

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5731198号  
(P5731198)

(45) 発行日 平成27年6月10日(2015.6.10)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015.4.17)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 K 39/00	(2006.01)	A 61 K 39/00
A 61 K 9/107	(2006.01)	A 61 K 9/107
A 61 K 9/127	(2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 K 47/44	(2006.01)	A 61 K 47/44

請求項の数 33 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-526115 (P2010-526115)
(86) (22) 出願日	平成20年9月24日 (2008.9.24)
(65) 公表番号	特表2010-539909 (P2010-539909A)
(43) 公表日	平成22年12月24日 (2010.12.24)
(86) 國際出願番号	PCT/CA2008/001678
(87) 國際公開番号	W02009/039628
(87) 國際公開日	平成21年4月2日 (2009.4.2)
審査請求日	平成23年9月9日 (2011.9.9)
(31) 優先権主張番号	60/975,602
(32) 優先日	平成19年9月27日 (2007.9.27)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/061,303
(32) 優先日	平成20年6月13日 (2008.6.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	508105740 イムノバクシーン・テクノロジーズ・イン コーポレイテッド IMMUNOVACCINE TECHNOLOGIES INC. カナダ ビー-3エイチ オエ-8 ノバス コシア州, ハリファックス, サマー スト リート 1344, スイート 412
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インビボでのポリヌクレオチドの送達のための連続疎水相を含む担体におけるリポソームの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

油又は油中水型エマルションから選択される担体であって乳化剤を含む前記担体と、  
リポソームと、  
ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと  
を含む組成物。

## 【請求項 2】

前記油が、天然油又は合成油である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記油が、鉱油、植物油又は堅果油である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記担体が、油の混合物を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記乳化剤が、オレイン酸マンニド、レシチン、Tween (商標) 80、Span (商標) 20、Span (商標) 80、Span (商標) 83 又はSpan (商標) 85 である、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】

前記乳化剤が、オレイン酸マンニドである、請求項 5 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記担体が、不完全フロイトアジュバント又はMontanide (商標) ISA 5

10

20

1 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記リポソームが、リン脂質を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記リポソームが、コレステロールを含む、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】

前記リポソームが、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) 及びコレステロールを含む、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】

アジュバントをさらに含む、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】

前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物細胞において機能性のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ポリヌクレオチドが発現プラスミドに挿入されている、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドを含む細菌ベクター又はウイルスベクターを含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、

(a) 前記リポソーム内に封入されて、  
(b) 前記リポソームの外部に、又は  
(c) 前記リポソーム内に封入されていると前記リポソームの外部の両方に存在する、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記アジュバントが、

(a) 前記リポソーム内に、  
(b) 前記リポソームの外部に、又は  
(c) 前記リポソーム内と前記リポソームの外部の両方に存在する、請求項 11 に記載の組成物。

30

【請求項 17】

請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の組成物、及び

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを被験者に送達するために前記組成物を使用するための指示書を含むキット。

【請求項 18】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを被験者に送達するための、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 19】

前記被験者が哺乳動物である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

リポソームと、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、油又は油中水型エマルションから選択される担体であって乳化剤を含む前記担体と、を組み合わせることを含む、組成物を作製するための方法。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチドが前記リポソーム内に封入されている、請求項 21 に記載の方法

50

。

## 【請求項 2 3】

前記リポソームを、前記担体と組み合わせる前に脱水する、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記リポソームが、リン脂質を含む、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

前記リポソームが、コレステロールを含む、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 2 6】

前記リポソームが、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) 及びコレステロールを含む、請求項 2 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 2 7】

前記担体中の油が、天然油又は合成油である、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 2 8】

前記担体中の油が、鉛油、植物油又は堅果油である、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 2 9】

前記担体が、油の混合物を含む、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 0】

前記担体が、不完全フロイトアジュバント又はMontanide (商標) ISA 5 1 である、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 1】

前記乳化剤が、オレイン酸マンニド、レシチン、Tween (商標) 80、Span (商標) 20、Span (商標) 80、Span (商標) 83 又はSpan (商標) 85 である、請求項 2 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 2】

前記乳化剤が、オレイン酸マンニドである、請求項 2 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 3 3】

請求項 2 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法によって生産される組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年9月27日出願の米国特許仮出願第 60/975,602 号及び 2008年6月13日出願の米国特許仮出願第 61/061,303 号の利益及び優先権を主張し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

## 【0002】

本出願は、ポリヌクレオチドをインピボで送達するためのリポソーム及びビヒクルとしての連続疎水相を含む組成物の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

例えば遺伝子治療における使用のために、標的細胞及び組織への核酸の有効な導入に関して多大の研究が行われてきた。そのような核酸は、例えば遺伝子産物をコードする配列又はその代わりに、特定遺伝子若しくはそれらの産物のセンス若しくはアンチセンス配列に対応し、したがってこれらの遺伝子及び / 又はそれらの産物の発現に直接の影響を及ぼすヌクレオチドの短い配列であり得る。

50

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

核酸を正しい標的部位に送達すること及び十分な数の標的細胞に送達することには引き続き問題が存在する。核酸はヌクレアーゼ攻撃の対象であり、しばしば細胞膜を横切ることができない。マイクロインジェクション、スクレーブローディング及び受容体を介したエンドサイトーシスを含む、多種多様な送達方法が提案されてきた。リポソームの使用を含むシステムを包含する、脂質ベースの担体システムは、治療用核酸をパッケージングするためにしばしば使用される。しかし、リポソームの使用は、低い封入効果及び循環からの迅速なクリアランスなどの問題を提起し得る。また、標的組織への送達が妨げられるところまでリポソームのサイズを増大させずに十分な核酸をパッケージングすることにも問題も存在し得る。従って、核酸を正しい標的組織に標的化するためのリポソームに基づく送達システムを開発する必要がある。10

**【課題を解決するための手段】****【0005】**

1つの態様では、本発明は、疎水性物質の連続相を含む担体、リポソーム、及びポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。

**【0006】**

もう1つの態様では、本発明は、前述した組成物を被験者に投与することを含む、ポリヌクレオチドを被験者に送達するための方法を提供する。20

**【0007】**

本発明の他の態様及び特徴は、本発明の特定の実施形態についての以下の説明を付属の図面と共に検討することによって当業者に明らかになる。

図面は、単なる例として本発明の実施形態を説明するものである。

**【図面の簡単な説明】****【0008】**

【図1】注射後8日目にリンパ節から単離した細胞におけるIL-12発現能を示す。

【図2】注射後8日目にリンパ節から単離した細胞におけるIL-12発現能を示す。各々の群のマウスから検出されたIL-12タンパク質レベルを平均した。

【図3】注射後8日目にリンパ節から単離した細胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)発現能を示す。第1群(PBS中のGFP)、第2群(GFP/リポソーム/疎水性担体)、第3群(GFP/疎水性担体)及び第4群(GFP/リポソーム)の動物からのリンパ節細胞は、水平な線によって表されるバックグラウンド蛍光を上回る検出可能なGFP発現細胞を含んだ。バックグラウンド蛍光は、第5群(リポソーム/疎水性担体、GFPなし)及び第6群(未処置マウス)の対照動物からのリンパ節細胞蛍光計数を用いて推定した。P値はスチューデントT検定を使用して計算した。30

【図4】ワクチン接種後8日目のGFP発現を示すCD11b/CD11c陽性リンパ節細胞を示す。第1群～第6群(図1で述べた)の動物からのリンパ節におけるCD11b/CD11c陽性及びGFP陽性細胞の数を比較するため、図1に提示したデータを再解析した。CD11b/CD11c陽性でGFP陽性の細胞の数を総リンパ節細胞のパーセンテージとして計算した。40

【図5】IL-12 siRNAの注射後、リンパ節から単離した細胞においてプラスミドIL-12が誘導するIL-12タンパク質発現の阻害を示す。各々の群のマウスから検出されたIL-12タンパク質レベルを平均した。リンパ節細胞は、第1群(pORF-mIL12プラスミド单独、siRNAなし)、第2群(pORF-mIL12プラスミド、PBS中のIL12-siRNA)、第3群(pORF-mIL12プラスミド、リポソーム/疎水性担体中のIL12-siRNA)及び第4群(未処置、ナイーブマウス)からである。p値はスチューデントT検定を使用して計算した。

【図6】IL-12 siRNAの注射後、リンパ節から単離した細胞においてオボアルブミンが誘導するIL-12タンパク質発現の阻害を示す。各々の群のマウスから検出さ50

れたIL-12タンパク質レベルを平均した。リンパ節細胞は、第1群（0日目のCFA中のオボアルブミン、siRNAなし）、第2群（CFA中のオボアルブミン、PBS中のIL12-siRNA、-1日目）、第3群（CFA中のオボアルブミン、リポソーム/疎水性担体中のIL12-siRNA、-1日目）、第4群（CFA中のオボアルブミン、PBS中のIL12-siRNA、+1日目）、第5群（CFA中のオボアルブミン、リポソーム/疎水性担体中のIL12-siRNA、+1日目）及び第6群（未処置ナイーブマウス）からである。p値はスチューデントT検定を使用して計算した。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、ポリヌクレオチドを被験者に送達するために有用な組成物を提供する。

10

【0010】

ポリヌクレオチド

本明細書で述べるポリヌクレオチドの使用は、特に、主として特定遺伝子又はそれらの産物のセンス又はアンチセンス配列に対応し、したがってこれらの遺伝子及び/又はそれらの産物の発現に直接の影響を及ぼす配列を含むポリヌクレオチドを指す。例えば、遺伝子コード配列を含むポリヌクレオチドの使用は、そのようなポリヌクレオチドを取り込む細胞において対象遺伝子の転写及び/又は翻訳に影響を及ぼす。同様に、RNA干渉ポリヌクレオチドの使用は、そのようなヌクレオチドを取り込む細胞においてmRNAのレベルに直接影響することにより、対象とする特定遺伝子の発現に影響を及ぼす。これは、遺伝子特異的配列の存在を介して作用するのではなく、他のポリヌクレオチドベースの分子、例えばCpG及びポリICアジュバントとは有意に異なる。さらに、ポリヌクレオチドベースのアジュバントは免疫応答を非特異的に調節すると考えられ、それらの作用は、それらが細胞外受容体と相互作用して免疫細胞の活性を非特異的に増強する、ワクチン接種部位から始まる。一部の場合、ポリヌクレオチドベースのアジュバントは、内在化されて、細胞内受容体と相互作用することによってそれらの作用を及ぼし、同様に下流経路の活性化を導き、免疫応答の生成を助ける免疫細胞活性の増強を集合的に生じさせる。そのようなアジュバントは、本明細書で考慮されるポリヌクレオチド構築物によって標的される特定遺伝子の発現には直接影響を及ぼさない。そのようなアジュバントは、標的遺伝子の発現産物とは直接相互作用せず、また標的遺伝子のセンス又はアンチセンス配列に対応する配列を含まない。

20

【0011】

1つの実施形態では、組成物は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのインビオでの発現を増強するために有用である。他の実施形態では、ポリヌクレオチドはポリペプチドをコードしなくてもよいが、その代わりに、例えばアンチセンスRNA又はポリペプチドではない他の分子を含む又はコードするポリヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、組成物は、場合によりポリヌクレオチドからのタンパク質発現を指令するのに適した調節配列（例えばプロモーター）に作動可能に連結された、対象とするポリヌクレオチド、リポソーム、及び疎水性物質の連続相を含む担体を含む。本発明の組成物は、マウスモデルにおいてELISAによって測定したとき、リン酸緩衝食塩水に懸濁したプラスミドDNAと比較して、プラスミドDNAからのポリペプチド発現を高めることが明らかにされた。本発明の組成物はまた、マウスモデルにおいて免疫蛍光によって測定したとき、リン酸緩衝食塩水、不完全フロイントアジュバント（IFA）又は油を含まないリポソームに懸濁したプラスミドDNAと比較して、プラスミドDNAからのポリペプチド発現を高めることも明らかにされた。

30

【0012】

本明細書で使用される、「ポリヌクレオチド」という用語は、任意の長さ（例えば9、12、18、24、30、60、150、300、600、1500又はそれ以上のヌクレオチド）又は任意の鎖数（例えば一本鎖若しくは二本鎖）のヌクレオチドの鎖を包含する。ポリヌクレオチドは、DNA（例えばゲノムDNA若しくはcDNA）又はRNA（例えばmRNA）又はそれらの組合せであり得る。それらは、天然に生じ得るか又は合成

40

50

(例えは化学合成)であり得る。ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド鎖内に1又はそれ以上の窒素含有塩基、五炭糖類又はリン酸基の修飾を含み得ることが考慮される。そのような修飾は当分野において周知であり、例えはポリヌクレオチドの安定性を改善するためであり得る。

【0013】

本明細書で使用される、「ポリペプチド」又は「タンパク質」という用語は、長さ(例えは4、6、8、10、20、50、100、200、500又はそれ以上のアミノ酸)又は翻訳後修飾(例えはグリコシル化又はリン酸化)にかかわらず、アミノ酸の任意の鎖を意味する。2つの用語は交換可能に使用される。

【0014】

本発明の組成物は、すべての種類のポリヌクレオチドをインビボで被験者に送達するために有用である。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは被験者においてタンパク質としては発現されず、むしろ、例えはアンチセンスRNA、干渉RNA、触媒RNA又はリボザイムをコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、被験者においてインビボで発現されるポリペプチドをコードする。本発明は、何らかの特定のタイプのポリペプチドの発現に限定されない。ポリペプチドは、単なる例示的な例として、抗原、抗体若しくは抗体フラグメント、酵素、サイトカイン、治療用タンパク質、ケモカイン、調節タンパク質、構造タンパク質、キメラタンパク質、核タンパク質、転写因子、ウイルスタンパク質、TLRタンパク質、インターフェロン調節因子、血管新生抑制タンパク質若しくは血管新生タンパク質、アポトーシスタンパク質、Fc受容体、造血タンパク質、腫瘍抑制因子、サイトカイン受容体、又はケモカイン受容体であり得る。

【0015】

代表的な抗原は、限定を伴わずに、以下を含む:コレラトキソイド、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、B型肝炎表面抗原、赤血球凝集素、ノイラミニダーゼ、インフルエンザMタンパク質、PfHRP2、pLDH、アルドラーーゼ、MSP1、MSP2、AMA1、Der-p-1、Der-f-1、アジポフィリン、AFP、AIM-2、ART-4、BAGE、-フェトプロテイン、BCL-2、Bcr-Ab1、BING-4、CEA、CPSF、CT、サイクリンD1Ep-CAM、EphA2、EphA3、ELF-2、FGF-5、G250、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、HER-2、腸力ルボキシルエステラーゼ(ICE)、IL13R-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MART-1、MART-2、M-CSF、MDM-2、MMP-2、MUC-1、NY-EOS-1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、p53、PBF、PRAME、PSA、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU1、RU2AS、SART-1、SART-2、SART-3、SAGE-1、SCRN-1、SOX2、SOX10、STEAP1、サバイビング(surviving)、テロメラーゼ、TGF-RII、TRAG-3、TRP-1、TRP-2、TERT又はWT1に由来するもの;ウイルス、例えは牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、偽牛痘ウイルス、ヒトヘルペスウイルス1型、ヒトヘルペスウイルス2型、サイトメガロウイルス、ヒトアデノウイルスA~F群、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルス、パルボウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、オルトレオウイルス、ロタウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、インフルエンザウイルスC型、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、肺炎ウイルス、ヒトRSウイルス、狂犬病ウイルス、カリボルニア脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ハンタンウイルス、リンパ球脈絡膜炎ウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、フラビウイルス、デング熱ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス及び水痘ウイルスに由来するもの;細菌、例えは炭疽菌(Anthrax)、ブルセラ属菌(Brucella)、カンジダ属菌(Candida)、クラミジア肺炎病原体(Chlamydia pneumoniae)、オウム病クラミジア(Chlamydia psittaci)、コレラ菌(Cholera)、ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)、コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis)、クリプトコック

10

20

30

40

50

ス属菌 (*Cryptococcus*)、ジフテリア菌 (*Diphtheria*)、大腸菌 O 157 : H 7 菌 (*Escherichia coli* 0157:H7)、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)、毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、レジオネラ属菌 (*Legionella*)、レプトスピラ属菌 (*Leptospira*)、リステリア属菌 (*Listeria*)、髄膜炎菌 (*Meningococcus*)、肺炎マイコプラスマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、ミコバクテリウム属菌 (*Mycobacterium*)、百日咳菌 (*Pertussis*)、肺炎菌 (*Pneumonia*)、サルモネラ属菌 (*Salmonella*)、赤痢菌 (*Shigella*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 及びエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) に由来するもの；又は原生動物、例えば熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に由来するもの。  
10

#### 【0016】

RNA干渉 (RNAi) は、二本鎖RNA、例えば低分子（又は短い）干渉RNA (siRNA) 及び一本鎖細胞内RNA、例えばマイクロRNA (miRNA) によってトリガされる、配列特異的な転写後遺伝子サイレンシング機構であり、前記RNAはどちらも、siRNA又はmiRNAに相同な配列のmRNAの分解を生じさせることができる (Fire et al, 1998, *Nature*, 391:806-811; Montgomery et al, 1998, *PNAS*, 95:15502-15507; Elbashir et al, 2001, *Nature*, 411:494-498)。RNAiは、相補的配列を有する遺伝子の発現を抑制する、植物と哺乳動物に共通する保存された経路である (Hannon and Rossi, 2004, *Nature*, 431:371-378; Meister and Tuschl, 2004, *Nature*, 431, 343-349)。RNAiは、下等生物、例えば植物又は線虫において最初に認められた。これらの系では、長いdsRNAはRNAiの有効なトリガーとして働く。長いdsRNAは実際のトリガーではないが、エンドリボヌクレアーゼ、ダイサー (Dicer) によってsiRNAと呼ばれる小さなエフェクター分子に分解される。哺乳動物では、ダイサーのプロセシングは、RNA結合タンパク質、TRBPとの複合体として起こる。新生siRNAは、ダイサー、TRBP及びAgo2と結合して、遺伝子サイレンシングを媒介するRNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) を形成する (Chendrimada et al, 2005, *Nature*, 436:740-744)。ひとたびRISCが形成されると、siRNAの一方の鎖（パッセンジャー鎖）は分解されるか又は処分され、他方の鎖（ガイド鎖）は残存してサイレンシング複合体の配列特異性を指令する。RISCのAgo2成分は、ガイド鎖の指令下で標的RNAを切断するリボヌクレアーゼである。  
20

#### 【0017】

長いdsRNA（数百塩基対）は、C. エレガンス (*C. elegans*) 又はキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) においてRNAiを開始させるために一般的に使用されるが、これらの分子は自然免疫系を活性化し、高等生物におけるインターフェロン (IFN) 応答を引き起こす。RNAiは、一般にIFN応答を誘導しない短いRNAを使用して哺乳動物細胞において実施され得る。多くの研究者らは、今日、長い基質RNAのダイサープロセシングから生じる天然siRNAを模倣する、合成21量体RNA二本鎖をRNAi試薬として使用する。選択的なアプローチは、ダイサーのための基質である、長さが21量体よりも大きい合成RNA二本鎖を使用することである (Tuschl, T. 2002, *Nature Biotechnology*, 20:446)。  
30

#### 【0018】

最近開発されたダイサー基質RNA (DsirNA) は、RNA干渉において高い潜在能を有する化学合成されたRNA二本鎖である (Kim et al, 2005, *Nat Biotechnol*, 23: 222-226)。DsirNAは、ダイサーによって21量体siRNAへとプロセシングされ、切断が1つの所望生成物を生じさせるように設計される。これは、RNA二本鎖がAS鎖上に1つの2塩基3'突出部を有し、他方の末端は平滑であり、その平滑末端がDNA塩基で修飾されている、新規非対称デザインの使用を通して達成される。このデザインは、ダイサーに、切断反応を指令するのを助ける1つの好ましいPAZ結合部位を提供する。RISCへのAS鎖の負荷を促進する、機能的極性がこのプロセシング事象によって  
40

導入され、これらの試薬の高い潜在能は、ダイサーブロセシングとRISC負荷の間の連鎖に関係すると思われる (Rose et al, 2005, Nucleic Acids Res, 33:4140-4156)。ダイサー基質アプローチは、同じ部位で従来の21量体s i RNAよりも10倍高い効力を有する試薬を生じさせることができる。

#### 【0019】

1993年に初めて記述された (Lee et al, 1993, Cell 75:843-854) m i RNAは、遺伝子発現を調節する、長さ約21～23ヌクレオチドの一本鎖RNA分子である。m i RNAは、DNAから転写されるがタンパク質には翻訳されない遺伝子によってコードされる（非コードRNA）；その代わりに、それらは、プリm i RNAとして知られる一次転写産物からプレm i RNAと呼ばれる短いステムループ構造へとプロセシングされ、最終的には機能性m i RNAへとプロセシングされる。成熟m i RNA分子は、1又はそれ以上のメッセンジャーRNA(mRNA)と部分的に相補的であり、それらの主たる機能は遺伝子発現を下方調節することである。m i RNAは細胞内で生成され、高度に保存されているが、mRNA配列と完全な相補性を有することはまれである。しかし、m i RNAは、同じく Agoタンパク質を必要とする (s i RNAにおいて認められるように必ずしもAgo2ではない)、mRNAの3'UTR領域上のその不完全に適合する標的部位への結合によってタンパク質翻訳及びmRNA分解に影響を及ぼし得る。s i RNAをm i RNAと比較し、対比させると、s i RNAが3'UTR上の不完全な相補的標的にヒットした場合、s i RNAはマイクロRNAと同様に挙動し、m i RNAがmRNA上の完全に適合する標的にヒットした場合、m i RNAはs i RNAのように挙動し得ることを示す。したがって、構造的に異なるが、s i RNAとm i RNAはどちらも宿主動物の細胞において類似の生物学的機能を有し、作用機構に多少の相違があると考えられる。

#### 【0020】

したがって、RNAi分子、s i RNA及び/又はm i RNAは、内因性遺伝子発現を阻害するための強力なツールを提供し、それにより生物学的応答を有効に調節するための手段を提供し得る。RNAiが抗原提示樹状細胞(DC)において誘導され、免疫応答を分極し得ることが試験で示された。サイトカインIL-12 p35サブユニットに特異的な合成s i RNAでDCをトランスフェクトすることにより、生物活性IL-12を阻害することが可能であり、これはその後Th2の分極を導いた (Hill et al, J Immunology, 2003, 171:691)。同様に、インビボでのs i RNAによる専門的抗原提示細胞の修飾が癌ワクチンの効力を高めるために使用された (Kim et al, Cancer Research, 2005, 65:309-316)。この試験では、ヒトパピローマウイルス16型E7をコードするDNAワクチンと、鍵となるプロアポトーシスタンパク質Bac及びBaxを標的化するs i RNAの同時投与が、ワクチン接種マウスにおいてリンパ節中の抗原発現DCの寿命を延長させ、E7発現腫瘍モデルに対して強力な抗腫瘍作用を有する抗原特異的CD8+T細胞応答を増強することが示された。したがって、感染症/自己免疫疾患、癌に対する有効なワクチン接種の間及び移植の間の特定の望ましくない応答を沈黙化させるためのs i RNAの使用には有望な見通しがある。対象とする細胞の細胞内区画へのs i RNAの効率的な送達は、そのような方法の成功のために重要であり、強化された送達製剤の使用を必要とする。

#### 【0021】

s i RNAは、様々な長さの天然に生じる又は合成の二本鎖ヌクレオチド(RNA)鎖であり得る。s i RNAは、19塩基対の中央二本鎖ドメインと末端の2塩基3'突出部を有する、必ずしも限定されるわけではないが通常は、20～25ヌクレオチド長の二重鎖であり得る。s i RNAは、そのインビボでの効果を増強し、分解を防ぐためにヌクレアーゼ耐性を誘導し、安定性を高めるためにさらに化学修飾することができる。これに関して、アンチセンス鎖は遊離5'-OH又は5'-リン酸末端のいずれかを有してもよく、後者は天然のダイサーブロセシングを生じさせ、分子の活性形態を示す。s i RNAは、血清又は他のヌクレアーゼ源に暴露されたときヌクレアーゼ安定性を改善し、二重鎖の寿命を延長させるヌクレオシド間結合のホスホロチオエート又はボラノホスフェート修飾

10

20

30

40

50

を有し得る。s i R N Aは、2'位置における修飾、例えば、血清中で安定性を保持し、細胞における潜在的I F N応答の危険度を有意に低減しつつ、非修飾R N Aと比較して完全な効力を保持するための2' - O - メチルR N A残基の組込みを有し得る。s i R N Aはまた、安定性と効力を改善するために2' - フルオロ修飾を有してもよく、これは通常、ピリミジン塩基において選択的に組み込まれる。

【0022】

R N A iのメディエイターとして使用されるs i R N A及びm i R N Aは、様々な感染症、自己免疫/アレルギー疾患、心臓病、代謝異常、固形腫瘍/癌、血液疾患/癌における、しかしこれらに限定されない、標的として使用し得る。

【0023】

本発明の実施形態では、組成物中のポリヌクレオチドは、R N A iにおける使用のためのポリヌクレオチドであり得、限定を伴わずに、すべて前記で述べた、s i R N A、m i R N A、ダイサーによる切断のための長いd s R N A、又はD s i R N Aを含む。

【0024】

リポソーム/連続疎水性担体中で製剤されたときI L - 12 s i R N Aヌクレオチド配列のインビボでの注射は、P B S担体中で製剤されたI L - 12 s i R N Aよりも良好な、I L - 12 プラスミドによって誘導されるI L - 12 タンパク質発現の阻害を生じさせた。同様の結果が、I L - 12 s i R N Aの注射後に、リンパ節から単離した細胞においてオボアルブミンが誘導するI L - 12 タンパク質発現の阻害に関する実験で達成された。やはり、リポソーム/連続疎水性担体中で製剤されたI L - 12 s i R N Aは、P B S担体中で製剤されたI L - 12 s i R N Aを上回る結果をもたらした。

【0025】

被験者は、ポリヌクレオチドを送達することが望ましいかなる被験者でもよい。被験者は、好ましくは脊椎動物、例えば鳥類、魚又は哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0026】

ポリヌクレオチドは様々な形態で送達され得る。一部の実施形態では、裸のポリヌクレオチドを、線状形態又はプラスミド、例えば発現プラスミドに挿入して、使用し得る。他の実施形態では、生ベクター、例えばウイルス又は細菌ベクターを使用し得る。

【0027】

ポリヌクレオチドの性質及び意図される用途に依存して、D N AのR N Aへの転写及び/又はR N Aのポリペプチドへの翻訳を助ける1又はそれ以上の調節配列が存在し得る。例えば、ポリヌクレオチドが転写若しくは翻訳されることが意図される場合又はポリヌクレオチドが転写若しくは翻訳される必要がない場合、そのような調節配列は存在しなくてよい。一部の場合、例えばメッセンジャーR N A(m R N A)分子であるポリヌクレオチドの場合、転写プロセスに関連する調節配列(例えばプロモーター)は必要とされず、タンパク質発現はプロモーターの不在下で実施され得る。当業者は、状況に応じて適切な調節配列を含めることができる。

【0028】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは発現カセット内に存在し、カセット内で、本発明の組成物が投与される被験者においてポリヌクレオチドが発現されることを可能にする調節配列に作動可能に連結されている。発現カセットの選択は、組成物が投与される被験者並びに発現されるポリペプチドに対して所望される特徴に依存する。

【0029】

典型的には、発現カセットは、被験者において機能性であり、構成的又は誘導的であり得るプロモーター；リボソーム結合部位；必要な場合は開始コドン(A T G)；対象とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；終結コドン；及び場合により3'末端領域(翻訳及び/又は転写ターミネーター)を含む。付加的な配列、例えばシグナルペプチドをコードする領域も含まれ得る。対象とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、発現カセット内のその他の調節配列のいずれかに相同又は非相同であり得る。対象ポリペプチドと共に発現されるべき配列、例えばシグナルペプチドコード領域は、典型的

10

20

30

40

50

には、発現されるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチドに隣接して位置し、適切なリーディングフレーム内に置かれる。発現されるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチドだけで又は発現されるべき何らかの他の配列（例えばシグナルペプチド）と共に構成されるオープンリーディングフレームは、組成物が投与される被験者において転写及び翻訳が起こるようプロモーターの制御下に置かれる。

【0030】

広範囲の宿主系におけるポリヌクレオチドの発現に適したプロモーターは、当分野で周知である。哺乳動物におけるポリヌクレオチドの発現に適したプロモーターは、構成的に、普遍的に又は組織特異的に機能するものを含む。非組織特異的プロモーターの例としては、ウイルス起源のプロモーターが挙げられる。ウイルスプロモーターの例としては、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルスロングターミナルリピート（HTLV-LTR）プロモーター、モロニーウイルス、トリ白血病ウイルス（ALV）、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター／エンハンサー、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、アデノ関連ウイルス（AAV）プロモーター、アデノウイルスプロモーター、及びエプスタイン-バーウイルス（EBV）プロモーターが挙げられる。特定ポリペプチドとウイルスプロモーターの適合性は、それらの組合せが発現レベルに影響を及ぼし得るので、考慮すべき事項である。発現を最適化するために合成プロモーター／エンハンサーを使用することが可能である（例えば米国特許公報第2004/0171573号参照）。

【0031】

組織特異的プロモーターの一例は、筋細胞における発現を駆動するデスミンプロモーターである（Li et al. 1989, Gene 78:243; Li & Paulin 1991, J. Biol. Chem. 266:6562 and Li & Paulin 1993, J. Biol. Chem. 268:10403）。他の例としては、人工プロモーター、例えば合成筋特異的プロモーター及びキメラ筋特異的／CMVプロモーター（Li et al. 1999, Nat. Biotechnol. 17:241-245; Hagstrom et al. 2000, Blood 95:2536-2542）が挙げられる。

【0032】

有用なベクターは、数多くの刊行物において、特に国際公開第94/21797号及びHartikka et al. 1996, Human Gene Therapy 7:1205において記載されている。

【0033】

前記のように、対象とするポリヌクレオチドを、何らかの必要な調節配列と共に、単独で若しくはプラスミドの一部として裸で送達し得るか、又はウイルス又は細菌ベクター中で送達し得る。

【0034】

プラスミド型ベクター、又は細菌若しくはウイルスベクターのいずれを使用するかにかかわらず、ベクターは被験者において実質的に複製できない又は被験者に組み込まれることができないことが望ましいと考えられる。そのようなベクターは、宿主-ベクターの組換えのリスクを最小限に抑えるために、その配列が被験者のゲノムに実質的に同一である領域を含まないベクターを包含する。これを行うための1つの方法は、対象ポリペプチドの発現を駆動するために受容者のゲノムに由来しないプロモーターを使用することである。例えば、受容者が哺乳動物である場合、プロモーターは、哺乳動物細胞において機能することができなければならないが、好ましくは非哺乳動物由来であり、例えばウイルスプロモーターである。

【0035】

ポリヌクレオチドを送達するために使用し得るウイルスベクターは、例えばアデノウイルス及びポックスウイルスを含む。有用な細菌ベクターは、例えば赤痢菌、サルモネラ属菌、コレラ菌（Vibrio cholerae）、乳酸杆菌（Lactobacillus）、カルメット-ゲラン杆菌（Bacille bilie de Calmette-Guerin）（BCG）、及び連鎖球菌（Streptococcus）を含む。

【0036】

10

20

30

40

50

アデノウイルスベクターの一例、並びにポリヌクレオチドを発現することができるアデノウイルスベクターを構築するための方法は、米国特許第4,920,209号に記載されている。ポックスウイルスベクターは、それぞれ米国特許第4,722,848号及び米国特許第5,364,773号に記載されている、ワクシニアウイルス及びカナリア痘ウイルスベクターを含む。また、ワクチンウイルスベクターの説明については、例えばTaglia et al. 1992, *Virology* 188:217及びカナリア痘ウイルスベクターの参考文献としてはTaylor et al. 1995, *Vaccine* 13:539も参照のこと。対象ポリヌクレオチドを発現することができるポックスウイルスベクターは、ポリヌクレオチドが哺乳動物細胞における発現のために適切な条件下でウイルスゲノムに挿入されるように、Kieny et al. 1984, *Nature* 312:163に記載されている相同的組換えによって入手し得る。

10

#### 【0037】

細菌ベクターに関して、宿主において外来性ポリヌクレオチドを発現するためには有用な毒素非産生コレラ菌突然変異株が公知である。Mekalanos et al. 1983, *Nature* 306:551及び米国特許第4,882,278号は、機能性コレラ毒素が産生されないように2つのc t x A対立遺伝子の各々のコード配列の実質的な量が欠失された菌株について述べている。国際公開第92/11354号は、i r g A遺伝子座が突然変異によって不活性化された菌株について記述する；この突然変異を1つの菌株内でc t x A突然変異と組み合わせることができる。国際公開第94/01533号は、機能性c t x A及びa t t R S 1

D N A配列を欠く欠失突然変異体について記述する。これらの突然変異株は、国際公開第94/19482号に記載されているように、異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。

20

#### 【0038】

異種タンパク質の組換え発現のために遺伝子操作された弱毒化ネズミチフス菌株(*Salmonella typhimurium*)が、Nakayama et al. 1988, *Bio/Technology* 6:693及び国際公開第92/11361号に記載されている。

#### 【0039】

被験者において異種タンパク質を発現するためのベクターとして使用し得る他の細菌株は、フレクスナー赤痢菌(*Shigella flexneri*)についてはHigh et al. 1992, *EMBO* 11:1991 and Sizemore et al. 1995, *Science* 270:299に、ストレプトコッカス・ゴルドニ(*Streptococcus gordonii*)についてはMedaglini et al. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:6868に、そしてカルメット-ゲラン杆菌についてはFlynn 1994, *Cell. Mol. Biol.* 40 (suppl. 1):31、国際公開第88/06626号、同第90/00594号、同第91/13157号、同第92/01796号及び同第92/21376号に記載されている。

30

#### 【0040】

細菌ベクターにおいて、対象とするポリヌクレオチドは、細菌ゲノムに挿入され得るか又はプラスミドの一部として遊離状態で保持され得る。

#### 【0041】

##### リポソーム

リポソームは、捕捉された水体積(aqueous volume)を含む完全に閉じた脂質二重層膜である。リポソームは、単層小胞(単一の二重層膜を有する)又は多重膜二重層によって特徴づけられる多重層小胞であり得、各々の二重層は、水層によって次の層から分離されてもよく、又は分離されなくてもよい。リポソームの一般的な考察は、Gregoriadis G. *Immuno. Today*, 11:89-97, 1990; and Frezard, F., *Braz. J. Med. Bio. Res.*, 32:181-189, 1999に見出される。本明細書及び特許請求の範囲において使用される、「リポソーム」という用語は、限定を伴わずに、当分野で「ニオソーム」、「トランスフェロソーム」及び「ビロソーム」として記述されるものを含む、前述したようなすべての小胞構造を包含することが意図されている。

40

#### 【0042】

古細菌脂質から作製されるリポソームを含む、任意のリポソームを本発明において使用

50

し得る。少なくとも4個の炭素、典型的には約4～28個の炭素長を含む少なくとも1つの脂肪酸鎖を有する任意の両親媒性脂質を使用し得る。脂肪酸鎖は、任意の数の飽和及び/又は不飽和結合を含み得る。考慮される両親媒性脂質は、リン脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、セレブロシド、ガングリオシドであり得る。特に有用なリポソームは、リポソーム製剤においてリン脂質及び非エステル化コレステロールを使用する。コレステロールはリポソームを安定化するために使用され、リポソームを安定化する任意の他の化合物をコレステロールの代わりに使用してもよい。リポソームを安定化する他の化合物は当業者に公知である。例えば、飽和リン脂質は、高い安定性を指示するより高い転移温度を有するリポソームを生成する。

## 【0043】

10

リポソームの調製において好ましく使用されるリン脂質は、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリン及びホスホイノシトールからなる群より選択される少なくとも1つのヘッド基を有するものである。約94～100%がホスファチジルコリンである脂質を含むリポソームがより好ましい。そのような脂質は、レシチンPhospholipon(登録商標)90G(Phospholipid GmbH, Germany)又はレシチンS100(Lipoid GmbH, Germany)として市販されている。他の好ましいリン脂質は、陽イオン性脂質、例えば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)及び1-[2-(オレオイルオキシ)エチル]-2-オレイル-3-(2-ヒドロキシエチル)イミダゾリニウムクロリド(DOTIM)を含む。

20

## 【0044】

リポソーム製剤において非エステル化コレステロールも同時に使用するとき、コレステロールは通常、リン脂質の量の約10%に等しい量で使用される。リポソームを安定化するためにコレステロール以外の化合物を使用する場合、当業者は、組成物中で必要とされる量を容易に決定することができる。

## 【0045】

30

リポソーム組成物は、例えば、天然脂質、合成脂質、スフィンゴ脂質、エーテル脂質、ステロール、カルジオリピン、陽イオン性脂質、並びにポリエチレングリコール及び他のポリマーで修飾された脂質を使用することによって入手し得る。合成脂質は、以下の脂肪酸成分：ラウロイル、ミリストイル、パルミトイyl、ステアロイル、アラキドイル、オレオイル、リノレオイル、エルコイル、又はこれらの脂肪酸の組合せを含み得る。

## 【0046】

## 担体

組成物の担体は、疎水性物質、好ましくは液体疎水性物質の連続相を含む。連続相は、実質的に純粹な疎水性物質又は疎水性物質の混合物であり得る。加えて、担体は、疎水性物質が連続相を構成することを条件として、疎水性物質中の水のエマルション又は疎水性物質の混合物中の水のエマルションであり得る。さらに、もう1つの実施形態では、担体はアジュバントとして機能し得る。

## 【0047】

40

本明細書で述べる組成物において有用な疎水性物質は、医薬的及び/又は免疫学的に許容されるものである。担体は、好ましくは液体であるが、大気温度で液体ではないある種の疎水性物質は、例えば加温することによって液化され得、同じく本発明において有用である。1つの実施形態では、疎水性担体はPBS/FIAエマルションであり得る。

## 【0048】

油性又は油中水型エマルションは、本発明における使用のために特に適切な担体である。油は医薬的及び/又は免疫学的に許容されるべきである。油の好ましい例は、鉛油(特に軽鉛油又は低粘度鉛油)、植物油(例えばダイズ油)、堅果油(例えば落花生油)である。低粘度鉛油、例えばDrakeol(登録商標)6VRは、一部の実施形態において好ましい。さらなる実施形態では、油は、Montanide(登録商標)ISA 51として市販されている、鉛油溶液中のオレイン酸マンニドである。動物性油及び人工疎水

50

性ポリマー材料、特に大気温度で液体であるか又は比較的容易に液化され得るものも使用し得る。種々の疎水性物質の混合物、例えば1又はそれ以上の異なる油、動物性油又は人工疎水性ポリマー材料を含む混合物も使用し得る。

#### 【0049】

##### 付加的な成分

組成物は、被験者において発現されるべきポリペプチドの機能を補完又は増強し得る1又はそれ以上の付加的な成分をさらに含み得る。例えば、コードされるポリペプチドがワクチン抗原である場合、付加的な成分、例えばアジュバントが存在し得る。「アジュバント」という用語は、抗原に対する免疫応答を増強する化合物又は混合物を指す。アジュバントは、抗原を緩やかに放出する組織デポー剤として、また免疫応答を非特異的に増強するリンパ系活性化剤としても働くことができる (Hood et al, Immunology, 2d ed., Benjamin/Cummings : Menlo Park, C.A., 1984; Wood and Williams, In: Nicholson, Webster and May(eds.), Textbook of Influenza, Chapter 23, pp. 317-323参照)。しばしば、抗原単独による一次抗原投与は、アジュバントが存在しない場合、体液性免疫応答を惹起することができない。被験者に送達されるべき対象ポリヌクレオチドは、それ自体アジュバントとして機能し得るか又はアジュバントを構成するポリペプチド(例えばIL-12、IFN-、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)をコードし得ることに留意すべきである。

#### 【0050】

一部の実施形態では、適切なアジュバントは、ミョウバン、他のアルミニウム化合物、カルメット-ゲラン杆菌 (BCG)、TitterMax (登録商標)、Ribi (登録商標)、不完全フロイントアジュバント (IFN)、サポニン、界面活性物質、例えばリゾレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、コリネバクテリウム・パルバム (*Corynebacterium parvum*)、QS-21、及びフロイント完全アジュバント (FCA)、TLRアゴニストファミリーのアジュバント、例えばCpG、ポリIC、フランジエリン、リポペプチド類、ペプチドグリカン類、イミダゾキノリン類、一本鎖RNA、リポ多糖類 (LPS)、熱ショックタンパク質 (HSP)、並びにセラミド類及び誘導体、例えばGal-cerを含むが、これらに限定されない。適切なアジュバントはまた、ポリペプチド又はDNAコード形態のサイトカイン又はケモカイン、例えば、限定されることなく、GM-CSF、TNF-、IFN-、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21を含む。

#### 【0051】

使用されるアジュバントの量は、抗原の量及びアジュバントのタイプに依存する。当業者は、特定適用において必要とされるアジュバントの量を容易に決定することができる。

#### 【0052】

広範囲の医薬的に許容されるアジュバント、賦形剤等が当分野で公知であり、本発明の組成物において使用され得る: 例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985)及び1999年に公表された米国薬局方: 国民医薬品集 (The United States Pharmacopoeia: The National Formulary) (USP 24 NF 19) 参照。

#### 【0053】

組成物中の付加的な成分がポリペプチドである場合、主要対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの場合と同じように、付加的なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが代わりに提供され得る。そのようなポリペプチドは、同じか若しくは別の発現ベクターから発現され得るか、又は融合タンパク質の形態で発現され得る。

#### 【0054】

##### 組成物の製剤

リポソームを作製するための方法は当分野において公知である: 例えば、どちらも先に引用した、Gregoriadis (1990)及びFrezard (1999) 参照。リポソームを作製するための任意の適切な方法を本発明の実施において使用し得る。リポソームは、典型的には、脂質二

10

20

30

40

50

重層を形成するリポソーム成分（例えばリン脂質及びコレステロール）を水溶液で水和することによって調製され、水溶液は、純水又は任意の他の生理的に適合性の溶液、例えば食塩水、例えばリン酸緩衝食塩水（P B S）であり得る。

【0055】

1つの実施形態では、リポソーム成分又はリポソーム成分の混合物、例えばリン脂質（例えばPhospholipon（登録商標）90G）とコレステロールを有機溶媒、例えばクロロホルムとメタノールの混合物に可溶化し、続いてろ過して（例えばPTFE 0.2 μm フィルター）、例えば回転蒸発器により、乾燥して、溶媒を除去し得る。

【0056】

生じた脂質混合物の水和は、例えば、脂質混合物を水溶液に注入する又は脂質混合物と水溶液を超音波処理することによって実施し得る。リポソームの形成の間に、リポソーム成分は、リポソーム成分が水和される水溶液の体積を取り囲む単一の二重層（単層）又は多数の二重層（多重層）を形成する。

【0057】

一部の実施形態では、リポソームを、次に、例えば凍結乾燥によって脱水し、その後水溶液で再溶解する。

【0058】

リポソームを、連続疎水相を含む担体と組み合わせる。これは様々な方法で実施することができる。

【0059】

担体が基本的に無水であり、疎水性物質又は疎水性物質の混合物のみからなる場合（例えば100%鉛油担体の使用）、リポソームは単に疎水性物質と混合し得るか、又は複数の疎水性物質が存在する場合は、それらのいずれか1つ又はそれらの組合せと混合し得る。

【0060】

そうではなく疎水性物質の連続相を含む担体が不連続水相を含有する場合、担体は、典型的には疎水相中の水相のエマルション、例えば油中水型エマルションの形態をとる。そのような組成物は、エマルションを安定化し、リポソームの均一な分布を促進するための乳化剤を含み得る。これに関して、乳化剤は、無水担体を使用する場合でも、担体中のリポソームの均一な分布を促進するために有用であり得る。典型的な乳化剤は、オレイン酸マンニド（Arlace1（商標）A）、レシチン、Tween（商標）80、並びにSpan（商標）20、80、83及び85を含む。典型的には、疎水性物質対乳化剤の重量対体積比（w/v）は、約5:1～約15:1の範囲内であり、約10:1の比率が好みしい。

【0061】

リポソームは、完成したエマルションに添加し得るか、又は乳化の前に水相若しくは疎水相のいずれかに存在し得る。

【0062】

発現されるべきポリヌクレオチドは、製剤工程の様々な異なる段階で導入し得る。この項において、「ポリヌクレオチド」という用語は、プラスミド中、例えば発現プラスミド中を含む裸の形態のポリヌクレオチド、又は生ベクター中、例えば細菌若しくはウイルス中のポリヌクレオチドを包含する。

【0063】

2以上のポリヌクレオチドを組成物に組み込んでもよい。例えば、異なるタンパク質をコードする2又はそれ以上のポリヌクレオチドを組成物に組み込み得るか、又はタンパク質をコードするポリヌクレオチド並びにアンチセンスRNA若しくは干渉RNAをコードするポリヌクレオチドが存在し得る。タンパク質は、2つの異なるポリヌクレオチドの融合産物として発現され得る。2以上のポリヌクレオチドが同じ調節エレメントの制御下にあってもよく、例えば2又はそれ以上のポリヌクレオチドが单一プロモーターの転写制御下に存在し得る。

10

20

30

40

50

## 【0064】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、リポソームの脂質二重層を形成するために使用される成分（例えばリン脂質及びコレステロール）を水和するために使用される水溶液中に存在する。この場合、ポリヌクレオチドはリポソームに封入され、その水性内部に存在する。生じたリポソームが洗浄又は乾燥されず、最終的に疎水性物質の連続相を含む担体と混合される残留水溶液が存在する場合、付加的なポリヌクレオチドが最終生成物中のリポソームの外部に存在し得る可能性がある。関連する手法では、ポリヌクレオチドを、水溶液で水和する前に、リポソームの脂質二重層を形成するために使用される成分と混合し得る。

## 【0065】

選択的アプローチでは、ポリヌクレオチドを、その代わりに、担体をリポソームと組み合わせる前、組み合わせる間又は組み合わせた後に、疎水性物質の連続相を含む担体と混合してもよい。担体がエマルションである場合、ポリヌクレオチドを乳化の前に水相又は疎水相のいずれか又は両方と混合し得る。あるいは、乳化後にポリヌクレオチドを担体と混合してもよい。

## 【0066】

ポリヌクレオチドを担体と組み合わせる手法は、ポリヌクレオチドがリポソーム内と疎水性物質の連続相を含む担体中の両方に存在するように、前述したリポソーム内へのポリヌクレオチドの封入と共に使用し得る。

## 【0067】

一般に、組成物は、組成物 1 m l につきポリヌクレオチド約 0 . 1 m g ~ 5 m g 及び組成物 1 m l につきリポソーム約 1 m g ~ 3 0 0 m g を含有し得る。

## 【0068】

組成物が 1 又はそれ以上の付加的な成分（例えばアジュvant）を含有する場合、付加的な成分は、同じ加工段階でポリヌクレオチドと共に又は異なる加工段階で別々に組成物に組み込むことができる。例えば、ポリヌクレオチドと付加的な成分は、ポリヌクレオチドと付加的な成分の両方がリポソーム内に封入されるように、脂質二重層を形成するリポソーム成分を水和するために使用される水溶液中に両方が存在し得る。あるいは、ポリヌクレオチドはリポソーム内に封入され、付加的な成分は疎水性物質の連続相を含む担体と混合されてもよい。多くのそのような組合せが可能であることは認識される。

## 【0069】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドと付加的な成分は、少なくとも組成物に組み込まれる前にはそれらが密接に接触している複合体の形態であり得る。複合体化は、化学結合、例えば共有結合を含み得るが、必ずしも必要ではない。

## 【0070】

本明細書で述べる組成物は、経口、経鼻、直腸又は非経口投与に適した形態に製剤され得る。非経口投与は、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、経上皮、肺内、髄腔内、及び局所投与方法を含む。好みの経路は、デポー効果を達成するために筋肉内、皮下及び皮内である。実際には、治療薬が約 1 時間を超えて注射部位にとどまる場合にデポー効果が達成される。

## 【0071】

注射部位は、例えば、リンパ節に近接する任意の部位又はリンパ節内に直接であり得る。あるいは、注射部位は、脾臓、腫瘍又は他の疾患組織内に直接であり得る。注射し得る容量は、臨床医の専門的判断の範囲内である。容量は、使用される注射装置及び注射の部位に依存する。注射が筋肉内又は皮下である場合、注射容量は約 2 m L であり得る。無針注射を使用する場合は、容量は 0 . 0 5 m L ほどの低い容量でよい。複数の部位に注射することによって容量を増加させ得る。

## 【0072】

## キット及び試薬

本発明は、場合によりキットとして使用者に提供される。例えば、本発明のキットは、

10

20

30

40

50

本発明の組成物の 1 又はそれ以上を含む。キットは、1 又はそれ以上の付加的な試薬、包装材料、キットの成分を保持するための容器、及び所望目的のためにキットの成分を使用する好ましい方法を詳述する取扱説明書のセット又は使用者マニュアルをさらに含み得る。

#### 【 0 0 7 3 】

##### 用途

本発明は、被験者にポリヌクレオチドを送達することが望ましい任意の場合に適用される。多くのそのような適用は、疾患の治療又は予防においてである。本発明の代表的な適用は、癌の治療及び予防、遺伝子治療、アジュバント療法、感染症の治療及び予防、アレルギーの治療及び予防、自己免疫疾患の治療及び予防、神経変性疾患治療、及び動脈硬化症治療を含む。

10

#### 【 0 0 7 4 】

疾患の予防又は治療は、臨床結果を含む、有益な又は望ましい結果を得ることを包含する。有益な又は望ましい臨床結果は、1 又はそれ以上の症状又は状態の緩和又は改善、疾患の程度の軽減、疾患の状態の安定化、疾患の発現の防止、疾患の拡大の防止、疾患の進行の遅延又は緩徐化、疾患の発症の遅延又は緩徐化、病原物質に対する防御免疫の付与、及び疾患状態の改善又は緩和を含み得るが、これらに限定されない。予防又は治療はまた、治療しない場合に予想される期間を越えた患者の生存期間の延長を意味することもあり、また疾患の進行を一時的に阻止することも意味し得るが、より好ましくは、例えば被験者において感染を予防することにより、疾患の発生を防止することを含む。

20

#### 【 0 0 7 5 】

当業者は、所望結果を達成するために任意の特定適用について適切な治療レジメン、投与経路、用量等を決定することができる。考慮し得る因子は、例えば、発現されるべきポリペプチドの性質；予防又は治療されるべき疾患状態；被験者の年齢、身体状態、体重、性別及び食事；並びに他の臨床的因子を含む。

#### 【 0 0 7 6 】

本発明を以下の非限定的な実施例によってさらに説明する。

##### 実施例

#### 【実施例 1】

#### 【 0 0 7 7 】

30

リポソーム及び連続疎水性担体を含む製剤を使用してタンパク質をコードするヌクレオチド配列のインビボでの発現を増強する能力を明らかにするため、IL-12 完全コード配列を用いて作製したモデル発現プラスミドを選択した。IL-12 プラスミドを最初にリポソーム中で作製し、生じた IL-12 プラスミド / リポソーム製剤を、鉛油からなる連続疎水性担体でモデル油中水型エマルションに乳化した。インビボでの発現を、注射部位の付近のリンパ節から単離した細胞において IL-12 発現能を検査することによって測定した。

#### 【 0 0 7 8 】

6 ~ 8 週齢の無菌雌性 C57BL / 6 マウスを Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canada) より入手し、施設のガイドラインに従って収容して、水と食餌は自由に摂取させ、フィルター制御空気循環下に置いた。

40

#### 【 0 0 7 9 】

マウス IL-12 プラスミド、pORF-mIL-12 を Invivogen, San Diego, California, USA より購入した。pORF-mIL-12 によって形質転換された GT100 大腸菌中で凍結乾燥して供給されたプラスミドを LB 培地において再構成し、アンピシリン - LB 寒天プレートに画線接種して、37 °C で一晩インキュベートした。アンピシリンを添加した TB 培地中で細菌を單一コロニーから増殖させた。LPS の完全な除去を確実にするためエンドフリー・マキシ又はメガプレップキット (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) を使用して

50

大規模細菌培養物からプラスミドDNAを精製した。

【0080】

IL-12プラスミドを1mg/mlの最終濃度で含むリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用してジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)とコレステロールの10:1(W/W)混合物を水和することにより、多重層リポソームを調製した。次に、手動押出機(Avanti lipids, Alabaster, AL, USA)を用いて200nmポリカーボネート膜を通してリポソームを押出した。最終リポソーム製剤を、その後、鉱油ベースの油性担体である不完全フロイントアジュvant( Sigma, Oakville, Ontario, Canada)中に、等しい容量のIL-12プラスミド含有リポソームと不完全フロイントアジュvantを混合することによって乳化した。

10

【0081】

各々3匹のマウスを含む(n=3)3つの群のマウスに対し、尾の基部の上方の右側腹部に以下のように皮下注射した: 第1群にはリン酸緩衝食塩水、第2群にはPBS中のIL-12プラスミド50μg、及び第3群にはリポソーム/連続疎水性担体中で前述したように製剤したIL-12プラスミド50μg。注射はすべて100μlの容量であった。すべてのマウスからの流入領域リンパ節を、注射後8日目に収集した。リンパ節を解剖し、単細胞懸濁液を、6ウェルプレート中の10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、2--メルカプトエタノール及びL-グルタミンを添加したRPMI培地において $2 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度でインビトロにて48時間培養した。細胞培養上清を収集し、IL-12タンパク質定量のために使用するまでアリコートに分けて凍結保存した。

20

【0082】

リンパ節におけるIL-12遺伝子発現の効果を、細胞培養上清中に分泌されたIL-12タンパク質のレベルを定量することによって測定した。IL-12タンパク質の定量は、市販のIL-12特異的ELISAキット(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)を使用して、固相酵素免疫検定法(ELISA)によって実施した。簡単に述べると、抗IL-12捕捉抗体をELISAプレート上に一晩被覆し、試料と標準IL-12を添加した。十分に洗浄した後、ビオチニル化抗IL-12検出抗体を添加し、室温で2時間インキュベートして、洗浄した。アビジン-HRPコンジュゲートと共にインキュベートし、洗浄した後、発色のためにABTS液体基質(Sigma, St Louis, MO)を使用した。マイクロタイターブレートリーダーを使用して405nmで吸光度を読み取り、キット中で供給されるIL-12標準品を用いて作成した標準曲線を使用してIL-12濃度を外挿した。

30

【0083】

第1群~第3群から単離したリンパ節細胞によって分泌されたIL-12レベルを図1に示す。PBSを注射したマウス(第1群)から単離したリンパ節細胞は、培養上清中に検出可能なIL-12タンパク質を分泌しなかった。PBS中のIL-12プラスミドを注射したマウスから単離したリンパ節細胞により、低レベルのIL-12タンパク質が分泌された。しかし、連続疎水性担体中にリポソームを含む製剤中でIL-12プラスミドを注射したマウスから単離したリンパ節細胞は、有意により高いレベルのIL-12を分泌し、タンパク質をコードするヌクレオチド配列のインビオでの改善された送達を示唆し、高いタンパク質発現を生じさせた。

40

【実施例2】

【0084】

6~8週齢の無菌雌性C57BL/6マウスをCharles River Laboratories(St Constant, Quebec, Canada)より入手し、施設のガイドラインに従って収容して、水と食餌は自由に摂取させ、フィルター制御空気循環下に置いた。

【0085】

マウスIL-12プラスミド、pORF-mIL-12をInvivogen, San Diego, California, USAより購入した。pORF-mIL-12に

50

よって形質転換されたG T 1 0 0 大腸菌中で凍結乾燥して供給されたプラスミドをL B 培地において再構成し、アンピシリン - L B 寒天プレートに画線接種して、37℃で一晩インキュベートした。アンピシリンを添加したT B 培地中で細菌を單一コロニーから増殖させた。L P S の完全な除去を確実にするためエンドフリーマキシ又はメガプレップキット (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) を使用して大規模細菌培養物からプラスミドDNAを精製した。

#### 【0086】

IL-12プラスミドを0.8mg/mlの最終濃度で含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) を使用して、リン脂質の精製ダイズ由来混合物 (Lipoid GmbHより提供されたリン脂質S100) とコレステロールの10:1 (W/W) 混合物を水和することにより、多重層リポソームを調製した。次に、手動押出機 (Avanti lipids, Alabaster, AL, USA) を用いて200nmポリカーボネート膜を通してリポソームを押出した。最終リポソーム製剤を、その後、鉛油ベースの油性担体である不完全フロイントアジュvant (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) 中に、等しい容量のIL-12プラスミド含有リポソームと不完全フロイントアジュvantを混合することによって乳化した。各々のマウスについての最終注射容量は100μlであった。

#### 【0087】

各々5匹のマウスを含む (n = 5) 6つの群のマウスに対し、尾の基部の上方の右側腹部に以下のように皮下注射した：第1群のマウスにはPBS中のIL-12プラスミド40μgを注射し、第2群のマウスにはリポソーム / 連続疎水性担体中で前述したように製剤したIL-12プラスミド40μg、第3群のマウスには、リポソームを含まない連続疎水性担体 (不完全フロイントアジュvant油中水型エマルション) 中で製剤したIL-12プラスミド40μg、第4群のマウスには、前述したように、但し連続疎水性担体を含まずにリポソーム中で製剤したIL-12プラスミド40μg、第5群のマウスには、IL-12プラスミドを含まないリポソーム / 連続疎水性担体からなる対照製剤を注射し、そして第6群のマウスは未処置のままとした。注射はすべて100μlの容量であった。すべてのマウスからの流入領域リンパ節を、注射後8日目に収集した。リンパ節を解剖し、単細胞懸濁液を、6ウェルプレート中の10%FBS、ペニシリン / ストレプトマイシン、2% - メルカプトエタノール及びL-グルタミンを添加した RPMI 培地において $2 \times 10^6$ 細胞 / mlの濃度でインピトロにて48時間培養した。細胞培養上清を収集し、IL-12タンパク質定量のために使用するまでアリコートに分けて凍結保存した。

#### 【0088】

リンパ節におけるIL-12遺伝子発現の効果を、細胞培養上清中に分泌されたIL-12タンパク質のレベルを定量することによって測定した。IL-12タンパク質の定量は、市販のIL-12特異的ELISAキット (Peptrotech, Rocky Hill, NJ, USA) を使用して、固相酵素免疫検定法 (ELISA) によって実施した。簡単に述べると、抗IL-12捕捉抗体をELISAプレート上に一晩被覆し、試料と標準IL-12を添加した。十分に洗浄した後、ビオチニル化抗IL-12検出抗体を添加し、室温で2時間インキュベートして、洗浄した。アビジン - HRPコンジュゲートと共にインキュベートし、洗浄した後、発色のためにABTS液体基質 (Sigma, St Louis, MO) を使用した。マイクロタイターブレートリーダーを使用して405nmで吸光度を読み取り、キット中で供給されるIL-12標準品を用いて作成した標準曲線を使用してIL-12濃度を外挿した。

#### 【0089】

第1群～第6群から単離したリンパ節細胞によって分泌されたIL-12レベルを図2に示す。PBS中のIL-12プラスミドを注射したマウス (第1群) から単離したリンパ節細胞は、培養上清中に検出可能なIL-12タンパク質を分泌しなかった。しかし、連続疎水性担体中にリポソームを含む製剤中でIL-12プラスミドを注射したマウス (第2群) から単離したリンパ節細胞は、かなり高いレベルのIL-12を分泌した。第3

10

20

30

40

50

群、第5群及び第6群からのマウスから単離したリンパ節細胞は、有意により低いレベルのIL-12タンパク質を分泌し、第4群からのマウスから単離したリンパ節細胞は、培養上清中に検出可能なIL-12タンパク質を分泌しなかった。この実験において、リポソームと連続疎水性担体のいずれか又は両方を欠く製剤と比較して、リポソーム/疎水性担体製剤を使用して卓越したIL-12タンパク質発現が達成された。

【実施例3】

【0090】

リポソーム及び連続疎水性担体を含む製剤を使用してタンパク質をコードするヌクレオチド配列のインビボでの発現を増強する能力を明らかにするため、緑色蛍光タンパク質(GFP)完全コード配列を用いて作製したモデル発現プラスミドを選択した。GFPプラスミドを最初にリポソーム中で作製し、生じたGFPプラスミド/リポソーム製剤を、鉛油からなる連続疎水性担体でモデル油中水型エマルションに乳化した。インビボでの取込みと発現を、注射部位の付近のリンパ節から単離した細胞においてGFP発現能を検査することによって測定した。

【0091】

6~8週齢の無菌雌性C57BL/6マウスをCharles River Laboratories(St Constant, Quebec, Canada)より入手し、施設のガイドラインに従って収容して、水と食餌は自由に摂取させ、フィルター制御空気循環下に置いた。

【0092】

合成GFPプラスミド、pMOD-GFPSh(カタログ名、pmod-zgfps)をInvivoGen, San Diego, California, USAより購入した。プラスミドを大腸菌のXL1株に形質転換し、LB培地で増殖させて、アンピシリン-LB寒天プレートに画線接種し、37℃で一晩インキュベートした。アンピシリンを添加したTB培地の中で細菌を單一コロニーから増殖させた。LPSの完全な除去を確実にするためエンドフリーマキシ又はメガプレップキット(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)を使用して大規模細菌培養物からプラスミドDNAを精製した。

【0093】

GFPプラスミドを0.8mg/mlの最終濃度で含むリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用して、リン脂質の精製ダイズ由来混合物(Lipoid GmbHより提供されたリン脂質S100)とコレステロールの10:1(W/W)混合物を水和することにより、多重層リポソームを調製した。次に、手動押出機(Avantilipids, Alabaster, AL, USA)を用いて200nmポリカーボネート膜を通してリポソームを押出した。最終リポソーム製剤を、その後、鉛油ベースの油性担体である不完全フロイントアジュバント(Sigma, Oakville, Ontario, Canada)中に、等しい容量のGFPプラスミド含有リポソームと不完全フロイントアジュバントを混合することによって乳化した。各々のマウスについての最終注射容量は100μlであり、この容量は、マウス1匹につき各投与当たりプラスミド40μgを送達した。

【0094】

各々4匹のマウスを含む(n=4)6つの群のマウスに対し、尾の基部の上方の右側腹部に以下のように皮下注射した:第1群のマウスにはPBS中のGFPプラスミド40μgを注射し、第2群のマウスにはリポソーム/連続疎水性担体中で前述したように製剤したGFPプラスミド40μg、第3群のマウスには、リポソームを含まない連続疎水性担体(不完全フロイントアジュバント油中水型エマルション)中で製剤したGFPプラスミド40μg、第4群のマウスには、前述したように、但し連続疎水性担体を含まずにリポソーム中で製剤したGFPプラスミド40μg、第5群のマウスには、GFPプラスミドを含まないリポソーム/連続疎水性担体からなる対照製剤を注射し、そして第6群のマウスは未処置のままとした。注射はすべて100μlの容量であった。すべてのマウスからの流入領域リンパ節を、注射後8日目に収集した。リンパ節を解剖し、単細胞懸濁液を調

10

20

30

40

50

製した。リンパ節におけるGFP遺伝子発現の効果を、GFP陽性細胞を検出するための2色免疫蛍光染色によって測定した。チャネルFL1におけるGFP検出と共にチャネルFL2において抗原提示細胞を同定するため、細胞をフィコエリトリン結合CD11b及びCD11c抗体で染色した。試料をフローサイトメーター(FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA)にかけた。GFP陽性細胞の検出精度を高めるため、各々の試料について少なくとも $3 \times 10^5$ 事象を収集した。

#### 【0095】

GFPを発現する(したがってフローサイトメトリー分析において陽性と同定された)、第1群～第6群から単離したリンパ節細胞の数を図3に示す。PBS中のGFPプラスミドを注射したマウス(第1群)から単離したリンパ節細胞は、低レベルのGFPタンパク質発現細胞を示した(<10)。しかし、連続疎水性担体中にリポソームを含む製剤中でGFPプラスミドを注射したマウス(第2群)から単離したリンパ節細胞は、GFP陽性細胞のほぼ4倍の増加を示した。さらに、第3群及び第4群からのマウスから単離したリンパ節細胞は、第2群のマウスと比較して有意に低い数のGFPタンパク質発現細胞を示した。第5群及び第6群のマウスにおいては、最小限の蛍光が検出され、これらのマウスはGFPプラスミド注射を受けなかったので、この最小限の蛍光はバックグラウンド自己蛍光事象に帰せられた。さらに、GFP陽性細胞の大部分はCD11b/CD11c陽性リンパ節細胞の集団内で検出された。CD11b/CD11c及びGFP二重陽性である細胞を特異的に標的化するリンパ節細胞の再解析の結果は、図3に提示した所見と相関し、第2群からのCD11b/CD11c陽性細胞におけるGFP発現は少なくとも4倍高かった(図4)。この再解析はまた、対照の第5群及び第6群からのリンパ節細胞においては特異的蛍光が検出できることを確認した。この所見は、この実験におけるGFP陽性細胞検出の特異性を確認した。従って、本実験では、リポソームと連続疎水性担体のいずれか又は両方を欠く製剤と比較して、リポソーム/疎水性担体製剤を使用して卓越したGFPプラスミドの取込み及びタンパク質発現が達成された。

#### 【実施例4】

#### 【0096】

リポソーム及び連続疎水性担体を含む製剤を使用して、所与のタンパク質をコードするヌクレオチド配列に対してsiRNAによってインビボでタンパク質コードヌクレオチド配列の発現を阻害する能力を明らかにするため、IL-12完全コード配列及びIL-12に対するsiRNA配列を用いて作製したモデル発現プラスミドを選択した。IL-12プラスミドを最初にリポソーム中で作製し、生じたIL-12プラスミド/リポソーム製剤を、鉛油からなる連続疎水性担体でモデル油中水型エマルションに乳化した。IL-12プラスミド注射の1日前に、siRNAを、PBS中又はリポソーム/鉛油からなる連続疎水性担体を含む油中水型エマルション中で注射した。siRNAのインビボでの機能的活性を、注射部位の付近のリンパ節から単離した細胞においてIL-12発現能を検査することによって測定した。

#### 【0097】

6～8週齢の無菌雌性C57BL/6マウスをCharles River Laboratories(St Constant, Quebec, Canada)より入手し、施設のガイドラインに従って収容して、水と食餌は自由に摂取させ、フィルター制御空気循環下に置いた。

#### 【0098】

マウスIL-12プラスミド、pORF-mIL-12をInvivogen, San Diego, California, USAより購入した。pORF-mIL-12によって形質転換されたGΤ100大腸菌中で凍結乾燥して供給されたプラスミドをLB培地において再構成し、アンピシリン-LB寒天プレートに画線接種して、37℃で一晩インキュベートした。アンピシリンを添加したTB培地中で細菌を單一コロニーから増殖させた。LPSの完全な除去を確実にするためエンドフリー・マキシ又はメガプレッピット(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)を使用して

10

20

30

40

50

大規模細菌培養物からプラスミドDNAを精製した。

【0099】

マウスIL-12に対するsiRNAをAmbion Applied Biosystems, Austin, TX, USAより購入した。この凍結乾燥製品は、分析用HPLCにより純度>95%であり、LALアッセイにより10EU未満の内毒素を含んだ。siRNAを滅菌リン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解した後、注射用に製剤した。

【0100】

IL-12プラスミドを1.6mg/mlの最終濃度で含むリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用してジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)とコレステロールの10:1(W/W)混合物を水和することにより、多重層リポソームを調製した。次に、手動押出機(Avanti lipids, Alabaster, AL, USA)を用いて200nmポリカーボネット膜を通してリポソームを押出した。リポソーム/IL-12懸濁液500μlごとに、等しい容量の鉱油担体(Montanide(商標)ISA 51, Seppic, France)を添加して、エマルションの水相に含まれるリポソーム懸濁液及び連続相を形成し、疎水性担体として働く油を含有する油中水型エマルションを形成した。

【0101】

有効なレベルのIL-12発現を誘導するため、各々3匹のマウスを含む(n=3)3つの群のマウス全部に対し、リポソーム/連続疎水性担体中で前述したように製剤したIL-12プラスミド40μgを50μl容量で0日目に尾の基部の上方の右側腹部に皮下注射した。加えて、-1日目に、第1群のマウスにはビヒクリだけを注射し、第2群のマウスにはPBS中のIL-12 siRNA 40μgを注射し、第3群のマウスには、プラスミドIL-12を送達するために使用した製剤と同様に、リポソーム/連続疎水性担体中のIL-12 siRNAを40μgを与えた。すべての注射は、50μl容量で尾の基部の上方の右側腹部に皮下的に実施した。

【0102】

注射したすべてのマウスからの流入領域リンパ節及び3匹のナイーブマウス(第4群)からの対応するリンパ節を、注射後8日目に収集した。リンパ節を解剖し、単細胞懸濁液を、24ウェルプレート中の10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、2--メルカプトエタノール及びL-グルタミンを添加した RPMI 培地において  $2 \times 10^6$  細胞/mlの濃度でインピトロにて48時間培養した。細胞培養上清を収集し、IL-12タンパク質定量のために使用するまでアリコートに分けて凍結保存した。

【0103】

様々な製剤中で注射したsiRNAの効果を、リンパ節細胞によるプラスミドIL-12誘導のIL-12タンパク質発現の阻害の程度を測定することによって決定した。細胞培養上清中のIL-12タンパク質の定量は、市販のIL-12特異的ELISAキット(Protech, Rocky Hill, NJ, USA)を使用して、固相酵素免疫検定法(ELISA)によって実施した。簡単に述べると、抗IL-12捕捉抗体をELISAプレート上に一晩被覆し、試料と標準IL-12を添加した。十分に洗浄した後、ビオチニル化抗IL-12検出抗体を添加し、室温で2時間インキュベートして、洗浄した。アビジン-HRPコンジュゲートと共にインキュベートし、洗浄した後、発色のためにABTS液体基質(Sigma, St Louis, MO)を使用した。マイクロタイアプレートリーダーを使用して405nmで吸光度を読み取り、キット中で供給されるIL-12標準品を用いて作成した標準曲線を使用してIL-12濃度を外挿した。

【0104】

第1群~第4群から単離したリンパ節細胞によって分泌されたIL-12レベルを図5に示す。IL-12プラスミドだけを注射し、IL-12に対するsiRNAは注射しなかったマウス(第1群)から単離したリンパ節細胞は、培養上清中に270.4pg/mlのIL-12を分泌した。PBS中のIL-12 siRNAを注射した第2群のマウスでは、IL-12タンパク質分泌の有意の阻害を認めなかった。これに対し、siRN

Aをリポソーム／連続疎水性担体中で送達した場合は、分泌されるIL-12の著明な減少が認められ、ナイーブマウスで認められたのと同程度に低かった。さらに、第3群のマウスからのリンパ節細胞は、PBS中のsiRNAを摂取した第2群のマウスと比較して有意に低いIL-12を分泌した。これは、IL-12プラスミドによって誘導されるIL-12タンパク質発現のより良好な阻害を生じさせる、リポソーム／連続疎水性担体中で注射した場合のインビボでのsiRNAスクレオチド配列の改善された送達を明らかにした。

【実施例5】

【0105】

さらなる例として、リポソーム／連続疎水性担体中で送達されたIL-12 siRNAがIL-12分泌を阻害する能力を試験するため、完全フロイントアジュバント(CFA)中のオボアルブミン抗原を使用して、リンパ節細胞によるIL-12分泌を誘導した。タンパク質抗原であるオボアルブミンは、マウスにおいてIL-12サイトカイン分泌を誘導することが以前に示されている(Yotsumoto et al, 2007, Vaccine, 25:5256-5262)、これは、IL-12 p35に特異的なsiRNAを使用して阻害することができた(Hill et al, Journal of Immunology, 2003, 171:691; Ichim et al, Journal of Translational Medicine, 2006, 4:2, 1-11)。この例では、CFA中のオボアルブミンを皮下注射したマウスに、オボアルブミン注射の1日前又は1日後にIL-12 siRNA(PBS中又はリポソーム／連続疎水性担体中)を皮下注射した。

【0106】

6～8週齢の無菌雌性C57BL/6マウスをCharles River Laboratories(St Constant, Quebec, Canada)より入手し、施設のガイドラインに従って収容して、水と食餌は自由に摂取させ、フィルター制御空気循環下に置いた。

【0107】

マウスを、50μl容量でCFA中に乳化したオボアルブミン5μg(Difco Laboratories, Detroit, MI)を用いて尾の基部の上方の右側腹部で皮下的に免疫した。

【0108】

IL-12 siRNAを1.6mg/mlの最終濃度で含むリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用してリン脂質の精製ダイズ由来混合物(Lipoid GmbHより提供されたリン脂質S100)とコレステロールの10:1(W/W)混合物を水和することにより、多重層リポソームを調製した。次に、手動押出機(Avantilipids, Alabaster, AL, USA)を用いて200nmポリカーボネート膜を通してリポソームを押出した。リポソーム/IL-12-siRNA懸濁液500μlごとに、等しい容量の鉱油担体(Montanide(商標)ISA 51, Seppic, France)を添加して、エマルションの水相に含まれるリポソーム懸濁液及び連続相を形成し、疎水性担体として働く油を含有する油中水型エマルションを形成した。

【0109】

5つの群のマウス(n=4)全部を、完全フロイントアジュバント(CFA)中で製剤したオボアルブミンを用いて0日目に皮下的に免疫し、各々の群を尾の基部の上方の右側腹部において以下のように皮下的に処置した：第1群のマウスは未処置であり、第2群のマウスは-1日目にPBS中のIL-12 siRNAを40μgで、第3群は-1日目にリポソーム／連続疎水性担体中で前述したように製剤したsiRNAで、第4群は+1日目にPBS中のsiRNAで、そして第5群は+1日目にリポソーム／連続疎水性担体中のsiRNAで処置し、第6群はワクチン接種していない未処置ナイーブマウスからなるものであった。注射はすべて50μlの容量であった。すべてのマウスからの流入領域リンパ節をオボアルブミン注射後8日目に収集した。リンパ節を解剖し、単細胞懸濁液を、24ウェルプレート中の10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、2-メルカプトエタノール及びL-グルタミンを添加した RPMI 培地において  $2 \times 10^6$  細胞

10

20

30

40

50

/ m<sup>1</sup> の濃度でインビトロにて 48 時間培養した。細胞培養上清を収集し、IL-12 タンパク質定量のために使用するまでアリコートに分けて凍結保存した。

【0110】

2 つの異なる製剤中で注射した siRNA の効果を、リンパ節細胞によるオボアルブミン誘導の IL-12 タンパク質発現の阻害の程度を測定することによって決定した。IL-12 タンパク質の定量は、市販の IL-12 特異的 ELISA キット (Peptrotect, Rocky Hill, NJ, USA) を使用して、固相酵素免疫検定法 (ELISA) によって実施した。簡単に述べると、抗 IL-12 捕捉抗体を ELISA プレート上に一晩被覆し、試料と標準 IL-12 を添加した。十分に洗浄した後、ビオチニル化抗 IL-12 検出抗体を添加し、室温で 2 時間インキュベートして、洗浄した。アビシン-HRP コンジュゲートと共にインキュベートし、洗浄した後、発色のために ABTS 液体基質 (Sigma, St Louis, MO) を使用した。マイクロタイタープレートリーダーを使用して 405 nm で吸光度を読み取り、キット中で供給される IL-12 標準品を用いて作成した標準曲線を使用して IL-12 濃度を外挿した。

【0111】

第 1 群～第 6 群から単離したリンパ節細胞によって分泌された IL-12 レベルを図 6 に示す。IL-12 に対する siRNA 注射を受けなかった第 1 群のマウスから単離したリンパ節細胞は、培養上清中に 300 pg/m<sup>1</sup> より多くの IL-12 を分泌した。オボアルブミン免疫の -1 日目に PBS 中の IL-12 siRNA を注射した第 2 群のマウス又は +1 日目に PBS 中の IL-12 siRNA を注射した第 4 群のマウスでは、IL-12 タンパク質分泌の有意の阻害を認めなかった。これに対し、-1 日目 (第 3 群) 又は +1 日目 (第 5 群) のいずれかにリポソーム / 連続疎水性担体中で siRNA を送達した場合は、分泌される IL-12 の著明な低下が認められ (それぞれ p = 0.003 及び p = 0.004)、ナイーブマウスからのリンパ節細胞で認められたのと同程度に低かった。さらに、第 3 群及び第 5 群のマウスからのリンパ節細胞は、PBS 中の siRNA を摂取した第 2 群及び第 4 群のマウスと比較して有意に低い IL-12 を分泌した。これは、オボアルブミン抗原によって誘導される IL-12 タンパク質発現の完全な阻害を生じさせる、リポソーム / 連続疎水性担体中で注射した場合のインビトロでの siRNA ヌクレオチド配列の有効で改善された送達を示す。

【0112】

本明細書中で引用するすべての刊行物及び特許出願は、各々個々の刊行物及び特許出願が参照により組み込まれることが明確且つ個別に指示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。いかなる刊行物の引用も、出願日以前のその開示に関してであり、本発明が先行発明によってそのような刊行物に先行する権利を有さないとの承認と解釈されるべきではない。

【0113】

本明細書及び付属の特許請求の範囲において使用される、単数形態「a」、「a n」及び「t h e」は、文脈によって明らかに異なる指示が与えられない限り、複数の言及を包含する。特に異なる定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び学術用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0114】

前記発明を、理解の明瞭さのために例示と実施例によってある程度詳細に説明したが、付属の特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱することなく本発明にある種の変更及び修正を加え得ることは、本発明の教示に照らして当業者には容易に明白である。

本発明は、以下の態様を包含する。

[1]

疎水性物質の連続相を含む担体と、  
リポソームと、  
ポリヌクレオチドと

10

20

30

40

50

を含む組成物。

[ 2 ]

前記担体が、油性又は油中水型エマルションである、上記 [ 1 ] に記載の組成物。

[ 3 ]

前記油が、天然油又は合成油である、上記 [ 2 ] に記載の組成物。

[ 4 ]

前記油が、鉱油、植物油又は堅果油である、上記 [ 3 ] に記載の組成物。

[ 5 ]

前記担体が、油の混合物を含む、上記 [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載の組成物。

10

[ 6 ]

前記リポソームが、リン脂質を含む、上記 [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 7 ]

前記リポソームが、コレステロールを含む、上記 [ 1 ] から [ 6 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 8 ]

前記リポソームが、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) 及びコレステロールを含む、上記 [ 1 ] から [ 7 ] のいずれか一項に記載の組成物。

20

[ 9 ]

前記ポリヌクレオチドが、アンチセンス RNA、干渉 RNA、触媒 RNA、リボザイム又はポリペプチドをコードする、上記 [ 1 ] から [ 8 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 10 ]

アジュバントをさらに含む、上記 [ 1 ] から [ 9 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 11 ]

前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物細胞において機能性のプロモーターに作動可能に連結されている、上記 [ 1 ] から [ 10 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 12 ]

前記ポリヌクレオチドが発現プラスミドに挿入されている、上記 [ 1 ] から [ 11 ] のいずれか一項に記載の組成物。

30

[ 13 ]

前記ポリヌクレオチドを含む細菌ベクター又はウイルスベクターを含む、上記 [ 1 ] から [ 12 ] のいずれか一項に記載の組成物。

[ 14 ]

前記ポリヌクレオチドが、

( a ) 前記リポソーム内に封入されて、

( b ) 前記リポソームの外部に、又は

( c ) 前記リポソーム内に封入されていると前記リポソームの外部の両方に存在する、上記 [ 1 ] から [ 13 ] のいずれか一項に記載の組成物。

40

[ 15 ]

前記アジュバントが、

( a ) 前記リポソーム内に、

( b ) 前記リポソームの外部に、又は

( c ) 前記リポソーム内と前記リポソームの外部の両方に存在する、上記 [ 10 ] に記載の組成物。

[ 16 ]

上記 [ 1 ] から [ 15 ] のいずれか一項に記載の組成物及びポリヌクレオチドを被験者に送達するために前記組成物を使用するための指示書を含むキット。

[ 17 ]

上記 [ 1 ] から [ 15 ] のいずれか一項に記載の組成物を前記被験者に投与することを

50

含む、ポリヌクレオチドを被験者に送達するための方法。

[ 1 8 ]

前記被験者が哺乳動物である、上記 [ 1 7 ] に記載の方法。

[ 1 9 ]

前記哺乳動物がヒトである、上記 [ 1 7 ] に記載の方法。

[ 2 0 ]

リポソーム、ポリヌクレオチド、及び疎水性物質の連続相を含む担体を組み合わせることを含む、組成物を作製するための方法。

[ 2 1 ]

前記ポリヌクレオチドが前記リポソーム内に封入されている、上記 [ 2 0 ] に記載の方法。

10

[ 2 2 ]

前記リポソームを、前記担体と組み合わせる前に脱水する、上記 [ 2 0 ] 又は [ 2 1 ] に記載の方法。

[ 2 3 ]

前記ポリヌクレオチドが、上記 [ 1 ] から [ 2 2 ] のいずれかにおいて定義されるポリヌクレオチドである、上記 [ 2 0 ] から [ 2 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 4 ]

前記リポソームが、上記 [ 1 ] から [ 2 3 ] のいずれかにおいて定義されるリポソームである、上記 [ 2 0 ] から [ 2 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

20

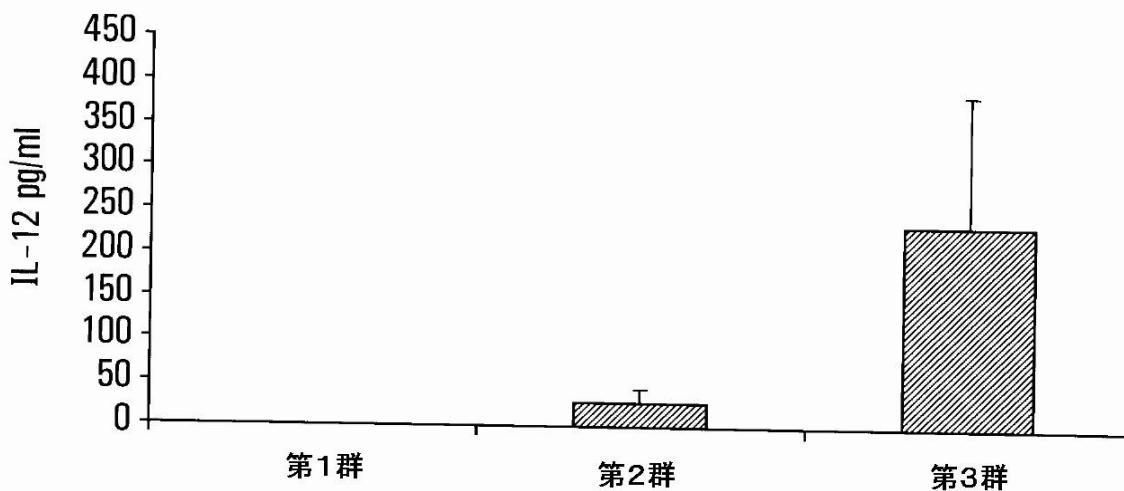
[ 2 5 ]

前記担体が、上記 [ 1 ] から [ 2 4 ] のいずれかにおいて定義される担体である、上記 [ 2 0 ] から [ 2 2 ] のいずれか一項に記載の方法。

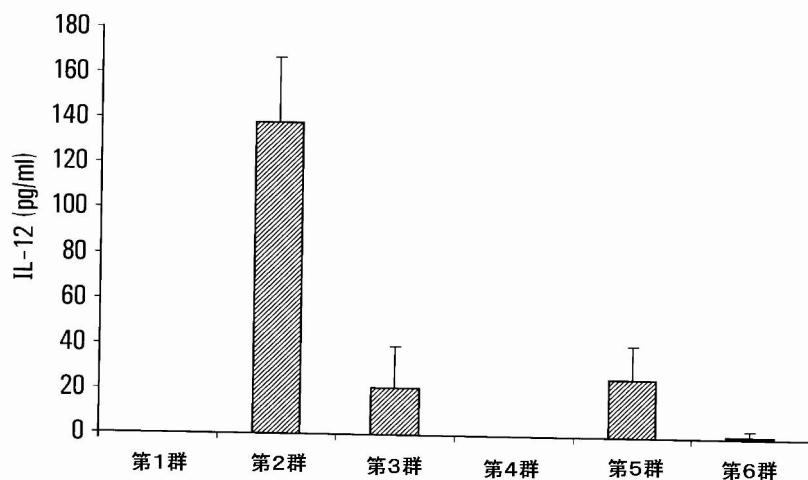
[ 2 6 ]

上記 [ 2 0 ] から [ 2 5 ] のいずれか一項に記載の方法によって生産される組成物。

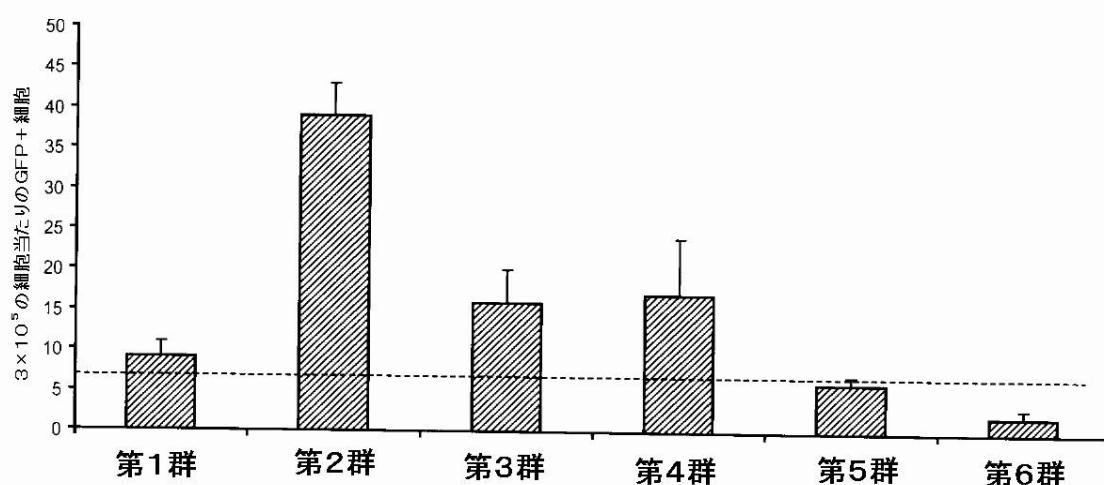
【図 1】



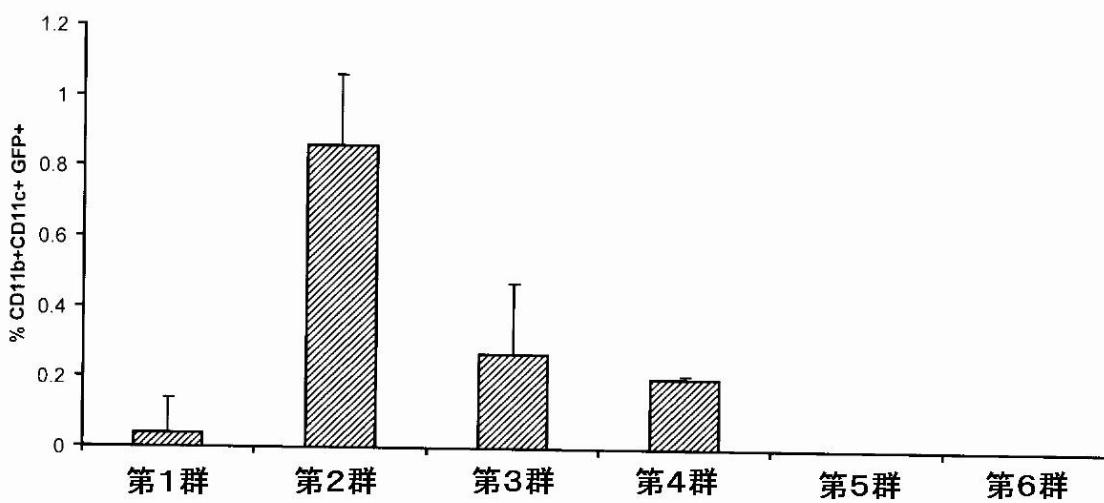
【図2】



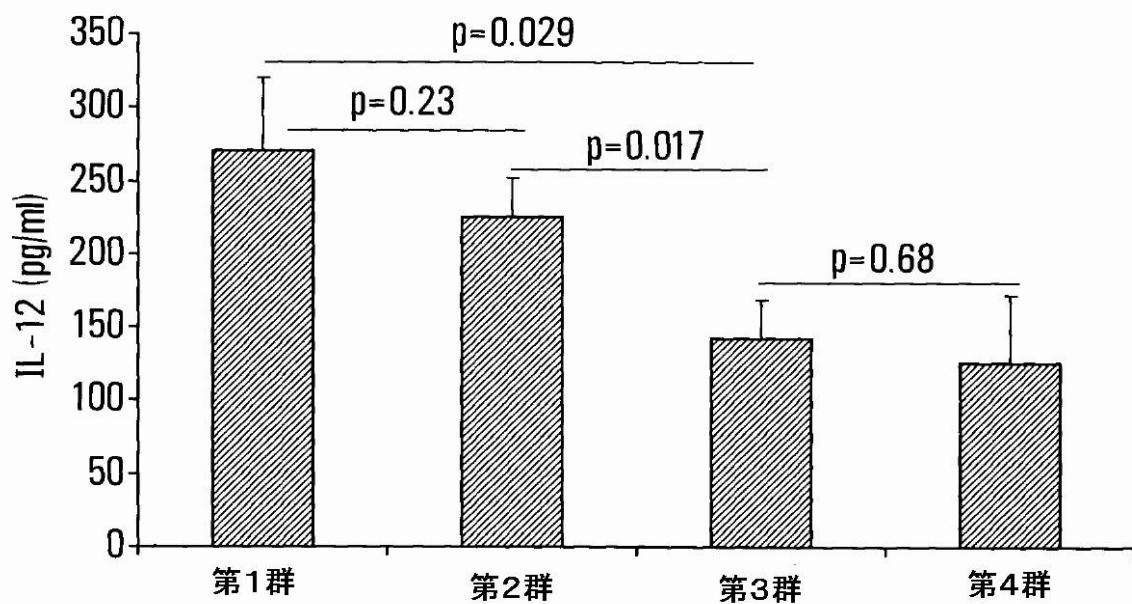
【図3】



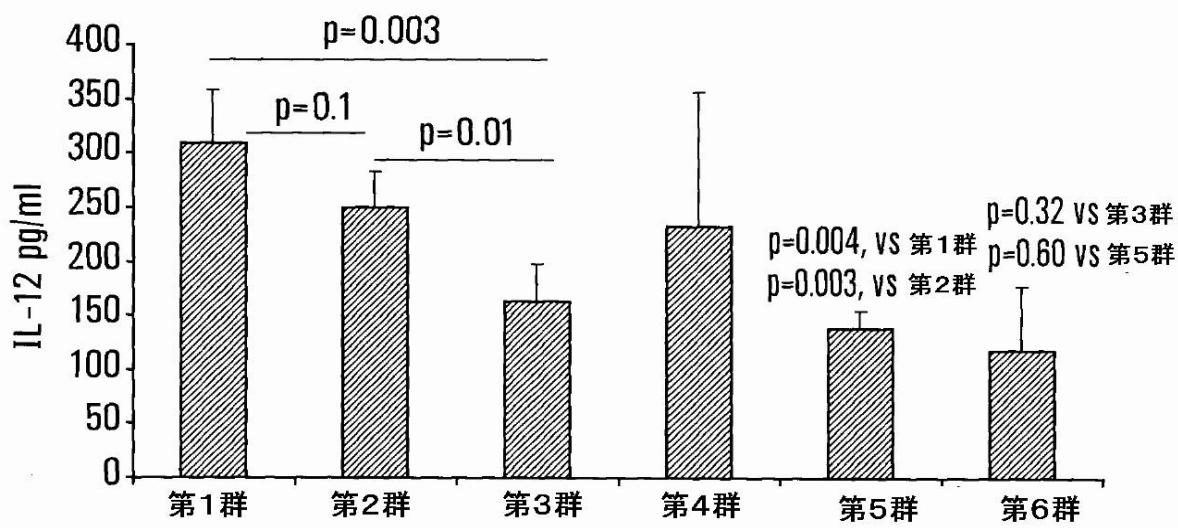
【図4】



【図5】



【図6】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	47/14	(2006.01) A 6 1 K 47/14
A 6 1 K	39/39	(2006.01) A 6 1 K 39/39
A 6 1 K	47/24	(2006.01) A 6 1 K 47/24
A 6 1 K	47/10	(2006.01) A 6 1 K 47/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01) A 6 1 P 31/00

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 マンスール, マーク

カナダ国 ノバ スコシア ピー3エヌ 1エル8, ハリファックス, アルトン ドライブ 17

(72)発明者 カーカダ, モハン

カナダ国 ノバ スコシア ピー3ティー 2ジー4, ハリファックス, ロッピー クローズ 1  
9

(72)発明者 ウェイヤー, ジェネヴィエブ メアリー

カナダ国 ノバ スコシア ピー2ダブリュ 1エックス8, ダートマウス, スプリング アベ.  
468

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 国際公開第2007/041832 (WO, A1)

国際公開第2006/113679 (WO, A1)

特表2004-512384 (JP, A)

Journal of Controlled Release, 2001年, Vol.71, No.3, pp.339-350

Biomaterials, 2004年, Vol.25, pp.5893-5903

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

C 1 2 N 1 5 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 2 5 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 2

A 6 1 P 3 7 / 0 8

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )