

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4987205号
(P4987205)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/30 (2006.01)	A 6 1 K 47/30
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 35 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-564801 (P2001-564801)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月2日(2001.3.2)
 (65) 公表番号 特表2003-525912 (P2003-525912A)
 (43) 公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/006953
 (87) 国際公開番号 W02001/066149
 (87) 国際公開日 平成13年9月13日(2001.9.13)
 審査請求日 平成20年2月27日(2008.2.27)
 (31) 優先権主張番号 60/187,236
 (32) 優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/261,751
 (32) 優先日 平成13年1月16日(2001.1.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505307297
 ジェネトロニクス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21-1318, サン ディエゴ, ソ
 レント バレー ロード 11494
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100138900
 弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子送達用核酸製剤および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

筋細胞にタンパク質をコードする核酸を送達するための製剤であって、該核酸、ならびにポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリガラクトロン酸、ポリビニル硫酸、グルタミン酸とアスパラギン酸とからなるコポリマー、およびそれらの塩からなる群より選択されるアニオン性ポリマーを含み、カチオン性ポリマーを含まない、アニオン性ポリマーが非封入性であり、筋細胞への該核酸の送達を該ポリマーのない該核酸の送達に比べて増進するものである製剤。

【請求項2】

アニオン性ポリマーがポリ-L-グルタミン酸、ポリアスパラギン酸、およびそれらの塩からなる群より選択される、請求項1に記載の製剤。

【請求項3】

アニオン性ポリマーが2,000~100,000ダルトンの分子量によって特徴づけられる、請求項2に記載の製剤。

【請求項4】

アニオン性ポリマーが15,000~50,000ダルトンの分子量によって特徴づけられる、請求項3に記載の製剤。

【請求項5】

アニオン性ポリマーが2,000~15,000ダルトンの分子量によって特徴づけられる、請求項3に記載の製剤。

【請求項 6】

アニオン性ポリマーが50,000～100,000ダルトンの分子量によって特徴づけられる、請求項 3 に記載の製剤。

【請求項 7】

アニオン性ポリマーが1～12mg/mlのアニオン性ポリマー濃度で核酸分子と共に製剤化される、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 8】

アニオン性ポリマーが2～6mg/mlのアニオン性ポリマー濃度で核酸分子と共に製剤化される、請求項 7 に記載の製剤。

【請求項 9】

等張性である請求項 1 に記載の製剤。

10

【請求項 10】

アニオン性ポリマーが生体内で筋細胞への核酸の送達を増進する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 11】

アニオン性ポリマーが生体内で筋組織中の筋細胞への核酸の送達を増進する、請求項 10 に記載の製剤。

【請求項 12】

アニオン性ポリマーが生体内で複数の筋細胞への核酸の送達を増進する、請求項 10 に記載の製剤。

20

【請求項 13】

アニオン性ポリマーが液体貯蔵、凍結乾燥および凍結からなる群より選択される貯蔵条件の間に核酸に安定性を付与する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 14】

核酸が成長ホルモン、増殖因子、サイトカイン、凝固因子、抗原、および抗原因子からなる群より選択されるタンパク質をコードする配列を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 15】

サイトカインがインターフェロンである、請求項 14 に記載の製剤。

【請求項 16】

体内投与に適した緩衝液をさらに含む、請求項 1 に記載の製剤。

30

【請求項 17】

ポリグルタミン酸が濃度6mg/mlのポリ-L-グルタミン酸またはその塩である、150mMのNaClをさらに含む請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 18】

核酸が1mg/mlの濃度で製剤中に存在する、請求項 17 に記載の製剤。

【請求項 19】

濃度5mM～10mMのトリス緩衝液をさらに含む、請求項 17 または 18 に記載の製剤。

【請求項 20】

タンパク質をコードする核酸分子、ならびにポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリガラクトロン酸、ポリビニル硫酸、グルタミン酸とアスパラギン酸とからなるコポリマー、およびそれらの塩からなる群より選択されるアニオン性ポリマーを含み、カチオン性ポリマーを含まない、筋細胞にタンパク質をコードする核酸分子を送達するための凍結乾燥核酸製剤であって、アニオン性ポリマーが非封入性であり、筋細胞への該核酸分子の送達を該ポリマーのない該核酸分子の送達に比べて増進するものである製剤。

40

【請求項 21】

ポリグルタミン酸がポリ-L-グルタミン酸またはその塩である、請求項 20 に記載の製剤。

【請求項 22】

ポリ-L-グルタミン酸の塩がナトリウム塩であり、かつ凍結乾燥前に1～12mg/mlの濃度で製剤中に存在する、請求項 21 に記載の製剤。

50

【請求項 23】

ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩が凍結乾燥前に6mg/mlの濃度で製剤中に存在する、請求項 22 に記載の製剤。

【請求項 24】

該タンパク質が治療タンパク質を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 25】

アニオン性ポリマーがポリ-L-グルタメートまたはその塩である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 26】

核酸がサイトカインをコードする、請求項 1 に記載の製剤。

10

【請求項 27】

筋細胞に治療タンパク質をコードするベクターを送達するための医薬組成物であって、該ベクター、ならびにポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリガラクトロン酸、ポリビニル硫酸、グルタミン酸とアスパラギン酸とからなるコポリマー、およびそれらの塩からなる群より選択されるアニオン性ポリマーを含み、カチオン性ポリマーを含まない、アニオン性ポリマーが非封入性であり、筋細胞への該ベクターの送達を該ポリマーのない該ベクターの送達に比べて増進するものである医薬組成物。

【請求項 28】

アニオン性ポリマーが生体内エレクトロポレーションと協同してトランスフェクションを増進する、請求項 27 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 29】

ポリグルタミン酸がポリ-L-グルタミン酸またはその塩である、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

治療タンパク質が凝固因子、増殖因子およびサイトカインからなる群より選択される、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

治療タンパク質が第IX因子、エリスロポイエチンおよびインターフェロン- からなる群より選択される、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

筋細胞に治療タンパク質をコードする非ウイルスベクターを送達するための安定化された医薬組成物であって、該ベクター、ならびにポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリガラクトロン酸、ポリビニル硫酸、グルタミン酸とアスパラギン酸とからなるコポリマー、およびそれらの塩からなる群より選択されるアニオン性ポリマーを含み、カチオン性ポリマーを含まない、アニオン性ポリマーが非封入性であり、筋細胞への該ベクターの送達を該ポリマーのない該ベクターの送達に比べて増進するものである医薬組成物。

30

【請求項 33】

アニオン性ポリマーがポリ-L-グルタメートまたはその塩である、請求項 32 に記載の安定化された医薬組成物。

【請求項 34】

凝固因子が第IX因子である、請求項 14 に記載の製剤。

40

【請求項 35】

増殖因子がエリスロポエチンである、請求項 14 に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(緒言)

本発明は、タンパク質、ペプチド、アンチセンスRNA、リボザイムまたはポリペプチドを発現させるべく、核酸分子を例えばパルス電圧送達法などによって細胞内に導入するための新規組成物および方法に関する。本願は、2000年3月3日に出願された米国仮出願第60/187,236号および2001年1月16日に出願された米国仮出願第60/261,751号に基づく優先権を

50

主張する（これらの仮出願は参照により本明細書に組み込まれるものとする）。

【0002】

（発明の背景）

下記の情報はもっぱら読者の理解を助けることを目的としている。いずれの情報も本発明の特許請求の範囲に対する先行技術の説明であるとは自認しない。

【0003】

遺伝子治療は薬剤開発における主要な研究分野である。遺伝子治療は、特定のタンパク質を産生することができないことに起因する遺伝的疾患ならびに自己免疫および癌などの後天的疾患を矯正するための機構として望ましいとみなされている。遺伝子治療になじむと考えられる遺伝的疾患群の一例は血友病である。例えば血友病Bは機能的な血液凝固因子IX（「F.IX」）の不足によって起こる出血障害である。病状は機能的F.IXのレベルに応じて重度、中等度または軽度で分類される（Lusher, J.M. (1999) Thromb Haemost 82: 572-5751）。米国ではおよそ5,200人の男性がこの疾患を患っており、その症例の約45%は重度タイプである。血友病Bの重度症例（正常F.IXレベルの<1%）では、患者の関節にしばしば消耗性の破壊を起こし、生命にも危険を及ぼしかねない出血事象が頻繁に起こる。現在行われている血友病Bの治療は、出血事象に対応してF.IXタンパク質を投与することでしかない。血液由来のF.IXまたは組換えF.IXを使用すると、最重度の血友病B症例を中等度域または軽度域に転換することによって、極めて大きな臨床上および生活の質（QOL）上の利点を達成できることが明らかになっている。F.IXタンパク質の予防的投与には多額の費用がかかるにもかかわらず、一部の国では、最重度の症例にF.IXタンパク質が予防的に投与されている（Ljung, R.C. (1999) Thromb Haemost 82: 525-530）。F.IXの予防的使用は米国ではあまり行われていない。

10

20

【0004】

遺伝子治療は血友病Bなどの疾患を処置するための新しい予防法になりうる。しかし、遺伝子治療の商業化は、実用的、効果的かつ安全な遺伝子送達法の必要性という技術的障壁によって阻まれている。血友病の動物モデルでは、ウイルス系ベクターを使って、ヒトF.IX遺伝子を肝臓または筋肉に投与することに成功している（Kay, M.A.ら (1993) Science 262: 117-119; Herzog, R.W.ら (1999) Nat Med : 56-63; Snyder, R.O.ら (1999) Nat Med 5: 64-70; Chao, H.ら (1999) Gene Ther 6: 1695-1704; Lozier, J.N.ら (1999) Blood 94: 3968-3975; Kaufman, R.J. (1999) Hum Gene Ther 10: 2091-2107）。一部の例では、これらの方法により、血友病Bのイヌモデルで、治療レベルのF.IXの長期間（>2年）にわたる発現が達成されている（Herzog, R.W.ら (1999) Nat Med 5: 56-63）。しかしウイルスに基づくアプローチの限界は幅広く報告されている。例えば、ウイルスタンパク質に対する体液性免疫応答が生じるので、これらのベクターを使った再投与は不可能である。十分な量のベクターを再現性よく供給するという製造上の課題に加えて、ウイルスベクター、特に肝臓を標的とする遺伝子発現用ウイルスベクターには、安全性に関する重大な懸念もある。ウイルス遺伝子療法には課題があるにもかかわらず、多くの人々は、ウイルスの方が非ウイルス型送達媒体よりも効率がよいと考えている。

30

【0005】

非ウイルス型遺伝子療法の課題は、生理学的に意味のある明確な発現が起こるように、十分な核酸の送達および発現を達成することにある。等張食塩水中のDNAプラスミド（いわゆる「裸の」DNA）が生体内で様々な細胞をトランスフェクトすることは数年前に明らかになったが、このような保護されていないプラスミドは酵素分解に対する安定性に欠けることから取り込みには再現性がなく、それが動物モデルにおける発現および生物学的応答の高変動性につながっている。また、「裸の」プラスミドの生物学的利用能はほとんどの組織で極めて低いので、薬理的な反応を得るには高用量のプラスミドを投与する必要もある。

40

【0006】

したがって非ウイルス型遺伝子送達分野では、プラスミドの送達効率を向上させ、長期間にわたる発現をもたらす、他の医薬製剤に期待されるような貯蔵安定性を持つ製剤を可

50

能にするような、さらに効率のよい合成送達系の開発が目標とされている。

【0007】

核酸(通例、プラスミドDNA(「pDNA」))の分解という課題を克服して、遺伝子のトランスフェクション効率を高めるために、カチオン凝集剤(ポリブレン、デンドリマー、キトサン、脂質およびペプチドなど)が、静電相互作用によりpDNAを凝集することによってpDNAを保護するために開発されている(Therapeutic drug carrier systems 15(2):143-198(1998)の総説、A.P.Rolland著「遺伝子から遺伝子医学まで:非ウイルス型遺伝子送達における最近の進歩」を参照のこと)。しかし、凝集プラスミド粒子を使って生体内で多数の筋細胞をトランスフェクトする試みは、「裸の」DNAの場合と直接比較すると、うまくいっていない(Wolff, J.A.ら, J. Cell Sci., 103, 1249, 1992を参照のこと)。特に、プラスミドを含む堅い凝集粒子を使って多数の筋細胞を効率よくトランスフェクトする試みは、筋肉が持つ生理学的特徴ゆえに、現在に至るまで成功していない。それは、カチオン性脂質およびポリリジンプラスミド複合体は、外側の薄膜(external lamina)を横切ってカベオラおよびT細管に接近することができないためである(同上)。

10

【0008】

固形組織に直接投与する場合は、非凝集保護相互作用系(例えばPINC™ポリマー)との相互作用によるプラスミド表面の電荷および疎水性を調整することを含む追加の方策をとると、「裸の」DNAを使用するより有利であることがわかっている(WO9621470、US特許第6,040,295号を参照のこと;参照により本明細書に組み込まれるものとする)。

【0009】

遺伝子の送達には、核酸を封入する(封入性である)生分解性マイクロスフェアも使用されている。例えばWO0078357(Chen, W.ら)には、ジヒドラジドで誘導体化され、核酸に架橋されて徐放性マイクロスフェアを形成しているヒアルロン酸(HA)を含んだマトリックス、フィルム、ゲルおよびヒドロゲルが開示されている。WO9524929(BoekeIheide, K.ら)には、好ましくはマイクロスフェアなどの微粒子、マイクロカプセル、フィルム、インプラント、またはステントなどの装置上のコーティングの形態をしたマトリックスへの遺伝子の封入が開示されている。US6048551(Beer, S.ら)には、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、セルロースアセテートフタレートおよびLudragit R、LおよびEシリーズのポリマーおよびコポリマーマイクロスフェアを利用して遺伝子ベクターを封入した制御放出遺伝子送達系が開示されている。Luo D.ら, Pharm Res 1999 Aug;16(8):1300-8には、植込み可能なポリマーマトリックス(EVAc:ポリ(エチレン-co-ビニルアセテート))および注射可能なマイクロスフェア(PLGAおよびPLA、すなわちそれぞれポリ(D,L-ラクチド-co-グリコリド)コポリマーおよびポリ(L-ラクチド))からDNAを制御送達する系の特性評価が報告されている。マイクロスフェアは、その将来性にもかかわらず、製造上の問題を生じる場合があり、また生体内、特に筋組織におけるDNAの放出を不利に抑制する場合もある。

20

30

【0010】

したがって、これら最近の進歩にかかわらず、改良された新たな核酸製剤および遺伝子治療のために前記製剤を投与する方法が、今なお必要とされている。

【0011】

(発明の要旨)

ウイルスベクターの使用に代わる代替的アプローチには、非ウイルスプラスミドに基づく遺伝子療法がある。本発明は、核酸の投与および生物によるその取り込みを増進するための新規組成物および方法を開示する。一態様として本製剤には、エレクトロポレーションによる筋組織への核酸のトランスフェクションまたはエレクトロポレーションによらない筋組織への核酸のトランスフェクションを増進することができる、ポリアミノ酸、ポリヌクレオチドまたはポリアクリル酸などのアニオン性ポリマーを使用する。本発明の一態様では、上記ポリアミノ酸がポリグルタミン酸およびその塩である。ポリグルタミン酸製剤は、エレクトロポレーションを使った生体内でのトランスフェクションにとりわけ役立つことが、本発明において明らかになった。

40

50

【0012】

核酸の投与（好ましくはパルス電圧送達法による核酸の投与）に使用される本発明の組成物は、疾患の処置、ワクチン接種ならびに筋障害および血清タンパク質欠乏症の処置に適している。

【0013】

もう一つの側面として本発明は、哺乳動物の異常または疾患を処置する方法を提供する。この方法は、前記の異常または疾患を患っている哺乳動物に治療的有効量の本発明組成物を投与する工程を含む。本発明の一態様では、該疾患は活性型第IX因子のレベルが不十分であることを特徴とする。本発明に従って、ポリグルタメート中に製剤化された第IX因子をコードする核酸を、エレクトロポレーションを併用して送達することで、大動物の末梢血中の第IX因子レベルをngレベルにすることができる。

10

【0014】

本発明の一態様では、前記疾患は赤血球のレベルが不十分であるために貧血が起こることを特徴とする。本発明に従って、ポリグルタメート中に製剤化されたエリスロポエチン（「EPO」）をコードする核酸を、エレクトロポレーションを併用して送達することで、ヘマトクリットレベルを最大にするのに十分なEPOレベルを得ることができる。

【0015】

本発明の一態様では、前記疾患は免疫系の調節不全を特徴とする。本発明に従って、ポリ-L-グルタミン酸中に製剤化されたサイトカイン、一例としてヒトインターフェロン 2b（「hINF」）をコードする核酸を、エレクトロポレーションを併用して送達することで、末梢循環中のhINF レベルをngレベルにすることができる。

20

【0016】

さらにもう一つの側面として、非凝集性アニオン性ポリアミノ酸製剤を利用して、哺乳動物、より好ましくはヒトに核酸分子を送達する方法も、本発明の特徴である。この方法は、本発明組成物のパルス電圧送達が起こるような構成および配置を持つ装置を使って、生物の細胞に本発明の組成物を与える工程を含む。

【0017】

好ましい態様では、送達装置は、本発明の組成物をパルス電圧によって細胞に送達し、かつ/または細胞を電場にさらすことによって本発明の組成物を送達するエレクトロポレーション装置である。

30

【0018】

またキットも本発明の特徴である。このキットは、本発明組成物を提供するための容器と、(i)本発明組成物を生物の細胞に送達するためのパルス電圧装置であって、該容器と組み合わせることができる装置、または(ii)パルス電圧装置を使って本発明組成物を送達する方法を説明した説明書のいずれかを含む。したがって「容器」には、当業者が本発明組成物を調製できるように記載された説明書を含ませることができる。該説明書には核酸分子を製剤化するために使用される化合物を調製する工程が記載されるだろう。また、該説明書には、エレクトロポレーション後の注入の際に、核酸分子が損傷を受けているかどうかを確定する本発明組成物の試験方法も含まれるだろう。またこのキットにはFDAが承認した用途の通知および説明書を含めることもできる。

40

【0019】

本発明のキットを製造する方法も提供する。この方法は、本発明組成物を提供するための容器を、(i)生物の細胞に本発明組成物を送達するためのパルス電圧装置であって、該容器と組み合わせることができる装置、または(ii)パルス電圧装置を使って本発明組成物を送達する方法を説明した説明書のいずれかと組み合わせる工程を含む。

【0020】

本発明は癌または感染性疾患を患っている哺乳動物の処置方法も提供する。この方法は、該哺乳動物の細胞に対して、分子が癌抗原または感染性疾患の抗原をコードしている本発明組成物のパルス電圧送達が起こるような構成および配置を持つ装置を使って、該哺乳動物の細胞に本発明組成物を与える工程を含む方法。

50

【0021】

上述のように、核酸を（好ましくはパルス電圧送達法によって）投与するために使用される本発明組成物は、生物に生体内投与された時またはインビトロで細胞培養物に投与された時に、核酸を保護し、かつ/または核酸の局所的な生物学的利用能を引き延ばし、かつ/または発現を増進する化合物を含む。

【0022】

本組成物は生体内での細胞への核酸分子の送達に役立つので、関連する一側面として、本発明は、生体内の投与部位に組成物を提供する。特にこれには、哺乳動物の生体内の一部に核酸分子を送達するための組成物が含まれる。

【0023】

本発明は上述した要旨に限定されるものではなく、本発明の他のさらなる目的、特徴および利点は、以下に述べる現在好ましい本発明の態様の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるだろう。

【0024】

（好ましい態様の詳細な説明）

真核細胞、特に哺乳動物の生体内におけるベクター上のコード配列の送達および発現は、例えばトランスフェクション効率およびトランスフェクト細胞におけるコード配列の寿命などといった様々な因子に依存する。そこで、そのような送達を達成する方法が、数多く報告されている。

【0025】

非ウイルス遺伝子薬は3つの主要素、すなわちi) 遺伝子産物（例えば治療タンパク質）をコードする核酸、ii) プラスミドに基づく発現系、およびiii) 合成遺伝子送達系から構成される。これらの製品のねらいは、遺伝子送達に合成成分を使用し（これにより例えばウイルスベクターに一般に付随する免疫原性の危険が最小限に抑えられる）、遺伝子発現には非組込みプラスミドを使用するために毒性が低くなることにある。宿主染色体へのプラスミド配列の組込みは現在のところ生体内では報告されていないので、癌遺伝子を活性化することも腫瘍抑制遺伝子を不活化することもないはずである。非ウイルス系に固有のこの安全性は、大半のウイルスベクターの使用に付随する危険性とは対照的である。エピソーム系は染色体外にあるので、プラスミドは明確な薬物動態および排除プロファイルを示し、標的組織内での遺伝子発現の持続時間は有限になる。

【0026】

核酸を下記のアニオン性ポリマーと共に製剤化することがとりわけ望ましいのは、アニオン性ポリマーが核酸のトランスフェクションと発現とを増進し、核酸を分解から保護し、しかも完全に生分解性だからである。また、核酸をアニオン性ポリマーと共に製剤化するとトランスフェクション効率が向上するので、使用するDNAの量を減らすこともできる。生分解性とは、アニオン性ポリマーが毒性または副作用を全くまたはほとんど示さずに、当該生物によって生体内で代謝または除去されうることを意味する。「アニオン性ポリマー」という用語は、中性pHで正味、負の電荷を持つ、イオン化したカルボキシル基、リン酸基または硫酸基などを含む繰返し単位を持つポリマーを意味する。アニオン性ポリマーの例にはポリアミノ酸（例えばポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸およびそれらの組合わせ）、ポリ核酸、ポリアクリル酸、ポリガラクトuron酸、およびポリビニル硫酸が含まれる。酸ポリマーの場合、そのポリマーは通例、塩型で利用されるだろう。

【0027】

例えばエレクトロポレーション、ソノポレーションおよび圧力などの物理的手段によって、細胞へのプラスミドDNAの送達を増進する努力がなされてきた。エレクトロポレーションによる注入は、パルス電場の適用により、細胞に持続的な損傷を与えることなく細胞膜に一過性の細孔を開け、それにより外因性分子の導入を可能にする最新の技術である。これはハイブリドーマを作製するために研究室で広く使用されてきた技術であり、現在は、治療的遺伝子導入法に応用されつつある。エレクトロポレーション系が発生する電気パルスを調節することにより、核酸分子は、処置中に形成される細胞内の通路または細孔を通

10

20

30

40

50

って細胞内に移動することができる。米国特許第5,704,908号には、患者の体腔内の選択された位置にある細胞に分子を送達するためのエレクトロポレーション機器が記載されている（米国特許第5,704,908号は添付の図面を含めて参照により本明細書に包含される）。

【0028】

冠疾患および末梢血管疾患の処置を行うモデルとして、エレクトロポレーション法を使って、食塩水中に懸濁した遺伝子をウサギ動脈およびブタ動脈に送達することが、3rd US-Japan Symposium on Drug Delivery (D.B.Dev, J.J.GiordanoおよびD.L.Brown, ハワイ・マウイ島、1995年12月17~22日)で議論された。食塩水に懸濁したlacZレポーター遺伝子をヘアレスマウスの真皮領域の様々な深度に標的化し、発現させることができることが、
「パルス電場による皮膚での深度を標的化した効率的な遺伝子送達および発現：皮膚加齢および他の疾患の遺伝治療へのアプローチ (Depth-Targeted Efficient Gene delivery and Expression in the skin by Pulsed Electric Fields: An approach to Gene Therapy of Skin Aging and Other Diseases)」(Zhangら, Biochemical and Biophysical Research Communications 220, 633-636 (1996))という論文に記載されている。2つの電極の間でエレクトロポレーションにかけられた脳腫瘍を持つラットの内頸動脈に、食塩水に懸濁したlacZ遺伝子用哺乳類発現プラスミドが注入された。遺伝子はプラスミド注入の3日後に腫瘍細胞中で発現したと報告され、さらにまた、lacZ活性は標的とした組織および細胞だけに限定されたと報告されている (Nishiら, Cancer Research 56, 1050-1055, 1996年3月1日)。

【0029】

エレクトロポレーション用の製剤は米国特許出願第09/322,602号に記載されている（この特許出願は図面を含めて全て参照により本明細書に包含される）。エレクトロポレーション系が発生する電気パルスを調節することにより、核酸分子は、処置中に形成される通路または細孔を通して細胞内に移動することができる。

【0030】

これまで非ウイルス法による血友病Bの処置は不可能だったのは、達成される遺伝子発現レベルが低いうえに一定しなかったからである。最近になって、生体内でエレクトロポレーションを使用すると、筋、肝臓、皮膚、固形腫瘍および精巣内で、当該組織へのプラスミドの直接注入後に、安定した高いレベルの遺伝子発現が得られることが明らかになった (Titomirov, A.V.ら (1991) Biochim Biophys Acta 1088: 131-134、Muramatsu, T.ら (1997) Biochem Biophys Res Commun 233: 45-49、Suzuki, T.ら (1998) FEBS Lett 425: 436-440、Aihara, H.およびMiyazaki, J. (1998) Nat Biotechnol 16: 867-870、Mir, L.M.ら (1998) CR Acad Sci III 321: 893-899、Rizzuto, G.ら (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96: 6417-6422、Goto, T.ら (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97: 354-359、Somiri, S.ら (2000) Mol Ther 2: 178-187)。マウスでは、食塩水中のプラスミドDNAのエレクトロポレーションを使って、正常値の2%に相当するhF.IXの循環レベルが達成され、それが少なくとも2ヶ月間は維持された (Bettan, M.ら (2000) Mol Ther 2: 204-210)。本願は、(1) 治療上有意な生体内タンパク質レベル、(2) 導入遺伝子の持続的発現、(3) 製剤化したプラスミドの再投与による初期レベルに匹敵するレベルの達成、および(4) 大動物における治療上有意なレベル、という4つの目標を達成するエレクトロポレーション用新規プラスミド製剤を開示する。

【0031】

パルス電圧送達装置を使った本発明の製剤化DNAの送達は、新規遺伝子送達法である。特に、アニオン性アミノ酸ポリマーまたはポリアミノ酸を使用する好ましい態様では、食塩水を使用した場合と比較して、エレクトロポレーションによる導入遺伝子の発現をかなり増大させることができた。ポリアミノ酸は、完全に生分解性である点でも、先行技術の製剤より有利である。好ましい態様には、製剤化された核酸分子（すなわち本発明の組成物中の核酸分子）の特異的な標的細胞および細胞系による取り込み、ならびに所望により複数の細胞系による取り込みが可能になるという利点もある。製剤化された核酸分子をバル

ス電圧送達法によって注入すると、エレクトロポレーション過程の結果として細胞壁が不安定化しかつ/または細孔が形成されることにより、製剤化された核酸分子が細胞内部に、より直接的に進入することが可能になる。さらに、場合によっては、複数の細胞系を標的にして、従来の針注入法よりもはるかに多くの細胞タイプと接触させることもできる。このように本発明は、核酸分子の送達を増進させるものであり、本発明はまた、免疫応答を引き起し、治療遺伝子を発現させ、細胞周期または細胞生理の諸側面を調整するために使用することができるより高効率な遺伝子送達系を提供し、または抗腫瘍療法などの他の遺伝子送達関連治療法を達成する方法を提供する。

【0032】

「ポリ-L-グルタミン酸」という用語は本明細書では「ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩」「ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム」および「ポリ-L-グルタメート」と互換可能的に使用される。「ポリ-L-グルタメート」とはポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩を指す。ポリグルタミン酸のL-立体異性体はとりわけ有用であることがわかったが、他の立体異性体または異性体のラセミ混合物も本発明の範囲に包含される。本発明では、他のアニオン性アミノ酸ポリマーの塩も同様に好適であると考えられる。

10

【0033】

「アニオン性アミノ酸ポリマー」という用語は、任意のアニオン性アミノ酸のポリマー型、例えばポリグルタミン酸またはポリアスパラギン酸などを意味する。本発明では、アニオン性アミノ酸の混合物、例えばグルタミン酸とアスパラギン酸との混合物からなるポリマーも同様に好適であると考えられる。

20

【0034】

「送達」とは所望の細胞または任意の細胞への核酸分子の輸送を意味する。核酸分子は所望の標的を含む複数の細胞系に送達することができる。送達により、核酸分子は細胞表面、細胞膜、細胞エンドソーム、細胞膜内、核もしくは核内または細胞の他の任意の望ましい領域と接触し、そこから様々な細胞系（例えば腫瘍細胞、上皮細胞、ランゲルハンス細胞、ランゲルハンス細胞、沿岸細胞、ケラチノサイト、樹状細胞、マクロファージ細胞、クッパー細胞、筋細胞、リンパ球およびリンパ節などが挙げられるが、これらに限らない）内でトランスフェクションが起こりうる。好ましくは、本発明の組成物はエレクトロポレーションによって細胞に送達され、核酸成分が送達時にあまり剪断されず、細胞の生存度もパルス電圧送達過程によって直接的な影響は受けない。

30

【0035】

「核酸」とは、RNAとDNAの両方を意味し、cDNA、ゲノムDNA、プラスミドDNAまたは凝集した核酸、カチオン性脂質と共に製剤化された核酸、ペプチド、カチオン性ポリマー、RNAまたはmRNAと共に製剤化された核酸を包含する。好ましい一態様では、投与される核酸は、「ベクター」を構成するプラスミドDNAである。核酸は、潜在的治療作用を持つタンパク質（例えばhGH、VEGF、EPO、IGF-1、TPO、第IX因子、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-12など）を発現させる真核プロモーターを持つプラスミドDNAベクターの場合がある（ただしこれに限るわけではない）。

【0036】

本明細書で使用する「プラスミド」という用語は、遺伝物質（すなわち核酸）から構成される構築物を意味する。これは、挿入されたコード配列が真核細胞内で転写されうるように配置された遺伝要素を含む。また、プラスミドはウイルス核酸由来の配列を含んでもよいが、そのようなウイルス配列はウイルス粒子へのプラスミドの組込みを引き起さないことが好ましく、それ故にプラスミドは非ウイルスベクターである。好ましくは、プラスミドは閉じた環状DNA分子である。発現プラスミドのエンハンサー/プロモーター領域は発現レベルを決定づけるだろう。高レベル発現用の遺伝子発現系の大半は、無傷のヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期(immediate early)エンハンサー/プロモーター配列を含んでいる。しかし組織ではCMVプロモーターの経時的下方制御が報告されている。レトロウイルスベクターに組み込んだときにみられるようなCMVプロモーターの過剰なメチル化は、生体内でエピソーム性プラスミドには観察されていない。それでもなお、CMVプロモ-

40

50

ターのサイレンシングは、低下した転写因子NF- κ Bレベルに対する感受性と関連しているのかもしれない。CMVプロモーターの活性は、インターフェロン（ α および γ ）ならびに腫瘍壊死因子（TNF- α ）などを含む様々なサイトカインによって弱められることも示されている。生体内での発現を引き延ばし、所望の組織における発現の特異性を確保するために、組織特異的エンハンサー/プロモーターが発現プラスミドに組み込まれている。ニワトリ骨格アクチンプロモーターは、非鳥類横紋筋内で数週間にわたる高レベル（CMV誘導型構築物で達成されるレベルと同等なレベル）の発現をもたらすことが明らかにされている。

【0037】

発現プラスミドに遺伝子配列をさらに加えることで、メッセンジャーRNA（mRNA）の安定性および翻訳の効率に影響を及ぼすことができる。5'非翻訳領域（5'UTR）は翻訳をもたらすことが知られており、キャップ部位と開始コドンの間に位置している。理想的には、5'UTRは比較的短く、二次構造および上流開始コドンを欠くべきであり、局所的にみて最適な位置に開始コドンAUGを持つべきである。5'UTRはRNAの安定性、RNAプロセッシングおよび転写にも影響を及ぼしうる。効果的かつ正確なRNAスプライシングを保証することによって遺伝子発現量を最大にするために、発現プラスミドには特定の位置に1または複数のイントロンを含ませることができる。コンセンサス配列に合致する理想的なスプライス接合部および枝分かれ部位配列を持つ合成イントロンを用いることによって、不十分および/または不正確なスプライシングが起こる可能性を最小限に抑えることができる。遺伝子発現系内のもう一つの重要な配列は、終止コドンからポリ(A)付加部位に至るmRNA中の配列、すなわち3'非翻訳領域（3'UTR）である。3'UTRはmRNAの安定性、翻訳および細胞内局在に影響を及ぼしうる。骨格筋-アクチン3'UTRは筋組織中でmRNAを安定化することにより、他の3'UTRより高レベルの発現をもたらすことが明らかにされた。この3'UTRは、産生されたタンパク質を異なる細胞内区画に区分することにより、タンパク質が分泌経路に効果的に輸送されるのを防ぎ、タンパク質の核周辺局在に有利に働く。

【0038】

プラスミド発現系の魅力的な特徴の一つは、一つの構築物から複数の遺伝子を発現させることが可能な点である。これらの多価系は、抗体などのヘテロ二量体タンパク質の発現に利用したり、遺伝子ワクチン接種のために強力な免疫応答を生成させる目的で複数の抗原の生体内産生に利用したりすることができる。癌免疫療法では、様々なサイトカインと共刺激分子との同時発現も、応答の強化につながりうる。

【0039】

本明細書で使用する「ベクター」という用語は、標的細胞の形質転換を目的として設計された遺伝物質を含む構築物を指す。ベクターは、トランスフェクト細胞での核酸の転写と、要すれば翻訳とが起こりうるように、他の必要な要素との位置関係および順序関係が調整された、複数の遺伝物質、好ましくは連続したDNAまたはRNAの断片を含む。「ベクター」は、好ましくは、治療産物（群）をコードする配列を含むと共に、転写、翻訳、転写物の安定性、複製および当技術分野で知られている他の機能についての様々な調節要素を含む核酸分子である。ベクターは、好ましくは、ベクター中に含まれる核酸配列によってコードされる産物の産生を可能にする。例えば、ある遺伝子によってコードされるある増殖因子タンパク質の発現である。「DNAベクター」は本来の形態がDNA分子であるベクターである。「ウイルスベクター」は本来の形態がウイルス粒子のゲノム物質であるベクターである。

【0040】

本明細書で使用する「トランスフェクション」という用語は、DNA（例えば製剤化されたDNA発現ベクター）を細胞内に導入することによって、細胞を形質転換させる過程を指す。トランスフェクトされたDNAは、細胞への進入後は（1）宿主のDNAと組換えを起こすか（2）プラスミドまたは溶原性ファージとして独立して複製するか、または（3）排除されるまで複製することなくエピソームとして保持されるだろう。

【0041】

本明細書で使用する場合、「形質転換」とは、細胞がベクターを取り込むことによって誘導される細胞の特徴（発現された表現型）の一過性のまたは恒久的な変化を指す。遺伝物質は、特定の遺伝子産物を発現させるか、または内因性遺伝子産物の発現もしくは効果を変化させるような形で細胞内に導入される。細胞の形質転換はタンパク質およびRNAを含む様々な遺伝子産物の産生を伴いうる。これらの産物は細胞内または細胞外構造要素、リガンド、ホルモン、神経伝達物質、成長調節因子、酵素、ケモタキシン、血清タンパク質、受容体、低分子量化合物の担体、薬物、免疫調節剤、癌遺伝子、サイトカイン、腫瘍抑制因子、毒素、腫瘍抗原、抗原、アンチセンス阻害剤、三本鎖形成性阻害剤、リボザイムとして機能するか、または細胞構造上の特定の構造決定基を認識してその活性を変化させることを目的とするリガンドとして機能しうる。上記のリストは一例に過ぎず、限定を意味するものではない。

10

【0042】

「遺伝子産物」とはベクターによってコードされる産物を意味する。遺伝子産物の例としては、翻訳用のmRNAテンプレート、リボザイム、アンチセンスRNA、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、リンタンパク質およびポリペプチドが挙げられる。遺伝子産物をコードする核酸配列には、効果的な標的化送達を達成するための標的リガンドを結合させることができる。

【0043】

「取り込み」とは細胞外区画から細胞内区画へのベクターの移行を意味する。これには受容体を介する過程、細胞膜との融合、エンドサイトーシス、ポトサイトーシス、飲作用または他の移行機構が伴いうる。ベクターは単独でも、複合体の一部としても取り込まれうる。

20

【0044】

本明細書にいう投与とは、細胞体または生物体内に本発明の組成物を導入する経路を指す。投与には、例えば筋細胞およびリンパ節などの領域にあるリンパ細胞などの哺乳動物の身体の標的領域にパルス電圧装置によって与えるような、エレクトロポレーション法の使用が包含される。投与には皮内投与、腫瘍内投与および皮下投与も包含される。

【0045】

組成物の「治療的有效量」とは、疾患または異常の症状または兆候を少なくとも一時的に緩和させるかまたは改善させるのに十分な量をいう。したがってこの量は、薬理学的作用を引き起すのに十分な量でもある。この組成物量は、恒久的な改善、またはあらゆる症状もしくは徴候の改善を引き起す必要はない。

30

【0046】

本明細書で使用する「パルス電圧装置」または「パルス電圧注入装置」という用語は、細胞に局所的な電気パルスを放出することにより、細胞膜を不安定化させ、細胞膜に通路または細孔を形成させ、生物の細胞への核酸分子の取り込みを引き起す能力を持つ機器、またはそのような取り込みを引き起す機器を表す。言うまでもなく、このタイプの従来装置は、所望の電圧強度および/またはパルス電圧の持続時間を当業者が選択および/または調節できるように校正できるので、この機能を果たすこの先の装置も同様に校正できるとが期待される。注入装置のタイプが本発明の側面を限定するものとは見なされない。実際、パルス電圧装置の最も重要な点は、生物の細胞への本発明組成物の送達を容易にするというその装置の能力である。パルス電圧注入装置としては、例えば米国特許第5,439,440号、米国特許第5,704,908号もしくは米国特許第5,702,384号に記載のエレクトロポレーション機器またはPCT W096/12520、PCT W096/12006、PCT W095/19805およびPCT W097/07826に公開されたエレクトロポレーション機器などを挙げるることができる（これらの全教示は参照により本明細書中に包含される）。

40

【0047】

本明細書で使用する「機器」という用語は、組み合わせた時に、生物の細胞へのパルス電圧送達法による本発明組成物の送達を可能にする一組の部品を表す。本発明の機器は、1つまたは複数のシリンジ、様々な組み合わせの電極、光ファイバーおよびビデオモニタリン

50

グなどの手段による標的の選択に役立つ装置、電圧パルスを生成する起電装置であって様々な電圧強度、持続時間および周期を校正することができる装置の組合わせでありうる。シリンジは様々なサイズを持つことができ、例えば哺乳動物などの生物の皮膚に、または皮膚を通して、本発明組成物が異なる送達深度で注入されるように選択することができる。

【0048】

本明細書で使用する「生物」という用語は、当業者が一般に用いている意味を表す。生物には、酵母または細菌などの微生物、植物、鳥類、は虫類、魚類または哺乳類を含めることができる。生物は伴侶動物(コンパニオンアニマル)または家畜であってもよい。好ましくは生物は哺乳動物であり、したがって任意の温血動物である。より好ましくは哺乳動物はヒトである。

10

【0049】

本明細書で使用する「伴侶動物」という用語は、従来から「ペット」として扱われている動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ、鳥、は虫類、マウス、ウサギ、ハムスターなどを指す。本明細書で使用する「家畜」という用語は、従来から家畜化された動物と見なされてきた動物を指し、ブタ、ニワトリ、アヒル、ウシ、ヤギ、子ヒツジなどの動物と共に、「伴侶動物」とみなされる動物なども、これに含まれる。

【0050】

「核酸の局所的な生物学的利用能を引き延ばす」とは、核酸を当該化合物を含む組成物に組み込んで生物に投与したときに、当該化合物を含まない組成物に組み込んで投与した場合、例えば食塩水溶液などの製剤に組み込んで投与した場合よりも長期間にわたって、核酸の細胞による取り込みに利用できることを意味する。核酸の利用可能性のこの増大は、例えば、核酸を含む組成物と細胞との接触時間が増加することによって、またはヌクレアーゼによる攻撃から核酸が保護されることによって起こりうる。核酸の局所的な生物学的利用能を引き延ばす化合物は体内投与に適している。

20

【0051】

「体内投与に適する」とは、当該化合物が生物の組織内、例えば筋肉内または関節腔内への投与、皮内投与または皮下投与に適することを意味する。利用することができる他の投与形態には、局所外用、経口投与、経肺投与、経鼻投与または経粘膜投与、例えば口腔粘膜投与、経膈投与または経直腸投与がある。化合物を体内投与に適したものとする特性には、例えば生物全体に対して高レベルの毒性が概して存在しないことを挙げることができる。

30

【0052】

「溶液」とは、核酸と共に溶解している水溶性ポリマーおよび/または界面活性剤を意味する。

【0053】

筋肉にプラスミドを送達するためのポリマー製剤

本発明は、食塩水に懸濁した核酸の注入に伴う課題に対処するポリマー製剤を提供する。食塩水に懸濁した製剤化されていない(裸の核酸分子)プラスミドは、細胞外ヌクレアーゼによってプラスミドが迅速に分解されるので、筋肉における生物学的利用能が低い。この低い生物学的利用能を克服するために考えられる方法の一つは、例えばプラスミドを通常使用されるカチオン性錯化剤を使ってプラスミドを凝集させることにより、プラスミドを迅速なヌクレアーゼ分解から保護することである。しかし、筋肉が持つ生理学的特徴のために、プラスミドを含む堅い凝集粒子を、多数の筋細胞の効率のよいトランスフェクションに使用することは、現在まで成功していない。カチオン性脂質およびポリリジンプラスミド複合体は、外側の薄膜を横切ってカベオラおよびT管に接近することができない(Wolff, J.A.ら, 1992, J.Cell.Sci. 103:1249-1259)。

40

【0054】

したがって本発明は、プラスミドを迅速な細胞外ヌクレアーゼ分解から保護し、無傷のプラスミドを筋肉および/または腫瘍に分散させて保持し、筋細胞および/または腫瘍細胞に

50

よるプラスミドの取り込みを容易にすることによって、筋肉におけるプラスミドの生物学的利用能を引き延ばす(増加させる)。これを果たす具体的方法であって、好ましくはパルス電圧送達法と併用される方法は、アニオン性ポリマーの使用である。

【0055】

投与

本明細書にいう投与とは、プラスミドまたはDNAの担体を体内に導入する経路を指す。投与は標的組織に直接行うか、全身投与後の標的組織への標的化送達によって行うことができる。特に本発明は、身体に製剤を投与して組織内で特定の核酸配列を遺伝子治療に有用な特定のレベルに制御して発現させることによる異常の処置に使用することができる。

【0056】

ベクター(プラスミド)の好ましい投与手段および送達用製剤の使用については上述した。好ましい実施態様は、細胞へのパルス電圧送達と針注入もしくは針なし注入とを併用することによる実施、またはパルス電圧の直接適用による実施、この場合は、エレクトロポレーション装置の電極を例えば表皮細胞などの標的組織または標的細胞に直接押し当て、パルス適用前またはパルス適用後に、ベクターを局所投与して、細胞を通じておよび/または細胞にベクターを送達する実施である。

【0057】

選択したベクター構築物の投与経路は、その発現ベクターの特定の用途に依存するだろう。一般に、使用する各ベクター構築物の具体的製剤では、特定の標的組織に関するベクター送達、パルス電圧送達パラメーター、続いて効力の実証に焦点が置かれる。送達試験には、細胞によるベクターの取り込みおよび選択したDNAの発現を評価するための取り込みアッセイが含まれるだろう。そのようなアッセイでは、取り込み後の標的DNAの局在も決定され、発現したタンパク質の定常状態濃度の維持に必要な条件が確立されるだろう。次に効力および細胞毒性も調べることができる。毒性には細胞の生存だけでなく細胞の機能も含まれるだろう。

【0058】

筋細胞は、DNA粒子を溶液、懸濁液またはコロイドとして筋肉内に単純に注入すると、細胞外間隙からDNAを取り込むという独自の能力を持っている。この方法によるDNAの発現は数ヶ月間持続することができる。

【0059】

選択した送達方法は、核酸カセット内にコードされた遺伝子産物の発現を適切な生物学的作用を発揮するレベルでもたらしめべきである。発現率は疾患、ベクターおよび遺伝子産物の薬物動態学、および投与経路に依存するだろうが、0.001~100mg/kg-体重/日、好ましくは0.01~10mg/kg-体重/日の範囲にあるべきである。このレベルは標準的方法によって容易に決定することができる。これは最適な投薬に依存して増減するかもしれない。処置は、疾患症状の経過中は、おそらく連続して、継続されるだろう。投与回数は疾患、送達媒体、および臨床試験で得られた効力データに依存するだろう。

【0060】

DNA注入可変要因

本発明によって達成される遺伝子送達および遺伝子発現のレベルまたは免疫応答の強度は、以下の可変要因を変化させることによって最適化することができる。可変要因は、製剤(組成、プラスミドのトポロジー)、注入技術および注入手順(注入範囲、電圧の持続時間および強度、電極間隙、放出するパルスの数、針の配置様式、細胞の注入前パルスまたは注入後パルス、筋肉の状態、腫瘍の状態)、および筋毒性剤による筋肉の前処置である。免疫応答は、例えば、注入した核酸分子によってコードされ発現されるタンパク質に対して産生される抗体の量によって測定することができるが、これに制限されない。

【0061】

本発明のパルス電圧注入法によって与えられる製剤化された核酸分子がコードするタンパク質、そのタンパク質に反応して産生される抗体および/または細胞傷害性Tリンパ球のレベルに大きな影響を及ぼす目的で使用することができる他の注入可変要因は、注入を行う

10

20

30

40

50

筋肉の状態および注入技術である。可変要因の例としては筋刺激、筋収縮、筋マッサージ、送達角度、および機器操作が挙げられる。筋肉のマッサージにより、プラスミドは、直接的にまたはリンパ排液によって筋肉から押し出されるだろう。本発明では、筋繊維に対してパルス電圧装置を設置する際の貫入深度および/または貫入角度を変えることにより、注入範囲全体にわたるプラスミド分布を改善し、次いでプラスミドがコードし発現させるタンパク質に対する抗体反応を増大させる。

【0062】

核酸に基づく治療法

本発明は、現時点でこれまで行われてきた方法よりも効率のよい方法で核酸ワクチンを送達するために使用することができる。核酸ワクチンまたは抗原もしくはヒト成長ホルモンなどの治療分子をコードするプラスミドの使用は、過去5年間に集中的な研究開発分野になった。核酸に基づくワクチンに関する包括的な総説が刊行されている(M.A.Liuら編, 1995, DNA Vaccines: A new era in vaccinology, Vol.772, Ann.NY.Acad.Sci., ニューヨーク, Kumar, V.およびSercarz, E., 1996, Nat.Med. 2: 857-859, Ulmer, J.B.ら編, Current Opinion in Immunology, 8: 531-536, Vol.772, Ann.NY.Acad.Sci., ニューヨーク)。ウイルスタンパク質をコードするプラスミドを用いた動物モデルにおける防御免疫は、1993年にUlmerらによって初めて観察された(Ulmer, J.B.ら, 1993, Science 259: 1745-1749)。それ以来、いくつかの研究によっていくつかの疾患標的に関して防御免疫が実証され、ヒト臨床試験が開始されている。

【0063】

多くの疾患標的が研究されてきた。例えばライム病のダニ媒介性感染因子ボレリアブルグドルフェリの抗原(Lukeら, J.Infect.Dis.175: 91-97, 1997)、ヒト免疫不全ウイルス-1(Letvinら, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 94: 9378-9383, 1997)、B細胞リンパ腫(Syrengelesら, Nature Medicine. 2: 1038-41, 1996)、単純疱疹ウイルス(Bourneら, J.Infectious dis.173: 800-807, 1996)、肝炎Cウイルス(Tedeschiら, Hepatology 25: 459-462, 1997)、狂犬病ウイルス(Xiangら, Virology, 209: 569-579, 1995)、マイコバクテリウムツベルクローシス(Lowrie「Genetic Vaccines and Immunotherapeutic Strategies」(CA Thibeault編, Intl Bus Comm, Inc.(マサチューセッツ州01772サウスボロ)の87~122頁, 1996)、および熱帯熱マラリア原虫(Hoffmanら, Vaccine 15: 842-845, 1997)などが、その例である。さらに、腫瘍細胞の免疫原性、成長および増殖を低下させるための核酸に基づく処置から、腫瘍原性脳腫瘍などの疾患の遺伝子治療が示唆される(Fakhraiら, Proc.Natl.Acad.Sci., 93: 2909-2914, 1996)。

【0064】

遺伝治療の重要な目標の一つは、細胞による核酸の取り込みに影響を及ぼし、それによって、注入した核酸がコードするタンパク質に対する免疫応答を引き起すことである。核酸に基づくワクチンはサブユニットワクチン、精製ウイルスタンパク質ワクチンまたはウイルスベクターワクチンに代わる魅力的なワクチン接種法である。伝統的なアプローチにはそれぞれ制約があるが、それらの制約は、身体の細胞中で抗原(群)を直接発現させれば克服される。さらに、これらの従来ワクチンは株特異的な防御しかもたらさない。したがって、いくつかの血清タイプがあるウイルスまたは突然変異を起こしやすいウイルスに対して長時間持続する免疫を従来ワクチン法を用いて得ることは極めて困難であり、不可能であるとさえ言える。

【0065】

核酸に基づくワクチンは、ウイルスの核タンパク質などの高度に保存されたウイルスエプトープに対して長時間持続する免疫をもたらす可能性がある。特定のタンパク質をコードするプラスミドの本発明による注入は、抗体産生によって測定される免疫応答の増加をもたらす。したがって本発明は、製剤化された核酸分子を上述のパルス電圧装置で送達することによる核酸ワクチンの新規提供方法を包含する。

【0066】

核酸ワクチンの効力は少なくとも3つの方法、すなわち(1)筋肉内でのプラスミドの安定

10

20

30

40

50

性および分布を増加させる送達系の使用、(2) 抗原提示/抗原移行を刺激する分子の発現(または送達)による方法、または(3) 免疫応答を調整するアジュバントを使用する方法、のいずれかによって増強される。

【0067】

筋肉内プラスミド送達に適した疾患および異常

本願発明は多種多様なコード配列の送達および発現に利用することができる。コード配列は先天性代謝異常、特定の必須タンパク質の遺伝的欠乏症、後天的代謝および調節失調ならびに癌などの細胞調節異常を改善するために使用することができる。コード配列を含む組成物は、好ましくは、パルス電圧送達法によって投与され、必要に応じて、有資格専門家が決定した外科的手段による被処置組織の露出を要してもよい。

10

【0068】

(実施例)

以下に実例として実施例を記載するが、これらの実施例はいかようにも本発明の範囲を限定するものではない。本実施例に開示する様々な分子および/または量を調節し、または代替物に置き換えることは、当業者には理解されるだろう。また、本実施例における送達標的および/または送達量は、異なる筋肉を選択して注入すること、腫瘍または結節に注入すること、パルス時間の長さを増減すること、またはパルス適用を注入前から注入後に変更することによって、調節しまたは代替物に置き換えることも理解されるだろう。

【0069】

製剤の製造

製剤は、水、プラスミド、ポリマー、緩衝液および/または5M NaClの滅菌保存溶液から適当な体積を分注して等張溶液中の最終プラスミドを得ることによって製造した。全ての製剤の総プラスミド濃度を260nmにおけるUV吸収によって測定した。一部の製剤の浸透圧をFiske 110 μ サンプルオスモメーター (Fiske Associates (マサチューセッツ州ノーウッド)) で測定した。スーパーコイルプラスミドの割合は、1%アガロースゲル電気泳動の後、蛍光イメージングを行うことによって測定した。

20

【0070】

プラスミドを5~10mMトリス (pH7.5) もしくは食塩水 (150mM NaCl) 中に製剤化するか、または等張食塩水中でポリマーと混合した。注入に使用するプラスミドを様々なポリマーと共に等張食塩溶液中に製剤化した。通例、プラスミドの濃度は食塩水中に1~2mg/mlとするか、ポリビニルピロリドン (PVP、5%) または6mg/mlポリ-L-グルタメート (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) と共に食塩水中に製剤化した。

30

【0071】

アニオン性ポリマーには、様々な分子量のポリ-L-グルタミン (p-L-Glu) ナトリウム塩 (重合度 (DP) 9 (Sigma P1943)、重合度10 (Sigma P1818)、2~15 kDa (Sigma P4636)、15~50kDa (Sigma P4761) および50~100kDa (Sigma P4886))、15~50kDa (Sigma P4033) および50~100kDa (Sigma 4637) のポリ-D-グルタミン酸 (p-D-Glu)、2~15kDa (Sigma P5387) および15~50kDa (Sigma P6762) のポリ-L-アスパラギン酸 (p-L-Asp) ナトリウム塩、ならびに5kDaおよび60kDaのポリアクリル酸 (pAA) ナトリウム塩を含ませた。ポリアミノ酸はSigma (ミズーリ州セントルイス) から購入し、ポリ(アクリル酸)はFluka (スイス) から入手した。

40

【0072】

DNA/アニオン性ポリマー製剤は、好ましくは、プラスミド、アニオン性ポリマーおよび5M NaClの滅菌保存溶液から適当な体積を分注して、選択した最終プラスミド濃度およびアニオン性ポリマー濃度を得ることによって調製した。アニオン性ポリマーは、張性調節用の塩を添加する前にDNA溶液に加えた。したがってポリ-L-グルタメート製剤は、好ましくは、ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム (ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩) の保存水溶液を、食塩水または10mMまでのトリス (pH7.5) 中の精製プラスミドDNAの保存溶液と混合することによって調製される。ポリ-L-グルタミン酸およびDNAを混合した後、5M NaClの保存溶液を添加することによって、溶液を150mM NaClの最終濃度に調節する。

50

【 0 0 7 3 】

各製剤の重量オスモル濃度はFiske110 μ サンプルオスモメーター (Fiske Associate (マサチューセッツ州ノーウッド)) を使って測定した。さらに、260nmおよび280nmにおける光学密度を測定すること、および1%アガロースゲルでプラスミドコンフォメーションを決定することによって、製剤を特徴づけた。

【 0 0 7 4 】

製剤中のプラスミドに関する安定性試験

製剤中のpDNAの安定性を分析するために、製剤化したpDNA 50ngを追跡用色素5 μ lと共に、1%トリス-酢酸-EDTA (TAE) 緩衝液中の1%アガロースゲルに充填し、そのゲルを100ボルトで1~2時間泳動した。次にゲルをSYBRグリーンII (Molecular Probes, Inc.) で20分間染色した。染色したゲルを水で洗浄し、スーパーコイルDNAおよび開環状DNAの割合をFluorinate (Molecular Dynamics Co. (カリフォルニア州サニーベール)) を使って決定した。

10

【 0 0 7 5 】

ELISAプロトコール

高親和性アッセイプレートにPBSに希釈した抗原 (50 μ l/ウェル) でコーティングし、4で一晩静置した。プレートを室温に戻した後、1 x PBS/Tween20中に調製した4% BSA/4% NGS溶液200 μ l/ウェルを使って、全てのウェルを37 で1時間ブロックした。血清試料を加え (4% BSA/4% NGS/PBS/Tween20中に1:100の出発希釈率で50 μ l/ウェル、二重試験)、37 で1~2時間インキュベートする。プレート (群) をPBS/Tween20で洗浄し、1% BSAに希釈した50 μ l/ウェルのHRP結合二次抗体を加え、37 で1時間インキュベートする。プレート (群) をPBS/Tween20で洗浄し、100 μ l/ウェルのTMB可溶性試薬を加える。室温で10分間インキュベートし、50 μ l/ウェルの0.2M H₂SO₄を添加することによって反応を停止する。プレート (群) を450nmで読みとる。

20

【 0 0 7 6 】

プラスミド

CMVエンハンサー プロモーターと、ヒト胎盤分泌型アルカリホスファターゼレポーター遺伝子 (SEAP) (pAP1166) またはhF.IXのコード領域 (pFN0945、配列番号3) のいずれかを含むプラスミドpAP1166およびpFN0945 (配列番号3) が、Valentis, Inc. で製造され、精製された。pFN0945のプラスミド地図を図17に示す。ヒト第IX因子 (hF.IX) プラスミドは、使用頻度の低いコドンを使用頻度の高いコドンに変換すると共に潜在的なスプライス部位候補を除去した合成コード配列を挿入することによって調製された (Oberon Technologies Inc. (カリフォルニア州アラメダ))。107bpの5'UTR、117bpの合成イントロン、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル、PUC12複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を含むValentisプラスミドバックボーンに、hF.IXコード配列を挿入した。このhF.IX遺伝子はCMVエンハンサー/プロモーターによって誘導された。プラスミドを大腸菌DH5 で増殖させ、アルカリ溶解法およびクロモグラフィ法 (chromographic method) を利用する独自の方法によって精製した (Abruzzese, R.V.ら (1999) Hum Gene Ther 10:1499-1507; この論文は参照により本明細書に組み込まれるものとする)。ヒト分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) プラスミドおよびヒトエリスロポエチンプラスミドは、コード領域以外hF.IXプラスミドと同じとした。

30

40

【 0 0 7 7 】

実験動物

雄C57BL/6マウス (19~21g)、雄CD-1マウス (29~31g)、雄C.B-17/1crCrl-scid-bgBR (SCIDベージュ) マウス (7週齢) および雌C57BL/6マウス (7~8週齢) をCharles River研究所から入手し、州および連邦のガイドラインに従って、23 /相対湿度40%にて、12時間の明-暗周期で3~7日間順応させた。飼料 (Purina齧歯類用飼料) および水を適宜給餌した。滅菌床敷餌および滅菌水を用い、動物をHEPAフィルター付きケージユニット (マウス4匹/隔離飼育器) で飼育した。ケージ交換およびSCIDマウスに関する操作は全て層流フード内で行った。動物の麻酔は、用量1.8~2.0mL/kg (マウス) の混合麻酔薬 (ケタミン

50

、キシラジンおよびアセプロマジン)を腹腔内(IP)注射することによって行った。ビーグル犬(Harlan(インディアナ州インディアナポリス))をStillmeadow, Inc(テキサス州シュガーランド)で社内実験動物委員会のガイドラインに従って飼育した。

【0078】

動物への注入

麻酔後に、後肢を剃毛し、ベタインで擦って消毒した後、70%エタノールで消毒した。プラスミド10 μ gを含む10 μ lの製剤を28ゲージ0.5インチ針を付けた0.3mlインスリン注射器(Becton Dickinson(ニュージャージー州フランクリンレイク))を使って注入した。マウスに注入した体積は、前脛骨筋(cranial tibialis muscle)および腓腹筋に、それぞれ25 μ lおよび50 μ lである。表示のある箇所では、製剤注入の7日後に、動物をCO₂窒息によって屠殺し、前脛骨筋を摘出し、素速く液体窒素に浸漬し、一晚凍結乾燥した。乾燥した筋肉を使用するか、または後にレポーター遺伝子活性を決定するために-80で保存した。

10

【0079】

装置および投与方法

必要な用量に製剤化したプラスミドを両前脛骨筋または両腓腹筋への長期注射(longitudinal injection)により齧歯類に投与した(両側投与)。下肢全体をキャリパー電極の間に保持することにより、良好な「エレクトロトランスフェクション」を達成することができた。注入のおよそ2分後に、Electro Square Porator(T820、BTX(カリフォルニア州サンディエゴ))によって放出されるそれぞれ25ミリ秒(「ms」)および375V/cmの方形波パルス2回(1秒に1回)の形で電場を適用した。クランプ電極は2つのステンレス鋼平行プレートキャリパー(1.5cm²)からなり、パルス適用中は常に肢が半伸長位置に保たれるように皮膚と接触して設置される。電極の分離距離は記載の通りである。通例、マウスの肢を2つのプレート間に置き、プレート間の分離距離が3~4mmになるまでそれらを押し縮めた。次に、T-820 Electro Square Porator(Genetronics(カリフォルニア州サンディエゴ))を使って電圧375V/cmの25msパルスを2回発生させた。パルスは約1回/秒の割合で適用した。

20

【0080】

イヌにイソフルランを注射して麻酔し、エレクトロポレーション処置を行った。6針アレイ電極を使用した(Genetronics(カリフォルニア州サンディエゴ))(Jaroszeski, M.J.ら(1997)Biochim Biophys Acta 1334:15-18)。エレクトロポレーション措置は持続時間60ms、電圧200V/cmのパルス6回とした。パルスの極性はAuto Switcher(Genetronics(カリフォルニア州サンディエゴ))の制御下で1パルス毎に反転させた。エレクトロポレーション処置に続いて、注射した筋肉上の皮膚に印をつけ、後の分析時に注入部位がわかるようにした。一部の筋肉には、組織学的分析のために注射部位のマーカーとして、エレクトロポレーション後に炭素粒子も注入した。

30

【0081】

高電圧(1800V/cm)かつ短パルス(100 μ s)のパラメーターを使用する他のプロトコールとは対照的に、一つの実施態様として、低電圧(375V/cm)長パルス(25ms)のエレクトロポレーション措置を使った遺伝子送達法をマウスに適応した(Vicat, J.M.ら(2000)Hum Gene Ther 11:909-916)。

40

【0082】

血清アッセイ

プラスミド投与後の適切な時点で血液試料を集めた。マウスをケタミン(60mg/kg)(Phoenix Scientifics, Inc.(ミズーリ州セントルイス))のIP投与によって麻酔した。塩酸プロパラカイン点眼薬(Solvay Animal Health Inc.(ミネソタ州メンドータハイツ))を目にさした。血液をMicrotainer(登録商標)血清分離チューブ(Becton Dickinson(ニュージャージー州フランクリンレイクス))に集め、15~30分間凝固させた後、7,000rpmで5分間遠心分離した。SEAPの血清レベルは、化学発光アッセイ(Tropix(マサチューセッツ州ベッドフォード))を使用し、製造者の説明書に従って決定した。

50

【0083】

F. IXアッセイ用に血液試料をマウスの後眼窩静脈叢から採取した。約250 μ lの血液をEDTAマイクロテイナーチューブ (Becton Dickinson (ニュージャージー州フランクリンレイクス)) に集めた。血液を \sim 5,000gで5分間遠心分離した。血漿試料を -80° で凍結し、分析に使用するまで保存した。血漿のhF. IXレベルをAsserachrom IX:AgヒトF. IX ELISAキット (Diagnostica Stago (フランス)) を使って決定した。精製ヒトF. IX (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) を使って検量線を作製した。イヌの場合は、意識下の動物の頸静脈からEDTAプラズマチューブに血液を集めた。ELISA用の参照血漿を処置前の各動物から採取した。エリスロポエチンの血清レベルは、R&D Systems (ミネソタ州ミネアポリス) から販売されているELISAキットを使って決定した。

10

【0084】

ウェスタンブロット解析

サンプル緩衝液 (0.5Mトリス、1.5% SDS、4% β -メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.03% ブロモフェノールブルー) 中の精製hF. IX (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) を10% グリシン-トリスポリアクリルアミドゲル (Novex (カリフォルニア州サンディエゴ)) に充填した。電気泳動後にタンパク質をニトロセルロース膜 (Novex (カリフォルニア州サンディエゴ)) に転写した。次にこの膜を処置した動物または正常なイヌ (陰性対照) から採取したイヌ血漿 (1:50) 中でまずインキュベートした。陽性対照として、ウサギ抗hF. IX抗体 (1:1,000、最終) を添加した正常イヌ血漿中で、この膜をインキュベートした。二次抗体はセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ウサギ抗イヌ抗体 (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) またはHRP結合ヒツジ抗ウサギ抗体 (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) のいずれかとした。プロット上のバンドをペルオキシダーゼ基質キット (Vector Laboratories Inc. (カリフォルニア州バーリンゲーム)) を用いて可視化した。

20

【0085】

クレアチンキナーゼ (CK)

イヌから集めた血清を凍結し、標準的方法によるCKレベルの分析を行うために、ドライアイスを含めて終夜便でIDEXX Veterinary Services (カリフォルニア州ウエストサクラメント) に輸送した。

【0086】

組織学的分析および繊維タイプの決定

マウス組織のhF. IX免疫組織化学のために、Herzogら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (11), 5804-5809の方法に変更を加えて使用した。簡単には、組織の10 μ m凍結切片を3% パラホルムアルデヒド中で15分間固定し、PBS中ですすぎ、メタノールで10分間処理し、PBS中で3回洗浄した後、20% 正常ヤギ血清中でブロッキングした。次に切片を、PBS/1% BSAで1:6,000希釈した親和性精製ウサギ抗hF. IX (Dako Corp. (カリフォルニア州カーピンテリア)) と共に1時間インキュベートした。切片をPBSですすぎ、PBSで1:400希釈したピオチン化ヤギ抗ウサギIgG (Vector研究所 (カリフォルニア州バーリンゲーム)) と共に30分間インキュベートした。その切片をすすぎ、Elite ABC試薬 (Vector Laboratories (カリフォルニア州バーリンゲーム)) を1:80の希釈率で30分間使用した後、DAB溶液 (Vector Laboratories (カリフォルニア州バーリンゲーム)) 中で5分間インキュベートすることによって、hF. IX染色像を可視化した。切片をマイヤーのヘマトキシリン液 (VWR (テキサス州ヒューストン)) で対比染色した。インキュベーション工程は全て室温で行った。

30

40

【0087】

ATPアーゼ繊維サブタイプ化のために、10 μ mの筋組織凍結切片 (hF. IX染色に使用したものの連続切片) を酢酸バルピタール緩衝液 (pH4.6) 中で5分間インキュベートし、ATPアーゼ溶液 (pH9.4) に移し、20分後に1% 塩化カルシウム中で3回洗浄し、2% 塩化コバルト中で5分間洗浄し、0.01Mナトリウムバルピタール洗浄溶液中で10回洗浄し、蒸留水中で5分間すすいだ。ATPアーゼ活性を可視化するために、切片を1.5% 硫化アンモニウムに20秒

50

間浸し、蒸留水中ですすぎ、エタノール中で脱水し、カバーガラスをかけた。pH4.6ではI型繊維は暗褐色に染色され、IIA型繊維は極めて明るい褐色に染色され、IIB型繊維はその中間である。

【0088】

イヌの場合は、筋肉試料を採取して直ちに10%中性緩衝化ホルマリンに室温で一晩入れておいた。組織をアルコールで脱水した後、パラフィンに包埋した。切片を切断し、マイヤーのヘマトキシリン液およびエオシン (Sigma (ミズーリ州セントルイス)) で染色した。

【0089】

検鏡は全て、DXC-960MDカラービデオカメラ (ソニー株式会社 (日本)) を装着したオリンパスBX-40 (Olympus America (ニューヨーク州メルビル)) 顕微鏡で行った。

10

【0090】

実施例1：レポーター遺伝子を用いた製剤および送達パラメーターの決定

DNAをアニオン性ポリマーと共に製剤化すると、筋肉内注射後のエレクトロポレーションによる遺伝子発現量が増加する。アニオン性ポリマーの一例は、導入遺伝子発現量を増加させることができる過剰の非コードDNAである。CD-1またはC57BL/6マウスの筋繊維のトランスフェクションに一般に使用したプロトコールは、DNA溶液を注射し、その2分後に、注射をした筋肉にクランプ電極を使ってエレクトロポレーションを行うことであった。SEAP (ヒト胎盤分泌型アルカリホスファターゼ) 遺伝子をコードする一定量のプラスミドDNA (0.75 μ g、2.5 μ gまたは15 μ g) と様々な量の空プラスミドとをCD-1マウスの前脛骨筋 (cranial tibialis muscle) に同時注射した。空プラスミドとは、そのプラスミドがSEAPのコード配列を含まないことを意味するか、好ましくはそのプラスミドが他の遺伝子を何も含まないことを意味する。

20

【0091】

図1はSEAP pDNA/空DNA混合物をCD-1マウスの前脛骨筋に注射し、その組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清SEAP濃度を表す。様々なSEAP pDNA量 (0.15 μ g、0.75 μ g、2.5 μ g、6.25 μ gおよび15 μ g) と (コードpDNAに対して) 過剰の空pDNAを1匹あたり50 μ lの量 (一肢あたりの用量はこの半分) で投与した。試験した各SEAP pDNA用量で、2倍過剰の空pDNAをコードpDNAと同時投与すると、発現のピーク時 (注射/エレクトロポレーション後7日目) の血清SEAP濃度が、かなり上昇した。例えば、これらの条件でSEAP pDNA量が2.5 μ gである場合のSEAP発現量は、空プラスミドがない場合に6.25 μ gのSEAP pDNAで得られる発現量と同等だった。投与するSEAP pDNAの量が2.5または15 μ gである場合は、過剰の空ベクターをさらに増やすと (6、30および120倍)、SEAP発現量は連続して低下した。逆に、最低量のコードpDNA (0.75 μ g) の場合は、6倍過剰の空DNAを同時注射しても、SEAP発現量は維持された。

30

【0092】

SEAP pDNAと前もって混合する空DNAの量を増やした時に見られるSEAP発現量のこの単調でない変化は、2つの現象の相互作用を反映している。第一に、空pDNAを添加すると、DNA分解機構の飽和またはDNAを不活化する過程 (例えば、それぞれ間質液中および筋細胞核中の二価カチオンまたはヒストンなどのカチオン性物体への結合) の飽和により、遺伝子発現が増進する。この作用により、細胞内 (または核内) 取り込みの増加、または核におけるSEAP pDNAのプロセッシング効率の向上が起こりうる。第二に、空ベクターは、導入遺伝子の転写につながる複数の段階の一部でSEAPコードDNAと競合し、それがSEAP発現量の低下をもたらす。これらの段階には、エレクトロポレーションに先立って間質液にDNAが分布する段階、電気穿孔を通じた細胞内進入、核への輸送、核への進入、および転写因子への結合が含まれる。

40

【0093】

したがって、非コード配列を持つポリヌクレオチド、また好ましくはランダムな配列を持つポリヌクレオチドは、動物の体内で発現させようとする遺伝子を含むプラスミドの生体内での分解を防ぐ機能を果たしうる。

50

【0094】

導入遺伝子の発現を増進し分解から保護するためにポリヌクレオチドまたは空プラスミドを使用することの他に、他のアニオン性ポリマーを使用することもできる。これらのアニオン性ポリマーとしては、空プラスミドと同様の薬効を示すが上述の過程でSEAP pDNAとは競合しないポリアミノ酸（例えばポリ-L-グルタミン酸、ポリ-D-グルタミン酸、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-D-アスパラギン酸およびそれらの組み合わせ）またはポリ有機酸（例えばポリアクリル酸）を挙げることができる。

【0095】

いくつかのアニオン性ポリマーは、非コードDNAよりかなり強力に導入遺伝子の発現量を増加させることがわかった。様々な起源、分子量、コンフォメーションおよび電荷密度のアニオン性ポリマーを様々な濃度でSEAP pDNA (0.05mg/ml) と混合した後、CD-1マウスの前脛骨筋に注射した。注射/エレクトロポレーション処置の7日後（発現ピーク時）に、血清SEAP濃度を決定した（図2）。試験した低いDNA用量（1.25 µg/脛骨）では、選択したアニオン性ポリマーの一部がSEAP発現をかなり増加させた。最も高レベルのSEAPは3.0mg/mlの60kDaポリアクリル酸（pAA）および6.0mg/mlの2～15kDaポリ-L-グルタミン酸で得られた。これらのアニオン性ポリマーをSEAP pDNAと共に同時投与すると、発現量がそれぞれ10倍および8倍増加した（図2）。

10

【0096】

アニオン性ポリマーによって得られる薬効をさらに特徴づけるために、濃度が10倍濃いDNA 0.5mg/mlを用いたことを除いて、上記と同じ種類の実験を行った。図2は、裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNA/アニオン性ポリマー混合物をCD-1マウスの前脛骨筋に注射してその組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清SEAP濃度を示す。1匹に投与したSEAP pDNAの量は50 µlの体積に2.5 µg（一肢あたりの用量はこの半分）である。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。図3は、1匹に投与したSEAP pDNAの量が、50 µlの体積に（特に言及しない限り）通常25 µg（一肢あたりの用量はこの半分）である点を除いて、図2と同じものを表す。注射した溶液中のアニオン性ポリマー（該当する場合はアニオン性モノマー）の濃度はグラフに示すとおり様々である。

20

【0097】

この高いDNA濃度では、アニオン性ポリマーの添加によってもたらされるSEAP発現量の増加の範囲が、先に観察されたものより低かった（図2、図3）。特に、低いDNA用量で効率が高かったポリアクリル酸は、ほとんど不活性だった。しかしポリペプチド類ではSEAP発現量が依然としてかなり増加した（6.0mg/mlの2～15kDaポリ-L-グルタミン酸で最高2倍）。このDNA濃度ではSEAP発現量が安定状態に達しつつあることを考えると、この結果はとりわけ注目に値するものだった。実際、DNAを「裸」で投与した場合、DNA濃度を3倍（0.5 mg/mlから1.5mg/mlに）および10倍（5.0mg/mlに）上げて、SEAP発現量はそれぞれ50%および15%しか増加しなかった（図3）。

30

【0098】

2～15kDaポリマーとは対照的にL-グルタミン酸モノマーは発現量を増加させることができなかったという事実（図3）から、発現量の増加をもたらす効果を得るには高分子が必要であることが実証された。図2および図3の一部を示す2つの独立した実験で得られた結果を合わせて複合グラフ（図5A）を作製すると、DNA濃度の関数としてのSEAP発現量の変化を、裸のDNA注射および2つのDNA/アニオン性ポリマー処置（すなわちDNA/6.0mg/mlの2～15kDaポリ-L-グルタミン酸およびDNA/3.0mg/mlの60kDaポリアクリル酸（pAA））について比較することができる。アニオン性ポリマーをDNA溶液に添加すると2つの異なる傾向が明らかに現れる。60kDaポリアクリル酸の場合、SEAP発現の増加（裸のDNAと比較した場合）は大きい、それは低および中DNA濃度に限られる。2～15kDaポリ-L-グルタミン酸の場合、この範囲のDNA濃度では発現レベルはわずかに低い、その効力は高いDNA濃度でも依存として大きい。

40

【0099】

一部のアニオン性ポリマーによって得られる発現量の増加が発現に使用した筋肉に特異的

50

であるかどうかを決定するために、注射/エレクトロポレーション処置をCD-1マウスの前脛骨筋ではなく腓腹筋で行った。選択したアニオン性ポリマーは、上記の研究で最も高い発現レベルを与えたもの、すなわち2~15kDaおよび50~100kDaポリ-L-グルタミン酸ならびに60kDaポリアクリル酸である。この研究では2つのDNA濃度、すなわち0.3mg/ml(1腓腹筋あたり15 μ gを注射)および1mg/mlを試験した。図4は、裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNA/アニオン性ポリマー混合物をCD-1の腓腹筋に注射し、その組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清SEAP濃度を表す。1匹あたりのSEAP pDNA投与量は100 μ lの体積に30 μ g、100 μ gまたは300 μ g(一肢あたりの用量はこの半分)であった。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。

【0100】

上記3つのポリマーは、低いDNA用量で、発現量をかなり増加させた(図4)。前脛骨筋に注射した時に観察された結果とは逆に、60kDaポリアクリル酸はその濃度が最も低い0.6mg/mlで最も効率がよく、6.0mg/mlまたは12.0mg/mlで使用したポリ-L-グルタミン酸よりも効力が低かった。試験したうち最も良い条件(6.0mg/mlの50~100kDaポリ-L-グルタミン酸)では、SEAP発現量が、裸のDNAを使った場合と比較して8倍増加した。DNA濃度が高くなると上記の傾向は強くなった。60kDaポリアクリル酸は高濃度では不活性であるか阻害的であったのに対し、ポリ-L-グルタミン酸は依存として発現量を2~3倍増加させていた。DNA濃度を1.0mg/mlではなく3.0mg/mlに上昇させても、裸のDNA処置によって達成される発現レベルが10%しか上昇しないことを考えると、これもまた注目に値する結果だった。

【0101】

図5Aは、7日目の血清SEAP濃度を、CD-1マウスの前脛骨筋に注射したSEAP pDNA量の関数として表している。エレクトロポレーションの2分前に投与した溶液は、裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNAと3.0mg/mlの60kDaポリアクリル酸との混合物またはSEAP pDNAと6.0mg/mlの2~15kDaポリ-L-グルタミン酸との混合物からなった。図5Bは、7日目の血清SEAP濃度を、CD-1マウスの腓腹筋に注射したSEAP pDNA量の関数として表している。エレクトロポレーションの2分前に投与した溶液は、裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNAと6.0mg/mlのポリ-L-グルタミン酸との混合物からなった。図5Bのように、注射後7日目の血清SEAP濃度を1匹あたりのDNA注射量の関数としてプロットすると、発現に対するポリ-L-グルタミン酸(濃度6.0mg/ml)の薬効が明らかになる。

【0102】

実施例2：エレクトロポレーションなしでポリグルタミン酸を用いた場合のレポーター遺伝子発現の決定

エレクトロポレーションなしでプラスミドDNA上にコードされている遺伝子の発現量を増加させるポリグルタミン酸ナトリウムの能力を決定するために、食塩水中に製剤化したプラスミドDNAと、ポリグルタミン酸ナトリウム中の製剤とを、マウスにおける直接心筋内注射後の発現について比較した。

【0103】

ルシフェラーゼをコードするプラスミドDNA(pLC0888)を食塩水または6%ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム(Sigma P4636)中に1mg/mLおよび3mg/mLのプラスミド濃度で製剤化した。合計20匹のCD-1雄マウス(29~31g)を使用した。外科的露出後に心筋に直接注射した。10 μ lの製剤(3/10ccインスリン注射器を使用)を心尖(すなわち左心室)に注射した。心臓を元に戻し、胸郭を縫合した。注射の7日後に心臓を摘出し、液体窒素で急速冷凍して、分析に必要なまで-80度で保存した。分析を行うために、心筋を2分間ビーズ破碎にかけた後、1mlの0.5 \times 溶解緩衝液を添加した。組織を5分間ビーズ破碎にかけ、13,000rpmで10分間遠心分離した。上清をルシフェラーゼ活性についてアッセイした。注射の7日後のルシフェラーゼ発現の結果を図6に示す。各バーはn=5に相当する。図6に示すように、プラスミドDNAをポリ-L-グルタミン酸中に製剤化すると、遺伝子発現量は食塩水の場合と比較して数倍増加した。

【0104】

実施例3：治療遺伝子第IX因子の発現

ポリマー製剤を用いた発現

レポーター遺伝子だけでなく、ポリ-L-グルタミン酸を使って治療遺伝子、すなわち凝固因子IXの発現量を増加させる実験も行った。これらのアニオン性ポリマーの効力を、hF.IX発現量が安定状態に達しているDNA濃度(0.5mg/mlおよび1.0mg/ml)のpFN0945(配列番号3および図17)で試験した。図7は、裸のhF.IX pDNAまたはhF.IX pDNA/ポリ-L-グルタミン酸混合物をC57BL/6マウスの脛骨筋に注射し、その組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清hF.IX濃度を表す。1匹あたりのhF.IX pDNA投与量は100 μ lの体積に25 μ g(0.5mg/ml)または50 μ g(1.0mg/ml)(一肢あたりの用量はこの半分)とした。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。選択したポリ-L-グルタミン酸は0.5~1.5kDa(重合度(DP)9)から15~50kDaまでの範囲で分子量が異なる。試験したポリ-L-グルタミン酸は全てhF.IX発現量を(6.0mg/mlではとりわけ)十分に増加させることができ、ポリマー間の効力の相違はわずかしかなかった。C57BL/6マウスの脛骨筋への注射およびその組織のエレクトロポレーション後に得られた最も高レベルのhF.IXは、0.5mg/mlのDNAと6.0mg/mlの2~15kDaポリ(L-グルタミン酸)とで処置した場合の280ng/mlだった。これに対し、裸のDNA処置では160ng/ml程度のhF.IXレベルしか得られなかった。

【0105】

プラスミドDNAからの発現の持続性

hF.IX発現が免疫応答の不在下に血漿中で長時間持続しうるかどうかを決定するために、PVP(5%)と共に製剤化したプラスミドを免疫不全SCIDベージュマウスで試験した。図8は、免疫不全(SCIDベージュ)マウスの血漿におけるhF.IX発現を表す。まず、5%PVPと共に製剤化したプラスミド(1mg/ml)を、マウスに注射した(各脛骨筋に25 μ l、各腓腹筋に50 μ l)。免疫適格マウスにおける発現パターンと一致して、hF.IXレベルは注射の7日後に約120ng/mlのピーク濃度に達した(図8)。注射後14日までにhF.IXレベルは35%低下した後、発現は注射後90日までかなり安定していたが、125日目までにはピーク値の約20%に低下した。

【0106】

153日目に、最初の処置で使用したのと同じ筋肉にプラスミドを再注射し、エレクトロポレーションを行った。153日目に行った2度目の注射(矢印で示す)では、動物を2つの群に分けた。一方の群には、5%PVPと共に製剤化したプラスミドを注射した(n=7)、他方の群には、6mg/mlポリ-L-グルタメートと共に製剤化したプラスミドを注射した(n=8)。2度目の注射には最初の注射に使用したのと同じ注射部位およびプラスミドを使用した。どちらのSCIDマウス群でも、プラスミドの再投与によって、血漿hF.IXレベルが著しく上昇した。ポリ-L-グルタメートと共に製剤化したプラスミドを注射した群における発現量は、PVPと共に注射した群より有意に高かった。2回目の投与後に群間で見られるこの発現レベルの相違は、実験中は常に維持された。両群におけるhF.IX発現の動態は、最初の2週間以内にピーク発現(再注射の約7日後に得られる)からの著しい低下が起こる点で、最初の投与後にみられたものに似ていた。

【0107】

図8の挿入図中のグラフも、6mg/mlポリ-L-グルタメートがhF.IX発現およびhEPO発現に及ぼす効果を食塩水と比較して表している。これらの実験では、hF.IXをコードするプラスミド(50 μ g)またはヒトエリスロポエチンをコードするプラスミド(75 μ g)をマウスの脛骨筋に注射した後、エレクトロポレーションを行った。処置の7日後に分析用の血漿または血清試料を集めた。値は全て平均値 \pm SEMとして表す。スチューデントのt検定を使って平均値を比較した。図8において*はP<0.05を表す。ポリ-L-グルタメート(6mg/ml)と共に製剤化したプラスミドにより、エレクトロポレーションを行った場合の発現量は、食塩水中のプラスミドと比較して1.5倍~5.9倍増加し、挿入されている遺伝子に依存した(図8、挿入図)。

【0108】

PVPを使った最初の注射に続いてポリ-L-グルタメート製剤を再注射したマウスについて、

10ヶ月後に、脛骨筋および腓腹筋を回収し、hF.IX免疫染色と筋繊維タイプの決定を行った。図9は、SCIDマウス筋肉中のhF.IX発現筋細胞の免疫組織像および繊維タイプを表す。最初の注射の約300日後に回収した組織から作製したSCIDマウス腓腹筋の代表的切片。図9Aは、hF.IXの免疫局在を表し、陽性筋細胞が暗く染色されている（オリジナルの倍率は100倍）。図9BはパネルAの連続切片のATPアーゼ染色（pH4.6）を表す。I型繊維（暗部）およびII型繊維（明部）が見分けられる（オリジナルの倍率は100倍）。相補的繊維の代表例がどちらのパネルでも標識されることから、I型繊維とII型繊維の両方がhF.IXを発現していることがわかる。脛骨筋と腓腹筋はどちらもhF.IX発現繊維の広い分布を示した。腓腹筋では、染色されたI型繊維の絶対数はII型繊維よりはるかに少なかったものの、I型繊維とII型繊維の両方にほぼ同じ割合で発現が認められた（図9）。マウス脛骨筋では、I型繊維はあるとしてもごくわずかに過ぎないので、発現は主にII型繊維で観察された。したがって、免疫無防備（SCIDベージュ）マウスで達成されるhF.IXの長期発現は、プラスミドが筋肉内で長期間にわたって安定であり転写的に活性であることを示している。

10

【0109】

大動物への適用可能性

本遺伝子送達法を大動物に応用できることは、潜在的に臨床上有用な遺伝子治療法の開発にとって、必要にして欠くことのできないステップである。図10Aは、エレクトロポレーションによりプラスミドを大量に筋肉内注射した後のイヌにおける血漿hF.IXレベルの結果を表す。6匹の成犬（9～13kgのビーグル犬）に、複数部位法を使って約1.6または約2.8 mg/kgのプラスミドを注射した後、6針アレイ電極を使ってエレクトロポレーションを行った。これらの研究ではDNAをポリ-L-グルタメート（6mg/mL）と共に製剤化した。イヌを2つの群に分割した。一方の群では、両後肢の大腿二頭筋、半膜様筋および前脛骨筋のそれぞれに1箇所ずつ合計6つの部位に分割して、合計18mgを筋肉内投与した。もう一つの群では、前肢および後肢の大腿二頭筋、半膜様筋、半腱様筋、外側広筋、前脛骨筋および上腕三頭筋の長頭にそれぞれ1箇所ずつ合計12の部位に、36mgのプラスミドを筋肉内投与した。各部位に投与した総液量は2.0mlである。各部位で、6.0mg/mlポリ-L-グルタメートと共に製剤化した2.0mlのプラスミド（1.5mg/ml）を注射した後、6針アレイ電極によるエレクトロポレーションを行った。6注射部位群および12注射部位群には一匹あたりそれぞれ18mgおよび36mgのプラスミドが注射された。図10Aは、血漿を集めてELISAで分析した結果を表す。値は平均値±SEMで、各群につきn=3である。

20

30

【0110】

12注射部位群および6注射部位群の平均値は、それぞれ36.1ng/ml（22日目）および27.2ng/ml（14日目）で頂点に達する（図10A）。上記2群の値は、12部位に注射した動物群における平均発現量が予想外に増加したことにより、22日目に分岐した。しかし22日目のこの群における発現レベルは14日目の発現レベルに比べて有意に高くはない。この特異点とは無関係に、28日目までには、どちらの群の発現レベルもバックグラウンドレベルと見分けがつかなくなった。

【0111】

発現したタンパク質に対する免疫応答

図10Bは、処置動物血清を一次抗体として使用した精製hF.IXのウェスタンブロットを表す。レーンAは分子量マーカーを表す。レーンBは陰性対照（すなわち非処置動物から得た血清）を表す。レーンCは陽性対照（すなわちウサギ抗hF.IX抗体を添加したイヌ血清）を表す。レーンDは6注射部位群の雌イヌから得た血清（hF.IXピーク発現量35.71ng/ml）によるhF.IXに対する免疫反応を表す。レーンEは12注射部位群の雄イヌから得た血清（hF.IXピーク発現量47.9ng/ml）によるhF.IXに対する免疫反応を表す。したがってウェスタンブロットによる分析から、イヌの血漿は精製hF.IXと交差反応する物質を含むことがわかった。これはヒトタンパク質に対する免疫応答と合致する（図10B）。

40

【0112】

さらに、クレアチニンキナーゼ（CK）レベルが一過性に増加して処置の2日後にピークに達し、処置の7日後までには正常レベルに戻ったことが、血清分析により明きらかとなり

50

、それは侵襲的6針アレイ電極を用いる遺伝子送達法には何らかの筋肉外傷が伴うことを示している。この応答は明らかに用量依存的であり、高用量（12注射部位）を投与した動物では6注射部位群の動物よりも3日目のピークCKレベルが高かった。様々な被注射筋肉の組織学的検査により、処置の約1ヶ月後に多少の筋肉損傷が明らかになった。ほとんどの場合、組織学的変化は認められないか、または筋細胞の喪失および浸潤する単球の徴候がみられる小さい病変部に限定されていた。稀に、注射部位が壊死組織になり、筋細胞の喪失を伴うこともあった。このタイプの損傷はキャリア電極を使用した場合にマウスでも処置後の早い時点（2週間）で観察されたが、筋肉は時間と共に正常な組織構造に回復した（非掲載データ）。特定の筋タイプが他の筋タイプより組織損傷を起こしやすいという徴候はなかった。

10

【0113】

発現は用量依存的である

イヌ筋肉におけるhF. IXの発現が用量依存的であることを立証するために、11週齢のイヌの左右後肢の大腿二頭筋および前脛骨筋を使って、遺伝子送達プロトコールを実行した。製剤化したプラスミドを各イヌの4部位（左右の前脛骨筋および左右の大腿二頭筋）に注射した。プラスミド濃度は3.0mg/mlとした。各部位に注射した液量は各群について0.12ml、0.36ml、0.60mlおよび1.2mlである。処置の7日後に分析（ピークレベル）用の血清を集めた。動物の体重の変動に関して規格化するために絶対的hF. IXレベルで表した（血液量をイヌの体重の7%と見積もることによって決定）。値は平均値±SEMであり、各群につきn=3である。値は1匹あたりの平均値±SEMであり、各群につきn=4である。血漿hF. IXレ

20

【0114】

本発明者らは、プラスミドを骨格筋に注射した後、直ちにエレクトロポレーションを行うことによって、マウスおよびイヌの血漿において治療上意味のあるレベルのhF. IX発現を達成した。

【0115】

hF. IX配列の最適化

上記の実験は、hF. IXをコードする天然ヒト核酸配列を有するプラスミドpFN0945（配列番号3および図17）を使って行った。ヒトへの遺伝子治療適用にpFN0945を用いてもよいが、コドン最適化mRNAのより高レベルな翻訳による、より高レベルな発現を望む場合は、hF. IXのコドン最適化配列が好ましいであろう。hF. IXのコドン最適化配列の一例は、配列番号4に記載し図18に示すプラスミドpFN1645である。

30

【0116】

実施例4：治療遺伝子の発現

非ウイルスエリスロポエチン（「EPO」）遺伝子の発現量を増加させるポリ-L-グルタメートの能力も検討した。定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）分析によると、ポリ-L-グルタメート中に製剤化したプラスミドは、食塩水/DNA製剤を投与した動物と比較して、mEPO DNAのレベルを少なくとも1logは増加させた。

40

【0117】

ポリマー製剤を用いたEPO発現

上述のように107bpの5'UTR、117bpの合成イントロン、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル、PUC12複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を含むValentisプラスミドバックボーンに、mEPOコード配列を挿入した。このmEPO遺伝子はCMVエンハンサー/プロモーターによって誘導された。結果として得られたmEPO遺伝子を含むプラスミドpEP1403の全配列を、配列表に配列番号2として記載し、そのプラスミド地図を図19に示す。プラスミドは大腸菌DH5⁺中で増殖させ、アルカリ溶解法およびクロモグラフィ法（chromographic method）を利用する独自の方法によって精製した（Abruzzese, R.V.ら（1999）Hum Gene Ther 10：1499-1507；この論文は参照により本明細書に包含される）。

50

【0118】

動物には15～50kDaポリ-L-グルタメート中または食塩水中に製剤化したCMV-mEPOを投与した。プラスミド製剤は各脛骨筋には25 μ l、各腓腹筋には50 μ lの量で各肢に筋肉内注射し、注射の2分後にエレクトロポレーション(375V/cm(113V/0.3cm)、2パルス、パルス長25msec)を行った。所定の時間間隔で、後眼窩法によって血液を採取し、ヘマトクリットレベルを決定するか、血清のEPOレベルをアッセイした。

【0119】

表示した時間に、全筋肉DNAを抽出し、そのレベルをqPCRによって以下のように定量した。マウス筋肉中のプラスミドDNA量は、先に述べたように、単離したDNA試料に対してTaqManリアルタイム定量PCR(Applied Biosystems(カリフォルニア州フォスターシティー))を実施することによって定量した(Mahato, R.I.ら, Hum. Gene Ther. 9, 2083-2099(1998))。PCRに使用したプライマーは5'非翻訳領域から合成を開始させるフォワードプライマーと、マウスEPOコード領域から合成を開始させるリバースプライマーである。プローブ配列はEPO遺伝子内に位置した。精製したCMV-mEPOプラスミドDNAを使ってPCRアッセイ用の検量線を作成した。図11に示すように、ポリ-L-グルタメート中の製剤は、エレクトロポレーション後に組織中に検出することができるプラスミドDNAの量を数倍増加させる。

【0120】

mEPO発現を決定するために、150ml中に75mgのpEP1403(配列番号2)を、脛骨筋1つあたり25 μ l、腓腹筋1つあたり50 μ lの量で、C57BL/6マウスに送達した。プラスミドは食塩水中または6mg/mLポリ-L-グルタメート中に製剤化した。図12および図13はmEPO発現を表す。また図12には、食塩水製剤またはポリ-L-グルタメート製剤を使ったエレクトロポレーションによるマウスEPO遺伝子の送達後のマウスにおけるヘマトクリットレベルも記載されている。

【0121】

図12および図13に示すように、ポリグルタメート製剤として送達すると、プラスミドDNAを食塩水に入れて送達した場合よりも発現されるタンパク質のレベルがかなり高くなる。ヘマトクリットを最も大きく増加させるために必要なエリスロポエチンはごく少量にすぎないので、図12に示す誘導されたヘマトクリットレベルは、食塩水製剤とポリグルタメート製剤の間で相違しない。しかし、ポリグルタメートを使用するとトランスフェクション効率が向上するので、ポリグルタメート製剤を使用すれば、DNAの投与量を減らすことができると考えられる。

【0122】

実施例5：治療遺伝子の発現

ポリマー製剤を用いたインターフェロンの発現

107bpの5'UTR、117bpの合成イントロン、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナル、PUC12複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を含むValentisプラスミドバックボーンに、hINF 2bコード配列を挿入した。このhINF 遺伝子はCMVエンハンサー/プロモーターによって誘導された。結果として得られたhINF 遺伝子を含むプラスミドpIF0921の全配列を、配列表に配列番号1として記載し、そのプラスミド地図を図20に示す。プラスミドは大腸菌DH5 α 中で増殖させ、アルカリ溶解法およびクロモグラフィー法(chromographic method)を利用する独自の方法によって精製した(Abruzzese, R.V.ら(1999) Hum Gene Ther 10: 1499-1507; この論文は参照により本明細書中に包含される)。

【0123】

発現解析のために、様々なDNA濃度(1.0mg/ml、0.1mg/mlおよび0.01mg/ml)を持つポリグルタメート中または食塩水中に調製した25 μ lのプラスミド製剤を両足の各脛骨筋に注射し、キャリパー電極を使って375V/cm、2パルス、各パルス25msの条件でエレクトロポレーションを行った。分析を行うために後眼窩採血法によって血清を集めた(4、7、14および30日目)。市販のELISA(Endogen)を使ってINF- γ レベルを決定した。図14AおよびBに示すように、DNA用量が5 μ gの場合も50 μ gの場合も、6mg/mlポリ-L-グルタメートと共に

製剤化したプラスミドを使用すると、CD-1マウスにおけるhINF- 発現量がかなり増加した。

【0124】

実施例6：ポリ-L-グルタメート中に製剤化したプラスミドDNAのヌクレアーゼ保護

プラスミドDNAをヌクレアーゼ消化から保護するポリ-L-グルタメートおよびPluronic F68の能力を決定するために実験を試みた。DNアーゼIはGibco/BRLから入手した（#18068-015）。ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム（2~15kDa）はSigmaから入手した。Pluronic F68はSpectrumから入手した。ポリマー/DNA 2×ストック溶液を調製した（Pluronic F68 = 10% F68中に200 µg/ml プラスミドDNA；ポリ-L-グルタメート = 12mg/ml ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム中に200 µg/ml プラスミドDNA）。1：10~1：10,000のDNアーゼ希釈液を1×DNアーゼ緩衝液に調製した。最終反応混合物は25 µlの製剤、15 µlの水、5 µlの10×DNアーゼ緩衝液および5 µlのDNアーゼを含み、これらの成分はここに挙げた順序で添加した。反応混合物を37 °Cで15分間インキュベートし、EDTAの添加によって反応を停止した後、ゲル電気泳動を行った。

10

【0125】

DNアーゼ保護アッセイの結果を図15に示す。パネルAは食塩水製剤中のDNAを表す。パネルBは5% Pluronic F68中に製剤化したDNAを表す。パネルCは6mg/ml ポリ-L-グルタメート中に製剤化したDNAを表す。レーンAは陰性対照（すなわちDNアーゼを含まないプラスミドDNA）を表す。レーンBは陽性対照（すなわち1：1に混合したプラスミドDNAおよびDNアーゼ）を表す。レーンC~Gは、食塩水（パネルA）、F68（パネルB）またはポリグルタメート（パネルC）と共に製剤化したDNAを1：1（レーンC）、1：10（レーンD）、1：100（レーンE）、1：1,000（レーンF）、および1：10,000（レーンG）に希釈したDNアーゼと混合した実験条件を表す。食塩水では、1：100のDNアーゼで、DNAの分解によってゲル上に様々な分子量のスミアを生じると共に、下部のスーパーコイルプラスミドバンドを消失させることができる。これに対し、ポリ-L-グルタメートおよびPluronic F68はどちらも、1：100希釈液でのDNアーゼ分解に対する保護を与えることができた。

20

【0126】

実施例7：ポリ-L-グルタメート中に製剤化したDNAの長期生物学的安定性

ポリ-L-グルタメート（15~50kDa）/DNA液体製剤の安定性を評価するための実験も試みた。

30

【0127】

動物：

108匹のCD-1マウス（29~31g）をCharles River Labsから入手した。マウスは、実験動物資源（Laboratory Animal Resource：LAR）施設のマイクロアイソレーター（マウス10匹/隔離飼育器）で飼育され、12/12時間の昼/夜周期、室温72 °F（23 °C）および湿度40%で維持された。飼料（Purina齧歯類用飼料）および水を適宜給餌した。ケタミン（74.0mg/ml）、キシラジン（3.7mg/ml）およびアセプロマジン（0.73mg/ml）の混合物からなる混合麻酔薬を1.8~2.0ml/kgの投与量でIP投与した。

【0128】

処置群および投与経路：

マウスを無作為に6匹/群（脛骨筋）または5匹/群（腓腹筋）の処置群に分割した。脛骨筋群には、25 µlの下記製剤を各脛骨筋に注射した（すなわちマウス1匹あたりの総液量は50 µl）。腓腹筋群には、50 µlの下記製剤を各腓腹筋に注射した（すなわちマウス1匹あたりの総液量は100 µl）。

40

【0129】

製剤

製剤は150mM NaCl、5mM トリス-HCl（pH7.5）中に調製した。1mg/mlのSEAPコードプラスミドpAP1166.157を使用した。プラスミドおよびポリ-L-グルタメート（15~50kDa）を以下のように製剤化した。

【表1】

50

製剤	pDNA 濃度(mg/ml)	塩	ポリ-L-Glu	緩衝液
A	1.0	150mM	6.0mg/ml	5mM トリス/pH7.5
B	0	150mM	6.0mg/ml	5mM トリス/pH7.5

【0130】

液体製剤の場合、インピボ試験（CD-1マウスの腓腹筋および脛骨筋での試験）およびQC解析に使用する直前に、同じ貯蔵条件のA（0.5ml）とB（1.5ml）を混合（凍結乾燥試料の場合は水で再水和して混合）した。混合物の最終DNA濃度は0.25mg/mlだった。各A_n/B_n対を8、21、60および105日目に試験した。対照として、0.5mlのAと1.5mlのBとからなる新鮮な試料を、各時点毎に試験した。新鮮な裸のDNA対照として、0.5mlのA（ポリ-L-グルタメートを含まないA）と1.5mlのB（ポリ-L-グルタメートを含まないB）とからなる試料を、各時点毎に試験した。

10

【0131】

図16に結果を示す凍結乾燥/貯蔵条件は以下の通りとした：

【表2】

群	物理的貯蔵条件	温度
A	凍結乾燥（凍結乾燥サイクルの完了直後に試験した試料については貯蔵期間なし）	+4℃
B	液体	-20℃
C	液体	+4℃
D	液体	+25℃
E	液体	+37℃
F	液体	+50℃
G	2日目、4日目（該当する場合はさらに10、17、24、31、38、45、52および59日目に液体/冷凍庫で貯蔵/融解/凍結サイクル	-20℃
H	新鮮なDNA/pGlu	
I	新鮮な裸のDNA	

20

30

40

【0132】

図16は最終105日時点での結果を表し、様々な貯蔵条件でのDNAの生物学的活性を示している。図16に示すように、ポリ-L-グルタメート中に製剤化した1mg/mlのプラスミドDNAは、溶液状態で室温にて3ヶ月以上安定である。ポリ-L-グルタメートは、凍結融解および凍結乾燥中もDNAを分解から保護した。

【0133】

本発明が、上記の目的を実行し、上記のそしてそれらに固有の目標および利点を達成するのに適していることは、当業者には容易に理解されるだろう。本明細書に記載する分子複合体および方法、手法、処置、分子、具体的化合物は、現時点で好ましい実施態様を代表

50

するものであり、典型例であって、本発明の範囲の限定を意図するものではない。上述した態様の変更および他の用法であって特許請求の範囲が規定する本発明の精神に包含されるものが、当業者には見いだされるだろう。

【0134】

本明細書に開示した発明に、本発明の範囲および精神から逸脱することなく様々な置換および変更を施しうことは当業者にはすぐにわかるだろう。

【0135】

本明細書で言及した特許および刊行物は全て、本発明が属する技術分野の当業者のレベルを示している。特許および刊行物は全て、個々の刊行物について参照によって組み込まれる旨を明示的かつ個別的に表示した場合と同様に、参照により本明細書中に包含される。

10

【0136】

本明細書に実例を挙げて説明した発明は、本明細書に明示されていない1または複数の要素もしくは限定を欠く状態で適切に実施されるかもしれない。本明細書で使用した用語および表現は限定ではなく説明を目的とするものであり、そのような用語および表現の使用に、上記の特徴またはその一部の均等物を排除する意図はなく、本願発明には様々な変更態様が包含されると理解される。したがって、本発明を好ましい態様および随意の特徴について詳しく開示したが、当業者は本明細書に開示した概念の変更および変形に頼ることができ、そのような変更および変形は特許請求の範囲が規定する本発明の範囲に包含されるとみなされることを理解すべきである。

【0137】

20

先の記述で参照によって本明細書に組み込まれていない文献は、特許文献であれ非特許文献であれ、ここに参照により本明細書に明示的に組み込まれるものとする。他の実施態様は特許請求の範囲に包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 SEAP pDNA/空DNA混合物をCD-1マウスの前脛骨筋に注射し、エレクトロポレーションを行なった後7日目の血清SEAP濃度を表す図。様々な量のSEAP pDNAと(コードpDNAに対して過剰の)空pDNAを投与した。

【図2】 裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNA/アニオン性ポリマー混合物を50 μ lに2.5 μ g(一肢あたりの用量はこの半分)のDNA濃度でCD-1マウスの前脛骨筋に注射しエレクトロポレーションを行なった後7日目の血清SEAP濃度を表す図。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。

30

【図3】 裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNA/アニオン性ポリマー混合物をCD-1マウスの前脛骨筋に注射し、エレクトロポレーションを行った後7日目の血清SEAP濃度を表す図。一匹あたりのSEAP pDNAの投与量は(特に示さない限り)通例、50 μ lに25 μ g(一肢あたりの用量はこの半分)とした。

【図4】 裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNA/アニオン性ポリマー混合物をCD-1マウスの腓腹筋に注射し、その組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清SEAP濃度を表す図。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。

【図5】 (A) CD-1マウスの前脛骨筋または(B) CD-1マウスの腓腹筋に、表示のとおり様々な製剤を使って注射したSEAP pDNA量の関数として、7日目の血清SEAP濃度を表す図であり、裸のSEAP pDNAまたはSEAP pDNAと6.0mg/mlのポリ-L-グルタミン酸との混合物を比較している。

40

【図6】 食塩水中に製剤化したプラスミドDNAおよびポリグルタミン酸中に製剤化したプラスミドDNAの直接心筋内注射後のルシフェラーゼ発現を表す図。

【図7】 C57BL/6マウスの脛骨筋に裸のhF. IX pDNAまたはhF. IX pDNA/ポリ-L-グルタミン酸混合物を注射し、その組織のエレクトロポレーションを行った後7日目の血清hF. IX濃度を表す図。注射した溶液中のアニオン性ポリマーの濃度はグラフに示すとおり様々である。

【図8】 免疫不全(SCIDページュ)マウスの血漿におけるhF. IX発現を表す図。

【図9】 SCIDマウス筋肉中のhF. IX発現筋細胞の免疫組織学および繊維タイプを表す図

50

。【図10】(A)異なる数の部位にプラスミドを筋肉内注射しエレクトロポレーションで増強した後のイヌにおける血漿hF.IXレベルをELISAによって決定したものを表す図。値は平均±SEMで、各群につきn=3である。(B)処置動物血清を一次抗体として使用した精製hF.IXのウェスタンブロットを表す図。レーンA、分子マーカー；レーンB、陰性対照血清；レーンC、陽性対照(ウサギ抗hF.IX抗体を添加したイヌ血清)；レーンD、6注射群の雌イヌから採取した血清(hF.IXピーク発現量35.71ng/ml)；レーンE、12注射群の雄イヌから採取した血清(hF.IXピーク発現量47.9ng/ml)。

【図11】食塩水製剤およびポリ-L-グルタミン酸製剤を使用し、エレクトロポレーションによって送達した後のマウスEPOプラスミドDNAの滞留時間を表す図。

10

【図12】食塩水製剤およびポリ-L-グルタミン酸製剤を使用し、エレクトロポレーションによってマウスEPO遺伝子を送達した後のマウスにおけるEPO発現およびヘマトクリットを表す図。

【図13】食塩水製剤およびポリ-L-グルタミン酸製剤を使用しエレクトロポレーションによってマウスEPO遺伝子を送達した後のマウスにおけるEPO発現の結果を3ヶ月間にわたって表す図。

【図14】食塩水に入れて送達した場合とポリグルタメートに入れて送達した場合のh1NF遺伝子の発現を比較した図。(A)は用量50μgのプラスミドDNAを使用した場合の結果を表し、(B)は用量5μgのプラスミドDNAを投与した結果を表す。

【図15】DNAをヌクレアーゼ分解から保護するポリ-L-グルタメート製剤およびポロキサマー(poloxamer)製剤の能力を表す図。パネルAは食塩水製剤中のDNAを表す。パネルBは5%プルロニックF68中に製剤化したDNAを表す。パネルCは6mg/mlポリ-L-グルタメート中に製剤化したDNAを表す。レーンA:DNアーゼを含まないプラスミドDNAの陰性対照。レーンB:プラスミドDNAとDNアーゼとを1:1に混合した陽性対照。レーンC:1:1に希釈したDNアーゼ；レーンD:1:10に希釈したDNアーゼ。レーンE:1:100に希釈したDNアーゼ。レーンF:1:1,000に希釈したDNアーゼ。レーンG:1:10,000に希釈したDNアーゼ。

20

【図16】6mg/mlポリ-L-グルタメート中に製剤化したSEAPをコードするプラスミドDNAの様々な貯蔵条件における長期生物学的安定性の結果を表す図。A:凍結乾燥し4で105日間貯蔵。B:液体製剤を凍結し-20で105日間貯蔵。C:液体を4で105日間貯蔵。D:液体を室温で105日間貯蔵。E:液体を37で105日間貯蔵。F:液体を50で8日間貯蔵。G:凍結/融解した液体製剤。H:ポリ-L-グルタメートで製剤化した新鮮なDNA。I:ポリ-L-グルタメートなしの新鮮なDNA。

30

【図17】hF.IXの遺伝子を運搬する発現プラスミド、pFN0945のプラスミド地図。このプラスミドの全配列を配列番号3に記載する。

【図18】hF.IXのコドン最適化遺伝子を運搬する発現プラスミド、pFN1645のプラスミド地図。このプラスミドの全配列を配列番号4に記載する。

【図19】マウスエリスロポエチン遺伝子を運搬する発現プラスミド、pEP1403のプラスミド地図。このプラスミドの全配列を配列番号2に記載する。

【図20】ヒトインターフェロンγ遺伝子を運搬する発現プラスミド、pIF0921のプラスミド地図。このプラスミドの全配列を配列番号1に記載する。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Valentis, Inc.
 <120> NUCLEIC ACID FORMULATIONS FOR GENE DELIVERY AND METHODS OF USE
 <130> 261/125
 <140> NOT YET ASSIGNED
 <141> HEREWITH
 <150> US 60/187,236 and US 60/261,751 10
 <151> 2000-03-03 and 2001-01-16
 <160> 4
 <170> Microsoft Word
 <210> 1
 <211> 3589
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> CDS 20
 <222> (768) ... (1334)
 <223> Expression plasmid pIF0921 encoding for human interferon alpha (768) ... (1334).
 <400> 1
 1 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc cccgcccatt
 61 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca
 121 atgggtggag tatttacggt aaactgocca ctggcgagta catcaagtgt atcatatgcc
 181 aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta
 241 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac
 301 catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 30
 361 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg
 421 ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggag gtaggcgtgt
 481 acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg
 541 ccattccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcgcccg
 601 ggaacgggtg attggaacgc ggattccccg tgttaattaa caggtaagtg tcttctcct
 661 gtttcttcc cctgctattc tgcacaacct tcctatcaga aactgcagta tctgtatttt
 721 tgctagcagt aataactaacg gttctttttt tctcttcaca ggccaccatg gacttgacct
 781 ttgctttact ggtggccctc ctgggtgaca gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgtg
 841 atctgactca aaccacagc ctgggtagca ggaggacctt gatgctctg gcacagatga
 901 ggagaatctc tctttctcc tgcttgaaga acagacatga ctttggattt cccagggagg 40

961 agtttggcaa ccagttccaa aaggctgaaa ceatccctgt cctccatgag atgatccagc
 1021 agatcttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag accctcctag
 1081 acaaatctta cactgaactc taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt gtgatacagg
 1141 gggtaggggt gacagagact cccctgatga aggaggactc cattctggct gtgaggaaat
 1201 acttccaaag aatcactctc tatctgaaag agaagaaata cagcccttgt gcctgggagg
 1261 ttgtcagagc agaaatcatg agatcttttt ctttgtcaac aaacttgcaa gaaagttaa
 1321 gaagtaagga atgaatctag aaaagccgaa ttctgcagga attgggtggc atccctgtga
 1381 cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt
 1441 cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactagggtg tcctctata atattatggg
 1501 gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag acaacctgta gggctcgagg
 1561 gggggcccg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc ttggcgtaat
 1621 catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct caccaattcca cacacatac
 1681 gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa
 1741 ttgcgttgcc ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat
 1801 gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttccctgc
 1861 tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg
 1921 cgtaatacag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa
 1981 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc
 2041 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagc
 2101 gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga
 2161 ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc
 2221 atagctcacg ctgtaggtat ctcaagctcg ttaggtcgtc tcgctccaag ctgggctgtg
 2281 tgcacgaacc ccccgctcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt
 2341 ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca
 2401 gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca
 2461 ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgetgaagcc agttaccttc ggaaaaagag
 2521 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtaggtttt tttgtttgca
 2581 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctaagg
 2641 ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg
 2701 gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccga agctcttcag
 2761 caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgcacacccc agccggccac
 2821 agtcgatgaa tcagaaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc
 2881 catgctcac gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt
 2941 cggctggcgc gagccctga tgcctctcgt ccagatcctc ctgatcgaca agaccggctt
 3001 ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag
 3061 ccgatcaag cgtatgcagc cgcgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag
 3121 gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc cggcacttc gcccaatagc agccagtccc
 3181 ttcccgcttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc
 3241 acgatagccg cgctgcctcg tcctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggctttga
 3301 caaaaagaac cgggcccctc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga
 3361 ttgtctgttg tgcccagtc tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg

10

20

30

40

3421 cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct tgatcagatc
 3481 ttgatcccct ggcctcatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg
 3541 gcttccaac cttaccagag ggccaattcg agcttgcacg cctgcaggt

<210> 2

<211> 3609

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> CDS

<222> (801) ... (1379)

<223> Expression plasmid pEP1403 encoding for mouse erythropoietin (801) ... (1379)

10

<400> 2

1 aattcgagct tgcacgctg caggctgcta cataacttac ggtaaatggc cgcctggct
 61 gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc
 121 caataggggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaacg gcccaacttg
 181 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat
 241 ggcccgccctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttccctact tggcagtaca
 301 tctacgtatt agtcacgctc attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 361 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 421 gtttgttttg gcacccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 481 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtcta tataagcaga gctcgtttag
 541 tgaaccgtca gatcgccctg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc
 601 gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcatttg aacgcggatt ccccggttta
 661 attaacagggt aagtgtcttc ctctgtttc cttcccctgc tattctgctc aaccttccca
 721 tcagaaactg cagtatctgt atttttgcta gcagtaatac taacggttct tttttctct
 781 tcacaggcca ccaagcttcc atgggggtgc ccgaaagccc caacctgctg ctgctgctct
 841 ccctgctgct gattcctctg ggccctccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgct
 901 acagtcgggt gctggagagg tacatccttg aggcacaagg ggcagaaaat gtcacgatgg
 961 gttgtgcaga aggtcccaga ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact
 1021 tctatgcttg gaaaagaatg gaggtggaag aacaggccat cgaagtgttg caaggcctgt
 1081 ccctgctcag cgaagccatc ctgcaggccc aggcctctgt ggccaattcc tcccagccac
 1141 cagagaccct gcagctgcat atcgacaaaag ccatacagtg tctgcgcagc ctcaactccc
 1201 tgctgcgggt gctgggagct cagaaggaac tgatgtcccc tccagatacc accccacctg
 1261 ctccactccg cacactcaca gtggataact tctgcaaget cttccgggtc tacgccaact
 1321 tcctccgggg gaaactgaag ctgtacacgg gagaggctct caggagaggg gacaggtgag
 1381 tctagaaaag ccgaattctg caggaattgg gtggcatccc tgtgacccct cccagtgcc
 1441 tctcctggcc ctggaagtg ccactccagt gccaccagc cttgtcctaa taaaattaag
 1501 ttgcatcatt ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atgggggtgga ggggggtgg

20

30

40

1561 atggagcaag gggcaagttg ggaagacaac ctgtagggct cgaggggggg cccggtacca
 1621 gcttttgttc cctttagtga gggttaattt cgagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt
 1681 ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa
 1741 agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgctctcac
 1801 tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
 1861 cggggagagg cggtttgctg attggcgct cttccgcttc ctgctcact gactcgtgct
 1921 gctcggctgt tcggctgctg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat
 1981 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca
 2041 ggaaccgtaa aaaggcggcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc
 2101 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccg gacaggacta taaagatacc
 2161 aggcgttttc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg
 2221 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta
 2281 ggtatctcag ttcgggtgtag gtcttctgct ccaagctggg ctgtgtgac gaacccccg
 2341 ttcagcccga ccgctcggcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc
 2401 acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
 2461 gcggtgctac agagtctctg aagtgtggtg ctaactacgg ctacactaga aggacagtat
 2521 ttggtatctg cgtctcgtg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat
 2581 ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc
 2641 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacggggtct gacgctcaga
 2701 agaactcgtc aagaaggcga tagaaggcga tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt
 2761 aaagcacgag gaagcggctc gccattcgc cccaagctc ttcagcaata tcacgggtag
 2821 ccaacgctat gtctgatag cggctcccca caccagccg gccacagtcg atgaatccag
 2881 aaaagcggcc attttccacc atgatattcg gcaagcagcc atcgcctatgc gtcacgacga
 2941 gatcctcgcg gtcgggcatg cgcgccttga gcctggcgaa cagttcggct ggcgcgagcc
 3001 cctgatgctc ttctccaga tcatcctgat cgacaagacc ggcttccatc cgagtaoctg
 3061 ctgctcgtat gcgatgttcc gcttgggtgg cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat
 3121 gcagccgccc cattgcatca gccatgatgg atactttctc ggcaggagca aggtgagatg
 3181 acaggagatc ctgccccggc acttcgcca atagcagcca gtcccttccc gcttcagtga
 3241 caacgtcgag cacagctcgc caaggaacgc ccgtcgtggc cagccacgat agcccgctg
 3301 cctcgtcctg cagttcattc agggcacccg acaggtcggc cttgacaaaa agaaccgggc
 3361 gccctcgcg tgacagccgg aacacggcgg catcagagca gccgattgtc tgttgtgccc
 3421 agtcatagcc gaatagcctc tccaccaag cggccggaga acctgctgct aatccatctt
 3481 gttcaatcat gcgaaacgat cctcatcctg tctcttgatc agatcttgat cccctgccc
 3541 atcagatcct tggcggcaag aaagccatcc agtttacttt gcagggcttc ccaaccttac
 3601 cagagggcg

10

20

30

<210> 3
 <211> 4496
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220> CDS
 <222> (782) ... (2167)
 <223> Expression plasmid pFN0945 having natural sequence
 encoding human coagulation factor IX

<400> 3

```

1 ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc goctggctga cgcaccaacg acccccgccc
61 attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg
121 tcaatgggtg gagtatattac ggtaaactgc ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat
181 gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaattgg cccgcctggc attatgccc
241 gtacatgacc ttatgggact ttctactctg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat
301 taccatcatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc
361 acgggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgttt ggcaccaaaa
421 tcaacggggac ttcccaaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc ttgacgcaaa tgggoggtag
481 gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg
541 gagacgccat ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg
601 cggccgggaa cgggtgcattg gaacgoggat tccccgtgtt aattaacagg taagtgtctt
661 cctcctgttt ccttccccctg ctattctgct caaccttctc atcagaaact gcagtatctg
721 tatttttctg agcagtaata ctaacgggtc ttttttctc ttcacaggcc acactggatc
781 catgcagcgc gtgaacatga tcatggcaga atcaccaggc ctcatcaca tctgcctttt
841 aggatatacta ctacgtgctg aatgtacagt ttttcttgat catgaaaaacg ccaacaaaat
901 tctgaatcgg ccaaagaggat ataattcagg taaattggaa gagtttgctc aagggaacct
961 tgagagagaa tgtatggaag aaaagtgtag ttttgaagaa gcacgagaag tttttgaaaa
1021 cactgaaaga acaactgaat tttggaagca gtatgttgat ggagatcagt gtgagtccaa
1081 tccatgtttt aatggcggca gttgcaagga tgacattaat tccatgaat gttggtgtcc
1141 ctttggattt gaaggaaaga actgtgaatt agatgtaaca tgtaacatta agaatggcag
1201 atcgagcag ttttgtaaaa atagtgtctg taacaagggtg gtttgctcct gtactgaggg
1261 atatgcactt gcagaaaacc agaagtcctg tgaaccagca gtgccatttc catgtggaag
1321 agtttctggt tcacaaaactt ctaagctcac ccgtgctgag actgtttttc ctgatgtgga
1381 ctatgtaaat totactgaag ctgaaaccat tttggataac atcactcaaa gcacccaatc
1441 atttaatgac ttcactcggg ttgttgggtg agaagatgcc aaaccaggtc aattccottg
1501 gcaggttggt ttgaaatggt aagttgatgc attctgtgga ggctctatcg ttaatgaaaa
1561 atggattgta actgctgcc actgtgttga aactgggtgtt aaaattacag ttgtcgcagg
1621 tgaacataat attgaggaga cagaacatac agagcaaaag cgaaatgtga ttcgaattat
1681 tccacaccac aactacaatg cagctattaa taagtacaac catgacattg ccctctgga
1741 actggacgaa cccttagtgc taaacagcta cgttacacct atttgcattg ctgacaagga
1801 atacacgaac atcttctcoa aatttggatc tggctatgta agtggctggg gaagagtctt
1861 ccacaaaggg agatcagctt tagttcttca gtacottaga gttccacttg ttgacggagc
1921 cacatgtctt cgatctacaa agttcaccat ctataacaac atgttctgtg ctggcttoca
1981 tgaaggagggt agagattcat gtcaaggaga tagtggggga ccccatgtta ctgaagtgga
2041 agggaccagt ttcttaactg gaattattag ctggggtgaa gagtgtgcaa tgaaggcaaa

```

2101 atatggaata tataccaagg tatcccggta tgtcaactgg attaaggaaa aaacaaagct
 2161 cacttaataa tctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc
 2221 tgttgtttgc ccctcccccg tgcccttcctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct
 2281 ttccataataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg
 2341 ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcagctggt
 2401 ggatgcgggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct cgagcatgca
 2461 agcttcgagg gggggcccgg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc
 2521 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca
 2581 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa
 2641 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag
 2701 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc
 2761 gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcttccggc tgcggcgagc ggtatcagct
 2821 cactcaagg cggaataac gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg
 2881 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgcttgc ggcgtttttc
 2941 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga
 3001 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct
 3061 cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctccctc ggaagcgtg
 3121 gcgctttctc atagctcacg ctgtagggtat ctcaagtccg tgtaggctgt tcgctccaag
 3181 ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgct gcgccttate cggtaactat
 3241 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac
 3301 aggattagca gagcgggta tgtaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac
 3361 tacggctaca ctagaaggac agtatattgtt atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc
 3421 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt
 3481 tttgtttgca agcagcagat tacgocgaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc
 3541 ttttctacgg ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgccc
 3601 tgogaatcgg gagcggcgat accgtaaacg acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccga
 3661 agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgcacacccc
 3721 agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatctt ccaccatgat attcggcaag
 3781 caggcatcgc catgcgtcac gacgagatcc tcgcccgtcg gcatgcgccc cttgagcctg
 3841 gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca
 3901 agaccggcct ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgagat gtttcgcttg gtggtcgaat
 3961 gggcaggtag ccgatcaag cgtatgcagc cggccattg catcagccat gatggatact
 4021 ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc
 4081 agccagtccc tccccgcttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc
 4141 gtggccagcc acgatagccg cgtgcctcgt tctgcagtt cattcagggc accggacagg
 4201 tcggtcttga caaaaagaac cgggcccggc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca
 4261 gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc
 4321 ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tctgtctct
 4381 tgatcagatc ttgatccctc gcgcatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt
 4441 actttgcagg gcttcccaac cttaccagag ggcgaaatcg agcttgcabg cctgca

10

20

30

<210> 4
 <211> 4276
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220> CDS
 <222> (786) ... (2171)
 <223> Expression plasmid pFN1645 having codon optimized
 sequence encoding for human coagulation factor IX
 (786) ... (2171).

10

<400> 4
 1 ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgccc
 61 attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcc aataggactt tccattgacg
 121 tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat
 181 gccaaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca
 241 gtacatgacc ttatgggact ttctactctg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat
 301 taccatgcat ggtgatgagg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact
 361 cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gagtttgatt tggcaccaaa
 421 atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaca actccgccc attgacgcaa atgggcggta
 481 ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgct
 541 ggagacgcca tccacgctgt ttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc
 601 gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttcccctgt taattaacag gtaagtgtct
 661 tcctcctggt tccttcccct gctattctgc tcaaccttc tatcagaaac tgcagtatct
 721 gtatttttgc tagcagtaat actaacggtt ctttttttct cttcacaggc cacactggat
 781 ccaccatgca gagggtgaa atgatcatgg cagaatccc aggcctcctc accatctgcc
 841 tgcgtgggata tctgctcagt gctgaatgta cagtgtttct ggatcatgaa aatgccaaaa
 901 aaattctgaa tgggccaag agatataatt ctggcaaac ggaagagttt gtgcaagggg
 961 acctggagag agaattgatg gaagaaaagt gtagttttga agaagcacgg gaagtgtttg
 1021 aaaacactga aagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggatggagat caatgcgagt
 1081 ccaatccatg tctgaatggg ggcagttgca aggatgacat taattcctat gaatgtttgt
 1141 gtcccttttg atttgaagga aagaactgtg aactggatgt gacatgtaac attaagaatg
 1201 gcagatgtga gcagttttgt aaaaatagtg ctgataacaa ggtggtgtgc tcctgtactg
 1261 agggatatcg cctggcagaa aaccagaagt cctgtgaacc agcagtgcc tttccatgtg
 1321 gaagagtgtc tgtgtcccaa acttctaagc tcacocgggc tgaggctgtg tttcctgatg
 1381 tggactatgt caattctact gaagctgaaa ccattctgga taacatcact caaagcacc
 1441 aatcctttaa tgacttcaact cgggtggtgg gtggagaaga tgccaaaoca ggtcaattcc
 1501 catggcaagt ggtcctgaat ggcaagtgg atgcattctg tggaggctct atcgtcaatg
 1561 aaaaatggat tgtgactgct gccactgtg tggaaactgg tgtcaaaatt acagtgggtg
 1621 caggcgaaca taatattgag gagacagaa atacagagca aaagcggaat gtgattcgca
 1681 ttattcctca ccacactac aatgcagcta ttaataagta caaccatgac attgccctgc

20

30

40

1741 *tggaactgga tgaacccctg gtgctgaaca gctatgtgac acctatattgc attgctgaca*
 1801 *aggsatacac caacatcttc ctoaaatttg gatctggcta tgtcagcggc tggggaagag*
 1861 *tcttccacaa agggagatct gctctggcc tgcagtacct gagagtcca ctgggtggacc*
 1921 *gggcacatg tctccgctct acaaagtca ccatctataa caacatgttc tgtgctggat*
 1981 *tccatgaagg aggtagagat tcoctgtcaag gagatagtgg gggaccccat gtcactgaag*
 2041 *tggaaaggac cagtttccctg actggaatta ttagctgggg tgaagagtgt gcaatgaaag*
 2101 *gcaaatatgg aatctatacc aagggtgcc gctatgtcaa ctggattaag gaaaaacaa*
 2161 *agctcactta atgactctag aaaagccgaa ttctgcagga attgggtggc atccctgtga*
 2221 *cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt*
 2281 *cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactaggtg tccttctata atattatggg*
 2341 *gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag acaacctgta gggctcgagg*
 2401 *gggggcccgg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc ttggtcttcc*
 2461 *gcttccctgc tcactgactc gctgcgctcg gtcggtcggc tgcggcggc ggtatcagct*
 2521 *cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg*
 2581 *tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaag cgcggttgct ggcgtttttc*
 2641 *cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga*
 2701 *aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct*
 2761 *cctgttccga ccoctgcgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgtg*
 2821 *gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag*
 2881 *ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttctc cggttaactat*
 2941 *cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac*
 3001 *aggattagca gagcagggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac*
 3061 *tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc*
 3121 *ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt*
 3181 *tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc*
 3241 *ttttctacgg ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc*
 3301 *tgcaaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccga*
 3361 *agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc*
 3421 *agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccacatgat attcggcaag*
 3481 *caggcatcgc catgcgtcac gacgagatcc tcgcccgcgg gcatgcgcgc cttgagcctg*
 3541 *gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga tgcctctcgt ccagatcctc ctgatcgaca*
 3601 *agaccggcct ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttccgctt gtggtcgaat*
 3661 *gggcaggtag ccgatcaag cgtatgcagc cgcgcattg catcagccat gatggatact*
 3721 *ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc*
 3781 *agccagtccc ttcccgtctc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc*
 3841 *gtggccagcc acgatagccg cgtgcctcog tcoctgcagt cattcagggc accggacagg*
 3901 *tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca*
 3961 *gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc*
 4021 *ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct*
 4081 *tgatcagatc ttgatcccct gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt*
 4141 *actttgcagg gcttcccaac ottaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgtt*

10

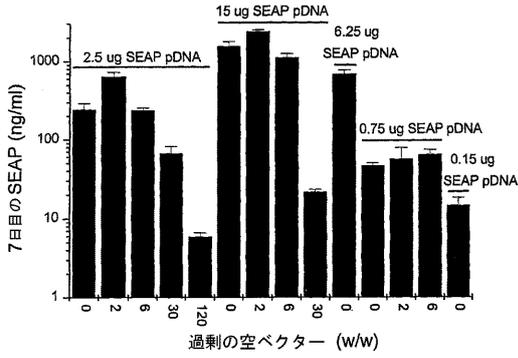
20

30

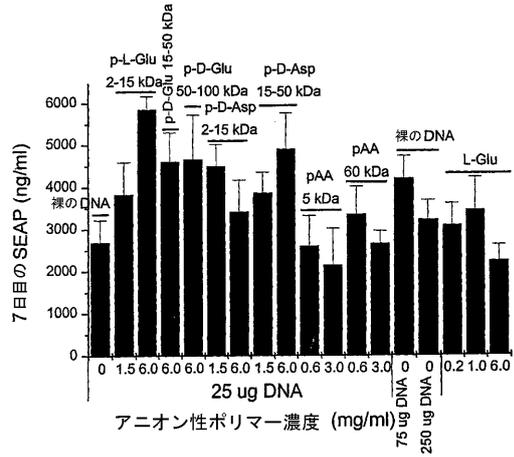
40

4201 *gctgtccata aaaccgcca gtctagcaac tgttgggaag ggcggggctg caggaattcg*
 4261 *agcttgcgatg cctgca*

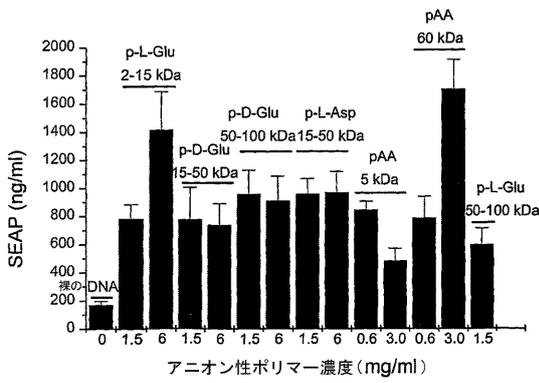
【 図 1 】



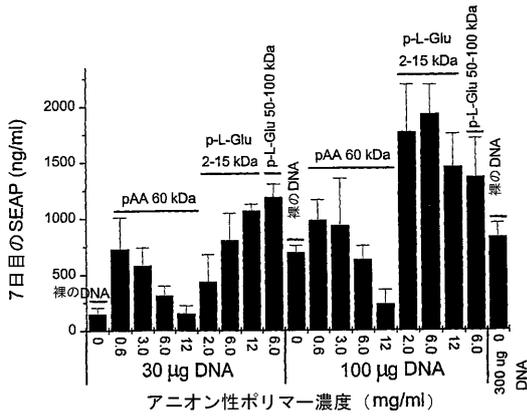
【 図 3 】



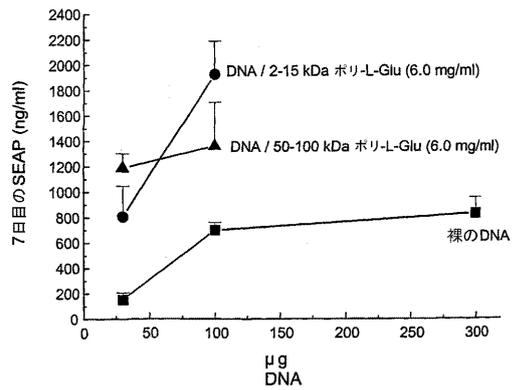
【 図 2 】



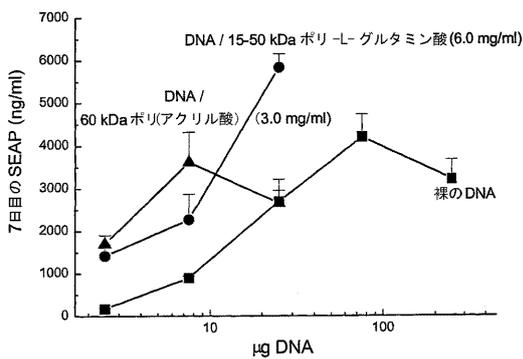
【 図 4 】



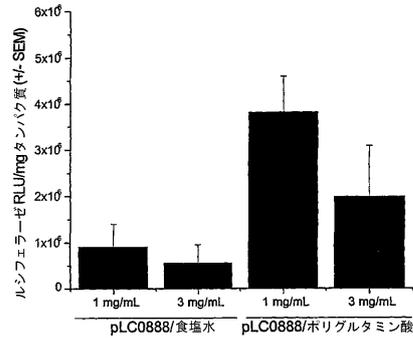
【 図 5 B 】



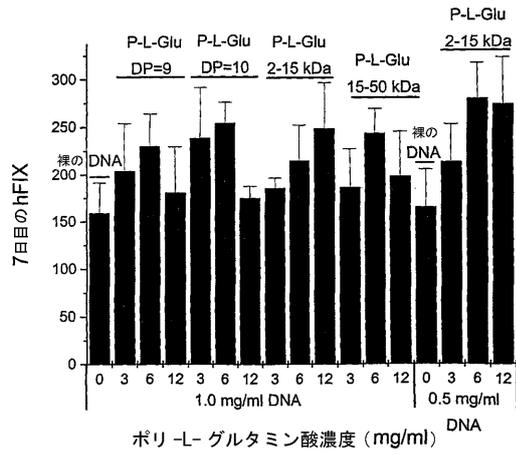
【 図 5 A 】



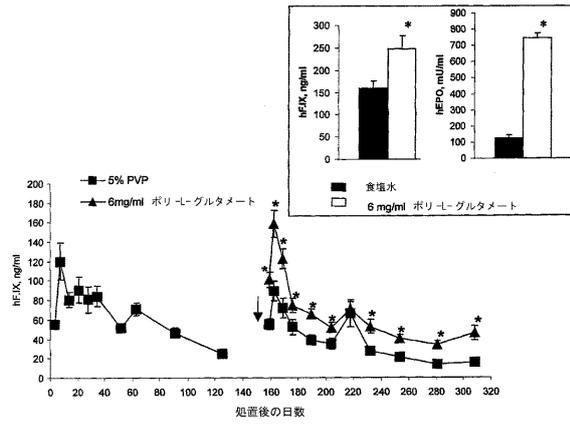
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

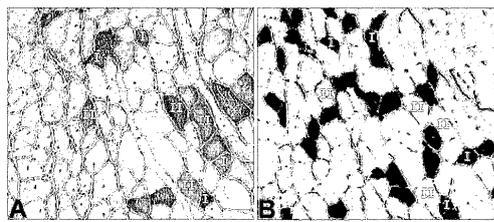
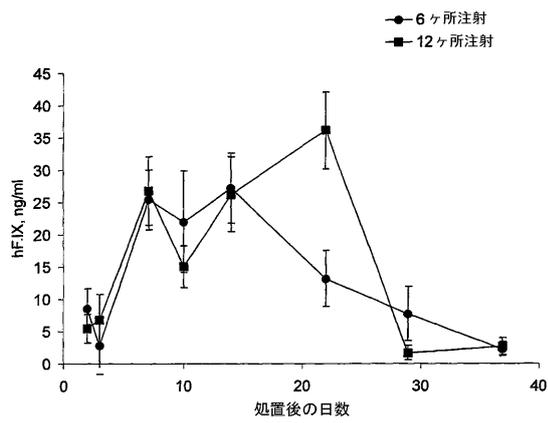


Fig. 9

【 図 10 A 】



【 図 10 B 】

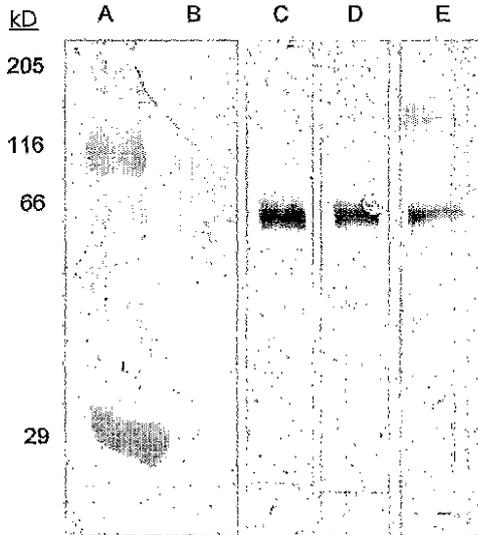
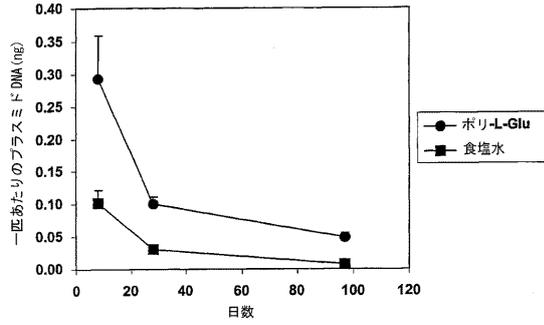
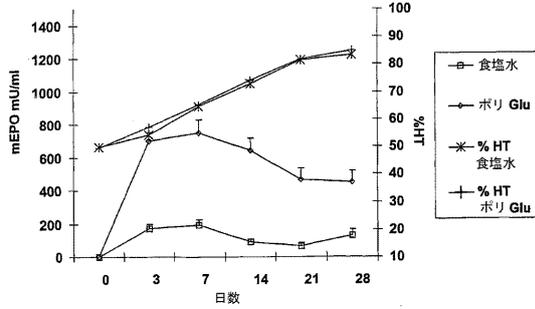


Fig. 10B

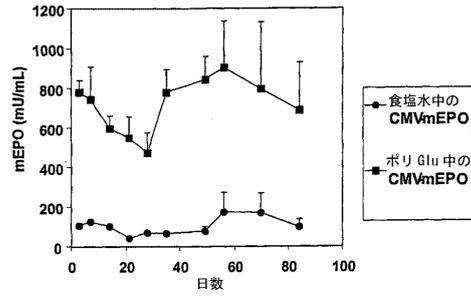
【 図 1 1 】



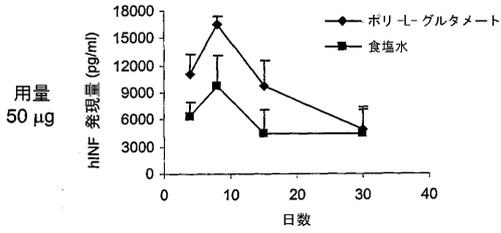
【 図 1 2 】



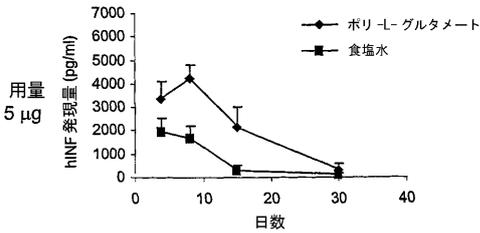
【 図 1 3 】



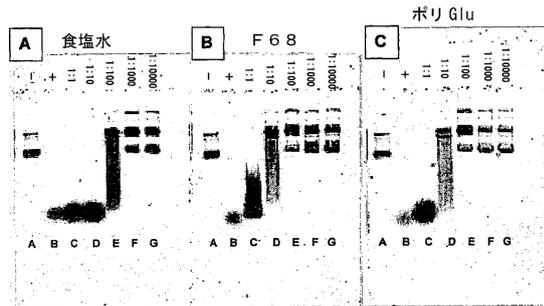
【 図 1 4 A 】



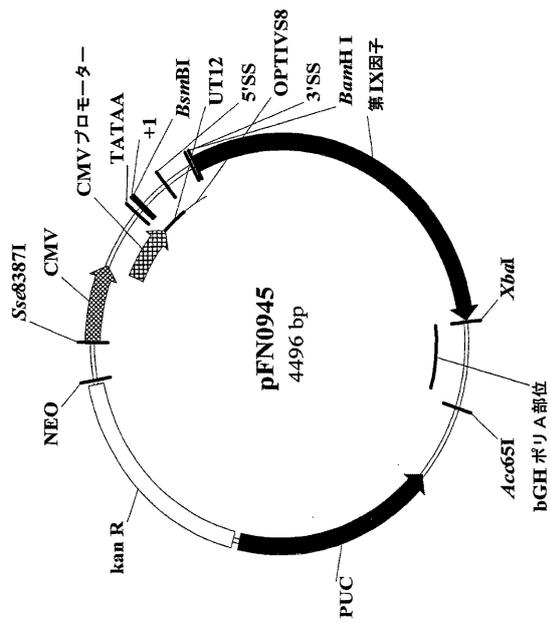
【 図 1 4 B 】



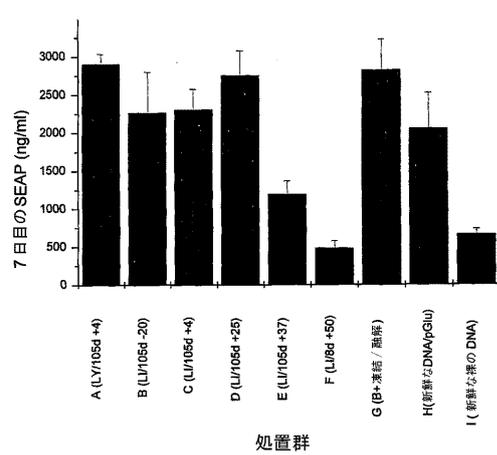
【 図 1 5 】



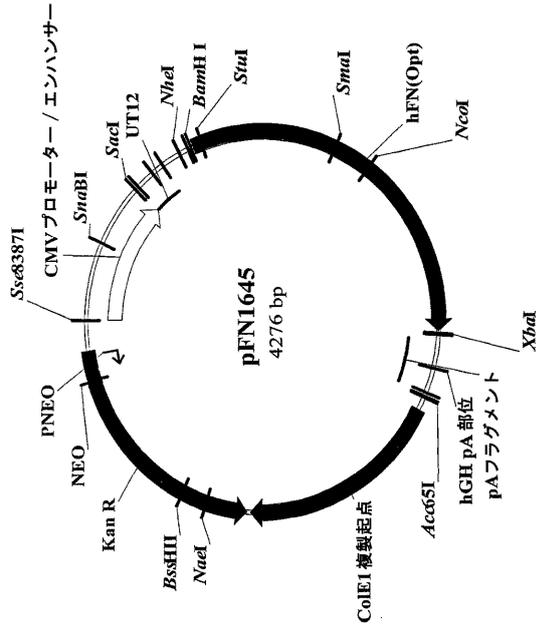
【 図 1 7 】



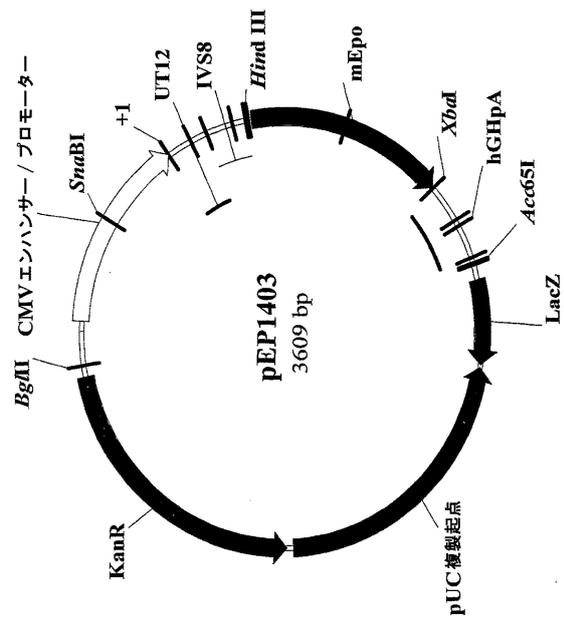
【 図 1 6 】



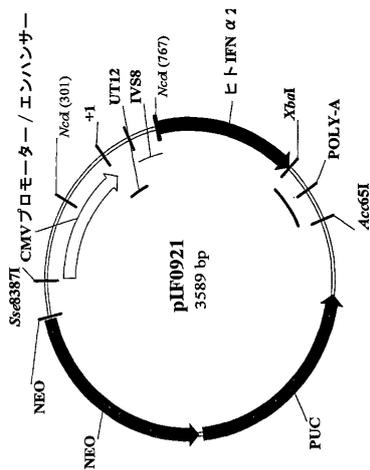
【 図 18 】



【 図 19 】



【 図 20 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 47/36 (2006.01) A 6 1 K 47/36

- (72)発明者 ジェイソン・ジー・フューエル
 アメリカ合衆国77381テキサス州ザ・ウッドランズ、ファイアウィロー・プレイス26番
- (72)発明者 フィオナ・マクローリン
 アメリカ合衆国77098テキサス州ヒューストン、ブラナード・ナンバー3、2010番
- (72)発明者 ルイス・シー・スミス
 アメリカ合衆国77098テキサス州ヒューストン、サウス・ブルバード2339番
- (72)発明者 フランソワ・ニコル
 フランス、エフ-67082ストラスブル・セデックス、リュ・ドゥ・モルスアイム11番
- (72)発明者 アラン・ロラン
 アメリカ合衆国77381テキサス州ザ・ウッドランズ、ドリフトオーク・サークル22番

審査官 中尾 忍

- (56)参考文献 特表平11-502507(JP,A)
 佐藤智典 外1名, 綜説 『DNA複合体を用いる細胞内遺伝子導入法の開発とアンチセンス医薬品への応用』, 日本臨床, 日本, 1996年10月, 第54巻, 第10号, P.235-244
 Levy,M.Y. et al., Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood, Gene Ther., 1996年 3月, Vol.3, No.3, P.201-211

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 48/00
 A61K 47/26
 A61K 47/30
 A61K 47/32
 A61K 47/34
 A61K 47/36
 A61K 48/00
 A61K 47/26
 A61K 47/30
 A61K 47/32
 A61K 47/34
 A61K 47/36

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)