

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4294584号
(P4294584)

(45) 発行日 平成21年7月15日(2009.7.15)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 K 9/127	(2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 K 39/00	(2006.01)	A 61 K 39/00
A 61 K 39/12	(2006.01)	A 61 K 39/12
A 61 K 47/18	(2006.01)	A 61 K 47/18

H

請求項の数 25 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-518995 (P2004-518995)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月7日 (2003.7.7)
 (65) 公表番号 特表2005-535653 (P2005-535653A)
 (43) 公表日 平成17年11月24日 (2005.11.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2003/002935
 (87) 國際公開番号 WO2004/004758
 (87) 國際公開日 平成16年1月15日 (2004.1.15)
 審査請求日 平成17年3月18日 (2005.3.18)
 (31) 優先権主張番号 02254733.5
 (32) 優先日 平成14年7月5日 (2002.7.5)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505003539
 リポクセン・テクノロジーズ・リミテッド
 イギリス国、ロンドン・ダブリュ・シー・
 1・エイチ・9・ビー・ビー、マーブルド
 ン・プレイス、ハミルトン・ハウス、スイ
 ート・303
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸ワクチン接種の免疫応答を高めるための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

両親媒性成分から形成された小胞を含む、核酸およびアシスタータンパク質を細胞に同時送達するための組成物であって、前記核酸は、少なくとも1つのエピトープを前記アシスタータンパク質と共有する抗原性タンパク質またはその一部を動物被験体内で機能的にコードし、前記組成物は、相互に同じ小胞と会合した前記核酸および前記アシスタータンパク質を含み、前記組成物は、核酸とタンパク質を1000:1から1:1の範囲の重量比で含有する、前記組成物。

【請求項 2】

前記小胞が、リポソーム形成物質から形成されるリポソームであり、前記核酸および前記アシスタータンパク質がリポソームと会合している、請求項1に記載の組成物。 10

【請求項 3】

前記核酸がリポソームの小胞内空間に捕捉されている、請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記アシスタータンパク質がリポソームの外側表面において利用可能である、請求項2または3に記載の組成物。

【請求項 5】

前記両親媒性成分が、少なくとも1つのカチオン性荷電成分を、小胞が全体的に正荷電を有するような量で含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記カチオン性成分が、1, 2 - ビス(オレオイルオキシ) - 3 - (トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1, 2 - ビス(ヘキサデシルオキシ) - 3 - トリメチルアミノプロパン(BiSHOP)、[1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル] - N, N, N - トリエチルアンモニウムクロリド(DOTAM)および3 - (N, N - デメチルアミノエタン)カルバミルコレステロール(DC - CHOL)から選択される、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記核酸が、それぞれ異なる抗原性タンパク質をコードする2つ以上の分子を含み、前記アシスタータンパク質が、それぞれのそのような抗原性タンパク質とエピトープを共有する対応するタンパク質を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項8】

前記核酸分子が同じ小胞と会合している、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記抗原性タンパク質および前記アシスタータンパク質がウイルスに由来する、請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記核酸がDNAである、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

ワクチンである請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、皮内投与、鼻腔投与、経口投与、粘膜投与または肺投与のために適合された、請求項11に記載の組成物。 20

【請求項13】

動物において免疫応答を生じさせるための医薬組成物であって、核酸およびアシスタータンパク質ならびに両親媒性成分から形成された小胞を含む組成物を含み、前記核酸はアシスタータンパク質と少なくとも1つのエピトープを共有する抗原性タンパク質またはその部分を機能的にコードし、前記組成物は、互いに同じ小胞に会合した前記核酸と前記アシスタータンパク質を1000:1から1:1の範囲の重量比で含む、前記医薬組成物。

【請求項14】

前記組成物が請求項2から12のいずれか一項に記載された組成物である、請求項13に記載の医薬組成物。 30

【請求項15】

前記免疫応答が、抗原性タンパク質および/またはアシスタータンパク質に対して特異的な抗体応答を含む、請求項13または14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記免疫応答が細胞傷害性Tリンパ球の刺激を伴う、請求項13から15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

感染性媒介因子による感染に対する免疫をもたらす、請求項13から16のいずれか一項に記載の医薬組成物。 40

【請求項18】

(a) リポソーム形成物質から形成された小さい単層小胞(SUV)の水性懸濁物を提供する工程；

(b) SUVの水性懸濁物を、抗原性タンパク質を動物被験体内で機能的にコードする核酸と接触させて、SUV - 核酸の懸濁物を形成させる工程；

(c) 前記SUV - 核酸の懸濁物を脱水して、脱水された混合物を提供する工程；および

(d) 前記脱水された混合物を水性の再懸濁媒体において再水和して、核酸含有リポソームの懸濁物を形成させる工程

を含むリポソーム組成物を形成させるための方法であって、

50

抗原性タンパク質と少なくとも 1 つのエピトープを共有するアシスタータンパク質を導入する工程を含み、それにより、前記核酸含有リポソームを前記アシスタータンパク質と会合させ、核酸とアシスタータンパク質が 1 0 0 0 : 1 から 1 : 1 の範囲の重量比である前記方法。

【請求項 1 9】

前記アシスタータンパク質を、工程 b の前に、または工程 b の途中で、または工程 b の後工程 c の前に、 S U V の水性懸濁物と接触させる、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記アシスタータンパク質が再懸濁媒体に存在する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記リポソーム形成物質が、少なくとも 1 つのリン脂質および少なくとも 1 つのステロールを含む、請求項 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記物質が、少なくとも 1 つのカチオン性化合物を含み、リポソームが全体的なカチオン性荷電を有する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

核酸対リポソーム形成物質の重量比が、1 : 1 0 0 から 1 : 1 0 0 0 の範囲にある、請求項 1 8 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

核酸対アシスタータンパク質の重量比が 3 0 : 1 から 5 : 1 の範囲にある、請求項 1 8 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

脱水が凍結乾燥によって行われる、請求項 1 8 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、核酸およびタンパク質を同時送達するための組成物に関する。同時送達は同じ小胞からの送達を意味し、これにより、両者が一緒に同じ細胞に送達されることがもたらされると考えられる。本発明の組成物は、免疫応答を生じさせるために有用である。特に、この核酸は、抗原性タンパク質またはその一部を機能的にコードし、前記核酸の配列は、組成物の一部を形成する「アシスタータンパク質」の配列に対して相同意であり、好みしくは同一である。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

病原体に由来するタンパク質抗原が、抗原に対して特異的な、被接種者における中和抗体または細胞媒介免疫応答を誘発するために設計されたワクチンにおいて長く使用されている。しかしながら、タンパク質は、一般に、ある種のタイプの細胞媒介免疫応答を誘発させる点、特に、非常に多くのワクチン（特に、細胞内病原体またはガン抗原に向けられたワクチン）に対する応答の望ましい構成成分であるエフェクター T 細胞（細胞傷害性 T 細胞を含む）の生成を誘発させる点が充分でない。最近、様々なワクチンが、むき出しの D N A （通常、哺乳動物細胞における発現のための適切なプロモーター配列を含有する、大腸菌から製造されたプラスミド D N A ）に基づいて開発されている。これら後者のワクチンは、細胞媒介免疫性（エフェクター T 細胞、例えば、インターフェロン - β を分泌する抗原特異的な T 細胞、および抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞などを伴う）を良好に生じさせることが分っているが、コードされ、発現された抗原に対する抗体を生じさせる点で不十分である。抗体は、非常に多くの病原体（特に、細菌およびある種のウイルス、例えば、インフルエンザウイルスなど）に対する保護免疫応答の重要な構成要素である。様々な治療が、下記に記載されるように、 D N A に基づくワクチンの不完全なところを修正するため提案および検討されている。

【 0 0 0 3 】

10

20

30

40

50

リポソーム配合が、何年も前から、タンパク質形態のワクチン抗原の免疫原性を高めるために使用されている。リポソーム配合はまた、近年では、DNAをワクチン目的のために配合することにも適用されている。リポソームを使用してプラスミドDNAをタンパク質と同時配合することを記載した様々な研究が行われている。しかしながら、タンパク質とDNAとのリポソームによる同時配合のこれらの研究は、通常、抗原そのものではない、免疫刺激性サイトカインまたは他の生物学的に活性なタンパク質をコードするプラスミドを使用している。タンパク質をインビボで発現させるために設計されている核酸を含有するワクチン配合物に抗原自体のタンパク質形態を取り込ませることは必要ないようであった。本発明者らは、タンパク質抗原をDNAと一緒に配合物における添加剤として使用した刊行物をただ1つ知っている (Alvarez-Lajonchere, L.他, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(1) : 95~99, 2002年1月)。本発明とは異なり、抗体応答の増強を、抗原をコードするDNAおよびその同系タンパク質の同時配合物において、タンパク質単独による免疫化と比較した場合、著者は認めなかつた。Alvarez-Lajonchere他によって使用された配合物は、活性な核酸(C型肝炎ウイルスのコア抗原をコードするプラスミド)および無関係なキャリアDNAと、ポリエチレングリコールと、タンパク質との混合物を含んでいた。注射後、タンパク質および活性なDNA(これらは混合物において物理的に会合していなかつた)は独立に拡散し、抗原提示細胞に別々に到達すると考えられる。Alvarez-Lajonchereのこの否定的な知見は、タンパク質をその同系DNAと配合することは、改善された免疫応答を達成するための有望な方法ではなかつたこと、少なくとも改善された抗体応答を達成するための有望な方法ではなかつたことを当業者に示唆していると考えられる。

【0004】

国際特許出願公開WO-A-9930733に、核酸ワクチンに対する免疫応答が、同系タンパク質の同時投与によって増強されることが提案されている。この2つの構成成分は同じ組成物で投与される必要はない。両者は、単に、核酸が免疫系を刺激した後まで、好ましくは遮蔽されているかまたは関与していないタンパク質とともに、免疫応答の誘導期の間に投与されなければならない。いくつかの例では、ワクチンは、物理的な混合状態にあるむき出しのDNAおよびむき出しのタンパク質抗原から構成されていた。他の例では、タンパク質抗原が、むき出しのDNAと混合された生分解性ポリマー-ミョウバン配合物において遅れて放出させるように配合されていた。

【0005】

国際特許出願公開WO-A-9728818では、様々なワクチンが、核酸およびタンパク質抗原を抗原提示細胞内に送達するように意図されている。この核酸は、タンパク質抗原と同じタンパク質を発現させることができる。この核酸およびタンパク質は、例えば、共有結合によるコンジュゲート化によって複合体化されている。この複合体は、合成されたウイルス様粒子として配合され得る。リポソームシステムを使用することができることもまた示唆されているが、このタンパク質および核酸の両方をいかにしてそのようなシステムに取り込ませるべきかに関する実施例はなく、また、明細書には、インビボ試験に関する定量的結果が何ら含まれておらず、実際には生じ得ない結果(特に、クラスII応答)が予測されている。

【0006】

非コードのプラスミドDNAが、ペプチドと一緒にリポソーム小胞に同時に捕捉されたとき、免疫アジュバント作用を有すること(Gur sel, M.他, Vaccine, (1999) 17: 1376~1383)、および、CpGモチーフを有するDNAが、むき出しのDNAおよびペプチドのワクチンに対する免疫アジュバント効果を有すること(Klinman, D. M.他, Vaccine, (1999) 17: 19~25)が知られている。

【発明の開示】

【0007】

10

20

30

40

50

しかしながら、本発明において、本発明者らは、核酸（例えば、DNAなど）をその同系タンパク質と一緒に物理的に会合させ、それらを捕捉されるようになされたならば、これらの2つの成分は抗原提示細胞に一緒に到達し、これにより、抗原の獲得されたタンパク質形態のプロセシングおよび提示が、同じ細胞において、抗原性タンパク質のDNAによりコードされた形態の発現と一緒にもたらされると考えた。発現したタンパク質の抗原プロセシングが、異なる経路によって、また、獲得されたタンパク質に対する速度論とは少し異なる速度論で起こるので、本発明者らは、その同系タンパク質と会合させたDNAのそのような同時送達により、これらの2つの抗原提示様式の付加的または相乗的な効果に対する機会、および改善された免疫応答が提供されると考えた。ここに、本発明者らは、DNAおよびタンパク質の会合を提供する、DNAおよびその同系タンパク質の小胞配合物に関するこの新しい仮説を試験した。Alvarez-Lajonchere他とは異なり、本発明者らは、「アシスタータンパク質」と呼ばれるその同系タンパク質と（リポソームを介して）会合したDNAの特別なワクチン組成物が可能であることを見出した。ここで、（タンパク質単独またはDNA単独による免疫化と比較した場合）、増強された抗体応答が免疫化後に観測されている。本発明者らは、DNAおよびタンパク質が別個の粒子に配合され、粒子が混合された場合、抗体産生の増強が認められないことを見出している。これらの観測結果は、同じ抗原提示細胞へのDNAおよびアシスタータンパク質の同時送達の本発明者らの理論と一致している。しかしながら、本発明者らは、この時点では排除することができない他の理論的説明があり得ることを認める。

【0008】

10

本発明は、両親媒性成分から形成された小胞を含む、核酸およびアシスタータンパク質を細胞に同時送達するための組成物であって、前記核酸は、少なくとも1つのエピトープを前記アシスタータンパク質と共有する抗原性タンパク質またはその一部を機能的にコードし、相互に同じ小胞と会合した前記核酸および前記アシスタータンパク質を含む、前記組成物を提供する。

【0009】

アシスタータンパク質の用語は、完全なタンパク質、タンパク質のフラグメント、単一タイプのタンパク質、または異なるタイプのタンパク質を示す。

【0010】

30

核酸によりコードされる抗原性タンパク質は、一般に、目的とするタンパク質（すなわち、有益な免疫応答が対象において所望される標的タンパク質）である。アシスタータンパク質は、一般に、核酸によりコードされる抗原性タンパク質の発現した形態（すなわち、核酸の同系タンパク質）と同一である。抗原性タンパク質および/またはアシスタータンパク質はそれが（別々に）、関連した供給源に由来する天然に存在するタンパク質の全長配列を含む。好ましくは、核酸は、天然に存在する完全なタンパク質抗原をコードする。あるいは、核酸は、アシスタータンパク質のエピトープの少なくとも1つを含む天然タンパク質の一部のみをコードすることができる。本発明の1つの好都合な実施態様において、前記エピトープは、感染性媒介因子の表面にその天然に存在する形態で露出しているB細胞エピトープである。核酸は、天然に存在する媒介因子のエピトープの少なくとも1つを含む天然タンパク質の一部のみをコードすることができる。媒介因子は、例えば、微生物（例えば、細菌または酵母）またはウイルスである。同様に、アシスタータンパク質は、供給源がその天然の環境に存在するとき、（1つの実施態様では）表面で利用可能な、それぞれの供給源に由来するエピトープを含有しなければならない。あるいは、そして有用なことには、抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質はともに、病原体の分泌された毒性産物（例えば、破傷風毒素など）と、そのような毒素の中和に適するエピトープを共有する。同様に、抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質はともに、毒素以外の病原体の分泌された毒性産物（例えば、エプスタイン・バールウイルスによりコードされ、エプスタイン・バールウイルスが感染した細胞により分泌されるインターロイキン-10アナログなど）とも共有されるエピトープを互いに共有することができる。

【0011】

40

50

本発明者らは、新しい組成物の改善された成果を説明するために、相互に排他的でない2つの関連した理論を組み立てている。本発明者らは、これらの理論を、(下記に記載されるように)一般的理論および特異的理論と呼んでいる。

【0012】

1. 一般的理論

一般的理論では、適切に同時配合された物質の増強された成果(DNAおよびその同系タンパク質の両方が、集団内の小胞がDNAおよびタンパク質の両方を有するように1つの小胞と会合している)は、(抗原提示細胞が古典的な抗原提示細胞(マクロファージもしくは樹状細胞など)またはB細胞であるとしても、抗原提示細胞が抗原特異的または抗原非特異的であるとしても)同じ抗原提示細胞による核酸およびその同系タンパク質(アシスタータンパク質)の両方の獲得によるためであるとするものである。同じ細胞へのDNAおよびその同系タンパク質の同時送達により、DNAがある1つの抗原提示細胞によって獲得されることになり、タンパク質が別の抗原提示細胞によって獲得されることになった場合には可能でないと考えられる、後に続く免疫応答における相乗的な相互作用が可能になる。(以前に記載された組成物は、同じ抗原提示細胞へのDNAおよびその同系タンパク質の同時送達を提供しないか、またはそのような同時送達の重要性を認識していない)。

【0013】

2. 特異的理論

特異的理論では、適切に同時配合された物質の増強された成果(この場合、DNAおよびその同系タンパク質の両方が、集団内の小胞がDNAおよびタンパク質の両方を有するように1つの小胞と会合する)には、小胞が、(粒子の表面に露出したタンパク質形態での抗原によって)抗原特異的なB細胞に標的化されること、それにより、DNAおよびその同系タンパク質の両方が、標的化された様式で、同じ抗原特異的なB細胞に選択的に送達されることが伴うとしている。抗原特異的なB細胞は、通常、免疫応答の途中で増殖するので、これらの増殖中の細胞の方が、増殖中でない細胞よりも、粒子に同様に存在する核酸による形質導入に対する良好な標的を形成すると考えられる。上記の一般的理論の場合のように、同じ細胞へのDNAおよびその同系タンパク質の同時送達により、DNAがある1つの抗原提示細胞(この場合には、抗原特異的なB細胞)によって獲得されることになり、タンパク質が別の抗原提示細胞によって獲得されることになった場合には可能でないと考えられる、後に続く免疫応答における相乗的な相互作用が可能になる。この理論の具体的な形態において、粒子はB細胞の抗原特異的な受容体(すなわち、表面抗体)によって捕獲され、核酸およびその同系タンパク質(アシスタータンパク質)がともに、個々の抗原特異的なB細胞によって取り込まれる。

【0014】

核酸に基づく免疫化の効率は、目的とする核酸を取り込んで、発現する細胞がほとんどないように、抗原をコードする核酸のむき出し配合物(例えば、むき出しDNA)を用いてインビボで達成される低い形質導入効率によって制限されている。本発明の例示において、本発明者らは、DNAをインビボでヌクレアーゼから保護することを達成するために、また、同じ粒子でのDNAおよびその同系タンパク質(アシスタータンパク質)の同時配合を可能にするために、小胞状の、主としてリポソームの組成物を使用している。しかし、他の小胞状の組成物が、DNAおよびその同系タンパク質の会合を達成して、本明細書中で規定される同時送達の必要な性質を達成するために使用され得ることが、読者には明らかになるに違いない。

【0015】

本発明による特定の好ましい組成物において、小胞は、リポソーム形成物質から形成されたリポソーム、すなわち、脂質二重層から形成されたリポソームを含む。あるいは、小胞は単層であり得る。リポソームは、合成された両親媒性成分(例えば、界面活性剤型の分子など)を含むことができる。このタイプの非イオン性の小胞は、多くの場合、ニオソームとして知られている。小胞は、リン脂質を含まないことがあるが、しかし、好ましく

10

20

30

40

50

は、実質的にリン脂質に基づいている。

【0016】

リポソーム組成物を使用した本発明者ら自身の研究の途中で、本発明者らは、同じリポソーム粒子におけるタンパク質およびDNAの効率的な同時捕捉および／または会合を得ようと努力した。本発明者らは、DNAをパッケージングし、DNAをヌクレアーゼから保護するために、また、DNA免疫化のために本発明者らが開発したリポソーム組成物（これは本発明者らの初期の出願（国際特許出願公開WO-A-9810748）に記載される）もまた、タンパク質およびDNAを同時に同時パッケージングすることにおいて非常に効率的であることを見出している。驚くべきことに、リポソームを配合するための本明細書中に規定される条件のもとでは、DNAおよびタンパク質は、リポソーム粒子内の会合または封じ込めに関して互いに競合しない。そのうえ、それらはまた、著しい量のアシスタータンパク質を抗原的に活性な形態でリポソーム粒子の表面に呈示することができる。本発明者らは、本発明者らの新しい組成物の表面局在化タンパク質抗原（アシスタータンパク質）が、リポソーム、または、これらの構造体の分解からインビボで生じたりポソームフラグメントを抗原特異的なB細胞に標的化する能力を有し得ると考えている。
10

【0017】

リポソームに配合されたDNAは、例えば、抗原提示細胞の細胞受容体に対するリガンド（例えば、マンノシル成分、またはC3dなどの補体タンパク質）をリポソームの表面に置くことによって、抗原提示細胞表面の受容体に標的され得るが、抗原そのものは、核酸に基づくワクチンにおける標的化デバイスとして以前には使用されていなかった。
20

【0018】

本発明の新しい組成物は、抗原の獲得されたタンパク質形態（アシスタータンパク質）と、その同系核酸からのタンパク質の発現した形態との両方の抗原提示細胞による同時提示を可能にする。そのような組成物は新規な抗原刺激・追加抗原刺激の作用を可能にし、それにより、（異なる時間で最大となる）発現した抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質の提示の動力学が異なることによって、抗原に対する関連した免疫細胞のより長く持続する「ダブルヒット」暴露がもたらされる。核酸ワクチン分野における他の抗原刺激・追加抗原刺激の現象とは異なり、本発明の新規な組成物は、1回の服薬により、抗原刺激および追加抗原刺激の機能をもたらす。
30

【0019】

本発明の新しい組成物の別の好都合な特徴は、2つの形態物（タンパク質の添加された形態およびインビボで発現した形態）の抗原提示様式が異なることに関係する。獲得されたタンパク質および発現したタンパク質は抗原提示細胞において2つの異なる経路によって提示される（前者はクラスIIのMHCを介してペプチド提示をもたらし、後者はクラスIのMHCを介してペプチド提示をもたらす）ので、この新しい発明により、Tヘルパー細胞（クラスII限定型）、クラスII限定型エフェクターT細胞、および細胞傷害性T細胞（クラスI限定型）の刺激を伴う、より広範囲に基づく免疫応答がもたらされる。新しい組成物によって生じる細胞の微小環境（この場合、クラスII提示およびクラスI提示の両方が同じ抗原提示細胞の表面で生じている）により、抗原提示細胞を必要とする種々のT細胞タイプの間での相互作用が可能になる。両方のT細胞タイプ（クラスI限定型およびクラスII限定型）が、同じ抗原提示細胞との相互作用のときに、また、抗原提示細胞の表面に同時に存在しながら相互の相互作用によって刺激され得るので、本発明の新しい配合物は、核酸免疫化について、以前に記載された方法および組成物を上回る理論的利点をいくつか有する。本発明において、本発明者らは、そのような理論的利点が、抗原に対する抗体応答のレベルで実際に確認されることを記載する。しかしながら、本発明者らは、さらなる利点が、（Tヘルパー細胞応答、および細胞傷害性T細胞を含むエフェクターT細胞応答を含む）細胞媒介免疫性を刺激することにおける新規な配合方法について見出されることを予測する。タンパク質抗原に対する抗体応答は非常にT細胞依存的であるので、抗体産生に関する本出願で示されたデータは、新しい組成物が、Tヘルパー細胞（MHCクラスII限定型）応答を（少なくとも）刺激することにおいて効果的である
40
50

ことを強く示唆している。新しい配合方法により、同じ抗原提示細胞の表面でのクラスⅠⅠ限定のヘルパー細胞およびクラスⅠ限定の細胞傷害性細胞の同時刺激がもたらされるという事実はまた、この方法が、細胞傷害性T細胞応答を刺激することにおいて効果的であることを示唆している。従って、アシスタータンパク質は、細胞傷害性T細胞応答のためにさらなる助けを提供する。すなわち、アシスタータンパク質は、抗原提示細胞の表面でTヘルパー細胞によって認識された抗原のMHCクラスⅠⅠ限定ペプチドエピトープの濃度および/または発現の持続時間を増大させ、これにより、クラスⅠのMHC経路を介して提示されたタンパク質抗原について発現した形態に対する細胞傷害性T細胞応答のT細胞援助のための機会を増大させる。

【0020】

10

免疫応答では、免疫系の異なる細胞の間での協調、すなわち、抗原提示細胞（例えば、マクロファージおよび樹状細胞など、これらは「古典的」な抗原提示細胞として知られている）、T細胞（Tリンパ球）およびB細胞（Bリンパ球）の間での協調が要求される。B細胞は、いくつかの点で従来の抗原提示細胞による提示と類似する様式で、抗原をT細胞に提示する能力を有する。B細胞が、特異的な抗体を産生させるために必要とされる「助け」を獲得するのは、このB細胞-T細胞の相互作用のときである。しかしながら、古典的な抗原提示細胞とは異なり、B細胞は、粒子状の抗原を獲得することが良好でない。しかしながら、一部のB細胞（すなわち、所与の抗原に対して特異的であるB細胞）は、その抗原特異的な表面免疫グロブリン受容体を介して（抗原分子を含む）小さい抗原粒子を獲得し、かつ濃縮することができる、抗原提示において特に良好である。抗原非特異的なB細胞と比較して、抗原特異的なB細胞は、クラスⅠⅠ限定のT細胞に対する抗原の提示において少なくとも1000倍大きい効率を有する（Lanzavecchia, A.、T細胞とB細胞との間での抗原特異的な相互作用、Nature、1985年4月、11~17；314(6011)：537~9）。従って、抗原特異的なB細胞は、抗原性タンパク質およびその会合したDNAの粒子を獲得する能力を有するので、本発明の組成物に対する重要な標的であり得る。

20

【0021】

T細胞およびB細胞は抗原を異なる方法で認識する。これらの異なる認識様式は、本発明の実施態様の異なる様式について様々な関わりを有する。本発明の好都合な実施態様を理解するためには、最初に、これらの異なる認識様式の特徴を理解することが必要である。T細胞は、細胞の表面におけるクラスⅡまたはクラスⅠのMHC抗原に埋め込まれたタンパク質のペプチドフラグメントを認識し、これに対して、B細胞（これにより、最終的には抗体が産生される）は、その細胞表面における抗体様抗原受容体を介して、（通常、性質が一致するタンパク質である）フラグメント化されていない抗原の表面特徴を認識する。T細胞およびB細胞のこのような異なる認識における条件は、それらのエピトープの性質が異なることを反映している。このように、B細胞は、抗原または病原体の表面特徴（B細胞エピトープ）を認識しなければならないが、T細胞エピトープ（これは、長さが約8アミノ酸から12アミノ酸のペプチドを含む）は、抗原の表面に存在することは必須ではなく、抗原の三次元構造に関連して見たとき、「外部」だけでなく、「内部」にも存在し得る。本発明の「特異的理論」（これは上記に規定される）によれば、B細胞エピトープの最も好都合な存在位置は、適切に配合されたリポソーム〔核酸+タンパク質〕による抗原特異的なB細胞の取り込みおよび刺激を容易にする、抗原または病原体における「表面」である。しかしながら、本発明の一般的理論（この場合、リポソームが抗原非特異的な様式で抗原提示細胞によって獲得される）によれば、エピトープ（特に、T細胞エピトープ）は、抗原の構造において内部に位置してもよく、抗原または媒介因子の表面において利用可能であること、またはその表面に露出することは要求されない。

30

【0022】

40

本発明の1つの好都合な実施態様において、抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質はともに、ウイルスタンパク質の表面抗原に由来する。これらのタンパク質は、少なくとも1つのエピトープ（B細胞またはT細胞）（好ましくは数個）を共有するならば、

50

相互に同じ配列を有してもよく、または変異していてもよく、または一部が欠失していてもよく、または他のポリペプチドと融合していてもよい。

【0023】

抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質が共通して有するタンパク質の一部を、それらの配列相同性の点で発現させることができる。これらのタンパク質は、アシスタータンパク質が、抗原性タンパク質の同じ長さの連続した配列と少なくとも50%（好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%）の類似性を有する少なくとも10残基の少なくとも1つの連続した配列を有するようにしなければならないと考えられる。一般に、それぞれの連続した配列は、長さが少なくとも50残基であり、少なくとも90%の配列類似性を有し、好ましくは少なくとも75%の配列類似性を有する。より好ましくは、前記の連続した配列は、少なくとも50%（好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%）の配列同一性を有する。

10

【0024】

しかしながら、配列類似性は構造的類似性の1つの指標にすぎず、「特異的理論」（上に規定されている）の場合、アシスタータンパク質、およびコードされ、発現したタンパク質が、配列相同性についての条件を何ら伴うことなく、1つのB細胞エピトープ（媒介因子を認識する単一の抗体により認識されるものと規定する）を共有することだけを必要とするだけである。

【0025】

本発明の組成物は、免疫応答（例えば、感染性因子による感染に抵抗するために十分である免疫応答）を生じさせるために有用である。従って、抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質は、好ましくは、感染性因子である供給源に由来し、例えば、細菌などの微生物またはウイルスに由来する。好適には、ウイルスは、それに対する免疫応答によりウイルスを中和または排除できることが知られている（あるいは、ウイルスを中和または排除できると考えられる）ウイルスであり、例えば、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルスまたはC型肝炎ウイルスなど）、またはインフルエンザウイルス（例えば、A型インフルエンザウイルスまたはB型インフルエンザウイルスなど）である。好適には、感染性因子は細菌であってもよく、例えば、連鎖球菌（例えば、肺炎連鎖球菌（*S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e*）、またはA群連鎖球菌もしくはB群連鎖球菌のメンバー）、あるいは髄膜炎を生じさせ得る媒介因子（例えば、髄膜炎菌群A、B & C、またはインフルエンザ菌（*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e*）など）、あるいは子供に耳感染症を生じさせ得る生物（例えば、モラクセラ・カタラリス（*M o r a x e l l a c a t t h a r a l i s*）など）であり得る。好適には、媒介因子は、結核菌（*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*）などのマイコバクテリウム属細菌であり得る。好適には、抗原はまた、ガン性の細胞または組織の表面または内部で選択的に発現する宿主タンパク質であってもよく、例えば、ガン胎児性抗原、またはCD55（補体制御タンパク質）、または腫瘍血管系の各種インテグリンもしくは他のマークーなどであり得る。本発明の新規なワクチン組成物の標的抗原はまた、中和または排除を必要とする宿主タンパク質または宿主ペプチドであってもよく、例えば、有害な自己抗体、または、アルツハイマー病のその様々な形態でのアミロイドペプチド（A-40およびA-42）などのペプチドなどであり得る。

20

30

40

【0026】

ワクチンの標的抗原はまた、細菌多糖などの炭水化物であり得る。この場合、タンパク質および/またはアシスタータンパク質の発現した形態は前記炭水化物抗原の抗原性構造を模倣する。B群髄膜炎菌多糖の好適なペプチド模倣体（*L a i n g , G r a n o f f , G r a n o f f D M* および *M o e G R*、B型髄膜炎菌エピトープの分子的模倣体、米国特許第6,030,619号）およびB群連鎖球菌多糖の好適なペプチド模倣体が記載されている。そのようなペプチドは、炭水化物エピトープのペプチド配列の種々の実施態様の、異なる配列が反復するエピトープを含むポリペプチドまたはタンパク質を形成させるDNAレベルで連結されたコンカテマー化形態として、発現させることができる。

50

【 0 0 2 7 】

本発明によれば、有益な免疫応答が所望される標的エピトープは、D N A によってコードされるタンパク質と、アシスタータンパク質との間で共有されるエピトープに対応しなければならない。標的抗原上の元の場所の標的エピトープ（例えば、A型インフルエンザ赤血球凝集素の中和エピトープなど）の位置は、抗体にとって利用可能であるが、一方、媒介因子（例えば、結核菌の熱ショックタンパク質など）中の内部でもまた利用可能であり得る。

【 0 0 2 8 】

アシスタータンパク質は、通常、組成物における核酸によりコードされるタンパク質に対して非常に類似しているか、または同一であるが、一方、核酸によりコードされるタンパク質との共有エピトープを少なくとも1つ（好ましくは数個）有するタンパク質を組成物が含有するならば、ウイルス全体（ビリオン）または「分割」ウイルス調製物（例えば、広く知られている界面活性剤溶解インフルエンザウイルス調製物など）もあり得る。アシスタータンパク質は、一般に、宿主動物での複製が可能である増殖可能なウイルスからは構成されない。

10

【 0 0 2 9 】

本発明において、核酸はR N A であり得るが、好ましくはD N A であり、好ましくは二本鎖である。抗原を機能的にコードするD N A は、好ましくは、プロモーターおよび好ましくは制御配列を含まなければならない。好適には、D N A は、好都合には大腸菌C 1 プラスミドに由来するプラスミドD N A であり、しかし、線状D N A も可能である。

20

【 0 0 3 0 】

本発明においては、核酸が、一つもしくはそれ以上のタンパク質をコードするか、および／または、1つもしくはそれ以上の異なるアシスタータンパク質を含むことが、望ましかろう。この実施態様の場合、単一の小胞が、この小胞粒子と会合した抗原性タンパク質またはアシスタータンパク質と上記のようなエピトープを共有している抗原性タンパク質をコードする核酸と会合していることが好ましい。例えば、本発明の組成物は、2つ以上の異なるリポソームタイプを混合状態で含むことができ、この場合、例えば、その1つが、第1の抗原性タンパク質をコードする核酸を第1のアシスタータンパク質とともに含み（この場合、抗原性タンパク質およびアシスタータンパク質は上記のように関係づけられる）、別のリポソームタイプが、第2の抗原性タンパク質をコードする核酸を、上記のように第2の抗原性タンパク質に関係づけられる第2のアシスタータンパク質と会合して含む。あるいは、1個のリポソームが2つ以上の異なる核酸を含有することができ、この場合、その1つが第1の抗原性タンパク質をコードし、他のものが第2の抗原性タンパク質（など）ならびに第1および第2（など）のアシスタータンパク質をコードし、第1および第2のアシスタータンパク質は、上記のように、それぞれの第1および第2の抗原性タンパク質に関係づけられる。これらの2つ以上の抗原性タンパク質は、1つの核酸によってコードされる同じ発現したタンパク質分子（すなわち、融合タンパク質）の一部分であってもよい。あるいは、2つ以上の別の核酸成分（それぞれが1つの抗原性タンパク質の異なる部分をコードする）を、1つのリポソームに（タンパク質とともに）含めることができる。好都合な組成物はまた、それぞれのD N A が同じリポソーム内にその同系タンパク質またはアシスタータンパク質と会合しているのであれば、別々に同時配合された複数のD N A およびそれらの同系タンパク質（アシスタータンパク質）を含むことができる。

30

【 0 0 3 1 】

核酸およびタンパク質との同じ構成を、非リン脂質成分から形成された本発明の小胞状の組成物において達成することができる。

40

【 0 0 3 2 】

2つ以上の抗原性タンパク質を伴う実施態様は、前段落で記載されたように、組成物が、いくつかの感染性株に存在し得る感染性媒介因子に対して免疫応答を生じさせるために、通常ワクチン接種するために使用される場合、特に有益であり得る。本発明のこの実施態様は、感染性媒介因子がウイルス（特にインフルエンザウイルス）である場合、特に有

50

益である。従って、核酸によりコードされる抗原性タンパク質およびその対応するアシスタータンパク質は、インフルエンザウイルスのA株およびB株に由来し得る。1つの好ましい実施態様は、A型インフルエンザの2つの現在流行している（または予期される）株、および、B型インフルエンザの1つの現在流行中の株（または予期される株）を含む。この組成物は、好都合には、それぞれの粒子が3つすべての核酸および3つすべてのタンパク質と会合するように1つの小胞（例えば、リポソーム粒子）と会合した6つの分子的実体のすべてを含む。インフルエンザウイルスを含む別の好都合な実施態様は、単回用量で混合されるか、または、3回の別個の投薬でヒトもしくは動物の受容者に投与される{A_iタンパク質+A_iDNA}、{A_iiタンパク質+A_iiDNA}および{Bタンパク質+B DNA}（この場合、中括弧は個々の小胞への負荷物を示す）を含む3つの別々に作製された小胞配合物を含む。10

【0033】

本発明の1つの有用な実施態様において、この核酸は、少なくとも一部が、好ましくは実質的には全体が小胞（通常、リポソーム）の小胞内空間に捕捉されている。この核酸が小胞内空間に捕捉されているとき、この核酸はその環境から最適に保護され、しかし、それにもかかわらず、対象に投与されると、適切な細胞に送達され得る。あるいは、しかしあまり好ましくないが、核酸を小胞と複合体化することができる。すなわち、核酸を、主に小胞の外側表面に結合させることができる。そのような配置は、核酸の投与時および送達時における低下した保護をもたらすが、効果的である場合もある。

【0034】

本発明の1つの実施態様において、アシスタータンパク質は、好ましくは、少なくとも一部が小胞の外側表面において利用可能である。これにより、抗原特異的なB細胞による小胞の獲得が可能になり、ワクチン組成物に対する免疫応答の初期段階において抗体が產生された後、小胞表面の表面に結合した抗原特異的なIgGを認識する高親和性のFc-受容体を介した抗原提示細胞による、抗体と複合体化した小胞の取り込みが容易になる。同様に、リポソームまたは他の小胞における表面に存在する抗原は補体の固定を可能にし、抗原提示細胞およびB細胞における補体受容体による小胞およびそのフラグメントの取り込みをもたらす。これらの結果を達成するために、タンパク質は、（例えば、外因性膜タンパク質の様式で、静電的相互作用または疎水性相互作用によって）小胞の外側表面と単に複合体化させることができ、または、好ましくは、小胞外の環境に一部を露出させたまま、（例えば、ポリペプチド鎖の二重層貫通疎水性配列を介して）小胞の壁に埋め込まれる。いずれの場合においても、本発明によれば、目的とするエピトープは小胞の外側から利用可能でなければならない。そのような利用可能性は、それぞれのエピトープに対する抗体を使用した結合実験を行うことによって決定することができる。表面露出を明らかにするそのような結合データが、A型インフルエンザウイルスについてのDNAおよびタンパク質の同時配合に関する本発明者らの研究に対する本文に関連する図に記載されている。30

【0035】

小胞がリポソームである場合、リポソームを形成させるために使用されるリポソーム形成分は、中性の脂質成分、両性イオン性の脂質成分、アニオン性の脂質成分および/またはカチオン性の脂質分を含むことができる。これらは、全体的な荷電をリポソームにもたらすような相対的な量で使用され得るか、または、あまり好ましくないが、リポソームが全体的な荷電を有しなくともよい。リポソームが全体的な正荷電を有するように脂質成分を使用することにより、良好な結果がもたらされ得ることが見出されている（本明細書のデータの節を参照のこと）。脂質と厳密に呼ばれる成分（これには、グリセリドおよびコレステロールが含まれる）に加えて、リポソーム形成分には、非イオン性またはカチオン性の表面活性剤などの非脂質性の成分（すなわち、天然に存在する脂質でない成分）が含まれ得る。

【0036】

本発明の特に好ましい実施態様によれば、本発明の新しい組成物は、リポソームが全体40

50

20

30

50

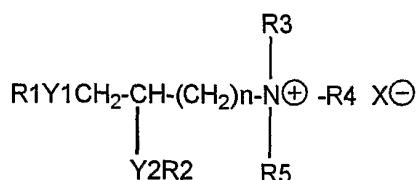
的に正荷電を有するような量で少なくとも1つのカチオン性荷電成分を含むリポソーム形成成分から形成されるリポソームを含む。

【0037】

本発明のこの実施態様において、リポソームに取り込まれるカチオン性成分は、ポリヌクレオチドとの複合体化によってトランスフェクション率を改善するためにリポソームの調製において使用されているカチオン性成分のいずれかであり得る。そのような成分は脂質化合物または非脂質化合物であってもよく、合成物または天然物であってもよい。好ましいカチオン性脂質は、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ビス(ヘキサデシルオキシ)-3-トリメチルアミノプロパン(BisHOP)、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウムクロリド(DOTAM)、および米国特許第4,897,355号(これは参照して本明細書中に組み込まれる)において規定される構造Iの他の脂質、またはそのエステルアナログである。構造は下記の通りである:

【0038】

【化1】



10

20

またはその光学異性体

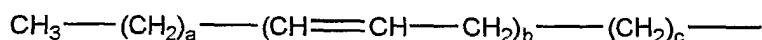
(式中、Y1およびY2は同じまたは異なり、それぞれが-O-またはO-C(O)-であり、この場合、カルボニル炭素は、場合により、R1またはR2に結合する; R1およびR2は独立して、炭素原子が6個から24個のアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、R3、R4およびR5は独立して、水素、炭素原子が1個から8個のアルキル、炭素原子が6個から11個のアリールまたはアラルキルである;あるいは、R3、R4およびR5の2つまたは3つは、正荷電の窒素原子と一緒にになって、5個から8個の原子を有する環状構造を形成し、この場合、正荷電の窒素原子に加えて、構造内の原子は炭素原子であり、1個の酸素原子、窒素原子またはイオウ原子を含むことができる; nは1から8である; Xはアニオンである)。

【0039】

好ましい実施態様は、R1およびR2が個々に、0個から6個の不飽和部位を有し、下記の構造を有する組成である。

【0040】

【化2】



30

40

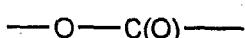
(式中、aおよびcの和は1から23である; bは0から6である)。

【0041】

最も好ましくは、R1およびR2のそれぞれがオレイルである。特に好ましい実施態様は、長鎖アルキル基が脂肪酸である組成、すなわち、Y1およびY2が等しく、

【0042】

【化3】



である組成である。

50

【0043】

あるいは、米国特許第5,459,127号（これは参照して本明細書中に組み込まれる）において規定される一般構造Iまたは一般構造IIのカチオン性脂質を使用することができる。

【0044】

他の好適なカチオン性化合物は、非脂質成分ステアリルアミン、および3-[N-N'-ジメチルアミノエタン]カルバミル]コレステロール(DC-CHOL)（脂質成分）またはその類似体である。

【0045】

リポソームは、カチオン性成分を含むことに加えて、一般に、脂質を含む非イオン性成分および／または両性イオン性成分をも含む。この場合、脂質は、リン脂質、またはホスホリル基を含まない他の脂質であり得る。好ましくは、そのような脂質には、リン脂質、例えば、天然または合成のホスファチジルコリン類、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファチジルセリン類などが含まれ、これらのいずれにおいても、長鎖アルキル基（これはエステル結合またはエーテル結合を介して結合し得る）は飽和または不飽和であり得る。好ましくは、グリセリド脂質のアシル基が不飽和である。これらの成分は非脂質成分を含むことができ、例えば、非イオン性界面活性剤、例えば、脂肪酸のソルビタンモノエステル、および／またはエトキシリ化脂肪酸、または、エトキシリ化ラノリンなどの他の類似体などを含むことができる。

【0046】

10

リポソームが融合性の脂質（これは、通常、アシル基が不飽和であるホスファチジルエタノールアミン類である）を含むとき、最も良い結果が達成される。コレステロールを含ませることができ。しかしながら、コレステロールは、リポソームを標的細胞内へのポリヌクレオチドの十分な送達のために安定にしそうことがある。

【0047】

20

カチオン性成分の量は、好ましくは、リポソーム形成成分の総モル数の5%から50%の範囲であり、好ましくは10%モルから25%モルの範囲である。

【0048】

小胞組成物は、一般に、例えば、生理学的緩衝液における水性懸濁物の形態である。あるいは、小胞組成物は、再水和される乾燥された組成物であり得る。

30

【0049】

組成物は、好ましくは、例えば、皮下経路、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、鼻腔経路、経口経路、他の粘膜経路または肺経路による投与のために適合化されたワクチンである。

【0050】

小胞は、通常使用されている小胞形成技術のいずれかによって作製することができる。小胞は多層小胞または単層小胞であってもよく、また、比較的大きくてもよく（300nmから5000nmの範囲にある小胞直径；好ましくは2000nm未満で、好ましくは500nmから1000nmの範囲にある平均直径を有する）、または小さくてもよい（100nmから400nmの範囲にある小胞直径；好ましくは200nmから300nmの範囲にある平均直径を有する）。好ましくは、小胞は平均直径が500nmを超えず、好ましくは、実質的にすべてが2000nm未満の直径を有する。

40

【0051】

本発明のリポソーム組成物は、従来のリポソーム形成プロセスによって、例えば、核酸およびタンパク質を含有する懸濁媒体にリポソーム形成物質を薄膜から分散させ、その後、1回または複数回のサイズ調節工程を行うことによって、あるいは、リポソーム形成物質および核酸および／またはアシスタータンパク質を共通溶媒に同時に溶解し、その後、水性液体の添加を伴うリポソーム形成工程を行うことによって、あるいは、濃度勾配エレクトロポレーション技術または電気泳動技術を使用して、予備形成リポソームの壁を介して核酸および／またはアシスタータンパク質を負荷することによって形成され得るが、好

50

ましい方法では、脱水・再水和技術が使用される。

【0052】

リポソーム配合のいくつかの好適な方法が、[Christopher J. KirbyおよびGregory Gregoriadisによる書籍：ISBN 0-471-14828-8、Encyclopedia of Controlled Drug Delivery (編者：Edith Mathiowitz、1999年7月にWileyにより発行、リポソームについては「L」章)]に記載されている。これらには、(網羅的ではないが)、「手振とう」法によって調製される多層リポソーム；脱水／再水和小胞(本発明の実施例で使用される方法、これは非常に効率的である)；および、溶媒に可溶化された脂質の簡単な水和が含まれる。これらの手法におけるDNAおよびタンパク質の同時存在は、両者とリポソームとの様々な程度の同時捕捉および他の形態の会合をもたらす。リン酸カルシウムもまた、DNAおよびタンパク質と一緒に沈殿させるために使用することができ、国際特許出願WO-A-0141739に記載される本発明者らの発明の「DNAを伴うタンパク質同時配合」形式をもたらす。

【0053】

会合したDNAおよびその同系タンパク質を形成させるための別の好都合な方法は、[Judith SeniorおよびGregory Gregoriadis(Biochimica et Biophysica Acta、1989、1003、58~62)]によって発表された方法である。これは脱水・再水和法の変法であり、この変法では、本発明の「アシスタータンパク質」成分が、小さい単層小胞(SUV)の表面への共有結合コンジュゲート化によって取り込まれ得る。その後、そのようなSUVは凍結乾燥され、その後、抗原をコードするDNAの溶液において、SeniorおよびGregoriadis(上記)に従って再水和される。得られる多層小胞は、タンパク質負荷量の大部分がリポソーム粒子の表面に存在する。これは本発明の好都合な実施態様である。

【0054】

リポソーム組成物を形成させるための本発明による方法は、
a) リポソーム形成物質から形成される小さい単層小胞(SUV)の水性懸濁物を提供する工程；
b) SUVの水性懸濁物を、抗原性タンパク質を機能的にコードする核酸と接触させて、
SUV-核酸の懸濁物を形成させる工程；
c) SUV-核酸の懸濁物を脱水して、脱水された混合物を提供する工程；および
d) 脱水された混合物を水性再懸濁媒体で再水和して、核酸含有リポソームの懸濁物を形成させる工程

を含み、アシスタータンパク質を導入する工程を含み、それにより、核酸含有リポソームが前記アシスタータンパク質と会合させられる。

【0055】

脱水・再水和法により、核酸は生成物リポソームの小胞内空間の内部に捕捉される。さらに、少量がリポソームの外側表面に残され得る。アシスタータンパク質は、このプロセスの様々な異なる段階で加えることができる。アシスタータンパク質は、工程bの前に、または工程bの途中で、または工程bの後、工程cの前に、SUVの水性懸濁物と接触させることができる。アシスタータンパク質は、核酸とともにリポソームの小胞内空間の内部に同時に捕捉される。

【0056】

代わりの方法において、アシスタータンパク質は、再水和工程のときの再懸濁媒体に存在する。この実施態様では、タンパク質の少なくとも一部がリポソームの外側表面に露出すると考えられる。代わりの方法において、タンパク質は核酸含有リポソームの水性懸濁物と接触させられる。この実施態様により、タンパク質の実質的にすべてがリポソームの外側表面と会合する。

【0057】

タンパク質の取り込み度を増大させ、その一方で、リポソームの外側表面でのエピト-

10

20

30

40

50

プの露出を可能にするために、アシスタータンパク質を、リポソームの壁の中に埋め込むために好適な親油性成分（例えば、脂肪アシル成分など）にコンジュゲート化することが、いくつかの実施態様では望ましい場合がある。コンジュゲート化は、アシスタータンパク質に対する調製法の一部を構成し得る。あるいは、アシスタータンパク質を、工程dの後で、リポソームの成分に化学的にコンジュゲート化することができる。

【0058】

リポソーム形成物質が、全体的なカチオン性荷電がリポソーム上に存在するように、カチオン性成分を含む場合、疎水性タンパク質が必要とされるように、またタンパク質の複合体化により強い十分な会合がもたらされるように、周囲条件の下でアシスタータンパク質が全体的な負荷電を有するとき、十分な静電的引力が正荷電リポソームとアシスタータンパク質との間に存在し得る。

10

【0059】

好ましくは、リポソーム形成物質は、モル比で少なくとも5%のカチオン性化合物を含む。

【0060】

本発明において、核酸対アシスタータンパク質の重量比は、好ましくは1000:1から1:1の範囲にあり、最も好ましくは、重量比は5:1から30:1の範囲にある。

【0061】

核酸対リポソーム形成物質の重量比は、好ましくは1:100から1:1000の範囲にあり、より好ましくは1:100から1:300の範囲にある。

20

【0062】

本発明の方法において、工程a)において使用されるリポソーム粒子は、好ましくは、30nmから5000nmの範囲のサイズを有し、最も好ましくは、リポソームの実質的にすべてが1000nm未満の直径を有する。本発明の方法は、粒子サイズが200nmから5000nmの範囲にある生成物リポソームをもたらし、好ましくは、300nmから2000nmの範囲にある生成物リポソームをもたらす。必要な場合には、本発明の方法はサイズ制御特徴を伴う場合がある。これは、成分を、リポソームのサイズを制御する再懸濁媒体（例えば、国際特許出願WO-A-0156548に記載されるように、糖類など）に取り込むことを伴い得る。あるいは、サイズ制御は、懸濁物が微小流体化またはフィルター通過または均質化に供されるさらなる工程を工程dの後に伴い得る。超音波処理は、この目的のためのあまり好ましくないが、実行可能な選択肢である。しかし、超音波処理では、ある程度のDNAフラグメント化が避けられない。

30

【0063】

処理後、核酸およびタンパク質の両方を含む生成物リポソームを、捕捉されていない核酸またはアシスタータンパク質または他の成分が生成物の懸濁物から除かれる精製工程に供することが好ましい。そのような精製プロセスは、遠心分離、ろ過、規定された細孔サイズの多孔性膜に通すこと、ゲル排除クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、この場合、小胞はボイド体積に現れる）を伴い得る。

【0064】

本発明者らは、本発明が、対象に施されたとき、免疫応答（特に、改善された抗体応答）を生じさせるために非常に効果的であることを見出している。本発明者らは、本発明によって示される改善は、基本的には、核酸およびアシスタータンパク質が同じ抗原提示細胞（これには、抗原特異的なB細胞がおそらく含まれる）に同時に標的化され、その結果、好適に配合された小胞と遭遇した後、個々の抗原提示細胞が核酸およびその同系タンパク質の両方を取り込むようになったためであると考えている。インフルエンザの赤血球凝集素の場合、本発明者らは、核酸（赤血球凝集素をコードするDNA）およびその同系タンパク質（赤血球凝集素タンパク質）を、この場合には、核酸を含まない完全な不活化ウイルスのタンパク質の形態で、別個のリポソーム区画またはリポソーム集団において別々に配合し、その後、混合し、インビボで同時投与したとき、それぞれのリポソームがDNAおよびその同系タンパク質の両方を含有するような小さいリポソーム粒子におけるD

40

50

NA およびその同系タンパク質の同時配合の相乗的な効果が達成されないことを観測している。これらのデータは、免疫応答（この場合にはインフルエンザ赤血球凝集素に対する免疫応答）を誘発することにおけるDNA およびその同系タンパク質の相乗作用には、DNA およびその同系タンパク質の両方を同じ抗原提示細胞に同時に標的化することを可能にするための適切な配合が要求されるという本発明者らの仮説を、裏付けている。

【0065】

本発明は、添付された実施例によって例示される。

【実施例1】

【0066】

カチオン性リポソームにおける赤血球凝集素

10

材料および方法：

脂質

卵ホスファチジルコリン（PC）、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1，2-ジオレオイル-3-（トリメチルアンモニウム）プロパン（DOTAP）をSigma Chemical Co.（英国）から購入した。すべての脂質は、クロロホルムに溶解し、窒素置換して保存した（-20℃）。

【0067】

DNA

プラスミドpCI-OVA（DNA OVAと称される）（T. Nagata博士（浜松医科大学、日本）からの譲渡）はニワトリの卵アルブミンタンパク質（オバルブミン、OVA）のcDNAを含有する（Yoshida A、Nagata T、Uchijima M、Higashi T、Koide Y、特異的な免疫応答の再現可能な誘導におけるプラスミドDNAワクチンの筋肉内接種を上回る遺伝子録媒介接種の利点、Vaccine、2000、18、1725～1729）。cDNAは、CMVエンハンサー／プロモーター領域の下流側の、pCIプラスミド（Promega、Madison、WI）のEcoRI部位にクローニングされている。プラスミドp1.17/SichHA（DNA HAと称される）はJ. Robertson博士（NIBSC、英国）によって提供された（Johnson, P他、J. Gen. Virol.、2000、1737～1745）。これは、A型インフルエンザ/四川/2/87に由来する全長のHAを含有する。両方の投薬用プラスミドがAldevron（Fargo、米国）によって商業的に製造され、1mgのDNAあたり100未満のエンドトキシン単位（EU）を含有し、残留タンパク質は検出できなかった。

20

30

30

【0068】

タンパク質

A型インフルエンザ/四川/2/87の不活化ウイルスの完全なタンパク質（スクロース勾配精製物、主要タンパク質HA、抗原HAと称される）をNIBSC（英国）から得た。オバルブミン（グレードVI、抗原OVAと称される）をSigma Chemical Co.（英国）から購入した。

【0069】

リポソーム組成物の調製

40

簡単に記載すると、卵ホスファチジルコリン（PC）およびジオレオイルホスファチジルコリン（DOPE）および1，2-ジオレオイルオキシ-3-（トリメチルアンモニウム）プロパン（DOTAP）（4：2：1のモル比）から超音波処理によって調製された小さい单層小胞（SUV）を、DNA単独またはタンパク質単独と混合するか、あるいは、DNAおよびタンパク質と一緒に混合した（表1）。配合物を三連で調製した：2つのバイアルが投薬（抗原刺激および追加抗原刺激）のためであり、1つのバイアルが、[Gregoriadis, G.、Saffie, R. およびHart, S. L.、リポソーム内におけるプラスミドDNAの高収率取り込み：DNA一体性およびトランスフェクション効率に対する影響、J Drug Targeting、1996、3(6)、467～475]に、および、[Kirby, C.、Gregoriadis, G.、脱水-

50

再水和小胞 (D R V) : リポソームにおける高収率薬物捕捉のための新しい方法、B i o t e c h n o l o g y、1994、2、979~984]に記載されたように、捕捉用物質に加えられ、一晩凍結乾燥された放射能標識トレーサー (H A およびO V A、D N A およびタンパク質) に基づく%捕捉の計算のためであった。制御された条件のもとでの再水和の後、得られた脱水 - 再水和小胞 (D R V リポソーム) を遠心分離によって洗浄して、取り込まれなかった物質を除いた。洗浄されたペレットを、要求される投薬体積にP B S で再懸濁した。リポソーム内へのD N A および / またはタンパク質の取り込みを、懸濁されたペレットに回収された³⁵S (D N A の場合) および¹²⁵I (タンパク質の場合) の放射能に基づいて見積もった。リポソームは、微量電気泳動、およびM a l v e r n Z e t a s i z e r 3 0 0 0 における25°での光子相關分光法 (P C S) に供され、そのゼータ電位 (Z P) およびz - 平均直径がそれぞれ測定された。

【0070】

【表1】

表1

群	配合			%捕捉	
	DNA μg	抗原 μg	リポソーム (PC:PE:DOTAP μmole)	DNA	タンパク質
1.1	70 (H A)	4.2 (H A)	11.2 : 5.6 : 2.8	100	99.5
1.2	70 (O V A)	4.2 (H A)	11.2 : 5.6 : 2.8	91.9	84.1
1.3	70 (H A)	5.25 (O V A)	11.2 : 5.6 : 2.8	97.5	99.0
1.4	70 (H A)		11.2 : 5.6 : 2.8	100	-
1.5		4.2 (H A)	11.2 : 5.6 : 2.8	-	89.8

【0071】

動物の処置

メスB a l b / cマウス (6週齢から12週齢; H a r l a n、英国) を、0.2mlの投薬体積で投与された皮下注射によって免疫化した(表2)。最終的な投薬量は、(放射能計数バイアルからの) 捕捉された物質% (D N A、タンパク質または両者) に基づいて計算された。陰性コントロールのマウスはP B S の投与をそれぞれ受けた。マウスは抗原の2回の投薬を0日目および28日目に受け、サンプル採血物が、最初の注射に関して16日目、28日目および42日目に尾静脈から集められた。

【0072】

配合物捕獲E L I S A

免疫化用配合物(表2)を、H A (A / 四川) の抗原性について捕獲酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によってアッセイした。保証された結合化学性の96ウェルプレートを、炭酸塩緩衝液 (p H 9.6) におけるヒツジ抗A / 四川H A の基準血清 (N I B S C) の1:2000希釈物の50 μl / ウエルで、一晩、4°でコーティングした。ヒツジ抗体溶液を除いた後、ウェルを、P B S における10% (w / v) F C S (ウシ胎児血清) の200 μlでコーティングした。37°で2時間後、ブロッキング溶液を除き、連続希釈された(x2系列の) 配合物(表2参照)をウェルに加えた(ウェルあたり50 μlのサンプル)。配合物は、P B S およびトリトンX100 (T x - 100) (これは、リポソーム配合物を溶解して、捕捉物質をあらわにできる)で希釈された(5) G r e g o r i a d i s , G、B r e n d a M c C o r m a c k、M i a O b r e n o v i c、R o g h i e h S a f f i e、B r a h i m Z a d i およびY v o n

10

20

30

40

50

ne Perrine、リボソームにおけるワクチン捕捉、Methods、1999、19、156～162）。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/ツイーン20で4回洗浄し、1/5000の希釈度でのネズミ特異的（A型インフルエンザ／四川）抗血清の希釈物で重層した（ウエルあたり50μlのサンプル）。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/ツイーン20で4回洗浄し、50μl/ウエルのウサギ抗マウスIg-HRPコンジュゲート化血清（Dak o）を重層した。37で1時間後、プレートをPBS/ツイーン20で4回洗浄し、50μl/ウエルの基質溶液o-フェニレンジアミン（Sigma、Fast O P D）で重層した。反応を、50μl/ウエルの停止溶液（3M硫酸）を添加することによって停止させ、各ウエルの490nmにおける吸光度（OD）を測定した。

10

【0073】

血清のELISA

サンプル採血物から得られた血清をPBSで20倍に希釈して、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によってアッセイされるまで-20で保存した。保証された結合化性の96ウエルプレートを、炭酸塩緩衝液（pH9.6）におけるヒツジ抗A／四川HAの基準血清（NIBSC、英国）の1：1000希釈物の50μl/ウエルで、一晩、4でコーティングした。ヒツジ抗体溶液を除いた後、ウエルを、PBSにおける2%（w/v）BSAの200μlでコーティングした。37で2時間後、ブロッキング溶液を除き、A型インフルエンザ／四川／2/87の不活化ウイルスの完全なタンパク質（スクロース勾配精製物、主要タンパク質HA）（PBSにおいて2.5μg/ml）をウエルに加えた（ウエルあたり50μlのサンプル）。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/ツイーン20（商標）で4回洗浄して、1/100の希釈度から始まる異なる実験血清（個々の動物サンプル採血物または群血清プール物）の希釈物で重層した（ウエルあたり50μlのサンプル）。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/ツイーン20で4回洗浄し、50μl/ウエルのウサギ抗マウスIg-HRPコンジュゲート化血清（Dak o）を重層した。37で1時間後、プレートをPBS/ツイーン20で4回洗浄し、50μl/ウエルの基質溶液o-フェニレンジアミン（Sigma、Fast O P D）で重層した。反応を、50μl/ウエルの停止溶液（3M硫酸）を添加することによって停止させ、各ウエルの490nmにおける吸光度（OD）を測定した。抗体応答が、ODが0.200の読み取り値に達するために要求される血清希釈度（終点希釈度）の逆数として表された。セロコンバージョンの基準が陰性コントロール動物から確立された（表3、群1.12の応答を参照のこと）：×2陰性コントロール（約0.2ユニットのOD）。

20

【0074】

30

【表2】

表2

投薬配合物

群	用量／動物 (0.2ml皮下)		
	リポソーム	DNA (μg)	抗原 (μg)
1.1	あり（同時配合）	HA (10)	HA (0.6)
1.2	あり（同時配合）	OVA (11)	HA (0.6)
1.3	あり（同時配合）	HA (10)	OVA (0.76)
1.4	あり	HA (10)	ゼロ
1.5	あり	ゼロ	HA (0.6)
1.6	あり(1.4および1.5の混合)	HA (10)	HA (0.6)
1.7	ゼロ	HA (10)	OVA (0.76)
1.8	ゼロ	OVA (11)	HA (0.6)
1.9	ゼロ	HA (10)	HA (0.6)
1.10	ゼロ	HA (10)	ゼロ
1.11	ゼロ	ゼロ	HA (0.6)
1.12	ゼロ	ゼロ	ゼロ

10

20

【0075】

結果

これらのデータは、組成物がDNAおよびタンパク質の非常に効率的な同時捕捉を生じさせていること、また、タンパク質の存在はDNAの捕捉効率に対して小さい負の影響を及ぼしているにすぎないこと、および逆の場合逆のことを示している。

【0076】

HA (A型インフルエンザ / 四川株) の抗原性に対する配合物の評価が図1に示される。OD (490nm) シグナルはHA抗原に比例している。12個の群に対する血清抗体の結果(表2)が表3に示される。これらの結果はまた、図2(16日目)、図3(28日目)および図4(42日目、すなわち、2回目の投薬の後の15日目)に示される。

30

【0077】

【表3】

表3

群 5 マウス/群	配合物 10ug/投薬	抗原 0.6ug/投薬	1回の投薬の後の16日目			1回の投薬の後の28日目			2回の投薬の後の15日目		
			OD (+/- ser)	sero /5	力価	OD (+/- ser)	sero /5	力価	OD (+/- ser)	sero /5	力価
1.1	Lip (HA)	0.400 (0.017)	5	675	0.457 (0.053)	5	1298	1.181 (0.071)	5	6015	
1.2	Lip (OVA*)	0.142 (0.039)	1	<100	0.240 (0.017)	4	150	0.656 (0.034)	5	1847	
1.3	Lip (HA OVA)*	0.080 (0.012)	0	<100	0.073 (0.003)	0	<100	0.158 (0.014)	0	<100	
1.4	Lip (HA nil)	0.086 (0.013)	0	<100	0.070 (0.007)	0	<100	0.126 (0.026)	0	<100	
1.5	Lip (なし HA)	0.075 (0.013)	0	<100	0.132 (0.043)	1	<100	0.425 (0.055)	5	974	
1.6	Lip(HA) + Lip(HA)	0.085 (0.009)	0	<100	0.158 (0.034)	2	<100	0.468 (0.042)	5	477	
1.7	HA + OVA	0.067 (0.004)	0	<100	0.080 (0.004)	0	<100	0.176 (0.009)	1	<100	
1.8	なし OVA + HA	0.130 (0.046)	1	<100	0.279 (0.122)	2	191	0.517 (0.233)	4	423	
1.9	なし HA + HA	0.079 (0.007)	0	<100	0.099 (0.011)	0	<100	0.381 (0.104)	4	334	
1.10	なし HA なし	0.046 (0.012)	0	<100	0.007 (0.002)	0	<100	0.180 (0.009)	1	<100	
1.11	なし なし + HA	0.078 (0.014)	0	<100	0.083 (0.006)	0	<100	0.336 (0.086)	4	298	
1.12	なし なし なし	0.115 (0.013)	0	<100	0.050 (0.002)	0	<100	0.063 (0.008)	0	<100	

1/100の血清希釈度で測定されたOD: sero (=セロコハージョン) 1/100の血清希釈度で0.2を超えるODユニット;
力価=0.2のOD値を与える血清希釈度

ODユニット(群あたりの個々の血清のペル物に対して測定されたもの)

* 11μg の用量
* 0.76 μg の用量

捕獲 E L I S A による H A の抗原性についての配合物（表 2）の評価（図 1）が、トリトン X 100 (T X 100) (リポソーム破壊剤) の非存在下および存在下で配合物に対して行われた（注：群 1.3、群 1.4、群 1.7、群 1.10 および群 1.12 は、これらの配合物は H A タンパク質を含有しないので、アッセイに対する陰性コントロールとして使用される）。T X 100 の非存在下で試験された配合物は、タンパク質がリポソームと配合されていない H A 含有配合物において、H A 抗原が容易に検出可能であり（群 1.8、群 1.9、群 1.10）、小さい H A 抗原陽性シグナルが配合物 1.1 および配合物 1.2 において検出可能であること（このことは、このアッセイで用いられた抗体によって結合され得る H A 抗原の表面露出により生じたとおそらくは考えられる）を示している。T X 100 の存在下では、実質的により大きい陽性シグナルがリポソーム群 1.1 およびリポソーム群 1.2 について得られており、このことは、リポソーム配合物に以前に含有された抗原の検出を示している（T X 100 非存在を参照のこと）。配合物 1.5 および配合物 1.6 はともに、配合において D N A の非存在下でリポソームにより捕捉された H A 抗原を含有するが（1.1 および 1.2 と比較のこと）、H A の抗原性をほとんど明らかにすることができる。10

【0079】

配合物（表 2）を用いた免疫化の後に生じた免疫応答が、抗インフルエンザ（主要タンパク質 H A）の抗体応答を測定することによって評価された。結果が表 3 にまとめられ、図 2、図 3 および図 4 にも示される。同じリポソーム配合物で同時送達される H A の D N A およびタンパク質の両方からなった配合物 1.1 は、試験されたそれぞれの血清サンプル採血物（16 日目、28 日目、および 42 日目（2 回目の投薬の後の 15 日目））において、それ以外の配合物のすべてよりも大きい応答をもたらしている。この同時送達された配合物に対する応答は、大きさ（O D 490 nm (1/100 の希釈血清) および力価）に関して、また、それぞれの採血時点で血清陽性と考えられる動物の数に関して最大である。20

【0080】

同じリポソーム配合物に同時送達されたタンパク質および D N A からやはりなる配合物 1.2 および配合物 1.3 は、配合物 1.1 と同じくらいの実質的な応答を生じさせていない。配合物 1.2 および配合物 1.3 は、互いに同系でないタンパク質および D N A からなる。30

【0081】

配合物 1.6 は、動物に投与されたタンパク質および D N A 生成物に関して、配合物 1.1 が 1.6 と同等であるという点で、本発明をさらに示している。しかしながら、配合物 1.1 では、生成物が同じリポソームビヒクルで同時送達され、一方、配合物 1.6 では、D N A およびタンパク質が別個のリポソームビヒクルで送達される。再度ではあるが、以前に述べたように、配合物 1.1 に対する免疫応答は 1.6 よりも実質的に大きい。

【0082】

H A の D N A を含有する配合物に対する応答は、1.1 を除き、（配合物 1.3、配合物 1.4、配合物 1.7 および配合物 1.10 では）、本質的には、免疫応答を生じさせることができない。しかしながら、Johnson、P 他（J. Gen. Virol. 2000, 1737~1745）が、（非捕捉での）免疫化の後でのこのプラスミドに対する陽性の応答を報告しているように、この応答は用量に関連づけられ得る。40

【0083】

これ以前に報告されている（Gregoriadis G、Tan L、Ben-Ahmeida ET、Jennings R、Vaccine、1992、10(11): 747~53）、リポソーム配合物で送達されたタンパク質に対するリポソームのアジュバント効果（配合物 1.5 対配合物 1.11）は、2 回の投薬の後の 15 日目のサンプル採血において弱く認めることができ、再度ではあるが、投薬および免疫化スケジュールの違いにより、異なる実験結果を説明することができる。リポソームにおけるプラスミド D N A の免疫アジュバント作用が以前に報告されている（Gur sel M 他、Vacci50

n e、1999、17:1376~1383)が、これもまた、配合物1.1および配合物1.5に対する応答の違いにおいて明らかにされる。しかしながら、赤血球凝集素タンパク質をその適切な(同系)プラスミドと同時配合することの相乗的な効果は、CpGモチーフについてKlinman(Klinman, D他, Vaccine, 1999, 19:2519~26)によって観測された免疫アジュバント効果などの、DNAの広く知られている免疫アジュバント効果に起因すると考えられる効果のいずれもはるかに超えている。

【0084】

示された結果はリポソーム配合物の皮下投与により得られたものであるが、提案された作用機構(一般的および特異的)(+抗原速度論的性質)は、他の投与経路(例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、鼻/肺を介した経路、および経口経路など)によっても有効であるはずである。実際、リポソームは、タンパク質およびDNAの両方を送達し、かつ、免疫応答を生じさせるために、これらの経路によって成功裏に使用されている。

【0085】

まとめると、本発明者らは、本発明が、対象に施されたとき、免疫応答を生じさせるために非常に効果的であることを見出している。応答には、抗体応答が伴う。本発明によって示される改善には、リポソーム形成物質の組成物で、抗原性タンパク質を機能的にコードする核酸および同時送達されるタンパク質を、リポソームと会合させて有する組成物を伴い、この場合、同時送達されるタンパク質はエピトープを抗原性タンパク質と共有する。

【実施例2】

【0086】

マンノース標的化B型肝炎ワクチン

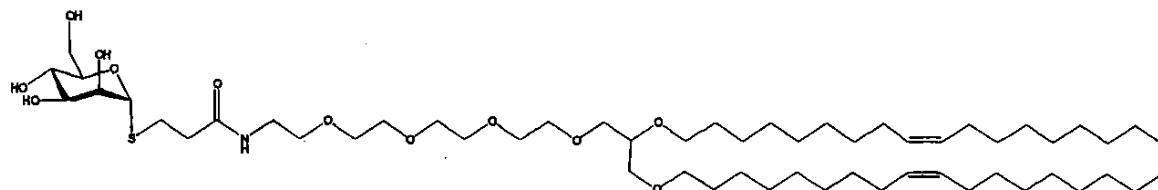
材料および方法

脂質

卵ホスファチジルコリン(PC)、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1,2-ジオレオイル-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)をSigma Chemical Co.(英国)から購入した。N-[2-{2-[2-(2,3-ビス-オクタデカ-9-エニルオキシ-プロポキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ]エチル]-3-(3,4,5-トリヒドロキシ-6-ヒドロキシメチル-テトラヒドロピラン-2-イルスルファニル)プロピオンアミド(式が下記に示される(DOGP4 Man, Francis Schuber教授(Universite Louis Pasteur, Strasbourg 1, Faculte de Pharmacie 74, Route du Rhin, BP 24 67401, Illkirch, Graffenstaden)からの譲渡))。すべての脂質は、クロロホルムに溶解し、窒素置換して保存した(-20)。

【0087】

【化4】



$C_{36}H_{107}NO_{12}S$
正確な質量: 1017.75
分子量: 1018.51
C, 66.04; H, 10.59; N, 1.38; O, 18.85; S, 3.15

【0088】

DNA

10

20

30

40

50

プラスミド p R c / CMV - HBs (S) (または単に p CMV - S) は、CMV 最初期プロモーターの制御下で B 型肝炎表面抗原 (小 (または S) タンパク質) を発現する (Davis HL, Michel ML, Whalen RG, DNA に基づく B 型肝炎に対する免疫化は抗原の継続した分泌および高レベルの循環抗体を誘導する (Human Molecular Genetics, 1993, 2 : 1847 ~ 1851))。投薬用プラスミドが Aldevron (Fargo、米国) によって商業的に製造され、1 mg の DNAあたり 100 未満のエンドトキシン単位 (EU) を含有し、残留タンパク質は検出できなかった。

【0089】

タンパク質

10

B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 組換えタンパク質、純度 : > 95% (SDS-PAGE による)、Aldevron (Fargo、米国) から購入された酵母 (Hansenula polymorpha) からの精製物 (Lot 05/00 HBsAg)。

【0090】

リポソーム組成物の調製

簡単に記載すると、卵ホスファチジルコリン (PC) およびジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP) および N-[2-(2-{2-[2-(2,3-ビス-オクタデカ-9-エニルオキシ-プロポキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エチル]-3-(3,4,5-トリヒドロキシ-6-ヒドロキシメチル-テトラヒドロピラン-2-イルスルファニル)プロピオンアミド (DOGP4-Man) (4:2:1:1 のモル比) から超音波処理によって調製された小さい单層小胞 (SUV) を、DNA 単独およびタンパク質単独と混合するか、または、DNA およびタンパク質と一緒に混合した (表 4)。配合物を投薬 (初回抗原刺激および追加抗原刺激) のために 2 つのバイアル中に調製した。各バイアルは、[Gregoriadis, G.、Saffie, R. および Hart, S. L.、リポソーム内におけるプラスミド DNA の高収率取り込み : DNA 一体性およびトランスフェクション効率に対する影響、J Drug Targeting, 1996, 3(6), 467 ~ 475]、および [Kirby, C.、Gregoriadis, G.、脱水 - 再水和小胞 (DRV) : リポソームにおける高収率薬物捕捉のための新しい方法、Biotechnology, 1994, 2, 979 ~ 984] に記載されたように、捕捉される物質に加えられ一晩凍結乾燥された放射能標識トレーサー (DNA 物質およびタンパク質物質) を含有した (% 捕捉の計算のため)。凍結 (予備凍結乾燥プロセス) の前に、スクロースを 1:3 の脂質対スクロース比 (w/w) で各バイアルに加え、20 % で溶解させた (Brahim, Z. および Gregoriadis, G.、溶質を小さいリポソームに高収率で捕捉するための新規な方法、J Liposome Research, 2000, 100(1), 73 ~ 80)。制御された条件のもとでの再水和の後、得られた脱水 - 再水和小胞 (DRV リポソーム) を、要求される投薬体積に PBS で希釈した。再水和後の各バイアルの一一定体積 (約 25%) を遠心分離によって洗浄して、取り込まれなかつた物質を除いた。リポソーム配合物への DNA および / またはタンパク質の取り込み割合を、懸濁されたペレットに回収された 35 S (DNA の場合) および 125 I (タンパク質の場合) の放射能に基づいて見積もった。リポソームは、微量電気泳動、および Malvern Zetasizer 3000 における 25 nm の光子相關分光法 (PCS) に供され、そのゼータ電位 (ZP) および z - 平均直径がそれぞれ測定された。

【0091】

20

30

40

【表4】

表4

群	配合		
	DNA μg	タンパク質 (HBsAg) μg	リポソーム PC:DOPE:DOTAP:DOGP4αMan μM
2.1	464	13.28	42.6:21.3:5.3:5.3
2.2	ゼロ	13.28	42.6:21.3:5.3:5.3
2.3	464	ゼロ	42.6:21.3:5.3:5.3

10

【0092】

動物の処置

メス Balb/c マウス（6週齢から12週齢； Harlan、英国）を、0.2ml の投薬体積で投与された皮下注射によって免疫化した。最終的な投薬量が表5にまとめられる。マウスは抗原の2回の投薬を0日目および28日目に受け、サンプル採血物が、最初の注射に関して28日目（1回の投薬後）および56日目（2回の投薬後）に尾静脈から集められた。

20

【0093】

【表5】

表5

群	総投薬量／動物		
	DNA μg	タンパク質 (HBsAg) μg	脂質 mg
2.1	35	1	4.35
2.2	ゼロ	1	4.35
2.3	35	ゼロ	4.35

30

【0094】

血清のELISA

サンプル採血物から得られた血清を PBS で希釈して、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によってアッセイされるまで -20° で保存した。保証された結合化学性 96 ウエルプレートを、0.1M炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) において 2.5 μg / ml の B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 組換えタンパク質 (Aldevron, Farago、米国、Lot 05/00 HBsAg) の 50 μl / ウエルで、一晩、4° でコーティングした。一晩インキュベーションした後、ウエルを PBS / ツイーン 20 (商標) (PBS-T) で 4 回洗浄し、その後、ウエルを PBS における 2% (w/v) BSA の 200 μl でコーティングした。37° で 2 時間後、ブロッキング溶液を除き、ウエルを PBS-T で 4 回洗浄して、1/100 の希釈度から始まる異なる実験血清（個々の動物サンプル採血物）の希釈物で重層した（ウエルあたり 50 μl のサンプル）。37° で 1 時間インキュベーションした後、プレートを PBS-T で 4 回洗浄して、50 μl / ウエルのウサギ抗マウス IgG-HRP コンジュゲート化血清 (Dako) を重層した。37° で 1 時間後、ブ

40

50

レートをP B S Tで4回洗浄して、 $50\mu l$ / ウエルの基質溶液3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (T M B、P i e r c e) で重層した。反応を、 $50\mu l$ / ウエルの停止溶液 (2M硫酸) を添加することによって停止させ、各ウエルの450nmにおける吸光度 (O D) を測定した。

【0095】

結果

物理的特性 (%生成物 (D N A および / またはタンパク質) 捕捉、粒子サイズ、および表面電位 (ゼータ)) を表6にまとめる。

【0096】

【表6】

10

表6

群	投薬 1		投薬 2		投薬 1		投薬 2	
	%捕捉		%捕捉		サイズ nm	ゼータ mV	サイズ nm	ゼータ mV
	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質				
2.1	79.8	71.3	90.5	88.9	379	18.1	448	ND
2.2	ゼロ	30.3	ゼロ	58.3	166	18.5	134	ND
2.3	85.6	ゼロ	94.5	ゼロ	367	19.1	355	ND

ND=測定されず

【0097】

抗体応答 (血清E L I S A) が、 \log_{10} (アッセイされた血清希釈度) における平均 ($n = 5$ 動物 / 群) O Dシグナル \pm S E Mとして表される。結果は、H b s A g の1回の投薬の後の28日目の総Ig結果を示す図5に、および、2回目の投薬の後の28日目の総Ig結果を示す図6に示される。

20

【0098】

考察

免疫応答を誘導するためのD N A およびタンパク質に対する送達ビヒクルとしてのマンノースリガンド標的化リポソームの使用が以前に記載されている (K a w a k a m i S、S a t o A、N i s h i k a w a M、Y a m a s h i t a F、H a s h i d a M、G e n e T h e r.、2 0 0 0、7 (4) : 2 9 2 ~ 9 (D N A) ; および、L a t i f N、B a c h h a w a t B K、I m m u n o l L e t t、1 9 8 4、8 (2) : 7 5 ~ 8 (タンパク質)。さらに、抗原提示細胞による抗原 (タンパク質) のマンノース受容体媒介取り込みの一般的な有用性が、免疫応答の誘導における強力な構成要素として認識されている (L a n z a v e c c h i a A、C u r r O p i n I m m u n o l、1 9 9 6、8 : 3 4 8 ~ 3 5 4)。D N A およびタンパク質の両方を同時送達するためのマンノースリガンド標的化リポソームビヒクルの、同じ送達ビヒクルに含ませての使用は、(そして、おそらくは同じ標的細胞に対しては)、これまで報告されていない。

30

【0099】

配合物 (表4および表5) を用いた免疫化の後に生じる免疫応答が、抗B型肝炎表面抗原 (H B s A g) 抗体応答を測定することによって評価された。結果が図5および図6に例示される。同じリポソーム配合物で同時送達されたH AのD N A およびタンパク質の両方からなった配合物2.1は、試験されたそれぞれの血清サンプル採血物 (28日目および56日目 (2回目の投薬の後の28日目))において、それ以外の配合物のすべてより

40

50

も大きい応答をもたらす。この同時送達された配合物に対する応答は、OD 450 nmでの血清希釈度および力値(0.3ユニットの終点読み取りOD)の両方の大きさに関して大きくなっている。

【0100】

DNA含有配合物(2.1を除く)、配合物2.3に対する応答は、マンノース脂質(DOGP4-Man)成分を伴わない同じリポソームビヒクル(PC:DOPE:DOTAP)において同じDNA生成物を(10 µgのDNA用量で)使用して発表された結果(Gregorius G, Pharm Res., 1998, 15(5):661~70)と一致する免疫応答である。リポソームにおけるプラスミドDNAの免疫アジュバント作用が、本明細書中に記載されるのと同じ、DNA(非コード、ISS能コントロール)およびタンパク質の生成物を使用して以前に報告されている(Gursel M他、Vaccine, 1999, 17:1376~1383)。この論文における抗原-pDNA同時捕捉配合物に対するDNA成分の報告されたアジュバント作用は、約3倍の力値で、あまり大きくならないとして記載されている(2回の投薬の後の結果)。図6に例示される類似する結果は、コードする(HBsAg)DNA成分が使用されたとき(配合物2.1)、応答の30倍の増大を示している(配合物2.2と比較のこと)。従って、HBsAgタンパク質をその適切な(同系)プラスミドと同時配合することの相乗的な効果は、CpGモチーフ単独についてGurselまたはKlinnman(Klinnman, D他、Vaccine, 1999, 19:2519~26)によって観測された免疫アジュバント効果などの、DNAの免疫アジュバント効果(これは約3倍にすぎない)に起因すると考えられる何らかの効果を超えている。10 20

【0101】

まとめると、本発明者らは、本発明が、対象に施されたとき、免疫応答を生じさせるために非常に効果的であることを見出している。応答には、抗体応答が伴う。本発明によって示される改善には、マンノシリ化された脂質成分を含むリポソーム形成物質の組成物で、抗原性タンパク質を機能的にコードする核酸および同時送達されるタンパク質を、リポソームと会合させて有する組成物を伴い、この場合、同時送達されるタンパク質は抗原性タンパク質とエピトープを共有する。

【実施例3】

【0102】

インフルエンザウイルス抗原投与からの保護

材料および方法

脂質

卵ホスファチジルコリン(PC)、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1,2-ジオレオイル-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)をSigma Chemical Co.(英国)から購入した。すべての脂質は、クロロホルムに溶解し、窒素置換して保存した(-20)。

【0103】

DNA

p1.18/PR8-HA(DNA HAと称される)がJ. Robertson博士(NIBSC、英国)から提供され、これは、A型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34に由来する全長のHAを含有する。投薬用プラスミドがAldevron(Fargo、米国)によって商業的に製造され、1mgのDNAあたり100未満のエンドトキシン単位(EU)を含有し、残留タンパク質は検出できなかった。40

【0104】

タンパク質

A型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34の不活性化ウイルスの完全なタンパク質(スクロース勾配精製物、主要タンパク質HA、抗原HAと称される)をNIBSC(英国)から得た。

【0105】

10

20

30

40

50

リポソーム組成物の調製

簡単に記載すると、卵ホスファチジルコリン（P C）およびジオレオイルホスファチジルコリン（D O P E）および1，2-ジオレオイルオキシ-3-（トリメチルアンモニウム）プロパン（D O T A P）（4：2：1のモル比）から超音波処理によって調製された小さい単層小胞（S U V）を、DNA（DNA HAと称される）およびタンパク質（抗原H Aと称される）と混合した（表7を参照のこと）。配合物を四連で調製した。2つのバイアルは投薬（初回抗原刺激および追加抗原刺激）のためであり、2つのバイアルは、[G regoriadis, G .、S affie, R .およびH art, S . L .、リポソーム内におけるプラスミドDNAの高収率取り込み：DNA一体性およびトランスフェクション効率に対する影響、J Drug Targeting、1996、3(6)、10
467～475]に、および[K irby, C .、G regoriadis, G .、脱水-再水和小胞（D R V）：リポソームにおける高収率薬物捕捉のための新しい方法、B iotechnology、1994、2、979～984]に記載されるように、捕捉された物質に加えられ、一晩凍結乾燥された放射能標識トレーサー（H A；DNAおよびタンパク質）に基づく%捕捉の計算のためであった。制御された条件のもとでの再水和の後、得られた脱水-再水和小胞（D R Vリポソーム）を遠心分離によって洗浄して、取り込まれなかった物質を除いた。洗浄されたペレットを、要求される投薬体積にP B Sで希釈した。DNAおよび/またはタンパク質の取り込みを、懸濁されたペレットに回収された³⁵S（DNAの場合）および¹²⁵I（タンパク質の場合）の放射能に基づいて見積もった。リポソームは、微量電気泳動、およびM alvern Z etasizer 3 0 0 20
0における25°での光子相關分光法（P C S）に供され、そのゼータ電位（Z P）およびz-平均直径がそれぞれ測定された。

【0106】

動物の処置

メスB a l b / cマウス（6週齢から12週齢；H arlan、英国）を、0.2m lの投薬体積で投与された皮下注射によって免疫化した。最終的な投薬量が表7にまとめられる。マウスは2回の投薬を0日目および28日目に受け、サンプル採血物が、最初の注射に関して21日目（1回の投薬の後）および42日目（2回の投薬の後）に尾静脈から集められた。

【0107】

【表7】

表7

群 (配合物)	総投薬量／動物		
	DNA μg	タンパク質(HA) μg	脂質 mg
3.1	10	1.5	2.1
3.2	10	0.5	2.1
3.3	10	1.5	非リポソームにより送達される 混合(DNA+タンパク質)
3.4	ゼロ	ゼロ	ゼロ(PBS)

【0108】

生インフルエンザウイルスの抗原投与

マウスに対して、最初の免疫化に関して57日目に、N ational I nstit ute o f B iolog ical S tandard s and C ontrol s（英国、N I B S C）において、マウス適合化生インフルエンザウイルス（A / プエルト 40
50

リコ / 8 / 34 の、2% (w/v) BSA を含む PBS における約 10 倍の M I D₅₀ (50% マウス感染用量) が抗原投与された。ウイルスは、鼻腔内滴下によって左右両方に、非麻酔マウスに 50 μl の体積で投与された。抗原投与後 1 日間隔で、鼻腔洗浄を、マウスあたり、2% (w/v) BSA を含む 0.5 ml の PBS を使用して行った。鼻腔洗浄サンプルにおける流出インフルエンザウイルスの存在をサンプリング後直ちに評価した。鼻腔洗浄サンプルを含む無血清イーグル最少必須培地で、96 ウエル組織培養プレートにおける MDCK 細胞の T P C K - トリプシン処理されたコンフルエント単層物を覆った。35 で 3 日間インキュベーションした後、各ウエルにおけるウイルスの存在を、50 μl の上清を等体積の 0.7% (v/v) 七面鳥赤血球とインキュベーションすることによって測定した。ウイルス陽性サンプルは、目に見える赤血球凝集をもたらした (凝集スポットが明瞭に認められる)。
10

【0109】

血清の E L I S A

サンプル採血物から得られた血清を PBS で希釈して、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によってアッセイされるまで - 20 で保存した。保証された結合化学性の 96 ウエルプレートを、PBS におけるインフルエンザ HA - PR8 抗原 (20 μg/ml) の 50 μl / ウエルで一晩コーティングした。4 で一晩インキュベーションする。一晩インキュベーションした後、ウエルを PBS / ツイーン 20 (商標) (PBS-T) で 4 回洗浄し、その後、ウエルを PBS における 2% (w/v) BSA の 200 μl でコーティングした。37 で 2 時間後、ブロッキング溶液を除き、ウエルを PBS-T で 4 回洗浄して、1/100 の希釈度から始まる異なる実験血清 (個々の動物サンプル採血物) の希釈物で重層した (ウエルあたり 50 μl のサンプル)。37 で 1 時間インキュベーションした後、プレートを PBS-T で 4 回洗浄して、50 μl / ウエルのウサギ抗マウス Ig - HRP コンジュゲート化血清 (Dako) を重層した。37 で 1 時間後、プレートを PBS-T で 4 回洗浄して、50 μl / ウエルの基質溶液 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB, Pierce) で重層した。反応を、50 μl / ウエルの停止溶液 (2M 硫酸) を添加することによって停止させ、各ウエルの 450 nm における吸光度 (OD) を測定した。
20

【0110】

結果

リポソームの物理的特性 (%生成物 (DNA および / またはタンパク質) 捕捉、粒子サイズ、および表面電位 (ゼータ)) を表 8 にまとめる。

【0111】

【表 8】

表 8

群	投薬 1		投薬 2		投薬 1		投薬 2	
	%捕捉		%捕捉		サイズ nm	ゼータ mV	サイズ nm	ゼータ mV
	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質				
3.1	80.0	78.9	89.3	91.1	913	ND	820	43
3.2	85.6	81.5	92.2	91.0	821	ND	906	43

ND = 測定されず

【0112】

抗体応答 (血清 E L I S A) は、Log₁₀ (アッセイされた血清希釈度) における平
50

均 ($n = 5$ 動物 / 群) O D シグナル \pm S E M として表される。結果は、1回の投薬の後の結果を示す図7に、および、2回の投薬の後の結果を示す図8に示される。

【0113】

生ウイルス抗原投与の結果が、得られた鼻腔洗浄サンプルにおける検出可能なウイルスを示した動物 ($n = 15$ 抗原投与) / 群の百分率として、表9に示される。

【0114】

【表9】

表9

10

群	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
3.1	0	0	3.3	30	3.6
3.2	6.7	6.7	53.3	50	3.3
3.3	0	35.7	39.3	60.7	50
3.4	0	66.7	93.3	100	82.1

【0115】

20

考察

配合物(表7)を用いた免疫化の後に生じた免疫応答が、抗インフルエンザ(A/PR8株特異的な)応答を測定することによって評価された。結果が図7および図8に示される。同じリポソーム配合物で同時送達されたHAのDNAおよびタンパク質の両方からなった群(配合物)3.1は、試験されたそれぞれの血清サンプル採血物(21日目および42日目(2回目の投薬の後の14日目))において、それ以外の群(配合物)のすべてよりも大きい応答をもたらす。この同時送達された配合物群(3.1.1)についての応答は、OD 490 nmでの血清希釈度および力値(0.3ユニットの終点読み取りOD)の両方の大きさに関して大きくなっている。

【0116】

30

負荷成分(混合されたHAのDNAおよびタンパク質)(群3.3)に対する応答は、一貫して、同時送達された同じ負荷成分(群3.1)よりも弱い免疫応答を生じさせている。実際、同じリポソームビヒクルにおいて、同じDNA負荷物($10 \mu g$ のDNA用量で)を、低下したタンパク質負荷物($0.5 \mu g$ のタンパク質用量)とともに使用した場合(群3.2)、3倍より大きいタンパク質成分負荷量と混合されたHAのDNAおよびタンパク質(群3.3)に対する同等の血清IgG免疫応答が生じている。群3.4は何ら特異的な抗IgGインフルエンザ応答を生じさせることができなかった。しかしながら、この群は免疫原成分が全く投与されなかった(PBSのみ)。従って、この結果は予想通りである。

【0117】

40

生ウイルス抗原投与の結果は、配合物を用いた免疫化に応答してマウスで誘導された免疫応答が、動物をウイルス感染から保護するために十分であるかどうかを示すために役立つ。これらは本質的に、抗原投与後、ウイルス感染の通常のプロファイルを反映する「ナイーブ」動物であるので、群3.4は陰性コントロールとして役立つ。この群(3.4)において、すべての動物が4日目までにウイルスに感染し、68% (sem 18%) の感染動物の平均% (5日超) を有する。負荷成分(混合されたHAのDNAおよびタンパク質)からなり、リポソームにより同時送達されず、一方で、抗インフルエンザ応答(図7)を誘導した群3.3は、ウイルスに感染している動物の割合(%)において、(群3.4に対して)著しい低下を明らかにできず、37% (sem 10%) の感染動物の平均% (5日超) を有した。同じリポソーム配合物で同時送達されるHAのDNA

50

およびタンパク質の両方からなった群（配合物）3.1は、それ以外の群（配合物）のすべてよりも大きい応答（抗体応答、図7および図8）をもたらし、また、ウイルスに感染している動物の割合（%）において、（群3.4に対して）著しい低下（ $p < 0.05$ ）を明らかにしており、わずかに7%（SEM 6%）の感染動物の平均%（5日超）を有しただけであった。

【0118】

まとめると、本発明者らは、本発明が、対象に施されたときに感染性生物による感染から個体を保護することができる免疫応答を生じさせるために非常に効果的であることを見出している。応答には、抗体応答が伴う。本発明によって示される改善には、抗原性タンパク質を機能的にコードする核酸の負荷物を送達するリポソーム形成物質と、同時送達されるタンパク質との組成物を伴い、この場合、同時送達されるタンパク質は抗原性タンパク質とエピトープを共有する。10

【実施例4】

【0119】

多価インフルエンザワクチン

材料および方法

脂質

卵ホスファチジルコリン（P C）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E）、および1,2-ジオレオイル-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン（D O T A P）をSigma Chemical Co.（英国）から購入した。すべての脂質は、クロロホルムに溶解し、窒素置換して保存した（-20）。20

【0120】

D N A

プラスミドp I 17 / H A - 四川およびプラスミドp I . 18 / P R 8 - H AがJ. R obertson博士（NIBSC、英国）から提供され、これらは、A型インフルエンザ/四川/2/87およびA型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34にそれぞれ由来する全長のH A配列を含有する。投薬用プラスミドがAldevron（Fargo、米国）によって商業的に製造され、1mgのDNAあたり100未満のエンドトキシン単位（E U）を含有し、残留タンパク質は検出できなかった。30

【0121】

タンパク質

A型インフルエンザ/四川/2/87およびA型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34の不活性化ウイルスの完全なタンパク質（スクロース勾配精製物、主要タンパク質H A、抗原H Aと称される）をNIBSC（英国）から得た。

【0122】

リポソーム組成物の調製

簡単に記載すると、卵ホスファチジルコリン（P C）およびジオレオイルホスファチジルコリン（D O P E）および1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン（D O T A P）（4:2:1のモル比）から超音波処理によって調製された小さい単層小胞（S U V）を、p I 17 / H A - 四川のDNAおよびA型インフルエンザ/四川/2/87のウイルスタンパク質と、または、p I . 18 / P R 8 - H AのDNAおよびA型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34のウイルスタンパク質とのいずれかと混合した（表10を参照のこと）。配合物を二連で調製した。1つのバイアルが投薬のためであり、1つのバイアルは、[Gregoriadis, G.、Saffie, R.およびHart, S. L.、リポソーム内におけるプラスミドDNAの高収率取り込み：DNA一体性およびトランスフェクション効率に対する影響、J Drug Targeting, 1996, 3(6), 467~475]および[Kirby, C.、Gregoriadis, G.、脱水-再水和小胞（DRV）：リポソームにおける高収率薬物捕捉のための新しい方法、Biotechnology, 1994, 2, 979~984]に記載されたように、捕捉された物質に加えられ、一晩凍結乾燥された放射能標識トレー4050

サー(H A ; D N A およびタンパク質)に基づく%捕捉の計算のためであった。制御された条件のもとでの再水和の後、得られた脱水・再水和小胞(D R V リポソーム)を遠心分離によって洗浄して、取り込まれなかった物質を除いた。洗浄されたペレットを、要求される投薬体積に P B S で希釈した。D N A および / またはタンパク質の取り込みを、懸濁されたペレットに回収された³⁵S (D N A の場合) および¹²⁵I (タンパク質の場合) の放射能に基づいて見積もった。リポソームは、微量電気泳動、およびM a l v e r n Z e t a s i z e r 3 0 0 0 における 25° での光子相關分光法 (P C S) に供され、そのゼータ電位 (Z P) および z - 平均直径がそれぞれ測定された。

【0123】

動物の処置

10

メスB a l b / c マウス(6週齢から12週齢; H a r l a n 、英国)を、0.2m l の投薬体積で投与された皮下注射によって免疫化した。最終的な投薬量が表10にまとめられる。マウスは1回の投薬を0日目に受け、サンプル採血物が14日目および28日目に尾静脈から集められた。群4.3に対するリポソーム組成物は、投与直前に混合された、群4.1および群4.2に対する組成物の混合物であった。

【0124】

【表10】

表10

20

群 (配合物)	総投薬量／動物				
	pI17/HA- 四川 DNA	A/ 四川 /2/87 ウイルスタンパク質	pI.18/PR8 -HA DNA	A/ フエルトリコ /8/34 ウイルスタンパク質	脂質 mg
4.1	10 μg	1.5 μg	--	--	2.1
4.2	--	--	10 μg	1.5 μg	2.1
4.3	10 μg	1.5 μg	10 μg	1.5 μg	4.2
4.4	--	--	--	--	ゼロ (PBS)

【0125】

血清のE L I S A

サンプル採血物から得られた血清をP B S で希釈して、酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)によってアッセイされるまで - 20° で保存した。2つの異なるプロトコルが、検出されるタンパク質基質に依存して使用された。

30

【0126】

H A - P R 8 の場合、保証された結合化学性 96 ウエルプレートを、P B S におけるインフルエンザH A - P R 8 抗原(20 μg / m l)の50 μl / ウエルでコーティングした。4° で一晩インキュベーションした後、ウエルをP B S / ツイーン20(商標)(P B S T)で4回洗浄し、その後、ウエルをP B S における2% (w / v) B S A の200 μl でコーティングした。37° で1時間後、ブロッキング溶液を除き、ウエルをP B S T で4回洗浄して、1 / 100 の希釈度から始まる異なる実験血清(個々の動物サンプル採血物)の希釈物の50 μl / ウエルで重層した。37° で1時間インキュベーションした後、プレートをP B S T で4回洗浄して、50 μl / ウエルのウサギ抗マウスI g - H R P コンジュゲート化血清(D a k o)を重層した。37° で1時間後、プレートをP B

40

50

S Tで4回洗浄して、 $50\mu l$ / ウエルの基質溶液 $3, 3', 5, 5'$ - テトラメチルベンジジン (TMB、Pierce) で重層した。反応を、 $50\mu l$ / ウエルの停止溶液 (2M硫酸) を添加することによって停止させ、各ウエルの 450nm における吸光度 (OD) を測定した。

【0127】

H A - 四川の場合、保証された結合化学性の96ウエルプレートを、0.1M炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) における抗H A 四川ヒツジ血清 (NIBSC標準試薬) の $1/200$ 0希釈物の $50\mu l$ / ウエルでコーティングした。4で一晩インキュベーションした後、ウエルをPBS / ツイーン20 (商標) (PBST) で4回洗浄し、その後、ウエルをPBSにおける2% (w/v) BSAの $200\mu l$ でコーティングした。37で1時間後、ブロッキング溶液を除き、ウエルをPBSTで4回洗浄して、PBSにおけるH A - 四川抗原 ($5\mu g/ml$) の $50\mu l$ / ウエルで重層した。37で1時間後、抗原溶液を除き、ウエルをPBSTで4回洗浄して、 $1/100$ の希釈度から始まる異なる実験血清 (個々の動物サンプル採血物) の希釈物の $50\mu l$ / ウエルで重層した。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBSTで4回洗浄して、 $50\mu l$ / ウエルのウサギ抗マウスIg - HRPコンジュゲート化血清 (Dak o) を重層した。37で1時間後、プレートをPBSTで4回洗浄して、 $50\mu l$ / ウエルの基質溶液 $3, 3', 5, 5'$ - テトラメチルベンジジン (TMB、Pierce) で重層した。反応を、 $50\mu l$ / ウエルの停止溶液 (2M硫酸) を添加することによって停止させ、各ウエルの 450nm における吸光度 (OD) を測定した。

【0128】

結果

リポソームの物理的特性 (%生成物 (DNAおよび/またはタンパク質) 捕捉、粒子サイズ、および表面電位 (ゼータ)) を表11にまとめる。

【0129】

【表11】

表11

群	%捕捉		サイズ nm	ゼータ mV
	DNA	タンパク質		
4.2	96.7	92.2	676	48.4
4.1	93.9	87.4	816	42.7

【0130】

抗体応答 (血清ELISA) は、 \log_{10} (アッセイされた血清希釈度) における平均 ($n = 5$ 動物 / 群) ODシグナル \pm SEMとして表される。結果が図9aからdに示される。

【0131】

考察

配合物 (表10) を用いた免疫化の後に生じた免疫応答が、抗インフルエンザのH A - PR8株特異的な抗体応答およびH A - 四川株特異的な抗体応答を測定することによって評価された。結果が図9aからdに示される。

【0132】

14日目において、これらのインフルエンザ抗原に対する明らかな抗体応答が、配合物4.4 (PBS) を除くすべての実験群において検出された。配合物4.3 (これは、インフルエンザ四川およびインフルエンザ・ブルートリコ8の両方に対するH AのDNAお

10

20

30

40

50

およびタンパク質からなる)を用いた免疫化は、これらの株のそれぞれに対して、配合物4.1(インフルエンザ四川のDNAおよびタンパク質)または配合物4.2(インフルエンザ・ペルトリコ8)を用いた免疫化の後に誘導された抗体力価と同じように、平均(SEM)の標準誤差の範囲内で同等の抗体力価を誘導した。

【0133】

28日目において、14日目と比較して、これらのインフルエンザ抗原に対する抗体応答の顕著な増大が認められた。さらに、配合物4.3(これは、インフルエンザ四川およびインフルエンザ・ペルトリコ8の両方に対するHAのDNAおよびタンパク質からなる)を用いた免疫化は、再度ではあるが、インフルエンザ四川株に対して、配合物4.1(インフルエンザ四川のDNAおよびタンパク質)を用いた免疫化の後に誘導された抗体力価と、SEMの範囲内で同等の抗体力価を誘導した。対照的に、配合物4.3(これは、インフルエンザ四川およびインフルエンザ・ペルトリコ8の両方に対するHAのDNAおよびタンパク質からなる)を用いた免疫化は、試験された2つの希釈度の値において、配合物4.2(インフルエンザ・ペルトリコ8)を用いた免疫化の後に誘導された抗体力価よりも低いインフルエンザ・ペルトリコ8株に対する抗体力価を誘導した。

10

【0134】

まとめると、本発明者らは、本発明が、多価(例えば、多系統)の送達に適用されたとき、配合物に存在する異なる系統に対する抗体応答を誘導することにおいて非常に効果的であることを見出している。この抗体応答は迅速に現れ(抗原特異的な抗体力価は1回の免疫化の後のほんの14日目で1000を超える)、1つだけの系統のDNA成分およびタンパク質成分のみを送達したときの(すなわち、一価配合物を送達したとき)、本発明により誘導されるレベルと同じレベルであり得る。多価配合物を用いた免疫化により、同等な一価配合物によって誘導される抗体応答と比較して、より低い抗体応答が、これらの系統の1つに対して誘導され得る場合でさえ、この応答レベルは、再度ではあるが、大きく(1000を超える力価)、時間とともに増大する。従って、本発明によってもたらされ、また、この実験において例示される改善は、いくつかの異なる抗原性系統に対する明らかな抗体応答を、これらの系統のすべてに由来するDNAおよびタンパク質を含有する配合物を用いた1回の免疫化の後に誘導することができるということである。

20

【実施例5】

【0135】

30

DNAおよびタンパク質の捕捉レベル、ならびにリポソームサイズ

実施例1に記されたリポソーム配合の一般的な方法が、B型肝炎表面抗原、およびその抗原をコードするプラスミドDNAを、表12に示される様々なタンパク質レベルで捕捉するために使用された。%捕捉値が表12に示され、表13には、リポソームの平均サイズおよびゼータ電位が示される。

【0136】

【表12】

表12

リポソーム内へのHbsAgタンパク質および／またはHbsAgコードDNAの捕捉

	DNA	タンパク質	脂質 PC:DOPE:DOTAP	%捕捉	
				DNA	タンパク質
5.1	62.0 μg	17.68 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	98.9	64.4
5.2	62.0 μg	3.536 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	100	76.4
5.3	62.0 μg	0.697 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	100	66.2
5.4	-	17.68 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	-	74.9
5.5	-	3.536 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	-	80.4
5.6	-	1.23 μg	9.07:4.53:2.27 μM 6.96+3.37+1.59 mg (総脂質 : 11.92mg)	-	93.8

【0137】

表12は、DNAの捕捉が非常に効率的であり、これに対して、HbsAgタンパク質の捕捉がそれほど効率的でなかったことを示している。プラスミドDNAの存在は、タンパク質の捕捉効率に対してあまり大きくない負の影響を有していた。しかしながら、タンパク質およびDNAが一緒に捕捉されたとき、DNAの捕捉に対する負の影響は全く認められなかった。これらのデータは、これらのリポソーム配合物におけるDNAおよびタンパク質の効率的な同時捕捉が、A型インフルエンザの赤血球凝集素に対して特有でないこと、または、任意のいずれかのプラスミドに対して特有でないことを明らかにしている。DNAおよびタンパク質の効率的な捕捉がこれらのリポソーム組成物の一般的な性質であるならば、これは、プラスミドDNAおよびタンパク質抗原の事実上すべての組合せに対して適用可能であると考えられる。

【0138】

10

20

30

【表13】

表13

HbsAg配合物において使用されたリポソームに対するZ平均サイズ (nm)
およびゼータ電位 (mV)

配合物	サイズ (nm)	ゼータ電位 (mV)	
5.1	547	+45	10
5.2	710	+37	
5.3	704	+39	
5.4	666	+41	
5.5	694	+33	
5.6	639	-10	

【0139】

リポソーム配合物についてこれらのデータから、また、実施例2、実施例3および実施例4の結果から、サイズ範囲が、古典的な抗原提示細胞（例えば、マクロファージおよび樹状細胞など）による取り込みに対して適切であることが明らかである。B細胞によるこれらのリポソームからの物質の取り込みでは、インビボでのある程度のフラグメント化または分解が避けられないか、または、より小さいサイズのリポソームがリポソーム配合物の不均一な集団において生じる可能性がある。

【実施例6】

【0140】

非リン脂質性の配合物

ビヒクル物質

材料：1 - モノパルミトイル - r a c - グリセロール (C 16 : 0) (Monopal)、コレステロール (CHOL) および 3 - - [N (N', N') - ジメチルアミノエタン]カルバモイル]コレステロール (DC - Chol) をSigma Chemical Co. (英国) から購入した。すべての脂質は、クロロホルムに溶解し、窒素置換して保存した (- 20 °)。

【0141】

DNA

プラスミドpCI-OVA (DNA OVAと称される) (T. Nagata博士(浜松医科大学、日本)からの譲渡) はニワトリの卵アルブミンタンパク質(オバルブミン、OVA)のcDNAを含有する (Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Higashi T, Koide Y、特異的な免疫応答の再現可能な誘導におけるプラスミドDNAワクチンの筋肉内接種を上回る遺伝子錠媒介接種の利点、Vaccine 2000, 18, 1725 ~ 1729)。cDNAは、CMVエンハンサー/プロモーター領域の下流側の、pCIプラスミド (Promega, Madison, WI) のEcoRI部位にクローン化されている。プラスミドp1.18/PR8-HA (DNA HAと称される) がJ. Robertson博士(NIBSC、英国)によって提供された。これは、A型インフルエンザ/ブルートリコ/8/34に由来する全長のHAを含有する。投薬用プラスミドがAldevron (Fargo、米国) によって商業的に製造され、1mgのDNAあたり100未満のエンドトキシン単位 (EU) を含有し、残留タンパク質は検出できなかった。

【0142】

10

20

30

40

50

タンパク質

A型インフルエンザ／プエルトリコ／8／34の不活性化ウイルスの完全なタンパク質（スクロース勾配精製物、主要タンパク質HA、抗原HAと称される）をNIBSC（英國）から得た。

【0143】

組成物の調製

送達システムビヒクルを、真空下での薄膜乾燥によって、MonopalおよびCholおよびDC-Chol（4:2:1のモル比）から調製した。得られた薄膜を、60で1時間振とうすることによって水で水和して、室温に冷却した後、DNA（DNA-HAまたはDNA-OVAと称される）および／またはタンパク質（抗原HAと称される）と混合した（表14を参照のこと）。配合物を四連で調製した。2つのバイアルは、投薬（初回抗原刺激および追加抗原刺激）のためであり、2つのバイアルは、[Gregoriadis, G.、Saffie, R.およびHart, S. L.、リポソーム内におけるプラスミドDNAの高収率取り込み：DNA一体性およびトランスフェクション効率に対する影響、J Drug Targeting、1996、3(6)、467～475]および[Kirby, C.、Gregoriadis, G.、脱水・再水和小胞（DRV）：リポソームにおける高収率薬物捕捉のための新しい方法、Biotechnology、1994、2、979～984]に記載されたように、捕捉された物質に加えられ、一晩凍結乾燥された放射能標識トレーサー（DNAおよびタンパク質）に基づく%捕捉の計算のためにあった。制御された条件のもとでの再水和の後、得られた脱水・再水和小胞（DRVリポソーム）を遠心分離によって洗浄して、取り込まれなかった物質を除いた。洗浄されたペレットを、要求される投薬体積にPBSで希釈した。DNAおよび／またはタンパク質の取り込みを、懸濁されたペレットに回収された³⁵S（DNAの場合）および¹²⁵I（タンパク質の場合）の放射能に基づいて見積もった。小胞は微量電気泳動に供され、Malvern Zetasizer 3000およびMalvern Mastersizerにおける25°でのレーザー回折を使用して、そのゼータ電位（ZP）およびz-平均直径がそれぞれ測定された。

【0144】

動物の処置

メスBalb/cマウス（6週齢から12週齢；Harlan、英国）を、0.2mlの投薬体積で投与された皮下注射によって免疫化した。最終的な投薬量が表14にまとめられる。マウスは2回の投薬を0日目および28日目に受け、サンプル採血物が、1回目の注射に関して21日目（1回の投薬の後）および42日目（2回の投薬の後）に尾静脈から集められた。

【0145】

【表14】

表14

群 (配合物)	総投薬量／動物		
	DNA μg	タンパク質(HA) μg	ビヒクル mg
6.1	10 (HA)	1.5	5.7
6.2	10 (OVA)	1.5	5.7
6.3	10 (HA)	1.5	11.4
6.4	nil	1.5	5.7
6.5	10 (HA)	nil	5.7
6.6	ゼロ	1.5	ゼロ (PBS)

【0146】

10

20

30

40

50

群6.1および群6.2の組成物では、DNAおよびタンパク質が同時捕捉された。群6.3の組成物では、DNAおよびタンパク質が別々に捕捉され、混合された。すなわち、これは6.4および6.5の混合物であった。群6.6では、タンパク質が捕捉されなかった。

【0147】

血清のELISA

サンプル採血物から得られた血清をPBSで希釈して、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によってアッセイされるまで-20度で保存した。保証された結合化学性96%ウエルプレートを、PBSにおけるインフルエンザHA-PR8抗原(20μg/ml)の50μl/ウエルで一晩コーティングした。4度で一晩インキュベーションした後、ウエルをPBS/ツイーン20(商標)(PBST)で4回洗浄し、その後、ウエルをPBSにおける2%(w/v)BSAの200μlでコーティングした。37度で2時間後、ブロッキング溶液を除き、ウエルをPBSTで4回洗浄して、1/100の希釈度から始まる異なる実験血清(個々の動物サンプル採血物)の希釈物で重層した(ウエルあたり50μlのサンプル)。37度で1時間インキュベーションした後、プレートをPBSTで4回洗浄して、50μl/ウエルのウサギ抗マウスIg-HRPコンジュゲート化血清(Dako)を重層した。37度で1時間後、プレートをPBSTで4回洗浄して、50μl/ウエルの基質溶液3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン(TMB、Pierce)で重層した。反応を、50μl/ウエルの停止溶液(2M硫酸)を添加することによって停止させ、各ウエルの450nmにおける吸光度(OD)を測定した。

【0148】

結果

ビヒクルの物理的特性(%生成物(DNAおよび/またはタンパク質)捕捉、粒子サイズ、および表面電位(ゼータ))を表15にまとめる。

【0149】

【表15】

表15

群	投薬1		投薬2		投薬1		投薬2	
	DNA	%捕捉	DNA	%捕捉	サイズ nm	ゼータ mV	サイズ nm	ゼータ mV
6.1	96.7	89.7	98.3	88.0	4140	23	3770	ND
6.2	94.6	90.2	79.4	82.8	4620	23.9	2950	ND
6.4	ND	86.9	ND	92.8	4550	23.6	4060	ND
6.5	97.2	ND	97.2	ND	4150	24.9	3580	ND

ND=測定されず

【0150】

個々の動物(n=5動物/群)の抗体応答(血清ELISA)が、ODが0.270の読み取り値に達するために要求される血清希釈度の逆数として表される(終点希釈度、アッセイされた1/100希釈度における約2×の正常マウス血清OD)。結果は図10に示される。

【0151】

考察

配合物(表14)を用いた免疫化の後に生じた免疫応答が、抗インフルエンザ(A/PR8特異的な)応答を測定することによって評価された。結果は図10に示される。同じ

10

20

30

40

50

送達ビヒクルで同時送達された H A の D N A およびタンパク質の両方からなった群（配合物）6.1は、群6.2を除くそれ以外の群のすべてよりも大きい応答を生じさせている。

【0152】

これらの結果は下記のことを示している： H A タンパク質の送達は、タンパク質単独を上回る利点をもたらさない（群6.4対群6.6）； H A の D N A 単独の送達は著しい抗体応答を生じさせない（群6.5）、実際、5匹中4匹の動物は、アッセイ（1/100希釈の血清）の検出限界よりも大きい応答を誘導させていない；別個のビヒクルにおける H A の D N A およびタンパク質の混合送達（群6.3）は、タンパク質単独またはビヒクル送達タンパク質（それぞれ、群6.6および群6.4）を上回る利点をもたらさない；および、 H A タンパク質を D N A 成分（ H A または O V A ）と同時送達すること（群6.1および群6.2）は、混合で送達された物質、または単独で送達された物質よりも、著しく大きい抗 H A 応答を生じさせている（それぞれ、群6.3、群6.4、群6.5および群6.6）。

【0153】

本発明に関連して、最後の観測結果は、「同系」および「非関連」の両方の D N A 成分に対して適用可能である。アッセイされた免疫系応答は抗体応答に限定されており、細胞媒介免疫応答（Tヘルパー、C T Lなど）は調べられていない。従って、「同系」および「非関連」の D N A 群（群6.1および群6.2）に対する免疫応答における等価性を結論することができない。実際、 H A の D N A 単独による免疫化（プラスミド D N A がインフルエンザの赤血球凝集素をコードする場合）は、抗体応答を生じさせるその限定された能力にもかかわらず、 T h 1 細胞、および、呼吸器感染に対する保護を誘導している。 Johnson P A 、 Conway M A 、 Daly J 、 Nicolson C 、 Robertson J 、 Mills K H (J Gen Virol. , 2000, Jul ; 81 (Pt 7) : 1737 ~ 45) は、抗体応答の非存在下で、従って、細胞媒介免疫応答単独に基づくインフルエンザ抗原投与からの保護をもたらすことを見出している。群6.1の「同系」同時送達は H A の D N A を配合物の活性な成分として有するが、「非関連」の群6.2は H A の D N A を配合物の活性な成分として有しないので、群6.1により、測定されないさらなる細胞媒介免疫応答が誘導され得ると示唆することは妥当でないようである。

【0154】

まとめると、本発明者らは、本発明が、抗体応答を誘導するために非常に効果的であることを見出している。この応答には、抗体応答が伴う。本発明により示される改善には、抗原性タンパク質を機能的にコードする核酸の負荷物を送達する脂質成分を伴わない送達ビヒクルと、同時送達されるタンパク質との組成物を伴う。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】 H A (インフルエンザ) 捕獲 E L I S A の結果を示す。

【図2】 1回の投薬の後の16日目の抗インフルエンザ - 総 I g を示す。

【図3】 1回の投薬の後の28日目の抗インフルエンザ - 総 I g を示す。

【図4】 2回の投薬の後の15日目の抗インフルエンザ - 総 I g を示す。

【図5】 B型肝炎表面抗原の1回の投薬の後の28日目の総 I g 結果を示す。

【図6】 B型肝炎表面抗原の2回目の投薬の後の28日目の総 I g 結果を示す。

【図7】 1回の投薬の後に生じた抗インフルエンザ応答を示す。

【図8】 2回の投薬の後に生じた抗インフルエンザ応答を示す。

【図9】 免疫化の後に生じた特異的な抗体応答および H A - 四川株特異的な抗体応答を示す。

【図10】 免疫化の後に生じた抗インフルエンザ応答を示す。

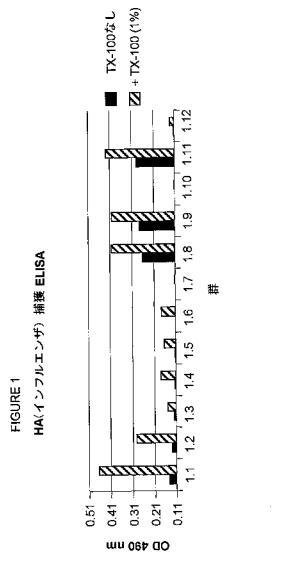
10

20

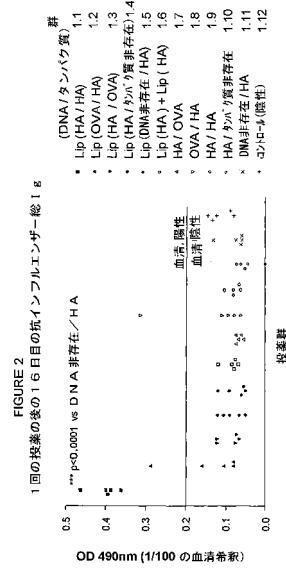
30

40

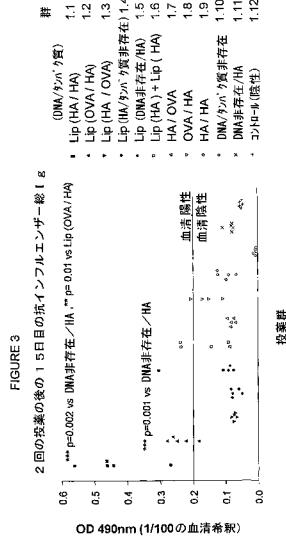
【図1】



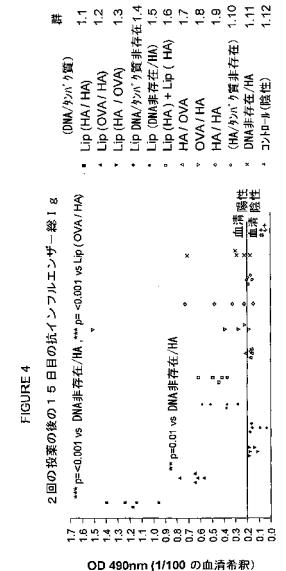
【図2】



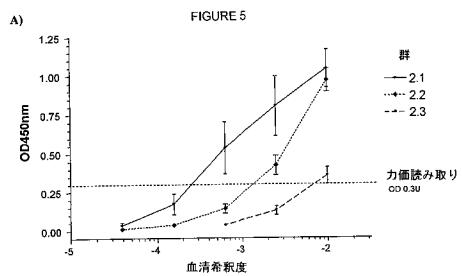
【図3】



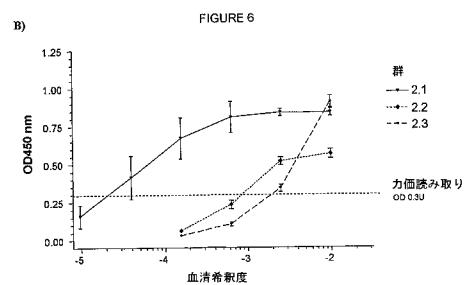
【図4】



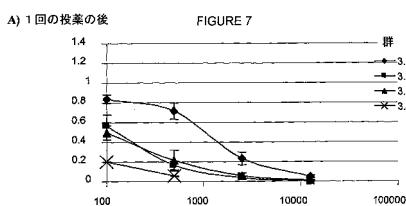
【図5】



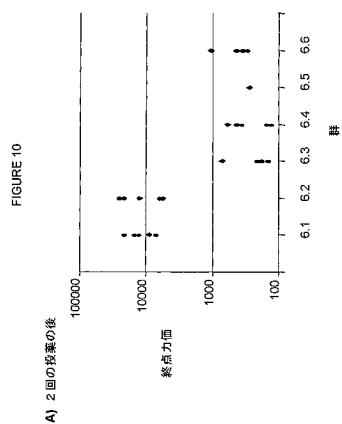
【図6】



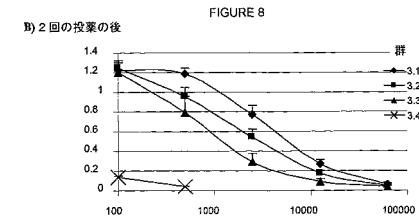
【図7】



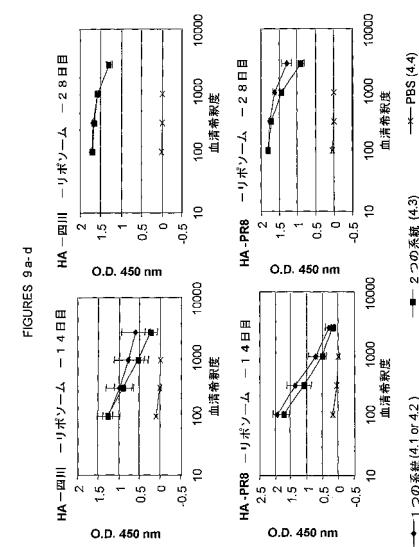
【図10】



【図8】



【図9】



【図11】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
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 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
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

- (72)発明者 ベーコン , アンドリュー・ディビッド
イギリス国、ロンドン・ダブリュ・シー・1・エイチ・9・ビー・ビー、マーブルドン・プレイス
、ハミルトン・ハウス、スイート・303、リポクセン・テクノロジーズ・リミテッド気付
- (72)発明者 レイング , ピーター
イギリス国、ロンドン・ダブリュ・シー・1・エイチ・9・ビー・ビー、マーブルドン・プレイス
、ハミルトン・ハウス、スイート・303、リポクセン・テクノロジーズ・リミテッド気付
- (72)発明者 グレゴリアディス , グレゴリー
イギリス国、ロンドン・ダブリュ・シー・1・エイチ・9・ビー・ビー、マーブルドン・プレイス
、ハミルトン・ハウス、スイート・303、リポクセン・テクノロジーズ・リミテッド気付
- (72)発明者 カパロス - ワンデルレイ , ウイルソン・ロメロ
イギリス国、ロンドン・ダブリュ・シー・1・エイチ・9・ビー・ビー、マーブルドン・プレイス
、ハミルトン・ハウス、スイート・303、リポクセン・テクノロジーズ・リミテッド気付

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 特表2002-508333 (JP, A)
特表2000-505802 (JP, A)
特表2001-502299 (JP, A)
国際公開第01/024773 (WO, A1)
Vaccine Research , 1995年, 4, 3, p.135-144
Mem Inst Oswaldo Cruz , 2002年 1月, 1, p.95-99
Vaccine , 1999年, 17, p.1376-1383
GREGORIADIS G, METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY , 米国 , ACADEMIC PRESS INC. , 1999年 9月, V19 N1 , P156-162

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 48/00
A61K 9/127
A61K 39/00
A61K 39/12
A61K 47/18
A61K 47/24
A61K 47/28
A61P 31/12
A61P 31/20
A61P 37/04
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)