２．３　ＰＩＣ液の調製：５０ｍｌのＰＩ溶液を５０ｍｌのＰＣ溶液に注入して、且つ４５℃水浴で３０分間反応させた。

２．４　８０－９９℃でＰＩＣ液について分子量加熱を１５～３００分間行った。

３、塩化カルシウム溶液（０．１６ｍｏｌ／Ｌ、２５ｍｌ）の調製

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（ＭＷ：１４７．０２）０．５８８１ｇを秤取して、１００ｍｌ三角フラスコに入れ、約２５ｍｌの注射用水を加えて溶解し、且つ定容した。

４、ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧの調製

ここでＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧグラフト物の調製方法は以下のとおりである。キトサンオリゴ糖グラフトポリエチレングリコールモノメチルエーテル（ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ）グラフトコポリマーを調製し、これを補助材料として抗癌薬を調製した。

原理：カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）カップリング法を用いてＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧを調製した。まず、カルボニルジイミダゾールを用いてポリエチレングリコールモノメチルエーテル（ＭＰＥＧ）を活性化させ、活性化ＭＰＥＧを調製し、次に、活性化ＭＰＥＧとキトサンオリゴ糖（ＣＯＳ）を用いてイオン液体中に反応させ、ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧコポリマーを合成し、具体的な反応ステップは、以下の３つのステップを含む。

４．１　イオン液体１－ブチル－３－メチルイミダゾールクロリド塩（［ＢＭＩＭ］Ｃｌ）の調製

１－メチルイミダゾールとクロロブタンとを反応させて、イオン液体［ＢＭＩＭ］Ｃｌを調製し、合成反応の方程式は以下のとおりである。

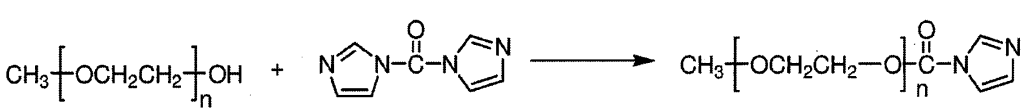
【化１】



４．２　ポリエチレングリコールモノメチルエーテル（ＭＰＥＧ、分子量１０００）の活性化

ＣＤＩを用いてＭＰＥＧを活性化させ、合成反応の方程式は以下のとおりである。

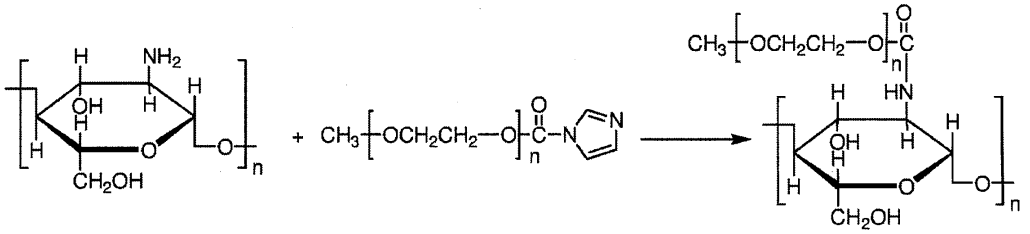
【化２】



４．３　ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧコポリマーの合成

活性化ＭＰＥＧとＣＯＳをイオン液体中にグラフト重合し、合成反応の方程式は以下のとおりである。

【化３】



４．４　器具及び試薬

メチルイミダゾール、クロロブタン、トルエン、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル、カルボニルジイミダゾール、無水エーテル、４Ａ分子篩（２－３ｍｍ）、ジメチルスルホキシド、１，４－ジオキサン、キトサンオリゴ糖、集熱式恒温磁気加熱撹拌器（ＤＦ－１０１Ｓ型）、電子天びん、電気加熱送風乾燥箱、循環水式真空ポンプ、自動三重効用純水蒸留器、真空乾燥箱、凍結乾燥機、ガラス器具用エアフロードライヤー、単相コンデンサスターターモーター、ロータリーベーン真空ポンプ、６連式マグネチックスターラー、セルロース透析バッグ、すぐに使える透析バッグ４５－２０００ＲＣ膜、三口フラスコ（５００ｍＬ、１０００ｍＬ）、ガラス栓、磁気ビーズ、使い捨て紙コップ、５００ｍＬビーカー、２Ｌビーカー、使い捨てスポイト、薬匙、試薬瓶、乾燥器等。

４．５　準備

４．５．１蒸留水の調製

ＳＺ－９７Ａ自動三重効用純水蒸留器を用いて三回蒸留水を調製した。

４．５．２　ガラス器皿の洗浄

三口フラスコ、ガラス栓、培養皿、磁気ビーズなどをまず水道水で洗い、次に、三回蒸留水でリンスし、最後に、ガラス器具用エアフロードライヤーに入れてベークした。

４．５．３　溶媒の乾燥：適量の分子篩を取って捨てビーカー中に入れ、適量のジメチルスルホキシド、１，４－ジオキサン、無水エーテルを取ってビーカーに入れ、水を除去した。

４．５．４　無水エーテルを冷凍しておく。

４．６．　操作（各ステップの注意事項）：

４．６．１　イオン液体の調製

（１）１－メチルイミダゾール１００ｇ、クロロブタン１４８．５ｍＬをそれぞれ取り、５００ｍＬの三口フラスコに順次加え、凝縮管を取り付けて、アルゴンガスを３０ｍｉｎ投入し、磁気撹拌して、油浴で８０℃に加熱し、２４ｈ反応させた。

（２）反応終了後、取り出して、室温に冷却し、－１８℃の冷蔵庫に入れて２ｈ冷凍し、溶液の層状化が見られると、上層の液体（主にクロロブタンを除去する）を捨てた。

（３）８０℃の送風乾燥箱に入れて、固体が完全に融解すると、熱いうちに適量のトルエンを加えて、振るってトルエンと溶液を十分に混合し、室温に冷却し、冷蔵庫に入れて冷凍し、取り出して、上層の液体（１－メチルイミダゾール、クロロブタンをトルエンに溶解して、トルエン、１－メチルイミダゾール、クロロブタンを除去する）を捨てた。

（４）さらにステップ（３）を２回繰り返して、未反応のクロロブタンを完全に除去した。

（５）サンプルを真空乾燥箱に入れ、９０℃に加熱し、完全に融解した後、９０℃で８ｈ真空乾燥させ（トルエン除去）、取り出して室温まで放冷し、次に乾燥器に入れて使用に備えた。

４．６．２　ＭＰＥＧの活性化

（１）ジメチルスルホキシド１０ｍＬ、１，４－ジオキサン２０ｍＬを取って５００ｍＬ三口フラスコに入れ、磁気撹拌し、ＭＰＥＧ　２０ｇを加えて、ＭＰＥＧが完全に融解すると、ＣＤＩ　３．２４ｇを加え、水浴で３７℃に加熱して１８ｈ反応させた。

（２）反応完了後、氷水浴、磁気撹拌の条件下で、サンプルを予冷された無水エーテルに加えて、ラップフィルムでビーカー口を覆い、サンプルを冷蔵庫に３０ｍｉｎ放置した。

（３）３０ｍｉｎ後取り出して、上層の溶液を捨てて、沈殿物に予冷された無水エーテルを加え、３０ｍｉｎ磁気撹拌して、冷蔵庫に３０ｍｉｎ放置した。

（４）さらにステップ（３）を２回繰り返して、未反応のＣＤＩを洗浄により十分に除去した。

（５）上層の溶液を捨てて、４０℃の送風乾燥箱に６ｈ放置し、エチルエーテルを予備除去した。

（６）４０℃の真空乾燥箱に入れて２．５ｈ真空乾燥し、エチルエーテルを十分に除去し、取り出して室温まで放冷した後、さらに乾燥器に入れて使用に備えた。

４．６．３　ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧの調製

（１）イオン液体を８０℃の送風乾燥箱で融解した。

（２）イオン液体１０５ｇを秤取して三口フラスコに入れ、油浴で７０℃に加熱し、アルゴンガスを導入して、ＣＯＳ　９ｇを緩やかに加え、ＣＯＳが完全に溶解すると、活性化ＭＰＥＧ　６ｇを加え、磁気撹拌して、すべての原料の添加が完了した後、アルゴンガス保護下で６ｈ反応させ、反応完了後、反応瓶を室温に冷却した。

（３）まず、クリップを用いて透析バッグの一方側を挟み、適量の蒸留水を加えて３回洗浄し、且つ透析バッグが水を漏らすか否かを検査し、その後、反応瓶中のサンプルを透析バッグ（分画分子量は２０００である）に入れて７２時間透析し、蒸留水の使用量について透析バッグを超えるのが好ましい。一日目に２～３ｈおきに水を１回交換し、それ以降、１２ｈおきに水を１回交換した。

（４）透析完了後、溶液を１０００ｍＬ三口フラスコに加え、且つ水浴鍋に置き、減圧蒸留装置を取り付けて、蒸留温度を室温から２５℃、３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃に勾配昇温し、５０ｍＬ程度が残されるまで蒸留すると、蒸留装置を取り外し、熱いうちに、サンプルを使い捨てビーカーに注入して、使い捨て手袋を用いてカップ開口部をカバーし、－１８℃の冷蔵庫に入れて８時間以上冷凍した。

（５）凍結乾燥機で３０ｍｉｎ予冷し、冷凍温度は－５２℃に達する。サンプルを粉砕して、培養皿に敷き、予冷された凍結乾燥機に入れて、－５２℃で３０ｈ凍結乾燥させた。冷凍完了後、装置を停止して、サンプルを取り出し、重量を量り、試薬袋に入れて、乾燥器に入れて保存した。

（６）　赤外線分析：適量のサンプルを取り、臭化カリウムを用いて打錠し、走査範囲を４００～４０００ｃｍ$^{-1}$として、サンプルの赤外線スペクトルを測定した。

５、ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧのＰＢＳ液の調製

５．１　５．１２％：０．１２８ｇのＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧを秤取して５ｍｌ遠心分離管に入れ、ＰＢＳ液を加えて溶解し、且つ２．５ｍｌに定容した。

５．２　２．５６％：５．１２％液１．２ｍｌ＋ＰＢＳ液１．２ｍｌ；

５．３　１．２８％：２．５６％液１．２ｍｌ＋ＰＢＳ液１．２ｍｌ；

５．４　０．６４％：１．２８％液１．２ｍｌ＋ＰＢＳ液１．２ｍｌ；

５．５　０．３２％：０．６４％液１．２ｍｌ＋ＰＢＳ液１．２ｍｌ；

５．６　０．１６％：０．３２％液１．２ｍｌ＋ＰＢＳ液１．２ｍｌ；

６、ＰＩＣ、ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ及び塩化カルシウム溶液のパミカ溶液の調製

６．１　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃の水浴鍋に入れ、５．１　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

６．２　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃水浴鍋に入れ、５．２　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

６．３　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃水浴鍋に入れ、５．３　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

６．４　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃水浴鍋に入れ、５．４　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

６．５　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃水浴鍋に入れ、５．５　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

６．６　ＰＩＣ液１．０ｍｌを取って４５℃水浴鍋に入れ、５．６　１．０ｍｌを滴下し、次に塩化カルシウム溶液０．００５ｍｌを滴下してその最終濃度を０．０００４ｍｏｌ／Ｌとした。

７、結果

ＭＰＥＧ、ＰＥＧ、ＰＥＩなどはすべて良好な水溶性を有し、且つ多くの有機物成分と良好な相溶性を有する。本実施例では、ＭＰＥＧを例に、ＭＰＥＧとカチオン安定剤（たとえばキトサンオリゴ糖）のグラフト物及びＰＩＣを用いて調製し、相容性が顕著に向上し、理論的には、ＰＥＧなどのグラフトキトサンなどのカチオン安定剤及びＰＩＣを用いて調製しても、相容性が向上し、カチオン安定剤上にＰＥＧがグラフトされると、グラフト物自体にもＰＥＧの特性を備える。

【表１】

番号	PIC (2mg/ml)	COS-g-MPEG の PBS 溶液						$CaCl_2$ (0.16mol/L)	結果	
		0.16% (1.6 mg/ml	0.32% (3.2 mg/ml	0.64% (6.4 mg/ml	1.28% (12.8 mg/ml	2.56% (25.6 mg/ml	5.12% (51.2 mg/ml		溶解度	増色効果 (ﾎﾟﾘｲﾉｼﾝ基準で≧55%)
6.1	1.0ml	1.0ml						0.005ml	澄明溶液	65.3%
6.2	1.0ml		1.0ml					0.005ml	澄明溶液	70.6%
6.3	1.0ml			1.0ml				0.005ml	澄明溶液	62.7%
6.4	1.0ml				1.0ml			0.005ml	澄明溶液	64.7%
6.5	1.0ml					1.0ml		0.005ml	澄明溶液	44.1%
6.6	1.0ml						1.0m	0.005ml	澄明溶液	15.6%

試験結果から明らかなように、ＰＩＣ：ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧは、１：２５．６ｍｇでも透明溶液であるが、増色効果の結果から明らかなように、グラフト物が多いほど好ましいわけではなく、また、我々は２０１８－０５－０７に調製されたサンプル６．１、６．、６．３、６．４、６．５、６．６を室温で放置し、２０１８－０５－１４に観察したところ、６．６のサンプルにフレーク状析出物が現れて、再溶解ができないことを見出した。総合的に考慮すると、我々は、パミカ処方中のＰＩＣ及びＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧの処方を１：６．４ｍｇの範囲内に制限する。

二、パミカナノ粒子の調製

薬用基準を満たすトリポリリン酸ナトリウム（ＴＰＰ）を購入し、適切な割合でＰＩＣ－ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ－ＣａＣｌ$_2$複合物を恒温磁気撹拌器にて一定の回転数で等速撹拌し、異なる濃度のＴＰＰ水溶液を１滴ずつ滴下し、顕著な乳光が観察されると、すぐに停止し、反応を３０分間維持し、イオン架橋自己組織化によりナノ粒子を形成し、高速遠心分離を経て、粒径が１０００ｎｍ未満のものを取得した。且つ各種の検定をしたところ、合格する。

三、ポリペプチド又はタンパク質抗原ナノ粒子

態様１：ポリペプチド又はタンパク質抗原を上記ナノ粒子の形成過程に加えた。各成分がＰＥＧ－ＣＯＳグラフト物又はＣＯＳ基質中に入り、ポリペプチド又はタンパク質抗原がＴＰＰ含有水相に入って結合される。ここで各成分を必ず適切な割合にし、且つ一定のｐＨ環境下で、磁気ボールで撹拌して結合し、複合物及びナノ粒子を形成する。

態様２：ポリペプチド又はタンパク質抗原を上記予め形成された複合物及びナノ粒子とインキュベートし、ポリペプチド又はタンパク質抗原を複合物及びナノ粒子の表面に結合させ、ポリペプチド又はポリペプチド又はタンパク質抗原を上記複合物及びナノ粒子と一定の割合で混合し、５分間磁気撹拌し、室温で１時間放置し、グリセリン基質下、２０００００ｒｃｆ、４℃で２時間超速遠心分離して取得した。

態様１／態様２の複合物及びナノ粒子については、各検定に合格する必要がある。

四、パミカの製剤形式

上記複合物／グラフト物含有複合物／複合物ナノ粒子／ポリペプチド又はタンパク質抗原ナノ粒子を無菌で適切な／合格する包材に包装し、注射、噴霧剤又はエアロゾル剤などの各種の剤型を調製し、各種の製品検定をしたところ合格すると、製品を調製した。

上記複合物／グラフト物含有複合物／複合物ナノ粒子／ポリペプチド又はタンパク質抗原ナノ粒子を無菌で適切な／合格する包材に包装し、膏剤を調製した。

噴霧剤に調製した実施例：上記方法によりパミカを調製し、その溶液を噴霧剤瓶に包装し、２０瓶を取り、それぞれ薬液の噴霧モード検出及び霧滴分布のデータ検出を行った。

噴霧モードを下記表に示す。

【表２】

ｸﾗｲｱﾝﾄ薬液		D1(cm)最大値	D2(cm)最小値	噴射距離(cm)	楕円度(D1/D2)	平均楕円度	全噴霧角度°	平均全噴霧角度
APF 100 snap on NTS	1#	4.4	4.1	5	1.07	1.20	46	43
	2#	4.2	3.0	5	1.40		40	
	3#	4.5	3.5	5	1.29		44	
	4#	4.5	3.6	5	1.25		44	
	5#	4.2	3.7	5	1.14		43	
	6#	4.0	3.0	5	1.33		39	
	7#	4.7	4.1	5	1.15		48	
	8#	4.5	4.0	5	1.13		46	
	9#	4.0	3.7	5	1.08		42	
	10#	4.0	3.5	5	1.14		41	

注：最長径と最短径との比から噴霧の形態を評価する（１．０に近いほど、噴霧形態が良好である）。

霧滴分布を下記表に示す。

【表３】

ｸﾗｲｱﾝﾄ薬液		<10μm(%)	D10(μm)	D50(μm)	D90(μm)	SPAN	平均
APF 100 snap on NTS	1#	1.2	55.32	115.28	187.52	1.15	1.1
	2#	1.1	48.37	98.36	166.84	1.20	
	3#	1.0	54.13	115.22	192.30	1.20	
	4#	1.3	42.18	89.78	132.54	1.01	
	5#	1.0	60.77	123.53	190.03	1.05	
	6#	1.3	51.81	111.83	173.90	1.09	
	7#	1.3	56.99	120.23	183.28	1.05	
	8#	1.4	43.88	87.50	126.41	0.94	
	9#	1.2	53.66	115.04	195.98	1.24	
	10#	1.2	53.28	125.02	197.17	1.15	

【０１３９】

実施例２　パミカとＰＥＩとの組み合わせによる溶解度増加試験

「パミカとＰＥＧとの組み合わせ」の調製方法（即ち実施例１）を参照して調製し、パミカ中のＣＯＳ使用量を増加すると沈殿が現れ、その投与の均一性に影響するが、ＰＥＩを添加すると、沈殿の出現を回避でき、且つＣＯＳの使用量を増加すると、その免疫効果をさらに強化させる。

【表４】

名称	1mlあたりのｻﾝﾌﾟﾙ中の各成分の含有量				結果
	PIC(mg/ml)	COS(mg/ml)	PEI(mg/ml)	$CaCl_2$(mol/L)	
１群	1	0.4	0	0.0004	澄明溶液
	1	0.8	0	0.0004	澄明溶液
	1	1.6	0	0.0004	沈殿
２群	1	0.8	32	0.0004	澄明溶液
	1	1.6	32	0.0004	澄明溶液
	1	3.2	32	0.0004	澄明溶液
	1	6.4	32	0.0004	澄明溶液

試験から、パミカは、ＰＥＩと組み合わせると、ＰＩＣ中のＣＯＳ溶解度が１．６ｍｇ／ｍｌから６．４ｍｇ／ｍｌに向上し、少なくとも４倍向上したことが明らかになる。

ＣＮ１０５３９６１３０Ａ特許出願文献には、「ポリイノシン－アミノ化合物－塩化カルシウムアジュバント及びポリイノシン－アミノ化合物－塩化カルシウムアジュバントを含有するワクチン」が開示されており、且つ非抗生物質アミノ化合物は選択的にキトサンであることが開示されている。

本比較例では、実施例１におけるキトサンオリゴ糖を水溶性キトサン（キトサン塩酸塩、略語ＣＳ）に代え、それにより、投与均一性の点についての両方の影響を比較し、結果を下記表に示す。

【表５】

名称	PIC(mg/ml)	CS (mg/ml	COS (mg/ml	$CaCl_2$(mol/L)	結果
１群	1	0.4	0	0.0004	沈殿
	1	0.8	0	0.0004	沈殿
２群	1	0	0.4	0.0004	澄明溶液
	1	0	0.8	0.0004	澄明溶液

研究したところ、水溶性キトサンを添加することにより、調製過程に沈殿が現れて、且つ揺動により分散させないことを引き起こし、その投与均一性に影響し、一方、キトサンオリゴ糖を用いると上記問題を解決できる。さらに、キトサングラフトＰＥＧ又は水溶性キトサンはともに小分子量キトサンオリゴ糖に分解されて初めて人体により容易に吸収することができ、一方、キトサンオリゴ糖は直接吸収可能であることを見出した。

【０１４０】

実施例３　ＰＩＣ加熱及び分子量検出

実施例１の調製方法により、ＰＩＣ液を調製し、ＰＩＣ液２６０ｍｌを取って２０ｍｌ／本、合計１３本個包装し、恒温水浴鍋の温度が８０－９９℃に上昇すると（好ましくは９０℃）、サンプル１２本を入れ、入れた後、計時し始めてそれぞれ１０分間（バンド３）、２０分間（バンド４）、３０分間（バンド５）、４０分間（バンド６）、５０分間（バンド７）、６０分間（バンド９）、７０分間（バンド１０）、８０分間（バンド１１）、９０分間（バンド１２）、１００分間（バンド１３）、１１０分間（バンド１４）、及び１２０分間（バンド１５）持続し、１回あたり１本取り出した。未加熱のサンプルはバンド２であった。

７０－１２０分間（好ましくは加熱時間１２０分間）加熱したＰＩＣで調製された複合物（パミカ）及びそのワクチンを取り、『中国薬局方』２０１５版四部「１１４１異常毒性検査法」によれば、これらは、すべてマウス及びモルモット異常毒性検出に合格し、パミカを調製するために使用されるＰＩＣは、９０℃で少なくとも７０分間加熱して初めて製品の調製に用いるべきであり、好ましくは９０℃で、加熱時間は１２０分間である。未加熱ＰＩＣ（バンド２）及び６０分間（バンド９）加熱したものを選択して調製された複合物及びそのワクチンは、モルモット異常毒性検出に合格できなかった。結果を図２に示し、対照バンド１：下から上へそれぞれ１００ｂｐ、３００ｂｐ、５００ｂｐ、７５０ｂｐ、１０００ｂｐ、１５００ｂｐ、２０００ｂｐ、３０００ｂｐ、５０００ｂｐであった。対照バンド８：下から上へそれぞれ１００ｂｐ、２００ｂｐ、３００ｂｐ、４００ｂｐ、５００ｂｐ、６００ｂｐ、７００ｂｐ、８００ｂｐ、９００ｂｐ、１０００ｂｐであった。

【０１４１】

実施例４　パミカ複合物の酵素分解試験

方法：本開示の実施例１の調製方法によりパミカ複合物を調製し、調製完了後、パミカ複合物及びポリイノシン注射液（ポリイノシン－カナマイシン－塩化カルシウム）のそれぞれのサンプルをそれぞれ０．０４ｍｇ／ｍｌに希釈し、１３個の１０ｍｌ管を取り、管ごとに５ｍｌのサンプル希釈液を加え、さらに管ごとにｓｉｇｍａのＲＮＡ酵素（商品番号Ｒ４６４２）２５μｇをそれぞれ加えて、３７℃水浴鍋に放置し、５ｍｉｎおきに１本取り出して、２４８ｎｍでのＯＤ値を測定し、曲線を描画した。

結果を図３に示す。

【０１４２】

実施例５　本開示のパミカ複合物が新規構造の複合物であること

（一）融解曲線のピーク値の測定

方法：本開示のパミカ複合物及びポリイノシン注射液のそれぞれのサンプルを０．０４ｍｇ／ｍｌに希釈し、２５０ｍｌ試薬瓶に移し、水浴鍋に置き、水浴鍋を持続的に昇温した。５℃おきに、３ｍｌを取って石英キュベットに入れて、２４８ｎｍでのＯＤ値を測定し、曲線を描画した。

結果を図４に示す。

試験の測定結果から明らかなように、本開示のパミカ複合物（ＰＩＣ－カチオン安定剤－塩化カルシウム）の融解曲線のピーク値は８５℃であり、ポリイノシン注射液（ＰＩＣ－カナマイシン－塩化カルシウム）の融解曲線のピーク値は８０℃であり、これは、本開示のパミカ複合物が新規複合物であることを示した。

（二）吸収ピーク走査

実施例１の調製方法により、ＰＩ溶液、ＰＣ溶液、ＰＩＣ溶液、ＰＩＣ－ＣＯＳ溶液、ＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$溶液をそれぞれ調製し、ＰＢＳ緩衝液を用いて上記サンプルをそれぞれ０．０４ｍｇ／ｍｌに希釈し、紫外線を用いてそれらの走査吸収スペクトルをそれぞれ測定し、図５の結果から、２４０－２６０ｎｍで現れるピークが降順で順次ＰＩ、ＰＣ、ＰＩＣ、ＰＩＣ－ＣＯＳ、ＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$であり、ここでＰＩＣ－ＣＯＳとＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$ピークが重なることを示し、これは、本開示のパミカ複合物（ＰＩＣ－ＣＯＳ－ＣａＣｌ$_2$）が新規構造の複合物であることを示した。

【０１４３】

実施例６　ＰＩＣ、ＣＯＳ及び塩化カルシウムで形成された一部のナノ粒子

実施例１の方法によりパミカを調製し、ここでカチオン安定剤はＣＯＳを用い、金属カチオンは塩化カルシウムを用いた。透過型電子顕微鏡写真（図６、図７）から分かるように、パミカ溶液中にナノ粒子が形成されており、そのほとんどは球状であり、粒径が５０ｎｍ程度であり、比較的均一であり、少数は角形であり、辺長が１００ｎｍを超える。

【０１４４】

実施例７　ＰＩＣ、ＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧ及び塩化カルシウムで形成された一部のナノ粒子

実施例１の方法によりパミカを調製し、ここでカチオン安定剤はＣＯＳ－ｇ－ＭＰＥＧを用い、金属カチオンは塩化カルシウムを用いた。透過型電子顕微鏡写真（図８、図９）から分かるように、パミカ溶液中にナノ粒子が形成されており、そのほとんどは角形であり、辺長が１００ｎｍを超え、少数は球状である。

【０１４５】

実施例８　ＰＩＣ、ＣＯＳ、ＴＰＰ及び塩化カルシウムで形成された一部のナノ粒子

ＣＯＳをリン酸塩緩衝溶液に溶解し、実施例１の方法によりＰＩＣのＴＰＰ溶液を調製し、ＰＩＣのＴＰＰ溶液を撹拌下でＣＯＳ溶液に緩やかに滴下し、次に、塩化カルシウム溶液を滴下した。透過型電子顕微鏡写真（図１０、図１１）からわかるように、形成されたナノ粒子は紡錘状である。

実施例５～８から、驚くべきことに、パミカ複合物溶液中に２種の状態の物質を同時に含有しており、１種はナノ粒子（電子顕微鏡結果）であり、もう１種は非ナノ粒子（実施例３の電気泳動結果）溶液であることを見出すことができた。

ナノ粒子の利点は、エンドサイトーシス作用を介さずに細胞膜を直接透過して、細胞内に入り、効き目が早いことであり、非ナノ粒子溶液は、エンドサイトーシスを介してしか細胞内に入られず、ナノ粒子よりも効き目が遅い。パミカは、エンドサイトーシスを介するモード、細胞に直接入るモードという２種のモードで効果を発揮できる。さらに、より重要なことは、ナノ粒子の構造では、パミカを保護し、それをヒトを含める霊長類以上の体内の血清中の核糖ヌクレアーゼによるＰＩＣの分解から守ることで、抗ウイルス・抗腫瘍の突破を達成させて、より大きな効果を取得することを期待することである。これらの効果により、パミカは、ヒトやマウスの抗癌効果のいずれに関しても、目立った効果を取得した。

【０１４６】

実験例　パミカ複合物の免疫効果に対する評価

下記実験例では、特に言及がない場合、パミカはすべて実施例１により調製されたＰＩＣ、ＣＯＳ及び塩化カルシウム溶液のパミカ溶液を指す。

【０１４７】

実験例１　組換えＢ型肝炎ワクチン［ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）］におけるパミカ複合物の免疫効果の評価

材料：ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）：２０μｇ／ｍｌ、パミカアジュバント：１ｍｇ／ｍｌ、ＡＤＶ２０アジュバント４００μｇ／ｍｌ、水酸化アルミニウムアジュバント：１０ｍｇ／ｍｌ、生理食塩水

アルミニウムアジュバント／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）：アルミニウムアジュバント０．０７ｍｌ＋ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）０．５ｍｌ＋生理食塩水０．４３ｍｌ

ＡＤＶ２０（サイトカインアジュバント）／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）：ＡＤＶ２０　０．２５ｍｌ＋ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）０．５ｍｌ＋生理食塩水０．２５ｍｌパミカアジュバント／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）：パミカアジュバント０．５ｍｌ＋ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）０．５ｍｌ

方法：アルミニウムアジュバント／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、ＡＤＶ２０（サイトカインアジュバント）／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）、パミカ／ｒＨＢｓＡｇ（ＣＨＯ）をそれぞれ用いて、０、１４日目に筋肉を介してハツカネズミを０．１ｍｌで免疫し、２１日目に、細胞免疫及び体液免疫の状況を検出した。

結果：本開示のパミカ複合物は、免疫効果が目立ち、特にＥＬＩＳＡ抗体及び細胞免疫のいずれも大幅に向上し、アルミニウムアジュバント及びＡＤＶ２０（サイトカインアジュバント）よりも明らかに優れており、パミカは、将来性が期待できる免疫アジュバントであり、詳細については図１２及び図１３を参照する。

【０１４８】

実験例２　不活性化ブルセラ抗原におけるパミカ複合物の免疫効果の評価

方法：ＰＢＳ、ポリイノシン注射液＋不活性化ブルセラ抗原、本開示のパミカ複合物＋不活性化ブルセラ抗原をそれぞれ用いてマウスを免疫し、０日目に１回免疫し、免疫してから４５日後、ブルセラ強毒株を用いてハツカネズミを攻撃し、毒株攻撃１５日後、ネズミを殺してマウス脾臓を摘出し、且つ脾臓のブルセラを３日間培養して計数し、本開示のパミカ複合物＋不活性化ブルセラ抗原の保護効力を評価した。

【表６】

群別 ﾈｽﾞﾐ番号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均値
空白対照群（log 値）	5.9	6.17	6.08	6.04	6.16	6.08	6.10	6.12	6.08
ﾎﾟﾘｲﾉｼﾝ注射液+不活性化ﾌﾞﾙｾﾗ抗原（log 値）	5.16	5.18	3.97	3.54	4.37	4.2	－	－	4.4
本開示のﾊﾟﾐｶ複合物+不活性化ﾌﾞﾙｾﾗ抗原(log 値)	2.59	2.78	3.32	3.11	2.88	2.9	3.81	3.02	3.05

結果：本開示のパミカ複合物は、免疫効果が目立ち、不活性化ブルセラ抗原の開発に関しては一定の将来性があり、本開示のパミカ複合物＋不活性化ブルセラ抗原は、空白対照群の細菌分離数とは３．０３個のｌｏｇほどの差を持ち、ポリイノシン注射液＋不活性化

ブルセラ抗原に比べて、分離数が１．３５の差を持ち、パミカ複合物の不活性化ブルセラの保護効果が目立つ。

【０１４９】

実験例３　パミカ複合物及びＭＹＯ抗原（ヒトミオグロビン）の、抗体調製における応用

材料：ＭＹＯ抗原（ヒトミオグロビン）、濃度１ｍｇ／ｍｌ

本開示のパミカ複合物、濃度１ｍｇ／ｍｌ

完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ、Ｓｉｇｍａ）

方法：２．３－２．５ｋｇのウサギを準備し、免疫前に陰性血を採取して血清を分離し対照とし、腹背部の皮下の複数の部位にそれぞれ異なるサンプルを注射した後、血清を分離して抗体検出を行った。ここで抗原＋アジュバントは０．５ｍｌ＋０．５ｍｌで調製し、１回あたりの免疫用量は１ｍｌであった。

結果

（１）本開示のパミカ複合物＋ＭＹＯ抗原、完全フロイントアジュバント＋ＭＹＯ抗原をそれぞれ用いてカイウサギを免疫し、７日おきに１回免疫注射した。完全フロイントアジュバントによる免疫を２回（１０日）追加すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は１３０００であり、完全フロイントアジュバントによる免疫を３回（１８日）追加すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は３９０００であり、完全フロイントアジュバントによる免疫を６回（３ヵ月）追加すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は２５０００であり、本開示のパミカ複合物による免疫を２回（１０日）追加すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は４５０００であり、３回（１８日）免疫すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は５１０００であり、６回（３ヵ月）免疫すると、ＥＬＴＳＡによる抗体力価は３６０００であり、パミカアジュバントは、ＭＹＯ抗原の初期では、抗体力価が高く、持続性が良好であり、これは、本開示のパミカ複合物が、ＭＹＯ抗原に対しては、免疫アジュバントゴールドスタンダードを有する完全フロイントアジュバントよりも顕著に優れ、詳細については図１４を参照する。

（２）本開示のパミカ複合物と完全フロイントアジュバントを組み合わせてＭＹＯ抗原に関してカイウサギを２回免疫する場合（０日目に１回免疫、１４日目に１回免疫）、ＥＬＩＳＡによる抗体力価（免疫後３５日）は、完全フロイントアジュバントでは１００００、本開示のパミカ複合物では６００００、本開示のパミカ複合物＋完全フロイントアジュバントでは１６００００（図１５）であった。

完全フロイントアジュバント＋抗原、パミカアジュバント＋完全フロイントアジュバント＋抗原、パミカアジュバント＋抗原でカイウサギを免疫して産生した抗体をそれぞれ用いてキットを調製した。臨床検証を経たところ、完全フロイントアジュバント又は完全フロイントアジュバント＋パミカアジュバント抗原群を用いて産生した抗体は臨床サンプルとマッチングしておらず、臨床検査に合格できず、パミカアジュバント抗原を用いて産生した抗体だけは臨床検査に合格でき、これは、中国国内のヒトミオグロビンラテックス比濁キットに使用される抗体原料の供給に対するオランダＤａｋｏ社の独占を完全に破り、中国国内の製品が完全フロイントアジュバントを使用することにより一般的に存在する、免疫力効が低く、エピトープ多様性が不足し、臨床サンプルを効果的に検出できないという深刻な状況を解決する。

下表は、パミカアジュバント＋抗原群で産生した抗体を用いて調製したキットと、オランダＤａｋｏ社により提供される抗体で調製した、臨床に使用されているキットとの比較である。

【表７】

ヒト血清	化学発光キット（輸入されたモノクローナル抗体製、高感度）	川至ラテックスキット	豪邁ラテックスキット	捷門ラテックスキット	パミカ抗原群によるラテックスキット
1	35	25.44	12.48	17.09	55.54
2	24	35.59	17.66	9.12	37.48
3	186	130.11	88.6	71.33	79.17
4	1200	353.25	248.66	OVER	523.29
5	47	51.65	32.91	25.35	44.2
6	74	85.55	63.5	73.74	46.54
7	18	14.89	8.91	1.32	39.13
8	37	46.42	30.05	27.58	37.21
9	54	50.46	31.37	30.51	58.14
10	56	63.63	32.12	21.78	106.3

【０１５０】

実験例４　狂犬病ワクチン抗原におけるパミカ複合物のＮＩＨ効力の評価

名称：狂犬病ワクチン抗原における本開示のパミカ複合物のＮＩＨ効力の評価

方法：本開示のパミカ複合物（１ｍｇ／ｍｌ）＋抗原、ポリイノシン注射液（１ｍｇ／ｍｌ）＋抗原、ＰＢＳ＋抗原、及び抗原をそれぞれ用いて、０日目にマウスを免疫し、１４日目に毒株で攻撃し、２８日後、効力を測定した。

結果：下記表に示す。

【表８】

群別	調製				結果（IU/ml）
	本開示のパミカ複合物(ml)	ポリイノシン注射液(ml)	PBS(ml)	抗原(ml)	
1	0	0	0	1.0	3.5
2	0	0	0.8	0.2	1.0
3	0	0.8	0	0.2	2.0
4	0.8	0	0	0.2	3.6

結果からわかるように、

ａ　本開示のパミカ複合物＋ＣＴＮ株狂犬病ワクチン抗原は、保護効果が単純なＣＴＮ株狂犬病ワクチン抗原の３．６倍であり、且つ抗原を１／５節約した。

ｂ　本開示のパミカ複合物＋ＣＴＮ株狂犬病ワクチン抗原は、保護効果がポリイノシン注射液＋ＣＴＮ株狂犬病ワクチン抗原の１．８倍であり、効果が目立った。

【０１５１】

実験例５　パミカ複合物によるマウスの複数種のサイトカインの産生誘導

方法：本開示のパミカ複合物、ポリイノシン注射液をそれぞれ用いてマウスを免疫し、免疫後１時間、２時間、５時間にそれぞれマウスの眼球を摘出して血を滅菌２ｍｌ遠心分

離管に採取し、室温で３０分間放置し、３５００回転で５分間遠心分離し、上清を１つの新しい遠心分離管に吸い取り、血清を－２０℃で冷凍保存した。

結果：本開示のパミカ複合物により誘導されたＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γサイトカインは、産量がポリイノシン注射液よりも顕著に優れ、得られたデータはすべて幾何平均値であり、具体的な結果を下記表に示す。

【表９】

群別	ｻｲﾄｶｲﾝ産生誘導	腫瘍壊死因子(TNF-α) pg/ml	ｲﾝﾀｰﾌｪﾛﾝ(IFN-γ)pg/ml
空白対照	0h	2	3
ﾎﾟﾘｲﾉｼﾝ注射液	1h	12	4
	2h	5	38
	5h	13	258
ﾊﾟﾐｶ	1h	863	32
	2h	331	71
	5h	143	285

結論：ＴＮＦ－αは、腫瘍細胞を死滅・抑制し、中性顆粒球貪食を促進し、感染に抵抗することができ、腫瘍細胞の死亡を直接引き起こしうる１種類のサイトカインであり、ＩＦＮ－γは、ウイルス感染に対する細胞の耐性発生を誘導することができ、これは、ウイルス遺伝子転写又はウイルスタンパク質成分の翻訳を干渉することにより、ウイルス感染を阻止又は制限し、現在最も主要な抗ウイルス感染及び抗腫瘍のサイトカインである。

マウスがパミカの誘導により産生したＴＮＦ－α、およびＩＦＮ－γサイトカインのレベルはいずれポリイノシン注射液よりも高く、これは、本開示のパミカ複合物の誘導により産生したＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γが、腫瘍細胞の共同殺滅及び抗感染の能力がより高いことを示す。

【０１５２】

実験例６　異常毒性検査

１、本開示のパミカ複合物のマウス試験法

１．１　試験方法

サンプル注射：１８～２２ｇの健全ＳＰＦ昆明マウスを、５匹／サンプルとし、０．５ｍｌ／匹で腹腔注射しながら、１８～２２ｇの健全マウス５匹を秤取して空白対照とした。

１．２　判定基準

各匹のマウスに試験品０．５ｍｌを腹腔注射して、７日間観察した。観察期間の間に、マウスがすべて健全に生存し、且つ異常反応がなく、期間が切れると、各匹のマウスの体重が増加すると、試験品を合格と判定した。上記要件に合致しないと、１０匹のマウスを用いて再度試験することができ、判定基準は前記と同じであった。

１．３　結果

【表１０－１】

番号	注射前体重	注射		観察日数、異常反応及び死亡状況							注射後体重	結果
		用量	経路	1	2	3	4	5	6	7		
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ1（120分間加熱後のPICで調製）		20.2g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	33.7g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ2（120分間加熱後のPICで調製）		20.3g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	32.6g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ3（120分間加熱後のPICで調製）		21.4g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	33.4g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ4（120分間加熱後のPICで調製）		19.3g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	27.3g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ5（120分間加熱後のPICで調製）		21.2g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	31.3g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ1（未加熱PICで調製）		20.9g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	32.1g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ2（未加熱PICで調製）		20.4g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	32.2g	合格

【表１０－２】

ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ3（未加熱PICで調製）	19.9g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	29.8g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ4（未加熱PICで調製）	20.1g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	30.7g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ5（未加熱PICで調製）	19.7g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	30.6g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ1	20.6g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	33.7g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ2	19.8g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	31.9g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ3	19.2g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	30.2g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ4	21.3g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	31.5g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ5	19.2g	0.5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	27.8g	合格

２　本開示のパミカ複合物のモルモット試験法

２．１　試験方法

サンプル注射：２５０～３５０ｇの健全ＳＰＦグレードＨａｒｔｅｌｙモルモットを、２匹／サンプルとし、５ｍｌ／匹で腹腔注射しながら、２５０～３５０ｇの健全モルモットを２匹秤取して空白対照とした。

２．２．　判定基準

各匹のモルモットに試験品５ｍｌを腹腔注射して、７日間観察した。観察期間の間に、モルモットがすべて健全に生存し、且つ異常反応がなく、期間が切れると、各匹のモルモットの体重が増加すると、試験品を合格と判定した。上記要件に合致しないと、４匹のモルモットを用いて再度試験することができ、判定基準は前記と同じであった。

２．３．　試験結果

【表１１－１】

番号	注射前体重	注射		観察日数、異常反応及び死亡状況							注射後体重	結果
		用量	経路	1	2	3	4	5	6	7		
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ1(120分間加熱後のPICで調製)	271g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	295g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ2(120分間加熱後のPICで調製)	263g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	301g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ1(90分間加熱後のPICで調製)	276g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	298g	合格

【表１１－２】

ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ2(90分間加熱後のPICで調製)	296g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	326g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ1(70分間加熱後のPICで調製)	266g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	297g	合格
ﾊﾟﾐｶ平行ｻﾝﾌﾟﾙ2(70分間加熱後のPICで調製)	273g	5m/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	302g	合格
複合物平行ｻﾝﾌﾟﾙ1(60分間加熱後のPICで調製)	263g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし					死亡、体重230g			不合格

【表１１－３】

複合物平行サンプル２（６０分間加熱後のＰＩＣで調製）	２７７ｇ	５ｍｌ／匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし 死亡	死亡、体重２４６ｇ		不合格
複合物平行サンプル１（５０分間加熱後のＰＩＣで調製）	２８７ｇ	５ｍｌ／匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし 死亡	死亡、体重２３４ｇ		不合格
複合物平行サンプル２（５０分間加熱後のＰＩＣで調製）	２９３ｇ	５ｍｌ／匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし 死亡	死亡、体重２６８ｇ		不合格

【表１１－４】

複合物平行ｻﾝﾌﾟﾙ1(未加熱PICで調製)	280g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし						死亡、体重258g		不合格
複合物平行ｻﾝﾌﾟﾙ2(未加熱PICで調製)	290g WS	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし					死亡、体重265g			不合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ1	288g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	308g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ2	301g	5m/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	334g	合格

３　本開示のパミカ複合物＋狂犬病ワクチン精製抗原のモルモット試験法

３．１　試験方法

サンプル注射：２５０～３５０ｇの健全ＳＰＦグレードＨａｒｔｅｌｙモルモットを、２匹／サンプルとし、５ｍｌ／匹で腹腔注射しながら、２５０～３５０ｇの健全モルモットを２匹秤取して空白対照とした。

３．２．　判定基準

各匹のモルモットに試験品５ｍｌを腹腔注射して、７日間観察した。観察期間の間に、モルモットがすべて健全に生存し、且つ異常反応がなく、期間が切れると、各匹のモルモットの体重が増加すると、試験品を合格と判定した。上記要件に合致しないと、４匹のモルモットを用いて再度試験することができ、判定基準は前記と同じであった。

３．３．　試験結果

【表１２－１】

番号	注射前体重	注射		観察日数、異常反応及び死亡状況							注射後体重	結果
		用量	経路	1	2	3	4	5	6	7		
ﾊﾟﾐｶ(120分間加熱後のPICで調製)+狂犬病ﾜｸﾁﾝ精製抗原1	281g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	303g	合格
ﾊﾟﾐｶ(120分間加熱後のPICで調製)+狂犬病ﾜｸﾁﾝ精製抗原2	273g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	316g	合格
複合物(60分間加熱後のPICで調製)+狂犬病ﾜｸﾁﾝ精製抗原1	275g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし							238g	不合格

【表１２－２】

複合物(60分間加熱後のPICで調製)+狂犬病ﾜｸﾁﾝ精製抗原2	302g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし					死亡		死亡、体重266g	不合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ1	293g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	328g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ2	314g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	340g	合格

注：１）再度試験でも不合格であった。

２）狂犬病ワクチン精製抗原：細胞：Ｖｅｒｏ細胞、毒種：ＣＴＮ株、（且つＶｅｒｏ細胞及びＣＴＮ株毒種に制限されない）。

４　本開示のパミカ複合物＋Ｂ型肝炎ワクチン抗原のモルモット試験法

４．１　試験方法

サンプル注射：２５０～３５０ｇの健全ＳＰＦグレードＨａｒｔｅｌｙモルモットを、２匹／サンプルとし、５ｍｌ／匹で腹腔注射しながら、２５０～３５０ｇの健全モルモットを２匹秤取して空白対照とした。

４．２．　判定基準

各匹のモルモットに試験品５ｍｌを腹腔注射して、７日間観察した。観察期間の間に、モルモットがすべて健全に生存し、且つ異常反応がなく、期間が切れると、各匹のモルモットの体重が増加すると、試験品を合格と判定した。上記要件に合致しないと、４匹のモルモットを用いて再度試験することができ、判定基準は前記と同じであった。

４．３．　試験結果

【表１３】

番号	注射前体重	注射		観察日数、異常反応及び死亡状況							注射後体重	結果
		用量	経路	1	2	3	4	5	6	7		
ﾊﾟﾐｶ(120分間加熱後のPICで調製)+B型肝炎ﾜｸﾁﾝ抗原1	263g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	299g	合格
ﾊﾟﾐｶ(120分間加熱後のPICで調製)+B型肝炎ﾜｸﾁﾝ抗原2	259g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	294g	合格
複合物(60分間加熱後のPICで調製)+B型肝炎ﾜｸﾁﾝ抗原1	265g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし							229g	不合格
複合物(60分間加熱後のPICで調製)+B型肝炎ﾜｸﾁﾝ抗原2	272g	5ml/匹	腹腔	毛間張力緩み、食欲不振、元気なし					死亡、体重246g			不合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ1	288g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	318g	合格
PBS平行ｻﾝﾌﾟﾙ2	294g	5ml/匹	腹腔	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	健全・生存	326g	合格

注：１）再度試験でも不合格であった。

２）Ｂ型肝炎ワクチン抗原：酵母発現（且つ酵母発現だけに制限されず、組換えＣＨＯ工学細胞を用いてＢ型肝炎抗原を発現させてもよい）。

概要分析

ＰＩＣ（二本鎖核酸）は、一定の温度に加熱されるとねじれを解き、温度が徐々に下がるにつれて、２本の一本鎖がさらに水素結合をもってペアリングして、二本鎖に回復し、加熱は、ＰＩＣの分子量を低下させて、その毒性を低下させることができ、ＰＩＣは加熱せず又は加熱時間が不十分である場合に調製すると、このような方法で調製された複合物自体は毒性が極めて高く、このような複合物で調製されたワクチンも毒性が極めて高く、このため、応用が極めて困難である。

【０１５３】

実験例７　一部の進行癌患者及び感染治療におけるパミカ複合物の応用

【表１４－１】

名前	性別	年齢	病種	投与前	投与後	投与時間
林さん	女	８０歳	２０１６年５月に顎下腺癌のため手術を２回受けた後、多臓器転移。医生より１－２ヵ月の生存期間が予測。	寝たきり、悪心、嘔吐、１日に１食しか食べられず、元気なし。輸血やタンパク質によって維持。	２０１６年１０月以来、食欲が徐々に増加し、１日３食食べられ、体重が増加し、精神状態が良好であり、医生より判定された生存期間よりも１４ヵ月（２０１６年０７月～２０１７年０９月）まで延長し、筋肉内注射後、１回あたり４ｍｇ投与し、注射部位は疼痛感があり、硬くなり、後で鼻噴霧投与に変更し、１回あたり４－６ｍｇ投与した。	２０１６年０６月～２０１７年０７月、２０１７年７月に投与停止してから２ヵ月後、再発により死亡
文さん	男	６７歳	肺腺癌、２０１７年０２月、０３月にそれぞれ北京協和、天津権健医院により肺癌と確診され、縦隔部位にカモの卵のようなサイズの腫瘍がある。	元気なし、手術を受けず、化学療法を採用した。	１回あたり６ｍｇ鼻噴霧投与し、１日おきに１回投与したところ、副作用が認められなかった。本粘膜免疫製剤は、化学療法薬（シスプラチン）と組み合わせて使用すると、副作用が低下し、ほぼ悪心や嘔吐がなく、白血球が、未使用時の１０００－２０００から３０００余り／mm^3になった。	２０１７年０３月～０６月に、患者の家族は２０１７年１０月に再度薬物を自発的に取ってきた（健在）。

【表１４－２】

朱さん	女	62歳	吉林省腫瘍医院より２０１７年５月８日に右乳癌と診断され、且つ肝臓内に多発性転移性癌があり、リンパ節の線維性組織内に癌細胞巣が見えられた。	２回の化学療法を受けた後、副作用が深刻であり、体重が低下し、悪心や嘔吐があり、腫瘍が増大した。トランスアミナーゼが高かった。	２０１７年０５月０４日から１日おきに１回投与し、まず、４ｍｇ／回鼻噴霧投与し、次に２ｍｇ／回筋肉内注射し、このように繰り返して投与し、約１０回後、患者によれば副作用がなく、化学療法薬と併用すると、化学療法の副作用を明らかに低下させ、飲食が増加し、体力が増加し、乳房のしこりが柔らかくなった。アラニンアミノ基転移酵素が１３０．５Ｕ／Ｌから３８．４Ｕ／Ｌに低下した。２０１７年４月０９日に、肝臓の最大低エコーハローは７．６×５．１ｃｍであったが、２０１７年０６月０２日に５．９×３．０ｃｍに減少した。	２０１７年０５月～２０１７年０８月に患者本人によれば、生活の質が明らかに向上し、東北地区の故郷に戻ってからアヘンを吸うことで肝不全になってまもなく死亡した。

【表１４－３】

王さん	女	７３歳	２００２年に結腸癌のため手術を受け、２００８年に乳癌のため手術を受け、２０１５年に肺癌のため手術を受け、２０１７年４月に肺癌のため放射線療法、化学療法を受けた。	食欲、味覚がなく、眠りが軽く、だるくて無力であり、軽度の脱毛があり、胃の運動性が悪く、咳をしており、且つ咳止め薬を服用しており、治療を受けなかった。	２０１７年０５月２７日から１日おきに１回投与し、４ｍｇ／回鼻噴霧投与し、６回投与後、患者本人及び家族からのフィードバックによれば副作用がなく、飲食が増加し、腫瘍が小さくなり、咳が顕著に緩和し、咳止め薬の服用を停止した。２０１８年０３月２９日の化学検査結果：１）癌胎児性抗原１．９３、基準値０－５ｎｇ／ｍｌ：２）糖類抗原ＣＡ１５３　９．２、基準値０－２５ＩＵ／ｍｌ：３）糖類抗原ＣＡ－１２５　１．２Ｕ／ｍｌ、基準値０－３５Ｕ／ｍｌ；４）糖類抗原ＣＡ１９－９　６．２４、基準値＜３９Ｕ／ｍｌ：５）糖類抗原ＣＡ－７２４　０．７２、基準値０－６．９Ｕ／ｍｌ：６）ニューロン特異的エノラーゼ１２．３６、基準値０－１６．３ｎｇ／ｍｌ；７）便中の潜血０、基準値＜１００ｎｇ／ｍｌ	２０１７年０５月から現在まで（健在）

【表１４－４】

高さん	女	７２歳	喉頭癌：２０１４年に手術を受け、手術後、いずれの薬物治療も行っておらず、２０１６年初期に再発。	体力がないこと（活動範囲が限られる）、倦怠感、食欲不振、呼吸困難、寝ていると息が詰まりやすかった。	２日おきに投与し、１回あたり２ｍｇ筋肉内注射投与し、半月後、疲労の症状が緩和し、町の市に行くことができるようになり、食欲が増加し、呼吸困難が緩和し、安らかに眠ることができるようになり、患者は調子が顕著によくなるような気がし、耐性が良好であり、顕著な不良反応がなく、鎮痛薬の服用を放棄し、後で患者は腫瘍内投与し、２日おきに投与し、１回あたり皮膚表面の腫瘍に２ｍｇ注射した。７回注射後、皮膚表面の腫瘍が化膿して消失した。	２０１６年０４月－２０１７年０１月（死亡）
白さん	男	５９歳	食道癌：約２０１６年６月に刑務所で癌に罹患したことを発見し、蘇家村委員会より刑務所から村へ連れて返り、いかなる治療も受けておらず、患者によれば良性腫瘍であった。	発汗、倦怠感、食欲不振（１つの鶏卵分の茶碗蒸ししか食べられなかった）、呼吸困難、体全体の具合が悪かった。	１日おきに１回筋肉内注射投与し、１回あたり２ｍｇ投与し、初回投与から半月後、食欲が大幅に増加し（１食７、８個の鶏卵分の茶碗蒸しを食べられ、また酒も飲める）、体重が増加し、患者は明らかに改善する気がして、元気が出され、発熱がなく、下痢をせず、顕著な不良反応がなく、手や足に発熱の状況がなく、体温が正常であり、発汗せず、注射部位に疼痛がなかった。	２０１６年０８月－２０１７年０２月、投与を停止してから２ヵ月後死亡。

【表１４－５】

鄭さん	男	４８歳	肝癌；肝臓を三分の一切除し、胆を切除し、鎮痛薬を服用した。	体力がないこと（活動範囲が限られる）、倦怠感、食欲不振。	１日おきに１回筋肉内注射投与し、１回あたり２ｍｇ投与し、初回投与から４日後、疲労の症状が緩和し、体力が増加し、投与を停止し、数日後、さらに投与を再開し、疼痛症状が緩和し、鎮痛薬の服用を停止し、食欲が増加した。	２０１６年０９月～２０１７年０１月（健在）
斉さん	男	５０歳	肺癌；２０１６年に発見され、治療を受けておらず、消炎、鎮痛類薬物だけを服用した。	寝たきり、体力がないこと（松葉杖を使うか他人にサポートしてしか歩けない）、マッチ棒のように痩せていた（２５キログラム）、倦怠感、食欲不振、呼吸困難、胸水毎日２５０グラム程度。	１日おきに１回筋肉内注射投与し、１回あたり２ｍｇ投与し、初回投与から半月後、疲労の症状が緩和し、松葉杖を利用せずに庭の外まで歩くことができ、食欲が増加し、胸水には顕著な緩和が見られず、投与後、発熱（体温未測定）、下痢が発生した。	２０１６年０８月～１０月（死亡）

【表１４－６】

趙さん	女	63歳	乳癌：手術後２回の化学療法を受けた。	肺、肝臓、骨の複数の箇所に転移、悪心、拒食	２０１７年５月初期からパミカを投与し、１日おきに１回、１回あたり３．６ｍｇ鼻噴霧投与し、副作用がなく、正常に飲食でき、元気が出て、パミカを投与する前にトランスアミナーゼが極めて高いため、化学療法を受けることができず、投与後、トランスアミナーゼが正常になり、３回目の化学療法を受けた。１ヵ月後、病院の検査報告書によれば、肝転移性癌が７．５×５．３ｃｍから５．９×３．５ｃｍに減少した。７月１８日に電話を受けて、肝腫瘍が約５ｃｍと小さくなり、健全人であるような気がすることを伝えられた（病院の検査報告書）。	２０１７年０５月～現在（健在）

【表１４－７】

姫さん	男	６４歳	２０１７年１１月１３日北医三院より進行性肺癌と診断	全身性の多発性骨転移、肺炎、肺塞栓症など、サイトケラチンＣＹＦＲＡ２１－１３．０４ｎｇ／ｍｌ、癌胎児性抗原２９８．５０ｎｇ／ｍｌ首のリンパ節が腫れ、背部と臀部の仙骨の痛みがあり、入院後、痛みを和らげるために、デュラジンを毎日５針／日まで増量しても、痛みがまだ和らげなかった。	２０１７年１１月１４日からパミカ鼻腔噴霧剤を使用し、１日おきに１回、３．６ｍｇ／回（患者の体重は９０キログラム）で鼻噴霧投与した。それと同時に、ゲフィチニブを１錠／日で経口投与した。１０日後、痛みが徐々に消えて、毎日１針のデュリュディンを減少し、最後にデュリュディンを使用しなくなり、痛みは完全に消えた。癌胎児性抗原（２０１７．１２．１）１７４．５０ｎｇ／ｍｌ。（投与前２９８．５０ｎｇ／ｍｌ。２０１７．１２．７のＣＴ画像報告書：両肺に５ｍｍ以下の結節影が多発し、左肺下葉に片状密度増加影が見られ、境界が明晰であり、気管と気管支の開口が流暢しており、縦隔内に腫大リンパ節は見られなかった。画像診断：両肺小結節影、フォローアップ観察提案、左下肺の慢性炎症。	２０１７年１１月～現在（健在）
林さん	男	７３歳	咽頭炎	咽頭痛に、咳、黄色い痰、膿鼻水が伴った。	パミカを咽頭部に噴霧し、数回後、咽頭の痛みや咳が顕著に好転し、約３日後完治し、以前のように抗生物質を服用せずに済み、副作用がなかった。	２０１７年１１月２０日～２０１７年１１月２２日

複数の進行癌病例から、本品は、注射投与経路に加えて、鼻腔噴霧を介して投与してもよく転移性癌に対して効果が顕著であることが見られる。

（１）安全性が良好であり、顕著な副作用が見られておらず、パミカ免疫製剤は非細胞毒性薬物である。

（２）放射線・化学療法の副作用を低減させ、白細胞数及び血清タンパク質の含有量を向上させることができる。

（３）臨床的効果が明らかである：疼痛が低減し、摂食量を増加し、体力を増加し、精神的に悲観的な状態から楽観的になり、全生存期間がすでに数月延長しており、１３ヵ月延長する病例がある。

（４）転移性癌の体積縮小が顕著であり、１／３－１／２の腫瘍縮小を示す病例がある。

【０１５４】
実験例８　安定性検出
本開示のパミカ複合物は、生産完了後、遮光下、室内に保管し、６ヵ月おきにサンプルを１回検出した。
【表１５】

検出項目	ポリイノシン注射液	パミカＰ－２０１７０８０１バッチ		パミカＰ－２０１７０８０２バッチ	
保存条件	冷暗所（２０℃を超えない）で保存	室温で０ヵ月保存	室温で６ヵ月保存	室温で０ヵ月保存	室温で６ヵ月保存
性状	透明溶液	透明溶液	透明溶液	透明溶液	透明溶液
蛍光反応	蛍光強化	蛍光強化	蛍光強化	蛍光強化	蛍光強化
ｐＨ	６．８	６．６６	６．５１	６．８５	６．４８
増色効果	５８．１％	７０．５％	６５．７％	７１．０％	６７．７％
分子量	２５～５００ｋＤ	１００－１５００ｂｐ	１００－１５００ｂｐ	１００－１５００ｂｐ	１００－１５００ｂｐ
含有量	９４．２％	９５．８％	１０２．３％	９１．３％	９５．３％
無菌検査	合格	合格	合格	合格	合格
細菌内毒素	＞１００ＥＵ／ｍｌ	＜１０ＥＵ／ｍｌ	＜１０ＥＵ／ｍｌ	＜１０ＥＵ／ｍｌ	＜１０ＥＵ／ｍｌ

結果：サンプルを室温（北京では、８－９月の室温はすべて３０℃を超える）で６ヵ月内保管したところ、製品の検出指標には顕著な変化が発生しておらず、このことから、製品が比較的安定しており、１ｍｇ／ｍｌのパミカを調製すると、少なくとも１２ヵ月の安定性を達成でき、３ｍｇ／ｍｌのパミカを調製すると、少なくとも９ヵ月の安定性を達成できることを示す。該製品は、ｐＨが比較的安定しており、放置のまま３年以内に、ｐＨには大きな変化がない。本開示のパミカは、細菌内毒素が＜１０ＥＵ／ｍｌであり、一方、ポリイノシン注射液は、細菌内毒素が１００ＥＵ／ｍｌよりも大きく、細菌内毒素がグラム陰性菌の細胞壁成分であり、細菌が死亡し又は自己消化すると、内毒素を放出することは本分野の公知技術である。したがって、細菌内毒素は自然界に広く存在している。たとえば、水道水中に含まれる内毒素の量が１～１００ＥＵ／ｍｌである。内毒素が消化管を介して人体に入ると害を発生させないが、内毒素が注射などの方式により血液に入ると、さまざまな疾患を引き起こす。少量の内毒素が血液に入った後、肝臓クッパー細胞により不活性化され、生体の損害を引き起こすことはない。大量の内毒素が血液に入ると、発熱反応である「熱原反応」を引き起こす。したがって、生物製品類、注射用薬剤、化学薬品類、放射性薬物、抗生物質類、ワクチン類、透析液等の製剤及び医療器具類（たとえば使い捨て注射器、埋め込み可能な生体材料）は使用する前に細菌内毒素検出試験に合格する必要がある。
【０１５５】
実験例９　パミカによるマクロファージ貪食機能促進の測定
場所：中国医学科学院薬物研究所
方法：マクロファージの収集：２０～２５ｇのＳＰＦグレード昆明ハツカネズミを６匹準備して、２群にランダムに分け、１群あたり３匹とした。０日目にパミカ及びＰＢＳで免疫し、各匹のマウスに２００μＬ点鼻し、２時間後、各匹のマウスに５．０％鶏赤血球の０．８５％生理食塩水懸濁液をさらに腹腔注射し、４時間後、各群のマウスごとにそれぞれハツカネズミ３匹を頸椎脱臼により死亡させた。消毒後、皮膚を切り開き、且つＨａ

ｎｋｓ緩衝液を腹膜注射し、各匹に２．５ｍＬを注射し、マウスの腹部を軽く揉んで、Ｈａｎｋｓ緩衝液で十分に腹腔内のマクロファージを濯いだ。その後、腹膜の中央部位で１つの小孔を開き、５ｍＬピペットを用いて腹腔内の液体を約２ｍＬ吸い取り、試験管中に投入した。

滴下済みスライドガラス：試験管から腹腔洗液を無菌で吸いだし、スライドガラス上に滴下し、滴下済みスライドガラスを水平にしてウェットガーゼ上に置き、３７℃恒温インキュベータに入れて半時間インキュベーションし、このとき、大量のマクロファージがスライドガラス上に粘着しており、０．８５％生理食塩水を用いてスライドガラス上の貪食されていない鶏赤血球及び他の組織細胞をリンスして除去し、冷たい空気で風乾した。

標本の固定化及び染色：標本をメタノールで５分間固定化し、ライトギムザ染色液で染色した。ギムザ染色法により行い、使用されるＰＢＳ緩衝液のｐＨを６．５に調整し、冷たい空気で風乾した後、油浸レンズで観察して且つ計算した。

貪食百分率：赤血球を貪食するマクロファージ総数÷マクロファージ総数×１００％。

貪食指数：マクロファージにより貪食される赤血球総数÷赤血球を貪食するマクロファージ総数×１００％（油浸レンズ下で１００個のマクロファージを観察し、各マクロファージにより貪食される赤血球数を記録し、これらの和を求めて１００で割って、得た数値は貪食指数となる）。

結果：ＰＢＳ対照群では、貪食百分率は１２％であり、貪食指数は０．１１であり、パミカ群では、貪食百分率は６６％であり、貪食指数は１．２であり、これは、パミカが高いマクロファージ貪食機能刺激の作用を有することを示し、以下の図１６には、マクロファージは赤血球を貪食し、図１７には、青色マクロファージ（矢印に示される）は赤血球を貪食していない。

【０１５６】

実験例１０　インフルエンザハツカネズミに対する、パミカ点鼻剤の粘膜免疫製剤単独での保護試験

インフルエンザウイルス：アジアＡ型ネズミ肺適応株ＦＭ１、中国予防医学科学院ウイルス病予防・治療研究所から購入。

リバビリン：陽性対照薬、瀋陽延風薬廠から購入。

ハツカネズミ：昆明種、８～１０ｇのものは、ＦＭ１ウイルス継代に用い、１４～２０ｇのものは下記本実験に用いた。

インフルエンザウイルスＦＭ１株ウイルスネズミ肺懸濁液を、５ＬＤ$_{50}$／匹でハツカネズミに点鼻することにより致死性肺炎を引き起こす可能性があり、試験時にまず感染させて、次に投与し、下記表に従って群分けして試験した。

【表１６】

群別	投与用量	死亡率％	X^2	Ｐ値
ＦＭ１インフルエンザウイルスハツカネズミ適応株 リバビリン陽性対照 本開示単独の点鼻剤	生理食塩水 ０．０７ｇ／ｋｇ／ｄ ０．１ｍｌ／匹ハツカネズミ	８９ ６３ ４３	１．６４ ３．８８	＞０．０５ ＜０．０５

該実験結果から明らかなように、ハツカネズミ保護試験において、本開示単独の点鼻剤は、粘膜免疫経路を介した非特異的な抗インフルエンザ効果が、公知の抗ウイルス薬であるリバビリンよりも優れ、統計学的に分析したところ、明らかな抗インフルエンザウイルス効果を有した。

【０１５７】
実験例１１　パミカ粘膜免疫製剤（点鼻剤）とインフルエンザワクチンとの組み合わせの鼻腔粘膜免疫、皮下注射免疫、及び完全フロイントアジュバントの、体液抗体ＩｇＡ及びインフルエンザウイルスの繁殖力価に対する影響の比較
実験態様は以下のとおりである。
インフルエンザウイルス：アジアＡ型ネズミ肺適応株ＦＭ１、中国予防医学科学院ウイルス病予防・治療研究所から購入。
インフルエンザワクチン：インフルエンザウイルススプリットワクチン　華蘭生物製品有限公司
完全フロイントアジュバント：上海偉進生物科技有限公司
本開示の粘膜免疫アジュバント：信福（北京）医薬科技有限公司
ハツカネズミ：昆明種、８～１０ｇのものはＦＭ１ウイルス継代に用い、１４～２０ｇのものは下記本実験に用いた。
完全フロイントアジュバントインフルエンザワクチン：遠心分離管内に、均一にボルテックス混合しながらワクチンと完全フロイントアジュバントとを等体積で加えて、油中水型エマルジョンとした。
本開示とインフルエンザワクチンとを組み合わせた点鼻剤：インフルエンザワクチンと本開示の粘膜免疫アジュバントとを等量で混合して水溶媒とした。
インフルエンザワクチン：インフルエンザワクチンとＰＢＳとを等量で混合して水溶媒とした。
免疫方法
皮下注射免疫：０日目、２８日目に０．１ｍｌ／匹の皮下注射によりハツカネズミを免疫し、４２日目に、一部のハツカネズミから採血して血清を分離し、抗体力価を検出し、別の一部のハツカネズミを、インフルエンザウイルスＦＭ１株ウイルスネズミ肺懸濁液５ＬＤ$_{50}$／点鼻により感染させ、感染後５日目に、肺組織のウイルス力価を検出した。
鼻腔免疫：点鼻法により０日目、２８日目にハツカネズミを０．１ｍｌ／匹で免疫し、４２日目に、一部のハツカネズミを採血して血清を分離し、抗体力価を検出し、別の一部のハツカネズミを、インフルエンザウイルスＦＭ１株ウイルスネズミ肺懸濁液５ＬＤ$_{50}$／点鼻により感染させ、感染後５日目に、肺組織のウイルス力価を検出した。
各群の実験結果を下記表に示す。
粘膜免疫製剤とインフルエンザワクチンとの組み合わせの点鼻法による抗インフルエンザ試験

【表１７】

群別	抗体指数	治療後のインフルエンザウイルス力価
皮下注射免疫：		
インフルエンザワクチン	$10^{3.1}$	10^{4}
完全フロイントアジュバントインフルエンザワクチン	$10^{5.5}$	$10^{3.5}$
本開示とインフルエンザワクチンとを組み合わせた点鼻剤	$10^{4.5}$	$10^{2.0}$
鼻腔粘膜免疫：		
インフルエンザワクチン	$10^{2.5}$	$10^{4.5}$
本開示とインフルエンザワクチンとを組み合わせた点鼻剤	10^{4}	＜１０
ＦＭ１ウイルス対照	$10^{5.0}$	

完全フロイントアジュバントは、生体細胞免疫促進を検出するゴールドスタンダードであり、試験結果から明らかなように、本開示の粘膜免疫製剤とインフルエンザワクチンとの組み合わせで皮下免疫して産生する抗体は、完全フロイントアジュバントインフルエンザワクチンよりも１０倍低いが、完全フロイントアジュバントインフルエンザワクチンよりもインフルエンザウイルス力価を３１．６倍低下させ、特に、ハツカネズミ鼻腔粘膜免疫によれば、本開示の粘膜免疫製剤と抗原とを結合した点鼻剤は、単純なインフルエンザワクチン抗体よりも３１．６倍高く、インフルエンザウイルス力価を３１００倍余り低下させ、極めて明らかな効果を有した。

【０１５８】

実験例１２　パミカはＣＩＫ細胞エフェクターターゲット実験の初期テストに対して明確な効果を有すること

北京京蒙高科乾細胞技術有限公司により検出したところ、本開示は、ＣＩＫ細胞エフェクターターゲット実験に対して明確な効果を有する。

試料番号：ＪＳＣＩＫ２０１６０４２６１４；検出日付：２０１６．０４．２６；報告日付：２０１６．０４．２８。

操作手順：一般的なＣＩＫ細胞エフェクターターゲット実験に従って培養及び分析を行い、実験方法は、たとえば（荘捷ら、樹枝状細胞とＣＩＫ細胞を共培養して誘発したＤＣＣＩＫ細胞群の、腫瘍に対する死滅作用、細胞生物学雑誌、２００７，２９；２３７－２４０）に示される。

ターゲット細胞：Ａ５４９　エフェクター細胞：培養ＪＳＣＩＫ２０１６０４２６１４

結論：蛍光顕微鏡とマイクロプレートリーダーによる検出方法及び実験自体の誤差を考慮して、ＪＳＣＩＫ２０１６０４２６１４細胞死滅能力を総合的に分析したところ、１：１０の死滅効果は中であった（ターゲットエフェクター比が１：１０である場合、ターゲット細胞Ａ５４９に対する死滅率は５１．４％であった）。

【０１５９】

実験例１３　担癌ハツカネズミＬＬ２肺癌モデルに対するパミカ粘膜免疫製剤の抗癌作用

ＬＬ２ハツカネズミ腫瘍移植モデルを用いて、鼻腔噴霧によりパミカの抗腫瘍効果を検出したところ、該モデルでは、腫瘍細胞が迅速に成長し、接種後１４日目に腫瘍体積がすでに２２０１．９±６８．０１mm^3に達し、ここまで実験を終了し、ここで、陽性対照シスプラチンは、腫瘍縮小が最も好ましく、パミカ筋肉内注射群がそれに次いで、ただし、パミカ鼻腔噴霧は、０．１ｍｇ／匹ハツカネズミを除く。残りの０．２ｍｇ／匹の各鼻

腔噴霧群は、溶媒陰性対照群よりもＰ＜０．０００１であり、有意差を有した。特に、従来の資料では、同じハツカネズミモデルにおいて、ネズミモデルＰＤ１はほぼ効果がなかった。解釈すべきのは、シスプラチン群では、細胞分裂が非常に迅速である該モデルにおいてその効力をより発揮しやすく、総合的に考慮すると、新しい抗癌メカニズムに基づくこのような担癌ハツカネズミモデルへのパミカ効果が注目されることである。また、該モデルでは、ハツカネズミに対する副作用が発現されなかった。

実験の群分けを下記表に示す。

【表１８】

Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ	ＴＶ ａｔ ｄａｙ １４	Ｔ／Ｃｂ（％）	ｐｖａｌｕｅ
Ｖｅｈｉｃｌｅ	２２０１．０９±６８．０１	－－	－－
シスプラチン（５ｍｇ／ｋｇ）	６３７．７９±６２．８７	２８．９	＜０．０００１
Ｐａｍｉｃａ－１（２００μｇ、即時投与、点鼻）	１３３１．５１±１３９±２１	６０．４	＜０．０００１
Ｐａｍｉｃａ－１（２００μｇ、点鼻）	１１６３．８３±５２．８８	５２．８	＜０．０００１
Ｐａｍｉｃａ－１（１５０μｇ、点鼻）	１８３９．３６±８３．５７	８３．５	０．０６６７
Ｐａｍｉｃａ－１（２００μｇ、筋肉内注射）	９２９．６９±１０９．９５	４１．７	＜０．０００１
Ｐａｍｉｃａ－１＋シスプラチン（２００μｇ＋５ｍｇ／ｋｇ、点鼻＋Ｉ．Ｖ）	７９９．６３±８２．８６	３６．３	＜０．０００１

具体的な実験結果を図１８～２１に示す。

本回の実験では、細胞の腫瘍形成率が高く、溶媒対照群の腫瘍が迅速に成長し、実験終了時に、腫瘍体積が２２０１．０９±６８．０１mm^3に達し、陽性対照群のシスプラチンは顕著な腫瘍抑制効果を示し、これは、本回の実験が成功し、結果が確実であることを示した。

試験結果から示すように、マウス肺癌ＬＬ２細胞Ｃ５７ＢＬ／６マウス腫瘍移植モデルに対する本回の研究では、パミカ、１５０μｇ／匹の群を除き、残りの群は、点鼻でも筋肉内投与でも、顕著な腫瘍成長抑制作用を示し、統計学的測定から、極めて有意的な差を有し、Ｐ＜０．０００１であり、また、担癌マウスに対して顕著な毒性や副作用がないことが示される。

輝源生物社の以前のデータから示されるように、マウス由来のＰＤ－１抗体は、ＬＬ２モデルにおいて薬効が低く（腫瘍抑制率は１０％未満であった）、同様に免疫系に作用するパミカとしては、示す効果がＰＤ－１抗体よりも優れた。通常、ＰＤ－１抗体の抗腫瘍

薬効が、腫瘍細胞ＰＤ－Ｌ１の発現レベルにより決まるか、もしくはｍｕｔａｔｉｏｎ ｌｏａｄ、マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）もしくはミスマッチ修復欠陥（ｄＭＭＲ）に関連し、さらにその薬物の効果に影響すると考えられている。免疫アジュバント類のパミカとして示す腫瘍抑制効果は、免疫検査点の範囲よりも広く、極めて巨大な開発将来性を示した。

【０１６０】

実験例１４　４Ｔ１－ｌｕｃマウス乳腺上皮内癌モデルに対するパミカの生体内抗腫瘍効果の研究

本回の薬力学的実験には、溶媒群、ＰＤ１群、６つのパミカ治療群、パミカ－ＰＤ１同時投与群の合計９群が設置されている。ここで、溶媒群は、接種１６日後、点鼻によりＰＢＳ溶液を６６．７μＬ／匹、２日ごとに１回投与するものであり、ＰＤ１群は、接種１６日後、ＰＤ１溶液を１００μｇ／匹、１週間に１回腹腔注射投与するものであり、６つのパミカ治療群は、それぞれ、接種７日前、点鼻によりパミカを２００μｇ／匹、２日に１回投与するもの、接種当日に、点鼻によりパミカを２００μｇ／匹、２日に１回投与するもの、接種１６日後、点鼻によりパミカを２００μｇ／匹、２日に１回投与するもの、接種１６日後、点鼻によりパミカを３００μｇ／匹、２日に１回投与するもの、接種１６日後、筋肉内注射によりパミカを２００μｇ／匹、２日に１回投与するもの、接種１６日後、筋肉内注射によりパミカを３００μｇ／匹、２日に１回投与するものであり、パミカ－ＰＤ１同時投与群は、接種１６日後、点鼻によりパミカを２００μｇ／匹、２日に１回投与し、且つ接種１６日後、ＰＤ１溶液を１００μｇ／匹、１週間に１回腹腔注射投与するものである。実験には、雌Ｂａｌｂ／ｃマウスを使用し、３日ごとに腫瘍体積を１回測定し、２日ごとに体重を１回量る。溶媒対照群の平均腫瘍体積が２０００mm^3を超えるときに実験を終了し、小動物ライブイメージャーで腫瘍生物発光の状況を測定し、最後に、各群のマウスの臓器を取ってＨＥ染色を行った。

薬力学的試験の結果から示すように、７日前群及び０日目群は、腫瘍成長及び転移の抑制能力が比較的低く、２つのパミカ筋肉内注射群は、腫瘍成長及び転移に対する抑制作用が、２つのパミカ点鼻群よりも高く、２００μｇ／匹パミカ点鼻群を除き、３００μｇ／匹パミカ点鼻群、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群、及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、すべて腫瘍成長及び転移を明らかに抑制できた。実験終了時、２００μｇ／匹パミカ点鼻群及び３００μｇ／匹パミカ点鼻群の腫瘍抑制率はそれぞれ２５％、及び３５％であった。２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群の腫瘍抑制率は、それぞれ５６％、及び６１％であった。

以上の結果から、パミカは、４Ｔ１乳癌に対して良好な腫瘍成長及び転移抑制作用を有することを示した。

以下、実験手順及び実験結果を具体的に検討する。

１．実験方法

１．１　４Ｔ１－ｌｕｃマウス乳腺上皮内癌腫瘍モデルの構築

雌Ｂａｌｂ／ｃマウスを取り、対数増殖期にある４Ｔ１－ｌｕｃ乳癌細胞を選択して、１×10^5個／０．２ｍＬ／匹の数量でＢａｌｂ／ｃマウスの第４乳腺パッド下に接種し、同所性担癌マウスモデルを構築した。ノギスを用いて腫瘍塊の体積を動的に計測した。腫瘍体積の計算式：Ｖ＝０．５×Ｌ×Ｄ２（ここで、Ｖは腫瘍体積、Ｌは腫瘍長径、Ｄは腫瘍短径である）。

１．２　投与時間の設定

接種７日前にパミカを点鼻投与する群（略語７日前群）：腫瘍接種７日前に、１０匹のマウスをランダムに選択し、表１に従って投与し始めた。

接種０日目にパミカを点鼻投与する群（略語０日目群）：腫瘍接種当日に、１０匹のマウスをランダムに選択し、表１に従って投与し始めた。

溶媒群：腫瘍体積が８０mm^3程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従って投与し始めた。

ＰＤ１群：腫瘍体積が８０mm^3程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従

って投与し始めた。
２００μｇ／匹パミカ点鼻群：腫瘍体積が８０ｍｍ^{3}程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従って投与し始めた。
３００μｇ／匹パミカ点鼻群：腫瘍体積が８０ｍｍ^{3}程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従って投与し始めた。
２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群：腫瘍体積が８０ｍｍ^{3}程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従って投与し始めた。
３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群：腫瘍体積が８０ｍｍ^{3}程度成長し、即ち、腫瘍接種後１６日目に、表１に従って投与し始めた。
【表１９】

表１　実験の投与用量及び群分け

	試験サンプル	動物	投与経路	用量	投与頻度
1	溶媒	１６	点鼻	６６．７μＬ	２日に１回
2	ＰＤ１	１６	腹腔	１００μｇ／匹	１週間に１回
3	パミカ	１６	点鼻（接種後１６日目に投与）	２００μｇ／匹	２日に１回
4	パミカ	１６	点鼻（接種後１６日目に投与）	３００μｇ／匹	２日に１回
5	パミカ	１６	筋肉内注射（接種後１６日目に投与）	２００μｇ／匹	２日に１回
6	パミカ	１６	筋肉内注射（接種後１６日目に投与）	３００μｇ／匹	２日に１回
7	パミカ	１０	点鼻（接種前７日目に投与）	２００μｇ／匹	２日に１回
8	パミカ	１０	点鼻（接種後０日目に投与）	２００μｇ／匹	２日に１回
9	パミカ＋ＰＤ１	１０	点鼻＋腹腔	２００ｍｇ／匹＋１００μｇ／匹	２日に１回＋１週間に１回

表１　実験の投与用量及び群分け

１．３　実験終点
投与後３０日目に、腫瘍体積が２０００ｍｍ^{3}を超えるため、実験全体を終了した。
１．４観察指標
３日ごとに腫瘍体積を１回計測し、２日ごとに体重を１回秤量した。実験終点時に心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、腫瘍を剥離し、ここで、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を４％中性ホルムアルデヒドで固定化した後、パラフィン切片にして、且つＨＥ染色分析を行い、腫瘍について写真を取って且つ重量を量り、肺を、Ｂｏｕｉｎ’ｓ固定液で１６ｈ固定化し、その後、５０％アルコールで２ｈ浸漬した後、写真を取り、４％中性ホルムアルデヒドで固定化した後、パラフィン切片にして、且つＨＥ染色分析を行った。

１．５　小動物ライブイメージャー

投与終点時に、腹腔注射により濃度１００μＬの３０ｍｇ／ｍＬのフルオレセイン基質Ｌｕｃｉｆｅｒｉｎを与えて、イソフルランを用いてマウスを麻酔し、１７ｍｉｎ後、マウスを小動物ライブイメージャーに固定して生物発光の状況を観察した。画像収集パラメータは以下のとおりである。収集時間　０．２秒；Ｂｉｎ値　４；Ｆ値　２。画像処理ソフトウェア：Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅｓｏｆｔｗａｒｅ（ｖｅｒｓｉｏｎ　４．３．１；Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．）。

２　統計学的分析

実験データはすべて「平均値±標準偏差」で表され、データ分析には、ＳＰＳＳ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　１９（ｖｅｒｓｉｏｎ　４．０．１００．１１２４；ＳＰＳＳ　Ｉｎｃ．，ＩＢＭ　Ｃｏｍｐａｎｙ，ＵＳＡ）ソフトウェアが採用された。データ比較には、一元配置分散分析ＡＮＯＶＡが採用され、群間有意差にはｔ検定が採用された：＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１；＊＊＊ｐ＜０．００１。

３．　実験結果及び検討

３．１　腫瘍体積

腫瘍体積の変化曲線を図２２に示す。

【表２０】

表２　腫瘍体積のｔ検定結果

	６日	１２日	１８日	２４日	３０日
７日前群					＊＊
０日目群				＊＊	＊
ＰＤ１		＊＊		－－	－－
２００μｇ／匹パミカ点鼻	＊＊	＊＊			＊
３００μｇ／匹パミカ点鼻	＊＊	＊		＊＊	＊
２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射	＊＊	＊＊＊	＊	＊＊＊	＊＊＊
３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊
２００μｇ／匹パミカ点鼻＋ＰＤ１	＊	＊＊	＊＊＊	－－	－－

Ｎｏｔｅ：誤差ラインはＳＤを表し、－－はデータなしを表す。＊：溶媒群に比べてｐ＜０．０５を表し、＊＊：溶媒群に比べてｐ＜０．０１を表し、＊＊＊：溶媒群に比べてｐ＜０．００１を表す。

図２２及び表２から分かるように、７日前群及び０日目群は、腫瘍抑制効果が比較的低く、２つの筋肉内注射群は、腫瘍抑制効果が２つの点鼻群よりも優れ、具体的な結果を以下に示す。

パミカ７日前群及び０日目群は、後期では、一定の腫瘍抑制作用を有し、前期では、ほぼ腫瘍抑制効果がなく、これは、早めて投与する、もしくはすぐに投与する場合、顕著な腫瘍死滅効果がないことを示し、別の角度からパミカは腫瘍治療ワクチンであり、予防ワクチンではないことを示す。実験終了時、７日前群及び０日目群の腫瘍抑制率は、それぞれ３６％及び２６％であった。

ＰＤ１群は、１２日目の腫瘍体積に関して、溶媒群に比べて、すべて有意差（＊＊ｐ＜０．０１）を有し、これは、ＰＤ１が４Ｔ１マウス乳癌に対して一定の抑制作用を有することを示す。

ＰＤ１－パミカ同時投与群の各治療群は、投与後２０日に、ほとんどのマウスがすでに死亡しており、したがって、後期の測定には、２群ともにデータなしであった。ここで、同時投与群は、６、１２、１８日目の腫瘍体積が、溶媒群に比べて、すべて有意差を有した（それぞれ＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）。

２００μｇ／匹パミカ点鼻群は、投与前期では、抑制効果が比較的顕著であり、投与後期では、腫瘍抑制効果が徐々に弱まり、６日目及び１２日目の腫瘍体積が、溶媒群に比べて、すべて有意差（＊＊ｐ＜０．０１）を有し、３００μｇ／匹パミカ点鼻群は、１８日目を除き、残りの時間での腫瘍体積が、溶媒群に比べて、すべて有意差を有した。これは、点鼻投与が有効であり、且つ腫瘍抑制作用が用量依存性を呈することを示す。実験終了時、２００μｇ／匹パミカ点鼻群及び３００μｇ／匹パミカ点鼻群の腫瘍抑制率は、それぞれ２５％及び３５％であった。

パミカの２つの筋肉内注射用量群は、投与過程にわたって腫瘍抑制効果が類似しており、且つ溶媒群に比べて、すべて有意差を有し、且つ、２つの筋肉内注射群は、腫瘍抑制効果が２つの点鼻群よりも良好であった。実験終了時、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群の腫瘍抑制率は、それぞれ５６％及び６１％であった。

３．２　体重

マウス体重の変化曲線を図２３に示す。

【表２１】

表３　各群のマウス及び溶媒群マウスの体重のｔ検定の統計学的結果

	０日	２日	４日	６日	８日	１０日	１２日	１４日
７日前群	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊＊	＊＊	＊＊	＊＊＊
０日目群	＊＊＊	＊＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊＊
ＰＤ１								
２００μｇ／匹パミカ点鼻		＊	＊	＊＊	＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊
３００μｇ／匹パミカ点鼻		＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊
２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射								
３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射		＊＊	＊					
２００μｇ／匹パミカ点鼻＋ＰＤ１			＊		＊＊	＊＊	＊＊	＊＊＊
	１６日	１８日	２０日	２２日	２４日	２６日	２８日	３０日
７日前群	＊＊＊	＊＊＊	＊	＊	＊	＊		
０日目群	＊＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊			
ＰＤ１				－－	－－	－－	－－	－－
２００μｇ／匹パミカ点鼻	＊＊＊	＊＊＊	＊＊＊	＊＊	＊	＊		
３００ｐｇ／匹パミカ点鼻	＊＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊＊	＊	
２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射								
３００ｐｇ／匹パミカ筋肉内注射				＊	＊	＊		
２００ｐｇ／匹パミカ点鼻＋ＰＤ１				－－	－－	－－	－－	－－

Ｎｏｔｅ：誤差ラインはＳＤを表し、－－はデータなしを表す。＊：溶媒群に比べてｐ＜０．０５を表し、＊＊：溶媒群に比べてｐ＜０．０１を表し、＊＊＊：溶媒群に比べてｐ＜０．００１を表す。

図２３及び表３から分かるように、ＰＤ１及び同時投与群のマウスは、いずれの体重も有効測定時間内に溶媒群に比べて有意差を有さず、これは、その副作用が比較的小さいことを提示した。７日前群、０日目群、２００μｇ／匹パミカ点鼻群、及び３００μｇ／匹パミカ点鼻群は、投与後期を除き、残りの時間での体重がすべて溶媒群よりも顕著に低かった。２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、投与期間にわたって、溶媒群に比べて、有意差を有さなかった。３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、投与中期では、体重が溶媒群よりも低く、投与前期及び後期では、溶媒群に比べて、いずれも有意差を有さなかった。

以上の結果から、筋肉内注射投は、マウスの体重に対する影響が比較的小さく、副作用が比較的小さく、点鼻投与は、マウスに対して一定の副作用を有することを示す。

３．３　腫瘍重量、脾臓重量及び腫瘍写真

図２４及び図２５から見られるように、７日前群、及び０日目群の腫瘍重量は、対照群に比べて、有意差がなく、２つのパミカ筋肉内注射群は、腫瘍成長に対する抑制作用が２つのパミカ点鼻群よりも高く、２００μｇ／匹パミカ点鼻群を除き、３００μｇ／匹パミカ点鼻群、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群、及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、すべて、腫瘍成長を明らかに抑制することができ、溶媒群に比べて、統計学的有意差を有した（それぞれ＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）。

脾臓は、生体の最大の免疫器官であり、全身のリンパ組織の全量の２５％を占め、大量のリンパ球及びマクロファージを含有し、生体細胞免疫及び体液免疫のセンターである。図２６から見られるように、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群、及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群の脾臓重量はすべて溶媒群よりも明らかに高く、統計学的有意差を有し（それぞれ＊＊ｐ＜０．０１、＊ｐ＜０．０５）、これは、筋肉内注射群の免疫反応が比較的強い可能性があることを示す。

３．４　肺写真

図２７及び図２８から見られるように、溶媒群、７日前群、０日目群のいずれも、肺組織の表面に比較的多くの白色腫瘍結節があり、これは、７日前群及び０日目群には、４Ｔ１肺転移抑制作用がほぼないことを示す。２００μｇ／匹パミカ点鼻群及び３００μｇ／匹パミカ点鼻群は、肺組織の表面における結節が比較的少なく、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、肺組織の表面における結節が最も少なく、これは、この２つの点鼻群及び２つの筋肉内注射群がすべて４Ｔ１肺転移を効果的に抑制でき、且つ筋肉内注射群の４Ｔ１肺転移抑制能力が点鼻群よりも強いことを示す。

３．５　小動物イメージャー

図２９－図３５から見られるように、溶媒群、７日前群、０日目群は、腫瘍部位及び転移性病巣の生物発光強度が比較的高く、２００μｇ／匹パミカ点鼻群、及び３００μｇ／匹パミカ点鼻群は、腫瘍部位及び転移性病巣の生物発光強度が弱まり、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群、及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、腫瘍部位及び転移性病巣の生物発光強度が最も弱く、これは、筋肉内注射群の４Ｔ１乳癌成長及び転移の抑制能力が点鼻群よりも高いことを示し、上記結果と一致した。

４．　結論

本回の実験では、我々は、４Ｔ１－ｌｕｃマウス乳腺上皮内癌モデルの作成に成功し、腫瘍成長が迅速であり、実験終了時、腫瘍体積が２０００mm^3を超える。

試験結果から示すように、マウス乳癌４Ｔ１－ｌｕｃ細胞Ｂａｌｂ／ｃマウス同所性腫瘍モデルに対する本回の研究では、ＰＤ１及び同時投与群マウスは、ＰＤ１の原因のため、大量のマウスが死亡して、一部の実験データだけを取得することを引き起こす以外、残りの各群は、すべて一定の時間で、一定の腫瘍抑制作用を有した。７日前群、０日目群、及び２００μｇ／匹パミカ点鼻群は、腫瘍抑制作用が顕著ではなく、２００μｇ／匹パミカ点鼻群、２００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群、及び３００μｇ／匹パミカ筋肉内注射群は、すべて顕著な腫瘍抑制作用を示した。

【０１６１】

実験例１５　ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染患者の治療におけるパミカの応用

【表２２】

名前（性別、年齢）	投与前	投与方法	投与後	投与時間
張さん（女、２８歳）	高リスクヒトパピローマウイルス感染（陽性－ＨＰＶ１６感染）	１日おきに１回噴霧投与、１回あたり２．４ｍｇ	高リスクヒトパピローマウイルスＨＰＶ１６陰性に変換	２０１７－０８－０９～２０１８－０１－０５
張さん（女、３０歳）	高リスクヒトパピローマウイルス感染（陽性－ＨＰＶ１８感染）	１日おきに１回噴霧投与、１回あたり２．４ｍｇ	高リスクヒトパピローマウイルスＨＰＶ１８陰性に変換	２０１７－１１－０４～２０１８－０１－２５
曲さん（女、３４歳）	高リスクヒトパピローマウイルス感染（陽性－ＨＰＶ１８感染）	１日おきに１回噴霧投与、１回あたり２．４ｍｇ	高リスクヒトパピローマウイルスＨＰＶ１８陰性に変換	２０１７－１０－２３～２０１８－０１－１３

【０１６２】

実験例１６　乳癌治療におけるパミカの応用

１、陽性対照薬

ＰＤ１、パクリタキセル注射液

４Ｔ１マウス乳腺上皮内癌担持動物モデルの構築

雌ＢＡＬＢ／ｃマウスを取り、対数増殖期にある４Ｔ１－ｌｕｃ乳癌細胞を選択し、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／０．２ｍＬ／匹の数量でＢＡＬＢ／ｃマウスの第４乳腺パッド下に接種し、同所性担癌マウスモデルを構築した。ノギスを用いて腫瘍塊の体積を動的に計測した。腫瘍体積の計算式：Ｖ＝０．５×Ｌ×Ｄ２（ここで、Ｖは腫瘍体積、Ｌは腫瘍長径、Ｄは腫瘍短径である）

３、４Ｔ１乳腺上皮内癌の成長及び自発転移に対する影響

３．１　群設置及び投与態様

1)ＰＢＳ群：腫瘍接種数日後、ＰＢＳを、１００μＬ／匹で点鼻投与し、１日おきに１回投与した。

2)ＰＤ１群：腫瘍接種数日後、ＰＤ１を、１００μｇ／匹で腹腔投与し、１週間に１回投与した。

3)パクリタキセル群：腫瘍接種数日後、パクリタキセルを１０ｍｇ／ｋｇ、１週間に１回尾静脈注射投与した。

4)パミカ点鼻群：腫瘍接種数日後、パミカを、１００μＬ（０．３ｍｇ）／匹で点鼻投与し、１日おきに１回投与し、投与当日の午前に５０μＬ点鼻し、午後に５０μＬ点鼻した。

5)パミカ筋肉内注射群：腫瘍接種数日後、パミカを１００μＬ（０．３ｍｇ）／匹で筋肉内注射投与し、１日おきに１回投与した。

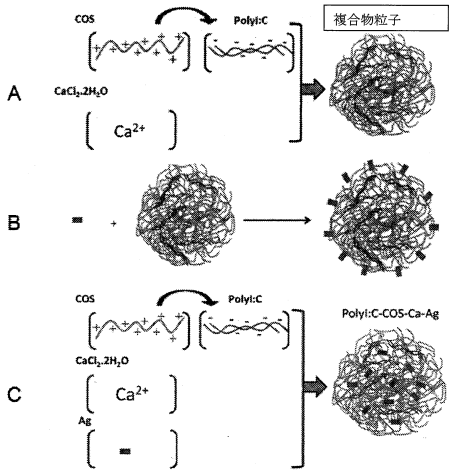
6)同時投与群：腫瘍接種数日後、ＰＤ１を（１００μｇ／匹、１週間に１回）腹腔投与し、且つ、パミカを（１００μＬ／匹、１日おきに１回投与）点鼻した。

7)同時投与群：腫瘍接種数日後、パクリタキセルを（１０ｍｇ／ｋｇ、１週間に１回投

与）尾静脈注射し、且つパミカを（１００μＬ／匹、１日おきに１回投与）点鼻した。
３．２　各群の動物数：１５匹／群（各群に５匹多い）。
３．３　終了実験時点：実際の状況（マウスが死亡する、もしくは投与群と対照群との差が有意である）に応じて、実験を早めて終了する可能性がある。
３．４　実験態様
同所性４Ｔ１－ｌｕｃ乳癌モデルを作成し、小動物ライブイメージャーを用いて早期検出を行って群分けし、６．１項における群設置及び投与態様に従って投与した。腫瘍体積（３日に１回測定）、体重変化（３日に１回測定）、腫瘍重量（終点検出）、脾臓重量（終点検出）、ＴＵＮＥＬ染色（終点検出）を検出し、肺をＢｏｕｉｎ’ｓ固定液で固定化した後、写真を取り、各組織器官を中性ホルムアルデヒドで固定化した後、Ｈ＆Ｅ染色（終点検出）を行い、且つ小動物ライブイメージャーを用いて、異なる時点及び最終時点での同所性腫瘍及び転移部位の生物発光強度を観察した。各群間の同所性腫瘍の成長及び転移の抑制作用の強さを総合的に比較した。
実験から、パミカは、乳癌腫瘍体積縮小、腫瘍重量、脾臓重量制御、腫瘍細胞アポトーシス促進などの点のいずれに関しても、顕著な効果を有することが証明されている。
最後に、なお、以上の各実施例は、本開示の技術案を説明するだけに使用され、それを制限するものではなく、前述各実施例を参照して本開示を詳細に説明したが、当業者が理解すべきことは、それは、依然として前述各実施例に記載の技術案を修正したり、ここの一部もしくは全部の技術的特徴に対して等同置換を行ったりすることができ、一方、これらの修正もしくは置換は、対応する技術案の趣旨が本開示の各実施例の技術案の範囲を逸脱するようにすることがない。
【産業上の利用可能性】
【０１６３】
本開示の複合物は、粘度及び分子質量が適当であり、簡便に製薬でき、化学的性質が安定的であり、長期間保管しても分解しにくく、安全に使用でき、該化合物は単独で使用するだけで、生体の非特異的免疫反応を顕著に向上させ、疾患を予防・治療する目的を達成させることができ、他の薬物と併用すると、より良好な抗腫瘍、抗ウイルス及び抗（スーパー）バクテリアの機能・効果を有し、患者により吸収されやすい。

【図面】

【図１】



【図２】

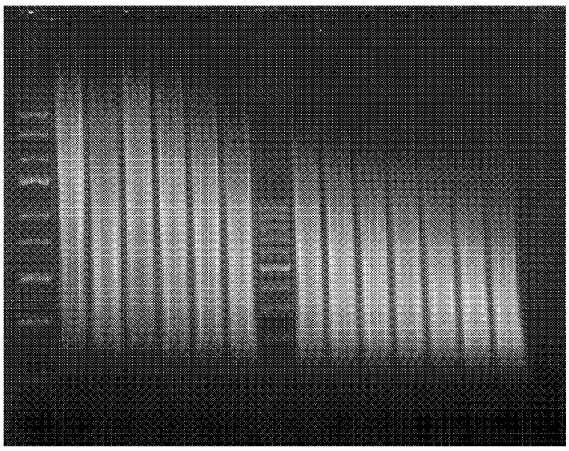
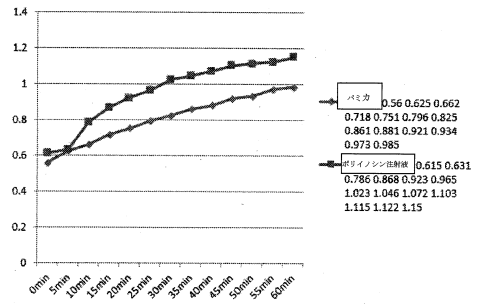
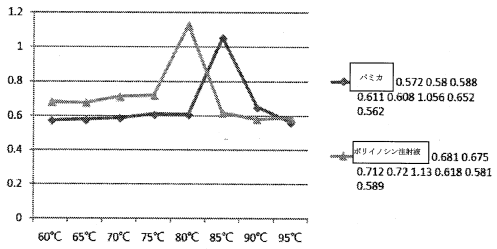


図２

【図３】



【図４】



【図５】

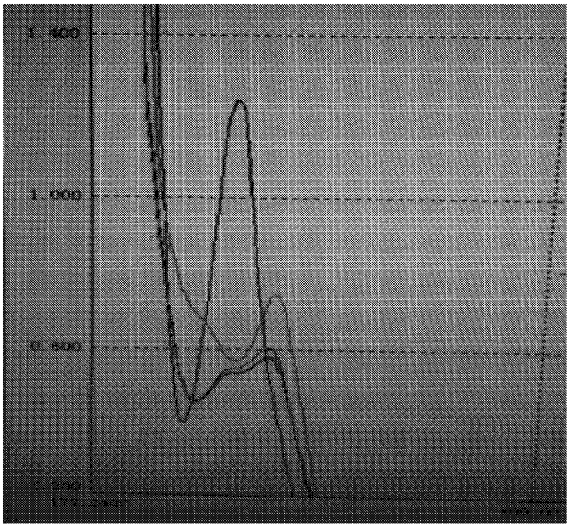


図5

【図６】

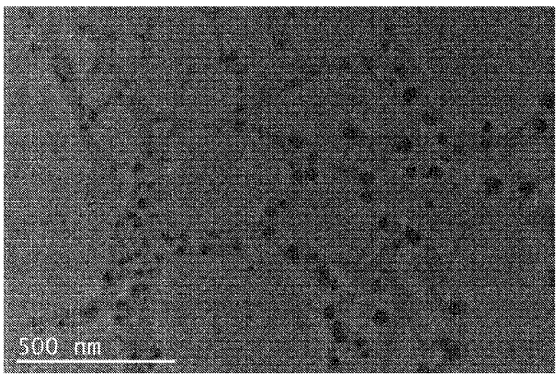


図6

【図７】

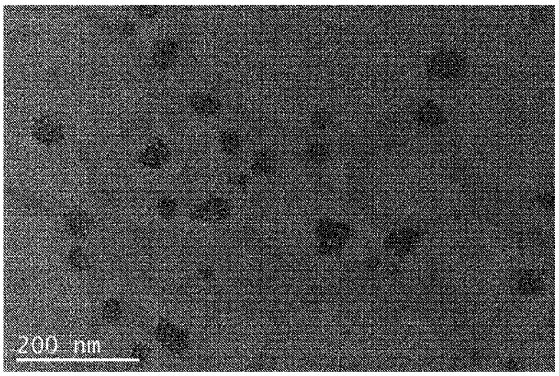


図7

【図８】

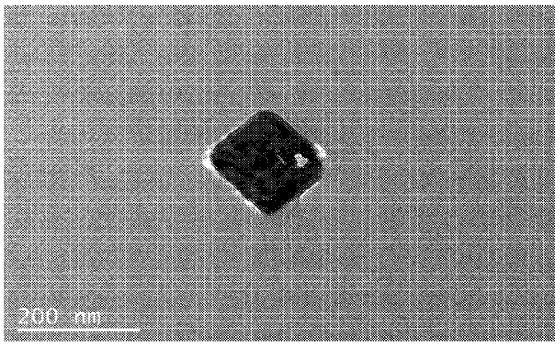


図8

【図９】

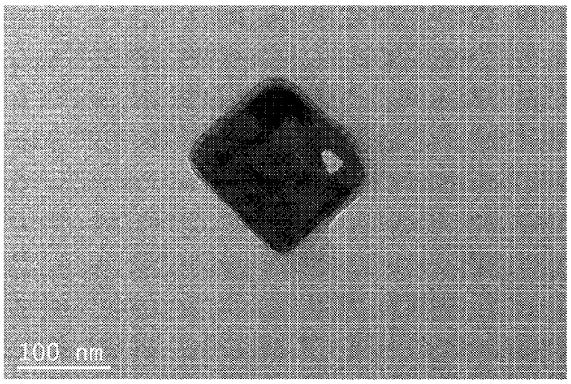


図 9

【図１０】

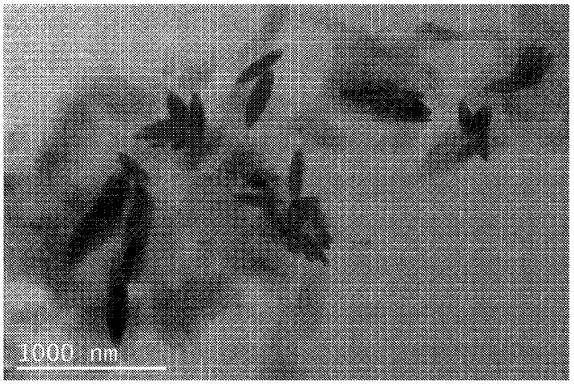


図 10

【図１１】

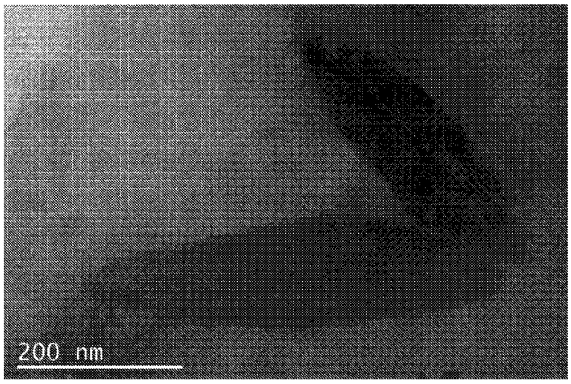
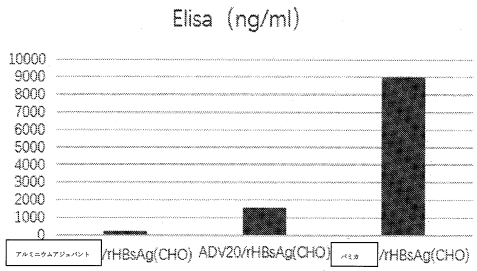
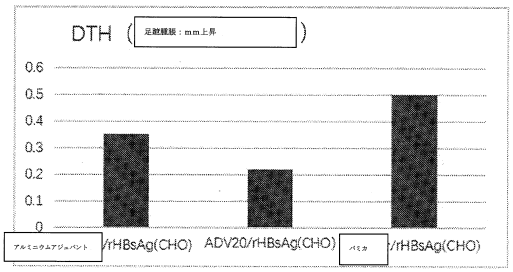


図 11

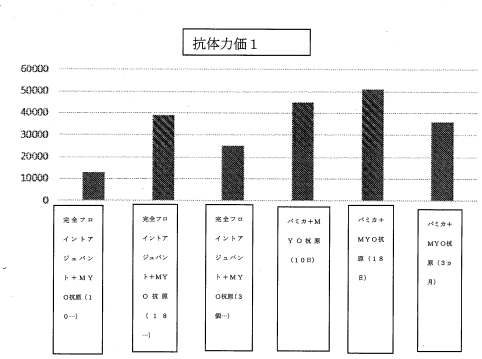
【図１２】



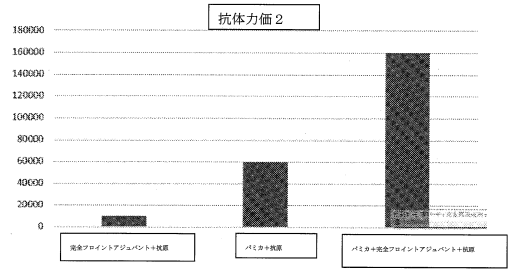
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【図１６】

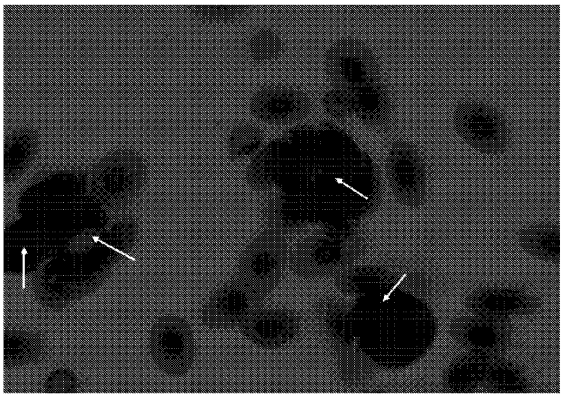


图 16

【図１７】

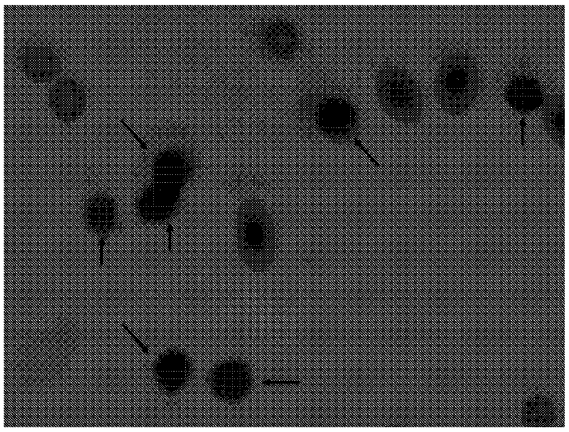
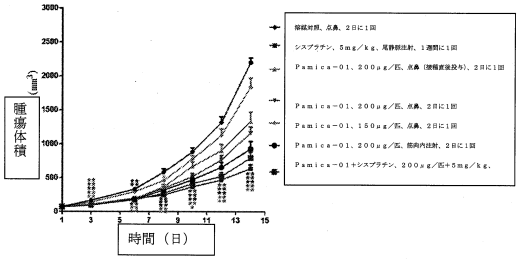
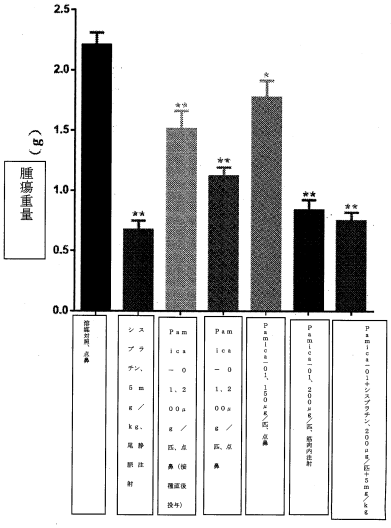


图 17

【図１８】



【図１９】



【図２０】

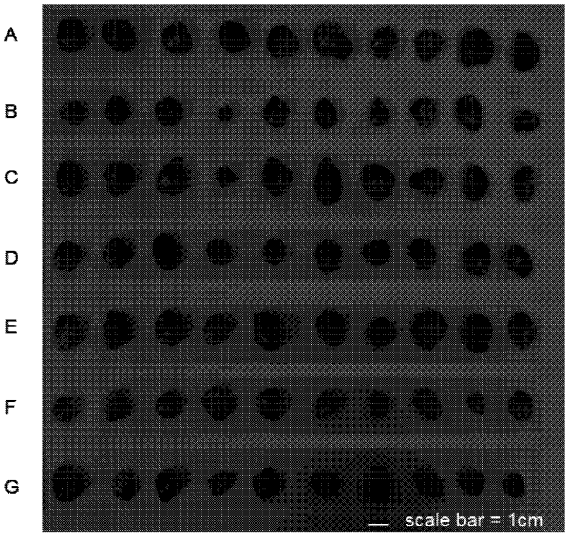
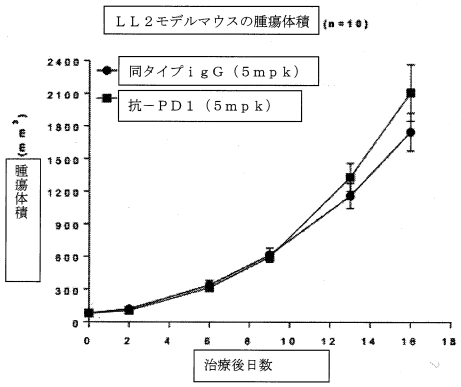
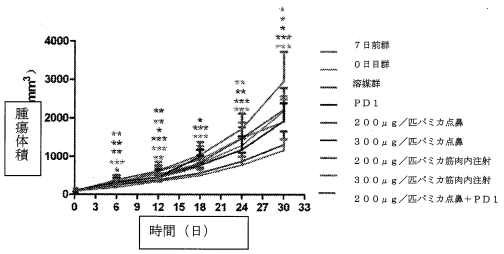


図 20

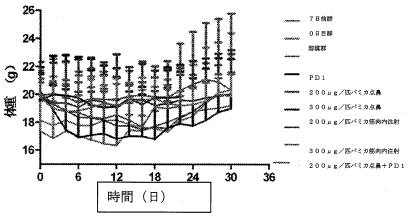
【図２１】



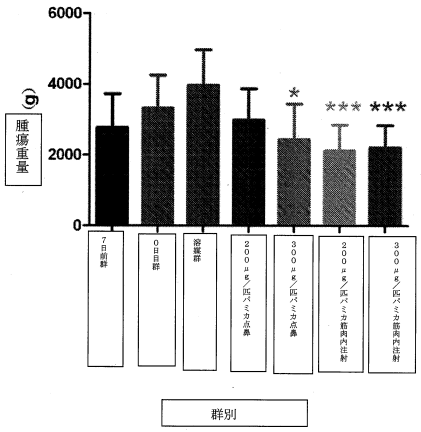
【図２２】



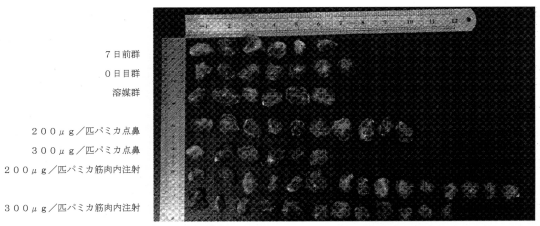
【図２３】



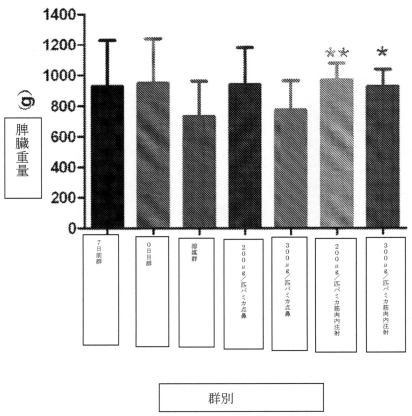
【図２４】



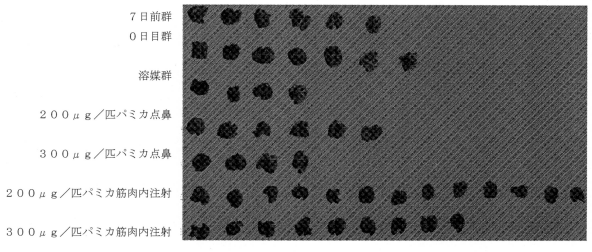
【図２５】



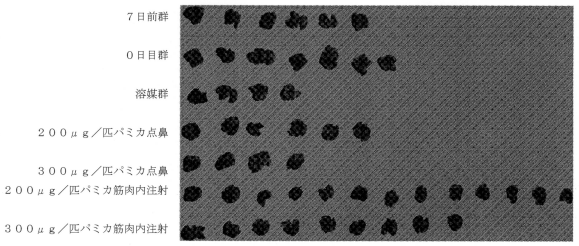
【図２６】



【図２７】



【図２８】



【図２９】

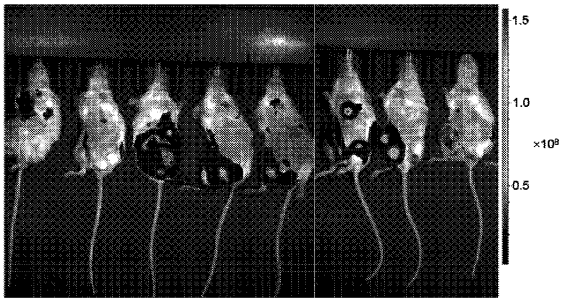


図 29

【図３０】



図 30

【図３１】

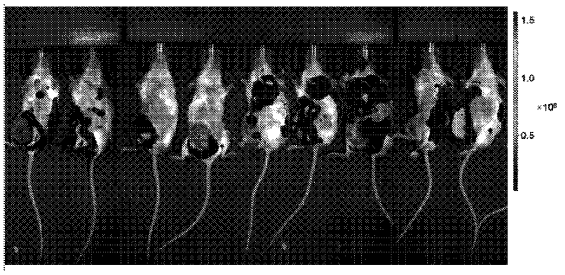


図 31

【図３２】

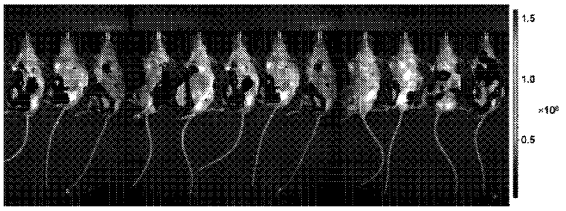


図 32

【図３３】

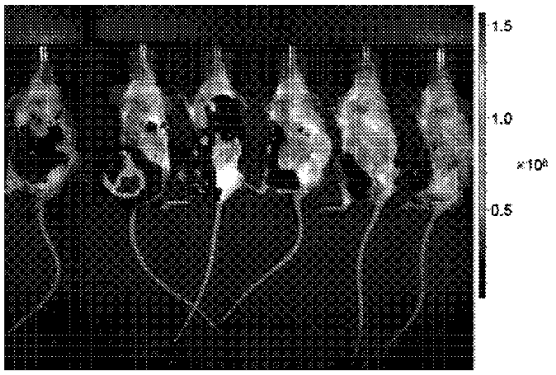


图 33

【図３４】

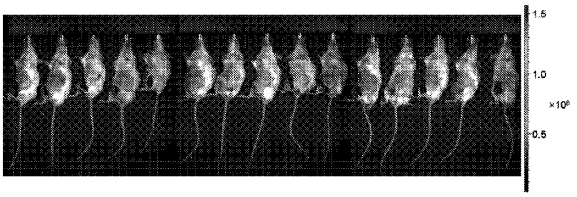


图 34

【図３５】

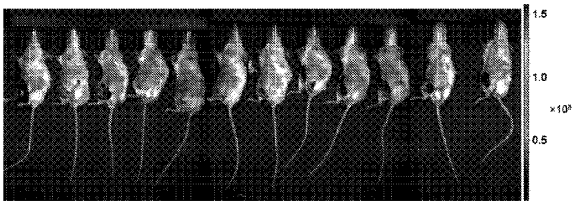


图 35

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI	
A61K	*47/24*	*(2006.01)*	A61K	47/24
A61K	*47/10*	*(2017.01)*	A61K	47/10
A61K	*39/39*	*(2006.01)*	A61K	39/39
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00
A61P	*31/12*	*(2006.01)*	A61P	31/12
A61P	*31/04*	*(2006.01)*	A61P	31/04
A61P	*31/10*	*(2006.01)*	A61P	31/10
A61P	*33/00*	*(2006.01)*	A61P	33/00
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
區開拓路５號５層５１７室
(72)発明者 ▲査▼ 力
中華人民共和国１００００００北京市海澱區開拓路５號５層５１７室
審査官 福山 則明

(56)参考文献 中国特許出願公開第１０７１８４９７３（ＣＮ，Ａ）
中国特許出願公開第１０４４３４７８４（ＣＮ，Ａ）
中国特許出願公開第１０３５９９０７１（ＣＮ，Ａ）
中国特許出願公開第１０５３９６１３０（ＣＮ，Ａ）
Use of Poly(I:C) Stabilized with Chitosan As a Vaccine-Adjuvant Against Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Infection in Zebrafish，ZEBRAFISH，2015年，Vol. 12, No. 6，pp. 1-11
応用糖質科学，2014年，Vol. 4, No. 2，pp. 127-132

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３１／００－３１／８０
Ａ６１Ｋ ３９／００－３９／４４
Ａ６１Ｋ ９／００－ ９／７２
Ａ６１Ｋ ４７／００－４７／６９
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）