

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-139225

(P2012-139225A)

(43) 公開日 平成24年7月26日(2012.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 5/02 (2006.01)	C 1 2 P 5/02	4 B 0 5 0
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 B 0 6 4
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 B 0 6 5
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107	4 C 0 8 5
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-36971 (P2012-36971)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成24年2月23日 (2012. 2. 23)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2011-524473 (P2011-524473) の分割		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 3 5
原出願日	平成21年8月28日 (2009. 8. 28)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/190, 486		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成20年8月28日 (2008. 8. 28)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	マイケル ブローカー
			ドイツ国 3 5 0 4 1 マールブルグ, パッペルヴェーグ 3 0
		Fターム(参考)	4B050 CC03 DD04 LL01 LL05
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 高度に生産する酵母からのスクアレンの生産

(57) 【要約】

【課題】スクアレンを高度に生産 (h y p e r - p r o d u c e) する酵母からスクアレンを調製するための方法の提供。

【解決手段】精製酵母を調製するための方法が開示され、ここでスクアレン供給源は、スクアレンを高度に生産する酵母である。上記スクアレンは、薬学的目的に有用である。例えば、上記スクアレンは、水中油型エマルジョンを調製するために使用され得、上記エマルジョンは、免疫学的アジュバントとして使用するのに特に適している。本発明は、純粋なスクアレンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a) 培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母を増殖させる工程；および (b) 上記工程 (a) において増殖させた酵母からスクアレンを精製する工程を包含する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、米国仮出願第 61 / 190, 486 号の利益を主張し、上記米国仮出願の全容は参照によって本明細書に援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、スクアレンを、例えば、水中油型エマルジョンにおける使用のために、製造する分野にある。

【背景技術】

【0003】

(背景技術)

サメ肝油は、スクアレン(2, 6, 10, 15, 19, 23-ヘキサメチル-2, 6, 10, 14, 18, 22-テトラコサヘキサエン)といわれる分枝状の不飽和テルペノイドを含む。スクアレンは、ヒトワクチンでは、水中油型エマルジョンにおける使用が公知であり、例えば、MF59エマルジョンは、インフルエンザワクチンを補助するために使用される。スクアレンはまた、他の薬学的製品(例えば、軟膏剤、坐剤)および化粧品において使用されている。

【0004】

スクアレンの現在の供給源は、主に魚油、そして特に、サメ肝油である。特に、厳格な製造基準(例えば、NovartisによるMF59の生産の間に使用されるもの)が遵守されていない場合には、サメ肝油から抽出されたスクアレンの使用と関連する問題が存在し得る。例えば、サメは、ヒトに対しても感染性であるかまたはヒトにとって有害である物質を生産する病原体に感染している可能性があり、そしてTSEもしくはTSE様サメ因子が、存在し得る[例えば、参考文献1-3(非特許文献1-3)]。さらに、サメは、ヒトに対する毒素(例えば、カーチャトキシン(carchatoxin))を含み得る。従って、安価で低グレードのスクアレン供給源は、ヒトの薬学的使用には適していない。ヒトレシピエントへの危害のリスクは、上記スクアレンが、免疫学的アジュバントの一部である状況において高まり得る。なぜなら、当然のことながら、アジュバントは、不純物に対して強力な不要の免疫応答を誘導し得るからである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】BorucinskaおよびFrasca、J Fish Diseases、2002年、25:287~98

【非特許文献2】Bertoneら、J Fish Diseases、1996年、19:429~34

【非特許文献3】Briionesら、J Vet Med B、1998年、45:443~5

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、サメ由来スクアレンの安価な低グレード供給源を使うのではなく、スクアレンの薬学的使用(例えば、MF59の製造において使用される場合)は、より高いグレードの材料を利用するが、これら高品質スクアレンは高価であり、利用が制限される。このような高価な供給源は、例えば、発展途上国における使用には、有用ではない。

【0007】

非常に高価であることなしに、これら高い薬学的標準を満たすスクアレン供給源を見いだすことは、有用である。従って、実現性のある代替のスクアレン供給源は、特に、上記スクアレンがヒトにおける非経口的使用について、および／もしくは免疫学的アジュバントにおける使用について意図される場合に、望ましい。薬学的グレードのスクアレンのより安価な供給源は、容易にサメを入手できないか、もしくは例えば、Novartisによって現在使用されている高価な薬学グレードの物質を容易に有することができないかのいずれかである発展途上国において特に有用である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の開示)

本発明は、スクアレンを高度に生産(hyper-produce)する酵母からスクアレンを調製するための方法に関する。酵母は、(一般に安全とみなされる)GRAS生物であるので、薬学的使用のための有用なスクアレン供給源である。さらに、上記スクアレンは、病原体、プリオンおよび環境毒素による汚染なしに調製され得る(例えば、酵母は、もともと(a priori)水銀を含まない)。ワクチン分野において、酵母は、既に使用されている(例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原の組換え発現のために)ので、いかなる特定の規制懸念も存在しない(すなわち、酵母由来スクアレンは、免疫学的アジュバントの調製における使用に特に適している)。最後に、酵母培養技術は、広く行き渡っておりかつ容易に技術移転しやすい。

【0009】

従って、本発明は、純粋なスクアレンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a)培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母を増殖させる工程；および(b)上記工程(a)において増殖させた酵母からスクアレンを精製する工程を包含する。上記精製されたスクアレンは、医薬、食品、食品添加物、化粧品などの調製における成分として使用され得る。

【0010】

本発明はまた、スクアレン含有産物を調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a)培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製されたスクアレンを得る工程；および(b)上記工程(a)のスクアレンと、非スクアレン成分とを合わせて、上記スクアレン含有産物を形成する工程を包含する。

【0011】

本発明はまた、精製スクアレンの製造のために、培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母の使用を提供する。

【0012】

本発明はまた、精製スクアレンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a)酵母培養物を、上記酵母が高収量でスクアレンを生産する条件下で増殖させる工程；(b)スクアレンが97重量%純粋であるように、上記スクアレンを上記培養酵母から精製する工程、を包含する。

【0013】

本発明はまた、水中油型エマルジョンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a)培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母からスクアレンを精製する工程；および(b)上記工程(a)において精製したスクアレンと、水性成分とを合わせて、上記水中油型エマルジョンを形成する工程、を包含する。

【0014】

従って、本発明は、水中油型エマルジョンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、(a)培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製されたスクアレンを得る工程；および(b)上記工程(a)のスクアレンと、水性成分とを合わせて、上記水中油型エマルジョンを形成する工程、を包含する。

【0015】

本発明はまた、免疫原性組成物(例えば、ワクチン)を調製するためのプロセスを提供

10

20

30

40

50

し、上記プロセスは、上記のように、水中油型エマルジョンを調製する工程、および上記エマルジョンと、免疫原とを混合する工程、を包含する。

【0016】

本発明はまた、このようにして免疫原性組成物を調製するためのキットを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、上記のように水中油型エマルジョンを調製する工程、上記エマルジョンを第1の容器にパッケージする工程、および上記キット形態の上記第1の容器と、第2の容器とを組み合わせる工程であって、ここで上記第2の容器は、免疫原を含む、工程を包含する。上記免疫原は、乾燥形態もしくは水性形態にあり得る。

【0017】

本発明はまた、動物における（例えば、哺乳動物における）免疫応答を惹起するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、上記方法において調製された免疫原性組成物を、上記動物に投与する工程を包含する。

10

【0018】

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を惹起するための医薬の製造において使用するためのスクアレンを提供し、ここで上記スクアレンは、（i）培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製され、（ii）水性成分と合わされて、上記医薬に含めるために、水中油型エマルジョンを形成する。

【0019】

本発明は、水中油型エマルジョンを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、（a）酵母培養物を、上記酵母が高収量でスクアレンを生産する条件下で増殖させる工程；（b）上記培養酵母からスクアレンを精製する工程；および（c）工程（b）において精製したスクアレンと、水性成分とを合わせて、上記水中油型エマルジョンを形成する工程を包含する。

20

【0020】

本発明はまた、スクアレンを使用するプロセスにおいて、培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製されたスクアレンを使用することからなる改善を提供する。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

スクアレン含有産物を調製するためのプロセスであって、該プロセスは、（a）培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製したスクアレンを得る工程；および（b）該工程（a）のスクアレンと、非スクアレン成分とを合わせて、該スクアレン含有産物を形成する工程を包含する、プロセス。

30

（項目2）

水中油型エマルジョンを調製するためのプロセスであって、該プロセスは、（a）培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母からスクアレンを精製する工程；および（b）該工程（a）において精製したスクアレンと、水性成分とを合わせて、該水中油型エマルジョンを形成する工程を包含する、プロセス。

（項目3）

水中油型エマルジョンを調製するためのプロセスであって、該プロセスは、（a）培養の間に高収量でスクアレンを生産する酵母から精製したスクアレンを得る工程；および（b）該工程（a）の精製したスクアレンと、水性成分とを合わせて、該水中油型エマルジョンを形成する工程を包含する、プロセス。

40

（項目4）

前記酵母が、5%の細胞乾燥重量のスクアレンを生産する、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

（項目5）

前記酵母が、*S. cerevisiae*などの*Saccharomyces*である、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

（項目6）

前記酵母が、サイトゾル位置を有する短縮型のHMG R酵素を発現する、前述の項目のい

50

ずれかに記載のプロセス。

(項目 7)

前記酵母が、修飾されていない親株と比較して、H M G Rを高度に発現する修飾された株である、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 8)

前記酵母が、修飾されていない親株と比較して、ザイモステロール - 2 4 - メチルトランスフェラーゼおよび / もしくはエルゴスタ - 5 , 7 , 2 4 (2 8) - トリエノール - 2 2 - デヒドロゲナーゼを過小発現する修飾された株である、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 9)

前記酵母が、変異型オキシドスクアレニンシクラーゼを発現する、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

10

(項目 1 0)

前記酵母が、妨害されたスクアレニンエポキシダーゼを有する、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 1 1)

前記酵母が、培養の間にスクアレニン収量を増大させる因子の存在下で増殖させられる、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 1 2)

前記因子が、アリルアミン、ポリコナゾール、6 - アミノ - 2 - n - ペンチルチオベンゾチアゾール、チアミン、もしくはチオカルバメートである、項目 1 1 に記載のプロセス。

20

(項目 1 3)

前記酵母が、スクアレニン精製の前に、部分的嫌気条件下もしくは完全嫌気条件下で増殖させられる、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 1 4)

前記酵母が、動物由来産物を含まない制御された培地中で増殖させられる、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 1 5)

前記スクアレニンが、(重量で) 9 7 % 超純粋である、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

30

(項目 1 6)

前記水中油型エマルジョンが、サブミクロン直径を有する油滴を有する、項目 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

(項目 1 7)

前記水中油型エマルジョンが、マイクロフルイダイズされたエマルジョンである、項目 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

(項目 1 8)

前記水中油型エマルジョンが、スクアレニンおよびポリソルベート 8 0 を含む、項目 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

(項目 1 9)

免疫原性組成物を調製するためのプロセスであって、該プロセスは、項目 3 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のプロセスによって水中油型エマルジョンを調製する工程、および該エマルジョンと免疫原とを混合する工程を包含する、プロセス。

40

(項目 2 0)

免疫原性組成物を調製するためのキットを調製するためのプロセスであって、該プロセスは、項目 3 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のプロセスによって、水中油型エマルジョンを調製する工程、該エマルジョンを第 1 の容器にパッケージする工程、およびキット形態中の該第 1 の容器と、第 2 の容器とを組み合わせる工程であって、ここで該第 2 の容器は免疫原を含む、工程を包含する、プロセス。

(項目 2 1)

50

哺乳動物における免疫応答を惹起するためのプロセスであって、該プロセスは、該哺乳動物に、項目 19 に記載のプロセスによって、もしくは項目 20 のキットを使用することによって調製された免疫原性組成物を投与する工程を包含する、プロセス。

(項目 22)

精製スクアレンを調製するためのプロセスであって、該プロセスは、(a) 酵母培養物を、該酵母が高収量でスクアレンを生産する条件下で増殖させる工程、(b) スクアレンが 97 重量% 純粋であるように、該培養された酵母から該スクアレンを精製する工程、を包含する、プロセス。

【発明を実施するための形態】

【0021】

10

(酵母におけるスクアレン生産)

本発明は、酵母から精製されたスクアレンを使用する。上記酵母は、高いスクアレン収量について選択された天然に存在する株もしくは変異株であり得るが、上記酵母は、一般に、スクアレンを高収量で生産するように操作された、遺伝的に操作された株である。別の可能性は、増大したスクアレン収量を生じる因子の存在下で、天然酵母株、変異酵母株もしくは操作された酵母株を培養することである。

【0022】

スクアレンの収量は、特定の酵母における細胞乾燥重量 (cdw) の%として表され得る。通常の酵母である野生型 *Yarrowia lipolytica* 株は、代表的には、約 0.5% cdw でスクアレンを生産し得るのに対して、通常の *Saccharomyces uvarum* 醸造用酵母は、約 1.4% cdw でスクアレンを生産し得る [4]。「高収量」でスクアレンを生産する酵母は、少なくとも 2% cdw がスクアレンである (例えば、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15% 以上の cdw) ものである。

20

【0023】

スクアレン収量はまた、特定の酵母における総脂質のうちの%として表され得る。通常の *S. uvarum* 醸造用酵母は、総脂質のうちの 33% でスクアレンを生産する [4]。「高収量」でスクアレンを生産する酵母は、総脂質のうちの 40% (例えば、50%、60% など) でスクアレンを生産し得る。

【0024】

30

上記スクアレンは、有利なことには、そのトランス配置 (天然のアイソフォーム) が少なくとも 95% (例えば、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%) である。

【0025】

高収量のスクアレンを有する天然に存在する変異酵母株は、当該分野で公知である (例えば、参考文献 5 に記載される *Torulaspora delbrueckii* 株)。変異体は、変異 (ランダム変異誘発もしくは指向性変異誘発のいずれか) (例えば、参考文献 6 および 7 に記載されるもの) を誘導し、続いて、変異誘発した細胞を、適切に高いスクアレン収量を有するものについてスクリーニングする、周知の方法によって得られ得る。参考文献 8 は、適切な温度で増殖させた場合にスクアレン蓄積を生じる、4- α -カルボキシステロール-C3-デヒドロゲナーゼ (ERG26) の温度感受性変異を有する変異酵母株を記載する。

40

【0026】

しかし、通常、本発明は、遺伝的に操作した酵母を使用する。種々の方法は、出発株のスクアレン収量を増大させるために使用され得る。ステロール代謝は、例えば、スクアレン同化作用を増大させることによって、および/もしくはスクアレン異化作用 (その分解および/もしくはその天然の、エルゴステロールへの変換が挙げられる) を低下させることによって、スクアレン収量を増大させるように操作され得る。スクアレン生合成に關与する遺伝子としては、メバロネートキナーゼ、ホスホメバロネートキナーゼ、ピロホスホメバロネートデカルボキシラーゼ、イソペンテニルピロホスフェートイソメラーゼ、HM

50

G R (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A レダクターゼ)、およびスクアレ
ンシンターゼが挙げられる。スクアレンをエルゴステロールへ変換するのに関与する遺伝
子としては、スクアレノエポキシダーゼ (E R G 1)、ラノステロールシンターゼ、C 1
4 - ジメチラーゼ、d 1 4 - レダクターゼ、C 4 - メチルオキシダーゼ、C 4 - デカルボ
キシラーゼ (E R G 2 6)、3 - ケトレダクターゼ、C 2 4 - メチルトランスフェラーゼ
、C 8 - イソメラーゼ、C 5 - デサチュラーゼ、d 2 2 - デサチュラーゼおよび d 2 4 -
レダクターゼが挙げられる。他の異化酵素としては、L E U 2 (β - イソプロピルマレー
トデヒドロゲナーゼ)、オキシドスクアレノシクラーゼ、ザイモステロール - 2 4 - メチ
ルトランスフェラーゼおよびエルゴスタ - 5 , 7 , 2 4 (2 8) - トリエノール - 2 2 -
デヒドロゲナーゼが挙げられる。このような操作は、例えば、参考文献 9 において開示さ
れている。

10

【 0 0 2 7 】

上記関連酵素についての活性レベルは、任意の適切な様式において、通常は、遺伝的操
作によって、増大させられ得るかもしくは低下させられ得る。酵母は、標準的な方法 (参
考文献 7 および 1 0 に記載されているものが挙げられる) によって遺伝的に操作され得る
。遺伝子は、種々の方法において (例えば、プラスミド中、もしくは染色体組み込みによ
って) 酵母の中へ導入され得る。遺伝子ノックアウト技術もまた、酵母については十分に
確立されている。

【 0 0 2 8 】

酵素活性を増大させる方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：あ
る株中に既に存在する酵素のコピー数を、例えば、1 種以上のさらなる遺伝子を、通常は
プラスミド上に付加することによって、増大させること；例えば、より強力なプロモータ
ーとともに提供することによって、既に存在する酵素の発現レベルを増大させること (高
度発現) ；異種酵素 (すなわち、ある株にこれまで存在していないもの) を付加すること
；阻害因子もしくは抑制因子の発現を低下もしくは防止すること；ある株に既に存在する
酵素の配列を修飾すること (例えば、安定性を高めるため、阻害をもたらすアミノ酸残基
を除去するため、タンパク質輸送もしくは細胞位置を変化させるため) など。例えば、酵
素の配列の短縮が、膜タンパク質から、サイトゾルタンパク質へとその酵素を変化させ、
その結果、このことがスクアレノ蓄積を引き起こし得ることは、公知である。

20

【 0 0 2 9 】

酵素活性を低下させる方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：あ
る株に既に存在する酵素の欠失；例えば、より弱いプロモーターとともに提供すること
によって、既に存在する酵素の発現レベルを低下させること；阻害因子もしくは抑制因子の
発現を増大させること；ある株に既に存在する酵素の配列を修飾すること (例えば、安定
性を低下させるため、酵素活性を媒介するアミノ酸残基を修飾するため、機能的ドメイン
を欠失させるため、タンパク質輸送もしくは細胞位置を変化させるため) など。

30

【 0 0 3 0 】

過小発現 (u n d e r - e x p r e s s i o n) もしくは過剰発現のレベル、および増
大した活性もしくは低下した活性のレベルは、関連する修飾を欠いている対応する野生型
株と比較して表される。

40

【 0 0 3 1 】

酵母における適切な遺伝的操作には既にいくつかの報告がある。例えば、参考文献 1 1
は、H M G R の高度発現と、ザイモステロール - 2 4 - メチルトランスフェラーゼおよび
／もしくはエルゴスタ - 5 , 7 , 2 4 (2 8) - トリエノール - 2 2 - デヒドロゲナーゼ
の低下した発現とに起因して、増大したスクアレノ蓄積を有する酵母を開示している。参
考文献 1 2 は、その膜結合領域を欠き、従って、サイトゾル酵素を提供し、スクアレノ蓄
積を示す、短縮型 H M G R (H M G 1 アイソザイム) を発現する酵母を開示している。ス
クアレノエポキシダーゼの妨害は、スクアレノの蓄積を引き起こす [1 3]。参考文献 1
4 は、アセチル - C o A カルボキシラーゼを阻害し、H M G R を高度に発現させるために
、*Y a r r o w i a l i p o l y t i c a* を修飾して、その結果、上記株が、安価な炭

50

素源（例えば、チーズホエイもしくはサトウキビ）を使用して、2 % c d w でスクアレ
 ンを生産したことを開示している。オキシドスクアレシクラーゼ（E R G 7）の変異は
 また、スクアレ蓄積を引き起こし得る [8]。コレステロールの添加なしでは3 - ケト
 ステロール上で増殖できないエルゴステロール栄養要求株は、スクアレを蓄積するこ
 とが分かった [1 5]。ヘム合成が損なわれた酵母株は、スクアレを蓄積し得る [1 6]

【 0 0 3 2 】

これらアプローチの組み合わせが使用され得る（例えば、スクアレエポキシダーゼの
 ノックアウトと組み合わせた、サイトゾルの短縮型 H M G R の発現）。

【 0 0 3 3 】

短縮型 H M G R を発現する *S . c e r e v i s i a e* 株（例えば、参考文献 1 2 に記載
 されているもの）は、好ましい。理想的には、構成性プロモーター（例えば、A D H 1 プ
 ロモーター）の制御下での可溶性の非膜結合型形態の H M G 1 の発現は、高レベルのスク
 アレン蓄積（4 0 × 野生型）をもたらす。上記短縮型タンパク質は、H M G 1 p のスパー
 サー領域および C 末端触媒ドメインの一部を含み得るが、その N 末端膜貫通領域を欠いて
 いる。ある株は、上記遺伝子の 1 つ以上のコピーを発現し得る。

【 0 0 3 4 】

酵母（天然、変異もしくは操作された）は、スクアレの収量を増大させる因子の存在
 下で増殖させられ得る。例えば、アリルアミン抗真菌剤（例えば、テルビナフィン、ナフ
 チフィン）は、スクアレエポキシダーゼを阻害し得、エルゴステロール欠乏および細胞
 内スクアレの蓄積を生じる [1 7]。スクアレエポキシダーゼインヒビターが致死レ
 ベル未満で含まれるか、または耐性株などで使用される場合、培養物の上記スクアレ収
 量は、増大し得る。約 1 0 0 倍というスクアレ収量の増大は、テルビナフィンの存在下
 で参考文献 1 8 において認められた。種々の *C a n d i d a* 種におけるスクアレエポキ
 シダーゼは、約 1 0 倍までテルビナフィンに対する感受性が異なるので、因子の濃度は、
 目的の任意の酵母について最適化されなければならないかもしれない。スクアレ蓄積を
 引き起こし得る他の抗真菌剤としては、ポリコナゾール [1 9]、6 - アミノ - 2 - n -
 ペンチルチオベンゾチアゾール [2 0]、およびチオカルバメート抗真菌剤（例えば、ト
 ルナフテートおよびトルシクラート） [2 1] が挙げられるが、これらに限定されない。
 チアミンの存在下での増殖はまた、スクアレ収量を増大させ得る [2 2] 。

【 0 0 3 5 】

適切な酵母としては、スクアレを生産するもしくはスクアレを生産するように操
 作され得る任意の酵母が挙げられる。適切な酵母の例としては、以下の属：

【 0 0 3 6 】

【 化 1 】

Arthroascus, Arxiozyma,

Arxula, Bullera, Candida, Debaryomyces, Dekkera, Dipodascopsis, Endomyces, Eremothecium,
Geotrichum, Hanseniaspora, Hansenula, Hormoascus, Issatchenkia, Kloeckera, Kluyveromyces,
Lipomyces, Lodderomyces, Metschnikowia, Pachysolen, Pachytichospora, Pichia,
Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycodes, Schizoblastosporion,
Schizosaccharomyces, Schwaniomyces, Sporobolomyces, Sterigmatomyces, Sympodiomyces,
Taphrina, Torula, Torulaspora, Torulopsis, Trichosporon, Yarrowia, Zygothansula, および
Zygosaccharomyces

に由来する種が挙げられる。本発明に有用な属は、*S a c c l i a r o m y c e s*、およ
 び *T o r u l a s p o r a* である。本発明での使用に好ましい種は、*T o r u l a s p o r a*
d e l b r u e c k i i であり、最も好ましいのは、*S a c c h a r o m y c e s*
c e r e v i s i a e である。

【 0 0 3 7 】

スクアレンを生産するための酵母発酵は、大スケールで行われ得、このことは、ほぼ無限の量のスクアレンをもたらし、従って、生産されるスクアレンの単位コストを下げる。上記酵母は、任意の公知の培養系もしくは発酵系を使用して増殖させられ得る。本発明の使用に適切な酵母発酵系としては、バッチ発酵系および連続発酵系が挙げられる。２段階培養系が使用され得る。上記酵母は、（少なくとも部分的に）嫌気相へ変化させて、スクアレン生産を増大させる前に、バイオマスを増大させる好気条件下で増殖させられ得る。２段階培養系は、スクアレン蓄積が増殖相から分離されるのを可能にする。嫌気条件下での酵母の培養は、スクアレン生産を増大させるために使用され得 [23 - 25]、炭素源はまた、影響力を有し得る。

【 0038 】

酵母は、制御された培地で増殖させられ得るので、培養物は、疾患原因因子、環境毒素および他の汚染物質が確実にない状態であり得る。酵母を増殖させるために適した培地は、酵母種および発酵系に依存する。適切な培地としては、補充物質ありもしくはなしの富栄養 (rich) 培地もしくは最小培地が挙げられる。例えば、上記酵母は、MM、EMM、YPD、YPDS、YPG、YPGS、YT、YAPD、YEPD、YPL、YEP、YNBDおよびSD中で増殖させられ得る。いかなる動物由来産物（例えば、ホエイ）をも含まない培地が、理想的である。動物（特に、ウシ）物質が細胞培養の間に使用される場合、それらは、伝染性海綿状脳症 (TSE) を含まず、特に、ウシ海綿状脳症 (BSE) を含まない供給源から得られるべきである。

【 0039 】

培養条件の制御に起因して、本発明に従って酵母から精製されたスクアレンは、病原体、病原体の代謝産物、毒素、および他の有害な物質による汚染がなく、もともとTSE原因因子を含まない（このような因子は、酵母においては見いだされていない）。酵母からスクアレンを単離するための方法は、当該分野で公知であり、クロマトグラフィー、液体-液体溶媒抽出、臨界未満ガス抽出 [26]、および超臨界流体抽出（必要に応じて、凍結乾燥が先に行われる）（例えば、CO₂を用いる）、クロロホルム-メタノール溶媒抽出 [5, 23, 27] のような方法が挙げられる。理想的には、上記精製スクアレンは、97%より純粋（重量で）であり、より好ましくは、98%より高い、99%、99.5%、99.9%、99.99%、さらには100%純粋である。理想的には、上記精製スクアレンは、スクアレン1gあたり6153pg未満のPCB/ダイオキシン（毒性等量 (TEQ) として測定される）を含む。TEQは、PCB/ダイオキシンの混合物の毒性が、単一の数字として表されることを可能にする。各PCB（ポリ塩化ビフェニル）の毒性は、2, 3, 7, 8-TCDDダイオキシン（基準値1を有する）の毒性の比（毒性等価係数, TEQ; WHO 2005）として表される。混合物の総TEQを計算するために、各PCBの質量には、そのTEFが乗算され、そして、上記TEQは、これら値の合計である。例えば、上記スクアレンは、5000pg/g未満、4000pg/g、3000pg/g、2000pg/g、1000pg/g、500pg/g、100pg/g、50pg/g (TEQ) のダイオキシン/PCBレベルを有し得る。

【 0040 】

いったん上記スクアレンが、上記酵母から精製されたら、上記スクアレンは、下流の産物（例えば、医薬、水中油型エマルジョンアジュバントなど）の調製のために使用され得る。

【 0041 】

（水中油型エマルジョン）

水中油型エマルジョンは、ワクチンを補助することにおいて使用するために特に適切であることが見いだされた。本発明に従って調製されるエマルジョンは、水性成分に加えて、スクアレンおよび少なくとも1種の界面活性剤を含む。上記エマルジョンは、さらなる油を含み得る。理想的には、上記油および界面活性剤は、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。

【 0042 】

スクアレンおよびトコフェロールの油組み合わせが、使用され得る。組成物がトコフェロールを含む場合、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロール、 ϵ -トコフェロール、もしくは ξ -トコフェロールのうちのいずれかが使用され得るが、 α -トコフェロールが、好ましい。上記トコフェロールは、いくつかの形態（例えば、種々の塩および／もしくはアイソマー）をとり得る。塩としては、有機性塩（例えば、コハク酸塩、酢酸塩、ニコチン酸塩など）が挙げられる。D- α -トコフェロールおよびDL- α -トコフェロールが、ともに使用され得る。好ましい α -トコフェロールは、DL- α -トコフェロールである。

【0043】

2～20%（容積で）の範囲の油含有量が代表的である。

10

【0044】

上記エマルジョン中の油滴は、一般に、5 μ m直径未満であり、さらにサブミクロン直径を有し得る。これら小さなサイズは、都合のよいことに、安定なエマルジョンを提供するためにマイクロフルイダイザーで達成される。220nm未満のサイズを有する液滴が好ましい。なぜなら、それらは、濾過滅菌に供され得るからである。

【0045】

界面活性剤は、それらの「HLB」（親水性／親油性バランス）によって分類され得る。本発明の好ましい界面活性剤は、少なくとも10、好ましくは、少なくとも15、およびより好ましくは、少なくとも16のHLBを有する。本発明は、界面活性剤とともに使用され得る。これら界面活性剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般にTweenといわれる）、特に、ポリソルベート20およびポリソルベート80；DOWFAXTM 商用名の下で販売される、エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）、および／もしくはブチレンオキシド（BO）のコポリマー（例えば、直鎖状EO／POブロックコポリマー）；オクトキシノール（これは、反復エトキシ（オキシ-1,2-エタンジール）基の数が変動し得る）（オクトキシノール-9（Triton X-100、もしくはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が特に重要である）；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPA LCA-630／NP-40）；リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（レシチン）；ノニルフェノールエトキシレート（例えば、TergitolTM NPシリーズ）；ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールに由来するポリオキシエチレン脂肪エーテル（Brij界面活性剤として公知）、例えば、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brij 30）；およびソルビタンエステル（一般に、SPANとして公知）、例えば、ソルビタントリオレエート（Span 85）およびソルビタンモノオレエート。非イオン性界面活性剤が好ましい。上記エマルジョン中に含めるための最も好ましい界面活性剤は、ポリソルベート80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート；Tween 80）である。

20

30

【0046】

界面活性剤の混合物が、使用され得る（例えば、Tween 80／Span 85混合物）。ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよびオクトキシノールの組み合わせもまた、適切である。別の有用な組み合わせは、ラウレス（laureth）9とポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび／もしくはオクトキシノールを含む。

40

【0047】

好ましい量の界面活性剤（重量％）は、以下である：ポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えば、Tween 80）0.01～2％；オクチルフェノキシポリオキシエタノールもしくはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えば、Triton X-100、もしくは他のTritonシリーズの界面活性剤）0.001～0.1％；ポリオキシエチレンエーテル（例えば、ラウレス 9）0.1～20％。

【0048】

ポリソルベート80界面活性剤を含むスクアレン含有水中油型エマルジョンが、好ましい。本発明に従って精製されたスクアレンを使用して作製され得る特定の水中油型エマ

50

ルジョンアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

・スクアレン、ポリソルベート 80、およびソルビタントリオレートのサブミクロンエマルジョン。上記エマルジョンの容積での組成は、約5% スクアレン、約0.5% ポリソルベート 80および約0.5% Span 85であり得る。重量の観点では、これら比率は、4.3% スクアレン、0.5% ポリソルベート 80および0.48% Span 85になる。このアジュバントは、参考文献31の第10章および参考文献32の第12章に詳細に記載されるように、「MF59」として公知である[28-30]。上記MF59エマルジョンは、有利なことには、クエン酸イオン（例えば、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液）を含む。

10

【0050】

・スクアレン、トコフェロール、およびポリソルベート 80のサブミクロンエマルジョン。これらエマルジョンは、2~10% スクアレン、2~10% トコフェロールおよび0.3~3% ポリソルベート 80を有し得、スクアレン：トコフェロールの重量比は、より安定なエマルジョンを提供し得るので、好ましくは、1（例えば、0.90）である。スクアレンおよびポリソルベート 80は、約5：2の容積比もしくは約11：5の重量比で存在し得る。1つのこのようなエマルジョンは、PBS中にTween 80を溶解して、2%溶液をもたらし、次いで、90 mlのこの溶液と、（5 gのDL- α -トコフェロールおよび5 mlのスクアレン）の混合物とを混合し、次いで、上記混合物をマイクロフルイダイズ（microfluidise）することによって、作製され得る。得られたエマルジョンは、サブミクロン油滴（例えば、平均直径100~250 nmの間、好ましくは、約180 nm）を有する。上記エマルジョンはまた、3-デオキシシロ化モノホスホリルリピドA（3d-MPL）を含み得る。このタイプの別の有用なエマルジョンは、1ヒト用量あたり、0.5~10 mg スクアレン、0.5~11 mg トコフェロール、および0.1~4 mg ポリソルベート 80を含み得る[33]。

20

【0051】

・スクアレン、トコフェロール、およびTriton界面活性剤（例えば、Triton X-100）のエマルジョン。上記エマルジョンはまた、3d-MPL（以下を参照のこと）を含み得る。上記エマルジョンは、リン酸緩衝液を含み得る。

30

【0052】

・スクアレン、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテル親水性非イオン性界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレン（12）セトステアリルエーテル）および疎水性非イオン性界面活性剤（例えば、ソルビタンエステルもしくはマンニドエステル（例えば、ソルビタンモノオレートもしくは「Span 80」））を含むエマルジョン。上記エマルジョンは、好ましくは、熱可逆性であり、そして/または200 nm未満のサイズを有する少なくとも（容積で）90%の油滴を有する[34]。上記エマルジョンはまた、アルジトール；凍結防止剤（例えば、糖（例えば、ドデシルマルトシドおよび/もしくはスクロース））；および/もしくはアルキルポリグリコシドのうちの1種以上を含み得る。上記エマルジョンは、TLR4アゴニストを含み得る[35]。このようなエマルジョンは、凍結乾燥され得る。

40

【0053】

・スクアレン、ポロキサマー 105およびAbil-Careのエマルジョン[36]。アジュバント付加したワクチン中のこれら成分の最終濃度（重量）は、5% スクアレン、4% ポロキサマー 105（プロニックポリオール）および2% Abil-Care 85（Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 ジメチコン；トリカプリルグリセリル/トリカプリン酸グリセリル）である。

【0054】

上記エマルジョンは、別個の抗原含有成分と、即座に、送達時に、もしくはワクチン製造の間に混合され得る。これら2つの成分が液体である場合、混合のための上記2つの液体の容積比は、変動し得る（例えば、5：1~1：5の間）が、一般に、約1：1である

50

。

【 0 0 5 5 】

従って、本発明のプロセスは、上記エマルジョンと免疫原とを合わせるさらなる工程を包含し得る。上記プロセスは、上記エマルジョンもしくは上記エマルジョン / 免疫原ミックスをパッケージするさらなる工程を包含し得る。本発明に従って生産されるエマルジョンは、キット内の第 1 の容器にパッケージされ得、ここで上記キットは、免疫原を含む第 2 の容器を含む。上記 2 つの容器の内容物は、混合され得、次いで、被験体（例えば、ヒト）に投与され得るか、もしくは別個に共投与され（*co-administered*）得る。

【 0 0 5 6 】

10

（一般）

用語「含む、包含する（*comprising*）」は、「含む、包含する（*including*）」、および「からなる（*consisting*）」を包含し、例えば、Xを「含む」組成物は、もっぱらXからなってもよいし、いくつかのさらなるものを含み得る（例えば、X + Y）。

【 0 0 5 7 】

数値 x に関して用語「約」とは、任意であり、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【 実施例 】

【 0 0 5 8 】

20

（発明を実施するための形態）

種々の変異酵母株を、遺伝的操作技術によって調製する。上記変異株は、スクアレン代謝に関与する酵素を過剰発現するか過小発現するかのいずれかである。1つのこのような酵母は、参考文献 11 に開示される ATC 1551 株（これは、最大 16 % までの *cdw* で、適切な増殖条件下でスクアレンを生産し得る）である。

【 0 0 5 9 】

培養後に、上記培養細胞を集め、ガラスビーズミルを使用して粉碎する。スクアレンを、（2 : 1）クロロホルム - メタノール溶媒抽出によって、または収量を改善するために、凍結乾燥および次いで超臨界二酸化炭素抽出を使用して参考文献 5 において開示される方法によって、上記溶解物から精製する。得られたスクアレンは、高度に純粋である（ $> 95\%$ ）。

30

【 0 0 6 0 】

上記精製スクアレンを、*Tween* 80 および *Span* 85 界面活性剤の混合物と、およびクエン酸緩衝液と合わせて、5 % スクアレン、0.5 % *Tween* 80 および 0.5 % *Span* 85（容積で）を有する混合物を調製する。この混合物をマイクロフルイダイズし、500 nm 未満の平均液滴サイズを有するエマルジョンを調製する。このエマルジョンは、「MF 59」として公知であり、ワクチンアジュバントとして使用し得る。

【 0 0 6 1 】

本発明は、例示のみを目的として記載されており、改変が行われ得ると同時に、それが本発明の範囲および趣旨内にあり得ることが理解される。

40

【 0 0 6 2 】

（参考文献）

【 0 0 6 3 】

【化 2】

- [1] Borucinska & Frasca (2002) *J Fish Diseases* 25:287-98.
- [2] Bertone *et al.* (1996) *J Fish Diseases* 19:429-34.
- [3] Briones *et al.* (1998) *J Vet Med B* 45:443-5.
- [4] Blagovic *et al.* (2001) *Food technol. Biotechnol.* 39:175-81.
- [5] Bhattacharjee *et al.* (2003) *World Journal of Micorbiology and Biotechnology*, 19: 605-608.
- [6] Boeke *et al.*, (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 197:345-346
- [7] Sherman *et al.*, (1986) *Methods and Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- [8] Germann *et al.* (2005) *J Biol Chem* 280:35904-13.
- [9] Veen *et al.* (2003) *FEMS Yeast Research* 4:87-95.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor
- [11] US patent 5460949.
- [12] Polakowski *et al.* (1998) *Appl Microbiol Biotechnol* 49(1):66-71.
- [13] Pasrija *et al.* (2005) *J Antimicrob Chemother.* 55(6):905-13.
- [14] *Performance of the Third 50 Completed ATP Projects* (2006) NIST SP 950-4, pages 59-62.
- [15] Gachotte *et al.* (1999) *PNAS USA* 96:12655-60.
- [16] Ness *et al.* (1998) *J Bacteriol.* 180(7):1913-9.
- [17] Ryder *et al.* (1985) *Biochem J.* 230:765-770
- [18] Leber *et al.* (2001) *European Journal of Biochemistry* 268:914-924.
- [19] Sanati *et al.* (1997) *Antimicrob Agents Chemother.* 41(11):2492-6.
- [20] Kuchta *et al.* (1997) *FEMS Microbiol Lett* 150:43-7.
- [21] Ryder *et al.* (1986) *Antimicrob Agents Chemother* 20:858-60.
- [22] Nishikawa *et al.* (1978) *Biochim Biophys Acta* 531(1):86-95.
- [23] Bhattacharjee *et al.*, (2001) *World Journal of Micorbiology and Biotechnology*, 17: 811-816
- [24] Jahnke & Klein (1983) *J Bacteriol* 155:488-92.
- [25] Valero *et al.* (2001) *J Bioscience Bioengin* 92:33-8.
- [26] WO94/26683.
- [27] Foch *et al.*, (1957) *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- [28] WO90/14837.
- [29] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [30] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [31] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [32] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [33] WO2008/043774.
- [34] US-2007/0014805.
- [35] US-2007/0191314.
- [36] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.

10

20

30

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02		
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00		
C 1 2 R	1/865	(2006.01)	C 1 2 P	5/02		
			C 1 2 R	1:865		

F ターム(参考) 4B064 AB04 BJ09 CA06 CC24 CE02 CE08 CE17 DA01
 4B065 AA80X AA80Y AB01 AC16 BA02 BD01 BD07 BD11 BD16 CA03
 CA44
 4C076 AA17 BB11 CC06 DD09F DD34A FF16 FF67
 4C085 AA38 EE06 EE07 FF12 GG01 GG08 GG10