

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635149号
(P7635149)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 47/62 (2017.01)	A 6 1 K 47/62	
A 6 1 K 9/1271(2025.01)	A 6 1 K 9/1271	
A 6 1 K 39/002(2006.01)	A 6 1 K 39/002	Z N A
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	

請求項の数 9 (全45頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-564509(P2021-564509)	(73)特許権者	519411043
(86)(22)出願日	令和2年4月29日(2020.4.29)		ザ リサーチ ファウンデーション フォー
(65)公表番号	特表2022-530539(P2022-530539 A)		ザ ステイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク
(43)公表日	令和4年6月29日(2022.6.29)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 2 2 8 2 5 6 7、パッファロー、スウィート 1 0 9、リー エントランス 5 2 0、ユービー コモンズ、ユニバーシティー アト パッファロー、テクノロジー トランスファー
(86)国際出願番号	PCT/US2020/030537	(73)特許権者	520454464
(87)国際公開番号	WO2020/223395		パス
(87)国際公開日	令和2年11月5日(2020.11.5)		アメリカ合衆国、ワシントン州 9 2 1 2 1、シアトル、ビーオーボックス 9 0 0 9 2 2、スウィート 2 0 0、ウエ
審査請求日	令和5年4月13日(2023.4.13)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	16/399,581		
(32)優先日	平成31年4月30日(2019.4.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 コバルトポルフィリン・リン脂質コンジュゲート及びポリヒスチジンタグを含むナノ構造体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

リポソームであって、

a) 以下の i) 及び ii) を有する二重層；

i) リン脂質、

ii) コバルトに配位して、コバルトポルフィリンを形成しているポルフィリン

b) ポリヒスチジン-タグ化提示分子、ここで、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、二重層の疎水性部分に存在し、ポリヒスチジン-タグの1以上のヒスチジンは、前記コバルトポルフィリンのコバルトに配位している；及び

c) リン酸化ヘキサアシル二糖 (PHAD)；

を含み、ここで、

前記コバルトポルフィリンが、リン脂質にコンジュゲートして、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを形成しており、

前記ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部が、リポソームの外側に露出しており、

前記ポリヒスチジン-タグ化提示分子が微生物由来のエピトープを含んでおり、

前記エピトープが、DS-Cav1、OspA、赤血球凝集素(HA)、又はノイラミニダーゼに由来するものであり、及び

当該リポソームが水性区画を取り囲んでいる、

リポソーム。

【請求項 2】

前記コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートが、二重層の1～25モル%を構成する、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項 3】

前記コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートが、二重層の5～10モル%を構成する、請求項2に記載のリポソーム。

【請求項 4】

前記二重層が、コレステロール及び/又はホスファチジルセリンをさらに含む、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項 5】

前記ポリヒスチジン-タグが、6～10のヒスチジン残基を含む、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項 6】

前記リポソームの大きさが50nm～200nmである、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項 7】

ナノ構造体であって、

a) コア；

b) 以下のi)及びii)を有する、前記コア上の単層又は二重層；

i) リン脂質モノマー、

ii) コバルトに配位して、コバルトポルフィリンを形成しているポルフィリン；

c) 微生物由来のエピトープを含むポリヒスチジン-タグ化提示分子；及び

d) リン酸化ヘキサアシル二糖 (PHAD)；

を含み、ここで、

前記コバルトポルフィリンは、リン脂質にコンジュゲートして、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを形成しており、

前記ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、単層又は二重層の疎水性部分に存在し、

前記ポリヒスチジン-タグの1以上のヒスチジンは、前記コバルトポルフィリンのコバルトに配位しており、

前記ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、ナノ構造体の外側に露出しており、及び

前記エピトープは、DS-Cav1、OspA、赤血球凝集素 (HA)、又はノイラミニダーゼに由来するものである、

ナノ構造体。

【請求項 8】

前記コアが金ナノ粒子である、請求項7に記載のナノ構造体。

【請求項 9】

宿主個体において免疫応答を生じさせるための組成物であって、医薬キャリア中に請求項1～6のいずれか1項に記載のリポソームを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

この出願は、2019年4月30日に提出された米国特許出願16/399,581号に基づく優先権を主張し、その開示は参照により本明細書に包含される。

【0002】

この発明は、国立衛生研究所によって付与された認可番号DP5OD017898及びR21A1122964の下で政府支援を受けて完成された。政府は本発明に所定の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

本開示は、一般的には機能性ナノ構造体の分野に関する。より具体的には、本開示は、コバルトポルフィリンを含むナノ構造体に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

機能性ナノ粒子の分野において、課題の一つは、ペプチド及びタンパク質をより大きなスキャフォールドに容易に且つ確実に付着させることである。標的ナノ粒子は、有効なりガンドを必要とし、非コンジュゲート型ペプチドそれ自体は、弱免疫原性である。バイオコンジュゲート化学は、広範な戦略を提供してきたが、ほとんどのナノ粒子コンジュゲーションは、以下の1つ以上に関連する制限を受ける：1) 低コンジュゲーション率及び必須の精製工程；2) インタクトなナノ粒子の標識を不可能にする、生理的緩衝液との不適合性、；3) 有効性の異なる不均質な粒子集団を生成する、変化しやすい標識サイト及びコンジュゲートポリペプチド構造；4) 複雑で外因的な化学アプローチの必要性。

10

【0005】

水性ナノ粒子へリガンドを付着するための標準的なアプローチは、マレイミド、サクシニミジルエステル、及びカルボジイミド-活性化カルボン酸を使用する。これらは、ポリペプチドのアミン基及びチオール基と共有結合的に反応し得る。抗体-コンジュゲート型免疫リポソームのために、マレイミド-脂質の使用が広く探究されてきた。コンジュゲーション率は、一晩の反応で90%に達する可能性があるが、その後遊離マレイミド基のクエンチング及びさらなる精製が必要となる。タンパク質は、コンジュゲーションの前に、チオール化及び精製の準備工程を必要とし得る。抗体の配向は、コンジュゲート型抗体標的結合の有効性に影響を与える主要な因子であるが、これらのアプローチは、多数の抗体標識サイト及び無差別配向を生じる。近年、クリック反応などの双直行合成戦略が、あらかじめ形成されたリポソームに適用されているが、これらは外因性触媒及び非従来型アミノ酸の使用を必要とする。

20

【0006】

有機溶媒中で永続的変性を起こしにくいより小さなペプチドに適切な別のアプローチは、脂質アンカーにペプチドをコンジュゲートすることである。得られたリポペプチドは、その後、リポソーム形成プロセス中に他の脂質とともに取り込まれ得る。このアプローチは、非免疫原性ペプチドに対して抗体産生を誘起する合成ワクチンを産生するために使用されてきた。しかしながら、その両親媒性の性質に起因して、リポペプチドの精製が困難な場合、収率は5~10%であった。リポペプチドが形成プロセスの間にリポソーム内に完全に取り込まれず、凝集をもたらすことも明らかになっている。

30

【発明の概要】

【0007】

本開示は、機能性ナノ構造体を提供する。前記ナノ構造体は、カーゴ(積荷)の送達、標的化送達及び/又は提示分子の送達のために使用できる。前記ナノ構造体は、水性区画をその中に囲い込む単層又は二重層であってもよい。水性区画を囲い込む二重層構造は、本明細書においてリポソームと称される。前記ナノ構造体は、ナノ粒子上の単層又は二重層コーティングであってもよい。前記単層又は二重層は、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲート、任意でポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質、任意でステロール、及び任意でポリエチレングリコール(PEG)を含む。ポリヒスチジン-タグを有する一以上の標的化ペプチド又はポリペプチド(本明細書において提示分子と称される)が、単層又は二重層内に取り込まれ、ポリヒスチジン-タグの一部が単層又は二重層に存在し、提示分子が単層又は二重層の外側に露出される。コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートの代わりに、又はコバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートに加えて、コバルトポルフィリンを使用することができる。

40

【0008】

本開示のナノ構造体は、ポリヒスチジン-タグ化提示分子によって標的とされる部位へ送達するために、カーゴを積むことができる。例えば、リポソームは、ポリヒスチジン-タグ化提示分子を使用することによって所望の部位に送達するために、カーゴを積むことができる。

【0009】

50

本明細書で提示されるデータは、コバルトポルフィリン-リン脂質(CoPOP)のようなコバルトポルフィリンを含む二重層が、ポリヒスチジン-タグ化(本明細書において「Hisタグ化」とも称される)ポリペプチドに安定に結合できることを実証する(図1a)。亜鉛、ニッケル及び銅などの他の金属ポルフィリンは、Hisタグ化ポリペプチドに安定に結合できない。ポルフィリン自体は、二重層の疎水性部分を形成し、外部の水性環境に接近できないため、このことは、膜相に埋め込まれた少なくともいくつかのポリヒスチジンをを用いた、新しい結合パラダイムを表す(図1b)。これは、より安定な結合をもたらし、ナノ粒子形成後に有意にシンプルな非共有結合性ポスト標識パラダイムを可能にし、リガンド配向に関する曖昧さを排除する。

【0010】

我々は、他の金属ではなく、コバルトでキレート化したポルフィリン-リン脂質を含む脂質二重層が、Hisタグ化タンパク質及びペプチドを効率的に捕獲できることを示す。結合はCo(II)からCo(III)への遷移に従い、保護された疎水性二重層内で起こり、例えば、血清中で又は百万倍過剰の競合イミダゾール中で、本質的に不可逆性の付着をもたらす。このアプローチを使用して、我々は、あらかじめ形成された空のリボソーム及びカーゴを含むリボソームの二重層内に、ホーミングペプチドを挿入し、二重層の完全性を損なうことなく、部位ターゲティング(例えば、腫瘍を標的とする)を可能にした。ペプチド又は合成ペプチドは、他の非抗原性ペプチドのための抗体を産生するためのアジュバント(例えば、脂質モノホスホリルリピドA)を含むリボソームに結合させることができる。

【0011】

本開示は、単層又は二重層構造を提供し、ここで当該単層又は二重層は、ポルフィリンとそれにキレート化したコバルトを含み、コバルト金属は単層又は二重層及びポルフィリン大環内に存在し、さらに、そこに非共有結合的に付着したヒスチジンタグを有する分子を有し、このHisタグの少なくとも1部は単層又は二重層内にあり、コバルト金属コアに配位している。前記提示分子は、免疫応答の標的化及び生成を含む様々な用途に使用可能である。この層で形成されたりボソーム又はミセルは、所望の位置で放出されるカーゴを装填していてもよい。前記コバルトポルフィリンは、コバルトポルフィリン-リン脂質(CoPOP)であってもよい。この層は、金属ナノ粒子、ナノチューブなどの他のナノ構造体のための、コーティングとして使用されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0012】

[図1] PoP-二重層へのHisタグの結合

(a) Hisタグ(緑色)を有するペプチドが、水溶液中で、あらかじめ形成されたCoPオリゴソームに結合することを示す図。

(b) CoPOPを含む二重層内への、Hisタグ化ポリペプチドの挿入。二重層の一片のみが示されている。

(c) 本研究で使用された金属-PoPの化学構造。

【0013】

[図2] Co(III)-PoPオリゴソームに結合するHisタグ化タンパク質

(a) ビーナス(V)に融合したセルリアン(C)を含むHisタグ(7)化蛍光タンパク質は、PoP二重層への結合を証明する。Cが励起すると、FRETが発生しVが蛍光を発する(左)が、これは、PoP-二重層に結合すると、FRETがフォトニック二重層と競合するため、阻害される(中央)。タンパク質が二重層に結合したときでさえ、C蛍光は直接的に探索できる(右)。

(b) 表示の金属-PoPオリゴソームとインキュベーションした後の、融合タンパク質電気泳動移動度シフトのマルチスペクトル蛍光画像。

(c) CからV FRETへのロスに基づく、表示の金属-PoPオリゴソームへの融合タンパク質の結合キネティクス。

(d) CoPOPのビニル基の下線付きプロトンのNMRピーク幅は、重水素化クロロホルム(CDCl₃)中でCo(II)の常磁性の幅広化を実証するが、重水中ではCoPOP-リボ

10

20

30

40

50

ソーム形成後のC o P o P (III)の非常磁性のピークを実証する。棒グラフの各セットは、左から右に、C o P o P、及び2 H - P o Pの棒グラフである。

(e) 2 Mの硫酸ナトリウムを添加した後の、C o P o PリボソームへのH i s タグ化ペプチド結合の逆転。リボソームは10モル%のC o P o P又はN i - N T Aリン脂質とともに形成された。棒グラフの各セットは、左から右に、水、及び+ 2 M亜硫酸塩の棒グラフである。

【 0 0 1 4 】

[図 3] C o P o PリボソームへのH i s タグ化タンパク質の強固な結合

(a) 表示した脂質を含むリボソームとインキュベートされた蛍光性レポータータンパク質のマルチスペクトル電気泳動移動度シフトの画像。

(b) 表示のリボソームに結合したレポータータンパク質の結合安定性(1 : 1血清中)。

(c) 表示のリボソームに結合したレポータータンパク質の結合安定性(過剰の遊離イミダゾール中)。平均値 ± 標準偏差 (n = 3)

【 0 0 1 5 】

[図 4] C o P o Pリボソームへの短H i s タグ化R G Dペプチドの結合

(a) F A Mで標識された短ペプチドの、金属-P o Pリボソームへの結合。

(b) C o P o Pリボソームへの結合半減期に対する、H i s タグ長の影響。結合なし(N . B .)は、H i s タグ化されていないペプチドで観察された。

P B S中(c)又は5 m g / m LのB S A中(d)でインキュベートした際の、表示組成のC o P o Pリボソームへの結合半減期に対するリボソーム組成の影響。三回の測定に関する平均値 ± 標準偏差。(c)及び(d)において、棒グラフの各セットは、左から右に、50及び0の棒グラフである。

【 0 0 1 6 】

[図 5] カーゴを含むリボソームの、R G D - H i s ターゲティング

(a) ペプチド結合の間の、P O Pリボソーム中に封入されたスルホローダミンBの放出。棒グラフの各セットは、左から右に、8時間及び24時間の棒グラフである。

(b) スルホローダミンBを含むリボソームの標的化取り込み。細胞を表示のコンディションでインキュベートし、スルホローダミンBの蛍光を試験することによって取り込みを評価した。棒グラフの各セットは、左から右に、M C F 7細胞及びU 8 7細胞の棒グラフである。

(c) リボソームの取り込みを示す共焦点顕微鏡写真。細胞を、表示のリボソーム溶液と2時間インキュベートし、洗浄し、画像化した。全ての画像は同じ設定で取得した。

(d) 皮下U 8 7腫瘍を有するヌードマウスへの注射後45分目の、C o P o Pリボソームに封入されたスルホローダミンBの体内分布(H i s タグ化環状R G D標的指向性ペプチドの付着がある場合又は無い場合)。平均 ± 標準偏差 (n = 3)。棒グラフの各セットは、左から右に、非標的化及び+ c R G D - H i sの棒グラフである。

【 0 0 1 7 】

[図 6] 免疫原性C o P o Pリボソームを用いたH I Vペプチドワクチン接種

(a) B A L B / c又は胸腺欠損ヌードマウスを、M P L 25 μ gとH i s タグ化M P E R ペプチド25 μ g (H I V g p 4 1エンベロープタンパク質由来)を含むC o P o Pリボソームを用いて免疫化した。血清力価は、H i s タグを欠くピオチン化M P E Rペプチドを使用するE L I S Aを用いて評価し、抗-I g G二次抗体でプローブした。矢印は、ワクチン接種の時間を示す。

(b) 表示のようにワクチン接種したB A L B / cマウスにおける抗-M P E R力価。0週目と2週目にマウスにワクチン接種を行い、4週目に血清を採取した。

(c) M P Lを含むC o P o Pリボソームをワクチン接種したマウスにおける、持続性の抗-M P E R力価。平均値 ± 標準偏差 (グループあたり n = 4マウス)。左側の最初の2つの棒グラフ(連結している)は、C o P o P及びN i - N T Aである。

(d) 表示の抗体の存在下における293細胞のH I V感染の中和。プロテインAを使用してマウス血清からI g Gを精製した。平均値 ± 標準偏差 (n = 3)。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

[図 7] リポソームへの R G D - H i s ペプチド結合の安定性

(a) 1 0 モル % の N i - N T A - 脂質、 C o - N T A - 脂質又は C o P o P を含むリポソームへの F A M - 標識化 R G D - H i s ペプチド結合。

(b) ペプチド結合後のゲルろ過。 C o P o P リポソームのみが、安定な結合を維持した。

(c) ウシ胎児血清による 1 : 1 希釈でインキュベーションした後のペプチド安定性。 C o P o P リポソームのみが、安定な結合を維持した。

【 0 0 1 9 】

[図 8] C o P o P を含むリポソームへの H i s タグ化タンパク質の安定な結合

レポータータンパク質を、 C o P o P 、 遊離 C o - ポルフィリン又は 2 H - P o P を含むリポソームとともにインキュベートし、その後、血清中でインキュベートし、 E M S A に供した。その後、前記タンパク質を F R E T チャネル (e x : 4 3 0 n m , e m : 5 2 5 n m) を使用して画像化した。 C o P o P レーンにシグナルが無いことは、リポソームへの安定な結合を実証する。 C o - ポルフィリンのレーンでの減弱したシグナルは、 H i s タグ化タンパク質のリポソームへのいくつかの結合を実証する。

10

【 0 0 2 0 】

[図 9] 組成の異なる C o P o P リポソームに対する R G D - H i s の 9 0 % ペプチド結合時間

R G D - H i s ペプチドとともに P B S 中でインキュベートした際の、表示した成分を含む C o P o P リポソーム (1 0 モル % の C o P o P) への 9 0 % ペプチド結合時間に対するリポソーム組成の影響。棒グラフの各セットは、左から右に、 (+) コレステロールと (-) コレステロールの棒グラフである。

20

【 0 0 2 1 】

[図 1 0] 血清又はアルブミンの存在下における、 C o P o P リポソームへの R G D - H i s 結合

表示の組成のリポソームを、 5 0 % ウシ胎児血清又は 5 0 m g / m L のウシ血清アルブミンの存在下で、 R G D - H i s ペプチドとともにインキュベートした。 F A M - 標識ペプチドの発光は、 C o P o P リポソームへ結合したときのペプチド発光を、 2 H - P o P リポソームと比較することによって正規化した。

【 0 0 2 2 】

[図 1 1] リポペプチドによる膜透過処理

スルホローダミン B を積んだリポソームを、表示のペプチド (5 μ g / m L) とともに、室温でインキュベートし、蛍光を使用して放出を評価した。棒グラフの各セットは、左から右に 8 時間及び 2 4 時間の棒グラフである。

30

【 0 0 2 3 】

[図 1 2] 1 モル % の C o P o P を含むリポソームへの R G D - H i s ペプチドの結合と細胞ターゲティング

(a) 1 モル % の C o P o P を含む C o P o P リポソームとともにインキュベートした際の正規化ペプチド蛍光。 C o P o P サンプルと 2 H - P o P とを比較することによって発光を正規化した。(b) 表示のように細胞とインキュベートされた、 1 モル % の C o P o P を含むスルホローダミン B リポソームの細胞取り込み。棒グラフの各セットは、左から右に、 M C F 7 細胞及び U 8 7 細胞の棒グラフである。

40

【 0 0 2 4 】

[図 1 3] C o P o P H i s タグ結合表面を有するコーティング金ナノ粒子

(a) 金ナノ粒子を分散するコーティングプロトコルの写真。 P O P コーティングが無い場合、クエン酸塩で安定化した金は、遠心ステップを繰り返した後に凝集する (矢印) 。(b) 脂質コーティング前後のナノ粒子のサイズ。挿入図は、 C o P o P 金の透過型電子顕微鏡写真を 5 0 n m のスケールバーとともに示す。(c) クエン酸塩で安定化した金と、 R G D - H i s 結合後の C o P o P 金の吸収スペクトル。(d) 標的ナノ粒子の取り込みを示す共焦点反射画像。細胞を 2 時間、表示の金ナノ粒子とともにインキュベートし、洗

50

浄し、その後画像化した。全ての画像は同じ設定で取得した。

【0025】

[図14] (A) P s f 2 5 (P f s 2 5 _ B) 結合を、遠心ろ過分析によって測定した。これらのデータは、C o - P o P リポソームに対する P s f 2 5 タンパク質の 1 0 0 % の結合を示す。(B) P s f 2 5 タンパク質結合の前後における C o P o P リポソームの粒子サイズ。

【0026】

[図15] C D - 1 マウスにおける抗 - P s f 2 5 I g G レベル
マウスに、筋肉内注射の後、C o P o P / M P L 又は I S A 7 0 中の P s f 2 5 をワクチン接種した。(A) 追加免疫前及び (B) 追加免疫後(三週間抗原刺激/三週間追加免疫 [一注射あたり、5、0.5、又は 0.05 u g の P f s 2 5) C o P o P (P s f 2 5) リポソーム、又は遊離 P s f 2 5 タンパク質 (I S A 7 0 有り又は無し) をワクチン接種されたマウスから得た 9 6 ウェルプレートで E L I S A によって I g G 価を測定した。データは平均値 ± 標準偏差を示す (グループあたり n = 5 マウス) 。

10

【0027】

[図16] 抗 - P s f 2 5 I g G 価

力価は、バックグラウンドに比べて 0.5 より大きい吸光度を生じる血清希釈率の逆数として定義される。

【0028】

[図17] C o P o P リポソーム上の様々な長さの N A N P ペプチドのコーティングの説明及び特徴

20

(A) 7 x ヒスチジン (H i s) タグを含む、様々な数の N A N P 反復ペプチド。

(B) 様々な長さの N A N P ペプチドとコンジュゲートした C o P o P リポソームの平均径及び多分散性 (P D I) を、動的光散乱で算出した (n = 3) 。エラーバー、標準偏差。

(C) C o P o P リポソーム及び 2 H C o P o P リポソームへの N A N P ペプチドのペプチド結合を、微量遠心ろ過プロセス及び B C A 分析で測定した (n = 3) 。

【0029】

[図18] H i s タグ化 M P E R と結合した C o P o P / ホスファチジルセリン・リポソームで前処置したマウスにおける抗 M P E R I g G 価。M P E R に対する抗体応答を誘発するために、C o P o P / M P L A リポソーム中の M P E R を注射する 4 週間前及び 2 週間前に、M P E R / C o P o P / P S リポソームでマウスを前処置した。

30

【0030】

[図19] 様々な H i s タグ化 C P P に結合した C o P o P リポソームとインキュベーションした後の U 8 7 細胞の蛍光

【0031】

[図20]

室温で 2 時間インキュベートした後、H i s タグを有する D S - C a v 1 は、C o P o P ナノ粒子とのほぼ完全な結合を達成した(図 2 0、左)。H i s タグ D S - C a v 1 は、コバルトを欠く P o P 粒子 (2 H P o P) に有意に結合せず、H i s タグが存在しない D S - C a v 1 は、いずれの粒子とも有意な結合を達成しなかった。H i s タグ D S - C a v 1 は、リポソーム直径(図 2 0、中央)又は多分散性(図 2 0、右)に基づくと、結合の際、リポソーム凝集を誘導しなかった。

40

【0032】

[図21]

C o P o P / D S - C a v 1 ワクチン接種は、追加免疫注射の前後の両方でより高い I g G 抗体価をもたらす。初回注射後 3 5 日で、C o P o P ワクチンは、最大 R S V 中和を達成する。C D - 1 マウスに 0 日目と 2 1 日目に、1 0 0 n g の D S - C a v 1 を筋肉注射し、4 2 日目に血清を採取し、中和について評価した。

【0033】

[図22]

50

H i s タグ付き O s p A の生成。

【 0 0 3 4 】

[図 2 3] C o P o P / P H A D リポソームを用いて形成された O s p A ベースのプロテオリポソームの特性決定。

(A) 天然 P A G E (ヒスチジン-M O P S 緩衝系、p H 6 . 8) によって評価した O s p A : C o P o P / P H A D リポソームの最適結合質量比。

(B) 室温で 1 : 4 の質量比でインキュベートされた C o P o P / P H A D リポソームへの O s p A 結合のキネティクス。

(C) リポソームの高速遠心分離から得られた上清の m i c r o B C A アッセイによって測定された、C o P o P / P H A D リポソームへの H i s タグ化 O s p A の特異的結合。

(D) 動的光散乱を用いて測定されたリポソームの流体力学的直径と多分散度指数。

(E) H i s タグ化タンパク質の結合有り及び無しでの、C o P o P / P H A D リポソームの T E M 画像。リポソームとタンパク質とのインキュベーションの 3 時間後に、獲得した。エラーバーは n = 3 測定値の標準偏差を表す。

10

【 0 0 3 5 】

[図 2 4] 抗原-機能化ナノリポソームのエピトープ利用能及び安定性の評価。

(A) 蛍光消光アッセイに基づく 2 0 % (v / v) ヒト血清中のナノリポソーム-抗原粒子の安定性。

(B) O s p A 特異的モノクローナル抗体 L A - 2 による O s p A 結合リポソームの免疫沈降。

(C) 表示のサンプルとの 2 時間のインキュベーション後の、マウス R A W 2 6 4 . 7 マクロファージ細胞による、D Y - 4 9 0 - O s p A 取り込み。サイトカラシン B を、インキュベーションの 1 時間前に培地に補充した。エラーバーは n = 3 実験の標準偏差を表す。

20

【 0 0 3 6 】

[図 2 5] O s p A ベースのナノリポソームワクチンの免疫原性の評価。

(A) 他の市販のアジュバントと比較した、C o P o P / P H A D リポソームによって誘導された抗 O s p A I g G 価。(B) ヤギ抗-マウス I g G (H + L) 二次抗体 D y L i g h t (登録商標) 4 8 8 コンジュゲートを用いた透過化 B . b u r g d o r f e r i B 3 1 の間接免疫蛍光アッセイによる抗-O s p A I g G 抗体の検出

(C) B . b u r g d o r f e r i B 3 1 及び B . a z f e l i i の全細胞溶解物を用いたイムノプロットアッセイによる、抗-O s p A I g G 抗体の検出。

30

横線は幾何平均を表す。

【 0 0 3 7 】

[図 2 6] O s p A -結合 C o P o P / P H A D リポソームの T h 1 -バイアス免疫応答

(A) E L I S A を用いた免疫後血清 (4 2 日目) の I g G アイソタイプ・プロファイリング

(B) O s p A による 7 2 時間刺激後のインターフェロン 及びインターロイキン-4 分泌を検出するための脾細胞刺激試験。エラーバーは、n = 3 の 3 重刺激実験からの標準偏差を表す。

横線は幾何平均を示す。

【 0 0 3 8 】

[図 2 7] S N A P 誘発 O s p A 抗体の殺ボレリア菌活性の評価。

(A) モルモット補体を用いて実施した血清殺菌抗体アッセイ。生存率は、一晩の血清処理後のスピロヘータの数を、インキュベーション直後のスピロヘータの数で正規化することから得た。生き残った B . b u r g d o r f e r i B 3 1 - A 3 を、暗視野顕微鏡を用いてカウントした。

(B) 3 匹の異なるマウス血清からの平均 5 0 % の殺ボレリア菌活性 (細菌の 5 0 % を効果的に排除する血清希釈率) 。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。N I は阻害なしを表す。殺菌力価間の差の統計的有意性 (p < 0 . 0 5 、アスタリスクで示す) は、D u n n ' s 事後による K r u s k a l - W a l l i s 検定により評価する。

40

【 0 0 3 9 】

50

[図 2 8]

S N A P免疫マウスにおける抗O s p A I g Gレベルの持続性。C o P o P / P H A D リポソームを用いた1 0 0 n gのO s p Aの初回及び追加免疫ワクチンを、それぞれ0日目及び21日目に接種した。終点力価は、0.5の吸光度カットオフ値での血清希釈の逆数として定義される。データ点は幾何平均を表し、エラーバーは95%信頼区間を表す。

【 0 0 4 0 】

[図 2 9]

H 3 N 2株F r 1 4 7 8由来のH i sタグ化H Aタンパク質の、C o P o Pリポソームへの結合。

【 0 0 4 1 】

10

[図 3 0]

(A) ~ (F) に示すように、3群のマウス(n = 8)に、C o P o P / M P L A、2 H P o P / M P L A、又はA l u m(水酸化アルミニウム)をアジュバントとし、1 0 0 n gのH 3抗原F r 1 4 7 8(f l u株A/イヌ/イリノイ州/1 1 6 1 3/2 0 1 5由来)をワクチン接種し、次いでA/Hong Kong/1/1968を接種した。

(A) ワクチン接種期間を通して採取された血清サンプルを用いて実施されたI g G E L I S A及び(B) H A Iアッセイは、C o P o P / M P L A + F r 1 4 7 8粒子が、ウイルスチャレンジの前に最良の抗体応答を達成することを示す。

(C ~ D) 体重は8日間のチャレンジ期間を通じて安定しており、(E) ウイルス量及び(F) 肺組織中の白血球数はいずれも、C o P o P ワクチン接種マウスで最小であり、ウイルスに対する効果的な防御が示された。

20

(G ~ I) 追跡チャレンジ試験を実施し、C o P o P / M P L A保護を、M P L Aを含まないC o P o P及び別のアジュバントであるモンタニドI S A 7 2 0と比較した。ここでも、C o P o P / M P L Aワクチン接種マウスは、最も一貫した体重保持と、肺における最小のウイルス量及び白血球数を示す。

【 0 0 4 2 】

[図 3 1]

ワクチン接種したマウス血清の受動的移行は、直接的ワクチン接種よりも低い防御をもたらすが、C o P o Pをワクチン接種したマウスからの血清の移行は、(A) 有意な体重減少の減少、(B) 高い生存率、(C) 低い臨床スコアをもたらす。このデータは、C o P o P ワクチン接種に起因する免疫応答が、有意に抗体媒介性であるという仮説を裏付けるものである。

30

【 0 0 4 3 】

[図 3 2]

(A) に示すように、種々のサブタイプからH i sタグ化インフルエンザ抗原を得て、C o P o Pとの結合親和性について試験した。H i sタグ化抗原の結合能は、サブタイプとは無関係であり、ほとんどの抗原は室温で3時間インキュベートすると、C o P o Pと約1 0 0 %の結合を達成する。(B) マウスに、1 0の選択された抗原の1つとインキュベートしたC o P o Pをワクチン接種し、血清を回収し、E L I S Aを使用して、得られた血清抗体の結合反応を定量した。ワクチン抗原と相同であった抗原に対する抗体反応は、最も高いI g G結合をもたらし、他のサブタイプによって誘発された抗体の非特異的結合は、平均して1 ~ 2桁低い結合を示す傾向があった。

40

【 0 0 4 4 】

[図 3 3]

合成アジュバントのいくつかの例の構造。

【 0 0 4 5 】

[図 3 4]

リポソームは4 : 2 : 1 : XのD P P C : コレステロール : C o P : M P L Aで形成され、ここで、M P L Aはこれらのタイプの合成バージョンの各々であり、Xは変化し、5, 4, 3, 2, 1のいずれかであった。C P (P H A D)、C 3 D 6 A (3 D 6 A - P H A D)

50

、C P 5 0 4 (P H A D - 5 0 4)、及びC A (M P L A なし)についての抗-P f s 2 5 力価についての結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本開示は、少なくとも単層を含むナノ構造体を提供する。例えば、この構造は単層又は二重層を含むことができ、前記単層又は二重層はポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを含み、コバルトが二重層内に存在するように、コバルトがそこにキレートされている。前記二重層構造はリポソームを形成することができる。前記構造は、2つの単層(二重層)を含むことができ、2つの単層の疎水性基が向い合せになり、親水性基が表面にさらされている。

10

【0047】

二重層に関する本明細書中の開示は、単層にも当てはめることができる。前記二重層又は単層は、本明細書において「膜(メンブラン)」と呼ばれることもある。

【0048】

本明細書で提供される全ての範囲は、別段の記載がない限り、小数第10位までの範囲に含まれるすべての数値を含む。

【0049】

単層又は二重層中のコバルトポルフィリンの一部又は全てが、ポリヒスチジン-タグ化分子に非共有結合的に結合することができ、ポリヒスチジン-タグの少なくとも1部は、二重層内に存在し、タグ化分子は、二重層の表面に提示される。本発明の二重層又は単層において、ポリヒスチジン-タグ中の一以上のヒスチジン残基は、二重層内のコバルト金属コアに配位し、それによって構造に安定性を提供していると考えられる。ポリヒスチジン-タグのヒスチジン残基は、膜内のポルフィリンのコア中のコバルト金属に配位していてもよい。ヒスチジンタグ全体が、二重層内に存在してもよい。そこにコンジュゲートしたコバルト金属を有するポルフィリン-リン脂質コンジュゲートは、本明細書中でC o P o P と称される。その二重層がC o P o P を含むリポソームは、本明細書中でC o P o P リポソームと称される。C o P o P リポソームは、ヒスチジンタグ化分子で機能化されることができる。本明細書中で使用される「H i s タグ化分子」という用語は、例えば、ヒスチジンテールを有するペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質等の分子を意味する。例えば、ヒスチジンテールを有するペプチドは、H i s タグ化分子である。このようなH i s タグを含むC o P o P リポソームは、本明細書中で、H i s タグ化C o P o P リポソーム又はH i s タグ化C o P o P と称される。

20

30

【0050】

本開示のH i s タグ化提示分子で機能化されたC o P o P 単層又は二重層は、循環内で関心のある様々な分子を提示するため、又は所望の位置への送達のため、又はそれらのH i s タグ化分子への特異的免疫応答を生じさせるためのプラットフォームを提供する。これらの分子は、本明細書中で提示分子(P M : presentation molecule)と称される。ヒスチジンタグに付着したP M を有する、H i s タグ化C o P o P 二重層を含む構造は、望ましい安定性を示す。前記H i s タグ化分子は、C o P o P に非共有結合的に付着し(配位し)、インキュベーションプロセスによって調製できる。それゆえ、このプロセスは、他の種類のコンジュゲーション化学で使用される反応性成分 - 例えば、マレイミドなど - 又は外来性の触媒あるいは非天然アミノ酸の除去を必要としない。

40

【0051】

コバルトポルフィリンは、内部に水性区画を有する自己会合性リポソームの二重層内に存在してもよい。あるいは、それは他のナノ粒子を被覆する単層又は二重層コーティング中に存在してもよい。コバルトポルフィリン-リン脂質(C o P o P)は、両親媒性の性質に関して従来の脂質のように挙動する。それゆえ、C o P o P を含む単層又は二重層は、当業者に既知の方法によって、ナノ粒子をコーティングするために使用できる。一実施形態では、本開示の二重層又は単層は、他のナノ粒子上に存在してもよい(例えば、コーティングの形態で)。一実施形態では、コバルトポルフィリンを含む二重層又は単層(例えば、コ

50

バルトポルフィリン-リン脂質)は、金ナノ粒子又はシリカナノ粒子、あるいは親水性表面を有する他のナノ粒子上のコーティングとして存在する。一実施形態では、前記コーティングは単層の形態であってもよい。一実施形態では、コバルトポルフィリンを含む単層又は二重層は(例えば、コバルトポルフィリン-リン脂質)は、カーボンナノチューブのような疎水性表面上のコーティングとして存在する。一実施形態では、前記単層は、一以上の疎水性分子を取り囲むミセルを形成してもよい。

【0052】

この開示は、単層又は二重層を含むナノ構造体を提供し、前記単層又は二重層は、i) 任意でリン脂質、及びii)コバルトに配位して、コバルトポルフィリンを形成しているポルフィリン、を含む。任意で、前記ナノ構造体は、一以上のポリヒスチジン-タグ化提示分子も有する。当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、前記単層又は二重層の疎水性部分に存在し、ポリヒスチジン-タグの一以上のヒスチジンは、コバルトポルフィリン中のコバルトに配位している。ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、前記ナノ構造体の外側に露出している。前記ナノ構造体は、水性区画を取り囲むリポソームの形態をとることができる。しかしながら、前記ナノ構造体は、金又はシリカナノ粒子のような親水性又は疎水性物質を被覆していてもよい。前記コバルトポルフィリンは、リン脂質にコンジュゲートして、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを形成してもよい。前記コバルトポルフィリンは、前記単層又は二重層の1~100モル%を構成することができ、前記範囲は、その間の0.1モル%の値及び範囲を含む。例えば、前記コバルトポルフィリンは、前記単層又は二重層の1~20モル%、あるいは5~10モル%を構成することができる。コバルトポルフィリンが、前記単層又は二重層の100%を構成する場合、コバルトポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質は存在しない。前記二重層又は単層は、ステロール及び/又はポリエチレングリコールを含んでもよい。前記ステロールはコレステロールであってもよい。

【0053】

前記単層又は二重層中のポリヒスチジン-タグにおけるヒスチジンの数は、2~20であってもよい。例えば、ポリヒスチジン-タグにおけるヒスチジンの数は、6~10であってもよい。例えば、ヒスチジンの数は、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19、又は20であってもよい。

【0054】

前記リポソームは、球形であっても、非球形であってもよい。リポソームの大きさは、50~1000nm以上とすることができる。一実施形態では、前記リポソームは、50~1000nm(その間の全ての整数のnm値及び範囲を含む)の大きさ(例えば、最大寸法、例えば、直径など)を有する。例えば、その大きさは、50~200nm、あるいは20~1000nmであってもよい。リポソームが球形ではない場合、その最大寸法が50~1000nmであってもよい。これらの寸法は、二重層の単層のナノ構造幅を保ちながら達成することが可能である。前記リポソームは、その水性区画中にカーゴを保有することができる。前記カーゴあるいはその一部は、さらに又は代わりに、前記単層又は二重層内に取り込まれてもよい。

【0055】

一実施形態では、本開示は、単層又は二重層を含むリポソームを提供し、ここで当該単層又は二重層は、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲート、任意でコバルトポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質、及びポリヒスチジン-タグ化提示分子を含み、ここで、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は前記単層又は二重層の疎水性部分に存在し、且つ、ポリヒスチジン-タグの一以上のヒスチジンは、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートのコバルトに配位している。前記ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、ナノ構造体の外側に露出している。前記ナノ構造体(例えば、リポソーム)は、水性区画を囲い込むことができる。前記単層又は二重層は、コバルトポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質を含む必要はなく、この場合、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートのみを有する。カーゴは水性区画中に存在できる。前記カー

10

20

30

40

50

ゴは、水性区画だけに存在する必要はなく、その一部は単層又は二重層に存在してもよい。

【0056】

本開示は、単層又は二重層も提供し、当該単層又は二重層は、リン脂質モノマー及びコバルトに配位しているポルフィリン(コバルトポルフィリンを形成している)を含む。前記単層又は二重層は、そこに会合した一以上のポリヒスチジン-タグ化提示分子を有し、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、前記単層又は二重層の疎水性部分に存在する。前記ポリヒスチジン-タグの一以上のヒスチジンは、コバルトポルフィリンのコバルトに配位しており、ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、前記二重層又は単層の外側に存在する。様々な例において、前記単層又は二重層は水性区画を封入するか、あるいはナノ粒子(例えば、金ナノ粒子又はシリカナノ粒子)上のコーティングを形成する。

10

【0057】

本開示は、コア、及び当該コア上の単層又は二重層コーティングを含むナノ構造体を提供し、ここで、前記単層又は二重層は、リン脂質、及びコバルトに配位してコバルトポルフィリンを形成しているポルフィリンを含む。前記ナノ構造体は、一以上のポリヒスチジン-タグ化提示分子を有することができ、ここで、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、単層又は二重層の疎水性部分に存在し、且つ、当該ポリヒスチジン-タグの一以上のヒスチジンは、コバルトポルフィリンのコバルトに配位している。前記ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、前記ナノ粒子の外側に露出している。前記ナノ構造体のコアは、金ナノ粒子又はシリカナノ粒子等のナノ粒子であってもよい。

【0058】

20

前記リポソーム、又はコーティングもしくは単層もしくは二重層を有するナノ粒子は、本明細書に記載されるように、その上に提示分子を有することができ、これは抗原分子及び/又は標的指向性分子(ターゲティング分子)であってもよい。前記提示分子は、ターゲティング能力及び/又はイメージング機能又は他の機能を提供することもできる。

【0059】

H i s タグ化ポリペプチド及びC o P o P組成を含むリポソーム又は他のナノ構造体は、H i s タグ化ポリペプチドのリポソームへの結合に関して、高い血清安定性を示す。一実施形態では、室温で血清(例えば希釈血清)とインキュベートした際、H i s タグ化ペプチドの60%より多くが、24時間のインキュベーション後に、C o P o P含有二重層に結合したままである。一実施形態では、H i s タグ化ペプチドの85%より多くが、血清と24時間インキュベーションした後に、C o P o P層に結合したままである。

30

【0060】

C o P o Pリポソーム又はH i s タグ化C o P o Pリポソームは、カーゴを積み込むことができる。カーゴは典型的には水性区画に存在するが、それが疎水性であるか疎水性成分を有する場合は、完全に又は部分的に二重層中に埋め込まれた状態で存在してもよい。表面に提示分子を有することに加えて、これらの構造体は、当該構造内の水性区画中に、あるいは二重層中にカーゴを積むために使用することができる。C o P o Pリポソームからのカーゴの放出は、近赤外線(N I R)光線によって誘発することができる。前記カーゴは所望の位置で放出させることが可能である(例えば、標的細胞中に内部移行させることによって、又は光誘発放出によって)。

40

【0061】

単層又は二重層のコバルトポルフィリンは、ポルフィリンにコンジュゲートしたコバルト(C o)カチオンを有するポルフィリンである。前記ポルフィリンは、リン脂質にコンジュゲートできる(本明細書において、コバルトポルフィリン-リン脂質又はコバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートと称する)。

【0062】

リポソームの二重層又は他の構造の少なくとも一部を構成しているコバルトポルフィリン又はコバルトポルフィリンコンジュゲートのポルフィリン部分は、ポルフィリン、ポルフィリン誘導體、ポルフィリン類似体、又はそれらの組み合わせを含む。代表的なポルフィリンには、ヘマトポルフィリン、プロトポルフィリン、及びテトラフェニルポルフィリ

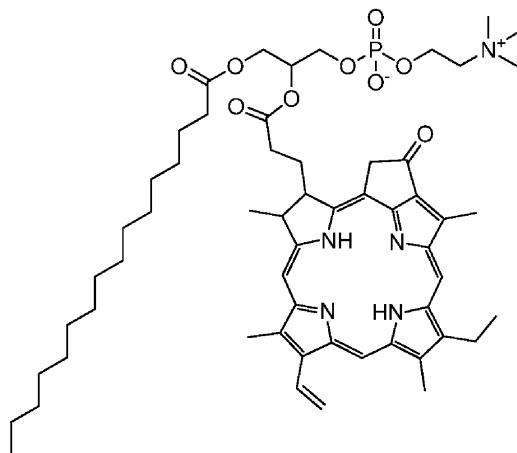
50

ンが含まれる。代表的なポルフィリン誘導体には、ピロフェオホルビド類、バクテリオクロロフィル類、クロロフィルA、ベンゾポルフィリン誘導体、テトラヒドロキシフェニルクロリン類、ブルブリン類、ベンゾクロリン類、ナフトクロリン類、ベルジン(verdin)類、ロジン(rhodin)類、ケトクロリン類、アザクロリン類、バクテリオクロリン類、トリポルフィリン類、及びベンゾバクテリオクロリン類が含まれる。代表的なポルフィリン類似体には、拡張ポルフィリン・ファミリーメンバー(例えば、テキサフィリン類、サフィリン類及びヘキサフィリン類)及びポルフィリン異性体(例えば、ポルフィセン類、反転ポルフィリン類、フタロシアニン類、及びナフトロシアニン類)が含まれる。例えば、コバルトポルフィリンは、ビタミンB₁₂(コバラミン)又はその誘導体であってもよい。

【0063】

一実施形態では、前記POPはピロフェオホルビド(pyropheophorbide)-リン脂質である。ピロフェオホルビド-リン脂質の構造を以下に示す。

【化1】



【0064】

一実施形態では、前記層(単層あるいは二重層)は、その中に組み込まれたHisタグ化提示分子を有するCoPOPのみを有する。この実施形態では、前記層中の唯一のリン脂質はCoPOPである(すなわち、CoPOP100モル%)。一実施形態では、前記層(単層あるいは二重層)は、CoPOP及びポルフィリンコンジュゲート型リン脂質(POP)のみを含み、ここで、CoPOPはその中に埋め込まれたヒスチジンを有し、当該ヒスチジンはそこに付着したペプチドあるいは他の提示分子を有する。ある実施形態では、他のリン脂質は存在しないが、前記層(単層あるいは二重層)は、任意でステロール及び/又はPEG-脂質を含んでもよい。

【0065】

一実施形態では、前記CoPOPに加えて、前記二重層又は単層は、ポルフィリンにコンジュゲートしていない、それゆえCoに配位していないリン脂質も含む。そのようなリン脂質は、本明細書中で「さらなるリン脂質」とも呼ばれる。前記二重層又は単層は、ステロール及びPEG-脂質を含んでもよい。一実施形態では、前記二重層又は単層は、本質的に、CoPOP、ポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質、及び任意でステロール及び/又はPEGのみからなるか、又はCoPOP、ポルフィリンにコンジュゲートしていないリン脂質、及び任意でステロール及び/又はPEGのみからなり、この際、PEGは脂質にコンジュゲートしていてもよい。一実施形態では、二重層中の唯一の金属-POPはCoPOPであり、そこに埋め込まれたHisタグ化提示分子を有する。一実施形態では、二重層中の唯一の金属はCoである。

【0066】

一実施形態では、前記リポソームの二重層は、CoPOP及びPOPを含む。CoPOPとPOPに加えて、前記二重層はさらなるリン脂質を含むことができる。前記二重層又は単層は、さらにステロール及び/又はPEGを含んでもよい。前記PEGは、脂質にコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートしていてもよい。一実施形態では、前記二重層は、本質的に、C o P o P、P o P、さらなるリン脂質、及び任意でステロール及び/又はP E Gのみからなるか、あるいはC o P o P、P o P、さらなるリン脂質、及び任意でステロール及び/又はP E Gのみからなり、この際、P E Gは脂質にコンジュゲートしていてもよい。一実施形態では、前記二重層中の唯一の金属-P o PはC o P o Pである。一実施形態では、前記二重層中の唯一の金属はC oである。

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、前記C o P o Pは、ナノ粒子中に0 . 1 ~ 1 0 モル%存在し、残りの9 9 . 9 ~ 9 0 モル%は、さらなる脂質によって構成されている(前記%は二重層の脂質全体に対するものである)。例えば、C o P o Pの組み合わせは、0 . 1 ~ 1 0 モル%で存在でき、ステロールは0 . 1 ~ 5 0 モル%で存在でき、任意で、弱毒化リポドA誘導体(例えば、モノホスホリルリポドA、あるいは3-脱アシル化モノホスホリルリポドA)又は関連する類似体は0 ~ 2 0 モル%又は0 . 1 ~ 2 0 モル%存在でき、残りはさらなるリン脂質で構成されることができる。前記リン脂質は、D O P C , D S P C , D M P C 又はそれらの組み合わせ、及びステロールである(ステロールが存在する場合; ステロールはコレステロールであってもよい)。

10

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、C o P o PとP o Pの組み合わせは、ナノ粒子中に0 . 1 ~ 1 0 モル%存在してもよく、残りの9 9 . 9 ~ 9 0 モル%は、さらなるリン脂質によって構成される。例えば、C o P o PとP o Pの組み合わせは0 . 1 ~ 1 0 モル%存在でき、ステロールは0 ~ 5 0 モル%又は0 . 1 ~ 5 0 モル%存在でき、任意でP E Gが0 ~ 2 0 モル%又は0 . 1 ~ 2 0 モル%存在でき、残りはリン脂質によって構成されることができる。前記リン脂質は、D O P C , D S P C , D M P C 又はそれらの組み合わせ、及びステロールであってもよい(ステロールが存在する場合; ステロールはコレステロールであってもよい)。

20

【 0 0 6 9 】

本明細書中で使用される「リン脂質」は、グリセロール骨格を介して疎水性の脂質テールに連結されたリン酸基を有する、親水性頭部を持つ脂質である。前記リン脂質は、炭素数6 ~ 2 2のアシル側鎖を含み、前記数値はその間の全ての整数値の炭素及びその間の範囲を含む。ある実施形態では、前記ポルフィリンコンジュゲート中のリン脂質は、1-パルミトイル-2-ヒドロキシ-s n-グリセロ-3-ホスホコリンである。ポルフィリンコンジュゲートのリン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン及び/又はホスファチジルイノシトールを含んでもよく、あるいは、本質的にそれらのみからなってもよく、又はそれらのみからなってもよい。

30

【 0 0 7 0 】

ある実施形態では、前記ポルフィリンは、炭素数1 ~ 2 0(その間の全ての整数値の炭素を含む)の炭素鎖リンカーによって、前記リン脂質のグリセロール基にコンジュゲートしている。

【 0 0 7 1 】

様々な実施形態において、リボソームの二重層は、本明細書に開示されているポルフィリンコンジュゲートに加えて、他のリン脂質も含む。これらのリン脂質の脂肪酸鎖は、二重層を形成するために適切な数の炭素原子を含んでもよい。例えば、脂肪酸鎖は、1 2 , 1 4 , 1 6 , 1 8 又は2 0の炭素原子を含んでもよい。様々な実施形態において、前記二重層は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン及び/又はホスファチジルイノシトールを含む。

40

【 0 0 7 2 】

本発明の二重層及び単層は、ステロールを含んでもよい。前記ステロールは、動物性ステロール又は植物性ステロールであってもよい。ステロールの例には、コレステロール、シトステロール、スチグマステロール、及びコレステロールが含まれる。一実施形態では、コレステロールは、0 モル% ~ 5 0 モル%、又は0 . 1 ~ 5 0 モル%であってもよい。他の実施形態では、コレステロールは1 ~ 5 0 モル%、5 ~ 4 5 モル%、1 0 ~ 3 0 モル

50

%存在し得る。

【0073】

ある実施形態では、前記二重層又は単層は、さらに、PEG-脂質を含む。PEG-脂質は、DSPE-PEG(例えば、DSPE-PEG-2000、DSPE-PEG-5000又は他のサイズのDSPE-PEG)であってもよい。前記PEG-脂質は、0~20モル%の量(少数第10位までのその間の全ての%量を含む)で存在する。PEG成分の平均分子量は500~5000ダルトンの間及びその間の全ての整数値及び範囲であってもよい。

【0074】

ある実施形態では、前記二重層又は単層は、さらにアジュバント、例えばモノホスホリルリピドAあるいは3-脱アシル化モノホスホリルリピドAのような弱毒化リピドA誘導体を含む。

10

【0075】

前記ヒスチジンタグ(Hisタグ)は、様々な用途のために、関心のある多様な提示分子を保有してもよい。Hisタグの少なくとも一端又は両端は、リポソームの外表面近くに存在してもよい。一実施形態では、ポリヒスチジン-タグの少なくとも一端が、提示分子に共有結合的に付着している。一実施形態では、前記Hisタグは、少なくとも2つのヒスチジンからなる鎖である。一実施形態では、前記Hisタグは、2~20のヒスチジン鎖である。一実施形態では、前記Hisタグは、4~12のヒスチジン及びその間の全ての整数値のヒスチジンからなる鎖である。一実施形態では、それは6~10のヒスチジンからなる。一実施形態では、それは6, 7, 8, 9又は10のヒスチジンである。一実施形態では、Hisタグの一端はフリーであり、他端にペプチドあるいは他の分子が付着している。Hisタグの少なくとも一部は、コバルト金属コアに配位するように、二重層内に位置していると考えられる。

20

【0076】

本開示のリポソーム(Hisタグ化分子を有さないもの)は、実質的に球形であってもよく、30nm~250nm(その間のnmまでの全ての整数値及び範囲を含む)の大きさ(例えば、最大寸法、例えば直径など)を有し得る。一実施形態では、前記リポソームの大きさは100~175nmである。一実施形態では、組成物中のリポソームの少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%が30~250nm又は100~175nmの大きさを有する。前記リポソーム又はナノ構造体は、200nmより大きくてもよい。一実施形態では、前記ナノ構造体は1000nmより大きい。一実施形態では前記ナノ構造体は200~1000nmである。前記リポソーム又はナノ構造体は、球形であっても、非球形であってもよい。一実施形態では、単層又は二重層のナノ構造幅を保ちつつ、前記ナノ構造体の最大寸法は200nm未満である。一実施形態では、単層又は二重層のナノ構造幅を保ちつつ、ナノ構造体の大きさは、ある寸法では200nmを超える。一実施形態では、単層又は二重層のナノ構造幅を保ちつつ、ナノ構造体の大きさは、ある寸法では1000nmを超える。

30

【0077】

一面では、本開示は、本開示のリポソーム又は他の構造体、あるいは異なるリポソーム又は他の構造体の混合物を含む組成物を提供する。前記組成物は、ヒトを含む個体に投与するための、無菌の適切なキャリア、例えば、生理学的バッファー、例えば、スクロース、デキストロース、生理食塩水、pHバッファリング成分(例えばpHを5~9、pHを7~8、pHを7.2~7.6(例えば7.4)にするための)(例えば、ヒスチジン、クエン酸塩、又はリン酸塩)等も含むことができる。一実施形態では、前記組成物は、少なくとも0.1%(w/v)の、CoPoPリポソーム又はHisタグ化-CoPoPリポソーム又は他の構造体を含む。様々な実施形態において、前記組成物は、0.1~100モル%の、CoPoPリポソーム又はHisタグ化-CoPoPリポソーム又は他の構造体(例えば、二重層で被覆されたナノ粒子)を含む。一実施形態では、前記組成物は、CoPoPリポソーム(それに会合しているHisタグ化提示分子を有する)を0.1~99モル%含む。

40

【0078】

50

一実施形態では、本開示の組成物は、マレイミド又はスクシンイミジル(succinimidyl)エステル反応基を有さない。一実施形態では、膜に付着するタグ化分子は、非天然アミノ酸を有さない。

【0079】

H i s タグを有する提示分子は、低分子であっても高分子であってもよい。一実施形態では、前記分子はペプチド又はペプチド誘導体である。一実施形態では、前記分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物又はポリマーである。H i s タグは、目的の分子に化学的にコンジュゲートしていてもよい。H i s タグは、ポリペプチドの一次アミノ酸配列内に取り込まれていてもよい。一実施形態では、前記分子は抗原、例えばペプチド(2 ~ 50のアミノ酸、及び2と50の間のアミノ酸長からなる全てのペプチド)又はポリペプチド(50 ~ 1000のアミノ酸及び50と1000の間のアミノ酸長からなる全てのポリペプチド)又はタンパク質(1000アミノ酸より大きい)である。前記ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、天然に存在するアミノ酸のみを有してもよく、あるいは天然に存在するアミノ酸と天然に存在しないアミノ酸の混合からなってもよく、あるいは天然に存在しないアミノ酸のみを有してもよい。

10

【0080】

H i s タグに付着される提示分子は、抗原分子、標的指向性分子、治療用分子、診断用分子、又は他の種類の機能を提供する分子であってもよい。タグ化分子は、標的指向化のため、すなわち、単層又は二重層を有する構造体を、その標的部位に導くために使用されてもよい。例えば、ペプチドリガンドは、リボソーム(又は他の構造体)を、当該リガンドのための受容体又は認識分子を有する細胞に導くために、H i s タグに付着されてもよい。一実施形態では、付着ペプチドは、代替の又は更なる機能を提供することができる。例えば、付着ペプチドは、治療、診断、又は免疫原性に関する機能を提供することができる。

20

【0081】

特定の実施形態では、前記提示分子は、標的指向性分子(例えば、抗体、ペプチド、アダプター、又は葉酸等の他の分子)であってもよい。用語「標的指向性分子」は、特定の標的に、リボソーム等の二重層を有する構造体を向かわせることができる分子を指すために用いられる(例えば、標的細胞の表面上の受容体又は他の分子に結合することによって)。標的指向性分子は、タンパク質、ペプチド、核酸分子、糖類あるいは多糖類、受容体リガンド又は他の低分子であってもよい。特異性の程度は、標的指向性分子の選択を通じて調節することができる。例えば、抗体は通常高い特異性を示す。これらは、ポリクローナル、モノクローナル、フラグメント、組換え体、単鎖、又はナノボディであってもよく、これらの多くは市場で入手可能であるか、標準技術を使用して容易に得ることができる。

30

【0082】

提示分子は、抗原分子(すなわち、抗原エピトープを有する分子)であってもよい。一実施形態では、前記分子はペプチドである。一実施形態では、前記ペプチドはR G D保有ペプチド配列である。このような配列は、エピトープを有する7 ~ 20アミノ酸又はより長いアミノ酸であり得る。前記ペプチドは、病原微生物のような微生物(例えば、ウイルス、細菌、寄生虫、又は真菌)の一部であるポリペプチド又はタンパク質のフラグメントであってもよく、又はそのようなポリペプチド又はタンパク質のエピトープを含んでもよい。例としては、呼吸器合胞体ウイルス(R S ウイルス)、Borrelia burgdorferi(本明細書中ではライム病ボレリアと称する)、インフルエンザウイルスなどが挙げられる。ペプチドは、一般的に免疫原性ではないポリペプチド又はタンパク質(例えば、事実上免疫原性があることは知られていないウイルスタンパク質など)のフラグメントであってもよい。ペプチドは、例えばH I V 外側エンベロープタンパク質等のH I V 抗原のフラグメントであってもよく、又はH I V 抗原のエピトープを含んでもよい。一実施形態では、H I V 抗原はg p 4 1である。例えば、ペプチドはg p 4 1エンベロープの膜近位外部領域(M P E R)であってもよい。抗原のさらなる例としては、R S V に対するD S - C a v 1、ライム病に対するO s p A、及びインフルエンザに対する赤血球凝集素及びノイラミニダーゼが挙げられる

40

50

が、これらに限定されない。

【0083】

一実施形態では、本開示は抗原性組成物を提供する。前記組成物は、二重層を有する構造体を含み、ここで、ヒスチジンテールを有する抗原が、コバルトポルフィリン(又はコバルトポルフィリン・リン脂質)に非共有結合的にコンジュゲートして、Hisタグが二重層に埋め込まれており、抗原の一以上のエピトープが、表面に露出している。前記組成物は、当該分野で既知のアジュバント及び他のキャリアを含んでもよい。アジュバントの例には、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、アラム(alum)、リン酸化ヘキサシル二糖(PHAD: phosphorylated hexaacyl disaccharide)、Sigmaアジュバントシステム(SAS)又はサポニンが含まれる。湿潤剤、乳化剤、フィラーなどの他のキャリアも使用可能である。AddaVax(Invitrogen)、又はサポニンが含まれる。湿潤剤、乳化剤、充填剤等のような他のキャリアも使用することができる。

10

【0084】

多種多様のカーゴを、本開示のリポソーム又は他の構造体に積み込むことが可能である。前記カーゴは、近赤外光を使用して所望の位置へ送達可能である。例えば、生理活性物質又は治療用物質、医薬物質、又は薬物を、COPリポソームの内部に封入することができる。これには、水溶性薬物、及び化学勾配を介して装填され、リポソームの水相中に濃縮され得る弱酸又は弱塩基である薬物も含まれる。このように、様々な実施形態において、前記リポソームは、その中に被包された活性物質(例えば、治療用物質及び/又は診断用物質、ドキソルピシンのような化学療法剤であってもよい)を含む。化学療法剤であるドキソルピシンは、能動的に積み込まれて、NIR照射で放出されることができ、COPリポソームを用いた、強く直接的な光誘発性放出を提供する。

20

【0085】

一実施形態では、脂質と薬物(あるいは他の任意のカーゴ物質)の比は、10:1~5:1である。様々な実施形態において、脂質と薬物/カーゴの比は、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、又は5:1である。前記比を計算するために使用される脂質は、ポルフィリン-リン脂質コンジュゲートの一部であるリン脂質、さらなるリン脂質、又はステロール、及びPEGにコンジュゲートした脂質(存在する場合)を含む、全ての脂質を含む。時には、本開示においてカーゴは薬物として記載されるが、その記載は、治療のため及び/又は所望の部位へ送達するために含まれるいかなる物質にも同じように当てはめることができ、用語「薬物」は、任意の物質を指すものである。前記物質は、その全体又は一部が、POPリポソームの内部又は中に含まれてもよく、それは水性区画、二重層又はその両方に存在してもよい。

30

【0086】

一実施形態では、前記リポソーム内又は他のキャリアに積み込まれたカーゴは、治療剤である。用語「治療剤」は、当該分野において承認されている用語であり、生物学的、生理学的、又は薬理的に活性な物質である任意の化学成分を指す。「薬物」とも称される治療剤の例は、「Merck Index」、「Physicians Desk Reference」、及び「Pharmacological Basis of Therapeutics」のような周知の参考文献に記載されており、それらには、医薬; ビタミン; ミネラルサプリメント; 疾患又は病気の治療、予防、診断、治療、緩和のために使用される物質; 体の構造又は機能に影響を与える物質; 又は生理環境に置かれた後、生物学的に活性又はより活性になるプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。被験者に投与された際、当該組成物から、隣接する組織や体液の中に放出される能力がある、様々な形態の治療剤を使用することができる。活性勾配によって積み込まれる既知の薬物には、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ゲムシタピン、エビルピシン、トポテカン、ピンクリスチン、ミトキサントロン、シプロフロキサシン及びシスプラチンが含まれる。治療的カーゴには、様々な抗生物質(例えば、ゲンタマイシン)、又は、細菌、真菌、寄生虫、あるいは他の生物によって引き起こされる感染に対して効果的な他の物質も含まれる。これらの薬物は、COPリポソームに積み込まれることができ、且

40

50

つ、放出されることができる。

【0087】

一実施形態では、リポソームに積み込まれるカーゴは診断用薬である。「診断薬」又は「診断用薬」は、診断のために使用できる任意の化学成分である。例えば、診断用薬には、造影剤、例えば、インジウムやテクネチウムなどの放射性同位元素を含むもの等；ヨウ素やガドリニウムを含むコントラスト剤；酵素、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、GFP、アルカリホスファターゼ、又はガラクトシダーゼ等；蛍光物質、例えばユーロピウム誘導体等；発光性物質、例えばN-メチルアクリジウム誘導体等；が含まれる。

【0088】

前記カーゴは2以上の物質であってもよい。例えば、カーゴは、診断用薬、治療用剤、免疫原性物質、及び/又は造影剤、及び/又は他の種類の物質の組み合わせを含んでもよい。同じ物質が複数の機能を有することも可能である。例えば、物質は診断用且つ治療用であってもよく、又は、物質は画像処理用であり且つ免疫原性を有するもの等であってもよい。

10

【0089】

本開示の層によって形成される構造は、血清に安定である。例えば、インビトロにおいて、CoPOP二重層に対するHisタグの結合安定性は、室温で24時間、50%ウシ血清中でインキュベートしたときでも、安定である。このように、これらの構造は、血清又は濃縮血清又は希釈血清コンディション下でも安定である。

【0090】

本開示は、本明細書に記載の二重層を有する構造体を使用する方法も提供する。一実施形態では、この開示は、ホストにおいて免疫応答を誘発する方法を提供する。前記免疫応答は、抗体を生成し得る。前記方法は、ヒスチジンタグ化抗原がコンジュゲートしたCoPOP二重層を有する構造体を含む組成物を、個体に投与することを含む。前記組成物は、皮下、皮内、筋肉内、腫瘍内又は任意の他のルートを含む、免疫化のための任意の標準的なルートによって投与することができる。前記組成物は、単回投与で投与されてもよく、あるいは、ブースターショットを含む複数回投与で投与されてもよい。抗体価を測定して、免疫応答をモニターすることができる。

20

【0091】

本発明のナノ構造体は、所望の抗原に対する抗体価を低下させるために使用できる。例えば、免疫原性を減らすことが望まれる場合、その中にPS(又はそれ以外)を含むリン脂質が存在するナノ構造体を使用することができる。これらのナノ構造体を含む組成物は、免疫原性を減らすために投与できる。

30

【0092】

一面では、本開示は、リポソームあるいは他のナノ構造体中にカーゴとして含まれる物質を、所望の位置に送達する方法を提供する。前記物質は、その全体又は一部が、CoPOPリポソームの内部又は中に含まれてもよく、それは水性区画、二重層又はその両方に存在してもよい。前記方法は、1)カーゴ(活性剤など)を任意で含む本開示の二重層を有するリポソーム又は他の構造体を含む組成物を準備する；2)選択された場所又は所望の場所に前記リポソームを到達させる；3)少なくとも一部のカーゴがリポソームから放出されるようなコンディション下で、リポソームに、近赤外波長を有する放射線を照射することを含む。その代わりに、又はそれに加えて、前記カーゴは、リポソームが内部移行し、その後細胞内プロセスの作用を受けてカーゴを放出することによって、細胞の内部に到達してもよい。

40

【0093】

前記リポソームは、波長650~1000nm(その間のnmまでの全ての整数値及び範囲を含む)・出力50~1000mW/cm²(その間のmW/cm²までの全ての整数値及び範囲を含む)のレーザーからの近赤外光を照射されてもよい。別の実施形態では、波長は650~800nmであり、これにはその間のnmまでの全ての整数値及び全ての範囲が含まれる。前記リポソームは、30分まで又はそれ以下の時間照射されてもよい。様々な実

50

施形態において、リポソームはインビトロ又はインビボで0.5～30分及びその間の小数点第10位までの全ての数値の時間照射されてもよい。一実施形態では、前記リポソームは、658nmのレーザーダイオードで、最大で10分間照射される。他の実施形態では、前記リポソームは、665nm又は671nmの波長で照射される。赤外線は、レーザー光線を所望のエリアにあてることによってそのエリアに直接送達されてもよく、又は光ファイバプローブが使用されてもよい。腫瘍の場合、局所に照射するために、光ファイバプローブを腫瘍内に挿入することができる(すなわち、カテーテル又は内視鏡装置によって)。

【0094】

一面では、本開示は、C o P o Pを含む二重層を調製する方法を提供する。遊離塩基のP o Pは、ピロフェオホルピド-aのようなモノカルボン酸ポルフィリンを、2-パルミトイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(L y s o-C 1 6-P C、Avanti #855675P)によって、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと4-ジメチルアミノピリジンを使用して、クロロホルム中で、L y s o-C 1 6-P C : P y r o : E D C : D M A P = 1 : 1 : 2 : 2のモル比で、室温で一晩攪拌することによって、エステル化して製造することができる。P o Pはその後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製される。C o P o Pは、暗所にて、溶媒(例えば、メタノール)中で、モル過剰の(例えば、10倍モル過剰)のコバルト塩(例えば、酢酸コバルト(II)四水和物)とポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを接触させることによって作製できる。

【0095】

一実施形態では本開示は、コバルトポルフィリン(例えば、C o P o P)二重層又は単層で、ナノ粒子を被覆する方法を提供する。当該方法は、一般的に、水中に粒子を分散させるために、脂質の溶液でナノ粒子を水和させることを含む。

【0096】

カーゴを所望の位置に送達するため、又は通常の投与のために、適切なキャリア中に前記リポソームを含む組成物を、任意の適切なルートによって、個体に投与することができる。一実施形態では、それが脈管構造(循環系)に入るように、静脈内注入によって投与する。前記組成物は、全身的に投与されてもよく、あるいは特定の器官又は組織又は腫瘍への血液供給中に直接投与されてもよい。N I Rで照射された際、P o Pリポソームの内容物は、循環系内で放出されてもよく、及び、その後周辺の組織に入ってもよい。

【0097】

以下の記載において、本開示のナノ構造体、組成物及び方法の様々な例が開示される。

1. ナノ構造体(例えば、リポソーム)であって、

a) 単層又は二重層であって、i) 任意でリン脂質、及びii) コバルトに配位して、コバルトポルフィリンを形成しているポルフィリン、を有する単層又は二重層；及び

b) 任意で、ポリヒスチジン-タグ化提示分子、ここで、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、単層又は二重層の疎水性部分に存在し、及びポリヒスチジン-タグの-以上のヒスチジンは、前記コバルトポルフィリンのコバルトに配位しており、ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、ナノ構造体(例えば、リポソーム)の外側に露出しており、且つリポソームである場合、当該リポソームは水性区画を取り囲んでいる；
を含むナノ構造体。

2. 前記コバルトポルフィリンがリン脂質にコンジュゲートして、コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートを形成している、上記1に記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

3. 前記コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートが、単層又は二重層の1～25%を構成する、上記2に記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

4. 前記コバルトポルフィリン-リン脂質コンジュゲートが、単層又は二重層の5～10%を構成する、上記3に記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

5. 前記二重層が、ステロール(例えば、コレステロール)をさらに含む、上記1～4のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

6. 前記二重層が、ホスファチジルセリン、及び、任意でコレステロールをさらに含む、上記1～4のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

7. 前記ポリヒスチジン-タグが、6～10のヒスチジン残基を含む、上記1～4のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

8. 前記リポソームの大きさが50nm～200nmである、上記1～4のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

9. 前記ナノ構造体(例えば、リポソーム)がカーゴを含み、且つリポソームである場合、前記カーゴの少なくとも一部が、リポソームの水性区画内に存在する、上記1～4のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

10. 前記提示分子が、4～50のアミノ酸からなるペプチドである(前記アミノ酸の数には、Hisタグのヒスチジンは含まれない)、上記1～9のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

10

11. 前記提示分子が、4～500kDaのタンパク質である、上記1～10のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

12. 前記提示分子が抗原分子であり、及び、前記単層又は二重層が、そこに取り込まれているアジュバントをさらに含む、上記1～11のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

13. 前記アジュバントが、弱毒化リポドA誘導体である、上記12に記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

14. 前記弱毒化リポドA誘導体が、モノホスホリルリポドA又は3-脱アシル化モノホスホリルリポドAである、上記13に記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)。

20

15. ナノ構造体であって、

a) コア; 及び

b) 前記コア上の単層又は二重層であって、i) 任意でリン脂質モノマー、及びii) コバルトに配位して、コバルトポルフィリン(例えば、CoPoP)を形成しているポルフィリン、を有する単層又は二重層; 及び

c) 任意で、ポリヒスチジン-タグ化提示分子、ここで、当該ポリヒスチジン-タグの少なくとも一部は、単層又は二重層の疎水性部分に存在し、ポリヒスチジン-タグの一以上のヒスチジンは、前記コバルトポルフィリンのコバルトに配位しており、ポリヒスチジン-タグ化提示分子の少なくとも一部は、ナノ構造体の外側に露出している;

30

を含むナノ構造体。

16. 前記コアが金ナノ粒子である、上記15に記載のナノ構造体。

17. カーゴの標的化送達方法であって、

a) 医薬キャリア中に、上記9～16のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)、又は上記9～16のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)の組み合わせを含む組成物を、個体に投与すること; 及び

b) ナノ構造体(例えば、リポソーム)を前記個体の所望の位置に到達させるために適切な時間が経過した後、前記リポソームを、波長650～1000nmの近赤外線にさらして、リポソームからカーゴを放出させること

を含む、方法。

40

18. 前記個体が、ヒト又は非ヒト動物である、上記17に記載の方法。

19. 宿主個体において免疫応答を生じさせる方法であって、医薬キャリア中に上記1～16のいずれか1つに記載のナノ構造体(例えば、リポソーム)、又は上記1～16のいずれか1つに記載の組み合わせナノ構造体(例えば、リポソーム)を含む組成物を個体に投与することを含み、前記提示分子が免疫原性エピトープを含むものである、方法。

20. 前記提示分子が、病原微生物由来のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質である、上記19に記載の方法。

21. 前記個体が、ヒト又は非ヒト動物である、上記19又は20に記載の方法。

【0098】

以下の実施例は、本開示を説明するために提示され、それらはいかなる方法による限定

50

も意図していない。

【実施例 1】

【0099】

本実施例は、ヒスチジントグ化リガンドと抗原を用いたコバルトポルフィリン-リン脂質 (CoPoP) 二重層の合成と機能付与を説明する。

【0100】

材料と方法

材料は、特に断りの無い限り、Sigma社から入手した。ペプチドは商業ベンダーから入手し、HPLCで純度を測定し、質量分析で同一性を確認した。

【0101】

【表 1】

表 1. ペプチドの性質

名称	配列	予測 質量	観測 質量	純度	供給元
RGD-His	5-FAM-GRGDSPKGAGAKG-HHHHHHHH (配列番号 1)	2475.52	2475.60	99.1%	GenScript
Free RGD	GRGDSPK (配列番号 2)	715.76	715.8	99.3%	GenScript
RGD-palm	5-FAM-GRGDSPKGAGAKG(lys(パルミチン酸)) (配列番号 3)	1882.15	N.D.	96.7%	GenScript
cRGD-His	Cyclo(RGDY(D-)K(-Suc-PRG12-HHHHHHH)) (配列番号 4)	2280.5	2280.1	94.7%	Anaspec
0-His	5-FAM-KKGGGG (配列番号 5)	860.9	861.68	95.3%	Biomatik
2-His	5-FAM-KKGGGGHH (配列番号 6)	1135.18	1135.63	96.8%	Biomatik
4-His	5-FAM-KKGGGGHHHH (配列番号 7)	1409.46	1409.20	93.6%	Biomatik
6-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHH (配列番号 8)	1683.75	1683.40	92.8%	Biomatik
8-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHHHH (配列番号 9)	1958.03	1957.30	92.9%	Biomatik
10-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHHHHHH (配列番号 10)	2232.32	2231.64	90.9%	Biomatik
MPER-His	NEQELLELDKWASLWNGGKGG-HHHHHHHH (配列番号 11)	3304.52	3304.75	93.6%	GenScript
MPER-Biotin	NEQELLELDKWASLWNGGK-ビオチン (配列番号 12)	2584.91	2285.55	90.1%	GenScript

【0102】

タンパク質結合のために、組換えヘプタヒスチジン-タグ化セルリアン-ビーナス融合レポータータンパク質を、大腸菌中で産生し、精製し、前述したように特性を明らかにした。化学量論の概算は、各 ~ 100 nm のリポソームが、80,000 の脂質を含むという仮定に基づく。

【0103】

CoPoP-脂質、PoP-リポソーム及びPoP-金の生成

遊離塩基(2H)PoP sn-1-パルミトイル sn-2-ピロフェオホルピド ホスファチジルコリンを、上述したように合成した。CoPoPは、100 mg の2H-PoPと、10倍モル過剰の酢酸コバルト(II)四水和物とを、4 mL のメタノール中で、17時間、暗所で攪拌することによ

10

20

30

40

50

て生成した。反応の完了と生成物の純度はTLCでモニターした(>90%純度)。その後溶媒を、回転エバポレーターによって除去し、PoPを、クロロホルム：メタノール：水(1：1.8：1)で三回抽出した。クロロホルム層を収集し、溶媒を回転エバポレーターによって除去し、tert-ブタノール中に20%の水を含む溶液中で生成物を凍結乾燥し、81.5 mgの生成物を得た(収率77%)(同一性は質量分析で確認した)。他の金属-PoPを、同じ方法を使用して合成した。Ni-PoPについては、酢酸Ni(II)四水和物を使用し、17時間インキュベートした。Zn-PoPについては、無水酢酸Zn(II)を使用し、17時間インキュベートした。Mn-PoPについては、酢酸Mn(II)を使用し、30時間インキュベートした。Cu-PoPについては、酢酸Cu(II)を使用し、テトラヒドロフラン中で、3時間インキュベートした。

【0104】

PoP-リポソームを1mgスケールで製剤化した。試験管内のクロロホルム中に脂質を溶解した後、溶媒を蒸発し、フィルムを真空下で一晩さらに乾燥した。脂質を、1 mLのリン酸緩衝食塩水(PBS)で再水和し、超音波処理し、10回の冷凍-解凍サイクルにかけ、その後、小型押出機を用いて(Avanti #610000)、100 nmのポリカーボネート膜(VWR #28157-790)を通して押し出した。タンパク質及びペプチドの結合分析のために、10モル%のPoP、85モル%のDOPC(Avanti #850375P)、及び5モル%のPEG-脂質(Avanti #880120P)を用いて、リポソームを形成した。Ni-NTAリポソームは、10モル%のNi-NTA脂質ジオレオイル-グリセロ-Ni-NTA(Avanti #790404P)及び10モル%の2H-PoPを含有した。遊離Co-ポルフィリンを取り込んだリポソームは、10モル%のCo-ピロフェオホルビドを、85モル%のDOPC及び5モル%のPEG-脂質とともに含んだ。Co-NTA-リポソームは、10モル%のジオレオイル-グリセロ-NTA(Avanti #790528P)を含むリポソームを使用して調製した。リポソームを、20 mg/mLの塩化コバルト(II)とともに、2時間インキュベートし、その後PBSで透析した。スルホローダミンBを積んだリポソームは、表記の通り、10モル%のPoP、35モル%のコレステロール(Avanti #700000P)、55モル%のDOPC及びPEG-脂質を含んだ。スルホローダミンBの溶液(VWR #89139-502)を用いて、脂質フィルムを水和し、その後凍結-解凍し、その後超音波処理した。封入されなかった色素は、10 mLのSephadex G-75(VWR #95016-784)カラム、その後のPBS中での透析によって除去した。二重層の完全性と定量的細胞結合研究のために50 mMの色素を使用し、顕微鏡研究では10 mMの色素を使用した。

【0105】

金コーティングのために、60 nmのクエン酸塩-安定化金ナノ粒子(Ted Pella #15709-20)を使用して、45モル%のジステアロイルホスホコリン(Avanti #850365P)、45モル%のジステアロイルホスホグリセロール(Avanti #840465X)及び10モル%のPoPからなる1 mgの脂質フィルムを水和した。短時間のボルテックス及び超音波処理の後、サンプルを15分間・相対遠心力1500(rcf)で繰り返し遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを二回以上、再懸濁及び再遠心分離した。さらなる分析のために、PoP金を水中に再懸濁した。

【0106】

ポリペプチド結合

1 µgの蛍光レポータータンパク質を、96ウェルプレートで、200 µLのPBS中のリポソーム20 µgとともにインキュベートした。FRETチャネルの蛍光(ex : 430 nm、em : 525 nm)を、蛍光マイクロプレートリーダー(Tecan Infinite II)を用いて定期的に測定した。リポソームを添加していないタンパク質中のFRETシグナルを基準として、データを正規化した。2.5 µgのタンパク質を50 µgのリポソームとインキュベートし、続いて、0.75%アガロースゲル中で電気泳動し(50Vを90分間適用)、IVIS Lumina IIシステムによって表示の励起及び発光フィルターを用いて画像処理することにより、EMSA実験を行った。血清安定性試験のために、3 mgのタンパク質を、40 µl PBS中のリポソーム60 mgとともにブレインキュベートした。24時間のインキュベーション後、40 µLのFBSを添加し、さらに8時間インキュベートした。イミダゾール置換実験のために、1 µgのレポータータンパク質を、PBS中で20 µgのリポソームに結合させた。その後イミダゾールを滴定し、蛍光

10

20

30

40

50

により結合を評価した。血清安定性のために、1 μ gのレポータータンパク質を、100 μ LのPBS中で20 μ gのリポソームに結合させ、その後、等容積のウシ胎児血清(VWR #82013-602)を添加して、蛍光で結合をモニターした。500 ngのペプチドを20 μ gのリポソームとともにインキュベートした後、ペプチド結合を、RGD-His FAMフルオロフォア消光で評価した。

【0107】

標的指向性実験

U-87及びMCF-7細胞株をATCCから入手し、供給者のプロトコルに従って培養した。2 \times 10⁴細胞を、96ウェルプレート中のウェルに一晩播種した。500 ngのRGD-Hisペプチドを、スルホローダミンBを積んだリポソーム20 μ gと結合させ、リポソームを細胞とともに2時間インキュベートした。培地を除去し、細胞をPBSで三回洗浄し、その後細胞とリポソームを、1% Triton X-100溶液で溶解した。リポソームの取り込みは、スルホローダミンBの蛍光を測定することによって評価した。

10

【0108】

共焦点画像解析のために、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むDMEM中のNunc chamber スライド(Nunc #155411)に、10⁴細胞を一晩播種した。20 μ gのリポソームを、血清を含む培地に添加して、2時間インキュベートした。培地を除去し、細胞をPBSで三回洗浄した。新しい培地を添加し、Zeiss LSM 710共焦点蛍光顕微鏡を用いた顕微鏡検査で細胞を画像化した。金のイメージングは、後方散乱イメージング用の励起と発光の両方に633 nmの光を使用した以外は、同じ方法で実施した。ペプチド結合後、金を遠心分離して、結合していないRGDペプチドを除去した。

20

【0109】

インビボ実験に関しては、バッファローにある大学のInstitutional Animal Care and Use Committee(IACUC)の方針と承認に従って、動物を扱った。5週齢のメスの胸腺欠損ヌードマウス(Jackson Labs)の側腹部に、U87細胞を接種し、腫瘍の成長が直径4~5 mmに達したときに、マウスを治療した。マウスに、cRGD-Hisで標的化した、あるいはcRGD-His無しの200 μ LのスルホローダミンB-搭載リポソーム(1 mg/mL脂質)を静脈注射した。注射後45分目にマウスを犠牲にし、臓器を抽出し、秤量し、0.2% Triton X-100溶液中で機械的にホモジナイズし、蛍光を評価して生体内分布を決定した。

【0110】

ワクチン接種

特に断わりのない限り、8週齢のメスのBALB/cマウス(Harlan Laboratories)に、0日目と14日目に、50 μ Lの無菌PBS中に25 μ gのMPERペプチドを含む注射を、後腹側の足蹠に注射した。表記されている場合、注射は、リポソーム中に、25 μ gのMPL(Avanti #699800P)又はTDB(Avanti #890808P)も含み、リポソームはDOPC: コレステロール: MPL: PoPを、50: 30: 5: 5のモル比で含んだ。フロイントアジュバントについては、ペプチドを、フロイント完全アジュバント(Fisher #PI-77140)中で直接混合し、注射した。最初の注射から4週間、又は表記の期間後、血液を顎下静脈から採取し、血液凝固と2000rcf・15分間の遠心分離後に血清を得て、-80 で保存した。

【0111】

抗-MPER力価を、96-ウェル・ストレプトアビジン-被覆プレート(GBiosciences #130804)中で、ELISAによって評価した。0.1% Tween 20を含む100 μ LのPBS (PBS-T)中の1 μ gのHisタグ-フリーMPERピオチンを、37 にて2時間、ウェル中でインキュベートした。ウェルをその後PBS-Tで五回洗浄し、0.1%のカゼインを含むPBS (PBS-C)で、マウスの血清を連続希釈し、37 で30分間インキュベートした。ウェルをPBS-Tで五回洗浄し、その後PBS-Cで希釈した100 μ Lのヤギ抗-マウスIgG-HRP (GenScript #A00160)をウェルに添加して、1 μ g/mLの二次抗体を含む最終濃度に調節し、37 で30分間インキュベートした。ウェルをPBS-Tで五回洗浄し、その後、100 μ Lのテトラメチルベンジジン基質溶液(Amresco #J644)を各ウェルに添加し、37 で20分間インキュベートした。反応を100 μ Lの1M HClで停止し、450 nmで吸収を測定した。力価は、450 nmでの吸

30

40

50

光度が、非血清バックグラウンドの同一希釈を、0.05吸光度単位を超えたときの、希釈度の逆数と定義した。全てのサンプルは、二回測定して平均した。

【0112】

ウイルス侵入実験

上述したようにして、ウイルス侵入実験を実施した。簡単に説明すると、HIV-1は、293T細胞にpHXB2-envとpNL4-3.HSA.R-Eを共トランスフェクションすることにより、産生した。トランスフェクションの2日後、細胞培地を、0.45 μm のフィルターに通し、遠心分離した。ウイルスペレットを乾燥し、600 μL のPBS中に再懸濁し、 -80°C で貯蔵した。HIV-1ストックの感染力価を、既報のように、X-Gal染色によって決定した。

【0113】

MPER及びCoPoPリポソームで免疫化した三匹のマウスの血清をプールし、固定化プロテインGビーズ(VWR #PI20398)を用いて、供給業者のプロトコルに従って、IgGを単離した。濃度はブラッドフォード分析による吸収で決定した。2F5を、フリーNIH AIDS試験プログラムから入手した。ウェルあたり 1×10^4 T2M-bl受容体細胞を、感染の前日に、96ウェルプレートに蒔いた。HIV(感染多重度0.1)を、抗体と共に37 $^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートし、細胞に添加し、25 $^\circ\text{C}$ で1時間、1000 rcfでスピノキュレーションし、続いてさらに5%CO₂インキュベーター中で、37 $^\circ\text{C}$ で2日間インキュベートした。その後、細胞生存率をCellTiter-Fluor Assay (Promega)を使用して、製造者のプロトコルに従って測定した。その後、ウイルス侵入レベルを、ルシフェラーゼ分析システム(ONE-Glo, Promega)によって、製造者のプロトコルに従って測定し、ウイルスのみのサンプルを基準として正規化した。データをさらに、細胞生存率に対して正規化した(全てのグループが、コントロールの未処理細胞の10%内の生存率を示した)。

【0114】

結果

【0115】

Hisタグ化タンパク質はCoPoPリポソームに結合する

遷移金属であるCo、Cu、Zn、Ni及びMnを用いて、一連のsn-1-パルミトイルsn-2-ピロフェオホルピド ホスファチジルコリンのキレートを作製した(図1c)。その後、10モル%の金属PoPを用いて、85モル%のジオレオイルホスホコリン(DOPC)と5モル%のポリエチレングリコール-コンジュゲート型ジステアロイルホスホエタノールアミン(PEG-脂質)とともに、押し出しにより100 nmのリポソームとすることにより、PoP二重層を形成した。PoP二重層に結合しているHisタグ化タンパク質を、蛍光タンパク質レセプターを用いて評価した。図2aに示すように、このシステムは、2つの連結された蛍光タンパク質であるセルリアン(青色発光)及びビーナス(緑色発光)からなる融合タンパク質を含んだ。それらが近接して連結しており、スペクトルが重複していることにより、セルリアンは、ビーナスのフェルスター共鳴エネルギー転移(FRET)ドナーとして働き、セルリアンの励起がビーナスからのFRET発光をもたらす。セルリアンのC末端をヘプタヒスチジンタグで標識した。しかしながら、PoP二重層に結合した場合、セルリアンからのエネルギー転移は、二重層それ自体に回され(セルリアン発光範囲に吸収される)、それゆえビーナスへのFRETと競合する。他方、ビーナスは、フォトリソームに直接付着していないため、直接励起すると完全には消光せず、結合した融合タンパク質の追跡を可能にする。

【0116】

様々なPoPリポソームへのレポーター融合タンパク質の結合を評価するために、三色電気泳動移動度シフト分析(EMSA)を開発した。2.5 μg のタンパク質を、様々なPoPリポソーム50 μg とともに、24時間インキュベートし、その後アガロースゲル電気泳動にかけた。図2bの上段の画像に示すように、PoPリポソームを画像化した場合、遊離塩基(2H)リポソームとZn-PoPのみが容易に可視化され、Zn-PoPリポソームの程度はより低かった。このことは、金属がPoPに対してクエンチング効果を有することを実証し、それらが二重層において安定にキレート化されたことを確認する。予期されたように、リポソームは、それらの比較的大きいサイズのために、最も小さい電気泳動移動度を示した。次に、FRET

10

20

30

40

50

の阻害についてプローブするために、セルリアン励起とビーナス発光を使用して、同じゲルを画像化した (PoPリポソームへの融合タンパク質結合の指標となる)。全てのサンプルが、同じ量のFRETを示し、遊離タンパク質と同じ距離を移動したが、CoPoPリポソームとインキュベートされたタンパク質は例外であり、この場合FRETは完全に消滅した (中段の画像)。タンパク質の存在を検証するために、ビーナスを直接励起し、画像化した。CoPoPリポソームを用いたときだけ、レポータータンパク質は、リポソームと共局在化した。あわせて、これらの画像は、タンパク質がCoPoPリポソームに定量的に結合したことを実証する。溶液ベースの研究は、この発見を裏付けた (図 2 c)。試験した全ての種類のPoPリポソームのうち、CoPoPのみが、リポソームの結合に起因して、セルリアンとビーナス間のFRET効率に著しい減少をもたらした。この結合は、50%結合 ($t_{1/2}$)に達する時間はわずか三時間であったが、完全に完了するのにほぼ一日を必要とした。2H-PoP二重層の分子動態シミュレーションによって、ポルフィリンの中心(金属キレート化が生じる)は、二重層を取り囲む水相にアクセスできないことが示された。それゆえ、この遅い結合は、タンパク質の残り部分で部分的に覆い隠されているHisタグ、及び、保護された疎水性二重層内への進路を作らなければならないことに起因し得る。

10

【0117】

ポリヒスチジンのCoPoPとの配位

固定化金属へのHisタグ結合の基礎となるメカニズムは、ヒスチジン残基の窒素含有イミダゾール基との金属配位を含む。Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)及びMn(II)PoPを用いて形成されたリポソームへのHisタグ結合の欠如は、ポルフィリン内の軸配位子の結合親和性又は配位数に関係すると思われる。例えば、Ni(II)及びCu(II)ポルフィリンキレートは、軸配位子なしで、周囲の4つの大環状窒素原子に完全に配位できることが提唱されてきた。Zn(II)及びMn(III)ポルフィリンについては、配位子結合強度は、安定なポリヒスチジン結合を与えるのに不十分と思われる。

20

【0118】

CoPoPの電子状態を決定するために、常磁性を評価した。Co(II)は常磁性であるが、Co(III)ポルフィリンは低スピンであり反磁性であるため、NMRを用いて、常磁性種によって誘発されるピークの広がりを調べた。図 2 d に示されるように、PoP内のビニル基の各炭素に結合した水素に基づいて、ピークの広幅化が、CoPoPについてのみ、及び有機溶媒中でのみ観察された。CoPoPが水性リポソーム内に形成された場合、ピークは狭くなり、二重層内での反磁性Co(III)への酸化の指標となった。このメカニズムをさらに検証するため、CoPoPリポソームが蛍光標識Hisタグ化ペプチドに定量的に結合した後、還元剤である亜硫酸ナトリウムをCoPoPリポソームに添加した。図 2 e に示すように、2 Mの亜硫酸塩は、CoPoPリポソームからのペプチド放出を誘発した。リポソームはまた、市場で入手できるNi-NTA脂質を用いて形成された。Hisタグ化ペプチドは、Ni-NTAリポソームに強く結合しなかった。容易に還元できないNi(II)から予測されるように、前記系への亜硫酸塩の添加により、ペプチドの放出は観察されなかった。共に、これらのデータは、CoPoPリポソームを形成する際に、CoPoPがCo(II)からCo(III)へ遷移し、ポリヒスチジン・イミダゾール基が、二重層内でPoP中のキレート化Co(III)と配位することを示唆する。

30

【0119】

CoPoPリポソームへの安定なHisタグ結合

次いで、蛍光レポータータンパク質を使用して、CoPoP又はNi-NTA-脂質のどちらかを包含するリポソームへのHisタグ化タンパク質の結合を比較した (図 3 a)。FRETに基づくタンパク質結合測定を可能にするために、Ni-NTAリポソームは10モル%の2H-PoPを含んだ。EMSAによると、リポソーム無しでインキュベートされたとき、又は2H-PoPリポソームとともにインキュベートされたとき、タンパク質はFRETチャンネル及びタンパク質チャンネルの両方で、妨げられずに移動した。Ni-NTAリポソームとともにインキュベートしたとき、タンパク質の移動は、わずかに阻害されただけであり、タンパク質の結合が、電気泳動のコンディションに抵抗しないことを示唆した。FRETチャンネルは消光されず、Ni-NTAリポソームへの結合がないことを確認した。これに対して、CoPoPリポソームとともに

40

50

にインキュベートした場合、タンパク質は安定に結合し、FRETチャネルは完全に消滅し、電気泳動移動度は減少した(これはリポソームに結合したままのタンパク質と一致する)。

【0120】

生物医学的応用のために、Ni-NTA-脂質を使用することの解決困難な障壁は、それが血清のような生体媒体中で、安定なHisタグ結合を維持しないことである。リポソームが血清の存在下で結合を維持できるかどうか試験するために、Hisタグ化タンパク質と結合させたリポソームの溶液に、ウシ胎児血清を1:1の容積比で添加した。図3bに示すように、Ni-NTAリポソームは、全てのタンパク質を完全には捕捉せず、これはEMSAの結果で示された弱い結合と一致する。さらに、血清の添加後、全ての結合が24時間かけて消滅した。同じコンディション下で、CoPoPリポソームは、実質的なタンパク質の放出無しに、Hisタグ化レポータータンパク質を安定に捕捉した。

10

【0121】

ヒスチジン側鎖はイミダゾール基を含むため、イミダゾール競合アッセイを使用して、Ni-NTAとCoPoPリポソームのHisタグ化ポリペプチドとの結合安定性を比較した。図3cに示すように、CoPoPリポソームは、1Mに近いイミダゾール濃度でさえ、レポータータンパク質への75%を超える結合を維持した。これは、結合研究で使用した100nMのタンパク質濃度を上回る約1000万倍のイミダゾール過剰を意味する。これに対して、Ni-NTAリポソームは、たった30mMのイミダゾールの存在下で、90%を超えるHisタグを放出した。CoPoPリポソームのHisタグへの劇的に強い結合は、少なくとも2つの要因: Co(III)のイミダゾール基への優れた安定なキレート化、及びCoPoP二重層の保護された疎水性環境(競合する外部分子へのアクセスを制限する)に起因し得る。

20

【0122】

Ni-NTA-脂質、コバルト-キレート化Co-NTA-脂質、及びCoPoPを用いて形成されたりポソームは、溶液中で蛍光ペプチドに結合できた(図7a)。しかしながら、Co-NTA及びNi-NTAの結合は、ゲルろ過クロマトグラフィーの間に維持されなかった(図7b)。Co-NTA及びNi-NTAを用いて形成されたりポソームは、血清中でインキュベートした際、ペプチドを放出したが、CoPoPはしなかった(図7c)。このことは、二重層に閉じ込められたポリヒスチジン結合の有意性を実証する。我々は次に、CoPoPが血清中での安定な結合のために必要か否か、あるいは、単純なりポソームに挿入されたコバルトポルフィリン(Co-pyro)で十分なのかを試験した。最初の結合後、血清とのインキュベーションは、ポリペプチドをリポソームから追い出した(図8)。この結果は、膜に挿入されたポルフィリンが血清成分と容易に交換され、リポソームの外に出たが、PoPはそうではなかったという最近の実証と一致する。これらの結果を総合すると、Hisタグ化ポリペプチドと安定に結合するための、CoPoPの重要な役割が示唆される。

30

【0123】

CoPoPリポソームへのペプチドの結合

【0124】

ペプチドの標的指向化は、疾患及び組織特異的な「郵便番号(zip codes)」としての使用のために、関心を集めている。フィブロネクチン及びビブロネクチン(vibronectin)に見られる短いRGDトリペプチドは、腫瘍血管内皮細胞上に発現するインテグリン $\alpha_3\beta_1$ へのその効率的な結合のために、有望な標的指向性リガンドである。CoPoPリポソームを試験し、線状単鎖アミノ酸配列GRGDSPKGAGAKG-HHHHHHH(配列番号1)を用いるHisタグ化リガンドアプローチによって、CoPoPリポソームを標的細胞上の分子レセプターに送達できるかどうかを検証した。カルボキシフルオレセイン(FAM)をN末端に標識し、FRETによってPoP-リポソームへの結合の検出を可能にした。線状RGDペプチドが、インテグリン結合を妨害することなく、フルオロフォアで標識できることが証明された。図4aに示すように、このペプチドを様々な金属-PoPリポソームとともにインキュベートすると、CoPoPのみが、ペプチドに結合した。タンパク質結合に比べて、ペプチド結合は約5倍速かった。おそらく、ペプチドのより小さいサイズ、より速い分子運動、及び減少した立体障害が、二重層へのより速い嵌合を可能にし、CoPoPと相互作用し、不可逆的に結合す

40

50

る。各 ~ 100 nm のリポソームが約 80,000 の脂質を含むという先の推定に基づくと、これはリポソームあたり、8000 の CoPoP 及び 750 のペプチドに等しい。各ペプチドが 7 つのヒスチジン残基を含むため、二重層における CoPoP とヒスチジンの比は 1 : 0.66 であった。Ni-NTA への従来の His タグ結合では、His タグの全ての残基のうち、i 番目と、i + 2 番目又は i + 5 番目のヒスチジン残基のみが、金属との配位に関与すると考えられている。CoPoP 二重層内のポルフィリンとポリヒスチジン密度はより高いと思われ、それゆえ配位メカニズムは異なるかもしれない。

【 0 1 2 5 】

CoPoP リポソームへのペプチド結合に対する His タグ長の影響を調べた。一連の N 末端 FAM 標識ペプチドを、C 末端に付着させる His タグの長さを変えて合成した。図 4 b で実証されているように、His タグをペプチドから取り除いた場合、ペプチド結合は観察されなかった。二つのヒスチジン残基が付いている場合、結合は遅く、結合 $t_{1/2}$ はほぼ 10 時間になった。His タグが長くなると、結合速度は急速に増加した。一般的なヘキサヒスチジンタグに相当する六つの残基を用いると、結合 $t_{1/2}$ は 1 時間未満になった。His タグの長さを 10 残基まで増やすと、結合 $t_{1/2}$ は 20 分に減少した。

【 0 1 2 6 】

次に、His タグ結合に対する膜流動性の影響を判定するために、脂質組成を変化させた。リポソームを、90 モル % の DSPC、DMPC 又は DOPC のいずれかと、10 モル % の CoPoP を用いて形成した。あるいは、50 モル % のコレステロールを二重層に取り込み、それに応じて使用する標準脂質の量を減らした。DSPC が室温で、硬質のゲル相二重層を形成するのに対し、DMPC 及び DOPC は、より低い転移温度を有し、液晶相にある。コレステロールは二重層中の空間を占め、膜流動性への緩和効果を有し得る。興味深いことに、コレステロールの有無に関わらず、組成の異なる膜について、ペプチド結合速度に大きな違いは観察されなかった (図 4 c)。ペプチド結合プロセスは、多段階プロセスで発生する可能性があり、一旦ペプチドの二重層への挿入が始まると、ポリヒスチジンの協同作用は、脂質組成によって影響されない。しかしながら、5 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) 中では、膜がコレステロールを有するか否かで、著しい違いが観察された (図 4 d)。コレステロールを含まないリポソームにおけるより遅い結合は、おそらく、ペプチド結合を妨害する膜と BSA とのより大きな相互作用によるものであった。50 mg/mL の BSA では結合半減期に達せず、血清は結合を完全に阻害した (図 9、図 10)。

【 0 1 2 7 】

カーゴを積んだリポソームのバイオターゲティング

リポソームへの His タグ化ペプチドの結合効力を考慮して、二重層の完全性を評価して、ペプチド結合が膜の不安定化を誘発するかどうかを決定した。リポソームの水性コアに、フルオロフォアスルホローダミン B (水溶性色素) を自己消光濃度で積み込み、膜透過性を調べた。図 5 a に示すように、色素搭載リポソームは、8 時間にわたって実質的な量の色素を放出せず、ペプチドはリポソームに完全に結合していた。24 時間時点で、結合したペプチドを有する CoPoP リポソームは、10 % 未満の色素を放出した。このように、His タグの挿入と結合プロセスは、二重層の完全性及び封入したカーゴを無傷に保つのに十分に穏やかで非破壊的であった。類似のアルミル化リポペプチドは、インキュベーションすると、カーゴ-搭載リポソームの透過化をもたらした (図 11)、His タグアプローチの頑強さをさらに実証した。

【 0 1 2 8 】

次に、U87 膠芽腫細胞 (RGD-結合) 及び MCF7 乳癌細胞 (RGD 非結合) の確立された細胞株ペアを用いて、RGD-装飾リポソームが、それらの分子標的に結合できるかどうかを評価した。スルホローダミン B の封入後、まずリポソームを His タグ化 RGD ペプチドと、その後、両方の細胞株とインキュベートした。約 550 のペプチドが、各リポソームに付着した。リポソームの取り込みは、洗浄及び溶解 (カーゴ自己消光作用を除去するため) 後、細胞内の蛍光を試験することによって評価した。図 5 b に示すように、標的化 CoPoP リポソームとインキュベートされた U87 細胞では、高いリポソーム取り込みが観察されたのに対し、

MCF7細胞で生じた結合は無視できるほどであった。予想通り、RGD標的指向性リガンドがなければ、どの細胞株でも取り込みは生じなかった。リポソーム製剤にPEG-脂質を含有させると、どの細胞株も標的としないリポソームが得られた。PEGの存在は、二重層表面に直接つながれているペプチドを妨害する効果を有していると思われる。過剰の遊離RGDペプチドの存在により結合を阻害することができ、このアプローチの標的特異性を確認した。共焦点顕微鏡法は、これらの結合結果を実証した(図5c)。FAM標識ペプチドは、PoPリポソームによって消光したが、標的指向性ペプチドとリポソームカーゴの両方の結合を検証するのに十分なシグナルが残った。カーゴとペプチドの両方が、U87細胞に内部移行し、共存した状態となった。CoPoPリポソームと標的指向性ペプチドを、U87細胞とのインキュベーションの直前に添加混合すると、標的指向性ペプチド自体はU87細胞に結合したが、リポソームに付着する時間はなく、標的化されないままであった。同じ結果が、ペプチドと結合していない2H-PoPリポソームで観察された。わずか1モル%のCoPoPとともにリポソームが形成された場合、ペプチド結合が維持され(図12a)、U87細胞への選択的結合が維持された(図12b)。Hisタグ化cRGD成分とインキュベートしたカーゴ搭載リポソームを、U87腫瘍を有するヌードマウスに静脈注射した。図5dに示すように、静脈注射後45分で、標的化リポソームが腫瘍内に蓄積し、非標的化リポソームと比べて2.5倍の活性を有した。これらのデータは、CoPoPリポソームは、リポソームのコアにカーゴを積み込むことができること、カーゴの漏出を引き起こすことなく、Hisタグ化標的指向性ペプチドで標識できること、インビトロ及びインビボで、特異的な表面タンパク質を発現している細胞に発現した分子レセプターに向かうことができることを示す。

【0129】

リポソームは、生物医学的用途において使用される全ての種類のナノ物質の一部を代表するにすぎない。CoPoPを、Hisタグに対する選択的接着性を有する一般化された表面コーティングとして評価した。金ナノ粒子が、モデルナノ粒子として使用された。これは、金ナノ粒子が、多数の生物学的用途で使用されているためである。脂質-被覆金ナノ粒子のための確率されたプロトコルを使用して、クエン酸塩で安定化した60 nmの金分散系を用いて、PoP-脂質の薄膜を水和した。遠心分離と再懸濁を繰り返すと、クエン酸塩が取り除かれ、ナノ粒子の凝集が生じた(図13a)。しかしながら、PoP-脂質の存在下では、ナノ粒子は被覆され、分散性のままであった。クエン酸塩で安定化した金と比べて、PoP-被覆ナノ粒子は、金を覆う二重層コーティングに対応して、わずかに大きい流体力学的径を有した(図13b)。Hisタグ結合後のコーティングの存在は、540 nmでの金のプラズモンピークに影響を与えず、リガンド結合の温和な性質を実証した(図13c)。図13dに示すように、RGD-His CoPoP-被覆金ナノ粒子だけが、U87細胞を標的とし、遊離RGDは、後方散乱顕微鏡によって測定されるように、結合を阻害した。CoPoP金単独、及びRGD-Hisペプチドを伴う2H-PoP-被覆金は、U87細胞を標的とする効果を有さなかった。

【0130】

抗原性リポソームの開発

HIVウイルス侵入を広く中和するモノクローナル抗体の多くが(例えば、2F5、Z13及び4E10)、gp41エンベロープタンパク質の膜近位外部領域(MPER)における保存された線状エピトープを標的とし、MPERをHIVペプチドワクチンの主要ターゲットにしている。しかしながら、それはウイルス侵入中にのみ露出し、中和抗体を産生するためにMPERペプチドを使用する試みは難題に直面している。これは、ワクチン接種戦略は、MPERが中に存在する脂質二重層と抗体の相互作用を考慮すべきだとするパラダイムを生じていた。我々は、リポソーム-結合MPERペプチド配列と組み合わせ、Toll様レセプター4(TLR-4)アゴニスト・モノホスホリルリピドA(MPL)を含むリポソームを使用した。しかしながら、Ni-NTAリポソームへのMPER Hisタグ化ポリペプチドの結合をベースとする単純なアンカー技術の使用は、低い抗体価を生じさせた。我々は、同じアプローチが、CoPoPリポソームを用いて増強できるかどうかを試験した。

【0131】

リポソーム-ペプチドのワクチン接種システムを、MPER-His配列であるNEQELLELDK

WASLWNGGKGG-HHHHHHH (配列番号 11) とともに使用した。MPER-Hisペプチドを、MPLを含むCoPoPリポソームに結合した。25 µgのMPER-His及び25 µgのMPLを含む単回注射を、BALB/cマウスと胸腺欠損ヌードマウスに投与した。これは、BALB/cマウスとヌードマウスの両方に、 10^4 オーダーの力価を誘発し、強い液性免疫応答を実証した(図6a)。HIVはヘルパーT細胞集団に感染し、B細胞を介した応答を重要なものに行っているため、このことは重要となり得る。ブースター注射の後、無胸腺ヌードマウスの抗MPER力価は影響を受けなかったが、健常マウスでは1桁の力価増加が認められ、T細胞媒介記憶効果が示された。それゆえ、ワクチン接種プロトコルは、B細胞性及びT細胞性免疫の両方を生じさせた。

【0132】

次に、免疫応答の特異性をよりよく判定するために、各種のワクチン成分を試験した(図6b)。MPER-Hisペプチドは、それ自体で、フロイント完全アジュバント中で、又はMPLを含む2H-PoPリポソームとともに注射された場合、抗体を誘発しなかった。興味深いことに、ペプチドを、MPLを含まないCoPoPリポソームとともに投与すると、抗体は全く産生されなかった。別の脂質アジュバントである、トレハロースジベヘネート(TDB)も、抗体産生を誘発しなかった。TDBはTLR-4に作用しないことから、リポソームワクチンシステムの免疫活性化におけるMPLの重要性が強調される。Ni-NTAリポソームに結合したMPER-Hisを使用した場合、以前の報告と一致する、 10^3 未満の弱い抗体価が確認された。しかしながら、CoPoPリポソームを使用すると、二桁強い応答が観察された。おそらく、インビボにおける、リポソームへのペプチドの安定な結合は、この効果の直接の原因である。このCoPoP免疫化戦略は有効であり、抗体価は少なくとも3ヶ月間持続したが、Ni-NTAリポソームでは一か月を超えると抗体は検出されなかった(図6c)。

【0133】

マウスのワクチン接種後の血清をプールし、プロテインGアガロースを使用して精製し、精製IgGを得た。その後、これを使用して、HIVによるウイルス侵入の阻害を評価した(図6d)。ワクチン接種マウスの精製IgGを、最終濃度0.2 mg/mLで使用した場合、ウイルス侵入は75%以上阻害された。この阻害効果は、2 µg/mLの濃度でインキュベートされた広域中和モノクローナル抗体2F5の効果より大きかったが、20 µg/mLの濃度でインキュベートされた2F5の効果よりは小さかった。これらのデータは、ウイルスの侵入を防止できる抗体産生を誘導するために、HIV-由来ペプチドとともにCoPoPリポソームを使用するワクチン接種アプローチのポテンシャルを示す。

【実施例2】

【0134】

本実施例では、Hisタグ化Pfs25(熱帯熱マラリア原虫由来の組換えタンパク質)と、CoPoP及びMPLAを含むリポソームとを使用してワクチンを開発した。

【0135】

リポソームの調製

CoPoPと2H-PoPリポソームを生成するために、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、コレステロール(CHOL)、モノホスホリルリピドA(MPLA)、及びCoPoP(あるいは2H-PoP)を、表示のモル比でクロロホルム中に溶解した(表2)。一晩のN₂流と減圧後、乾燥脂質フィルムが形成され、これをPBS中で再水和し、最終脂質濃度を3 mg/mLとした。このリポソーム懸濁液を、氷冷CO₂/アセトン及び水浴を使用して、11回の冷凍/解凍サイクルにかけ、続いて200 nmのポリカーボネート膜を通して、60 で10回押し出した。

【0136】

Psf25昆虫タンパク質(super sf9細胞から精製した組換えサブユニットPfs25、BCA分析によって測定した濃度は1 mg/mL)を、4 にて一晩(20時間)リポソームと併せた。H₂O中でインキュベートしたPsf25をコントロールとした。ネガティブコントロールとして、BSAをリポソームと併せた。Psf25タンパク質とリポソームの結合は、微小遠心ろ過法で測定した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 7 】

【表 2】

表 2. 各マウス注射用のPsf25 CoPoP/MPLAリポソームの処方

各マウス注射用量	DMPC	CHOL	CoPoP	MPLA	Psf25
モル比	55	35	5	5	
$\mu\text{g}/50\mu\text{L}$	84.6	30.7	12.1	20.0	5/0.5/0.05
nmole	127.75	79.39	11.34	11.34	0.25/0.025/0.0025

10

【 0 1 3 8 】

結合のための微小遠心ろ過

CoPoPとPsf25タンパク質、基準PoP(コバルト無し)とPsf25タンパク質、及び水とPsf25タンパク質を、Nanosep遠心装置(100K, OMEGA)内に置いた。使用前に装置をQH₂Oですすぎ、1100 rpmで3分間遠心分離した。各サンプルを加え、1400 rpmで3分間回転した。装置をQH₂Oで二回洗浄し、1400 rpmで3分間遠心分離した。底のろ液からサンプルを集め、562 nmでの吸光度を測定するBCA分析(Thermo cat.23235)で、タンパク質濃度を分析した。

20

【 0 1 3 9 】

ワクチン接種

0日目及び21日目に、CD-1マウス(8週齢のメス、Envigo)に、5、0.5、0.05 μg のPsf25タンパク質を筋肉内注射(i.m.)した。表示がある場合、この注射は、リポソーム内に取り込まれた20 μg のMPLAも含んだ(Avanti No.699800P)。ISA720も、5 μg のPsf25タンパク質とインキュベートされるアジュバントとして使用した。治療グループ及びフローチャートを表3に示す。

【 0 1 4 0 】

【表 3】

表 3. 血清IgG価に関する治療グループ (グループあたり、n=10マウス)

30

	CoPoP/MPLA	Psf25 (μg)	ISA720
グループ 1 (G1)	+	5	-
グループ 2 (G2)	+	0.5	-
グループ 3 (G3)	+	0.05	-
グループ 4 (G4)	+	0	-
グループ 5 (G5)	-	5	-
グループ 6 (G6)	-	5	+

40

【 0 1 4 1 】

ELISAによる血清抗-Psf25 IgGレベル

抗-Psf25力価を、96-ウェルプレート(Thermo, Maxisorp)で、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって評価した。100 μL のコートングバッファー(3.03 g Na₂CO₃及び6.0 g NaHCO₃/1L蒸留水、pH 9.6)中のHisタグ化Psf25 (0.1 μg)を、ウェル中で一晚4 でインキュベートした。ウェルを0.1%のTweenを含むPBS (PBS-T)で三回洗浄し、0.1%のカゼインを含むPBS (PBS-C)でブロックし、その後2時間インキュベートした。ウ

50

エルをその後PBS-Tで三回洗浄し、ヤギ抗-マウスIgG-HRP (GenScript No.A00160)をPBS-Cで希釈して1 µg/mLとし、各ウェルに添加した。ウェルを再度PBS-Tで六回洗浄し、その後テトラメチルベンジジン(Amresco No.J644)を添加した。

【0142】

結果

【0143】

Psf25タンパク質被覆後の、リポソームとタンパク質結合能の特性決定

動的光散乱によって測定した、Psf25タンパク質が結合する前後のCoPoPリポソームの平均径は、それぞれ122.9及び139 nmであり(図14A)、多分散指標は約0.05で同程度であり、結合後も望ましいリポソームのサイズを高い単分散度とともに示した。さらに、Psf25タンパク質が、効率的及び特異的にCoPoPリポソームに結合するかどうかを調べるために、Pfs25をCoPoPリポソーム又は2H-PoPリポソームとともに4 で一晩インキュベートし、続いて、リポソームへのタンパク質結合を微小遠心ろ過によって測定した。BCA分析によって検出されたる液中のPfs25の量によると、Psf25の大部分がCoPoPリポソームに結合したが(99.27%)、2H-PoPリポソームには結合しなかった(12.33%)。CoPoPリポソームへのPfs25の結合は、~99%であった(図14A)。

【0144】

抗-Pfs25 IgGレベル

【0145】

CD-1マウスに、i.m.により、Psf25 (5、0.5及び0.05 µg濃度)とコンジュゲートしたCoPoP/MPLA/Pfs25リポソームもしくはPsf25とコンジュゲートしていないものを、又は遊離Psf25(ISA70有り又は無し)を、0日目(初回刺激)及び21日目(追加免疫)にワクチン接種した。20日及び42日目に、血清を採取し、抗-Psf25 IgG力価をELISAで測定した(図15A及び図15B)。CoPoP/MPLA/Pfs25リポソームによる追加免疫前のマウスは、5 µgと0.5 µgのPsf25コンジュゲート型グループの両方で、同程度の血清IgGレベルを示した。各治療グループについて、希釈の異なる(1/1000から開始)抗-Psf25 IgG-血清サンプルを、Psf25(プラント)ELISAで試験した(表3)。ここで、カットオフポイントは、0.5に等しいO.D.に設定した。データは、G1及びG2 (5又は0.5 µgのPsf25タンパク質とコンジュゲートしたCoPoP/MPLA/Pfs25リポソームを表す。表3)において、追加免疫後にIgG価が1/5000から1/45000まで変化したことを示す。他方、0.05 µgのPsf25タンパク質とコンジュゲートしたCoPoP/MPLA/Pfs25リポソームのIgG価は、追加免疫後に、1/1000から1/15000に切り替わり、同様の結果がG6 (ISA70とインキュベートされた5 µgのPsf25タンパク質を表す)で示された。このデータは図16にも反映され、図16は、CoPoP/MPLAリポソーム中の0.05 µgのPfs25の力価が、ISA720中の5 µgのPfs25より高い力価を生じさせたことを示す。

【実施例3】

【0146】

本実施例では、熱帯熱マラリア原虫のスポロゾイト周囲タンパクに由来するNANPの反復配列を含む合成Hisタグ化ペプチドを使用して、リポソームワクチンを開発した。リポソームは実施例1と同じ組成を有したが、タンパク質の代わりにペプチドを使用した。試験したペプチドを図17Aに示す。動的光散乱によって測定した、異なるNANPが結合する前後のCoPoPリポソームの平均径は、それぞれ122.9及び139 nmであり(図17B)、多分散指標は約0.05で同程度であり、結合後も望ましいリポソームのサイズを高い単分散度とともに示した。さらに、NANPペプチドが効率的及び特異的にCoPoPリポソームに結合するかどうかを調べるために、NANPペプチドをCoPoPリポソーム又は2H-PoPリポソームとともに4 で一晩インキュベートし、続いて、リポソームへのペプチド結合を微小遠心ろ過によって測定した。BCA分析によって検出されたる液中のペプチドの量によると、NANPの大部分がCoPoPリポソームに結合したが(様々なペプチド長で、~80%)、2H-PoPリポソームには結合しなかった(20%未満)。CoPoPリポソームへのNANPの結合は、異なるペプチド長のすべてにおいて~80%であった(図17C)。

【実施例 4】

【0147】

本実施例では、ホスファチジルセリン(PS)を含むCoPoPリポソームを使用して、Hisタグ化提示分子に対する抗体応答を減少させた。CoPoP：ホスファチジルセリン：DOPC：コレステロール = 10：30：30：30で、薄膜水和と押出によって、リポソームを形成した。その後Hisタグ化MPERをリポソームに結合させた。これらのPSリポソームを、MPERで装飾したCoPoP/MPLAリポソームによるワクチン接種の4週間及び2週間前にマウスの足蹠から注射した。図18に示すように、PSリポソームを用いた前処置は、MPERに対するIgG価の減少をもたらした。

【実施例 5】

【0148】

本実施例では、CoPoPのリポソームは、Hisタグ化細胞透過性ペプチドにより、細胞を標的とした。以下のHisタグ化細胞透過性ペプチドが得られた：

HHHHHHHGRKKRRRQRRPPQ (配列番号13)(TATペプチド)；

HHHHHHHRRRRRRRRR (配列番号14)(R8ペプチド)；

HHHHHHHRQIKIWFQNRMMKWKK (配列番号15)(PENペプチド)。

図19に示すように、[PoP:CoP:CHOL:DMPC][2:5:30:63]を含むCoPoPリポソームと直接水性インキュベーションした後、これらのリポソームは結合し、U87細胞との1時間のインキュベーション後に、取り込まれることができた。

【実施例 6】

【0149】

この実施例では、CoPoPリポソームを、融合前RSV抗原(Hisタグ化抗原、RSVのためのDS-Cav1)と共に使用した。Hisタグ化抗原は、機能性抗体を生成するためにCoPoP/PHADシステムと共に使用することができる。

【0150】

抗原DS-Cav1は、RSVウイルスの表面上のFタンパク質の融合前の形態である。His標識DS-Cav1は、RSV A2に対する中和抗体を誘導することが明らかになっている。

【0151】

CoPoPリポソームは、抗原とリポソームとの単純な混合でHisタグ化タンパク質に結合し、その結果、得られるリポソームは、均一な配向で提示される立体構造的に無傷の抗原で装飾されるようになる。抗原結合は、生物学的環境において非共有結合的に安定である。CoPoPリポソームが、インビトロ及びインビボにて、抗原提示細胞への改善された抗原送達をもたらすことが示された(別のHisタグ化抗原、Pfs25、マラリア伝達遮断抗原を用いて)。

【0152】

Hisタグ化DS-Cav1が、CoPoPリポソームに効率的に結合することが示された。50 µL容量の抗原-リポソーム溶液を、CoPoP及びPoP(2Hとも呼ばれる)を使用して調製し、200 µLに希釈する。抗原無しのリポソーム、及びリポソーム無し抗原の参照試料も調製した。試料を20,000 rcfで90分間遠心分離し、得られたリポソームペレットから上清を抽出した。等容量のBCAを添加して、400 µLの総容量とした。次に、試料を水浴中で60にて10分間インキュベートした。100 µL体積の各試料を、96ウェルプレートの3ウェルそれぞれに移し、吸光度を562nmで測定した。抗原-リポソーム上清とリポソームのみの参照試料との間の吸光度の差を使用して、結合パーセントを算出した。ここで、より高い吸光度は、上清中のより高いタンパク質濃度に対応し、ゆえに結合はより少ない。

【0153】

次いで、マウスに、6つのアジュバント(PHAD有りのCoPoP、PHAD無しのCoPoP、PHAD有りの2HPoP、水酸化アルミニウム(Alum)、Sigma Adjuvant System(SAS)、及びAddaVax)のうちの1つと共にRSV抗原を注射した。マウスにRSVをワクチン接種した場合、CoPoP/PHAD粒子を含有するRSVワクチンを注射したすべてのマウスは、追加免疫ワクチン接種前に、検出可能なIgG抗体価を示した(図21A)。対照的に、残りの5群から

10

20

30

40

50

は合計 2 匹のマウスのみが、検出可能な IgG 価を示した。追加接種の 2 週間後、CoPoP、2HPoP、SAS を接種したマウスの IgG 価は、いずれも有意な上昇を示したが、PHAD 有りの CoPoP が、依然として抗体産生の誘導に最も有効な製剤であった(図 2 1 B)。CoPoP/PHAD グループの平均抗体価は他の 5 群を上回り、CoPoP/PHAD は、追加免疫注射後にワクチンに無反応であったマウスを含まない唯一のグループであった。

【0154】

初回注射の 35 日後にマウスから採取した血清を用いて、RSV 中和アッセイを行った(図 2 1 C、D)。このアッセイの結果は、CoPoP/PHAD ワクチンに応答して産生された抗体が、他のどのワクチングループよりも、RSV の A 型及び B 型を中和するのに有意に有効であることを示す。データから、CoPoP/PHAD は、Alum、SAS、及び AddaVax などの代替アジュバントと比較して良好に機能すると結論付けられた。さらに、CoPoP リポソームも、CoPoP の PHAD アジュバント成分単独も、有効性を増加させるのに十分ではなく、これらの結果は、新規な CoPoP/PHAD 製剤の複合効果にのみ起因し得る。

【実施例 7】

【0155】

この実施例では、CoPoP リポソームを、ライム病抗原である OspA と共に使用した。His タグ化抗原は、機能性抗体を生成するために CoPoP/PHAD システムと共に使用することができる。

【0156】

OspA はライム病抗原である。脂質テールのない B31 株タンパク質配列に基づいて His タグ付き OspA を生成し、図 2 2 に示すように精製した。

【0157】

プロテオリポソームの自然形成は、疎水性二重層へのヒスチジンタグの挿入、及びその後の金属中心へのイミダゾール部分の配位を介して生じる。アクリルアミドゲルの限られた孔径により、リポソーム結合タンパク質と遊離タンパク質との物理的分離を可能にするネイティブ電気泳動を用いて、結合条件を評価した。PHAD : OspA の 4 : 1 の観察された最適結合質量比(図 2 3 A)は、マラリア抗原である Pfs25 を用いた以前の研究と一致する。80 µg/mL の OspA を、等量の 320 µg/mL の CoPoP リポソームと共にインキュベートするには、室温で 3 時間のインキュベーションが必要である(図 2 3 B)。アクリルアミドゲルの目視検査は、15 分後に結合のキネティクスがプラトーになり始めたことを示したが、これはおそらく、近くの非結合部位へのその後の結合に対する立体障害に起因する。0 分及び 15 分時点での相対的なバンド強度に基づくと、結合の初期段階は、速い速度で生じたことが推定される。粒子化条件では、特異的結合は、高速遠心分離から得られた上清のマイクロ BCA 分析に基づいて約 80% と推定される(図 2 3 C)。同じ方法を用いて、キレート化金属を欠く PoP/PHAD リポソームについて低い非特異的結合が観察された。非ヒスチジンタグ化タンパク質であるリゾチームは、CoPoP/PHAD にも PoP/PHAD リポソームにも結合しなかった。DLS 測定に基づくと、インキュベーション後のリポソームサイズは、CoPoP/PHAD 及び PoP/PHAD リポソームの両方について本質的に同じままである(図 2 3 D)。さらに、透過型電子顕微鏡写真は、CoPoP/PHAD リポソームが抗原結合後にその形状を保持することを明らかにした(図 2 3 E)。

【0158】

血清安定性試験(図 2 4 A)は、37 °C でのヒトとのプロテオリポソームのインキュベーションが、12 日後に蛍光シグナルを有意に増加させなかったことを示した。これは基本的に、研究期間の間、金属キレート化リポソームに OspA が主に会合したままであることを示す。CoPoP リポソームは、疎水性二重層内の金属キレート結合の戦略的空間位置のために、ニッケルキレート化リポソームと比較して、安定性において 100 倍を超える増加を示した。血清安定性抗原結合は、流入領域リンパ節への輸送の間のプロテオリポソームの完全性を確実にする。

【0159】

類似のナノ粒子系を用いた以前の研究は、ナノ粒子スキャフォールドへの付着点による

10

20

30

40

50

免疫原性及び保護効果の多様性を実証した。これは、粒子表面上の適切な抗原エピトープ提示の重要性を強調する。この研究では、ポリヒスチジンタグを保護エピトープの局所性と反対側のN末端に付加して、リポソーム表面上のエピトープ到達性を確実にし、重要なC末端エピトープの起こり得る閉塞を回避した。この立体配置は、基本的にライム病ボレリアの外膜へのリボタンパク質の組込みを模倣している。免疫沈降法を用いたエピトープ利用能の評価は、表面結合OspA上のLA-2エピトープの露出を示した(図24B)。非相同タンパク質に対するモノクローナル抗体である陰性対照は、低いPoP蛍光シグナルを示した。これらの結果は、組換えOspAの二次構造を解明するCD分光測定における発見を間接的に裏付けた。さらに、LA-2抗体-OspA認識は、結合抗原の構造的完全性が、リポソームに結合した後も維持されることを示唆した。

10

【0160】

抗原送達小胞としてのリポソームの実用性は、抗原提示細胞によるその増強された取り込みに起因する。マウスのマクロファージ様細胞を用いたナノ粒子内部移行研究(図24C)は、表面機能化リポソーム(CoPoP/PoPリポソーム)のみで高い抗原取り込みを示した。抗原の遊離非アジュバント形態又は混合非会合(すなわち、PoP/PHAD)形態では、最小の取り込みが観察された。これらの結果は、ナノ粒子形成における増強された抗原内部移行を実証する研究を裏付ける。混合形態におけるPoP/PHADリポソームのマクロファージ選択的取り込みは、リポソームへの抗原の物理的会合が、リポソームアジュバント作用に必要であり得ることをさらに意味する。表面露出抗原及び免疫刺激剤の免疫細胞への同時送達は、CoPoP/PHADリポソームの重要な側面である。食作用を介する細胞取り込みメカニズムは、サイトカラシンBの存在下で、抗原及びリポソームの両方の取り込みが減少することによって支持される。

20

【0161】

ELISAを用いた免疫原性の評価は、この新規ワクチンプラットフォームが、低抗原量で強い免疫応答を刺激できることを示す。CoPoP/PHADリポソームを用いた相同プライムブーストワクチン接種は、他の市販のアジュバントよりも高いOspA特異的IgG抗体価を誘発した(図25A)。さらに、*B. burgdorferi* B31細胞の表面標識(図25B)は、生成されたOspA特異的抗体が、細胞表面上のエピトープを認識できることを示唆し、免疫沈降アッセイから得られた結果を支持した。蛍光顕微鏡写真はさらに、アラム(alum)での免疫化から誘導された抗OspA抗体の低機能性を明らかにする。CoPoP/PHAD免疫由来の抗血清を用いたイムノプロットにより、OspA特異抗体はライム病ボレリアの異なる株を認識するが、その程度は異なることが示された(図25C)。異なるバンド強度は、異なる遺伝子種にわたるOspAの抗原性不均一性を示す。陰性対照の*B. hermsii* (ospa遺伝子を欠いている)では、明らかなバンドは認められない。ヒスチジンタグ化OspAを有する大腸菌溶解物について、最小の非特異的バンドが観察された。OspAバンドについて観察されたより低い分子量は、脂質付加シグナル配列をより短いポリヒスチジンセグメントで置換したことに起因する。

30

【0162】

リポソーム製剤にモノホスホリルリピドAの合成バージョンであるPHAD(TLR-4アゴニスト)を含めると、免疫応答がTh1に偏り、アイソタイプがIgG2aに切り替わった。CoPoP/PHADリポソームは、IgG1よりも高レベルのOspA特異的IgG2a抗体を産生した(図26A)。他方、アラムは、より高いレベルのIgG1アイソタイプを誘導した。IgG2aアイソタイプの優性は、このアイソタイプが、IgG1アイソタイプよりもより高い殺菌活性及びより大きな補体活性化能力を示すため、重要である。CoPoP/PHADリポソームについて観察されたTh1に偏った免疫応答は、脾細胞研究における、インターロイキン-4よりもインターフェロン- γ のより高い刺激と相関する(図26B)。

40

【0163】

殺菌アッセイを用いて、スピロヘータを根絶するOspA特異的抗体の能力を実証した。CoPoP/PHAD-OspA免疫化から生成された抗体は、アラム又はPoP/PHADリポソームと比較して、より高い殺菌活性を示した(図27)。CoPoP/PHADリポソームについて計算され

50

た50%の殺ポレリア菌力価は、アラムよりも有意に高い。

【0164】

OspAベースの伝播阻止ワクチンは、循環抗体の高レベルに大きく依存している。異なる時点で計算されたELISA力価は、一年後にほとんど同じままであり、これは、抗体応答の高い耐久性を示す(図28)。

【実施例8】

【0165】

この実施例では、CoPoPリポソームを、インフルエンザのための赤血球凝集素抗原及びノイラミニダーゼと共に使用した。Hisタグ化抗原は、機能性抗体を生成するためにCoPoP/PHADシステムと共に使用することができる。

【0166】

インフルエンザ赤血球凝集素(HA: hemagglutinin)は、インフルエンザウイルス上の主要な表面抗原であり、主要なワクチン標的である。我々は、His標識H3株HAを得た。図29に示すように、Hisタグ化HAは、CoPoPリポソームに効率的に結合した。

【0167】

50 μ L容量の抗原-リポソーム溶液を、CoPoP及びPoP(2Hとも呼ばれる)を使用して調製し、200 μ Lに希釈する。抗原を含まないリポソーム、及び、リポソームを含まない抗原(参照試料)も調製した。試料を20,000rcfで90分間遠心分離し、得られたリポソームペレットから上清を抽出した。等容量のBCAを添加して、総容量を400 μ Lとした。次に、試料を水浴中で60 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートした。各試料100 μ L容量を、96ウェルプレートの3ウェルのそれぞれに移し、吸光度を562nmで測定した。抗原-リポソーム上清と、リポソームのみの参照試料との間の吸光度の差を使用して、結合パーセントを計算した。ここで、より高い吸光度は、上清中のより高いタンパク質濃度(すなわち、より少ない結合)と相関する。

【0168】

図30に示すように、CoPoPリポソーム及びHisタグ化HAによる免疫化は非常に強力であった。

【0169】

受動的血清移行実験は、ワクチンによる保護が、少なくとも部分的に抗体産生に起因することを確立した(図31)。

【0170】

次いで、多重化の能力を、複数のHisタグ化HAを用いて評価した。図32Aに示されるように、種々のHA及びNAタンパク質が、CoPoPリポソームに結合した。免疫化された場合、全てのHAは、最小の交差反応性を有する特異的抗体を生成し得る(図32B)。

【実施例9】

【0171】

この実施例は、PHAD、PHAD-504、及び3D6A-PHADを含む、異なるタイプの合成MPLAが、本組成物及び方法において使用できることを実証する。これらのアジュバントの構造を図33に示す。リポソームは4:2:1:XのDPPC:コレステロール:CoPoP:MPLAで形成され、この際、MPLAはこれらのタイプの合成バージョンのそれぞれであり、Xは変化し、5、4、3、2、1のいずれかであった。

【0172】

図34に示されるように、全てのタイプのMPLAを含めてリポソームを生成することができ、MPLAの脱落(「CA」)よりも一般的に高い抗体生成を生じる。Hisタグ化Pfs25を、抗原:CoPoPの質量比1:4で混合し、0日目及び21日目にマウスを免疫した。42日目に血清を採取し、Pfs25結合IgG ELISAについて血清を評価した。

【0173】

本発明を、特定の実施例を通じて説明してきたが、通常の変更は当業者に自明であり、そのような変更は本開示の範囲内であることが意図される。

10

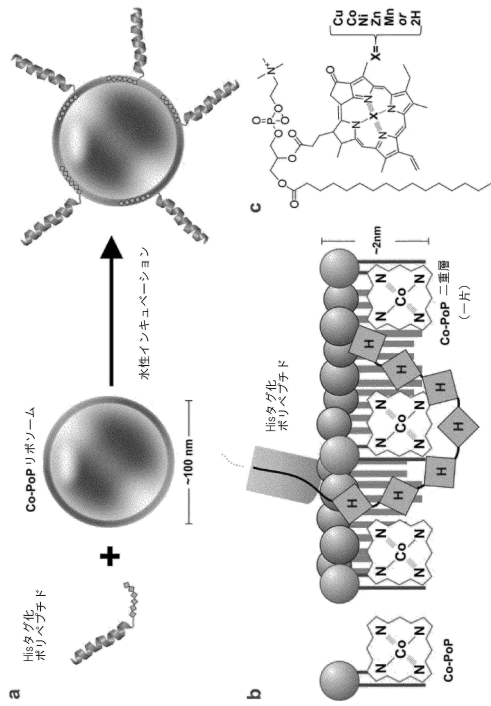
20

30

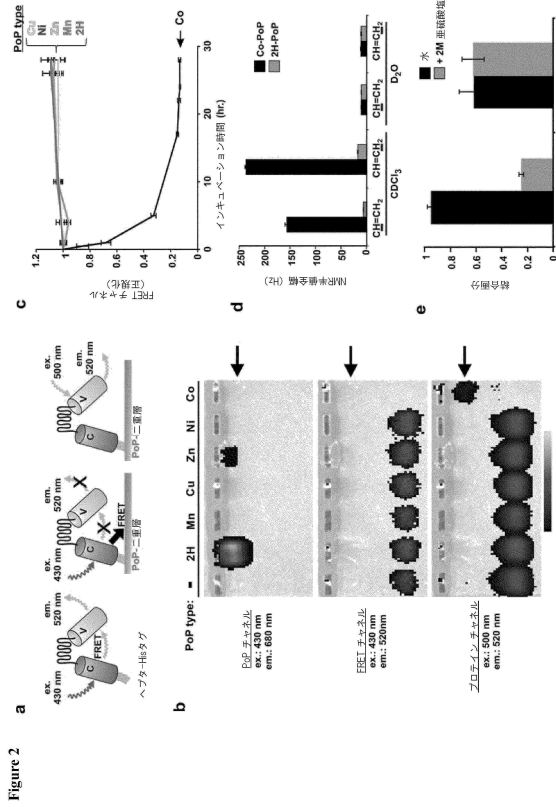
40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】



10

20

【図 3】

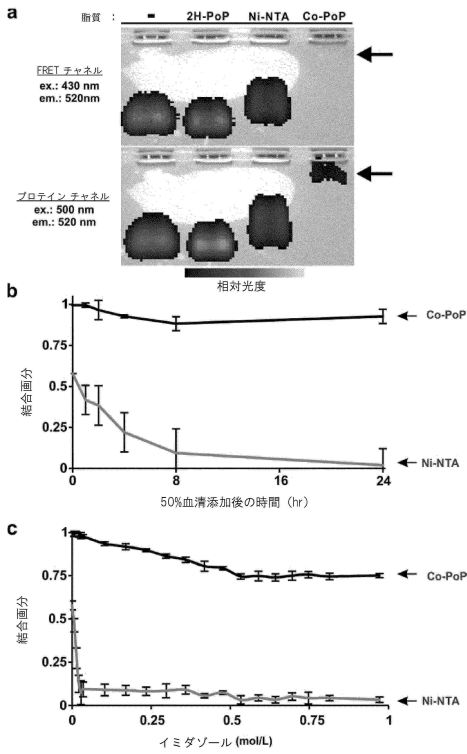


Figure 3

【図 4】

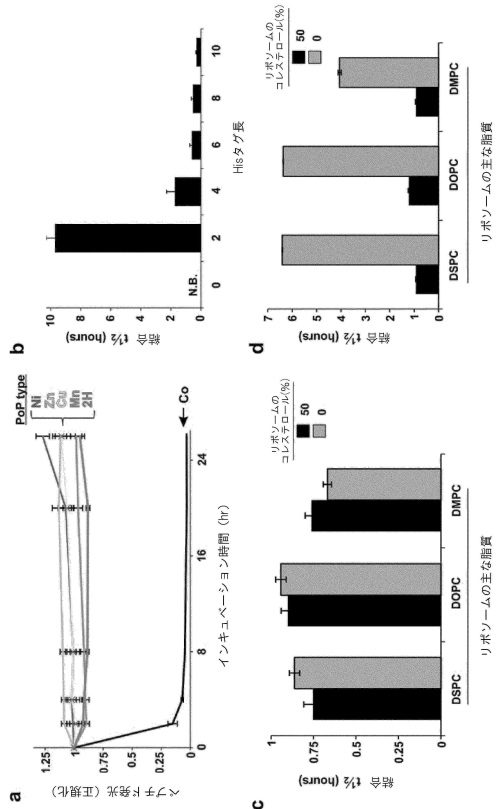


Figure 4

30

40

50

【 図 5 】

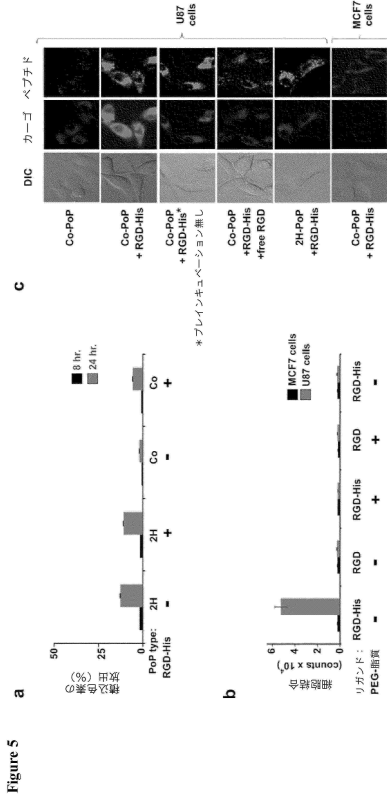


Figure 5

【 図 6 】

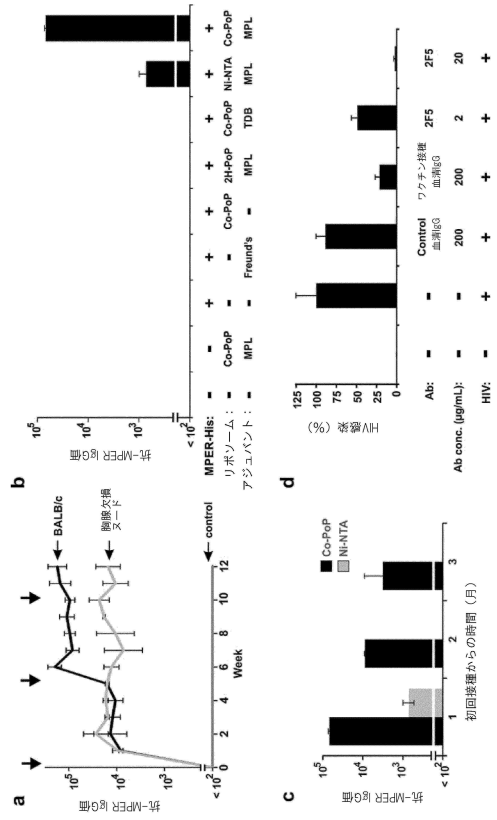


Figure 6

【 図 7 】

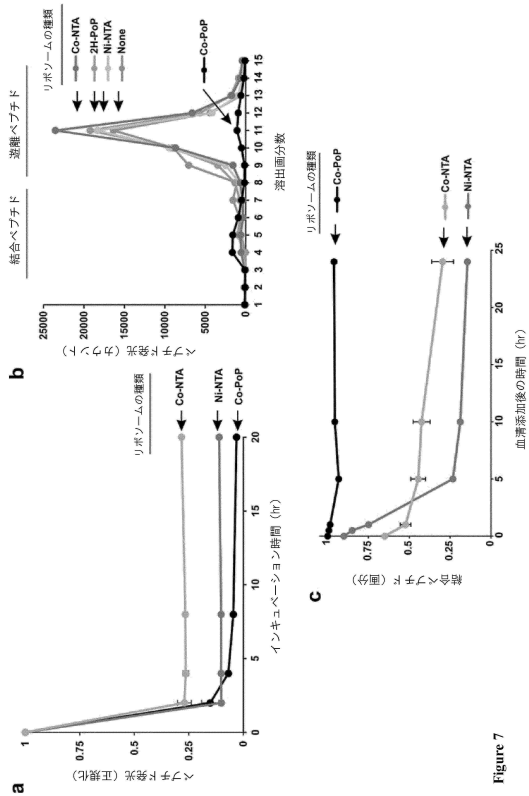


Figure 7

【 図 8 】

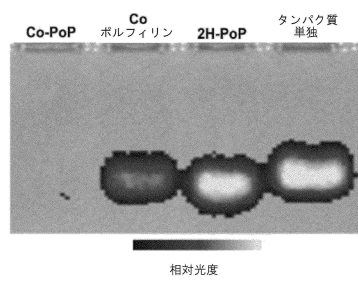


Figure 8

10

20

30

40

50

【 9 】

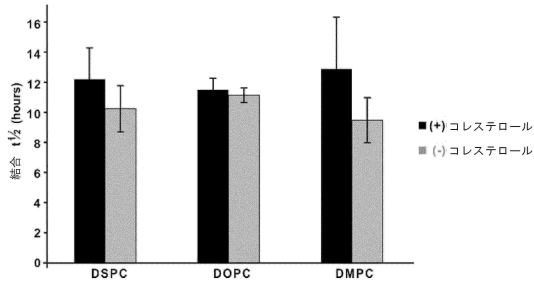


Figure 9

【 10 】

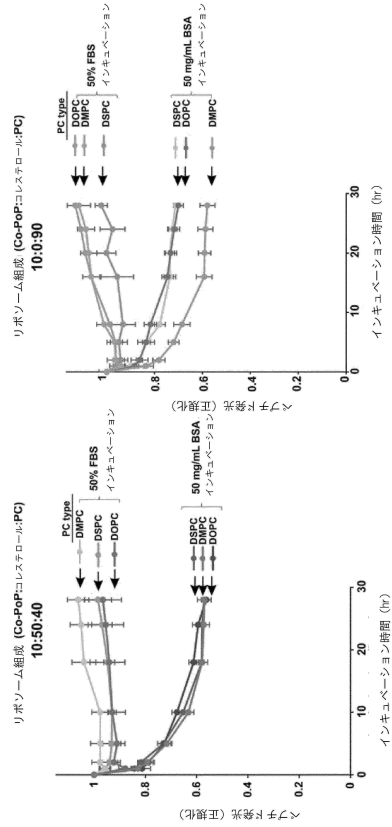


Figure 10

【 11 】

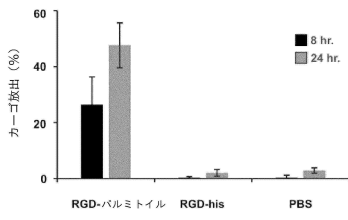


Figure 11

【 12 】

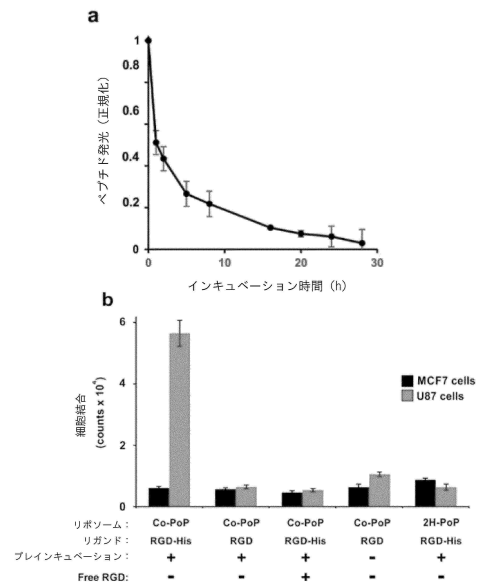


Figure 12

10

20

30

40

50

【 13 】

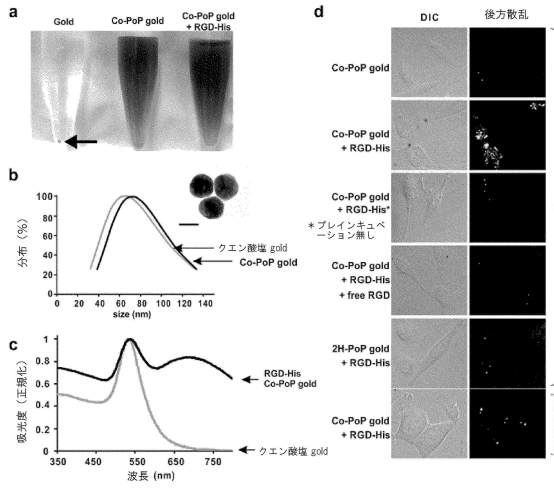


Figure 13

【 14 】

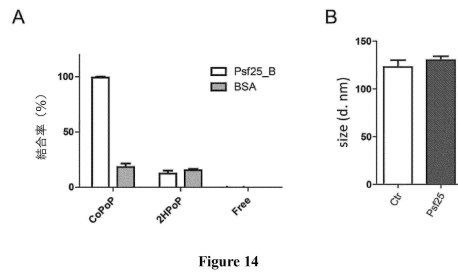


Figure 14

10

【 15 】

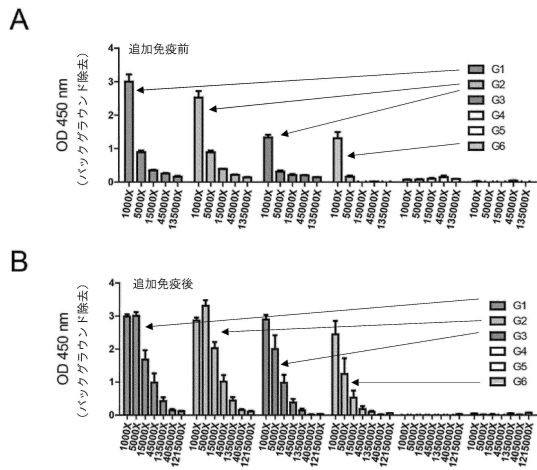


Figure 15

【 16 】

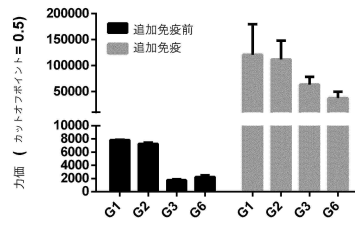


Figure 16

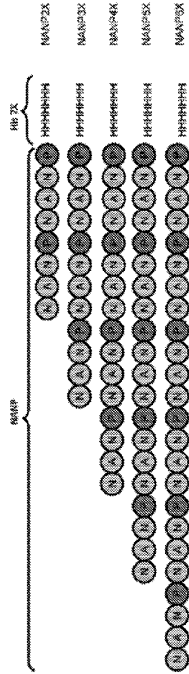
20

30

40

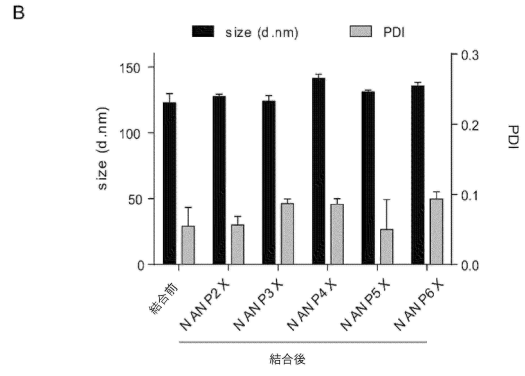
50

【 図 17 A 】

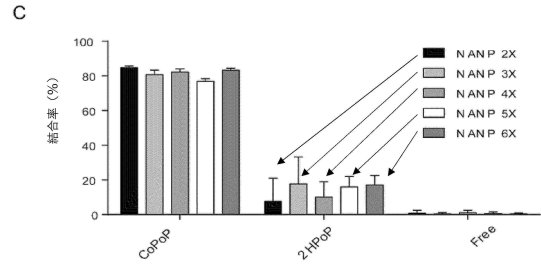


A

【 図 17 B 】



10



20

【 図 18 】

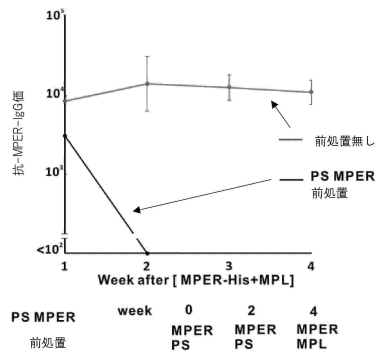


Figure 18

【 図 19 】

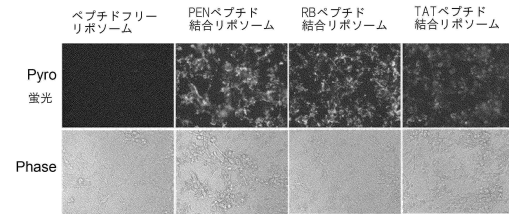


Figure 19

30

40

50

【図 20】

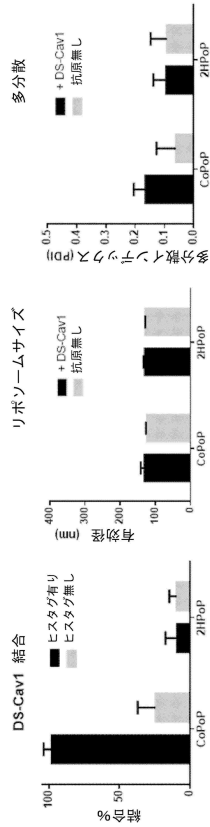


Figure 20

【図 21】

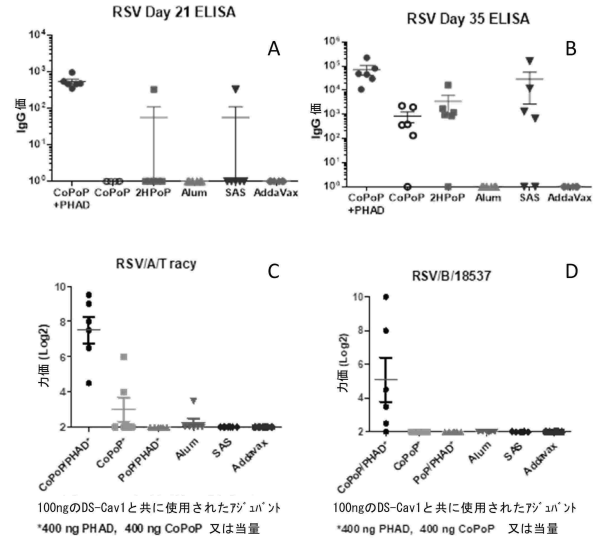


Figure 21

【図 22】

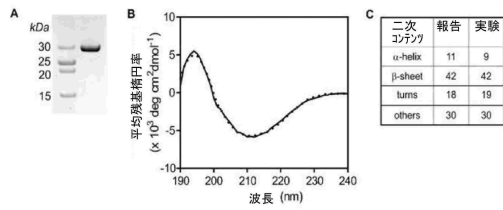


Figure 22

【図 23】

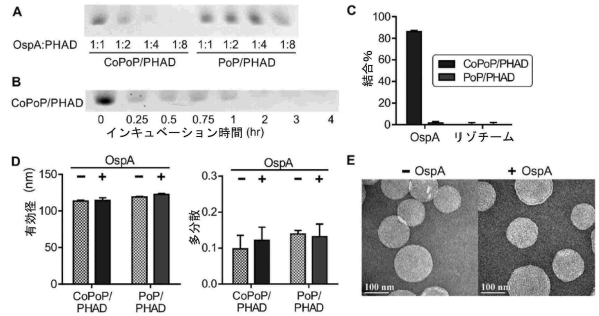


Figure 23

10

20

30

40

50

【 図 2 4 】

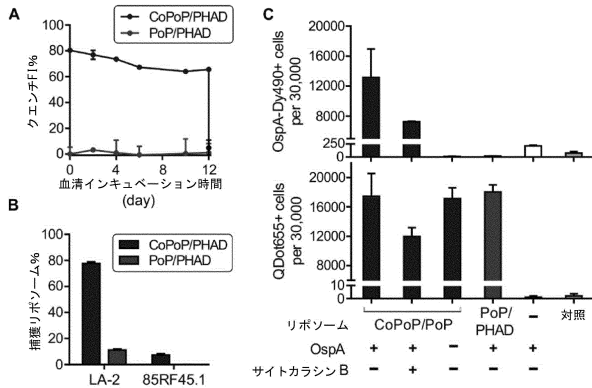


Figure 24

【 図 2 5 】

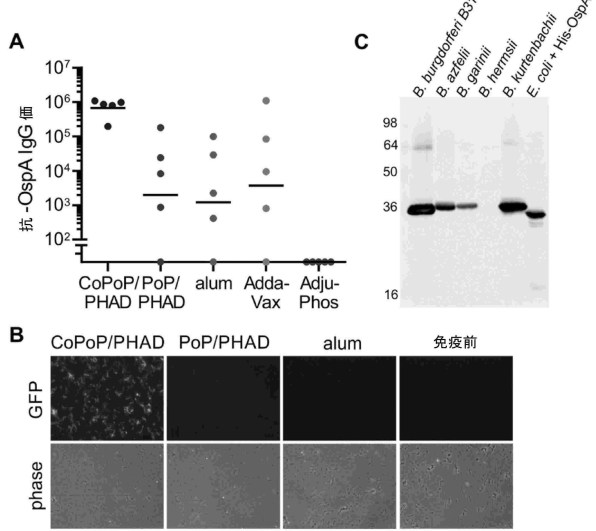


Figure 25

【 図 2 6 】

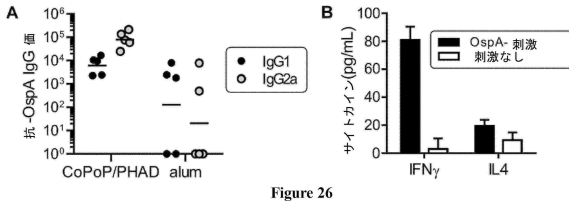


Figure 26

【 図 2 7 】

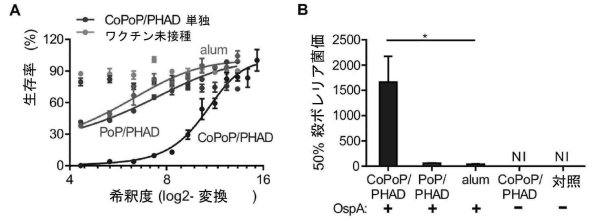


Figure 27

10

20

30

40

50

【 28 】

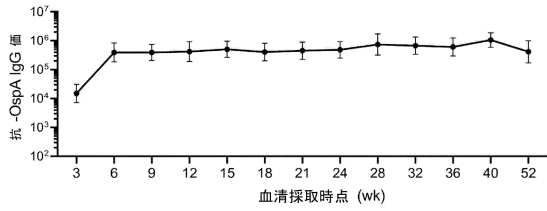


Figure 28

【 29 】

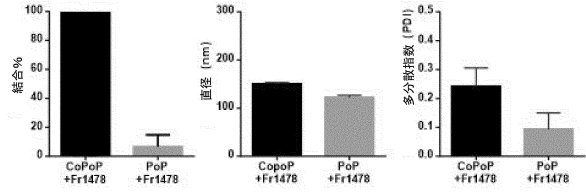


Figure 29

【 30 】

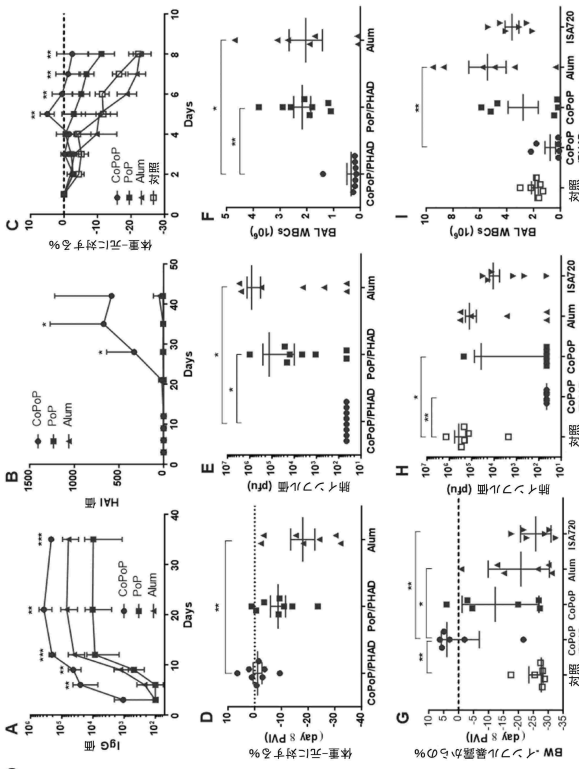


Figure 30

【 31 】

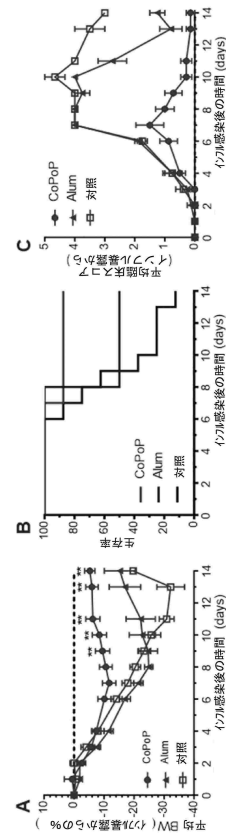


Figure 31

10

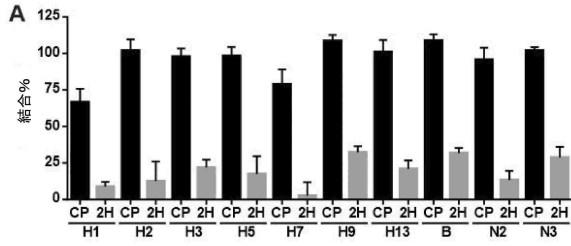
20

30

40

50

【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

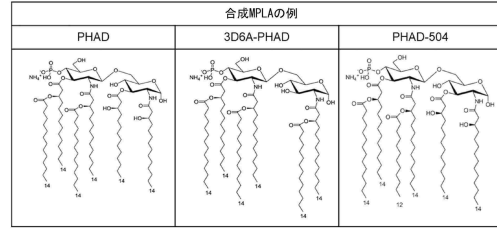


Figure 33

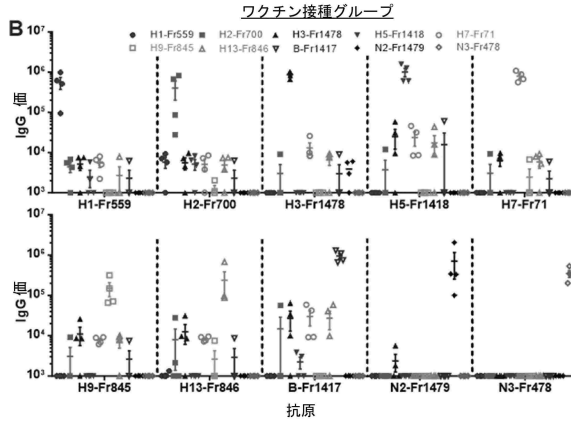


Figure 32

【 図 3 4 】

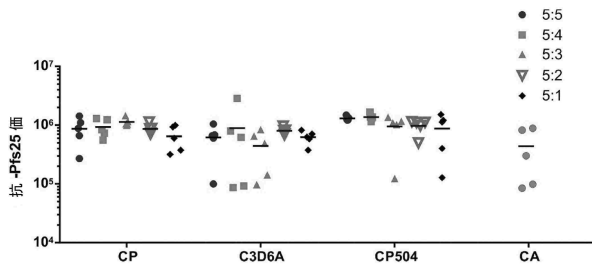


Figure 34

【 配列表 】

0007635149000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04

ストレイク アベニュー 2 2 0 1

(74)代理人 110000475

弁理士法人みのり特許事務所

(72)発明者 ラヴェル, ジョナサン

カナダ国、エル2イー1ケイ9、オンタリオ州、ナイアガラ フォールズ、ジェプソン ストリート
5 1 8 3

(72)発明者 シャオ, シュアイ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 1 5 0、トナワンダ、アパートメント 5、クレストマウン
ト アヴェニュー 1 8 7

(72)発明者 ゲン, ジューミン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 2 2 1、ウィリアムビル、ストーンリッジ コート 4 8

(72)発明者 ヒュアン, ウエイ シャオ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 2 2 6、アムハースト、アパートメント 1 2 3、メイヤー
ロード 1 2 0、ブルバード タワー アパートメンツ

(72)発明者 リー, シュー マアーン

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 5 5、ロックヴィル、カタルパ コート 1 7 0 5 4

(72)発明者 キング, チャールズ, リクター

アメリカ合衆国、コロンビア特別区 2 0 0 1 0、ワシントン、ノースウエスト パーク ロード
1 8 4 0

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 特表2 0 1 8 - 5 1 3 1 5 6 (J P , A)

Nat Chem , 2015年 , Vol.7, No.5 , pp.438-446

Nat Nanotechnol , 2018年 , Vol.13, No.12 , pp.1174-1181

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

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

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

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

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

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)

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)