

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175562号
(P6175562)

(45) 発行日 平成29年8月2日(2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	9/107	(2006.01)	A 6 1 K	9/107

請求項の数 8 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-516427 (P2016-516427)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月4日(2013.6.4)
 (65) 公表番号 特表2016-520123 (P2016-520123A)
 (43) 公表日 平成28年7月11日(2016.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/004927
 (87) 国際公開番号 W02014/193016
 (87) 国際公開日 平成26年12月4日(2014.12.4)
 審査請求日 平成28年1月29日(2016.1.29)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0062734
 (32) 優先日 平成25年5月31日(2013.5.31)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 506010208
 バイオリーダーズ コーポレーション
 BIOLEADERS CORPORAT
 ION
 大韓民国, 305-500 テジョン, ユ
 ソン-グ, テクノ 8-ロ, 13
 (73) 特許権者 511314636
 ザ インダストリー アンド アカデミッ
 ク コオペレーション イン チュンナム
 ナショナル ユニバーシティ
 大韓民国, 305-764 テジョン, ユ
 ソン-グ, テハク-ロ, 99

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 粘膜粘着性ポリ-γ-グルタミン酸ナノミセルおよびこれを用いた薬物伝達体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カルボキシル基の一部がヒドラジン、エチレンジアミン、1,3-ジアミノプロパン、3,5-ジアミノ-1,2,4-トリアゾール、カダベリン、ヘキサメチレンジアミン、ビス(ヘキサメチレン)トリアミン、トリエチレントトラミン、N,N'-ビス(2-アミノエチル)-1,3-プロパンジアミン、2,2-ビス(アミノエトキシ)プロパン、ベンジジン、スペルミン、ミノキシジル、2,2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)、アルギニン、リジン、シスタミン、及びシステアミンで構成されている群から選択されるジアミン系化合物のアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と

コレステロール、コレステロールβ-D-グルコシド、コレステリルN-(トリメチルアンモニオエチル)カルバメートクロリド、コレステリルオレイルカーボネート、コレスタノール、ラノステロール、クロフィブラート、コレステリルオレアート、メバスタチン、チオコレステロール、スチグマスタノール、コレステリルパルミテート、ジエチルウンベリフェリルホスフェート、コレステリルヘプタデカノエート、β-シトステロール、5α-コレスタン、及び5-コレステン-3-オンで構成されている群から選択されるコレステロール系親油性化合物と

の複合体で構成されたナノミセル。

【請求項 2】

ポリ-γ-グルタミン酸は、分子量が1~15,000kDaであることを特徴とする請求項1に記載のナノミセル。

10

20

【請求項 3】

次のステップを含む、請求項 1 に記載のナノミセルの製造方法：

(a) ポリグルタミン酸溶液に、

コレステロール、コレステロール β - D - グルコシド、コレステリル N - (トリメチルアンモニオエチル)カルバメートクロリド、コレステリルオレイルカーボネート、コレスタノール、ラノステロール、クロフィブラート、コレステリルオレアート、メバスタチン、チオコレステロール、スチグマスタノール、コレステリルパルミテート、ジエチルウンベリフェリルホスフェート、コレステリルヘプタデカノエート、 β - シトステロール、 5α - コレスタン、及び 5 - コレステン - 3 - オンで構成されている群から選択されるコレステロール系親油性化合物と

10

ヒドラジン、エチレンジアミン、1, 3 - ジアミノプロパン、3, 5 - ジアミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、カダベリン、ヘキサメチレンジアミン、ビス(ヘキサメチレン)トリアミン、トリエチレンテトラミン、N, N' - ビス(2 - アミノエチル) - 1, 3 - プロパンジアミン、2, 2 - ビス(アミノエトキシ)プロパン、ベンジジン、スベルミン、ミノキシジル、2, 2' - (エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)、アルギニン、リジン、シスタミン、及びシステアミンで構成されている群から選択されるジアミン系化合物と

を混合して得られる親油性化合物 - アミン複合体溶液を混合してポリグルタミン酸 - 親油性化合物複合体を製造するステップと、

(b) 前記ポリグルタミン酸 - 親油性化合物複合体を、ヒドラジン、エチレンジアミン、1, 3 - ジアミノプロパン、3, 5 - ジアミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール、カダベリン、ヘキサメチレンジアミン、ビス(ヘキサメチレン)トリアミン、トリエチレンテトラミン、N, N' - ビス(2 - アミノエチル) - 1, 3 - プロパンジアミン、2, 2 - ビス(アミノエトキシ)プロパン、ベンジジン、スベルミン、ミノキシジル、2, 2' - (エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)、アルギニン、リジン、シスタミン、及びシステアミンで構成されている群から選択されるジアミン系化合物で処理してポリ - γ - グルタミン酸のカルボキシル基をアミン基で置換し、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ - γ - グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルを製造するステップ。

20

【請求項 4】

ポリ - γ - グルタミン酸は、分子量が 1 ~ 15,000 kDaであることを特徴とする請求項 3 に記載のナノミセルの製造方法。

30

【請求項 5】

請求項 1 に記載のナノミセルの内部に、タンパク質、遺伝子、ペプチド、化合物、抗原および天然素材からなる群より選択される薬物が封入されていることを特徴とするナノミセル薬物伝達体。

【請求項 6】

抗原は、ポリサッカライド、弱毒生完全体微生物、不活性化微生物、組み換えペプチドおよびタンパク質、糖タンパク質、糖脂質、リボペプチド、合成ペプチド、並びに破裂された微生物からなる群より選択されることを特徴とする請求項 5 に記載のナノミセル薬物伝達体。

40

【請求項 7】

前記薬物は粘膜を介して伝達されることを特徴とする請求項 5 に記載のナノミセル薬物伝達体。

【請求項 8】

前記粘膜は、口腔、鼻腔、呼吸器粘膜、目の粘膜、生殖器粘膜及び皮膚潰瘍部位からなる群より選択されることを特徴とする請求項 5 に記載のナノミセル薬物伝達体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルに関し、より詳細には、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルおよびその製造方法と、前記ナノミセルの粘膜粘着特性を用いた薬物伝達体に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、生体親和性の天然高分子であるポリ-γ-グルタミン酸を用いて薬物または蛍光体を伝達できるポリ-γ-グルタミン酸ナノミセルおよびその製造方法に関する。医薬の投与経路のうち最も多く用いられることが経口投与であるが、粘膜部位に直接投与して治療効果を増大できる薬品の場合、また粘膜を介して吸収されるものが生体利用率の増大に効果的な薬物の場合、粘膜が主な代替投与経路として注目されている。粘膜は、胃腸管など、外部に露出しないところをはじめ、口腔、鼻腔、生殖器、直腸、消化器、皮膚潰瘍部位などに存在している。これらの粘膜部位に投与された生理活性物質は、一般的に経口に投与されて吸収される薬物に比べて、すぐ血流内への吸収が可能で薬効発現にかかる時間が短いという利点がある。また、口腔、鼻腔、呼吸器粘膜、目の粘膜、生殖器粘膜、皮膚潰瘍部位の場合、病巣部位への直接的な薬物適用は、経口投与に比べて薬物の有効性をより増強させることができるという利点がある。

【0003】

また、粘膜の周りに多くの免疫細胞が集中しているため、インフルエンザ (influenza) ワクチン用抗原物質を粘膜を介して伝達することで粘膜免疫性 (mucosal immunity) を増強させることも非常に重要である。このときに抗原伝達体として使用される素材が、単に抗原の伝達性を増加させる役割の他にも免疫細胞の活性化に役立つワクチンアジュバント (vaccine adjuvant) 物質の機能まで行うことができれば、その価値はさらに大きいといえる。

【0004】

粘膜粘着性高分子としては、ポリアクリル酸素材の物質が多く使用されてきた。米国登録特許第4,292,299号では、ポリアクリル酸とその誘導体およびポリアクリル酸セルロース誘導体などとの共重合体を用いた粘膜粘着性薬物体が提案されており、ヨーロッパ登録特許第654,261号では、セルロースエーテル誘導体、ポリアクリル酸誘導体およびゼラチンの物理的混合組成物を粘膜粘着性を得るために使用した。また、米国登録特許第5,942,243号では、ポリスチレンを基剤とした共重合体を粘膜投与用薬物伝達剤成分として使用した。しかし、これらの粘膜粘着性素材のほとんどは化学的合成方法により製造された有機合成物質である。したがって、生体親和性のある生体由来素材物質をベースとした粘膜粘着性伝達体の開発が活発に行われている。

【0005】

粘膜を形成する主成分であるムチンは、動物の外分泌腺から分泌する粘性物質の通称であり、糖質と結合した複合タンパク質を指す。このムチンは、細胞の主成分であるタンパク質の消化を促進して体内で有用な作用をし、胃壁の保護作用、解毒作用をする。このムチンが存在する機関は、口腔、鼻腔、喉頭、胃腸管、目、肛門、膣であり、その厚さは数nmから170μmまで様々である。ムチンネットワークの構造は、様々な結合により維持されるが、その結合には、イオン結合、水素結合、ジスルフィド (disulfide) 結合、バンデルワールス結合、ムチン同士の絡みなどがある。かかる結合と連結される粘膜付着性高分子に関する研究が活発に進められており、ムチン層に存在する結合と相互作用の強い特徴を有する高分子が主である。一般的に粘膜層は、複雑な多孔性網目構造を有しており、数マイクロメートルサイズのバクテリアの場合、一般的に粘膜層を通過することができないが、粘膜層が崩壊したところや薄いところでは一部通過することが知られている。約10ナノメートルのサイズを有する抗体とそれより大きいプラスミドDNAの場合、粘膜層を通過することはできるが、粘膜層に存在する数多くの酵素により分解されるため粘膜層を通過することが困難である。200ナノメートル以下のサイズを有するウイ

10

20

30

40

50

ルスの場合、粘膜層を迅速に通過すると知られている。

【0006】

本発明で使用されたポリ-γ-グルタミン酸は、カルボキシル基を有するポリペプチドとして、高分子量のポリ-γ-グルタミン酸を生産する耐塩性菌株バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) リケニホルミス菌株を用いてポリ-γ-グルタミン酸を生産する方法に関する特許 (韓国登録特許第500796号) およびポリ-γ-グルタミン酸を含有する抗がん組成物、免疫補強剤、免疫増強剤、ウイルス感染抑制に関する特許 (韓国登録特許第496606号、第517114号、第475406号、第0873179号) を出願した。また、物質の医薬用途に関する研究が行われ続けて、様々な効能が明らかになり続けている。

10

【0007】

したがって、本発明者らは、粘膜粘着特性を有する薬物伝達体を開発するために鋭意研究を重ねた結果、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルが粘膜粘着特性と免疫増強効果を有することと、前記ナノミセルを薬物伝達体として使用する場合、粘膜への薬物伝達効果が高いということを見出し、本発明を完成するに至った。

【発明の概要】

【0008】

本発明の目的は、生体由来の天然高分子であるポリ-γ-グルタミン酸をベースとし、粘膜粘着性に優れたナノミセルおよびその製造方法を提供することにある。

20

【0009】

本発明の他の目的は、粘膜粘着性に優れたナノミセルを用いた薬物伝達体を提供することにある。

【0010】

前記目的を達成するために、本発明は、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルを提供する。

【0011】

本発明はまた、(a) ポリグルタミン酸溶液に親油性化合物-アミン複合体溶液を混合してポリグルタミン酸-親油性化合物複合体を製造するステップと、(b) 前記ポリグルタミン酸-親油性化合物複合体にアミン系化合物を処理してポリ-γ-グルタミン酸のカルボキシル基をアミン基で置換し、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルを製造するステップと、を含むカルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルの製造方法を提供する。

30

【0012】

本発明はまた、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルの内部に、タンパク質、遺伝子、ペプチド、化合物、抗原および天然素材からなる群から選択される薬物が封入されていることを特徴とするナノミセル薬物伝達体を提供する。

【図面の簡単な説明】

40

【0013】

【図1】本発明の実施例による粘膜粘着性ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセル (*r*-PGA nanomicelles) の化学構造式とこのナノミセルが有するウイルス抗原伝達体の特性に関する原理を示す概念図 (a)、また、このナノミセルの粒径をDLS (b) と、cryo-TEM (c) で示す図である。

【図2】マウスモデルにおいて鼻腔内に注入された粘膜粘着性ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの粘膜粘着性を (a) SPET/CT と、(b) 免疫組織蛍光映像法 (b) を用いて測定した映像を示す図である。

【図3】マウスモデルにおいてモデル抗原 (OVA) が導入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルを鼻腔内に注入した後、抗原特異的な免疫効能を測定した

50

結果を示す図である。(a)OVA-特異的IgG抗体反応の誘導能力測定(比較のためにポリ-γ-グルタミン酸にコレステロールのような親油性基のみで置換されているポリ-γ-グルタミン酸-コレステロール(r-PGA-Cholesterol、表面がカルボキシル基からなっている)複合体の場合に示される抗原特異的免疫反応を比較して示した。)、(b)OVA-特異的IgA抗体反応の誘導能力測定、(c)IFN-γ ELISpot検定によるIFN-γを生成する細胞の個数を測定した結果を示す図である(**, p<0.01; ***, p<0.001, n.s., not significant)。

【図4】マウスモデルにおいてインフルエンザウイルス抗原が導入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルを鼻腔内に注入した後、抗原特異的な免疫効能を測定した結果を示す図である(1.PBS、2.PR8 only、3.PR8 plus γ-PGA nanomicelle (10 μg)、4.PR8 plus γ-PGA nanomicelle (100 μg))。(a)インフルエンザウイルス特異的なIgG抗体の生成測定、(b)インフルエンザウイルス特異的なIgA抗体の生成測定、(c)IFN-γ ELISpot検定によるIFN-γを生成する細胞の個数の測定、(d)ウイルス抗体によりヘマグルチニンの血液凝集反応抑制効能の測定、(e)ワクチン投与後、ウイルス感染に対するマウスの体重の変化、(f)ワクチン投与後、ウイルス感染に対するマウスの致死率の測定を示す図である(*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, n.s., not significant)。

【発明を実施するための形態】

【0014】

一観点で、本発明は、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルおよびその製造方法に関するものである。

【0015】

本発明のカルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルは、以下のステップを経て製造される。

【0016】

(a)ポリグルタミン酸溶液に親油性化合物-アミン複合体溶液を混合してポリグルタミン酸-親油性化合物複合体を製造するステップと、(b)前記ポリグルタミン酸-親油性化合物複合体にアミン系化合物を処理してポリ-γ-グルタミン酸のカルボキシル基をアミン基で置換して、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルを製造するステップ。

【0017】

本発明において、親油性化合物としては、コレステロールおよびその誘導体、炭素数3~21個を有する脂肪族(aliphatic)化合物(C3-C21)およびベンゼン基を1~10個含む芳香族化合物からなる群から選択されるものを使用することができる。

【0018】

一例として、親油性化合物のうちコレステロール系は、コレステロール(Cholesterol)、コレステロールβ-D-グルコシド(Cholesterol β-D-glucoside)、コレステリルN-(トリメチルアンモニオエチル)カルバメートクロリド(Cholesteryl N-(trimethylammonioethyl)carbamate chloride)、コレステリルオレイルカーボネート(Cholesteryl oleyl carbonate)、コレスタノール(Cholestanol)、ラノステロール(Lanosterol)、クロフィブラート(Clofibrate)、コレステリルオレート(Cholesteryl oleate)、メバスタチン(Mevastatin)、チオコレステロール(Thiocholesterol)、スチグマスタノール(Stigmastanol)、コレステリルパルミテート(Cholesteryl palmitate)、ジエチルウンベリフェリル

ホスフェート (Diethylumbelliferoyl phosphate)、コレステリルヘプタデカノエート (Cholesteryl heptadecanoate)、 β -シトステロール (β -Sitosterol)、 5α -コレスタン (5α -Cholestane)、5-コレステン-3-オン (5-Cholesten-3-one) などのコレステロールおよびその化合物および誘導体から選択されることを特徴とする。

【0019】

親油性化合物のうちトコフェロール系は、 $(\pm)$ - α -トコフェロール ($(\pm)$ - α -Tocopherol)、 $(+)$ - δ -トコフェロール ($(+)$ - δ -Tocopherol)、DL- α -トコフェロールアセテート (DL- α -Tocopherol acetate)、 $(+)$ - γ -トコフェロール ($(+)$ - γ -Tocopherol)、ビタミンEアセテート (Vitamin E acetate)、ピノバンクシン (Pinobanksin)、メチルジャスモネート (Methyl jasmonate)、レチニルアセテート (Retinyl acetate) などの約10~100個の炭素からなるトコフェロールおよび前駆体、誘導体化合物から選択されることを特徴とする。

【0020】

親油性化合物のうち脂肪族化合物は、プロピン (Propyne)、アクロレン (Acrolein)、アリルアルコール (Allyl alcohol)、2-プロペン-1-チオール (2-Propene-1-thiol)、プロパン (Propane)、イソプロピルアミン (Isopropylamine)、1,3-ジアミノプロパン (1,3-Diaminopropane)、N-イソプロピルメチルアミン (N-Isopropylmethylamine)、プロピレングリコール (Propylene glycol)、2-ニトロプロパン (2-Nitropropane)、1-ニトロプロパン (1-Nitropropane) などを含む3炭素系疎水性化合物および誘導体、ブチン (Butyne)、ブチルアルデヒド (Butyraldehyde)、2-メチル-1-プロパノール (2-Methyl-1-propanol)、ジエチルエーテル (Diethyl ether)、2-ブタノール (2-Butanol)、1-ブタノール (1-Butanol)、ブチルアルコール (Butyl alcohol) などの4炭素系を含む疎水性化合物および誘導体、ペンチルアセテート (Pentyl acetate)、2-ペンチルアセテート (2-Pentyl acetate)、2-ペンチル-2-シクロペンテン-1-オン (2-Pentyl-2-cyclopentene-1-one)、ペンチルナイトライト (Pentyl nitrite)、ペンチルプロピオネート (Pentyl propionate)、ペンチルバレレート (Pentyl valerate)、N-(1-ペンチル)ホルムアミド (N-(1-Pentyl)formamide)、ペンチルラウレート (Pentyl laurate)、2-ペンチルブチレート (2-Pentyl butyrate) の5個炭素を含む疎水性物質およびその誘導体から選択されることができる。

【0021】

親油性化合物のうちベンゼン基を1個以上含む芳香族化合物は、ベンゼン (Benzene)、シクロヘキサン (cyclohexane)、ヘキサン (hexane) などの形態をベースとする脂肪族および非芳香性環状化合物および芳香族化合物とその誘導体、ベンジルクロリド (Benzyl chloride)、ベンジルクロロホルメート (Benzyl chloroformate)、ベンジルホルメート (Benzyl formate)、ベンジルメチルエーテル (Benzyl methyl ether)、ベンジルプロピオネート (Benzyl propionate)、フェノール (Phenol)、2-(メチルアミノ)フェノール (2-(Methylamino)phenol)、2-tert-ブチル-6-メチル-フェノール (2-tert-Butyl-6-methyl-phenol)、3-(トリフルオロメチル)フェノール (3-(Trifluoromethyl)phenol)、ダンシルカダベリン (Dansylcadaverine)、3-(ダンシルアミノ)フェニルボロン酸 (3-(Dansyl

10

20

30

40

50

amino) phenylboronic acid)、ヘキサン、3 - オキサビシクロ [3.1.0]ヘキサン - 2, 4 - ジオン (3 - Oxabicyclo[3.1.0]hexane - 2, 4 - dione)、1, 6 - ビス(トリクロロシリル)ヘキサン (1, 6 - Bis(trichlorosilyl)hexane)、シクロペンテンオキシド (Cyclopentene oxide)、4 - ヘキシルフェノール (4 - Hexylphenol)、シクロ (Leu - Ala) (Cyclo (Leu - Ala))、アピシジン (Apicidin)、ボーベリシン (Beauvericin) など環状構造と非環状構造物から選択されることができる。

【0022】

また、親油性化合物は、QS - 21、MPLA、テントキシシン (Tentoxin)、エンニアチン A (Enniatin A)、チアミン (Thiamine)、アンシタビン (Ancitabine)、トラボキシシン A (Trapoxin A)、エンニアチン A1 (Enniatin A1)、シクロアルテノール (Cycloartenol)、シベルメトリン糖 (Cypermethrin 糖)、アミノ酸、有機酸および有機アルコール化合物およびその誘導体、グリセロール (Glycerol)、マロン酸 (Malonic acid)、リンゴ酸 (Malic acid)、シュウ酸 (Oxalic acid)、乳酸 (Lactic acid)、フマル酸 (Fumaric acid)、酒石酸 (Tartaric acid)、クエン酸 (Citric acid)、キナ酸 (Quinic acid)、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (Diisopropyl azodicarboxylate)、酢酸 (Acetic acid)、トリオクチルアミン (Trioctylamine)、安息香酸 (Benzoic acid)、2 - フェニル - ペンタン酸 (2 - phenyl - pentanoic acid)、オレイン酸 (Oleic acid)、パルミチン酸 (ステアリン酸) (Palmitic acid (stearic acid))、ソルビン酸 (Sorbic acid)、ヘキサン酸 (Hexanoic acid)、イソ吉草酸メチル (Methyl isovalerate)、ヘプタン酸クロリド (Heptanoyl chloride)、ドデセン酸 (Dodecenoic acid)、ラウリン酸 (Lauric acid)、セバシン酸 (Sebacic acid)、塩酸ピリドキシン (Pyridoxine hydrochloride)、ウンデシレン酸ナトリウム (Sodium undecylenate) のような 3 C 以上の有機酸、有機酸誘導体および脂肪酸から選択されることを特徴とする。

【0023】

本発明において、アミン系化合物は、エチレンジアミンを含むアルキルジアミン系化合物、またはポリアミンを含むオリゴマーおよびポリマーを使用することができる。

【0024】

一例として、ジアミン系化合物のうちモノマー系としては、ヒドラジン (Hydrazine)、エチレンジアミン (Ethylenediamine)、1, 3 - ジアミノプロパン、3, 5 - ジアミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール (3, 5 - Diamino - 1, 2, 4 - triazole)、カダベリン (Cadaverine)、ヘキサメチレンジアミン (Hexamethylenediamine)、ビス(ヘキサメチレン)トリアミン (Bis(hexamethylene) triamine)、トリエチレントトラミン (Triethylenetetramine)、N, N' - ビス(2 - アミノエチル) - 1, 3 - プロパングジアミン (N, N' - Bis(2 - aminoethyl) - 1, 3 - propanediamine)、2, 2 - ビス(アミノエトキシ)プロパン (2, 2 - Bis(aminoethoxy) propane)、ベンジジン (Benzidine)、スペルミン (Spermine)、ミノキシジル (Minoxidil)、2, 2' - (エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン) (2, 2' - (Ethylenedioxy) bis(ethylamine))、アルギニン (Arginine)、リジン (Lysine)、シスタミン (Cystamine)、システアミン (Cysteamine) などから選択されることを特徴とする。

【0025】

ポリマー系としては、ポリ(エチレングリコール)ビス(アミン)(Poly(ethylene glycol)bis(amine))、O,O'-ビス(2-アミノエチル)オクタデカエチレングリコール(O,O'-Bis(2-aminoethyl)octadecaethylene glycol)、キトサン(Chitosan)、PEI、コラーゲン(Collagen)などの生体親和性ポリマーを媒介としたジアミンおよび多価アミン型ポリマー化合物誘導体から選択されることを特徴とする。

【0026】

本発明で使用されるポリ-γ-グルタミン酸は、分子量が1~15,000kDaであることを特徴とする。

10

【0027】

本発明の一様態では、カルボキシル基を有するポリ-γ-グルタミン酸にコレステロールのような親油性物質複合体に負電荷を帯びる細胞表面と反応することができる正電荷を有するアミン基を置換することにより、薬物や抗原を封入できる生体親和性高分子ナノミセルを製造した。

【0028】

本発明において、ポリ-γ-グルタミン酸ナノミセルは、ポリ-γ-グルタミン酸にコレステロールのような親油性基とアミン基のような正電荷を帯びる物質が同時に付着されているポリ-γ-グルタミン酸コンジュゲートを水溶液に分散して得た高分子ミセルを示す。

20

【0029】

まず、本発明の一実施例により製造されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの特性を確認した。DLSを用いてナノミセルの粒径を測定した結果、直径が 22.1 ± 2.0 nmであることを確認し、Cryo-TEMにより球状のポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルを確認した(図1)。また、NMRを用いて分析した結果、コレステロールは1.7mol%、元素分析により確認した結果、約28.1mol%のアミン基が置換されていることを確認することができた。また、動的散乱法を用いて測定した結果、表面電荷は約36.43mVであることを確認することができた。

【0030】

他の観点で、本発明は、カルボキシル基の一部がアミン基で置換されたポリ-γ-グルタミン酸と親油性化合物の複合体で構成されたナノミセルの内部に、タンパク質、遺伝子、ペプチド、化合物、抗原および天然素材からなる群から選択される薬物が封入されていることを特徴とするナノミセル薬物伝達体に関するものである。

30

【0031】

本発明において、前記抗原は、ポリサッカライド、弱毒生完全体微生物(live attenuated intact microorganisms)、不活性化微生物(inactivated microorganisms)、組み換えペプチドおよびタンパク質、糖タンパク質、糖脂質、リポペプチド、合成ペプチド、破裂させた微生物(disrupted microorganism)などを使用することができるが、これに制限されるものではない。

40

【0032】

本発明の薬物伝達体に含まれた薬物は、薬物伝達体の粘膜粘着特異性を用いて、粘膜を介して伝達され、前記粘膜は、口腔、鼻腔、呼吸器粘膜、目の粘膜、生殖器粘膜、皮膚潰瘍部位などであってもよい。

【0033】

本発明の一様態では、前記ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの粘膜接着性および抗原伝達体の特性を証明するために、ヨウ素123またはFITCが標識されたOVAモデル抗原をマウスの鼻腔内に注入した後、SPECT/CT映像と免疫組織蛍光映像技法によりOVAの生体内挙動を確認した。SPECT/CT映像においてγ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、12時間が経過して

50

も鼻腔内にOVAが残っている一方、OVAのみ注入した場合には、6時間以内にOVAが無くなることを確認した。免疫組織蛍光映像において γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、6時間が経過しても鼻腔内にOVAが残っている一方、OVAのみ注入した場合には、1時間が経過するとOVAが無くなることを確認した。また、OVAのみ注入した場合とは異なり、 γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、OVAが鼻腔粘膜組織内へ効果的に伝達されることを確認した(図2)。

【0034】

前記結果により、本発明者らは、本発明のポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルが鼻腔粘膜接着性および抗原伝達体の特性を有することを確認し、マウスモデルにおいてモデル抗原であるOVAが導入されたポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルを鼻腔内に注入した後、抗原特異的な免疫効能を測定した。まず、抗原特異的な体液性免疫反応効能を確認するために、マウス血漿内に生成されたOVA特異的なIgG抗体を確認した。ポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAが注入されたマウスにおいて対照群に比べて、IgG抗体生成率が10.2倍高いことが確認された。また、粘膜免疫で特異的に生成される抗体であるIgAもまた対照群に比べて4.5倍高い生成率を示す(図3)。

【0035】

参考までに、ポリ- γ -グルタミン酸にコレステロールのような親油性基のみで置換されているポリ- γ -グルタミン酸-コレステロール(表面がカルボキシル基からなっている)の場合には、抗原特異的な免疫反応が、抗原自体を使用した場合と比較してみたとき、あまり差がないことを示しており、粘膜を介した抗原伝達が非効率的であることが分かる(図3のa)。かかる結果は、ポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルにおいてアミノ基(NH_2)から誘導される正電荷の機能が、粘膜粘着性および粘膜を介した薬物伝達機能と非常に密接に関係していることが分かる。

【0036】

細胞性免疫反応は、ウイルスの感染を制御し、疾患の兆候を改善し、疾患の回復を促進することから重要な役割を果たすと認められる。このような抗ウイルス細胞性免疫は、細胞毒性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocytes)とIFN- γ 、IL-2のような免疫刺激性サイトカインを誘導する類型1CD4+ T-ヘルパーリンパ球(T-helper lymphocytes; Th1)の導入により構成される。

【0037】

したがって、本発明のポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルがOVA抗原特異的な細胞性免疫を誘導するかをIFN- γ ELISpot検定により確認した。ワクチンが注入されたマウスの脾臓内細胞のうちIFN- γ を生成する細胞の個数を確認した結果、対照群に比べて5.2倍高い数値であることを確認することにより、細胞性免疫誘導能力を確認した(図3)。

【0038】

したがって、前記結果により、本発明者らは、本発明のポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルが体液性、細胞性免疫誘導に効果的であることを確認し、インフルエンザウイルス(influenza A/Puerto Rico/8/34; PR8; H1N1)抗原を用いてその効能を検証した。

【0039】

まず、抗原特異的な体液性免疫反応効能を確認するためにPR8抗原特異的な抗体を確認した。ポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとPR8抗原が注入されたマウスにおいて対照群に比べて28.6倍の高いIgG抗体生成、また27.6倍高いIgA生成能力を確認した(図4)。PR8抗原特異的な細胞性免疫を誘導するかをまたIFN- γ ELISpot検定により確認した。ワクチンが注入されたマウスの脾臓内細胞のうちIFN- γ を生成する細胞の個数を確認した結果、対照群に比べて3.2倍高い数値であることを確認することにより、細胞性免疫誘導能力を確認した。また、抗ウイル

10

20

30

40

50

ス抗体がインフルエンザウイルス表面タンパク質であるHAと赤血球が結合することを妨げる原理を用いてPR8抗原特異的な抗体効能を確認した結果、対照群に比べて4倍高いことを確認した(図4)。

【0040】

前記結果に基づき、本発明者らは、ウイルス感染に対する生存率を確認した。50%の致死率を有するウイルスの10倍を用いて生存率を確認した結果、PBS注入実験群は100%の致死率を示し、PR8抗原のみ注入した実験群は50%の致死率を示した。一方、ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルとPR8抗原を注入した実験群の場合、100%生存する結果を示した(図4)。

【0041】

したがって、前記結果により、本発明者らは、本発明のポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルが、体液性、細胞性免疫誘導に効果的であることを確認し、ウイルス感染に対する抵抗能力を高めることができることを確認した。

【0042】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は、単に本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されるものに解釈されないことは、当業者にとって自明であろう。

【0043】

<実施例1>ポリ-γ-グルタミン酸/コレステロールナノミセルの製造

<1-1>コレステロール-アミンの合成

250mmolのエチレンジアミン(シグマアルドリッチ社製、米国)を250mLのトルエンに溶解させた。この際、氷を用いて温度を低く維持した。2.25gコレステロールを50mLのトルエンに溶解させ、10分間静置した後、前記製造したエチレンジアミン溶液に滴下して混合させ、直ちに室温で16時間攪拌して反応させた。反応が終了した後、脱イオン水を用いて数回洗浄した。前記過程を経てクリーンになった有機層を硫酸マグネシウムを用いて乾燥させ、乾燥した溶液でトルエンを回転蒸発させた。蒸発された試料を20mLのジクロロメタンと20mLのメタノール混合液で数回洗浄し、1マイクロメートルのPTFEフィルターを用いて濾過した。濾過したクリーンな溶液をまた回転蒸発させ、白色固体形態のコレステロール-アミン試料を得た。このように得られたコレステロール-アミン試料をもってNMRを用いてコレステロールとアミンの結合程度を確認した。NMR分析結果、約98mol%のアミンが結合されたことを確認した。

【0044】

<1-2>ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールの合成

ポリ-γ-グルタミン酸(1g、50kDa、Bioleader社製、韓国)を40で10mLのDMSO(10mL)に約一日溶解させた。<1-1>で製造したコレステロール-アミン(1g)を室温で10mLのTHF(Tetrahydrofuran、シグマアルドリッチ社製、米国)に溶解させた。コレステロール-アミン溶液をポリ-γ-グルタミン酸溶液に徐々に滴下し、混合された二つの溶液にCDI(1g)を入れた後、40で約一日反応させた。反応された溶液を室温で冷やした後、回転蒸発によりTHFを除去した。

【0045】

前記THFが除去された溶液をアセトンにより沈殿させ、遠心分離により溶媒と溶質を十分に分離させてアセトン除去し、40で残っているアセトンを乾燥させた。乾燥した試料を脱イオン水に入れて炭酸水素ナトリウムを最初反応させたポリ-γ-グルタミン酸と同様なモル数で入れてポリ-γ-グルタミン酸を中和させた。完全に溶解した溶液にアンバーライト(amberlite)(5g、シグマアルドリッチ社製、米国)で2時間程度攪拌して反応していないコレステロールおよび不純物を除去した。メッシュを介してアンバーライトを除去し、セルロースメンブレンチューブ(MWCO12,000、シグマアルドリッチ社製、米国)を用いて2日間透析した。透析した溶液を凍結乾燥してポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセル試料を得た。前記ナノミセルをNMR

10

20

30

40

50

で分析してコレステロール導入量を測定した。NMR分析結果、1.7mol%コレステロールが結合されたことを確認した。

【0046】

<1-3>ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの合成

100mgのポリ-γ-グルタミン酸-コレステロール複合体と0.518mLのエチレンジアミンを60mgのカルボニルジイミダゾール(Carbonyldiimidazole)が溶解されている50mLのジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解した後、約24時間攪拌する。元素分析(elemental analysis)によりC、N、Hの量を定量化することにより、導入したアミン基の量を定量化した。分析結果、ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロール複合体(γ-PGA-Cholesterol)の場合、それぞれ、C(35.16±0.08%)、H(4.87±0.19%)、N(7.40±0.04%)の値を示し、ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセル(γ-PGA nanomicelles, i.e., aminated γ-PGA-Cholesterol)の場合は、C(42.41±0.38%)、H(6.95±0.13%)、N(15.90±0.14%)の値を示した。結果として、ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの場合、約28.1mol%のアミン基が置換されていることを確認することができた。

10

【0047】

<実施例2>ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの特性化

ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルを蒸留水に1mg/mLで分散させてDLS(Dynamic Light Scattering、大塚製薬社製、日本)測定結果、図1のb)のように直径が22.1±2.0nmであることを確認し、Cryo-TEMにより分析した結果、図1のc)のように球状のポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルであることを確認した。また、NMRを用いて分析した結果、コレステロールは1.7mol%、元素分析により確認した結果、約28.1mol%のアミン基が置換されていることを確認することができた。また、動的散乱法を用いて測定した結果、表面電荷は約36.43mVであることを確認することができた。

20

【0048】

<実施例3>ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルのOVA封入

実施例1で作製したポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルにOVA(ovalbumin、シグマアルドリッチ社製、米国)を封入するために8mg/mLのナノミセルと10mg/mLのOVAを質量比5:1の割合で混合し、1時間反応を行うと、OVAが封入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルが作製される。遊離OVAなく100%封入される割合を見出すために、8mg/mLのポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルと10mg/mLのOVAを質量比で2:1から9:1の割合で反応を行い、ポリアクリルアミドゲル(Polyacrylamide gel)(SDS free gel)で実験した結果、5:1の割合で100%封入されたことを確認した。

30

【0049】

<実施例4>ヨウ素(I)が導入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの製造

40

<4-1>チロシンが導入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの製造

ヨウ素は、チロシンのフェノール環に対して高い結合親和力を有することからナノミセル構造にチロシンを結合することでヨウ素を導入することができる。実施例1で製造したポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルを水に溶解した後、EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride、シグマアルドリッチ社製、米国)、NHS(N-hydroxysuccinimide、シグマアルドリッチ社製、米国)とチロシンアミド(シグマアルドリッチ社製、米国)を添加してポリ-γ-グルタミン酸のカルボキシル

50

基とチロシンアミドのアミン基とのアミド結合を形成した。透析と凍結乾燥過程を経て未反応物を除去し、パウダー状のナノゲル試料を得ており、ナノミセルに付着されたチロシンは、NMR分析結果、約0.7 mole %が導入された。

【0050】

<4-2> ヨウ素が導入されたナノミセルの製造

チロシンが導入されたナノミセルをPBSに溶解して準備し、同位元体イオン溶液($Na^{123}I$ 、ピアス社製、米国)と混合した後、混合液をヨウ素化チューブ内で1時間程度攪拌して室温で反応する。

【0051】

反応溶液をPD10カラム(シグマアルドリッチ社製、米国)にロードし、PBSを移動相とし、すべての溶出液を1 mLあるいは0.5 mLずつ分画して受け取った。各溶出分画の ^{123}I 活性をガンマカウンターで測定して記録した後、最も高い活性を示す溶出分画を選択して使用した。

【0052】

<4-3> マウスモデルにおいてポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルの粘膜粘着性(SPECT/CT)の測定

チロシンが導入されたナノミセルとヨウ素の反応後、最も高い活性の溶出分画を選択して準備し、マウス1匹当たり注入する ^{123}I 活性を考慮して溶出液をPBSで希釈し、最終濃度は500 $\mu g/mL$ であった。

【0053】

SPECT/CTイメージングのための試料の注入量は、鼻腔投与の際に40 μL 内に略200 μCi 以上の ^{123}I 活性を有するようにした。鼻腔投与用tipを用いて40 μL の試料をマウスに注入し、注入後、1、6、12時間後にSPECT/CTイメージングを開始する。各イメージングにかかる時間は略1時間であり、10分間CTイメージングした後、続けて50分間SPECTイメージングを行う。試料の鼻腔投与の際には注入量が最大40 μL に制限されるため、イメージングのための ^{123}I 活性を確保するために、試料の濃縮過程を必ず必要とする。 ^{123}I 標識ナノミセルを遠心分離フィルタリング(ultrace1、10 kDa)を進めて濃縮し、40 μL 当たりイメージングに必要な活性を確保する。試料の注入は、マウスのサイズと状態を考慮して両鼻腔に交互に数分の間隔で注入した。

【0054】

その結果、図2に示されたように、SPECT/CT映像において γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、12時間が経過しても鼻腔内にOVAが残っている一方、OVAのみ注入した場合は6時間以内にOVAが無くなることを確認した。免疫組織蛍光映像において γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、6時間が経過しても鼻腔内にOVAが残っている一方、OVAのみ注入した場合は1時間が経過するとOVAが無くなることを確認した。また、OVAのみを注入した場合は異なり、 γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAを注入した場合、OVAが鼻腔粘膜組織内へ効果的に伝達されることを確認した。

【0055】

<実施例5> 動物免疫実験

<5-1> 動物および動物免疫化

前記<実施例3>で製造した抗原が封入されたポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルの生体内(in vivo)での免疫特性を調べるために動物免疫実験を行った。動物実験には、特定の病原菌のない6週齢のメスC57BL/6マウス(coretech社製、韓国)を使用し、すべての動物実験は、忠南大学共同動物実験センターで承認を受けて行った。まず、体重(g)当たり0.01 mLの2.5%アバチン(averitin; 2,2,2-tribromoethanol-tert-amyl alcohol、シグマアルドリッチ社製、米国)溶液をマウスの腹腔に注入してマウスを麻酔し、20 μL の抗原が封入されたポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルを

10

20

30

40

50

マウスの両鼻腔に10 μ Lずつ交互に注入した。対照群には、PBSに抗原のみを含んで鼻腔内に注入した。免疫方法は3回免疫化で実施し、各注入の間に7日の間隔で免疫化を実施した。

【0056】

<5-2>抗体測定のための試料採取および抗体ELISA検査

<実施例5-1>で処理された動物免疫1週間後、目の血管で血液を採取して室温で1時間放置した後、室温で約1時間放置した。そして4で遠心分離機を用いて上澄み液のみ分離した。この溶液を用いて抗原特異的なIgG生成を確認した。鼻腔粘液を採取するために3次免疫化の1週間後、頸椎脱骨方法でマウスを犠牲にした後、鼻腔内へ200 μ LのPBSを注入してまた回収した。この溶液を用いて抗原特異的なIgAを測定した。

10

【0057】

抗原特異的なIgG、IgAの生成は、ELISA検定により確認した。マウス抗体ELISA検定は、製造業者の指針に従った。まず、抗原タンパク質を0.05M炭酸水素塩緩衝液(pH9.6)に1 μ g/mLでウエル当たり100 μ LずつELISAプレートにコーティングした。4で一晩中反応させ、その後、PBS-T(バイオラッド社製、米国)で3回洗浄した後、2%BSAでブロッキングした。この過程は37で1時間行った。また、洗浄後にPBSで希釈した血漿と鼻腔粘液を順次8進希釈した溶液をウエル当たり100 μ Lずつ入れて2時間37で反応した。その後、HRPが結合された2次抗体を1時間反応させた後、TMB溶液(バイオラッド社製、米国)を添加して発色を誘導した。30分後、2N硫酸を添加して反応を中止した後、ELISA readerを用いて450 nmの波長で吸光度を測定した。抗体の力価は、吸光度0.1で希釈値で決定した。

20

【0058】

その結果、図3のaに示されたように、IgGの抗体生成率は、ポリグルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAが注入されたマウス群が対照群に比べて10.2倍高い生成率を示すことを確認し、アミン基で表面が置換されていないポリグルタミン酸-コレステロール複合体の場合、抗体生成率の増加を確認することができなかった。

【0059】

図3のbに示されたように、粘膜免疫特異的に生成される抗体であるIgAは、ポリグルタミン酸-コレステロールナノミセルとOVAが注入されたマウス群が、対照群に比べて4.5倍高い生成率を示すことを確認した。

30

【0060】

<5-3>ELISpot検定

<実施例5-1>で処理された動物免疫1週間後、マウスを頸椎脱骨させて犠牲にした。マウスを1グループ当たり5匹ずつを選択してそれぞれのマウスで脾臓を摘出し、滅菌されたペトリ皿に前記脾臓組織を移し、セルストレーナー(cell strainer)を用いて前記脾臓を交換し、組織被膜から細胞を分離した。単一脾臓細胞懸濁液を製造した。マウスIFN- γ ELISpot(Nunc、オランダ)検定は、製造業者の指針に従った。ELISpotプレートにIFN- γ 抗体(5 μ g/mL)を添加して一晩中反応させた後、完全培養培地(10%ウシ胎児血清を補充したRPMI)で2時間ブロッキングした。脾臓細胞(5×10^5)を200 μ Lの総体積で37および5%CO₂で60時間完全培養培地でペプチド当たり10 μ L/mLの濃度で刺激させた。次に、洗浄とHRPが結合された2次抗体を2時間処理した後、AEC(3-amino-9-ethyl-carbozole、シグマイルドリッチ社製、米国)に15分間反応させて発色を誘導した後、CTL-免疫スポット読み取り機ユニット(Molecular Devices、米国)でスポットを計数した。入力脾臓細胞当たりスポット形成細胞(spot forming cells; SFC)の平均 $\pm$ 標準偏差に相当した。

40

【0061】

その結果、図3のcに示されたように、ワクチンが注入されたマウスの脾臓内細胞のうちIFN- γ を生成する細胞の個数を確認した結果、対照群に比べて5.2倍高い数値で

50

あることを確認することにより、細胞性免疫誘導能力を確認した。

【0062】

<5-4> 血球凝集 (Hemagglutination) 検定

各グループ別マウス血清での抗体力価測定は、ウイルスに対するHI (Haemagglutination Inhibition) 検定により測定した。すべての血清は、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) から抽出したRDE (receptor-destroying enzyme、(デンカ生研社製、日本) を血清サンプルの体積に対して1:10で処理した後、37℃で16時間培養した。血清内非特異的な受容体の活性を除去したサンプルを96ウエルの丸底プレートで25μLずつ順次2進希釈した。第二に、血清サンプルに同一体積の4HAUウイルスを入れ、37℃の培養器で30分間反応させ、最後に0.5%ニワトリ赤血球 (tRNA) が含まれたPBSを50μLずつ入れた後、室温で40分間反応させた。力価は、希釈された50μL内で計算された値で、 $\log_{10} N = 10 - N$ でN値で表記した (図4のd)。

10

【0063】

<実施例6> ウイルス感染に対する生存能検定

本実施例では、PR8ウイルス抗原が封入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルの鳥インフルエンザウイルスに対する免疫増強効果を調査するために、インフルエンザウイルスを感染させた実験動物の致死率を検定した。

【0064】

<6-1> ウイルスの準備

病原体として使用されたインフルエンザウイルスは、マウスで高病原性を示すH1N1インフルエンザウイルス株 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)、韓国生命工学院製、韓国) を10~11日経過した白色産卵鶏の有精卵に接種して増幅した後、実験に使用しており、実験動物としては6週齢のメスC57BL/6マウス (coretech社製、韓国) を使用した。分譲されたウイルスの純粹分離は次のように実施した。1次的に分離したウイルスを抗生剤が入っているPBSに希釈して10日齢の白色産卵鶏の有精卵に接種した後、37℃で48時間静置培養した後、有精卵の液を取り増幅されたウイルスを使用した。卵

20

【0065】

<6-2> 動物免疫およびウイルス感染

対照群としては、インフルエンザウイルスを単独で鼻腔に注入したマウスとPR8ウイルス抗原 (M.-S. Lee, A. Hu, Trends Microbiol. 20:103, 2012) を鼻腔に注入したマウスを使用し、実験群は、PR8ウイルス抗原が封入されたポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセル鼻腔投与した後、翌日インフルエンザウイルスを投与した。ウイルスの感染は、実験動物にアバチンを200μL腹腔投与して麻酔した後、ウイルス30μLを各マウスに鼻腔を介して50%の致死率を有するウイルスの10倍 ($10 \times LD_{50}$) を投与した。ウイルス感染2週間までマウスの体重を測定してマウスの致死率を検定した。

30

【0066】

その結果、ポリ-γ-グルタミン酸-コレステロールナノミセルとPR8抗原が注入されたマウスにおいて対照群に比べて28.6倍の高いIgG抗体生成、そして27.6倍の高いIgA生成能力を確認した (図4のaおよびb)。PR8抗原特異的な細胞性免疫を誘導するかをまたIFN-γ ELISpot検定により確認した。ワクチンが注入されたマウスの脾臓内細胞のうちIFN-γを生成する細胞の個数を確認した結果、対照群に比べて3.2倍高い数値であることを確認することにより、細胞性免疫誘導能力を確認した (図4のc)。また、抗ウイルス抗体がインフルエンザウイルス表面タンパク質であるHAと赤血球が結合することを妨げる原理によりPR8抗原特異的な抗体効能を確認した結果、対照群に比べて4倍高いことを確認した (図4のd)。

40

【0067】

前記結果に基づき、本発明者らは、ウイルス感染に対する生存率を確認した。50%の

50

致死率は有するウイルスの10倍を用いて生存率を確認した結果、PBS注入実験群は100%致死率を示し、PR8抗原のみ注入した実験群は50%の致死率を示した。一方、ポリ- γ -グルタミン酸-コレステロールナノミセルとPR8抗原を注入した実験群の場合、100%生存する結果を示した(図4のf)。

【0068】

以上、本発明における内容の特定の部分について詳細に記述しているところ、当業者にとってかかる具体的技術は単に好ましい実施様態であって、これにより本発明の範囲が制限されるものではない点は明らかであろう。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とそれらの等価物により定義されると言える。

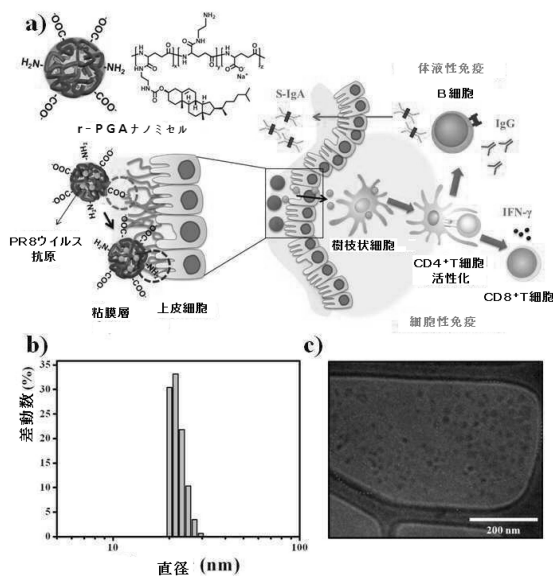
【産業上の利用可能性】

10

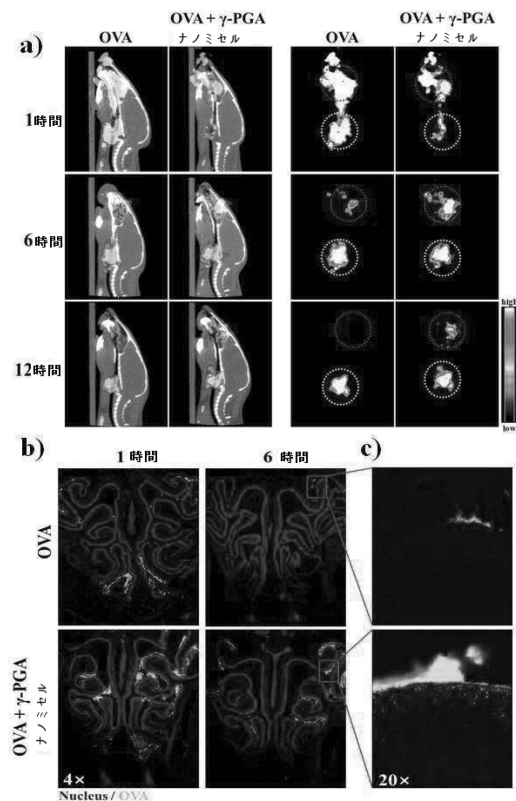
【0069】

本発明による生体由来の天然高分子であるポリ- γ -グルタミン酸をベースとしたナノミセル薬物伝達体を粘膜部位の薬物伝達分野に活用することにより、薬物の生体安定性および有効性を向上させることができる。

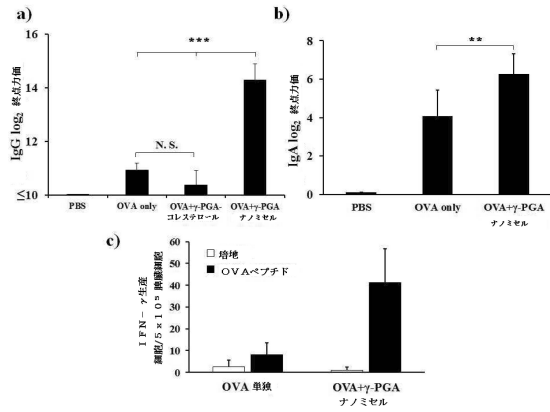
【図1】



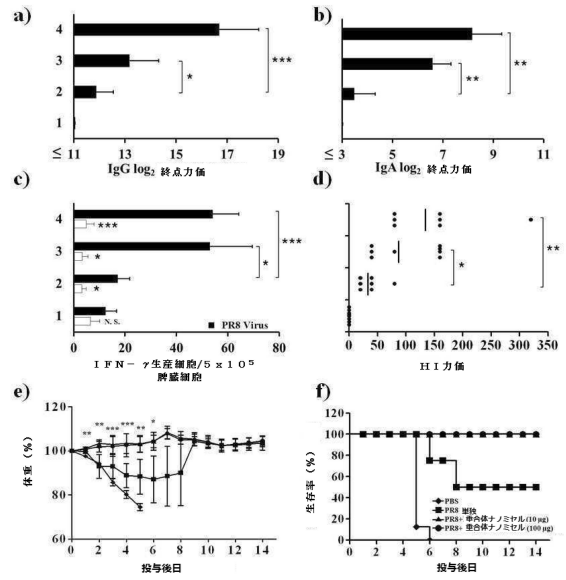
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 9/51 (2006.01) A 6 1 K 9/51
 A 6 1 K 39/00 (2006.01) A 6 1 K 39/00

(73)特許権者 506272301

コリア リサーチ インスティテュート オブ バイオサイエンス アンド バイオテクノロジー
 大韓民国, テジョン 305-333, ユソン-ク, オウン-ドン, 52

(73)特許権者 511166998

ククミン ユニバーシティ インダストリー-アカデミック コオペレーション ファウンデーション
 大韓民国, ソウル 136-702, ソンブク-ク, チョンヌン-ドン, 861-1, ククミン
 ユニバーシティ

(74)代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(74)代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 チョイ ジェチョル

大韓民国, 305-751, テジョン, ユソン-グ, クジユク-ロ, 25, ソンカン グリーン
 アpartment, 301-751

(72)発明者 イム ヨンテク

大韓民国, 302-773, テジョン, ソ-グ, トゥンサンブク-ロ, 160, ハンマル アパー
 トメント, 105-904

(72)発明者 ブ ハリョン

大韓民国, 305-8096, テジョン, ユソン-グ, クウハク-ロ, 125

(72)発明者 ソン ムンヒ

大韓民国, 136-753, ソウル, ソンブク-ク, ソンブク-ロ 4-ギル, 52, ハンシン
 ハンジン アpartment, 104-801

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第2007/129746(WO, A1)

特表2010-529214(JP, A)

国際公開第99/043736(WO, A1)

特開2011-173802(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9/00 - 9/72

A 6 1 K 47/00 - 47/69