

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-530695
(P2005-530695A)

(43) 公表日 平成17年10月13日(2005.10.13)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 48/00
A61K 9/06
A61K 9/08
A61K 9/10
A61K 9/14

F 1

A 61 K 48/00
A 61 K 9/06
A 61 K 9/08
A 61 K 9/10
A 61 K 9/14

テーマコード(参考)

4 C 0 5 3
4 C 0 7 6
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-569798 (P2003-569798)	(71) 出願人	500166471 ザイコス インク.
(86) (22) 出願日	平成15年2月18日 (2003.2.18)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レ キシントン ハートウェル アベニュー 44
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月15日 (2004.10.15)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/004937	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(87) 國際公開番号	W02003/070905	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 國際公開日	平成15年8月28日 (2003.8.28)	(72) 発明者	バーマン シクハ ピー. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベ ッドフォード マリオン ロード 31
(31) 優先権主張番号	60/357,542		
(32) 優先日	平成14年2月15日 (2002.2.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性物質を細胞内に導入するエレクトロポレーション法

(57) 【要約】

本発明は、生理活性物質を細胞内に導入するための組成物および方法を提供する。生理活性物質を送達媒体と共に提供し、細胞にエレクトロポレーションを行うことで、生理活性物質が細胞内に導入される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生理活性物質を生細胞内に導入する方法であって、
生理活性物質を含む送達媒体に生細胞を接触させる段階；および
細胞内への生理活性物質の取り込みを可能にする条件下で、およびそうするのに十分な
時間、エレクトロポレーションにより細胞に電界を印加する段階
を含み、該送達媒体は微粒子またはヒドロゲルであって、該微粒子はリポソーム内に封入
されていない、方法。

【請求項 2】

生理活性物質が核酸である、請求項1記載の方法。 10

【請求項 3】

核酸がオリゴヌクレオチドである、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

核酸がプラスミドDNAである、請求項2記載の物品。

【請求項 5】

核酸がポリペプチドをコードし、細胞によって該ポリペプチドが産生される、請求項2
記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも4週間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度
に発現される、請求項5記載の方法。 20

【請求項 7】

少なくとも12週間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度
に発現される、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも12週間後に、細胞によって産生されるポリペプチドの発現を検出する段階を
含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

生理活性物質がペプチド核酸である、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

生理活性物質がポリペプチドである、請求項1記載の方法。 30

【請求項 11】

細胞に対する接触段階および印加段階がインビトロで行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

細胞が生きた動物内に含まれ、電極を動物の組織に使用する段階を含む、請求項1記載
の方法。

【請求項 13】

組織が筋組織である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

核酸がポリペプチドをコードし、細胞によって該ポリペプチドが産生される、請求項12
記載の方法。 40

【請求項 15】

少なくとも4週間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度
に発現される、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも12週間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度
に発現される、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも12週間後に、細胞によって産生されるポリペプチドの発現を検出する段階を
含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

50

動物の体内でポリペプチドに対する免疫応答が生じる、請求項14記載の方法。

【請求項 19】

免疫応答が治療的免疫応答である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

免疫応答が予防的免疫応答である、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

送達媒体および生理活性物質を含む水溶液を動物の組織内に注射する段階を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 22】

組織が筋組織である、請求項21記載の方法。

10

【請求項 23】

送達媒体が微粒子である、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

微粒子が合成重合体を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

合成重合体がラクチド-グリコリド共重合体を含む、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

微粒子が、乳酸、グリコール酸、乳酸-グリコール酸、カプロン酸、トリメチレンカーボネート、またはそれらの組み合わせを含む生分解性結合を有する、請求項23記載の方法。

20

【請求項 27】

微粒子が直径10 μm未満である、請求項23記載の方法。

【請求項 28】

微粒子が少なくとも直径1 μmである、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

微粒子が陽イオン性脂質を含まない、請求項23記載の方法。

【請求項 30】

送達媒体が水溶液中に存在する、請求項1記載の方法。

【請求項 31】

水溶液が賦形剤を含む、請求項29記載の方法。

30

【請求項 32】

賦形剤が、細胞溶解性ペプチド、重合体、脂質、アジュバント、または生物学的利用能促進剤である、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

送達媒体がヒドロゲルである、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般に、生理活性物質を細胞内に導入する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

発明の背景

核酸および他の外来物質を生物の細胞または組織内に導入するために、遺伝子銃移入、ウイルスを介する遺伝子移入、「裸の」DNAの注入（米国特許第5,580,859号）、陽イオン性リポソームによる送達（米国特許第5,264,618号）、および微粒子による送達（米国特許第5,783,567号）を含む様々な技法が用いられている。遺伝子移入のさらなる非ウイルス法には、リポフェクション/リポソーム融合法（(1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. 84:74 13-7417）、および溶液中で核酸と混合され筋組織に送達される重合体の使用（米国特許第6,040,295号）が含まれる。

50

【 0 0 0 3 】

核酸等の外来物質を細胞内に導入するためには、細胞透過処理のための電気パルスの使用も用いられている (Somiarilら (2000) Molecular Therapy 2:178-87; Mathiesen (1999) Gene Therapy 6:508-514; 米国特許第6,261,281号)。この過程は電気的透過処理とも称され、これにより例えば大きくかつ高電荷のポリヌクレオチド分子が細胞質に効率的に取り込まれ得る。調節した電気パルスを細胞に印加することにより細胞膜に「孔」が開き、関心対照のポリヌクレオチドおよび他の高分子はそこから細胞の内部に向けて濃度勾配を通過すると考えられる。最初の透過処理後やがて孔は分子を封入したまま再度閉じ、次にこの分子は生物学的効果を発揮し得る。

【発明の開示】

10

【 0 0 0 4 】**発明の概要**

本発明は、送達媒体中に含まれる生理活性物質がエレクトロポレーションにより細胞内に効率的に導入され得るという発見に基づく。本明細書に記載の方法により、細胞内に導入された後の生理活性物質の活性が増加および/または長期化し得る。

【 0 0 0 5 】

1つの局面において、本発明は、生理活性物質を含む送達媒体に生細胞を接触させる段階；および細胞内への生理活性物質の取り込みを可能にする条件下で、およびそうするのに十分な時間、エレクトロポレーションにより細胞に電界を印加する段階を含み、送達媒体は微粒子またはヒドロゲルであって、微粒子はリポソーム内に封入されていない、生理活性物質を生細胞内に導入する方法を扱う。

20

【 0 0 0 6 】

別の局面において、本発明は、生理活性物質を含む送達媒体に生細胞を接触させる段階；細胞内への生理活性物質の取り込みを可能にする条件下で、およびそうするのに十分な時間、エレクトロポレーションにより細胞に電界を印加する段階を含む、生理活性物質を生細胞内に導入する方法を扱う。

【 0 0 0 7 】

「生理活性物質」とは、細胞に対して生物学的効果を有する任意の物質である。この用語には、例えば、(任意の長さの)ポリペプチド、(任意の長さの)核酸、高分子、小分子、炭水化物、脂質、および任意の種類の薬剤が含まれる。

30

【 0 0 0 8 】

「エレクトロポレーション」とは、細胞膜の透過処理をもたらす、個人による細胞への電気パルスの印加を指す。エレクトロポレーションは自然現象を含まない。「エレクトロポレーション」および「電気的透過処理」という用語は、互換的に用いられる。調節した電気パルスを細胞に印加することにより細胞膜に「孔」が開き、そこから生理活性物質が細胞の内部に向けて濃度勾配を通過し得ると考えられる。やがて孔は細胞内に生物活性物質を封入したまま再度閉じ、次にこの物質は生物学的効果を発揮する(例えば、米国特許第5,993,434号および第6,096,020号を参照のこと)。エレクトロポレーションにより生じた孔は、直径約20~120 nmの大きさの範囲であると考えられる (Changら (1990) Biophys. J. 1990 58:1-12)。

40

【 0 0 0 9 】

「送達媒体」とは、生理活性物質の細胞内への導入を促進する組成物を指す。「送達媒体」は生理活性物質の細胞内への導入を促進し、これにより、送達媒体の非存在下で細胞を生理活性物質と接触させた場合の生理活性物質の活性と比較して、その活性が増加および/または長期化する。したがって、「送達媒体」は水または他の生理的緩衝液を指さない。送達媒体は一般に、生理活性物質を含むか(例えば、生理活性物質を封入するまたは埋め込む)、生理活性物質と物理的に会合するか(例えば、生理活性物質と共に水溶液中に存在する)、または生理活性物質と複合体を形成する(例えば、生理活性物質と共有結合または非共有結合的複合体を形成する)。送達媒体の例には、微粒子、マイクロスフェア、マイクロカプセル、ヒドロゲル、デポー剤、リポソーム、懸濁液、コロイド、乳濁液

50

、分散系、ペレット、移植片、ポンプ、粒子状物質、重合体ネットワーク、免疫刺激複合体（ISCOM）、ならびにウイルスおよび細菌等の微生物が含まれる。

【0010】

本明細書に記載の方法で使用する生理活性物質は、核酸（例えば、DNA分子、またはRNAもしくはsiRNA等のRNA分子）、ウイルスDNA、オリゴヌクレオチド、もしくはプラスミドDNA、またはペプチド核酸であってよい。核酸は状況に応じてポリペプチドをコードし得り、本明細書に記載の方法により細胞によってそのポリペプチドが産生され得る。

【0011】

生理活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様においては、この方法により、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、もしくはそれ以上の週、または3、6、9、もしくは12ヶ月間、または1年間もしくはそれ以上の期間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度に発現される。これらの任意の時点で検出されるポリペプチドのレベルは、例えば、少なくとも10 pg、0.1 ng、1 ng、10 ng、100 ng、1 μg、またはそれ以上のポリペプチドであってよい。

10

【0012】

生理活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様において、この方法は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、もしくはそれ以上の週、または3、6、9、もしくは12ヶ月間、または1年間もしくはそれ以上の期間の後に、細胞によって産生されるポリペプチドの発現を検出する段階を含み得る。本明細書に記載の方法を実施することにより核酸の発現が予想外に長期化し得るため、コードされるポリペプチドは、核酸を始めに投与してから予想外に長期にわたって検出され得る。

20

【0013】

本明細書に記載の諸方法で使用する生理活性物質は、ポリペプチドであってよい。

【0014】

本明細書に記載する方法の接触段階および印加段階は、細胞もしくは細胞集団または組織もしくは器官に対してインビトロまたはインビボで行うことができる。インビトロで該段階が行われる態様において、細胞もしくは細胞集団または組織もしくは器官は、生理活性物質の導入後に動物へ導入することができる。送達の方法には治療のエクスピボでの方法が含まれる。

30

【0015】

1つの態様において、細胞もしくは細胞集団または組織もしくは器官は生きた動物、例えばヒト、非ヒト霊長動物、イヌ、ブタ、マウス、またはラット内に含まれ、本方法は電極を動物の組織、例えば筋組織に使用する段階を含む。1つの態様において、細胞は生きた植物内に含まれる。生理活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様において、この方法により、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、もしくはそれ以上の週、または3、6、9、もしくは12ヶ月間、または1年間もしくはそれ以上の期間にわたって、細胞によって産生されるポリペプチドが検出可能な程度に発現される。ポリペプチドは、例えば、動物の血清、体液（例えば、唾液、精液、涙、汗、尿）、または固形組織内に検出され得る。ポリペプチドが血清内に検出される場合の態様において、検出されるレベルは、例えば、少なくとも10 pg、0.1 ng、1 ng、10 ng、100 ng、1 μg、またはそれ以上のポリペプチドであってよい。

40

【0016】

生理活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様において、この方法は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、もしくはそれ以上の週、または3、6、9、もしくは12ヶ月間、または1年間もしくはそれ以上の期間の後に、動物の細胞によって産生されるポリペプチドの発現を検出する段階を含み得る。本明細書に記載の方法を実施することにより核酸の発現が予想外に長期化し得るため、コードされるポリペプチドは、核酸を動物に始めに投与してから予想外に

50

長期にわたって検出され得る。

【0017】

本明細書に記載の方法により、動物内でポリペプチドに対する免疫応答が生じ得る。1つの例において、免疫応答は治療的免疫応答である。別の例において、免疫応答は予防的免疫応答である。免疫応答には、NK細胞、マクロファージ、B細胞、T細胞、抗体産生、ならびにインターロイキンおよび/またはサイトカイン産生の活性化が含まれ得る。

【0018】

本明細書に記載の方法は、送達媒体および生理活性物質を含む水溶液を、動物の腫瘍、例えば筋組織等の組織、または器官内に注射する段階を含み得る。

【0019】

本明細書に記載の諸方法で使用する送達媒体は、微粒子であつてよい。

【0020】

送達媒体が微粒子である場合の態様において、微粒子は合成重合体から構成され得る。例えば、合成重合体はラクチド-グリコリド共重合体であつてよい。他の例では、微粒子は、乳酸、グリコール酸、乳酸-グリコール酸、カプロン酸、トリメチレンカーボネート、またはそれらの組み合わせを含む生分解性結合を含む。

【0021】

送達媒体が微粒子である場合の態様において、微粒子は直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満であつてよい。他の態様では、微粒子は少なくとも 500 nm 、 600 nm 、 700 nm 、 800 nm 、 900 nm 、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、またはそれ以上の直径である。エレクトロポレーションによって細胞膜に生じると考えられる孔の大きさの範囲から見て、エレクトロポレーションにより、例えば $1\text{ }\mu\text{m}$ を超える直径を有する微粒子内に含まれる生物活性の送達が増加しある/または活性が長期化することは予想外であった。

【0022】

送達媒体が微粒子である場合のいくつかの態様において、微粒子は陽性脂質を含まない。

【0023】

本明細書に記載の諸方法で使用する送達媒体は、水溶液中に存在し得る。いくつかの態様において、水溶液は賦形剤を含む。賦形剤の例には、細胞溶解性ペプチド、重合体、脂質、アジュバント、および生物学的利用能促進剤が含まれる。

【0024】

本明細書に記載の諸方法で使用する送達媒体は、ヒドロゲルであつてよい。例えば、本方法は国際公開公報第02/057424号に記載されるヒドロゲル組成物の使用を含む。

【0025】

本明細書に記載の生理活性物質（例えば、核酸またはポリペプチド）は、本明細書に記載の諸方法（例えば生理活性物質を対象に送達する方法）で使用する医薬用製剤を調製するために使用され得る。状況に応じて、そのように使用するために生理活性物質を薬学的組成物として製剤化することができる。

【0026】

本発明の送達法の利点は、本方法により生理活性物質の活性が予想外に増加し得る点である。例えば、生物活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様において、本方法により核酸の発現が増加し、それにより核酸にコードされるポリペプチドの産生が増加し得る。または、本方法により生理活性物質の取り込みが増加し、それにより発現レベルが増加し得る。または、本方法により生理活性物質の安定性が増し、それにより発現レベルが増加し得る。「活性の増加」とは、送達媒体（エレクトロポレーションなしで）またはエレクトロポレーション（送達媒体の非存在下において）のどちらかにより生理活性物質を細胞に投与する場合に検出される生理活性物質の活性レベルを上回るレベルを意味する。

【0027】

本発明の送達法のさらなる利点は、本方法により生理活性物質の活性が予想外に長期化

10

20

30

40

50

し得る点である。例えば、生理活性物質がポリペプチドをコードする核酸である場合の態様において、本方法により核酸の発現が長期化し、それにより核酸にコードされるポリペプチドの産生が長期化し得る。「活性の長期化」とは、例えば送達媒体（エレクトロポレーションなしで）またはエレクトロポレーション（送達媒体の非存在下において）のどちらかにより生理活性物質を細胞に投与する場合の規定の閾値レベルでの活性の持続時間を上回る期間にわたる閾値レベルでの核酸発現といった、生理活性物質の活性の持続を意味する。

【0028】

生理活性物質の活性の増加/および長期化は状況に応じて、生理活性物質の活性の増加/および長期化の結果である代用指標を測定することにより、間接的に検出することができる。例えば、生理活性物質により、免疫応答の活性化、免疫応答の抑制、サイトカインの産生、基質レベルの減少（例えば、生理活性物質が酵素または酵素をコードする核酸である場合）、または酵素反応産物のレベルの増加等の生物反応が起こり得る。結果として起ころうのような反応を測定し、生理活性物質の活性の増加/および長期化を検出することができる。

【0029】

生理活性物質の活性の増加/および長期化は、それにより生理活性物質、例えばポリペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸を繰り返して投与する必要性が低減または削除され得る点で有利である。例えば、細胞が比較的大量におよび/またはより長期間にわたり生理活性物質を利用できる場合、生理活性物質をより少ない投与回数で細胞に投与し、および/またはより低用量の生理活性物質を細胞に投与し、所望の生物学的効果を達成することが可能である。

【0030】

特記されない限り、本明細書で使用する専門用語および科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者によって共通に理解されるものと同じ意味をもつ。本発明の実施または試験において、本明細書に記載するものと類似したまたは同等の方法および材料が使用できるが、以下に記載する方法および材料が好ましい。本明細書で言及するすべての文献、特許出願、特許、および他の参照は、完全に参照として本明細書に組み入れられる。抵触する場合には、本出願が定義も含め調整すると考えられる。さらに、材料、方法、および実施例は説明するためのみのものであり、制限する意図はない。

【0031】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになると考えられる。

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は送達媒体をエレクトロポレーションと組み合わせて用いることによる生理活性物質を細胞内に導入する方法に関し、これにより生理活性物質の活性または利用能が増加および/または長期化する。本明細書に記載する活性の増加または長期化は、生理活性物質の分解からの保護または送達媒体からの徐放等の多くの機能により起こり得る。本発明の方法は、細胞活性化の誘導、細胞活性化の阻害、細胞分裂の阻害もしくは促進、細胞死の誘導、免疫系の活性化もしくは抑制、遺伝子発現の制御、遺伝子発現の誘導、またはタンパク質の発現もしくは活性の制御を含むがこれらに限定されない様々な機能に用いることができる。

【0033】

生理活性物質

本明細書に記載するように、生理活性物質を送達媒体と会合させ、エレクトロポレーションにより細胞内に効率的に導入することができる。生理活性物質には、ポリペプチド、小分子、炭水化物、脂質、および核酸、ならびに他の種類の高分子および薬剤が含まれる。

【0034】

10

20

30

40

50

生理活性物質の活性の増加または長期化は、送達媒体とエレクトロポレーションを組み合わせることにより、送達の極大化または生理活性物質の分解からの保護を含むがこれらに限定されない多くの点で達成され得る。活性の増加は、エレクトロポレーションにより送達媒体からの生理活性物質の放出を調節することによっても起こり得る。本発明の方法を用いて、核酸を真核生物系内（例えば、細胞、組織、器官、または動物内）に送達することができる。例えば、RNAi、siRNA、オリゴヌクレオチド、cDNA、遺伝子、または遺伝子断片等の核酸を微粒子内に封入し、動物の筋肉内に注射することができる。次に、注射部位をエレクトロポレーションする。cDNA、遺伝子、または遺伝子断片等の核酸を送達する場合、次に送達された核酸の発現をモニターすることができる。cDNA、遺伝子、および遺伝子断片等は遺伝子発現を誘導するために用いる場合が多いのに対し、RNAi、siRNA、およびオリゴヌクレオチドは遺伝子発現を減少させるために用い得る。遺伝子発現は、化学発光法、ELISA法、ウェスタン法、RT-PCR法、蛍光活性化細胞分類法（FACS法）、および免疫組織化学法等の機構によりモニターすることができる。10

【0035】

生理活性物質が核酸である場合の態様において、核酸はRNA、DNA、またはPNA（ペプチド核酸）であってよい。本発明の方法で用い得る核酸の例には、例えば、cDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチド、mRNA、RNAi、siRNA、ウイルスDNA、細菌DNA、プラスミドDNA、凝縮DNA、およびペプチド核酸（PNA）が含まれる。

【0036】

核酸がポリペプチドをコードする場合の態様において、核酸はポリペプチドの発現を可能にするベクター内で用いることができる。例えば、発現ベクター、すなわちコード配列が発現調節配列に機能的に結合されているベクター内に、核酸をクローニングすることができる。発現調節配列の必要性および独自性は、DNAを発現させる細胞の種類に応じて変わる。一般に、発現調節配列には、転写プロモーター、エンハンサー、適切なリボソーム結合部位、翻訳開始部位、およびポリアデニル化を含む転写および翻訳を終結する配列、ならびにおそらくは翻訳調節配列が含まれる。適切な発現調節配列は、当業者により選択され得る。本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドのアミノ末端においてメチオニン残基をコードし得る。当業者が標準的な方法を使用することにより、発現ベクターを構築することができる。一般に、Current Protocols in Molecular Biology, 2001, Wiley Interscience, NYを参照されたい。本発明で有用なベクターには、線状核酸断片または環状DNA、プラスミドベクター、スーパーコイルDNA、ウイルスベクター、真菌ベクター、および細菌ベクターが含まれる。2030

【0037】

「プラスミド」は、自律的な自己複製染色体外環状DNAである。適切なプラスミドベクターの例は、PCR産物の直接的でありかつ迅速的なクローニングを可能にするpcDNA哺乳動物発現ベクター（Invitrogen）のファミリーである。

【0038】

好みしいウイルスベクターは、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、SN40ウイルス、アルファウイルス、またはヘルペスウイルス由来のベクターである。40

【0039】

本発明の方法により細胞内に導入する核酸は、核酸の核への移動を促進する核局在化シグナルを含み得る。例えば、核酸は転写因子等のDNA結合タンパク質により結合されるヌクレオチド配列を含み得る。別の例では、ペプチドに基づく核局在化シグナルを本発明の核酸と共に提供し、それにより核酸の核への移動を促進することができる。有用なシグナルには、hnRNPA配列およびSV40核局在化シグナルが含まれる。核局在化ペプチド配列は、例えば、核酸と混合するか、核酸に結合させるか、またはリポソーム等の送達媒体内に取り込むことができる。制御エレメントを核酸内に含めて、ポリペプチドをコードする核酸の発現を促進することができる。これらのエレメントには、ヒトまたは他の哺乳動物細胞で発現を増強させる配列、例えばプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。50

例えば、CMVプロモーター、RSVプロモーター、T7、SP6、もしくはT3 RNAポリメラーゼプロモーター、筋特異的プロモーター等の組織特異的プロモーター、抗原提示細胞（APC）特異的プロモーター等の細胞特異的プロモーター、または誘導性プロモーターが、状況に応じてコード配列の5'末端に存在する。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネインプロモーター（例えば、Testaら（1994）Cancer Res. 54:4508を参照のこと）、テトラサイクリン応答性プロモーター（例えば、Giavazziら（2001）61:309を参照のこと）が含まれる。

【0040】

核酸配列はまた、例えばアフリカツメガエル -グロビン遺伝子のコード配列の5'および/または3'に由来するRNA安定化配列といったRNA安定化配列；インtron（コード配列内またはこれに隣接した任意の位置に配置することができる）；ポリ(A)付加部位；複製開始点；および原核宿主および/または真核宿主内で構築物が複製し選択されることを可能にする、例えばカナマイシン耐性遺伝子といった抗生物質、栄養要求性、または他の選択マーカーをコードする1つまたは複数の遺伝子を含み得る。10

【0041】

核酸はまた、Kozak配列等の他の転写および翻訳シグナル、ならびに状況に応じてコード配列の3'または5'末端に存在するFLAG、myc、HA、またはHis等のタグをコードする配列を含んでもよい。10

【0042】

核酸がポリペプチドをコードする場合の態様において、コードされるポリペプチドは、例えば治療ポリペプチドまたはレポーターポリペプチドであってよい。「治療ポリペプチド」は、それが産生される細胞、器官、もしくは組織、および/またはそれが接触する別の細胞、器官、もしくは組織に対して有利な生物学的效果を誘導する（例えば、ポリペプチドを産生する細胞以外の細胞を刺激する分泌ポリペプチド）ポリペプチドである。「レポーターポリペプチド」は、所与の細胞において核酸が発現されたことの指標となる検出可能なシグナルを提供する。レポーターポリペプチドをコードする核酸を用いて遺伝子移入を確認することができ、よってスクリーニングアッセイにおいておよび陽性対照として非常に有用である。有用なレポーターポリペプチドの例には、分泌型胚性アルカリホスファターゼ（SEAP；実施例の詳細な説明を参照のこと）、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、および緑色蛍光タンパク質（GFP）が含まれる。治療ペプチドの例には、（次の項で詳述するような）免疫応答を促進するタンパク質、ケモカイン、酵素（例えば、グリコセレブロシダーゼまたはガラクトシダーゼ）、サイトカイン（例えば、IL-12またはIL-2）、増殖・分化因子（例えば、エリスロポエチンまたはGM-CSF）、またはホルモン（例えば、hGH、aMSH、またはインスリン）が含まれる。2030

【0043】

本発明の方法で用いる核酸はまた、リボザイムであってもまたはリボザイムを含んでもよい。リボザイムは、酵素として働き多くの機能を遂行するRNAの断片である。特定タンパク質の過剰発現により、癌を含む多くの疾患が起こり得る。リボザイムは、タンパク質が産生された後にこれを攻撃するよりもむしろ、その原因：mRNAを攻撃する。リボザイムは、相補的塩基対ハイブリダイゼーションにより特異的mRNAを標的する。標的への結合後、リボザイムの酵素活性により標的mRNAが切断され、それによりそのタンパク質への翻訳が妨げられる。癌と関連するmRNA配列を選択することで、例えばリボザイムにより癌の進行が阻害され得る。疾患過程に関与する特定のmRNAを同定した後、リボザイムを用いてそのmRNAの量を減じることができる。例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性ウイルス性肝炎の病原体である。ウイルスRNA内の配列を標的することによりmRNAレベルの減少をもたらし、ひいてはHCVの減少をもたらす可能性がある。現代の分子生物学の技法を用いて、リボザイムを設計、合成すること、および哺乳動物細胞または真核細胞に送達することができる。化学修飾することにより、リボザイムが血清内で数日間安定的でありかつ活性を有するようにできる。40

【0044】

RNA干渉のために、本発明の方法に従い核酸(例えば、RNAiまたはsiRNA)を細胞内に導入することができる。RNA緩衝は遺伝子特異的サイレンシングを引き起こし、二本鎖RNA(dsRNA)を経て機能する。線虫にアンチセンスmRNAおよびセンスmRNAを別々に注入することで、dsRNAが相補的RNAを分解の標的にすることにより、配列特異的様式で遺伝子発現が阻害される(Fireら (1998) Nature 19:806-11)。

【0045】

最近、21ヌクレオチド長の干渉RNA二本鎖が、アポトーシスを誘導することなく培養哺乳動物細胞で遺伝子サイレンシングを媒介し得ることが見出された(Elbashirら (2001) Nature 411:494-98)。21ヌクレオチド二本鎖は遺伝子特異的サイレンシングを開始するのには十分長いものの、非配列特異的インターフェロン応答を誘発するに足りるほど長くない。

【0046】

本発明の方法に従って、オリゴヌクレオチドを細胞内に導入することができる。オリゴヌクレオチドは、特定の疾患に関連するもしくは望ましくないRNAまたはmRNA(例えば腫瘍性タンパク質をコードするmRNA)を標的するアンチセンス化合物であつてよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは標的RNAに対して相補的であり、それと相互作用することによりRNA翻訳が妨げられるかまたはRNA分解が促進されることになる。オリゴヌクレオチドはまた、米国特許第6,239,116号に記載されるような免疫促進化合物であつてもよい。

【0047】

免疫応答を調節するための生理活性物質の送達

免疫応答を調節する(例えば、増加または減少させる)ために、本発明の方法に従って生理活性物質を細胞内に導入することができる。

【0048】

生理活性物質の例には、インフルエンザ、呼吸器合胞体、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザ菌、百日咳菌、淋菌、肺炎連鎖球菌、炭疽菌、天然痘、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、単純ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、熱帯熱マラリア原虫等のウイルス、細菌、原虫、または真菌感染、および病原微生物によって起こる他の感染に対してワクチン接種するために用いることができる抗原または抗原をコードする核酸が含まれるが、これらに限定されない。生理活性物質のさらなる例には、寄生虫病原体等の非顕微的微生物によって起こる疾患に対してワクチン接種するための抗原または抗原をコードする核酸、およびアレルギーに対してワクチン接種するための抗原または抗原をコードする核酸が含まれる。生理活性物質のさらなる例には、免疫調節物質(例えば免疫促進剤)、栄養素、薬剤、ペプチド、リンホカイン、モノカイン、およびサイトカインが含まれる。

【0049】

有用な免疫促進剤の例には、IL-12、GM-CSF、IL-2、またはIFN- 等のサイトカイン；リポ多糖(LPS)；モノホスホリル脂質A；QS21；例えば18~30ヌクレオチド長のCpG1含有オリゴヌクレオチド；および細菌毒素等の細菌の炭水化物、脂質、またはポリペプチドが含まれる。CpG含有オリゴヌクレオチドの例は、米国特許第6,239,116号に記載されている。

【0050】

本明細書に記載する核酸は、免疫促進剤(例えば、CpG含有オリゴヌクレオチド)であるかまたは免疫促進剤(例えばサイトカイン)をコードしてよい。ポリペプチドおよび免疫促進剤をコードする核酸は、状況に応じて、例えば2プロモーターベクターもしくはIRE Sベクターまたは単一シストロンから複数の遺伝子の発現が可能な任意の他のベクター(例えば、Gakenら (2000) Gene Therapy 7:1979-1985)といった単一のベクターに含まれ得る。または、核酸は免疫促進剤にインフレームに融合しているポリペプチドまたはその一部をコードし得る。そのような融合タンパク質を作製する方法は当業者に周知であり、例えば国際公開公報第95/05849号に記載されている。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明の方法で使用する核酸は、細菌DNAに存在する非メチル化CpG配列（脊椎動物DNAでの存在は少なくメチル化されている）を含み得る。CpG DNAに応答する免疫活性化は、微生物分子に対する先天性免疫防御機構の1つの成分として発達した可能性がある。これらの短い免疫促進配列を含むプラスミドベクターは、これらの配列をもたないベクターよりも迅速に免疫応答を修飾することが示された（Satoら（1996）Science 273:352-354）。

【0052】

CpG配列を含む核酸またはオリゴヌクレオチドは免疫系細胞に入り、細胞質内のタンパク質と相互作用し、ある遺伝子を活性化する細胞シグナル事象のスイッチを入れる可能性がある。この経路を介してあるCpG分子が体の先天性免疫に影響を及ぼす遺伝子を活性化し、これにより造血（血液細胞の产生）が復活し、病原体または癌細胞に対する広範囲で非特異的な治療的および予防的応答が活性化する。他のCpG配列は体の獲得免疫を活性化し、特異的感染症または癌抗原に対する標的免疫応答を促進する。最後に、CpGに基づく産物はまた、過敏性免疫応答をより正常な免疫応答に「バランス回復する」ことによりアレルギーまたは喘息症状を妨ぐ可能性がある。

【0053】

オリゴヌクレオチドは、アジュバントとして本発明の方法に用いることもできる。免疫促進性オリゴヌクレオチドは、実験系でTh1を誘導することが示されている（CarsonおよびRaz、J. Exp. Med. (1997) 186:1621-22）。オリゴヌクレオチドは強力な免疫応答を生じることが示されている。オリゴデオキシヌクレオチド、特にCGモチーフを含むものは、弱い抗原を強力な抗原に変えることができる。例えば胃粘膜を介してラットに投与した破傷風トキソイドは、免疫応答を誘発できない。しかし、オリゴヌクレオチドアジュバントと組み合わせた場合には、皮下注射の場合と匹敵した（Eastcottら（2001）Vaccine 19:1 636-42）。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを抗腫瘍薬として、単独でまたは化学療法と組み合わせて使用してもよい。

【0054】

本発明の方法により送達する核酸はマクロファージおよび他の種類のプロフェッショナルAPCならびに食細胞を受動的に標的にし得るため、免疫機能を調節する手段となる。マクロファージ、単球、および樹状細胞はプロフェッショナルAPCとして働き、MHCクラスIおよびクラスIIの両方を発現する。さらに、DNAの分裂促進効果を用いて、B細胞、T細胞、NK細胞、および他の細胞によって媒介される非特異的免疫応答を刺激することもできる。MHCクラスIまたはクラスII分子に結合するペプチドを含む外来抗原をコードする発現ベクターを送達することにより、抗原に対する宿主T細胞応答が誘導され、それにより宿主に免疫が付与されることになる。

【0055】

生理活性物質が、自己免疫に関するMHCクラスIIに結合する遮断ペプチド（例えば、国際公開公報第94/04171号を参照のこと）または改変ペプチドリガンドをコードする核酸である場合の態様においては、クラスII分子による自己免疫疾患関連自己ペプチドの提示が下方制御されるかまたは妨げられ、自己免疫疾患の症状が緩和される。

【0056】

別の例では、自己免疫誘導ペプチドと同一またはほぼ同一であるMHC結合ペプチドは、T細胞を寛容誘導またはアネルギー誘導することによりT細胞機能に影響を及ぼし得る。または、（例えば、MHC/ペプチド複合体の認識後の）サイトカイン分泌特性を改変することによって、T細胞機能を調節するようにペプチドを設計することも可能であると考えられる。T細胞によって認識されるペプチドは、B細胞に特定のクラスの抗体を產生させ、炎症を誘導させ、さらに宿主T細胞応答を促進させるサイトカインの分泌を誘導することができる。

【0057】

例えばペプチドまたはタンパク質に対する特異的抗体応答といった免疫応答の誘導は、いくつかの要因を必要とし得る。本発明の送達方法を用いて多くの面で免疫関連細胞を操

10

20

30

40

50

作しようとする試みの機動力となったのは、この多要因性である。例えば、各組成物内にDNAおよびポリペプチドの両方を有する組成物を調製し、細胞内に送達することができる。

【0058】

クラスI/II MHCに拘束されるT細胞応答

抗原提示細胞(APC)はクラスIおよびII MHC分子と関連して小さなペプチド断片であるT細胞エピトープを未熟T細胞に対して提示し、T細胞応答、より具体的には細胞障害性T細胞(CTL)またはヘルパーT(TH)応答を活性化する。ペプチド断片はT細胞エピトープとして知られている。CTLおよびTHを完全に活性化するためには、抗原ペプチドに加えて因子が有用である。これらには、インターロイキン-2(IL-2)、IL-12、IL-4、および-インターフェロン(-IFN)等のある種のサイトカインが含まれる。抗原提示細胞の遊走、活性化、もしくは分化を促進するまたはT細胞応答の発現を増強し得る任意の因子を、核酸またはタンパク質の形で、抗原またはT細胞エピトープをコードする核酸と共に提供することができる。

【0059】

T細胞応答を活性化するのに有用な核酸は、それぞれ1つもしくは複数のT細胞エピトープを含む完全な抗原、抗原断片、または抗原のいくつかの領域をコードし得る。さらに、個々のT細胞エピトープは縦列に並んでコードされ得る。ポリペプチドは状況に応じて、抗原性領域の重複しない2つまたはそれ以上の抗原性ペプチドを有する。そのような縦列に並んだペプチドは2つ、3つ、4つ、またはそれ以上のペプチド(例えば、最大で10または20もしくはそれ以上)を含んでよく、それらは同じであっても異なってもよい。そのような縦列に並ぶペプチドの間には、重複ペプチドが散在し得る。例えば、本明細書に記載する方法で用いる核酸は、国際公開公報第01/19408号に記載される任意のポリエピトープポリペプチド(例えば、HPVポリエピトープポリペプチド)をコードし得る。

【0060】

抗体応答

ある感染物質を宿主から排除するには、抗体応答およびT細胞応答の両方を必要とする場合がある。例えば、インフルエンザウイルスが宿主に侵入した際には、抗体によって宿主細胞を感染から防止し得る場合が多い。しかし、細胞が感染した場合は、感染細胞を排除し宿主内でのウイルスの持続的な産生を防ぐために、T細胞応答が必要である。

【0061】

多くの抗体応答は高次構造的な決定基に対して向けられるため、そのような決定基を含むタンパク質またはタンパク質断片の存在が必要である。しかし、アジュバントと共に投与した場合には、ペプチドも抗体応答を誘発し得ることが知られている。これに対して、T細胞エピトープは通常は典型的に7~25残基長の線状決定基である。したがってT細胞応答および抗体応答の両方を誘導する必要がある場合には、抗原性タンパク質、抗原性タンパク質をコードする核酸、または抗原性タンパク質およびT細胞エピトープをコードするDNAの両方を送達媒体に含めることができる。

【0062】

免疫抑制

ある種の免疫応答はアレルギーおよび自己免疫を引き起こすため、宿主にとって有害となり得る。これらの例では、組織を損傷する免疫細胞を不活化する必要がある。免疫抑制は、例えば遮断ペプチドおよび寛容誘導ペプチド、改変ペプチドリガンドといった、ヘルパーT(TH)細胞または細胞障害性T細胞(CTL)を下方制御するエピトープをコードするDNAを有する微粒子を用いて達成することができる。さらに、ある種のサイトカイン、ケモカイン、または他のポリペプチド(例えば、TGF- β 、MSH、またはMSH様活性を有するペプチド)をコードするDNAを有する微粒子を用いても、免疫抑制を達成することができる。これらの微粒子において、免疫抑制性DNAの効果は、DNAを含む担体微粒子中にある種のタンパク質を含めることによって增幅することができると考えられる。そのようなタンパク質のリストには、抗体、受容体、転写因子、およびインターロイキンが含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

例えば、刺激性サイトカインまたはインテグリンもしくは細胞間接着分子(ICAM)等のホーミングタンパク質に対する抗体は、免疫抑制性DNAエピトープの有効性を高め得る。これらのタンパク質がすでに活性化されたT細胞の応答を抑制する役割を果たすと同時に、DNAは新生T細胞の活性化をさらに妨げる。T細胞制御応答の誘導は、T細胞受容体(TCR)が関与する際に存在するサイトカイン環境によって影響を受け得る。IL-4、IL-10およびIL-6等のサイトカインは、DNAにコードされるエピトープに応答したTH2分化を促進する。TH2反応は、TH1細胞の活性、およびこれに対応する関節リウマチ、多発性硬化症、および若年性糖尿病の病態を引き起こす有害応答を阻害することができる。

【 0 0 6 4 】

可溶型の共刺激分子(例えば、CD-40、gp-39、B7-1、およびB7-2)またはアポトーシスに関する分子(例えば、Fas、FasL、Bc12、カスパーゼ、bax、TNF、またはTNF受容体)を含むタンパク質を含めることは、特定のT細胞および/またはB細胞応答の活性化を阻害するためのもう1つの方法である。例えば、B7-1はTH1細胞の活性化に関与し、B7-2はTH2細胞を活性化する。必要とされる反応に応じて、これらのタンパク質の一方もしくは他方をDNAと共に微粒子に含めるか、または別の微粒子中でDNA含有微粒子と混合して供給することが可能と思われる。

【 0 0 6 5 】

本発明の方法でオリゴヌクレオチドを使用し、例えば喘息を治療することが可能である。CGヌクレオチドを中心とする非メチル化モチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)は、強力にTh1サイトカインを誘導しつつTh2サイトカインを抑制し、動物モデルにおいて喘息の徴候を防ぐことができる。これらの物質はアレルゲンに対するTh2型応答を逆戻りさせ、それにより免疫系のバランスを回復する可能性を有する(HussianおよびKlin (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:914-18)。

【 0 0 6 6 】

本発明の方法を用いて、例えば癌、自己免疫疾患、感染症、炎症性疾患、または特定の規定された生理活性物質で治療可能な任意の他の病態を治療するための医薬用製剤を送達することができる。有用な医薬用製剤の例には、米国特許第6,013,258号、米国特許第6,183,746号、国際公開公報第01/19408号、国際公開公報第02/006316号、および国際公開公報第02/42325号(MSH含有組成物、ならびにヒトパピローマウイルスタンパク質およびCYP1B1タンパク質に対する免疫応答を生じるのに有用である組成物について記載している)に記載されるポリペプチドおよび核酸が含まれる。

【 0 0 6 7 】**送達媒体**

生理活性物質を送達媒体と会合させ、エレクトロポレーションにより細胞内に導入することができる。送達媒体の例には、微粒子、ヒドロゲル、デポー剤、リポソーム、懸濁液、コロイド、分散系、ペレット、移植片、ポンプ、粒子状物質、重合体、洗浄剤、ブルロニック、重合体ネットワーク、免疫刺激複合体(ISCOM)、ならびにウイルスおよび細菌等の微生物が含まれる。

【 0 0 6 8 】**微粒子**

米国特許第5,783,567号、国際公開公報第00/53161号、および国際公開公報第01/93835号に記載されるものを含む微粒子を、DNA、RNA、またはポリペプチド等の生理活性物質を細胞内に送達するための媒体として用いることができる「微粒子」には、例えば中空球体といったマイクロスフェアおよびマイクロカプセル、ならびにナノスフェアおよびナノ粒子が含まれる。

【 0 0 6 9 】

微粒子を用いて、本明細書に記載するような生理活性物質を状況に応じて免疫促進剤と共に、細胞、例えば個人の細胞に送達することができる。微粒子は、重合体マトリックスに埋め込まれたまたは重合体の殻に封入された高分子を含む。微粒子は、例えば封入され

10

20

30

40

50

た核酸を非分解状態で維持することにより、高分子の完全性を維持し得る。微粒子は、高分子（例えば、核酸、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、脂質）のパルス送達、および特異的部位（例えば、筋肉等の組織または器官）での、または食細胞、マクロファージ、単球、もしくは樹状細胞等の特定の細胞、もしくは標的細胞集団への送達に用いることもできる。微粒子製剤を用いて、好中球、マクロファージ、単球、または樹状細胞等の関連性のある細胞集団を活性化することもできる。

【0070】

重合体マトリックスは、乳酸-グリコール酸共重合体、デンプン、ゼラチン、またはキチン等の生分解性共重合体であつてよい。

【0071】

微粒子はまた、本明細書に参照として組み入れられるMathiowitzら（国際公開公報第95/24929号）ならびに米国特許第5,817,343号、第5,922,253号、および第6,475,779号に記載されるように製剤化してもよい。

【0072】

重合体材料は販売元から入手するか、または既知の方法により調製することができる。例えば、乳酸およびグリコール酸の重合体は、米国特許第4,293,539号に記載されるように作製するか、またはAldrichから購入することができる。

【0073】

代替的にまたはさらに、重合体マトリックスは、ポリラクチド、ポリグリコリド、ラクチド-グリコリド共重合体、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリカプロラクトン、ポリホスファゼン、タンパク質性重合体、ポリペプチド、ポリエステル、またはアルギン酸、キトサン、およびゼラチン等の天然重合体を含み得る。

【0074】

本発明の方法で有用な好ましい徐放性物質には、ポリ無水物、乳酸とグリコール酸の重量比が4:1を超えない乳酸とグリコール酸の共重合体、および例えば1%無水マレイン酸といった無水物等の分解促進性触媒を含むポリオルトエステルが含まれる。ポリ乳酸がインビボで分解するのに少なくとも1年を要し得るため、この重合体は長期にわたる分解が所望される場合にのみ単独で利用すべきである。

【0075】

核酸と重合体粒子との会合

核酸を含む重合体粒子は、二重エマルジョン法を用いて作製することができる。まず、重合体を有機溶媒中に溶解する。好ましい重合体は、乳酸/グリコール酸の重量比が65:35、50:50、または75:25である乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）である。次に、水溶液中に懸濁した核酸試料を重合体溶液に添加し、2つの溶液を混合して第1の乳濁液を形成させる。溶液は、ボルテックス、マイクロ流動化、振盪、超音波処理、またはホモジナイズすることによって混合することができる。最も好ましいのは、核酸がニック形成、剪断、または分解の形態で被る損傷の量ができるだけ少なく、同時にやはり適切な乳濁液が形成できる任意の方法である。例えば、Vibra-cellモデルVC-250超音波処理器に1/8インチのマイクロチッププローブを装着し#3に設定した場合、またはマイクロ流動化装置内で圧力を調節することにより、またはSL2T Silversonホモジナイザーに5/8インチのチップを装着して10Kで用いることにより、許容される結果を得ることができる。

【0076】

この工程の間に、水滴（核酸を含む）が有機溶媒中に形成される。必要であれば、例えばゲル電気泳動、キャピラリーゲル電気泳動、HPLCにより完全性を評価するために、この時点で少量の核酸を単離することができる。

【0077】

水溶液中に懸濁する前に核酸のアルコール沈殿を行うことまたはさらに精製を行うことにより、封入効率を向上させることができる。エタノール沈殿により取り込まれるDNAは最大147%増加し、イソプロパノール沈殿により取り込みは最大170%増加した。

【0078】

10

20

30

40

50

水溶液の性質は、スーパーコイルDNAの収量に影響を及ぼし得る。例えば、DNA試料の調製および精製中に内毒素を除去するために用いられることが多いポリミキシンB等の洗浄剤が存在すると、DNA封入効率が低下するおそれがある。特に洗浄剤、界面活性剤、および/または安定剤を封入時に用いる場合には、封入効率に対するマイナスの影響とスーパーコイルに対するプラスの効果とのバランスをとることが必要であると考えられる。さらに、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、またはTRISとEDTAとの組み合わせ(TE)のいずれかを含む緩衝液の添加により、ゲル電気泳動による分析で、スーパーコイルプラスミドDNAの安定化が得られた。pHの影響も認められる。デキストラン硫酸、デキストロース、デキストラン、CTAB、ポリビニルアルコール、およびショ糖等の他の安定化化合物も、単独またはTE緩衝液との組み合わせで、DNAのスーパーコイルの安定性および程度を高めることができる。安定剤の組み合わせを用いて、スーパーコイルDNAの量を増加させることができる。荷電脂質(例えばCTAB)、陽イオン性ペプチド、またはデンドリマー(J. Controlled Release (1996) 39 : 357)等の安定剤を用いることもできる。これらの内のいくつかは、DNAを凝縮または沈殿させることができる。さらに、安定剤は、封入手順の際に形成された粒子の物理的性質に対しても影響を及ぼし得る。例えば、封入手順の際に糖または界面活性剤が存在すると、多孔性の内部構造または外部構造を有する多孔性粒子が生じ、これによって粒子からのより迅速な薬剤排出が可能となる。安定剤は、マイクロスフェアの調製の任意の時点: 例えば、乳化、封入、もしくは凍結乾燥の際、またはその両方において作用し得る。

10

20

30

40

【0079】

続いて、第1の乳濁液を有機溶媒に添加し、微粒子を形成させる。溶液は、例えば、塩化メチレン、酢酸エチル、アセトン、ポリビニルピロリドン(PVP)で構成され得り、好ましくはポリビニルアルコール(PVA)を含む。最も好ましくは、溶液におけるPVAの重量と溶液体積との比は1:100~1:800である。一般にホモジナイザー(例えば、SilversonモデルL4RTホモジナイザー(5/8インチプローブ)を7000 RPMに設定して約12秒間)またはマイクロ流動化装置にて攪拌しながら、第1の乳濁液を有機溶液に添加する。

40

【0080】

この工程によって第2の乳濁液が形成され、続いてこれを別の有機溶液に攪拌しながら添加することができる(例えば、ホモジナイザー、マイクロ流動化装置、または攪拌プレートにて)。その後の攪拌により第1の有機溶媒(例えばジクロロメタン)が放出され、微粒子が硬化する。溶媒の蒸発を促進するために、加熱、真空、または希釈をさらに用いることができる。有機溶媒の緩徐放出(例えば室温で)によって「海綿状」粒子が生じ、急速放出(例えば高温で)によって中空微粒子が生じる。後者の溶液は、例えば0.05% w/v PVAであってよい。糖または他の化合物をDNAに添加する場合には、容量オスモル濃度を等しくするために第3または第4の溶液に等濃度の化合物を添加することにより、硬化工程におけるマイクロスフェアからの核酸の損失を効果的に減じることができる。この結果得られた微粒子を、有機化合物を除去するために水で数回洗浄する。粒子を分粒選別にかけ、所望の大きさよりも大きいものを選択的に除去することができる。微粒子の大きさが特に重要な場合には、分粒段階を省くことができる。粒子は洗浄後に直ちに用いることもでき、後に用いるために凍結することも、または保存用に凍結乾燥することもできる。

40

【0081】

微粒子の特徴解析

本明細書に記載する方法によって調製した微粒子の粒度分布は、COULTER(商標)カウンターまたは粒径分析装置を用いて測定することができる。これらの装置により、粒子の粒度分布特性および統計分析が得られる。または、サイズ測定用のスライドガラスまたは接眼レンズを装着した顕微鏡下で肉眼的に粒子の平均サイズを求めるることもできる。

50

【0082】

必要に応じて、以下の手順による分析のために、微粒子から核酸を抽出することができる。微粒子を、水溶液の存在下でクロロホルムまたは塩化メチレン等の有機溶媒中に溶解する。重合体は有機相に残るが、核酸は水相に移行する。これらの相の界面は、遠心分離

によってより明確にすることができる。水相を単離することにより、核酸を収集することができる。標準的な方法に従って塩およびエタノールを用いて沈殿させることにより水相から核酸を回収し、または乾燥させることにより上清を濃縮することもできる。濃度を試験するためには、抽出した核酸をUV分光測定、HPLC、またはキャピラリーゲル電気泳動により分析することができる。分解に関して試験するためには、抽出した核酸をHPLC、キャピラリーゲル電気泳動、またはアガロースゲル電気泳動により分析することができる。

【0083】

脂質含有微粒子

本明細書に記載する微粒子には、1つまたは複数の種類の脂質を含めることもできる。微粒子中に脂質を含めると、例えば閉環二本鎖DNA分子がスーパーコイル状態に維持されることにより、微粒子中の核酸の安定性が高まる。さらに、粒子中に脂質を存在させることにより、薬剤または核酸が微粒子から放出される速度を調節すること、すなわち増減させることができる。電荷の存在により電界での粒子の移動が促進され得るため、荷電脂質を含めることによりエレクトロポレーションの効率を高めることも可能である。

【0084】

ある場合においては、脂質を微粒子に添加することにより、核酸の封入効率を高める、または微粒子内への核酸の充填量を増やすことができる。例えば、封入効率は、脂質の存在によって内部の水相と有機相との間の表面張力が低下するために向上する可能性がある。表面張力が低下すると核酸にとってより好ましい環境が生じ、そのためマイクロスフェア内の保持力が高まると考えられる。表面張力が低下すると一次乳濁液をより少ない操作で形成させることもでき、これによって核酸の剪断が最小限に抑えられ、封入効率も高まる。また、微粒子中に脂質が存在すると微粒子/核酸製剤の安定性が増し、微粒子の疎水性が増し、それによって食細胞による取り込みが増えることも考えられる。脂質は陽イオン性、陰イオン性、または両性イオン性のいずれでもよく、非極性グリセリドのように荷電基をもたなくてもよい。脂質は、微粒子を封入する(すなわち取り囲む)リポソームとして存在しないことが好ましい。状況に応じて、脂質がミセルを形成してもよい。微粒子に使用できる脂質の例には、以下の基の1つまたは複数を含む酸(カルボン酸等)、塩基(アミン等)、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸が含まれる:プロパノイル基(トリアノイック)、ブチロイル基(テトラノイック)、バレロイル基(ペントノイック)、カブロイル基(ヘキサノイック)、ヘプタノイル基(ヘプタノイック)、カブロイル基(デカノイック)、ウンデカノイル基(ウンデカノイック)、ラウロイル基(ドデカノイック)、トリデカノイル基(トリデカノイック)、ミリストイル基(テトラデカノイック)、ペントデカノイル基(ペントデカノイック)、パルミトイyl基(ヘキサデカノイック)、フィタノイル基(3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカノイック)、ヘプタデカノイル基(ヘプタデカノイック)、ステアロイル基(オクタデカノイック)、ブロモステアロイル基(ジブロモステアロイック)、ノナデカノイル基(ノナデカノイック)、アラキドイル基(エイコサノイック)、ヘンエイコサノイル基(ヘンエイコサノイック)、ベヘノイル基(ドコサノイック)、トリコサノイル基(トリコサノイック)、リグノセロイル基(テトラコサノイック)、ミリストレオイル基(9-シス-テトラデカノイック)、ミリストライドイル基(9-トランス-テトラデカノイック)、パルミトレオイル基(9-シス-ヘキサデカノイック)、パルミテライドイル基(9-トランス-ヘキサデセノイック)、ペトロセリノイル基(6-シス-オクタデセノイック)、オレオイル基(9-シス-オクタデセノイック)、エライドイル基(9-トランス-オクタデセノイック)、リノレオイル基(9-シス-12-シス-オクタデカジエノイック)、リノレノイル基(9-シス-12-シス-15-シスオクタデカノエノイック)、エイコセノイル基(11-シス-エイコセノイック)、アラキドノイル基(5,8,11,14(オールシス)エイコサテトラエノイック)、エルコイル基(13-シス-ドクセノイック)、およびネルボノイル基(15-シス-テトラオセノイック)。

【0085】

10

20

30

40

50

他の適した脂質には、臭化セチルトリメチルアンモニウム（「CTAB」）として入手可能なセチルトリメチルアンモニウムが含まれる。

【0086】

複数の脂質を用いて、脂質含有微粒子を作製することができる。適した市販の脂質調製物には、レシチン、OVOOTHIN 160（商標）、およびEPIKURON 135F（商標）脂質懸濁液が含まれ、これらはすべてLucas Meyer, Inc.、イリノイ州、ジケーターから入手可能である。

【0087】

脂質は、マイコバクテリウム等の生物から単離してもよい。脂質は、Pamer, Trend Microbiol. 7:13, 1999; Braud, Curr Opin. Immunol. 11:100, 1999; Jackman, Crit. Rev. Immunol. 19:49, 1999; およびPrigozy, Trends Microbiol. 6:454, 1998に記載されている脂質等のCD1拘束性脂質であることが好ましい。

【0088】

微粒子内に取り込む脂質に加えて、送達を改善するためおよび送達後の分散を改善するために、微粒子を脂質（または脂質懸濁液）中に懸濁することもできる。

【0089】

観察される放出量の相対的な増減は、一部には微粒子に用いる1つまたは複数の脂質の種類に依存することになる。微粒子からの核酸の放出を増加させる脂質の例には、CTABおよびレシチンおよびOVOOTHIN（商標）脂質調製物が含まれる（例えば、国際公開公報第00/53161号を参照のこと）。

【0090】

脂質の化学的性質は、粒子内でのそれと核酸との空間的関係に影響を及ぼし得る。脂質が陽イオン性であれば、核酸と直接相互作用する可能性がある。脂質が荷電していない場合には、微粒子内で散在する可能性がある。脂質はまた、マイクロカプセルの中空部またはミクロスフェアの空胞内に存在する可能性がある。

【0091】

脂質含有微粒子はまた、上記の安定剤を含んでもよい。脂質をショ糖等の安定剤とともに微粒子中に含めることにより、微粒子内の核酸の放出が相乗的に増加し得る。

【0092】

脂質含有微粒子は、上記のように、重合体を含む有機溶媒、DNA溶液を含む水溶液、または第2の乳濁液を作製するために用いる第3の溶液のいずれかに脂質を添加することによって調製することができる。有機溶媒または水性溶媒中の特定の脂質の溶解特性により、どの溶媒を用いるかが決まることになる。

【0093】

脂質または脂質懸濁液の中には、有機溶媒または水溶液に添加し得るものもある。しかし、その結果得られた微粒子の放出特性は異なる可能性がある。例えば、レシチン脂質懸濁液を核酸を含む水溶液に添加することによって調製した微粒子は、脂質を添加せずに調製した微粒子による放出量と同等かまたはそれに満たない量を放出する。これに対して、レシチン脂質懸濁液を有機溶媒に添加すると、より多くの核酸を放出する微粒子が生成される。

【0094】

微粒子の再懸濁および分散を促進するために、微粒子をさらに脂質含有溶液中に再懸濁してもよい。

【0095】

本明細書に記載する脂質含有微粒子に加えて、キチン、ゼラチン、もしくはアルギン酸塩等の他の高分子、またはこれら高分子と脂質の様々な組み合わせを用いて、微粒子を作製してもよい。他の高分子を用いて作製したこれらの微粒子に、上記の安定剤をさらに含めてよい。

【0096】

重合体中の微粒子の復元

10

20

30

40

50

脂質を含むまたは含まない微粒子は、生理食塩水中で送達してもよいし、または他の重合体中に組み入れてもよい。例えばラクチド-グリコリド共重合体等の微粒子は、ポリ(エチレンオキシド)(PEO)(BSF Inc.)、ポリ(エチレンオキシド)-コ-(プロピレンオキシド)-ポリ(エチレンオキシド)(PEO-PPO-PEO)(BSF Inc.)、ポリ(プロピレンオキシド)-コ-ポリ(エチレンオキシド)-コ-ポリ(プロピレンオキシド)(PRO-PEO-PPO)(BSF Inc.)、酢酸セルロース(Sigma)、カルボキシメチルセルロース(CMC, Sigma, Inc.)、ポリ(ビニルアルコール)、およびポリ(ビニルピロリジノン)等の非イオン性重合体の水溶液中に組み入れることができる。

【0097】

別の例では、ラクチド-グリコリド共重合体等の微粒子は、ポリ(アミノ酸)(ポリ(リジン)、ポリ(アルギニン)等)、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)(Dendritech, Inc.)、ポリ(エチレンイミン)(PEI)(Sigma, Inc.)、ポリ(アスパラギン酸)(Sigma, Inc.)、キトサン(Pronova, Inc.)、ヒアルロン酸(Genzyme)、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸(Sigma)等の荷電重合体の水溶液中に組み入れることができる。

【0098】

別の態様では、微粒子は、プルロニック(登録商標)(BASF)、ポリ(ビニルカプロラクトム)(Sigma)、ポリ(n-プロピルイソアクリルアミド)等の温度感受性重合体または増粘重合体、およびプルロニック(登録商標)乳酸/グリコール酸/カプロン酸/トリメチレンカーボネート等の誘導体化PEO-PPO-PEO重合体中に組み入れができるが、この場合、微粒子を重合体の冷溶液中で復元し、低粘性製剤として注入または塗布する。製剤は組織に塗布した後に体温(37)で粘度を増す。これにより微粒子製剤が非化学的に架橋したゲルを適所で形成することが可能となり、これは局所的送達用途において有用である。

【0099】

別の態様では、CTAB(臭化セトリアンモニウム)(Sigma, Inc.)、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)(Sigma, Inc.)、DOTAP(ジオレイルリン酸トリアンモニウム)(Sigma, Inc.)等の荷電分子で被覆した微粒子を水溶液中で復元し、エレクトロポレーションする前に注入する。

【0100】

別の例では、核酸含有微粒子は桂皮酸(Sigma, Inc.)、アゾ桂皮酸等の導電剤を含む。これらの種類の微粒子は、電気パルスに応答してエレクトロポレーションにより細胞内に導入され得る。

【0101】

別の例では、細胞溶解性ペプチド(例えば、マガイニン(Sigma, Inc.)、セクロピン(Sigma, Inc.)、ストレプトリジン(Sigma, Inc.)、リステリオリジン(Sigma, Inc.))等の細胞浸透促進剤を核酸と共に粒子内に封入する。これらの微粒子を注入した後にエレクトロポレーションを行う。細胞浸透促進剤を同時封入することにより、細胞の核酸取り込みがさらに増加する可能性がある。逆に、核酸含有微粒子を細胞浸透促進剤を含む水溶液中で復元することもできる。これらは、マガイニン、セクロピン等のペプチド、ポリ(エチレンオキシド)(BASF)、プルロニック(登録商標)(BASF)、デシル硫酸ナトリウム(Sigma, Inc.)等の重合体または小分子界面活性剤から構成され得る。別の例では、ビタミンE、ビタミンE-TPGS(peg化ビタミンE)(Eastman Chemical, Inc.)等の生物学的利用能促進剤中で微粒子を復元することができる。これらの促進剤をエレクトロポレーションと組み合わせて使用することにより、細胞のDNA取り込みを促進することができる。

【0102】

ISCOM

ISCOMは、自然に、またはコレステロールおよびQuill A(サポニン)ともしくはサポニンのみと混合することにより形成される、30~40 nmの大きさの負に荷電した鳥かご構造をしている。本明細書に記載のいずれの生理活性物質も、ISCOMにより細胞内に導入する

10

20

30

40

50

ことができる。抗原の送達媒体としてISCOMを使用し、トキソプラスマ症、エプスタイン・バーウイルス誘導性腫瘍を含む様々な感染実験モデルで防御免疫がもたらされた (Mowatら (1991) *Immunology Today* 12:383-385)。

【0103】

生理活性物質が核酸である場合の態様において、1回の投与当たり体重kg当たり投与量約1~200μgのDNAを投与すると予想される。患者が成人である場合、ワクチン療法には例えば、微粒子または他の送達媒体中で3~6回繰り返して送達する際、DNA 10~10000μgの筋肉内、鼻腔内、皮内、皮下、器官内(例えば、肝臓、腎臓、脳)、または直腸内投与が含まれ得る。当然のことながら、医学的技術では周知の通り、所与の患者への投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、性別、および基本的健康状態；投与時間および投与経路；投与する化合物の詳細；および同時に投与する他の薬剤を含む多くの要因に依存する。最適な投与量の決定は、十分に当業の薬理学者の能力の範囲内にある。10

【0104】

エレクトロポレーション

送達媒体中に含めた生理活性物質は、エレクトロポレーションにより細胞内に導入する。エレクトロポレーションは、抗血栓薬および抗凝血薬(例えば、米国特許第5,944,710号を参照のこと)、薬理化合物(例えば、米国特許第5,439,440号を参照のこと)、化学療法薬(例えば、米国特許第6,055,453号を参照のこと)等の多種多様な治療化合物の送達に用いられている。この技法は、いくつかの哺乳動物種(例えば、ヒト、ブタ、チンパンジー、イヌ、マウス、およびラット)において生理活性物質を送達するために用いられ成功している(例えば、Tozenら (2001) *Anticancer Res.* 4A:2483-88を参照のこと)。エレクトロポレーションを用いて外来DNAが真核細胞内に導入されている(Somiariら (2000) *Mol. Ther.* 2:178-87; Mathiesen Gene Therapy (1999) 6:508-14)。エレクトロポレーションでは電気パルスを調節して利用し、生理活性物質を細胞の細胞質内に導入する。20

【0105】

この技法は、遺伝子治療(Jaroszeskiら (1999) *Adv Drug Deliv Rev* 35:131-137)、癌を治療するための薬物送達(Hellerら (1997) *Adv Drug Deliv. Rev.* 26:185-97)、ならびに細胞内のウイルス、癌細胞、シグナル伝達、遺伝学、代謝、および他の構造および機能を研究するための抗体送達(Boranら (2000) *J. Immunol. Methods* 242:115-26)の分野において有用であることが示されている。30

【0106】

エレクトロポレーションは実質的に、インビトロまたはインビボでいかなる細胞にも適用できる(例えば、皮膚または筋細胞)。インビトロ法は、培養物中の細胞に治療生理活性物質をエレクトロポレーションする段階、およびその後生理活性物質を必要とする対象にその細胞を送達する段階を含み得る。エレクトロポレーションの装置および細胞をエレクトロポレーションする方法は周知であり、例えば米国特許第5,702,359号および第6,014,584号に記載されている。エレクトロポレーションに適した装置およびエレクトロポレーションのパラメータの選択は、本明細書に記載の技法により当業者によって達成され得る。40

【0107】

用途

本発明の方法により、生理活性物質の細胞内への導入が可能となる。生理活性物質を細胞内に導入する方法は、以下に詳述するものを含むがこれらに限定されず生物科学および医学において幅広い用途を有する。特によく知られかつ有用な用途は核酸の細胞内への導入であり、これにより核酸にコードされるポリペプチドが産生される。この技法は、基礎研究および治療用途の両方において基本的に重要である。

【0108】

本発明の方法により細胞内に導入する生理活性物質(例えば、核酸、ペプチド、タンパク質、小分子、炭水化物、または脂質)は、リンパ増殖性疾患もしくは癌等の様々な種類50

の細胞増殖性疾患を有することがわかっている個人、様々な種類の癌を有する疑いのある個人、または様々な種類の癌を起こしやすい個人（例えば、BRCA1遺伝子における変異といった、癌感受性の遺伝的および/または遺伝性徵候を有する個人）において免疫原として使用することができる。他の適した個人には、癌に関連した病態の症状を示す、またはこの病態を発症する可能性が高い個人が含まれる。生理活性物質を予防的または治療的に使用し、例えば膀胱、乳房、結腸、結合組織、肺、食道、皮膚、リンパ節、脳、卵巣、胃、子宮、精巣、および前立腺の癌といった様々な細胞増殖性疾患または癌に関連する病態を予防または治療することができる。1つの例では、核酸、タンパク質、またはペプチドをワクチンとして使用する。

【0109】

生理活性物質を単独で、または化学療法、プレオマイシン、照射、および手術といった当技術分野で周知の他の療法と組み合わせて細胞内に導入し、様々な種類の細胞増殖性疾患もしくは癌、またはこれらの細胞増殖性疾患もしくは癌に関連した疾患を治療することができる。さらに、本発明の方法により送達する生理活性物質は、当技術分野で周知のように例えばアジュvant、ビタミン、免疫促進剤、またはサイトカイン（またはサイトカインをコードする核酸）と共に投与することにより、免疫応答を高めるように設計された他の治療と組み合わせて投与することができる。核酸および免疫促進剤を含む組成物については、本明細書内で説明している。

【0110】

本発明の方法により細胞内に導入する生理活性物質は、様々な癌もしくはこれらの癌に関連する病態の予防または治療のための医薬用製剤の製造にも用いることができる。

【0111】

本明細書に記載の生理活性物質は、エクスピボ治療にも用いることができる。例えば、樹状細胞、末梢血单核細胞、または骨髄細胞等の細胞を個人または適切なドナーから採取し、核酸組成物を用いてエクスピボで活性化し、その後個人に戻す。さらに、核酸発現ベクターを筋芽細胞等の細胞内に導入し、その後個人に戻すこともできる。

【0112】

本明細書に記載の生理活性物質を用いて、免疫調節が有効である病状を有する哺乳動物の免疫応答を調節することもできる。本明細書で用いる「免疫応答の調節」は、病状の治療に有益であると考えられる哺乳動物の免疫応答を変化させる任意の方法を指すことを意図する。免疫応答の調節の例には、単球細胞および他の細胞のTh1サイトカインの産生を誘導することにより、病態の症状を防ぐためにT細胞集団の活性を変化させることにより、B細胞の増殖を誘導することにより、および免疫グロブリン（Ig）分泌を誘導することにより、哺乳動物の免疫応答をTh2応答からTh1応答へ方向変換させる段階が含まれる。

【0113】

微粒子の細胞内インピトロおよびエクスピボ送達

DNA等の生理活性物質を含む微粒子は、生理食塩水、緩衝生理食塩溶液、組織培養液、または他の生理的に許容される担体中に懸濁することができる。インピトロ/エクスピボで用いるためには、微粒子の懸濁液を培養付着性哺乳動物細胞または細胞懸濁液に添加することができる。次に、細胞をエレクトロボレーションに供す。1~24時間インキュベートした後に、取り込まれなかった粒子を吸引するかまたはウシ胎仔血清に対する遠心処理によって除去する。細胞を直ちに分析することもできるし、またはその後の分析のために再培養することもできる。

【0114】

DNA等の生理活性物質を含む微粒子の細胞内への取り込みは、PCRにより、または核酸の発現をアッセイすることによって検出することができる。例えば、ノーザンプロット法、逆転写PCR法、またはRNAマッピング法により、核酸の転写を測定できると考えられる。タンパク質の発現は、抗体に基づく適切なアッセイ法、または微粒子内に含まれるもしくは核酸によってコードされるポリペプチドの機能に合わせた機能アッセイ法によって測定することができる。例えば、ルシフェラーゼをコードする核酸を発現する細胞は、以下のよ

10

20

30

40

50

うにアッセイすることができる：適切な緩衝液（例えば、細胞溶解培養試薬、Promega Corp、ウィスコンシン州、マディソン）中で溶解した後に、溶解液をルシフェリン含有基質（Promega Corp）に添加し、光出力を照度計またはシンチレーションカウンターで測定する。光出力は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現に正比例する。

【0115】

生理活性物質がクラスIまたはクラスII MHC分子と相互作用することが知られているペプチドをコードする核酸である場合には、MHC分子/ペプチド複合体に対して特異的な抗体を用いて、蛍光活性化細胞選別装置（FACS）により細胞の表面上の複合体を検出することができる。そのような抗体は、標準的な技法を用いて作製することができる（Murphyら、Nature, 第338巻、1989、765-767ページ）。ペプチドをコードする核酸を含む微粒子と共に細胞をインキュベートした後に、細胞を組織培養液中で特異的抗体と共に10~120分間インキュベートする。培地中で細胞を洗浄し、過剰な抗体を除去する。一次抗体に結合する蛍光標識タグ化二次抗体を、細胞と共にインキュベートする。これらの二次抗体は市販されている場合が多いが、既知の方法を用いて調製することもできる。過剰な二次抗体は、FACS解析の前に洗浄除去しなければならない。

【0116】

また、Tエフェクター細胞またはBエフェクター細胞を観察することによって、アッセイすることもできる。例えば、T細胞増殖、細胞傷害性活性、アポトーシス、またはサイトカイン分泌を測定することができる。

【0117】

または、蛍光標識した核酸を用いて細胞をFACSまたは顕微鏡によって分析することにより、粒子の細胞内送達を直接示すこともできる。蛍光標識した核酸の内部移行により、細胞はバックグラウンドレベルを上回る蛍光を発するようになる。これは迅速かつ定量的であるため、FACSは核酸のインビトロまたはインビボ送達の条件の最適化に特に有用である。そのような最適化の後に、蛍光標識の使用を中断する。

【0118】

核酸がそれ自体で細胞機能に影響を及ぼす場合、例えば、それがリボザイムもしくはアンチセンス分子である場合、またはそれらに転写される場合には、適した機能アッセイ法を利用することができます。例えば、リボザイムまたはアンチセンス核酸が特定の細胞タンパク質の発現を低下させるように設計してある場合には、そのタンパク質の発現をモニターすることができる。

【0119】

微粒子の細胞内インビボ送達

核酸等の生理活性物質を含む微粒子は、本発明の方法に従い、筋肉内、局所的、皮内、または皮下投与で哺乳動物の細胞内に導入することができる。例えば、微粒子を筋肉内注射した後にエレクトロポレーションすることができ、これにより生理活性高分子の効率的な細胞内移入が可能になる。

【0120】

別の例では、高濃度のポリ(エチレンオキシド)-コ-ポリ(プロピレンオキシド)-コ-ポリ(エチレンオキシド)（PEO-PPO-PEO）等のペースト形成重合体中で微粒子を復元し、正常または罹患皮膚に局所的に塗布した後にエレクトロポレーションすることができる。

【0121】

別の例では、化学的に架橋し組織接着（皮膚）ヒドロゲルに変化し得る重合体溶液中で微粒子を復元し、微粒子を適所に保持することができる。次に塗布領域をエレクトロポレーションして、生理活性物質、例えば核酸の細胞内取り込みを増加させることができる。

【0122】

核酸活性をモニターする方法

リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはRNA干渉を促進する分子等の核酸の活性は、標的RNAの存在または標的RNAによってコードされるタンパク質の発現もしくは活性を解析することによりモニターすることができる。例えば、VEGF核酸を標的するア

ンチセンスオリゴヌクレオチドの活性は、VEGF RNAの量（例えばタックマン（Taqman）RT-PCR解析により）、VEGFタンパク質（例えば、ELISAまたはウェスタン解析により）、またはVEGF活性（血管増殖の測定により）を解析することによりモニターすることができる。

【0123】

CpGオリゴヌクレオチドの活性は、免疫応答に及ぼす所望の効果（例えば、腫瘍の退縮、寿命の長期化、NK細胞活性、炎症、サイトカイン放出、または抗原に対するT細胞もしくはB細胞の応答）をモニターすることにより測定することができる。

【0124】

治療オリゴヌクレオチドの活性は、所望のタンパク質の存在を検出することによりモニターすることができる。例えば、インターフェロン応答を誘発するように設計したポリICオリゴヌクレオチドの活性は、インターフェロンの血清レベルまたは組織レベルを測定することにより決定することができる。

10

【0125】

遺伝子発現をモニターする方法

適切な方法により、核酸の発現をモニターすることができる。例えば、ELISA法、HPLC法、質量分析法、化学発光法、ウェスタン法、RT-PCR法、または免疫組織化学法により、レポータータンパク質の発現をモニターすることができる。関心対照の免疫原性タンパク質をコードする核酸の発現は、サイトカイン、抗体、またはそのタンパク質に対するT細胞応答を検出することによりアッセイすることができる。

20

【0126】

抗体応答は、ELISAアッセイ法で血清を試験することにより測定することができる。このアッセイ法では、関心対照のタンパク質を96ウェルプレート上にコーティングし、試験対象由来の血清を段階希釈して各ウェルに分注する。次に、抗ヒト西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体等の、酵素を結合した二次抗体をウェルに添加する。関心対象のタンパク質に対する抗体が試験対象の血清中に存在すれば、この抗体がプレート上に固定されたタンパク質に結合し、次に二次抗体がこれに結合することになる。混合物に酵素の基質を添加し、ELISAプレートリーダーで比色変化を定量する。正の血清応答により、微粒子のDNAにコードされる免疫原性タンパク質が試験対象内で発現し、抗体応答を刺激したことが示唆される。または、ELISAスポットアッセイ法を利用することもできる。

30

【0127】

タンパク質をコードする核酸を含む微粒子を細胞内に送達した後にタンパク質に応答するT細胞増殖は、試験動物の脾臓、リンパ節、または末梢血リンパ球中に存在するT細胞をアッセイすることにより測定する。そのような供給源から得られたT細胞を、関心対象のタンパク質またはペプチドの存在下で同質遺伝子的なAPCと共にインキュベートする。T細胞の増殖は、標準的な方法に従い³H-チミジンの取り込みによりモニターする。細胞内に取り込まれた放射能量は、微粒子の送達する核酸の発現により試験対象内で誘導される増殖応答の強度に直接関連する。正の応答により、タンパク質またはペプチドをコードするDNAを含む微粒子がインビボでAPCにより取り込まれ提示されたことが示唆される。

40

【0128】

細胞障害性T細胞の產生は、標準的な⁵¹Cr放出アッセイ法で示すことができる。そのようなアッセイ法では、試験対象から得られた脾臓細胞または末梢血リンパ球を、同質遺伝子的なAPCおよび関心対象のタンパク質またはこのタンパク質に由来するエピトープの存在下で培養する。4~6日後、エフェクター細胞障害性T細胞を、関心対象のタンパク質由来のエピトープを発現する⁵¹Cr標識標的細胞と混合する。試験対象が微粒子内に含まれる核酸によってコードされるタンパク質またはペプチドに対して細胞障害性T細胞応答を生じるならば、細胞障害性T細胞により標的が溶解されることになる。溶解された標的は、放射性⁵¹Crを培地中に放出することになる。シンチレーションカウンターで、一定分割量の培地を放射能についてアッセイする。

【0129】

50

細胞障害性T細胞の產生は、ELISpotアッセイ法を用いても示すことができる。市販のIFN-ELISpotキット(R&D Systems、ミネソタ州、ミネアポリス)を、製造業者の示す手順に従って利用することができる。疎水性フッ化ビニリデン樹脂(PVDF)膜付き96ウェルプレートに抗IFN-モノクローナル抗体(mAb)を予め吸着させ、10% RPMIを用いて20分間ブロッキングする。続いて、約 10^4 ~ 10^5 個のエフェクターと 10^5 個の標的を37℃で5% CO₂下で18~20時間混合する。次に、各ウェルを4回洗浄し、ビオチン化非競合抗IFN-モノクローナル抗体と共に4℃で一晩インキュベートする。その後ウェルを3回洗浄し、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼと共に室温で2時間インキュベートし、再度3回洗浄してからBCIP/NBTと共に30分間インキュベートして発色させ、蒸留水で十分に洗浄する。IFN- 分泌細胞(スポット)は、Zellnet Consulting, Inc.(ニューヨーク州、ニューヨーク)のKS ELISpotソフトウェア4.2を用いて自動化ELISpotリーダーシステム(Cariz Ziss Inc.、ニューヨーク州、ソーンウッド)で数える。

10

20

30

40

【0130】

ELISAまたはFACS等のアッセイ法を用いても、応答T細胞のサイトカイン特性を測定することができる。

【0131】

分泌タンパク質をコードするプラスミドを用いれば、動物を屠殺することなく血清を採取し発現したタンパク質を解析することができる。そのような分泌タンパク質の例には、分泌型胚性アルカリホスファターゼ遺伝子、第VIII因子、第IX因子、エリスロポエチン(EPO)、エンドスタチン、aMSH、様々なサイトカイン、インスリン、および骨形成タンパク質(BMP)が含まれる。

20

【0132】

1つの例では、全身での発現をモニターするために、ヒト分泌型胚性アルカリホスファターゼ遺伝子(pgWiz(商標)SEAP、以後SEAPと称する)を用いることができる。膜結合型胎盤性アルカリホスファターゼの分泌型であるSEAPは、血清中で数分~2、3日間の半減期を有する。短い半減期を有するタンパク質は、発現動態を確実に解析するために特に有用である。

【0133】

マウス血清中のSEAP酵素活性のレベルは、Tropix Phospha-Light照度測定アッセイキット(Applied Biosystems、カリフォルニア州、フォスター・シティ)を用いて測定する。発光測定は、反応緩衝液中で40分間インキュベートした後にTopcountプレートリーダー(Packard Instruments、イリノイ州)を用いて行う。各時点での血清SEAPレベルは、アッセイキットに同梱されている陽性対照(精製ヒト胎盤性アルカリホスファターゼ)で作製した検量線を用いてナノグラム/mlで表す。トンプソン-タウ棄却分析によりデータをさらに分析し(WheelerおよびGanji、Introduction to Engineering Experimentation, Prentice Hall, 1996, ページ；142-145)、平均および標準偏差としてプロットする。

30

【0134】

以下は本発明の実施例である。これらの実施例は、本発明の範囲を制限すると決して解釈されるべきではない。

【0135】

40

実施例

実施例1：プラスミドDNA含有微粒子のインビボエレクトロポレーションによって達成される高レベル遺伝子発現

微粒子の合成

分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードするプラスミドをAldevron, LLC(ノースダコタ州、ファー・ゴ)から入手し、インビボでの遺伝子発現を評価するために利用した。これらの実験では、ラクチド-グリコリド共重合体(ランダム50:50 L:G)(PLG; Boehringer Ingelheim、ドイツ)を含むプラスミドDNA含有微粒子を、水/油/水(w/o/w)改変エマルジョン工程により合成して特徴解析を行った。

【0136】

50

1.6 mLのTE pH 8.0(トリス10 mM、EDTA 1 mM)/303 mMショ糖緩衝液、pH8.0中に、10.6 mgのプラスミドDNAおよび1.5 mgのポリエチレンオキシドジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPE; Genzyme Corp.、マサチューセッツ州)を溶解した。内径16 mmホモジナイゼーションプローブを備えたSilverson SL2Tミキサー(Silverson Machines Inc.; マサチューセッツ州、イーストロングメドウ)を用いて、17 mL塩化メチレン中でこの溶液をPLG 1gと共にホモジナイズすることにより乳化した。有機PLG層への水性DNA溶液の添加は、外界温度において20秒間で起こった。水/油乳濁液を4分間ホモジナイズした後、さらに塩化メチレン18 mLをホモジネートに添加した。さらに30秒間、乳濁液のホモジナイズを行った。

【0137】

10

次に、インラインミキサーを装着したL4Rホモジナイザーを用いて、1 w/v % PVAおよび303 mMショ糖を含む水溶液(ポリ(ビニルアルコール)、分子量23,000 g/モル、Sigma Inc.、ミズーリ州、セントルイス)1リットルを連続フローして6000 RPMで2.5分間乳濁液をホモジナイズした。w/o/w乳濁液を37 °Cで2.5時間攪拌した。これを、1500 RPMで15分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを脱イオン水中に懸濁した。懸濁液を再度1500 RPMで15分間遠心分離し、上清を廃棄してペレットを脱イオン水中に再懸濁した。洗浄した懸濁液を外界温度(約19~21 °C)で12時間、減圧下(<10 mm Hg)で凍結乾燥し、白いフレーク上の凝結粉末を得た。凍結乾燥品を含むバイアルを窒素下で密封した。-20 °Cでこの粉末を保存した。

【0138】

20

超微細構造(表面性状、完全性、形状)

AMR-1000走査型電子顕微鏡を加速電圧10 kVで操作し、金スパッタ微粒子の走査型電子顕微鏡写真(SEM)を得た。

【0139】

粒度測定(量avg、数avg)

微粒子2.5 mgを200 μLのTE緩衝液、pH 8.0中で復元し、適切な復元について試験した。復元した微粒子は、凝集について視覚的に試験した。復元した微粒子の粒度測定は、Coulter Multisizer II(Beckman Coulter、フロリダ州、ハイアリーラ)で行った。

【0140】

30

封入(μg DNA/mg凍結乾燥品)

DNA含有微粒子約2.5 mg(1.5 mLマイクロチューブ内で検量)にクロロホルム500 μLを添加し、PLG重合体を溶解した。この溶液にTE緩衝液200 μLを添加した。二相溶液をLabQuakeローテータ(VWR、イリノイ州、シカゴ)で室温で90分間反転回転させ、DNAの水層への抽出を促進した。解析のため、水性上清100 μLを採取した。UV分光光度法により上清を260 nmで測定した。ベール-ランバートの式により、微粒子中のDNA濃度(μg/mg)を算出した。

【0141】

40

DNAスーパーコイル形成(%)

DNA含有水性抽出物(前項に記載)を用いて、アガロースゲル電気泳動により微粒子中のDNAのスーパーコイル形成を判定した。先に決定した封入値を利用し、DNA 250 ngに相当する量をエチジウムプロマイド/アガロースゲルに泳動した。定性測定を行い、スーパーコイルDNAの割合を決定した。

【0142】

破裂したDNA(%)

破裂したDNAを、室温で復元した後に生理食塩溶液中に放出される表面近傍のDNAと定義する。微粒子約2.5 mgを1.5 mLマイクロチューブに秤量し、0.9%生理食塩水を用いて外界温度で穏やかに復元した。5分後(静置)、懸濁液を3000 rpmで10分間遠心分離した。上清を採取し、10,000 RPMでさらに10分間、2度目の遠心分離を行った。マイクロチップを装着したピペットで上清を採取し、=260 nmでのUV分光測定により分析した。ベール-ランバートの式により、放出されたDNAの割合を算出した。

50

【0143】

表1はPLG微粒子の物理化学的特性を要約しており、この粒子は平均DNA封入 $5.6\mu\text{g}/\text{mg}$ であり、量平均（量avg）および数平均（数avg）分布から $10\mu\text{m}$ 未満の粒度分布であった。封入されたDNAは、アガロースゲル電気泳動で判定されるように高率で（約95%）スーパーコイル形成を有した。微粒子は、生理食塩水での復元で約19%破裂した。SEMでの判定から、微粒子は無傷であり、滑らかであり、球状であった。

【0144】

(表1) 微粒子の物理化学的特性

外観(SEM)	無傷、滑らか、球状
大きさ(数avg、量avg)(ミクロン)	2.1, 5.2
封入*($\mu\text{g DNA}/\text{mg}$ 連結乾燥品)	5.6 ± 0.35
スーパーコイル形成	95%
破裂(%)	19.2

10

【0145】

マウスへの注射

微粒子内に封入されヒトSEAPをコードするプラスミドDNA $50\mu\text{g}$ を生理食塩水中で懸濁し、マウス(C57BL/6、雌、4~6週齢；n=10/群)の前脛骨筋に注射した。生理食塩水を注射したマウスを対照とした。エレクトロポレーションに供するマウスには、微粒子の注射後直ちに注射部位をエレクトロポレーションした。2-ニードルアレイチップ(#533、0.5cmギャップ)を用いて、ニードルのアレイが注射部位を取り囲むように筋肉内に挿入することにより、以下の条件を用いてエレクトロポレーションを行った：100V、8パルス、20msパルス長、パルス間隔1秒、および単極極性(Genetronicsエレクトロポレーター、ECM 830、BTX Inc.、カリフォルニア州、サンディエゴ)。注射後直ちに、注射部位の両側でエレクトロポレーションニードルを筋肉内に設置した。

20

【0146】

各時点でマウスの眼窩後から採血し、遠心分離により血清を分離した。Tropix Phospha-Light照度測定キットを製造業者(Applied Biosystems、カリフォルニア州、フォスター・シティ)の説明に従って利用し、所定の時点で血清中のSEAPのレベルを測定した。データはSEAP(ng/ml)対時間(日数)でプロットした。

30

【0147】

図1は、注射部位にエレクトロポレーションを供した場合に遺伝子発現の増加が得られたことを示す。生理食塩水を注射したマウスの血清は、どの時点においても陰性であった(<0.3ng/ml；データは示さず)。エレクトロポレーションをせずに微粒子を受け取ったマウスと比較して、エレクトロポレーションにより微粒子を受け取ったマウスでは、エレクトロポレーションから300日経過した後でも血清SEAPレベルは維持されていた(図1)。エレクトロポレーションの存在下では、SEAPを発現するマウスの頻度も増加した(表2)。エレクトロポレーションにより微粒子を受け取ったマウスはすべて、処置してから最長で300日間陽性血清SEAP産生(血清中0.3ng/ml SEAPと定義する)を有した。エレクトロポレーション非存在下では、血清SEAPを発現するマウスの頻度は7日目で60%陽性であり、その後低下した。

40

【0148】

(表2) 0.3ng/mlより多量のSEAPを発現している動物の割合

群	7日目	21日目	49日目	90日目	200日目	300日目
DNA 封入微粒子 (-エレクトロポレーション)	60	100	40	0	0	0
DNA 封入微粒子 (+エレクトロポレーション)	100	100	100	100	100	100

【0149】

実施例2：DNA含有PLG微粒子のインビボエレクトロポレーションによる免疫応答および遺伝子発現の増加：用量反応研究

合成および特徴解析

SEAPプラスミド(pSEAP)または β -GalプラスミドDNA(p β -Gal)を含むラクチド-グリコリド共重合体(PLG、Boehringer Ingelheim、ドイツ)微粒子を合成し、上記の過程により特徴解析を行った。SEAPプラスミド含有粒子は6.95 μg DNA/mg凍結乾燥品を有し、 β -Galプラスミド含有微粒子は3.94 μg DNA/mg凍結乾燥品を含んだ。

【0150】

マウスへの注射

30、10、3 μg/マウス筋肉のDNA用量を送達するように、微粒子を0.9%無菌生理食塩水中で復元した(p β -Gal: 7.61 mg凍結乾燥品/30 μg DNA/生理食塩水50 μL、2.53 mg凍結乾燥品/10 μg DNA/生理食塩水50 μL、0.76 mg凍結乾燥品/3 μg DNA/生理食塩水50 μL; pSEAP: 4.32 mg凍結乾燥品/30 μg DNA/生理食塩水50 μL、1.44 mg凍結乾燥品/10 μg DNA/生理食塩水50 μL、0.44 mg凍結乾燥品/3 μg DNA/生理食塩水50 μL)。Balb/cマウス(雌、4~6週齢)に各製剤30 μg、10 μg、または3 μgを注射した。各マウスの右脛骨筋にSEAP製剤を注射し、各マウスの左脛骨筋に β -gal製剤を注射した。エレクトロポレーションを供す群のマウスには、注射後直ちに注射部位において各脛骨筋をエレクトロポレーションした。2-ニードルアレイチップ(#533、0.5 cmギャップ)を用いて、ニードルのアレイが注射部位を取り囲むように筋肉内に挿入することにより、以下の条件を用いてエレクトロポレーションを行った: 100 V、8パルス、20 msパルス長、パルス間隔1秒、および単極極性(Genetronicsエレクトロポレーター、ECM 830、BTX Inc.、カリフォルニア州、サンディエゴ)。注射後直ちに、注射部位の両側でエレクトロポレーションニードルを筋肉内に設置した。陰性対照マウスには、脛骨筋当たり生理食塩水50 μLを注射した。

【0151】

要約すると、マウス群を以下のように処理した:

- ・ 生理食塩水、n=9、(-エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 30 μg/マウス(-エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 30 μg/マウス(+エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 10 μg/マウス(-エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 10 μg/マウス(+エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 3 μg/マウス(-エレクトロポレーション)
- ・ 試験群、n=5、各封入プラスミドDNA 3 μg/マウス(+エレクトロポレーション)

【0152】

血清の回収

7、23、および42日目に、眼窩後から採血することにより各マウスから血液を回収した。血液を凝固させ、10,000 rpmで15分間遠心分離することにより血清を回収した。

【0153】

SEAPアッセイ法

7日目に、Tropix Phospha-Light照度測定アッセイキットを用いて、マウス血清中のSEAP酵素活性を測定した。以下の変更を加え製造業者の説明に従い、アッセイを行った: 1) 検量線用のSEAPタンパク質試料は、通常のマウス血清を1:4希釈して調製した; 2) 実験血

10

20

30

40

50

清試料もすべて、製造業者の同梱する希釈緩衝液で1:4に希釈した；および3) 反応緩衝液中で40分間インキュベートした後、市販の発光リーダーを用いて発光測定値を分析した。各時点での血清SEAPレベルはng/mlで表した。

【0154】

-Gal特異的抗体の力価

免疫してから23日後に、眼窩後から採血することによりマウスから血清を回収した。23日目の -gal特異的IgGの力価をELISA法により測定した。血清抗体を解析するため、96ウェルプレートをPBS中で2μg/mlの -galタンパク質と共に室温で3時間インキュベートした。プレートをPBS中の1% BSAで1.5時間ブロッキングした。以下の様式で抗 -gal IgG ELISAを行った：固相を通常のマウス血清（NMS）もしくは抗血清、または -gal特異的モノクローナルAb（Calbiochem Novabiochem、カリフォルニア州、パサディナ）と共に4で一晩インキュベートした後、マウスIgG（H+L）に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合抗体と共にインキュベートした。免疫複合体をABTS基質（Zymed、カリフォルニア州、サンフランシスコ）と反応させた後、抗体の結合を405 nmでの吸光度として測定した。力価は、同じ希釈での非免疫血清の吸光度（OD 405）の2倍の吸光度値を生じる最も高い血清希釈と定義した。

10

【0155】

T細胞応答

免疫をしてから42日後に、濃縮カラム（R&D systems、ミネソタ州、ミネアポリス）を用いて、免疫したまたは未処置のマウスのプールした脾細胞からT細胞を精製した。精製したCD3+ T細胞（ 2×10^5 個）を、照射して -galまたはHBVペプチドでパルスした 2×10^5 個の同質遺伝子的な脾臓細胞で24時間刺激した。ELISPOT解析により、製造業者の説明に従って（R&D systems）T細胞応答を判定した。

20

【0156】

正の応答マウス数

30μg用量で注射してから7日後、封入SEAP DNAを注射したマウスの4/5（80%）がバックグラウンドレベル（0.3 ng/ml）を上回るSEAPを発現した（表3）。これに対して、エレクトロポレーションすると同じ用量で5/5（100%）のマウスでSEAP発現が検出されるように、応答マウスの数が増加した。10μg用量では、SEAP DNA含有微粒子を注射したマウスの3/5（60%）が0.3 ng/mlを上回るSEAPを発現した。10μg用量においても、エレクトロポレーションにより正の応答マウス数は5/5（100%）に増加した。3μg用量では、SEAP DNA含有微粒子を注射したマウスの1/5（20%）が0.3 ng/mlを上回るSEAPを発現した。一方、エレクトロポレーションにより正の応答マウスの数は5/5（100%）に増加した。

30

【0157】

（表3） SEAPを発現する動物の発生率（%）はエレクトロポレーションにより増加する

DNA用量(μg)	微粒子(%) (陽性数/総数)	微粒子+ エレクトロポレーション(%) (陽性数/総数)
3	20 (1/5)	100 (5/5)
10	60 (3/5)	100 (5/5)
30	80 (4/5)	100 (5/5)

40

【0158】

SEAP発現

エレクトロポレーションによりマイクロ封入SEAPを受け取った応答Balb/cマウスの7日の血清SEAPレベルは、エレクトロポレーションをしていないマウスよりも高かった（30μg、3.9対101 ng SEAP/mL；10μg、0.4対36.7 ng SEAP/ml；3μg、0.4対11.42 ng SEAP/

50

mI) (図2)。

【0159】

-Gal免疫応答

免疫してから23日後に、抗 -gal抗体 (IgG) の平均力値を評価した。 -gal DNAの微粒子を介した送達と組み合わせてエレクトロポレーションを用いた場合に、 -gal抗体力値の増加が達成された(図3)。平均抗 -gal抗体力値は以下のとおりである：30 μg、217対5250；10 μg、390対2462。エレクトロポレーションをしてもしなくとも、この時点では3 μg -gal DNAを受けたマウス中に正の応答マウスは検出されなかった。応答するマウスの発生率は、やはり微粒子製剤の送達と組み合わせてエレクトロポレーションを用いた場合に増加した。封入 -gal 30 μgを受け取ったマウスでは、応答マウス数は1/5(エレクトロポレーションなし)および5/5(エレクトロポレーションあり)であった。封入 -gal 10 μgを受け取ったマウスでは、応答マウス数は1/5(エレクトロポレーションなし)および4/5(エレクトロポレーションあり)であった。

10

【0160】

MHCクラスIに拘束される -gal (876-884) 特異的T細胞の誘導

INF-ELISPOTで測定したすべての用量レベルにおいて、エレクトロポレーションにより42日目におけるMHCクラスIに拘束されるT細胞応答が増加した(図4)。

20

【0161】

実施例3：エレクトロポレーションと組み合わせてP4-AM/P4-SGネットワーク中で核酸を送達することにより遺伝子発現のレベルが増す

材料

ポリエチレンオキシド-テトラアミン (P4-AM; SunBio West、韓国)、ポリ(エチレンオキシド)-テトラスクシニミジルグルタレート (P4-SG; SunBio West、韓国)、メトキシ-ポリエチレンオキシド2.5K-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (mPEG-DSPE; Genzyme Corporation、マサチューセッツ州)、SEAPプラスミドDNA (Zycos Inc.、マサチューセッツ州)、およびBrookfield粘度計 (cp40スピンドル、Brookfield, Inc.、マサチューセッツ州、ミドルボロー)。

30

【0162】

製剤化

3% w/v P4-AM/P4-SGをmPEG-DSPE (10 μg/100 μl) およびSEAP DNA (100 μg/100 μl)と共に調剤し、GT20製剤を作製した。GT20は、pH 8の緩衝液で復元した後、25 °Cでの粘土測定によりゲル化時間20分を示す。

30

【0163】

マウスへの注射

イソフルランを用いてマウスを穏やかに麻酔し、3% w/v P4-AM/P4-SGネットワーク製剤または未調剤のプラスミドDNA(生理食塩水中)を前脛骨筋肉の両側に注射した。どのマウスも、筋肉当たり50 μlの注射量でプラスミドDNA 50 μgを注射した。製剤の注射後直ちに、2-ニードルアレイチップ (#533、0.5 cmギャップ)を用いてニードルのアレイが注射部位を取り囲むように筋肉内に挿入することにより、以下の条件を用いてマウス筋肉にエレクトロポレーションした：100 V、8パルス、20 msパルス長、パルス間隔1秒、および単極性 (Genetronicsエレクトロポレーター、ECM 830、BTX Inc.、カリフォルニア州、サンディエゴ)。注射後直ちに、注射部位の両側でエレクトロポレーションニードルを筋肉内に設置した。注射とエレクトロポレーションを行った後、所定の時点でマウスの眼窩後から採血した；血清を回収し、先に実施例1で示したようにSEAPについて解析した。ネットワーク製剤中のDNA送達では、エレクトロポレーションと組み合わせた場合にSEAP発現の増加が得られた(図5)。

40

【0164】

実施例4：細胞溶解性ペプチド、アジュバント、生物学的利用能促進剤、脂質、または界面活性剤を共に封入した微粒子を介しての、エレクトロポレーションを併用したDNAの送達

50

材料

ヒトSEAPをコードするプラスミドDNA(先の実施例に記載)をレポーター遺伝子として用いて、インビボでの遺伝子発現を評価する。PLG微粒子内にプラスミドDNAと共に賦形剤を封入する。賦形剤は、細胞溶解性ペプチド(例えば、メリチン、マガイニンI、ストレプトリジン0; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)、界面活性剤(例えば、L62; BASF, Inc.、バージニア州、シャーロット)、アジュバント(例えば、モノホスホリル脂質A; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)、生物学的利用能促進剤(例えば、ビタミンEポリエチレングリコールスクシネット、Eastman Chemical, Inc.、テネシー州、キングズポート)、荷電重合体(例えば、ポリ(アミドアミン)(PAMAM); Dendritech, Inc.; ミシガン州、ミッドランド)、ポリ(グルタミン酸)(Polysciences, Inc.、ペンシルベニア州、ウォリントン)、または荷電脂質(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、または臭化セチルトリメチルアンモニウム; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)のいずれかである。

【0165】

製剤化

微粒子を合成し、実施例1のように特徴解析を行った。プラスミドDNAを含む水相中に約0.1~50パーセントの賦形剤が溶解した後に、一次乳濁液を調剤する。水に溶解しない賦形剤(例えばメリチン)は有機塩化メチレン相中に溶解する。実施例1に記載したように、選択した賦形剤を含む微粒子を物理化学的特性について解析する。

【0166】

マウスへの注射

マウス(C57BL/6、雌、4~6週齢)の筋肉内に、pDNA 50 μgおよび選択した賦形剤を含む微粒子を一度だけ注射する(n=8/群)。賦形剤なしのDNA含有PLG粒子および生理食塩水を注射したマウスを適切な対照とする。エレクトロポレーションを供する群については、微粒子の注射後直ちにマウス筋肉をエレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは実施例1に記載するように行う。所定の時点でマウスの眼窩後から採血し、遠心分離により血清を分離する。所定の時間で血清中の生理活性SEAPレベルを測定し、図1のようにナノグラムSEAP/ml対日数でプロットする。

【0167】

実施例5：アジュバント、細胞溶解性ペプチド、荷電重合体、荷電脂質、生物学的利用能促進剤、または界面活性剤を含む溶液中で復元した微粒子を介しての、エレクトロポレーションを併用したDNAの送達材料

実施例1のように、ヒトSEAPをコードするプラスミドDNAをレポーター遺伝子として用いてインビボでの遺伝子発現を評価する。他の試薬は実施例1に記載のとおりである。

【0168】

方法

プラスミドを含む微粒子を合成し、実施例1のように特徴解析を行った。本明細書で合成した微粒子を、1% w/vの選択した賦形剤を含む水溶液中で復元する。水溶液中に溶解または懸濁または乳化した賦形剤は、細胞溶解性ペプチド(例えば、マガイニンI、ストレプトリジン0; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)、界面活性剤(例えば、L62、分子量2000 Da; BASF, Inc.、バージニア州、シャーロット)、アジュバント(例えば、モノホスホリル脂質A; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)、生物学的利用能促進剤(例えば、peg化ビタミンE; Eastman Chemical, Inc.)、荷電重合体(例えば、ポリ(アミドアミン)(PAMAM); Dendritech, Inc.)、ポリ(グルタミン酸)(Polysciences, Inc.)、荷電脂質(例えば、ラウリル硫酸ナトリウムまたはCTAB; Sigma, Inc.、ミズーリ州、セントルイス)、またはポリ(エチレンオキシド)-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPE; Genzyme Corp.、ケンブリッジ)のいずれかである。実施例1に記載したように、微粒子を物理化学的特性について解析する。

【0169】

10

20

30

40

50

マウスへの注射

マウス(C57BL/6、雌、4~6週齢)の筋肉内に、選択した賦形剤中のpDNA 50 μg含む微粒子を一度だけ注射する(n=8/群)。賦形剤の非存在下で懸濁したDNA含有PLG粒子および生理食塩水を注射したマウスを適切な対照とする。エレクトロポレーションを供する群については、微粒子の注射後直ちにマウス筋肉をエレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは実施例2に記載するように行う。所定の時点でマウスの眼窩後から採血し、遠心分離により血清を分離する。実施例2に記載したようにSEAPアッセイを行う。

【0170】

実施例6：エレクトロポレーションを併用した、オリゴホスホチオエートを封入した微粒子の送達

10

材料

オリゴホスホチオエート(ODN)(分子量7500 g/mol、22-mer; Oligos, Etc.、オレゴン州、ウィルソンビル)を微粒子内に封入した。他の材料および装置はすべて実施例1に記載のとおりである。

【0171】

封入工程

オリゴホスホチオエート10.6 mgを1.6 mlのTE pH 8.0(トリス10 mM、EDTA、1 mM)/303 mMショ糖緩衝液、pH 8.0に溶解した。内径16 mmホモジナイゼーションプローブを備えたSilverson SL2Tミキサー(Silverson Machines Inc.; マサチューセッツ州、イーストロングメドウ)を用いて、塩化メチレン17 ml中でPLG 1gと共にホモジナイズすることによりこの溶液を乳化した。有機PLG層への水性DNA溶液の添加は、外界温度において20秒間で起こった。水/油乳濁液を4分間ホモジナイズした後、さらに塩化メチレン18 mlをホモジネーターに添加した。さらに30秒間、乳濁液のホモジナイズを行った。次に、インラインミキサーを装着したL4Rホモジナイザーを用いて、1 w/v % PVAおよび303 mMショ糖を含む水溶液(PVA、Sigma Inc.、ミズーリ州、セントルイス)1リットルを連続フローして6000 RPMで2.5分間乳濁液をホモジナイズした。w/o/w乳濁液を37°で2.5時間攪拌した後、遠心分離により(25°、10分間、2500 RPM)回収した。上清を廃棄し、ペレットを脱イオン(dI)水中に再懸濁した。懸濁液を再度室温で1500 RPMで遠心分離し、上清を廃棄してペレットを脱イオン水中に再懸濁した。懸濁液を減圧下(<10 mm Hg)で12時間凍結乾燥し、白い凝結粉末を得た。凍結乾燥品を含むバイアルを窒素下で密封した。-20°でこの粉末を保存した。

【0172】

粒度測定

微粒子2.5 mgを200 μlのTE緩衝液、pH 8.0中で復元し、凝集について試験した。復元した微粒子の粒度測定は、Coulter Multisizer II(Beckman Coulter)で行った。

【0173】

ODNの封入

クロロホルム500 μlを添加し、重合体微粒子を溶解した。二相溶液を室温で90分間反転回転させ、ODNの水層への抽出を促進した。オリゴホスホチオエートの濃度(μg/mg)は、陰イオン交換カラムを用いてHPLCにより測定した(Tosohas DNA-NPR、λ=260 nmでのUV検出)。0.7 ml/分の移動相Aで、外界温度にてカラムを一晩平衡化した。この方法は、25 mM NH4Ac(酢酸アンモニウム)、25% ACN(アセトニトリル)、pH 8を含有する移動相Aおよび25 mM NH4Ac、25% ACN、500 mM NaOCl4(過塩素酸ナトリウム)、pH 8を含有する移動相Bを含んだ。分析物中のオリゴヌクレオチドの濃度を定量するため、以下の勾配を利用した:

【0174】

(表4) HPLC勾配法

20

30

40

時間	流速(ml/分)	%A	%B	%C	%D
0	0.7	100	0	0	0
3	0.7	40	60	0	0
6	0.7	0	100	0	0
7	0.7	0	100	0	0
10	0.7	40	60	0	0
13	0.7	100	0	0	0

【0175】

10

オリゴヌクレオチド0、5、10、25、50、および100 μg/mlの検量線を作製し、線形回帰から%RSDを算出した。

【0176】

破裂

リン酸緩衝食塩水中のオリゴホスホチオエート0、10、50、100 μg/mlで作製した検量線に基づき、破裂の割合を算出した。破裂したDNAを、室温で復元した後に生理食塩溶液中に放出される表面近傍のODNと定義する。微粒子約2.5 mgをマイクロチューブに秤量した(n=2)。生理食塩水1 mlを微粒子に添加し、粒子を穏やかに懸濁した。懸濁液を室温で5分間反転回転させた後、試料チューブを3000 RPMで10分間遠心分離した。各試料から上清800 μlを採取した。上清800 μlを凍結乾燥することにより、破裂試料を濃縮した。凍結乾燥した粉末をmilliQ水100 μl中で復元し、HPLC解析のために調製した。先に記載した方法に従い、陰イオン交換カラムを用いて高速クロマトグラフィーによりオリゴホスホチオエート濃度(μg)を測定した。

20

【0177】

インピトロ放出

1時間目、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目等の時点に対して微粒子2.5 mg(n=3)を2 ml丸底遠心チューブに秤量し、1 mlのダルベッコリン酸緩衝食塩水(PBS)/0.5 mM EDTA、pH 7.0を用いて復元した。37 °Cのインキュベーター内でチューブを反転回転させた。各時点で上清800 μlを回収し、新たなPBS 800 μlで置換した。上清800 μlを凍結乾燥することにより、インピトロ放出試料を濃縮した。凍結乾燥した粉末をmilliQ水100 μl中で復元し、HPLC解析のために調製した。

30

【0178】

化学的適合性

微粒子からODNを抽出して(封入抽出法を参照のこと)抽出物をHPLC解析することにより、製剤のオリゴヌクレオチドとの適合性を判定した。無傷のODNが時間と共に微粒子から放出されたか否かを判定するため、インピトロで放出されたODNの滞留時間を未調製のODNと長期にわたって比較した。

30

【0179】

超微細構造

AMR-1000走査型電子顕微鏡を加速電圧10 kVで操作し、金スパッタ微粒子(賦形剤有りおよび無し)の走査型電子顕微鏡写真(SEM)を得た。

40

【0180】

結果

微粒子の外観は滑らかであり球状であった(走査型電子顕微鏡による)。表5は、オリゴホスホチオエートを含む微粒子3バッチの物理化学的特性を要約したものである。封入はHPLC測定により5~8 μg/mg PLGであった。破壊はHPLC測定により<20%であった。

【0181】

(表5) オリゴヌクレオチドを含む微粒子の特徴解析

PLG 微粒子	封入 ($\mu\text{g ODN}/\text{mg}$ 連結乾燥品)	破裂 (%)	大きさ (数 _{avg} 、量 _{avg}) ミクロン
バッチ 1	5.87	15.1	2.2, 5.6
バッチ 2	7.51	6.89	1.9, 5.1
バッチ 3	8.46	11.29	2.1, 5.5

【 0 1 8 2 】

微粒子から抽出したODNのHPLC解析によりオリゴヌクレオチドの単一ピークが示されたことから、微粒子調剤行程により薬剤が損傷を受けなかったことが示唆された（データは示さず）。さらに、46日間にわたって放出されたODNの滞留時間は未調剤のODNと同等であり、このことから無傷のODNが微粒子から放出されたことが示唆された（データは示さず）。PLG微粒子からのODNのインピトロ放出において、25日間でPLG微粒子から累積的に35%放出されたことが示された（図6A）。図6Bは、1日当たりに放出されたODNの、24日間にわたるマイクログラムでのプロットである。

10

【 0 1 8 3 】

マウスの免疫化

封入ODN（例えば、CPGオリゴホスホチオエート）を含む微粒子（-エレクトロポレーション）をB型肝炎表面抗原を含む生理食塩水中で懸濁し、Balb/cマウスに $100\mu\text{g ODN}/\text{マウス} \text{ および } 1\mu\text{g B型肝炎表面抗原}/\text{マウス}$ の用量で皮下注射する（n=6/群）。無菌食塩水中に懸濁した封入ODNおよび肝炎表面抗原をBalb/cマウスに皮下注射した後、エレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは実施例1に示すように行う。生理食塩水を注射したマウス（-エレクトロポレーション）を対照とする。注射後様々な時点でマウスの眼窩後から採血し、B型肝炎表面抗原 IgG、IgG2aレベルをELISA法により測定する。

20

【 0 1 8 4 】

別の実験では、アンチセンスオリゴホスホチオエートを含む微粒子を生理食塩水中で懸濁し、エレクトロポレーション有りまたは無しでBalb/cマウスに1日用量 $0.1 \sim 10\mu\text{g/kg}/\text{マウス}$ で皮下注射する。注射後様々な時点でマウスの眼窩後から採血する。アンチセンスオリゴホスホチオエートが結合するmRNAによってコードされるタンパク質の下方制御についてアッセイすることにより（例えば、ELISA法による）、アンチセンスオリゴホスホチオエートの生物活性を測定する。

30

【 0 1 8 5 】

実施例7：エレクトロポレーションを併用した、温度感受性重合体を含む溶液中の核酸封入微粒子の送達製剤化

核酸（例えば、プラスミドDNAまたはオリゴホスホチオエート）を含む微粒子を作製し、先の実施例（実施例1および2）に記載した方法により特徴解析する。リン酸緩衝食塩水、pH 7.4中で、プルロニックF127（登録商標）（ポリ(エチレンオキシド)-コ-ポリ(ブロピレンオキシド)-コ-ポリ(エチレンオキシド)、分子量12000ダルトン； BASF, Inc.、バージニア州、シャーロット）等の温度感受性重合体の30% w/v溶液を調製する。溶液を4で維持する。微粒子（例えば約50 mg）をプルロニック溶液1 ml中で復元する。

40

【 0 1 8 6 】

方法

局所的投与の例では、微粒子を含む溶液を低温度で皮膚にスプレーする。プルロニック含有溶液は、皮膚と接触した際に（37度）ゾルからゲルへ移行する。局所的投与に加え、プルロニック含有溶液を低温度で注射し、微粒子を含むゲルデポー剤を形成させることもできる。投与形態を問わず、微粒子の投与部位を複数回のパルスによりエレクトロポレーションする。エレクトロポレーションは、DermPulser（登録商標）エレクトロポレーター装置（Genetronics, Inc.、カリフォルニア州、サンディエゴ）等の経皮EPT用に設計さ

50

れた装置を用いて行う。

【0187】

実施例8：エレクトロポレーション併用した、ヒドロゲル中の核酸封入微粒子の送達

核酸（例えば、プラスミドDNAまたはオリゴホスホチオエート）を含む微粒子を作製し、先の実施例に記載した方法により特徴解析する。微粒子（例えば約50 mg）を、リン酸緩衝液、pH 7.0中の10% w/v P4-SH（Sunbio Systems、韓国）1 mL中で復元する。次に溶液1 mLを、1 mLの0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.5中の10% w/v P4-SG（Sunbio Systems、韓国）と混合する。微粒子含有溶液（P4-SH+P4-SG）をシリンジ中に吸引し、投与領域（例えば、腫瘍切除または腫瘍切除内）に投与する。次に、本明細書に記載するように投与部位をエレクトロポレーションに供する。

10

【0188】

他の態様

本発明をその詳細な説明と共に記載したが、前述の説明は例証を目的とするものであり、本発明の範囲を制限することを意図するものではないことは理解されねばならない。本発明の他の局面、利点、および変更は、本発明の特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1】SEAPをコードするDNAを含む微粒子を投与したC57/BL6マウスにおける分泌型胚性アルカリホスファターゼ（SEAP）血清レベルに及ぼすエレクトロポレーション（EPT）の効果を示すグラフである。EPTの存在下または非存在下で、マウスに製剤を筋肉内注射した。生理食塩水を与えた対照マウスは、試験したどの時点においてもSEAP発現について陰性であった(<0.3ng/mL)。7日目（黒棒）、21日目（白棒）、49日目（薄い灰色の棒）、90日目（濃い灰色の棒）、200日目（ダイヤモンド柄の棒）、および300日目（斜線棒）に血清試料を試験した。

20

【図2】SEAPをコードするDNAを含む微粒子をx軸に示すように用量30、10、および3μgで投与したBalb/cマウスにおける7日目の分泌型SEAP血清レベルに及ぼすEPTの効果を示すグラフである。7日目に血清SEAPレベルを試験した。EPTの非存在下で微粒子を（黒棒）、EPTと共に封入DNAを受け取った群（斜線棒）、および生理食塩水を（白棒）注射したマウスのデータを示す。スチューデントのt検定を用いてP値を算出した(*P=0.004、30μg；**P=0.0009、10μg；***P=0.0004、3μg)。

30

【図3】注射後23日目におけるBalb/cマウス血清中の-*gal*特異的IgG力値に及ぼすEPTの効果を示すグラフである。30および10μg用量で-*gal*をコードする封入DNAをマウスに注射した。各群の平均力値をy軸に、製剤をx軸に示す。データは、5匹のマウスの平均値±標準誤差（SE）として表す。EPTの非存在下で-*gal*をコードする封入DNAを受け取った群（黒棒）、およびEPTと共に封入DNAを受け取った群（白棒）についての力値を示す。スチューデントのt検定を用いてP値を算出した(*P=0.006、30μg；**P=0.0009、10μg)。

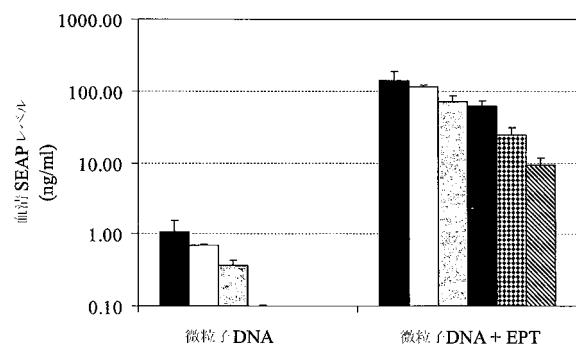
【図4】-*gal*をコードするDNAを封入した微粒子で免疫してから6週間後のBalb/cマウス(n=群当たり5)のプールした脾臓から誘発されたIFN- γ スポット形成細胞（SFC）の数に及ぼすEPTの効果を示すグラフである。IFN- γ SFCの数/10⁶個のCD3+ T細胞をy軸に示す。各群は、EPTの非存在下で封入DNAを（黒棒）、EPTと共に封入DNAを（斜線棒）、または生理食塩水（白棒）を受け取った。

40

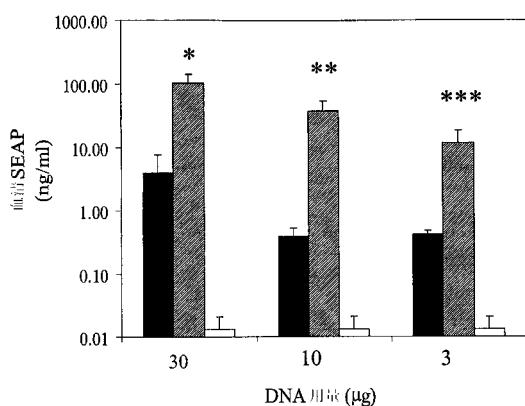
【図5】GT20 P4-AM/P4-SG重合体ネットワーク製剤を筋肉内注射したマウスの血清SEAPレベルに及ぼすEPTの効果を示すグラフである。各群は、EPTなしで製剤を（GT20）、EPTありで製剤を（GT20+EPT）、または生理食塩水を受け取った。血清SEAPレベルは投与してから7日目に測定した。

【図6】図6Aおよび6BはPLG微粒子からのCPGオリゴホスホチオエート（ODN）のインビトロ放出を示すグラフである。図6Aは、PLG微粒子から放出された累積ODNの割合を時間の関数として示す。図6Bは、PLG微粒子から放出されたODNの量(μg)を時間の関数として示す。

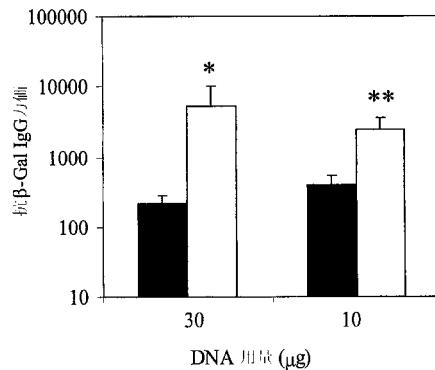
【図1】



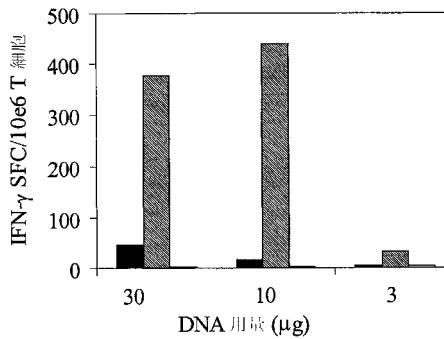
【図2】



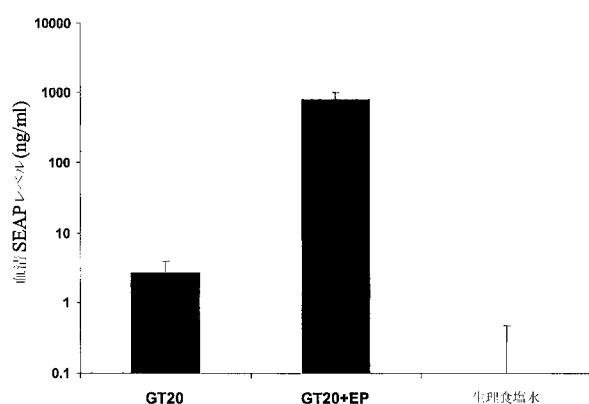
【図3】



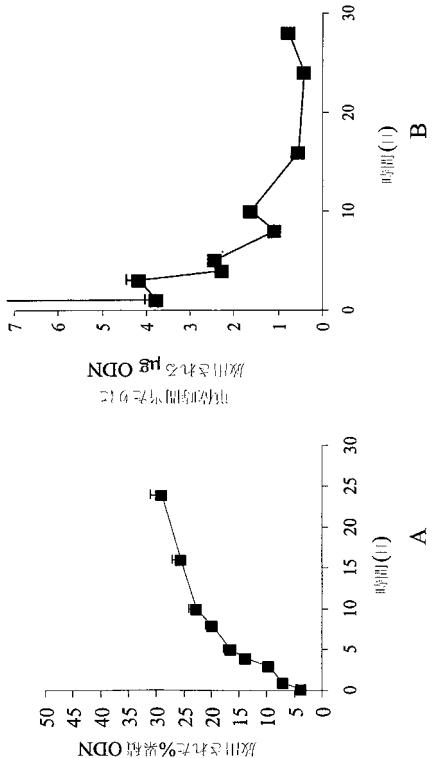
【図4】



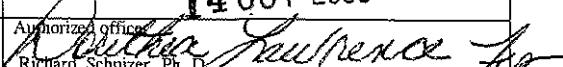
【図5】



【図6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/04937																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A 61K 41/00, C12N 15/88, 87 US CL : 435/455, 459, 461 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/455, 459, 461																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Category *</th> <th style="padding-right: 10px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="padding-right: 10px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 98/29134 A2 (ALTEA TECHNOLOGIES, INC.) 09 July 1998(09.07.1998). see abstract, page 1, line 22 to page 2, line 2, page 10, lines 10-16page 25, lines 5-8 and 21-23, page 28, lines 8-13, page 29, lines 8-15, page 32, lines 13 and 14, page 52, lines 6-11, page 105, lines 15-21, page 106, line 23 to page 108, line 25, and claims 48-50 at page 130.</td> <td>1, 2, 5-8, 10-12, 14-18, 23, 24, 29-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.</td> <td>9, 13, 19-22, 25-28, 33</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.</td> <td>1-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,955,096 A (SANTOS et al) 21 September 1999 (21.09.1999). See entire document, especially column Table 1 at column 10, column 11, line 48-61, column 13, lines 32-47, column 15, lines 1-8, and column 16, lines 31-34.</td> <td>24-28, 33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Databases Medline on STN, Accession Number 2000265285, US National Library of Medicine, LARSEN et al. Antisense properties of peptide nucleic acid, Biochim. Biophys. Acta, 10 December 1999 (10.12.1999), Vol. 1489, No. 1, page 159-166, see abstract.</td> <td>9</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 98/29134 A2 (ALTEA TECHNOLOGIES, INC.) 09 July 1998(09.07.1998). see abstract, page 1, line 22 to page 2, line 2, page 10, lines 10-16page 25, lines 5-8 and 21-23, page 28, lines 8-13, page 29, lines 8-15, page 32, lines 13 and 14, page 52, lines 6-11, page 105, lines 15-21, page 106, line 23 to page 108, line 25, and claims 48-50 at page 130.	1, 2, 5-8, 10-12, 14-18, 23, 24, 29-32	Y	US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.	9, 13, 19-22, 25-28, 33	A	US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.	1-33	Y	US 5,955,096 A (SANTOS et al) 21 September 1999 (21.09.1999). See entire document, especially column Table 1 at column 10, column 11, line 48-61, column 13, lines 32-47, column 15, lines 1-8, and column 16, lines 31-34.	24-28, 33	Y	Databases Medline on STN, Accession Number 2000265285, US National Library of Medicine, LARSEN et al. Antisense properties of peptide nucleic acid, Biochim. Biophys. Acta, 10 December 1999 (10.12.1999), Vol. 1489, No. 1, page 159-166, see abstract.	9
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	WO 98/29134 A2 (ALTEA TECHNOLOGIES, INC.) 09 July 1998(09.07.1998). see abstract, page 1, line 22 to page 2, line 2, page 10, lines 10-16page 25, lines 5-8 and 21-23, page 28, lines 8-13, page 29, lines 8-15, page 32, lines 13 and 14, page 52, lines 6-11, page 105, lines 15-21, page 106, line 23 to page 108, line 25, and claims 48-50 at page 130.	1, 2, 5-8, 10-12, 14-18, 23, 24, 29-32																		
Y	US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.	9, 13, 19-22, 25-28, 33																		
A	US 5,820,879 A (FERNANDEZ et al) 13 October 1998 (13.10.1998). See entire document.	1-33																		
Y	US 5,955,096 A (SANTOS et al) 21 September 1999 (21.09.1999). See entire document, especially column Table 1 at column 10, column 11, line 48-61, column 13, lines 32-47, column 15, lines 1-8, and column 16, lines 31-34.	24-28, 33																		
Y	Databases Medline on STN, Accession Number 2000265285, US National Library of Medicine, LARSEN et al. Antisense properties of peptide nucleic acid, Biochim. Biophys. Acta, 10 December 1999 (10.12.1999), Vol. 1489, No. 1, page 159-166, see abstract.	9																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.																		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 23 July 2003 (23.07.2003)		Date of mailing of the international search report 14 OCT 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  Richard Schnizer, Ph.D. Telephone No. 703-308-1123																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/04937

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN Biosci cluster
WEST

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 47/30	
A 6 1 K 47/30	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/44	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 K 37/02	
// A 6 1 N 1/30	A 6 1 N 1/30	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヘドリー マリー リン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン フォールン ロード 51

(72)発明者 ワン ダキング

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード セルフリッジ ロード 7

F ターム(参考) 4C053 HH01

4C076 AA08 AA09 AA12 AA16 AA30 BB40 CC03 CC04 CC27 CC32
DD63 EE01 EE24A EE41 FF04
4C084 AA13 AA30 BA01 BA35 MA17 MA28 MA43 MA70 NA10 ZB08
ZB11 ZB26 ZB35