

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4110329号
(P4110329)

(45) 発行日 平成20年7月2日(2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int.Cl. F I

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 9/12 (2006.01)

A 6 1 K 9/72 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 9/12

A 6 1 K 9/72

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 11/00

請求項の数 14 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-512453	(73) 特許権者	トランスジーン ソシエテ アノニム
(86) (22) 出願日	平成6年10月26日(1994.10.26)		フランス国 67000 ストラスブール
(65) 公表番号	特表平8-505405		リュ ドゥ モルシャイ 11
(43) 公表日	平成8年6月11日(1996.6.11)	(74) 代理人	
(86) 国際出願番号	PCT/FR1994/001245		弁理士 三枝 英二
(87) 国際公開番号	W01995/011664	(74) 代理人	
(87) 国際公開日	平成7年5月4日(1995.5.4)		弁理士 掛樋 悠路
審査請求日	平成12年11月10日(2000.11.10)	(74) 代理人	
(31) 優先権主張番号	93/12743		弁理士 小原 健志
(32) 優先日	平成5年10月26日(1993.10.26)	(72) 発明者	セネ クロード
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス国 67190 ミューツイヒ
			リュ フォフ 12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウィルスのエアロゾルの調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 6 ~ 12 g / l の 1 価のカチオンの塩を含む水溶液中に $10^4 \sim 10^{13}$ p f u の組換えアデノウィルスを含むウィルス懸濁液の希釈物に対応する希釈ウィルス懸濁液を調製し；および (b) 該希釈ウィルス懸濁液を 1 ~ 3 . 5 バールのガス圧を用いて噴霧化することを特徴とする、哺乳動物の気道を介してその投与を可能にするウィルスのエアロゾルの製造方法。

【請求項 2】

希釈ウィルス懸濁液を 2 ~ 3 . 5 バールのガス圧で噴霧化することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記希釈がウィルス懸濁液 / 水溶液の体積比が 1 : 5 ~ 1 : 20 に従うようになされることを特徴とする請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 4】

前記希釈がウィルス懸濁液 / 水溶液の体積比が 1 : 10 ~ 1 : 20 に従うようになされることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記希釈がウィルス懸濁液 / 水溶液の体積比が 1 : 12 ~ 1 : 18 に従うようになされることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも $10^4 \sim 10^{13}$ p f u のウィルスを含むウィルス懸濁液を $6 \sim 12$ g / l の 1 価のカチオンの塩を含む水溶液中に希釈することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】

ウィルス懸濁液を塩化ナトリウムおよび塩化カリウムからなる群から選ばれた 1 価のカチオンの塩を $6 \sim 12$ g / l 含む水溶液中に希釈することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ウィルス懸濁液を約 9 g / l の 1 価のカチオンの塩を含む水溶液中に希釈することを特徴とする請求項 6 および 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 9】

ウィルス懸濁液が、そのゲノム中に該ウィルスの異種タンパク質をコードする DNA フラグメントが挿入された組換えウィルスの懸濁液であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

ウィルス懸濁液が、そのゲノム中に C F T R タンパク質をコードする DNA フラグメントが挿入された組換えウィルスの懸濁液であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ウィルス懸濁液が $10^6 \sim 10^{12}$ p f u のウィルスを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 12】

ウィルス懸濁液が $10^8 \sim 10^{11}$ p f u のウィルスを含むことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法を行うことにより得られるエアロゾルを含む、肺疾患の治療を意図した医療用製品 (medicinal product) 。

【請求項 14】

嚢胞線維症、肺気腫、ぜん息または肺癌の治療を意図した請求項 13 に記載の医療用製品。

30

【発明の詳細な説明】

本発明は、ウィルスを含むエアロゾル (aerosol) の調製方法に関する。

種々の物質、特に医薬物質のエアロゾル製剤は、非常に長い間、知られている。安定性および無視できる沈降率が、エアロゾルの必須の特徴をなす。他方、この理由の故に、粒子が互いに凝集したり、あるいは高い沈降率のような優れた有効性と相容れない特性を防止するために、構成成分の配合割合は、特に湿気および温度の程度のような異なる外界のパラメーターによる多数の特定の制約を満足させねばならず、他方で、その製剤は、吸収された有効成分が迅速に分解する傾向がある、空気の汚染物質に対する気道の防御 (清浄化メカニズム) の効率に主として関連する多数の困難な事態を考慮に入れなければならない。

特に、有効成分が、ウィルスから成る場合、ウィルス粒子の完全性 (integrity) が、肺上皮の細胞への感染および侵入に必要であり、それによりエアロゾルを得るための非常に特殊な条件を負荷することになる。

40

一般的に言えば、エアロゾル化 (aerolization) する間、ウィルスは、3 つの主たる理由の結果、不活化され得る。まず、感染力の消失が、噴霧化 (nebulization) の過程 (気道中への噴霧) の際にウィルスが被る障害の結果として生じ得、それはまた、脱水によりエアロゾル中で不活化され得、そして最後には、気道の全体を覆い非常に多数の (タンパク質分解およびその他の) 酵素を有する粘液により示される潜在的に不利な環境中で分解され得る。

ウィルス不活化は、エアロゾルを得るために特定の条件の噴霧化およびパッケージングを使用する本発明の方法を適用することにより制限され、適当な限度内に維持され得るこ

50

とが示されている。さらに、この方法は、ウィルスを、肺、特に気管気管支の通路に、効果的に適切な量で、送り込むことを可能にする。

従って、本発明の主題は、特に哺乳動物の気道を介して投与することを可能にする、ウィルスのエアロゾルを得るための方法であり、以下により特徴付けられる：

(a) 少なくとも $6 \sim 12 \text{ g/l}$ の 1 価のカチオンの塩または $50 \sim 100 \text{ g/l}$ のヘキソースを含む水溶液中に、 $10^4 \sim 10^{13}$ プラーク形成単位 (p f u) のウィルスを含むウィルス懸濁液の希釈物に対応する、希釈ウィルス懸濁液を調製し；

(b) 希釈ウィルス懸濁液を、 $0.5 \sim 3.5$ バールの空気圧または $2 \sim 5 \text{ MHz}$ の超音波周波数を用いて噴霧化 (nebulize) する。

本発明に従う方法は、エアロゾルにより投与され得る非常に多数のウィルス、特に、ボックスウィルス、レトロウィルス、ヘルペスウィルス、アデノ関連性ウィルス、ライノウィルス、インフルエンザウィルスおよびアデノウィルスからなる群から選ばれるウィルスに適用可能である。

本発明の論旨において、用語「ウィルス」は、自然界に見出されるような天然のウィルス、およびゲノムが、それが起源とする親ウィルスに対して改変を含む修飾されたウィルスの両方を表す。それは、それが由来する天然のウィルスに対して、その病原性の全てまたは一部を失った、弱毒化されたウィルスであることができる。そのゲノムは、インビボで、細胞培養中または生物中の、連続的な継代の過程で修飾される。

用語「ウィルス」はまた、そのゲノムが、インビトロで遺伝子工学的技法により修飾された、組換えウィルスを指すこともできる。この修飾は、例えば、ウィルス複製に必須な少なくとも 1 つの遺伝子が不活化されるのを可能とし (ウィルスを複製に関して不完全なものにする)、および/または異種タンパク質 (天然ウィルスにより通常コードされない) をコードする DNA フラグメントが挿入されるのを可能にする。挿入は、ウィルスゲノムの適切な領域で起こり、異種 DNA フラグメントの宿主細胞内での発現を可能にする。宿主細胞は、該ウィルスにより感染され得るあらゆる真核生物、有益にはヒトの細胞および好ましくは気管気管支の通路の上皮細胞から構成される。

本発明の目的のために、異種 DNA フラグメントは、真核生物に、または、それが中に挿入されるもの以外のウィルスに由来することができる。それは、当分野において慣用されているあらゆる技法、例えば、クローニング、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) または化学合成により、単離され得る。それは、ゲノム型 DNA (天然遺伝子のイントロンのセットを全部または一部含む)、相補的 DNA 型 (cDNA; イントロンを欠く) またはミニ遺伝子、即ち、混合された型 (少なくともイントロンを全部または一部を含む) のフラグメントであり得る。

本発明により追求される目的に従って、異種 DNA フラグメントは、その発現に必要とされるエレメントの制御下に、置かれ得る。「必要とされるエレメント」とは、該 DNA フラグメントのメッセンジャー RNA (mRNA) への転写、または mRNA のタンパク質への翻訳を可能とする、エレメントのセットを表す。

異種 DNA フラグメントは、(i) 細胞内タンパク質、(ii) 宿主細胞の表面に存在する膜タンパク質、または (iii) 外界の培地に分泌されるタンパク質をコードすることができる。従って、それは、膜に向かって、または宿主細胞の外側にタンパク質の分泌を可能にするシグナル配列を含むことができる。

エアロゾルによる投与から恩恵を受けることが可能な多くの組換えウィルスは、当技術分野で記載されている。それらの構築および増殖は、当業者の能力の範囲内にある。例として、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン ($\alpha 1 \text{ AT}$) をコードするヒト遺伝子とそのゲノムに挿入されている $\text{Ad} - \alpha - 1 \text{ AT}$ (Rosenfeldら、1991、Science、252、431-434)、および CFT R (英語では、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) の貫膜コンダクタンスレギュレーター) タンパク質をコードするヒト遺伝子とそのゲノムに挿入されている $\text{Ad} - \text{CFT R}$ (Rosenfeldら、1992、Cell、68、143-155) が、言及され得る。

本発明に従う方法は、希釈ウィルス懸濁液の調製物を含む。この希釈懸濁液は、少なくとも $6 \sim 12 \text{ g/l}$ の 1 価のカチオンの塩または $50 \sim 100 \text{ g/l}$ のヘキソースを含む水

10

20

30

40

50

溶液中に $10^4 \sim 10^{13}$ p f u のウィルスを含む、ウィルス懸濁液の希釈物に対応する。この工程では、希釈されるべき懸濁液は、一般に、必要に応じて、マグネシウム、カルシウムまたはマンガンのような2価のカチオンを含む緩衝培地に播かれたウィルスから構成される。このタイプの懸濁液も、貯蔵に使用できる。凍結形態での貯蔵のためには、該懸濁液は、少なくとも10%の濃度のグリセロール、または約1Mの濃度のシュクロースのような安定剤を添加されるべきである。

希釈されるべきウィルス粒子の懸濁液は、必要に応じて、他の物質、特にヒト血清アルブミン(HSA)、尿素、グルタミン酸ナトリウム、グリシンおよびイノシトールを含むことができる。

本発明の方法に従うと、ウィルス懸濁液は、ウィルスを $10^4 \sim 10^{13}$ 、有益には $10^6 \sim 10^{12}$ および好ましくは $10^8 \sim 10^{11}$ p f u 含むことが必要であり；この懸濁液の活性は、特に使用されるウィルスに依存することがあり得る。

希釈されるべきこの懸濁液は、次に、懸濁液/水溶液の体積比が、1:5 ~ 1:20、有益には1:10 ~ 1:20、好ましくは1:12 ~ 1:18、および特に好ましいものとして約1:16に従うように、水溶液で希釈される。

該水溶液は、好ましくは、1価のカチオンの塩、好ましくはナトリウム塩またはカリウム塩、および特に好ましいものとして塩化カリウム、乳酸ナトリウムおよび/または塩化ナトリウムを6 ~ 12 g / l 含む。1価のカチオンの塩の濃度は、好ましくは6 ~ 10 g / l、特に好ましいものとして約9 g / l である。

水溶液が、ヘキソースを50 ~ 100 g / l、好ましくは約50 g / l 含むとき、考えられるヘキソースは、特にグルコースおよびマンノースである。

さらに、水溶液は、カルシウム塩、例えば塩化カルシウムのような他の化合物を含むことができる。

このように希釈された懸濁液は、気道において、ウィルスがそこを通過可能なほどに十分な、特別の安定性を付与されたエアロゾルを製造するのを可能とする。当然、他の操作手順により、対応するウィルス懸濁液を得ることが可能である。

希釈懸濁液の噴霧化は、ガス圧によるかまたは超音波により達成され得る。この噴霧化の条件も、本方法の実行の重要なパラメーターを構成する。本発明に従う方法の好ましい実施態様によれば、希釈懸濁液を、0.5 ~ 3.5 バール、特に好ましいものとして2 ~ 3.5 バールのガス圧にかける。あるいは、それを、2 ~ 5 MHz の、特に好ましくは約2 ~ 3 MHz の超音波周波数にかけても良い。ガス圧および超音波周波数も、噴霧器(nebulizer)により適用して良い。

一般的に言えば、噴霧器は、エアロゾルの投与を可能にする装置である。噴霧器は、いかなるタイプのものでも良く、その構造は、当業者に公知であり、これらの装置は市販されている。

使用される本方法が、ガス圧の適用を必要とするとき、空気または医療用酸素のような圧縮ガスの源または空気ポンプのいずれかに接続された、空気式タイプの噴霧器が、好適に使用される。希釈ウィルス懸濁液を超音波周波数で噴霧化に関しては、超音波タイプの噴霧器で、高い周波数で振動する水晶結晶板を取り付けたものを使用するのが好ましい。

本発明に従う方法は、治療的目的を意図したエアロゾルの調製に特に最も十分に適しており、気道の気管気管支の通路の中に最適な量のウィルス粒子を送り込む。

一般的に言えば、人間では、気道は、3つの異なる領域から構成される：

- 鼻から気管の上端にまたがる上部(upper part)；
- 気管の上端から終末の細気管支にまたがる気管気管支の通路；および
- 細気管支から肺胞嚢にまたがる肺胞領域。

本発明に従う方法を使用することにより治療されることが可能な疾病の中で、気管気管支の通路に影響を与える肺疾患、特に嚢胞線維症、肺気腫、ぜん息および肺癌が言及される。

この論旨の中では、本発明に従う方法を遂行することにより送り込むのに有利であるウィルスは、好ましくは、そのゲノムが、特に肺疾患の進行を阻止するか遅らせる、またはそ

れが確立するのを防ぐことが可能な、異種タンパク質をコードするDNAフラグメントを含むゲノムを有する組換えウイルスである。異種タンパク質の中で、以下のものが可能であるものとして言及され得る：

- 細胞膜を介して、直接的または間接的にイオンを移送すること、より詳細には、塩素 (Cl^-) またはナトリウム (Na^+) イオンの移送に関係する、例えばCFTRタンパク質 (Riordanら、Science、245、1066-1073)；
- 肺の、特に炎症状態に存在するプロテアーゼの活性を減少させる、例えば天然の $\alpha 1$ AT (Longら、1984、Biochemistry、23、4828-4837) または修飾された $\alpha 1$ AT (Jallatら、1986、Protein Engineering、1、29-35)；および
- 細胞性免疫を強化することにより腫瘍細胞の増殖をを阻害する、例えばインターロイキン (IL)、インターフェロン (IFN) または腫瘍壊死因子 (TNF)、および腫瘍抑制活性を有することにより腫瘍細胞の増殖を阻害する、例えばタンパク質 p53 (Bakerら、1989、Science、244、217-221) または Rb (Friendら、1986、Nature、323、643646)。

10

このリストは、限定的なものではない。文献中に、肺組織の破壊に関する、それらの抗腫瘍効果または抑制効果について記載されている他のタンパク質をコードするDNAフラグメントを使用して良い。

最後に、本発明はまた、以下に従う方法：

- (a) 希釈ウイルス懸濁液を少なくとも $6 \sim 12 \text{ g/l}$ の1価のカチオンの塩又は $50 \sim 100 \text{ g/l}$ のヘキソースを含む水溶液中に $10^4 \sim 10^{13} \text{ pfu}$ のウイルスを含むウイルス懸濁液の希釈物に対応するように調製する；
- (b) 希釈ウイルス懸濁液を、 $0.5 \sim 3.5$ パールのガス圧または $2 \sim 5 \text{ MHz}$ の超音波周波数で噴霧化する、

20

方法により調製されるエアロゾルを、気道の疾病、特に人間の肺疾患の、そのような治療を必要とする患者の鼻腔または口腔で、吸入により投与方法にも関する。

吸入は、1回の用量もしくは一定時間の間隔をおいて1又は数回繰り返す用量で、行うことができる。

本発明は、以下の実施例により、より完全に説明される。

実施例 1 10%のグリセロール存在下に貯蔵され、1価のカチオン溶液で希釈されたウイルス懸濁液由来のエアロゾルの調製

30

ローゼンフェルト (Rosenfeld) ら (1992、上記) に記載されたようにして、CFTRタンパク質 (Ad-CFTR) をコードするヒト遺伝子がゲノムに挿入された組換えアデノウイルスからウイルス懸濁液を調製する。

簡単に言うと、それはアデノウイルス・タイプ5に由来し、該ウイルスのゲノムは、一方ではアデノウイルスの複製に必須であるトランス-活性化タンパク質 (trans-activating protein) をコードするE1A遺伝子を欠き、他方では必須ではないE3遺伝子を欠いている。CFTR遺伝子は、E1A遺伝子の代わりに挿入されている。

Ad-CFTRは、ヒト胎児腎細胞株293 (グラハム (Graham) ら、1977、J. Gen. Virol.、36、59-72) により増やされ、該細胞株はE1機能を構成的に発現する。この株は、ATCC (CRL 1573) で利用可能である。該293細胞は、供給者の推薦に従い培養される。

40

培養中の細胞は、Ad-CFTRウイルスの最初のイノキュラム (inoculum) との融合の前に $2 \sim 10$ 倍の感染の多重度 (moi) に従い感染される。それらは37℃でインキュベートされ、細胞変性効果が観察されるとすぐに、通常は4～10日間の培養後であるが、ウイルスは以下のプロトコールに従い収獲される。

細胞懸濁液は、低速で10分間遠心分離される。細胞ペレットは、2%ウシ胎児血清を添加された約10mlのGEMM培地 (グラスゴー・モディファイド・イーグル・メディウム (Glasgow Modified Eagle Medium), Gibco BRL, Cergy-Pontoise) に再懸濁される。ウイルスは、エタノール-ドライアイス浴/37℃の水浴中の、数回の連続した凍結/解凍サイクルにより細胞から分離される。最後のサイクルに続き、細胞の破片を5～10分

50

間の低速遠心分離により除去する。

ウィルスは、各々 1.40 及び 1.25 g/ml の2つの密度層を有する塩化セシウム・グラジエントでの分別により遠心分離の上清から精製される。遠心分離は、室温で、 $100,000g$ で数時間行われる。ウィルスは、2つの層の界面に位置する白いバンドの形態で現れ、シリンジを用いて回収される。それらは、 1.33 g/ml を含む溶液を用いて調製された、自然発生の塩化セシウム・グラジエント上で第2の精製に供される。ウィルスは、同様にシリンジでチューブを刺すことにより回収され、 $1/10$ 倍容量と等価のグリセロールを加える。

塩化セシウムは、 10 mM トリス - 塩酸、 $\text{pH } 7.4$ 、 1 mM MgCl_2 、及び 10% グリセロールを含む緩衝液に対する透析により除去される。

かくして得られたウィルス懸濁液の力価は、カンテン中の滴定法または 30 h に従い正確に測定される (Graham 及び Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, 7, 109-128, E.J.Murray 編, The Human Press Inc. Clinton, NJ)。懸濁液は、各々 5×10^9 から $5 \times 10^{10} \text{ pfu}$ を含むようにチューブ (Nunc 又は Nalgene) 中に $100 \mu\text{l}$ のアリコートに分配される。これらのチューブは、貯蔵ウィルス懸濁液を構成し、使用時まで -60 で保存される。

使用時には、 9 g/l (Meram, Melun) を含む塩化ナトリウム溶液 1.5 ml を、 $100 \mu\text{l}$ の Ad - C F T R 懸濁液 (10^7 、 10^8 又は 10^9 pfu の濃度) に加える。実施されたコントロールは、かくして得られた希釈ウィルス懸濁液の力価が室温で数時間安定であることを示す。

加速安定性の研究も、 37°C で行われた。異なる濃度 (10^9 、 10^7 、 10^5 pfu/ml) へのウィルス懸濁液の上記塩化ナトリウム溶液中の希釈の後、各希釈液のサンプルを規則的な間隔 ($t = 0 \text{ h}$ 、 2 h 、 4 h 及び 24 h) で採り、ウィルス感染性がカンテン又は 30 h 技術で滴定される。希釈ウィルス懸濁液の 37°C での3時間以上の安定性が、特に高濃度 (10^9 及び 10^7 pfu/ml) で観察される。

エアロゾールは、希釈ウィルス懸濁液を Optineb 709 噴霧器 (Air Liquide, Paris) の貯蔵器中に配置することにより製造される。後者は、高圧で作動し、キャリアーガスを選択できる空気式製造装置である。それは、圧縮空気の源に接続され、そして種々の圧力のメディカル・エアーが適用される。エアロゾール化試験は、腭嚢胞性繊維炎 (cystic fibrosis) を患う患者に適用するための最適条件を評価するために行われる。特に、圧力 ($1 \sim 3.5$ バール) 及び呼吸速度の影響が検討される。後者は1分間当たりの呼吸数を定義し、装置のセッティングにより予め決められる。この意味で、位置7のセッティングは、子供の呼吸速度に相当し、位置9は大人の呼吸速度に相当する。

エアロゾール化は、3工程 (ウィルス懸濁液の希釈、次いで塩化ナトリウム希釈液でカップを2回リンスする) で行われる。Optinebは、自己誘発性 (self-triggering) にセットされ、トラップ又はコレクター、例えばコレクトロン MD 8 (Sartorius, Palaiseau, FRANCE) に接続され、その末端に噴霧後にウィルス粒子を回収できるゼラチン濾過膜が固定される。この膜は次いで 10 mM トリス - 塩酸緩衝液、 $\text{pH } 7.4$ 、 1 mM MgCl_2 、及び 10% グリセロール中 37°C で溶解され、回収されたウィルスの感染性が 30 h 及びカンテン技術により滴定される。この測定は、患者の気道に入ることのできる活性なウィルス量を評価できる。異なる試験条件下で相対的に繰り返し、補足された感染性ウィルスはウィルスの最初の数 $15 \sim 40\%$ を示す。幾分変異が観察されたが、最良の回収率は高圧 (3.5 バール) で得られ、これは両方のセット位置での場合である。指針として、エアロゾール化により適用される医療用製品の回収率は通常約 10% である。これらの結果は、腭嚢胞性繊維炎を患う患者の治療に、Ad - C F T R 組換えアデノウィルスのエアロゾール化の用途を認識できる。

実施例 2 1 M シュクロースの存在下に貯蔵され、1 価のカチオン溶液で希釈された貯蔵されたウィルス懸濁液由来のエアロゾールの調製

以下のバリエーションを用いて実施例 1 を繰り返す：

第2の塩化セシウム・グラジエント後のウィルスの回収後に、ウィルスは 10 mM トリス

10

20

30

40

50

- 塩酸緩衝液、pH 7.4、1 mM $MgCl_2$ 、及び 1 M シュクロースに対して透析される。

エアロゾル化試験は、3.5 バールの圧力及び位置 9 の Optineb のセッティングで実施例 1 に記載したように行われる。27% の活性なウイルス粒子の回収率が得られる。

実施例 3 グルコース溶液で希釈されたウイルス懸濁液由来のエアロゾルの調製

以下のバリエーションを用いて実施例 1 を繰り返す：

100 μ l のウイルス懸濁液を、1.5 ml の 50 g/l を含むグルコース溶液 (Laboratoire Chaix du Marais Lavoisier, Paris) に加えることにより希釈ウイルス懸濁液を調製する。

該希釈ウイルス懸濁液を 37 °C で、希釈がグルコース溶液で行われる以外は実施例 1 で定義されたのと同じ条件下に加速安定性研究に供されると、ウイルス活性が 2 時間を越えて安定であることが観察される。

実施例 4 超音波振とうによるエアロゾルの調製

以下のバリエーションを用いて実施例 1 を繰り返す：

エアロゾルが、SAMLS 超音波噴霧器 (System Assistance Medical, LeLédat, France) を用い、供給者の推薦に従い使用して製造される。実施例 1 に従い得られる希釈ウイルス懸濁液は、噴霧器のカップに導入され、2.4 MHz の周波数で振動する水晶結晶板により生み出される超音波振動に供される。これらの条件下で、回収率は 10% のオーダーである。

実施例 5 霊長類の前臨床試験

これらの試験の目的は、組換えアデノウイルスのエアロゾル化がインビボでの CFTR 遺伝子の肺細胞への移動を許容することを確認し、治療の毒性を評価することにある。

A. 方法

該実験は、5 匹のアカゲザル (*Mecaca mulatta*) (TNO Center for Animal Research, Rijswijk, Holland) を含む。選択された動物は、良好な健康状態で、体重 5 ~ 10 kg である。それらは 3 つのグループに分けられた：グループ 1 は単一用量の Ad-CFTR を第 1 のサルは高用量 (7.5×10^9 pfu)、第 2 は低用量 (1.5×10^7 pfu) 投与される ($D = 0$) 2 匹のサルからなる。それらは、 $D + 10$ で犠牲になる。

グループ 2 は 10 日間隔で ($D = 0$ 及び $D + 10$) 等しい用量の Ad-CFTR (各々 7.5×10^9 pfu 及び 1.5×10^7 pfu) を 2 回投与される 2 匹のサルからなる。それらは、 $D + 13$ で犠牲になる。

コントロール群は、グループ 2 に適用されるプロトコール ($D + 13$ に犠牲になる前に $D = 0$ 及び $D + 10$ の連続 2 回投与) に従いコントロール液 (10 mM トリス - 塩酸 pH 7.4、1 mM $MgCl_2$ 、及び 10% グリセロール) で処置される 1 匹のサルを含む。

上記濃度に調整された 100 μ l の Ad-CFTR 溶液 (グループ 1 及び 2)、または 100 μ l のコントロール溶液 (グループ 3) が、9 g/l 含む塩化ナトリウム希釈溶液 1.5 ml に加えられ、Optineb 装置のカップに配置される。噴霧化は、気管に導入され、噴霧器に接続されたチューブを介して麻酔されたサルに行われる。操作条件は、以下の通りである：位置 7 のセッティング、医療用空気圧 3.5 バール及び 2 段階の噴霧化 (希釈ウイルス溶液の投与、続く 800 μ l の希釈液によるすすぎ)。

B. ウイルスの伝播力の分析

各々組換え又は野生株ウイルス粒子の存在を試験するために、各動物の糞便を定期的に集め、許容される 293 または HepG2 細胞上で培養する。約 3 及び 7 日の培養の後、そのような粒子が例えばアデノウイルス 5 カプシドタンパク質 (Bio-Science 012070) を認識する抗体のような特異的なモノクローナル抗体を用いた間接免疫蛍光法 (indirect immunofluorescence) により検出される。これらの分析により、実験のすべてのサルで陰性であることが証明され、それは環境中へのウイルスの伝播のリスクが低いからであることを示している。

C. インビボでの CFTR 遺伝子の転移の分析

使用される方法論は、Boutらに記載される (1994, Hum. Gene Therapy, 5, 3-10)。簡単

10

20

30

40

50

に言う、主要な臓器（肝臓、睪丸など）と同様に気管の全長にわたり分布する組織サンプルが犠牲になった動物から除去される。DNAが抽出されると、アデノウィルスの配列が、各々OTG3042（配列番号1、CFTR配列とハイブリダイズする）及びOTG4347（配列番号2、アデノウィルス・タイプ5配列を認識する）であるCFTR発現カセットおよびアデノウィルスベクターの接合部に位置するAd-CFTRに特異的なプライマーを用い、PCRにより試験される。30回の増幅サイクルの終わりに、PCR産物がアガロースゲル電気泳動により分離され、³²Pを用いたリン酸化により標識された特別なプローブ（配列番号3）とハイブリダイズされる前に、Hybond N+膜（Amersham）上に移動される。高ウィルス用量（ 7.5×10^9 pfu）で処理されたグループ1及び2のサルの気管及び肺中にのみ特異的なシグナルが得られる。試験された他のすべての臓器は陰性であることに注目することは興味深い。

10

1.5×10^7 pfuのウィルス用量を受けたサルのアデノウィルス配列の存在を検出するために、技術の感度を増加させる必要がある。この目的で、PCRの最初の30サイクルの後、OTG3042および内部プライマーOTG4908（配列番号：4）を用いてさらに30サイクルを行う。PCR産物は、次いで上記のように処理される。気管から除去されたサンプルの約半分にシグナルが得られる。従って、エアロゾルによる肺へのウィルス投与は用量依存的であるように思われる。当然に、ハイブリダイゼーションはコントロールのサルについては陰性である。

全体として、これらの結果は、Ad-CFTRが標的器官、すなわち気管に含まれたままであることを示す。

20

D. CFTR遺伝子のインビボでの発現

ヒトCFTR遺伝子の発現が、RNAの逆転写及び引き続くPCRの技術により気管から除去されたサンプルについて検討される（ショルディナー（Shouldiner）ら、1993, in *Methods in Molecular Biology*, 15, 169-176, 編：ホワイト, Human Press Inc, Totowa, NJ）。この技術は、高度に特異的であるという利点があり、ヒトCFTRをコードするmRNAの存在が視覚化できるであろう。RNAが通常の技術によりサンプルから単離される。1 µgの全RNAが、MoMLV（Moloney Murine Leukemia Virus）逆転写酵素の存在下に、5'末端にユニーク同定配列（英語ではtagと表現される）を有するプライマーを用いて逆転写される。より正確には、該プライマー（OTG5987；配列番号：5）は、30ヌクレオチドの同定配列及びポリアデニレーション・シグナルに相当し、Ad-CFTRの転写に始まるCFTR mRNAの再会合を許容する17ヌクレオチドを包含する。PCRは次いで、最初の30増幅サイクルの間、プライマーOTG5988（配列番号：6）及びOTG5999（配列番号：7 OTG5987の同定配列に相当する）を用い、さらに次の30サイクルの間、OTG5988およびOTG4741（配列番号：8）を用いて上記反応混合物について直接に実施される。増幅産物は上記のように分析される。

30

ヒトCFTR mRNAが、 7.5×10^9 pfuのウィルス用量を1又は2回投与したサルの肺小葉のサンプル中に検出される。一方、コントロールのサル又は低ウィルス用量を受けたサルから始まるサンプル中にはシグナルは検出されない。

これらの結果は、適当な投与量のAd-CFTRの噴霧化は、肺細胞の機能的なCFTR遺伝子を発現する結果となることを示し、特に遺伝子治療による肺嚢胞性繊維炎の治療の観点を勇気づけるものである。

40

E. 病理学

一般的に言えば、Ad-CFTRの噴霧化は、サルの体重減少又は異常行動、あるいは血液学的又は生化学的血清パラメーターの有意な障害に関与しない。

肺機能をより正確に評価するために、死後の組織病理学的分析が、ボウト（Bout）ら（1994、上記）に記載の方法論に従い、気管の異なる部分から除去された組織の切片について行われる。これらの切片は、肺上皮の炎症及び損傷の兆候を探す観点から検査される。結果は以下の通りである。すべてのサルについて、肺の構造は無傷であった。軽微な炎症発現及び落屑性の化成が観察されたが、それらはコントロールのサルにも存在するため

50

、A d - C F T R の投与とは無関係である。

しかしながら、低度の追加の損傷（脈管周囲及び気管支周囲のリンパ球の浸潤及び間質性肺炎）が高ウィルス用量を受けた2匹のサルで見られたが、グループIの動物（ 7.5×10^9 pfuの用量を1回噴霧化）とグループIIの動物（ 7.5×10^9 pfuの用量を2回噴霧化）の間で有意な相違は明らかでない。

結論として、A d - C F T R のエアロゾールによる投与は、処置されたすべての動物により十分に耐えられる。これらの研究は、A d - C F T R 組換えウィルスが肺に含まれたままであり、体内に伝播しないことをチェックすることができる。肺損傷が、高ウィルス用量の投与に続き観察されるが、これらは重大な病状を導くことはないように見える。これらの前臨床試験により、ヒトの治療も可能であると結論付けることができる。

10

実施例 6 脾嚢胞性繊維炎の治療法

実施例 1 を、以下のバリエーションを用いて繰り返す。

エアロゾールが、Optineb 709 の貯蔵所に実施例 1 の希釈ウィルス懸濁液を配置することにより製造され、後者は患者の呼吸速度により適当な位置（7または9）にセットされる。100 μ l が引き続く分析のためにサンプルとされた後、該装置は医療用空気の供給源と接続される。該装置のバッカルノズルが、脾嚢胞性繊維炎を患う患者の口内に配置され、3.5 バールのガス圧力がかけられる（第1の噴霧化）。

気管でのエアロゾールの噴霧化は、患者の吸気により引き起こされる。噴霧化は、呼気相の始まる前に中止し；それにより材料の損失と環境中へのエアロゾールの放出を避けることができる。

20

各吸気で送り込まれるエアロゾールの用量は、患者の呼吸能力により調節される。30 ~ 40 サイクル/分の呼吸速度を持つ乳児には、1 噴霧 (puff) 当たりの平均投与量は 1.8 μ l である。20 ~ 25 サイクル/分の呼吸速度を持つ子供には、各噴霧で 3.2 μ l の用量が投与される。最後に、平均 15 ~ 20 サイクル/分の呼吸速度を持つ成人には、各噴霧で 5 μ l 量のエアロゾールが投与される。

これらの基準によると、160 のエアロゾールの噴霧が成人に送り込まれ、初期希釈ウィルス溶液の約半分に相当する量が噴霧できる。

この第1シリーズの吸入の直後に 9 g / l を含む塩化ナトリウム溶液 900 μ l が、噴霧器の貯蔵所に加えられる。上記のように、3.5 バールのガス圧力がかけられ、160 の噴霧を含む第2シリーズの吸入が行われる。最後に、装置の貯蔵所に 9 g / l を含む塩化ナトリウム溶液 900 μ l のが導入された後、同一条件下に第3シリーズが行われる。

30

配列表

(1) 一般情報：

(i) 特許出願人

(A) 名称：トランスジーン ソシエテ アノニム

(B) 通り：11 リュ ドゥ モルシャイ

(C) 市：ストラスブル

(E) 国：フランス

(F) 郵便番号：67082

(G) 電話番号：(33) 88 27 91 00

40

(H) FAX番号：(33) 88 22 58 07

(ii) 発明の名称：ウィルスのエアロゾールの調製方法

(iii) 配列の数：8

(iv) コンピューター リーダブル フォーム：

(A) メディウムタイプ：テープ

(B) コンピューター：IBM PC 互換性

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0 Version #1.25 (EPO)

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴

50

- (A) 長さ：23塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (iii) ハイボセティカル配列：No
 (iii) アンチセンス：No
 (vi) 起源
 (A) 生物名：ヒトCFTR cDNA
 (C) 個体・単離クローン名：合成オリゴヌクレオチド
 (vii) 直接の起源
 (B) クローン：OTG3042
 (xi) 配列：配列番号：1：

GCAGTTGATG TGCTTGGCTA GAT

23

10

- (2) 配列番号2の情報：
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：21塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)
 (iii) ハイボセティカル配列：No
 (iii) アンチセンス：Yes
 (vi) 起源
 (A) 生物名：アデノウィルス タイプ5
 (C) 個体・単離クローン名：合成オリゴヌクレオチド
 (vii) 直接の起源
 (B) クローン：OTG4347
 (xi) 配列：配列番号：2：

CAGCTCCTCG GTCACATCCA G

21

20

30

- (2) 配列番号3の情報：
 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ：24塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：cDNA
 (iii) ハイボセティカル配列：No
 (iii) アンチセンス：Yes
 (vi) 起源
 (A) 生物名：ヒトCFTR cDNA
 (C) 個体・単離クローン名：合成オリゴヌクレオチド
 (vii) 直接の起源
 (B) クローン：OTG4905
 (xi) 配列：配列番号：3：

TGCTGCTCTC TAAAGCCTTG TATC

24

40

50

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 2 4 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(iii) ハイボセティカル配列 : N o

(iii) アンチセンス : Y e s

(vi) 起源

(A) 生物名 : アデノウィルス タイプ 5

10

(C) 個体・単離クローン名 : 合成オリゴヌクレオチド

(vii) 直接の起源

(B) クローン : O T G 4 9 0 8

(xi) 配列 : 配列番号 : 4 :

TCGTACCTCA GCACCTTCCA GATC

24

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 4 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

20

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : m R N A の c D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : N o

(iii) アンチセンス : Y e s

(vi) 起源

(C) 個体・単離クローン名 : 合成オリゴヌクレオチド

(vii) 直接の起源

(B) クローン : O T G 5 9 8 7

(xi) 配列 : 配列番号 : 5 :

30

CTTATACGGA TATCCTGGCA ATTCGGACTT ATTTGTGATG

CTATTGC

47

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 3 0 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : c D N A

40

(iii) ハイボセティカル配列 : N o

(iii) アンチセンス : N o

(vi) 起源

(A) 生物名 : ヒト C F T R c D N A

(C) 個体・単離クローン名 : 合成オリゴヌクレオチド

(vii) 直接の起源

(B) クローン : O T G 5 9 8 8

(xi) 配列 : 配列番号 : 6 :

AAGCAGTTGA TGTGCTTGGC TAGATCTGTT

30

(2) 配列番号 7 の情報 :

50

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 3 0 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : c D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : N o

(iii) アンチセンス : Y e s

(vi) 起源

(C) 個体・単離クローン名 : 合成オリゴヌクレオチド

10

(vii) 直接の起源

(B) クローン : O T G 5 9 9 9

(xi) 配列 : 配列番号 : 7 :

CTTATACGGA TATCCTGGCA ATTCGGACTT

30

(2) 配列番号 8 の情報 :

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 2 5 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(ii) 配列の種類 : D N A (ゲノム)

(iii) ハイボセティカル配列 : N o

(iii) アンチセンス : Y e s

(vi) 起源

(A) 生物名 : アカゲザル マカク ポリオーマ ウィルス (S V 4 0)

(C) 個体・単離クローン名 : 合成オリゴヌクレオチド

(vii) 直接の起源

(B) クローン : O T G 4 7 4 1

(xi) 配列 : 配列番号 : 8 :

GTAACCATTA TAAGCTGCAA TAAAC

25

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 ラミィ ディディエール
フランス国 6 7 0 0 0 ストラスブール リュ デ ムーリン 2 8

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 特開昭 6 4 - 0 7 1 8 1 9 (J P , A)
米国特許第 0 4 5 5 4 1 5 8 (U S , A)
国際公開第 9 2 / 0 0 5 2 7 3 (W O , A 1)
国際公開第 9 3 / 0 1 2 2 4 0 (W O , A 1)
英国特許出願公開第 0 2 0 4 8 6 6 9 (G B , A)
DATABASE WPIDS ON STN, ACC.NO. 1992-259288 ABSTRACT
SCIENCE, 1 9 9 1 年, 252(5004), 431-434
CELL, 1 9 9 2 年, 68(1), 143-155
CAN. J. COMP. MED., 1 9 7 9 年, 43(3), 305-312
APPL. MICROBIOL., 1 9 7 1 年, 21(4), 676-679
DATABASE WPI ON DIALOG, WPI ACC.NO.1993-204156
DATABASE WPI ON DIALOG, WPI ACC.NO.1993-091794
DATABASE WPI ON DIALOG, WPI ACC.NO.1992-259288

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 35/76
A61K 9/12
A61K 9/72
A61K 48/00
WPI(DIALOG)