明　細　書

発明の名称 ： エマルジョン製剤及びその調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチドのエマルジョン製剤及び当該製剤を調製する方法に関する。より具体的には、ＣＴＬエピトープペプチドと油性アジュバントとを含有する油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤及びその調製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年注目されているがんペプチドワクチン療法は、投与された抗原ペプチドを提示するがん細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）を、エピトープ特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の細胞受容体（ＴＣＲ）が認識し、ＣＴＬががん細胞を傷害することで効果を発揮するものである。ヒトにおけるＭＨＣはヒト白血球抗原（ＨＬＡ）と呼ばれ、ＨＬＡの型は非常に多型性を示すことが知られている。

[0003] 有効ながんペプチドは投与対象のヒトのＨＬＡ型によって異なるため、個々のがんペプチドワクチンが対象とするＨＬＡ型は限定的であったが、ＨＬＡ－Ａ２、ＨＬＡ－Ａ２４、ＨＬＡ－Ａ２６若しくはＨＬＡ－Ａ３スーパータイプのいずれか１つ又は複数のＨＬＡ型にＣＴＬ誘導能を示す様々なＣＴＬエピトープペプチドを連結したＣＴＬエピトープ４連結ペプチドが報告されている（特許文献１）。

[0004] 一方、がんペプチドワクチンの効果を高めるためのアジュバントとして油性アジュバントが知られている。油性アジュバントを用いてペプチドを、特にがんペプチドワクチンとして製剤化する場合、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤とすることが一般的である。エマルジョン製剤の場合には経時的な分離・凝集等の問題が生じることが懸念されるため、用時調製することが好ましく、そのための調製方法及び装置が提案されている（特許文献２及び３）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１５／０６０２３５号

特許文献2：国際公開第２００７／０８３７６３号

特許文献3：特許第５６２９８８２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 国際公開第２０１５／０６０２３５号に開示されたようなＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのエマルジョン製剤の調製は、当該公報に記載されているが、これらは１種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのエマルジョン製剤の調製に関する内容であり、本発明の３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含むエマルジョン製剤は開示されていない。そのため、本発明の第１の課題は、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを安定に含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を提供することにある。

[0007] また、本発明の３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含むエマルジョン製剤を標準的なエマルジョン調製法で調製する場合に、調製に時間がかかる上に失敗することもあり、用時調製を行う病院等の現場での負担は多大なものであるとの課題も知られていなかった。本発明者らは、標準的なエマルジョン調製法を用いて、本発明の３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含むエマルジョン製剤を調製することにより、前記課題を見出した。従って本発明の第２の課題は、上記ｗ／ｏエマルジョン製剤を効率的に調製する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、油性アジュバントを含む油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相を段階的に混合することにより、短時間でかつ効率的にエマルジョン製剤を調製できることを見出し、それにより、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する安定なｗ／ｏエマルジョン製剤を調製することに成功し、本発

明を完成するに至った。

[0009] 本発明は、次の〔１〕～〔１３〕を提供するものである。

〔１〕 リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤であって、３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する、上記製剤。

〔２〕 ３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと油性アジュバントとを含有する、上記〔１〕記載の油中水型エマルジョン製剤。

〔３〕 ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相と油性アジュバントを含有する油相とを混合して乳化して得られる、上記〔１〕又は〔２〕記載の油中水型エマルジョン製剤であって、当該ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相が、それぞれ下記一般式（Ｉ）で表される1種類のペプチドと、（ＩＩ）で表される1種類のペプチドと、（ＩＩＩ）で表される1種類のペプチドとで構成される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチド：

Ａ－（Ｌ）－Ｂ－（Ｌ）－Ｃ－（Ｌ）－ＰＥＰ２ （Ｉ）、

Ｄ－（Ｌ）－Ｅ－（Ｌ）－Ｆ－（Ｌ）－ＰＥＰ４ （ＩＩ）及び

Ｇ－（Ｌ）－Ｈ－（Ｌ）－Ｉ－（Ｌ）－ＰＥＰ１０ （ＩＩＩ）

（一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、

（Ｌ）は、リンカーを示し、

ＰＥＰ２は配列番号２で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

ＰＥＰ４は配列番号４で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

ＰＥＰ１０は配列番号１０で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々配列番号１で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１）、配列番号５で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ５）、配列番号６で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ６）、配列番号７で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ７）、配列番号８で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ８）、配

列番号９で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ９）、配列番号１３で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１３）、配列番号１５で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１５）及び配列番号１８で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１８）からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、
一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）で表されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい。）
を含む溶液である、上記エマルジョン製剤。

〔４〕　上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、（Ｌ）はリンカーを示し、Ａ、Ｂ及びＣは、各々ＰＥＰ７、ＰＥＰ８及びＰＥＰ１３からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、Ｄ、Ｅ及びＦは、各々ＰＥＰ５、ＰＥＰ６及びＰＥＰ９からなる群から相異なって選択され、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々ＰＥＰ１、ＰＥＰ１５及びＰＥＰ１８からなる群から相異なって選択され、一般式（Ｉ）で表されるペプチドは親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、上記〔３〕記載のエマルジョン製剤。

〔５〕　上記一般式（Ｉ）で表されるペプチドが、以下からなる群：
・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
及び
・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
から選択され、上記一般式（ＩＩ）で表されるペプチドが、以下からなる群：
・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；及び
・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
から選択され、上記一般式（ＩＩＩ）で表されるペプチドが、以下からなる群：
・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；及び
・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
から選択され、一般式（Ｉ）で表されるペプチドはＮ末端に親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、上記〔３〕又は〔４〕記載のエマルジョン製剤。

〔６〕　上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、（Ｌ）がアルギニンダイマーであって、親水性アミノ酸からなるペプチド配列がアルギニンテトラマーである、上記〔３〕～〔５〕のいずれか記載のエマルジョン製剤。

〔７〕　上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）で表される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドが、ＲＲＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号１９）、ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２５）、及びＰＥＰ１

５－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３３）である、上記〔３〕～〔６〕のいずれか記載のエマルジョン製剤。

〔８〕　上記〔１〕～〔７〕のいずれか記載のエマルジョン製剤を調製する方法であって、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成されるエマルジョン製剤を得ることを特徴とする、上記方法。

〔９〕　上記水相の一部が、油性アジュバントを有する油相に対し、１／１０～１／２倍量（ｖ／ｖ）である、上記〔８〕記載の方法。

〔１０〕　ペプチドを含有する油中水型エマルジョン製剤を調製する装置であって、

第２のシリンジ２と、

該第２のシリンジ２に連結したシリンジコネクタ５と、

該シリンジコネクタ５に連結した三方活栓４と、

該三方活栓４に更に連結した第１のシリンジ１及び第３のシリンジ３とから構成され、該第１のシリンジ１又は該第２のシリンジ２の内部に充填された油相中に、該第３のシリンジ３の内部に充填された水相を添加して、得られる混合液を該シリンジコネクタ５を介して該第１のシリンジ１及び該第２のシリンジ２の間で往復移動させることによって油中水型エマルジョン製剤を製造することを可能とする、上記装置。

〔１１〕　上記第１、第２及び第３のシリンジの容量がそれぞれ３ｍＬ以下である、上記〔１０〕記載の装置。

〔１２〕　上記混合液を通過させる上記シリンジコネクタ５の内径が０．８～１．７ｍｍの範囲である、上記〔１０〕又は〔１１〕記載の装置。

〔１３〕　リンカーを介して連結された４個のＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと、油性アジュバントと、上記〔１０〕～〔１２〕のいずれか記載の装置とを含む、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョンの調製用キット。

[0010]　本発明は、以下の態様にも関する。

〔１４〕　上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤を患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法。

〔１５〕　腫瘍の治療に使用するための、上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤。

〔１６〕　上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤を製造するための、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液の使用。

〔１７〕　腫瘍の治療に使用される油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤を用時調製するための、上記〔１０〕～〔１２〕のいずれか記載の装置、又は上記〔１３〕記載のキット。

〔１８〕　油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤が、上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載の製剤である、上記〔１０〕～〔１２〕のいずれか記載の装置、又は上記〔１３〕記載のキット。

〔１９〕　（ａ）以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成される、上記〔1〕～〔7〕のいずれか記載のエマルジョン製剤を調製すること、及び

（ｂ）得られたエマルジョン製剤を腫瘍を有する患者に投与すること

を含む、患者における腫瘍の治療方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2018-207779号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明の方法によれば、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと油性アジュバントを段階的に混合することにより、短時間で効率的に安定なｗ／ｏエマルジョン製剤を調製することが可能である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明のエマルジョン製剤を調製するために好適に使用できる装置において、第１のシリンジ１、シリンジコネクタ５、及び第２のシリンジ２間での液の移動を可能とし、第３のシリンジ３との液の移動がない状態の装置を模式的に示す。矢印は通液方向を示す。

[図2]本発明のエマルジョン製剤を調製するために好適に使用できる装置において、第１のシリンジ１及び第３のシリンジ３の間での液の移動を可能とし、第２のシリンジ２及びシリンジコネクタ５との液の移動がない状態の装置を模式的に示す。矢印は通液方向を示す。

[図3]分割調製法によってエマルジョン製剤を製造した場合の本乳化時のシリンジの往復回数（Ａ：０回；Ｂ：１０回；Ｃ：２０回；Ｄ：３０回；Ｅ：６０回）と得られるエマルジョンの粒子径の関係を示す。

[図4]三方活栓を用いたエマルジョン調製法によってエマルジョン製剤を製造した場合の本乳化時のシリンジの往復回数と得られるエマルジョンの粒子径の関係を示す。

[図5]本発明の方法によって得られるｗ／ｏエマルジョン製剤の粒子径の均一性を示す。

発明を実施するための形態

[0013] ＜油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤＞

本発明は、リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤であって、３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチド

を含有する、上記製剤を提供する。より具体的には、リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと、油性アジュバントとを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤であって、３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する、上記製剤を提供する。

[0014] 本発明において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、同一及び／又は異なる腫瘍抗原分子由来のＣＴＬエピトープペプチドから選ばれる４つのペプチドを、リンカーを介して直鎖状に連結して１分子としたペプチドを意味する。

[0015] 本発明において、上記のエマルジョン製剤は、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液と油性アジュバントとを混合し、エマルジョン化して得ることができる。本発明のエマルジョン製剤は、安定したｗ／ｏエマルジョン製剤として利用することができることが見出された。

[0016] 腫瘍抗原分子由来のＣＴＬエピトープペプチドとしては、例えば以下のようなものが知られている。

ＫＬＶＥＲＬＧＡＡ（配列番号１、本明細書において「ＰＥＰ１」と記載する、例えば国際公開第２００Ｉ／０Ｉ１０４４号）；

ＡＳＬＤＳＤＰＷＶ（配列番号２、本明細書において「ＰＥＰ２」と記載する、例えば国際公開第２００２／０１０３６９号）；

ＡＬＶＥＦＥＤＶＬ（配列番号３、本明細書において「ＰＥＰ３」と記載する、例えば国際公開第２００２／０１０３６９号）；

ＬＬＱＡＥＡＰＲＬ（配列番号４、本明細書において「ＰＥＰ４」と記載する、例えば国際公開第２０００／１２７０１号）；

ＤＹＳＡＲＷＮＥＩ（配列番号５、本明細書において「ＰＥＰ５」と記載する、例えば特開平１１－３１８４５５号）；

ＶＹＤＹＮＣＨＶＤＬ（配列番号６、本明細書において「ＰＥＰ６」と記載する、例えば国際公開第２０００／１２７０１号）；

ＬＹＡＷＥＰＳＦＬ（配列番号７、本明細書において「ＰＥＰ７」と記載する、例えば特開２００３－０００２７０号）；

ＤＹＬＲＳＶＬＥＤＦ（配列番号８、本明細書において「ＰＥＰ８」と記載する、例えば国際公開第２００１／０１１０４４号）；

ＱＩＲＰＩＦＳＮＲ（配列番号９、本明細書において「ＰＥＰ９」と記載する、例えば国際公開第２００８／００７７１１号）；

ＩＬＥＱＳＧＥＷＷＫ（配列番号１０、本明細書において「ＰＥＰ１０」と記載する、例えば国際公開第２００９／０２２６５２号）；

ＶＩＱＮＬＥＲＧＹＲ（配列番号１１、本明細書において「ＰＥＰ１１」と記載する、例えば国際公開第２００９／０２２６５２号）；

ＫＬＫＨＹＧＰＧＷＶ（配列番号１２、本明細書において「ＰＥＰ１２」と記載する、例えば国際公開第１９９９／０６７２８８号）；

ＲＬＱＥＷＣＳＶＩ（配列番号１３、本明細書において「ＰＥＰ１３」と記載する、例えば国際公開第２００２／０１０３６９号）；

ＩＬＧＥＬＲＥＫＶ（配列番号１４、本明細書において「ＰＥＰ１４」と記載する、例えば国際公開第２００２／０１０３６９号；

ＤＹＶＲＥＨＫＤＮＩ（配列番号１５、本明細書において「ＰＥＰ１５」と記載する、例えば国際公開第２００５／０７１０７５号）；

ＨＹＴＮＡＳＤＧＬ（配列番号１６、本明細書において「ＰＥＰ１６」と記載する、例えば国際公開第２００１／０１１０４４号）；

ＮＹＳＶＲＹＲＰＧＬ（配列番号１７、本明細書において「ＰＥＰ１７」と記載する、例えば特開２００３－０００２７０号）；

ＲＹＬＴＱＥＴＮＫＶ（配列番号１８、本明細書において「ＰＥＰ１８」と記載する、例えば国際公開第２００５／１１６０５６号）

[0017] 下記の表１に、ＣＴＬエピトープペプチドＰＥＰ１～ＰＥＰ１８の由来となるタンパク質の情報を記載する。これらのタンパク質は、腫瘍組織において高発現することが報告されている。

[0018]

[表1]

ペプチド	由来	アミノ酸配列	配列番号
PEP1	Lck-246	KLVERLGAA	配列番号 1
PEP2	WHSC2-103	ASLDSDPWV	配列番号 2
PEP3	HNRPL-140	ALVEFEDVL	配列番号 3
PEP4	SART3-302	LLQAEAPRL	配列番号 4
PEP5	SART2-93	DYSARWNEI	配列番号 5
PEP6	SART3-109	VYDYNCHVDL	配列番号 6
PEP7	MRP3-503	LYAWEPSFL	配列番号 7
PEP8	Lck-488	DYLRSVLEDF	配列番号 8
PEP9	SART3-734	QIRPIFSNR	配列番号 9
PEP10	Lck-90	ILEQSGEWWK	配列番号 10
PEP11	Lck-449	VIQNLERGYR	配列番号 11
PEP12	CypB-129	KLKHYGPGWV	配列番号 12
PEP13	UBE2V-43	RLQEWCSVI	配列番号 13
PEP14	WHSC2-141	ILGELREKV	配列番号 14
PEP15	EGFR-800	DYVREHKDNI	配列番号 15
PEP16	Lck-208	HYTNASDGL	配列番号 16
PEP17	MRP3-1293	NYSVRYRPGL	配列番号 17
PEP18	PTHr-102	RYLTQETNKV	配列番号 18

[0019] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、上記ＣＴＬエピトープペプチドのうち特定の１３種類（配列番号１で表されるペプチド「ＰＥＰ１」、配列番号２で表されるペプチド「ＰＥＰ２」、配列番号４で表されるペプチド「ＰＥＰ４」、配列番号５で表されるペプチド「ＰＥＰ５」、配列番号６で表されるペプチド「ＰＥＰ６」、配列番号７で表されるペプチド「ＰＥＰ７」、配列番号８で表されるペプチド「ＰＥＰ８」、配列番号９で表されるペプチドを「ＰＥＰ９」、配列番号１０で表されるペプチド「ＰＥＰ１０」、配列番号１３で表されるペプチド「ＰＥＰ１３」、配列番号１５で表されるペプチド「ＰＥＰ１５」、配列番号１７で表されるペプチド「ＰＥＰ１７」及び配列番号１８で表されるペプチド「ＰＥＰ１８」）

から選択される４種類のＣＴＬエピトープペプチドがリンカーを介して直鎖状に連結したペプチドであり、各ＣＴＬエピトープペプチドに特異的なＣＴＬを３つ以上誘導、及び／又は、活性化することができる。なお、ＣＴＬエピトープペプチドに特異的な誘導を直接的に評価しなくても、イムノプロテアソームによる切断実験（国際公開第２０１５／０６０２３５号等）により、当該エピトープペプチドに特異的なＣＴＬ誘導の有無について判断することができる。

[0020] 本発明において、ＰＥＰ１、ＰＥＰ２、ＰＥＰ４、ＰＥＰ５、ＰＥＰ６、ＰＥＰ７、ＰＥＰ８、ＰＥＰ９、ＰＥＰ１０、ＰＥＰ１３、ＰＥＰ１５、ＰＥＰ１７、及びＰＥＰ１８の各アミノ酸配列において、一又は複数のアミノ酸が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、元のペプチドと同等又はそれ以上のＣＴＬ誘導能及び／又は免疫グロブリン産生誘導能を有するペプチドも、「ＣＴＬエピトープペプチド」として使用することができる。ここで「複数」とは２～３個、好ましくは２個である。このようなペプチドとしては、例えば、元のアミノ酸と類似した特性を有するアミノ酸で置換された（すなわち、保存的アミノ酸置換により得られた）ペプチドが挙げられる。

[0021] 「元のペプチドと同等又はそれ以上のＣＴＬ誘導能及び／又は免疫グロブリン産生誘導能を有するペプチド」であるか否かは、例えば、国際公開第２０１５／０６０２３５号パンフレットに記載の方法に準じて評価することができる。前記方法を用いて評価する場合、ＣＴＬ誘導能は、一又は複数のアミノ酸が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する試験ペプチドを予め投与したマウス由来の細胞、同系マウス由来の抗原提示細胞及び試験ペプチドを添加したウェルにおけるＩＦＮ－γ産生細胞の数を指標とし、得られたΔ値の判定結果（陽性（１０≦Δ＜１００）、中陽性（１００≦Δ＜２００）、強陽性（２００≦Δ））が同等又はそれ以上であれば、元のペプチドと同等又はそれ以上のＣＴＬ誘導能を有するペプチドであると判断できる。この場合、元のペプチドが「陽性」であり、一又は複数のア

ミノ酸が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドも「陽性」であれば同等と判断する。また、免疫グロブリン産生誘導能は、試験ペプチドを投与したマウス血清中のＣＴＬエピトープ特異的ＩｇＧ抗体価を指標とし、得られたＩｇＧ抗体価の増加（ｆｏｌｄ）の測定結果（２＜ｆｏｌｄ＜１０、１０≦ｆｏｌｄ＜１００、１００≦ｆｏｌｄ）が同等又はそれ以上であれば、同等又はそれ以上の免疫グロブリン産生誘導能を有するペプチドであると判断できる。この場合、元のペプチドの測定結果が「２＜ｆｏｌｄ＜１０」の範囲内であり、一又は複数のアミノ酸が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドの測定結果も「２＜ｆｏｌｄ＜１０」の範囲内であれば同等と判断する。

[0022] 本発明において、リンカーは、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドが生体に投与された際に切断され、連結されたＣＴＬエピトープペプチドが個々に分離されることを可能とするものであればよく、例えば、エステル結合、エーテル結合、アミド結合、糖鎖リンカー、ポリエチレングリコールリンカー、アミノ酸リンカーなどが挙げられる。アミノ酸リンカーとして用いられるアミノ酸配列としては、アルギニンダイマー（ＲＲ）、アルギニントリマー（ＲＲＲ）、アルギニンテトラマー（ＲＲＲＲ）、リジンダイマー（ＫＫ）、リジントリマー（ＫＫＫ）、リジンテトラマー（ＫＫＫＫ）、グリシンダイマー（ＧＧ）、グリシントリマー（ＧＧＧ）、グリシンテトラマー（ＧＧＧＧ）、グリシンペンタマー（ＧＧＧＧＧ）、グリシンヘキサマー（ＧＧＧＧＧＧ）、アラニン－アラニン－チロシン（ＡＡＹ）、イソロイシン－ロイシン－アラニン（ＩＬＡ）、アルギニン－バリン－リジン－アルギニン（ＲＶＫＲ）等が例示され、好ましくはアルギニンダイマー（ＲＲ）又はアルギニントリマー（ＲＲＲ）であり、より好ましくはアルギニンダイマー（ＲＲ）である。エピトープ連結ペプチドにおいて使用されるリンカーは当分野において知られており、当業者であれば適宜選択して使用することができる。

[0023] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、さらに親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい。親水性アミノ酸か

らなるペプチド配列は、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に付加することができ、好ましくはＮ末端に付加する。親水性アミノ酸からなるペプチド配列は、アルギニン、ヒスチジン、リジン、トレオニン、チロシン、セリン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、及びグルタミン酸からなる群から選択される１～１５個、好ましくは２～１０個、さらに好ましくは３～５個の親水性アミノ酸からなるものを選択することができる。例えば、親水性アミノ酸からなるペプチド配列として、アルギニントリマー（ＲＲＲ）、アルギニンテトラマー（ＲＲＲＲ）、リジントリマー（ＫＫＫ）、リジンテトラマー（ＫＫＫＫ）、ヒスチジントリマー（ＨＨＨ）、ヒスチジンテトラマー（ＨＨＨＨ）等が挙げられ、好ましくはアルギニントリマー（ＲＲＲ）又はアルギニンテトラマー（ＲＲＲＲ）であり、より好ましくはアルギニンテトラマー（ＲＲＲＲ）である。

[0024] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、配列番号１で表されるペプチド「ＰＥＰ１」、配列番号２で表されるペプチド「ＰＥＰ２」、配列番号４で表されるペプチド「ＰＥＰ４」、配列番号５で表されるペプチド「ＰＥＰ５」、配列番号６で表されるペプチド「ＰＥＰ６」、配列番号７で表されるペプチド「ＰＥＰ７」、配列番号８で表されるペプチド「ＰＥＰ８」、配列番号９で表されるペプチド「ＰＥＰ９」、配列番号１０で表されるペプチド「ＰＥＰ１０」、配列番号１３で表されるペプチド「ＰＥＰ１３」、配列番号１５で表されるペプチド「ＰＥＰ１５」、配列番号１７で表されるペプチド「ＰＥＰ１７」及び配列番号１８で表されるペプチド「ＰＥＰ１８」からなる群より選択される４つのペプチドが、リンカーを介してそれぞれ連結されてなり、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、以下の（１）～（３）より選択されるいずれか一つの特徴を有するペプチドである：

（１）Ｃ末端がＰＥＰ２である（ただし、Ｎ末端にＰＥＰ７及びＰＥＰ８をＮ末端側からリンカーを介して隣り合ってこの順で含むものを除く）；

（２）Ｃ末端がＰＥＰ４である；

（３）Ｃ末端がＰＥＰ１０である。

[0025] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、好ましくは配列番号１で表されるペプチド「ＰＥＰ１」、配列番号２で表されるペプチド「ＰＥＰ２」、配列番号４で表されるペプチド「ＰＥＰ４」、配列番号５で表されるペプチド「ＰＥＰ５」、配列番号６で表されるペプチド「ＰＥＰ６」、配列番号７で表されるペプチド「ＰＥＰ７」、配列番号８で表されるペプチド「ＰＥＰ８」、配列番号９で表されるペプチド「ＰＥＰ９」、配列番号１０で表されるペプチド「ＰＥＰ１０」、配列番号１３で表されるペプチド「ＰＥＰ１３」、配列番号１５で表されるペプチド「ＰＥＰ１５」、配列番号１７で表されるペプチド「ＰＥＰ１７」及び配列番号１８で表されるペプチド「ＰＥＰ１８」からなる群より選択される重複しない４つのペプチドが、リンカーを介してそれぞれ連結されてなり、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、以下の（１）～（３）より選択されるいずれか一つの特徴を有するペプチドである：

（１）ＰＥＰ１、ＰＥＰ７、ＰＥＰ８及びＰＥＰ１３から選択される３つのＣＴＬエピトープペプチドを含みＣ末端がＰＥＰ２である（ただし、Ｎ末端にＰＥＰ７及びＰＥＰ８をＮ末端側からリンカーを介して隣り合ってこの順で含むものを除く）；

（２）ＰＥＰ５、ＰＥＰ６及びＰＥＰ９の３つのＣＴＬエピトープペプチドを含みＣ末端がＰＥＰ４である；

（３）ＰＥＰ１、ＰＥＰ１３、ＰＥＰ１５、ＰＥＰ１７及びＰＥＰ１８から選択される３つのＣＴＬエピトープペプチドを含みＣ末端がＰＥＰ１０である。

[0026] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、より好ましくは以下より選択される配列を含み、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよいペプチドである：

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１７－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

（式中「（Ｌ）」はリンカーを示す）。

[0027] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、より好ましくは上記配列中「Ｌ」で表されるリンカーがアミノ酸リンカーであり、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよいペプチドである。

[0028] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、より

好ましくは上記配列中「Ｌ」で表されるリンカーがアルギニンを２個又は３個連結したアルギニンダイマー又はアルギニントリマーであり、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよいペプチドである。

[0029] 本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、より好ましくは上記配列中「Ｌ」で表されるリンカーがアルギニンを２個又は３個連結したアルギニンダイマー又はアルギニントリマーであり、Ｎ末端に親水性アミノ酸としてアルギニンを３個連結したアルギニントリマー又はアルギニンを４個連結したアルギニンテトラマーからなるペプチド配列を有していてもよいペプチドである。

[0030] なお、本発明で好適に使用されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、例えば、国際公開第２０１５／０６０２３５号パンフレットに記載の方法に準じて合成することができる。

[0031] 本発明において、エマルジョン製剤の調製のために使用するＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液は、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含む溶液である。

[0032] 本発明において、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドをエマルジョン製剤に含める場合、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、それぞれ下記一般式（Ｉ）で表される1種類のペプチドと、（ＩＩ）で表される1種類のペプチドと、（ＩＩＩ）で表される1種類のペプチド：

Ａ－（Ｌ）－Ｂ－（Ｌ）－Ｃ－（Ｌ）－ＰＥＰ２　（Ｉ）

Ｄ－（Ｌ）－Ｅ－（Ｌ）－Ｆ－（Ｌ）－ＰＥＰ４　（ＩＩ）

Ｇ－（Ｌ）－Ｈ－（Ｌ）－Ｉ－（Ｌ）－ＰＥＰ１０　（ＩＩＩ）

とから構成され、（Ｌ）はリンカーを示し、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々ＰＥＰ１、ＰＥＰ５、ＰＥＰ６、ＰＥＰ７、ＰＥＰ８、ＰＥＰ９、ＰＥＰ１３、ＰＥＰ１５及びＰＥＰ１８からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドであることが好ましい。

[0033] 本発明において、好適に使用される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、より好ましくは、上記一般式（ＩＩ）で表される１種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩＩ）で表される1種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩＩ）で表される１種類のペプチドとから構成され、（Ｌ）はリンカーを示し、上記一般式（Ｉ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

及び

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

から選択され、上記一般式（ＩＩ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；及び

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

から選択され、上記一般式（ＩＩＩ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；及び

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

から選択される。なお、一般式（Ｉ）で表されるペプチドは親水性アミノ酸からなるペプチド配列をＮ末端及び／又はＣ末端に有していてもよい、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドである。

[0034] 本発明において好適に使用される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、より好ましくは、上記一般式（Ｉ）で表される１種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩ）で表される1種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩＩ）で表される１種類のペプチドとから構成され、（Ｌ）はリンカーを示し、上記一般式（Ｉ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

及び

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

から選択され、上記一般式（ＩＩ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；及び

・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；

から選択され、上記一般式（ＩＩＩ）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；及び

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

から選択され、一般式（Ｉ）で表されるペプチドが親水性アミノ酸からなるペプチド配列としてＮ末端にアルギニントリマー又はアルギニンテトラマーを有する、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの組合せである。

[0035] 本発明において好適に使用される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、より好ましくは、ＲＲＲＲ－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２、ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４、及びＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０であり、（Ｌ）はリンカーを示す、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの組合せである。

[0036] 本発明において好適に使用される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、最も好ましくは、ＲＲＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号１９）、ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２５）、及びＰＥＰ１５－ＲＲ－

ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３３）である、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの組合せである。

[0037] 本発明の態様の１つにおいて、３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは、下記一般式（Ｉ’）：

Ａ－ＲＲ－Ｂ－ＲＲ－Ｃ－ＲＲ－ＰＥＰ２ （Ｉ’）

で表される１種類のペプチドと、下記一般式（ＩＩ’）：

Ｄ－ＲＲ－Ｅ－ＲＲ－Ｆ－ＲＲ－ＰＥＰ４ （ＩＩ’）

で表される1種類のペプチドと、下記一般式（ＩＩＩ’）：

Ｇ－ＲＲ－Ｈ－ＲＲ－Ｉ－ＲＲ－ＰＥＰ１０ （ＩＩＩ’）

で表される１種類のペプチドとから構成され、ＲＲはアルギニンダイマーを示し、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々ＰＥＰ１、ＰＥＰ５、ＰＥＰ６、ＰＥＰ７、ＰＥＰ８、ＰＥＰ９、ＰＥＰ１３、ＰＥＰ１５及びＰＥＰ１８からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、一般式（Ｉ’）、（ＩＩ’）及び（ＩＩＩ’）で表されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのいずれか１つがＮ末端にアルギニンテトラマーを有する、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの組合せである。

[0038] 本発明において好適に使用される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして、より好ましくは、上記一般式（Ｉ’）で表される１種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩ’）で表される１種類のペプチドと、上記一般式（ＩＩＩ’）で表される１種類のペプチドとから構成され、上記一般式（Ｉ’）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＲＲＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号１９）；

・ＲＲＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号２０）；

・ＲＲＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号２１）；

・ＲＲＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号２２）；及び

・ＲＲＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号２３）；

から選択され、上記一般式（ＩＩ’）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２４）；

・ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２５）；

・ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２６）；

・ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２７）；

・ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２８）；及び・ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２９）；

から選択され、上記一般式（ＩＩＩ’）で表されるペプチドは、以下からなる群：

・ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３０）；

・ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３１）；

・ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３２）；

・ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３３）；

・ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配

列番号３４）；及び

・ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３５）；

から選択され、ＲＲはアルギニンダイマー、ＲＲＲＲはアルギニンテトラマーを示す、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの組合せである。

[0039] 本発明において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相としては、凍結乾燥した３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを溶解液で溶解した溶液を用いることができる。ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを凍結乾燥する際は、添加剤としてトレハロース等を含んでいてよい。そのため、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相としては、添加剤としてトレハロース等を含むものであっても良い。上記溶解液は、注射剤用の溶解液を用いることができ、例えば、注射用水や生理食塩水が挙げられ、特に注射用水が好ましい。また、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの水相中の濃度は、３種類の合計量として３～２７ｍｇ／ｍＬが好ましく、６～１８ｍｇ／ｍＬがより好ましく、７～１２ｍｇ／ｍＬがより好ましく、９ｍｇ／ｍＬがより好ましい。

[0040] また、本発明のエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤は、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを３種類の合計量として用量当たり３～２７ｍｇ含有することが好ましく、６～１８ｍｇ含有することがより好ましく、７～１２ｍｇ含有することがより好ましく、９ｍｇ含有することがより好ましい。

[0041] 本発明のエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤の粒子径は、平均粒子径が１～３μｍであることが好ましい。より好適には、平均粒子径が１～３μｍであって、粒子径１～３μｍの範囲に、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９９％以上のエマルジョン製剤が存在することが好ましい。

[0042] 本発明のエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤の粘度は、特に限定するものではないが、２００～４

００ｍＰａ・Ｓが好ましい。

[0043] 本発明において、油性アジュバントは、水相と混合して乳化した時にｗ／ｏエマルジョンを形成し、エマルジョンの形態で投与可能な、免疫応答を促進する油性の免疫アジュバントであれば特に限定されない。油性アジュバントとしては、油性成分のみからなるアジュバント単独のものと、油性成分に加えて界面活性剤を含有するものとが含まれる。本発明において好適に使用される油性アジュバントとしては、例えば流動パラフィン、ラノリン、スクワレン、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、NH_2（Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ．，１０１（１０）：２１１０－２１１４，２０１０）、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ７２０ ＶＧ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ５１ ＶＧ等が挙げられる。本発明において、特に好ましい油性アジュバントはＭｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ５１ ＶＧであり、これは例えばＳＥＰＰＩＣ社から入手することができる。

[0044] 油性アジュバントは、単独でエマルジョン調製のための油相として使用することもでき、また他の油性成分及び／又は界面活性剤との混合物の状態で油相とすることもできる。例えば上記のＭｏｎｔａｎｉｄｅ ＩＳＡ ５１ ＶＧは、単独でｗ／ｏエマルジョン製剤の調製のための油相として使用し得る。

[0045] ｗ／ｏエマルジョンを調製することで、水相に溶解した抗原を長期に渡って投与部位に滞留させることが可能であり、また、抗原が油相に保護されることで酵素的分解から保護することもできる。また、抗原が一定以上の粒子サイズの水滴中に内封されることで，抗原単体より免疫細胞による貪食を受けやすく免疫原性を高めることが可能である。このような性質はｏ／ｗエマルジョンではなしえない特性であり、本発明の形態のがんワクチンにおいてはｗ／ｏエマルジョンを調製することが極めて重要となる。

[0046] 本発明において、エマルジョン製剤を調製する際のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相に対する油性アジュバントを含有する油相の量は、０．５～２倍量（ｖ／ｖ）が好ましく、等量がより好ましい。

[0047] ＜ｗ／ｏエマルジョンの調製方法＞

本発明はまた、上記の本発明のエマルジョン製剤を調製する方法であって、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成されるエマルジョン製剤を得ることを特徴とする、上記方法を提供する。

[0048] 本発明における「一部」とは、油性アジュバントを有する油相に対し、１／１０～１／２倍量（ｖ／ｖ）が好ましく、１／１０～２／５倍量（ｖ／ｖ）がより好ましく、１／１０～１／５倍量（ｖ／ｖ）がさらに好ましく、１／５倍量（ｖ／ｖ）が最も好ましい。例えば、油性アジュバントの量が１ｍＬの場合、「ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相」の「一部」は、０．１～０．４ｍＬが好ましく、０．１～０．２ｍＬがより好ましく、０．２ｍＬが最も好ましい。

[0049] 尚、本明細書において、「本乳化」は、それぞれ全量の油相と水相を混合した後に行う乳化作業を示し、「プレ乳化」は全量の油相に対し、分割して水相を混合する毎に行う乳化作業を示す。なお、全量の油相に対し、分割して水相を混合する最後の操作の後の乳化は、それぞれ全量の油相と水相が混合された状態のため、「本乳化」となる。

[0050] 本発明のエマルジョン製剤は、例えば国際公開第２００７／０８３７６３号に記載された方法を利用して製造することができる。しかしながら、従来知られていた標準的なエマルジョン調製法では、プレ乳化はシリンジを振とうさせる方法でしか実施できないため、より好ましくは、本発明のエマルジョン製剤は、下記に記載する本発明の装置を用い、本発明の方法によって調製することが最も好ましい。

[0051] 具体的には、本発明のエマルジョン製剤は、油性アジュバントを含有する油相とＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相との混合液を、例えば内径が０．８～１．７ｍｍの範囲の狭い流路を有するシリンジコネクタを介して連結した２本のシリンジ間を往復移動させることによって乳化すること（プレ乳化及び本乳化）で調製することができる。このようなシリンジコネクタとして、例えばＧＰシリンジコネクタ（ニプロ）が知られている。

[0052] 本発明において、プレ乳化及び本乳化の際に、油性アジュバントを含有する油相とＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相との混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる回数は、例えば１０往復以上、２０往復以上、３０往復以上、４０往復以上、５０往復以上、又は６０往復とすることができる。プレ乳化時の往復回数は、作業効率の観点から１０～２０往復が好ましく、１０回がより好ましい。また、本乳化時の往復回数は、好ましくは１０～２０往復である。

[0053] 本発明において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を調製する方法としては、以下の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含む。

[0054] 例えば、上記の方法は、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成されるエマルジョン製剤を得ることを特徴とする、上記方法である。

[0055] この場合、上記水相の一部は、油性アジュバントを有する油相に対し、好ましくは１／１０～１／２倍量（ｖ／ｖ）であり、より好ましくは１／１０～２／５倍量（ｖ／ｖ）であり、さらに好ましくは１／１０～１／５倍量（ｖ／ｖ）であり、最も好ましくは１／５倍量（ｖ／ｖ）であり得る。

[0056] また、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を２回～１０回反復するものであり、好ましくは３～７回反復するものであり、より好ましくは５回反復するものであり得る。

[0057] また、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を調製する方法は、好ましくは以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を含む方法である。

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相を、油相に対して１／５倍量（ｖ／ｖ）ずつ段階的に合計５回注入し、混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）上記の注入毎に当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程。

[0058] ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を調製する方法は、より好ましくは以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含む方法である。

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相を、油相に対して１／５倍量（ｖ／ｖ）注入し、混合液を調製する工程、

（ｉｉ）上記の注入後に当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を１０回以上往復移動させる工程、

（ｉｉｉ）上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程をさらに４回繰り返す工程、及び

（ｉｖ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を１０回以上往復移動させる工程。

[0059] ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を調製する方法は、より好ましくは以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含む方法

である。

（ｉ）Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧに、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液をＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧに対して１／５倍量（ｖ／ｖ）注入し、混合液を調製する工程、

（ｉｉ）注入後に当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を１０回以上往復移動させる工程、

（ｉｉｉ）上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程をさらに４回繰り返す工程、及び

（ｉｖ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を１０回以上往復移動させる工程。

[0060] 上記のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのエマルジョン製剤を調製する方法は、さらにドロップテストにより得られたエマルジョンの型を確認する工程を含むのが好ましい。本発明において、ドロップテストは、得られたエマルジョンの１滴を水面上に滴下し、エマルジョンの分散の有無を確認するテストである。当該ドロップテストにおいて、エマルジョンがすぐに水に分散しない場合は「ｗａｔｅｒ　ｉｎ　ｏｉｌ（ｗ／ｏ）エマルジョン」、すぐに水に分散する場合は「ｏｉｌ　ｉｎ　ｗａｔｅｒ（ｏ／ｗ）エマルジョン」と判断することができる。本発明においてはｗ／ｏエマルジョンを得ることが必要である。

[0061] ＜装置＞

本発明において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドのエマルジョン製剤を調製するために好適に使用し得る装置は、例えば三方活栓に２本のシリンジと１つのシリンジコネクタを連結し、三方活栓に連結したシリンジコネクタにシリンジを連結した装置である。

[0062] 上記の通り、エマルジョン製剤は、用時調製されるものであり、また投与量が少ないため、大量生産には適さず、従って注射用シリンジ等の容量が数ｍＬのシリンジを使用して調製することが好適である。このようなエマルジョン製剤の調製のために、従来、２本のシリンジがコネクタを介して連結された装置を使用する方法が知られていた（国際公開第２００７／０８３７６

３号；特許第５６２９８８２号）。

[0063] 本発明のエマルジョン製剤は、上記従来の装置を使用して調製することも可能である。しかしながら、従来の装置では、プレ乳化はシリンジを振ることでしか行えないため、振り方や振る力によってその結果は変わりやすい。従って、プレ乳化として十分に振れたかどうかを時間で管理することは難しく、さらにプレ乳化状態が十分であるか否かの判断は調製者の主観に委ねられていた。そのため、調製者間で差が生じること、また同一調製者であっても調製毎に差が生じることが問題となることを見出した。

[0064] また、従来の装置を使用した場合、調製に時間がかかり、安定なｗ／ｏエマルジョンの調製に失敗することもあったため、用時調製を行う病院等の現場の負担が多大であり、改良が望まれることを見出した。

上記の問題点を解決するために、本発明者等は、エマルジョン製剤の用時調製のために連結された２本のシリンジに、三方活栓を用いて第３のシリンジを連結することで、上記の本発明の方法を簡便に実現できることを見出した。

[0065] 本発明の方法において好適に使用できる装置は、図１に示すように、第１のシリンジ１と、第２のシリンジ２とがシリンジコネクタ５を介して連結され、更に三方活栓４を介して第３のシリンジ３が連結された構成を有するものである。

[0066] すなわち、本発明は、ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤を調製する装置であって、

第２のシリンジ２と、

該第２のシリンジ２に連結したシリンジコネクタ５と、

該シリンジコネクタに連結した三方活栓４と、

該三方活栓４に更に連結した第１のシリンジ１及び第３のシリンジ３とから構成され、該第１のシリンジ１又は該第２のシリンジ２の内部に充填された油相中に、該第３のシリンジ３の内部に充填された水相を添加して、得られる混合液を該シリンジコネクタ５を介して該第１のシリンジ１及び該第

２のシリンジ２の間で往復移動させることによってｗ／ｏエマルジョン製剤を製造することを可能とする、上記装置を提供する。

[0067] 上記第１、第２及び第３のシリンジの容量は、特に限定するものではないが、例えばそれぞれ３ｍＬ以下のものとすることが、調製時の簡便な操作のために好適である。上記の通り、本発明のｗ／ｏエマルジョン製剤は、用時調製することが一般的であるため、投与前に調製すべき量は少なく、大量生産の必要性は低い。

また、上記本発明の装置において、上記混合液を通過させる上記シリンジコネクタ５の内径は０．８～１．７ｍｍの範囲であることが好適である。

[0068] このような装置を用いた調製方法では、

（１）従来のエマルジョン調製法では、プレ乳化はシリンジを振る操作により行っていたため、調製間で水相と油相の混合状態にばらつきが生じやすかったが、本乳化時だけでなく、プレ乳化時にも内径の細いシリンジコネクタを通すことで剪断力が働き、調製間で水相と油相の混合状態のばらつきが小さくなる、

（２）三方活栓を導入し流路の切り替えを可能にすることで、水相の溶液を分割して油相に押し込むことで、オイルリッチな条件を実現すると共に、シリンジプランジャーの往復移動によるプレ乳化が可能となる、

との効果を得ることができる。

[0069] 上記本発明の装置で用いるシリンジ筒部内部の断面積（図１及び２における破線Ｂ部分）は、好ましくはシリンジコネクタ内流路の断面積（図１及び２における破線Ａ部分）の２～１５０倍であり、より好ましくは２～５０倍である。シリンジ筒部内部の断面積がシリンジコネクタ内流路の断面積の２倍未満であると、上述した効果が十分に発揮されない場合があり、一方、１５０倍を超えるとシリンジや装置等にかかる負担が大きくなり過ぎるおそれがある。

[0070] より具体的には、シリンジの筒部内部の断面積は５０～５００ｍｍ^{2}程度とすればよく、シリンジコネクタ内流路の断面積は０．５～３０ｍｍ^{2}程度とす

ればよい。なお、シリンジ筒部やシリンジコネクタの断面の形状は特に制限されないが、負担が局所的にかかることを防ぐために円形や楕円形、或いは多角形である略円形が好ましく、円形が特に好ましい。また、当該規定における断面積は、シリンジの筒部内部の断面積と、シリンジコネクタ内に形成されている流路のうち最も細い部分の断面積とする。

[0071] 本発明で用いるシリンジコネクタは、端部においてシリンジと密着させる必要があるため、図１及び２に示すように、シリンジコネクタ端部６は中央部の流路から円錐状に断面積が広くなる構成としても良い。

[0072] シリンジコネクタの流路の断面形状を円形にする場合には、当該流路の内径を０．８～１．７ｍｍとすることが好ましく、０．９ｍｍ～１．５ｍｍがより好ましい。なお、当該流路の太さが均一でない場合は、流路の内径とは、最も細い部分における内径をいうものとする。また、シリンジコネクタの流路の長さは、１０～１５ｍｍが好ましい。このようなシリンジコネクタとして、例えばＧＰシリンジコネクタ（ニプロ）が挙げられる。

[0073] 上記の装置は、例えばエマルジョン製剤の投与前に医療関係者の手によって操作することが可能である。あるいはまた、上記の装置は、特許第５６２９８８２号等に開示されている当分野における技術を利用して、第１、第２及び第３のシリンジを固定する機構と、第１、第２及び第３のシリンジのプランジャーをそれぞれ押圧するための第１、第２及び第３の押圧機構と、これらの押圧機構を制御する機構とを備えるように構成された、自動化された装置とすることもできる。

[0074] また、本発明は、別の態様として、リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと、油性アジュバントと、上記の装置とを含む、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョンの調製用キットを提供することができる。

[0075] 本発明のエマルジョン製剤を投与する患者において治療の対象となる腫瘍は、抗腫瘍効果の増強効果を奏する範囲であれば特に制限されないが、好ましくはＣＴＬエピトープ４連結ペプチドが抗腫瘍効果を発揮する腫瘍であり

、より好ましくはＬｃｋ、ＷＨＳＣ２、ＳＡＲＴ２、ＳＡＲＴ３、ＭＲＰ３、ＵＢＥ２Ｖ、ＥＧＦＲ、又はＰＴＨｒＰ陽性の悪性腫瘍である。

[0076] 本発明のエマルジョン製剤を用いた治療の対象となる腫瘍としては、具体的には、脳腫瘍、頭頸部癌、消化器癌（食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臓癌、胆道癌（胆嚢・胆管癌など）、膵臓癌、小腸癌、大腸癌（結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌など）、消化管間質腫瘍など）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、乳癌、卵巣癌、子宮癌（子宮頸癌、子宮体癌など）、腎癌、尿路上皮癌（膀胱癌、腎盂癌、尿管癌）、前立腺癌、皮膚癌、原発不明癌等が挙げられる。なお、ここで癌には、原発巣のみならず、他の臓器（肝臓など）に転移した癌をも含む。このうち、抗腫瘍効果の観点から、頭頸部癌、消化器癌、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、皮膚癌が好ましく、消化器癌、肺癌、尿路上皮癌、皮膚癌がより好ましく、肺癌、尿路上皮癌が特に好ましい。また、本発明の抗腫瘍剤は、腫瘍を外科的に摘出した後に再発防止のために行われる術後補助化学療法に用いるものであっても、腫瘍を外科的に摘出するために事前行われる術前補助化学療法であってもよい。

[0077] また、本発明において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョン製剤は、有効成分としてのＣＴＬエピトープ４連結ペプチドに加えて、必要に応じて薬学的担体を配合することが可能であり、注射剤として投与することができる。

[0078] 薬学的担体としては、通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば、賦形剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、ｐＨ調節剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、着色剤、矯味・矯臭剤等の製剤添加物を用いることもできる。

[0079] 賦形剤としては、乳糖、白糖、Ｄ－マンニトール、トレハロース等が挙げられる。

[0080] 溶剤としては、水、プロピレングリコール、生理食塩液等が挙げられる。

[0081] 溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、エタノール、α－シクロデキストリン、マクロゴール４００、ポリソルベート８０等が挙げられる。

[0082] 懸濁化剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等が挙げられる。

[0083] 等張化剤としては、塩化ナトリウム、グリセリン、塩化カリウム等が挙げられる。

[0084] ｐＨ調節剤としては、クエン酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、塩酸等が挙げられる。

[0085] 緩衝剤としては、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等が挙げられる。

[0086] 抗酸化剤としては、亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸、天然ビタミンＥ、メチオニン等が挙げられる。

[0087] 本発明のエマルジョン製剤は、注射として、好ましくは静脈内注射として投与される。投与単位形態中に配合されるべきＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの量は、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド１種あたり１～９ｍｇが好ましく、２～４．５ｍｇがより好ましく、３ｍｇが最も好ましい。

[0088] 上記投与形態を有するＣＴＬエピトープ４連結ペプチド１種あたりの１日あたりの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、１～２７ｍｇ／ｂｏｄｙが好ましく、２～１２ｍｇ／ｂｏｄｙがより好ましく、３～９ｍｇ／ｂｏｄｙがより好ましく、これを１日１回又は２～３回程度に分けて投与するのが好ましい。

[0089] 本発明のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドの投与スケジュールは、癌種や病期等に応じて適宜選択しうる。

当該投与スケジュールは、１週間に１回投与する工程を３回（１日目、８日目、１５日目に１日１回）繰り返す計２１日間を１サイクルとした投与スケジュールが好ましい。また、３サイクル目以降は、１日目に投与し２０日間の休薬を行う（３週間に１回投与する方法）計２１日間を１サイクルとした投与スケジュールが好ましい。

実施例

[0090] 以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、下記の実施例は特定の構成の装置を使用して行ったものであり、本発明はこれらによって何

ら限定されるものではない。

[0091] なお、以下の実施例において、特段の記載が無い場合、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液は、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドとして配列番号１９、配列番号２５及び配列番号３３からなる３種のペプチドをそれぞれ３ｍｇ／ｍＬで含有する溶液である。

[0092] ［実施例１　プレ乳化における水相と油相の混合時における分割回数の検討］

ＧＰシリンジコネクタ（内径：１．０ｍｍ、流路の長さ：１５ｍｍ、ニプロ株式会社）を用いてｗ／ｏエマルジョンを調製した。調製は、ＧＰシリンジコネクタの取扱説明書に記載された標準的なエマルジョン調製法を用いた。

[0093] 具体的には、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液及びＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧ（ＳＥＰＰＩＣ）をそれぞれ１ｍＬずつ充填したシリンジ（Ｉｎｊｅｋｔ　Ｓｙｒｉｎｇｅ　２　ｍＬ　Ｌｕｅｒ　Ｌｏｃｋ，Ｂ　Ｂｒａｕｎ）を準備し、空気が混入しないようにＧＰシリンジコネクタで接続して調製操作を行った。ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液（水相）の全量（分割無し）をＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧ（油相）側のシリンジに押し込み、シリンジを激しく振って（５～１０分程度）プレ乳化した。プレ乳化の終点は、液中に明瞭な水滴・油滴を認めず、均一な白濁液になった時点とした。

[0094] その後、本乳化として、シリンジのプランジャーを交互に押して６０往復することでｗ／ｏエマルジョンを調製した。エマルジョンの調製は５回行い、ドロップテストによりｗ／ｏエマルジョンが得られた割合を判定した。調製したエマルジョンが、容易に水に分散しない場合は「ｗ／ｏエマルジョン」が得られ、容易に水に分散した場合は「ｏ／ｗエマルジョン」が得られたと判定した。

[0095] その結果、表２に示すように、標準的なエマルジョン調製法において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液のｗ／ｏエマルジョンが得られた割合は

０％であり、標準的なエマルジョン調製法では、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液のｗ／ｏエマルジョンの調製は著しく困難であることを見出した。

[0096] 上記課題を解決するために、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液（水相）とＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧ（油相）とを混合する際に、水相を分割して混合する方法（分割調製法）を検討した。具体的には、上記の標準的なエマルジョン調製法において、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液（水相）を３分割又は５分割してＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧ（油相）側のシリンジに押し込み、シリンジを激しく振ってプレ乳化した。プレ乳化の終点は、液中に明瞭な水滴・油滴を認めず、均一な白濁液になった時点とした（プレ乳化１回あたりのシリンジを激しく振る時間は、５～１０分程度）。

[0097] その後、本乳化として、シリンジのプランジャーを交互に押して６０往復することでｗ／ｏエマルジョンを調製した。エマルジョンの調製は５回行い、ドロップテストによりｗ／ｏエマルジョンが得られた割合を判定した。

[0098] [表2]

分割の有無	分割無し	３分割	５分割
１回当たりの水相の油相への押し込み量(mL)	1	0.33	0.2
w/o エマルジョンが得られた割合(%)	0	20	100

[0099] 表２に示すように、プレ乳化時にＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液（水相）を３分割して調製することにより、分割無しの場合に比べ、ｗ／ｏエマルジョンが得られた割合が向上し、５分割して調製することにより、ｗ／ｏエマルジョンが得られる割合が著しく向上した。ｗ／ｏエマルジョンを得るためには水相の分割回数を増やして油相に注入する、すなわちオイルリッチな条件で調製するのが望ましいことが示された。

[0100] ［実施例２　ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液の分割注入によるエマル

ジョン調製］

上記実施例１で得られた５分割してＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液を油相に注入する方法において、エマルジョンの調製者及び実施回数を増やし、ｗ／ｏエマルジョンが得られた割合を検討した。また、プレ乳化時の調製間での差を低減するために、シリンジを激しく振ってプレ乳化する操作をＹＳ－８Ｄ（ヤヨイ）を用いて行った。その結果、表３に示すように、調製者を増やし手動でプレ乳化を行った場合、７４％の割合でｗ／ｏエマルジョンが得られ、機械でプレ乳化を行った場合、６３％の割合でｗ／ｏエマルジョンが得られた。エマルジョンの調製者及び実施回数を増やした際に一定の割合でｗ／ｏエマルジョンが得られない原因としては、プレ乳化時のシリンジを激しく振る操作は、「均一な白濁液になって時点」を終点としており、その判断は調製者の主観に委ねられているため、得られたエマルジョンは調製者の振り方や振る力にばらつきが生じることが一因であると考えられた。

[0101] [表3]

	実施回数(回)	w/o エマルジョンが得られた回数(回)	w/o エマルジョンが得られた割合(%)
プレ乳化手動	19	14	74
プレ乳化自動	43	27	63

[0102] ［実施例３　三方活栓を用いたエマルジョン調製法］

実施例１に示した通り、プレ乳化はオイルリッチな条件で調製するのが望ましいことが示された。標準的なエマルジョン調製法や分割調製法では、オイルリッチな状況を作り出したとしても、プレ乳化はシリンジを振ることでしか行えないため、先に述べたように振り方や振る力によってその結果は変わりやすい。また、分割調製法において、機械を用いて自動でプレ乳化を行った場合においてもｗ／ｏエマルジョンが得られた割合は６０％程度であり、さらなる改善を行うことが望ましいことが確認できた。

上記の問題点を解決し、ｗ／ｏエマルジョンが得られる割合を向上させるために、三方活栓を用いたエマルジョン調製法を考案した。

[0103] 三方活栓を用いたエマルジョン調製法は、空の第１のシリンジ１、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧを１ｍＬ充填した第２のシリンジ２、及びＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液を１ｍＬ充填した第３のシリンジ３（いずれもＩｎｊｅｋｔ　Ｓｙｒｉｎｇｅ　２　ｍＬ　Ｌｕｅｒ　Ｌｏｃｋ，Ｂ　Ｂｒａｕｎを使用）を準備し、図１に示すように、三方活栓４（ＴＳ－ＴＲ２Ｋ，テルモ）の水平方向に空の第１のシリンジ１を接続し、同じく水平方向に、シリンジコネクタ５（ＧＰシリンジコネクタ，ニプロ株式会社）を介してＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧを充填した第２のシリンジ２を直接接続し、第２のシリンジ２のＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧを第１のシリンジ１に移動させ、垂直方向にＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液を充填した第３のシリンジ３を接続した装置を用いた。

[0104] プレ乳化は、三方活栓４のコックを図２のように操作して、第１のシリンジ１及び第３のシリンジ３間で液体の移動が可能となる状態にし、第３のシリンジ３に充填されたＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液０．２ｍＬを、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧが充填されている第１のシリンジ１内に押し込んだ。

[0105] 次いで、コックを図１の状態となるように操作して、第１のシリンジ１及び第２のシリンジ２の間で液体の移動が可能となる状態にし、第１のシリンジ１及び第２のシリンジ２のプランジャーを交互に押し込んで、０．２ｍＬのＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液と１ｍＬのＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧの混合液を、シリンジコネクタ５を介して第１のシリンジ１と第２のシリンジ２との間を水平方向に往復移動させる操作を行った（プレ乳化）。プレ乳化のために混合液のシリンジ間の往復移動は２０往復とした。

[0106] 上記の操作を、第３のシリンジ３からＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液０．２ｍＬずつを追加して第１のシリンジ１内に押し込み、更に３回繰り返した。第３のシリンジ３からＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液０．２ｍＬずつを追加して第１のシリンジ１内に押し込む５回目の操作の後は、Ｃ

ＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液と１ｍＬのＭｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５１　ＶＧの混合液を、シリンジコネクタ５を介して第１のシリンジ１と第２のシリンジ２との間を水平方向に往復移動させる操作を６０往復行った（本乳化）。ｗ／ｏエマルジョンの調製成否は、ドロップテストにより判断した。得られたエマルジョンは、ドロップテストによってｗ／ｏエマルジョンであることが確認できた。

[0107] ［実施例４　プレ乳化時のシリンジ往復回数の検討］

三方活栓を用いたエマルジョン調製法のさらなる最適化のために、まずはプレ乳化の混合回数を検討した。三方活栓を用いたエマルジョン調製法は、実施例３と同様の装置を用いて、プレ乳化時のシリンジを往復させる回数以外は、実施例３と同様の方法で実施した。

[0108] 上記の方法において、プレ乳化１回当たりのシリンジを往復させる回数を１０、１５又は２０往復でエマルジョン調製を行った。

[0109] プレ乳化時のシリンジを往復させる回数が１０～２０往復の範囲において、エマルジョンは容易に水に分散せず、ｗ／ｏエマルジョンが得られた。以上の結果から、標準的なエマルジョン調製法において、シリンジを激しく振ることにより行っていたプレ乳化に比べ、三方活栓を用いて、プレ乳化時にシリンジを往復させることにより作業効率が改善することが確認できた。

[0110] ［実施例５　本乳化時のシリンジ往復回数の検討］

実施例４において、プレ乳化を１０往復する条件において、本乳化時のシリンジを往復させる回数を検討した。すなわち、本乳化時のシリンジを往復させる回数を１０、２０又は３０往復で検討した。また、比較のために、分割調製法（実施例１において、プレ乳化時の分割回数を５分割の条件で実施）における本乳化時のシリンジを往復させる回数の検討も行った。

ｗ／ｏエマルジョンの調製可否は、ドロップテストを行うことにより判断した。また、それぞれの混合回数にて調製したエマルジョンの粒子径を、湿式・乾式粒度分布測定装置（レーザ回折散乱法）ＬＳ　１３　３２０（ベックマン・コールター株式会社）で測定した。

[0111] 測定条件を以下に示す。

使用モジュール：ユニバーサルリキッドモジュール（湿式粒度分布測定）

分散媒：Ｍｉｎｅｒａｌ　Ｏｉｌ　Ｌｉｇｈｔ　Ｗｈｉｔｅ

分散媒屈折率：１．４５

超音波分散：無し

測定試料調製法：エマルジョン１滴を１０ｍＬのＭｉｎｅｒａｌ　ｏｉｌ　Ｌｉｇｈｔ　Ｗｈｉｔｅ中に一次分散させた。

[0112] 三方活栓を用いたエマルジョン調製法において、本乳化時にシリンジを往復させる回数に関わらず、容易に水に分散することなく、ｗ／ｏエマルジョンが得られた。また、分割調製法では、本乳化時のシリンジを往復させる回数を６０往復行った方法のみドロップテストを行い、ｗ／ｏエマルジョンが得られたことを確認した。

[0113] 得られたエマルジョンの粒子径は、図３に示すように、分割調製法では、本乳化時のシリンジを往復させる回数が２０往復以下の場合、粒子径にばらつきが見られたのに対し、シリンジを往復させる回数が３０往復以上で粒子径が均一かつ同程度になることを確認した。一方、図４に示すように、三方活栓を用いたエマルジョン調製法では、１０往復以上で粒子径が均一かつ同程度となった。

[0114] ［実施例６　三方活栓を用いたエマルジョン調製法における再現性検討］

実施例５の三方活栓を用いたエマルジョン調製法において、本乳化時のシリンジの往復回数を２０往復に設定した条件で、エマルジョン調製を行い、得られたエマルジョンの粒子径及び粘性を測定し、調製間における再現性を検討した。

[0115] 粒子径の測定法は実施例５と同様の方法で実施し、粘度の測定は以下の条件で実施した。

使用機器：Ｅ型粘度計（東京計器）

Ｃｏｎｅ：1°３４’

サンプル量：約１ｍＬ

測定温度：３０℃

回転数：１０ｒｐｍ

[0116] 図５に示すように、３回の実施において得られたエマルジョンの粒子径は、均一かつ同程度であり、粒子径は１～３μｍの範囲内であった。また、表４に示すように、３回の実施において得られたエマルジョンの粘度も大きなばらつきは見られなかった。

[0117] [表4]

	１回目	２回目	３回目	平均	S.D.
粘度 (mPa･s)	305.4	276.2	357.1	312.9	41.0

[0118] ［実施例７　三方活栓を用いたエマルジョン調製法］

実施例６の条件において、エマルジョンの調製者及び調製回数を増やし、ｗ／ｏエマルジョンが得られた割合を検討した。その結果、表５に示すように９８％の割合でｗ／ｏエマルジョンが得られた。

[0119] [表5]

実施回数(回)	w/o エマルジョンが得られた回数(回)	w/o エマルジョンが得られた割合(%)
52	51	98

[0120] 以上の結果より、標準的なエマルジョン調製法では、本発明の３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含むｗ／ｏエマルジョン製剤を得ることが著しく困難であったのに対し、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液（水相）と油性アジュバントを含有する油相を混合する際に、水相を分割して注入すること（分割調製法）により、ｗ／ｏエマルジョンを得られることが示された。さらに、三方活栓を用いたエマルジョン調製法により、より高い割合でｗ／ｏエマルジョンが得られ、さらに標準的なエマルジョン調製法や分割調製法に比べ、少ない労力かつ短時間でｗ／ｏエマルジョンが得られること

が示された。

符号の説明

[0121] 1　第１のシリンジ

2　第２のシリンジ

3　第３のシリンジ

4　三方活栓

5　シリンジコネクタ

6　シリンジコネクタ端部

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを水相中に含有する、油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤であって、３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する、上記製剤。

[請求項2] ３種のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと油性アジュバントとを含有する、請求項１記載の油中水型エマルジョン製剤。

[請求項3] ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相と油性アジュバントを含有する油相とを混合して乳化して得られる、請求項１又は２記載の油中水型エマルジョン製剤であって、当該ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相が、それぞれ下記一般式（ＩＩ）で表される１種類のペプチドと、（ＩＩＩ）で表される１種類のペプチドと、（ＩＩＩ）で表される１種類のペプチドとで構成される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチド：

Ａ－（Ｌ）－Ｂ－（Ｌ）－Ｃ－（Ｌ）－ＰＥＰ２　（Ｉ）、

Ｄ－（Ｌ）－Ｅ－（Ｌ）－Ｆ－（Ｌ）－ＰＥＰ４　（ＩＩ）及び

Ｇ－（Ｌ）－Ｈ－（Ｌ）－Ｉ－（Ｌ）－ＰＥＰ１０　（ＩＩＩ）

（一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、

（Ｌ）は、リンカーを示し、

ＰＥＰ２は配列番号２で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

ＰＥＰ４は配列番号４で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

ＰＥＰ１０は配列番号１０で表されるＣＴＬエピトープペプチドを示し、

Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々配列番号１で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１）、配列番号５で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ５）、配列番号６で表されるＣ

ＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ６）、配列番号７で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ７）、配列番号８で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ８）、配列番号９で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ９）、配列番号１３で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１３）、配列番号１５で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１５）及び配列番号１８で表されるＣＴＬエピトープペプチド（ＰＥＰ１８）からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、

一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）で表されるＣＴＬエピトープ４連結ペプチドは親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい。）

を含む溶液である、上記エマルジョン製剤。

[請求項4] 上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、（Ｌ）はリンカーを示し、Ａ、Ｂ及びＣは、各々ＰＥＰ７、ＰＥＰ８及びＰＥＰ１３からなる群から相異なって選択され（ＡがＰＥＰ７でありＢがＰＥＰ８である組み合わせを除く）、Ｄ、Ｅ及びＦは、各々ＰＥＰ５、ＰＥＰ６及びＰＥＰ９からなる群から相異なって選択され、Ｇ、Ｈ及びＩは、各々ＰＥＰ１、ＰＥＰ１５及びＰＥＰ１８からなる群から相異なって選択され、一般式（Ｉ）で表されるペプチドは親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、請求項３記載のエマルジョン製剤。

[請求項5] 上記一般式（Ｉ）で表されるペプチドが、以下からなる群：

・ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；

・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ２；及び
・ＰＥＰ１３－（Ｌ）－ＰＥＰ８－（Ｌ）－ＰＥＰ７－（Ｌ）－ＰＥＰ２；
から選択され、上記一般式（ＩＩ）で表されるペプチドが、以下からなる群：
・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ４；及び
・ＰＥＰ９－（Ｌ）－ＰＥＰ６－（Ｌ）－ＰＥＰ５－（Ｌ）－ＰＥＰ４；
から選択され、上記一般式（ＩＩＩ）で表されるペプチドが、以下からなる群：
・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；
・ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；及び

・ＰＥＰ１８－（Ｌ）－ＰＥＰ１５－（Ｌ）－ＰＥＰ１－（Ｌ）－ＰＥＰ１０；

から選択され、一般式（Ｉ）で表されるペプチドはＮ末端に親水性アミノ酸からなるペプチド配列を有していてもよい、請求項３又は４記載のエマルジョン製剤。

[請求項6] 上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）中、（Ｌ）がアルギニンダイマーであって、親水性アミノ酸からなるペプチド配列がアルギニンテトラマーである、請求項３～５のいずれか１項記載のエマルジョン製剤。

[請求項7] 上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）で表される３種類のＣＴＬエピトープ４連結ペプチドが、ＲＲＲＲ－ＰＥＰ７－ＲＲ－ＰＥＰ１３－ＲＲ－ＰＥＰ８－ＲＲ－ＰＥＰ２（配列番号１９）、ＰＥＰ５－ＲＲ－ＰＥＰ９－ＲＲ－ＰＥＰ６－ＲＲ－ＰＥＰ４（配列番号２５）、及びＰＥＰ１５－ＲＲ－ＰＥＰ１８－ＲＲ－ＰＥＰ１－ＲＲ－ＰＥＰ１０（配列番号３３）である、請求項３～６のいずれか１項記載のエマルジョン製剤。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか１項記載のエマルジョン製剤を調製する方法であって、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成されるエマルジョン製剤を得ることを特徴とする、上記方法。

[請求項9] 上記水相の一部が、油性アジュバントを有する油相に対し、１／１０～１／２倍量（ｖ／ｖ）である、請求項８記載の方法。

[請求項10] ペプチドを含有する油中水型エマルジョン製剤を調製する装置であって、

第２のシリンジ２と、

該第２のシリンジ２に連結したシリンジコネクタ５と、

該シリンジコネクタ５に連結した三方活栓４と、

該三方活栓４に更に連結した第１のシリンジ１及び第３のシリンジ３と

から構成され、該第１のシリンジ１又は該第２のシリンジ２の内部に充填された油相中に、該第３のシリンジ３の内部に充填された水相を添加して、得られる混合液を該シリンジコネクタ５を介して該第１のシリンジ１及び該第２のシリンジ２の間で往復移動させることによって油中水型エマルジョン製剤を製造することを可能とする、上記装置。

[請求項11] 上記第１、第２及び第３のシリンジの容量がそれぞれ３ｍＬ以下である、請求項１０記載の装置。

[請求項12] 上記混合液を通過させる上記シリンジコネクタ５の内径が０．８～１．７ｍｍの範囲である、請求項１０又は１１記載の装置。

[請求項13] リンカーを介して連結された４つのＣＴＬエピトープペプチドを含むＣＴＬエピトープ４連結ペプチドと、油性アジュバントと、請求項１０～１２のいずれか１項記載の装置とを含む、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有するｗ／ｏエマルジョンの調製用キット。

[請求項14] 請求項１～７のいずれか１項記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤を患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法。

[請求項15] 腫瘍の治療に使用するための、請求項１～７のいずれか１項記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤。

[請求項16] 請求項１～７のいずれか１項記載の油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョ

ン製剤を製造するための、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチド溶液の使用。

[請求項17] 腫瘍の治療に使用される油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤を用時調製するための、請求項１０～１２のいずれか１項記載の装置、又は請求項１３記載のキット。

[請求項18] 油中水型（ｗ／ｏ）エマルジョン製剤が、請求項１～７のいずれか１項記載の製剤である、請求項１０～１２のいずれか１項記載の装置、又は請求項１３記載のキット。

[請求項19] （ａ）以下の（ｉ）及び（ｉｉ）の工程：

（ｉ）油性アジュバントを含有する油相に、ＣＴＬエピトープ４連結ペプチドを含有する水相の一部を注入して混合液を調製する工程、及び

（ｉｉ）当該混合液を、シリンジコネクタを介して連結したシリンジ間を往復移動させる工程、

を含み、上記（ｉ）及び（ｉｉ）の工程を反復して、上記油相と上記水相の全量とから構成される、請求項１～７のいずれか１項記載のエマルジョン製剤を調製すること、及び

（ｂ）得られたエマルジョン製剤を腫瘍を有する患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法。