

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7291633号
(P7291633)

(45)発行日 令和5年6月15日(2023.6.15)

(24)登録日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K 47/46
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28

請求項の数 23 (全68頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-565928(P2019-565928)
(86)(22)出願日	平成30年3月23日(2018.3.23)
(65)公表番号	特表2020-522485(P2020-522485 A)
(43)公表日	令和2年7月30日(2020.7.30)
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/057488
(87)国際公開番号	WO2018/219521
(87)国際公開日	平成30年12月6日(2018.12.6)
審査請求日	令和3年3月18日(2021.3.18)
(31)優先権主張番号	62/512,352
(32)優先日	平成29年5月30日(2017.5.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73)特許権者	305060279 グラクソスミスクライン バイオリジカルズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 8 9
(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者	アルヴァン, ポル ベルギー 1 3 3 0 リクセンサール, リ ュ ドランスティテュ 8 9, グラクソ スミスクライン バイオリジカルズ ソシ エテ アノニム
(72)発明者	ジュホーレット, フィリップ ベルギー 1 3 3 0 リクセンサール, リ ュ ドランスティテュ 8 9, グラクソ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アジュバントを製造する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

(b)溶媒を除去するステップ

を含む、前記方法。

【請求項 2】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b)サポニンを加えるステップ、並びに

(c)溶媒を除去するステップ

を含む、前記方法。

【請求項 3】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並

びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b)溶媒を除去するステップ、並びに

(c)サポニンを加えるステップ

を含む、前記方法。

【請求項 4】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む、前記方法。

【請求項 5】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、以下:

(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

(b)サポニンを加えるステップ

を含む、前記方法。

【請求項 6】

マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、以下:

(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b)サポニンを加えるステップ、並びに

(c)TLR4アゴニストを加えるステップ

を含み、ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい、前記方法。

【請求項 7】

第1の溶液が更にTLR4アゴニストを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、混合チャンバーへの第1の溶液のための1つの入口及び混合チャンバーへの第2の溶液のための2つの入口を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、混合チャンバーの断面積が $0.2 \sim 3.2 \text{ mm}^2$ であり、且つ混合チャンバーが実質的に長方形の横断面である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、混合チャンバーの横断面が $1.6 \sim 2.4 \text{ mm}$ の長辺及び $0.1 \sim 4 \text{ mm}$ の短辺を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、混合チャンバーが $1 \sim 10 \text{ cm}$ の長さである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

マイクロ流体デバイスが、横断面が長方形の混合チャンバーを含み、該混合チャンバーが $0.2 \sim 3.2 \text{ mm}^2$ の断面積、 $1.4 \sim 3.2 \text{ mm}$ の長辺、 $0.1 \sim 1.2 \text{ mm}$ の短辺、第1の溶液のための1つの入口及び該混合チャンバーの近位端に对称に配置された第2の溶液のための2つの入口、 $1.5 \sim 5 \text{ cm}$ の混合チャンバー長さ並びに該混合チャンバーの遠位端に位置する出口を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、混合チャンバーへの総流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり $12 \sim 30 \text{ ml/min/mm}^2$ である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1

10

20

30

40

50

項記載の方法。

【請求項 1 4】

マイクロ流体デバイスが混合チャンバーを含み、第1と第2の溶液の混合チャンバーへの流量の比率が1:2～1:6の範囲である、請求項 1～1 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 5】

マイクロ流体デバイスが複数の混合チャンバーを含み、且つ、複数の混合チャンバー内の全ての混合チャンバーが同一のポンプにより供給され、且つ、全ての混合チャンバーからの混合された材料が更に処理及び/又は貯蔵する前に収集される、請求項 1～1 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 6】

溶媒が70～90%v/vのエタノール及び10～30%v/vのイソプロパノールを含む、請求項 1～1 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 7】

第1の溶液が100～170mg/mlのホスファチジルコリン脂質、20～50mg/mlのステロール及び4～10mg/mlのTLR4アゴニストを含む、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 8】

ステロールがコレステロールであり、サポニンがQS-21であり、且つ、TLR4アゴニストが、存在する場合、3D-MPLである、請求項 1～1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 9】

第2の溶液が少なくとも90%w/wの水及び1～4mg/mlのサポニンを含む、請求項 1～1 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 0】

免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含むアジュバント化免疫原性組成物の調製方法であって、

(i)請求項 1～1 9 のいずれか 1 項記載の方法に従ってリポソームアジュバントを製造するステップ、

(ii)リポソームアジュバントを免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドと混合するステップ

を含む、前記方法。

【請求項 2 1】

アジュバント化免疫原性組成物の製造方法であって、免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを、請求項 1～1 9 のいずれか 1 項記載の方法に従って製造されたりポソームアジュバントと組み合わせるステップを含む、前記方法。

【請求項 2 2】

ホスファチジルコリン脂質がジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)及びジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジパルミトレオイルホスファチジルコリン及びジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、並びにこれらの混合物から選択される、請求項 1～2 1 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 3】

ホスファチジルコリン脂質がDOPCである、請求項 2 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むアジュバントを製造する方法及び関連する態様に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

特に免疫原性の弱いサブユニットワクチンの場合、体液性及び細胞性免疫反応を改良す

10

20

30

40

50

るためにアジュバントをワクチンに含ませる。病原体による自然感染と同様に、アジュバントは、長期にわたる適応免疫を増進する先天性免疫系の活性化に依拠している。多数の先天性免疫経路の同時活性化が自然感染の特徴であるので、アジュバントは、ワクチン接種に対する適応免疫反応を増進するために多数の免疫刺激剤を組み合わせることがある。

【 0 0 0 3 】

Adjuvant System 01(AS01)は、2種類の免疫刺激剤、3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドA(3D-MPL)及びQS-21を含有するリポソームをベースとするアジュバントである(Garcon及びVan Mechelen、2011;Didierlaurentら、2017)。TLR4アゴニスト3D-MPLは、サルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)由来リポ多糖の非毒性誘導体である。QS-21は、南米の木キラヤ・サポナリア・モリナ(*Quillaja saponaria* Molina)の樹皮から抽出された天然のサポニン分子である(Kensilら、1991;Ragupathiら、2011)。AS01は、最近開発されたマラリアワクチンRTS,S(Mosquirix(商標))及び帯状疱疹(*Herpes zoster*)HZ/suワクチン(Shingrix(商標))並びにヒト免疫不全ウイルス及び結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のような病原体に対して開発中の多数の候補ワクチンに含まれている。これらの候補ワクチンの臨床前及び臨床評価の間、抗原特異的抗体及びCD4⁺T細胞免疫の両方が一貫して観察された。ワクチン接種に対して一貫して細胞性免疫反応を生じるAS01の能力により、ワクチン接種に対して通例主として体液性反応を増進する他のアジュバントと区別される(Blackら、2015;Garcon及びVan Mechelen、2011)。付随して、AS01アジュバント化(adjuvanted)ワクチンは、幼児(RTS,S接種)及び高齢者(HZ/su接種)のような困難な集団においてワクチン接種に対する免疫原性を増進するのに効率的である。

【 0 0 0 4 】

AS01の注入の結果、動物モデルにおいて先天性免疫の迅速且つ一時的な活性化が生じる。免疫化の際好中球及び単球が流入領域リンパ節(dLN)に迅速に補充される。更に、AS01が、T細胞活性化にとって必要なMHCII^{high}樹状細胞(DC)の補充及び活性化を誘発する(Didierlaurent A.M.ら、2014)。また、AS01の成分の作用機序に関する幾つかのデータも利用可能である。3D-MPLはTLR4を介して伝わってNF- κ B転写活性及びサイトカイン産生を刺激し、ヒト及びマウスの両方で抗原提示細胞(APC)を直接活性化する(De Beckerら、2000;Ismailiら、2002;Martinら、2003;Mata-Haroら、2007)。QS-21は、マウスにおいて高い抗原特異的抗体反応及びCD8⁺T細胞反応を(Kensil及びKammer、1998;Newmanら、1992;Soltysikら、1995)、そしてヒトにおいて抗原特異的抗体反応を(Livingstonら、1994)増進する。その物理的性質のため、QS-21はin vivoで危険信号として機能するかもしれないと考えられる(Lambrechtら、2009;Liら、2008)。QS-21はASC-NLRP3インフラマソーム及びその後のIL-1 β /IL-18放出を活性化することが示されているが(Marty-Roix, R.ら、2016)、サポニンのアジュバント効果に関わる正確な分子経路はまだ明確に定義付けられていない。

【 0 0 0 5 】

3D-MPL及びQS-21は免疫反応の誘発に相乗的に作用することが示されている。また、両方の免疫刺激剤が供給されるやり方は誘発される反応の質に影響を及ぼす重要な要因であることが示されており、AS01におけるリポソームによる提示は水中油エマルジョンをベースとするAS02より高い効能を提供する(Dendougaら、2012)。

【 0 0 0 6 】

米国特許出願公開第2010202928号及び米国特許出願公開第2015115488号は、マイクロ流体工学を用いたリポソームの調製を記載している。

【 0 0 0 7 】

国際公開第2013/192310号は、制御されたマイクロボルトテックスによるナノ粒子の大量生産の方法を開示している。これらの方法はポリマー又は非ポリマー性粒子及びハイブリッド粒子の調製の際に役に立つと述べられている。

【 0 0 0 8 】

Kimら、Nano Letters、2012、12(7):3587~3591も、制御されたマイクロボルテ

10

20

30

40

50

ックスによるナノ粒子の大量生産の方法を開示している。

【 0 0 0 9 】

Hoodら、Small、2015、11、43:5790～5799は、マイクロ流体工学を用いたリポソームの製造方法を記載している。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

リポソームアジュバントの安全且つ便利で費用効果がある生産を商業的に実行可能な規模で可能にしつつ伝統的な製造アプローチで得られる免疫学的性能を維持する新しい製造アプローチに対するニーズが残されている。

10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

この度、驚くべきことに、マイクロ流体デバイスを使用して、サポニンを含むリポソームアジュバントを製造し、一方伝統的な製造アプローチに匹敵する免疫学的性能を維持することができるということが判明した。

【 0 0 1 2 】

したがって、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される：

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

20

(b) 溶媒を除去するステップ。

【 0 0 1 3 】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される：

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b) サポニンを加えるステップ、並びに

(c) 溶媒を除去するステップ。

【 0 0 1 4 】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される：

30

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b) 溶媒を除去するステップ、並びに

(c) サポニンを加えるステップ。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供する。

40

【 0 0 1 6 】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法も提供される：

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

(b) サポニンを加えるステップ。

【 0 0 1 7 】

更に、リポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物が提供され、前記リポソーム濃縮物は、水、溶媒、ホスファチジルコリン脂質、サポニン及びコレステロールを含む。したがって、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含

50

むりポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを
含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
- (b)溶媒を除去するステップ。

【0018】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液
を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、並びに
- (c)溶媒を除去するステップ。

10

【0019】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液
を混合するステップ、
- (b)溶媒を除去するステップ、並びに
- (c)サポニンを加えるステップ。

【0020】

本発明はまた、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供する。

20

【0021】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法も提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液
を混合するステップ、並びに
- (b)サポニンを加えるステップ。

【0022】

更に、リポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物が提供され、前記リポソーム濃縮物は、水、溶媒、DOPC、サポニン及びコレステロールを含む。

30

【0023】

本発明は、更に、溶媒及び100~170mg/mlの脂質を含む溶液を提供し、溶媒は70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。そのような溶液は、リポソームアジュバントのようなりポソームの製造に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】単一混合チャンバマイクロ流体チップの模式図。

【図2】八混合チャンバマイクロ流体チップ。

40

【図3】液体分配マニホールド(1から16)。

【図4】2つの八混合チャンバマイクロ流体チップと分配及び収集マニホールドとの作動上の配置。

【図5】リポソームサイズ分布に対するストック調製方法の影響。

【図6】濃度及び温度に対するストック安定性依存度。

【図7】リポソームサイズに対する溶媒組成及び温度の影響。

【図8】実施例4の作動条件及び組織配置の詳細。

【図9】実施例4の試験条件の視覚的概要。

【図10】実施例4の結果。

【図11】ZavとPdlとの関係。

50

- 【図12】100mg/mlのDOPC及び比率5(1:4の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図13】130mg/mlのDOPC及び比率5(1:4の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図14】160mg/mlのDOPC及び比率5(1:4の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図15】100mg/mlのDOPC及び比率4(1:3の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図16】100mg/mlのDOPC及び比率6(1:5の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図17】130mg/mlのDOPC及び比率6(1:5の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図18】130mg/mlのDOPC及び比率4(1:3の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図19】160mg/mlのDOPC及び比率4(1:3の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図20】160mg/mlのDOPC及び比率6(1:5の有機:水性相)でのサイズの予測。
- 【図21】130mg/mlのDOPC及び比率5(1:4の有機:水性相)で試験した確認条件。 10
- 【図22】gE特異的IgG力価。
- 【図23】gE特異的CD4+ T細胞のパーセンテージ。
- 【図24】マイクロ流体生産リボソームサイズ及び貯蔵後のPdI安定性。
- 【図25】商業規模のマルチチャンバードesignのプロセスの模式図。
- 【図26】初期マニホールドdesignの模式図。
- 【図27】初期マニホールドを試験するためのセットアップの写真。
- 【図28】200ml/minで初期マニホールドに対して観察された流量変化。
- 【図29】50ml/minで初期マニホールドに対して観察された流量変化。
- 【図30】流量分布の予測された値と測定された値とを比較したグラフ。
- 【図31】改良されたマニホールドdesignの模式図。 20
- 【図32】改良されたマニホールドユニット1(「B1」)に対する各々のチャンネルの平均からの流量変化。
- 【図33】改良されたマニホールドユニット2(「B2」)に対する各々のチャンネルの平均からの流量変化。
- 【図34】改良されたマニホールドユニット3(「A2」)に対する各々のチャンネルの平均からの流量変化。
- 【図35】16の混合チャンバーと単一の混合チャンバーのリボソームのサイズ分布比較。
- 【図36】マイクロ流体と薄膜のリボソームアジュバントのgE特異的IgG力価比較。
- 【図37】マイクロ流体と薄膜のリボソームアジュバントのgE特異的CD4+ T細胞比較。
- 【図38】マイクロ流体と薄膜のリボソームアジュバントのgE特異的IgG力価GMR比較。 30
- 【図39】マイクロ流体と薄膜のリボソームアジュバントのgE特異的CD4+ T細胞GMR比較。
- 【図40】サポニン(QS21)及びTLR4アゴニスト(3D-MPL)を有する16の混合チャンバーと単一の混合チャンバーのリボソームのサイズ分布比較。
- 【発明を実施するための形態】
- 【0025】
- 配列識別子の説明
- 配列番号1:RTSポリペプチド配列
- 配列番号2:結核菌(M. tuberculosis)H37Rv株Rv1196ポリペプチド配列
- 配列番号3:結核菌H37Rv株Rv0125ポリペプチド配列 40
- 配列番号4:M72融合ポリペプチド配列
- 配列番号5:M72-2his融合ポリペプチド配列
- 配列番号6:水痘帯状疱疹(Varicella zoster)ウイルストランケート化したgEポリペプチド配列
- 配列番号7:立体配座的に制限されたRSV PreF抗原ポリペプチド配列
- 配列番号8:HIV TV1 gp120ポリペプチド配列
- 配列番号9:HIV 1086.C gp120ポリペプチド配列
- 【0026】
- 詳細な説明
- 本発明は、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリボ
- 50

ソームアジュバントを製造する方法を提供する:

- (a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
- (b)溶媒を除去するステップ。

【0027】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、並びに
- (c)溶媒を除去するステップ。

10

【0028】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)溶媒を除去するステップ、並びに
- (c)サポニンを加えるステップ。

【0029】

本発明はまた、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供する。

20

【0030】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法も提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
- (b)サポニンを加えるステップ。

【0031】

更に、リポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物が提供され、前記リポソーム濃縮物は、水、溶媒、ホスファチジルコリン脂質、サポニン及びコレステロールを含む。

30

【0032】

本発明はまた、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供する:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
- (b)溶媒を除去するステップ。

【0033】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、並びに
- (c)溶媒を除去するステップ。

40

【0034】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液

50

を混合するステップ、
 (b)溶媒を除去するステップ、並びに
 (c)サポニンを加えるステップ。

【0035】

本発明はまた、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供する。

【0036】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法も提供される：

(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

(b)サポニンを加えるステップ。

【0037】

更に、リポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物が提供され、前記リポソーム濃縮物は、水、溶媒、DOPC、サポニン及びコレステロールを含む。

【0038】

本発明は更に、溶媒及び100～170mg/mlの脂質を含む溶液を提供し、溶媒は70～90%v/vのエタノール及び10～30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。

【0039】

本発明は更に、溶媒及び100～170mg/mlの脂質を含む溶液を提供し、溶媒は70～90%v/vのエタノール及び10～30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。そのような溶液は、リポソームアジュバントのようなりポソームの製造に使用することができる。

【0040】

マイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスは、通例少なくとも1つの面がmm以下の程度の寸法を有し、混合が通例受動的手段によって起こる(即ち、混合チャンバー内に可動部品がなく、流体流の接触によって起こる)流体処理装置である。マイクロ流体デバイスは、第1の溶液と第2の溶液を混合する混合チャンバーを含む。

【0041】

混合チャンバーは通例25.6mm²以下、例えば12.8mm²以下、適切には6.4mm²以下、殊に3.2mm²以下、特に1.6mm²以下の断面積を有する。混合チャンバーは通例0.1mm²以上、適切には0.2mm²以上、殊に0.3mm²以上、特に0.4mm²以上の断面積を有する。幾つかの実施形態において、混合チャンバーは0.2～3.2mm²、例えば0.4～1.6mm²、殊に0.6～1.2mm²、特に0.7～1.0mm²(例えば0.8mm²)の断面積を有する。

【0042】

混合チャンバーの横断面はいかなる形状でもよいが、通例対称である。横断面は実質的に長方形(例えば正方形)でよい。横断面は實際上細長くてよく、大きい方の寸法が垂直方向の寸法の少なくとも二倍、例えば少なくとも三倍又は少なくとも四倍である。大きい方の寸法は垂直方向の寸法の十倍以下、例えば八倍以下又は六倍以下でよい。大きい方の寸法は通常垂直方向の寸法の二～十倍、例えば三～八倍、殊に四～六倍、特に五倍である。

【0043】

長方形の横断面は1～8mm、例えば1～4mm、例えば1.4～3.2mm、殊に1.6～2.4mm、特に1.8～2.2mm(例えば2mm)の長辺を有し得る。長方形の横断面は0.1～4mm、例えば0.1～2mm、場合により0.1～1.2mm、例えば0.1～0.8mm、殊に0.2～0.6mm、特に0.3～0.5mm(例えば0.4mm)の短辺を有し得る。

【0044】

マイクロ流体デバイスは第1の溶液の送達のために混合チャンバーへの少なくとも1つの入口(例えば1つの入口)を有する。デバイスは第1の溶液の送達のために混合チャンバーへ

10

20

30

40

50

の複数の入口、例えば2つの入口を有していてもよい。マイクロ流体デバイスは第1の溶液の送達のために混合チャンバーへの5つ以下、例えば4つ以下の入口を有するのが適切である。

【0045】

マイクロ流体デバイスは第2の溶液の送達のために混合チャンバーへの少なくとも1つの入口を有する。デバイスは第2の溶液の送達のために混合チャンバーへの複数の入口、例えば2つの入口を有していてもよい。マイクロ流体デバイスは第2の溶液の送達のために混合チャンバーへの5つ以下、例えば4つ以下の入口を有するのが適切である。

【0046】

適切な混合を容易にするために、より大きい断面積の混合チャンバーの場合第1の溶液及び第2の溶液のための入口の数を増やしてもよい。

10

【0047】

入口の横断面はいかなる形状でもよいが、通例対称である。横断面は長方形(例えば正方形)でもよい。

【0048】

各々の入口は通例 1.28mm^2 以下、適切には 0.64mm^2 以下、殊に 0.32mm^2 以下、特に 0.16mm^2 以下の断面積を有する。各々の入口は通例 0.01mm^2 以上、適切には 0.02mm^2 以上、殊に 0.03mm^2 以上、特に 0.04mm^2 以上の断面積を有する。幾つかの実施形態において、各々の入口は $0.02\sim 0.32\text{mm}^2$ 、例えば $0.04\sim 0.16\text{mm}^2$ 、殊に $0.06\sim 0.12\text{mm}^2$ 、特に $0.07\sim 0.10\text{mm}^2$ (例えば 0.8mm^2)の断面積を有する。

20

【0049】

全ての入口の合計断面積は混合チャンバーの断面積の70%未満、例えば60%未満、殊に50%未満が適切である。

【0050】

便利には、入口は混合チャンバーの1つの辺の全長に及び得る。

【0051】

各々の入口の形状及びサイズは独立して変わり得る。しかし、通例、第1の溶液のための入口は形状及びサイズが同じであり、第2の溶液のための入口は形状及びサイズが同じである。全ての入口の形状及びサイズが同じであるのが便利である。各々の入口は混合チャンバーの幅の2~20%、例えば5~15%、例えば8~12%、殊に10%であり得る。特定の入口デザインは形状が長方形であり、0.2mmの幅で、混合チャンバーの他の辺の全長に及び(例えば0.4mmの高さ)。

30

【0052】

入口は、通例、混合チャンバー内への第1の溶液及び第2の溶液の流れの方向が混合チャンバーを通る流れの全般的な方向に対して実質的に平行(例えば15度以内、例えば10度以内、特に5度以内)、例えば平行であるように位置する。

【0053】

マイクロ流体デバイスは混合された材料の回収のために混合チャンバーからの少なくとも1つの出口を有する。デバイスは混合された材料の回収のために混合チャンバーからの複数の出口、例えば2つ又は3つの出口を有していてもよく、これらは後に一緒にされる。デバイスは混合された材料の回収のために混合チャンバーからの単一の出口を有するのが適切である。

40

【0054】

出口の横断面はいかなる形状であってもよいが、通例対称である。横断面は長方形(例えば正方形)でよく、通例 $0.2\sim 1\text{mm}^2$ 、例えば $0.3\sim 0.6\text{mm}^2$ 、例えば $0.4\sim 0.5\text{mm}^2$ の面積を有する。他の例において、出口は円形の横断面であってもよい(例えば $0.5\sim 1\text{mm}$ 、例えば $0.6\sim 0.8\text{mm}$ 、例えば 0.75mm の直径を有する)。

【0055】

全ての出口の合計断面積は混合チャンバーの断面積の70%未満、例えば60%未満、殊に50%未満であるのが適切である。

50

【 0 0 5 6 】

混合チャンバーは、液体が出口に到達する時間までに混合が実質的に完全になるのが可能なように適切な長さであるべきである。通例、チャンバーは長さが1～10cm、例えば1.5～5cm、殊に1.8～4cm、特に2～3cm、例えば2.5cmである。

【 0 0 5 7 】

1つの実施形態において、デバイスは横断面が長方形の混合チャンバーを含み、該混合チャンバーは $0.2 \sim 3.2 \text{ mm}^2$ (例えば $0.6 \sim 1.0 \text{ mm}^2$)の断面積、 $1.4 \sim 3.2 \text{ mm}$ (例えば $1.6 \sim 2.4 \text{ mm}$)の長辺、 $0.1 \sim 1.2 \text{ mm}$ (例えば $0.32 \sim 0.48 \text{ mm}$)の短辺、第1の溶液のための1つの入口及び混合チャンバーの近位端に対称に配置された第2の溶液のための2つの入口、 $1.5 \sim 5 \text{ cm}$ (例えば $2 \sim 3 \text{ cm}$)の混合チャンバー長さ、並びに混合チャンバーの遠位端に位置する出口を有する。入口は $0.16 \sim 0.24 \text{ mm}$ の幅で、混合チャンバーの他の辺の全長に及ぶのが適切である。

10

【 0 0 5 8 】

マイクロ流体デバイスはいずれかの適切な材料、即ち第1の溶液及び第2の溶液中に使用される成分に認容され、且つ製造に適している材料から形成され得る。適切な材料にはシリコン及びガラスが含まれる。ステンレス鋼はもう1つ別の適切な材料である。デバイスはそのような材料からエッチングによって製造することができ、例えばシリコンデバイスはDeep Reactive Ion Etching(DRIE又はプラズマエッチング)によって製造することができ、ガラスデバイスはウェットエッチング(HFエッチング)によって製造することができる。選ばれた材料は、表面処理に供して表面の特性を改良してもよい。

20

【 0 0 5 9 】

扱い易い期間であるバッチ実行時間(例えば240分以下、殊に120分以下)を達成するには、系が十分なレベルの生産性を達成することが必要である。加えて、始動及び停止効果の影響を低減することによってバッチ間の一貫性を支援するには、実行時間が適切な長さ(例えば少なくとも30分、殊に少なくとも60分)であることが必要である。

【 0 0 6 0 】

マイクロ流体デバイスのスケールアップ

工業規模(例えば毎分少なくとも 0.5 g のホスファチジルコリン脂質、例えば毎分少なくとも 1 g 、特に毎分少なくとも 2 g 、殊に毎分少なくとも 4 g の規模、例えば毎分少なくとも 0.5 g のDOPC、例えば毎分少なくとも 1 g 、特に毎分少なくとも 2 g 、殊に毎分少なくとも 4 g の規模)でのリポソームアジュバントの製造を容易にするために、大きい混合チャンバーを使用してもよいし、又は複数の混合チャンバーを並行して作動させてもよい。例えば、2つ以上の混合チャンバー、特に4つ以上、殊に8つ以上、例えば16以上(例えば16)。並行して作動させる複数の混合チャンバーは128以下、例えば64以下、特に32以下でよい。それ故、幾つかの実施形態において、複数の混合チャンバーは2～128、例えば4～64、例えば8～32である。

30

【 0 0 6 1 】

幾つかの状況において、複数の混合チャンバーの各々の混合チャンバーは独立して作動させ、第1の溶液及び第2の溶液を独立したポンプにより混合チャンバーへ供給することができる(即ち、各々のポンプが同時に他の混合チャンバーへ溶液を供給することはない)。第1の溶液及び/若しくは第2の溶液は独立した容器に貯蔵してもよいし(即ち、これらの容器は第1の溶液及び/又は第2の溶液を1つより多くの混合チャンバーに同時に供給することはない)、又は第1の溶液及び/若しくは第2の溶液を1つより多くの混合チャンバー(例えば全ての混合チャンバー)内に使用される1つの容器に貯蔵してもよい。各々の混合チャンバーからの混合された材料は個別に回収し、貯蔵/処理することができ、場合により後の段階で合わせてもよいし、又は更に処理及び/若しくは貯蔵する前に(例えば全ての混合チャンバーからのものを)合わせてもよい。

40

【 0 0 6 2 】

複数の混合チャンバーの全ての混合チャンバーに同一のポンプで供給し、全ての混合チャンバーからの混合された材料を更に処理及び/又は貯蔵する前に収集するのが便利である

50

。全ての混合チャンバー及び全ての混合チャンバー内の流体の流れが実質的に同じであって、各々の混合チャンバーから得られる材料が実質的に同じであるのが適切である。各々の混合チャンバーで測定される流量が所望の流量から5%未満だけ変化するの望ましい。

【0063】

混合チャンバー、入口及び出口、第1の溶液の供給、第2の溶液及び多数の混合チャンバーの混合された材料の収集は作動中実質的に同じであるように構成するのが最適である。

【0064】

複数の混合チャンバーの各々の混合チャンバーは個々のチップとして構成してもよいし、又は便宜上幾つかの混合チャンバーを単一のチップに組み合わせてもよい(例えば8つの混合チャンバーを含有する)。そのようなチップの幾つかは複数のチャンバーを提供するように並行して使用することができる(例えば、各々が8つの混合チャンバーを含有する2つのチップは並行して作動する全部で16の混合チャンバーを提供する)。

10

【0065】

複数の混合チャンバーは50~2000ml/min、例えば100~1000ml/min、特に200~500ml/minの総速度で混合された材料を製造することができるのが適切である。

【0066】

本明細書に記載されているマイクロ流体デバイスは本発明の1つの態様である。

【0067】

第1の溶液

第1の溶液(「有機」相)は溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む。第1の溶液は溶媒、DOPC及びステロールを含むのが適切である。

20

【0068】

溶媒は、ホスファチジルコリン脂質(例えばDOPC)、ステロール及び存在する他のあらゆる成分を可溶化して、第1の溶液を単一の相として提供するべきである。また、溶媒は水性溶液と混和性であって、第1の溶液及び第2の溶液の混合の結果リポソームの懸濁物を含む単一の液体相が得られるべきである。

【0069】

溶媒は有機溶媒又は少なくとも1種の有機溶媒を含む単一相混合物である。

【0070】

溶媒は短鎖の有機アルコール、例えばエタノール及び/又はイソプロパノールを含み得る

30

【0071】

適切には、溶媒はエタノールを、例えば70~90%v/vの間、より適切には75~85%v/vの間、又は78~82%v/vの間の濃度で含む。

【0072】

適切には、溶媒はイソプロパノールを、例えば10~30%v/vの間、より適切には15~25%v/vの間、又は18~22%v/vの間の濃度で含む。

【0073】

溶媒は、70~90%v/vの間の濃度のエタノール及び10~30%v/vの間の濃度のイソプロパノール、例えば75~85%v/vの間の濃度のエタノール及び15~25%v/vの間の濃度のイソプロパノール、殊に78~82%v/vの間の濃度のエタノール及び18~22%v/vの間の濃度のイソプロパノール、特に80%v/vの濃度のエタノール及び20%v/vの濃度のイソプロパノールから本質的になるのが適切である。より高いエタノール濃度、例えば90%v/v超のエタノールでは、溶媒の可溶化能力が制限される(最終的には系の能力を束縛する)。より低いエタノール濃度、例えば70%v/v未満のエタノールでは、方法が作動パラメーター、例えば温度に対してより敏感になり得る。

40

【0074】

既に述べたように、第1の溶液はホスファチジルコリン脂質を含む。ホスファチジルコリン脂質は12~20個の炭素原子を有し、場合により1つの二重結合を有する非分岐アシル鎖を含有し、14~18個の炭素原子を有し、場合により1つの二重結合を有するアシル鎖を

50

有するものが特に重要である。通例、脂質分子中の2つのアシル鎖は各々同じである。興味のある特定のホスファチジルコリン脂質としては、飽和ホスファチジルコリン脂質、ジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)及びジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、並びに不飽和ホスファチジルコリン脂質、ジパルミトレオイルホスファチジルコリン及びジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、並びにこれらの混合物がある。ホスファチジルコリン脂質は他の脂質から実質的に精製されているのが適切である。通例ホスファチジルコリン脂質は少なくとも80%純粋、例えば少なくとも90%純粋、殊に少なくとも95%純粋、特に98%純粋、例えば少なくとも99%又は更には少なくとも99.8%純粋である。

10

【0075】

本発明は、したがって、溶媒及び100~170mg/mlの脂質を含む溶液を提供し、溶媒は70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。脂質はホスファチジルコリン脂質であるのが適切であり、したがって提供される溶液は第1の溶液であるのが適切である。

【0076】

既に述べたように、第1の溶液はDOPC(ジオレオイルホスファチジルコリン)を含むのが適切である。DOPCは他の脂質から、他のアシル鎖の型であれ他の頭部基の型であれ、実質的に精製されているのが適切である。通例、DOPCは少なくとも90%純粋、例えば少なくとも95%純粋、殊に少なくとも98%純粋、特に99%純粋、例えば少なくとも99.8%純粋である。

20

【0077】

第1の溶液は100~170mg/mlのDOPC、例えば100~160mg/mlのDOPC、殊に120~160mg/mlを含むのが適切である。第1の溶液は120~150mg/mlのDOPC、例えば120~140mg/mlのDOPCを含み得る。特に、第1の溶液はおよそ130mg/mlのDOPC(例えば125~135mg/mlのDOPC、殊に130mg/mlのDOPC)を含み得る。

【0078】

ステロールは通例コレステロールである。コレステロールはMerck Index、第13版、381頁に獣脂中に見られる天然に存在するステロールとして開示されている。コレステロールは式(C₂₇H₄₆O)を有し、(3 β)-コレスタ-5-エン-3-オールともいわれる。

30

【0079】

第1の溶液は20~50mg/ml、例えば25~40mg/ml、殊におよそ32.5mg/ml(例えば30~35mg/ml、特に32.5mg/ml)のステロール(例えばコレステロール)を含むのが適切である。

【0080】

第1の溶液の乾燥重量は100~250mg/ml、例えば140~220mg/ml、殊に150~220mg/mlであるのが適切である。

【0081】

本発明は、したがって、溶媒及び100~170mg/mlの脂質を含む溶液を提供し、溶媒は70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。脂質はDOPCであるのが適切であり、したがって提供される溶液は第1の溶液であるのが適切である。

40

【0082】

本発明で役に立つ脂質は通例膜形成性脂質である。膜形成性脂質はリン脂質(例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール及びホスファチジルセリン)、セラミド及びスフィンゴミエリンを含めて多様な範囲の構造を含む。膜形成性脂質は通例極性の頭部基(膜内で水性相に向けて整列する)及び1つ以上(例えば2つ)の疎水性の尾部基(膜内で会合して疎水性のコアを形成する)を有する。疎水性の尾部基は通例アシルエステルの形態であり、これはその長さ(例えば8~26個の炭素原子)及びその不飽和度(例えば1つ、2つ又は3つの二重結合)の両方

50

が変化し得る。

【0083】

本発明で役に立つ脂質は天然起源でも合成起源でもよく、単一の純粋な成分(例えば重量基準で90%純粋、殊に95%純粋、適切には99%純粋)、単一の種類の脂質成分(例えばホスファチジルコリンの混合物、又は代わりに、保存されたアシル鎖型の脂質の混合物)でよく、又は多くの異なる脂質型の混合物でもよい。

【0084】

本発明の1つの実施形態において、脂質は単一の純粋な成分である。

【0085】

純粋な脂質は一般に合成又は半合成起源である。本発明で役に立つ純粋な脂質の例としては、ホスファチジルコリン(例えば、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC及びDOPC、特にDLPC、DMPC、DPPC及びDOPC、殊にDOPC)及びホスファチジルグリセロール(例えばDPPG)、適切にはホスファチジルコリンがある。純粋な脂質の使用は、その明確な組成のために望ましいが、一般により高価である。

10

【0086】

本発明の1つの実施形態において、脂質は成分の混合物である。

【0087】

本発明で役に立つ脂質の混合物は、当業者に公知の手段による抽出及び精製によって得られる天然の起源のものでよい。天然起源の脂質混合物は一般に純粋な合成脂質よりかなり安価である。天然由来の脂質としては卵又は大豆からの脂質抽出物があり、これらの抽出物は一般にアシル鎖長、不飽和度及び頭部基型の混合物を有する脂質を含有する。植物起源の脂質抽出物は通例動物起源のものより高い不飽和レベルを示すと期待され得る。起源の変動のため、脂質抽出物の組成はバッチ間で変動し得ることに注意されたい。

20

【0088】

本発明の1つの実施形態において、脂質は単一の頭部基型のリン脂質(例えばホスファチジルコリン)を重量で少なくとも50%、殊に少なくとも75%、適切には少なくとも90%含有する脂質抽出物である。本発明の第2の実施形態において、特定の脂質抽出物は、それらの比較的安価なコストのために好ましいことがある。本発明の第3の実施形態において、脂質は保存されたアシル鎖長(例えば重量で少なくとも50%、殊に少なくとも75%、適切には少なくとも90%)、例えば長さが12個(例えばラウリル)、14個(例えばミリスチル)、16個(例えばパルミチル)又は18個(例えばステアリル又はオレオイル)の炭素原子を有する脂質混合物である。

30

【0089】

本発明で役に立つ脂質抽出物は重量で少なくとも50%のリン脂質(例えば、ホスファチジルコリン及びホスファチジリエタノールアミン)、殊に重量で少なくとも55%のリン脂質、特に重量で少なくとも60%(例えば75%又は90%)のリン脂質を含むのが適切である。

【0090】

脂質混合物はまた、純粋な脂質の組合せ、又は1つの脂質抽出物と他の脂質抽出物若しくは純粋な脂質との組合せによって調製することもできる。

【0091】

脂質(例えばDOPC)とステロールとの比率は通常3:1~5:1w/w、例えば3.5:1~4.5:1w/wである。

40

【0092】

幾つかの実施形態において、第1の溶液は溶媒及び100~160mg/mlの脂質及び30~40mg/mlのコレステロールから本質的になり、溶媒は70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。脂質はホスファチジルコリンであるのが望ましい。脂質はDOPCであるのが適切である。

【0093】

TLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを調製するために、TLR4アゴニストは場合により第1の溶液に含ませてもよい。第1の溶液は1~25mg/ml、例えば2~16mg/m

50

l、殊に3～12mg/ml、特に4～10mg/ml(例えばおよそ6.5、例えば5.5～7.5mg/ml、殊に6.5mg/ml)のTLR4アゴニストを含有し得る。

【0094】

本発明はまた、溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法も提供し、前記方法は、

- (i)少なくとも一部分の溶媒中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、
 - (ii)懸濁したTLR4アゴニストをホスファチジルコリン脂質及びコレステロールと組み合わせるステップ、
 - (iii)更なる溶媒を加えるステップ、
 - (iv)混合するステップ
- を含む。

10

【0095】

本発明はまた、溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法も提供し、前記方法は、

- (i)少なくとも一部分の溶媒中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、
 - (ii)懸濁したTLR4アゴニストをDOPC及びコレステロールと組み合わせるステップ、
 - (iii)更なる溶媒を加えるステップ、
 - (iv)混合するステップ
- を含む。

【0096】

混合は30～50、殊に35～45、例えば40の温度で始めるのが適切である。少なくとも一部分の溶媒は溶媒の少なくとも25%、殊に少なくとも35%、特に少なくとも45%であるのが適切である。少なくとも一部分は溶媒の90%以下、例えば80%以下、殊に70%以下、特に60%以下であるのが適切である。幾つかの例において、少なくとも一部分は溶媒の35～70%、例えば45～60%である。

20

【0097】

更なる溶媒は残りの溶媒全てであるのが適切であるが、残りの溶媒の一部であって追加の溶媒を後に加えてもよい。それ故、本発明はまた、溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法も提供し、前記方法は、

- (i)少なくとも一部分の溶媒中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、
 - (ii)懸濁したTLR4アゴニストをホスファチジルコリン脂質及びコレステロールと組み合わせるステップ、
 - (iii)更なる溶媒を加えるステップ、
 - (iv)混合するステップ、
 - (v)追加の溶媒を加えるステップ
- を含む。

30

【0098】

更なる溶媒は残りの溶媒全てであるのが適切であるが、残りの溶媒の一部であって追加の溶媒を後に加えてもよい。それ故、本発明はまた、溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法も提供し、前記方法は、

- (i)少なくとも一部分の溶媒中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、
 - (ii)懸濁したTLR4アゴニストをDOPC及びコレステロールと組み合わせるステップ、
 - (iii)更なる溶媒を加えるステップ、
 - (iv)混合するステップ、
 - (v)追加の溶媒を加えるステップ
- を含む。

40

【0099】

追加の溶媒は溶媒の0～30%、例えば0～20%でよい。

【0100】

上述の方法のいずれかで得られる溶液はその後マイクロ流体装置で使用する前にろ過し

50

て微粒子状の物質を除去することができる。

【0101】

この方法の他の特徴は第1の溶液に関して記載した通りであり得、例えば溶液は100～160mg/mlの脂質及び30～40mg/mlのコレステロールを含み、溶媒は70～90%v/vのエタノール及び10～30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。脂質はホスファチジルコリンであるのが望ましい。脂質はDOPCであるのが適切である。溶液は4～10mg/mlのTLR4アゴニスト、特に3D-MPLを含むのが適切である。

【0102】

本発明は、100～160mg/mlの脂質及び30～40mg/mlのコレステロールから本質的になる溶液を提供するのが適切であり、溶媒は70～90%v/vのエタノール及び10～30%v/vのイソプロピルアルコールを含む。脂質はホスファチジルコリンが望ましく、脂質はDOPCであることより適切である。溶液は4～10mg/mlのTLR4アゴニスト、特に3D-MPLを含むのが適切である。

10

【0103】

第2の溶液

第2の溶液(「水性」相)は水を含み、幾つかの方法においてはサポニンを含んでいてもよい。

【0104】

第2の溶液は逆溶媒(counter solvent)として働き、第1の溶液と混合するとリポソームを形成する。第1の溶液からの成分の沈殿が速ければ速いほど、通例得られるリポソームはより小さくなる。

20

【0105】

第2の溶液は実質的に水性であり、少なくとも90%v/vの水、例えば少なくとも95%の水、殊に少なくとも98%の水、特に100%の水を含む。

【0106】

第2の溶液中に存在する場合、サポニンは0.05～25mg/ml、例えば0.2～10mg/ml、殊に0.5～5mg/ml、特に0.8～3mg/ml(例えば約1.625mg/ml、例えば1.2～2mg/ml、殊に1.625mg/ml)の濃度で存在するのが適切である。

【0107】

第2の溶液中にサポニンが存在しない場合、第2の溶液は水から本質的になる(例えば水からなる)のが適切である。

30

【0108】

サポニンが第2の溶液中に存在する場合、第2の溶液は水及びサポニンから本質的になる(例えば水及びサポニンからなる)のが適切であり、例えば第2の溶液は注射用水中のサポニン(例えばQS-21)でよい。

【0109】

第2の溶液のイオン強度は150nM以下、例えば100nM以下、特に80nM以下、殊に60nM以下、例えば40nM以下であるのが適切である。

【0110】

導電率は水性溶液のイオン強度の都合のよい代用物であり得る。第2の溶液の導電率は12mS/cm以下、例えば10mS/cm以下、8mS/cm以下、6mS/cm以下、又は4mS/cm以下であるのが適切である。

40

【0111】

第2の溶液は水性サポニンから本質的になるのが適切である。

【0112】

マイクロ流体の作動

最適作動条件はデバイスの正確な構成及び生成物の所望の特性に依存する。

【0113】

混合チャンバー内への総流量は混合チャンバー横断面の単位面積当たり15～30ml/min/mm²、例えば16～28ml/min/mm²、殊に17.5～25ml/min/mm²、特に19～21(例え

50

ば20)ml/min/mm²であるのが適切である。

【0114】

第1と第2の溶液との流量の比率は1:2～1:6、例えば1:3～1:5、殊に1:3.5～1:4.5の範囲、特に1:4であるのが適切である。混合された材料中の溶媒の高いレベルはリポソームの安定性に影響を及ぼし得るので高い溶媒濃度をもたらず流量の比率は回避するのが望ましく、溶媒濃度50%は1:1の比率の結果であり、1:2では33%、1:3の比率では25%、1:4の比率では20%、1:5の比率では16.6%となる。第1の溶液の低い流量では系の生産性が低下する。比較的大きい容積の混合された材料を生じる流量の比率は、一定の閾値(例えば50L)を超える溶媒を含有する組成物の取扱い及び使用に関する安全プロトコールのためあまり望ましくない。

10

【0115】

混合チャンバー中への第1の溶液の流量は混合チャンバー横断面の単位面積当たり2～7.5ml/min/mm²、例えば2.5～7ml/min/mm²、殊に3～6.5ml/min/mm²、特に3.5～6(例えば5)ml/min/mm²の範囲が適切である。

【0116】

混合チャンバー中への第2の溶液の流量は混合チャンバー横断面の単位面積当たり11～25ml/min/mm²、例えば12～20ml/min/mm²、殊に14～18ml/min/mm²、特に15～17(例えば16)ml/min/mm²の範囲が適切である。

【0117】

第1の溶液及び第2の溶液は通例10～30℃、例えば15～25℃、特に18～22℃、殊に20℃の領域の温度で供給され、同じ又は異なる温度、適切には同じ温度、殊に20℃でよい。

20

【0118】

混合チャンバーは10～30℃、例えば15～25℃、特に18～22℃、殊に20℃の領域の温度に維持することができる。デバイスのデザイン及び環境条件に応じて、第1の溶液及び第2の溶液の温度を積極的に制御することが必要なだけで、混合チャンバー温度を積極的に制御する必要はないことがある。第1の溶液及び第2の溶液の混合は少々発熱性であり得る。より低い作動温度はより小さいリポソームを形成することになる。

【0119】

マイクロ流体デバイスは、例えば温度が10～30℃、例えば15～25℃の範囲、特に約20℃(例えば18～22℃、特に20℃)に維持される制御された温度環境内で作動させることができる。

30

【0120】

系の作動圧力は制御する必要がない。

【0121】

混合チャンバー内の最大のレイノルズ数は2100、特に1800、例えば1500、殊に1000、例えば500が適切である。混合チャンバー内の最大のレイノルズ数は25～1500の範囲内、より適切には50～500、特に75～300、殊に100～200の間が適切である。レイノルズ数を計算する方法は当業者に公知であり、本明細書中実施例に例示されている。

【0122】

リポソーム

第1の溶液及び第2の溶液を混合するとリポソームが形成される。

40

【0123】

用語「リポソーム」は当技術分野で周知であり、水性の空間を取り囲む1つ以上の脂質二重層を含む小胞の一般的カテゴリーを規定する。それ故、リポソームは1つ以上の脂質及び/又はリン脂質二重層からなり、その構造中に他の分子、例えばタンパク質又は炭水化物を含有することができる。脂質及び水性相が両方とも存在するので、リポソームは水溶性の物質、脂溶性の物質、及び/又は両親媒性の化合物をカプセル化又は封じ込めることができる。

【0124】

50

リポソームのサイズはリン脂質の組成及びその調製に使用した方法に応じて30nmから数umまで変化し得る。

【0125】

本発明のリポソームはホスファチジルコリン脂質を含有するか、又は、ホスファチジルコリン脂質及びステロールから本質的になる(該当する場合はサポニン及びTLR4アゴニストを含む)。

【0126】

本発明のリポソームはDOPCを含有するか、又は、DOPC及びステロールから本質的になる(該当する場合はサポニン及びTLR4アゴニストを含む)のが適切である。

【0127】

本発明において、リポソームのサイズは50nm~200nm、殊に60nm~180nm、例えば70~165nmの範囲である。最適には、リポソームは安定であっておよそ100nmの直径を有している過による便利な滅菌が可能であるべきである。

【0128】

リポソームの構造完全性は、リポソームのサイズ(Z平均直径、Zav)及び多分散性を測定する動的光散乱(DLS)のような方法により、又は、リポソームの構造解析のための電子顕微鏡法により評価することができる。適切には、平均粒径は95~120nmの間であり、及び/又は、多分散性(PdI)指数は0.35以下、特に0.3以下、例えば0.25以下である。1つの実施形態において、平均粒径は95~120nmの間であり、及び/又は、多分散性(PdI)指数は0.2以下である。

【0129】

幾つかの状況において、溶媒及びある種の追加の成分の存在はリポソームのサイズに影響を及ぼす可能性がある。それ故、リポソームのサイズは溶媒除去及び追加の成分の組み込み後に適切に測定される。

【0130】

溶媒を除去する

回収された混合材料は水及び溶媒中にリポソームを含む。そのような材料はリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物であり、前記リポソーム濃縮物は水、溶媒、ホスファチジルコリン脂質、サポニン及びコレステロールを含み、例えば水、溶媒、DOPC、サポニン及びコレステロールを含む。回収された材料は後に使用するために貯蔵してもよいし、又は溶媒の幾らか若しくは全てを除去するために更に処理してもよい。

【0131】

アジュバント中のリポソームの使用を容易にするために、実質的に全ての有機溶媒を除去する(例えば少なくとも98%w/wの水、例えば少なくとも99%の水、殊に少なくとも99.5%の水、特に少なくとも99.9%の水、例えば少なくとも99.99%を残す)のが望ましい。

【0132】

残留する有機溶媒はヒト用量当たり150ug未満、例えばヒト用量当たり100ug未満、例えばヒト用量当たり50ug未満、殊にヒト用量当たり20ug未満(例えばヒト用量当たり10ug以下)と一致するレベルが適切である。残留する有機溶媒はInternational Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use Guideline For Residual Solvents Q3C(R6)に適合するレベルであるのが望ましい。

【0133】

溶媒除去は、個別に、又は組み合わせて使用できるいろいろな方法で行うことができる。適切な方法としては、限外ろ過及び透析、殊に透析ろ過がある。

【0134】

溶媒の少なくとも一部分、例えば溶媒の実質的に全部の除去は透析により行うことができる。透析は選択的に透過性の半透過性の封じ込め容器を使用するが、その結果、回収された材料が半透過性の封じ込め容器に導入される場合、溶媒が容器の半透過性の部分を通過し、リポソーム(存在するならばサポニン及びTLR4アゴニストも)が保持される。例えば、使用する半透過性の封じ込め容器は単一の半透膜を含むことができ、溶媒除去は回収さ

10

20

30

40

50

れた材料を含む半透過性の封じ込め容器を交換媒体内に浸し、膜により分離される液体を拡散により平衡に到達させることによって達成することができる。透析はバッチ又は連続モードの作動で行われ得る。例えば、透析は、交換媒体のバッチ交換を伴って複数回繰り返して所望のレベルの溶媒除去を達成することができる。透析はまた、回収された材料及び/又は交換媒体を連続的に交換する連続的プロセスであることもできる。本方法で役に立ち得る代表的な透析膜には7kDa膜がある。

【0135】

溶媒の少なくとも一部分、例えば溶媒の実質的に全部の除去は限外ろ過により行うことができる。限外ろ過は、半透膜で分離された第1の区画及び第2の区画を含む封じ込め容器を使用する。回収された材料は封じ込め容器の第1の区画に入れることができ、次いでこれを第2の区画に対して正圧にすることができ、その結果液体が封じ込め容器の半透過性の部分を通過する。透析ろ過は限外ろ過の一形態であり、交換媒体を容器の第1の区画に加えることにより残りの液体の少なくとも一部分を交換媒体と交換することができる。その結果、限外ろ過が進行するにつれて、残りの液体は交換媒体の組成になる傾向がある。透析ろ過はいろいろな方法で行うことができ、連続法(定容積ともいわれる)では、交換媒体を膜上での液体ろ過に匹敵する速度で加え、不連続法では残りの液体の容積が変化し、交換媒体を不連続的に加える(例えば、初期の希釈と、その後の元の容積への濃縮又は初期の濃縮と、その後の元の容積への希釈など)。最適な作動モードは、1)初期の試料容積、濃度及び粘度、2)所要の最終試料濃度、3)様々な濃度での試料の安定性、4)透析ろ過に必要とされる緩衝剤の容積、5)合計処理時間、6)利用可能なりザーサイズ、7)経済を始めとする多くの要因に依存し得る。代表的な透析ろ過膜にはHydrosart 30kDがある。

【0136】

溶媒除去の間に使用される交換媒体は最終のリポソームアジュバントの媒体に対応する必要はないが、便宜上交換媒体は所望の最終のリポソームアジュバント媒体又はその濃縮物、例えばリン酸緩衝生理食塩水又は別の所望の緩衝組成物であるのが適切である。

【0137】

幾つかの方法において、サポニン は溶媒の除去の前に回収された混合材料に加えてもよい。他の方法において、サポニンは溶媒の除去後に加えてもよい。

【0138】

サポニン

本発明で使用するのに適切なサポニンはQuil A及びその誘導体である。Quil Aは南米の木キラヤ・サボナリア・モリナから単離されたサポニン調製物であり、1974年Dalgaardらによりアジュバント活性を有すると最初に記載された("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, 44巻, Springer Verlag, Berlin, 243~254頁)。アジュバント活性を保持し、Quil Aに関連する毒性をもたないQuil Aの精製画分がHPLCにより単離されている(例えば、欧州特許第0362278号参照)。一般的に興味がある画分としてはQS7、QS17、QS18及びQS-21、例えばQS7及びQS-21(QA7及びQA21ともいわれる)がある。QS-21は特に重要なサポニンである。

【0139】

本発明の幾つかの実施形態において、サポニンはキラヤ・サボナリア・モリナquil Aの誘導体、適切にはQuil Aの免疫学的に活性な画分、例えばQS7、QS17、QS18又はQS-21、特にQS-21である。

【0140】

通例サポニン、例えばQuil A、特にQS-21は、少なくとも90%純粋、例えば少なくとも95%純粋、殊に少なくとも98%純粋、特に99%純粋である。

【0141】

本発明の有益な特徴は、サポニンが外因性のステロール、例えばコレステロールを用いてクエンチされる反応原性の(reactogenic)より少ない組成物として提示されることである。

【0142】

10

20

30

40

50

サポニンが第1及び第2の溶液の混合後に加えられる方法において、サポニンの量は通例より早く加えるならば使用されるはずの量と同等である。

【0143】

TLR4アゴニスト

TLR4アゴニストの適切な例はリポ多糖、適切にはリピドAの非毒性誘導体、特にモノホスホリルリピドA、より特定のには3-デオ-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)である。

【0144】

3D-MPLはGlaxoSmithKline Biologicals N.A.により「MPL」という名称で販売されており、文書を通じて3D-MPLと称されている。例えば、米国特許第4,436,727号、同第4,877,611号、同第4,866,034号及び同第4,912,094号参照。3D-MPLは英国特許出願公開第2 220 211号に記載されている方法に従って製造することができる。化学的にはそれは、4、5又は6つのアシル化された鎖を有する3-脱アシル化されたモノホスホリルリピドAの混合物である。本発明において、小さい粒子の3D-MPLは水性のアジュバント組成物を調製するのに使用できる。小さい粒子の3D-MPLは、0.22µmのフィルターを通して滅菌ろ過できるような粒径を有する。そのような調製物は国際公開第94/21292号に記載されている。本発明で役に立つ水性のアジュバント組成物を調製するには粉末化された3D-MPLを使用するのが適切である。

10

【0145】

使用することができる他のTLR4アゴニストはアルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)、例えば国際公開第98/50399号又は米国特許第6,303,347号(AGPの調製方法も記載されている)に記載されているものである。幾つかのAGPIはTLR4アゴニストであり、幾つかはTLR4アンタゴニストである。

20

【0146】

本発明で役に立ち得る他のTLR4アゴニストとしては、例えば国際公開第2008/153541号若しくは国際公開第2009/143457号又は文献論文Coler RNら、(2011)、Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant.、PLoS ONE、6(1): e16333.、doi:10.1371/journal.pone.0016333及びArias MAら、(2012)、Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140.、PLoS ONE、7(7): e41144.、doi:10.1371/journal.pone.0041144に記載されているグルコピラノシル脂質アジュバント(GLA)がある。国際公開第2008/153541号又は国際公開第2009/143457号は、本発明で役に立ち得るTLR4アゴニストを規定する目的で参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0147】

通例TLR4アゴニスト、例えばリポ多糖、特に3D-MPLは少なくとも90%純粋、例えば少なくとも95%純粋、殊に少なくとも98%純粋、特に99%純粋である。

【0148】

幾つかの方法において、TLR4アゴニストは溶媒の除去の前に回収された混合材料に加えてもよい。他の方法において、TLR4アゴニストは溶媒の除去後に加えてもよい(そのような状況において、TLR4の量は通例より早く加えられるならば使用される量と同等である)。

40

【0149】

それ故、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質、ステロール及びTLR4アゴニストを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
- (b)溶媒を除去するステップ。

【0150】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴ

50

ニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される:

- (a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b) サポニンを加えるステップ、
- (c) TLR4アゴニストを加えるステップ、並びに
- (d) 溶媒を除去するステップ。

ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

【0151】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

10

- (a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b) 溶媒を除去するステップ、
- (c) サポニンを加えるステップ、並びに
- (d) TLR4アゴニストを加えるステップ。

ステップ(c)及び(d)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

【0152】

加えて、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

20

- (a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b) サポニンを加えるステップ、
- (c) 溶媒を除去するステップ、並びに
- (d) TLR4アゴニストを加えるステップ。

【0153】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される:

- (a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b) TLR4アゴニストを加えるステップ、
- (c) 溶媒を除去するステップ、並びに
- (d) サポニンを加えるステップ。

30

【0154】

また、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質、ステロール及びTLR4アゴニストを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供される。

【0155】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なりポソーム濃縮物を製造する方法も提供される:

40

- (a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b) サポニンを加えるステップ、並びに
- (c) TLR4アゴニストを加えるステップ。

ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

【0156】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される:

- (a) デバイス内で溶媒、DOPC、ステロール及びTLR4アゴニストを含む第1の溶液、並びに

50

水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに
(b)溶媒を除去するステップ。

【0157】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法も提供される：

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、
- (c)TLR4アゴニストを加えるステップ、並びに
- (d)溶媒を除去するステップ。

10

ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

【0158】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される：

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)溶媒を除去するステップ、
- (c)サポニンを加えるステップ、並びに
- (d)TLR4アゴニストを加えるステップ。

20

ステップ(c)及び(d)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

【0159】

加えて、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される：

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、
- (c)溶媒を除去するステップ、並びに
- (d)TLR4アゴニストを加えるステップ。

【0160】

更に、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントを製造する方法が提供される：

30

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)TLR4アゴニストを加えるステップ、
- (c)溶媒を除去するステップ、並びに
- (d)サポニンを加えるステップ。

【0161】

また、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、DOPC、ステロール及びTLR4アゴニストを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む方法も提供される。

40

【0162】

また、以下のステップを含む、マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法も提供される：

- (a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、
- (b)サポニンを加えるステップ、並びに
- (c)TLR4アゴニストを加えるステップ。

ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい。

50

【0163】

用語「単一のステップで行う」とは、本明細書で使用される場合、同時期又は同時が意図されている。

【0164】

本明細書に記載されているいずれかの方法に従って第1の溶液及び第2の溶液を混合することにより得ることができる(例えば得られた)リポソームを含有する溶液は本発明の更なる態様を形成する。

【0165】

更なる添加物(賦形剤)

本発明の方法で生じるリポソームアジュバントは更に改変することができる。例えば、後の使用に望まれる成分及び/又は加えられた追加の成分の特定の濃度を達成するために希釈してもよい。そのようなステップは方法の幾つかの段階で、即ち溶媒除去の前、溶媒除去の間(例えば交換媒体によって)又は溶媒除去の後に行うことができる。

10

【0166】

更なる実施形態において、緩衝剤が組成物に加えられる。液体調製物のpHは、組成物の成分及び対象への投与に対する必要な適合性を考慮して調節される。液体混合物のpHは少なくとも4、少なくとも5、少なくとも5.5、少なくとも5.8、少なくとも6であるのが適切である。液体混合物のpHは9未満、8未満、7.5未満又は7未満でよい。他の実施形態において、液体混合物のpHは4~9の間、5~8の間、例えば5.5~8の間である。それ故、pHは6~9の間、例えば6.5~8.5であるのが適切である。特に好ましい実施形態において、pHは5.8~6.4の間である。

20

【0167】

適当な緩衝剤は酢酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、マレイン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩及びTRISから選択し得る。1つの実施形態において、緩衝剤はリン酸緩衝液、例えばNa/Na₂PO₄、Na/K₂PO₄又はK/K₂PO₄である。

【0168】

緩衝剤は少なくとも6mM、少なくとも10mM又は少なくとも40mMの量で液体混合物中に存在することができる。緩衝剤は100mM未満、60mM未満又は40mM未満の量で液体混合物中に存在することができる。

【0169】

周知のように、非経口投与用の溶液は細胞の変形又は溶解を回避するために薬学的に許容できるオスモル濃度を有するべきである。薬学的に許容できるオスモル濃度とは、一般に、溶液がおおよそ等張又はやや高張のオスモル濃度を有することを意味する。本発明の組成物は再構成された場合250~750mOsm/kgの範囲のオスモル濃度を有するのが適切であり、例えばオスモル濃度は250~550mOsm/kgの範囲、例えば280~500mOsm/kgの範囲でよい。特に好ましい実施形態において、オスモル濃度は280~310mOsm/kgの範囲でよい。

30

【0170】

オスモル濃度は当技術分野で公知の技術に従って、例えば商業的に入手可能な浸透圧計、例えばAdvanced Instruments Inc.(USA)から入手可能なAdvanced(商標)Model 2020を使用して測定することができる。

40

【0171】

「等張剤」は、生理学的に容認され、製剤と接触する細胞膜を横切る正味の水の流れを防ぐのに適した張度を製剤に付与する化合物である。幾つかの実施形態において、組成物に使用される等張剤は塩(又は塩の混合物)であり、塩は塩化ナトリウムであるのが便利であり、おおよそ150nMの濃度が適切である。しかし、他の実施形態において、組成物是非イオン性の等張剤を含み、組成物中の塩化ナトリウムの濃度は100mM未満、例えば80mM未満、例えば50mM未満、例えば40mM未満、30mM未満、殊に20mM未満である。組成物中のイオン強度は100mM未満、例えば80mM未満、例えば50mM未満、例えば40mM未満又は30mM未満であり得る。

50

【0172】

特定の実施形態において、非イオン性の等張剤はポリオール、例えばショ糖及び/又はソルビトールである。ソルビトールの濃度は、例えば約3%~約15%(w/v)の間、例えば約4%~約10%(w/v)の間であり得る。免疫学的に活性なサポニン画分及びTLR4アゴニストを含み、等張剤が塩又はポリオールであるアジュバントは国際公開第2012/080369号に記載されている。

【0173】

0.05ml~1mlの間、例えば0.1~0.5mlの間のヒト用量容積、特に約0.5ml、又は0.7mlの用量容積が適切である。使用される組成物の容積は送達経路及び位置に依存し得、皮内経路ではより小さい用量が使われる。単位用量容器は、単位用量の投与中の物質の的確な操作を可能にするために過剰量を含むことがある。

10

【0174】

サポニン、例えばQS-21は、ヒト用量当たり1~100ugの間の量で使用することができる。QS-21は約50ugのレベルで使用できる。適切な範囲の例は40~60ug、適切には45~55ug又は49~51ug、例えば50ugである。更なる実施形態において、ヒト用量は約25ugのレベルでQS-21を含む。より低い範囲の例として20~30ug、適切には22~28ug又は24~26ug、例えば25ugがある。小児向けに意図されたヒト用量は成人向けに意図されたものと比較して低減し得る(例えば50%低減)。

【0175】

TLR4アゴニスト、例えばリポ多糖、例えば3D-MPLはヒト用量当たり1~100ugの間の量で使用することができる。3D-MPLは約50ugのレベルで使用できる。適切な範囲の例は40~60ug、適切には45~55ug又は49~51ug、例えば50ugである。更なる実施形態において、ヒト用量は約25ugのレベルで3D-MPLを含む。より低い範囲の例として20~30ug、適切には22~28ug又は24~26ug、例えば25ugがある。小児向けに意図されたヒト用量は成人向けに意図されたものと比較して低減できる(例えば50%低減)。

20

【0176】

TLR4アゴニスト及びサポニンの両方がアジュバント中に存在する場合、TLR4アゴニストとサポニンとの重量比は適切には1:5~5:1の間、適切には1:1である。例えば、3D-MPLが50ug又は25ugの量で存在する場合、適切にはQS-21もヒト用量当たり50ug又は25ugの量で存在し得る。

30

【0177】

サポニン:DOPCの比率は通例1:50~1:10(w/w)の程度、適切には1:25~1:15(w/w)の間、好ましくは1:22~1:18(w/w)、例えば1:20(w/w)である。

【0178】

抗原

本発明の方法に従って調製されるリポソームアジュバントは免疫原又は抗原と併せて利用することができる。幾つかの実施形態において、免疫原又は抗原をコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0179】

リポソームアジュバントは免疫原若しくは抗原とは別に投与してもよいし、又は製造中若しくはその場で併用投与のための免疫原性組成物として免疫原若しくは抗原と組み合わせてもよい。

40

【0180】

それ故、免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物の調製方法が提供され、前記方法は、
(i)本明細書に記載されている方法に従ってリポソームアジュバントを調製するステップ、
(ii)リポソームアジュバントを、免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドと混合するステップを含む。

【0181】

50

また、本明細書に記載されている方法に従って調製されるリボソームアジュバントの医薬の製造における使用も提供される。医薬は免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含むのが適切である。

【0182】

更に、医薬として使用される本明細書に記載されている方法に従って調製されるリボソームアジュバントが提供される。医薬は免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含むのが適切である。

【0183】

用語免疫原とは、免疫反応を引き起こすことができるポリペプチドを意味する。免疫原は、少なくとも1つのB又はT細胞エピトープを含む抗原であるのが適切である。引き起こされる免疫反応は、中和抗体を生成する抗原特異的なB細胞反応であってもよい。引き起こされる免疫反応は、全身性及び/又は局所反応であり得る抗原特異的なT細胞反応であってもよい。抗原特異的なT細胞反応は、CD4+ T細胞反応、例えば複数のサイトカイン、例えばIFNガンマ、TNFアルファ及び/又はIL2を発現するCD4+ T細胞が関与する反応を含み得る。代わりに、又は加えて、抗原特異的なT細胞反応はCD8+ T細胞反応、例えば複数のサイトカイン、例えばIFNガンマ、TNFアルファ及び/又はIL2を発現するCD8+ T細胞が関与する反応を含む。

10

【0184】

抗原は、ヒト若しくは非ヒト病原体、例えば、ヒト及び非ヒト脊椎動物に感染する細菌、菌類、寄生性微生物若しくは多細胞寄生生物、又はがん細胞若しくは腫瘍細胞に由来し得る(例えばそれらから得ることができる)。

20

【0185】

1つの実施形態において、抗原は組換えタンパク質、例えば組換え原核生物タンパク質である。

【0186】

1つの実施形態において、抗原は、マラリア原虫(*Plasmodium* spp.)(例えば熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*))、マイコバクテリウム属の種(*Mycobacterium* spp.)(例えば結核菌(TB))、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒト呼吸器多核体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、モラクセラ属の種(*Moraxella* spp.)(例えばモラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*))又は無莢膜型インフルエンザ菌(*nontypable Haemophilus influenzae*)(ntHi)に由来する。

30

【0187】

抗原は、マラリアを引き起こす寄生生物、例えば熱帯熱マラリア原虫又は三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*)に由来する調製物を含み得るか又はそれからなり得る。

【0188】

1つの実施形態において、抗原は熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲(CS)タンパク質又はその変異体でよい。CSタンパク質の適切な変異体は、CSタンパク質の一部がB型肝炎の表面抗原S(HBsAg)とのハイブリッドタンパク質の形態である変異体であり得る。CS変異体抗原は例えばCSタンパク質の実質的に全てのC末端部分、CSタンパク質免疫優性領域の4つ以上のタンデム反復配列、及びHBsAgを含むハイブリッドタンパク質の形態であり得る。ハイブリッドタンパク質は、少なくとも160個のアミノ酸を含有し、CSタンパク質のC末端部分と実質的に相同であるが疎水性のアンカー配列を欠く配列を含み得る。CSタンパク質はC末端の最後の12個のアミノ酸を欠いていてもよい。更に、4個以上、例えば10個以上のAsn-Ala-Asn-Proテトラペプチド(NANP)反復モチーフを含有していてもよい。

40

【0189】

本発明で使用されるハイブリッドタンパク質は、線状のリンカーを介してHBsAgのN末端にインフレームで融合したNF54株由来の熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)クローン3D7のアミノ酸207~395に実質的に対応する熱帯熱マラリア原虫のCSタンパク質の一部を含むタンパク質でよい。リンカーはHBsAg由来のpreS2の一部を含み得る。本発明で使用するのに適切なCS構築体は、米国では米国特許第5,928,902号及び同第6,169,17

50

1号(いずれも、本発明で使用するのに適切なタンパク質を説明する目的で参照により組み込まれる)として特許された国際公開第93/10152号に概説されている。

【0190】

本発明で使用される特定のハイブリッドタンパク質は、RTSとして公知のハイブリッドタンパク質であり(配列番号1、国際公開第2015/150568号、国際公開第93/10152号(RTS*と表示されている)及び国際公開第98/05355号にも記載されている)、これは

- メチオニン残基
 - 3個のアミノ酸残基Met Ala Pro
 - 熱帯熱マラリア原虫3D7株のCSタンパク質のアミノ酸207~395を表す一続きの189個のアミノ酸
 - グリシン残基
 - B型肝炎ウイルス(adw血清型)preS2タンパク質の4個のカルボキシ末端残基を表す4個のアミノ酸残基Pro Val Thr Asn、及び
 - スクレオチド1653~2330によりコードされており、B型肝炎ウイルス(adw血清型)のSタンパク質を規定する一続きの226個のアミノ酸
- からなる。

【0191】

RTSはRTS,S混合粒子の形態であり得る。RTS,S粒子は2つのポリペプチドRTS及びSを含んでおり、同時に合成され得、自発的に複合の微粒子状構造(RTS,S)を形成し得る。

【0192】

抗原はマイコバクテリウム属の種、例えばウシ型結核菌(*Mycobacterium bovis*)又は結核菌、特に結核菌に由来する調製物を含み得るか又はそれからなり得る。

【0193】

結核の分野で興味のある抗原としてRv1196及びRv0125がある。Rv1196(例えば、Dillonら、*Infection and Immunity*、1999、67(6): 2941~2950にMtb39aという名称で記載されている)は、H37Rv、C、Haarlem、CDC1551、94-M4241A、98-R6041NH-RIF-EM、KZN605、KZN1435、KZN4207、KZNR506株、単一の点突然変異Q30Kを有するF11株(殆ど他の臨床分離株が90%を超えるH37Rvとの同一性を有する)にわたって100%の配列同一性で高度に保存されている。Rv0125(例えば、Skeikyら、*Infection and Immunity*、1999、67(8): 3998~4007にMtb32aという名称で記載されている)も、多くの株にわたって100%の配列同一性で高度に保存されている。全長Rv0125はN末端シグナル配列を含んでおり、これは開裂されて成熟タンパク質を生じる。

【0194】

1つの実施形態において、抗原はRv1196に由来し、例えば配列番号2と少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、殊に少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含み、例えばそれからなる。典型的なRv1196関連抗原は少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号2の誘導体を含む(例えばそれからなる)。例は、0~5の位置に5個までの残基の欠失、0~5の5つの位置に5個までの残基の挿入及び20個までの残基の置換を有するものである。Rv1196の他の誘導体は、配列番号2の断片であって、少なくとも200個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも250個のアミノ酸の長さ、特に少なくとも300個のアミノ酸の長さ、殊に少なくとも350個のアミノ酸の長さである断片を含む(例えばそれからなる)ものである。

【0195】

1つの実施形態において、抗原はRv0125に由来し、例えば配列番号3と少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、殊に少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含み、例えばその配列からなる。典型的なRv0125関連抗原は少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号3の誘導体を含む(例えばそれからなる)。例は0~5の位置に5個までの残基の欠失、0~5の5つの位置に5個までの残基の挿入及び20個までの残基の置換を有するものである。Rv0125の他の誘導体は配列番号3の断片であって、少なくとも150個のアミノ酸の長さ、例えば

10

20

30

40

50

少なくとも200個のアミノ酸の長さ、特に少なくとも250個のアミノ酸の長さ、殊に少なくとも300個のアミノ酸の長さである断片を含む(例えばそれからなる)ものである。Rv0125の特定の誘導体は配列番号3の残基1~195に対応する配列番号3の断片を含む(例えばそれからなる)ものである。Rv0125の更なる免疫原性誘導体は配列番号3の残基192~323に対応する配列番号3の断片を含む(例えばそれからなる)ものである。特に好ましいRv0125関連抗原は、触媒三残基の少なくとも1個(例えば1個、2個又は更には3個全部)が置換されているか又は欠失していて、プロテアーゼ活性が低下しており、タンパク質がより容易に生産される、即ち触媒のセリン残基が欠失していてもよいし若しくは置換されていてもよく(例えばアラニンで置換されている)及び/又は触媒のヒスチジン残基が欠失していてもよいし若しくは置換されていてもよく、触媒のアスパラギン酸残基が欠失していてもよいし若しくは置換されていてもよい配列番号3の誘導体である。触媒のセリン残基が置換されている(例えばアラニンで置換されている)配列番号3の誘導体が殊に興味がある。また、配列番号3と少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、殊に少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有し、触媒三残基の少なくとも1つが置換されているか若しくは欠失している配列を含み、例えばそれからなるRv0125関連抗原、又は配列番号3の断片であって、少なくとも150個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも200個のアミノ酸の長さ、特に少なくとも250個のアミノ酸の長さ、殊に少なくとも300個のアミノ酸の長さであり、触媒三残基の少なくとも1個が置換されているか若しくは欠失している、断片を含み、例えばそれからなるものも興味がある。Rv0125の更なる免疫原性誘導体は、配列番号3の残基192~323に対応する配列番号3の断片であって、触媒三残基の少なくとも1個(例えば1個、2個又は更には3個全部)が置換されているか又は欠失している、断片を含む(例えばそれからなる)ものである。Rv0125の特定の免疫原性誘導体は、配列番号3の残基1~195に対応する配列番号3の断片であって、触媒のセリン残基(配列番号3の位置176)が置換されている(例えばアラニンで置換されている)、断片を含む(例えばそれからなる)ものである。

【0196】

抗原は配列番号4と少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、殊に少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含み、例えばそれからなるのが適切である。典型的なM72関連抗原は少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号4の誘導体を含み、例えばそれからなる。例は、0~5の位置に5個までの残基の欠失、0~5の5つの位置に5個までの残基の挿入及び20個までの残基の置換を有するものである。M72の他の誘導体は配列番号4の断片であって、少なくとも450個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも500個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも550個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも600個のアミノ酸の長さ、例えば少なくとも650個のアミノ酸の長さ又は少なくとも700個のアミノ酸の長さである断片を含み、例えばそれからなるものである。M72は2つの個々の抗原Rv0125及びRv1196に由来する融合タンパク質であるので、少なくとも450個の残基のいずれかの断片が全長配列に由来する複数のエピトープを含む(Skeikyら、J. Immunol.、2004、172:7618~7628;Skeiky、Infect. Immun.、1999、67(8):3998~4007;Dillon、Infect. Immun.、1999、67(6):2941~2950)。

【0197】

M72関連抗原は配列番号4と少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも80%、特に少なくとも90%、殊に少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%の同一性を有する配列を含み、例えばそれからなる。

【0198】

典型的なM72関連抗原は少数の欠失、挿入及び/又は置換を有する配列番号4の誘導体を含み、例えばそれからなる。例は0~5の位置に5個までの残基の欠失、0~5の5つの位置に5個までの残基の挿入及び20個までの残基の置換を有するものである。

【0199】

特定の実施形態において、M72関連抗原は配列番号4の残基2~723を含み、例えば配列

10

20

30

40

50

番号4を含み(又はそれからなり)、又は配列番号5を含む(又はそれからなる)。

【0200】

本発明に従って使用できる更なる抗原は、例えば国際公開第2010010180号に記載されている結核抗原Rv1753及びその変異体、例えば国際公開第2010010180号の配列番号1及び2~7から選択されるRv1753配列、特に配列番号1である。結核の分野で興味のある別の抗原は、例えば国際公開第2010010179号に記載されているRv2386及びその変異体、例えば国際公開第2010010179号の配列番号1及び2~7から選択されるRv2386配列、特に配列番号1である。結核の分野で興味がある他の抗原には、例えば国際公開第2011092253号に記載されているRv3616及びその変異体、例えば国際公開第2011092253号の配列番号1及び2~7から選択される天然のRv3616配列又は改変されたRv3616配列、例えば国際公開第2011092253号の配列番号161~169、179及び180から選択されるもの、特に配列番号167がある。興味のある追加の抗原は、国際公開第97044463号、国際公開第03044048号及び国際公開第2010149657号に記載されているようなHBHAである。上述の特許出願国際公開第2010010180号、国際公開第2010010179号、国際公開第2011092253号、国際公開第97044463号、国際公開第03044048号及び国際公開第2010149657号は本発明で役に立ち得る抗原を規定する目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0201】

興味のある他の抗原は、国際公開第2010010177号の配列番号8に記載されているようなDPVともいわれるRv1174、国際公開第2010010177号の配列番号10に記載されているようなMTI又はMtb9.9ともいわれるRv1793、国際公開第2010010177号の配列番号9に記載されているようなMSL又はMtb9.8ともいわれるRv2087、国際公開第2010010177号の配列番号1及び2~7又は国際公開第2011092253号の配列番号161~169、179若しくは180に記載されているようなHTCC1又はMtb40ともいわれるRv3616、及び/或いは国際公開第2010010177号の配列番号9に記載されているようなCFP10又はTb38.1ともいわれるRv3874、或いは免疫原性的一部分(例えばそれに由来する少なくとも20、50、75又は100個の残基)又はその変異体(例えばそれと少なくとも70%、80%、90%又は95%の同一性を有する)を含む(又はそれからなる)ものである(国際公開第2010010177号及び国際公開第2011092253号は本発明で役に立ち得る抗原を規定する目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

20

30

【0202】

結核抗原はポリペプチドの形態で最も適切に利用されるが、代わりに前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの形態で提供され得る。

【0203】

本発明に従って使用できる更なる抗原は水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に由来する。本発明で使用されるVZV抗原は任意の適切なVZV抗原又はその免疫原性誘導体でよく、精製されたVZV抗原が適切である。

【0204】

1つの実施形態において、VZV抗原はVZV糖タンパク質gE(gp1ともいわれる)又はその免疫原性誘導体である。野生型又は全長gEタンパク質はシグナルペプチド、タンパク質の主要部、疎水性アンカー領域(残基546~558)及びC末端尾部を含む623個のアミノ酸からなる。1つの態様において、gE C末端トランケート体(トランケート化gE又はgEトランケート体ともいわれる)が使用され、ここでトランケーションにより全アミノ酸残基の4~20パーセントがカルボキシ末端から除去される。更なる態様において、トランケート化gEはカルボキシ末端アンカー領域(野生型配列のおよそアミノ酸547~623が適切である)を欠いている。更なる態様において、gEは配列番号6の配列を有するトランケート化gEである。

40

【0205】

gE抗原、そのアンカーなしの誘導体(これも免疫原性誘導体でもある)及びその製造は欧州特許第0405867号及びその参照文献に記載されている[Vafai A., Antibody binding

50

sites on truncated forms of varicella-zoster virus gpl(gE) glycoprotein、Vaccine、1994、12:1265～9も参照)。欧州特許第192902号もgE及びその製造を記載している。トランケート化gEはまた、参照により全体が本明細書に組み込まれているHaumontら、Virus Research、(1996)、40巻、199～204頁にも記載されている。本発明に従って使用するのに適切なアジュバントで補強した(アジュバント化；adjuvanted)VZV gE組成物、即ち、更にコレステロールを含有するQS-21、3D-MPL及びリポソームを含むアジュバントと組み合わせたカルボキシ末端をトランケート化したVZV gEが国際公開第2006/094756号に記載されている。Leroux-Roels I.ら(J. Infect. Dis.、2012、206: 1280～1290)はアジュバントで補強したVZVトランケート化gEサブユニットワクチンを評価したフェーズI/II臨床試験について報告した。

10

【0206】

抗原はヒト呼吸器多核体ウイルス(RSV)に由来する調製物を含み得るか又はそれからなり得る。幾つかの有利な実施形態において、ポリペプチド抗原はRSVに由来するFタンパク質ポリペプチド抗原である。本発明においてポリペプチド抗原成分として特に適切なのは立体配座的に制限されたFポリペプチド抗原である。立体配座的に制限されたFタンパク質は融合前(prefusion)(PreF)及び融合後(postfusion)(PostF)の立体配座の両方について以前に記載されている。そのような立体配座的に制限されたFタンパク質は通例工学処理したRSV Fタンパク質外部ドメインを含む。Fタンパク質外部ドメインポリペプチドはRSV Fタンパク質の細胞外ドメインの全部又は一部分を含み、機能性の(例えば、欠失又は置換による)膜貫通ドメインを欠くRSV Fタンパク質の一部であり、例えば、細胞培養で可溶性の(膜に付着していない)形態で発現することができる。

20

【0207】

融合前立体配座において立体配座的に制限された代表的なFタンパク質抗原は当技術分野で既に記載されており、例えば各々が融合前Fポリペプチド(及び核酸)、及びその製造方法を説明する目的で参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,563,002号(国際公開第2009079796号)、米国特許出願公開第2012/0093847号(国際公開第2010/149745号)、米国特許出願公開第2011/0305727号(国際公開第2011/008974号)、米国特許出願公開第2014/0141037号、国際公開第2012/158613号及び国際公開第2014/160463号に詳細に開示されている。通例、抗原はポリペプチドの三量体の形態である。融合前立体配座のFタンパク質の例を提供する追加の刊行物として、各々本明細書に開示されている免疫原性の組合せとの関連で使用することもできるMcLellanら、Science、340巻: 1113～1117;McLellanら、Science、342巻: 592～598、及びRigterら、PLOS One、8巻: e71072がある。

30

【0208】

例えば、融合前立体配座が安定化されたFタンパク質ポリペプチドは通例Fタンパク質の融合前立体配座を安定化させた少なくとも1つの改変を含むFタンパク質の外部ドメイン(例えば、可溶性のFタンパク質ポリペプチド)を含む。例えば、改変は、三量化ドメインの(通例C末端への)付加、1つ以上のフリン開裂部位の(アミノ酸およそ105～109及びおよそ133～136での)欠失、pep27ドメインの欠失、疎水性ドメインでの親水性アミノ酸の置換又は付加(例えば、HRA及び/又はHRB)から選択することができる。一実施形態において、立体配座的に制限されたPreF抗原はフリン開裂部位が介在しないRSV Fタンパク質ポリペプチドのF2ドメイン(例えば、アミノ酸1～105)及びF1ドメイン(例えば、アミノ酸137～516)を含み、ポリペプチドは更にF1ドメインに対してC末端に位置する異種の三量化ドメインを含む。場合により、PreF抗原はグリコシル化を変える(例えば、グリコシル化を増やす)改変、例えばRSV Fタンパク質のアミノ酸約500～502に対応する位置の1つ以上のアミノ酸の置換も含む。オリゴマー化配列が存在する場合は三量化配列が好ましい。適切なオリゴマー化配列は当技術分野で周知であり、例えば、酵母GCN4ロイシンジッパータンパク質のコイルドコイル、バクテリオファージT4フィブリチン由来三量化配列(「フォルドン(foldon)」)、及びインフルエンザHAの三量体ドメインが包含される。加えて、又は代わりに、融合前立体配座において立体配座的に制限されたFポリペプチドは少な

40

50

くとも2個の導入されたシステイン残基を含むことができ、これらは互いに近接しており、融合前RSV Fポリペプチドを安定化するジスルフィド結合を形成する。例えば、2つのシステインは互いの約10以内であることができる。例えば、システインは位置165及び296又は位置155及び290に導入することができる。代表的なPreF抗原は配列番号7で表される。

【0209】

抗原はHIVに由来する調製物を含み得るか、又はそれからなり得る。抗原はHIVエンベロープタンパク質のようなHIVタンパク質でよい。例えば、抗原はHIVエンベロープgp120ポリペプチド又はその免疫原性断片であってもよい。

【0210】

1つの適切な抗原は公開された出願国際公開第2008/107370号の配列番号8のHIVクレードB gp120ポリペプチド(又はこのポリペプチドの免疫原性断片)である。国際公開第2008/107370号の配列番号8は参照によりこの出願に組み込まれる。

【0211】

適切な抗原としては、また、公開された出願国際公開第2015/036061号の配列番号1のV1V2領域を含むポリペプチド、又は配列番号1のV1V2領域の免疫原性の誘導体若しくは断片もある。加えて、国際公開第2015/036061号の配列番号5のV1V2領域を含むポリペプチド又は配列番号5のV1V2領域の免疫原性の誘導体若しくは断片を適切な抗原として使用してもよい。国際公開第2015/036061号の配列番号1及び配列番号5は参照により組み込まれる。

【0212】

別の実施形態において、抗原は2つ以上の異なるHIVエンベロープgp120ポリペプチド抗原(又はこれらのポリペプチドの免疫原性断片)を含んでいてもよい。適切な抗原は、TV1 gp120(配列番号8)及び1086.C gp120(配列番号9)を含むHIVクレードC gp120ポリペプチド抗原を包含する。

【0213】

他の適切なHIV抗原として、Nef、Gag及びPol HIVタンパク質並びにこれらの免疫原性断片がある。

【0214】

組成物は、例えばフィンプリンタンパク質[(米国特許第5,766,608号、Ohio State Research Foundation)]及びそれ由来のペプチドを含む融合体[例えばLB1(f)ペプチド融合体、米国特許第5,843,464号(OSU)又は国際公開第99/64067号]、OMP26[国際公開第97/01638号(Cortecs)]、P6[欧州特許第281673号(State University of New York)]、TbpA及び/若しくはTbpB、Hia、Hsf、Hin47、Hif、Hmw1、Hmw2、Hmw3、Hmw4、Hap、D15(国際公開第94/12641号)、プロテインD(欧州特許第594610号)、P2、及びP5(国際公開第94/26304号)、プロテインE(国際公開第07/084053号)並びに/又はPilA(国際公開第05/063802号)から選択される無莢膜型インフルエンザ菌抗原を含んでいてもよい。組成物は、例えばOMP106[国際公開第97/41731号(Antex)及び国際公開第96/34960号(PMC)]、OMP21、LbpA及び/又はLbpB[国際公開第98/55606号(PMC)]、TbpA及び/又はTbpB[国際公開第97/13785号及び国際公開第97/32980号(PMC)]、CopB[Helminen MEら、(1993)、Infect. Immun.、61:2003~2010]、UspA1及び/又はUspA2[国際公開第93/03761号(University of Texas)]、OmpCD、HasR(国際出願PCT/EP99/03824)、PilQ(国際出願PCT/EP99/03823)、OMP85(国際出願PCT/EP00/01468)、lipo06(英国特許出願第9917977.2号)、lipo10(英国特許出願第9918208.1号)、lipo11(英国特許出願第9918302.2号)、lipo18(英国特許出願第9918038.2号)、P6(国際出願PCT/EP99/03038)、D15(国際出願PCT/EP99/03822)、OmpIA1(国際出願PCT/EP99/06781)、Hly3(国際出願PCT/EP99/03257)、並びにOmpEから選択されるモラクセラ・カタラーリスタンパク質抗原を含んでいてもよい。

【0215】

一実施形態において、組成物は無莢膜型インフルエンザ菌(*H. influenzae*)(NTHi)タン

10

20

30

40

50

パク質抗原及び/又はモラクセラ・カタラーリス(*M. catarrhalis*)タンパク質抗原を含んでいてもよい。組成物はインフルエンザ菌由来のプロテインD(PD)を含んでいてもよい。プロテインDは国際公開第91/18926号に記載されているものでよい。組成物は更にインフルエンザ菌由来のプロテインE(PE)及び/又はピリンA(PilA)を含んでいてもよい。プロテインE及びピリンAは国際公開第2012/139225号に記載されているものでよい。プロテインE及びピリンAは融合タンパク質、例えば国際公開第2012/139225号に記載されているLVL735として提示されてもよい。例えば、組成物は3つのNTHi抗原(PD、PE及びPilA、後の2つはPEPilA融合タンパク質として一緒にされる)を含んでいてもよい。組成物は更にモラクセラ・カタラーリス由来のUspA2を含んでいてもよい。UspA2は国際公開第2015125118号に記載されているものでよく、例えば国際公開第2015125118号に記載されているMC-009((M)(UspA2 31-564)(HH))でもよい。例えば、組成物は3つのNTHi抗原(PD、PE及びPilA、後の2つはPEPilA融合タンパク質として一緒にされる)及び1つのモラクセラ・カタラーリス抗原(UspA2)を含んでいてもよい。

10

【0216】

複数の抗原が提供され得る。例えば、引き起こされる免疫反応を強化する(例えば強固な保護を確実にする)ために複数の抗原を提供してもよいし、免疫反応を拡大する(例えば広範囲の病原菌株に対する、又は対象の集団の大部分で保護を確実にする)ために複数の抗原を提供してもよいし、又は幾つかの障害に対する免疫反応を広く引き起こす(それにより投与プロトコルを簡単にする)ために複数の抗原を提供してもよい。複数の抗原が提供される場合、これらは区別されるタンパク質であってもよいし、又は1つ以上の融合タンパク質の形態であってもよい。

20

【0217】

抗原はヒト用量当たり0.1~100ugの量で提供され得る。

【0218】

本発明は、上記の1つ以上の抗原に関連する疾患又は障害の治療又は予防における使用に適用され得る。1つの実施形態において、疾患又は障害はマラリア、結核、COPD、HIV及びヘルペスから選択される。

【0219】

リポソームアジュバントは免疫原若しくは抗原と別に投与してもよいし、又は製造中若しくはその場で免疫原若しくは抗原と併用投与用の免疫原性組成物として組み合わせてもよい。

30

【0220】

殺菌(滅菌)

特に非経口投与の場合、組成物は無菌でなければならない。殺菌は様々な方法で行うことができるが、無菌グレードフィルターを通する過によって行うのが便利である。殺菌はアジュバント又は免疫原性組成物の調製中何度行ってもよいが、通例少なくとも製造終了時に行う。

【0221】

「無菌グレードフィルター」とは、有効ろ過面積1cm²当たり 1×10^7 以上の負荷レベルでの微生物による負荷後無菌の流出液を生成するフィルターを意味する。無菌グレードフィルターは本発明の目的で本発明の当技術分野の当業者に周知であり、無菌グレードフィルターは0.15~0.25umの間、適切には0.18~0.22um、例えば0.2又は0.22umの細孔径を有する。

40

【0222】

無菌グレードフィルターの膜は当業者に公知のいずれかの適切な材料、例えば限定されることはないが酢酸セルロース、ポリエーテルスルホン(PES)、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)から作製することができる。本発明の特定の実施形態において、本発明の1つ以上又は全てのフィルター膜はポリエーテルスルホン(PES)、特に親水性のポリエーテルスルホンを含む。本発明の特定の実施形態において、本明細書に記載されている方法で使用されるフィルターは二重層フィルター、特にエンドフィル

50

ターの細孔径より大きい細孔径を有するビルドインプレフィルターを有する無菌フィルターである。1つの実施形態において、滅菌フィルターは、プレフィルター膜層が0.3～0.5 nmの間、例えば0.35又は0.45nmの細孔径を有する二重層フィルターである。更なる実施形態によると、フィルターは非対称のフィルター膜、例えば非対称の親水性PESフィルター膜を含む。代わりに、滅菌フィルター層は、例えば非対称の親水性PESプレフィルター膜層と組み合わせてPVDFで作製してもよい。

【0223】

意図される医療用途を考慮して、材料は医薬品級(例えば非経口グレード)であるべきである。

【0224】

整数について用語「実質的」とは、機能上同等であり、その整数の本質的性質が変化しなければ偏差が容認され得ることを意味する。例えば、具体的な値について、用語「実質的」は通例その表されている値のプラスマイナス10パーセント以内の値を意味する。

【0225】

本出願中の特許出願及び許可された特許を含めて全ての文献の教示は参照により完全に本明細書に組み込まれる。ある種の要素を「含む」として定義されている組成物又は方法若しくはプロセスは(それぞれ)その要素からなる組成物、方法又はプロセスを包含すると理解される。本明細書で使用される場合、「から本質的になる」とは、追加の成分が存在してもよいことを意味するが、それらが全体としての性質又は機能を変えないことを条件とする。

【0226】

以下、本発明の実施形態を示す。

(1) マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

(b) 溶媒を除去するステップ

を含む、方法。

(2) マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b) サポニンを加えるステップ、並びに

(c) 溶媒を除去するステップ

を含む、方法。

(3) マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法であって、以下:

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、

(b) 溶媒を除去するステップ、並びに

(c) サポニンを加えるステップ

を含む、方法。

(4) マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む、方法。

(5) マイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、以下:

(a) デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに

10

20

30

40

50

(b)サポニンを加えるステップを含む、方法。(6) マイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法であって、以下:(a)デバイス内で溶媒、ホスファチジルコリン脂質及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、(b)サポニンを加えるステップ、並びに(c)TLR4アゴニストを加えるステップを含み、ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい、方法。(7) 以下:(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップ、並びに(b)溶媒を除去するステップを含む、(1) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法。(8) 以下:(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、(b)サポニンを加えるステップ、並びに(c)溶媒を除去するステップを含む、(2) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法。(9) 以下:(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、(b)溶媒を除去するステップ、並びに(c)サポニンを加えるステップを含む、(3) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントを製造する方法。(1 0) デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水及びサポニンを含む第2の溶液を混合するステップを含む、(4) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法。(1 1) 以下:(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、並びに(b)サポニンを加えるステップを含む、(5) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニンを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法。(1 2) 以下:(a)デバイス内で溶媒、DOPC及びステロールを含む第1の溶液、並びに水を含む第2の溶液を混合するステップ、(b)サポニンを加えるステップ、並びに(c)TLR4アゴニストを加えるステップを含み、ステップ(b)及び(c)はいずれの順序でもよく、又は単一のステップで行ってもよい、(6) に記載のマイクロ流体デバイスを用いてサポニン及びTLR4アゴニストを含むリポソームアジュバントの調製に有用なリポソーム濃縮物を製造する方法。(1 3) 第1の溶液が更にTLR4アゴニストを含む、(1) から (5) 又は (7) から (1 1) のいずれかーに記載の方法。

10

20

30

40

50

(1 4) 溶媒除去の前にTLR4アゴニストを加える、(1) から (3) 又は (7) から (9) のいずれかーに記載の方法。

(1 5) 溶媒除去の後にTLR4アゴニストを加える、(1) から (3) 又は (7) から (9) のいずれかーに記載の方法。

(1 6) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第1の溶液のための1つの入口を有する、(1) から (15) のいずれかーに記載の方法。

(1 7) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第1の溶液のための2つの入口を有する、(1) から (15) のいずれかーに記載の方法。

(1 8) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第1の溶液のための3つ以上の入口を有する、(1) から (15) のいずれかーに記載の方法。

10

(1 9) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第2の溶液のための1つの入口を有する、(1) から (18) のいずれかーに記載の方法。

(2 0) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第2の溶液のための2つの入口を有する、(1) から (18) のいずれかーに記載の方法。

(2 1) マイクロ流体デバイスが混合チャンバーへの第2の溶液のための3つ以上の入口を有する、(1) から (18) のいずれかーに記載の方法。

(2 2) 各々の入口が0.2mmの幅があり、混合チャンバーの他の辺の全長に及ぶ、(1) から (21) のいずれかーに記載の方法。

(2 3) 混合チャンバーの断面積が 25.6mm^2 以下である、(1) から (22) のいずれかーに記載の方法。

20

(2 4) 混合チャンバーの断面積が 0.1mm^2 以上である、(1) から (23) のいずれかーに記載の方法。

(2 5) 混合チャンバーの断面積が $0.2 \sim 3.2\text{mm}^2$ である、(22) から (24) のいずれかーに記載の方法。

(2 6) 混合チャンバーの断面積が $0.6 \sim 1.2\text{mm}^2$ 、例えばおよそ 0.8mm^2 である、(25) に記載の方法。

(2 7) 混合チャンバーが実質的に長方形の横断面である、(1) から (26) のいずれかーに記載の方法。

(2 8) 混合チャンバーの横断面が $1 \sim 8\text{mm}$ の長辺を有する、(27) に記載の方法。

(2 9) 混合チャンバーの横断面が $1.6 \sim 2.4\text{mm}$ の長辺を有する、(28) に記載の方法。

30

(3 0) 混合チャンバーの横断面が 2mm の長辺を有する、(29) に記載の方法。

(3 1) 混合チャンバーの横断面が $0.1 \sim 4\text{mm}$ の短辺を有する、(1) から (30) のいずれかーに記載の方法。

(3 2) 混合チャンバーの横断面が $0.2 \sim 0.6\text{mm}$ の短辺を有する、(31) に記載の方法。

(3 3) 混合チャンバーの横断面が 0.4mm の短辺を有する、(32) に記載の方法。

(3 4) 混合チャンバーが $1 \sim 10\text{cm}$ の長さである、(1) から (33) のいずれかーに記載の方法。

(3 5) 混合チャンバーが $2 \sim 3\text{cm}$ の長さである、(34) に記載の方法。

(3 6) 混合チャンバーが 2.5cm の長さである、(35) に記載の方法。

(3 7) マイクロ流体デバイスが混合された材料の回収のための混合チャンバーからの1つの出口を有する、(1) から (36) のいずれかーに記載の方法。

40

(3 8) マイクロ流体デバイスが混合された材料の回収のための混合チャンバーからの2つ以上の出口を有する、(1) から (37) のいずれかーに記載の方法。

(3 9) マイクロ流体デバイスが、横断面が長方形の混合チャンバーを含み、該混合チャンバーが $0.2 \sim 3.2\text{mm}^2$ の断面積、 $1.4 \sim 3.2\text{mm}$ の長辺、 $0.1 \sim 1.2\text{mm}$ の短辺、第1の溶液のための1つの入口及び該混合チャンバーの近位端に対称に配置された第2の溶液のための2つの入口、 $1.5 \sim 5\text{cm}$ の混合チャンバー長さ並びに該混合チャンバーの遠位端に位置する出口を有する、(1) から (38) のいずれかーに記載の方法。

(4 0) 混合チャンバーへの総流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり $12 \sim 30\text{ml}/\text{min}/\text{mm}^2$ である、(1) から (39) のいずれかーに記載の方法。

50

(41) 混合チャンバーへの総流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり17.5~25 ml/min/mm²である、(40)に記載の方法。

(42) 混合チャンバーへの総流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり20ml/min/mm²である、(41)に記載の方法。

(43) 第1と第2の溶液の流量の比率が1:2~1:6の範囲である、(1)から(42)のいずれかーに記載の方法。

(44) 第1と第2の溶液の流量の比率が1:3~1:5の範囲である、(43)に記載の方法。

(45) 第1と第2の溶液の流量の比率が1:4である、(44)に記載の方法。

(46) 混合チャンバーへの第1の溶液の流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり2~7.5ml/min/mm²である、(1)から(45)のいずれかーに記載の方法。

10

(47) 混合チャンバーへの第1の溶液の流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり3~6.5ml/min/mm²である、(46)に記載の方法。

(48) 混合チャンバーへの第1の溶液の流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり5 ml/min/mm²である、(47)に記載の方法。

(49) 混合チャンバーへの第2の溶液の流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり11~25ml/min/mm²である、(1)から(48)のいずれかーに記載の方法。

(50) 混合チャンバーへの第2の溶液の流量が混合チャンバー横断面の単位面積当たり14~20ml/min/mm²である、(49)に記載の方法。

(51) 第1の溶液を10~30 の温度で供給する、(1)から(50)のいずれかーに記載の方法。

20

(52) 第1の溶液の温度が15~25 の温度で供給される、(51)に記載の方法。

(53) 第2の溶液の温度が10~30 の温度で供給される、(1)から(52)のいずれかーに記載の方法。

(54) 第2の溶液の温度が15~25 の温度で供給される、(53)に記載の方法。

(55) 混合チャンバーの温度が10~30 である、(1)から(54)のいずれかーに記載の方法。

(56) 混合チャンバーの温度が15~25 である、(55)に記載の方法。

(57) 混合チャンバー内の最大レイノルズ数が1500以下である、(1)から(56)のいずれかーに記載の方法。

(58) 混合チャンバー内の最大レイノルズ数が75~300、例えば100~200である、(57)に記載の方法。

30

(59) マイクロ流体デバイスが複数の混合チャンバーを含む、(1)から(58)のいずれかーに記載の方法。

(60) デバイスが2~128個の混合チャンバーを含む、(59)に記載の方法。

(61) デバイスが4~32個の混合チャンバーを含む、(60)に記載の方法。

(62) デバイスが16個の混合チャンバーを含む、(61)に記載の方法。

(63) 複数の混合チャンバー内の全ての混合チャンバーが同一のポンプにより供給され、全ての混合チャンバーからの混合された材料が更に処理及び/又は貯蔵する前に収集される、(59)から(62)のいずれかーに記載の方法。

(64) 複数の混合チャンバーが50~2000ml/minの速度で混合された材料を生成することができる、(59)から(63)のいずれかーに記載の方法。

40

(65) 複数の混合チャンバーが毎分少なくとも1gのホスファチジルコリン脂質の速度で混合された材料を生成することができる、(59)から(64)のいずれかーに記載の方法。

(66) 複数の混合チャンバーが毎分少なくとも1gのDOPCの速度で混合された材料を生成することができる、(59)から(65)のいずれかーに記載の方法。

(67) 溶媒が有機アルコールを含む、(1)から(66)のいずれかーに記載の方法。

(68) 溶媒がエタノールを含む、(67)に記載の方法。

(69) 溶媒が70~90%v/vのエタノールを含む、(68)に記載の方法。

(70) 溶媒が75~85%v/vのエタノールを含む、(69)に記載の方法。

(71) 溶媒が80%v/vのエタノールを含む、(70)に記載の方法。

50

- (72) 溶媒がイソプロパノールを含む、(67) から (71) のいずれかーに記載の方法。
- (73) 溶媒が10～30%v/vのイソプロパノールを含む、(72) に記載の方法。
- (74) 溶媒が15～25%v/vのイソプロパノールを含む、(73) に記載の方法。
- (75) 溶媒が20%v/vのイソプロパノールを含む、(74) に記載の方法。
- (76) 第1の溶液が100～170mg/mlのホスファチジルコリン脂質を含む、(1) から (75) のいずれかーに記載の方法。
- (77) 第1の溶液が100～160mg/mlのホスファチジルコリン脂質を含む、(76) に記載の方法。
- (78) 第1の溶液が130mg/mlのホスファチジルコリン脂質を含む、(77) に記載の方法。
- (79) 第1の溶液が100～170mg/mlのDOPCを含む、(1) から (78) のいずれかーに記載の方法。
- (80) 第1の溶液が100～160mg/mlのDOPCを含む、(79) に記載の方法。
- (81) 第1の溶液が130mg/mlのDOPCを含む、(80) に記載の方法。
- (82) 第1の溶液が20～50mg/mlのステロールを含む、(1) から (81) のいずれかーに記載の方法。
- (83) 第1の溶液が30～35mg/mlのステロールを含む、(1) から (82) のいずれかーに記載の方法。
- (84) ステロールがコレステロールである、(1) から (83) のいずれかーに記載の方法。
- (85) 第1の溶液の乾燥重量が120～250mg/mlである、(1) から (84) のいずれかーに記載の方法。
- (86) 第2の溶液が少なくとも90%w/wの水を含む、(1) から (85) のいずれかーに記載の方法。
- (87) 第2の溶液が少なくとも98%w/wの水を含む、(86) に記載の方法。
- (88) サポニンがQuil A又はその誘導体である、(1) から (87) のいずれかーに記載の方法。
- (89) サポニンがQS-21である、(88) に記載の方法。
- (90) 第2の溶液が0.15～15mg/mlのサポニンを含む、(1) から (89) のいずれかーに記載の方法。
- (91) 第2の溶液が1～4mg/mlのサポニンを含む、(90) に記載の方法。
- (92) TLR4アゴニストがリポ多糖である、(6) 又は(12) から (91) のいずれかーに記載の方法。
- (93) リポ多糖が3D-MPLである、(92) に記載の方法。
- (94) 第1の溶液が4～10mg/mlのTLR4アゴニストを含む、(13) 又は(16) から (93) のいずれかーに記載の方法。
- (95) 平均リポソームサイズが95～120nmである、(1) から (94) のいずれかーに記載の方法。
- (96) リポソーム多分散度が0.3以下である、(1) から (95) のいずれかーに記載の方法。
- (97) リポソーム多分散度が0.2以下である、(96) に記載の方法。
- (98) 溶媒を透析ろ過、限外ろ過及び/又は透析、特に透析ろ過により除去する、(1) から (97) のいずれかーに記載の方法。
- (99) 溶媒除去の結果少なくとも98%w/wの水の水含量が得られる、(1) から (98) のいずれかーに記載の方法。
- (100) 例えば所望の最終濃度まで希釈する追加のステップを含む、(1) から (99) のいずれかーに記載の方法。
- (101) pHを5～9に調節する追加のステップを含む、(1) から (100) のいずれかーに記載の方法。
- (102) オスモル濃度を250～750mOsm/kgに調節する追加のステップを含む、(1)

10

20

30

40

50

から(101)のいずれかーに記載の方法。

(103) 免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含むアジュバント化免疫原性組成物の調製方法であって、

(i) (1) から(102)のいずれかーに記載の方法に従ってリポソームアジュバントを製造するステップ、

(ii) リポソームアジュバントを免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドと混合するステップ

を含む、方法。

(104) アジュバント化免疫原性組成物の製造方法であって、免疫原若しくは抗原、又は免疫原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを、(1) から(102)のいずれかーに記載の方法に従って製造されたりポソームアジュバントと組み合わせるステップを含む、方法。

(105) 抗原がマラリア原虫(例えば熱帯熱マラリア原虫)、マイコバクテリウム属の種(例えば結核菌(TB))、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒト呼吸器多核体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、モラクセラ属の種(例えばモラクセラ・カタラーリス)又は無莢膜型インフルエンザ菌(ntHi)に由来する、(103)又は(104)に記載の方法。

(106) ろ過により殺菌する追加のステップを含む、(1) から(105)のいずれかーに記載の方法。

(107) (1) から(106)のいずれかーに記載の方法に従って製造されたサポニン、TLR4アゴニスト、DOPC及びステロールを含むリポソームアジュバント。

(108) (104)又は(105)に記載の方法に従って製造されたアジュバント化免疫原性組成物。

(109) サポニン、例えばQS-21を、ヒト用量当たり1~100ugの量で含む、(107)又は(108)に記載のアジュバント又は免疫原性組成物。

(110) TLR4アゴニスト、例えば3D-MPLを、ヒト用量当たり1~100ugの量で含む、(107)から(109)のいずれかーに記載のアジュバント又は免疫原性組成物。

(111) 溶媒及び100~170mg/mlの脂質を含む溶液であって、溶媒が70~90%v/vのエタノール、例えば75~85%v/vのエタノール、及び10~30%v/vのイソプロピルアルコール、例えば15~25%v/vのイソプロパノールを含む、溶液。

(112) 脂質がホスファチジルコリンである、(111)に記載の溶液。

(113) 脂質がDOPCである、(111)に記載の溶液。

(114) 100~160mg/mlの脂質を含む、(111)から(113)のいずれかーに記載の溶液。

(115) 120~140mg/ml、例えば130mg/mlの脂質を含む、(114)に記載の溶液。

(116) 更に20~50mg/mlのステロールを含む、(111)から(115)のいずれかーに記載の溶液。

(117) 脂質とステロールとの比率が3:1~5:1である、(111)から(116)のいずれかーに記載の溶液。

(118) ステロールがコレステロールである、(111)又は(117)に記載の溶液。

(119) TLR4アゴニストを含む、(111)から(118)のいずれかーに記載の溶液。

(120) TLR4アゴニストが4~12mg/mlの濃度で存在する、(119)に記載の溶液。

(121) 溶媒並びに100~160mg/mlのDOPC及び30~40mg/mlのコレステロール、4~10mg/mlのTLR4アゴニストから本質的になり、溶媒が70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含む、(111)から(120)のいずれかーに記載の溶液。

(122) TLR4アゴニストがリボ多糖、例えば3D-MPLである、(111)から(121)のいずれかーに記載の溶液。

(123) 溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法であって、

(i) 溶媒の少なくとも一部分中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、

10

20

30

40

50

(ii)懸濁したTLR4アゴニストをホスファチジルコリン脂質及びコレステロールと組み合わせるステップ、

(iii)更なる溶媒を加えるステップ、

(iv)混合するステップ

を含む、方法。

(124) 溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法であって、

(i)溶媒の少なくとも一部分中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、

(ii)懸濁したTLR4アゴニストをホスファチジルコリン脂質及びコレステロールと組み合わせるステップ、

(iii)更なる溶媒を加えるステップ、

(iv)混合するステップ、

(v)追加の溶媒を加えるステップ

を含む、方法。

(125) (i)溶媒の少なくとも一部分中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、

(ii)懸濁したTLR4アゴニストをDOPC及びコレステロールと組み合わせるステップ、

(iii)更なる溶媒を加えるステップ、

(iv)混合するステップ

を含む、(123)に記載の溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法。

(126) (i)溶媒の少なくとも一部分中のTLR4アゴニストの懸濁液を調製するステップ、

(ii)懸濁したTLR4アゴニストをDOPC及びコレステロールと組み合わせるステップ、

(iii)更なる溶媒を加えるステップ、

(iv)混合するステップ、

(v)追加の溶媒を加えるステップ

を含む、(124)に記載の溶媒、脂質、コレステロール及びTLR4アゴニストを含む溶液の調製方法。

(127) 混合が30~50 の温度である、(123)から(126)のいずれかーに記載の方法。

(128) 混合が35~45 の温度である、(127)に記載の方法。

(129) 混合が40 の温度である、(128)に記載の方法。

(130) 溶媒の少なくとも一部分が溶媒の少なくとも25%である、(123)から(129)のいずれかーに記載の方法。

(131) 溶媒の少なくとも一部分が溶媒の少なくとも35%である、(130)に記載の方法。

(132) 溶媒の少なくとも一部分が溶媒の少なくとも45%である、(131)に記載の方法。

(133) 溶媒の少なくとも一部分が溶媒の90%以下、例えば80%以下、殊に70%以下、特に60%以下である、(123)から(132)のいずれかーに記載の方法。

(134) 更なる溶媒が残りの溶媒全てである、(123)から(133)のいずれかーに記載の方法。

(135) 溶液が100~160mg/mlの脂質及び30~40mg/mlのコレステロールを含み、溶媒が70~90%v/vのエタノール及び10~30%v/vのイソプロピルアルコールを含み、脂質が好適にはDOPCである、(123)から(134)のいずれかーに記載の方法。

(136) TLR4アゴニストが3D-MPLである、(123)から(135)のいずれかーに記載の方法。

(137) 溶液が4~10mg/mlの3D-MPLを含む、(136)に記載の方法。

(138) 追加の溶媒が溶媒の0~30%である、(124)から(137)のいずれかーに記載の方法。

(139) 溶媒の除去に先立って(1)から(139)のいずれかーに記載の方法に従って

10

20

30

40

50

第1の溶液及び第2の溶液を混合することにより得ることができるリポソーム含有溶液。

(140) ホスファチジルコリン脂質が12~20個の炭素原子を有する飽和の非分岐アシル鎖、例えば14~18個の炭素原子を有するアシル鎖を含有する、(1)から(139)のいずれかーに記載の方法、アジュバント、組成物又は溶液。

(141) ホスファチジルコリン脂質が12~20個の炭素原子及び1つの二重結合を有する非分岐のアシル鎖、例えば14~18個の炭素原子及び1つの二重結合を有するアシル鎖を含有する、(1)から(139)のいずれかーに記載の方法、アジュバント、組成物又は溶液。

(142) ホスファチジルコリン脂質がジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)及びジアラキドイルホスファチジルコリン(DAPC)、ジパルミトレオイルホスファチジルコリン及びジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、並びにこれらの混合物から選択される、(1)から(141)のいずれかーに記載の方法、アジュバント、組成物又は溶液。

10

以下の非限定的実施例を参照して本発明を更に記載する。

【0227】

[実施例]

全般的な実験の詳細

単一混合チャンバーマイクロ流体デバイス及び一般的作動デバイス

図1は、単一のチップ上に1つの混合チャンバーを有する代表的なマイクロ流体デバイスのデザインを説明する。デバイスは、長さが2.5cmで2mm×0.4mmの細長い横断面を有する混合チャンバーを含む。混合チャンバーは、第1の溶液の供給のための1つの中央に位置する入口及び第2の溶液の供給のための2つの入口を有する。各々の入口は0.2mmの幅があり、混合チャンバーの他の辺の全長に及ぶ。単一の出口が混合チャンバーの遠位端に位置する。

20

【0228】

作動

マイクロ流体実験を行うために、Cetoni neMesys Mi圧カシリンジポンプ、Cetoniガラス製注射筒及びデバイスを含むMicronitチップホルダーを温度制御領域に入れた(Sartorius Certomat)。あらゆる実験の実行の前に、系を清浄化し、設定温度で安定化させる。

30

【0229】

生成物収集及び溶媒除去

収集した濃縮リポソームを2つの部分に分けた。

第1の部分を用リン酸緩衝生理食塩水(PBS)pH6.1で希釈して2mg/mlのDOPCの最終濃度とし、0.22µmポリエーテルスルホン(PES)膜でろ過した。この試料に対して組成試験(DOPC、コレステロール、3D-MPL、QS-21)を行った。

【0230】

第2の部分を用リン酸緩衝生理食塩水pH6.1で透析して(デバイス7000MWCO Thermo Slide-A-Lyser)、有機溶媒を除去した。使用したプロトコールは2×15分、2×30分及び一晩であった(各時点で1LのPBS pH6.1緩衝剤)。次いで保持液を希釈して2mg/mlのDOPCとし、0.22µm PES膜でろ過した。この試料に対してサイズ測定を行った。この試料に対してガスクロマトグラフィーによって残留するアルコールを試験した。

40

【0231】

マルチ混合チャンバーマイクロ流体デバイス及び一般的作動

デバイス

図2は、単一のチップ上に8つの混合チャンバーを有する代表的なマルチ混合チャンバーマイクロ流体デバイスのデザインを説明する。デバイスは、長さが2.5cmで2mm×0.4mmの細長い横断面を有する8つの混合チャンバーを含む。各々の混合チャンバーは、第1の溶液の供給のための1つの中央に位置する入口及び第2の溶液の供給のための2つの入口を

50

有する。各々の入口は0.2mmの幅があり、混合チャンバーの他の辺の全長に及ぶ。単一の出口が各々の混合チャンバーの遠位端に位置する。

【0232】

図3は、第1の溶液若しくは第2の溶液を16の混合チャンバーの入口に供給するために、又は混合された材料を16の混合チャンバーの出口から収集するためにマルチ混合チャンバーマイクロ流体チップと併せて使用することができるマニホールドデザインを説明する。

【0233】

図4は、(2つの中央のホルダーを占める)図2に示されているスタイルの2つのチップに基づく合計16の混合チャンバーを、16のチャンバーの第1の溶液入口に供給する分配マニホールド(左下のホルダー)、16のチャンバーの第2の溶液入口に供給する分配マニホールド(左上のホルダー)及び16のチャンバーからの出口をプールする収集マニホールド(右のホルダー)と併せて有する代表的なマルチ混合チャンバーマイクロ流体デバイスを表す。

10

【0234】

作動

マルチ混合チャンバーデバイスは単一のデバイスと類似のやり方で作動させることができる。例えば、80:20エタノール/IPA中にDOPC 130mg/ml、コレステロール32.5mg/ml及び3D-MPL 6.5mg/mlを含有する有機ストック(例えば4.9L)を調製し得る。水性相(例えば19.7L)は注射用水に希釈した1.625mg/mlのQS-21で構成し得る。

【0235】

適切なポンプ、例えば有機相のためのタンデムのIsco 500D及び水性相のためのタンデムの1000Dを用いて、液体相を連続流としてマニホールドに通して供給することができ、このマニホールドで流れを16の流れに分割し、これが並行して配置された16の混合チャンバーに入る。混合チャンバーの端で、別のマニホールドを用いて、濃縮リポソームを含有する混合された材料を1つの容器に収集することができる。

20

【0236】

透析ろ過を用いて、混合された材料から有機溶媒を除去し、注射用水を適切な緩衝剤(例えばPBS pH6.1緩衝剤)と交換することができる。

【0237】

更に適切な緩衝剤(例えばPBS pH6.1)で希釈して成分の所望の濃度に応じて最終の組成を実現することができる。次いで無菌ろ過を行うことができる。

30

【0238】

分析方法

- サイズ測定

サイズ測定ではMalvern Zetasizer機器を用いてDLS原理を使用した。

試料は測定用の対応する緩衝剤(通例PBS pH6.1)に希釈した。

- 3D-MPL含量

蛍光検出と組み合わせたHPLCを用いて3D-MPL成分を定量化した。分離はC18カラムで実施した。

基準はリポソームマトリックス(DOPC、コレステロール)中に再構成したグルコサミンHCl及びグルコサミン6リン酸の等モル混合から調製した。

40

試料及び基準は強い還元性条件中酸で誘導体化する。

- QS-21含量

UV検出と組み合わせたHPLCを用いてQS-21成分を定量化した。分離はC18カラムで実施する。

基準は25~75ug/mlのDMSOに希釈したQS-21標本で調製する。

試料は分析のためにDSMOに希釈する。

- DOPC-Chol含量

2つの方法を使用した。

第1の方法(個別の基準)はUV検出器と組み合わせたU-HPLCを使用した。分離はC18カラムで実施した。

50

基準は、ストックではIPA/CHCl₃に希釈し、DOPCでは0～700ug/ml及びコレステロールでは0～175ug/mlの同じ緩衝剤に希釈したDOPC/Cholで調製した。

試料はIPA/CHCl₃に希釈する。

第2の方法(先に特性決定されたアジュバント組成物に対する)はUV検出器と組み合わせたHPLCを使用した。分離はC18カラムで実施する。

基準は古典的手段により調製し、DOPCでは0～500ug/ml及びコレステロールでは0～125ug/mlのメタノールに希釈した先に特性決定されたアジュバント組成物を用いて調製する。

試料はメタノールに希釈する。

- 溶媒残留

方法はHead-Space注射器及びFID(Flam Ionization検出器)と組み合わせたガスクロマトグラフィーを用いる。分離はCP WAX52-CB Agilentカラムで実施する。

基準は2～160ug/mlの各々特定の有機溶媒(この場合は、IPA及びエタノール)に対して調製する。LOQは2ug/mlである。

試料は基準の範囲にするために希釈する。

【0239】

[実施例1]

第1の溶液調製方法及び組成の研究

[実施例1A]

溶媒組成

方法

リポソーム生産に対する溶媒組成の影響を研究するために、様々なエタノール/イソプロピルアルコール比でDOPC、コレステロール及び3D-MPLの溶液を調製した。

【0240】

DOPC、コレステロール及び3D-MPLを各々個別に15分55秒で可溶化した(DOPCは60%の容積、コレステロールは20%、3D-MPLは20%)。次いで3D-MPL溶液をDOPC溶液に加え、この混合物をコレステロール溶液に加え、更に追加の15分混合して、150mg/mlのDOPCを有する最終の組成物を得た(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)。

【0241】

単一チャンバマイクロ流体デバイスを、総流量14ml/min、流量比20(19:1)(1:19の有機:水性)で、注射用水を水性相として使い、ストック溶液及び室温の雰囲気で作動させた。

【0242】

結果

【0243】

【表1】

表1-溶媒組成のリポソームサイズに対する影響

エタノール:IPA比	リポソームサイズ(nm)
100:0	-
80:20	124
70:30	139
60:40	154
50:50	174

【0244】

結論

純粋なエタノールは標的濃度の成分を可溶化することができなかった。純粋なイソプロ

10

20

30

40

50

パネルは標的濃度の成分を可溶化することができたが、同様の実験(160mg/ml)で生産したリポソームは極めて大きく、直径203nmであった。

【0245】

エタノールとIPAの混合物は、特に90:10~70:30の範囲で、低粘度の良好な可溶化能をもたらす。

【0246】

[実施例1B]

溶液調製

方法

次の2つの方法を比較して成分添加の順序を評価した。

1. DOPC、コレステロール及び3D-MPLを各々個別に80:20のエタノール:IPAに15分55 で可溶化した(それぞれ60%、20%、20%の容積)。次いで3D-MPL溶液をDOPC溶液に加え、更に追加の15分混合した。次いで3D-MPL/DOPC混合物をコレステロール溶液に加え、更に追加の1時間混合して、120mg/mlのDOPCを有する最終の組成物を得た(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)。

2. 3D-MPLを50%の溶媒(80:20のエタノール:IPA)で懸濁させ、次いでDOPC及びコレステロール粉末に加えた。次いで容積を残りの溶媒で調節し、混合物を15分で40 に加熱して、120mg/mlのDOPCを有する最終の組成物を得た(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)。

【0247】

方法1は成分の完全な可溶化のために混合物を1時間55 に保つ必要があった。しかし、穏やかな掻き混ぜ状態に数分間保たないと相分離が観察される可能性がある。これを避けるためには、可溶化が完了するまで連続的に掻き混ぜる必要がある。

【0248】

方法2では、より少ない時間(15分)で完全な可溶化が可能であり、掻き混ぜなければ相分離は観察できない。

【0249】

両方の方法で調製した第1のストック溶液を用いて総流量18ml/min、流量比20(1:19の有機:水性)、温度15~25 で単一混合チャンバーストック流体デバイスを作動させた。第2の溶液(水性)は注射用水中QS-21であった。

【0250】

結果

結果は図5に示す。

【0251】

結論

15~25 の範囲で95~120nmのサイズ仕様内のリポソーム試料によるマイクロ流体作動で方法1は温度に対してより敏感であるが方法2では温度に対してより敏感でない作動が可能である。

【0252】

[実施例1C]

溶液濃度限界

ストック安定性及び溶解性に対するDOPC、コレステロール及び3D-MPLの濃度の影響を評価した。

【0253】

DOPC、コレステロール及び3D-MPLのエタノール/IPA 80:20中ストック溶液を方法2に従って40、60、80、100、120、140、160及び200mg/ml(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)のDOPC濃度で調製した。最初にT₀(30)で測定し、次に試料を25 で1時間貯蔵し、分析した後20 で1時間貯蔵し、分析し、次いで15 で1時間貯蔵し、分析した。

【0254】

10

20

30

40

50

結果

結果を図6に示す。

【0255】

Nephelostarによる比濁分析測定によって、100mg/ml未満の濃度は進展し、より高い濁度を有することが明らかになった。同様に、200mg/mlは進展し、より高い濁度を有する。

【0256】

結論

100～160mg/mlの間の濃度は15～30の間の温度で安定である。これらの驚くべき結果は、エタノール/IPA中この濃度範囲内で混合された場合の脂質(DOPC)、ステロール(コレステロール)及びTLR4アゴニスト(3D-MPL)の間の特定の相互作用で説明することができよう。

10

【0257】

[実施例2]

リポソームサイズに対する溶媒組成及び温度の影響の研究

方法

方法2に従って80:20、70:30及び60:40の比率のエタノール:IPA中120mg/ml(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)のDOPC濃度でDOPC、コレステロール及び3D-MPLのストック溶液を調製し、1.5mg/mlの水性QS-21ストックと共に使用した。

【0258】

マイクロ流体プロセスは、15、20及び25の温度、総流量18ml/min及び流量比5(1:4の有機:水性)で実行した。

20

【0259】

この実験では透析の前にリポソームサイズを測定した。

【0260】

結果

結果を図7に示す。

【0261】

結論

温度は成分(DOPC、コレステロール及び3D-MPL)の溶解性を一部推進する。40で調製したストックは沈殿することなく15に冷却することができる。しかし、より低い温度での作動はより速い沈殿を誘発することにより、より小さいリポソームを生じる。

30

【0262】

リポソームサイズはいろいろな温度の第1の溶液の組成による影響を受け、最大の変動は60:40 70:30 80:20の比率である。この実験により、80:20の比率の選択が温度に対する最低の感受性を有することが確かめられている。

【0263】

[実施例4]

マイクロ流体実行条件及びそのリポソームサイズに対する影響の詳細な分析

以前に決定された一般的な限界に基づいて、DOE(実験計画法)中心複合を組み立てて、サイズ(Zav)に関してプロセス応答を決定し、温度、総流量、流量比及びストック濃度間のあらゆる交差相互作用を検出した。

40

【0264】

方法

【0265】

50

【表 2】

表2-研究した条件の概要

パラメーター	評価範囲(上限及び下限)
第1の溶液DOPC濃度	100 ug/ml
	160 ug/ml
総流量	14 ml/min
	20 ml/min
流量比	4 (1:3の有機:水性)
	6 (1:5の有機:水性)
温度	15 °C
	25 °C

10

【0266】

試験条件の表を図8に示し、試験条件の視覚的概要を図9に示す。実験は4日にわたって行った。

【0267】

第1の溶液は先に記載した方法2に従って調製した。簡単に言うと、DOPC(Lipoid)、続いてコレステロール(Sigma)を秤量した。別のバイアルに3D-MPL(GSK Hamilton)を秤量した。50%の有機相(80%のエタノール(Merck)及び20%のイソプロパノールを3D-MPLに加えた。次いで、懸濁したMPLをDOPC/コレステロール粉末に加え、40 で混合した。3つの成分の可溶化後(透明な溶液)、有機ストックを更に15分40 に放置する。次いで、容積を調節して標的濃度とする(20:5:1の重量比のDOPC:コレステロール:3D-MPL)。

20

【0268】

第2の溶液では、QS-21濃縮液塊を注射用水に希釈して所要の最終濃度とした。

【0269】

6つの中心点及び24のモデル点を有する応答表面評価に対する面心中心複合計画に基づくSAS 9.2及びDesign Expert 9を用いて統計分析を行った。

30

【0270】

レイノルズ数は次式に従って計算した。

【0271】

【数1】

$$Re = \frac{\rho U D_h}{\mu} = \frac{\rho U}{\mu} \frac{2wh}{w+h} = \frac{\rho}{\mu} \frac{2Q}{w+h}$$

40

【0272】

例えば次の条件下:

【0273】

50

	有機相	水性相
密度	22.4°Cで0.829g/cm ³	21.7°Cで1.002g/cm ³
粘度	19.8°Cで3.345Cp	20°Cで1.09Cp
流量	3.2 ml/min	12.8 ml/min
作動T°	20°C	20°C

【0274】

10

その割合による流体の平均密度及び粘度に基づいて、

密度: $(12.8 \times 1.002 + 3.2 \times 0.829) / 16 = 0.9674 \text{ g/cm}^3$

粘度: $(12.8 \times 1.09 + 3.2 \times 3.345) / 16 = 1.541 \text{ Cp}$ 、 $1 \text{ Pa} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ 及び $1 \text{ Cp} = 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ とすれば、粘度 $= 1.541 \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 0.01541 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

【0275】

混合チャンバー寸法は2000um(w) × 400um(h)である。

【0276】

$2Q = 2 \times 16 = 32 \text{ ml/min} = 0.53 \text{ cm}^3/\text{s}$

$W+h = 400 \text{ um(高さ)} + 2000 \text{ um(幅)} = 2400 \text{ um} = 0.24 \text{ cm}$

【0277】

20

全てを式に入れて: $(0.9674 \times 0.53) / (0.01541 \times 0.24) = 138.6$

【0278】

全ての流量及び流量比に対して同様なアプローチを使用することができる。

【0279】

結果

図10は、実験の結果を示す。

【0280】

- Pdlのモデリング

表3に、Zav及びPdlの標準偏差(SD)及び変動係数(CV)を示す。

【0281】

30

【表3】

表3- DOEの中心点に関する再現性の解析

	Zav	Pdl
SD再現性	1.17	0.01
SD室内再現精度	5.53	0.03
CV再現性	1.05%	4.24%
CV室内再現精度	4.97%	16.89%

40

【0282】

Pdlに対する、データに合う信頼性のある予測モデルはなかったが、Zav(相関係数0.75)と有意な相関関係があった。Zav 110nMでは0.95の事例でPdl 0.2となる。ZavとPdlとの関係を図11に説明する。

【0283】

- Zavのモデリング

研究したいろいろな要因の幾らかの有意な効果、並びに濃度と温度及び温度と流量の明らかな共同効果が観察された。

Adj R² = 0.80

Pred R² = 0.73

50

他の効果は有意でないと考えられる(p値 5%)。

【 0 2 8 4 】

【表 4】

表4-研究したパラメーター及び交差効果のp値

要因	P値
濃度(A)	0.008308
流量比(B)	0.000998
温度(C)	<0.0001
流量(D)	0.957301
濃度及び温度(AC)	0.008791
温度及び流量(CD)	0.000151
平方比(B^2)	<0.0001

10

【 0 2 8 5 】

図12～20は、創成されたモデルを用いたいろいろな固定要因でのZav応答の予測を表す。

【 0 2 8 6 】

- モデルの確認

図21に示されているように、8つの確認実験を行ってモデルの性能を試験した(全ての実験は130mg/mlのDOPC及び流量比5(1:4の有機:水性)で行った。

20

【 0 2 8 7 】

得られた結果はモデルと良く一致しており、全ての結果は90～110nmの予期された範囲である。

【 0 2 8 8 】

【表 5】

表5-確認結果

実験	温度 (°C)	総流量 (ml/min)	Zav (nm)		Pdl
			予測値	測定値	
1	23	15	105	101	0.188
2	23	17	108	104	0.187
3	20	16	100	98	0.185
4	20	16	100	99	0.196
5	17	15	94	97	0.168
6	17	17	91	89	0.160
7	20	16	100	96	0.173
8	20	16	100	95	0.176

30

【 0 2 8 9 】

結論

温度、実行時間及び採取容積に関してプロセスを最適化するために、DOPC濃度およそ130mg/ml、流量14～17ml/minの間及び温度16～25の間で1:4(有機:水性)の比率が95～120nmの領域(即ちおよそ100nm)のリポソームを得るのに最良のようである。

40

【 0 2 9 0 】

特定のパラメーターは80:20エタノール:IPA中130mg/mlのDOPC、流量比1:4(有機:

50

水性)、総流量16ml/min及び温度20℃である。

【0291】

表3はZav及びPdIに対する標準偏差(SD)及びCVを示す。良好な再現性を表す極めて低いCVが示されている。

【0292】

[実施例5]

適応免疫反応

方法

- アジュバント調製

先に記載した単一混合チャンバー装置を用いてリポソームを調製した。80/20エタノール/IPA中にDOPC(120mg/ml)、コレステロール(30mg/ml)及び3D-MPL(6mg/ml)を含む有機相を、総流量18ml/min及び流量比5(1:4の有機:水性)の条件下で、注射用水中にQS-21(1.5mg/ml)を含有する水性相と混合した。有機相は20℃に維持した。水性相は15℃に維持した。

10

【0293】

透析により溶媒を除去し、得られた濃縮物を希釈して最終のアジュバント調製物を得た。

【0294】

- ワクチン接種

6~8週齢のメスC57Bl6マウス(22/群)に、3D-MPL及びQS-21を有するマイクロ流体生産リポソームと共に調合したgE抗原を、14日間隔で二回注射した。5匹のマウスの対照群には緩衝剤のみと共にgEを与えた。

20

【0295】

最終のアジュバント調製物を希釈し、必要に応じてgEと混合してワクチン接種混合物を得た。2つの用量のアジュバントを評価した(動物1匹につき0.4及び0.1ugの3D-MPL及びQS-21の両方、それぞれ典型的な50ugヒト用量(HD)の1/125及び1/500に対応する)。各々の動物には5ugのgEを与えた。注射容積は20ulであった。

【0296】

第2の免疫化の7日後(21日目)脾臓及び血清を収集し、それぞれT及びB細胞反応に関して分析した。

【0297】

- ICS(細胞内サイトカイン染色)

脾臓をRPMI培地に収集し、ポッター型組織粉碎機(ホモジナイザー)で2つの往復行程を用いて解離させた。ホモジナイズした試料を50mlのポリプロピレンチューブに移した。100uMナイロンセルストレイナーに通して繊維状物質をろ過により除去した。次いで細胞を洗浄し、カウントし、 10^7 細胞/mlに再懸濁した。

30

【0298】

ICSは、サイトカイン産生に基づいて抗原特異的なTリンパ球の定量化を可能にする科学技術である。

【0299】

リンパ球様細胞を、タンパク質輸送阻害剤(プレフェルジンA)の存在下ペプチドgE又は培地によりin vitroで一晩(O.N)再刺激する。次いでこれらの細胞を、蛍光抗体(細胞外染色:CD4、CD8、細胞内染色:TNF-アルファ、IFN-ガンマ及びIL2)を用いる伝統的な免疫蛍光法によって処理する。

40

【0300】

結果は、各々のマウスに対する培地条件の控除後CD4細胞集団内のサイトカイン陽性細胞の頻度として表される。少なくとも2つのサイトカイン(IL2、IFN-アルファ又はTNF-アルファ)の発現を示した集団に対して統計分析を行った。

【0301】

- ELISA

抗gE総IgGをELISAで測定した。96ウェルプレートに抗原を一晩4℃で塗布した。次い

50

でプレートを洗浄し、飽和緩衝剤を用いて1時間37℃で飽和した。その後、100ulの希釈したマウス血清又は標準若しくは対照を加え、37℃で1時間30分インキュベートした。洗浄後、プレートを100ulのビオチン化抗マウスIgGと共に1時間37℃でインキュベートした。洗浄後、プレートを100ulのストレプトアビジン-PODコンジュゲートと共に30分37℃でインキュベートした。洗浄後、100ulのTMB/ウェルを加え、プレートを暗所に室温で15分保った。反応を停止させるために、1ウェル当たり100ulのH₂SO₄ 0.4Nを加えた。Elisaプレートリーダーにより450/630nmの波長で吸光度を読み取った。結果はsoftmax-proソフトウェアを用いて計算した。

【0302】

結果

リポソームは95.5nmの直径、PdI0.184を有していた。最終のアジュバント調製物は2.2mg/mlのDOPC含量、0.58mg/mlのコレステロール含量、119ug/mlのQS-21含量及び90ug/mlの3D-MPL含量を有していた。

【0303】

ELISA結果は図22に示し、ICS結果は図23に示す。

【0304】

結論

TLR4アゴニスト及びサポニンと併せたマイクロ流体工学で生産したリポソームは代表的な抗原に対して細胞性及び抗体反応をアジュバントで補強することができた。

【0305】

[実施例6]

マイクロ流体リポソームの安定性

先に記載した単一混合チャンバー装置を用いてリポソームを調製した。80/20エタノール/IPA中にDOPC(130mg/ml)、コレステロール(32.5mg/ml)及び3D-MPL(6.5mg/ml)を含む有機相を総流量16ml/min及び流量比5(1:4の有機:水性)の条件下で注射用水中にQS-21(1.625mg/ml)を含有する水性相と混合した。有機相は20℃に維持した。水性相は20℃に維持した。

【0306】

透析により溶媒を除去し、材料を滅菌ろ過した。

【0307】

結果を図24に示す。図は、マイクロ流体工学を用いて生産したリポソームが2ヵ月4で貯蔵した後実質的に変化しないことを示している。

【0308】

[実施例7]

プロセスのアップスケールリング

この実施例の目的は、マイクロ流体プロセスを用いてアジュバントの商業規模のバッチを生産するためにプロセスのスケールアップを試験することであった。単一バッチの320Lのアジュバントを1営業日に適した生産サイクルで調製した(図25)。使用した混合チャンバーの数は16であった。

【0309】

マニホールド評価

有機及び水性相を16の混合チャンバーに分配するために、分配マニホールドは理想的には均一な流量分布を供給するべきである。実際の制限が意味するように、完全な分配は可能でないが、過度の変動は避けなければならない。流れの過度の変動は最終生成物の不均一性及び潜在的に標的仕様を外れる生成物をもたらす可能性がある。

【0310】

最終生成物中の成分含量の理論的な概算値を流量分布の変動に応じて計算した。表6が示しているように、5%未満の変動は、標的仕様範囲内に留まる最終生成物中の成分含量に実質的に影響を及ぼさない。

【0311】

10

20

30

40

50

変動が6%を超えると、3D-MPLの含量は上側の許容可能な限界に近くなり、変動のパーセンテージが更に増大するとこの限界を超える。

【0312】

【表6】

表6-流量の変動と共に予期される最終生成物中の成分含量

% Var	% (Aq-Org)	ml/min		比率	ml/min	最終の量(mg/ml)			
		Aq	Org			総流量	DOPC	Chol	3D-MPL
0	100-100	12.8	3.2	5.00	16	2.0	0.50	0.100	0.100
2	102-98	13.06	3.14	5.16	16.2	1.9	0.48	0.097	0.101
2	98-102	12.54	3.26	4.84	15.8	2.1	0.52	0.103	0.099
5	105-95	13.44	3.04	5.42	16.5	1.8	0.46	0.092	0.102
5	95-105	12.16	3.36	4.62	15.5	2.2	0.54	0.108	0.098
6	106-94	13.57	3.01	5.51	16.6	1.8	0.45	0.091	0.102
6	94-106	12.03	3.39	4.55	15.4	2.2	0.55	0.110	0.098
8	108-92	13.82	2.94	5.70	16.8	1.8	0.44	0.088	0.103
8	92-108	11.78	3.46	4.41	15.2	2.3	0.57	0.113	0.097
10	110-90	14.08	2.88	5.89	17.0	1.7	0.42	0.085	0.104
10	90-110	11.52	3.52	4.27	15.0	2.3	0.59	0.117	0.096

10

20

【0313】

マニホールド試験に適用される手順

初期マニホールドデザイン(図26)の入口を水で満たされたISCOポンプに接続した。マニホールドの16の出口の各々に20cmのETFE(エチレンテトラフルオロエチレン)配管(1/16"、0.04"ID)を接続し、50mlのFalcon(商標)チューブ(図27)に入れた。実験の前に各々のFalcon(商標)チューブを秤量した。次いで配管(入口及び出口)及びマニホールドに水を満たして気泡を除いた。

【0314】

系を約200ml/minの総流量で2分動かした。2分の期間の後、各々のFalcon(商標)チューブを秤量して送達された水の正確な質量を計算した。流れの変動の%を計算した:チャンネルX(1~16)の重量を測定された平均重量で割った。

30

【0315】

初期マニホールドを200ml/minの水で、また50ml/minのエタノールとイソプロパノールの混合物で試験した。結果(図28及び図29)はチャンネル間の変動を示す:高い総流量(約200ml/min)で、1つは5%の許容可能な変動限界を上回ったが(チャンネル1)、他はこの限界に近かった(チャンネル2、3、4、9、10、11及び12)。最も低い流量(約50ml/min)では変動は5%未満であるが同じ一般的傾向を示す。

【0316】

これらの結果に従って、CFD(計算流体力学)分析を行ってマニホールドの各々のセグメントに沿った流量分布を予測した。分析により、初期の屈曲部はその後の分岐内に流量差を誘発することが示された。これらの差は最終的分岐に沿って残った。予測された変動を観察された実験値(200ml/minの試験)に対してプロットすると、同じ一般的傾向を示す(図30)。

40

【0317】

所望の均一性で分配することはできなかったという第1のマニホールドに対する実験的知見はCFD分析で確認された。

【0318】

これらの結果に従って、CFDを改良された第二世代マニホールド(図31)のデザインを支持

50

するツールとして使用した。研究の結果、初期の屈曲部が除去され、第1のチャンネル長さが短縮され、第2及び第3のチャンネル長さが増大された。これらの状況下で速度プロフィールはより一定であり、循環ゾーンは殆ど完全に除去された。

【0319】

改良されたマニホルドの試験

第2のマニホルドを同様の手順(12.8ml/min/チャンネル=204.8総流量)で試験し、3つのマニホルド(B1、B2及びA2とする)の各々に対して三回再現した。図32～34は得られた実験結果を示す。全ての場合に個々のチャンネルの変動は5%の所望の限界未満であり、多くの場合に測定された流量の変動は平均から2%未満であった。

【0320】

リポソーム生産

改良されたマニホルドを用いて、単一の混合チャンバーで生産されたものと同じプロフィールのリポソームを商業規模で生産することができることを確かめるために実験を行った。

【0321】

実験のために、ISCO 1000D及び500Dポンプをタンデムで使用した。限定された実行時間のため、各々のポンプの1つのシリンダーのみを使用した。ポンプ加熱ジャケットをポンプ1つ当たり1つの水浴で水浴(Julabo F33)に接続した。温度の制御は保証されたプローブを用いて監視した。

【0322】

2つの改良されたマニホルドを入口で各々のポンプに、各々8つの混合チャンバーを含有する2つのマイクロチップに接続して並行して合計16の混合チャンバーを得た。使用した配管はETFE 1/16 0.04"ID、29.5cmの長さであった。29.5cmのETFE配管(1/16 0.02"ID)を各々の混合チャンバーの出口に接続した。プロトタイプの温度は直接制御しなかったが装置を制御された温度の領域(20)に入れ、実験前に慣れさせた。

【0323】

ポンプを二回濯ぎ、空にした後適当な有機(130mg/mlのDOPC、32.5mg/mlのコレステロール、80/20エタノール/イソプロパノールに可溶化)及び水性相(注射用水)を満たした。次いでポンプをプライミングして系内の空気を除いた後分配マニホルドに接続した。流量を有機相は51.2ml/minに、水性相は204.8ml/minに設定した。系をプライミングし、空気を除去した場合、各々のチャンバーからの最初の2mlを捨て、その後各々のチャンバーの出口で16の別々の容器に採取した(実行時間 30秒)。各々のチャンネルからの500ulの生成物をプールし、pH6.1のPBSで130×に希釈した後DLS測定に付した。

【0324】

マルチチャンバー型プロトタイプで実験を行った後、ポンプからの配管のマルチチャンバー型プロトタイプからの接続を切り、1つの混合チャンバーに接続した。流量を有機3.2ml/min及び水性12.8ml/minに適應させた。系を安定化させた(空気なし)場合、混合チャンバーを出る最初の2mlを捨て、その後の約2mlを採取した。

【0325】

Malvern ZS Nanoシリーズ機器(図35)を用いてサイズ測定を計算し、「1つの」混合チャンバーで生産したリポソームと比較して16の混合チャンバーのプールに対して同じ傾向を示す。サイズ及び多分散性も同等である(表7)。

【0326】

結果は、商業規模生産で使用するのに適した16の混合チャンバー(及び付随のマニホルド)を含有するプロトタイプと1つの混合チャンバーとのリポソーム生産(DOPC-コレステロール)に関する等価性を初めて示す。

【0327】

10

20

30

40

50

【表 7】

表7-マルチチャンバー及び単一チャンバーのリポソームのDLS結果

	Zav (nm)	Pdl
単一の混合チャンバー	141	0.22
16の混合チャンバーのプール	143	0.23

【0328】

[実施例8]

薄膜方法で生産したリポソームに対する適応免疫反応

10

方法

- アジュバント調製

先に記載された単一混合チャンバー装置を用いて3つのロットのリポソームを調製した。80/20エタノール/IPA中にDOPC(130mg/ml)、コレステロール(32.5mg/ml)及び3D-MPL(6.5mg/ml)を含む有機相を注射用水中にQS-21(1.625mg/ml)を含有する水性相と総流量16ml/min及び流量比5(1:4の有機:水性)の条件下で混合した。温度は20℃に維持した。

【0329】

Hydrosart 30kDa膜及び6容積の交換緩衝剤を用いて透析ろ過により溶媒を除去した。透析ろ過時間はおよそ40分であった。続いて材料を0.22µm PES膜上の無菌ろ過を用いて滅菌ろ過した。

20

【0330】

得られるリポソームアジュバント濃縮物は、必要に応じて希釈して最終のアジュバント調製物を得ることができる。

【0331】

- ワクチン接種

6～8週齢のメスC57Bl6マウス(1群当たり6匹のマウス、合計186匹の動物)に、3D-MPL及びQS-21を含むリポソーム製剤としたgE抗原を14日間隔で二回注射した。陰性対照群には同じスケジュールで緩衝剤のみと共にgEを与えた。

【0332】

最終のワクチン接種用混合物は、アジュバント濃縮物の希釈及び必要に応じてgEとの混合により調製した。5つの用量のアジュバントを評価した(動物1匹当たり注射毎に3D-MPL及びQS-21の両方を0.05、0.1、0.2、0.4及び1µg、それぞれ予期された免疫刺激剤の含量に基づいて典型的な50µgのヒト用量(HD)の1/1000、1/500、1/250、1/125及び1/50に相当する)。各々の動物に注射毎に5µgのgEを与えた。注射容積は20µlであった。3つのロットのマイクロ流体リポソームアジュバントを薄膜方法で生産した3つのロットのリポソームアジュバントと比較した。

30

【0333】

空間の制約のため、実験は二連で行った(即ち、各群の3匹のマウスに各連で6つの処置を受けさせ、結果を合わせた)。

40

【0334】

第2の免疫化の7日後(21日目)脾臓と血清を収集し、それぞれT及びB細胞反応を分析した。

【0335】

実施例5に挙げた方法を用いてICS及びELISAを行った。

【0336】

結果

マイクロ流体ロットの特性決定

【0337】

50

【表 8】

表8-マイクロ流体ロットのDLS特性決定

ロット	マイクロ流体混合後		透析ろ過及び殺菌後		貯蔵(4℃)後		
	ZAV (nm)	Pdl	ZAV (nm)	Pdl	ZAV (nm)	Pdl	時間
1	98	0.18	96	0.19	98	0.19	4.5ヵ月
2	100	0.21	100	0.22	99	0.21	4ヵ月
3	103	0.22	102	0.24	102	0.24	4ヵ月

【0338】

10

【表 9】

表9-マイクロ流体ロット組成(濃縮物の希釈後)

ロット	DOPC (mg/ml)	コレステロール (mg/ml)	QS21 (ug/ml) (予測100)	3D-MPL (ug/ml) (予測100)	残留するアルコール (ug/500ul用量)
1	1.9	0.46	91	74	55
2	2	0.51	96	82	125
3	2	0.48	96	79	85

20

【0339】

【表 10】

表10-薄膜ロット特性決定

ロット	DOPC (mg/ml)	コレステロール (mg/ml)	QS21 (ug/ml) (予測100)	3D-MPL (ug/ml) (予測100)	残留するアルコール (ug/500ul用量)	Zav (nm)	Pdl
1	2	0.49	99	84	行わなかった	104	0.14
2	1.9	0.49	94	88	行わなかった	108	0.14
3	2	0.48	101	84	行わなかった	105	0.13

30

【0340】

ELISAの結果を図36に、ICSの結果を図37に示す。

【0341】

モデルを使用してデータから実験連(Exp 1対Exp 2)及びロット(Lot 1、Lot 2又はLot 3)の影響を算定した後回収した。次いで線状モデルを両方の方法について別々にこれらのデータに当て嵌めた。方法間の関連する予測幾何平均比を図38及び図39に示す(それぞれ、ELISA及びICS)。

【0342】

40

結論

TLR4アゴニスト及びサポニンと併せてマイクロ流体工学で生産したリポソームは薄膜で生産したリポソームとほぼ同等なやり方で代表的な抗原に対する細胞及び抗体反応をアジュバントで補強することができた。

【0343】

[実施例9]

薄膜方法で生産したリポソームに対する適応免疫反応

実施例7に記載した上首尾なスケールアップに続いて、16チャンネルマイクロ流体装置を用いて、サポニン(QS21)及びTLR4(3D-MPL)免疫刺激剤を含むリポソーム材料のバッチを調製した。

50

【 0 3 4 4 】

80/20エタノール/IPA中にDOPC(130mg/ml)、コレステロール(32.5mg/ml)及び3D-MPL(6.5mg/ml)を含む有機相を注射用水中にQS-21(1.625mg/ml)を含有する水性相と総流量16ml/min(チャンバー1つにつき)及び流量比5(1:4の有機:水性)の条件下で混合した。温度は20 に維持した。

【 0 3 4 5 】

単一のチャンバーを用いて初期の単一チャンバーベンチマーク実験を行った(最初の2mlは捨てた)。

【 0 3 4 6 】

続いて、16全てのチャンバーで並行して系を作動させ、各々のチャンバー出口からの材料を個別に収集した(各々のチャンバーからの最初の2mlは捨てた)。16のチャンバーのプールを調製した。ベンチマーク条件について使用したのと同じ単一の混合チャンバーで第3の実験を行った(インキュベーターには入れなかった)。ここでも最初の2mlは捨てた。

【 0 3 4 7 】

マイクロ流体プロセスの後(溶媒除去なし)DLSでサイズ測定を行った。

【 0 3 4 8 】

【表 1 1】

表11-マルチチャンバー及び単一チャンバーのリポソームのDLS結果

	Zav (nm)	Pdl
単一混合チャンバーベンチマーク	105	0.21
16の混合チャンバーのプール	103	0.20
単一の混合チャンバー	106	0.21

【 0 3 4 9 】

3つの実験で得られたサイズの比較(図40)は同等なプロフィールを示しており、本出願に記載したアプローチのロバストでスケール調整可能な性質が確かめられた。

【 0 3 5 0 】

本明細書及びそれに続く特許請求の範囲を通じて、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」という言葉及びその変化形、例えば「含み」などは述べられている整数、ステップ、整数の群又はステップの群が含まれているが、その他の整数、ステップ、整数の群又はステップの群が排除されるものではないと理解される。

【 0 3 5 1 】

本詳細説明及び特許請求の範囲がその一部を構成している本出願は以後の出願に関して優先権の基礎として使用され得る。そのような以後の出願の特許請求の範囲は本明細書に記載されているあらゆる特徴又は特徴の組合せに関し得る。実施形態は独立して、状況により適宜互いに完全に組み合わせて本発明の更なる実施形態を構成すると考えられる。それらは生成物、組成物、方法、又は使用請求項の形態をとることができ、限定されることはないが一例として以降の特許請求の範囲を含み得る。

【 0 3 5 2 】

この明細書で引用した、限定されることはないが特許及び特許出願を含めて全ての刊行物は、各々個々の刊行物が参照によりその全てが記載されているように本明細書に組み込まれていると具体的且つ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 3 5 3 】

参考文献一覧

10

20

30

40

50

Arias MA et al. (2012) Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140. PLoS ONE 7(7): e41144. doi:10.1371/journal.pone.0041144

Black, S., E. De Gregorio, and R. Rappuoli. 2015. Developing vaccines for an aging population. *Science translational medicine*. 7:281ps288

Coler RN et al. (2011) Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. PLoS ONE 6(1): e16333. doi:10.1371/journal.pone.0016333

10

20

30

40

50

Dalsgaard *et al.* in 1974 ("Saponin adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)

De Becker, G., V. Moulin, B. Pajak, C. Bruck, M. Francotte, C. Thiriart, J. Urbain, and M. Moser. 2000. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *International immunology*. 12:807-815.

Dendouga, N., M. Fochesato, L. Lockman, S. Mossman, and S.L. Giannini. 2012. Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS-21 in mice. *Vaccine*. 30:3126-3135.

10

Didierlaurent A.M., Collignon C., Bourguignon P., Wouters S., Fierens K., Fochesato M., Dendouga N., Langlet C., Malissen B., Lambrecht B.N., Garcon N., Van Mechelen M., and S. Morel. 2014 Enhancement of Adaptive Immunity by the Human Vaccine Adjuvant AS01 Depends on Activated Dendritic Cells *Journal of Immunology* 193(4):1920-1930.

Didierlaurent et al, 2017 Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines *Expert Reviews of Vaccines* 16(1): 55-63

20

Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950

Enhancement of Adaptive Immunity by the Human Vaccine Adjuvant AS01 Depends on Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 193

Garcon, N., and M. Van Mechelen. 2011. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. *Expert review of vaccines*. 10:471-486

Fochesato, M., Dendouga N. and Boxus M. 2016 *Hum Vaccin Immunother* 12(8):2092-2095

30

Haumont M., Jacquet A., Massaer M., Deleersnyder V., Mazzu P., Bollen A. and Jacobs P 1996 Purification, characterization and immunogenicity of recombinant varicella-zoster virus glycoprotein gE secreted by Chinese hamster ovary cells *Virus Res* 1996 40(2):199-204

Helminen ME, et al. (1993) *Infect. Immun.* 61:2003-2010

Hood, R. R.; DeVoe, D. L. 2015 High Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing. *Small Journal*. 11, No. 43, 5790–5799

40

Ismaili, J., J. Rennesson, E. Aksoy, J. Vekemans, B. Vincart, Z. Amraoui, F. Van Laethem, M. Goldman, and P.M. Dubois. 2002. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *Journal of immunology*. 168:926-932.

Kensil, C.R., U. Patel, M. Lennick, and D. Marciani. 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *Journal of immunology*. 146:431-437.

Kensil, C.R., and R. Kammer. 1998. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert opinion on investigational drugs*. 7:1475-1482. 10

Kim YT et al 2012 Mass production and size control of lipid-polymer hybrid nanoparticles through controlled microvortices. *Nano Letters* 12(7):3587-3591

Lambrecht, B.N., M. Kool, M.A. Willart, and H. Hammad. 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology*. 21:23-29.

Leroux-Roels I. et al. *J. Infect. Dis.* 2012, 206: 1280-1290

Li, H., S.B. Willingham, J.P. Ting, and F. Re. 2008. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of immunology*. 181:17-21. 20

Livingston, P.O., S. Adluri, F. Helling, T.J. Yao, C.R. Kensil, M.J. Newman, and D. Marciani. 1994. Phase 1 trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet haemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine*. 12:1275-1280.

Ragupathi, G., J.R. Gardner, P.O. Livingston, and D.Y. Gin. 2011. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert review of vaccines*. 10:463-470 30

Martin, M., S.M. Michalek, and J. Katz. 2003. Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infection and immunity*. 71:2498-2507.

Marty-Roix, R. *et al.* Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *J. Biol. Chem.* **291**, 1123–36 (2016)

Mata-Haro, V., C. Cekic, M. Martin, P.M. Chilton, C.R. Casella, and T.C. Mitchell. 2007. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*. 316:1628-1632.

McLellan et al., *Science*, Vol. 340: 1113-1117. 40

McLellan et al., *Science*, Vol 342: 592-598

Newman, M.J., J.Y. Wu, B.H. Gardner, K.J. Munroe, D. Leombruno, J. Recchia, C.R. Kensil, and R.T. Coughlin. 1992. Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of immunology*. 148:2357-2362.

Rigter et al., *PLOS One*, Vol. 8: e71072

10

Skeiky et al *Infection and Immunity* 1999 67(8): 3998-4007

Skeiky et al *J. Immunol.* 2004 172:7618-7628

Soltysik, S., J.Y. Wu, J. Recchia, D.A. Wheeler, M.J. Newman, R.T. Coughlin, and C.R. Kensil. 1995. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine*. 13:1403-1410.

20

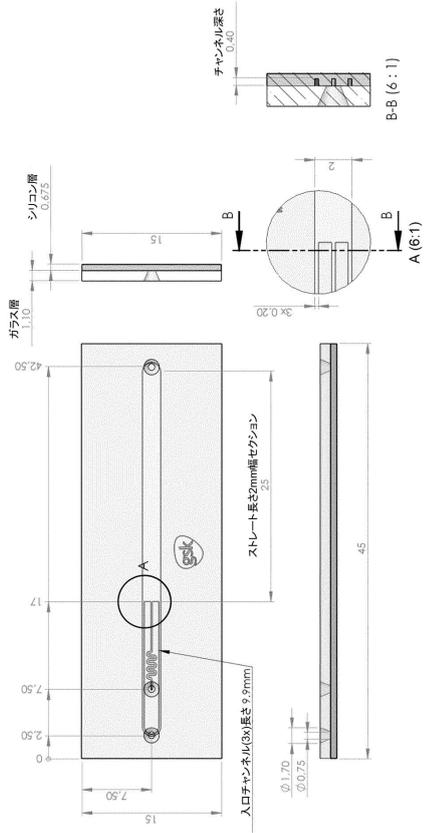
Vafai A., Antibody binding sites on truncated forms of varicella-zoster virus gpl(gE) glycoprotein, *Vaccine* 1994 12:1265-9

30

40

50

【図面】
【図 1】



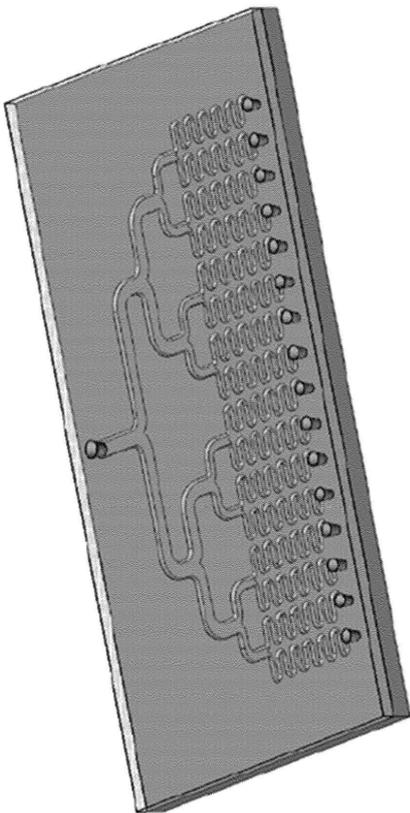
【図 2】



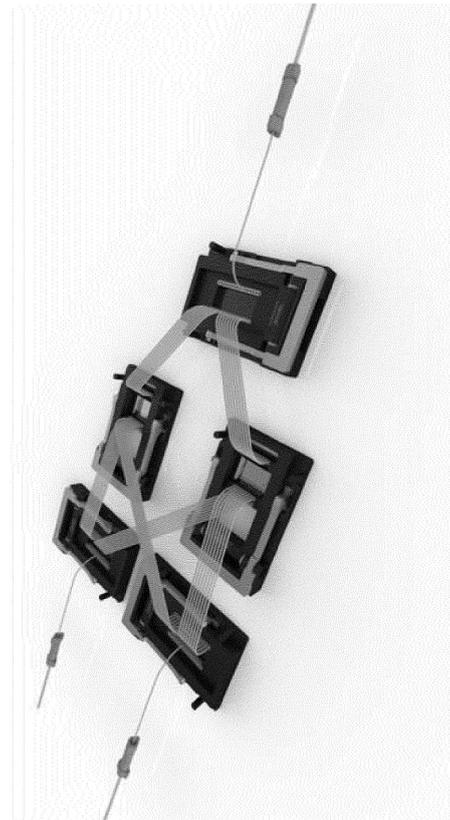
10

20

【図 3】



【図 4】

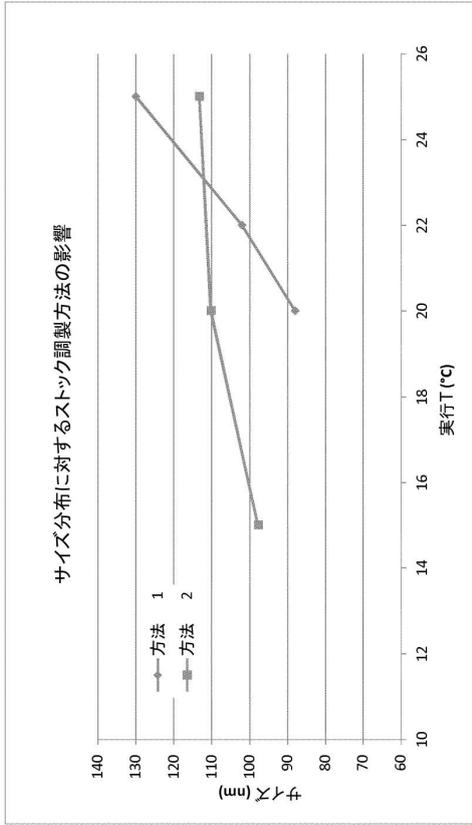


30

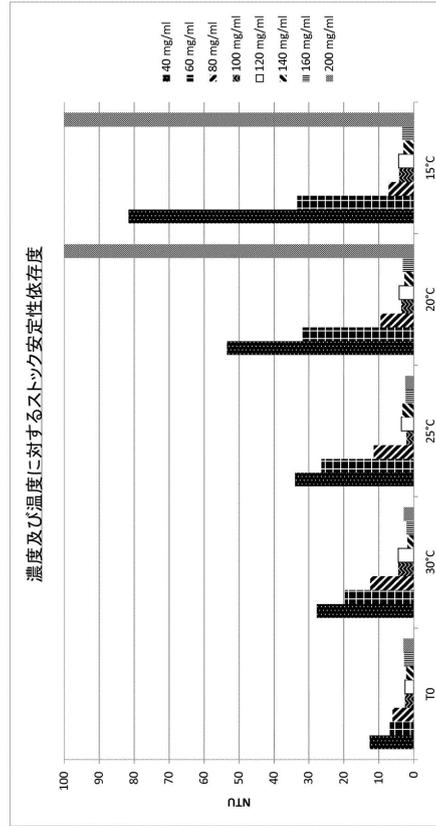
40

50

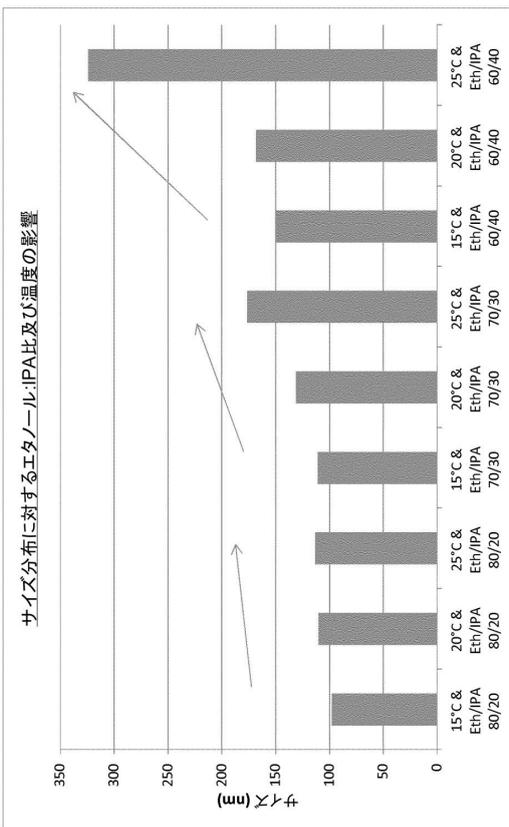
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

日	DOPC濃度 (ug/ml)	流量比	温度 (°C)	総流量 (ml/min)	注釈
1	100	4	15	14	
1	100	4	25	20	
1	130	4	20	17	
1	130	5	15	17	
1	130	5	20	17	PI中心
1	160	5	20	17	
1	160	6	15	14	
1	160	6	15	20	
1	160	6	25	20	1日目
2	100	4	15	14	2日目を繰り返す
2	100	5	20	17	
2	100	6	25	14	
2	100	6	25	20	
2	130	5	20	17	PI中心
2	130	5	20	17	PI中心
2	160	4	15	20	
2	160	4	25	14	
2	160	6	25	20	2日目を繰り返す
3	100	4	15	14	3日目を繰り返す
3	100	4	15	20	
3	100	4	25	14	
3	100	6	15	14	
3	130	5	20	17	PI中心
3	130	5	20	17	PI中心
3	130	6	20	17	
3	160	6	25	14	
3	160	6	25	20	3日目を繰り返す
4	100	4	15	14	4日目を繰り返す
4	100	6	15	20	
4	130	5	20	14	
4	130	5	20	17	PI中心
4	130	5	20	20	
4	130	5	25	17	
4	160	4	15	14	
4	160	4	25	20	
4	160	6	25	20	4日目を繰り返す

10

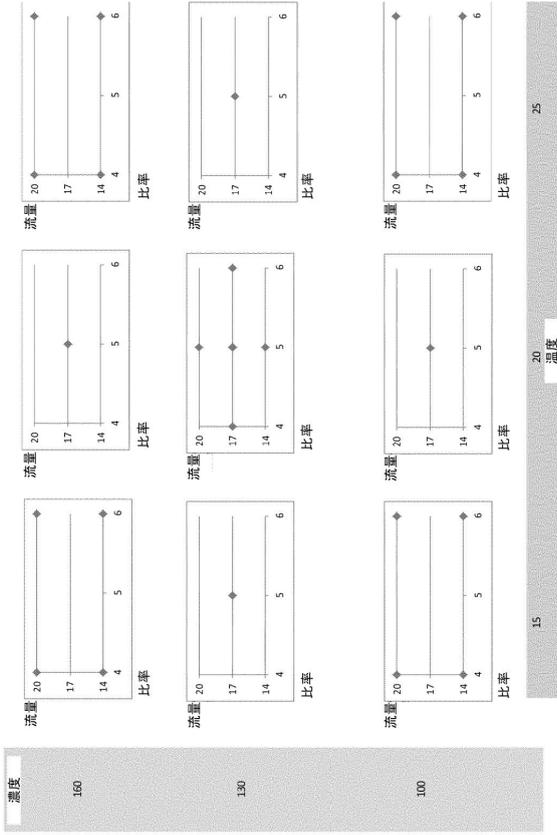
20

30

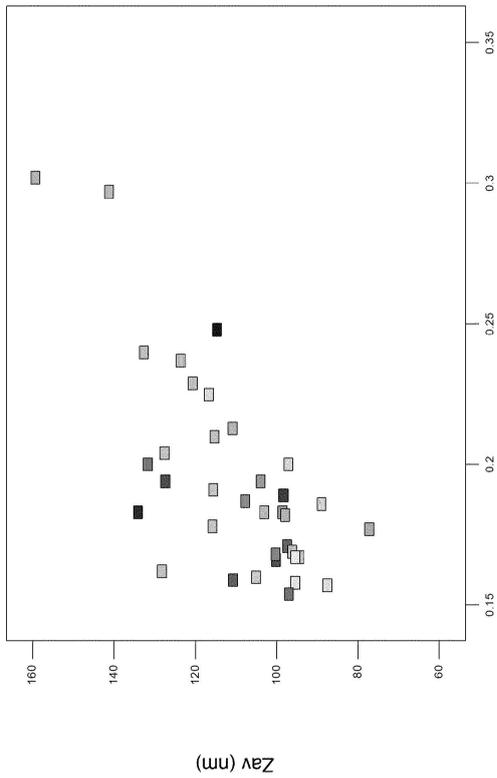
40

50

【図 9】



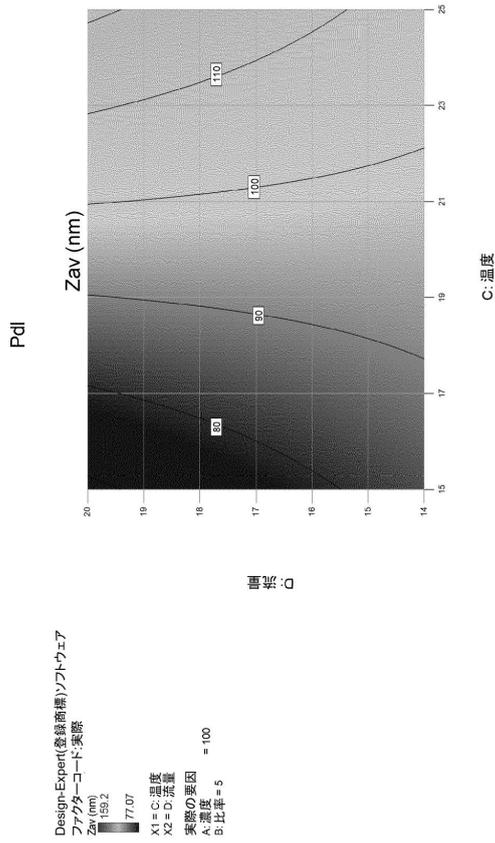
【図 11】



【図 10】

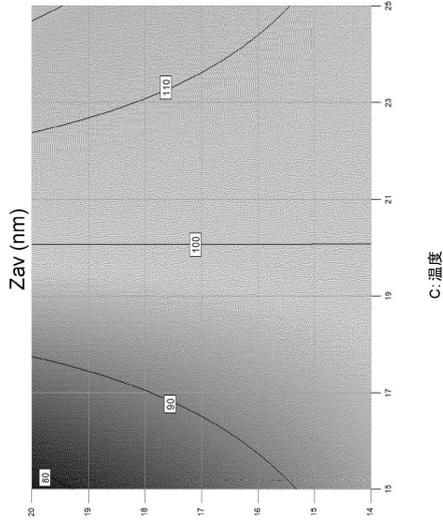
目	速度 mm/min	比率	温度 ℃	流量 ml/min	レイリス 数	水性剤中のSS21 mg/ml	Zav	Pdl
1	100	4	25	20	171	1.60	159.2	0.302
1	130	6	25	198	20	1.60	144.1	0.237
1	160	4	20	17	137	2.17	116.6	0.225
1	130	5	20	17	148	1.63	97.09	0.200
1	160	5	20	17	148	2.00	100.6	0.239
1	100	4	15	14	104	1.67	114.6	0.248
1	130	5	15	17	136	1.63	94.41	0.167
1	160	6	15	14	118	1.60	110.8	0.213
1	100	6	15	20	169	1.60	100.1	0.166
2	100	6	25	14	139	1.00	115.2	0.21
2	160	6	25	20	198	1.00	123.5	0.237
2	160	4	25	14	120	2.67	128.1	0.162
2	160	6	25	14	120	1.60	127.5	0.204
2	100	5	20	17	148	1.25	87.42	0.157
2	130	5	20	17	148	1.63	95.35	0.158
2	130	5	20	17	148	1.63	95.36	0.157
2	100	4	15	14	104	1.67	103	0.183
2	160	4	15	20	149	2.67	107.7	0.187
3	100	4	25	14	120	1.67	131.6	0.2
3	160	6	25	14	139	1.60	115.7	0.178
3	160	6	25	20	198	1.60	132.6	0.24
3	130	5	20	17	148	1.63	96.19	0.169
3	130	5	20	17	148	1.63	98.51	0.183
3	130	6	20	17	157	1.30	97.39	0.171
3	100	6	15	14	104	1.67	97.85	0.182
3	100	6	15	14	118	1.00	96.3	0.189
4	130	5	25	17	158	1.63	88.89	0.186
4	160	4	25	20	171	2.67	105	0.16
4	160	6	25	20	198	1.60	127.3	0.194
4	130	5	20	14	122	1.63	110.7	0.159
4	130	5	20	17	148	1.63	96.91	0.154
4	130	5	20	20	174	1.63	100.2	0.188
4	100	6	15	14	168	1.67	105.9	0.154
4	100	6	15	20	169	1.67	77.67	0.177
4	160	6	15	14	104	2.67	115.5	0.191

【図 12】



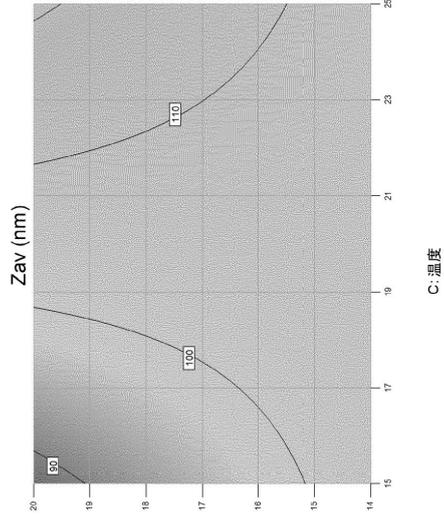
Design-Expert(登録商標)ソフトウェア
 ファクターコード実績
 Zav (nm) 159.2
 77.07
 X1 = C: 温度
 X2 = D: 流量
 実際の要因 = 100
 A: 速度
 B: 比率 = 5

【図 1 3】



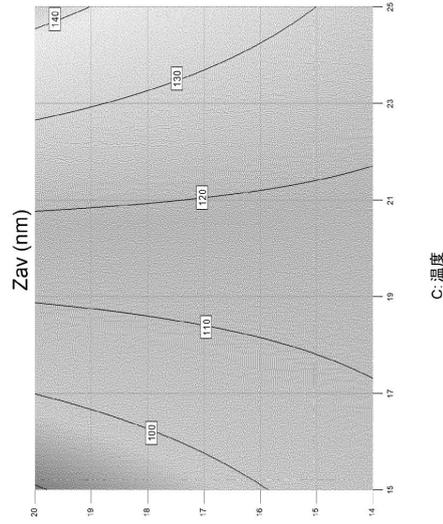
D:湿度

【図 1 4】



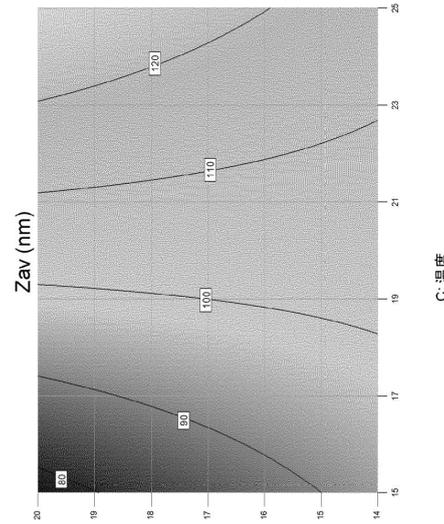
D:湿度

【図 1 5】



D:湿度

【図 1 6】



D:湿度

10

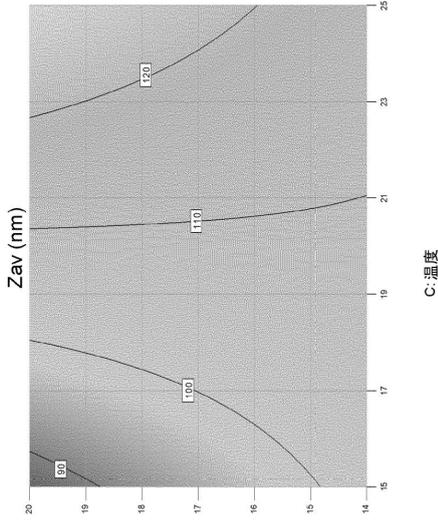
20

30

40

50

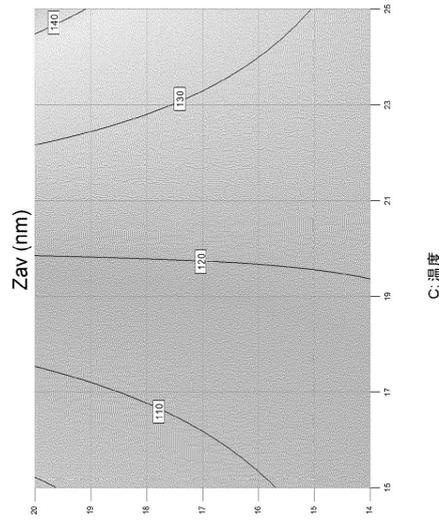
【図 17】



調製 口

Design-Expert(登録商標)ソフトウェア
 ファクターコード:実際
 Zav (nm) 77.07
 159.2
 X1 = C:温度
 X2 = D:流量
 実際の要因 = 130
 A:濃度
 B:比率 = 6

【図 18】



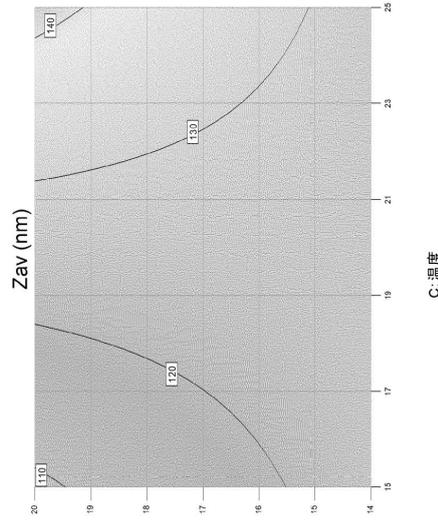
調製 口

Design-Expert(登録商標)ソフトウェア
 ファクターコード:実際
 Zav (nm) 77.07
 159.2
 X1 = C:温度
 X2 = D:流量
 実際の要因 = 130
 A:濃度 = 4
 B:比率 = 4

10

20

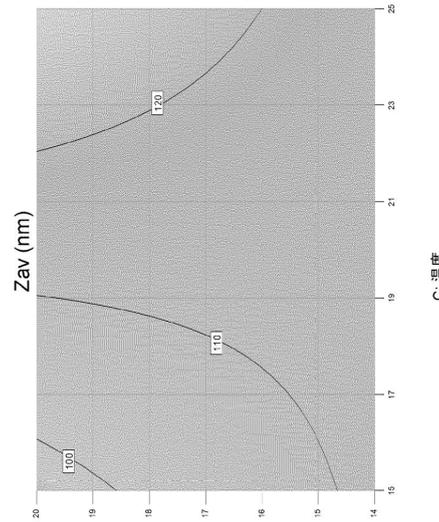
【図 19】



調製 口

Design-Expert(登録商標)ソフトウェア
 ファクターコード:実際
 Zav (nm) 77.07
 159.2
 X1 = C:温度
 X2 = D:流量
 実際の要因 = 160
 A:濃度 = 4
 B:比率 = 4

【図 20】



調製 口

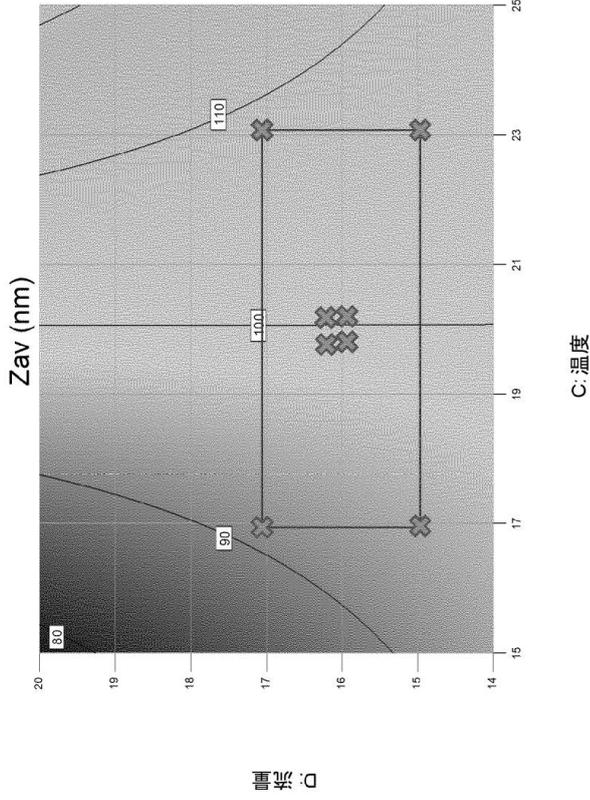
Design-Expert(登録商標)ソフトウェア
 ファクターコード:実際
 Zav (nm) 77.07
 159.2
 X1 = C:温度
 X2 = D:流量
 実際の要因 = 100
 A:濃度 = 6
 B:比率 = 6

30

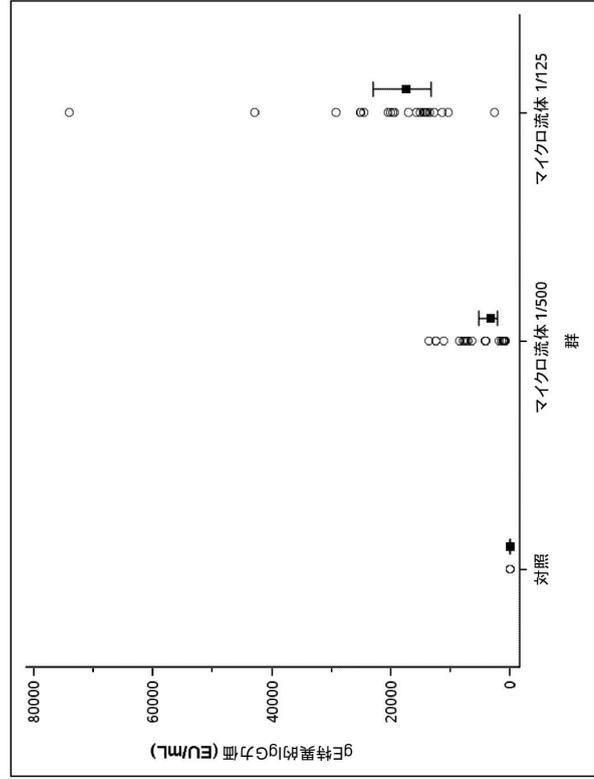
40

50

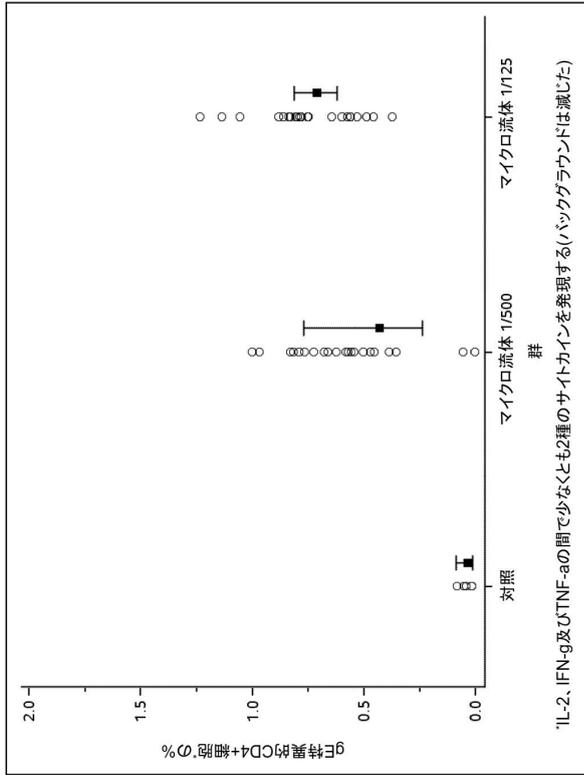
【図 2 1】



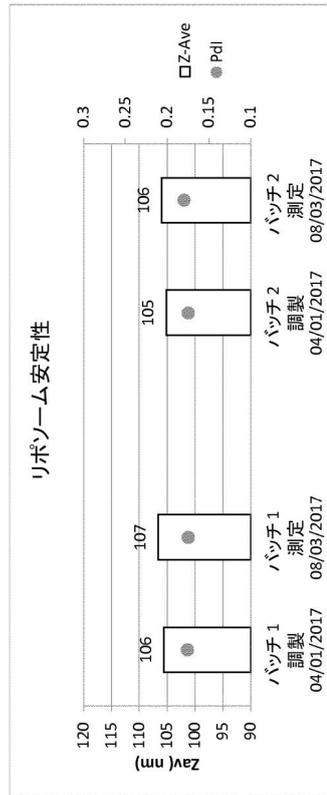
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

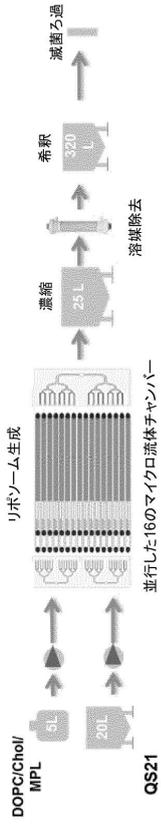
20

30

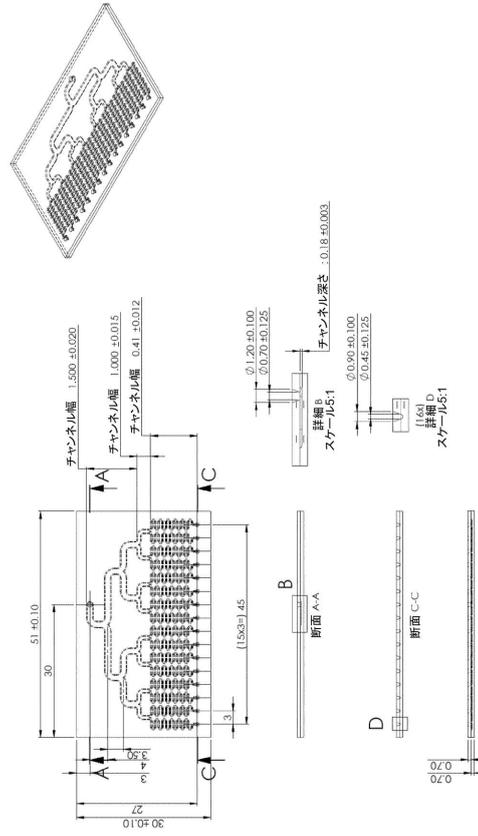
40

50

【図 2 5】



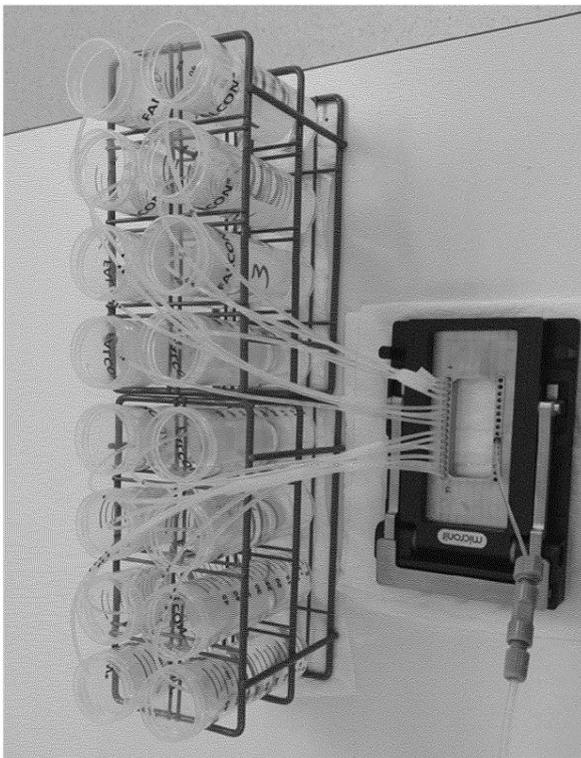
【図 2 6】



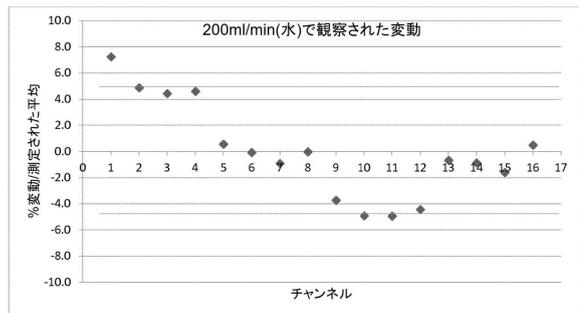
10

20

【図 2 7】



【図 2 8】

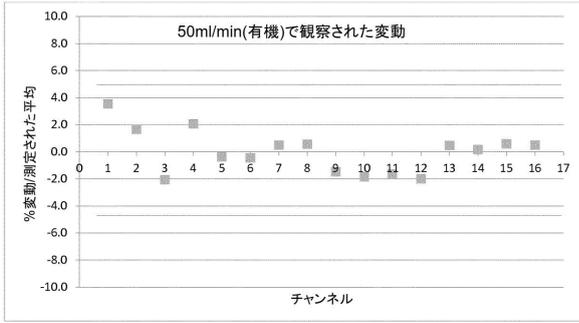


30

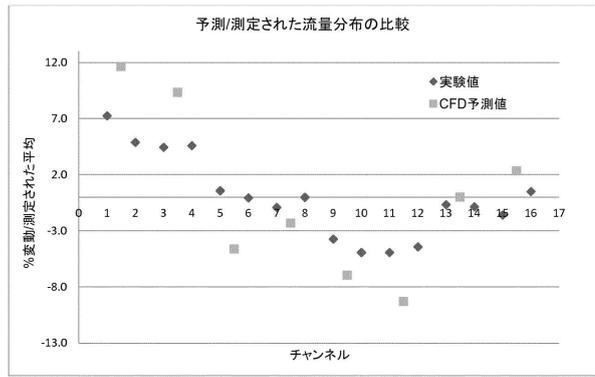
40

50

【図 29】

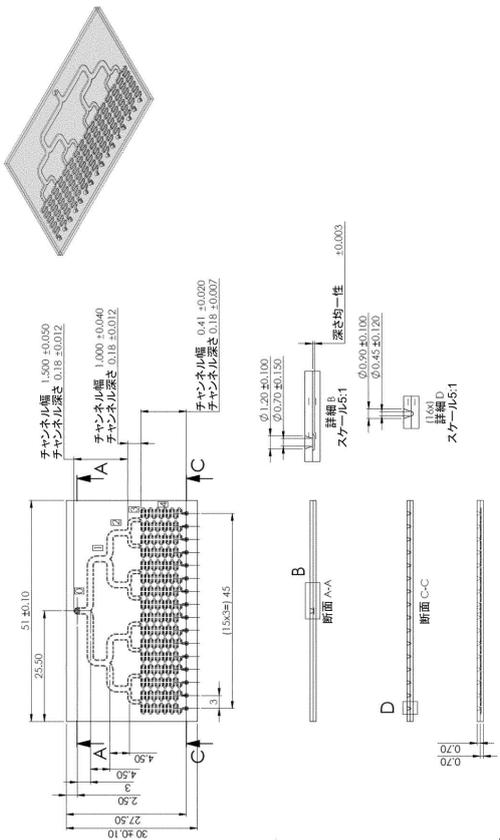


【図 30】

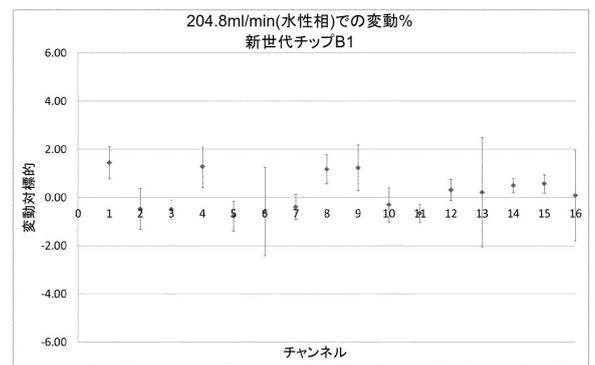


10

【図 31】



【図 32】



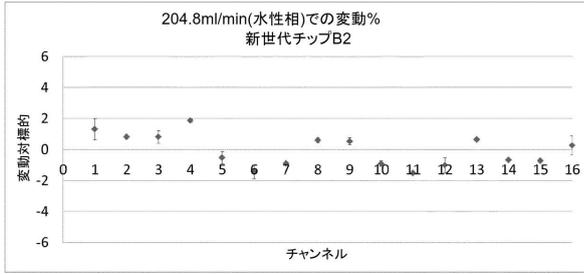
20

30

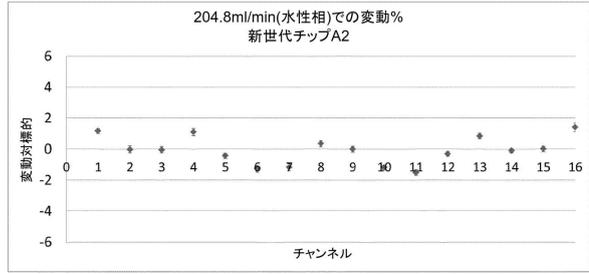
40

50

【 図 3 3 】

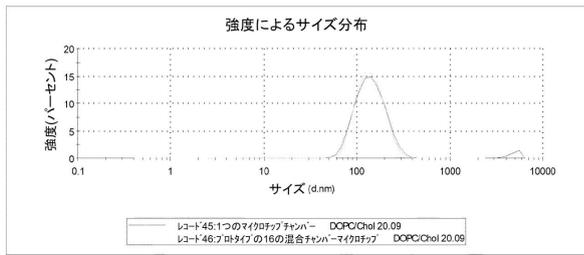


【 図 3 4 】

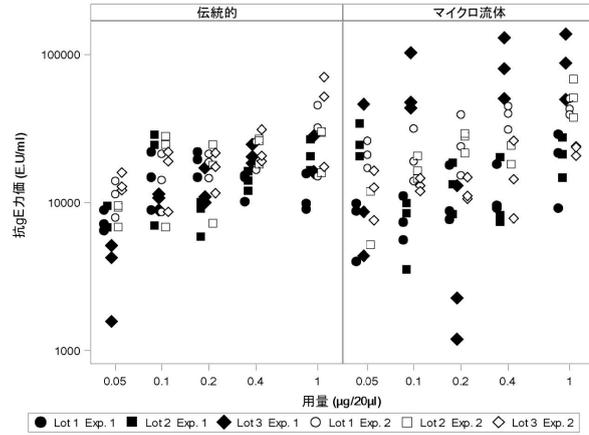


10

【 図 3 5 】

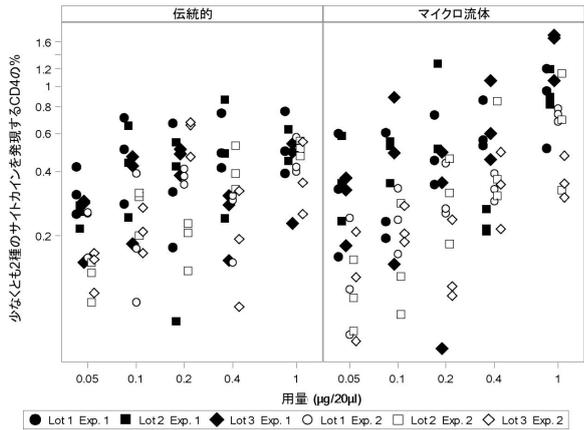


【 図 3 6 】

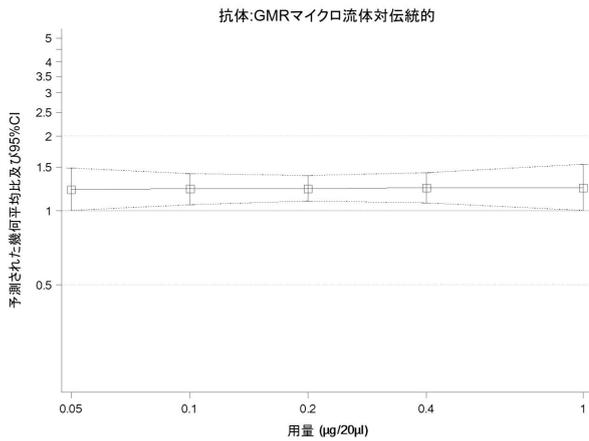


20

【 図 3 7 】



【 図 3 8 】

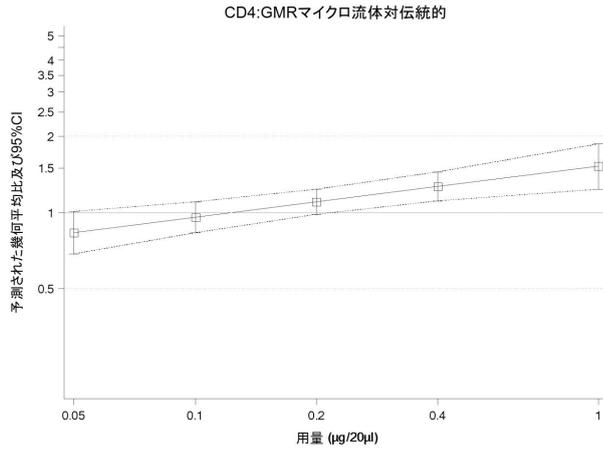


30

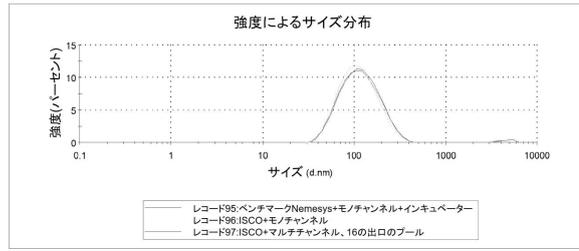
40

50

【図 39】



【図 40】



10

【配列表】

0007291633000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	
C 1 2 N	15/30 (2006.01)	C 1 2 N	15/30	Z N A
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/49 (2006.01)	C 1 2 N	15/49	
C 1 2 N	15/38 (2006.01)	C 1 2 N	15/38	

スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者

ル グリエレック, ロイク

ベルギー 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ド ランスティテュ 8 9 , グラクソスミスクライン
バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者

シファカキス, デモステネ

ベルギー 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ド ランスティテュ 8 9 , グラクソスミスクライン
バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者

ストロディオット, ローレン

ベルギー 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ド ランスティテュ 8 9 , グラクソスミスクライン
バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 植原 克典

(56)参考文献

特表 2 0 0 2 - 5 2 2 3 9 7 (J P , A)

特表 2 0 0 9 - 5 1 7 4 2 1 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 1 2 1 8 4 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 6 8 8 8 5 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)