

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5890095号  
(P5890095)

(45) 発行日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(24) 登録日 平成28年2月26日(2016.2.26)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 G

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/145

A 6 1 K 39/21 (2006.01)

A 6 1 K 39/21

請求項の数 33 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-516041 (P2010-516041)  
 (86) (22) 出願日 平成20年7月9日(2008.7.9)  
 (65) 公表番号 特表2010-533178 (P2010-533178A)  
 (43) 公表日 平成22年10月21日(2010.10.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/008394  
 (87) 国際公開番号 W02009/009054  
 (87) 国際公開日 平成21年1月15日(2009.1.15)  
 審査請求日 平成23年1月27日(2011.1.27)  
 審判番号 不服2014-7523 (P2014-7523/J1)  
 審判請求日 平成26年4月23日(2014.4.23)  
 (31) 優先権主張番号 60/929,685  
 (32) 優先日 平成19年7月9日(2007.7.9)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 594140915  
 ジョージタウン・ユニバーシティ  
 GEORGETOWN UNIVERSITY  
 アメリカ合衆国ディ・シー20057、  
 ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティ  
 ーセブンス・アンド・オー・ストリート (番地の表示なし)  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性リボソーム媒介核酸送達を用いて免疫応答を引き起こす方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳類においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発するための医薬の製造におけるリガンド - 標的化カチオン性リボソーム複合体の使用、ここで、該カチオン性リボソーム複合体は以下を含む：

(a) カチオン性リボソーム；

(b) カチオン性リボソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化した、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 Fv (c y s - T f R s c F v) である、リガンド；

(c) カチオン性リボソームに結合した 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子；および

(d) カチオン性リボソームに結合した 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子。

【請求項2】

該ウイルス抗原が、インフルエンザウイルス、H I Vウイルス、S A R Sウイルス、鳥インフルエンザウイルス、エボラウイルス、B 型肝炎ウイルスおよび天然痘ウイルスからなる群から選択されるウイルスからのものであり、該 1 以上のウイルスタンパク質が、H I Vウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、S A R Sウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、B 型肝炎ウイルススタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択され、該 1 以上のイ

10

20

ンターロイキンが、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 17、IL - 18 および IL - 23 からなる群から選択される、請求項 1 の使用。

【請求項 3】

該複合体が、静脈内投与、経口投与、筋肉内投与、病巣内投与、皮内投与、経皮投与、眼内投与、腹腔内投与、経皮的投与、エアロゾル投与、鼻腔内投与、臓器内投与、脳内投与、局所投与、皮下投与、内視鏡下投与、徐放インプラントおよび浸透圧または機械的ポンプを介する投与からなる群から選択される経路を介して、ポータルとしてまたは注入として投与される請求項 1 の使用。

【請求項 4】

該リガンド - 標的化カチオン性リポソームが、該カチオン性リポソームに結合した K [ K ( H ) K K K ]<sub>5</sub> - K ( H ) K K C ( H o K C ) ( 配列番号 1 ) ペプチドを含むペプチドをさらに含む請求項 1 の使用。

【請求項 5】

哺乳類におけるウイルス性疾患を治療または予防するための医薬の製造におけるカチオン性リポソーム複合体の使用、ここで、該カチオン性リポソーム複合体は以下を含む：

- ( a ) カチオン性リポソーム；
- ( b ) カチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化した、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( c y s - T f R s c F v ) である、リガンド；
- ( c ) カチオン性リポソームに結合した 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子；および、
- ( d ) カチオン性リポソームに結合した 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子。

【請求項 6】

該ウイルス性疾患が、インフルエンザ、H I V、S A R S、鳥インフルエンザ、エボラ、B 型肝炎および天然痘からなる群から選択され、該 1 以上のウイルスタンパク質が、H I V ウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、S A R S ウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、B 型肝炎ウイルスタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択され、該 1 以上のインターロイキンが、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 17、IL - 18 および IL - 23 からなる群から選択される請求項 5 の使用。

【請求項 7】

該複合体が、静脈内投与、経口投与、筋肉内投与、病巣内投与、皮内投与、経皮投与、眼内投与、腹腔内投与、経皮的投与、エアロゾル投与、鼻腔内投与、臓器内投与、脳内投与、局所投与、皮下投与、内視鏡下投与、徐放インプラントおよび浸透圧または機械的ポンプを介する投与からなる群から選択される経路を介して、ポータルとしてまたは注入として投与される請求項 5 の使用。

【請求項 8】

該リガンド - 標的化カチオン性リポソームが、該カチオン性リポソームに結合した K [ K ( H ) K K K ]<sub>5</sub> - K ( H ) K K C ( H o K C ) ( 配列番号 1 ) ペプチドを含むペプチドをさらに含む請求項 5 の使用。

【請求項 9】

哺乳類の抗原提示細胞 ( A P C ) に 1 以上のウイルスタンパク質および / または 1 以上の インターロイキンをコードする核酸分子を送達するための、抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( T f R s c F v ) - 標的化カチオン性免疫リポソーム複合体を含む組成物、ここで、該抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( T f R s c F v ) - 標的化カチオン性免疫リポソーム複合体は、カチオン性リポソーム、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( c y s - T f R s c F v )、および 1

10

20

30

40

50

以上のウイルスタンパク質および／または１以上のインターロイキンをコードする核酸分子を含み、c y s - T f R s c F vはカチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している。

【請求項 10】

該核酸分子が１以上のウイルスタンパク質と１以上のインターロイキンとの両方をコードする請求項 9 の組成物。

【請求項 11】

該１以上のウイルスタンパク質が、H I Vウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、S A R Sウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、B 型肝炎ウイルスタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択され、該１以上のインターロイキンが、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 12、I L - 13、I L - 15、I L - 17、I L - 18およびI L - 23からなる群から選択される請求項 9 の組成物。

【請求項 12】

該組成物が、静脈内投与、経口投与、筋肉内投与、病巣内投与、皮内投与、経皮投与、眼内投与、腹腔内投与、経皮的投与、エアロゾル投与、鼻腔内投与、臓器内投与、脳内投与、局所投与、皮下投与、内視鏡下投与、徐放インプラントおよび浸透圧または機械的ポンプを介する投与からなる群から選択される経路を介して、ボラスとしてまたは注入として肝臓、脾臓、リンパ節、腸および／または呼吸器に位置するA P Cに投与される請求項 9 の組成物。

【請求項 13】

該カチオン性リポソームが１以上のカチオン性脂質と１以上の中性またはヘルパー脂質との混合物を含む請求項 1 の使用。

【請求項 14】

該c y s - T f R s c F vと該カチオン性リポソームとが１：１から１：１００（w：w）、または１：１０から１：５０（w：w）、または１：２０から１：４０（w：w）の範囲の比である請求項 1 の使用。

【請求項 15】

該カチオン性リポソームが、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび／またはコレステロール、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンとの混合物；またはジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび／またはコレステロールとの混合物を含む請求項 1 の使用。

【請求項 16】

該核酸分子が、0.1モルの１以上のウイルスタンパク質をコードする１以上の核酸分子、対、10モルの１以上のインターロイキンをコードする１以上の核酸分子；から、10モルの１以上のウイルスタンパク質をコードする１以上の核酸分子、対、0.1モルの１以上のインターロイキンをコードする１以上の核酸分子、のモル比にて存在するかまたは、1モルの１以上のウイルスタンパク質をコードする１以上の核酸分子、対、1モルの１以上のインターロイキンをコードする１以上の核酸分子、のモル比にて存在する請求項 1 の使用。

【請求項 17】

該１以上のウイルスタンパク質をコードする１以上の核酸分子、該１以上のインターロイキンをコードする１以上の核酸分子、および該カチオン性リポソームが、0.5：１から１：４０（μg全核酸：μgリポソーム）、または１：５から１：２０（μg全核酸：μgリポソーム）の間の重量比、または１：１０（μg全核酸：μgリポソーム）の重量比にて存在する請求項 1 の使用。

## 【請求項 18】

該カチオン性リポソームが 1 以上のカチオン性脂質と 1 以上の中性またはヘルパー脂質との混合物を含む請求項 5 の使用。

## 【請求項 19】

該 c y s - T f R s c F v と該カチオン性リポソームとが、1 : 1 から 1 : 100 (w : w) または 1 : 10 から 1 : 50 (w : w) または 1 : 20 から 1 : 40 (w : w) の範囲の比にて存在する請求項 5 の使用。

## 【請求項 20】

該カチオン性リポソームが、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび/またはコレステロール、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンとの混合物；またはジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび/またはコレステロールとの混合物を含む請求項 5 の使用。

## 【請求項 21】

該核酸分子が、0.1モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、10モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子；から、10モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、0.1モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比、または 1モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、1モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比にて存在する請求項 5 の使用。

## 【請求項 22】

該 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、該 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、および該カチオン性リポソームが、0.5 : 1 から 1 : 40 (μg 全核酸 : μg リポソーム)、または 1 : 5 から 1 : 20 (μg 全核酸 : μg リポソーム)、の間の重量比、または 1 : 10 (μg 全核酸 : μg リポソーム) の重量比にて存在する請求項 5 の使用。

## 【請求項 23】

以下を含む医薬組成物：

カチオン性リポソーム、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( c y s - T f R s c F v ) であるリガンドおよび 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子を含む第一のリガンド - 標的化カチオン性リポソーム複合体であって、該リガンドが該カチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している第一のリガンド - 標的化カチオン性リポソーム複合体；および、

カチオン性リポソーム、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗 - トランスフェリン受容体一本鎖 F v ( c y s - T f R s c F v ) であるリガンドおよび 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子を含む第二のリガンド - 標的化カチオン性リポソーム複合体であって、該リガンドが該カチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している第二のリガンド - 標的化カチオン性リポソーム複合体。

## 【請求項 24】

該核酸分子が該カチオン性リポソーム内にカプセル封入されているか、または該カチオン性リポソームの内側または外側単層に結合している請求項 23 の医薬組成物。

## 【請求項 25】

該第一および第二のカチオン性リポソームが 1 以上のカチオン性脂質と 1 以上の中性またはヘルパー脂質との混合物を含む請求項 23 の医薬組成物。

## 【請求項 26】

該カチオン性リポソームのそれぞれの該 c y s - T f R s c F v が 1 : 1 から 1 : 100 (w : w)、または 1 : 10 から 1 : 50 (w : w)、または 1 : 20 から 1 : 40 (

10

20

30

40

50

w : w )、の範囲の比にて存在する請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 2 7】

該第一および第二のカチオン性リポソームが、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび/またはコレステロール、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェートとジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンとの混合物；またはジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイドとジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび/またはコレステロールとの混合物を含む請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 2 8】

該核酸分子が、0.1モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、10モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子；から、10モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、0.1モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子、のモル比、または1モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、1モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子、のモル比にて存在する請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 2 9】

該1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、該1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子、および該カチオン性リポソームがそれぞれ、0.5 : 1から1 : 40 (μg全核酸 : μgリポソーム)、または1 : 5から1 : 20 (μg全核酸 : μgリポソーム)、の間の重量比、または1 : 10 (μg全核酸 : μgリポソーム)の重量比にて該第一および第二のカチオン性リポソーム中に存在する請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 3 0】

該1以上のウイルスタンパク質が、HIVウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、SARSウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、B型肝炎ウイルスタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択され、該1以上のインターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18およびIL-23からなる群から選択される請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 3 1】

該複合体のそれぞれに結合したK[K(H)KKK]<sub>5</sub>-K(H)KKC(HoKC)(配列番号1)ペプチドを含むペプチドをさらに含む請求項 2 3 の医薬組成物。

【請求項 3 2】

抗原提示細胞(APC)と、カチオン性リポソーム、カルボキシ末端にてシステイン部分を含む抗-トランスフェリン受容体一本鎖Fv(cys-TfRscFv)、および1以上のウイルスタンパク質をコードするか、1以上のインターロイキンをコードするか、または1以上のウイルスタンパク質および1以上のインターロイキンの両方をコードする、1以上の核酸分子を含む抗-トランスフェリン受容体一本鎖Fv(TfRscFv)-標的化カチオン性免疫リポソーム複合体とを接触させることを含む、哺乳類のAPCに1以上の核酸分子をインビトロで送達する方法であって、該TfRscFvが該カチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している方法。

【請求項 3 3】

該1以上のウイルスタンパク質が、HIVウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、SARSウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、B型肝炎ウイルスタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択され、該1以上のインターロイキンが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL

10

20

30

40

50

- 12、IL - 13、IL - 15、IL - 17、IL - 18およびIL - 23からなる群から選択される請求項32の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

発明の分野

本発明は、薬物送達、具体的には、カチオン性リポソームに基づくワクチンの分野におけるものである。態様において、本発明は、ウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する、または、ウイルス性疾患を治療または予防する、分子の送達に有用なリガンド-標的化（例えば、抗体-または抗体フラグメント-標的化）リポソームを製造する方法を提供する。送達システムの特異性はターゲティングリガンドに由来する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ワクチンは、高度に伝染性の感染性病原体に対する強力な武器であり、前世紀において感染性疾患の負荷を顕著に低減するのに役立った。しかし、感染性疾患によりもたらされる世界的な健康に対する脅威は低減しておらず、むしろ国家および全世界の重要事項となっている。結核およびマラリアなどのウイルス性病原体の衝撃は、例えば、世界的規模で感じられ続けており、新たに現れた病原体、例えば、HIV/AIDS、SARS-コロナウイルスおよび最近出現している感染爆発のインフルエンザ、即ち「鳥インフルエンザ」ウイルスは公衆衛生に対する新たな挑戦である。

20

【0003】

ほとんどのワクチン技術には、不活性化ワクチン製剤、タンパク質サブユニットに基づくものまたは弱毒性の性質のものを伴う。例えば、インフルエンザワクチンの現在の生産および製造技術は、鶏卵の接種に基づき、依然として時間と労力のかかる方法である。弱毒性ウイルスである天然痘ワクチンは、免疫不全集団においては重篤な有毒な事象が伴う。したがって、現在のワクチン技術は旧式であり、ワクチンに対する国家的または世界的要求を満たすには不十分である。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

それゆえ、高度に易変性の出現しつつある病原体によってもたらされる挑戦に取り組む新しいワクチン技術を開発することが緊急の要求である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、抗原に対する免疫応答の誘発における使用および患者におけるウイルス性疾患の治療または予防のためのカチオン-リポソームに基づく薬物送達システムを提供することによってかかる要求を満たすものである。

【0006】

40

発明の簡単な概要

一つの態様において、本発明は、リガンド-標的化 (ligand-targeted) (例えば、タンパク質/ペプチド-標的化、抗体-または抗体フラグメント-標的化) カチオン性リポソームを調製する方法を提供する。好適な態様において、かかる方法は、リガンド (例えば、トランスフェリン、ガラクトース、L-37pA、抗体、または抗体フラグメント) を調製する工程およびリガンドとカチオン性リポソームとを混合してリガンド-標的化カチオン性リポソームを形成させる工程を含む。好適には、リガンドはカチオン性リポソームと直接的に結合 (associate) /複合体化しているが、カチオン性リポソームに化学的に結合してはいない。別の態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合していてもよい。次いで、リガンド-標的化カチオン性リポソームを1以上のウイルスタンパク質をコード

50

する 1 以上の核酸分子、および/または 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子と混合して、リガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体を形成させる。好適な態様において、抗体フラグメント、例えば、Fab フラグメント、または一本鎖 Fv フラグメント、例えば、抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv) が用いられる。さらなる態様において、方法はさらに、リガンド-標的化カチオン性リボソームと K[K(H)KKK]5-K(H)KKC (HoKC) (配列番号1) ペプチドを含むペプチドとを混合する工程を含んでいてもよい。

#### 【0007】

好適には、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント) はカチオン性リボソームと約 1:1 から約 1:100、好適には 約 1:10 から約 1:50 (w:w)、より好適には約 1:20 から約 1:40の範囲の比にて混合される。例示的な態様において、カチオン性リボソームは、ジオレオイルトリメチルアンモニウム ホスフェート (DOTAP) とジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) および/または コレステロール (chol)との混合物;または、ジメチルジオクタデシルアンモニウム ブロマイド (DDAB)とジオレオイルホスファチジルエタノールアミン および/または コレステロールとの混合物を含む。

#### 【0008】

核酸は好適には約 0.1 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 10 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比; 約 10 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 0.1 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比にて存在する。例えば、約 1 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 1 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、の比が利用できる。例示的な態様において、カチオン性免疫リボソームは、1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子と、約 1:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)、好適には 約 1:5 から約 1:20 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)、例えば、約 1:10 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)の重量比にて混合される。

#### 【0009】

核酸分子によってコードされうるウイルスタンパク質の例としては、これらに限定されないが、HIV ウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、A、BまたはC型肝炎ウイルスタンパク質、SARS ウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、西ナイルウイルスタンパク質および天然痘ウイルスタンパク質からなる群から選択されるウイルスタンパク質が挙げられる。核酸分子によってコードされうるインターロイキンの例としては、これらに限定されないが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18およびIL-23からなる群から選択されるインターロイキンが挙げられる。好適な態様において、核酸は、IL-2、IL-12およびIL-15をコードする。本発明はまた、本発明の様々な方法によって調製されるカチオン性免疫リボソーム複合体を提供する。

#### 【0010】

さらなる態様において、本発明は、カチオン性リボソーム、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)、1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子を含むリガンド-標的化 (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント-標的化) カチオン性リボソーム複合体を提供し、ここでリガンドはカチオン性リボソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している。さらなる態様において、リガンドはリボソームに化学的に結合していてもよい。

#### 【0011】

本発明はさらに、本発明の様々なリボソーム複合体を含む医薬組成物を提供する。本発明のさらなる医薬組成物は、カチオン性リボソーム、リガンド (例えば、タンパク質/ペ

10

20

30

40

50

プチド、抗体または抗体フラグメント) および 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子を含む第一のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含み、ここでリガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している。さらなる態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合していてもよい。好適な態様において、医薬組成物はさらに、カチオン性リポソーム、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント) および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子を含む第二のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含み、ここでリガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化している。さらなる態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合していてもよい。

10

#### 【0012】

さらなる態様において、本発明は、カチオン性リポソーム、TfRscFv、および 1 以上の活性薬剤を含む抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv)-標的化 カチオン性免疫リポソーム複合体を哺乳類に投与することを含む、哺乳類の抗原提示細胞(APC)に 1 以上の 活性薬剤を送達する方法を提供し、ここでTfRscFvはカチオン性リポソームに化学的に結合していないが、直接的にカチオン性リポソームと結合/複合体化している。さらなる態様において、TfRscFvはカチオン性リポソームに化学的に結合していてもよい。好適には、方法は、プロフェッショナルおよび非プロフェッショナル APC、例えば肝臓、脾臓、リンパ節、腸および/または 呼吸器に位置するAPCに薬剤(例えば、核酸)を送達する。

#### 【0013】

本発明はまた、本発明の様々なカチオン性リポソーム複合体、または本発明の医薬組成物を哺乳類に投与することを含む、哺乳類におけるウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。

20

#### 【0014】

さらなる態様において、本発明は、本発明の様々なカチオン性リポソーム複合体、または本発明の医薬組成物を哺乳類に投与することを含む、哺乳類におけるウイルス性疾患を治療または予防する方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

図/図面の簡単な説明

30

特許または出願のファイルはカラーでなされた少なくとも 1 つの図を含む。カラー図を含むこの特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な料金の支払いにより序によって提供される。

【図 1】図 1は、抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 抗体フラグメント (sc) およびルシフェラーゼレポーター遺伝子と複合体化したリポソーム(HoKC ペプチドを含むまたは含まない)によりトランスフェクトしたHep3B 細胞におけるルシフェラーゼ活性を示す。

【図 2】図 2は、sc、GalまたはL-37-pAおよびルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するDNAと複合体化した 3 種類のリポソーム(A、DおよびG)によりトランスフェクトした初代チンパンジー 肝細胞におけるルシフェラーゼ 発現を示す。すべてのデータは平均 +SD (n=3)として示す。

40

【図 3】図 3は、以下と複合体化したEGFPを発現する20-25  $\mu$ gのDNAを接種された 2 連のマウスからの肝臓 抽出物におけるGFP 発現を非処理マウス(UT)と比較して示すウェスタンブロットを示す: リピドA (scLA)、リピドAおよびHoKC (scLAHK)、リピドDおよびHoKC (scLDHK)、リピドGおよびHoKC (scLGHK) と結合したTfRscFv リガンド (sc)、リピドA (GalLA) と結合したガラクトースおよびリピドA (L-37pALA) と結合したL-37pA。

【図 4】図 4は、HCV 抗原NS3-NS5Bを発現するDNA プラスミド(pAG410)によりトランスフェクトされた細胞のウェスタンブロットを示す。ブロットは、NS5Bに対するモノクローナル抗体(左)および慢性的に感染したチンパンジーからの血清(右)によりプローブした。

【図 5】図 5は、pSCMVおよびCMV プロモーターの下でのIL-2の発現比較を示す。

【図 6】図 6は、scL と複合体化したまたは遊離のpAG410の静脈内注射の後のマウス 肝

50



臓におけるNS3のDNA PCR 増幅を示す。

【図 7】図 7は、scL-HCV/scL-IL12を接種されたマウスにおけるHCV 組換え ワクシニアウイルス 複製の阻害を示す。

【図 8】図 8Aおよび8Bは、未処理 動物 (Ch1601)および回復した動物 (Ch1587)のワクチン接種およびHCVによる攻撃の際のHCV 抗-HVR1 抗体(棒)およびRNA プロファイル (黒三角)を示す。抗-HVR1はP/N比として表す。P/Nは試験血清のOD405を、同じチンパンジーからのワクチン前 サンプルについて得たものによって割ることにより算出する。カットオフ値は P/N=2である。

【図 9】図9A-9Cは、2匹の回復したチンパンジー(Ch1588およびCh1606)および未処理 チンパンジー (Ch6394)のT細胞に基づく ワクチン接種およびHCVによる攻撃の際の疾患 プロファイルを示す。RNA タイター(titer)(黒四角)、ALT レベル(黒三角)。免疫化動物のHCV 攻撃は、0週目に行った (100 CID<sub>50</sub>のcHCV)。

【図 10】図 10A-10Cは、scL-HCV により免疫され、組換え アデノウイルスにより追加免疫された チンパンジー(Ch1611およびCh6407)または、scL-空ベクターにより免疫され、非組換え アデノウイルスにより追加免疫されたチンパンジー (Ch0257)におけるペプチド プールに対するエリスポット 応答を示す。

【図 11】図 11A-11Cは、免疫化(Ch6407 および1611)および対照 (Ch 0257) チンパンジーにおける攻撃前後のエリスポット 応答を示す。

【図 12】図 12A-12Cは、ワクチン接種した (Ch6407および1611)および対照 (Ch 0257) チンパンジーにおける肝臓内 サイトカイン mRNA レベルを示す。

【図 13】図 13は、対照 (Ch 0257)およびワクチン接種した (Ch6407および1611) チンパンジーにおける攻撃後のHCV RNA タイターを示す。

【図 14】図 14は、対照 (Ch 0257) およびワクチン接種した(Ch6407および1611) チンパンジーにおける攻撃後の血清 ALT レベルを示す。

【図 15】図 15は、慢性的に感染した チンパンジーにおけるPBMC T-細胞 応答を示す。

【図 16】図16A-16C は、遊離 (裸(naked)) プラスミド DNA (LUC)として(B)、またはscL ナノ免疫リボソーム複合体 (scLLUC)にカプセル封入された (C)、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現するプラスミド DNA のIN 投与、次いでルシフェリン 基質 注射の後のBALB/cマウスの光学イメージングを示す。パネル Aは非処理対照を表す。

【図 17】図17A-17Cは、遊離 (裸) プラスミド DNA (LUC) として(B)、または scL ナノ免疫リボソーム複合体 (scLLUC)にカプセル封入された(C)、ルシフェラーゼ 遺伝子を発現するプラスミド DNA の静脈内投与、次いでルシフェリン 基質 注射の後のBALB/cマウスの光学イメージングを示す。パネル Aは非処理対照を表す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

一つの態様において、本発明の態様によるリガンド-標的化 (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント- 標的化) カチオン性リボソームまたはカチオン性ポリマー 複合体は、好適には、所望の複合体の成分が所定の比および所定の順序にて混合される簡便かつ効率的な非化学的結合方法によって作られる。さらなる態様において、リガンド-標的化カチオン性リボソームまたはカチオン性ポリマー複合体は、リガンドがカチオン性リボソームの表面に化学結合を介して化学的に結合する化学的結合方法によって作られうる。

【0017】

「免疫複合体」、「免疫リボソーム」、「複合体」、「ナノ複合体」、「免疫ナノ複合体」、「リボソーム複合体」および「ナノ免疫リボソーム」という用語は本明細書に渡って互換的に本発明のカチオン性リボソームを指すために用いられる。本発明の実施における使用のための例示的なカチオン性リボソームおよびその生産方法は、2006年9月14日出願の米国公開特許出願番号2003/0044407 および 米国特許出願番号11/520,796に開示されており、それぞれの開示内容は引用によりその全体を本明細書に含める。

## 【 0 0 1 8 】

本明細書において用いる場合、「約」という用語は、言及された値ならびにその言及された値の10%の範囲内にある値をいう。例えば、「約 100 nm」には、その範囲の間の値を含む90 nmから110 nmの値が含まれる。

## 【 0 0 1 9 】

本明細書において用いる場合、「リガンド」という用語は、カチオン性リポソームに化学的に結合していてもよいし、あるいはカチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に結合/複合体化していてもよい、あらゆる好適なターゲティング部分をいう。本発明の実施における使用のための例示的なリガンドとしては、これらに限定されないが、タンパク質(例えば、トランスフェリン または葉酸)、ペプチド(例えば、L-37pA)、抗体、抗体フラグメント(例えば、Fab' フラグメントおよび一本鎖 Fv フラグメント) および糖類(例えば、ガラクトース)、ならびにその他のターゲティング分子が挙げられる。

10

## 【 0 0 2 0 】

本発明の態様による複合体が簡便かつ効率的な 非化学的結合によって作られる例示的な方法および組成は、2006年9月14日出願の米国公開特許出願番号2003/0044407 および米国特許出願番号11/520,796に開示されている。本発明の態様による複合体が化学的結合を介して作られる例示的な方法および組成は、2001年10月1日出願の米国特許出願番号09/914,046に開示されている。これら特許出願のそれぞれの開示内容はそれらの全体を引用により本明細書に含める。

## 【 0 0 2 1 】

20

例示的な態様において、抗体全体または抗体フラグメントが本発明の複合体の作製のためのリガンドとして使用できる。好適な態様において、抗体フラグメントが用いられ、例えば、抗体のFab フラグメントおよび一本鎖 Fv フラグメント(scFv)が挙げられる。一つの好適な抗体は抗-トランスフェリン 受容体 (抗-TfR) モノクローナル抗体であり、好適な 抗体フラグメントは抗-TfR モノクローナル抗体に基づくscFvである。好適な 抗-TfR モノクローナル抗体は 5E9である (例えば、Hayes, B.F., et al., "Characterization of a Monoclonal Antibody (5E9) that Defines a Human Cell Surface Antigen of Cell Activation," J. Immunol. 127:347-352 (1981); Batra, J.K., et al., "Single-chain Immunotoxins Directed at the Human Transferrin Receptor Containing Pseudomonas Exotoxin A or Diphtheria Toxin: Anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-Anti-TFR(Fv)," Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205 (1991)を参照; これらの開示内容は引用により本明細書に含める)。5E9 抗体に基づくscFvは、この MAbによって認識されるTfRのエピトープに対する完全な抗体 結合部位を一本のおよそ 分子量 26,000のポリペプチド 鎖として含む。scFvは第一の可変領域のC-末端と第二の可変領域のN-末端をVH-ペプチド-VLまたはVL-ペプチド-VHの順で架橋する適宜に設計されたペプチドによりそれぞれ重鎖および軽鎖からの成分である VH およびVL 可変領域を連結することにより形成される。さらなるリガンド、例えば、明細書中に記載のものも、本発明の実施において使用することができる。

30

## 【 0 0 2 2 】

一つの態様において、システイン部分がscFvのC-末端に付加される。理論に拘束される意図はないが、遊離のスルフヒドリル基を提供するシステインは、化学的結合および非化学的結合の両方の態様において抗体とリポソームとの間の複合体の形成を促進しうると考えられる。システインが無くてもあっても、タンパク質は大腸菌内のインクルージョンボディにて発現され得、再フォールディングされて活性形態における抗体フラグメントが生産される。

40

## 【 0 0 2 3 】

複合体の形成において立体的に安定化された免疫リポソームの使用が望ましい場合以外は、例示的な非化学的結合した本発明の複合体の製造における第一工程は、カチオン性リポソームまたはリポソームの組合せを選択された抗体または抗体フラグメントと混合することを含む。多種多様なカチオン性リポソームが本発明の複合体の調製において有用である。公開PCT 出願 WO99/25320は、いくつかのカチオン性リポソームの調製を記載してい

50

る。好適なりポソームの例としては、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS)ならびにジオレオイルトリメチルアンモニウム ホスフェート (DOTAP)およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) および/または コレステロール (chol)の混合物;ジメチルジオクタデシルアンモニウム プロマイド (DDAB)およびDOPE および/または cholの混合物を含むものが挙げられる。脂質の比は、特定の標的細胞のタイプに対する治療用分子の取り込みの効率を最適化させるために変動されうる。リポソームは、1以上の カチオン性脂質と1以上の 中性またはヘルパー脂質との混合物を含みうる。カチオン性脂質の中性またはヘルパー脂質に対する望ましい比は約 1:(0.5-3)、好ましくは 1:(1-2) (モル比)である。

#### 【0024】

好適なりリガンド、例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメントは、標的細胞の表面に結合するものであり、好ましくは、標的細胞上に示差的に発現する受容体に結合するものである。リガンドはカチオン性リポソームまたはポリマーと、室温で、リガンド (例えば、タンパク質):脂質比(重量:重量)が約 1:10 から約 1:50の範囲、好適には 約 1:20 から約 1:40 (w:w)の範囲にて混合される。

#### 【0025】

リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)およびリポソームを室温で短時間、典型的には約 10-15 分間インキュベートし、次いで混合物を選択した治療または診断薬と混合する。リポソーム複合体と複合体化されうる治療用分子または薬剤の例としては、遺伝子、高分子量 DNA (ゲノム DNA)、プラスミド DNA、アンチセンス オリゴヌクレオチド、ペプチド、リボザイム、核酸 (例えば、siRNAおよびアンチセンス)、低分子、ウイルス粒子、免疫調節剤、イメージングのための造影剤、タンパク質および化学薬品が挙げられる。

#### 【0026】

リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)およびリポソームの組合せは、治療薬と約 0.5:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$ の治療薬:nmolの総脂質)、好適には 約 1:10から 1:20 ( $\mu\text{g}$ の治療薬:nmoleの総脂質) の範囲の比にて混合され、室温で短時間、典型的には 約 10から15 分間インキュベートされる。リポソーム複合体のサイズは典型的にはMalvern ZETASIZER (登録商標) 3000または Malvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSを用いて動的光散乱により測定して約 50-500 nmの範囲内である。その開示内容全体を引用により本明細書に含める米国公開特許出願番号2003/0044407および米国特許出願番号11/520,796を参照されたい。

#### 【0027】

本発明の一つの態様において、複合体の形成に用いられるリポソームは立体的に安定化されたリポソームである。立体的に安定化されたリポソームとは、そのなかに親水性 ポリマー、例えば、PEG、ポリ(2-エチルアクリル酸)、またはポリ(n-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM)が統合したりポソームである。かかる改変リポソームは治療薬と複合体化した場合に特に有用であり得る。というのはそれらは典型的には、改変されていない対応するリポソームと同じように迅速には細網内皮系によって血流から排除されないからである。本発明の立体的に安定化されたリポソーム複合体を製造するためには、抗体または抗体フラグメント、リポソームおよび治療または診断薬を混合する順序を上記の順序とは逆のものとする。第一工程において、上記のカチオン性リポソームはまず上記の治療薬と約 0.5:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$  の治療薬:nmol の脂質)、好適には 約 1:10から1:20 ( $\mu\text{g}$  の治療薬:nmoleの脂質) の範囲の比にて混合される。このリポプレックスに、生理的に許容される 緩衝剤中のPEG ポリマー の溶液を約 0.1:100 (nmolのPEG:nmol のリポソーム)、好適には、約 0.5:50、例えば、約 1:40 (nmolのPEG:nmolのリポソーム)の比にて添加する。その結果得られた溶液を、ポリマー がリポソーム複合体に統合するのに十分な時間室温でインキュベートする。リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)を次いで、安定化されたリポソーム複合体 と室温でリガンド (例えば、タンパク質):脂質の比が約 1:5 から約 1:40 (w:w)の範囲にて混合する。

## 【0028】

本発明にしたがって調製されたりポソーム複合体は、医薬上許容される製剤としてインビボ投与のために製剤されうる。複合体は医薬上許容される媒体または担体と混合されてもよい。組成物は、例えば、治療用分子または複合体中のその他のペイロードの投与により利益を被る哺乳類、例えば、ヒト患者への静脈内投与のために製剤されうる。複合体は静脈内投与の後に体中に分布するのに適当なサイズとされる。あるいは、複合体は、その他の投与経路、例えば、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下投与、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介して送達されうる。かかる方法を介する送達のための製剤の調製、およびかかる方法を用いる送達は当該技術分野において周知である。

10

## 【0029】

複合体は、脂質の選択および比、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント) のリポソームとの比、リガンドおよびリポソームの治療薬との比、およびリガンドおよび治療薬の選択を介して標的細胞タイプについて最適化することが出来る。

## 【0030】

本発明の方法にしたがって製造された複合体は、核酸、治療用分子、またはその他のペイロードの複合体による全体的送達における使用のためのキットの形態で提供されうる。好適なキットは、別々に、好適な容器、リポソーム、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)、および核酸、治療または診断薬を含みうる。成分は無菌条件下で適当な順序で混合され得、調製の後、合理的な時間内、一般的には、約 30 分間 から約 24 時間内に患者に投与されうる。キット成分は好ましくは、溶液または乾燥粉末として提供される。溶液形態にて提供される成分は、好ましくは、適当な緩衝剤、浸透圧調節剤等とともに注射用無菌水中に製剤される。完全な複合体はまた乾燥粉末として製剤してもよい (凍結乾燥) (例えば、その開示内容全体を引用により本明細書に含める米国公開特許出願番号2005/0002998を参照されたい)。

20

## 【0031】

その開示内容を引用により本明細書に含める米国公開特許出願番号2003/0044407および米国特許出願番号11/520,796にわたって議論されているように、記載されるカチオン性免疫リポソーム複合体は、抗-トランスフェリン-本鎖抗体フラグメント (TfRscFv) を用いるターゲティングを介して腫瘍細胞に様々な治療および診断薬を送達するのに成功している。具体的には、核酸分子、例えば、アンチセンスおよびsiRNA、ならびにプラスミド DNA (例えば、p53 およびRB94) が、本発明の免疫リポソーム複合体を用いる送達に成功している (米国公開特許出願番号2003/0044407 および米国特許出願番号11/520,796を参照)。低分子も開示されている方法およびリポソームによって送達されている (2007年5月11日出願のその開示内容全体を引用により本明細書に含める米国特許出願番号11/798,296を参照)。全体に渡って議論されているように、このたび、TfRscFvをターゲティング部分として用いることにより、肝臓肝細胞、クッパー細胞、肝臓類洞上皮細胞 (LSEC) および樹状細胞を含むがこれらに限定されない、体中のあらゆる場所における抗原提示細胞 (APC) に標的化され、それら細胞を効率的にトランスフェクトするためのワクチンコンストラクトを調製しうることが発見された。

30

40

## 【0032】

ワクチン接種のためのカチオン性リポソーム複合体

一つの態様において、本発明は、哺乳類 (本明細書において用いる場合、哺乳類、例えば、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ラット、マウス、チンパンジー、サル、類人猿などならびにヒト) におけるウイルス複製一次部位、例えばC型肝炎ウイルス (HCV) による場合は肝臓、具体的には抗原提示細胞 (APC) にて、カチオン性リポソーム複合体を用いてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。一例として、HCVにお

50

いて、T 細胞 応答が感染の際にウイルス複製部位（肝臓）にてより迅速かつより有効であることが判明した。本発明はそれゆえ、HCVから回復した哺乳類において起こるT 細胞 プライミングを模倣する方法を提供し、かかる方法は、組換え プラスミド DNAを送達するカチオン性リポソーム、およびウイルスベクターを用いる(viral-vectored) 免疫を介してインビボで肝臓（例えば、クッパー 細胞、肝臓類洞上皮細胞、樹状細胞および肝細胞）に位置する細胞を標的化する免疫応答(例えば、予防 ワクチン)を誘発することによる。本発明はまた、慢性（および急性）病原体感染の予防および治療のための免疫治療薬として使用するためのワクチンを提供する。様々な リガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を体の正常細胞（即ち、腫瘍ではない細胞）に送達する能力は予期せぬ驚くべき結果である。本発明の例示的な方法は哺乳類(例えば、ヒト)の治療に用いられているが、本発明の方法、リポソーム 製剤および組成物は、鳥類、魚類などを含むその他の動物の治療にも利用可能であることを理解すべきである。

10

#### 【 0 0 3 3 】

本発明のカチオン性免疫リポソーム複合体は好適には、抗-トランスフェリン 受容体一本鎖 抗体 分子 (TfRscFv)をその表面に含む。このターゲティング分子はウイルスタンパク質を発現するカプセル封入/結合された核酸(例えば、プラスミド DNA)の、送達およびAPCによる取り込みを促進することが判明した。例えば、米国公開特許出願番号2003/0044407および米国特許出願番号11/520,796を参照されたい。さらに、本発明は、免疫応答を刺激するために同じ免疫リポソーム複合体中でのインターロイキン (IL) アジュバントを発現する核酸の同時投与を提供する。

20

#### 【 0 0 3 4 】

免疫応答のサイトカイン増強(enhancement)

サイトカインは、活性化刺激に応答して体内の細胞によって放出される小さいタンパク質(~25kDa)である。それらは自然および獲得免疫応答を調節する特定の受容体に結合することによって自己分泌および傍分泌の様式で応答を誘発する。それらは精製タンパク質 (Berzofsky J.A., et al., Immunological Reviews, 170:151-172 (1999))または所望のサイトカイン産物を発現するDNA プラスミド(Toka F.N., et al., Immunological Reviews, 199:100-112 (2004))のいずれかの共投与を介してワクチンの活性を向上させるために広く用いられている。これらアジュバントの遺伝子送達に関するほとんどの研究は投与の筋肉内または皮内 経路に焦点をあてたものであり、静脈内送達は徹底的には評価されていない (Toka参照)。CD4 細胞はそれらのサイトカイン 遺伝子転写および分泌に基づいて2つの主要なタイプに分けられる。Th1 細胞はそのIL-2 およびガンマインターフェロン (IFN- $\gamma$ )の分泌によって特徴づけられるが、Th2 細胞はIL-4、IL-5、およびIL-10を産生する。アジュバントはTh1 またはTh2 方向のいずれかに向けられたT-細胞 応答を誘発し得、それはワクチンの結果に顕著な影響を有しうる。免疫を向上させ、有効な Th1-型応答を刺激するために、IL-2、IL-12またはIL-15を発現する核酸、例えば、プラスミドが好適には記載されるカチオン性リポソームに結合(associated)/カプセル封入される。

30

#### 【 0 0 3 5 】

IL-2: IL-2 (15.5-kDa 糖タンパク質)の大部分はCD4 Th1 型細胞によって産生され、その主要な作用は、ヘルパーおよび細胞傷害性 T 細胞 (CTL)増殖、ナチュラルキラー (NK) 細胞、リンホカイン活性化キラー 細胞、単球、およびマクロファージを刺激することである。IL-2は抗原特異的 免疫応答の開始および維持において重要な役割を果たすことが知られており、いくつかのDNA ワクチンによって誘発される免疫応答を増強することが示された。その機構は、DCにおけるCD48および CD80の発現の上方制御ならびにそれらそれぞれのリガンド、CD8+ T 細胞上のCD2およびCD28 の上方制御であるようである(Toka参照)。

40

#### 【 0 0 3 6 】

IL-12: ヒト IL-12は、2つのサブユニットであるp35およびp40から構成されるヘテロダイマーである。それは病原体 感染に反応して貪食細胞およびDCによって産生される炎症誘発性 サイトカインであり、IFN- $\gamma$  産生を誘発する。このサイトカインはTh2 細胞よ

50

りもTh1の分化を好み、自然耐性と獲得免疫とを結びつける。DNAに基づくHCV ワクチンにより免疫されたマウスにおいて、IL-12 DNA の送達はCTL 応答およびコア-rVVのクリアランスを向上させた。

【 0 0 3 7 】

IL-15: IL-15は、多面的かつ多機能的に作用する14kDa 糖タンパク質である。それは多種多様な 細胞、例えば、単球、マクロファージ、DC、クッパー 細胞、肝細胞および内皮細胞によって発現される。それは同じ受容体成分を用いる 2つのサイトカインとしてIL-2と共通して多くの生物活性を有する。IL-15は NK 細胞およびCTLの細胞溶解 活性を増強し得、NKおよびT 細胞からのIFN- 産生を誘発しうる。さらにそれはCD8+ メモリー およびエフェクター T 細胞の増殖を誘発し、そのためそれは抗ウイルス CD8+ メモリー T 細胞 応答を誘発する場合にアジュバントとして含めるための魅力的な候補である。

10

【 0 0 3 8 】

例示的な態様において、カチオン性リポソームはHK ペプチドを有するかまたは有さない、一本鎖 トランスフェリン 受容体 抗体 (scL または scLHK)およびHCVゲノムのNS3、NS4A、NS4B、NS5A および NS5B (NS3-NS5B) 部分を発現する 1 以上の プラスミドを含む(scL-HCVまたはscLHK-HCV)。しかし、記載されるように、いずれのウイルスタンパク質を発現するいずれの核酸分子も本発明のリポソームにカプセル封入/結合(associated with)されうることに注目すべきである。

【 0 0 3 9 】

ワクチン接種され、組換え アデノウイルスにより追加免疫された未処理( naive)チンパンジーにおける結果は、アジュバントとしてIL-12を発現するプラスミド DNAを含む全身的 scL-HCV アプローチは、HCV-特異的免疫応答を引き起こしうることを示す。HCV 複製は攻撃の後に劇的に抑制され、それにはHCV-特異的 T 細胞応答が伴った。HCV NS3 タンパク質を発現する組換え ワクシニア ウイルスによる接種後のT 細胞 応答「攻撃」を評価するマウス 細胞性免疫実験においてもscL-HCV/IL 群におけるウイルス複製の阻害が示され、これらの結果は、ウイルス抗原に対する免疫応答を誘発するための予防 ワクチン接種についてのこのアプローチの使用を支持する。

20

【 0 0 4 0 】

例示的な態様において、本発明は、リガンド-標的化 (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント-標的化) カチオン性リポソーム複合体を調製する方法を提供する。好適な態様において、かかる方法は、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)を調製する工程、および、リガンドとカチオン性リポソームとを混合してリガンド-標的化カチオン性リポソームを形成させる工程を含み、ここでリガンドは、カチオン性リポソームに化学的に結合していないがカチオン性リポソームに直接的に結合/複合体化している。リガンド-標的化カチオン性リポソームは次いで 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子と混合され、リガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体が形成される。別の例示的な態様において、本発明は、リガンド-標的化 (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント-標的化) カチオン性リポソーム複合体を調製する方法を提供する。好適な態様において、かかる方法は、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)を調製する工程、および、リガンドとカチオン性リポソームとを混合してリガンド-標的化カチオン性リポソームを形成させる工程を含み、ここでリガンドは、化学的結合を介してカチオン性リポソームと直接的に複合体化される。リガンド-標的化カチオン性リポソームは次いで、 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および/または 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子と混合され、リガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体が形成される。

30

40

【 0 0 4 1 】

本明細書において記載されるように、核酸分子は好適には、 1 以上の核酸分子とリポソームとを処理の間に単に混合することによって、本発明のリポソーム複合体にカプセル封

50

入、含有または複合体化/結合(associated with)される。核酸分子:リボソーム複合体の好適な比は、当業者に容易に決定される。例示的な態様において、核酸は、約 1 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 1 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比にて存在する。例えば、1 以上のウイルスタンパク質をコードする核酸分子は 1 以上の インターロイキンをコードする核酸分子と約 0.1:10 から約 10:0.1、好適には 約 0.5:1 から約 2:1、より好適には 約 1:1 の範囲のモル比にて、例えば、リボソームとの複合体形成の前に一緒に混合され、核酸 溶液が形成されるが、これら範囲外のさらなるモル比を用いることも可能である。別の態様において、核酸分子はリボソームに対して別々に(即ち、異なる溶液中で)複合体化されうるが、依然として所望のモル比を維持している。

10

#### 【0042】

好適には、核酸分子対リボソーム複合体のモル比は約 0.5:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)、好適には 約 1:5 から約 1:20 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)、より好適には 約 1:10 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  リボソーム)の範囲内である。本明細書において用いる場合、核酸分子対リボソーム複合体のモル比には、核酸の両方の「集団」が含まれ、即ち、核酸の総量には 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子が含まれる。

#### 【0043】

明細書中に記載されるように、核酸分子の送達のために望ましい カチオン性リボソームの例としては、ジオレオイルトリメチルアンモニウム ホスフェート (DOTAP)とジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) および/または コレステロール (chol) との混合物;およびジメチルジオクタデシルアンモニウム プロマイド (DDAB)とDOPE および/または cholとの混合物を含むものが挙げられる。脂質の比は、特定の標的細胞タイプに対する核酸分子の取り込み効率を最適化するために変動されうる。リボソームは、1 以上の カチオン性脂質と 1 以上の 中性またはヘルパー脂質との混合物を含みうる。カチオン性 脂質対中性またはヘルパー脂質の望ましい比は、約 1:(0.5-3)、好ましくは 約 1:(1-2) (モル比)である。本発明の実施に有用な様々な 脂質の例示的な比としては、これらに限定されないが以下が挙げられる:

20

#### 【表 1】

LipA	DOTAP/DOPE	1:1 モル比
LipB	DDAB/DOPE	1:1 モル比
LipC	DDAB/DOPE	1:2 モル比
LipD	DOTAP/Chol	1:1 モル比
LipE	DDAB/Chol	1:1 モル比
LipG	DOTAP/DOPE/Chol	2:1:1 モル比
LipH	DDAB/DOPE/Chol	2:1:1 モル比

30

(DOTAP = ジオレオイルトリメチルアンモニウム(aminnonium)ホスフェート、DDAB = ジメチルジオクタデシルアンモニウム プロマイド; DOPE = ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン; chol = コレステロール)。

40

#### 【0044】

本明細書において議論されるように、好適な態様において、本発明の組成物および方法において有用なリガンドは、抗体フラグメント、例えば、一本鎖 Fv フラグメント、例えば、抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv)である。好適には、抗体または抗体フラグメントはカチオン性リボソームと約 1:1 から約 1:100、好適には 約 1:10 から約 1:50 (w:w)、より好適には 約 1:30、または約 1:33 (抗体または抗体フラグメント:脂質) の範囲の比にて混合され、標的化 カチオン性免疫リボソームが形成される。さらなる態様において、リボソームはまた、エンドソーム破壊(endosomal disrupting)ペプチド、例えば、Sigma-Genosys (The Woodlands, TX)により製造されているK[K(H)KKK]<sub>5</sub>-K(H)KKC (HoKC) (HK) (配列番号1) ペプチドをリボソームと結合(associate)して含んでいて

50

もよい。エンドソーム破壊 ペプチド HoKCは、細胞の細胞質における薬剤の放出を助ける。

【0045】

例示的な態様において、カチオン性 リポソーム 製剤A (1:1 モル比のDOTAP:DOPE)、B (1:1のDDAB:DOPE)、G (1:1:1のDOTAP:DOPE: コレステロール)および H (1:1:1のDDAB:DOPE: コレステロール) または本明細書において記載されるいずれかの脂質 製剤は本明細書において記載されるようにエタノール 注射 方法を用いて調製される。各リポソーム 製剤はまた好適には総脂質の5 モルパーセントにてMPB-DOPEを含む。HoKC ペプチド (K[K(H)K KK]<sub>5</sub>-K(H)KKC) は末端システインを担持しているので、MPB-DOPE をすべてのリポソーム 組成物に含めてペプチドのリポソームへの結合を可能とした。Lip-HoKC リポソームは、マレイミド基を担持する カチオン性リポソーム(Lip-MPB)とペプチドとの間のカップリング反応を用いて調製した。システイン上に遊離 チオール基を有するペプチドの0.1 mmolのアリコートに10 mM HEPES、pH 7.4中の2 mmolの Lip-MPB溶液に添加し、室温で2時間回転させた(20-30 r.p.m.)。結果として得られたLip-HoKCの脂質濃度は1.4 mMである。

10

【0046】

完全な複合体は、HoKC を含まないTfRscFv:Lip:DNA 複合体の生産に用いられたものと同じようにして形成される。この場合でも、抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 抗体フラグメント (TfRscFv) が特定の比にて穏やかに反転させることによりLip-HoKCと混合され、室温で10分間インキュベートされる。DNAが次いで TfRscFv:Lip-HoKC 溶液に添加され、穏やかに反転させることにより混合され、さらに室温で15分間インキュベートされ、その後、デキストロースまたはスクロースが5-10% の終濃度 となるように添加され、さらに穏やかに反転させることにより混合される。TfRscFv:Lip-HoKC:DNA 複合体についての好適な比は0.3 mg:7 nmol:1 mgである。

20

【0047】

さらなる態様において、本発明の方法は、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)を調製する工程、および、リガンドをカチオン性リポソームの表面に化学的に結合させてカチオン性免疫リポソームを形成させる工程を含む。カチオン性リポソームは次いで、1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、および1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子と混合されて、リガンド-標的化 リポソーム複合体が形成される。リガンド(例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)をカチオン性リポソームに化学的に結合させるための例示的な方法、組成、比および条件は、その開示内容全体を引用により本明細書に含める2001年10月1日出願の米国特許出願番号09/914,046に開示されている。

30

【0048】

本発明の実施における使用のための例示的な核酸分子としてはDNA および RNAが含まれ、プラスミドおよびベクターが挙げられる。1以上のウイルスタンパク質をコードする核酸分子はいずれのウイルスタンパク質をコードするものであってもよい。本明細書において用いる場合、「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は互換的に用いられ、2以上のアミノ酸のあらゆる鎖または鎖群を意味し、産物の特定の長さを言及するものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸 鎖」または2以上のアミノ酸の鎖または鎖群をいうために用いられるあらゆるその他の用語は、「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語の定義に含まれる。

40

【0049】

本発明を用いて送達される核酸によってコードされうるウイルスペプチド/タンパク質の例としては、ウイルス性病原体 (例えば、インフルエンザ、HIV、エボラ、ポックスウイルス(天然痘)、西ナイル ウイルス、SARS、等)等が挙げられる。本発明において用いられる核酸によってコードされうるウイルスタンパク質のさらなる例としては、これらに限定されないが、アデノウイルス ポリペプチド、アルファウイルス ポリペプチド、カリシウイルス ポリペプチド、例えば、カリシウイルス カプシド 抗原、コロナウイルス ポリ

50



ペプチド、ジステンパー ウイルス ポリペプチド、エボラ ウイルス ポリペプチド、エンテロウイルス ポリペプチド、フラビウイルス ポリペプチド、例えば、西ナイル ウイルス E-糖タンパク質、肝炎 ウイルス (AE) ポリペプチド、例えば、A型肝炎、B型肝炎 および/または C型肝炎、ヘルペスウイルス ポリペプチド、例えば、単純ヘルペス ウイルスまたは水痘帯状疱疹 ウイルス 糖タンパク質、免疫不全 ウイルス ポリペプチド、例えば、ヒト 免疫不全 ウイルス エンベロープまたはプロテアーゼ、伝染性腹膜炎 ウイルス ポリペプチド、インフルエンザウイルス ポリペプチド、例えば、インフルエンザ A ポリペプチド、例えば、赤血球凝集素 または細胞外 M2 タンパク質 (M2e)、ノイラミニダーゼ、または核タンパク質、白血病 ウイルス ポリペプチド、マールブルグ ウイルス ポリペプチド、オルトミクソウイルス ポリペプチド、パピローマ ウイルス ポリペプチド、ラッサ熱 ポリペプチド、パラインフルエンザウイルス ポリペプチド、例えば、赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ、パラミクソウイルス ポリペプチド、バルボウイルス ポリペプチド、ペスチウイルス ポリペプチド、ピコルナ ウイルス ポリペプチド、例えば、ポリオウイルス カプシド ポリペプチド、ポックス ウイルス ポリペプチド、例えば、ワクシニア ウイルス ポリペプチド (例えば、天然痘)、狂犬病 ウイルス ポリペプチド、例えば、狂犬病 ウイルス 糖タンパク質 G、レオウイルス ポリペプチド、レトロウイルス ポリペプチド、およびロタウイルス ポリペプチドが挙げられる。かかるウイルスタンパク質をコードする核酸分子は当該技術分野において入手可能であり、かかる核酸分子を含むベクターおよびプラスミドが挙げられる。例えば、公共データベース、例えば、GENBANK (登録商標) は、本発明の実施に使用できる核酸分子の様々な例を含んでいる。

#### 【0050】

1 以上の インターロイキンをコードする核酸分子も当該技術分野において周知であり、公共データベース、例えば、GENBANK (登録商標) から容易に入手可能である。本発明の実施に有用な核酸分子によってコードされうる例示的なインターロイキンとしては、これらに限定されないが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18およびIL-23が挙げられる。好適な態様において、核酸は IL-2、IL-12またはIL-15をコードする。

#### 【0051】

本発明はまた、本明細書において記載される方法にしたがって調製されるカチオン性免疫リポソーム複合体を提供する。例えば、本発明は、カチオン性リポソーム、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)、1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、および 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子を含むリガンド-標的化 (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント-標的化) カチオン性リポソーム複合体を提供し、ここでリガンドは、カチオン性リポソームに化学的に結合してはいないが、カチオン性リポソームに直接的に複合体化/結合(associated with)している。リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)は好適には、リガンドとリポソームとの間の相互作用 (例えば、静電的、ファンデルワールス、またはその他の非化学的結合による相互作用)を介してリポソームに結合(associated with) している。一般的に、リンカーまたはスペーサー分子 (例えば、ポリマーまたはその他の分子)は、非化学的結合している場合のリガンドとリポソームとの結合には用いられない。

#### 【0052】

本明細書において記載されるように、さらなる態様において、リガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)は、例えば、マレイミジル基またはその他のスルフヒドリル反応基を含むカチオン性リポソーム、およびリガンド (例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント)上の硫黄原子との間の化学的 相互作用を介してカチオン性リポソームに化学的に結合している。核酸は次いでリポソームに添加されてリポソーム-DNA 複合体が形成されるか、または核酸が最初に添加され、次いでリガンドと複合体化されてもよい。かかる方法はその開示内容全体を引用により本明細書に含める2001年10月1日出願の米国特許出願番号09/914,046に開示されている。

## 【 0 0 5 3 】

核酸を含むトランスフェリン (Tf)-結合(conjugated)リポソーム(Tf-Lip-DNA)は、以前に記載された処方にしたがって調製される(その開示内容全体を引用により本明細書に含める、Xu, et al., "Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts," Hum Gene Ther. 10(18):2941-2952. (1999))。放射線照射と組合せたトランスフェリン-リポソーム-媒介全身的 p53 遺伝子治療の結果、ヒト 頭頸部癌異種移植片の退縮が起こる。簡単に説明すると、好適な 調製のために、25 mlのTf (5 mg/ml、鉄飽和 ホロ-トランスフェリン; Sigma, St. Louis, MO)および50 mlのLip (2 mM 総脂質) + 75 mlの水をポリプロピレン チューブ中で混合し、5-15 分間 室温で頻繁に揺り動かしながらインキュベートする。120 mlの20 mM HEPES 緩衝剤、pH 7.4中の10 µgのプラスミド DNAをチューブに添加し、すぐに徹底的に混合し、20 分間 室温で 頻繁に揺り動かしながらインキュベートした。30 µlの50% デキストロース 溶液を次いでチューブに添加する。最終的なDNA:脂質:Tf 比は約 1:10:12.5 (mg/nmol/mg)である。さらなる態様において、HEPES 緩衝剤は水で置換してもよい。

10

## 【 0 0 5 4 】

核酸分子はカチオン性リポソーム内にカプセル封入されてもよく、カチオン性リポソームの炭化水素 鎖 領域に含まれてもよく、カチオン性リポソームの内側または外側 単層 (例えば、頭部領域) に結合していてもよく(associated with)、またはそれらのいずれかの組合せであってもよい。好適には、本発明のカチオン性免疫リポソームは単層 リポソーム(即ち、一つの二重層)であるが、いくつかの同心円状の二重層を含む多重膜 リポソームも用いることが出来る。本発明の一つの二重層のカチオン性リポソームは、核酸分子が中にカプセル封入されうる内部水性体積を含む。それらはまた、その中に中性またはほとんど無電荷に調整された核酸分子が含まれうる炭化水素 鎖 領域 (即ち、脂質の脂質鎖領域)を有する一つの二重層も含む。さらに、核酸分子は、例えば、負に荷電している核酸分子と正に荷電している カチオン性リポソームとの間の電荷-電荷 相互作用を介してリポソーム 膜の内側単層 および/または外側単層(即ち、脂質の頭部領域)のいずれかまたは両方と複合体化または結合しうる(associated with)。さらなる態様において、核酸分子は、本発明のカチオン性リポソーム複合体のこれらの領域のいずれかまたはすべての中にカプセル封入/結合/複合体化されうる。

20

30

## 【 0 0 5 5 】

本明細書において議論されるように、好適には、核酸分子は、約 0.1 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 10 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子;から 10 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 0.1 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、のモル比にて存在し;特に、約 1 モルの 1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、対、約 1 モルの 1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子をリポソーム複合体において用いることが出来る。脂質、ターゲティングリガンドおよび核酸分子の好適な量/比もまた本明細書において記載される。例示的な態様において、1 以上のウイルスタンパク質をコードする 1 以上の核酸分子、1 以上のインターロイキンをコードする 1 以上の核酸分子、およびリポソームは、約 0.5:1 から約 1:40 (µg 全核酸:µg 脂質)、好適には 約 1:5 から約 1:20 (µg 全核酸:µg 脂質)、例えば、約 1:10 (µg 全核酸:µg 脂質) の重量比にて存在する。本発明の例示的な リポソーム 組成物は、全核酸、脂質およびリガンド、例えば、一本鎖 抗体 (例えば、TfscFv)を、約 1:10:0.33 (µg 全核酸:µg 脂質:µg 一本鎖 抗体)の重量比にて含む。

40

## 【 0 0 5 6 】

本発明のカチオン性リポソームにおいて用いられる核酸分子によってコードされうる例示的な ウイルスタンパク質としては、本明細書において記載されるものが含まれ、例えば、HIV ウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、SARS ウイルスタン

50

パク質、A、B および/または C型肝炎ウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質および天然痘 ウイルスタンパク質その他が挙げられる。本発明のカチオン性リポソームにおいて用いられる核酸分子によってコードされうる例示的な インターロイキンとしては、本明細書において記載されるものが含まれ、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18およびIL-23が挙げられ、好適には、IL-2、IL-12およびIL-15である。

【0057】

例示的な態様において、本発明の実施における使用のためのウイルスタンパク質および/またはインターロイキンをコードする核酸は、核酸 プロモーター、例えば、米国公開特許出願番号2007/0065432に記載のプロモーターの下流に配置される。

10

【0058】

本発明はまた、本明細書において記載されるリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含む医薬組成物を提供する。好適な態様において、医薬組成物はさらに、1以上の抗菌薬（例えば、アンホテリシン B、クロルテトラサイクリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン）、1以上の保存料（例えば、塩化ベンゼトニウム、EDTA、ホルムアルデヒド、2-フェノキシエタノール）、1以上の緩衝剤（例えば、リン酸緩衝剤、ホウ酸ナトリウム、塩化ナトリウム）、1以上の界面活性剤（ポリソルベート 20、80）、1以上のタンパク質安定化剤（例えば、アルブミン、ラクトース、グルタミン酸カリウム）、糖類、例えば、スクロースまたはデキストロース、およびアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）からなる群から選択される1以上の賦形剤を含む。さらなる賦形剤は当該技術分野において周知であり、本発明の実施において容易に利用できる。

20

【0059】

本発明はまた、カチオン性リポソーム、リガンド（例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント）、および1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む第一のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含む医薬組成物を提供し、ここでリガンドは、カチオン性リポソームに化学的に結合してはいないがカチオン性リポソームと直接的に複合体化/結合している。さらなる態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合したものであってもよい。医薬組成物はまた好適には、カチオン性リポソーム、リガンド（例えば、タンパク質/ペプチド、抗体または抗体フラグメント）、および1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子を含む第二のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含み、ここで、リガンドは、カチオン性リポソームに化学的に結合してはいないがカチオン性リポソームと直接的に複合体化/結合している。さらなる態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合したものであってもよい。

30

【0060】

特定のかかる態様において、1以上のウイルスタンパク質をコードする核酸分子は1以上の インターロイキンをコードする核酸と同じ組成物中にて送達されるが、同じカチオン性リポソームにカプセル封入/結合(associated with)されるよりはむしろ、それらは2種の(またはそれより多い)異なるカチオン性リポソームと結合され(associated with)、その後、同じ組成物中にて送達される(即ち、2種類のリポソーム 集団が混合されて一緒になる)。別の態様において 1以上のウイルスタンパク質をコードする核酸分子および1以上の インターロイキンをコードする核酸分子は同じプラスミド ベクターに含まれていてもよい。本発明はまた、哺乳類に2つの別々の免疫リポソーム 組成物を投与することも包含し、一方はウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、他方はインターロイキンをコードする核酸を含む。本発明の医薬組成物に使用するための好適な脂質、ターゲティング分子および核酸分子の例ならびに、かかる成分の比は本明細書において記載される。

40

【0061】

本発明はまた、1以上の 活性薬剤を哺乳類の抗原提示細胞(APC)に送達する方法を提供する。好適な態様において、かかる方法は、カチオン性リポソーム、TfRscFv、および1

50

以上の 活性薬剤を含む抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv)-標的化 カチオン性免疫リポソーム複合体を哺乳類に投与することを含み、ここで、TfRscFvはカチオン性リポソームに化学的に結合してはいないがカチオン性リポソームと直接的に複合体化/結合している。さらなる態様において、TfRscFvはカチオン性リポソームに化学的に結合している。本発明のかかる方法は、体のあらゆる臓器または組織、例えば、肝臓、リンパ節、腸および/または呼吸器におけるAPCに薬剤を送達するために用いることが出来る。好適には、APCは、例えば、プロフェッショナル、または非プロフェッショナル APCであり得る。「プロフェッショナル APC」とは、その表面上にMHC クラス II 分子を発現するものをいう。

#### 【 0 0 6 2 】

好適な態様において、送達される薬剤は核酸分子であるが、その他の薬剤、例えば、化学薬品、例えば、低分子、ならびにペプチドおよびタンパク質も送達され得る。薬剤は、プロフェッショナルならびに非プロフェッショナル APC、例えば、肝臓、脾臓、リンパ節、腸および/または呼吸器に位置するAPCへと送達されうる。例示的な態様において、送達される薬剤は、1以上のウイルスタンパク質(例えば、HIV ウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、SARS ウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質または天然痘 ウイルスタンパク質) および/または 1以上の インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18またはIL-23)をコードする。

#### 【 0 0 6 3 】

さらなる態様において、本発明は、リガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を哺乳類に投与することを含む、哺乳類においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。好適な態様において、カチオン性リポソーム複合体は以下を含む：カチオン性リポソーム；カチオン性リポソームに化学的に結合してはいないがカチオン性リポソームと直接的に複合体化/結合したリガンド；カチオン性リポソームと結合した(associated with) 1以上のウイルスタンパク質をコードする 1以上の核酸分子；およびカチオン性リポソームと結合した(associated with) 1以上のインターロイキンをコードする 1以上の核酸分子。さらなる態様において、リガンドは、例えば、リガンド上(例えば、抗体または抗体フラグメント上)の硫黄含有基とリポソーム上の基、例えば、マレイミド基との間の化学的結合を介してカチオン性リポソームに化学的に結合している。例示的な リガンドが本明細書において記載され、例えば、これらに限定されないが、ガラクトース、L-37 pA、抗体および抗体フラグメント (例えば、scFv 抗体フラグメント、例えば、抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv))が挙げられる。

#### 【 0 0 6 4 】

本明細書において用いる場合、「ウイルス抗原に対する免疫応答の誘発」とは、哺乳類(例えば、いずれかの哺乳類、例えば、ヒト)の免疫系がウイルス抗原を同定し、それを除くため、あるいはウイルス抗原の存在に対して応答するようにトリガーされるプロセスをいう。抗原にはそれに対する抗体の産生が引き起こされるあらゆるウイルス性物質が含まれる。特定のウイルス抗原または抗原の群に対する免疫応答を誘発することにより、哺乳類はワクチン接種されることになり、抗原にさらに曝されると、結果として応答/抗原の排除が起こる。

#### 【 0 0 6 5 】

免疫応答が引き起こされうるウイルス抗原の例としては、当該技術分野において知られているあらゆるウイルス抗原が含まれ、本明細書において記載されるものが挙げられ、例えば、肝炎 (A、BまたはC型) ウイルス、インフルエンザウイルス、HIV ウイルス、エボラ ウイルス、SARS ウイルス、鳥インフルエンザウイルス、天然痘 ウイルス等と関連する抗原が挙げられる。カチオン性リポソームがAPCを標的化する能力により、免疫応答のプライミングに関与する細胞への直接的かつ効率的な核酸分子の送達が可能となり、それにより、哺乳類におけるウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する非常に有効かつ強力な方法が提供される。

10

20

30

40

50

## 【0066】

本発明の治療方法に用いられる核酸分子によって発現されうる好適な ウイルスタンパク質は本明細書において記載され、例えば、これらに限定されないが、HIV ウイルスタンパク質、エボラウイルスタンパク質、インフルエンザウイルスタンパク質、SARS ウイルスタンパク質、鳥インフルエンザウイルスタンパク質および天然痘 ウイルスタンパク質が挙げられる。核酸分子によってコードされうる例示的な インターロイキンとしては本明細書において記載されるものが含まれ、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18およびIL-23が挙げられる。例示的な態様において、本発明の様々な 方法において送達されるリガンド-標的化カチオン性リポソームは、カチオン性リポソームと結合して(associated with)  $K[K(H)KKK]_5$ -K(H)KKC (HoKC) (配列番号1) ペプチドを含むペプチドをさらに含む。

10

## 【0067】

さらなる態様において、本発明は、哺乳類におけるウイルス性疾患を治療または予防する方法を提供する。好適には、方法は哺乳類にカチオン性リポソーム複合体を投与することを含み、ここでカチオン性リポソーム複合体 は以下を含む：カチオン性リポソーム；カチオン性リポソームに化学的に結合していないが直接的に複合体化したりガンド；カチオン性リポソームと結合した(associated with) 1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子；およびカチオン性リポソームと結合した(associated with) 1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子。投与方法としては、これらに限定されないが、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的(percutaneous)、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (transdermal) (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与、または浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介するものが挙げられる。それらはボーラスとしてまたは注入として投与されうる。さらなる態様において、リガンドは、本明細書に記載する様々な 方法またはその他の当該技術分野において公知の方法を用いてカチオン性リポソームに化学的に結合していてもよい。

20

## 【0068】

本発明の方法を用いて治療または予防されうるウイルス性疾患の例としては、当該技術分野において公知のあらゆるウイルス性疾患が含まれ、例えば限定されないが、本明細書において記載されるもの、例えば、 肝炎 (A、B またはC型)、インフルエンザ、HIV、エボラ、SARS、鳥インフルエンザ、天然痘等が挙げられる。したがって哺乳類においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発することに加えて、本発明はまた、哺乳類におけるウイルス性疾患を治療または予防する方法も提供する。これには最近(例えば、 約 1年未満内、好適には、約 6ヶ月未満内または約 1ヶ月未満内)に感染した哺乳類ならびに慢性感染を患う哺乳類 (例えば、例えば1年以上感染している哺乳類)が含まれる。

30

## 【0069】

本発明の治療または予防の方法における使用のための例示的な リガンドは本明細書において記載され、例えば、様々な ペプチドおよびタンパク質、例えば、 トランスフェリン、ガラクトース、L-37pA、抗体および抗体フラグメント (例えば、一本鎖 Fv 抗体フラグメント、例えば、 抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 Fv (TfRscFv))が挙げられる。本発明の治療および予防の様々な 方法を用いて送達される核酸分子によってコードされうる例示的な ウイルスタンパク質およびインターロイキンは本明細書において記載されている。例示的な態様において、本発明の様々な 治療および予防 方法において送達されるリガンド-標的化カチオン性リポソームはさらに、カチオン性リポソームに結合した (associated with)  $K[K(H)KKK]_5$ -K(H)KKC (HoKC) (配列番号1) ペプチドを含むペプチドを含む。

40

## 【0070】

本発明はまた、本明細書において記載される様々な 方法によって調製されるリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を哺乳類に投与することを含む、哺乳類におけるウイルス抗原 に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。さらに、哺乳類におけるウイル

50

ス性疾患を治療または予防する方法は、哺乳類に本発明の様々な方法/プロセスによって調製されるリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を投与することを含む。かかる方法における使用のための 好適な リガンド、リポソームおよび核酸は本明細書において記載されている。

【 0 0 7 1 】

免疫応答の誘発およびウイルス性疾患の治療または予防ならびにAPCへの送達を含む本発明の様々な 治療/予防 方法において、様々な 本発明のリポソーム複合体をいずれかの所望の経路を介して投与することが出来る。例示的な 送達 経路としては、これらに限定されないが、静脈内、経口、局所、吸入を介するもの、筋肉内 注射、腫瘍内 注射、皮内注射、経皮 注射、皮下 注射、腹腔内 注射、鼻腔内 注射、眼内 注射または点眼剤、頭蓋内 注射、臓器内 投与（例えば、肝臓内）またはその他の経路、例えば、徐放インプラントまたは浸透圧または機械的ポンプを介するものが挙げられる。それらはボーラスとしてまたは注入として投与されうる。

10

【 0 0 7 2 】

本発明はまた、様々な本発明のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、1以上の 賦形剤、例えば、1以上の 抗薬、1以上の 保存料、1以上の 緩衝剤および/または 1以上の 界面活性剤をさらに含んでいてもよい。

【 0 0 7 3 】

さらなる態様において、本発明はまた、2以上の リガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含む医薬組成物を提供する。例えば、組成物は、カチオン性リポソーム、リガンド、および1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む第一のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含みうる。好適な態様において、リガンド はカチオン性リポソームに化学的に結合していないがカチオン性リポソームと直接的に複合体化している。別の態様において、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合している。

20

【 0 0 7 4 】

組成物はさらに以下を含む第二のリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を含みうる：カチオン性リポソーム、リガンド、および1以上のインターロイキンにコードする1以上の核酸分子。好適には、リガンドは該カチオン性リポソームに化学的に結合していないが該カチオン性リポソームと直接的に複合体化しており、別の態様においては、リガンドはカチオン性リポソームに化学的に結合している。

30

【 0 0 7 5 】

以下に示す実施例は、C型肝炎 ウイルス (HCV) タンパク質の送達のための免疫リポソーム複合体の生産、および予防 ワクチン接種/ HCV に感染した哺乳類の治療について記載するが、あらゆるウイルスタンパク質をコードする核酸分子 が本発明の様々な 方法において利用でき、本明細書において記載される免疫リポソーム複合体中に結合/カプセル封入されうることを理解すべきである。核酸分子によってコードされる最終的なウイルスタンパク質は本発明の免疫リポソーム複合体の形成能力に影響を有さない。単に核酸分子の負の荷電が、核酸分子がカチオン性免疫リポソームと結合する/カチオン性免疫リポソームにカプセル封入されることを可能にするようである。それゆえ、本発明は、HCV タンパク質の送達に限定されず、あらゆるウイルスタンパク質 および/またはあらゆるインターロイキンをコードするあらゆる核酸（例えば、プラスミド、ベクター）の送達を包含する。

40

【 0 0 7 6 】

さらに、異なるウイルスタンパク質をコードする数種類の核酸が免疫リポソーム複合体にカプセル封入/結合し得、したがって、本発明は一つのリポソーム系により、あるいは複数の異なるリポソーム複合体により、多種多様なウイルス 感染についてワクチン接種/治療するための複合体および方法を提供する。

【 0 0 7 7 】

50

関連技術分野の当業者には、本明細書に記載する方法および用途に対するその他の好適な改変および適用が、本発明の範囲またはそのいずれかの態様から逸脱することなくなされうることが明らかであろう。本発明を詳細に説明してきたが、本発明を限定する意図はなく、例示の目的のみで本明細書に含める以下の実施例を参照することにより同じことはより明確に理解されよう。

#### 【実施例】

#### 【0078】

##### 実施例 1

カチオン性リポソームに基づく C型肝炎 ウイルス (HCV) ワクチン接種および治療システムの調製および使用

HCV 再感染からの保護は、チンパンジーにおいて自然の感染によっては誘発されないという以前の教義(Farci P., et al., Science 258: 140 (1992); Prince A.M., et al., J. Infect. Dis., 165: 438-443 (1992))に反して、回復したヒトおよびチンパンジーにおいては、再感染は起こるもののメモリー免疫応答が存在し、それが再感染の際にウイルス複製の即時の制御および迅速なクリアランスを導くということがこのたび明らかとなった。HCVからの自然な回復の後、休止した HCV-特異的メモリー T 細胞が数十年間にわたり末梢血において検出することが出来、多くの場合、検出可能な HCV-抗体の非存在下で検出できる(Takaki A., et al., Nat. Med., 6:578-582 (2000))。HCV-特異的細胞免疫応答は、回復したチンパンジーにおいて実証されるように肝臓においても存続し、再感染の際の防御免疫を媒介する(例えば、Bassett S.E., et al., Hepatology, 33:479-1487 (2001) を参照)。二次感染の持続時間は短く、初期感染と比較して血液および肝臓におけるウイルスタイターは低下しており、アラニン アミノトランスフェラーゼ レベル(ALT)によって示されるように肝臓の炎症も低下している(Bassett et al.)。ヒトにおいても以前の曝露の後に類似のメモリー応答が存在し、HCV 感染を迅速に制御し、排除することができるということが患者の研究から示されている(Mehta S.H., et al., Lancet, 359:1478-1483 (2002))。明細書中に記載されるように、本発明は、APC、例えば限定されないが肝臓におけるAPCに効率的に送達される、HCV の非構造タンパク質に注目した、予防と治療の両方のためのT細胞に基づく ワクチンを提供する。肝臓はHCV 複製の一次部位であり、したがって、肝臓における免疫応答の誘発は、自然の感染の際に誘発される免疫応答を模倣し、攻撃の際に保護またはウイルスの迅速なクリアランスを導く。

#### 【0079】

C型肝炎 ウイルス (HCV) は、一本鎖のプラス鎖 RNA ゲノムを有するエンベロープを持ったウイルスである。そのRNAの長さは ~9.6 kbであり、~341-塩基の5' 非翻訳領域 (NTR)、すべてのウイルス-特異的タンパク質(~3011 アミノ酸)をコードする長いオープンリーディングフレーム、および3' NTRからなる。ゲノム RNAの翻訳はキャップ非依存的であり、配列内リポソーム進入部位として機能する5'NTRによって媒介される。その結果得られるポリタンパク質は、2つの宿主プロテアーゼおよび2つのウイルスプロテアーゼによって翻訳中および翻訳後の両方に切断されて、以下の産物を生じる: NH2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH。構造タンパク質(C、E1、およびE2)は N-末端に位置する; 非構造 (NS) 成分は残りの部分によってコードされる(総説としてその開示内容全体を引用により本明細書に含めるMajor M.E., et al., Hepatitis C Viruses. In: Fields Virology, Knipe D.M. and Howley P.M. (eds.), Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1127-1161 (2001)を参照されたい)。すべてのRNA ウイルスについて、HCV RNA 複製は誤りがちであり、変異体が連続して生じることとなる。かかる変異体は、プール即ち「疑似種」を提供し、これは迅速に、例えば、免疫応答によって奏される淘汰圧に適応することができる。この変異性はHCV 生存および進化に重要であるようであるが、HCV 分子生物学、病原性、免疫応答の正確な研究そして最終的にはワクチン開発を困難なものとする。

#### 【0080】

HCV感染は典型的には非経口経路によるが、経粘膜感染、例えば、性的および母子感染も起こる。慢性C型肝炎の治療において顕著な進展がなされた。ベグ化された IFN- およ

10

20

30

40

50

ビリバビリンによる現在の治療法では、およそ50%の症例においてHCV感染が排除されるが、治療はいまだに非常に高価であり、6-12ヶ月の治療を必要とし、そして重篤な副作用の顕著なリスクが伴う。予防ワクチンが、米国および全世界の両方においてHCV-関連疾患の最終的な制御のために重要である。治療のための免疫学的アプローチも必要である。

#### 【0081】

キメラ ヒト 肝臓を有するSCID マウス モデルの開発にも拘わらず、チンパンジーがいまだにHCV感染についての唯一の確立された動物モデルである(Grakoui A., et al., *Hepatology*, 33:489-495 (2001)に概説されている)。したがって、それは実験的ワクチンが投与され、その有効性が評価されうる唯一のモデルである。チンパンジー免疫系に關与するタンパク質の多くは、ヒトオルソログと同一であるかまたは非常に密接に関連しているので、検出に必要とされる試薬は互換的である。甚大なコストのために、チンパンジーにおいてすべての有望な HCV ワクチンアプローチを試験することは不可能である。ワクチン研究は現在まで、多数の免疫戦略を試験するために正常免疫適格性マウスを使用していた(例えば、Forns X., et al., *Vaccine*, 17:1992-2002 (1999)を参照)。ヒト クラス I MHC 分子を発現するトランスジェニックマウスが、特異的HCV エピトープ 分析および代替保護システムのために用いられてきた(Qiao M., et al., *Hepatology*, 37:52-59 (2003))。ワクチン戦略はしたがって今まで、組換えタンパク質、ウイルスベクター、ウイルス-様粒子およびDNA-に基づく免疫に基づくものであった。急性感染の排除におけるHCV NS3 に対する免疫応答の關与についての強力な支持がある(Diepolder H.M., et al., *J. Virol.*, 71:6011-6019 (1997))。この抗原は現在ではあらゆる HCV T 細胞 ワクチンの重要な成分であると考えられている。報告によると、NS3 タンパク質を発現するコンストラクトにNS4Aを含めると、その結果としてマウスにおけるより良好な発現および向上した免疫応答が起こることが示されている (Frelin L., et al., *Gene Ther.*, 10:686-699 (2003))。広範な、多選択性 T 細胞応答がHCV 感染の排除において重要であることも同定されてきており、それゆえ、NS5AおよびNS5B タンパク質は重要な T 細胞 ワクチン成分であろう。

#### 【0082】

HCVは、米国において慢性肝臓疾患の40-60%に關与している。これら患者のうち、3分の1は、進行性の線維症および硬変を発症する (Liang T.J., et al., *Ann. Intern. Med.*, 132:296-305 (2000))。C型肝炎は現在ではB型肝炎にとってかわって日本における肝細胞癌 (HCC)の主な原因となっており、CDCによると、HCV-関連硬変および癌に起因して米国のみにおいて毎年8,000-10,000名が死亡している。HCV-関連HCCの機構は未知である。それは主に長年の感染にわたる慢性免疫媒介肝細胞障害および再生により誘発されると考えられている。HCVのコア遺伝子産物は、多数の細胞タンパク質と相互作用することが示されている。それは核移行シグナルを含み、RNA 結合活性を有し、そして細胞において複数の機能、例えば、トランス活性化および抑制、を発揮することが示されている(Matsumoto M., et al., *J. Virol.*, 71:1301-1309 (1997))。HCV コアのトランス活性化因子または抑制因子としての機能を同定する研究では、生物学的 レベルよりも桁違いに高いインビトロでの発現 レベルを用いていた。しかし、数十年にわたるかかるタンパク質の低レベルの発現は感染細胞において有害事象を導びき得、それがHCC 進行において役割を果たしている可能性がある。HCCと闘う最善の手段は、予防、初期の検出およびより良好な治療法による。したがって、C型肝炎 ウイルス 感染を予防することによって、HCCも予防されうる。

#### 【0083】

HCV 複製を支持する特定の細胞タイプはいまだに同定されていないが、HCV 複製の主な場所は肝臓であると考えられており、感染した個体の肝臓の病態と一致する。正常な肝臓は、免疫応答の媒介において重要な役割を果たしている。ほとんどの臓器とは異なり、肝臓における抗原の提示の結果、未処理(naive) T 細胞の活性化が起こりうるという証拠がある (Bertolino P., et al., *Cell Biol.*, 80:84-92 (2002))。肝臓に入ると、血液中の抗原はまず、類洞細胞集団、即ち肝臓類洞上皮細胞 (LSEC) およびクッパー 細胞と接触



することになる。抗原の肝臓への送達の結果、T細胞の局所活性化が起こり、それはおそらくこれら同じ細胞によるものであり、それら両方は抗原提示細胞として作用することが示されている。肝臓における抗原の提示の結果、T-細胞 プライミングまたはT-細胞トランスが起こりうる。

#### 【0084】

癌の治療および腫瘍へのターゲティングのためのカチオン性免疫リポソームの使用に反して(米国公開特許出願番号2003/0044407および米国特許出願番号11/520,796におけるようなもの)、本願の実施例は、有効に取り込まれ(受容体媒介エンドサイトーシスおよび促進されたエンドソーム放出)、肝臓を含む体内のいずれの場所で起こったとしても抗原がT細胞に提示されるように、HCV タンパク質を発現するDNAを送達するためにTfRscFv- リポソーム (HK ペプチドを含むかまたは含まない) 複合体を利用する。

#### 【0085】

TfRscFvの存在は、カチオン性リポソーム複合体を効率的に細胞内に移動させる受容体-媒介エンドサイトーシスを提供し、一方HK ペプチドは(必要というわけではないが)DNAの細胞質へのエンドソーム放出を促進する。

#### 【0086】

肝細胞のためにインビボで使用するためのもっとも適当な製剤を決定するために様々なリポソーム複合体を用いたインビトロでの比較研究を行った。2つの肝細胞-特異的リガンドである、ガラクトース (GAL) (アシアロ糖タンパク質 受容体に結合する)およびL-37pA (HCVに対する推定受容体であるスカベンジャー 受容体、SR-B1に結合する)を試験した。これらを非改変リポソーム 製剤およびトランスフェリン (Tf) 受容体の一本鎖 Fvフラグメント(TfRscFv)で改変した複合体と比較した。3タイプの脂質をこれら分析に用いた: リピドA (DOTAP:DOPE、1:1 モル比); リピドD (DOTAP:Chol、1:1 モル比);およびリピドG (DOTAP:DOPE:Chol、1:1:1 モル比)である。3つのサンプル調製方法を比較した。方法 A: DNAが直接リガンド-改変リポソームと混合されるプレコーティング 方法。方法 B: DNAがリポソームと混合されてカチオン性 リピドDNA コア (リポブレックス)が形成された後、リガンドがリポブレックスの表面に結合されるポストコーティング 方法。方法 C: DNAがリポソームまたはヒスチジル化 オリゴリジン (HoKC) ペプチド 修飾を有するリポソームと混合されてリポブレックスが形成された後、特定のリガンドを担持するアニオン性 (PSchol)または中性 (PCchol) リポソームが添加されてリポブレックスをカプセル封入する方法。

#### 【0087】

##### A. 方法

##### 1. 複合体形成

##### 化学的結合による複合体形成

リポソーム表面に直接的に化学的に結合した抗体または抗体フラグメントを含むカチオン性免疫リポソームを調製するための例示的な 方法は、2001年10月1日出願の、その開示内容全体を引用により本明細書に含める米国特許出願番号09/914,046に開示されている。例えば、4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート-DOPE (MPB-DOPE) (Avanti Polar Lipids) は総脂質の5-8%モルにて上記に記載の7つのリポソーム製剤に含まれる。MPB-リポソームは当該技術分野において周知の方法によって調製される。例えば、Campbell MJ (Biotechniques 1995 Jun;18(6):1027-32)に記載のものから改変されたエタノール 注射方法を本発明において用いることが出来る。簡単に説明すると、すべての脂質をエタノールに可溶化し、混合し、50-60 のボルテックスしている 純水にハミルトンシリンジにて注入する。溶液をさらに10-15 分間ボルテックスする。終濃度は1-2mM 総脂質である。1M HEPES、pH7.5 (pH7.0-8.0)を終濃度10-20mMにて添加する。マレイミド基はpH >7の水溶液中では不安定であるので、リポソームは 水 (pH 5-6.5)中で調製すべきである。pH はscFv-SHとの結合の前に1M HEPES 緩衝剤、pH7.0-8.0を用いて7.0-8.0に調整するとよく、それによりポストコーティング 反応が促進される。

#### 【0088】

scFv-SHを約 1:1 から約 1:100、好適には、約 1:10 から約 1:50 (w:w)、より好適には約 1:20 から約 1:40のタンパク質/脂質比にてMPB-リポソームに添加する。溶液を30分間 室温での穏やかな回転 (~20-30 RPM)により混合し、scFv-Lipを作る。scFv-Lipは精製せずに用いられるが、それはSephacrose CL-4B カラムクロマトグラフィーにより精製してもよい。プラスミド DNA を水に希釈し、scFv-Lip に約 0.5:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  脂質)、好適には 約 1:5 から約 1:20 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  脂質)、例えば、約 1:10 ( $\mu\text{g}$  全核酸: $\mu\text{g}$  脂質) のDNA/脂質比にて添加し、scFv-Lip-DNA 複合体を作る。scFv-Lip-DNAは精製せずに用いられるが、それは Sephacrose CL-4B カラムクロマトグラフィーにより精製してもよい。80-100%の scFvがリポソームに結合されると期待されうる。

【0089】

#### 単純な混合による複合体形成

結合した TfRscFv-免疫リポソームはその免疫学的活性を保持している。cys-TfRscFv はリポプレックスに化学的に結合することができ(2001年 10月 1日出願の米国特許出願番号09/914,046参照)、ヒト 前立腺 腫瘍細胞をインビトロおよびインビボで効率的にトランスフェクトしうることが確立されている。様々な 化学的結合 方法を用いてリポソームに結合させるの是一本鎖 抗体フラグメントについての慣行である。cys-TfRscFvとカチオン性リポソーム (還元性基、例えば、マレイミド DOPEまたはいずれかの還元性基を有する脂質を含まない)との、化学的結合ではなく単純な混合の結果、免疫学的に活性な複合体が形成されることも判定され、ここでリガンドはリンカーまたは化学的結合分子を使用せずにリポソームに直接的に結合しており、また、依然として腫瘍細胞に効率的に結合しトランスフェクトすることが判定された (例えば、そこに開示される組成および方法を含めてその開示内容を引用により本明細書に含める米国公開特許出願番号2003/0044407を参照)。

【0090】

cys-TfRscFv-免疫リポソーム複合体は、本明細書において記載される範囲内において混合された複合体中に所定の比の一本鎖 タンパク質対リポソーム、および、DNA 対n モル (または $\mu\text{g}$ ) 総脂質となるようにcys-TfRscFv とリポソーム 組成物 Aとを混合することによって調製される。以下に記載する複合体の調製は以下の一般的手順にしたがった。適当な量の2 mM リポソーム (上記のA-H)をなんらかの水 (例えば、DI 水)と混合して所望の体積とし、反転させて混合する。リポソーム-水 混合物に、適当な量のcys-TfRscFvを添加し、所望の比とし、約 1 秒 から約 2 分間穏やかな反転により混合する。この混合物を室温で約 10 分間 から約 20 分間維持する(およそ5 分間後、5-10 秒間穏やかに反転させる)。同時に、適当な量のDNAを約 1 秒 から約 2 分間なんらかの水と反転により混合し、所望の体積とする。典型的には、インビトロ アッセイにおける使用のためには、DNA濃度がウェルあたり約 0.01  $\mu\text{g}$  から約 2  $\mu\text{g}$  の範囲にあるのが望ましく; インビボでの使用のためには、注射あたり約 5  $\mu\text{g}$  から約 100  $\mu\text{g}$ のDNAを提供するのが望ましい。DNA 溶液をcys-TfRscFv-リポソーム 溶液に迅速に添加し、混合物を約 1 秒 から約 2 分間反転させる。最終混合物を室温で約 10 分間 から約 20 分間維持し、およそ5 分間後に5-10 秒間穏やかに反転する。インビボでの使用のためには 50% デキストロースまたは50% スクロースを終濃度1-20% (V:V)、好適には 5-20% (V:V)となるように添加し、穏やかな反転により約 1 秒 から約 2 分間混合する。1:30 (cys-TfRscFv:リポソーム、w:w)および1:14 ( $\mu\text{g}$  DNA:n モル 総脂質) の好適な比での具体例は以下の通りである。最終体積800  $\mu\text{l}$ 中の40  $\mu\text{g}$ のDNAについて、183  $\mu\text{l}$  水と280  $\mu\text{l}$  の2 mM リポソーム 溶液を混合する。34  $\mu\text{l}$  のcys-TfRscFv (濃度0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加する。183  $\mu\text{l}$  の水と40  $\mu\text{l}$ の1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DNAを混合する。80  $\mu\text{l}$ の50% デキストロースを最終工程として添加する。

【0091】

本発明の方法によって調製される最終的な複合体のサイズは約 100 から400 (nm) であってMalvern ZETASIZER (登録商標) 3000またはMalvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSを用いる動的光散乱により判定して正のゼータ電位を有する。このサイズは腫瘍毛細血

10

20

30

40

50

管床を効率的に通過し、腫瘍細胞に到達するのに十分に小さく、また、毛細血管床を効率的に通過し、標的APC 細胞に到達するのに十分に小さい。

【 0 0 9 2 】

## 2. HCV-特異的抗原に対する免疫応答の評価

### 標的HCV抗原

ワクチン 研究に含めるHCV 抗原は NS3からNS5Bである。これらの配列は遺伝子型 1a H 77 株に由来する。その開示内容全体を引用により本明細書に含めるMajor M.E., et al., Hepatitis C Viruses. In: Fields Virology, Knipe D.M. and Howley P.M. (eds.), Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1127-1161 (2001)参照。回復した動物におけるこの抗原のみに対するT-細胞 応答の増強の結果は、一過性の臨床的に有意でない感染である(以下を参照)。CMV プロモーターの制御下で抗原を発現するプラスミドについて、293-Tおよび Huh7.5 細胞を用いた。アデノウイルス ベクターについては、AD-293 細胞株を用いた。発現は特異的抗体を用いた蛍光免疫染色およびウェスタンブロッティングにより判定した。

【 0 0 9 3 】

### アデノウイルス ベクター

ADEASY (登録商標) システムを用いてHCV遺伝子を発現するヒト アデノウイルス 血清型 5 組換え体が本発明に好適に用いられる(Stratagene, CA)。このベクターは E1および E3 遺伝子の欠失により複製欠損とされたものである。目的遺伝子を大腸菌における組換えを介してアデノウイルス バックボーンに導入する。組換え プラスミドを次いでAD-293 細胞に形質転換し、ここで欠失したウイルスアセンブリー遺伝子が補完されてウイルス粒子が作られる。アデノウイルスもまた、HCV 治療のための魅力的なウイルス ベクターである。というのはこのウイルスは肝臓において導入遺伝子を効率的に発現させることができたからである。

【 0 0 9 4 】

### インターロイキン-12 (免疫増強)

インターロイキン-12 (IL-12) はIFN- $\gamma$  産生を誘発し、Th2 細胞よりもTh1細胞への分化を支持し、自然耐性と獲得免疫とを連結させる。DCおよび貪食細胞が感染の際に病原体に応答してIL-12を産生する。免疫を増強し、効率的な Th1-型応答を刺激するために、IL-12を発現する プラスミドをカチオン性免疫リポソーム 製剤に含める。マウスおよび ヒト IL-12の両方を発現するプラスミドを、マウスおよび霊長類研究の間の一貫性を達成するために調製した。

【 0 0 9 5 】

### マウス接種

研究は、HCV 抗原を発現する組換え ベクターを用いるDNAプライム(prime)/アデノウイルス 追加免疫を含む。マウスに 0および4 週目に本明細書に開示するリポソーム複合体中の20-30  $\mu$ g のDNAを接種し、組換え アデノウイルス ( $10^8$  感染単位、皮下(s.c.))によって、10-12 週目に追加免疫する。この追加免疫の4週間後に、肝臓および脾臓をフローサイトメトリーにより分析して肝臓におけるT 細胞の特徴を決定する。T 細胞は肝細胞からフィコールグラジエントを用いて分離でき、標識化抗体を用いて特定の表面 マーカーについて染色する。対照として、PBS 処理マウス、非リガンド化(unliganded)リポソーム/DNA 複合体、空ベクターを担持する複合体、筋肉内 (i.m.) (1- 50  $\mu$ g/マウス)、腹腔内(i.p.)、静脈内(i.v.)、および皮内 (i.d.) (1-50  $\mu$ g/マウス) 注入された裸 DNA、およびi.m.またはi.d.にて複合体を接種されたマウスを含める。用量および時期を最適化し、6 ヶ月の期間にわたる肝臓におけるT 細胞の持続および復活を評価して 肝臓内 T 細胞数およびマーカーに基づき最良のシステムを判定する。トランスフェリン 受容体は樹状細胞上に発現し、複合体化した DNAは受容体-媒介エンドサイトーシスによって取り込まれるので、scL-HCVまたは scLHK-HCV 複合体のi.m. および/または i.d. 接種の結果は裸 プラスミド DNAよりも良好な全身的応答となると期待される。T 細胞集団は CD45RA、CD62L、CD27 およびCCR7の発現に基づいて同定されうる。IL-7R は短命なエフェクター

細胞と機能的なメモリー 細胞へと発達する細胞とを識別することが出来る有用なマーカーを提供する。これらマーカーを一次マウス研究において用いて長期免疫を確立する候補ワクチンの能力を分析する。チンパンジーにおけるHCV の排除の後に肝臓におけるメモリー CD8+ T 細胞の、排除の後6 ヶ月 の血液と比較して肝臓において~10-倍高いレベルの選択的保持の証拠がある。

#### 【 0 0 9 6 】

脾臓および肝臓内 T 細胞の特異性をインビトロ イムノアッセイによって評価する。まず、精製HCV抗原またはオーバーラップする18 mer ペプチドを用いるエリスポット アッセイを用いてIFN- またはIL-4を分泌する細胞を分析する。増殖 アッセイはまた、免疫化マウスの脾臓から単離した細胞およびMikrogen (Germany)から購入した全タンパク質を用いて行う。HLA-A2 トランスジェニック マウスを用いる。これらマウスはHLA-A2 MHC 分子を発現し、HLA-A2 エピトープを提示することが出来る。これらトランスジェニック マウスをBALB/cマウスについて用いたものと同じプロトコルを用いて免疫することができるが、HLA-A2 ハプロタイプによって認識されるペプチドを免疫学的試験において用いることが出来る。これら分析のために、このハプロタイプに特異的なNS5AおよびNS5Bについて同定されたHLA-A2 テトラマーおよびエピトープを用いる。肝臓由来細胞を、FACS 緩衝剤 (カルシウムを含まないPBS中の1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム)中の特異的ペプチドおよび表面 マーカー (CD4、CD8)に特異的なFITC 標識化抗体を提示するテトラマー-フィコエリトリン (PE)により30 分間 室温または氷上で染色する。事象を、死細胞を排除するために7AAD (BD Pharmigen)を用いる分析についてソフトウェア Cellquest (Becton Dickinson)を用いてFACS-Calibur (Becton Dickinson)で獲得する。非特異的バックグラウンド 染色を未処理または偽接種 マウス由来のT 細胞を用いて判定する。クローン化のために、リンパ球を抗原刺激し、照射した同系の APCとIL-2およびIL-7とともに限界希釈にて共培養し、HCV 特異的増殖について試験する。

#### 【 0 0 9 7 】

### B. 結果

#### 1. インビトロでのヒト 肝細胞癌 (Hep3B) 細胞へのリボソーム複合体のターゲティング

Hep3B HCC 細胞 ( $5 \times 10^4$ )を24 ウェルディッシュに播き、哺乳類プロモーターの制御下でルシフェラーゼ 遺伝子を発現する上記のようなDNA プラスミド(0.05ug/ウェル) と複合体化したりボソームによりトランスフェクトした。scL-HCVについて用いた比は、0.33ug (TfRscFv:LipA:DNA)であり、scLHK-HCVについては0.33ug:7nmol:1ug (TfRscFv:LipA-HoKC:DNA)であった。トランスフェクションの24 時間後、ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ アッセイ システム (Promega、Madison、WI)を用いて判定した。結果を図1に平均+ SD (n=3)として示す。効率的な トランスフェクションが抗-トランスフェリン 受容体 一本鎖 抗体フラグメント (sc)と複合体化したりボソームを用いた場合に得られ、sc/LipAおよびsc/LipA-HoKC 複合体についてそれぞれルシフェラーゼ 値は257,815 RLUおよび1,120,643 RLU であった(図1)。これを非修飾リポドA (LipA) と複合体化したルシフェラーゼ プラスミドについてのルシフェラーゼ 値が 538.9 RLU/  $\mu$ g タンパク質であることと比較されたい。HoKC ペプチドをリボソーム複合体に組み込んだ場合のこの肝細胞株へのDNAのトランスフェクション 効率の上昇は、前立腺および脾臓細胞株を用いた以前の観察と一致する。

#### 【 0 0 9 8 】

#### 2. インビトロでの初代チンパンジー 肝細胞へのリボソーム複合体のターゲティング

正常肝細胞は肝細胞癌細胞と同じレベルの受容体を有さず、それゆえ、TfRscFv (sc)、ガラクトース (GAL)およびL-37pA リガンドと結合した一連の脂質複合体を初代チンパンジー 肝細胞において比較した。5 万の初代チンパンジー 肝細胞を24 ウェル プレートに播き、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (0.1  $\mu$ g DNA プラスミド/ウェル)を担持し、HoKC ペプチドを有するかまたは有さない複合体によりトランスフェクトした。sc/Lip-HoKC/DNA (レーン 1-3)およびsc/Lip/DNA (レーン 7-9) 複合体は上記に開示の単純な混合方法により調製した。即ち、TfRscFvを0.33ug sc:7nm Lip-HoKC および0.33ug sc:14nmol Lip

の比にて適当なりポソーム (HoKCを有するかまたは有さない)と混合し、混合は、手による10回の穏やかな反転または20-30 PRMでの15-60 秒の回転により行い、室温で10-15 分間維持した。DNAを次いでsc/Lip-HoKCまたはsc/Lip 混合物 (1ug DNA:7nmol (Lip-HoKCについて) および1ug DNA:14nmol (Lipについて) の比)に添加し、溶液を手による10回の穏やかな反転または20-30 PRMでの15-60 秒の回転により混合し、室温で10-15 分間維持した。非リガンド化(unliganded) 複合体も対照として同じ比にて調製し(レーン 4-6および10-12)、同じ手順にしたがった。L-37pA リガンド (レーン 19-21)を用いる複合体は、Lip-マレイミドを6.7% モル比にて含むリポソーム (A、D、またはG)にL-37pA リガンドを化学的に結合させることによって形成させた。Lip-Malを14:7 (nmol:nmol) (Lip:L-37pA)

の比にてL-37pA と混合し、1.5mM HEPES 緩衝剤 (終濃度)を添加し、20-30RPMで3 時間室温で回転させた。その後、DNAを1ug DNA:14nmol Lipの比にて添加し、上記のように混合し、室温で15 分間保持した。比較のために、異なる方法もGAL リガンドとの複合体の形成に用いた (レーン 13-18)。ここでは、DNAをなんらかの必要な水に添加し、上記のように混合する。リポソームA、D、またはG (HoKCを含むかまたは含まない)をなんらかの必要な水に添加し、上記のように混合する。2つの溶液を室温で15 分間保持し、次いで一緒に添加し、上記のように混合し、室温で15 分間保持し、カチオン性リポソーム/DNA コアを形成する。GAL リガンドは、以前にアニオン性 (ホスファチジルセリン:コレステロール) リポソームとモル比1:1:0.05 (PS:chol:GAL)にて結合していた。このPScholGAL 混合物を次いであらかじめ形成された カチオン性リポソーム/DNA 複合体に添加し、溶液を上記のように混合し、室温で15 分間保持し、カチオン性リポソーム/DNA コアをカプセル封入する。これら複合体についての成分の比は以下の通り: 7nmol:7nmol:1ug (PScholGAL:Lip-HoKC:DNA)および7nmol:14nmol:1ug (PScholGAL:Lip:DNA)。トランスフェクションの48時間後、ルシフェラーゼ活性を上記のようにルシフェラーゼ アッセイ システムを用いて判定した。図2は、初代チンパンジー 肝細胞におけるタンパク質 1  $\mu$ gあたりのルシフェラーゼ RLUによって判定したトランスフェクション効率を示す。3つのすべての方法によって3つのすべてのリガンドを用いて形成された複合体は、これら初代チンパンジー 肝臓細胞をトランスフェクトすることができた。初代チンパンジー 肝細胞を用いることにより、使用した脂質にかかわらず、scと複合体化したリポソームは、様々な方法を用いてGAL (15,509 RLU) またはL-37pA (19,662 RLU) と複合体化した最良のリポソームと比較してほぼ10-倍高いトランスフェクション効率 (~150,000 RLU) を与えた。期待されたように、正常 肝細胞上にはTf 受容体の数がより少ないと推測されるために、sc/リポソームの全体のトランスフェクション効率は同じ複合体を Hep3B 細胞において用いた場合と比較して16-倍まで低かった。しかし、HoKC ペプチドを含めると、TfRscFvを用いるトランスフェクションの効率が10-倍上昇した。Hep3B 細胞を用いて以前に観察されたように、GALおよびL-27pA リガンドを用いる最良のトランスフェクション効率はHoKC ペプチドを GAL リガンドとともに含めた場合に観察された。したがって、これらの研究は、scLHK-DNA 複合体はDNAを正常 肝臓細胞内に送達することにおいて高度に効率的であったこと、およびその他のリガンドも正常 肝臓 肝細胞をトランスフェクトするための複合体において用いることが出来ることを示す。

【0099】

### 3. インビボでの肝臓細胞へのリポソーム複合体のターゲティング

インビトロ実験に続いて、非腫瘍担持 BALB/cマウスおよび特定のリポソーム複合体を用いてインビボで試験を行った。6 から 9 週齢の動物に尾静脈を介して、400  $\mu$ lの上記に示す比にて上記のように調製したリポソーム複合体中の20-25  $\mu$ gのEGFPを発現するDNA プラスミドを、2-3回 24時間の期間にわたってi.v. 接種した。最後の接種の24-48 時間後、肝臓、脾臓、腎臓、肺および心臓からの組織切片を液体窒素で瞬間凍結し、-70 で保存した。さらに、肝臓組織切片を組織学的 分析のためにホルマリンで固定した。ウェスタンブロット 分析のために、肝臓組織をプロテアーゼ インヒビターカクテル (Sigma)を含むT-PER 組織抽出試薬 (Pierce、Rockford、IL)を用いて抽出し、上清を細胞片を除くために遠心分離した後回収した。タンパク質濃度をBCA タンパク質 アッセイ 試薬キット

(Pierce、Rockford、IL) を用いて評価し、40  $\mu$ g の総タンパク質を、モノクローナル抗-GFP 抗体 (BAbCo) およびECL ウェスタンブロットキット(Yu W., et al., Nucleic Acids Research, 32:e48 (2004))を用いて分析した。同じ膜を、ウェルあたり等量のタンパク質のローディングを確認するために抗-GAPDH 抗体で処理した。図3は、非処理マウス (UT)と比較した、リピドA (scLA)、リピドA およびHoKC (scLAHK)、リピドDおよびHoKC (scLDHK)、リピドG およびHoKC (scLGHK) と結合したTfRscFv リガンド (sc)、リピドAと結合したガラクトース (GalLA)およびリピドA と結合したL-37pA (L-37pALA)を接種した二連のマウス からの肝臓 抽出物のウェスタンブロットを示す。左側のレーンは、GFP およびGAPDHの両方についての陽性対照 (PC)を示す。すべてのリボソーム複合体は、接種されたマウスの肝臓においてGFPの発現をもたらした。リピドAを用いた場合HoKC ペプチドを含めることにより、マウスの肝臓へのDNAの送達が増進した(scLAとscLAHKとを比較されたい)。最高の発現レベルはscLGHK リボソーム複合体について観察されたが、これは2匹のマウスのうち1匹のみにおけるものであり、scLAHK 複合体が、複数の(replicate)動物においてGFP タンパク質のより一貫して強力な発現をもたらすようであった。GalLAおよびL-37pALA 改変リボソームもGFPの発現をもたらしたが、より低いレベルであった。

【 0 1 0 0 】

総じて、このデータは、3つのすべてのリガンドが使用できるが、リボソーム中にターゲティングリガンド TfRscFvおよびHoKC ペプチドを含む遺伝子送達媒体が、ガラクトースまたはL-37pA ペプチドよりも肝臓細胞については良好であることを示す。これらの結果は、ガラクトースが肝臓細胞の標的化にしばしば用いられているために予期せぬものである(Wu, J., et al., "Targeting Hepatocytes for Drug and Gene Delivery: Emerging Novel Approaches and Applications," Frontiers in Bioscience 7:d717-725 (2002))。

【 0 1 0 1 】

#### 4. HCVに対する免疫応答を誘発させるためのDNAおよびウイルスベクターの構築

当業者に周知の標準的クローニング方法を用いて、高発現プロモーター (pAG410) の制御下でHCVのNS3 からNS5B タンパク質を発現するDNA ベクターを構築した。これらHCV-特異的タンパク質を発現させるために用いたバックボーン ベクターは既に臨床用途についてFDAによって承認されており、現在、癌-特異的製剤を用いる患者におけるフェーズI 臨床試験にある。発現をインビトロで293T およびHuh7.5 (肝細胞) 細胞を用いて試験し、ウェスタンブロット (図4)と免疫蛍光法 (データ示さず) 分析との両方によってHCV 抗原を特異的に発現することが示された。6 ウェルディッシュ中の細胞を製造業者のプロトコルを用いてLipofectin (Invitrogen, CA)を用いてトランスフェクトした。48 時間後、細胞を特異的遺伝子発現について分析した。ウェスタンブロット分析のために、細胞を、プロテアーゼ インヒビターカクテル (Sigma)を含む250  $\mu$ lの M-PER 試薬 (Pierce、Rockford、IL)を用いて溶解した。80  $\mu$ gの総タンパク質を8-20% SDS-PAGE グラジエントゲル (Invitrogen)を用いるウェスタンブロットによって分析した。タンパク質をPVDF 膜にトランスファーし、1:500に希釈したNS5Bに対するモノクローナル抗体、または1:500に希釈した慢性 チンパンジー血清によってプローブした。タンパク質を、抗-ヒトまたは 抗-マウス IgG HRP0 結合体および化学発光 (West Pico system, Pierce, Rockford, IL)を用いて可視化した。図4は、pAGVec (空ベクター)によりトランスフェクトされた細胞と比較した、NS3、NS4B、NS5A および NS5Bについて観察された特異的バンドを示す。これら同じ抗原のそれぞれを個別に発現するアデノウイルス 組換え体も標準的 クローニング 方法を用いて構築した。これらウイルス ベクターのそれぞれからの発現もウェスタンブロット 分析によって確認した(データ示さず)。

【 0 1 0 2 】

#### 5. 高発現プロモーターへとクローニングされたヒト IL-2の増強した効率

ILが効率的な アジュバント 分子として作用するためには、それらは Th-1 T 細胞応答を効率的に刺激するために十分に高いレベルにて発現されなければならない。それらを高発現プロモーターの制御下に配置することは、これを達成する一つの手段である。このアプローチにより可能なILの発現の高いレベルを示すために、ヒト IL-2を高発現プロモ-

10

20

30

40

50

ターの制御下にてpSCMV ベクターにクローニングした(その開示内容を引用により本明細書に含める、米国特許出願公開番号2007/0065432を参照)。インビボでの発現レベルを試験し、標準的 CMV プロモーターからのレベルと比較した。両方の場合において、プラスミドは、本明細書において記載されるように調製されたHoKC ペプチドを有さない標的化リポソーム ナノ複合体によって送達された。PANC-1 ヒト 膵臓癌異種移植片腫瘍を、PANC-1 腫瘍 組織の皮下 接種により4-6 週齢雌性胸腺欠損 ノードマウスにおいて誘発した。およそ3 週間後、腫瘍は平均して  $400-700 \text{ mm}^3$  となり、動物に6日間にわたって比 (0.3  $3\mu\text{g}:10\mu\text{g}:1\mu\text{g}$  (TfRscFv:Lip:DNA)) を用いて上記のように単純な混合によって調製された、標準的 CMV プロモーターまたは高発現プロモーター (40  $\mu\text{g}$  DNA/注射) のいずれかの制御下でIL-2についての遺伝子を担持するナノ免疫リポソーム複合体によるi.v. (尾静脈) 注射を6回与えた。マウスを最後の注射の24時間後に屠殺した。腫瘍および肺組織を採取し、液体窒素で瞬間凍結し、hIL-2に対する市販の ポリクローナル抗体およびECL 検出を用いる標準的技術によるウェスタンブロット 分析によってhIL-2 タンパク質発現レベルについて分析した。図5に示すように、psCMV-hIL-2 プラスミドを担持する複合体を与えられた動物からの腫瘍はすべて、腫瘍における高レベルの発現を示した。一方、hIL-2遺伝子が標準的 CMV プロモーターの制御下にある腫瘍においてはhIL-2 発現は明らかではなかった。

#### 【 0 1 0 3 】

#### 6. scL を介するi.v. 送達後のマウス 組織におけるHCV DNA 配列/発現の検出

scL-pAG410 複合体の全身的 投与の後の様々な 非腫瘍担持 マウス 組織におけるNS3からNS5Bをコードする遺伝子の存在を評価するための実験を行った。BALB/cマウス (3匹/群) に、scL (一本鎖 トランスフェリン 抗体-標的化カチオン性リポソーム) と複合体化したプラスミド pAG410 DNAまたは遊離 プラスミド DNA (25  $\mu\text{g}$ /マウス/注射) としてのプラスミドpAG410 DNAのいずれかを、2 回 (8時間間隔をあけて) i.v. 注入した。複合体は上記のように比 (0.33 $\mu\text{g}:10\mu\text{g}:1\mu\text{g}$  (TfRscFv:Lip:DNA)) にて単純な混合によって調製した。一群のマウスには、同じ手法および同じ比にて調製した空の pSCMV ベクターを担持するscL を与えた。注射の48 時間後、動物を屠殺した。肝臓、肺、脾臓、および胸腺を収集し、液体N<sub>2</sub>で瞬間凍結した。サンプルの一部はPCRのためにDNeasy Extraction Kit (Qiagen)を用いてDNAを単離するために用いた。DNA PCR (1  $\mu\text{g}$  DNA) を、NS3、NS5A およびNS5B を増幅するプライマーを用い、Taq Gold ポリメラーゼを用いて別々の反応において行った。PCR 条件は以下の通りとした: 50 $\mu\text{l}$ の総体積中、6ng DNA、2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM 各 dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP; 300 nM 各プライマー; および 1.25 ユニットの Amp liTaq。増幅は反応混合物を94 で10 分間、次いで 40サイクルの、94 15 秒間および60 30秒間、次いで60 で7 分間インキュベートすることにより行った。図6は、肝臓におけるNS3遺伝子についてのPCRデータを示すが、シグナルの相違はNS5A およびNS5Bについて類似であった。複合体となった、および、遊離pAG410を与えられたマウスの間ですべての臓器においてコピーレベルに有意差がある。肝臓 (図6)と同様に、肺、脾臓および胸腺において、scL-pAG410は強いPCRバンドを有し、一方、遊離 DNAによってはシグナルは検出されなかった。予測されたように、ベクター-処理マウスからはシグナルはなかった。したがって、複合体となったHCV プラスミド DNAのi.v. 送達の結果、肝臓およびその他の臓器において細胞による効率的な 取り込みが起こった。これらの結果は、正常肝臓およびその他の正常細胞に対するHCV 抗原の全身的送達のためのこのアプローチの可能性を確認し、かつ支持する。

#### 【 0 1 0 4 】

#### 7. マウス 免疫応答

マウスはHCVに感染しえない。しかし、誘発される T 細胞応答の効力を評価するため、HCVのNS3 タンパク質を発現する組換え ワクシニア ウイルス (rVV)を代替 ウイルス 攻撃 モデルとして用いた。このタイプのrVV モデルは当該技術分野において周知であり、T 細胞応答のインビボ有効性を評価するために受け入れられている手段である。マウス (3匹/群)に0および4 週目に、上記のようにscLと複合体となった、または 遊離 プラスミ

ド DNAとしての、HCV およびIL-12 プラスミド DNAをI.V. 接種した。TfRscFv/Lip/DNA 複合体は上記のように0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA) の比を用いる単純な混合によって調製した。DNAを等モル量にて混合した (計 50ug/マウス/注射)。マウスを8 週目に、HCVのNS3 タンパク質を発現する $10^6$  プラーク形成単位 (pfu)の rVVによって攻撃した。攻撃の5日後に、卵巣をマウスから取り出し、PBS中でホモジナイズし、3ラウンドの凍結/融解および超音波処理に供した。タイター測定(titration)のために、卵巣抽出物(100 ul)を100 ulのトリプシンおよび100 ulのPBSと合わせ、37 °Cで30 分間インキュベートした。希釈( $10^{-1}$  から $10^{-6}$ までの10-倍)を2% FBS/EMEM中で行い、250 ulを、12-ウェルディッシュ中のBSC-1 細胞の二連のウェルの感染に用いた。感染後2 日目に、培地を除き、細胞を固定し、クリスタルバイオレット (20% エタノール、20% ホルムアルデヒド、0.3% クリスタルバイオレット)で染色した。群 1にはPBSを与え、群 2にはscL 複合体となった pAG410およびIL-12 プラスミドを与え、群 3にはscL 複合体となった空ベクターおよびIL-12 プラスミドを与え、群 4 には裸 DNA としてのpAG410およびIL-12 プラスミドを与えた。図7は、各群におけるpfu/卵巣として表したrVV タイターを示す。黒丸は個々のマウスをあらわし、黒棒は群あたり平均タイターを示す。scL pAG410/IL-12 複合体による免疫の結果、スチューデントのT分布を用いて評価して、PBS 群と比較して高度に有意なウイルス タイターの低下が起こった( $p=0.002$ )。平均タイターはGp 2では $10^4$  であるのに対してGp 1では $10^6$  であった。興味深いことに、scLと 複合体となったIL-12 ベクターと空の バックボーンベクターのマウスへの接種もまた、ウイルス タイターの有意な低下をもたらしたが(平均タイター $2 \times 10^5$  pfu/卵巣)、 pAG410 プラスミドと組み合わせた場合にみられた低下ほどは程度は高くなかった。ウイルス複製に対するこの効果はscL を用いる送達の結果である。というのは裸 DNA としてのpAG410 およびIL-12(Gp 4)による免疫は、ウイルス タイターの有意な低下をもたらさなかったからである。このデータは、scL 複合体となった DNAによる免疫がウイルス 攻撃に対して保護することが出来るT 細胞応答の誘発をもたらすこと、およびこれら免疫応答は裸 DNAを用いて誘発されるものより優れていることを示す。このデータは、サイトカイン を発現する プラスミドのみのscL 送達でもウイルス複製を阻害する免疫応答を誘発することができることを示す。

#### 【0105】

#### 8. scL 複合体となったDNAによる免疫の後の肝臓内T-細胞浸潤

scL 複合体となったDNAによる免疫が、肝臓指向性 ウイルスによる感染の際により良好な肝臓内 T 細胞 浸潤をもたらしたかどうかを評価するために、上記と同じ4 群(上記と同一の複合体により0および4週目に免疫したものを)、免疫の8 週間後に、NS3、NS5AおよびNS5B HCV タンパク質を発現する非複製的アデノウイルス 組換え体の $3 \times 10^8$  の感染性粒子によって、I.V. 攻撃した。攻撃の10日後、肝臓組織を収集し、ホルマリン-固定し、当該技術分野において周知の標準的 プロトコルを用いてパラフィンブロックにマウントした。切片を H&E 染色し、T-細胞浸潤について分析した。肝臓に浸潤する T-細胞の数を異なるマウス群において評価した。3匹マウス/群のそれぞれについて3つの視野をカウントした。各群についてのカウントを足して平均をとり、T 細胞数/ 視野 (fov)を求めた。データをスチューデントの T 検定により分析した。scL pAG410/IL-12を与えたマウスにおける平均 T-細胞 浸潤は有意にPBSを与えたマウスにおけるものより高く、118.8 T 細胞/fov 対70.2 T 細胞/fov ( $p=0.000007$ )であった。これをscL-ベクター/IL-12を与えたマウスについての71.5 T-細胞/fovと比較する。裸 pAG410/IL-12を与えたマウスにおいても有意により高いレベルのT-細胞 浸潤、108.75 T-細胞/fov ( $p=0.001$ )がみられたが、scL-pAG410/IL-12によるものよりも程度は低かった。これらの観察は、HCV 抗原を発現するscL 複合体となったプラスミドによる免疫は、組換え 肝臓指向性 ウイルスによる感染の際に肝臓におけるより良好なT-細胞 応答をもたらすことを示す。

#### 【0106】

9. HCV-特異的RNA、抗原および免疫応答についての発現および試験のためのツールの開発 シンドビス 発現 システムを用いて、発現 組換え ウイルスが、HCVのコア、E1E2、およびNS3 タンパク質を発現するように操作された。これらタンパク質は次いでニッケルカ



ラムを用いる精製を容易にするためにヒスチジンタグ付加される。効率的な精製が行われ、特異性はマウス モノクローナルまたはウサギ ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット 分析により判定される。慢性期血清が、HCVのE1E2、NS3、およびNS5A タンパク質に対する高タイター抗体により感染したチンパンジーから同定された。この不活性化血清はいくつかのウェスタンブロットおよび免疫蛍光法 アッセイに用いられ、組換え DNA およびウイルス ベクターからのHCV 抗原の発現の検出が成功している。Mikrogen (Germany) から市販されている、NS3、NS5AおよびNS5B タンパク質もまた、エリスポット、増殖アッセイ、およびフローサイトメトリー 分析を用いるチンパンジーにおけるHCVに対するT 細胞 応答の検出に用いられた。一連の オーバーラップする 18 mer ペプチドもまた、NIH AIDS Research and Reference Reagent Programから得られ、これらはチンパンジー 末梢血 単核細胞(PBMC)を用いるエリスポット アッセイでの使用が成功している1a H77 遺伝子型配列に対応する。ほとんどのHCV 抗原である、コア、E1E2、NS2、NS3、NS5AおよびNS5Bに対する抗体について試験するためのELISAが開発された。最近の研究は、ELISAを用いて得られた抗-E1E2 タイターが、感染したチンパンジーにおける中和抗体タイターの良好な指標であることが判明したことを示している。ネスト化 およびリアルタイム PCR アッセイの両方が、血清中のHCV RNAを検出および定量するために開発された。これらのアッセイの感度および特異性が評価され、たった40 RNA コピー/mL程度でもネスト化 PCRを用いて検出可能であり、200 RNA コピー/mL (74 WHO IU/mL) 程度でもリアルタイムPCRを用いて検出可能である。これら試薬および検出システムはすべて、HCV 遺伝子型1a (HCV-H) 感染性 クローンから転写されたRNAを接種されたチンパンジーにおける感染の初期急性期の間に収集された血漿に由来するモノクローナル ウイルスに対して特異的である。

#### 【 0 1 0 7 】

10. HCV 攻撃の前の未処理(naive)および回復したチンパンジーの予防 ワクチン接種

HCV 感染の経過を変化させる糖タンパク質-特異的または非構造 タンパク質-特異的 免疫応答のいずれかを誘発するワクチンの能力を調べた。これらの研究は、中和抗体 (nAb) とワクチンとの両方によって誘発される T 細胞がチンパンジー モデルにおけるHCV 感染を改変しうることを示す。

#### 【 0 1 0 8 】

a) エンベロープ に基づく ワクチンは HCV 感染を改変する

ワクチン 実験において使用するためのHCV E1E2 タンパク質を生産するための発現および精製 システムが開発された。ヒスチジンタグ付加されたE1E2 タンパク質をシンドビス 発現 システムを用いて発現させ、当該技術分野においてよく確立された方法であるGNL レクチンおよびニッケルカラムを用いて>80% 純度にまで精製した。特異性および純度をE1 およびE2に対するモノクローナル 抗体を用いるウェスタンブロットおよびSDS PAGEゲルの銀染色により評価した。2 匹のチンパンジー、一方は未処理であり (Ch1601)、もう一方は急性 HCV 感染から回復したもの (Ch1587) を、筋肉内送達された25  $\mu$ g のrE1E2 タンパク質により免疫し、100 チンパンジー 感染用量 (CID<sub>50</sub>) のクローン性(clonal)HCV (図8Aおよび8B)により攻撃した。攻撃の結果を、ワクチン接種されていない 対照 動物における感染と比較した。強力かつ特異的なT-細胞 増殖性 応答に加えて、両方の動物の免疫により、E2の超可変領域(HVR1)に対する抗体を含むE1E2に対する高い抗体 タイターが生じた。この領域は天然分離株においてもっとも可変性であることが示されており、また、nAb エピトープを提示すると考えられている。抗体を、ビオチン化 HVR1 ペプチドまたは E1E2を発現するワクシニア ウイルス 組換え体で感染したBSC-1 細胞から精製されたE1E2 タンパク質を用いて開発された全タンパク質 E1E2および HVR1 ペプチド ELISA アッセイを用いて測定した。両方のワクチン接種した動物においてウイルス血症 が3週間遅延した。Ch1601において、HCV RNA タイターは  $5 \times 10^4$  コピー/ml未満に維持され、ALT レベルはわずかに上昇した。肝臓内 サイトカイン mRNA レベルの上昇は、HCV RNAの定量不可能な レベルまでの低下と一致した。この制御にもかかわらず、ウイルス血症は抗体 タイターが低下すると再び現れ、動物は慢性的に感染した状態となり、この再発は免

疫エスケープを伴わなかった。急性 HCV 感染から回復するチンパンジーはnAbを発達させない。一次感染において誘発された既存のメモリー T 細胞 応答に対してnAbを加えると、動物を再感染から保護することができる免疫応答が生じた。Ch1587において、ウイルス血症は 3週目の 1 つのサンプルにおいてのみ検出可能であり( $<10^4$  コピー/ml)、肝炎の証拠はなかった。

#### 【 0 1 0 9 】

b) T 細胞 ワクチンは HCV 感染を改変する

HCV NS 抗原である NS3、NS5AおよびNS5Bのみを含む本発明の方法を用いないワクチンを構築した。回復したチンパンジー (Ch1588)をNS3に対するDNA prime/rVV (組換え ワクチン シニア ウイルス) 追加免疫レジメンで免疫した。第 2 の回復したチンパンジー (Ch1606) をNS3、NS5AおよびNS5Bを含むワクチンで免疫した。チンパンジーを 100  $CID_{50}$  のクローン性 HCVにより攻撃した。両方の動物において、T 細胞応答がワクチン接種の後に追加免疫された。両方の動物の攻撃の結果、無症候性の感染がもたらされ、注射後 (p.i.) 6 週目に1 (Ch1606)または2 (Ch1588) 週間のみ持続する低レベルウイルス血症が伴った(図9A-9C)。一方、ワクチン接種されていない 回復したチンパンジーはp.i. 1 週目にてウイルス血症を発症し、少なくとも14週目まで検出可能であった。

#### 【 0 1 1 0 】

未処理 チンパンジー (Ch6394) を次いでNS3-NS5 ワクチンによりワクチン接種し、100  $CID_{50}$  のモノクローン性H77により攻撃した。T-細胞 応答を全抗原およびオーバーラップする ペプチドを用いる増殖およびエリスポット アッセイを用いて試験した。Ch6394はすべてのワクチン抗原に対するワクチン接種の後に特異的なT 細胞 応答を起こした。攻撃により、この動物はp.i. 1 週目にてウイルス血症になったが、最高のタイターは $<10^5$  コピー/mlでありウイルス 複製は即時に制御された(図9A-9C)。未処理動物において、タイターは7日ごとに~2-倍上昇したが、Ch6394においては、同じ期間内にタイターは30-倍低下した。しかし、10 週目において、ウイルス制御は失われ、動物は慢性感染を発症した。この欠失はNS3-特異的免疫応答(IFN- $\gamma$ 生産性 T 細胞頻度および増殖) の欠失を伴い、1 つはNS3 領域におけるものであり 1 つはNS5A 領域におけるものである 2 つのアミノ酸突然変異の発生と関連していた。エリスポット アッセイはこれら突然変異を担持するペプチドは、野生型 ペプチドと比較してCh6394からのPBMCによって認識されなくなることを示し、これらの変化が免疫エスケープ突然変異であることを示す。CD4 T 細胞からのエスケープはヘルパー機能の欠失を導いた可能性があり、それによるとこの動物におけるNS3特異的応答の欠失を説明することができる。これらの結果は HCV に対するT細胞に基づく ワクチンは感染を制御する能力を有することを示唆する。

#### 【 0 1 1 1 】

11. HCV 攻撃の前の未処理 チンパンジーの予防 ワクチン接種

a)特異的T 細胞応答がi.v. リガンド-リボソーム ナノ複合体 (scL-HCV) ワクチン 戦略を用いて未処理 チンパンジーにおいて誘発され、攻撃後に増強される

明細書中に記載されるようなscL-HCV ナノ複合体を用いる未処理 チンパンジーにおけるワクチン研究を行った。免疫応答を開始させるための注射をscL-HCV 複合体を用いて0、4および8 週目に行い、次いで組換え アデノウイルス (rAd) 追加免疫 (16 週目)を行った。動物をワクチン接種するのに用いた複合体は、0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA)の比にて、5% デキストロースを賦形剤として含め、チンパンジー重量に基づいておよそ0.164 mgDNA/Kg/注射にて作られた。調製した複合体をi.v. 注入のために250mlの 5% デキストロースバッグに注入し、動物に投与した。動物を32 週目 (追加免疫後16 週目)に攻撃した。ナノ複合体の注入およびアデノウイルス 追加免疫は良好に耐用され、いずれの動物においても有害な反応は起こらなかった。

#### 【 0 1 1 2 】

ワクチン接種後: エリスポット 研究は、2匹のワクチン接種した動物(Ch1611、Ch6407)においてワクチン接種16 週後に強力かつ広範に反応性のHCV-特異的 IFN- $\gamma$  応答を示し(図10A-10C)、空ベクター ナノ複合体および非-rAdを与えられた対照 動物 (Ch0257)に

10

20

30

40

50

においては最小または検出不可能な応答しか示されなかった。低-レベル IFN- $\gamma$  特異的T細胞応答がscLHK-HCVの接種の後にCh1611およびCh6407においてみられ、ワクチンのこのプライミング成分に対する免疫応答が示された。肝臓内 IFN- $\gamma$  およびCD3 mRNA レベルの上昇も2匹のワクチン接種した動物において免疫後に観察された(図12A-12C、12、16、および32週目)。データは、0週目(ワクチン接種前)に対するmRNA レベルとして表し、内因性対照(GAPDH)に対して正規化した。16および32週目におけるCD3 mRNAの上昇もまた、肝臓におけるT細胞浸潤を示す。対照動物(Ch0257)についてのサイトカインの上昇は免疫後および攻撃前(32週目)のいつの時期においてもみられなかった(図12A-12C)。このデータは、本明細書に開示する複合体およびアプローチを用いるワクチン接種の後に肝臓および末梢血においてT細胞応答が誘発されたことを示し、Ch6407および対照 Ch0257における(TransSignal Cytokine Antibody Array kit (Panomics)を用いる)血清 サイトカインの分析によって支持される。本発明者らは、最初のscL-HCV DNA ナノ複合体処理の2週間後、ICAM-1、様々なインターロイキン、TGF- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  を含むサイトカインの上方制御を、ワクチン接種したチンパンジーにおいてのみ観察し、対照動物においては観察しなかった。

#### 【0113】

攻撃後:免疫したチンパンジーを、当該技術分野において周知の標準的方法を用いて、32週目に100感染用量のHCVにより攻撃した。攻撃後、両方のワクチン接種した動物は、ウイルス複製の即時の制御を示し、これは、エリスポットアッセイにより測定したHCV-特異的T細胞応答の上昇(図11A-11C)および肝臓内サイトカイン応答の上昇と一致した(図12A-12C)。攻撃の際、両方の動物は依然としてワクチン抗原(NS3-NS5B)に対して特異的な検出可能なT細胞応答を有していた。攻撃後およびウイルス複製に応答して、これらの応答は上昇した。対照チンパンジーからのPBMCを用いるエリスポットアッセイでは、HCV-特異的応答は示されなかった(図11A-11C)。未処理感染動物の急性期における検出可能な免疫応答のこの非存在は、その他の公表された観察と一致する。肝臓内 IFN- $\gamma$  mRNAレベルは2匹の免疫化動物において攻撃の直後に上昇した(図12A-12C)。Ch6407およびCh1611についての34週目(攻撃後2週目)のベースラインを超えるそれぞれ8-および10-倍の上昇により証拠づけられる。これらの上昇は、肝臓におけるウイルス感染に対する即時の免疫応答を示す。対照動物において、肝臓内サイトカインレベルは攻撃の数週間後においてのみ上昇し始め、41週目まで免疫化動物におけるレベルと匹敵するレベルには至らなかった。

#### 【0114】

ウイルスタイターを0から8週目にリアルタイムPCRアッセイを用いて測定し、血清ALTレベルを0から6週目に測定した。図13は、両方のワクチン接種した動物が、対照チンパンジーにおいて観察されたものと比較して攻撃後に有意に低いウイルスタイターを示したことを示す。さらに、タイターは、対照チンパンジーにみられるように、そしてすべての未処理動物にみられるように、最初の5週間の間は指数関数的に上昇しなかった。実際、両方のワクチン接種した動物において、ウイルスタイターは、5週目まで4  $\log_{10}$  を超えて対照動物より低い。両方のワクチン接種したチンパンジーはまた、感染の2週間後にALT上昇を示したが対照チンパンジーは示さず、肝臓における迅速な免疫応答を示す肝臓内サイトカインデータを確認する(図14)。予測されたように、対照動物におけるALTレベルは感染の後期まで上昇しなかった。攻撃後のすべての動物の感染は予測されたものである。というのはこれはT細胞ワクチンであって、中和抗体および完全排除免疫を誘発するよう設計されていないからである。ウイルスの最初の複製が以前に誘発されたT細胞応答を刺激するために必要とされる。このデータは、このI.V. scLHK-HCV ワクチン戦略がウイルスによる感染によって復活するメモリーT細胞を誘発し、この復活応答が、ウイルス複製を迅速に制御することにおいて有効であることを示す。

#### 【0115】

### 12. 慢性的に感染したチンパンジーにおける免疫治療薬戦略の試験

HCV NS3、NS5AおよびNS5Bを含むワクチンを構築して、T細胞免疫治療薬ワクチンが

10

20

30

40

50

慢性的に HCV-感染したチンパンジーにおいて有効であるかどうかを判定した。裸 DNA prime (scL-HKではない) (i.m.) /組換え ワクシニア ウイルス (rVV) 追加免疫 レジメンを用いて慢性的に感染した チンパンジーを処置した。このチンパンジーは3 用量の裸 DNA をアジュバントとしてのCpG i.m.と組み合わせて送達するNS3、NS5AおよびNS5B ワクチンにより免疫された後、rVV 追加免疫されたものである。rVVの接種の後、末梢血におけるT 細胞応答は、NS3、NS5AおよびNS5Bについて12-20倍上昇した (図15)。しかし、HCV RNA および肝臓酵素のレベルには影響は無かった; RNA タイターは  $\sim 10^4$  RNA コピー/mlのままであり、処置前レベルと同様であった。肝臓内 IFN- および TNF- mRNAの分析の後、これらサイトカインのいずれの上昇もみられず、血液におけるT 細胞活性の上昇はHCV 複製部位における上昇をもたらさないことが示唆された。ウイルスを制御できないことは、肝臓においてT 細胞が機能できないことの結果である可能性がある。

10

#### 【0116】

4 匹の異なる慢性的に感染したチンパンジーに本明細書において記載されるように単純な混合によって作られた本発明のscL-HCV複合体をi.v. 注入した。複合体は、NS3、NS4B、NS5AおよびNS5Bをコードする遺伝子を担持するpSCMV プラスミド DNAをカプセル封入するもの、IL-2をコードする遺伝子を担持するpSCMV プラスミド DNAをカプセル封入するもの、または空ベクターをカプセル封入するものであった。複合体は体重に基づいて0.2mg/Kg/注射にて0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA)の比で単純に混合することによって作られる。5% デキストロースを賦形剤として添加する。DNAを複合体の調製の前に、HCV:IL-2についてはモル比1:1または空ベクター:IL-2については2.5:1にて混合する。3 匹の動物にscL/HCV-IL-2をワクチン接種し、1 匹には空ベクター-IL-2を担持する複合体を与えた。各動物には3 回の注射を4-6 週間間隔をあけて与えた。組換え アデノウイルス ベクターによる追加免疫を最後のワクチン接種の4 週後に行った。

20

#### 【0117】

研究は、HCV 抗原およびIL-2を発現する等モル量の組換え ベクターを用いてi.v. 送達されたscL-DNAまたはscLHK-DNA 接種を含む。すべての発現された遺伝子は同じバックボーン ベクター中にあるので、モル量でのDNA 比に基づいて、すべての発現されたインサートが同じように送達されることが確実となる。別々の HCVおよびIL DNAが等モル比のベクター インサートにて混合され、scLまたは scLHKにカプセル封入される。DNAは GLP 条件下で(Aldevron、ND) 内毒素-非含有調製物(< 5EU/mg DNA)として産生される。DNA ( $\sim 7$ mg/動物/注射)はチンパンジー の重量に基づいて複合体中にて投与される(0.17mg/kg)。この用量は60 kgのヒトに投与される用量にほぼ匹敵し、未処理 チンパンジーをワクチン接種するために以前に用いられた用量である。複合体を調製し、凍結乾燥し、再構成および注射のための動物の位置に運んだ。scL-HCV/IL-2またはscLHK-HCV/IL-2を3匹の動物に0、4、8および12 週目にi.v.送達する。このスケジュールを、免疫系に接種に対して応答する時間を与えるために用いる。4 週後にT-細胞 応答またはRNA タイターに対して効果がみられなければ、さらなる接種なしにはいずれの新しい効果もみられないと予測される。4番目 (対照動物)には空ベクターおよび IL-2 プラスミドと複合体化したscL またはscLHKを同じ時点に与えた。これにより、このサイトカインのみのHCV 感染に対する効果が識別される。4 用量の後にウイルス学的 応答が観察されなければ、予防 ワクチン研究において用いられたようにHCV 抗原NS3-NS5Bを発現するrAd ( $10^{11}$  感染単位)により追加免疫をして免疫応答およびウイルス タイターのモニタリングを続ける。肝臓指向性 ウイルスベクターの使用はまた、肝臓区画へのターゲティングの目的も達成する。

30

40

#### 【0118】

#### C. サンプリング

動物を24 週目まで研究する。サンプル収集は最初の接種の4 週前に開始する;これらサンプルをベースラインおよび陰性対照として用いる。サンプリングを最後の接種の8 週後まで続けることにより、処置が陽性の応答を与えるかどうかを判定する時間を確保する。研究の間にわたり、肝臓組織診をNIRC SOPによって規定されるMenghini技術によって二週間に一回行い、血液を大腿静脈を介して以下に詳細に示す研究に使用するために毎週採取

50

する。40mL の全血を偶数週(-4、-2、0、2週目など)に得て、5mLの血漿を奇数週(-3、-1、1週目など)に得る。プラスミドの安定性を判定するために、1 mLの血液を投与前および最初の接種の15分、1、3、8、24、48、および72時間後に収集する。その他のすべての血液採取および肝臓組織診は接種の前に得る。この出血スケジュールは、非-ヒト霊長類における血液収集についてのNIRCによって作成されたガイドラインに基づいている。1ヶ月に90mLを収集し、これは許容可能な限界の範囲内である。血液をヘパリンを抗凝固剤として用いて採取する。血漿を5 mL および1 mL体積から2700 rpmで10 分間の遠心分離によって得る。血漿 サンプルを500uL アリコートに分けて-80 で保存する。肝臓組織診の半分をホルマリンで固定し、半分を2mmの切片に切り分けて液体 N<sub>2</sub>で瞬間凍結する。

【0119】

#### D. 血液中のscL-HCVまたはscLHK-HCV 複合体の肝臓における存在および安定性の判定

本発明者らのマウスにおける予備的研究は、カプセル封入が有意に肝臓にみられる核酸の量を上昇させ、血液中に検出されうる時間を延長させることを示す。これらの知見は、チンパンジーにおけるカプセル封入されたHCV NS3-NS5B プラスミドにより確認される。注射の後どれほど長い間 HCV DNAが循環中に存在するかを調べるために、1 mLの血液を、投与前および最初の注射の15分、1、3、8、24、48、および72時間後に収集する。血漿を2つのアリコートに分けて-80 で凍結する。1つのアリコートをプラスミドの単離に用いる(High Pure PCR Template Preparation kit (Roche))。DNAを瞬間凍結した肝臓組織の1つの2mm の切片から単離する (DNeasy Extraction Kit (Qiagen))。陰性対照 サンプルは接種前に採取した同じ動物からの血漿および肝臓組織である。外来性 HCV プラスミドをPCRによって評価する。逆転写酵素の非存在下でのPCRの使用により、慢性感染に起因して存在するウイルス RNAからプラスミドを識別する。さらに、pSCMV バックボーンに位置する1つのプライマーとHCV インサートにおける1つのプライマーを用いる。したがって、外来性 DNAのみが増幅される。このアプローチはpSCMV ベクター中のその他のインサートでの使用が成功している (IND 体内分布研究についてp53)。定量するために、シグナル 標準を既知量のNS3-NS5B プラスミドを、感染していないチンパンジーからの血漿または肝臓組織に添加することにより調製し、次いで抽出を行う。FDAは用いられた動物からの多量のアーカイブしたサンプルを有している。スキャンしたゲルをIMAGEQUANT (登録商標) 画像分析 ソフトウェア (Molecular Dynamics)を用いて定量し、プラスミドの量を標準との比較により算出する。DNAを第2のアリコートの血漿、および瞬間凍結した肝臓組織の第2の切片から単離し、Stratagene DNA 抽出キットを用いるサザン分析に供する。接種の前に採取した血漿および肝臓組織を陰性対照として含める。ハイブリダイゼーションをGene Image Alkaline Phosphatase DNA Labeling and Detection System (Amersham)を用いて行う。上記のように、サザン分析による外来性 DNAの検出のためのプローブは、ベクターとインサートとの接合部をまたがる。このプローブはIDT, Inc. (Coralville, IA)により合成される。この方法はまた、組織における外来性 DNA の分析にも用いられた。標準を上記のように調製する。サンプルを次いでアガロースゲル、ブロッティングおよびハイブリダイゼーションによって分析する。10-から 50-倍過剰のプローブを用いることにより、すべてのバンドの飽和を確認する。スキャンしたオートラジオグラフをIMAGEQUANT (登録商標) ソフトウェア (Molecular Dynamics) を用いて定量し、プラスミド DNA の量を標準との比較により算出する。この非放射方法の感度レベルが低すぎる場合は、<sup>32</sup>P-ATP による5'-末端標識を用いてもよいし、またはネスト化 PCR を以前に記載されているようにして行ってもよい(Fernandez J., et al., J. Virol, 78, 9782-9789 (2004))。血液および肝臓におけるDNAを評価するために両方の方法を用いることにより、一つの方法が成功しなくても結果が確実に得られることになる。試験は三連で行い、それぞれの動物からの順次の血漿 サンプルにおけるプラスミド レベルを t-検定を用いて15分において観察されたレベルと統計的に比較し、経時的な DNA 濃度における有意な低下を評価する。統計的比較は肝臓については行わない。というのはこの組織についての研究は、この臓器におけるDNA の存在を調べるためであって、経時的安定性を調べるためではないからである。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 0 】

E. 慢性的に感染した チンパンジーのI.V. 接種の後のscLHK-HCV 複合体に対する応答の試験

## 1. 末梢血における免疫応答の評価

治療ワクチンを与えられた慢性的に HCV-感染したチンパンジーの末梢血における特異的T 細胞 活性の上昇は、肝臓におけるより高いT 細胞 活性および低下したウイルス タイターを必ずしも導くわけではない。したがって、これら動物の肝臓におけるT 細胞 浸潤およびサイトカイン 応答を分析することが必須である。しかし、末梢血が、誘発された免疫応答の程度および特異性を評価するための第一のソースとして用いられ得る。肝臓組織診は貴重であり制限されており、より多くのT-細胞が末梢血から得られる。肝臓の研究は、末梢血における免疫応答の上昇が、肝臓におけるより大きいT-細胞 活性と相関しているかどうかを判定するために用いられる。PBMCを、当該技術分野において以前に記載されているように フィコールグラジエント 遠心分離を用いて2週間に1回得られる全血から単離する(Puig M., et al., Vaccine, 22, 991-1000 (2004))。血漿をグラジエントの頂点から取り出し、-80 で 1mL および200uL アリコート中で保存する。およそ  $10^8$  のPBMCおよび15mLの血漿が40mLの全血から得られる。凍結細胞の1つの アリコート( $10^7$  /mL)を融解し、AIM-V 培地 (Invitrogen) + 2% ヒト AB 血清 (Biowhittaker)中で洗浄する。生細胞数を評価し、細胞をエリスポットにより試験する (Shoukry N.H., et al. J. Exp. Med., 197, 1645-1655 (2003))。各分析に用いる細胞の総数は、1つのアッセイにおいて試験する抗原の数に依存する。オーバーラップする ペプチドの完全なパネルを用いて(11 aaによりオーバーラップする18-mer、NIH Reagent Program)、1a ゲノムを包含させ、それに対応させる。これらのペプチドは、チンパンジーの感染に用いたウイルスおよび、scL-HCVまたはscLHK-HCVにおけるHCV プラスミドに用いた配列に対応する。サンプルをスクリーニングするための30-45のオーバーラップする ペプチドを含む10のペプチドプールを用いる。陰性 卵白アルブミン ペプチド 対照、陽性 フィトヘマグルチニン 対照および媒体対照を各アッセイに含める。サンプルを $10^5$  細胞/ウェルを用いて三連で試験する。サンプルを全ウイルス ゲノムをカバーするペプチドに対して試験する。ワクチンは抗原NS3-NS5Bに対する応答を刺激すると予測されるが、この刺激の結果、T ヘルパー 応答の上昇またはIL-2 産生の上昇が起こりえ、これはワクチンに含まれないウイルス抗原に対する応答の増強を導く。PBMCの前刺激およびIFN、IL4、IL2およびIL10を産生する細胞のエリスポット 分析を、1  $\mu$ g/ml の各個々のペプチドおよびヒト エリスポット試験キットにて96-ウェル プレートにおいて行う (U-Cytech, Netherlands) (Shoukry N.H., et al. J. Exp. Med., 197, 1645-1655 (2003))。特異的スポット形成単位(SFU)の数を、三連の試験ウェルの平均値から三連の対照 (抗原なし)の平均値を差し引くことによって計算する。T 細胞 増殖 アッセイを当該技術分野において以前に記載されているようにしてPBMCに対して96-ウェル プレート ( $10^5$  細胞/ウェル、三連)を用いて行う (Puig M., et al., Vaccine, 22, 991-1000 (2004))。細胞を1ug/mL のタンパク質 (NS3、NS5AまたはNS5B) (Mikrogen, Germany) またはペプチドで刺激する。後の研究のために CD4+ およびCD8+ T 細胞を抗-ヒト CD4+ または CD8+ dynabeads (DynaI)を用いて全集団から枯渇させ (Puig M., et al., Hepatology, 44, 736-745 (2006))、特異的抗原を認識する特異的細胞タイプを判定するために試験する。これらの研究から得られるデータはHCV-特異的 T 細胞 応答の増強の最良の指標を与える。結果を各動物についてワクチン前およびワクチン後のサンプルの間で比較する。t-検定を用いてワクチン接種の後のSFUの有意な上昇を評価する。末梢血に対する研究の結果を、肝臓内 T 細胞 浸潤、サイトカイン 応答およびウイルス RNA レベルの変化の分析と合わせてこの治療戦略の有効性を判定する。

## 【 0 1 2 1 】

## 2. 血漿 サイトカイン レベルにおける変化の検出

未処理 チンパンジーへのscL-HCVの接種後の血清 サイトカインの分析により、ワクチン接種した動物において多数の サイトカイン (ICAM-1、TGF- およびIFN-)の変化が示

10

20

30

40

50

されたが対照においては示されなかった。治療ワクチン接種後の血清 サイトカインのパネルにおける変化を調べ、処理前 サンプルおよび対照動物と比較する。サイトカインをワクチン接種前および後に採取した1-2mLの血漿についてTransSignal Human Cytokine Antibody Array kitを用いて分析する。感染していないチンパンジーからの正常血漿を陰性対照として含める。血清 サイトカインにみられる変化(種類とレベルとの両方)を肝臓におけるmRNA レベルにおいてみられたものと比較する。血清 サイトカインに対するこれらの研究をmRNAの肝臓内分析に加えて行う。mRNA 分析を定量し、統計的に分析し、肝臓におけるサイトカイン レベルの指標を提供する。末梢血における応答が肝臓において観察されたものを反映しているかを決定するためにこれらの分析を組み合わせることが重要である。サイトカインパターンにおける変化をメモリー T 細胞の持続と関連させる。正の相関は排除に関連する特異的T 細胞の存在を判定するより簡便な手段の開発に対する第一工程である。

10

#### 【 0 1 2 2 】

### 3. 組織学的およびサイトカイン 分析による肝臓におけるHCV-特異的 応答の評価

#### a) 肝臓に浸潤する T-細胞の存在についての試験

浸潤性T-細胞の証拠を組織学的 分析およびサイトカイン 応答によって肝臓において試験する。治療ワクチンを与えられた慢性的に感染した チンパンジーの末梢血におけるHCV-特異的 T 細胞 活性の上昇は、肝臓におけるより高いT 細胞 活性およびウイルス タイターの低下を必ずしも導くわけではない。したがって、これら動物の肝臓におけるT 細胞浸潤およびサイトカイン 応答を分析することが重要である。

20

#### 【 0 1 2 3 】

#### b) ホルマリン-固定した肝臓組織の分析:

ホルマリン 固定し、パラフィン包埋した 組織を切片とし、以下の特異的タンパク質および 細胞 マーカーについて染色する: CD4; CD8; パーフォリン; IFN- $\gamma$ ; IL-2; CD45RA/ROおよびCCR-7。T 細胞 集団は CD45RAおよび CCR7 の発現に基づいて同定することができる(Campbell J.J., et al., Journal of Immunology, 166, 877-884 (2001); Sallusto F., et al. Nature, 401, 708-712 (1999); Seder R.A. and Ahmed R., Nature Immunology, 4, 835-842 (2003))。肝臓 切片の免疫組織学的分析を、各組織診について肝臓に存在するリンパ球の数、種類および位置を識別するために行う。切片をキシレン中で脱パラフィンし、アルコール中で水分補給し、PBSで洗浄する。抗原賦活化のために、組織を10mM クエン酸緩衝液 pH 6.0 で100 $\times$ で10 分間処理する。組織切片上の非特異的部位を 5% ミルクでブロッキングした後、 特異的抗体とともにインキュベーションする。感染の前(以前の保存サンプル)および処理前に同じ動物から得た肝臓組織診を、比較のために用いる。これらの研究は標識化ストレプトアビジン-ビオチン技術およびDABを用いて開発された製品により行う。6つの視野を処理前および処理後切片について分析し、陽性 細胞タイプを計数する。この 染色方法により、門脈または特定の肝臓細胞タイプと比較しての肝臓内の細胞の位置を評価する。統計分析をT 細胞 浸潤についてt-検定を用いて行う。

30

#### 【 0 1 2 4 】

#### c) 瞬間凍結した肝臓組織の分析:

トータルRNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen, CA)を用いて瞬間凍結した 組織の一部から単離する。RNAをFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia)を用いて逆転写し、当該技術分野において以前に記載されているように IFN- $\gamma$ 、IL2、CD3、CD8、およびCD4に対する特異的プライマー プローブセットを用いて サイトカイン mRNA レベルについてリアルタイム PCR により試験する(Major M.E., et al. Hepatology, 39, 1709-1720 (2004))。これらサイトカインレベルを内因性 対照 (GAPDH)に対して正規化し、各動物について処理前 組織診におけるレベルと統計的に比較する (Thimme R., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 99, 15661-15668 (2002))。同時に凍結肝臓組織の小さい部分を用い、TransSignal Human Cytokine Antibody Array kit (Panomics)を用いて36のサイトカインのパネルのタンパク質 レベルを同時に分析する。

40

#### 【 0 1 2 5 】

50

## F. 毒性評価

慢性的に感染した個体における肝臓に関連する治療ワクチンの効果の研究が特に重要である。ワクチンは肝臓における免疫応答の増強に起因してウイルス タイターの低下を導きうるが、それは肝炎を悪化させ、肝臓疾患を導く可能性がある。チンパンジーからの血清および肝臓組織を毒性の指標である肝臓-特異的 酵素および組織病理学的 変化について分析する。血漿のアリコート (2mL)を肝臓 機能に特異的な以下のマーカーのパネルについて民間試験所 (ANTECH Diagnostics)によって毎週試験する: 総ビリルビン、ALT、アルカリホスファターゼ (ALP)、血清 アルブミン、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)。接種の後<2 週間持続する正常範囲を超えるこれらマーカーのレベルの上昇は許容可能とみなす。正常範囲を超える持続的レベルは毒性を示す。これは肝臓 疾患に特異的なわずかな試験の1つであるため (McIntyre, N. and Rosalki, S. Biochemical investigations in the management of liver disease. In: Oxford Textbook of Clinical Hepatology McIntyre, Benhamou, Bircher, Rizzetto and Rodes (eds). Oxford University Press, 293-309. (1991))、処理前および処理後の ALT レベルを各動物について比較し、毒性を統計的に評価する。

## 【0126】

アポトーシスを評価するため、組織をインサイチュ細胞死検出キットである TMR Red (Roche)を用いて改変蛍光 TUNEL アッセイにより染色する。このシグナルは近赤外範囲において発光し、アルゴンレーザーの下での赤血球 細胞の自己蛍光により、肝臓 切片におけるアポトーシスについてのシグナルとしてFITC よりも優れている。蛍光強度および分布をLaser Scanning Cytometer (LSC)を用いて評価する。これはスライドに基づく装置であり、フローサイトメーターと類似の様式で作動し、FITC、PE、PI、Cy5 およびDAPIを検出する。走査設定を最適化し、バックグラウンド、陰性および陽性 シグナルを測定する同じプロトコールによって、すべてのサンプルに対して適用する。ヒストグラムとして示されるデータはCompucyte プログラムによるシグナルの統計分析および組織における陽性 アポトーシス シグナルの領域のパーセンテージならびにシグナル強度の定量評価を可能とする。

## 【0127】

H&E 染色した肝臓切片を、組織病理学的変化について有資格の獣医病理学者によって評価する。処理前および処理後の切片をIshak スコア付け システム (0-4 スケール)を用いてランク付けして慢性肝炎について評価する(Ishak K., et al., Journal of Hepatology, 22, 696-699 (1995))。これは肝臓組織診のランク付けのための確立された方法であり、臨床設定において広く用いられている。ランク付けは、門脈、門脈周囲および腺房内の炎症性細胞 浸潤および肝臓細胞傷害および壊死の評価を含む。肝臓 毒性を分析するためにこれら3つの方法を用いることにより、将来の臨床用途についての安全性を評価するためのこの臓器に対するこの治療ワクチンの効果の完全像が提供される。

## 【0128】

## G. ウイルス タイターの変化のモニタリング

scL-HCV または scLHK-HCV治療アプローチの免疫応答および成功の最初の試験は、血液におけるHCV RNA タイターの変化である。これらは院内のリアルタイム RT-PCR アッセイを用いて判定する (Major M.E., et al., J. Virol, 73, 3317-3325 (1999); Major M.E., et al., J. Virol, 73, 3317-3325 (1999))。トータルRNAを処理前および処理後出血からの200  $\mu$ Lの血清からTriZol (Invitrogen)および当該技術分野において以前に記載されているようにして行う(Major M.E., et al., J. Virol, 73, 3317-3325 (1999); Fernandez J., et al., J. Virol, 78, 9782-9789 (2004)) RT PCRを用いて単離する。RNAをレブリカウエル(n=4)に分け、RNA 濃度を 一連の HCV RNA 標準を用いて算出し、RNA コピー/mL血漿として表す。本発明者らはクリーンな制御された条件下でHCV 配列を増幅する経験を非常に多く有する(Major M.E., et al., J. Virol, 73, 3317-3325 (1999); Fernandez J., et al., J. Virol, 78, 9782-9789 (2004))。手順を汚染を避けるため別々の部屋で行い、すべての場合において指定されたピペットおよび試薬を用いる。すべての抽出にお



いて、感染していないチンパンジーからの陰性対照血漿を含め、抽出された RNA を RT-PCR アッセイにおいて用いる。処理前および処理後 RNA タイターを比較してタイターにおける統計的に有意な変化を判定する。肝臓よりもむしろ血漿をウイルス RNA タイターについて分析する。肝臓組織診は制限されており、血漿におけるタイターは肝臓におけるレベルの直接的な指標である。動物がウイルスの排除を示す場合のみ、肝臓を ウイルス RNA について、40 RNA コピー/mL程度さえ検出するより感度の高いネスト化 PCRにて試験する (Major M.E., et al. Hepatology, 39, 1709-1720 (2004), Puig M., et al. J. Virol. Methods, 105, 253-263 (2002))。

#### 【 0 1 2 9 】

標的化 治療ワクチンが、RNA タイターの低下、肝臓内 T 細胞、肝臓内 サイトカイン および末梢HCV T-細胞 応答の上昇を導く場合、これは、HCV-特異的 応答が、特に対照動物と比較して肝臓において機能していることの強い指標である。肝臓内 T 細胞および サイトカイン レベルが上昇するが、ウイルス RNA タイターが 低下しない場合、これは誘発されたT 細胞が、エスケープ 突然変異またはT 細胞機能不全によってウイルス エピトープを認識しなかったことを示唆する。RNA タイターの一過性の低下、次いで、処理前レベルへの復活は、新たに 誘発されたT 細胞 応答をエスケープするためにウイルスにおいて突然変異が発生していることの指標である。これは復活前および復活後のウイルスの配列 分析を介して調べる。突然変異が観察される場合、T 細胞 エスケープを、PBMCおよび突然変異を含むことが判明した領域にわたる新旧のアミノ酸 配列を表すペプチドを用いてインビトロで試験することが出来る。

#### 【 0 1 3 0 】

慢性的に HCV-感染したチンパンジーにおけるこれらの研究は慢性的に感染した 患者において使用されうるHCV-特異的 治療ワクチンの評価に必須である。HCV-特異的T細胞応答の増強が臨床処理のために許容されないレベルへと肝臓の炎症を上昇させないことを示すことが重要である。

#### 【 0 1 3 1 】

##### 実施例 2

##### 免疫リポソームの鼻腔内 (IN) 投与

IN 経路を介するワクチン投与は、特定のタイプのウイルス、例えば、頭頸部の組織(これには鼻および喉が含まれる)に対して指向性を有するものに対して特に有用である。例としては呼吸器疾患を誘発するウイルスが挙げられ、呼吸器疾患にはインフルエンザのみならずSARSおよび鳥インフルエンザも含まれる。しかし、この経路はその他のタイプのワクチンの送達にも同様に利用可能である。INにて与えられた場合に、scL 複合体が局所組織を標的化し、トランスフェクトする能力を比較するため、非腫瘍担持 BALB/cマウスに、ルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミド DNAをカプセル封入するscL ナノ免疫リポソーム複合体(scLLUC)、または等量の遊離の複合体化していない (裸) プラスミド DNA (LUC) (両方の処理について10 ug/マウス/用量)を与えるか、あるいは処理をしなかった (CTL)。実施例 1におけるように、0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA)の比にて、5% デキストロースを賦形剤として用いて、単純な混合によりscLLUC 複合体を調製した。2回の用量を24 時間以内に投与した。最後の投与の48 時間後、動物にルシフェリン 基質 (i p 投与) を ~3mg/マウスにて注入し、動物全体を、IVIS 100 光学イメージング システム (Xenogen, Alameda CA) を用いて麻酔下で可視化した(図16A-16C)。現れたシグナルの強度は実際の測定においては色によって示される。赤色/黄色は最も高い強度であり、トランスフェクトされたルシフェラーゼ 遺伝子の最も高い発現レベルに対応し、一方、青色は最小の 発現を表し、緑色は中程度の発現である。これらの発現レベル(高/中程度/最小)をカラー表示の代わりに図16A-16Cおよび17A-17Cに示した。図16A-16C から、scL 複合体 (scLLUC)のIN 投与(パネル C)の結果、遊離の裸 DNA (LUC) (パネル B)と比較して鼻領域におけるトランスフェクション/発現のより高いレベルがもたらされたことが明らかである。パネル Aは非処理対照を表す。scL ナノ免疫リポソーム複合体と裸 DNA との両方がトランスフェクトされる組織に直接的に投与(局所送達)された場合に、scLナノ免疫

リポソーム複合体が裸 DNA (今回用いられたような)よりもかなり良好な結果をもたらしたということは、驚くべき予期せぬことである。

#### 【0132】

A. 静脈内投与の後に裸 DNAと比較してプラスミド DNA ペイロードの分布および局在が増強されることの実証

IVIS 100 光学イメージング システム (Xenogen、Alameda CA)を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミド DNAをカプセル封入するscL ナノ免疫リポソーム複合体(scLLUC) (上記のもの)、または等量の遊離の複合体化していない (裸) プラスミド DNA (LUC) (両方の処理について25ug/マウス/用量) をIV 尾静脈 注射を介して与えた、非腫瘍担持 BALB/cマウスまたは非処理マウス (CTL)を画像化した。2 用量を24 時間以内に投与した。最後の投与の48 時間後、動物にルシフェリン 基質 (ip 投与)を~3mg/マウスにて注入し、動物全体を麻酔下で可視化した。図17A-17Cに示すように、尾部における注射部位を除いては裸 DNA (パネル B) を与えたマウス(LUC)においては シグナルはみられない (口での少量はおそらく注射部位でのなめる行為による)。一方、同じ量の プラスミド DNAを担持するscL 複合体の静脈内投与の後は(scLLUC) (パネル C)、動物のほぼ全体にわたって中程度から高レベルのシグナルがみられた。パネル Aは非処理対照を表す。リンパ節および肝臓が位置している位置ではより強度が高い。これはおそらく、 樹状細胞およびクッパー 細胞が実際にトランスフェリン 受容体を発現しており、そのため複合体を取り込むことができるという事実に起因する。しかし、正常の非腫瘍組織におけるこの高レベルの取り込みおよび発現は、予期せぬ驚くべきことである。

#### 【0133】

##### 実施例 3

マウス モデルを用いるインビボでの肝細胞へのscL-HCVまたはscLHK-HCVの送達の最適化

リポソーム複合体中の20から30  $\mu$ gのDNAを24 時間かけて2-3回の接種により尾静脈を介して複数連のマウスにリポソーム複合体を介して送達する。リポソームの特定の細胞タイプへのエンドサイトーシスを追跡するために、ローダミン-DOPEで標識したリン脂質を総脂質の0.05 モルパーセントにて用いる (Avanti Polar Lipids, AL)。組織 サンプルをウェスタンブロット、組織学的 染色により分析し、細胞の高分解能 イメージングはHCV 特異的タンパク質の発現について注射の24-48 時間後にフローサイトメトリーによって行う。組織学的分析のために、組織をTissue-Tek培地中に瞬間凍結するか、またはホルマリン固定する。組織をクリオスタットまたはミクロトームを用いて切片とし、特異的タンパク質または細胞 マーカーについて染色する。パラフィン包埋し、ホルマリン 固定した組織について、切片をキシレン中で脱パラフィンし、アルコール中で水分補給した後、PBSで洗浄する。抗原賦活化のために、組織を10 mM クエン酸緩衝液 pH 6.0 によりマイクロ波で100 で10 分間処理する。冷却および洗浄の後、内因性 ペルオキシダーゼ 活性のクエンチングを0.3%  $H_2O_2$ を用いて達成する。組織 切片上の非特異的部位を次いで5% ミルクまたは正常 血清でブロッキングした後、特異的抗体とともにインキュベーションする。

#### 【0134】

フローサイトメトリーによる肝細胞の分析のために、フローサイトメトリー 分析のためにマウスから全肝臓細胞および常在性 T 細胞を単離するための灌流 技術が開発された。マウスを手順にわたって麻酔下で維持することにより、血圧を最初に維持する。これにより静脈の崩壊が妨げられることにより、次に行う カニューレ挿入の成功率が上昇する。マウスをイソフルランで麻酔し、ノーズ・コーンの装着によって手順の間中麻酔を維持する。腹部を切開して肝臓を露出させ、腸管をマウスの左側に移して門脈を露出させる。24G IV 注入セットを門脈に挿入する。肝臓をあらかじめ温めておいたLiver Perfusion Medium(Gibco; 肝臓を血液から洗浄し、凝固を防止し、細胞と細胞との接着をゆるめることを開始させるよう製剤された緩衝平衡塩類溶液) により5 分間3ml/分にて灌流する。あらかじめ温めておいた Liver Digest Medium (Gibco;生きた肝臓細胞の解離のための条件付き(qualified) Collagenase-Dispase 培地)で 肝臓を 3ml/にて10-12 分間灌流する。

肝臓 をついでマウスから取り出し、氷上に置く。肝細胞を取り出し、100  $\mu\text{m}$ 篩に通すことにより細胞片から精製し、次いで低速遠心分離に供する。ローダミン-標識化リボソームを用いることにより、細胞をフローサイトメトリーにより直接的に分析してリボソーム/DNA 複合体のトランスフェクション 効率または細胞内局在を判定することが出来る。複合体の肝細胞への取り込みを、脾臓 細胞による 取り込みまたは非-標的化 リボプレックスの取り込みに対してフローサイトメトリーを用いて比較する。細胞を低速遠心分離によって脾臓 細胞片から単離する。赤血球 細胞を ACK 溶解緩衝剤 (Biowhittaker、MD)によって溶解し、洗浄後、細胞を100  $\mu\text{m}$  細胞 濾過器 (Falcon、BD、NJ)に通す。さらなる組織をDNAのその他の臓器への取り込みを分析するために取り出す。具体的には、腎臓、心臓および肺 組織を取り出し、タンパク質 抽出物をウェスタンブロットにより分析する。

10

#### 【 0 1 3 5 】

##### A. インビボ有効性についてのscL-HCVまたはscLHK-HCVの用量 最適化

BALB/cマウスを用いて、持続的な肝臓酵素の上昇の非存在下での良好な免疫応答を達成するための最適 生物学的 用量 (OBD)を決定する。対照として、遊離の(複合体化していない) プラスミド、空ベクターを担持する改変リボソームおよびHCV遺伝子を欠く非組換え アデノウイルスを用いる。群あたり5匹の動物を用いる。最も高い投与用量は約 50  $\mu\text{g}$ である。マウスの群に、1、5、10、20、および50  $\mu\text{g}$ /注射を含むリボソーム/DNA 複合体(実施例 1に記載のように調製)を静脈内注射により与える。接種は0および4 週目に行い、次いで10 週目にアデノウイルス 追加免疫を行う。この追加免疫の4 週後、肝臓および脾臓をフローサイトメトリーおよびインビトロ試験により分析し、上記のような免疫の際に誘発されたT 細胞の特徴および特異性を判定する。この実験を簡略化するために、対照動物には最も高い 用量の DNA およびアデノウイルスのみを与える。動物を肝臓 酵素および肝臓における組織学的 変化についてモニターする。OBD がいったん確立されたら、この用量を各注射について用いるが、注射の回数は4 週間隔で1から5回まで変動させ、次いで最後の注射の6 週後にアデノウイルス追加免疫を行う。4 週間後に、肝臓および脾臓を最適 応答をもたらす注射回数を判定するために上記のように分析する。

20

#### 【 0 1 3 6 】

##### B. 誘発されたT 細胞応答の交差反応性

米国において支配的なHCV 遺伝子型は1aであるが、ワクチン 開発においては2 以上のHCV 遺伝子型からのウイルス エピトープの認識に取り組む必要がある。誘発された免疫応答の交差反応性を、遺伝子型1bおよび2aからのコンセンサス 配列に対応するオーバーラップする ペプチドを用いてマウスにおいて評価する。1a H77 ゲノム 配列に対応するオーバーラップする 18 mer ペプチドの完全なセットはNIH AIDS Research and Reference Reagent Programによって提供されている。この同じプログラムにより1b J4 遺伝子型に対応する類似のセットのオーバーラップする ペプチドが入手可能である。タイプ 2 ペプチドセットはMimotopes (Washington、NC)から購入した。患者集団において起こりうる交差反応性をよりよく評価するために、これら分析を上記のHLA-A2 トランスジェニック マウスを用いて行う。これらマウスはHLA-A2 MHC 分子を発現し、HLA-A2 エピトープを提示することが出来る。異なる遺伝子型を表すペプチド プールに対する応答をエリスポット アッセイを用いて評価し、免疫のために用いられる1a H77 配列に対応するペプチドと並行して行う。交差反応性が観察されなければ、三価のワクチンを3つのすべての遺伝子型に対応するDNA プラスミドを含むナノリボプレックスを用いて試験すべきであり、次いでそれぞれこれら3つの異なる遺伝子型に対応する3つのrAd を用いる追加免疫を行う。各個々の遺伝子型に対する免疫応答を評価し、個々の遺伝子型配列を単独で用いた場合に得られる応答と比較する。

30

40

#### 【 0 1 3 7 】

##### C. インビボでの安全性研究

scL-HCV またはscLHK-HCVのマウス LD<sub>50</sub>は上記のように判定されるOBDに基づく。OBDから出発して、徐々に増加する用量のプラスミド DNA (100  $\mu\text{g}$ まで)を、5 週間毎週1回注入する。複合体における成分の比は決められているので、プラスミド DNAの量を増やすこ

50

とにより、複合体(実施例 1のように調製)中のTfRscFvおよびLipまたはLip-HKの量も上昇する。scL-HCV またはscLHK-HCVを、10 マウス/群の雄性および雌性 4-6 週齢 BALB/cマウスにi.v.、i.p.、i.m.またはi.d. 注入する。動物の重量を週に2回評価し、毒性(例えば、消耗)の兆候について毎日モニターする。遊離 プラスミド DNAまたは非リガンド化リボソーム-DNAを与えた動物を対照として用いる。短期毒性を評価するため、最後の注射の2日後にマウスの半数を屠殺する。残りの半分は最後の投与の2週後に屠殺して長期毒性を評価する。肝臓、性腺、肺、膵臓、腎臓、心臓、皮膚、脾臓、脳、腸、および骨髄を含む様々な臓器および組織を組織学的に調べる。肝臓酵素レベルも週ごとにモニターする(Antech Diagnostics)。臓器からの組織 サンプルを瞬間凍結し、DNA 抽出のために-70℃で保存する。PCR 分析をすべての組織サンプルについて行って接種後のすべての組織におけるscLHK-HCVの体内分布およびDNAの持続を評価する。HCV遺伝子に特異的なプライマーは入手可能である。

#### 【0138】

DNA/リボソーム複合体についてのLD<sub>50</sub>がいったん確立されると、以下の一工程での用量が、徐々に上昇する用量の組換え アデノウイルスと組合せて雄性および雌性 BALB/cマウスの処理に用いられる。10 マウスからなる各群に 1または3 回のscL-HCVまたはscLHK-HCV (実施例1のように調製)のi.v.、i.p.、i.m.、または i.d. 注射/週を5 週間与え、次いで徐々に上昇する用量の組換え アデノウイルス (10<sup>8</sup> から 10<sup>9</sup> 感染単位)を週に2回3週間皮下(s.c.) 投与する。上記のように、マウスの半分を最後の投与の2日後に屠殺して 短期応答を評価し、半分を2 週間後に屠殺して長期応答を評価する。性腺、肺、膵臓、腎臓、心臓、皮膚、脾臓、脳、腸、および骨髄を含む臓器および組織を組織学的に分析し、肝臓組織学について特に強調する。血液を採取し、肝臓 酵素をこの研究の間毎週評価する。脾臓を取り出し、T 細胞応答について分析し、トレランス 誘発がこれらの動物において起こっているか否かを評価する。

#### 【0139】

血漿薬物動態分析および体内分布研究を雄性および雌性ヌードマウスにおいて行う。動物にはscL-HCVまたはscLHK-HCV 複合体 (実施例1のように調製)をOBDにて1回i.v.、i.p.、i.m.、またはi.d. 注射する。血液 サンプルを麻酔下で心穿刺を介して、複合体投与前および複合体投与の5 分後、15 分後、30 分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、24時間後、48時間後および72時間後に、抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを含むチューブ中に得る。マウスを安楽死させ、肝臓、膵臓、性腺、脾臓、腎臓、肺、心臓、リンパ節および脳を迅速に切り出し、氷冷生理食塩水ですすぎ、ドライアイスで瞬間凍結する。血液サンプルを3000 rpmで10 分間4 で遠心分離して血漿を細胞から分離する。血漿および組織サンプルの両方を-80℃で保存する。

#### 【0140】

血漿、および組織サンプルにおけるHCV プラスミド 濃度を決定する。簡単に説明すると、プラスミド DNAをフェノール・クロロホルム抽出法を用いて血漿 サンプルから、そしてDNA 抽出キット(Stratagene, La Jolla, CA))を用いて組織 サンプルから単離する。HCV 濃度標準を既知量のプラスミドをブランク 血漿 またはブランク 組織 サンプル中に添加することによって調製し、次いで抽出する。抽出物を次いでアガロースゲル、プロッティングおよびハイブリダイゼーションによって分析する。ハイブリダイゼーションはGene Image Alkaline Phosphatase DNA Labeling and Detection System (Amersham)を用いてHCV 配列をプローブとして用いて行う。10-から50-倍過剰のプローブを用いてすべてのバンドの飽和を確実にする。オートラジオグラフをスキャンし、IMAGEQUANT (登録商標) ソフトウェア (Molecular Dynamics) を用いて定量し、様々な サンプルにおけるプラスミド DNAの量を標準との比較により算出する。あるいは、プローブを <sup>32</sup>P-ATP により5'-末端標識するかまたはHCVに特異的なネスト化 PCRを行う。血漿 薬物動態 パラメーターを標準的方法によって評価する(例えば、Gokhale, P.C., et al., Gene Therapy 4: 1289-1299 (1997)を参照)。

#### 【0141】

霊長類における肝臓へのターゲティングの安全性および効率の評価

用量 応答 研究をアカゲザルにおいて scL-HCVまたはscLHK-HCV (実施例1のように調製)およびアデノウイルス 組換え体を用いて行う。特異的メモリー マーカーを担持する最良のHCV-特異的 T 細胞を誘発する免疫系および用量を、アカゲザル モデルにおける出発用量として用いる。アカゲザルにscL-HCVまたはscLHK-HCVを接種し、s.c. 送達により 10<sup>12</sup> 感染単位までの組換え アデノウイルスにより追加免疫する。提案されるワクチン接種 レジメンは0 および 3 ヶ月目のDNAプライムおよび追加免疫、次いで6 ヶ月目のアデノウイルスからなる。対照群には空ベクター 遊離 プラスミド DNAと複合体化したscL-HCVまたはscLHKおよび非組換え アデノウイルスを接種する。

【0142】

第一の研究は4 群 (3のワクチンおよび1の対照)を用い、群あたり動物は2 匹とする。群1-3 には徐々に上昇する用量のナノ複合体 scL-HCVまたはscLHK-HCVを与えるが、rAd 接種は上記のマウスにおける用量 最適化 研究から決定されたレベルに維持する。群 4は対照群であり、scL またはscLHK-空ベクターを与えた後、非組換え アデノウイルスにより追加免疫する。応答におけるプラトーが観察されると、プラトーの中央におけるscL-HCVまたはscLHK-HCV 用量にて残りの4 匹の動物を用いて免疫 研究を行い、rAd 用量を0.5 log<sub>10</sub>上昇させる(2 群の 動物、群あたり2匹の動物、2回の上昇用量のrAd)。研究 1における対照 群からのデータはこれら動物についての対照データを提供する。プラトーが観察されず、最小の ALT 上昇による用量上昇と比較して免疫応答が上昇すると、第二の研究を上昇用量のscLHK-HCVを用いて残りの4匹の動物において行う。

【0143】

ワクチン接種したアカゲザルにおいて、末梢血および肝臓の両方においてエリスポット、フローサイトメトリーおよび組織学的分析を用いて特異的免疫およびメモリー T 細胞の証拠を評価する。経皮的 肝臓 組織診を月に2 回行う;組織 サンプルの半分を培地に入れ、4 分の1を液体窒素で瞬間凍結し、4 分の1をホルムアルデヒドで固定する。肝臓切片の免疫組織学的 分析を行って、各接種の後に2-4 週間隔で肝臓に存在するリンパ球の数、種類および位置を識別する。特にこの種における メモリー T 細胞サブセットの同定における有用なマーカーであると考えられるCD95、CD45RA/CD45RO、CD62LおよびCD28の発現を評価する。

【0144】

アカゲザルのハプロタイプを決定し、末梢血において同定されたT 細胞エピトープを用いる。テトラマーを作り、マウス T 細胞 分析について上記したようにフローサイトメトリー 分析によりメモリー T 細胞の特異性を示すのに用いる。既知のT 細胞 エピトープおよび多色フローサイトメトリー表現型により、T 細胞に関連するサイトカインおよび細胞溶解 分子が非常に少数の細胞を用いて評価することが出来る。血液をALT 上昇について分析し、組織をアポトーシスのマーカーについて染色して、肝臓における細胞がブラ イミングの際に誘発されたHCV 抗原に特異的な細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の作用によってアポトーシスを経ているかどうかを判定する。

【0145】

E. 慢性 チンパンジーのリボソーム/DNA 複合体による処理

scL-HCVまたはscLHK-HCV/アデノウイルス ワクチンを慢性 チンパンジーにおいて治療 ワクチンとして用いる。4 匹の慢性的に感染した チンパンジーはすべて最初は遺伝子型 1a (H77 株)に対応する単一配列 モノクローン性ウイルスにより感染されている。これらの 動物は3.5-5年間慢性的に感染している。HCVはRNA ウイルスであり、それゆえゲノムは複製の際に突然変異を受ける。この同じモノクローン性ストックの接種後に持続的に感染している動物からのウイルスはおそらく免疫圧の結果として、感染のおよそ 6 ヶ月後には突然変異を蓄積している。感染の38 週後にCh6412から単離したウイルスについての配列データが準備された。完全なコード領域の分析により9 アミノ酸の変化が明らかとなり、そのなかの6つはNS3、NS5AおよびNS5B 領域に位置していた。循環しているウイルスゲノムにおけるこれらの突然変異にもかかわらず、野生型配列をこれらの動物における治

療ワクチンにおいて用いる。多数の よく保存されたエピトープに対応する野生型配列の使用は、ウイルス タイターの低減に有効である。主要エンドポイントとして、ウイルス RNA タイターの低下を、第二のエンドポイントとしての処理前 レベルと比較して、各動物の血清において評価する。上昇した T 細胞 活性を肝臓において測定し、肝臓内 サイトカイン mRNA レベルの上昇も測定する。処理前 レベルと比較して、 $0.5 \log_{10}$  を超える RNA タイターの低下および2-倍を超えるT 細胞数またはサイトカイン mRNA レベルの上昇を、有意であるとみなす。2 匹の動物には治療ワクチンを接種し、2 匹の動物にはベクター 対照を接種する。

#### 【0146】

治療ワクチンについては、OBDにてi.v.で、3-週間隔で3回scL-HCVまたはscLHK-HCV (実施例1のように調製)を送達するか、または対照 動物については空のDNA ベクターを送達する。最後の DNA 接種の4週間後(13週目)、これら同じ HCV 抗原を発現する組換え アデノウイルス( $10^{12}$  感染単位、i.v.)または非組換え ウイルスを投与する。動物を6 ヶ月まで追跡する。研究に渡って、組織診を2週間に1回得、血液(20-50ml)を毎週得て、動物を血清 ALT 上昇、HCV RNA タイターおよび肝臓内 T 細胞 浸潤についてモニターする。HCV RNA タイターをHCVの5' UTR およびコア 領域を標的とするプライマーおよびプローブを用いるリアルタイム RT-PCR アッセイを用いて判定する。特異的免疫およびメモリー T 細胞の増強の証拠を末梢血と肝臓との両方において、エリスポット、フローサイトメトリー および組織学的 分析を用いて調べる。経皮的 肝臓組織診をKlatskin 技術によって行う;組織 サンプルの半分を培地に入れ、4分の1を液体窒素で瞬間凍結し、4分の1をホルマリン固定する。

#### 【0147】

#### F. 新鮮な肝臓組織の分析

リンパ球を肝臓組織診から機械的ホモゲニゼーションによって単離し、次いで洗浄および計数を行う。細胞をCD4、CD8、CD45RA/CD45RO、CD95、CD62Lおよび CD28に対する抗体(BD Pharmingen)で染色し、数をフローサイトメトリーによって判定する。事象をFACS-Calibur (Becton Dickinson)を用いて獲得し、死細胞の排除のために7AAD (BD Pharmingen)を用いる分析のためにソフトウェアCellquest (Becton Dickinson)を用いる。マウスおよびアカゲザル研究について記載したように、テトラマーを処理したチンパンジーからの特異的T細胞の機能の研究に用いる。

#### 【0148】

チンパンジーにおいて、MHC ハプロタイプはPatr (チンパンジー(Pan Troglodytes))型として知られている。これらPatr 対立遺伝子のいくつかがチンパンジーおよび慢性動物について同定されており、これら動物のそれぞれからのT 細胞によって認識されるPatr 対立遺伝子およびHCV エピトープ配列が同定されている。これら動物における循環するウイルスは、持続的な感染の際に突然変異を組み込んでおり、それはおそらく以前に同定されたエピトープにおけるものである。T 細胞エピトープの詳細な分析の後に、新しいテトラマーをフローサイトメトリー 分析における使用のためにT 細胞 エピトープを用いて合成する。T 細胞 クローンもインビトロでのより長期の分析のために開発する。リンパ球を100,000のガンマ照射されたPBMC、0.01  $\mu$ g/mlの抗-CD3および 100 U/mlの1L-2を用いてクローン化する。

#### 【0149】

#### G. 瞬間凍結した肝臓組織の分析

トータルRNAを RNeasy Mini Kit (Qiagen、CA)を用いて瞬間凍結した組織から単離する。RNA をFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia)を用いて逆転写し、リアルタイム PCRによって、IFN-、CD3、CD8、および CD4 についての特異的プライマー プローブセットを用いて(Perkin-Elmer Applied Biosystems、CA) サイトカイン mRNA レベルについて試験する。これらサイトカインのレベルを内因性対照 (GAPDH)に対して正規化し、それぞれの動物についての処理前組織診におけるレベルと比較する。サイトカイン mRNA レベルの2-倍を超える上昇または低下を有意であるとみなす。

## 【0150】

## H. ホルマリン-固定した肝臓組織の分析

ホルマリン固定した組織をマイクロトームを用いて切片とし、アポトーシスの特異的タンパク質、細胞 マーカーまたはマーカーについて染色し、肝臓における細胞がワクチン接種の際に誘発されたHCV 抗原に特異的なCTLの作用に起因してアポトーシスを経ているかどうかを判定する。免疫組織学的 分析を肝臓切片に対して行って、各組織診について肝臓に存在するリンパ球の数、タイプおよび位置を識別する。切片をキシレン中で脱パラフィンし、アルコール中で水分補給した後、PBSで洗浄する。抗原賦活化のために、組織を10 mM クエン酸緩衝液 pH 6.0で マイクロ波で100 で 10 分間処理する。組織切片上の非特異的部位を次いで5% ミルクまたは正常血清によりブロッキングした後、特異的抗体と

10

## 【0151】

## I. フェーズI 臨床試験に向けての正式な薬物動態および毒性学研究

毒性学研究を低い (OBDまたはLD<sub>10</sub>より10x低い)および高い (OBDまたはLD<sub>10</sub>より10高い) 用量の実施例 1に記載のように調製されたこれらscL-DNAまたはscL-HK-DNA 複合体を用いて1つの対照群 (30匹のマウス)および 2つの処理群(それぞれ30匹のマウスであって、半数は雄性であり半数は雌性)について行う。複合体の注入を上記に決定した投与スケジュールにて1日目から開始する。各群からの10匹のマウスを最後の注射の2日後、3週間後および6週間後に屠殺する。体重および食餌摂取を毎日モニターする。対照および処理群についての臨床病理 (尿血液学、臨床化学、特に肝臓酵素)および組織病理学を評価する。以下の臓器を含める: 注射部位、脳、脾臓、鼠径リンパ節、骨髓 (組織およびスミア)、肝臓、腎臓、精巣/卵巣、脾臓、肺、心臓。

20

## 【0152】

体内分布研究: この研究には、複合体の単回注射の後4つの時点(2日間、2週間、4週間、および6週間)にて最も高い 用量にて1つ対照 (10匹のマウス)および4つの処理群(それぞれ10匹のマウス)を含める。すべての群における以下の臓器について上記のようにDNA PCR による分析を行う: 肝臓、骨髓、脾臓、腎臓、脾臓、注射部位、精巣/卵巣、鼠径リンパ節、肺、心臓、脳。

## 【0153】

## 実施例 4

化学的結合によって調製されたナノ免疫リポソームによるヒトにおけるウイルス抗原に対する免疫応答の誘発

30

本発明はまた、ウイルスタンパク質およびインターロイキンをコードする核酸分子、例えば、1以上のインターロイキンをコードする抗原 遺伝子として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む1以上の プラスミド、を含むリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を個体に投与することを含む、ヒト (およびその他の哺乳類および動物)においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。様々な標的化リガンドを含む複合体はリポソームの表面に直接的に化学的に結合したものであり得、以下に記載のように実施例 1 において実質的に記載したように調製される:

40

## 【0154】

MPB-リポソームはCampbell MJ (Biotechniques 1995 Jun;18(6):1027-32)によって記載されたものから改変されたエタノール 注射 方法によって調製される。4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート-DOPE (MPB-DOPE) (Avanti Polar Lipids)をリポソーム 製剤 [リピドA (DOTAP:DOPE、1:1 モル比); リピドB (DDAB:DOPE、1:1 モル比); リピドD (DOTAP:Chol、1:1 モル比);およびリピドG (DOTAP:DOPE:Chol、1:1:1 モル比)]に、総脂質の5-8% モルとなるように含める。簡単に説明すると、すべての脂質をエタノール中に可溶化し、混合し、ボルテックスしている50-60 の純水にハミルトンシリンジによって注入する。溶液をさらに10-15 分間ボルテックスする。終濃度は1-2 mM 総脂質である。1M HEPES、pH7.5 (pH7.0-8.0)を終濃度10-20 mMとなるように添加する。マレイミド基はpH >7の水

50

溶液中では安定ではないので、リポソームは好適には水 (pH 5-6.5) 中で調製される。pH は1M HEPES 緩衝剤、pH7.0-8.0を用いてscFv-SHと連結する前に7.0-8.0に調整してよく、それによりポストコーティング反応が促進される。

#### 【 0 1 5 5 】

scFv-SHまたは-SH基を有するいずれかの抗体または抗体フラグメント (例えば、Fab' またはMab)をMPB-リポソームにタンパク質/脂質 の比 が約 1:1 から約 1:100、好適には 約 1:10 から約 1:50 (w:w)、より好適には 約 1:20 から約 1:40、例えば1:30となるように添加する。溶液を30 分間 室温での穏やかな回転 (~20-30 RPM)により混合し、scFv-Lipを作る。scFv-Lipは精製せずに用いられるが、それはSephacrose CL-4B カラムクロマトグラフィーによって精製してもよい。scFv-Lip-DNA 複合体を作るために、プラスミド DNAを必要であれば水で希釈し、scFv-LipにDNA/脂質 の比が約 0.5:1 から約 1:40 ( $\mu\text{g}$  全核酸 :  $\mu\text{g}$  脂質)、好適には 約 1:5 から約 1:20 ( $\mu\text{g}$  全核酸 :  $\mu\text{g}$  脂質)、例えば、1 :10 ( $\mu\text{g}$  全核酸 :  $\mu\text{g}$  脂質)となるように添加し、混合物を5-10 秒間反転させ、より大きい体積の場合は20-30 RPMで 1-2 分間回転させる。最終的な混合物を室温で10-15 分間維持し、およそ5 分後に再び5-10 秒間穏やかに反転させる。インビボでの使用のために50% デキストロースまたは50% スクロースを終濃度5-20% (V:V)となるように添加し、5-10 秒間の穏やかな反転により混合し、より大きな体積の場合は20-30 RPMで 1-2 分間回転させることにより混合する。 scFv-Lip-DNA は精製せずに用いられるが、それはSephacrose CL-4B カラムクロマトグラフィーにより精製してもよい。80-100%のscFv (または-SH基を有するいずれかの抗体)がリポソームに結合すると予測される。

#### 【 0 1 5 6 】

複合体との結合/カプセル封入の前に、ウイルス抗原およびインターロイキンをコードするプラスミドをインサート対インサートのモル比が、0.1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、10 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子;から、10 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、0.1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子、となるように一緒に混合する。例えば、1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子のインサート、対、1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子のインサートの比が用いられる。

#### 【 0 1 5 7 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、HIVである場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、以下の1以上をコードする遺伝子を含むものである:エンベロープ タンパク質 (Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212.; Ferrantelli, F. and Ruprecht, R. M. (2002): Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Current Opinion in Immunology*, 14:495-502.) および/または Nef タンパク質 (Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212.; Lichterfeld, M., Yu, X.G., Cohen, D., Addo, M. M., Malenfant, J., Perkins, B., Pae, E., Johnston, M.N., Strick, D., Allen, T.M., Rosenberg, E.S., Korber, B., Walker, B.D., and Altfeld, M. (2004): HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS*, 18:1383-1392.); および/または gp140 (Smith, S.M. (2002): HIV vaccine development in the nonhuman primate model of AIDS. *Journal of Biomedical Science*, 9:100-111.)。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

#### 【 0 1 5 8 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、インフルエンザである場合、使用されるプラ



スミド DNAは好適には、赤血球凝集素 (HA) (Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Japanese Journal of Infectious Diseases, 58:195-207.; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29.; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. Japanese Journal of Infectious Diseases, 53:219-228.)、および/または ノイラミニダーゼ (NA) (Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Japanese Journal of Infectious Diseases, 58:195-207.; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29.; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. Japanese Journal of Infectious Diseases, 53:219-228.)、および/または

ヌクレオカプシド (Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29.) および/またはマトリックスタンパク質 M2 (Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 7:24-29.) をコードする遺伝子を含むものである。この DNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

#### 【 0 1 5 9 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、SARSである場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、スパイク 糖タンパク質、および/またはヌクレオカプシド および/または 構造タンパク質 S1、および/または 構造タンパク質 M、および/または 構造タンパク質 N (Weiss, S.R. and Navas-Martin, S. (2005): Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 69:635-664.) をコードする遺伝子を含むものである。この DNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

#### 【 0 1 6 0 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、鳥インフルエンザ(H5N1としても称される)である場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、赤血球凝集素 (Wong, S.S. and Yuen, K.Y. (2006): Avian influenza virus infections in humans. Chest, 129:156-168.; Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K.G., Podda, A., Wood, J.M., Zambon, M. C., and Katz, J.M. (2005): Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. Journal of Infectious Diseases, 191:1210-1215.; Treanor, J.J., Wilkinson, B.E., Maseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., O'Brien, D., Wolff, M., Rabinovich, G., Blackwelder, W., and Katz, J.M. (2001): Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. Vaccine, 19:1732-1737.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

## 【 0 1 6 1 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、エボラ、マールブルグまたはフィロウイルス科(filoviridae)のいずれかである場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、VP24、および/または VP30、および/または VP35、および/または VP40および/または sGP、および/または糖タンパク質、および/または核タンパク質 (Hart, M.K. (2003): Vaccine research efforts for filoviruses. International Journal for Parasitology, 33:583-595.; Wilson, J.A., Bosio, C.M., and Hart, M.K. (2001): Ebola virus: the search for vaccines and treatments. Cellular & Molecular Life Sciences, 58:1826-1841.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

10

## 【 0 1 6 2 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、B型肝炎である場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、B型肝炎 表面 抗原 (HBsAg) (Hanke, T. (2006): On DNA vaccines and prolonged expression of immunogens. European Journal of Immunology, 36:806-809.; Zuckerman, J.N. (2006): Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. Current Opinion in Infectious Diseases, 19:456-459.)、および/またはヌクレオカプシド (HBc) (Michel, M.L. and Mancini-Bourgine, M. (2005): Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. Journal of Clinical Virology, 34 Suppl 1:S108-S114.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

20

## 【 0 1 6 3 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、西ナイル ウイルス、デング熱、黄熱病、またはいずれかのフラビウイルス科(flaviviridae)である場合、使用されるプラスミド DNAは好適には、ほとんどのウイルス-中和抗体を誘発する タンパク質であるE-糖タンパク質 (Sampathkumar, P., "West Nile Virus: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Prevention," Mayo Clinic Processings 78:1137-1144 (2003); King, N.J.C., "Immunopathology of Flavivirus Infections, Immunology," Immunology and Cell Biology 85:33-42 (2007)参照) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適には、いずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミドを含む。

30

## 【 0 1 6 4 】

上記のように調製した最終的な複合体のサイズは好適には約 50 から500 (nm)の間であり、Malvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSのMalvern ZETASIZER (登録商標) 3000を用いる動的光散乱によって判定したゼータ電位が正のものである。このサイズは毛細血管床を効率的に通過し、標的APC 細胞に到達するために十分に小さいものである。

40

## 【 0 1 6 5 】

上記のように調製した複合体は、予防または治療ワクチンとして使用される。予防のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体 ナノリポブレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患に以前に曝露されていないヒトに静脈内注入される。注射は複合体を用いて0、4および8 週目になされる。対象にワクチン接種するのに用いられる複合体は好適には0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA)の比にて作られ、5% デキストロースが賦形剤として用いられる。複合体中の DNA の総量は、0.01から10 mg/kg/注射である。好適な 量は0.164 mg/kg/注射であり、これは対象の重量

50

に基づいて7-12 mg DNA/注射である。調製された複合体は250ml 5% デキストロースバッグにi.v. 注入のために注入されるか、またはボーラスとして、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介して注入される。

#### 【0166】

治療用途のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体 ナノリポプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患 (例えば、B型肝炎) に慢性的に感染した、または急性にウイルス性疾患 (例えば、エボラ、SARS、H5N1、天然痘、西ナイル ウイルス) に曝露されたヒトに静脈内注入される。予防用途についてのもと同じ範囲の量のDNAを含む複合体は、250 ml の5% デキストロース 溶液中でi.v. 送達されるか、またはボーラスとして、0、4および 8週目に3回、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与によって、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる 投与を介して送達される。

#### 【0167】

##### 実施例 5

単純な混合により調製されたナノ免疫リポソーム複合体によるヒトにおけるウイルス抗原に対する免疫応答の誘発

本発明はまた、ヒト(ならびにその他の哺乳類および動物)においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供し、該方法は、個体に、ウイルスタンパク質およびインターロイキンをコードする核酸分子、例えば、1以上のインターロイキンをコードする抗原 遺伝子として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む1以上の プラスミドを含むリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体を投与する工程を含む。リポソーム表面に化学的に結合していないが直接的に複合体化/結合した様々な ターゲティングリガンドを含む複合体は本質的に実施例 1に記載のようにして以下のように調製される:

#### 【0168】

リポソーム[リピドA (DOTAP:DOPE、1:1 モル比); リピド B (DDAB:DOPE、1:1 モル比); リピドD (DOTAP:Chol、1:1 モル比); およびリピドG (DOTAP:DOPE:Chol、1:1:1 モル比)]は、Campbell, MJ (Biotechniques 1995 Jun;18(6):1027-32)によって記載された方法を改変したエタノール 注射 方法によって調製される。簡単に説明すると、すべての脂質がエタノール中に可溶化され、混合され、ボルテックスしている50-60 の純水にハミルトンシリンジを用いて注入される。溶液をさらに10-15 分間ボルテックスする。終濃度は1-2mM 総脂質である。

#### 【0169】

TfRscFvまたはいずれかの抗体または抗体フラグメント (例えば、scfv、Fab ' またはMab) -免疫リポソーム複合体は、TfRscFvとリポソーム 組成物 A (またはいずれかの上記のリポソーム 組成物) とを、一本鎖 タンパク質とリポソームおよびDNAとが混合された複合体中で所定の比となるように混合することによって調製される。複合体の調製は、以下の一般的手順にしたがう。適当な量の2 mM リポソーム (上記のA-H)を なんらかの必要な水 (例えば、DI 水)と混合し、 所望の体積とし、穏やかに10回反転して混合するか、またはより大きい体積の場合は20-30 RPMで1-2 分間回転させる。リポソーム-水 混合物に対して、適当な量のTfRscFvを添加して、所望の比とし、穏やかな反転により約 5-10 秒間混合するか、またはより大きい体積の場合は、20-30 RPMで1 分間回転させる。この混合物を室温で10-15 分間維持する (およそ5 分後に再び穏やかに5-10 秒反転させる)。同時に、適当な量の DNAを5-10 秒間の反転により混合し、またはより大きい体積の場合は20-30 RPM で 1-2 分間回転させ、なんらかの必要な水を用いて所望の体積とする。典型的には、インビボで使用するためには、注射あたり約 5  $\mu$ g から約 100 mg のDNAを提

供することが望ましい。DNA 溶液をTfRscFv-リボソーム 溶液に迅速に添加し、混合物を5-10 秒間反転させるか、または、より大きい体積の場合は20-30 RPMで1-2 分間回転させる。最終混合物を 室温で10-15 分間維持し、およそ5 分後に5-10 秒間再び穏やかに反転させる。インビボでの使用のためには、50% デキストロースまたは50% スクロースを終濃度が5-20% (V:V)となるように添加し、5-10 秒間の穏やかな反転により混合するか、またはより大きい体積の場合は、20-30 RPMで1-2 分間回転させる。1:30 (TfRscFv:リボソーム、w:w) および 1:14 ( $\mu\text{g}$  DNA:n モル 総脂質) の好適な比 での具体例は以下の通りである。最終体積800  $\mu\text{l}$ 中の40  $\mu\text{g}$ の DNAについては、183  $\mu\text{l}$ の水と280  $\mu\text{l}$ の2 mM リボソーム 溶液を混合する。34  $\mu\text{l}$ の TfRscFv (濃度 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加する。183  $\mu\text{l}$ の水と40  $\mu\text{l}$  の1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DNAを混合する。80  $\mu\text{l}$ の50% デキストロースを最終工程にて添加する。

#### 【0170】

Tf-Lip-DNA 複合体を以前に記載されたインビボ 製剤にしたがって調製する。Xu et al., Human Gene Therapy, 10(18):2941-52 (1999)。トランスフェリン-リボソーム-媒介全身的 p53 遺伝子治療と放射線照射との組合せの結果、ヒト 頭頸部癌 異種移植片が退縮する。最適化されたインビボ 製剤による典型的な調製のために、25 mlのTf (5 mg/ml、鉄飽和 ホロ-トランスフェリン; Sigma, St. Louis, MO)および50 mlのLip (2 mM 総脂質) + 75 mlの水をポリプロピレンチューブ中で混合し、5-15 分間 室温で頻りに揺り動かしながら保持するか、またはより大きい体積のためには、20-30 RPMで1-2 分間回転させる。120 mlの20 mM HEPES 緩衝剤、pH 7.4中の10  $\mu\text{g}$ のプラスミド DNAをチューブに添加し、すぐに徹底的に穏やかに10回反転させることによって混合し、より大きい体積のためには20-30 RPMで1-2 分間回転させ、10-20 分間 室温で頻りに揺り動かしながら保持する。30  $\mu\text{l}$ の50% デキストロース 溶液を次いでチューブに添加し、すぐに徹底的に穏やかに10回反転させることによって混合するか、またはより大きい体積のためには、20-30 RPMで1-2 分間回転させ、室温で10-15 分間保持する。最終的なDNA:脂質:Tf 比は1:10:12.5 (mg/nmol/mg)である。HEPES 緩衝剤を水と置換してもよい。

#### 【0171】

##### A. Lip-HoKCの調製

{K[K(H)KKK]<sub>5</sub>-K(H)KKK} ペプチド (HoKC)を複合体に含める場合は、カチオン性 リボソーム 製剤A (DOTAP:DOPE、1:1 モル比)、B (DDAB:DOPE、1:1)、G (DOTAP:DOPE:コレステロール、1:1:1) およびH (DDAB:DOPE:コレステロール、1:1:1) (または上記のいずれかのリボソーム製剤)を上記のようにエタノール 注射 方法を用いて調製する。各リボソーム製剤にはまた、MPB-DOPEを総脂質の5 モルパーセントにて含める。HoKC ペプチドは末端システインを担持するため、MPB-DOPEをすべてのリボソーム組成物に含めることにより、ペプチドとリボソームとの結合を可能とする。Lip-HoKC リボソームをマレイミド基を担持するカチオン性リボソーム (Lip-MPB) とペプチドとの以下のようなカップリング反応を用いて調製する。0.1 mmol のシステイン上に遊離 チオール基を有するペプチドのアリコートに10 mM HEPES、pH 7.4溶液中の2 mmolのLip-MPBに添加し、室温で2時間回転させる(20-30 r.p.m.)。結果として得られるLip-HoKCの脂質濃度は1.4 mMである。

#### 【0172】

リボソームがHoKCを含む場合、完全な複合体がHoKCを有さないTfRscFv-Lip-DNA 複合体の生産に使用されたものと同じの方法で形成される。この場合もTfRscFvまたはいずれかの抗体または抗体フラグメント (例えば、Fab' またはMab)を Lip-HoKC と(10回の穏やかな反転により、またはより大きな体積については20-30 RPMで1-2 分間回転させることにより)特定の比にて混合し、室温で10-15 分間インキュベートする。DNAを次いで TfRscFv-Lip-HoKC 溶液に添加し、穏やかな10回の反転により、またはより大きな体積については20-30 RPMで 1-2 分間回転させることにより混合し、再び室温で10-15 分間インキュベートし、その後、デキストロースまたはスクロースを終濃度 5-20%となるように添加し、穏やかに10回反転させることにより、またはより大きな体積については20-30 RPMで1 分間回転させることにより混合し、室温で10-15 分間インキュベートする。複合体中のTfRs

cFv:LipA-HoKC:DNAの比は0.3 mg:7 nmol:1 mgである。

【 0 1 7 3 】

複合体中へのカプセル封入の前に、ウイルス抗原およびインターロイキンをコードするプラスミドを、インサートとインサートのモル比が、0.1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、10 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子；から、10 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子、対、0.1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子となるように混合する。例えば、1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子のインサート、対、1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子のインサートの比が用いられる。

10

【 0 1 7 4 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、HIVである場合、用いられるプラスミド DNA は好適にはエンペロープ タンパク質 (Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212.; Ferrantelli, F. and Ruprecht, R.M. (2002): Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Current Opinion in Immunology*, 14:495-502) および/または Nef タンパク質 (Vanniasinkam, T. and Ertl, H.C. (2005): Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. *Current Gene Therapy*, 5:203-212.; Lichterfeld, M., Yu, X.G., Cohen, D., Addo, M.M., Malenfant, J., Perkins, B., Pae, E., Johnston, M.N., Strick, D., Allen, T.M., Rosenberg, E.S., Korber, B., Walker, B.D., and Altfeld, M. (2004): HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS*, 18:1383-1392.); および/または gp140 (Smith, S.M. (2002): HIV vaccine development in the nonhuman primate model of AIDS. *Journal of Biomedical Science*, 9:100-111.) の1以上をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

20

【 0 1 7 5 】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、インフルエンザである場合、使用されるプラスミド DNA は好適には赤血球凝集素 (HA) (Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58:195-207.; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29.; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53:219-228.)、および/または ノイラミニダーゼ (NA) (Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. (2005): Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58:195-207.; Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29.; Ze, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000): Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53:219-228.)、および/またはヌクレオカプシド (Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29) および/またはマトリックスタンパク質 M2 (Cox, M.M. (2005): Cell-based protein vaccines for influenza. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 7:24-29.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAに

30

40

50

よってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0176】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、SARSである場合、使用されるプラスミド DNA は好適にはスパイク 糖タンパク質、および/またはヌクレオカプシド および/または 構造タンパク質 S1、および/または 構造タンパク質 M、および/または 構造タンパク質 N (Weiss, S.R. and Navas-Martin, S. (2005): Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 69:635-664.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0177】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、鳥インフルエンザ (H5N1としても知られる) である場合、使用されるプラスミド DNA は好適には、赤血球凝集素 (Wong, S.S. and Yuen, K.Y. (2006): Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, 129:156-168.; Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K.G., Podda, A., Wood, J.M., Zambon, M.C., and Katz, J.M. (2005): Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *Journal of Infectious Diseases*, 191:1210-1215.; Treanor, J.J., Wilkinson, B.E., Masseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., O'Brien, D., Wolff, M., Rabinovich, G., Blackwelder, W., and Katz, J.M. (2001): Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, 19:1732-1737.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0178】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、エボラ、マールブルグまたはいずれかのフィロウイルス科である場合、使用されるプラスミド DNA は好適には、VP24、および/または VP30、および/または VP35、および/または VP40および/または sGP、および/または 糖タンパク質、および/または 核タンパク質 (Hart, M.K. (2003): Vaccine research efforts for filoviruses. *International Journal for Parasitology*, 33:583-595.; Wilson, J.A., Bosio, C.M., and Hart, M.K. (2001): Ebola virus: the search for vaccines and treatments. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 58:1826-1841.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0179】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、B型肝炎である場合、使用されるプラスミド DNA は好適には、B型肝炎 表面 抗原 (HBsAg) (Hanke, T. (2006): On DNA vaccines and prolonged expression of immunogens. *European Journal of Immunology*, 36:806-809.; Zuckerman, J.N. (2006): Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:456-459.) 、および/またはヌクレオカプシド (HBc) (Michel, M.L. and Mancini-Bourguine, M. (20

10

20

30

40

50

05): Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. Journal of Clinical Virology, 34 Suppl 1:S108-S114.) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15 をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0180】

それに対してワクチン接種すべき疾患が、西ナイル ウイルス、デング熱、黄熱病、またはいずれかのフラビウイルス科である場合、使用されるプラスミド DNA は好適には、ウイルス-中和抗体のほとんどを誘発するタンパク質であるE-糖タンパク質(Sampathkumar, P., "West Nile Virus: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Prevention," Mayo Clinic Processings 78:1137-1144 (2003); King, N.J.C., "Immunopathology of Flavivirus Infections, Immunology," Immunology and Cell Biology 85:33-42 (2007)参照) をコードする遺伝子を含むものである。このDNAによってコードされるタンパク質は免疫応答を誘発するための抗原として作用する。さらに、同複合体は好適にはいずれかのインターロイキン、好適には インターロイキン 2、および/または インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含む プラスミドを含む。

#### 【0181】

これらの方法により調製した最終的な複合体のサイズは約 50 から400 (nm)の間であり、Malvern ZETASIZER (登録商標) 3000 またはMalvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSを用いる動的光散乱によって判定したゼータ電位が正のものである。このサイズは毛細血管床を効率的に通過し、標的APC 細胞に到達するために十分に小さいものである。

#### 【0182】

上記のように調製した複合体は、好適には予防または治療ワクチンとして使用される。予防のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体 ナノリポプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患に以前に曝露されていないヒトに静脈内注入される。静脈内注射は複合体を用いて0、4および8 週目になされる。対象にワクチン接種するのに用いられる複合体は好適には1:10:12.5 (mg/nmol/mg) (DNA:脂質:Tf)の比にて作られ、5-210%デキストロースまたはスクロースが賦形剤として用いられる; HoKC が複合体の成分でない場合は0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA) の比にて作られ、5-20% デキストロース またはスクロースが賦形剤として用いられる; および複合体が HoKCを含む場合は 0.3 mg:7 nmol:1 mg (TfRscFv:Lip-HoKC:DNA) の比にて作られ、5% デキストロースまたはスクロースが用いられる。複合体中の DNA の総量は、0.01から10 mg/kg/注射である。好適な 量は0.164 mg/kg/注射であり、これは対象の重量に基づいて7-12 mg DNA/注射である。調製された複合体は250ml 5% デキストロースバッグにi.v. 注入のために注入されるか、またはボーラスとして、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介して注入される。

#### 【0183】

治療用途のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体 ナノリポプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患 (例えば、B型肝炎) に慢性的に感染した、または急性にウイルス性疾患 (例えば、エボラ、SARS、H5N1、天然痘、西ナイル ウイルス)に曝露されたヒトに注入される。予防用途についてのもと同じ範囲の量のDNAを含む複合体は、250 ml の5% デキストロース 溶液中でi.v. 送達されるか、またはボーラスとして、0、4および 8週目に3回、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝

臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与によって、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる 投与を介して送達される。

#### 【0184】

##### 実施例 6

化学的結合によって調製された2つのナノ免疫リボソーム複合体の共注射によるヒトにおけるウイルス抗原に対する免疫応答の誘発

本発明はまた、ヒト(ならびにその他の哺乳類および動物)においてウイルス抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供し、該方法は、個体にウイルスタンパク質およびインターロイキンコードする核酸分子、例えば、1以上のインターロイキンコードする抗原 遺伝子として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む1以上の プラスミドを含むリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体を投与することを含む。リボソームの表面に直接的に化学的に結合した様々な ターゲティング 薬剤を含む複合体は実施例 4において記載のように調製される。

10

#### 【0185】

抗原として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を担持するプラスミド DNA は実施例 4に記載のものと同一である。例えば、インターロイキン 2、インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミド DNAを含む別々のリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体は、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子を担持する プラスミド DNAについて用いられたものと同じ手順および比を用いて調製される。

20

#### 【0186】

上記のように調製した最終的な複合体のサイズは約 50 から500 (nm)の間であり、Malvern ZETASIZER (登録商標) 3000 またはMalvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSを用いる動的光散乱によって判定したゼータ電位が正のものである。このサイズは毛細血管床を効率的に通過し、標的APC 細胞に到達するために十分に小さいものである。

#### 【0187】

上記のように調製した複合体は、予防または治療ワクチンとして使用される。ワクチンとして使用するために、2つの複合体はそれぞれの複合体中のプラスミド DNA インサートのモル比を反映する複合体:複合体の比にて混合されて一緒にされる。したがって、2つの複合体の比は、0.1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、10 モルの1以上のインターロイキンコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量; から、10 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、0.1 モルの1以上のインターロイキンコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量である。例えば、1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、1 モルの1以上のインターロイキンコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量の比が用いられる。ウイルスタンパク質をコードするプラスミド DNAを含む複合体がインターロイキンをコードするプラスミド DNA を含む複合体に添加され、溶液が穏やかに10回反転されるかまたは20-30RPMで1分間回転されて、ヒト対象において使用するための最終的なワクチンが形成される。

30

#### 【0188】

予防のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体ナノリボプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患に以前に曝露されていないヒトに静脈内注入される。注射は複合体を用いて0、4および8 週目になされる。対象に投与されるワクチンを形成するのに用いられるそれぞれの複合体(ウイルス遺伝子を含むものおよびインターロイキン 遺伝子を含むもの)は好適には0.33ug:10ug:1ug (TfRsc Fv:Lip:DNA)の比にて作られ、5%デキストロースが賦形剤として用いられる。ワクチン中の DNA の総量は、0.01から10 mg/kg/注射である。好適な 量は0.164 mg/kg/注射であり、これは対象の重量に基づいて7-12 mg DNA/注射である。調製された複合体は250ml 5%デキストロースバッグにi.v. 注入のために注入されるか、またはボーラスとして、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋

40

50



肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介して注入される。

#### 【0189】

治療用途のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体 ナノリボプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患 (例えば、B型肝炎) に慢性的に感染した、または急性にウイルス性疾患 (例えば、エボラ、SARS、H5N1、天然痘、西ナイル ウイルス) に曝露されたヒトに注入される。予防用途についてのもと同じ範囲の量のDNAを含む調製された複合体は、250 ml の5% デキストロース 溶液中でi.v. 送達されるか、またはボーラスとして、0、4および 8週目に3回、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与によって、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる 投与を介して送達される。

#### 【0190】

##### 実施例 7

単純な混合によって調製された2つのナノ免疫リボソーム複合体の共注射によるヒトにおけるウイルス抗原に対する免疫応答の誘発

本発明はまた、個体に、ウイルスタンパク質およびインターロイキンをコードする核酸分子、例えば、1以上のインターロイキンをコードする抗原 遺伝子として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含む1以上の プラスミドを含むリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体を同時投与することを含む、ヒトにおけるウイルス抗原に対する免疫応答の誘発方法も提供する。リボソームの表面(HoKC ペプチドを有するかまたは有さない)に化学的に結合していないが直接的に複合体化した様々な リガンドを含む複合体は実施例 5に記載のように調製される。抗原として作用するウイルスタンパク質をコードする遺伝子を担持するプラスミド DNAは、実施例 5に記載のものと同一である。いずれかのインターロイキン、例えば、インターロイキン 2、インターロイキン 12 および/または インターロイキン 15をコードする遺伝子を含むプラスミド DNAを含む別々のリガンド-標的化カチオン性リボソーム複合体は、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子を担持するプラスミド DNAに用いられたものと同一の手順および比を用いて調製される。

#### 【0191】

上記のように調製した最終的な複合体のサイズは約 50 から400 (nm)の間であり、Malvern ZETASIZER (登録商標) 3000 またはMalvern ZETASIZER (登録商標) NANO-ZSを用いる動的光散乱によって判定したゼータ電位が正のものである。このサイズは毛細血管床を効率的に通過し、標的APC 細胞に到達するために十分に小さいものである。

#### 【0192】

ワクチンとして使用するために、2つの複合体はそれぞれの複合体中のプラスミド DNA インサートのモル比を反映する複合体:複合体の比にて混合されて一緒にされる。したがって、2つの複合体の比は、0.1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、10 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量; から、10 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、0.1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量である。例えば、1 モルの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量、対、1 モルの1以上のインターロイキンをコードする1以上の核酸分子を含む複合体の量の比が用いられる。ウイルスタンパク質をコードするプラスミド DNAを含む複合体がインターロイキンをコードするプラスミド DNA を含む複合体に添加され、溶液が穏やかに10回反転されるかまたは20-30RPMで1分間回転されて、ヒト対象において使用するための最終的なワクチンが形成される。

#### 【0193】

上記のように調製した複合体は予防または治療ワクチンとして用いられる。予防のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体 ナノリポプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患に以前に曝露されていないヒトに注入される。静脈内注射は複合体を用いて0、4および8 週目になされる。対象にワクチン接種するのに用いられる複合体は好適には1:10:12.5 (mg/nmol/mg) (DNA:脂質:Tf)の比にて作られ、5-20% デキストロース またはスクロースが賦形剤として用いられる; HoKCが複合体の成分ではない場合0.33ug:10ug:1ug (TfRscFv:Lip:DNA) の比にて作られ、 5-20% デキストロースまたは スクロースが賦形剤として用いられ、複合体が HoKCを含む場合、0.3 mg:7 nmol:1 mg (TfRscFv:Lip-HoKC:DNA) の比にて作られ 5% デキストロース またはスクロースが用いられる。複合体中の DNA の総量は、 0.01から10 mg/kg/注射である。好適な 量は0.164 mg/kg/注射であり、これは対象の重量に基づいて7-12 mg DNA/注射である。調製された複合体は250ml 5% デキストロースバッグにi.v. 注入のために注入されるか、またはボーラスとして、 静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる投与を介して注入される。

10

#### 【0194】

治療用途のためには、上記のように調製したリガンド-標的化カチオン性リポソーム複合体 ナノリポプレックス ワクチンは、哺乳類、例えば、ウイルス性疾患 (例えば、B型肝炎) に慢性的に感染した、または急性にウイルス性疾患 (例えば、 エボラ、SARS、H5N1、天然痘、西ナイル ウイルス)に曝露されたヒトに注入される。予防用途についてのもと同じ範囲の量のDNAを含む複合体は、250 ml の5% デキストロース 溶液中でi.v. 送達されるか、またはボーラスとして、0、4および 8週目に3回、静脈内 (IV)、腫瘍内 (IT)、病巣内 (IL)、エアロゾル、経皮的、経口、内視鏡下、局所、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、眼内 (IO)、腹腔内 (IP)、経皮 (TD)、鼻腔内 (IN)、脳内 (IC)、臓器内 (例えば、肝臓内)、徐放インプラント、または皮下 投与によって、あるいは浸透圧または機械的ポンプを用いる 投与を介して送達される。

20

#### 【0195】

本明細書において言及するすべての刊行物、特許および特許出願が個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に引用により含まれて示されているのと同じ程度に、引用により本明細書に含まれる。

30

【 図 2 】

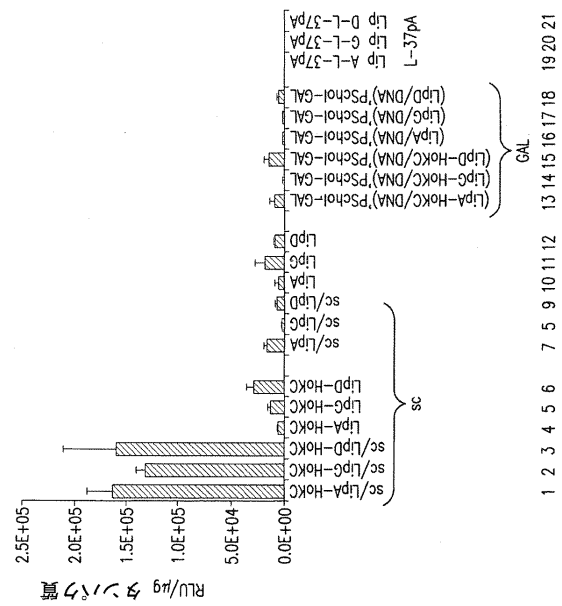


FIG. 2

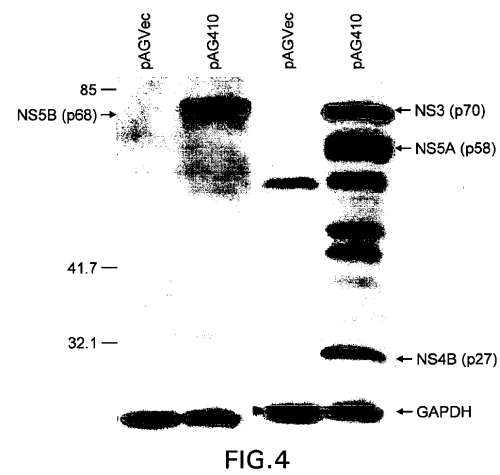
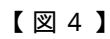


FIG.4

【図 5】

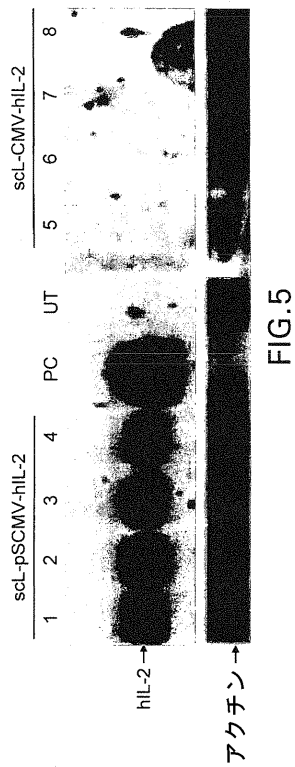


FIG.5

【図 6】

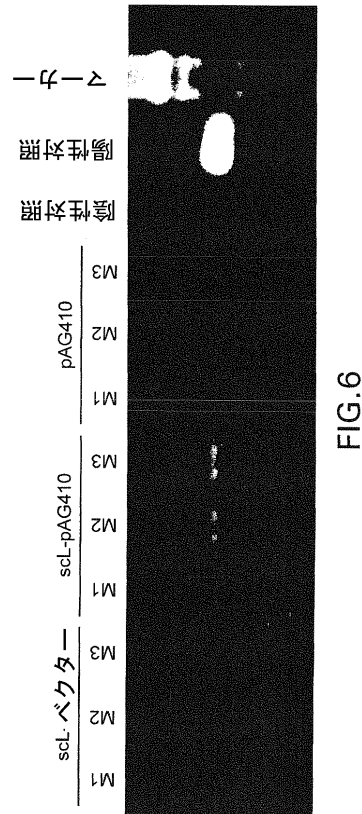


FIG.6

【図 7】

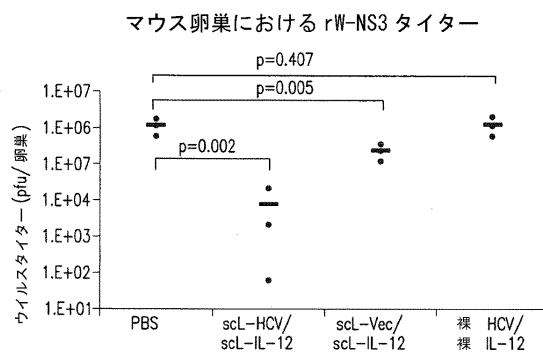


FIG.7

【図 8】

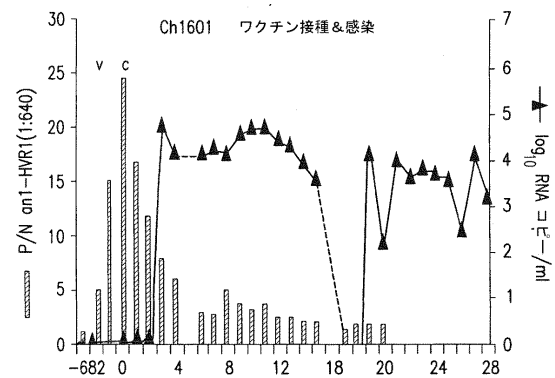


FIG.8A

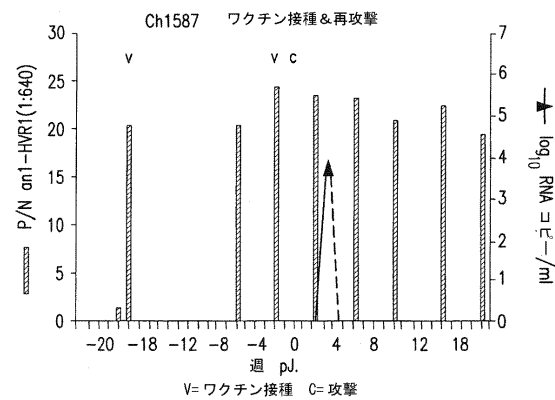


FIG.8B

【図 9】

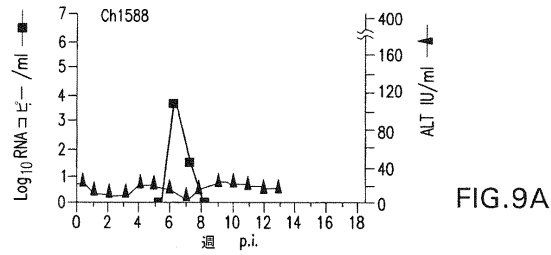


FIG.9A

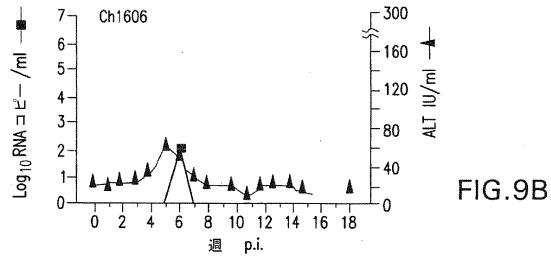


FIG.9B

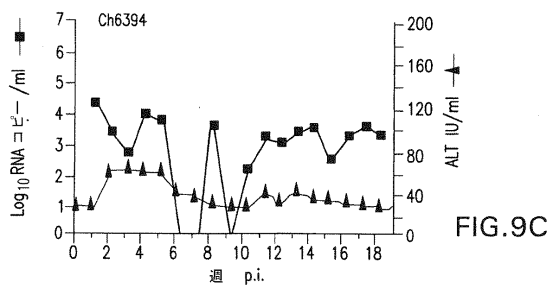


FIG.9C

【図 10】

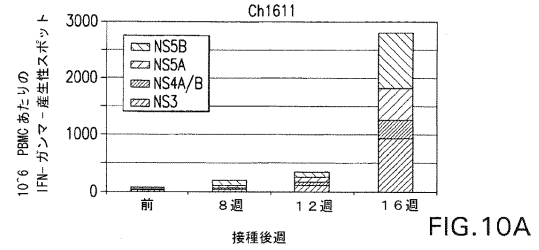


FIG.10A

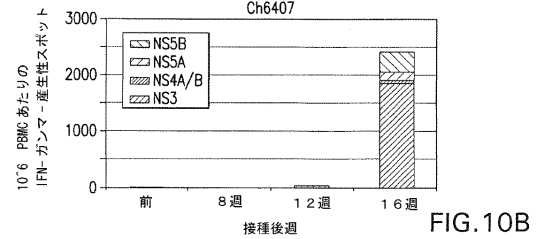


FIG.10B

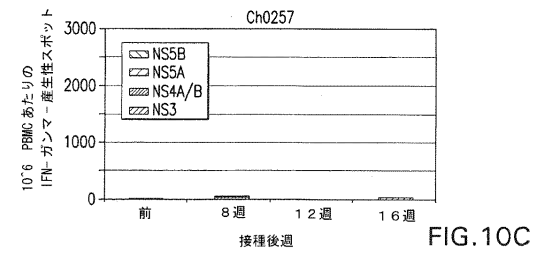


FIG.10C

【図 11】

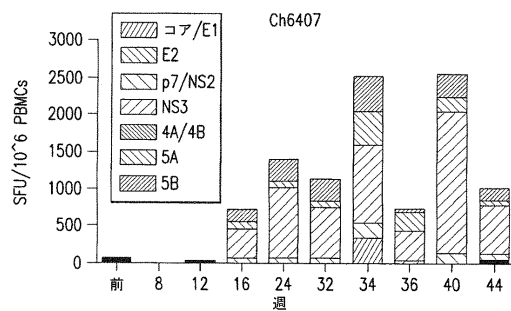


FIG.11A

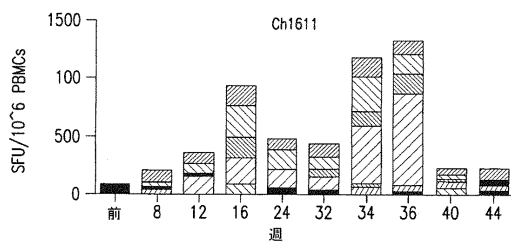


FIG.11B

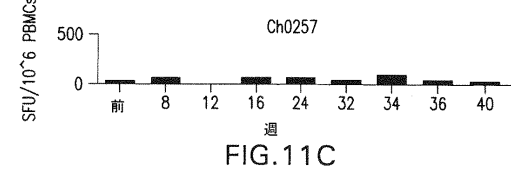


FIG.11C

【図 12】

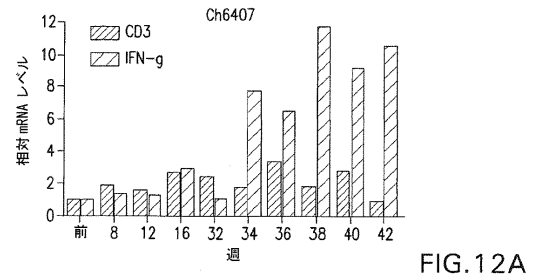


FIG.12A

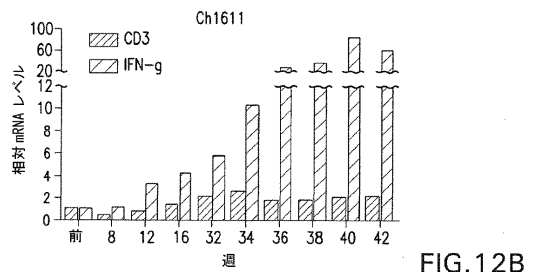


FIG.12B

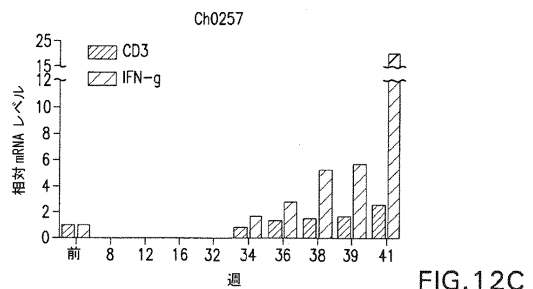


FIG.12C

【図 13】

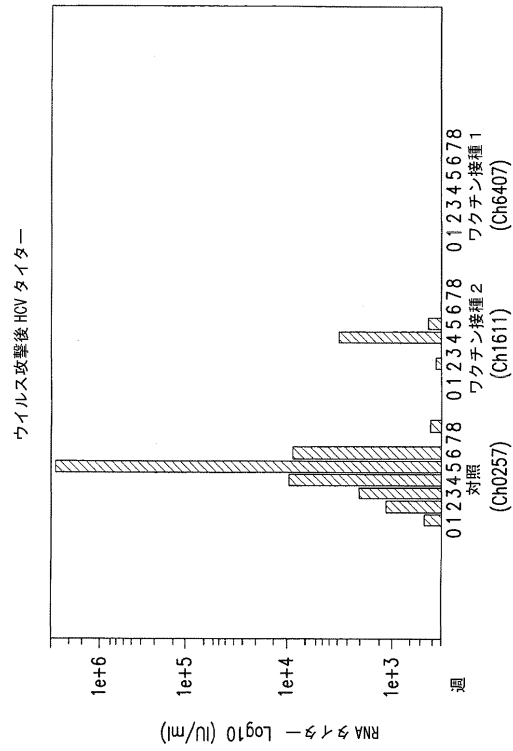


FIG.13

【図 14】

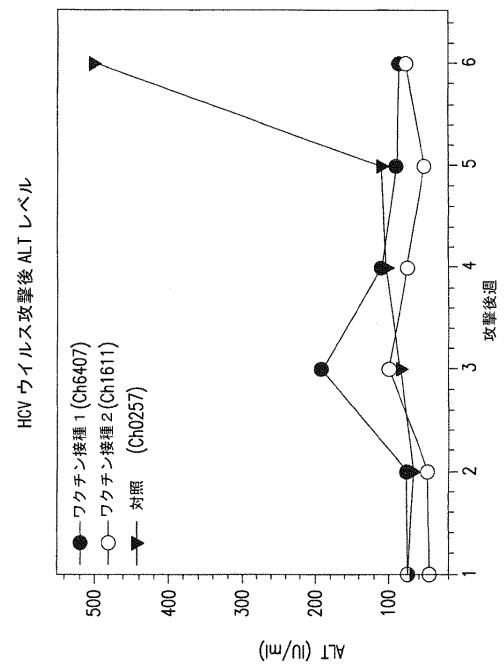


FIG.14

【図 15】

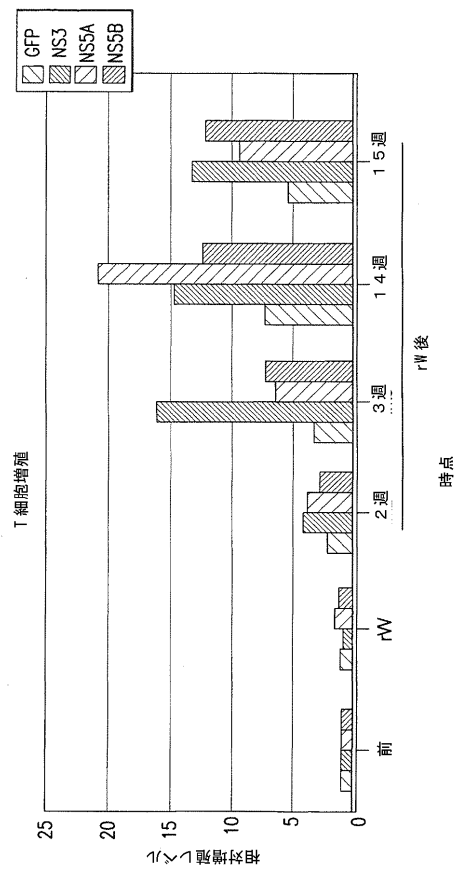


FIG.15

【図 16】

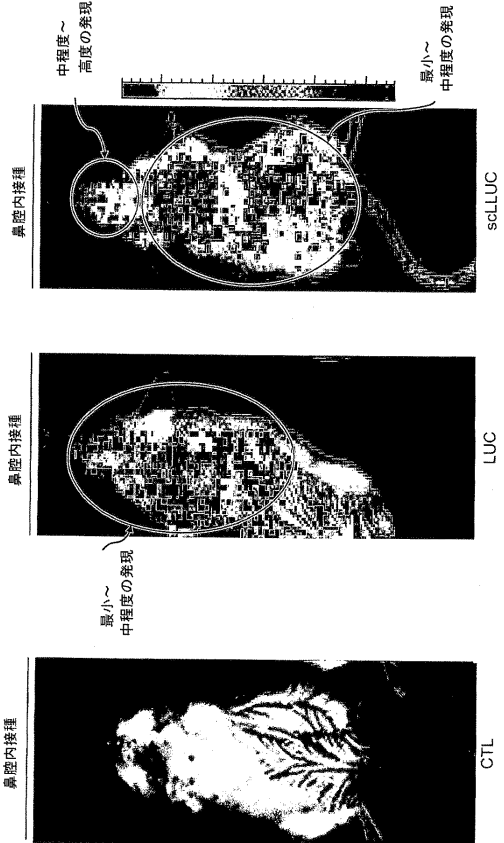


FIG.16A

FIG.16B

FIG.16C

【図 17】

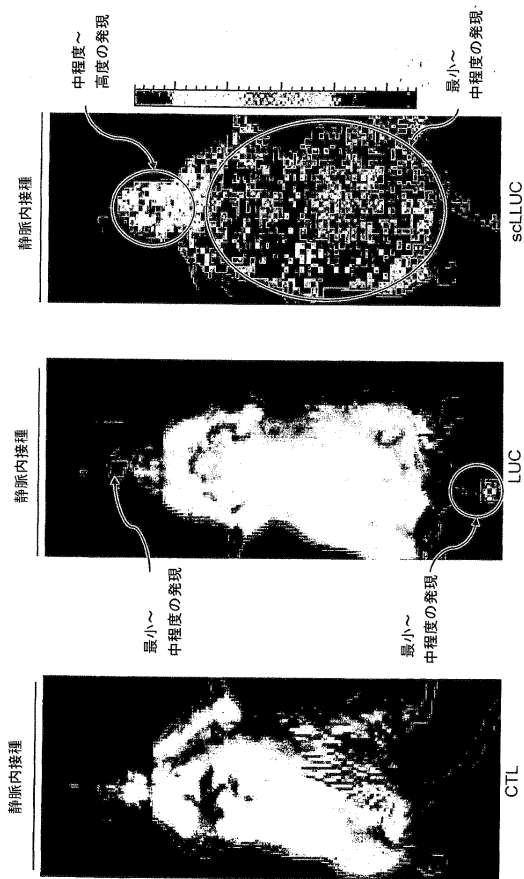


FIG.17C

FIG.17B

FIG.17A

【配列表】

0005890095000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)		A 6 1 K 39/215	
A 6 1 K 39/285 (2006.01)		A 6 1 K 39/285	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)		A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 47/24 (2006.01)		A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)		A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/54 (2006.01)		C 0 7 K 14/54	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 エスター・エイチ・チャン

アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州ボトマック、デモクラシー・ブルバード 1 0 2 4 4 番

(72)発明者 キャスリーン・エフ・ピロロ

アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州ロックビル、アンダーソン・アベニュー 5 4 7 番

## 合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 關 政立

審判官 齋藤 恵

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 2 3 7 6 9 ( U S , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 6 5 4 9 9 ( U S , A 1 )

米国特許第 4 9 5 7 7 3 5 ( U S , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K39/00-39/44

A61K47/00-47/48

A61K9/127

A61K37/02