

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-6336

(P2006-6336A)

(43) 公開日 平成18年1月12日(2006.1.12)

|                                |  |         |       |             |
|--------------------------------|--|---------|-------|-------------|
| (51) Int.Cl.                   |  | F I     |       | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 P</b> 21/08 (2006.01) |  | C 1 2 P | 21/08 | 4 B O 2 4   |
| <b>C O 7 K</b> 16/18 (2006.01) |  | C O 7 K | 16/18 | 4 B O 6 4   |
| <b>C 1 2 N</b> 15/02 (2006.01) |  | C 1 2 N | 15/00 | 4 H O 4 5   |

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 21 頁)

|              |                              |          |                       |
|--------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2005-201595 (P2005-201595) | (71) 出願人 | 502221282             |
| (22) 出願日     | 平成17年7月11日 (2005.7.11)       |          | インヴィトロジェン コーポレーション    |
| (62) 分割の表示   | 特願平7-501040の分割               |          | アメリカ合衆国 カリフォルニア 920   |
| 原出願日         | 平成6年5月31日 (1994.5.31)        |          | 08, カールスバッド, ファラデー アベ |
| (31) 優先権主張番号 | 08/069, 720                  |          | ニュー 1600              |
| (32) 優先日     | 平成5年6月1日 (1993.6.1)          | (74) 代理人 | 100062144             |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          | 弁理士 青山 稔              |
|              |                              | (74) 代理人 | 100068526             |
|              |                              |          | 弁理士 田村 恭生             |
|              |                              | (72) 発明者 | ジョエル・エイ・ジェシー          |
|              |                              |          | アメリカ合衆国21771メリーランド、   |
|              |                              |          | マウント・エアリー、オールド・ナショナル・ |
|              |                              |          | ル・パイク4139番            |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性脂質による遺伝子免疫

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】カチオン性脂質およびポリヌクレオチドを含む遺伝子材料を用いた免疫法を提供する。

【解決手段】非ヒト動物において免疫原に対するポリクローナル抗体を製造する方法であって、(a)少なくとも1種のカチオン性脂質を免疫原をコードするポリヌクレオチドと混合してカチオン性脂質-ポリヌクレオチド複合体を形成させ、(b)該脂質-ポリヌクレオチド複合体を動物に腹腔内または鼻内投与し、ついで(c)該動物からポリクローナル抗体を単離することを特徴とする方法、および；タンパク質分子のエピトープをマッピングする方法の提供。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非ヒト動物において免疫原に対するポリクローナル抗体を製造する方法であって、  
(a) 少なくとも 1 種のカチオン性脂質を免疫原をコードするポリヌクレオチドと混合してカチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体を形成させ、  
(b) 該脂質 - ポリヌクレオチド複合体を動物に腹腔内または鼻内投与し、ついで  
(c) 該動物からポリクローナル抗体を単離する  
ことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

(a) 少なくとも 1 種のカチオン性脂質を、免疫原をコードする DNA 配列を含むポリ  
ヌクレオチドと混合して脂質 - ポリヌクレオチド複合体を形成させ、 10  
(b) 該脂質 - ポリヌクレオチド複合体を少なくとも 1 のマウスに投与し、  
(c) 該免疫したマウスから B リンパ球を取り出し、  
(d) 該免疫したマウスからの B リンパ球をミエローム細胞と融合させてハイブリドーマ  
を生成させ、  
(e) 該ハイブリドーマをクローニングし、  
(f) 抗免疫原抗体を産生する陽性クローンを選択し、  
(g) 該抗免疫原抗体を産生するクローンを培養し、ついで  
(h) 抗免疫原抗体を培養液から単離する  
ことを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法。 20

## 【請求項 3】

タンパク質分子のエピトープをマッピングする方法であって、  
(a) 該タンパク質分子をコードする DNA 分子をランダムに断片化し、  
(b) これら DNA 断片を発現ベクター中にサブクローニングし、  
(c) 少なくとも一つのカチオン性脂質を各発現ベクターサブクローンと混合して各発現  
ベクターサブクローンとのカチオン性脂質 - 発現ベクター複合体を生成させ、  
(d) 該カチオン性脂質 - 発現ベクター複合体をマウスに投与し、ついで  
(e) どの DNA 断片がマウスにおいて抗体を産生させることができるかを決定する  
ことを特徴とする方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、免疫学の技術分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、カチオン性脂質および免疫原をコードするポリヌクレオチド分子からなる組成物を用いた免疫方法に関する。本発明はまた、遺伝子で免疫した動物からポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を製造する方法にも関する。本発明はさらに、タンパク質エピトープのマッピングのための遺伝子免疫の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来の免疫法は、侵入してきた病原体と免疫反応する抗体の混合物を注射するか（すなわち受動免疫）、免疫系を刺激して病原体特異的な抗体を産生させるワクチンによって行われている。外来性の抗体は受容者によって排除されるので、受動免疫は一時的な防御を提供するにすぎない。ワクチンは一層長期間持続する能動免疫を与える。

40

## 【0003】

ワクチンが有効であるためには、ワクチンによって体液性および/または細胞媒体性の免疫が生起され、その後の対応病原体への暴露による疾患の発症を防ぐことができない。関連抗原決定基が天然の感染を擬態するような仕方で免疫系に呈示される必要がある。従来のウイルスワクチンは、不活化ビルレント株かまたは生きた弱毒化株からなる（非特許文献 1）。ウイルスを含むワクチンを用いることの一般的問題点は、多くの

50

ウイルス（Ｂ型肝炎ウイルスなど）は組織培養液中で高力価まで増殖するように適合することができず、そのため十分な量で産生することができないことである（非特許文献１）。加えて、不活化ウイルスの使用は、増殖の結果としてのワクチン関連疾患の潜在的可能性を提起する、すなわちコンピートなウイルスが接種物中に残存しているかもしれない。ヨーロッパにおける口蹄疫の発症は、このことが原因である（非特許文献１）。一方、弱毒化ウイルス株は、ワクチン中で複製する間にビルレントな表現型に逆戻りする可能性がある。この問題は、生ポリオワクチンを受けた１００万人当たりおよそ１回または２回生じていることが報告されている（非特許文献１）。さらに、弱毒化ウイルスによる麻疹免疫の後に脳炎が発症することがある（非特許文献２）。弱毒化株を用いることの他の欠点は、適当な冷貯蔵装置を維持するのが困難で費用がかかることである（非特許文献２）。生ウイルスワクチンを使用することに伴う主要な欠点は、先天的または後天的な免疫不全を有する個体が重篤な感染症への危険にさらされることである。そのような個体には、栄養不良および／またはウイルスもしくは寄生虫感染のためにしばしば免疫不全である開発途上国の子供が含まれる（非特許文献１、非特許文献２）。

10

20

30

#### 【０００４】

分子生物学およびペプチド合成における近年の進歩の結果、免疫予防に使用するために精製ウイルスタンパク質または合成ペプチドを製造することが可能である（非特許文献３）。精製抗原の製造は、当該病原体の表面抗原の免疫学的に重要なドメインを呈示するペプチドを合成することにより行うことができる。合成ペプチド法は、上記口蹄疫ウイルスの抗原決定基に用いられて成功している（非特許文献３）。この方法の一つの問題は、合成ペプチドの抗原性が不十分であるため、実験動物において免疫応答を促進するためにフロイントのアジュバントを使用する必要があることである（非特許文献３）。フロイントのアジュバントはヒトには使用できないため、ヒトへの使用にも有効なアジュバントを開発する必要がある（非特許文献３）。加えて、単一の抗原性部位は耐性を誘発するには充分ではない。というのは、大きな表面の抗原は、通常、体液性および／または細胞媒体性応答を引き起こす幾つかの異なる免疫学的ドメインを含むからである（非特許文献４、非特許文献５）。線状タンパク質分子の隣接しない部分によって形成されるエピトープに対する免疫応答を刺激することもまた困難である（非特許文献３）。タンパク質決定基の大部分は不連続であって一次アミノ酸配列では遠隔の位置にあるアミノ酸残基が関与するが、ペプチドの折り畳みによって隣接して併置されるようになるという証拠が存在する（非特許文献２）。

#### 【０００５】

ワクチン用タンパク質の製造の別法には、適当なベクター中に挿入したクローニングウイルスＤＮＡを使用することによって原核または真核細胞中でウイルスタンパク質を産生させることが含まれる（非特許文献６）。この方法もまた幾つかの制限を有する。たとえば、組換え宿主細胞によって目的組換えタンパク質を最適に産生させるための適当な条件を考案する必要がある。産生されたタンパク質は培養系から単離および精製する必要がある、ワクチンとして使用するために十分な量で得る必要がある。最後に、精製タンパク質の翻訳後修飾（グリコシル化および／または融合タンパク質の開裂など）を行う必要があるかもしれない。

40

#### 【０００６】

インビトロで組換え抗原を製造するための別法は、抗原をコードする核酸配列をワクチンの細胞中に導入することである。この方法では、抗原はワクチンの細胞によってインビボで産生され、免疫応答を引き起こす。タング（Tang）らは、ヒト成長ホルモンのゲノム配列を含有するプラスミドをコーティングした金のマイクロ投射物（microprojectiles）を投射する（propelling）ことにより、ヒト成長ホルモンに対する免疫応答をマウスで起こさせることが可能であることを示している（非特許文献７）。その結果得られる抗体産生の変動性は、マイクロ投射装置の操作またはマイクロ投射物へのＤＮＡのコーティングによるものであると仮定された。

#### 【０００７】

50

さらに最近では、ウルマー（Ulmer）らは、インフルエンザ A 核タンパク質の遺伝子を有するプラスミドをマウスの四頭筋中に注射した（非特許文献 8）。このマウスは核タンパク質抗体を産生したので該遺伝子がマウス細胞中で発現されたことが示された。このマウスはまた核タンパク質に特異的な細胞毒性の T リンパ球をも産生したが、該リンパ球はインフルエンザ A ウイルスの異種株によるその後の攻撃からマウスを防御するのに有効なものであった。同様に、ワング（Wang）らは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1 型のエンベロープ DNA 構築物のマウスへの筋肉内注射が抗原特異的な細胞性および体液性の免疫応答を生じさせることを観察した（非特許文献 9）。加えて、接種したマウスからの脾臓リンパ球は HIV - エンベロープ - 特異的な増殖性の応答を示した。それゆえ、病原体抗原をコードする DNA の直接接種は、ウイルス、タンパク質またはペプチドの使用にと

10

#### 【0008】

接種のために裸の DNA を使用することの一つの問題点は、細胞による取り込みの効率が低いことである。たとえば、上記ワングらのプロトコルによれば、 $100\mu\text{g}$  の DNA 構築物の 2 週間毎の注射を全部で 4 回接種する必要がある。本明細書に記載するように、DNA 構築物の担体としてのカチオン性脂質の使用は遺伝子免疫の一層効率的な手段を提供する。本発明によれば、遺伝子免疫はわずかに  $5\mu\text{g}$  の DNA 構築物（カチオン性脂質と複合体を形成）を用いて達成することができる。

#### 【0009】

リポソームは、組織培養細胞のトランスフェクションにおいて遺伝情報の担体として用いられている。中性またはアニオン性の脂質を含むリポソームを用いたリポソーム媒体トランスフェクションの基本的な問題点は、そのようなりポソームが一般に標的細胞表面と融合しないということである。融合する代わりにリポソームは食作用によって取り込まれ、ポリヌクレオチドはその後リソゾーム画分の分解酵素の作用に供される（非特許文献 10、非特許文献 11）。従来のリポソーム法の他の問題点は、DNA や RNA のような大きな巨大分子を収容するには通常のリポソームの水性空間では小さ過ぎることである。その結果、通常のリポソームは捕捉効率が低い（非特許文献 12）。

20

#### 【0010】

カチオン性脂質を含むリポソームは DNA や RNA などのポリアニオンと自発的かつ迅速に相互作用し、その結果、該ポリヌクレオチドを 100% 取り込んだリポソーム / 核酸複合体を生成する（非特許文献 13、非特許文献 14）。さらに、生成したポリカチオン性複合体は、負に荷電したまたは中性のリポソームに比べて約 10 倍から 100 倍の効率で組織培養細胞のアニオン性表面によって取り込まれる（非特許文献 12）。加えて、このポリカチオン性複合体は細胞表面と融合し、その結果、ポリヌクレオチドが細胞内に送達され、リソゾーム画分の分解酵素を回避することができる（非特許文献 15、非特許文献 16）。

30

#### 【0011】

インビトロで細胞をトランスフェクションするためにカチオン性脂質の種々の調合物が用いられている（特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5 および特許文献 6）。カチオン性脂質はまた、外来ポリヌクレオチドをカエルまたはラット細胞中にインビボで導入するのにも用いられている（非特許文献 17、非特許文献 18）。それゆえ、カチオン性脂質は一般に生物学的活性物質を送達するための医薬担体として用いることができる（たとえば、特許文献 1、特許文献 2 および特許文献 7 参照）。それゆえ、カチオン性リポソームは、遺伝子免疫のために宿主細胞中に外来ポリヌクレオチドを導入するための効率的な担体を提供する。

40

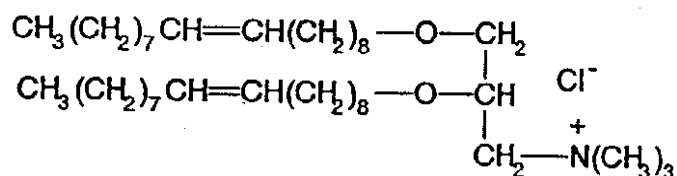
#### 【0012】

種々のカチオン性脂質が当該技術分野でよく知られている。よく知られたカチオン性脂質の一つは N - [ 1 - ( 2, 3 - ジオレオイルオキシ ) プロピル ] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロライド ( DOTMA ) である。DOTMA の構造は、下記の通りである。

50

【 0 0 1 3 】

【 化 1 】



【 0 0 1 4 】

DOTMAは、単独またはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)と1:1で組み合わせて標準法によりリポソームに調合することができる。フェルグナーらは、かかるリポソームが培養細胞への核酸の効率的な送達を可能とすることを示している(非特許文献13)。DOTMA:DOPE(1:1)調合物はリポフェクチン<sup>TM</sup>(LIPOFECTIN<sup>TM</sup>)(GIBCO/BRL:ライフ・テクノロジー・インコーポレイテッド、ゲイサーバーグ、メリーランド州)の商品名で販売されている。他の市販のカチオン性脂質は1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)であり、これはオレオイル残基がプロピルアミンにエーテル結合ではなくエステル結合で結合している点がDOTMAと異なっている。DOTAPは標的細胞によって一層容易に分解されると思われる。

10

【 0 0 1 5 】

関連する公知化合物群は、トリメチルアンモニウム基のメチル基の一つがヒドロキシエチル基で置換されている点がDOTMAおよびDOTAPと異なっている。このタイプの化合物は、プロピルアミン核にステアロイルエステルが結合したホスホリパーゼAのローゼンタールインヒビター(非特許文献19)と類似している。ローゼンタールインヒビター(RI)のジオレオイル類似体は一般に、プロピルアミン核への脂肪酸残基の結合に応じてDORI-エーテルおよびDORI-エステルと略する。ヒドロキシ基は、たとえばカルボキシスベルミンへのエステル結合による官能化などのような、さらなる官能化のための部位として用いることができる。

20

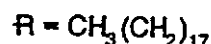
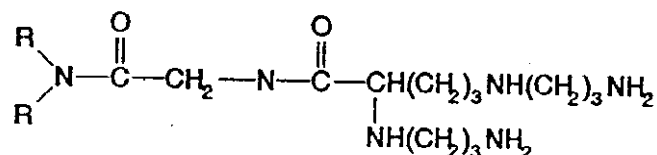
【 0 0 1 6 】

他のクラスの公知化合物は、ベール(Behr)らによって記載されており(非特許文献20、特許文献8)、これはカルボキシスベルミンが2つのタイプの脂質に結合したものである。5-カルボキシルスベルミルグリシンジオクタデシルアミド(DOGS)の構造は下記の通りである。

30

【 0 0 1 7 】

【 化 2 】

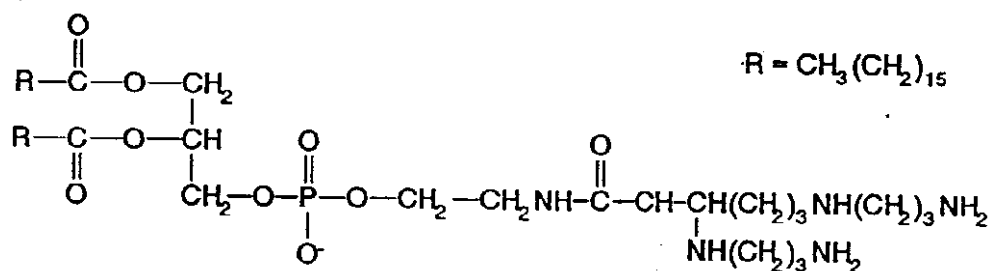


40

【 0 0 1 8 】

ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド(DOPE-S)の構造は下記の通りである。

## 【化 3】



## 【0019】

10

D O G S および D D P E S の両者とも、プラスミドをコーティングし、効率的なトランスフェクションを提供する脂質凝集複合体を形成させるのに用いられている。これら化合物は、ある種の細胞株をトランスフェクションするのに D O T M A より効率的であり、毒性も低いとされている。D O G S はトランスフェクタム<sup>TM</sup> (T R A N S F E C T A M<sup>TM</sup>) (プロメガ、マジソン、ウイスコンシン州) の商品名で市販されている。

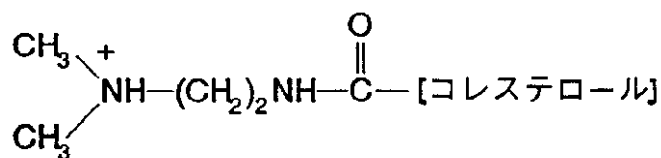
## 【0020】

カチオン性コレステロール誘導体 (D C - C h o l) が合成され、D O P E と組み合わせてリポソームに調合されている (非特許文献 21)。この化合物の構造は下記の通りである。

## 【0021】

20

## 【化 4】



## 【0022】

D C - C h o l を用いて調合したリポソームは、D O T M A 含有リポソームに比べ、ある種の細胞株において一層効率的なトランスフェクションが可能であり、毒性も低い。

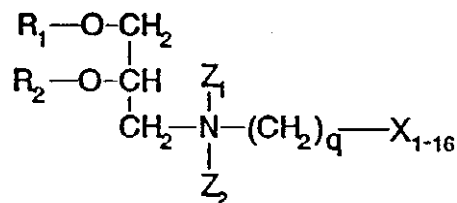
30

リボポリリシンは、ポリリシンを D O P E に結合させることによって生成される。この化合物は、血清の存在下でのトランスフェクションに特に有効であると報告されている (非特許文献 22)。それゆえ、リボポリリシンは免疫のための有効な担体である。

## 【0023】

加えて、ゲベフ (G e b e y h u) らは、下記一般式で示される新規カチオン性脂質を開発した (特許文献 9) :

## 【化 5】



40

(式中、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、それぞれ、または両者とも、C<sub>1</sub> ~ C<sub>23</sub> アルキルまたは - C O - C<sub>1</sub> ~ C<sub>23</sub> アルキルまたはアルケニル、q は 1 ~ 6、

Z<sub>1</sub> および Z<sub>2</sub> は、それぞれ、または両者とも、H または非分枝鎖アルキル C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>、X<sub>1</sub> は - (C H<sub>2</sub>)<sub>n</sub> B r、C l、F または I、n = 0 ~ 6 または

X<sub>2</sub> は - (C H<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - N H<sub>2</sub>、n = 0 ~ 6 または

X<sub>3</sub> は - N H - (C H<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - N H<sub>2</sub>、m = 2 ~ 6 または

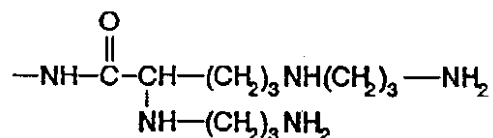
50

$X_4$  は  $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$  または

$X_5$  は  $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$  または

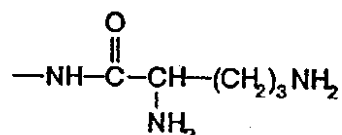
$X_6$  は

【化 6】



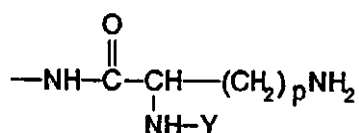
または  $X_7$  は

【化 7】



または  $X_8$  は

【化 8】



(式中、 $p$  は 2 ~ 5、 $Y$  は H、またはアミドもしくはアルキルアミノ基により結合した他の基) または

$X_9$  はポリアミン、たとえば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリブレン、ヒストンまたはプロタミン、または

$X_{10}$  はリポーター分子、たとえば、 $-NHCO-$ フルオレセイン、ピオチン、葉酸または PPD、または

$X_{11}$  は多糖または置換多糖、または

$X_{12}$  はタンパク質、または

$X_{13}$  は抗体、または

$X_{14}$  はアミンまたはハライド反応性基、または

$X_{15}$  は  $-(CH_2)_r-SH$  (式中、 $r$  は 0 ~ 6)、または

$X_{16}$  は  $-(CH_2)_s-S-S-(CH_2)_t-NH_2$  (式中、 $s$  は 0 ~ 6、 $t$  は 2 ~ 6)。

【0024】

これら化合物は、単独または他の脂質凝集体形成成分 (DOPE または コレステロール など) と組み合わせてリポソームまたは他の脂質凝集体に調合するのに有用である。そのような凝集体はカチオン性であり、DNA や RNA などのアニオン性巨大分子と複合体を形成することができる。

【0025】

【特許文献 1】WO 91 / 17424

【特許文献 2】WO 91 / 16024

【特許文献 3】米国特許第 4,897,355 号

【特許文献 4】米国特許第 4,946,787 号

【特許文献 5】米国特許第 5,049,386 号

【特許文献 6】米国特許第 5,208,036 号

【特許文献 7】WO 93 / 03709

【特許文献 8】EPO 公開第 0394111 号

10

20

30

40

50

【特許文献 9】継続中の米国特許出願第 07 / 937,508 号；1992 年 8 月 28 日出願

【非特許文献 1】オールド (Old) ら、「遺伝子操作の原理：遺伝子工学入門 (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering)、ブラックウエル・サイエンティフィック・パブリケーションズ」第 4 版、1989

【非特許文献 2】ロウ (Roit, I. M.)、免疫学概論 (Essential Immunology)、ブラックウエル・サイエンティフィック・パブリケーションズ、第 6 版、1988

【非特許文献 3】マーフィー (Murphy) ら、ウイルス学 (Virology)、フィールズ (Fields) ら編、レーブン・プレス、ニューヨーク、349 ~ 370 頁 (1985) 中、「ウイルスに対する免疫 (Immunization against Viruses)」

10

【非特許文献 4】ブラシアル (Braciale) ら、1981, J. Exp. Med. 153: p.910-923

【非特許文献 5】ウイリー (Wiley) ら、1981, Nature, 289: p.373-378

【非特許文献 6】アルドビニ (Aldovini) ら、1992, Jan. The New Vaccines, Technology Review, p.24-31

【非特許文献 7】タング (Tang) ら、1992, Nature, 356: p.152-154

【非特許文献 8】ウルマー (Ulmer) ら、1993, Science, 259: p.1745-1749

【非特許文献 9】ワング (Wang) ら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: p.4156-4160

【非特許文献 10】ストラウビンガー (Straubinger) ら、1983, Methods Enzymol., 101: p.512-527

20

【非特許文献 11】マニーノ (Mannino) ら、1988, Biotechniques, 6: p.682-690

【非特許文献 12】フェルグナー (Felgner)、「リポフェクチン T M 試薬を用いたカチオン性リポソーム媒体トランスフェクション (Cationic Liposome - Mediated Transfection with Lipofectin T M Reagent)」、Gene Transfer and Expression Protocols Vol 1., 7, マレイ (Murray, E. J.) 編、ヒューマナ・プレス、ニュージャージー、81 ~ 89 頁 (1991)

【非特許文献 13】フェルグナーら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: p.7413-7417

【非特許文献 14】フェルグナーら、1989, Focus, 11: p.21-25

【非特許文献 15】デュツギユネス (Duzgunes) ら、1989, Biochemistry, 28: p.9179-9184

30

【非特許文献 16】フェルグナーら、1989, Nature, 337: p.387-388

【非特許文献 17】ホルト (Holt) ら、1990, Neuron, 4: p.203-214

【非特許文献 18】ハジンスキー (Hazinski) ら、1991, Am. J. Respr. Cell. Mol. Biol., 4: p.206-209

【非特許文献 19】ローゼンタール (Rosenthal) ら、1960, J. Biol. Chem. 235: p.2202-2206

【非特許文献 20】ベール (Behr) ら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: p.6982-6986

【非特許文献 21】ガオ (Gao) ら、1991, Biochim. Biophys. Res. Comm., 179: p.280-285

40

【非特許文献 22】ゾウ (Zhou) ら、1991, Biochim. Biophys. Res. Comm., 165: p.8-14

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】

【0026】

本発明は、(a) 少なくとも 1 種のカチオン性脂質を抗原決定基をコードするポリヌクレオチドと混合してカチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体を形成させ、ついで (b) 該脂質 - ポリヌクレオチド複合体を動物に投与することを特徴とする、動物において免疫応答を引き起こさせる方法に関する。

50

## 【 0 0 2 7 】

本発明はまた、(a)少なくとも1種のカチオン性脂質を、感染性疾患の病原体である微生物の抗原決定基をコードするポリヌクレオチドと混合してカチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体を形成させ、ついで(b)該脂質 - ポリヌクレオチド複合体を動物に投与して該感染性疾患に対する能動免疫を生じさせることを特徴とする、動物における感染性疾患に対する能動免疫を生じさせる方法に関する。

## 【 0 0 2 8 】

本発明はまた、ポリヌクレオチドが免疫原をコードするDNA配列を含む発現ベクターであり、該DNA配列の転写がプロモーターの制御下にある、遺伝子免疫法に関する。

## 【 0 0 2 9 】

本発明はまた、ポリヌクレオチドが免疫原をコードするRNA分子である遺伝子免疫法に関する。

10

## 【 0 0 3 0 】

本発明はまた、上記遺伝子免疫法を使用し、免疫した動物からポリクローナル抗体を単離することを特徴とする、ポリクローナル抗体の製造方法に関する。

## 【 0 0 3 1 】

本発明はまた、

(a)少なくとも1種のカチオン性脂質を、免疫原をコードするDNA配列を含むポリヌクレオチドと混合して脂質 - ポリヌクレオチド複合体を形成させ、  
(b)該脂質 - ポリヌクレオチド複合体を少なくとも1のマウスに投与し、  
(c)該免疫したマウスからBリンパ球を取り出し、  
(d)該免疫したマウスからのBリンパ球をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを生成させ、  
(e)これらハイブリドーマをクローニングし、  
(f)抗免疫原抗体を産生する陽性クローンを選択し、  
(g)該抗免疫原抗体を産生するクローンを培養し、ついで  
(h)抗免疫原抗体を培養液から単離する  
ことを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法に関する。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明はまた、タンパク質分子のエピトープをマッピングする方法であって、(a)該タンパク質分子をコードするDNA分子をランダムに断片化し、  
(b)これらDNA断片を発現ベクター中にサブクローニングし、  
(c)少なくとも一つのカチオン性脂質を各発現ベクターサブクローンと混合して各発現ベクターサブクローンとのカチオン性脂質 - 発現ベクター複合体を生成させ、  
(d)該カチオン性脂質 - 発現ベクター複合体をマウスに投与し、ついで  
(d)どのDNA断片がマウスにおいて抗体を産生させることができるかを決定する  
ことを特徴とする方法に関する。

30

## 【 0 0 3 3 】

定義

以下の記載において、組換えDNA法において使用される多数の術語が広範に利用されている。そのような術語によって与えられるべき範囲を含め、明細書および請求の範囲の明確かつ一貫した理解が得られるよう、下記に定義を記載する。

40

## 【 0 0 3 4 】

クローニングベクター：

宿主細胞中で自律複製することができ、ベクターの本質的な生物学的機能を損なうことなく決定しうる仕方でDNA配列を切断しうるような1または少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することを特徴とし、DNA断片の複製およびクローニングのためにDNA断片をスプライスしうる、プラスミドまたはファージDNAまたは他のDNA配列。クローニングベクターはまた、クローニングベクターで形質転換された細胞の同定に使用するのに適したマーカを含んでいてもよい。マーカは、たとえば、テトラサイクリン

50

耐性またはアンピシリン耐性をもたらす。

【 0 0 3 5 】

発現ベクター：

クローニングベクターと類似のベクターであるが、クローニングされた遺伝子の発現を宿主中に形質転換した後に促進しうるベクター。クローニングされた遺伝子は、通常、プロモーター配列などのある種の制御配列の制御下に置かれる（すなわち、機能的に連結している）。プロモーター配列は、構成的または誘導的であってよい。

【 0 0 3 6 】

組換え宿主：

一般に、組換え宿主とは、発現ベクターまたはクローニングベクター上の所望のクローニング遺伝子を含む原核または真核微生物または細胞をいう。この術語はまた、染色体またはゲノム中に所望の遺伝子を含むように遺伝子操作した微生物をも包含する。

【 0 0 3 7 】

組換えベクター：

所望のクローニング遺伝子を含むクローニングベクターまたは発現ベクター。

【 0 0 3 8 】

宿主：

複製可能な発現ベクターまたはクローニングベクターの受容者である原核または真核微生物または細胞。本明細書において使用する「宿主」なる語はまた、染色体またはゲノム上に所望の遺伝子を含むように、よく知られた方法によって遺伝子操作されうる原核または真核微生物または細胞をも包含する。そのような宿主の例としては、マニアチス（Maniatis）らのモレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（1982）を参照。

【 0 0 3 9 】

プロモーター：

開始コドンに近接して位置する、遺伝子の5'領域として一般に記載されるDNA配列。隣接する遺伝子の転写はプロモーター領域で開始される。プロモーターが誘導性プロモーターである場合には、転写速度は誘導因子に応答して増加する。対照的に、プロモーターが構成的プロモーターである場合には、転写速度は誘導因子によって制御されない。

【 0 0 4 0 】

遺伝子：

ポリペプチドまたはタンパク質を発現するのに必要な情報を含有するDNA配列。

【 0 0 4 1 】

構造遺伝子：

メッセンジャーRNA（mRNA）に転写され、ついで特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸の配列に翻訳されるDNA配列。

【 0 0 4 2 】

発現：

発現とは、ポリペプチドが構造遺伝子から製造されるプロセスである。このプロセスには、該遺伝子のmRNAへの転写、および該mRNAのポリペプチドへの翻訳が含まれる。

【 0 0 4 3 】

トランスフェクション：

トランスフェクションとは、DNAによる宿主細胞の形質転換をいう。組換え宿主細胞は、トランスフェクションされたDNAによってコードされるタンパク質を発現する。

【 0 0 4 4 】

エピトープ：

非免疫グロブリン抗原のうち抗体の可変領域が結合する部分。

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

抗原決定基：

1 または 2 以上のエピトープを含むタンパク質またはペプチド。

【0046】

免疫原：

1 または 2 以上のエピトープの存在のために免疫応答を引き起こしうるタンパク質またはペプチド。

【0047】

本発明は、カチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体（該ポリヌクレオチドは抗原決定基をコードする）を投与することによる、動物において免疫応答を引き起こさせる方法に関する。

10

【0048】

本発明はまた、カチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体（該ポリヌクレオチドは感染性疾患の病原体である微生物の抗原決定基をコードする）を投与することによる、動物における感染性疾患に対する能動免疫を生じさせる方法に関する。

【0049】

本発明はまた、ポリヌクレオチドが免疫原をコードする DNA 配列を含む発現ベクターであり、該 DNA 配列の転写がプロモーターの制御下にある、遺伝子免疫法に関する。

【0050】

本発明はまた、ポリヌクレオチドが免疫原をコードする RNA 分子である遺伝子免疫法に関する。

20

【0051】

本発明はまた、上記遺伝子免疫法を使用し、免疫した動物からポリクローナル抗体を単離することを特徴とする、ポリクローナル抗体の製造方法に関する。

【0052】

本発明はまた、遺伝子免疫後のマウスからの B リンパ球を用いたモノクローナル抗体の製造方法に関する。

【0053】

本発明はまた、遺伝子免疫を用いたエピトープのマッピング方法に関する。

#### I. カチオン性脂質

従来より知られているいかなるカチオン性脂質も本発明の実施に用いることができる。たとえば、フェルグナーら（Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84 : 7413 ~ 7417 (1987)）；フェルグナーら（Focus 11 : 21 ~ 25 (1989)）；フェルグナー（「リポフェクチン<sup>T M</sup> 試薬を用いたカチオン性リポソーム媒体トランスフェクション」、Gene Transfer and Expression Protocols Vol. 7、マレイ編、ヒューマナ・プレス、ニュージャージー、81 ~ 89 頁 (1991)）；WO 91 / 17424；WO 91 / 16024；米国特許第 4,897,355 号；米国特許第 4,946,787 号；米国特許第 5,049,386 号；米国特許第 5,208,036 号；ペールら（Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86 : 6982 ~ 6986 (1989)）；EPO 公開 0394111 号）；ガオら（Biochim. Biophys. Res. Comm. 179 : 280 ~ 285 (1991)）；ゾウら（Biochim. Biophys. Res. Comm. 165 : 8 ~ 14 (1991)）；およびゲベイチュ（Gebeychu）ら（継続中の米国特許出願第 07 / 937,508 号；1992 年 8 月 28 日出願）（これらすべての文献を参照のため本明細書中に引用する）を参照。

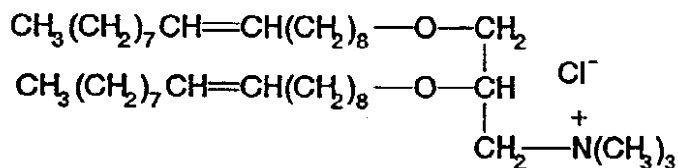
30

40

【0054】

好ましいカチオン性脂質としては、N - [ 1 - ( 2,3 - ジオレオイルオキシ ) プロピル ] - N,N,N - トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA) が挙げられる。DOTMA の構造は、下記の通りである。

## 【化 9】



DOTMAは、単独またはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)と1:1で組み合わせて標準法によりリポソームに調合することができる。DOTMA:DOPE(1:1)調合物はリポフェクチン<sup>TM</sup>(LIPOFECTIN<sup>TM</sup>)(GIBCO/BRL:ライフ・テクノロジー・インコーポレイテッド、ゲイサーバーグ、メリーランド州)の商品名で販売されている。

10

## 【0055】

他の好ましい市販のカチオン性脂質は1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)であり、これはオレオイル残基がプロピルアミンにエーテル結合ではなくエステル結合で結合している点がDOTMAと異なっている。

## 【0056】

関連する好ましいカチオン性脂質群は、トリメチルアンモニウム基のメチル基の一つがヒドロキシエチル基で置換されている点がDOTMAおよびDOTAPと異なっている。このタイプの化合物は、プロピルアミン核にステアロイルエステルが結合したホスホリパーゼAのローゼンタールインヒビター(ローゼンタールら、上記文献)と類似している。ローゼンタールインヒビター(RI)のジオレオイル類似体は一般に、プロピルアミン核への脂肪酸残基の結合に応じてDORI-エーテルまたはDORI-エステルと略する。ヒドロキシ基は、たとえばカルボキシスベルミンへのエステル結合による官能化などのような、さらなる官能化のための部位として用いることができる。

20

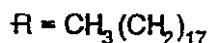
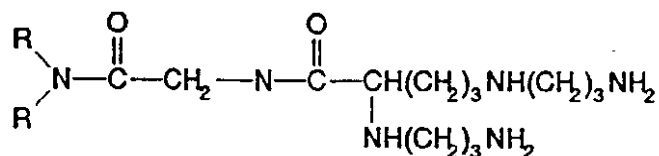
## 【0057】

他のクラスの好ましいカチオン性脂質では、カルボキシスベルミンが2つのタイプの脂質に結合している。5-カルボキシルスベルミルグリシンジオクタデシルアミド(DOGS)の構造は下記の通りである。

30

## 【0058】

## 【化 10】



## 【0059】

40

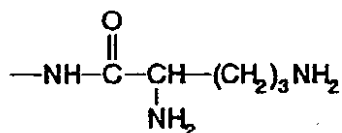
ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシルスベルミルアミド(DPES)の構造は下記の通りである。

## 【0060】



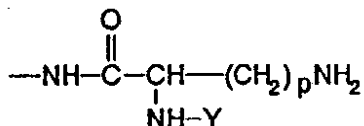
または  $X_7$  は

【化 1 5】



または  $X_8$  は

【化 1 6】



10

(式中、 $p$  は 2 ~ 5、 $Y$  は H、またはアミドもしくはアルキルアミノ基により結合した他の基) または

$X_9$  はポリアミン、たとえば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリブレン、ヒストンまたはプロタミン、または

$X_{10}$  はリポーター分子、たとえば、-NHCO-フルオレセイン、ビオチン、葉酸または PPD、または

$X_{11}$  は多糖または置換多糖、または

20

$X_{12}$  はタンパク質、または

$X_{13}$  は抗体、または

$X_{14}$  はアミンまたはハライド反応性基、または

$X_{15}$  は  $-(CH_2)_r-SH$  (式中、 $r$  は 0 ~ 6)、または

$X_{16}$  は  $-(CH_2)_s-S-S-(CH_2)_t-NH_2$  (式中、 $s$  は 0 ~ 6、 $t$  は 2 ~ 6)。

【0065】

これら化合物は、単独または他の脂質凝集体形成成分 (DOPE またはコレステロールなど) と組み合わせてリポソームまたは他の脂質凝集体に調合するのに有用である。そのような凝集体はカチオン性であり、DNA や RNA などのアニオン性巨大分子と複合体を形成することができる。

30

【0066】

## II. 発現ベクター

遺伝子免疫のために用いることのできるポリヌクレオチドの一つの形態は、真核細胞中で免疫原タンパク質を発現させるためのプラスミド発現ベクターである。真核発現ベクターは 4 つの主要な成分を含む。第一に、プラスミドは細菌複製起点および抗生物質耐性マーカーをコードする原核細胞配列を含んでいなければならない。これら原核細胞配列は、細菌宿主内でのプラスミドの増殖および選択を可能にする。第二に、プラスミドは転写の開始を制御する真核細胞要素を含んでいなければならない。これら要素にはプロモーターおよびおそらくエンハンサー配列が含まれる。第三に、プラスミドはポリアデニル化配列などの転写物のプロセッシングに関与する配列を含んでいなければならない。第四に、プラスミドは免疫原をコードする DNA 配列を含んでいなければならない。これら DNA は、ゲノム DNA 配列であるか、または相補的 DNA (cDNA) 配列のいずれかであってよい (発現ベクターの概説としては、オールドラの上記文献; サンプルックら、モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル、第 2 版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989; ゴーマン (Gorman)、「哺乳動物細胞中への高効率遺伝子導入 (High Efficiency Gene Transfer into Mammalian Cells)」、DNA Cloning、Volumell、グロバー (Glover, D.M.) 編、IRL プレス、ワシントン DC、143 ~ 190 頁 (1985))。

40

【0067】

50

免疫原をコードするDNAまたはcDNA分子は発現ベクター中に機能的に連結させることができる。2つのDNA配列（プロモーター領域配列と免疫原コード配列など）の間の連結の性質が、（１）フレームシフト変異の導入をもたらさないか、（２）免疫原コード遺伝子配列の転写を指令するプロモーター領域配列の能力を妨げないか、または（３）免疫原遺伝子配列がプロモーター領域配列によって転写される能力を妨げない場合に、これら2つのDNA配列は機能的に連結しているといえることができる。

#### 【0068】

免疫原分子をコードするDNA配列は、通常の技術（ライゲーションのための平滑末端化または粘着末端化した末端、適当な末端を提供するための制限消化、所望の場合の粘着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および適

10

#### 【0069】

宿主の性質に応じて広範囲の種々の転写および翻訳制御配列を用いることができる。哺乳動物宿主に対しては、転写および翻訳制御シグナルは、ウイルス源、たとえばアデノウイルス、ウシバビロウマウイルス、シミアンウイルスなどに由来するものであってよく、その際、制御シグナルは高発現レベルを有する特定の遺伝子を伴う。加えて、アクチン、コラーゲン、ミオシンなどの哺乳動物発現生成物からのプロモーターを用いることができる。別法として原核細胞プロモーター（バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターなど）を用いることができ、その際、原核細胞プロモーターは真核細胞プロモーターによって制御される（たとえば、ゾウら、Mol. Cell. Biol. 10: 4529~4537 (1990)；カウフマン（Kaufman）ら、Nucl. Acids Res. 19: 4485~4490 (1991) 参照）。遺伝子の発現を調節できるように、抑制または活性化を可能とする転写開始制御シグナルを選択することができる。

20

#### 【0070】

動物中で所望の免疫原分子を発現させるためには、真核細胞制御領域を用いる必要がある。そのような領域には、一般に、RNA合成の開始を指令するに十分なプロモーター領域が含まれるであろう。好ましい真核細胞プロモーターとしては、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター（ハマー（Hamer）ら、J. Mol. Appl. Gen. 1: 273~288 (1982)）；ヘルペスウイルスのTKプロモーター（マックナイト（McKnight, S.）、Cell 31: 355~365 (1982)）；SV40初期プロモーター（ベノイスト（Benoit）ら、Nature（ロンドン）290: 304~310 (1981)）；ラウス肉腫ウイルスプロモーター（ゴーマンら、上記文献）；およびサイトメガロウイルスプロモーター（フェッキング（Foecking）ら、Gene 45: 101 (1980)）が挙げられる。

30

#### 【0071】

広く知られているように、真核細胞のmRNAの翻訳は最初のメチオニンをコードするコドンから開始される。この理由から、真核細胞プロモーターと所望の免疫原分子をコードするDNA配列との間の連結部はいかなる介在配列（メチオニン（すなわち、AUG）をコードしうる）も含まないのが好ましい。そのようなコドンが存在すると、融合タンパク質が生成されるか（もしも該AUGコドンが所望のレセプター分子をコードするDNA配列と同じ読み取り枠にあるなら）、またはフレームシフト変異（もしも該AUGコドンが所望のレセプター分子をコードする配列と同じ読み取り枠にないなら）のいずれかをきたす。

40

#### 【0072】

所望の免疫原分子をコードする配列および機能的に連結したプロモーターは、非複製性のDNA（またはRNA）分子としてワクチンの細胞中に導入されてよく、該分子は線状分子であるか、または一層好ましくは閉じた共有環状分子のいずれかであってよい。そのような分子は自律複製することができないので、所望のレセプター分子の発現は導入配列の一過性の発現によって起こる。別法として、導入配列を宿主染色体中に組み込むことに

50

よって永久的な発現とすることができる。

【0073】

導入配列は、受容細胞中で自律複製しうるプラスミドベクターまたはウイルスベクター中に組み込むのが好ましい。この目的のために幾つかの可能なベクター系が利用できる。かかるベクターの1クラスは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルスまたはSV40ウイルスなどの動物ウイルス由来の、自律複製しうる染色体外プラスミドを提供するDNA要素を利用する。第二のクラスのベクターは、所望の遺伝子配列の宿主染色体中への組み込みに基づく。mRNAの最適合成のためには別の要素も必要となるかもしれない。これら要素には、スプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルが含まれる。これら要素を組み込んだcDNA発現ベクターには、オカヤマ（Okayama）ら（Mol. Cell. Biol. 3: 280（1983））その他に記載されているものが含まれる。 10

【0074】

別法として、ポリヌクレオチド分子は所望の免疫原をコードするRNA分子であってもよい。そのようなRNA分子は、インビトロ転写の後にRNA精製を行うことによって十分な量で得ることができる。DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてクローニングDNA配列を転写する技術は当該技術分野でよく知られている（たとえば、サンプルックらの上記文献参照）。

【0075】

本発明ではあらゆる免疫原コード配列を用いることができる。たとえば、そのような免疫原としては、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D、B型肝炎表面抗原、インフルエンザウイルス赤血球凝集素、およびヒト免疫不全ウイルスエンベロープ抗原が挙げられる。加えて本発明はまた、以下に記載するように、同定されていないポリヌクレオチド配列のタンパク質産物を特徴付けるのにも用いることができる。 20

【0076】

III. 脂質 / ポリヌクレオチド複合体の使用

本発明によれば、脂質 / ポリヌクレオチド複合体を用いてインビボトランスフェクションを行う。トランスフェクションした細胞は該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を発現し、細胞表面上に該外来タンパク質を呈示する。その結果、宿主動物は該外来タンパク質、すなわち免疫原に対する免疫応答が増大する。 30

【0077】

それゆえ、脂質 / ポリヌクレオチド複合体は能動免疫を誘発するためのワクチンとして用いることができる。そのような能動免疫はヒトにおいて誘発するのが好ましいが、本発明はそのように限定されるものではない。本発明のワクチンの有利な効果を受ける動物はすべて本発明に従って処置しうる動物の範囲に包含される。

【0078】

遺伝子免疫は、カチオン性脂質およびポリヌクレオチドを広範囲の投与量および広範囲の比率にて投与することによって行うことができる。有効投与量および調合形態は種々の因子（ワクチンの被接種体の種など）に依存するであろうが、当業者によって決定することができる。投与量、調合形態および投与方法の例については以下に記載する。 40

【0079】

カチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体の調製は、カチオン性脂質溶液を等容量のポリヌクレオチド溶液と混合することによって行う。カチオン性脂質およびポリヌクレオチドは、滅菌した生理学的に許容しうる水性担体中に溶解することができる。カチオン性脂質およびポリヌクレオチドは滅菌食塩水（150 mM NaCl）中に溶解するのが好ましい。これら溶液を周囲温度にて混合する。これら溶液は25にて混合するのが好ましい。混合後、カチオン性脂質 - ポリヌクレオチド複合体を室温にて好ましくは15～45分間インキュベートする。

【0080】

本発明の脂質 / ポリヌクレオチド複合体の投与は、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、鼻 50

内、または他の適当な手段により行うことができる。投与する特定の投与量は、年齢、体重、もしあれば現在行っている治療の種類、および発現されるであろう免疫原の性質に依存する。免疫原応答を促進させるため、最初の投与から約4週間後にブースター投与を行うことができる。

#### 【0081】

遺伝子免疫はまたワクチンの受容者において免疫原特異的な抗体の産生を生じさせるので、本発明はまた免疫原特異的な抗体の産生方法にも関する。当該技術分野でよく知られた手順を用い、ワクチンを施した動物からポリクローナル抗体を単離および精製することができる（たとえば、ハーロウ（Harlow）ら、アンチボディーズ：ア・ラボラトリー・マニュアル（Antibodies：A Laboratory Manual）、コールドスプリングハーバーラ

10

#### 【0082】

本発明はまた、モノクローナル抗体を産生させるための遺伝子免疫の使用にも関する。この方法によれば、マウスにカチオン性脂質/ポリヌクレオチド複合体を注射し、該免疫マウスからBリンパ球を単離する。モノクローナル抗体は、ケーラー（Köhler）およびミルシュテイン（Milstein）らの手順（Nature 256：495～497（1975））に従って産生させる（たとえば、ハーロウらの上記文献参照）。簡単に説明すると、マウスをカチオン性脂質-ポリヌクレオチド複合体で免疫し、血清試料を採取することによって抗体産生の存在を確認し、脾臓を取り出してBリンパ球を得、該Bリンパ球をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを得、該ハイブリドーマをクローニングし、抗免疫

20

#### 【0083】

既知の免疫原に対するモノクローナル抗体を産生させる代わりに、遺伝子免疫はエピトープマッピングによってタンパク質中の抗原決定基を同定するのに用いることができる。この方法によれば、該脂質/ポリヌクレオチド複合体中のポリヌクレオチドはタンパク質分子の一部をコードする。完全なタンパク質分子をコードするDNAのランダム断片を超音波処理（デイニング（Deininger）ら、Anal. Biochem. 129：216～223（1983））または部分DNAアーゼI消化（アンダーソン（Anderson）ら、Nucleic

30

#### 【0084】

加えて、本発明は、同定されていないDNAまたはRNA配列によってコードされるタンパク質産物を特徴付けるのにも用いることができる。たとえば、コスミドベクター中でゲノムライブラリーを構築することができ、その際、クローニングされたDNA断片の発

40

#### 【0085】

上記で記載したように、裸のDNAを投与する遺伝子免疫プロトコールでは接種当たり100μgのDNA構築物が必要である。対照的に、本発明に従ってカチオン性脂質をDNA担体として用いると、わずか5μgのDNA構築物で遺伝子免疫を行うことが可能となる。それゆえ、本発明は遺伝子免疫の一層効率的な手段を提供するものである。

#### 【0086】

以上、本発明を一般的に記載したが、本発明は下記実施例を参照することによって一層容易に理解されるであろう。これら実施例は例示のために掲げたものであり、特に断らな

50

い限り本発明を限定するものではない。

【0087】

#### 実施例 1

##### 免疫プロトコルの評価

この一連の実験では pSV2CAT プラスミドを用いるが、該プラスミドはシミアンウイルス 40 プロモーターの制御下に細菌性クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を有する (ゴーマン (SV; Gorman)、「哺乳動物細胞中への高効率遺伝子導入」、DNA Cloning、Volume II、グロバー編、IRL プレス、ワシントン DC、143~190 頁 (1985))。プラスミド DNA をアルカリ溶解法によって細菌細胞から単離し、セシウムクロライド/エチジウムブロマイド勾配中での等密度遠心分離によって精製する (マニアチスら、上記文献)。これら実験ではカチオン性脂質としてリポフェクタミン<sup>T M</sup> (LIPFECTAMINE<sup>T M</sup>) (BRL) を用いた。リポフェクタミン<sup>T M</sup> は 2,3 - ジオレイルオキシ - N - [2 (スベルミンカルボキサミド) エチル] - N,N - ジメチル - 1 - プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート (DOSPA) からなり、これをジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) と水中で 3 : 1 (W : W) の比率で調合する。これらカチオン性脂質およびプラスミドを滅菌食塩水 (150 mM NaCl) 中に溶解した。

10

【0088】

脂質 / DNA 複合体をマウスに腹腔内 (IP) または鼻内 (IN) 投与した。IN 投与用には、25  $\mu$ l の DNA 溶液を 25  $\mu$ l の脂質溶液と混合することによって脂質 / DNA 混合物を調製した。IP 投与用には、200  $\mu$ l の DNA 溶液を 200  $\mu$ l の脂質溶液と混合することによって脂質 / DNA 混合物を調製した。これら実験において、5  $\mu$ g の pSV2CAT を 0  $\mu$ g、15  $\mu$ g、30  $\mu$ g、45  $\mu$ g、または 60  $\mu$ g の脂質と混合した。混合後、投与前に脂質 / DNA 複合体を室温にて 15 ~ 45 分間静置した。コントロールとして、幾匹かのマウスに完全フロイントアジュバント中の CAT タンパク質 (25  $\mu$ g) を皮下 (SC) 注射した。

20

【0089】

マウス血清試料中の CAT 抗体の存在を決定するため、CAT 酵素結合イムノアッセイ (ELISA) を用いた。マイクロウエルタイタープレートの各ウエルを 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) 中の 1  $\mu$ g / ml の CAT とともにインキュベートすることによって該プレートを調製した。これらプレートを 4 にて 18 時間インキュベートした。0.1 % トゥイーン 20 を含有するリン酸緩衝食塩水 (PBS) (希釈緩衝液) 中に溶解した 0.2 % 卵アルブミンでウエルをブロックした。試料を希釈緩衝液中に希釈し、その 200  $\mu$ l をプレート上のウエルに加えた。プレートを密封し、ついで 37 で 60 分間インキュベートした。洗浄後、プレートを 0.1  $\mu$ g / ml のヤギ抗マウス IgG - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートとともにインキュベートした。プレートを密封し、ついで 37 で 30 分間インキュベートした。2 回目の洗浄を行った後、プレートを 3,3',5,5' - テトラメチルベンジジン基質で室温にて発色させた。2 N 硫酸を加えて反応を停止させた。

30

【0090】

完全フロイントアジュバント中の CAT タンパク質を投与することによって得られる応答ほど大きくはなかったが、脂質 / CAT タンパク質で免疫したマウスは免疫応答を発色した。脂質 / pSV2CAT を IP 注射した何匹かのマウスは、弱いバックグラウンドを明らかに上回る免疫応答を生じた。鼻内投与による免疫で得られた結果はマウスによって変化した、応答は IP 投与で得られたものよりも大きかった。

40

【0091】

#### 実施例 2

##### DNA 複合体形成剤としてのカチオン性脂質の比較

これらの実験では下記カチオン性脂質を比較した：リポフェクタミン<sup>T M</sup>、リポフェクテース<sup>T M</sup> (LIPOFECTACE<sup>T M</sup>) (BRL)、DORI - エーテル (バイカル

50

(VICAL, Inc.)、サンジエゴ、カリフォルニア州)、DORI-エーテル/リゾ脂質(バイカル、サンジエゴ、カリフォルニア州)、およびプロモ脂質(1-プロパンアンモニウム, N-[2(2-プロモ)エチル]-N,N-ジメチル-2,3-ビス(9-オクタデセニルオキシ)プロマイド)。リポフェクテース<sup>T M</sup>は、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロマイド(DDAB)およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)の1:2.5(W/W)リポソーム調合物である。このプロモ脂質は、継続中の米国特許出願第07/937,508号(1992年8月28日出願)(参照のために本明細書中に引用する)の記載に従って調製した。

#### 【0092】

免疫は、5 μg、10 μg、20 μg、40 μgまたは80 μgのpSV2CATをカチオン性脂質と1:4の比(W/W; pSV2CAT/カチオン性脂質)で複合体を形成させてIP投与することによって行った。1匹のマウスにはpSV2CATのみを与え、1匹のマウスにはCATタンパク質のみを与え、さらに1匹のマウスには完全フロイントアジュバント中のCATタンパク質のみを与えた。約14日の時点で選択したマウスにブースター投与を行った。

10

#### 【0093】

得られた結果をウエスタンブロット分析により分析した。精製CATタンパク質をニトロセルロースに適用することにより(0.1 μg CATタンパク質/cmニトロセルロース)ニトロセルロースシートを調製した。血清試料を希釈緩衝液中に希釈し、その2 mlを各ニトロセルロースストリップに加えた。これらストリップを室温にて振動させながら90分間インキュベートした。洗浄後、ストリップを0.1 μg/mlのヤギ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼコンジュゲートとともにインキュベートした。ついで、ストリップを室温にて30分間インキュベートした。1 mlのニトロブルーテトラゾリウム/5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートの安定な混合基質でストリップを発色させた。発色後にストリップを蒸留水で洗浄し、乾燥させた。

20

#### 【0094】

これら結果は、DNAおよび脂質で免疫したマウスが抗CAT抗体を産生することを示していた。ブースター投与は応答を大きく促進するとは思えなかった。ウエスタンブロット分析は、ELISAの結果が免疫応答の強度が異なることを示しはしたが、脂質-DNA複合体を注射したすべての動物で抗IgGが産生されたことを示した。

30

#### 【0095】

### 実施例 3

#### 免疫応答に対する異なるプロモーターの効果

これら実験ではカチオン性脂質としてプロモ脂質(実施例2に記載のもの)またはリポフェクテース<sup>T M</sup>を用いた。CATプラスミドには、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(フェッキングら、Gene 45:101(1980))、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター(ゴーマン、「哺乳動物細胞中への高効率遺伝子導入」、DNA Cloning、Volumell、グロバー編、IRLプレス、ワシントンDC、143~190頁(1985))、またはSV40プロモーター(上記)のいずれかが含まれていた。マウスを下記プロトコールに従って上記のようにIP免疫した。

40

| 脂質                      | 脂質の量  | DNAの量 |
|-------------------------|-------|-------|
| プロモ脂質または                | 20 μg | 5 μg  |
| リポフェクテース <sup>T M</sup> | 40 μg | 10 μg |
|                         | 80 μg | 20 μg |

#### 【0096】

1セット(すなわち、2匹のマウス)を用いて各プロモーターを試験した。コントロールとして、マウスに脂質なしでDNAのみを与えるか、完全フロイントアジュバント中のCATタンパク質を与えるか、または接種をしなかった。

#### 【0097】

ELISA分析の結果によると、SV40プロモーターが最良で、ついでCMVプロモ

50

ーター、ついでR S Vプロモーターの順であった。プロモ脂質ではリポフェクテース<sup>T M</sup>に比べて免疫応答の生成において一層一定した結果が得られた。E L I S Aで観察された陽性結果をウエスタンブロット分析により確認した。両アッセイ形態とも、D N A - 脂質免疫で得られた結果はD N A 単独で観察された結果よりも良好であった。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ウィリアム・ジー・ハール

アメリカ合衆国 2 1 0 4 4 メリーランド、コロンビア、シーダー・レイン 5 7 2 8 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA61 CA01 EA04 FA02 FA06 FA10 GA05 GA11

4B064 AG26 AG27 CA10 DA01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA71

|                |                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 阳离子脂质的遗传免疫                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2006006336A</a>                                                                                                                                                                                                                                | 公开(公告)日 | 2006-01-12 |
| 申请号            | JP2005201595                                                                                                                                                                                                                                                 | 申请日     | 2005-07-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 茵维特罗根公司                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 酒店的Vie托罗创公司                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| [标]发明人         | ジョエルエイジェシー<br>ウィリアムジーハール                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 发明人            | ジョエル・エイ・ジェシー<br>ウィリアム・ジー・ハール                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| IPC分类号         | C12P21/08 C07K16/18 C12N15/02 G01N33/53 A61K31/70 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61P37/04 C07H21/04 C07K16/00 C07K16/40 C07K16/44 C12N9/10 C12N15/09 C12N15/88                                                                                     |         |            |
| CPC分类号         | A61K39/00 A61K2039/53 A61P37/04 C07K16/00 C07K16/40 C12N9/1033 C12N15/88                                                                                                                                                                                     |         |            |
| FI分类号          | C12P21/08 C07K16/18 C12N15/00.C C12N15/88.P C12N15/88.Z                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA71 |         |            |
| 优先权            | 08/069720 1993-06-01 US                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种使用包含阳离子脂质和多核苷酸的遗传物质的免疫方法。在非人类动物中产生针对免疫原的多克隆抗体的方法，其包括：(a)将至少一种阳离子脂质与编码免疫原的多核苷酸混合以形成阳离子脂质-多核苷酸复合物。形成身体，(b)向动物腹膜内或鼻内施用脂质-多核苷酸复合物，然后(c)从动物分离多克隆抗体；和蛋白质分子。映射表位的方法 [选择图]无

