

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5646851号  
(P5646851)

(45) 発行日 平成26年12月24日(2014.12.24)

(24) 登録日 平成26年11月14日(2014.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	A
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 7 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2009-537218 (P2009-537218)	(73) 特許権者	505209061
(86) (22) 出願日	平成19年11月16日(2007.11.16)		ジェネトロニクス、インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2010-510218 (P2010-510218A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア 921
(43) 公表日	平成22年4月2日(2010.4.2)		21-1318, サンディエゴ, ソレント
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/024051		バリー ロード 11494
(87) 国際公開番号	W02008/063555	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成20年5月29日(2008.5.29)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成22年10月5日(2010.10.5)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/859,724		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成18年11月17日(2006.11.17)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エレクトロポレーション支援ワクチン投与及び追加投与を用いた免疫応答の増強方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類における免疫応答を増強させるためのワクチン組成物であって、ここで、当該ワクチン組成物は、第一の時点で、第一組織送達部位に、第一ブーストとして前記哺乳類に投与され、第二の時点で、第二組織送達部位に、追加ブーストとして前記哺乳類に投与されることを含んでなり、前記哺乳類に投与される追加の送達は、前記第一の時点の後、2～30日間で行なわれ、ここで前記ワクチン組成物は抗原をコードする核酸を含んでなり、当該抗原が前記哺乳類において前記核酸から発現可能であり、前記第一組織送達部位は、皮膚、真皮及び真皮下の組織からなる群から選択される組織であり、前記第二組織送達部位は、筋肉、横紋筋及び平滑筋からなる群から選択される組織である、組成物。

10

【請求項 2】

前記第一及び追加ブーストの投与が、前記第一及び/又は追加ブーストの投与前、投与時又は投与後に、少なくとも1回のエレクトロポレーションの電気パルスを含んでなり、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

前記哺乳類がヒトである請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項 4】

哺乳類を免疫するためのワクチン組成物であって、ここで当該ワクチン組成物は、第一の時点で、哺乳類の第一組織投与部位へ、少なくとも1の第一ブーストとして前記哺乳類へ送達され、第二の時点で、哺乳類の第二組織投与部位へ、少なくとも1の追加のボーラ

20

スとして前記哺乳類へ送達され、ここで前記ワクチン組成物は抗原をコードする核酸を含んでなり、当該抗原が前記哺乳類において前記核酸から発現可能であり、前記第一組織投与部位は、皮膚、真皮及び真皮下の組織からなる群から選択される組織であり、前記第二組織投与部位は、筋肉、横紋筋及び平滑筋からなる群から選択される組織である、組成物。

【請求項 5】

前記第一及び追加ボースの投与が、前記第一及びノ又は追加ボースの投与前、投与時又は投与後に、少なくとも 1 回のエレクトロポレーションの電気パルスを含んでなる、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記哺乳類がヒトである請求項 4 又は 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

第一組織部位への前記組成物投与は、第二組織部位への前記組成物投与と、3 日～4 週間の時間間隔がある、請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ワクチン及びその投与に関するものである。さらに具体的には、本発明は、哺乳類における抗原薬剤に対する免疫応答の誘導及び増強に関するものである。これは、哺乳類に、第一の免疫応答性組織における前記抗原の予備投与を行い、その後に、哺乳類に、第二の体組織における前記少なくとも 1 の追加投与を行うことにより、免疫応答の誘導及び増強がなされる。ここで、予備投与及び追加投与の少なくとも 1 つはエレクトロポレーション法を用いてなされるものである。

【背景技術】

【0002】

以下の記載は本発明の理解のために有効な情報を含む。当該記載は、かかる情報を本発明の特許請求の範囲記載の発明に対する従来技術又は関連技術であると認めるものではなく、直接的又は間接的に参照される文献を従来技術と認めるものでもない。

【0003】

ワクチン投与の技術分野においては、一般的にワクチン投与は、シリンジと針を用いる注射によって、皮下あるいは筋肉内 (IM) 組織のいずれかに投与されるものである。従来は、最初のワクチン投与の後に、1 又は複数回の追加刺激の注射が最初の注射と同じ手順で投与され、これはしばらく経ってから、又は典型的には最初の投与から 2～6 週間経過して初めて行われる。いくつかの事例によれば、2 回目の追加投与は第二インターバルで行われるが、この第二インターバルは多くの場合第一インターバル (即ち、最初の (又は「予備刺激の (priming)」) ワクチン投与と 1 回目の追加ワクチン投与の間の期間) よりも長い。インターバルの間に一般的に免疫系が応答し、これには、例えば、ワクチンの抗原化合物に対する抗体の増加 (いわゆる「体液性」免疫) によるもの、及びノ又は、細胞障害性 T リンパ球などの細胞性免疫応答の誘導によるものがある。抗体産生に関しては、ほとんどの場合追加投与後約 4～8 週で抗体値レベルは最大値に達する。

【0004】

多くの疾患では、身体が感染やある種の腫瘍の進行と闘うための準備状態を維持するための免疫系の追加刺激が必要である。しかし、単一の組織型における追加刺激は、常に最適な免疫応答をもたらすわけではない。多くの要因が免疫応答の質に影響を及ぼしており、例えば、強い免疫応答を誘導しない抗原もあれば、強い免疫応答や、炎症性又は時に制御性の免疫応答を誘導し得る抗原もある。多様な抗原に対する免疫系応答のばらつきが、ワクチン開発における主な懸案事項である。パイオテロリズムの出現や病原体の高伝染性種が生物兵器として使われる可能性、また、哺乳類と鳥類の病原菌 (例えば HIV、SARS、H5N1 等) の、種内又は種間における、進化及び急速拡散する潜在能力によりもたらされる危険性がある。よって当該分野においては、大個体群において着実な手法で、

10

20

30

40

50

強固で広範に及ぶ免疫応答を早急に誘導できる手法により、個体群にワクチン投与する方法論の提供が求められている。

【 0 0 0 5 】

本発明は、まさに前記手法におけるワクチン投与技術を発展させたものであり、標的抗原に対する免疫応答を増強させるための方法であって、予め選択した組織に予備刺激及び追加刺激用組成物を、エレクトロポレーション法を用いて投与することを含んでなる方法を提供するものである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

ある一の態様によれば、本発明はワクチン組成物を皮膚及び／又は筋肉組織に投与することを含んでなる。この態様のいくつかの実施態様によれば、本発明はワクチン組成物の投与のための投与計画を含んでなり、ここで最初のボーラスは1の組織型に投与され（例えば、筋肉、皮膚、皮下空間、粘膜、鼻腔内に、又は肺で吸入される）、（1又は複数の）追加投与は異なる（又は第二の）組織型に送達される。特に好ましい実施態様によれば、最初の予備ボーラスは皮膚に投与され、追加ボーラスは筋肉組織に投与されるものである。他の実施態様によれば、最初のボーラスは筋肉に投与され、1又は複数の追加投与は皮膚組織に送達されてもよい。

【 0 0 0 7 】

他の態様によれば、本発明は、各々2日以上の間隔を置いた2回以上の投薬により投与されるワクチン組成物の送達におけるエレクトロポレーション（EP）の使用に関するものである。エレクトロポレーションは、特定の組織型中の細胞に適切に物質を送達する、任意の適切なエレクトロポレーション装置で行うことができる。例えば、皮膚組織細胞への物質投与用エレクトロポレーションとしては、非侵襲的電極を用いて経皮的又は経粘膜的エレクトロポレーションが可能な任意の装置、又は、エレクトロポレーションされるべき組織、例えば皮膚（経皮的でも経粘膜的でもよい）、粘膜又は筋肉に電極を直接挿入して組織をエレクトロポレーションできる、針状電極を有するその他の装置がある。

【 0 0 0 8 】

さらに本発明の他の態様は、エレクトロポレーションを用いてワクチンを患者に投与する方法に関するもので、これは、同量同質の免疫原のエレクトロポレーション不存在下で、又は、1の組織型のみにおける投与の後に観察されることが予想される免疫応答と比較して、増強した免疫応答を引き起こすようにしたものである。

【 0 0 0 9 】

さらなる態様によれば、本発明はエレクトロポレーション補助的な投与に関するもので、投与するワクチンは、弱毒化又は不活性化された細菌又はウイルス；タンパク質、ポリペプチド又はペプチド等の形態の抗原から構成される。あるいは、投与する核酸（又は多様な核酸種）は、1又は複数の抗原をコードしており、中でも特定の核酸は体組織に投与され組織内の細胞に取り込まれた後、コードされた抗原を直接発現することができるものである。

【 0 0 1 0 】

さらに他の態様によれば、本発明は、より高速かつ強力な、体液性及び／又は細胞性（即ちT細胞）免疫応答を誘導する能力を含む免疫応答を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

以上及びその他の態様及び実施態様は、以下の図、詳細な説明及び添付の特許請求の範囲を参照することにより明らかにされるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図1】図1は、ヒトIgGをコードするDNAプラスミドをウサギの選択した組織に対して注射及びEPした後の、ウサギの抗ヒトIgG抗体値の結果を示すグラフである。エラーバーは平均の標準偏差を表す。

10

20

30

40

50

【図 2 A - B】図 2 A 及び B は、Balb/cマウスの異なる同齡集団における B 型肝炎の表面抗原に対する抗体産生の結果を示すグラフである。図によると、皮膚へ第一接種とその後 6 日目の筋肉への追加刺激に、エレクトロポレーションを組み合わせた場合は、増強された抗体値レベルを示す。

【図 3 A - B】図 3 A 及び B は、Balb/cマウスの異なる同齡集団における B 型肝炎の表面抗原に対する抗体産生の結果を示すグラフである。図によると、この結果は、図 2 A 及び B で得られた結果を裏付けるものである。特に、エレクトロポレーションと同時に筋肉への追加刺激を行った場合、最初の接種後 20 日で増強された抗体値レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本発明は、病原体、感染性物質及び他の疾患状態（例えば癌）のワクチンを、エレクトロポレーションを用いて送達する方法に関するものであり、そのワクチン組成物は 1 又は複数の投薬で時間をかけて投与されるものである。但し、本方法は独創的な認識に基づくものであり、第一の組織、例えば皮膚組織への最初のポーラス送達、それに続く異なる第二の組織、例えば筋肉組織への追加刺激を行うとともに、エレクトロポレーションを用いて、前記組織の少なくとも一方、好ましくは双方の細胞へのワクチン組成物を直接送達することにより、哺乳類において増強された免疫応答を得るものである。いくつかの好ましい実施態様においては、実際には、最初の（又は予備刺激）投与は、具体的な疾患又は不調の治療用抗原の、皮膚組織に対するエレクトロポレーション支援送達を含んでなり、一方、1 又は複数の続く「追加刺激」投与は、同時にエレクトロポレーションを実施しつつ筋肉組織へ送達する（即ち、抗原（又は抗原をコードする核酸）の送達前、送達時又は送達後にエレクトロポレーションすることにより、抗原（又は核酸）の取り込みを向上させる）。他の好ましい実施態様によれば、予備刺激は選択的に、同時の E P 及び筋肉への最初のポーラスにより行われ、続いて皮膚組織への追加刺激が行われる。

【 0 0 1 4 】

E P 支援ワクチン送達においては、多様なタイプの電極を含んでなるエレクトロポレーション装置を用いて、ワクチンを送達することができる。例えば、皮膚組織（例えば角質層、真皮及び真皮下の組織）のエレクトロポレーションに関する場合、エレクトロポレーション装置は非侵襲的電極を使用してもよく、例えば湾曲電極及び環状電極が、米国特許第 6,009,345 号、米国特許第 5,968,006 号及び米国特許第 6,972,013 号に記載されている。さらに、例えば P C T 出願国際公開第 02/072781 号記載の非侵襲的電極及び米国特許第 5,439,440 号記載のキャリパー電極を使用してもよい。関連する好ましい実施態様によれば、ワクチンを皮膚表面に対して局所的な適用を介して送達してもよく、例えば陽電性パルス又はパルス列（pulse train）を用い、角質層の表面を通し皮膚組織の深部に抗原を運搬する「経皮的エレクトロポレーション」による方法がある。他の好ましい実施態様によれば、皮膚組織（例えば、真皮又は真皮下）に針とシリンジ、針無しジェット式注射装置（例えば Biojector）、皮膚パッチ送達系又は任意の他の適切な方法を用い、それと併せて、任意の適切な構造の電極、例えば湾曲状、環状又は点状電極を用い、皮膚組織に対して陽電性パルス又はパルス列を同時に与えることで、ワクチンを投与する。

【 0 0 1 5 】

皮膚組織におけるワクチン接種は、侵襲的電極を用いて行ってもよく、例えば、針状電極、微小電極又はジェット装置から放出される導電性流体ジェットにより形成される電極がある。いくつかの実施態様によれば、針状電極は、体組織に抗原物質を送達するために使用できる、中空針を含んでなるものであってもよい。皮膚投与に関しては、例えば分離した皮下用針、ジェット式注射又は電極それ自身を介し、その後 1 又は複数の陽電性パルスを印加することにより、ワクチン組成物を真皮下皮膚組織に注射してもよい。

【 0 0 1 6 】

ワクチン組成物の筋肉組織への投与に関しては、針とシリンジ又はジェット式注射（ワクチンを送達可能なものでもよい）による、筋肉へのワクチン送達と共に（多くは、その後）典型的には針型電極が同時にパルスを受ける。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の方法で用いる針型電極は、意図した目的に合わせた任意の適切な針型電極、例えば上記特許又は、米国特許第5,273,525号、米国特許第6,110,161号、米国特許第6,261,281号、米国特許第6,958,060号、PCT出願国際公開第01/85202号及び国際公開第/2007/095140号のいずれかに記載のものが挙げられ、それら全てが各々全体で参照されることにより本明細書に組み込まれる。

## 【 0 0 1 8 】

以上から理解されるように、本発明は、最初のワクチン接種を第一の組織（例えば、皮膚組織）に行い、その後、第二の組織（例えば、筋肉組織）において、1又は複数回、追加刺激することで、免疫応答の増強を提供するものである。多数の追加刺激投与を含む実施態様においては、二回目以降の追加刺激は、最初の追加投与量で投与された組織とは別の組織型に投与されてもよい。特定の理論に束縛されるのを望むものではないが、皮膚組織における予備刺激及び筋肉における追加刺激を含む方法により、少なくとも一部において増強された免疫応答が生じるのは、皮膚へのワクチン接種が、送達された抗原の免疫処理に影響を及ぼすことができる樹状突起細胞を比較的高濃度にし、一方、筋肉への追加投与が、抗原が細胞性応答を与える細胞において処理され、筋肉区画（compartment）における抗原を比較的長時間存在させるためであると考えられる。したがって、1又は複数のペプチド又はポリペプチド抗原種をコードする、1又は複数の核酸種の送達が、ペプチド又はポリペプチド抗原の長期間発現を強化し、その結果、細胞性及び体液性の免疫系に対して、発現された抗原の比較的長期間の暴露をさせる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる実施態様によれば、投与方法は予備刺激から追加刺激の時期まで、適切な日数の間隔を置くことを含むものである。当然に、予備刺激と追加刺激の間（及び、それら2以上の追加刺激が意図され又は望まれる場合には追加投与の間）の具体的なインターバルは容易に確定することができ、それは以下の要因に依存するであろう。例えば、誘導される所望の免疫応答、送達される抗原、予備刺激及び追加刺激組成物が送達された組織型、送達される組成物のタイプ（例えば、各事例においてペプチド含有組成物、各場合において抗原コード核酸、1の事例（例えば予備刺激）においてペプチドで他の事例（例えば追加刺激）においてペプチドをコードした核酸）、予備刺激、追加刺激、又は予備刺激及び追加刺激との組み合わせにおけるEP使用の有無、組成物を投与される患者の年齢や状態等である。添付の図1に示した通り、免疫系が皮膚における予備刺激に反応できるような十分な期間予備刺激と追加刺激の間に間隔をあけるものと比較して、皮膚及び筋肉の両方への同時投与は、最善ではない。好ましい実施態様によれば、追加ボースは、ワクチンの予備ボースの投与から、1日から約4～7週間の間隔を空ける。特に好ましい実施態様によれば、予備及び追加ボース間の時間インターバルは、1日～7、14、20、30、35、40、45、50及び54日間であってもよい。特に好ましい実施態様によれば、インターバルは、2日、6日又は20日であってもよい。多数の追加投与が投与される場合は、連続する追加投与間のインターバルが同じ又は異なることがある。いくつかの好ましい追加投与間のインターバルとしては、1週間、2～4週間、1～3月、4、5、6、8及び10月、並びに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15及び20年が挙げられる。

## 【 0 0 2 0 】

既に記載した通り、本発明のワクチンとしては、中でも1又は複数の抗原性のペプチド、タンパク質又はポリペプチドをコードしており、その発現がプロモーター、好ましくは誘導性又は組織特異的なプロモーターにより調整又は制御される、遺伝子に基づくワクチンが挙げられる。これらのいくつかの好ましい実施態様によれば、ボースは、事前に決定されるインターバルの間、皮膚と筋肉両組織にそれぞれ予備刺激と追加刺激で送達される。ただし、本発明は、好適には皮膚になされる予備ボースと筋肉に送達される追加刺激の投与をする、予備刺激及び追加刺激接種の両方の同時投与も想定している。この種の特に好ましい実施態様によれば、筋肉に送達されるワクチン組成物は、誘発性プロモーターの制御下で抗原をコードする核酸を含んでなり、それは誘発性薬剤への暴露で誘発され

得、又は誘発性薬剤との関係で操作可能であり得る。従って、選択される時に、例えば予備刺激と追加刺激の同時投与後1～14日の間に、筋肉組織に送達された核酸にコードされる遺伝子発現が、問題の抗原の発現を誘導することができ、特定抗原に対する免疫応答性の誘導又は増強ができる。さらに他の実施態様によれば、予備刺激に使用されるワクチン組成物は、抗原ペプチドをコードする発現性の核酸を含んでなり、追加投与組成物は、前記抗原自身を含むペプチド又はポリペプチドを含んでなるものでもよい。前記実施態様においては、1又は複数のワクチン組成物（予備刺激又は追加刺激に使用される組成物）が同じ抗原の異なる形態を含んでいてもよい；例えば、組成物の1つが単一の抗原性ペプチド、タンパク質又はポリペプチド種で、組成物の他方が同じ抗原性ペプチド、タンパク質又はポリペプチド種の発現を誘導できる核酸を含んでなるものでもよい。さらに、予備刺激及び/又は追加刺激組成物は、任意の適切な遺伝子運搬体を含んでいてもよく、例えば、DNAもしくはRNAウイルス、ウイルス性ゲノム、「裸の」DNAベクター、プラスミド、又は導入される細胞のゲノムに組み込まれることを意図しない遺伝因子、（相同組換え、ランダム挿入又はその他の手法による）組み込みを意図したベクター又はその一部、ペプチド、タンパク質又はポリペプチド種、及び/又は、免疫応答が所望される場合に任意の具体的指示のためにデザインされた有機分子混合物が挙げられる。

10

#### 【0021】

ここで具体的に、代表的かつ非限定的な本発明の実施例を表し、皮膚へのワクチン組成物投与とその後の筋肉における追加刺激（両事例においてエレクトロポレーションを使用）の実験が、増強された免疫応答をもたらすことを述べる。

20

#### 【実施例1】

#### 【0022】

白色ニューージーランドウサギの3つの同齡集団（n=4）に、全ヒトIgGタンパク質をコードするDNAでワクチン投与した。ワクチン投与は、以下の同齡集団1～3に投与した。

1）0日目：筋肉注入（injection）のみ

2）0日目：皮膚接種；7日目：筋肉注入、各々エレクトロポレーションと共に

3）0日目：皮膚と筋肉両方ワクチン投与

#### 【0023】

筋肉組織に注入とエレクトロポレーションが可能な対の注入/電極を有する、装置Elgen1000（Inovio AS, Oslo, Norway）、及び皮膚のエレクトロポレーション用のキャリパー電極（9mm×9mm）を有するBTX ECN820を用いてエレクトロポレーションを実施した。皮膚及び筋肉の両投与に対し、ワクチン溶液の真皮又は真皮下注入後、それぞれに電場をかけた。皮膚に対するワクチン投与は、ウサギ背側皮膚に、30 µg/30 µLのIgGコードDNA溶液を注入するため28G針を用いて行った。筋肉に対する接種は、200 µL DNA/針=400 µL/注入部位、又は、20 µg/400 µL hIgGを用い、ウサギ大腿四頭筋にi.m.注入をおこなった。

30

#### 【0024】

エレクトロポレーション条件：

筋肉：250 mA、20 ms、2 パルス、100 ms 間隔(10Hz)、2 針配列（2-needle array）、21 G 針、2 針電極間距離 2 mm、200 µl/針、全挿入深さ 1 cm、注入深さ 0.7 cm。

40

皮膚：100 V/mm、10ms、5 パルス、1 s 間隔、30 µL/部位。

#### 【0025】

図1に示す通り、筋肉にのみ又は皮膚と筋肉に、予備刺激としてのみワクチン投与を実施した場合に対し、皮膚と筋肉においてそれぞれ予備刺激及び追加刺激を行った場合、ウサギにおけるヒトIgGに対して発生した抗体値は、驚くほど大幅に高かった。従って、異なる組織に対する抗原薬剤の時間間隔をあける投与は、当該抗原薬剤に対する免疫応答性を増強させ得ることを本実験は示している。当該方法は、循環器系での当該薬剤に対するより高速かつより高レベルな抗体の出現をもたらすものである。

#### 【実施例2】

#### 【0026】

50

本実施例においては、皮膚における予備刺激及び第二組織（例えば筋肉）における追加刺激の驚くべき優位性と共に、エレクトロポレーションの追加的な優位性を、（BALB/c）マウス免疫モデルを用い、抗原特異的な抗IgG 1 及び抗IgG 2 a抗体値を、ELISAで測定する研究を行った。抗IgG 1 及び抗IgG 2 a抗体の両方の使用により、本発明に従う免疫投与計画（regimen）が炎症性の細胞媒介型免疫に関連する応答（TH 1 応答とも言う）、及び体液性免疫の調整に関連する応答（TH 2 応答とも言う）を増強させるという確証を提供するものである。

#### 【 0 0 2 7 】

第一の実験において、Balb/cマウスの5の同齢集団（n=7）を、マウス大腿四頭筋の皮膚（真皮）か筋肉組織のいずれかに、B型肝炎表面抗原をコードするプラスミドDNA（pDNA）（g-Wiz- HBsAg）（Aldevron LLC, Fargo, ND, USA）を30 µg/30 µLワクチン投与し、その後エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、筋肉においてはElgen1000装置（Inovio Biomedical Corp, San Diego）、皮膚においてはBTX ECM 820を用いて行った。

#### 【 0 0 2 8 】

筋肉治療用エレクトロポレーションを、50 V、電流制限250mA、5パルス、20msパルス長、100ms間隔を用いて実施した。皮膚（真皮）組織用としては、キャリパー電極を用い、パラメータが3パルス、10msパルス長、150 V/mm、パルス間1 s間隔でエレクトロポレーションを行った。

#### 【 0 0 2 9 】

同齢集団1に、0日目に皮膚（真皮下）組織に予備接種を行った（S0）。

同齢集団2に、0日目に筋肉に予備接種を行った（M0）。

同齢集団3に、0日目に皮膚（真皮下）及び筋肉に予備接種を行った（S0M0）。

同齢集団4に、0日目に皮膚（真皮下）に予備接種、その後2日目に筋肉に追加刺激を行った（S0M2）。

同齢集団5に、0日目に皮膚（真皮下）に予備接種、その後6日目に筋肉に追加刺激を行った（S0M6）。

#### 【 0 0 3 0 】

抗HB血清特異的免疫応答を、ELISAで測定した。（A）抗HB抗体のIgG1抗体値終点の相乗平均（±標準偏差）を異なる時点で決定した（最初の免疫化後、14、21、28及び42日目）。統計的有意差は42日目で記録され、\* $p < 0.05$ であった。（B）抗HB抗体のIgG2a抗体値終点の相乗平均（±標準偏差）を異なる時点で決定した。統計的有意差はまた42日目で記録され、\* $p < 0.05$ であった。

#### 【 0 0 3 1 】

上記プロトコルの結果を、図2 A及びBに示した。明らかに、本ワクチン投与計画は、疾患標的抗原（例えばB型肝炎抗原）に対する（抗体）値の増加をもたらしている。当該処置投与計画は、体液性及び細胞性応答の両方を増強した。例えば、図2 Aは抗HB抗体のIgG1抗体値（体液性）、図2 Bは抗HB抗体のIgG2a抗体値（細胞性）の免疫応答を示す。驚くべきことに、2の異なる組織に同時接種した場合でも、あるいは一方又は他方の組織型のみに同時接種した場合も（例えば、皮膚と筋肉又は皮膚か筋肉）は、エレクトロポレーションを用いた皮膚における予備刺激とその後の筋肉における追加刺激を含んでなる接種計画の場合と比べ、低い値をもたらした。さらに驚くべきことに、増強効果は予備刺激及び追加刺激との間がわずか2日という少ない日数の場合でも観察された。

#### 【 0 0 3 2 】

さらなるデータでは、第二組織（例えば筋肉）における追加投与は、第一接種から遅らせることができ（ここでは20日程度まで）、さらに皮膚（真皮）組織における予備刺激と筋肉組織における追加刺激の両方にエレクトロポレーションを用いることを含んでなる免疫投与計画が、増強された免疫効果を示した。具体的には、Balb/cマウスの5の同齢集団（各同齢集団でn=7）に対し、マウス大腿四頭筋の、皮膚（真皮）組織か筋肉組織のいずれかにプラスミドg-Wiz-HBsAg（Aldevron LLC, Fargo, ND）を30 µg/30 µL接種した。筋

肉処置用には、Elegan1000ツインインジェクター (Inovio Biomedical Corp, San Diego) を用い、50 V にセットしパルスパラメータ (pulsing parameter)、制限電流250mA、5 パルス、20msパルス長、100msパルス間隔でエレクトロポレーションを実施した。皮膚 / 真皮組織処置用には、キャリパー電極で、パルスパラメータとして3パルス、10msパルス長、150 V / mm、1 s間隔を用いてエレクトロポレーションを実施した。

#### 【 0 0 3 3 】

同齡集団 1 に、0 日目に皮膚 (真皮下) 組織に対し接種を行った (S0)。

同齡集団 2 に、0 日目に皮膚 (真皮下) 組織に、20日目に再び皮膚 (真皮下) 組織に対し追加接種を行った (S0S20)。

同齡集団 3 に、0 日目に筋肉組織に、20日目に再び筋肉組織に対し追加接種を行った (M0 M20)。

同齡集団 4 に、0 日目に皮膚 (真皮下) 組織に、20日目に筋肉組織に対し追加接種を行った (S0M20)。

同齡集団 5 に、0 日目に筋肉組織に、20日目に皮膚 (真皮下) 組織に対し追加接種を行った (M0S20)。

#### 【 0 0 3 4 】

図 3 A 及び B に本実験の結果を示す。具体的には、抗 H B 血清特異的免疫応答を、ELIS A で測定した。図 3 A では、第一のワクチン接種後28日及び42日での、抗 H B 抗体の IgG1 抗体値 (体液性応答) 終点の相乗平均 (±標準偏差) を示す。統計的有意差は42日目で記録され、 $p < 0.05$  である。図 3 B では、抗 H B 抗体の IgG2a 抗体値 (細胞性) 終点の相乗平均 (±標準偏差) を示す。統計的有意差 ( $p < 0.05$ ) は42日目で記録される。これらの結果から、1 の組織型におけるワクチンの患者へ予備刺激と、第二組織型における追加刺激の確かな優位性があることが明らかになる。具体的に好ましい実施態様によれば、皮膚 (真皮) 組織においてエレクトロポレーションを経て予備刺激を行い、筋肉においてエレクトロポレーションを経て追加刺激を行うことの優位性が認識される。さらに、第一の接種後、少なくとも2日目、好ましくは6及び/又は7日目、さらに7日目の後も好ましく例えば20日目での追加刺激からしばらく遅れての追加刺激の利益が観察される。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書で開示及び請求する全ての組成物及び方法は、本出願に照らして過度の実験なく作成及び実行することができる。一方、本発明の組成物及び方法は、好ましい実施態様の観点で記載しており、本発明の精神及び範囲から逸脱しない場合は、前記組成物及び方法、並びに明細書で述べた方法のステップ又はステップの順番に変更を適用してもよいことは当業者にとって明らかであろう。さらに具体的には、記載の実施態様はいかなる観点においても、単に実例的な及び非限定的なものとして、考慮されるべきものである。当業者にとって明らかな、全ての同様の置換及び変更は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神及び範囲内であると考えられる。

#### 【 0 0 3 6 】

全ての特許、特許出願、及び本明細書中で述べた文献は、本発明が属する分野のレベルを示すものである。各個別の文献が具体的に及び個別に参照として組み込まれているのと同程度に、全ての特許、特許出願、及び出版物、例えば優先権又は他の利益を請求されるものが参照として明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 3 7 】

明細書に、適切に実例的に記載された発明は、本明細書中に具体的に開示されていない任意の要素の不存在下で実施してもよい。従って、例えば明細書における各例において、「含んでなる (comprising)」、「本質的に含む (consisting essentially of)」及び「含む (consisting of)」という用語はいずれも、他の用語と互いに置き換えてもよい。使用される前記の用語及び表現は、説明の用語として使用され、制限の用語として使用されるものでない。また前記用語及び表現の使用が、その全体又は部分に提示及び記載された任意の同等な特徴を除外することを暗示する意図はなく、請求される本発明の範囲内で、多様な修正も可能であると認識される。従って、本発明は好ましい実施態様及び任意の



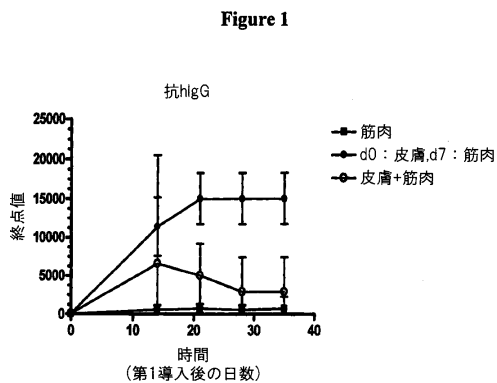
特徴により具体的に開示したが、当業者による明細書中に開示した概念の修正及び変更が行われてもよく、前記修正及び変更は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内であるとみなされる。

【 0 0 3 8 】

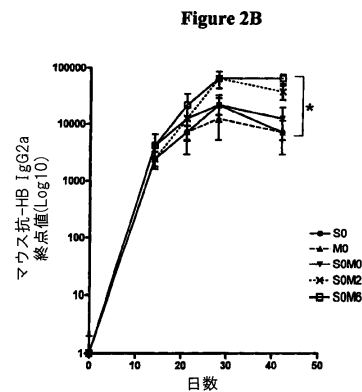
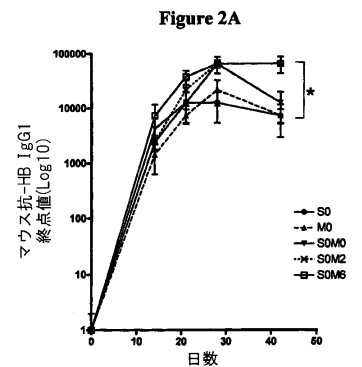
本発明は特許可能な過程と方法に関するものである。本発明による「特許可能な」過程又は方法は、ちょうど特許可能な機械、工業製品、物質の組成物と同様に、解析 (analysis) が行われる時点でその主題が法定の特許要件を全て具備することを意味する。新規性、非自明性又はその類のものについては、例えば本願添付の請求の範囲の1又は複数が、新規性、非自明性等を否定される1又は複数の実施態様を包含していることが審査の後に明らかになった場合は、定義により「特許可能な」実施態様が制限され、具体的には特許不可能な実施態様は排除される。また、本願添付の請求項は、最も幅広く妥当なスコープを提供し、且つその有効性も維持していると解釈されるべきである。さらに、1又は複数の法定特許可能要件が改正された場合、又は、本出願が提出又は特許として公開される時から、1又は複数の添付した請求項の有効性を疑問視される時まで、特定の法定特許可能要件を具備するかについて評価するための基準が変更した場合、請求項は(1)有効性を維持し、(2)最も幅広く妥当な解釈を当該環境下で与えるもの、という順序で解釈されるべきである。

10

【 図 1 】



【 図 2 A - B 】



## 【図3A - B】

Figure 3A

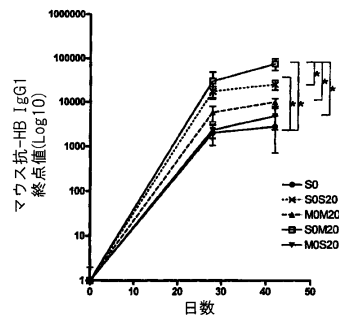
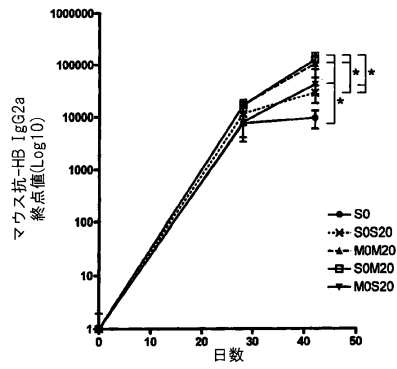


Figure 3B



## フロントページの続き

- (74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝
- (72)発明者 マティーセン, イアコブ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4
- (72)発明者 チェッレ, エリザベート トルン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4
- (72)発明者 チェケン, ルネ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4
- (72)発明者 ラブッセイ, ディートマール  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4
- (72)発明者 リン, フェン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4

審査官 吉田 佳代子

- (56)参考文献 国際公開第00/045823 (WO, A1)  
特表2005-513062 (JP, A)  
特表2003-509470 (JP, A)  
国際公開第2005/067966 (WO, A1)  
特表2005-518430 (JP, A)  
SUDARSHAN, M.K. et al., The National Medical Journal of India, 2006年 8月, Vol.19, p.192-194  
GONZALEZ, M.L. et al., Vaccine, 1990年, Vol.8, p.402-405  
GRAMZINSKI, R.A. et al., Molecular Medicine, 1998年, Vol.4, p.109-118  
Methods in Molecular Biology, 1995年, Vol.48, p.63  
CHAKRABARTI, R. et al., The Journal of Biological Chemistry, Vol.264, No.26, p.15494-15500  
TIMMERMAN, J.M. et al., Cancer Research, 2002年, Vol.62, p.5845-5852  
LUND, L.H. et al., Cancer Gene Therapy, 2003年, Vol.10, p.365-376  
SELBY, M. et al., Journal of biotechnology, 2000年, Vol.83, No.1-2, p.147-52  
BABIUK, S. et al., Vaccine, 2002年, Vol.20, No.27-28, p.3399-3408  
BUCHAN, S. et al., Journal of immunology, 2005年, Vol.174, No.10, p.6292-8  
ZHAO, Y. et al., Vaccine, 2005年 9月, Vol.24, No.7, p.897-903  
ALPAR, H.O. et al., Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 2002年, Vol.19, No.4-5, p.307-83

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8  
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0  
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 P 3 7 / 0 4

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )