

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-538569

(P2013-538569A)

(43) 公表日 平成25年10月17日(2013. 10. 17)

| | | |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 9/127 (2006.01) | A 6 1 K 9/127 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 39/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/00 G | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 K 38/53 (2006.01) | A 6 1 K 37/60 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2013-526206 (P2013-526206)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月31日 (2011. 8. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月23日 (2013. 4. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/049873
 (87) 国際公開番号 W02012/030901
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日 (2012. 3. 8)
 (31) 優先権主張番号 61/378, 831
 (32) 優先日 平成22年8月31日 (2010. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 3 5
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ジアール, アンドリュウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6
 6 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー
 オー ボックス 8 0 9 7, ノバルティ
 ス バクシンズ アンド ダイアグノステ
 イックス, インコーポレーテッド 気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原をコードするRNAの送達のための小さなリポソーム

(57) 【要約】

核酸免疫化は、リポソーム内に被包されたRNAを送達することによって達成される。上記RNAは、目的の免疫原をコードし、上記リポソームは、60～180nmの範囲、および理想的には、80～160nmの範囲の直径を有する。従って、本発明は、水性コアを被包する脂質二重層を有するリポソームを提供し、ここで：(i) 上記脂質二重層は、60～180nmの範囲の直径を有し；そして(ii) 上記水性コアは、免疫原をコードするRNAを含む。これらリポソームは、脊椎動物細胞への上記RNAのインビボ送達に適しているため、それらは、種々の疾患に対して被験体を免疫化するための薬学的組成物中の成分として有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

目的の免疫原をコードするRNAの中に被包しているリボソームであって、60nm～180nmの範囲の直径を有する、リボソーム。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のリボソームであって、80nm～160nmの範囲の直径を有する、リボソーム。

【請求項 3】

前述の請求項のいずれかに記載のリボソームであって、カチオン性頭部を有する脂質を含む、リボソーム。

10

【請求項 4】

前述の請求項のいずれかに記載のリボソームであって、両性イオン性頭部を有する脂質を含む、リボソーム。

【請求項 5】

前記RNAは、自己複製RNAである、前述の請求項のいずれかに記載のリボソーム。

【請求項 6】

前記自己複製RNA分子は、

(i) 該自己複製RNA分子からRNAを転写し得るRNA依存性RNAポリメラーゼ、および

(ii) 免疫原

20

をコードする、請求項 5 に記載のリボソーム。

【請求項 7】

前記RNA分子は、2個のオープンリーディングフレームを有し、該2個のオープンリーディングフレームのうちの第1のものは、アルファウイルスレプリカーゼをコードし、該2個のオープンリーディングフレームのうちの第2のものは、前記免疫原をコードする、請求項 6 に記載のリボソーム。

【請求項 8】

前記RNA分子は、9000～12000ヌクレオチド長である、前述の請求項のいずれかに記載のリボソーム。

【請求項 9】

前記免疫原は、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物に対するインビボでの免疫応答を誘発し得る、前述の請求項のいずれかに記載のリボソーム。

30

【請求項 10】

前述の請求項のいずれかに記載のリボソームを含む、薬学的組成物。

【請求項 11】

リボソームの集団を含む薬学的組成物であって、ここで該集団中の該リボソームの平均直径は、60nmおよび180nmも含めた60nm～180nmである、薬学的組成物。

【請求項 12】

脊椎動物における防御免疫応答を惹起するための方法であって、該方法は、該脊椎動物に、請求項 1～9 に記載のリボソームまたは請求項 10 もしくは請求項 11 に記載の薬学的組成物の有効量を投与する工程を包含する、方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2010年8月31日に提出された米国仮出願番号第61/378,831号の利益を主張し、上記米国仮出願の全容は、全ての目的のために、参考として本明細書に援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、免疫化のためのRNAの非ウイルス性送達分野にある。

50

【背景技術】

【0003】

(背景技術)

動物を免疫化するための核酸の送達は、数年間にわたり目標であった。種々のアプローチが、試験されてきており、それらとしては、DNAもしくはRNAの使用、ウイルスもしくは非ウイルス性送達ビヒクルの使用（またはさらには「裸の」ワクチンにおいて、送達ビヒクルなし）、複製もしくは非複製ベクターの使用、またはウイルスもしくは非ウイルス性ベクターの使用が挙げられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0004】

さらなる改善された核酸ワクチン、特に、核酸ワクチンの送達の改善された方法への必要性が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の開示)

本発明によれば、核酸免疫化は、リボソーム内に被包されたRNAを送達することによって達成される。上記RNAは、目的の免疫原をコードし、上記リボソームは、60～180nmの範囲、および理想的には、80～160nmの範囲の直径を有する。このサイズは、例えば、エンベロープで包まれていないアルファウイルスアイソメトリックタンパク質キャプシドの直径約40nmと匹敵する。小さなリボソームとRNA（特に、自己複製RNA）の効率的な被包との組み合わせは、強力な免疫応答を誘発するための効率的送達を可能にする。

20

【0006】

従って、本発明は、目的の免疫原をコードするRNAの中に被包しているリボソームを提供し、ここで上記リボソームは、60～180nmの範囲の直径を有する。これらリボソームは、脊椎動物細胞への上記RNAのインビボ送達に適しているので、それらは、種々の疾患に対して被験体を免疫化するための薬学的組成物中の成分として有用である。

【0007】

本発明はまた、RNA含有リボソームを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、RNAと、1種以上の脂質とを、上記脂質がリボソーム（60～180nmの範囲の直径を有し、上記RNAが被包されている）を形成する条件下で混合する工程を包含する。

30

【0008】

(リボソーム)

本発明は、免疫原コードRNAの中に被包しているリボソームを利用する。従って、上記RNAは、いかなる外部媒体からも分離している（天然ウイルスにおけるように）。上記リボソーム内への被包は、RNAをRNase消化から保護することが見いだされた。上記リボソームは、いくらかの外部RNAを（例えば、それらの表面に）含み得るが、上記RNAのうちの少なくとも半分（および理想的には、全て）は、上記リボソームのコア中に被包される。リボソーム内への被包は、例えば、参考文献1で開示される脂質/RNA複合体とは異なる（ここでは、RNAは、予め形成されたりリボソームと混合される）。

40

【0009】

種々の両親媒性脂質は、水性環境中で二重層を形成して、RNA含有水性コアをリボソームとして被包し得る。これら脂質は、アニオン性、カチオン性もしくは両性イオン性の親水性頭部（head group）を有し得る。アニオン性リン脂質からのリボソームの形成は、1960年代にさかのぼり、カチオン性リボソーム形成脂質は、1990年代以来研究されてきた。あるリン脂質はアニオン性であるのに対して、他のものは両性イオン性であり、そして他のものはカチオン性である。リン脂質の適切なクラスとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ホスファチジルエタノールアミン、ホスファ

50

チジルコリン、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルグリセロール。そしていくつかの有用なリン脂質は、表 1 に列挙される。有用なカチオン性脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、1, 2 - ジステアリルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DSDMA)、1, 2 - ジオレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DODMA)、1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DlinDMA)、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチル - 3 - アミノプロパン (DLenDMA)。両性イオン性脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アシル両性イオン性脂質およびエーテル両性イオン性脂質。有用な両性イオン性脂質の例は、以下である：DPPC、DOPC、DSPC、ドデシルホスホコリン、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、および 1, 2 - ジフィタノイル (diphytanoyl) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPyPE)。上記脂質は、飽和であってもよいし、不飽和であってもよい。リポソームを調製するための少なくとも 1 種の不飽和脂質の使用が好ましい。不飽和脂質が 2 つのテールを有する場合、両方のテールが不飽和であり得、またはそれは、1 つの飽和テールおよび 1 つの不飽和テールを有し得る。脂質は、例えば、RV05 におけるように、1 つのテールにステロイド基を含み得る (図 16 A および C ~ K もまた参照のこと)。

10

20

【0010】

従って、いくつかの実施形態において、本発明は、水性コアを被包する脂質二重層を有するリポソームを提供し、ここで：(i) 上記リポソームは、60 ~ 180 nm の範囲の直径を有し；そして(ii) 上記水性コアは、免疫原をコードするRNAを含む。

【0011】

本発明のリポソームは、単一の脂質から、または脂質の混合物から形成され得る。混合物は、(i) アニオン性脂質の混合物、(ii) カチオン性脂質の混合物、(iii) 両性イオン性脂質の混合物、(iv) アニオン性脂質とカチオン性脂質との混合物、(v) アニオン性脂質と両性イオン性脂質との混合物、(vi) 両性イオン性脂質とカチオン性脂質との混合物、または(vii) アニオン性脂質と、カチオン性脂質と、両性イオン性脂質との混合物を含み得る。同様に、混合物は、飽和脂質および不飽和脂質の両方を含み得る。例えば、混合物は、DSPC (両性イオン性、飽和)、DlinDMA (カチオン性、不飽和)、および/もしくはDMG (アニオン性、飽和) を含み得る。脂質の混合物が使用される場合、上記混合物中の成分の脂質の全てが、両親媒性である必要はない (例えば、1 種以上の両親媒性脂質が、コレステロールと混合され得る)。

30

【0012】

本発明のリポソームが脂質の混合物から形成される場合、好ましくは、カチオン性である脂質の割合は、脂質の全量のうちの20 ~ 80 % (例えば、30 ~ 70 %、もしくは40 ~ 60 %) であるべきである。その残りは、例えば、コレステロール (例えば、35 ~ 50 % コレステロール) および/もしくはDMG (必要に応じて、PEG化される) および/もしくはDSPCから構成され得る。このような混合物は、以下で使用される。これらパーセンテージの値は、モルパーセンテージである。

40

【0013】

リポソームは、親水性部分がPEG化されている (すなわち、ポリエチレングリコールの共有結合によって改変されている) 両親媒性脂質を含み得る。この改変は、上記リポソームの安定性を増大させ得、かつ非特異的吸着を妨げ得る。例えば、脂質は、参考文献2 および3に開示されるもののような技術を使用して、PEGに結合体化され得る。PEGは、上記リポソームに、都合の良い薬物動態特性を付与し得るコーティングを提供する。種々の長さのPEGが使用され得る (例えば、0.5 ~ 8 kDa)。

【0014】

従って、リポソームは、カチオン性脂質 (例えば、DlinDMA、RV05)、両性

50

イオン性脂質（例えば、DSPC、DPyPE）、コレステロール、およびPEG化脂質から形成され得る。DSPC、DlindMA、PEG-DMGおよびコレステロールの混合物は、実施例において使用され、いくつかのさらなる混合物もまた同様に使用される。

【0015】

リポソームは、通常、3つの群に分けられる：多層小胞（MLV）；小さな単層小胞（SUV）；および大きな単層小胞（LUV）。MLVは、各小胞において複数の二重層を有し、いくつかの別個の水性区画を形成する。SUVおよびLUVは、水性コアを被包する単一の二重層を有する；SUVは、代表的には、直径50nmを有し、LUVは、直径>50nmを有する。本発明のリポソームは、理想的には、60~180nmの範囲、好ましくは、80~160nmの範囲の直径を有するLUVである。上記リポソームは、好ましくは、実質的に球状である。それらが球状でない場合には、用語「直径」は、リポソームの最も大きな断面直径に言及する。

10

【0016】

本発明のリポソームは、複数のリポソームを含む組成物の一部であり得、上記複数のリポソーム中のリポソームは、ある範囲の直径を有し得る。異なる直径を有するリポソームの集団を含む組成物に関して：(i)上記リポソームの数で少なくとも80%は、60~180nmの範囲、および好ましくは、80~160nmの範囲の直径を有するべきであり、そして/または(ii)上記集団の平均直径（強度で、例えば、Z平均）は、理想的には、60~180nmの範囲、および好ましくは、80~160nmの範囲にある。

20

【0017】

理想的には、リポソームサイズ（強度で）の分布は、唯一の最大を有する。すなわち、2つの最大を有するのではなく、平均あたりに分布したリポソームの単一の集団が存在する（モード）。リポソームの集団内の直径は、理想的には、多分散性指数<0.2、およびときおり、<0.1を有するはずである。参考文献1のリポソーム/RNA複合体は、600~800nmの範囲の直径を有し、高い多分散性を有すると予測される。

【0018】

リポソームの懸濁物における平均粒子直径およびサイズ分布を決定するための装置は、市販されている。これらは、代表的には、動的光散乱および/もしくは単一粒子光学感知の技術を使用する（例えば、Particle Sizing Systems（Santa Barbara, USA）から入手可能なAccusizerTMおよびNicompTMシリーズの機器、またはMalvern Instruments（UK）のZetasizerTM機器、またはHoriba（Kyoto, Japan）のParticle Size Distribution Analyzer機器）。動的光散乱は、リポソーム直径が決定される好ましい方法である。リポソームの集団に関して、本発明の組成物中の平均リポソーム直径を規定するための好ましい方法は、Z平均（すなわち、動的光散乱（DLS）によって測定されるリポソームの全体の集合の強度重み付け平均流体力学的サイズ（intensity-weighted mean hydrodynamic size））である。上記Z平均は、測定された相関曲線のキュムラント分析から導出され、ここで、単一粒子サイズ（リポソーム直径）が想定され、単一指数関数的あてはめが、自己相関関数に適用される。上記キュムラント分析アルゴリズムは、分布を生じるのではなく、強度重み付けZ平均に加えて、多分散性指数を与える。

30

40

【0019】

適切なリポソームを調製するための技術は、当該分野で周知である（例えば、参考文献4~6を参照のこと）。1つの有用な方法は、参考文献7において記載され、(i)脂質のエタノール性溶液、(ii)核酸の水性溶液、および(iii)緩衝液を混合する工程、続く、混合、平衡化、希釈および精製を包含する。好ましい本発明のリポソームは、この混合プロセスによって得られ得る。所望の直径を有するリポソームを得るために、混合は、水性RNA溶液の2つの供給ストリームが、1つの混合ゾーンにおいて、脂質のエタノール性溶液の1つのストリームと、全て同じ流量において、例えば、以下に記載される

50

とおりのマイクロ流体チャネルにおいて、合わされるプロセスを使用して行われ得る。

【0020】

(RNA)

本発明のリボソームは、免疫原をコードするRNA分子(s i RNAとは異なる)を含む。上記粒子のインピボ投与後、RNAは、上記粒子から放出され、上記免疫原をインサイチュで提供するように、細胞の中で翻訳される。

【0021】

上記RNAは、プラス鎖であるので、いかなる介在複製工程(例えば、逆転写)も必要とすることなく、細胞によって翻訳され得る。それはまた、免疫細胞によって発現されるTLR7レセプターに結合し得、それによって、アジュバント効果を開始する。

【0022】

好ましいプラス鎖RNAは、自己複製性である。自己複製RNA分子(レプリコン)は、あらゆるタンパク質なしで脊椎動物細胞に送達される場合でも、上記自己複製RNA分子自体からの転写によって(上記自己複製RNA分子自体から生成するアンチセンスコピーを介して)、複数の娘RNAの生成をもたらし得る。自己複製RNA分子は、従って、代表的には、細胞へ送達された後に直接翻訳され得るプラス鎖分子であり、この翻訳は、RNA依存性RNAポリメラーゼを提供し、次いで、これは、上記送達されたRNAからアンチセンス転写物およびセンス転写物の両方を生成する。従って、上記送達されたRNAは、複数の娘RNAの生成をもたらす。これら娘RNA、ならびに同一線上(c o l l i n e a r)のサブゲノム転写物は、それ自体が翻訳されて、コードされた免疫原のインサイチュ発現を提供し得るか、または転写されて、上記送達されたRNAと同じセンスのさらなる転写物(上記免疫原のインサイチュ発現を提供するように翻訳される)を提供し得る。この一連の転写の全体的な結果は、上記導入されたレプリコンRNAの数における非常に多くの増幅であり、よって、上記コードされた免疫原は、上記細胞の主なポリペプチド生成物になる。

【0023】

自己複製を達成するための1つの適切なシステムは、アルファウイルスベースのRNAレプリコンを使用することである。これらのプラス鎖レプリコンは、細胞への送達後に翻訳され、レプリカーゼ(もしくはレプリカーゼ-転写酵素)をもたらす。上記レプリカーゼは、上記送達されたプラス鎖RNAのゲノムマイナス鎖コピーを作り出す複製複合体を提供するように自己切断するポリプロテインとして翻訳される。これらマイナス鎖転写物は、これ自体が、上記プラス鎖親RNAのさらなるコピーを与え、そしてまた、免疫原をコードするサブゲノム転写物を与えるように転写され得る。従って、上記サブゲノム転写物の翻訳は、感染した細胞による上記免疫原のインサイチュ発現をもたらす。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビス・ウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼを使用し得る。変異型ウイルスもしくは野生型ウイルスの配列が使用され得る(例えば、VEEVの弱毒化TC83変異体は、レプリコンにおいて使用されてきた[8])。

【0024】

好ましい自己複製RNA分子は、従って、(i)上記自己複製RNA分子からRNAを転写し得るRNA依存性RNAポリメラーゼ、および(ii)免疫原をコードする。上記ポリメラーゼは、アルファウイルスレプリカーゼ(例えば、アルファウイルスタンパク質nsP1、nsP2、nsP3およびnsP4のうちの1種以上を含む)であり得る。

【0025】

天然のアルファウイルスゲノムが、上記非構造レプリカーゼポリプロテインに加えて、構造的ビリオンタンパク質をコードするのに対して、本発明の自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好ましい。従って、好ましい自己複製RNAは、細胞においてそれ自体のゲノムRNAコピーの生成をもたらし得るが、RNA含有ビリオンの生成はもたらさない。これらのビリオンを生成できないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、上記自己複製RNA分子が、感染性形態においてそれ自体

10

20

30

40

50

を永続させられないことを意味する。野生型ウイルスにおいて永続に必要な上記アルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製RNAには存在せず、それらの位置は、上記目的の免疫原をコードする遺伝子によってしめられている。その結果、上記サブゲノム転写物は、上記構造的アルファウイルスポリオンタンパク質ではなく、上記免疫原をコードする。

【0026】

従って、本発明で有用な自己複製RNA分子は、2個のオープンリーディングフレームを有し得る。第1の(5'側)オープンリーディングフレームは、レプリカーゼをコードし；第2の(3'側)オープンリーディングフレームは、免疫原をコードする。いくつかの実施形態において、上記RNAは、例えば、さらなる免疫原(以下を参照のこと)をコードするために、もしくは補助ポリペプチドをコードするために、さらなる(例えば、下流の)オープンリーディングフレームを有し得る。

10

【0027】

自己複製RNA分子は、コードされたレプリカーゼとの適合性の5'配列を有し得る。

【0028】

自己複製RNA分子は、種々の長さを有し得るが、それらは、代表的には、5000~25000ヌクレオチド長(例えば、8000~15000ヌクレオチド、もしくは9000~12000ヌクレオチド)である。従って、上記RNAは、siRNA送達において認められるものより長い。

【0029】

20

本発明で有用なRNA分子は、5'キャップ(例えば、7-メチルグアノシン)を有し得る。このキャップは、上記RNAのインビボ翻訳を増強し得る。

【0030】

本発明で有用なRNA分子の上記5'ヌクレオチドは、5'トリホスフェート基を有し得る。キャップされたRNAにおいて、これは、5'から5'への架橋を介して、7-メチルグアノシンに連結され得る。5'トリホスフェートは、RIG-I結合を増強し得るので、アジュバント効果を促進し得る。

【0031】

RNA分子は、3'ポリ-Aテールを有し得る。それはまた、その3'末端付近にポリ-Aポリメラーゼ認識配列(例えば、AAUAAA)を含み得る。

30

【0032】

本発明で有用なRNA分子は、代表的には、一本鎖である。一本鎖RNAは、一般に、TLR7、TLR8、RNAヘリカーゼおよび/もしくはPKRへの結合によって、アジュバント効果を開始し得る。二本鎖形態において送達されるRNA(dsRNA)は、TLR3に結合し得、このレセプターはまた、一本鎖RNAの複製の間もしくは一本鎖RNAの二次構造内のいずれかで形成されるdsRNAによって駆動(trigger)され得る。

【0033】

本発明で有用なRNA分子は、便宜上、インビトロ転写(IVT)によって調製され得る。IVTは、細菌においてプラスミド形態において作られ、増やされたか、または合成で作製された(例えば、遺伝子合成および/もしくはポリメラーゼ連鎖反応操作法によって)(cDNA)テンプレートを使用し得る。例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼ(例えば、バクテリオファージT7、T3もしくはSP6 RNAポリメラーゼ)は、DNAテンプレートからRNAを転写するために使用され得る。適切なキャッピングおよびポリA付加反応は、必要時に使用され得る(しかし、上記レプリコンのポリAは、通常、上記DNAテンプレート内にコードされる)。これらRNAポリメラーゼは、転写される5'ヌクレオチドについてストリンジェントな要件を有し得、いくつかの実施形態において、これらの要件は、上記IVT転写RNAが、自己がコードするレプリカーゼの基質として効率的に機能し得ることを確実にするために、上記コードされたレプリカーゼの要件とマッチしなければならない。

40

50

【 0 0 3 4 】

参考文献 9 において考察されるように、上記自己複製 RNA は、（任意の 5' キャップ構造に加えて）改変された核酸塩基を有する 1 個以上のヌクレオチドを含み得る。従って、上記 RNA は、以下を含み得る：m 5 C（5 - メチルシチジン）、m 5 U（5 - メチルウリジン）、m 6 A（N 6 - メチルアデノシン）、s 2 U（2 - チオウリジン）、Um（2' - O - メチルウリジン）、m 1 A（1 - メチルアデノシン）；m 2 A（2 - メチルアデノシン）；Am（2' - O - メチルアデノシン）；ms 2 m 6 A（2 - メチルチオ - N 6 - メチルアデノシン）；i 6 A（N 6 - イソペンテニルアデノシン）；ms 2 i 6 A（2 - メチルチオ - N 6 イソペンテニルアデノシン）；i o 6 A（N 6 - （c i s - ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；ms 2 i o 6 A（2 - メチルチオ - N 6 - （c i s - ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；g 6 A（N 6 - グリシニルカルバモイルアデノシン）；t 6 A（N 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン）；ms 2 t 6 A（2 - メチルチオ - N 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン）；m 6 t 6 A（N 6 - メチル - N 6 - スレオニルカルバモイルアデノシン）；h n 6 A（N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；ms 2 h n 6 A（2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；Ar（p）（2' - O - リボシルアデノシン（ホスフェート））；I（イノシン）；m 1 I（1 - メチルイノシン）；m' Im（1, 2' - O - ジメチルイノシン）；m 3 C（3 - メチルシチジン）；Cm（2 T - O - メチルシチジン）；s 2 C（2 - チオシチジン）；ac 4 C（N 4 - アセチルシチジン）；f 5 C（5 - ホルミル（f o n n y l）シチジン）；m 5 Cm（5, 2 - O - ジメチルシチジン）；ac 4 Cm（N 4 アセチル 2 T O メチルシチジン）；k 2 C（リシジン）；m 1 G（1 - メチルグアノシン）；m 2 G（N 2 - メチルグアノシン）；m 7 G（7 - メチルグアノシン）；Gm（2' - O - メチルグアノシン）；m 2 2 G（N 2, N 2 - ジメチルグアノシン）；m 2 Gm（N 2, 2' - O - ジメチルグアノシン）；m 2 2 Gm（N 2, N 2, 2' - O - トリメチルグアノシン）；Gr（p）（2' - O - リボシルグアノシン（ホスフェート））；y W（ワイプトシン）；o 2 y W（ベルオキシワイプトシン）；O H y W（ヒドロキシワイプトシン）；O H y W*（改変未満（u n d e r m o d i f i e d）ヒドロキシワイプトシン）；i m G（ワイオシン）；m i m G（メチルグアノシン）；Q（キューオシン）；o Q（エポキシキューオシン）；gal Q（ガラクトシル（g a l t a c t o s y l）- キューオシン）；man Q（マンノシル - キューオシン）；pre Q o（7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン）；pre Q i（7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン）；G*（アルカエオシン（a r c h a e o s i n e））；D（ジヒドロウリジン）；m 5 Um（5, 2' - O - ジメチルウリジン）；s 4 U（4 - チオウリジン）；m 5 s 2 U（5 - メチル - 2 - チオウリジン）；s 2 Um（2 - チオ - 2' - O - メチルウリジン）；ac p 3 U（3 - （3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル）ウリジン）；h o 5 U（5 - ヒドロキシウリジン）；m o 5 U（5 - メトキシウリジン）；c m o 5 U（ウリジン 5 - オキシ酢酸）；m c m o 5 U（ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステル）；c h m 5 U（5 - （カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン）；m c h m 5 U（5 - （カルボキシヒドロキシメチル）ウリジンメチルエステル）；m c m 5 U（5 - メトキシカルボニルメチルウリジン）；m c m 5 Um（S - メトキシカルボニルメチル - 2 - O - メチルウリジン）；m c m 5 s 2 U（5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン）；n m 5 s 2 U（5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン）；m n m 5 U（5 - メチルアミノメチルウリジン）；m n m 5 s 2 U（5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン）；m n m 5 s e 2 U（5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン）；n c m 5 U（5 - カルバモイルメチルウリジン）；n c m 5 Um（5 - カルバモイルメチル - 2' - O - メチルウリジン）；c m n m 5 U（5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン）；c n m m 5 U（5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - L - O メチルウリジン）；c m n m 5 s 2 U（5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン）；m 6 2 A（N 6, N 6 - ジメチルアデノシン）；T m（2' - O - メチルイノシン）；m 4 C（N 4 - メチルシチジン）；m 4 Cm（N 4, 2 - O - ジメチルシチジン）；h m 5 C（5 - ヒドロキシメチ

10

20

30

40

50

ルシチジン) ; m 3 U (3 - メチルウリジン) ; c m 5 U (5 - カルボキシメチルウリジン) ; m 6 A m (N 6 , T - O - ジメチルアデノシン) ; r n 6 2 A m (N 6 , N 6 , O - 2 - トリメチルアデノシン) ; m 2 ' 7 G (N 2 , 7 - ジメチルグアノシン) ; m 2 ' 2 ' 7 G (N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアノシン) ; m 3 U m (3 , 2 T - O - ジメチルウリジン) ; m 5 D (5 - メチルジヒドロウリジン) ; f 5 C m (5 - ホルミル - 2 ' - O - メチルシチジン) ; m 1 G m (1 , 2 ' - O - ジメチルグアノシン) ; m ' A m ((1 , 2 - O - ジメチルアデノシン) イリノメチルウリジン) ; t m 5 s 2 U (S - タウリノメチル - 2 - チオウリジン) ; i m G - 1 4 (4 - デメチルグアノシン) ; i m G 2 (イソグアノシン) ; もしくは a c 6 A (N 6 - アセチルアデノシン)、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソ - アデニン、7 - 置換されたその誘導体、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - (C 1 - C 6) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - (C 2 - C 6) - アルケニルウラシル、5 - (C 2 - C 6) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル) ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - (C 1 - C 6) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - (C 2 - C 6) - アルケニルシトシン、5 - (C 2 - C 6) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、N 2 - ジメチルグアニン、7 - デアザグアニン、8 - アザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 7 - (C 2 - C 6) アルキニルグアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、8 - ヒドロキシグアニン、6 - チオグアニン、8 - オキソグアニン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2 , 4 - ジアミノプリン、2 , 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換された7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、または無塩基ヌクレオチド。例えば、自己複製RNAは、1つ以上の改変されたピリミジン核酸塩基(例えば、シュードウリジンおよび/もしくは5 - メチルシトシン残基)を含み得る。しかし、いくつかの実施形態において、上記RNAは、改変された核酸塩基を含まず、改変されたヌクレオチドを含まなくてもよい(すなわち、上記RNA中のヌクレオチドのすべては、標準的なA、C、GおよびUというリボヌクレオチドである(任意の5' キャップ構造を除く。これは、7' - メチルグアノシンを含み得る))。他の実施形態において、上記RNAは、7' - メチルグアノシンを含む5' キャップを含み得、最初の1個、2個もしくは3個の5' リボヌクレオチドは、リボースの2' 位においてメチル化され得る。

【0035】

本発明で使用されるRNAは、理想的には、ヌクレオチド間にホスホジエステル結合のみを含むが、いくつかの実施形態において、それは、ホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合、および/もしくはメチルホスホネート結合を含み得る。

【0036】

理想的には、リボソームは、10より少ない種の異なるRNA(例えば、5種、4種、3種、もしくは2種の異なる種)を含み；最も好ましくは、リボソームは、単一のRNA種を含み、すなわち、上記リボソーム中の全てのRNA分子は、同じ配列および同じ長さを有する。

【0037】

リボソーム1つあたりのRNAの量は、変動し得る。リボソーム1つあたりの個々の自己複製RNA分子の数は、代表的には、リボソーム1つあたり50(例えば、<20、<10、<5、もしくは1~4)である。

【0038】

(免疫原)

本発明で使用されるRNA分子は、ポリペプチド免疫原をコードする。上記リボソームの投与後に、上記RNAは、インビボで翻訳され、上記免疫原はレシピエントにおける免疫応答を誘発し得る。上記免疫原は、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物に対して(あるいは、いくつかの実施形態において、アレルゲンに対して；および他の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、腫瘍抗原に対して)免疫応答を誘発し得る。上記免疫応答は、抗体応答(通常は、IgGを含む)および/もしくは細胞媒介性免疫応答を含み得る。上記ポリペプチド免疫原は、代表的には、対応する細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物(またはアレルゲンもしくは腫瘍)ポリペプチドを認識する免疫応答を誘発するが、いくつかの実施形態において、上記ポリペプチドは、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物のサッカリドを認識する免疫応答を誘発するように、ミモトープとして作用し得る。上記免疫原は、代表的には、表面ポリペプチド(例えば、アドヘシン、ヘマグルチニン、エンベロープ糖タンパク質、スパイク糖タンパク質など)である。

【0039】

上記RNA分子は、単一のポリペプチド免疫原もしくは複数のポリペプチドをコードし得る。複数の免疫原は、単一のポリペプチド免疫原(融合ポリペプチド)として、または別個のポリペプチドとして提示され得る。免疫原が、レプリコンから別個のポリペプチドとして発現される場合、これらのうちの1種以上は、上流のIRESもしくはさらなるウイルスプロモーターエレメントと共に提供され得る。あるいは、複数の免疫原は、短い自己触媒性プロテアーゼ(例えば、口蹄疫ウイルス2Aタンパク質)に融合された個々の免疫原をコードするポリプロテインから、またはインテインとして発現され得る。

【0040】

参考文献1および10とは異なり、上記RNAは、免疫原をコードする。不確かさを避けるために、本発明は、ホタルルシフェラーゼをコードするRNA、E.coli - ガラクトシダーゼの融合タンパク質をコードするRNA、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするRNAを含まない。このようなポリペプチドは、マーカーとして、またはさらに遺伝子治療の状況においても有用であり得るが、本発明は、免疫学的応答系を誘発するためのRNAの送達に関する。遺伝子治療のためのリボソームの最適な直径は、免疫化目的のためのリボソームとは異なり得る。なぜなら標的細胞および組織が、これら2つのアプローチに関して異なるからである。従って、上記免疫原はまた、防御的宿主タンパク質を補充するかもしれないもしくはその代わりになる(遺伝子治療におけるように)ように送達される自己タンパク質ではない。また、上記RNAは、全マウス胸腺RNAではない。

【0041】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、これら細菌のうちの1種に対して免疫応答を誘発する：

Neisseria meningitidis：有用な免疫原としては、膜タンパク質、例えば、アドヘシン、オートトランスポーター、毒素、鉄獲得タンパク質、およびH因子結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。3種の有用なポリペプチドの組み合わせが、参考文献11に開示される。

【0042】

Streptococcus pneumoniae：有用なポリペプチド免疫原は、参考文献12に開示される。これらとしては、RrgB線毛サブユニット、-N-アセチル-ヘキソサミニダーゼ前駆体(spr0057)、spr0096、一般的なストレスタンパク質(general stress protein)GSP-781(spr2021、SP2216)、セリン/スレオニンキナーゼStkP(SP1732)、および肺炎球菌表面アドヘシンPsaAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

Streptococcus pyogenes：有用な免疫原としては、参考文献13および14に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

Moraxella catarrhalis

Bordetella pertussis：有用な百日咳免疫原としては、百日咳毒素もしくはトキソイド(PT)、線維状ヘマグルチニン(FHA)、ペルタクチン、ならびに凝集原2および3が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

10

20

30

40

50

Staphylococcus aureus : 有用な免疫原としては、参考文献 15 に開示されるポリペプチド (例えば、溶血素、*esxA*、*esxB*、フェリクロム結合タンパク質 (*sta006*) および / もしくは *sta011* リボプロテイン) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

Clostridium tetani : 代表的な免疫原は、破傷風トキソイドである。

【0047】

Corynebacterium diphtheriae : 代表的な免疫原は、ジフテリアトキソイドである。

【0048】

Haemophilus influenzae : 有用な免疫原としては、参考文献 16 および 17 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

Pseudomonas aeruginosa

Streptococcus agalactiae : 有用な免疫原としては、参考文献 13 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0050】

Chlamydia trachomatis : 有用な免疫原としては、*PepA*、*LcrE*、*ArtJ*、*DnaK*、*CT398*、*OmpH* 様、*L7/L12*、*OmcA*、*AtoS*、*CT547*、*Eno*、*HtrA* および *MurG* (例えば、参考文献 18 に開示されるとおり) が挙げられるが、これらに限定されない。*LcrE* [19] および *HtrA* [20] は、2つの好ましい免疫原である。

【0051】

Chlamydia pneumoniae : 有用な免疫原としては、参考文献 21 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0052】

Helicobacter pylori : 有用な免疫原としては、*CagA*、*VacA*、*NAP*、および / もしくはウレアーゼ [22] が挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

Escherichia coli : 有用な免疫原としては、腸毒素産生性 *E. coli* (*ETEC*)、腸管凝集性 *E. coli* (*EAggEC*)、分散接着性 (*diffusely adhering*) *E. coli* (*DAEC*)、腸病原性 *E. coli* (*EPEC*)、腸管外病原性 *E. coli* (*ExPEC*) および / もしくは腸管出血性 *E. coli* (*EHEC*) に由来する免疫原が挙げられるが、これらに限定されない。*ExPEC* 株としては、尿路病原性 *E. coli* (*UPEC*) および髄膜炎 / 敗血症関連 *E. coli* (*MNEC*) が挙げられる。有用な *UPEC* ポリペプチド免疫原は、参考文献 23 および 24 に開示される。有用な *MNEC* 免疫原は、参考文献 25 に開示される。いくつかの *E. coli* タイプに有用な免疫原は、*AcfD* である [26]。

【0054】

Bacillus anthracis

Yersinia pestis : 有用な免疫原としては、参考文献 27 および 28 に開示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

10

20

30

40

【化 1】

*Staphylococcus epidermis**Clostridium perfringens* もしくは *Clostridium botulinum**Legionella pneumophila**Coxiella burnetii**Brucella*, 例えば *B.abortus*, *B.canis*, *B.melitensis*, *B.neotomae*, *B.ovis*, *B.suis*, *B.pinnipediae*.*Francisella*, 例えば *F.novicida*, *F.philomiragia*, *F.tularensis*.*Neisseria gonorrhoeae**Treponema pallidum**Haemophilus ducreyi**Enterococcus faecalis* もしくは *Enterococcus faecium**Staphylococcus saprophyticus**Yersinia enterocolitica**Mycobacterium tuberculosis**Rickettsia**Listeria monocytogenes**Vibrio cholerae**Salmonella typhi**Borrelia burgdorferi**Porphyromonas gingivalis**Klebsiella*

10

20

30

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、これらウイルスのうちの 1 種に対して免疫応答を誘発する：

オルソミクソウイルス：有用な免疫原は、インフルエンザ A、B もしくは C ウイルスに由来し得る（例えば、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼもしくはマトリクス M 2 タンパク質）。上記免疫原がインフルエンザ A ウイルスヘマグルチニンである場合、それは、任意のサブタイプ（例えば、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 10、H 11、H 12、H 13、H 14、H 15 もしくは H 16）に由来し得る。

40

【0056】

パラミクソウイルス科のウイルス：ウイルス免疫原としては、肺炎ウイルス（例えば、RS ウイルス、RSV）、ルブラウイルス（例えば、ムンプスウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザ・ウイルス）、メタニューモウイルスおよびモルビリウイルス（例えば、麻疹ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0057】

ポックスウイルス科：ウイルス免疫原としては、オルトポックスウイルス（例えば、真

50

正痘瘡（大痘瘡および小痘瘡が挙げられるが、これらに限定されない））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

ピコルナウイルス：ウイルス免疫原としては、ピコルナウイルス（例えば、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパルナウイルス、カルジオウイルスおよびアフトウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、上記エンテロウイルスは、ポリオウイルス（例えば、1型、2型、および／もしくは3型のポリオウイルス）である。別の実施形態において、上記エンテロウイルスは、E V 7 1 エンテロウイルスである。別の実施形態において、上記エンテロウイルスは、コクサッキー A もしくは B ウイルスである。

10

【 0 0 5 9 】

ブンヤウイルス：ウイルス免疫原としては、オルソブンヤウイルス（例えば、カリフォルニア脳炎ウイルス）、フレボウイルス（例えば、リフトバレー熱ウイルス）、もしくはナイロウイルス（例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

ヘパルナウイルス：ウイルス免疫原としては、ヘパルナウイルス（例えば、A 型肝炎ウイルス（H A V））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 1 】

フィロウイルス：ウイルス免疫原としては、フィロウイルス（例えば、エボラウイルス（ザイルエボラウイルス、アイボリーコーストエボラウイルス、レストンエボラウイルスもしくはスーダンエボラウイルスを含む））またはマールブルグウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 6 2 】

トガウイルス：ウイルス免疫原としては、トガウイルス（例えば、ルビウイルス、アルファウイルス、もしくはアルテリウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。これは、風疹ウイルスを含む。

【 0 0 6 3 】

フラビウイルス：ウイルス免疫原としては、フラビウイルス（例えば、ダニ媒介脳炎（T B E）ウイルス、デング（1、2、3もしくは4型）ウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、ウエストナイル脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルス、ポワッサン脳炎ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 6 4 】

ペスチウイルス：ウイルス免疫原としては、ペスチウイルス（例えば、牛ウイルス性下痢（B V D V）、豚コレラ（C S F V）もしくはボーダー病（B D V））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 5 】

ヘパドナウイルス：ウイルス免疫原としては、ヘパドナウイルス（例えば、B 型肝炎ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、B 型肝炎ウイルス表面抗原（H B s A g）を含み得る。

40

【 0 0 6 6 】

他の肝炎ウイルス：組成物は、C 型肝炎ウイルス、デルタ型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、もしくはG 型肝炎ウイルスに由来する免疫原を含み得る。

【 0 0 6 7 】

ラブドウイルス：ウイルス免疫原としては、ラブドウイルス（例えば、リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）およびベシクロウイルス（V S V））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 8 】

カリシウイルス科：ウイルス免疫原としては、カリシウイルス科（例えば、ノーウォー

50

クウイルス（ノロウイルス）、およびノーウォーク様ウイルス（例えば、ハワイウイルスおよびスノーマウンテンウイルス））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

コロナウイルス：ウイルス免疫原は、SARSコロナウイルス、トリ伝染性気管支炎（IBV）、マウス肝炎ウイルス（MHV）、およびブタ伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。上記コロナウイルス免疫原は、スパイクポリペプチドであり得る。

【0070】

レトロウイルス：ウイルス免疫原としては、オンコウイルス、レンチウイルス（例えば、HIV-1もしくはHIV-2）またはスプマウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

レオウイルス：ウイルス免疫原としては、オルトレオウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、もしくはコルチウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0072】

パルボウイルス：ウイルス免疫原としては、パルボウイルスB19に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

ヘルペスウイルス：ウイルス免疫原としては、ヒトヘルペスウイルス（例えば、例示に過ぎないが、単純ヘルペスウイルス（HSV）（例えば、HSV1型および2型）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタイン・バー・ウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV6）、ヒトヘルペスウイルス7（HHV7）、およびヒトヘルペスウイルス8（HHV8））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

パポバウイルス：ウイルス免疫原としては、パピローマウイルスおよびポリオーマウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。上記（ヒト）パピローマウイルスは、血清型1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63もしくは65のもの（例えば、血清型6、11、16および/もしくは18のうちの1種以上に由来する）であり得る。

【0075】

アデノウイルス：ウイルス免疫原としては、アデノウイルス血清型36（Ad-36）に由来するものが挙げられる。

【0076】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、魚類に感染するウイルス（例えば：伝染性サケ貧血ウイルス（ISA）、サケ脾臓病ウイルス（SPDV）、伝染性脾臓壊死症ウイルス（IPNV）、アメリカナマズウイルス（CCV）、魚類リンホシスチス病ウイルス（FLDV）、伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）、コイヘルペスウイルス、サケピコルナ様ウイルス（大西洋サケピコルナ様ウイルスとしても公知）、ヤマメウイルス（LSV）、大西洋サケロタウイルス（ASR）、マスイチゴ病ウイルス（TSD）、銀ザケ腫瘍ウイルス（CSTV）、もしくはウイルス性出血性敗血症ウイルス（VHSV））に対する免疫応答を誘発する。

【0077】

真菌免疫原は、皮膚糸状菌類（*Dermatophytes*）（以下が挙げられる：

【0078】

10

20

30

40

【化2】

Epidermophyton floccusum,
Microsporum audouini, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*,
Microsporum gypsum, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*,

【0079】

【化3】

Trichophyton gallinae, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*,
Trichophyton tonsurans, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoideus*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum*, および/もしくは *Trichophyton faviforme*; または *Aspergillus fumigatus*,
Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*,
Aspergillus flavatus, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitaniae*, *Candida pseudotropicalis*,
Candida guilliermondi, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*,
Cryptococcus neoformans, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*,
Microsporidia, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* および *Enterocytozoon bieneusi*; それほど
一般的でないものは *Brachiola* spp., *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp.,
Trachipleistophora spp., *Vittaforma* spp *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*,
Pythium insidiosum, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*,
Saccharomyces pombe, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*,
Toxoplasma gondii, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp.,
Sporothrix spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp,
Mortierella spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp,
Helminthosporium spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia*
spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp, および *Cladosporium* spp. (である)

に由来し得る。

【0080】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、*Plasmodium* 属（例えば、*P. falciparum*、*P. vivax*、*P. malariae* もしくは *P. ovale*）に由来する寄生生物に対する免疫応答を誘発する。従って、本発明は、マラリアに対して免疫化するために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記免疫原は、*Caligidae* 科に由来する寄生生物、特に、*Lepeophtheirus* 属および *Caligus* 属に由来する寄生生物（例えば、*Lepeophtheirus salmonis* もしくは *Caligus rogercresseyi* のようなフナムシ）に対する免疫応答を誘発する。

【0081】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、以下に対する免疫応答を誘発する：花粉アレルゲン（樹木花粉、草本花粉、雑草の花粉、および草の花粉のアレルゲン）；昆虫もしくは蛛形類のアレルゲン（吸入、唾液および毒液のアレルゲン、例えば、ダニアレルゲン、ゴキブリアレルゲンおよび小虫アレルゲン、膜翅類毒液アレルゲン（*hymenoptera venom allergen*））；動物の毛およびふけのアレルゲン（例

えば、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、マウスなどに由来する)；ならびに食物アレルギー(例えば、グリアジン)。樹木、草および草本に由来する重要な花粉アレルギーは、Fagales、Oleales、Pinalesの分類学上の目およびスズカケノキ科(Platanaceae)(カバノキ(Betula)、ハンノキ(Alnus)、ハシバミ(Corylus)、シデ(Carpinus)およびオリーブ(Olea)、シーダー(CryptomeriaおよびJuniperus)、プラタナス(Platanus)が挙げられるが、これらに限定されない)、Poalesの目(属Lolium、Phleum、Poa、Cynodon、Dactylis、Holcus、Phalaris、Secale、およびSorghumの草が挙げられる)、AsteralesおよびUrticalesの目(属Ambrosia、Artemisia、およびParietariaの草本が挙げられる)から由来するそのようなものである。他の重要な吸入アレルギーは、属DermatophagoideesおよびEuroglyphusのチリダニ類、コナダニ類(storage mite)(例えば、Lepidoglyphys、GlycyphagusおよびTyrophagus)、ゴキブリ、小虫およびノミに由来するもの(例えば、Blattella、Periplaneta、ChironomusおよびCtenocephalides)、ならびに哺乳動物(例えば、ネコ、イヌおよびウマ)に由来するもの、毒液のアレルギー(刺咬昆虫(stinging or biting insect)に由来するもの、例えば、Hymenopteraの分類学上の目(蜂(Apidae)、スズメバチ(Vespidae)、およびアリ(Formicoidae)が挙げられる)が挙げられる)に由来するものである。

【0082】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、以下から選択される腫瘍抗原である：(a)がん-精巢(cancer-testis)抗原、例えば、NY-ESO-1、SSX2、SCP1ならびにRAGE、BAGE、GAGEおよびMAGEファミリーのポリペプチド(例えば、GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、およびMAGE-12)、これらは、例えば、黒色腫、肺、頭頸部、NSCLC、乳房、胃腸、および膀胱の腫瘍に対処するために使用され得る；(b)変異した抗原、例えば、p53(種々の固形腫瘍(例えば、結腸直腸がん、肺がん、頭頸部がん)と関連)、p21/Ras(例えば、黒色腫、膵臓がんおよび結腸直腸がんと関連)、CDK4(例えば、黒色腫と関連)、MUM1(例えば、黒色腫と関連)、カスパーゼ-8(例えば、頭頸部がんと関連)、CIA0205(例えば、膀胱がんと関連)、HLA-A2-R1701、-カテニン(例えば、黒色腫と関連)、TCR(例えば、T細胞非ホジキンリンパ腫と関連)、BCR-ab1(例えば、慢性骨髄性白血病と関連)、トリオースホスフェートイソメラーゼ、KIA0205、CDC-27、およびLDLR-FUT；(c)過剰発現された抗原、例えば、ガレクチン4(例えば、結腸直腸がんと関連)、ガレクチン9(例えば、ホジキン病と関連)、プロテインナーゼ3(例えば、慢性骨髄性白血病と関連)、WT1(例えば、種々の白血病と関連)、炭酸脱水酵素(例えば、腎がんと関連)、アルドラーゼA(例えば、肺がんと関連)、PRAME(例えば、黒色腫と関連)、HER-2/neu(例えば、乳がん、結腸がん、肺がんおよび卵巣がんと関連)、マンマグロビン、-フェトプロテイン(例えば、肝がんと関連)、KSA(例えば、結腸直腸がんと関連)、ガストリン(例えば、膵臓がんおよび胃がんと関連)、テロメラーゼ触媒タンパク質、MUC-1(例えば、乳がんおよび卵巣がんと関連)、G-250(例えば、腎細胞がんと関連)、p53(例えば、乳がん、結腸がん、肺がん、および胃腸管のがん(例えば、結腸直腸がん)と関連)；(d)共通抗原(shared antigen)、例えば、黒色腫-メラノサイト分化抗原、例えば、MART-1/MelanA、gp100、MC1R、メラノサイト刺激ホルモンレセプター、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質-1/TRP1およびチロシナーゼ関連タンパク質-2/TRP2(例えば、黒色腫と関連)；(e)前立腺関連抗原(例えば、PAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2(例えば、前立腺が

んと関連)) ; (f) イムノグロブリンイディオタイプ (例えば、骨髄腫およびB細胞リンパ腫と関連)。特定の実施形態において、腫瘍免疫原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : p 1 5、H o m / M e l - 4 0、H - R a s、E 2 A - P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A R、エプスタイン・バー・ウイルス抗原、E B N A、ヒトパピローマウイルス (H P V) 抗原 (E 6 および E 7 を含む)、B 型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの抗原、ヒトTリンパ球向性ウイルス抗原、

【 0 0 8 3 】

【 化 4 】

TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, ベータ-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90

10

(M a c - 2 結合タンパク質 / シクロフィリンC 関連タンパク質)、T A A L 6、T A G 7 2、T L P、T P S など。

【 0 0 8 4 】

(薬学的組成物)

本発明のリボソームは、種々の疾患に対して被験体を免疫化するための薬学的組成物中の成分として有用である。これらの組成物は、代表的には、上記リボソームに加えて、薬学的に受容可能なキャリアを含む。薬学的に受容可能なキャリアの詳細な考察は、参考文献 2 9 において入手可能である。

20

【 0 0 8 5 】

本発明の薬学的組成物は、1 種以上の低分子免疫強化因子を含み得る。例えば、上記組成物は、T L R 2 アゴニスト (例えば、P a m 3 C S K 4)、T L R 4 アゴニスト (例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート (例えば、E 6 0 2 0))、T L R 7 アゴニスト (例えば、イミキモド)、T L R 8 アゴニスト (例えば、レシキモド) および / もしくは T L R 9 アゴニスト (例えば、I C 3 1) を含み得る。任意のこのようなアゴニストは、理想的には、分子量 < 2 0 0 0 D a を有する。いくつかの実施形態において、このようなアゴニストもまた、上記 R N A と共リボソーム内に被包されるが、他の実施形態において、それらは、被包されない。

30

【 0 0 8 6 】

本発明の薬学的組成物は、上記リボソームを、ただの水 (p l a i n w a t e r) (例えば、w . f . i .) もしくは緩衝液 (例えば、リン酸緩衝液、T r i s 緩衝液、ホウ酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、もしくはクエン酸緩衝液) 中に含み得る。緩衝塩は、代表的には、5 ~ 2 0 m M 範囲において含まれる。

【 0 0 8 7 】

本発明の薬学的組成物は、5 . 0 ~ 9 . 5 (例えば、6 . 0 ~ 8 . 0) の p H を有し得る。

40

【 0 0 8 8 】

本発明の組成物は、張度を与えるために、ナトリウム塩 (例えば、塩化ナトリウム) を含み得る。1 0 ± 2 m g / m l N a C l の濃度が代表的である (例えば、約 9 m g / m l)。

【 0 0 8 9 】

本発明の組成物は、金属イオンキレート化剤を含み得る。これらは、ホスホジエステル加水分解を加速し得るイオンを除去することによって、R N A 安定性を延長し得る。従って、組成物は、E D T A、E G T A、B A P T A、ペンテ酸などのうちの 1 種以上を含み得る。このようなキレート化剤は、代表的には、1 0 ~ 5 0 0 μ M (例えば、0 . 1 m

50

M) で存在する。クエン酸塩 (例えば、クエン酸ナトリウム) はまた、キレート化剤として作用し得るのと同時に、有利なことには、緩衝化活性も提供し得る。

【0090】

本発明の薬学的組成物は、 $200\text{ mOsm/kg} \sim 400\text{ mOsm/kg}$ (例えば、 $240 \sim 360\text{ mOsm/kg}$ 、もしくは $290 \sim 310\text{ mOsm/kg}$) の重量オスモル濃度を有し得る。

【0091】

本発明の薬学的組成物は、1種以上の保存剤 (例えば、チオメルサルもしくは2-フェノキシエタノール) を含み得る。水銀非含有組成物が好ましく、保存剤非含有ワクチンが調製され得る。

【0092】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、無菌である。

【0093】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、非発熱性である (例えば、1用量あたり $< 1\text{ EU}$ (エンドトキシユニット、標準尺度)、および好ましくは、1用量あたり $< 0.1\text{ EU}$ を含む)。

【0094】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、グルテンを含まない。

【0095】

本発明の薬学的組成物は、単位用量形態において調製され得る。いくつかの実施形態において、単位用量は、 $0.1 \sim 1.0\text{ ml}$ (例えば、約 0.5 ml) の容積を有し得る。

【0096】

上記組成物は、注射物として調製され得る (溶液もしくは懸濁物のいずれかとして)。上記組成物は、微細スプレーを使用する、肺投与 (例えば、吸入器による) のために調製され得る。上記組成物は、鼻、耳もしくは眼への投与 (例えば、スプレーもしくは滴剤として) のために調製され得る。筋肉内投与のための注射物が、代表的である。

【0097】

組成物は、免疫学的に有効量のリボソーム、ならびに任意の他の成分 (必要であれば) を含む。「免疫学的に有効な量」とは、個体への投与量が、単一用量においてもしくはシリーズのうちの一部としてのいずれかで、処置もしくは予防に有効であることを意味する。この量は、処置されるべき個体の健康状態および身体的状態、処置されるべき個体の年齢、分類学上の群 (例えば、非ヒト霊長類、霊長類など)、上記個体が抗体を合成する免疫系の能力、所望される防御の程度、ワクチンの処方、その処置している医師の医学的状況の評価、および他の関連因子に依存して変動する。上記量は、慣用的な治験を通じて決定され得る比較的広い範囲に入ると予測される。本発明の組成物のリボソームおよびRNA含有量は、一般に、1用量あたりのRNAの量に関して表される。好ましい用量は、 $100\text{ }\mu\text{g}$ RNA (例えば、 $10 \sim 100\text{ }\mu\text{g}$ (例えば、約 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、 $25\text{ }\mu\text{g}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g}$ 、 $75\text{ }\mu\text{g}$ もしくは $100\text{ }\mu\text{g}$)) を有するが、発現は、遙かに低いレベル、例えば、 $1\text{ }\mu\text{g/用量}$ 、 100 ng/用量 、 10 ng/用量 、 1 ng/用量 などにおいてみられ得る。

【0098】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含む送達デバイス (例えば、シリンジ、ネブライザ、噴霧器、吸入器、皮膚パッチなど) を提供する。このデバイスは、上記組成物を脊椎動物被験体に投与するために使用され得る。

【0099】

本発明のリボソームは、リボソームを含まない。

【0100】

(処置方法および医学的使用)

参考文献10で開示される粒子とは対照的に、本発明のリボソームおよび薬学的組成物は、目的の免疫原に対する免疫応答を誘発するためのインビボでの使用のためのものであ

10

20

30

40

50

る。

【0101】

本発明は、本発明のリボソームもしくは薬学的組成物の有効量を投与する工程を包含する、脊椎動物において免疫応答を惹起するための方法を提供する。上記免疫応答は、好ましくは、防御的であり、好ましくは、抗体および／もしくは細胞媒介性免疫を含む。上記方法は、ブースター応答を惹起し得る。

【0102】

本発明はまた、脊椎動物における免疫応答を惹起するための方法において使用するための本発明のリボソームもしくは薬学的組成物を提供する。

【0103】

本発明はまた、脊椎動物における免疫応答を惹起するための医薬の製造における本発明のリボソームの使用を提供する。

【0104】

これら使用および方法により上記脊椎動物における免疫応答を惹起することによって、上記脊椎動物は、上記で考察されるように、種々の疾患および／もしくは感染から（例えば、細菌疾患および／もしくはウイルス疾患から）防御され得る。上記リボソームおよび組成物は、免疫原性であり、より好ましくは、ワクチン組成物である。本発明に従うワクチンは、予防的である（すなわち、感染を妨ぐ）か、もしくは治療的である（すなわち、感染を処置する）のいずれかであり得るが、代表的には、予防的である。

【0105】

上記脊椎動物は、好ましくは、哺乳動物、例えば、ヒトもしくは大型の獣医学的哺乳動物（例えば、ウマ、ウシ、シカ、ヤギ、ブタ）である。上記ワクチンが予防的使用のためのものである場合、上記ヒトは、好ましくは、小児（例えば、幼児もしくは乳児）またはティーンエイジャーである；上記ワクチンが治療的使用のためのものである場合、上記ヒトは、好ましくは、ティーンエイジャーもしくは成人である。小児用に意図されたワクチンはまた、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために、成人に投与され得る。

【0106】

本発明に従って調製されるワクチンは、小児および成人の両方を処置するために使用され得る。従って、ヒト患者は、1歳未満、5歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳、もしくは少なくとも55歳であってもよい。上記ワクチンを受けるのに好ましい患者は、高齢者（例えば、50歳、60歳、および好ましくは、65歳）、若年者（例えば、5歳）、入院患者、ヘルスケアワーカー、軍従事者、および軍職員、妊婦、慢性疾患患者、もしくは免疫不全患者である。しかし、上記ワクチンは、これらの群にのみ適切であるわけではなく、より一般に、集団において使用され得る。

【0107】

本発明の組成物は、一般に、患者に直接投与される。直接送達は、非経口注射によって達成され得る（例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内、もしくは組織の間隙空間に；参考文献1とは異なり、舌内（*intraglossal*）注射は、代表的には、本発明で使用されない）。代替の送達経路としては、直腸、経口（例えば、錠剤、スプレー）、口内、舌下、膺、局所、経真皮（*transdermal*）もしくは経皮（*transcutaneous*）、鼻内、眼、耳、肺もしくは他の粘膜投与が挙げられる。皮内および筋肉内投与は、2つの好ましい経路である。注射は、針を介してであってもよい（例えば、皮下針）が、針なしの注射が、代わりに使用され得る。代表的な筋肉内用量は、0.5 ml である。

【0108】

本発明は、全身免疫および／もしくは粘膜免疫を誘発するために、好ましくは、増強された全身免疫および／もしくは粘膜免疫を誘発するために、使用され得る。

【0109】

投与量は、単一用量スケジュールもしくは複数用量スケジュールによってであり得る。

10

20

30

40

50

複数用量は、一次免疫スケジュールにおいて、および／もしくはブースター免疫スケジュールにおいて使用され得る。複数用量スケジュールにおいて、種々の用量が、同じ経路もしくは異なる経路（例えば、非経口の一次と粘膜のブースト、粘膜の一次と非経口のブーストなど）によって与えられ得る。複数用量は、代表的には、少なくとも1週間間隔を空けて（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）投与される。一実施形態において、複数用量は、生後約6週間、10週間、および14週間で（例えば、世界保健機関のExpanded Program on Immunisation（「EPI」）においてしばしば使用されるように、6週齢、10週齢および14週齢において）投与され得る。代替の実施形態において、2回の一次用量が、約2ヶ月間間隔を空けて（例えば、約7週間、8週間もしくは9週間間隔を空けて）投与され、続いて、1回以上のブースター用量が、2回目の一次用量の約6ヶ月から1年後に（例えば、2回目の一次用量の約6ヶ月後、8ヶ月後、10ヶ月後もしくは12ヶ月後）投与される。さらなる実施形態において、3回の一次用量が、約2ヶ月間間隔を空けて（例えば、約7週間、8週間もしくは9週間間隔を空けて）投与され、続いて、1回以上のブースター用量が、3回目の一次用量の約6ヶ月後から1年後に（例えば、3回目の一次用量の約6ヶ月後、8ヶ月後、10ヶ月後もしくは12ヶ月後）投与される。

10

【0110】

（一般）

本発明の粒子は、別段示されなければ、化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の、当該分野の技術内の従来の方法を使用する。このような技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、参考文献30～36などを参照のこと。

20

【0111】

用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」ならびに「からなる（consisting）」を包含し、例えば、Xを「含む（comprising）」組成物は、Xから専らなってもよいし、何かさらなるものを含んでいてもよい（例えば、X+Y）。

【0112】

数値xに関して用語「約」とは、選択的であり、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0113】

語句「実質的に」とは、「完全に」を排除せず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まない場合もある。必要な場合、語句「実質的に」は、本発明の定義から省略され得る。

30

【0114】

電荷、カチオン、アニオン、両性性イオンなどへの言及は、pH7において取り扱われる。

【0115】

TLR3は、Toll様レセプター3である。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR3アゴニストは、ポリ（I:C）を含む。「TLR3」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:11849である。ヒトTLR3遺伝子のRefSeq配列は、GI:2459625である。

40

【0116】

TLR7は、Toll様レセプター7である。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR7アゴニストは、例えば、イミキモドを含む。「TLR7」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:15631である。ヒトTLR7遺伝子のRefSeq配列は、GI:67944638である。

【0117】

TLR8は、Toll様レセプター8である。これは、先天免疫系において重要な役

50

割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR8アゴニストは、例えば、レシキモドを含む。「TLR8」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:15632である。ヒトTLR8遺伝子のRefSeq配列は、GI:20302165である。

【0118】

RIG-I様レセプター(「RLR」)ファミリーは、先天免疫系において重要な役割を果たす種々のRNAヘリカーゼを含む[37]。RLR-1(RIG-Iもしくはレチノイン酸誘導性遺伝子Iとしても公知)は、そのN末端付近にある2つのカスパーゼリクルートドメインを有する。上記RLR-1ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「DDX58」(DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド58(DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)box polypeptide 58)について)であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:19102である。ヒトRLR-1遺伝子のRefSeq配列は、GI:77732514である。RLR-2(MDA5もしくは黒色腫分化関連遺伝子5(melanoma differentiation-associated gene 5)としても公知)はまた、そのN末端付近にある2つのカスパーゼリクルートドメインを有する。RLR-2ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「IFIH1」(ヘリカーゼCドメイン1で誘導されるインターフェロン(interferon induced with helicase C domain 1)について)であり、特有のHGNC IDは、HGNC:18873である。ヒトRLR-2遺伝子のRefSeq配列は、GI:27886567である。RLR-3(LGP2もしくは遺伝学および生理学研究室2(laboratory of genetics and physiology 2)としても公知)は、カスパーゼリクルートドメインを有さない。RLR-3ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「DHX58」(DEXH(Asp-Glu-X-His)ボックスポリペプチド58について)であり、特有のHGNC IDは、HGNC:29517である。ヒトRLR-3遺伝子のRefSeq配列は、GI:149408121である。

【0119】

PKRは、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼである。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす。「EIF2AK2」(真核生物翻訳開始因子2-キナーゼ2(eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2)について)は、この酵素をコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:9437である。ヒトPKR遺伝子のRefSeq配列は、GI:208431825である。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】図1は、染色されたRNAを有するゲルを示す。レーンは、(1)マーカー、(2)裸のレプリコン、(3)RNase処理後のレプリコン、(4)リボソームに被包されたレプリコン、(5)RNase処理後のリボソーム、(6)RNaseで処理し、次いで、フェノール/クロロホルム抽出に供したリボソーム、を示す。

【図2】図2は、リボソームの電子顕微鏡写真である。

【図3】図3は、大きな(下の線)、もしくは小さな(上の線)リボソームにおいてRNAを送達した後、1日目、3日目および6日目でのタンパク質発現(相対光単位、RLUとして)を示す。

【図4】図4は、染色されたRNAを有するゲルを示す。レーンは、(1)マーカー、(2)裸のレプリコン、(3)リボソームに被包されたレプリコン、(4)RNaseで処理し、次いで、フェノール/クロロホルム抽出に供したリボソームを示す。

【図5】図5は、ビリオンパッケージングされたレプリコン(四角)として、裸のRNA(菱形)として、もしくはリボソーム中(+ = 0.1 μg、x = 1 μg)においてRNAを送達した後、1日目、3日目および6日目でのタンパク質発現を示す。

【図 6】図 6 は、リボソーム被包 RNA の 4 種の異なる用量を送達した後、1 日目、3 日目および 6 日目でのタンパク質発現を示す。

【図 7】図 7 は、ビリオンパッケージングされたレプリコン (VRP もしくは VSRP)、 $1 \mu\text{g}$ 裸の RNA、および $1 \mu\text{g}$ リボソーム被包 RNA を与えられた動物における抗 F I g G 力価を示す。

【図 8】図 8 は、VRP、 $1 \mu\text{g}$ 裸の RNA、および 0.1 g もしくは $1 \mu\text{g}$ のリボソーム被包 RNA を与えられた動物における抗 F I g G 力価を示す。

【図 9】図 9 は、VRP、または 0.1 g もしくは $1 \mu\text{g}$ のリボソーム被包 RNA のいずれかを与えられた動物における中和抗体力価を示す。

【図 10】図 10 は、裸の RNA (丸)、リボソーム被包 RNA (三角および四角)、またはリポプレックス (lipoplex) (逆三角) としてレプリコンを送達した後の発現レベルを示す。

【図 11】図 11 は、レプリコンを裸の RNA として ($0.01 \sim 1 \mu\text{g}$)、リボソーム被包 RNA として ($0.01 \sim 10 \mu\text{g}$)、またはビリオンとしてパッケージングされたものとして (VRP、 10^6 感染単位もしくは IU)、送達した後の F 特異的 I g G 力価 (2 回目の用量後 2 週間) を示す。

【図 12】図 12 は、レプリコンを裸の RNA として ($1 \mu\text{g}$)、リボソーム被包 RNA として (0.1 もしくは $1 \mu\text{g}$)、またはビリオンとしてパッケージングされたものとして (VRP、 10^6 IU)、送達した後の F 特異的 I g G 力価 (丸) および PRNT 力価 (四角) を示す。ナイーブマウスの力価もまた、示す。実線は、幾何平均を示す。

【図 13】図 13 は、2 回目の用量の 4 週間後、F タンパク質中の主要なエピトープを表す合成ペプチドで再刺激した後の細胞内サイトカイン生成を示す。y 軸は、 $\text{CD}8 + \text{CD}4 -$ の % サイトカイン + を示す。

【図 14】図 14 は、仔ウシの免疫化後 210 日間にわたる F 特異的 I g G 力価 (平均 \log_{10} 力価 \pm 標準偏差) を示す。その 3 つの線は、63 日目において容易に区別され、下から上へ: PBS 陰性コントロール; リボソーム送達 RNA; および「Triangle 4」製品である。

【図 15】図 15 は、F タンパク質をコードするレプリコンの第 1 の用量の 2 週間後の抗 F 力価発現 (相対的) を示す。上記力価は、リボソーム Z 平均直径 (nm) に対してプロットされている。

【図 16 A】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

【図 16 B】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

【図 16 C】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

【図 16 D】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

【図 16 E】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

10

20

30

40

50

【図 16 F】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

【図 16 G】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

【図 16 H】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

10

【図 16 I】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

【図 16 J】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

20

【図 16 K】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

【図 16 L】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

【図 16 M】図 16 A ~ 16 M は、代替のカチオン性脂質の構造を示す：(A) RV 0 5 ; (B) RV 0 2 ; (C) RV 0 4 ; (D) RV 0 7 ; (E) RV 0 3 ; (F) RV 0 8 ; (G) RV 0 9 ; (H) RV 1 4 ; (I) RV 1 0 ; (J) RV 1 1 ; (K) RV 1 5 ; (L) RV 1 6 ; (M) RV 1 7。

30

【図 17】図 17 は、有用な「スプリット」PEG 結合体化脂質の構造を示す。ボックスの中の PEG の全分子量は、試験されたりボソームにおいて 2000 である。

【図 18 A】図 18 A ~ 18 E は、種々の PEG 結合体化脂質（ここで R は、所望の長さの PEG である）の構造を示す。

【図 18 B】図 18 A ~ 18 E は、種々の PEG 結合体化脂質（ここで R は、所望の長さの PEG である）の構造を示す。

【図 18 C】図 18 A ~ 18 E は、種々の PEG 結合体化脂質（ここで R は、所望の長さの PEG である）の構造を示す。

40

【図 18 D】図 18 A ~ 18 E は、種々の PEG 結合体化脂質（ここで R は、所望の長さの PEG である）の構造を示す。

【図 18 E】図 18 A ~ 18 E は、種々の PEG 結合体化脂質（ここで R は、所望の長さの PEG である）の構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【0121】

（発明を実施するための態様）

（RNA レプリコン）

種々のレプリコンは、以下で使用される。一般に、これらは、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）に由来する非構造タンパク質、VEEV 由来のパッケージングシグナル

50

、およびシンドビス・ウイルスもしくはV E E V変異体に由来する3' UTRを有するハイブリッドアルファウイルスゲノムに基づく。上記レプリコンは、約10 kb長であり、ポリAテールを有する。

【0122】

アルファウイルスレプリコンをコードするプラスミドDNA（名称：pT7-mV E E V-F L . R S V FもしくはA317；pT7-mV E E V-S E A PもしくはA306；pS P 6-V C R-G F PもしくはA50）を、インビトロでのRNA合成のテンプレートとして供した。上記レプリコンは、RNA複製に必要とされるアルファウイルス遺伝的エレメントを含むが、粒子アセンブリに必要な遺伝子産物をコードするエレメントを欠いている；構造タンパク質は、代わりに、目的のタンパク質（レポーター（例えば、S E A PもしくはG F P）または免疫原（例えば、全長R S V Fタンパク質）のいずれか）によって置き換えられるので、上記レプリコンは、感染性粒子の生成を誘導できない。上記アルファウイルスcDNAの上流にあるバクテリオファージ（T7もしくはS P 6）プロモーターは、インビトロで上記レプリコンRNAの合成を促進し、上記ポリ（A）テールの直ぐ下流にあるデルタ型肝炎ウイルス（H D V）リボザイムは、その自己切断活性を介して正確な3'末端を生成する。

10

【0123】

適切な制限エンドヌクレアーゼで上記H D Vリボザイムの下流で上記プラスミドDNAを直線状にした後に、ランオフ転写物（run-off transcript）を、T7もしくはS P 6バクテリオファージ由来DNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、インビトロで合成した。転写を、製造業者（A m b i o n）によって提供される指示書に従って、ヌクレオシドトリホスフェート（A T P、C T P、G T PおよびU T P）の各々の7.5 mM（T7 RNAポリメラーゼ）もしくは5 mM（S P 6 RNAポリメラーゼ）の存在下で、37において2時間にわたって行った。転写の後、上記テンプレートDNAを、T U R B O D N a s e（A m b i o n）で消化した。上記レプリコンRNAを、L i C lで沈殿させ、ヌクレアーゼ非含有水中で再構成した。キャップのないRNAを、S c r i p t C a p m7 Gキャッピングシステム（E p i c e n t r e B i o t e c h n o l o g i e s）を使用して、ユーザーマニュアルに概説されるとおり、ワクシニアキャッピング酵素（V C E）で転写後にキャップした；このようにキャップしたレプリコンに、「v」の接頭文字を付ける（例えば、v A 3 1 7は、V C EによってキャップされたA 3 1 7レプリコンである）。転写後キャップされたRNAを、L i C lで沈殿させ、ヌクレアーゼ非含有水中で再構成した。上記RNAサンプルの濃度を、O D_{260nm}を測定することによって決定した。上記インビトロ転写物の完全性を、変性アガロースゲル電気泳動によって確認した。

20

30

【0124】

（リボソーム被包）

RNAを、参考文献7および38の方法によって作製したリボソーム中に被包した。上記リボソームを、10% D S P C（両性イオン性）、40% D l i n D M A（カチオン性）、48% コレステロールおよび2% P E G結合体化D M G（2 k D a P E G）から作製した。これら割合は、全リボソーム中の%モルに言及する。

40

【0125】

D l i n D M A（1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパン）を、参考文献2の手順を使用して合成した。D S P C（1, 2-ジアステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）を、G e n z y m eから購入した。コレステロールを、S i g m a - A l d r i c hから得た。P E G結合体化D M G（1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）、アンモニウム塩]、D O T A P（1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン、塩化物塩）およびD C - c h o l（3-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロールヒドロクロリド）は、A v a n t i P o l a r L i p i d sからであった。

50

【0126】

簡潔には、脂質をエタノール（2 mL）中に溶解し、RNAレプリコンを、緩衝液（2 mL，100 mM クエン酸ナトリウム，pH 6）中に溶解し、これらを2 mLの緩衝液と混合し、続いて、1時間平衡化させた。上記混合物を6 mLの緩衝液で希釈し、次いで、濾過した。得られた生成物は、リボソームを含み、約95%の被包効率であった。

【0127】

例えば、1つの特定の方法において、新鮮な脂質ストック溶液を、エタノール中で調製した。37 mgのDl i nDMA、11.8 mgのD S P C、27.8 mgのコレステロールおよび8.07 mgのP E G - D M Gを秤量し、7.55 mLのエタノール中に溶解した。新たに調製した脂質ストック溶液を、37 において約15分間にわたって穏やかに振盪して、均質な混合物を形成した。次いで、755 μ Lの上記ストックを、1.245 mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液2 mLを作製した。この脂質量を使用して、250 μ g RNAを有するリボソームを形成した。RNAの2 mL 作業溶液をまた、100 mM クエン酸緩衝液（pH 6）中の約1 μ g / μ Lのストック溶液から調製した。3つの20 mL ガラスバイアル（撹拌子有り）を、R N a s e A w a y 溶液（M o l e c u l a r B i o P r o d u c t s）ですすぎ、使用前に多量のM i l l i Q 水で洗浄して、上記バイアルのR N a s e の汚染を除去した。上記バイアルのうちの1つを、上記RNA作業溶液に使用し、他のものを脂質およびRNA混合物を集めるために使用した（後に記載されるとおり）。作業脂質溶液およびRNA溶液を、37 において10分間にわたって加熱し、その後、3 c c ルアーロックシリンジに入れた。2 m L クエン酸緩衝液（pH 6）を、別の3 c c シリンジに入れた。RNAおよび脂質を含むシリンジを、F E P チューブ（フッ素化エチレン - プロピレン；使用したすべてのF E P チューブは、2 mm 内径および3 mm 外径を有した；I d e x H e a l t h S c i e n c e から得た）を使用して、Tミキサー（P E E K ^{T M} 500 μ m I D 接合部，I d e x H e a l t h S c i e n c e）に接続した。上記Tミキサーからの出口もまた、F E P チューブであった。上記クエン酸緩衝液を含む第3のシリンジを、別個の1つのチューブに接続した。次いで、すべてのシリンジを、流量7 mL / 分においてシリンジポンプを使用して作動させた。上記チューブ出口を、20 mL ガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した（撹拌しながら）。上記撹拌子を取り出し、上記エタノール / 水性溶液を、室温へと1時間にわたって平衡化させた。上記混合物のうちの4 mL を、5 c c シリンジに入れ、これを、F E P チューブの1つに接続し、別の5 c c シリンジを、等しい長さのF E P チューブに接続し、等量の100 mM クエン酸緩衝液（pH 6）を入れた。上記2本のシリンジを、上記シリンジポンプを使用して7 mL / 分の流量において作動させ、最終の混合物を、20 mL ガラスバイアルに集めた（撹拌しながら）。次に、第2の混合工程（リボソーム）から集めた上記混合物を、M u s t a n g Q 膜（P a l l C o r p o r a t i o n から得られる、結合してアニオン性分子を除去するアニオン交換支持体）を通過させた。上記リボソームに関してこの膜を使用する前に、4 mL の1 M N a O H、4 mL の1 M N a C l および10 mL の100 mM クエン酸緩衝液（pH 6）が、連続してこの膜を通過した。リボソームを、10分間にわたって37 において加温し、その後、上記膜を通過させた。次に、接線流濾過を使用することによって、リボソームを2 mL に濃縮し、10 ~ 15 容積の1 x P B S に対して透析し、その後、最終生成物を収集した。上記T F F システムおよび中空ファイバー濾過膜を、S p e c t r u m L a b s（R a n c h o D o m i n g u e z）から購入し、上記製造業者のガイドラインに従って使用した。100 k D 孔サイズカットオフおよび8 c m ² 表面積を有するポリスルホン中空ファイバー濾過膜を使用した。インビトロおよびインビボ実験に関しては、処方物を、1 x P B S で、必要とされるRNA濃度へと希釈した。

【0128】

図2は、これら方法によって調製されるリボソームの例示的な電子顕微鏡写真を示す。これらリボソームは、被包された、全長R S V F 抗原をコードするRNAを含む。1つのバッチの動的光散乱は、平均直径141 nm（強度で）もしくは78 nm（数で）を示

10

20

30

40

50

した。

【0129】

被包されたRNAのパーセンテージおよびRNAの濃度を、Quant-iT RiboGreen RNA試薬キット(Invitrogen)によって、製造業者の指示書に従って決定した。上記キット中に提供されたリボソームRNA標準を使用して、標準曲線を作成した。リボソームを、1×TE緩衝液(キットから)中で、10×もしくは100×に希釈し、その後、色素を添加した。別個に、リボソームを、0.5% Triton Xを含む1×TE緩衝液中で10×もしくは100×に希釈し、その後、色素を添加した(上記リボソームを破壊するため。従って、全RNAをアッセイするため)。その後、等量の色素を各溶液に添加し、次いで、色素添加後の約180μLの各溶液を、二連において、96ウェル組織培養プレートに入れた。蛍光(励起485nm, 発光528nm)を、マイクロプレートリーダーで読み取った。すべてのリボソーム処方物を、被包されたRNAの量に基づいて、インビボで投与した。

10

【0130】

リボソームにおける被包は、RNase消化からRNAを保護することを示した。実験では、3.8mAUのRNase A/μg RNAを使用し、30分間にわたって室温においてインキュベートした。RNaseを、プロテイナーゼKで、55℃において10分間にわたって不活性化した。次いで、サンプル対25:24:1 v/v/v, フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールの1:1 v/v混合物を添加して、上記RNAを上記脂質から水相へと抽出した。サンプルを、数秒間にわたってボルテックスすることによって混合し、次いで、12k RPMにおける15分間にわたる遠心分離に置いた。上記水相(上記RNAを含む)を取り出し、上記RNAを分析するために使用した。ローディング前に(400ng RNA/ウェル)、上記サンプルすべてを、ホルムアルデヒドローディング色素と共にインキュベートし、10分間にわたって65℃において変性させ、室温へと冷却した。Ambion Millenniumマーカースを使用し、上記RNA構築物の分子量を概算した。上記ゲルを、90Vにおいて泳動した。上記ゲルを、室温において1時間にわたって振盪することによって、製造業者のガイドラインに従って、水中の0.1% SYBRゴールドを使用して染色した。図1は、被包の非存在下でRNaseがRNAを完全に消化することを示す(レーン3)。RNAは、被包後に検出不能であり(レーン4)、これらリボソームがRNaseで処理されても全く変化が認められない(レーン4)。RNase処理リボソームをフェノール抽出に供した後、消化されていないRNAが認められる(レーン6)。4℃において1週間後ですら、上記RNAを、いかなるフラグメント化もなしに認めることができた(図4, 矢印)。インビボでのタンパク質発現は、4℃において6週間および1回の凍結融解サイクル後にも変化しなかった。従って、リボソーム被包RNAは安定である。

20

30

【0131】

上記RNAのインビボ発現を評価するために、免疫原ではなく、レポーター酵素(SEAP; 分泌型アルカリホスファターゼ)を、上記レプリコン中にコードさせた。発現レベルを、化学発光アルカリホスファターゼ基質を使用して、1×Phosphatase Light希釈緩衝液中で1:4希釈した血清中で測定した。8~10週齢BALB/cマウス(5匹/群)に、0日目に、0.1μgもしくは1μg RNA用量で50μl/脚を筋肉内に注射した。同じベクターを、1μgにおいて上記リボソームなしで(RNase非含有1×PBS中で)も投与した。ビリオンパッケージングされたレプリコンもまた、試験した。本明細書で使用したビリオンパッケージングされたレプリコン(「VRP」と呼ぶ)を、参考文献39の方法によって得た。ここでアルファウイルスレプリコンは、変異VEEVに由来するか、またはシンドビスウイルスの3'UTRおよびシンドビスウイルスパッケージングシグナル(PS)を含むように操作されたVEEVのゲノムから得られるキメラであり、シンドビスウイルスキャプシドおよび糖タンパク質遺伝子をコードする欠損性ヘルパーRNAと共にBHK細胞へと共電ロポレーション(cotransfection)することによってパッケージングした。

40

50

【0132】

図5に示されるように、被包は、1 μ g用量においてSEAPレベルを約1/2対数増大させ、6日目において、0.1 μ g 被包用量からの発現は、1 μ g 非被包用量で認められたレベルに匹敵した。3日目までに、発現レベルは、VRPで達成されたものを超えた(四角)。従って、発現は、裸のRNAコントロールと比較して、10 \times 低用量においてすら、上記RNAが上記リボソーム中に処方された場合に増大された。発現はまた、上記VRPコントロールと比較して高かったが、発現の動態は、非常に異なっていた(図5を参照のこと)。エレクトロポレーションを用いた上記RNAの送達は、上記裸のRNAコントロールと比較して増大した発現を生じたが、これらレベルは、リボソームでのものより低かった。

10

【0133】

上記リボソーム群において認められる効果が、上記リボソーム成分にのみ起因するか、または上記被包に関連するのかを評価するために、上記レプリコンを、被包形態(2つの異なる精製プロトコルで、0.1 μ g RNA)において、または上記リボソーム形成後に混合して(非被包化「リポプレックス(lipoplex)」, 0.1 μ g RNA)、または裸のRNA(1 μ g)として投与した。図10は、上記リポプレックスが、最低レベルの発現を与えたことを示し、このことは、被包が、強力な発現に必須であることを示す。

【0134】

さらなるSEAP実験から、インピボで明らかな用量応答が示された。発現は、1 ngほどのRNAの送達後にも認められた(図6)。被包レプリコンからの発現と裸のレプリコンからの発現とを比較するさらなる実験から、0.01 μ g 被包RNAは、1 μ gの裸のRNAに等しいことが示された。RNAの0.5 μ g用量において、上記被包物質は、6日目において12倍高い発現を与えた; 0.1 μ g用量レベルでは、6日目において24倍高かった。

20

【0135】

上記群において平均レベルで調べるだけでなく、個々の動物もまた研究した。いくらかの動物は、裸のレプリコンに対して非応答者であったのに対して、被包は、非応答者を排除した。

【0136】

さらなる実験では、DlindMAをDOTAPで置換した。DOTAPリボソームは、裸のレプリコンより良好な発現を与えたが、それらは、DlindMAリボソームより劣っていた(1日目において2~3倍の差異)。

30

【0137】

インピボでの免疫原性を評価するために、レプリコンを構築して、RSウイルス(RSV)に由来する全長Fタンパク質を発現させた。これを、裸(1 μ g)、リボソーム中に被包(0.1もしくは1 μ g)、またはビリオン中でパッケージング(10⁶ IU;「VRP」)で、0日目および21日目に送達した。図7は、2回目の用量の2週間後の抗FのIgG力価を示す。上記リボソームは、明らかに免疫原性を増強する。図8は、2週間後の力価を示す。この時点までに、0.1 μ gの上記被包RNAと、1 μ gの上記被包RNAと、上記VRP群との間に統計学的差異は何らなかった。中和力価(60%のプラーク減少として測定,「PRNT60」)は、2回目の用量の2週間後に、これら3群において有意差はなかった(図9)。図12は、2回目の用量の4週間後のIgG力価およびPRNT力価の両方を示す。

40

【0138】

図13は、上記RNAが堅調なCD8⁺ T細胞応答を誘発することを確認する。

【0139】

さらなる実験において、VRP、0.1 μ g リボソーム被包RNA、もしくは1 μ g リボソーム被包RNAを与えられたマウスにおけるF特異的IgG力価を比較した。2回目の用量の後の種々の時点での力価比(VRP:リボソーム)は、以下のとおりであっ

50

た：

【 0 1 4 0 】

【 数 1 】

| | 2 週間 | 4 週間 | 8 週間 |
|-------------|------|------|------|
| 0.1 μ g | 2.9 | 1.0 | 1.1 |
| 1 μ g | 2.3 | 0.9 | 0.9 |

従って、上記リボソーム被包RNAは、ビリオン送達で認められるのと本質的に同程度の免疫応答を誘導する。

【 0 1 4 1 】

さらなる実験から、優れたF特異的IgG応答が10 μ g用量で示され、これは、1 μ gおよび0.1 μ g用量についての応答と等しく、0.01 μ g用量ではより低い応答が示された。図11は、3種の異なる用量における裸の形態において、4種の異なる用量におけるリボソームにおいて、もしくはVRP(10⁶ IU)として、上記レプリコンを与えられた動物におけるIgG力価を示す。1 μ g リボソーム被包RNAで認められた応答は、VRPと比較した場合に統計的に有意ではなかった(ANOVA)が、10 μ g リボソーム被包RNAで認められたより高い応答は、これらの群の両方と比較した場合、統計的に有意であった($p < 0.05$)。

【 0 1 4 2 】

さらなる研究から、上記0.1 μ gのリボソーム被包RNAは、0.1 μ gの送達されたDNAより遙かに高い抗F IgG応答を与え(2回目の用量の15日後)、さらに、エレクトロポレーション(ElgenTM DNA Delivery System, Inovio)によって送達された、上記F抗原をコードする20 μ g プラスミドDNAより免疫原性であることが確認された。

【 0 1 4 3 】

(コットンラット)

研究を、マウスの代わりにコットンラット(*Sigmodon hispidus*)において行った。1 μ g用量において、リボソーム被包は、裸のRNAと比較してF特異的IgG力価を8.3倍増大させ、PRNT力価を9.5倍増大させた。抗体応答の大きさは、5 $\times 10^6$ IU VRPによって誘導されたものに等しかった。裸のRNAおよびリボソーム被包RNAはともに、上記コットンラットをRSVチャレンジ(1 $\times 10^5$ プラーク形成単位)から保護することができ、肺のウイルス負荷を少なくとも3.5対数低下させた。被包は、上記低下を約2倍増大させた。

【 0 1 4 4 】

コットンラットにおけるさらなる研究は、4種の異なるレプリコンを使用した：vA317は、全長RSV-Fを発現する；vA318は、短縮型(膜貫通および細胞質テールが除去されている)RSV-Fを発現する；vA142は、RSV-F(融合ペプチドが欠失されている)を発現する；vA140は、短縮型RSV-F(同様にそのペプチドなし)を発現する。コットンラット(1群あたり4~8匹の動物)に、以下を0日目および21日目に筋肉内にワクチン接種した(一方の脚に100 μ L)：方法(D)によって(ただし150 μ g RNAバッチサイズで)、2kDa PEG結合体化DMGを使用して作製したリボソーム中に処方した、2種の用量(1.0 μ gおよび0.1 μ g)での、4種の異なるレプリコン。コントロール群には、アラム(alum)をアジュバント添加したRSV-Fサブユニットタンパク質ワクチン(5 μ g)(8匹の動物/群)、全長RSV-Fを発現するVRP(1 $\times 10^6$ IU, 8匹の動物/群)、もしくはナীবココントロール(4匹の動物/群)を与えた。0日目、21日目および34日目に、抗体分析のために、血清を集めた。

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

50

2 1 日目および 3 4 日目の F 特異的血清 I g G 力価および R S V 血清中和抗体力価は、以下であった：

【 0 1 4 6 】

【 数 2 】

| 群 | IgG, 21 日目 | IgG, 34 日目 | NT, 21 日目 | NT, 34 日目 |
|-------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 1 μ g vA317 | 915 | 2249 | 115 | 459 |
| 0.1 μ g vA317 | 343 | 734 | 87 | 95 |
| 1 μ g vA318 | 335 | 1861 | 50 | 277 |
| 0.1 μ g vA318 | 129 | 926 | 66 | 239 |
| 1 μ g vA142 | 778 | 4819 | 92 | 211 |
| 0.1 μ g vA142 | 554 | 2549 | 78 | 141 |
| 1 μ g vA140 | 182 | 919 | 96 | 194 |
| 0.1 μ g vA140 | 61 | 332 | 29 | 72 |
| 5 μ g Fトリマーサブユニット / アラム | 13765 | 86506 | 930 | 4744 |
| 1x10 ⁶ IU VRP-F 完全 | 1877 | 19179 | 104 | 4528 |
| ナイーブ | 5 | 5 | 10 | 15 |

この研究において評価した 4 種全てのレプリコン (v A 3 1 7 、 v A 3 1 8 、 v A 1 4 2 、 v A 1 4 0) は、リボソームによって送達された場合にはコットンラットにおいて免疫原性であったが、血清中和力価は、アジュバント添加したタンパク質ワクチンもしくは V R P によって誘導されるものの、多くとも 1 / 1 0 であった。上記リボソーム / R N A ワクチンは、第 1 のワクチン接種後に、血清 F 特異的 I g G および R S V 中和抗体を誘発し、第 2 のワクチン接種は、上記応答を効率的にブーストした。1 μ g レプリコンでの上記第 2 のワクチン接種後の F 特異的 I g G 力価は、0 . 1 μ g レプリコンでの上記第 2 のワクチン接種後より 2 ~ 3 倍高かった。上記 4 種のレプリコンは、同等の抗体力価を誘発した。このことは、全長および短縮型 R S V - F (各々、上記融合ペプチドありもしくはなし) が、コットンラットにおいて同様に免疫原性であることを示唆する。

【 0 1 4 7 】

コットンラットにおけるさらなる研究は、再び、上記 v A 3 1 7 、 v A 3 1 8 および v A 1 4 2 レプリコンを使用した。コットンラット (1 群あたり 2 ~ 8 匹の動物) に、0 日目および 2 1 日目に、以下を筋肉内にワクチン接種した (一方の脚に 1 0 0 μ L) : 方法 (D) によって (ただし 1 5 0 μ g R N A バッチサイズで) 作製された R V 0 1 リボソーム (P E G - 2 0 0 0 を有する) 中に被包されたレプリコン (0 . 1 μ g もしくは 1 μ g) 。コントロール群に、アラムをアジュバント添加した上記 R S V - F サブユニットタンパク質ワクチン (5 μ g) 、もしくは全長 R S V - F を発現する V R P (1 x 1 0 ⁶ I U , 8 匹の動物 / 群) を与えた。これらの動物全てに、アラムをアジュバント添加した R S V - F サブユニットタンパク質ワクチン (5 μ g) で第 3 のワクチン接種を行った (5 6 日目) 。さらに、ナイーブコントロールを加えた (4 匹の動物 / 群) 。さらに、追加の群に、0 日目および 5 6 日目に、リボソーム中の 1 μ g v A 3 1 7 R N A を両側の筋肉内にワクチン接種 (5 0 μ L / 脚) したが、上記サブユニットタンパク質ワクチンでの第 3 のワクチン接種は与えなかった。

【 0 1 4 8 】

0 日目、2 1 日目、3 5 日目、5 6 日目、7 0 日目に、上記追加の群については、加えて、1 4 日目、2 8 日目および 4 2 日目に、抗体分析のために血清を集めた。F 特異的血清 I g G 力価 (G M T) は、以下のとおりであった：

【 0 1 4 9 】

【数 3】

| | 21 日目 | 35 日目 | 56 日目 | 70 日目 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 μ g vA318 | 260 | 1027 | 332 | 14263 |
| 0.1 μ g vA318 | 95 | 274 | 144 | 2017 |
| 1 μ g vA142 | 483 | 1847 | 1124 | 11168 |
| 0.1 μ g vA142 | 314 | 871 | 418 | 11023 |
| 1 μ g vA317 | 841 | 4032 | 1452 | 13852 |
| 1 \times 10 ⁶ VRP (F-完全) | 2075 | 3938 | 1596 | 14574 |
| 5 μ g フトリマーサブユニット/ アラム | 12685 | 54526 | 25846 | 48864 |
| ナイーブ | 5 | 5 | 5 | 5 |

10

血清中和力価は、以下のとおりであった（3～4匹の動物/群の2つのプールについての60% RSV中和力価，1群あたりこれら2プールのGMT）：

【0 1 5 0】

【数 4】

20

| | 21 日目 | 35 日目 | 56 日目 | 70 日目 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 μ g vA318 | 58 | 134 | 111 | 6344 |
| 0.1 μ g vA318 | 41 | 102 | 63 | 6647 |
| 1 μ g vA142 | 77 | 340 | 202 | 5427 |
| 0.1 μ g vA142 | 35 | 65 | 56 | 2223 |
| 1 μ g vA317 | 19 | 290 | 200 | 4189 |
| 1 \times 10 ⁶ VRP (F-完全) | 104 | 1539 | 558 | 2876 |
| 5 μ g フトリマーサブユニット/ アラム | 448 | 4457 | 1630 | 3631 |
| ナイーブ | 10 | 10 | 10 | |

30

上記追加の群の血清力価および中和力価は、以下のとおりであった：

【0 1 5 1】

【数 5】

| 日数 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 56 | 70 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| IgG | 397 | 561 | 535 | 501 | 405 | 295 | 3589 |
| NT | 52 | 82 | 90 | 106 | 80 | 101 | 1348 |

40

従って、上記レプリコンは、コットンラットにおいて免疫原性であると確認され、上記第1のワクチン接種後に血清F特異的IgGおよびRSV中和抗体を誘発する。第2のワクチン接種は、上記応答を効率的にブーストした。1.0 μ g レプリコンでの上記第2のワクチン接種後のF特異的IgG力価は、0.1 μ g レプリコンでの上記第2のワクチン接種後より1.5～4倍高かった。

【0 1 5 2】

上記第3のワクチン接種（56日目でのタンパク質）は、フトリマーサブユニット+ア

50

ラムを以前にワクチン接種したコットンラットにおいて力価をブーストしなかったが、レプリコンを以前にワクチン接種したコットンラットにおいて力価の大きなブーストを提供した。大部分の場合において、2回のレプリコンワクチン接種、続くタンパク質ブーストの後の上記RSV血清中和力価は、2回もしくは3回の一連のタンパク質ワクチン接種によって誘導される力価に匹敵するかもしれないもしくはそれより大きかった。

【0153】

この研究はまた、 $1.0 \mu\text{g}$ vA317に対する抗体応答の動態を評価した。単一のワクチン接種によって誘導されたF特異的血清IgGおよびRSV中和力価は、21日目あたりでピークに達し、少なくとも56日目まで維持された（F特異的IgG力価においては50～70%低下，RSV中和力価においてはごく僅かに変化）。同種の第2のワクチン接種を、56日目にこれら動物に与えたところ、上記第2のワクチン接種を21日目に施した場合に達成されたものに少なくとも等しいレベルへと抗体力価をブーストした。

【0154】

さらなる実験は、ウイルスチャレンジを包含した。上記vA368レプリコンは、EV71 IRESによって発現が駆動される、上記融合ペプチドが欠失したRSVの全長野生型表面融合糖タンパク質をコードする。コットンラット（7匹/群）に、0日目および21日目に、以下を筋肉内にワクチン接種した（ $100 \mu\text{L}$ /脚）：方法（H）によって調製したリポソーム中のvA368（ $175 \mu\text{g}$ RNAバッチサイズ）、または同じレプリコンを有するVRP。上記リポソームは、DMGに結合体化されたkDaPEGを含む。コントロール群に、 $5 \mu\text{g}$ アラムアジュバント添加タンパク質を与え、ナイー

【0155】

全ての群に、最後の免疫化の4週間後に、 1×10^6 PFU RSVでの鼻内チャレンジ（i.n.）を与えた。0日目、21日目、35日目に、抗体分析のために血清を集めた。ウイルス肺力価を、チャレンジの5日後に測定した。結果は、以下のとおりであった：

【0156】

【数6】

| | リポソーム | VRP | タンパク質 | ナイーブ |
|------------------|-------|------|--------|--------|
| F特異的血清IgG力価（GMT） | | | | |
| 21日目 | 370 | 1017 | 28988 | 5 |
| 35日目 | 2636 | 2002 | 113843 | 5 |
| 中和力価（GMT） | | | | |
| 21日目 | 47 | 65 | 336 | 10 |
| 35日目 | 308 | 271 | 5188 | 10 |
| 肺ウイルス負荷（pfu/g 肺） | | | | |
| 54日目 | 422 | 225 | 124 | 694110 |

従って、上記RNAワクチンは、非ワクチン接種コントロールコットンラットの約 10^6 PFU/gから、ワクチン接種コットンラットの 10^3 PFU/g未満へと、上記肺ウイルス負荷を3対数超低下させた。

【0157】

（大型哺乳動物研究）

大型動物研究を、ウシにおいて行った。仔ウシ（4～6週齢，約60～80kg，5頭/群）を、全長RSV Fタンパク質をコードするレプリコンvA317 $66 \mu\text{g}$ で、0日目、21日目、86日目および146日目に免疫化した。上記レプリコンを、方法（E）によって（ただし 1.5mg RNAバッチサイズで）作製したリポソームの中に処

方した；それらは、40% DlinDMA、10% DSPC、48% コレステロール、および2% PEG-2000 (DMGに結合体化)を有した。PBS単独を、陰性コントロールとして使用し、認可されたワクチンを、陽性コントロールとして使用した (Fort Dodgeの「Triangle 4」, 死滅ウイルスを含む)。全ての仔ウシに、146日目に、MF59エマルジョンをアジュバント添加した15 µg Fタンパク質を与えた。

【0158】

上記RNAワクチンは、ヒトRSV Fをコードしたのに対して、上記「Triangle 4」ワクチンは、ウシRSV Fを含むが、上記RSV Fタンパク質は、BRVVとHRVVとの間で非常によく保存されている。

10

【0159】

仔ウシに、各実験ワクチン2mlを与え、頸部の各側に2×1mlとして筋肉内投与した。対照的に、上記「Triangle 4」ワクチンは、頸部に単一の2ml用量として与えた。

【0160】

0日目、14日目、21日目、35日目、42日目、56日目、63日目、86日目、100日目、107日目、114日目、121日目、128日目、135日目、146日目、160日目、167日目、174日目、181日目、188日目、195日目、および202日目に、抗体分析のために血清を集めた。個々の動物が検出限界より低い力価を有した場合、それには、力価5を割り当てた。

20

【0161】

図14は、210日間にわたるF特異的IgG力価を示す。最初の63日間にわたって、上記RNAレプリコンは、リポソームを介して雌ウシにおいて免疫原性であったが、上記認可されたワクチンより低い力価を与えた。全てのワクチン接種した雌ウシは、第2の用量の後にF特異的抗体を示し、力価は、上記第2の用量後の2～6週の期間、非常に安定であった (そして上記RNAワクチンに関しては、特に安定であった)。202日目までの力価は、以下のとおりであった：

【0162】

【数7】

| | D0 | 3wp1 D21 | 2wp2 D35 | 5wp2 D56 | ~9wp2 D86 | 2wp3 D100 | 5wp3 D121 | 8wp3 D146 | 2wp4 D160 | 5wp4 D181 | 8wp4 D202 |
|------------|----|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PBS | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 46 | 98 | 150 |
| リポソーム | 5 | 5 | 12 | 11 | 20 | 768 | 428 | 74 | 20774 | 7022 | 2353 |
| Triangle 4 | 5 | 5 | 1784 | 721 | 514 | 3406 | 2786 | 336 | 13376 | 4775 | 2133 |

30

RSV血清中和抗体力価は、以下のとおりであった：

【0163】

40

【数8】

| | D0 | 2wp2 D35 | 5wp2 D56 | 2wp3 D100 | 3wp3 D107 | 4wp3 D114 | 8wp3 D146 | 2wp4 D160 | 3wp4 D167 | 4wp4 D174 |
|------------|----|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PBS | 12 | 10 | 10 | 14 | 18 | 20 | 14 | 10 | 10 | 10 |
| リポソーム | 13 | 10 | 10 | 20 | 13 | 17 | 13 | 47 | 26 | 21 |
| Triangle 4 | 12 | 15 | 13 | 39 | 38 | 41 | 13 | 24 | 26 | 15 |

50

上記第2のリボソーム用量のために使用した物質は、新たに調製しなかったので、RNAのそのロットは、マウス免疫原性研究において効力の低下を示した。従って、新たな材料を全てのワクチン接種のために使用していれば、上記ワクチンはより免疫原性であったと考えられる。

【0164】

補体でアッセイされる場合、中和抗体を、全てのワクチン接種した雌ウシにおいて検出した。このアッセイにおいて、全てのワクチン接種した仔ウシは、第2のRNAワクチン接種の後に、良好な中和抗体力価を有した。さらに、上記RNAワクチンは、F特異的血清IgG力価を誘発し、これは、上記第2のワクチン接種の後に数頭の仔ウシにおいて、および第3のワクチン接種の後に全ての仔ウシにおいて検出された。

10

【0165】

MF59アジュバント添加したRSV-Fは、全ての以前にワクチン接種した仔ウシにおいてIgG応答をブーストでき、RNAを以前にワクチン接種した仔ウシの補体非依存性中和力価をブーストできた。

【0166】

大型動物におけるRNAワクチンの概念の立証は、小動物モデルから大型動物およびヒトへと移行する場合に、DNAベースのワクチンで以前に観察された効力の喪失を踏まえると、特に重要である。雌ウシDNAワクチンの代表的な用量は、0.5~1mgである[40, 41]ので、免疫応答がわずかに66μgのRNAで誘導されたことは、非常に有望である。

20

【0167】

(リボソーム直径の効果)

より小さなリボソームを得るために、上記シリンジ/チューブ法を、上記脂質およびRNA溶液をマイクロ流体チップ上のチャンネルにおいて混合する方法に交換した。

【0168】

エタノール中に新たな脂質ストック溶液を調製した。37mgのDl i nDMA、11.8mgのDSPC、27.8mgのコレステロールおよび8.07mgのPEG-DMGを秤量し、7.55mLのエタノール中に溶解した。上記新たに調製した脂質ストック溶液を、37において約15分間にわたって穏やかに振盪させて、均質な混合物を形成した。次いで、上記ストック226.7μLを、1.773mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液2mLを作製した。また、RNAの作業溶液4mLを、100mM クエン酸緩衝液(pH6)において、約1μg/μLのストック溶液から調製した。4本の20mL ガラスバイアル(攪拌子あり)を、RNAse Away 溶液ですすぎ、使用前に多量のMilliQ水で洗浄して、上記バイアルのRNAseの汚染を除去した。上記バイアルのうちの2本を、上記RNA作業溶液(各バイアル中に2mL)のために使用し、他のものを、上記脂質およびRNA混合物を集めるために使用した。上記作業脂質溶液および上記RNA溶液を、37において10分間にわたって加熱し、その後、3cc ルアーロックシリンジの中に入れた。RNAおよび脂質を含むシリンジを、4ウェイエッジコネクタを使用するPTFEチューブ(0.03インチID×1/16インチOD, (Syrri s))を使用して、Mit os Dropl et 接合チップ(Sy r r i s から得たガラス製マイクロ流体デバイス, 部品番号3000158)に接続した。2本のRNAストリームおよび1本の脂質ストリームを、シリンジポンプによって作動させ、上記エタノール相および水相の混合を、上記チップのX接合部(100μm×105μm)において行った。3本全てのストリームの流量を、1.5mL/分において維持し、従って、全水性の流量 対 エタノール性の流量の比は、2:1であった。チューブ出口を、20mL ガラスバイアル中に上記混合物を集めるために配置した(攪拌しながら)。上記攪拌子を取り出し、上記エタノール/水性溶液を、室温へと1時間にわたって平衡化させた。次いで、上記混合物を、5cc シリンジに入れ、これを、1本のPTFEチューブ(0.03インチID×1/16インチOD)にはめ、等しい長さのPTFEチューブ付きの別の5ccシリンジに、等容積の100mM クエン酸緩衝液(pH6)

30

40

50

を入れた。上記 2 本のシリンジを、3 mL / 分の流量において、シリンジポンプを使用して作動させ、最終混合物を、20 mL ガラスバイアル中に集めた（攪拌しながら）。次に、TFFシステムを使用して、リボソームを 2 mL に濃縮し、10 ~ 15 容積の 1 × PBS に対して透析し、その後、最終生成物を収集した。100 kDa 孔サイズカットオフおよび 20 cm² 表面積を有する中空ファイバー濾過膜を使用した。インビトロ実験およびインビボ実験のために、処方物を、1 × PBS で、必要とされる RNA 濃度へと希釈した。

【0169】

上記シリンジ/チューブ法を使用して、75 μg RNA で調製したリボソームは、Z 平均直径 148 nm および多分散性指数 0.122 を有したのに対して、上記チップ混合は、Z 平均直径 97 nm および多分散性指数 0.086 を有するリボソームを与えた。被包 RNA の割合は、90 % から 87 % へと僅かに低下した。これら直径および多分散性指数は、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) を使用して、製造業者の説明書に従って測定した。リボソームを、1 × PBS で希釈し、その後、測定した。

10

【0170】

上記リボソームを、0 日目に、8 ~ 10 週齢の BALB / c マウスに筋肉内注射によって投与した（50 μL / 脚）。1 日目および 3 日目に眼窩静脈洞採血を行い、6 日目に最後の採血を行った。血清 SEA P レベルを、化学発光アッセイによって測定した。図 3 に示されるように、小さなリボソームによって、SEA P レベルは、1 日目に約 2 倍、および 6 日目に約 5 倍、増大した。

20

【0171】

また、2 種の異なる方法によって調製したリボソームを、全長 RSV - F タンパク質をコードするレプリコンの送達について評価した。マウスの F 特異的血清 IgG 力価（8 匹の動物 / 群）を、0 日目および 21 日目に筋肉内にワクチン接種した後に測定した。14 日目（2wp1）および 35 日目（2wp2）に、抗体分析のために血清を集めた。個々の動物が、力価 < 25（検出限界）を有した場合、それには力価 5 に割り当てた。データを、各群の幾何平均力価として以下に示す：

【0172】

【数 9】

30

| 処方物 | 裸 | シリンジ/チューブ リボソーム | チップ リボソーム |
|----------|-----|--------------------|-----------|
| 2wp1 GMT | 35 | 2421 | 4695 |
| 2wp2 GMT | 457 | 10757 | 19773 |

従って、上記のより小さなチップ混合リボソームは、2wp1 および 2wp2 において、約 2 倍高い GMT であった。

【0173】

40

また、異なる直径を有する種々の異なるリボソームを使用して、全長 RSV - F タンパク質をコードするレプリコンを送達した。第 1 の用量の 2 週間後の F タンパク質に対する全 IgG 力価を、図 15 においてリボソーム直径に対してプロットする。

【0174】

（リボソーム製造法）

一般に、8 つの異なる方法を、本発明に従うリボソームを調製するために使用した。これらは、方法（A）～（H）として本文中で言及され、主に濾過および TFF 工程に関連して異なっている。詳細は、以下のとおりである。

【0175】

（A）エタノール中の新鮮な脂質ストック溶液を調製した。37 mg の D l i n D M A

50

、11.8 mgのDSPC、27.8 mgのコレステロールおよび8.07 mgのPEG DMG 2000を秤量し、7.55 mLのエタノール中に溶解した。上記新たに調製した脂質ストック溶液を、37において約15分間にわたって穏やかに振盪して、均質な混合物を形成した。次いで、上記ストックのうちの755 μ Lを、1.245 mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液2 mLを作製した。この量の脂質を使用して、250 μ g RNAと共にリボソームを形成した。RNAの2 mL 作業溶液をまた、100 mM クエン酸緩衝液(pH 6)中のストック溶液約1 μ g/ μ Lから調製した。3つの20 mL ガラスバイアル(攪拌子有り)を、RNase Away溶液(Molecular BioProducts, San Diego, CA)ですすぎ、使用前に多量のMilliQ水で洗浄して、上記バイアルのRNaseの汚染を除去した。10
上記バイアルのうちの1つを、上記RNA作業溶液に使用し、他のものを脂質およびRNA混合物を集めるために使用した(後に記載されるとおり)。作業脂質溶液およびRNA溶液を、37において10分間にわたって加熱し、その後、3 cc ルアーロックシリンジに入れた。2 mL クエン酸緩衝液(pH 6)を、別の3 cc シリンジに入れた。RNAおよび脂質を含むシリンジを、FEPチューブ(フッ素化エチレン-プロピレン; すべてのFEPチューブは、2 mm内径 \times 3 mm外径を有した; Index Health Scienceによって供給)を使用して、Tミキサー(PEEKTM 500 μ m ID接合部, Index Health Science, Oak Harbor, WA)に接続した。上記Tミキサーからの出口もまた、FEPチューブであった。上記クエン酸緩衝液を含む第3のシリンジを、別個の1つのFEPチューブに接続した。次いで、20
すべてのシリンジを、流量7 mL/分においてシリンジポンプを使用して作動させた。上記チューブ出口を、20 mL ガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した(攪拌しながら)。上記攪拌子を取り出し、上記エタノール/水性溶液を、室温へと1時間にわたって平衡化させた。上記混合物のうちの4 mLを、5 cc シリンジに入れ、これを、FEPチューブの1つに接続し、別の5 cc シリンジを、等しい長さのFEPチューブに接続し、等量の100 mM クエン酸緩衝液(pH 6)を入れた。上記2本のシリンジを、上記シリンジポンプを使用して7 mL/分の流量において作動させ、最終の混合物を、20 mL ガラスバイアルに集めた(攪拌しながら)。次に、第2の混合工程(リボソーム)から集めた上記混合物を、Mustang Q膜(Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USAから得られる、結合してアニオン性分子を除去するアニオン交換支持体)を通過させた。上記リボソームを通過させる前に、4 mLの1 M NaOH、4 mLの1 M NaClおよび10 mLの100 mM クエン酸緩衝液(pH 6)が、上記Mustang膜を連続して通過した。リボソームを、10分間にわたって37において加温し、その後、上記膜を通過させた。次に、TFFを使用して、リボソームを2 mLに濃縮し、10~15容積の1 \times PBSに対して透析し、その後、最終生成物を収集した。上記TFFシステムおよび中空ファイバー濾過膜を、Spectrum Labsから購入し、上記製造業者のガイドラインに従って使用した。100 kD孔サイズカットオフおよび8 cm² 表面積を有するポリスルホン中空ファイバー濾過膜(部品番号P/N: X1AB-100-20P)を使用した。インピトロおよびインピボ実験に関しては、処方物を、1 \times PBSで、必要とされるRNA濃度へと希釈した。40
。

【0176】

(B) 振盪後、上記ストックのうちの226.7 μ Lを、1.773 mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液2 mLを作製したこと(従って、上記脂質:RNA比を改変)を除いて、方法(A)のとおり。

【0177】

(C) 上記Mustang濾過を省略したので、リボソームが、上記20 mL ガラスバイアルから上記TFF透析へと向かったことを除いて、方法(B)のとおり。

【0178】

(D) 上記TFFが、100 kD孔サイズカットオフおよび20 cm² 表面積を有す

るポリエーテルスルホン (P E S) 中空ファイバー膜 (部品番号 P - C 1 - 1 0 0 E - 1 0 0 - 0 1 N) を使用したことを除いて、方法 (C) のとおり。

【 0 1 7 9 】

(E) 方法 (A) のように M u s t a n g 膜を使用したことを除いて、方法 (D) のとおり。

【 0 1 8 0 】

(F) 上記 M u s t a n g 濾過を省略したので、リボソームが、上記 2 0 m L ガラスバイアルから上記 T F F 透析へと向かったことを除いて、方法 (A) のとおり。

【 0 1 8 1 】

(G) R N A の 4 m L 作業溶液を、1 0 0 m M クエン酸緩衝液 (p H 6) 中の約 1 μ g / μ L のストック溶液から調製したことを除いて、方法 (D) のとおり。次いで、4 つの 2 0 m L ガラスバイアルを、同じ方法で調製した。それらのうちの 2 本を、上記 R N A 作業溶液 (各バイアル中 2 m L) に使用し、他のものを、(C) のように、上記脂質および R N A 混合物を集めるために使用した。T ミキサーを使用するのではなく、R N A および脂質を含むシリンジを、M i t o s D r o p l e t 接合チップ (S y r r i s から得られるガラス製マイクロ流体 (m i c r o f l u i d i c) デバイス (部品番号 3 0 0 0 1 5 8)) に、P T F E チューブ (0 . 0 3 インチ内径 \times 1 / 1 6 インチ外径) を使用して、4 ウェイエッジコネクタ (S y r r i s) を使用して接続した。2 つの R N A ストリームおよび 1 つの脂質ストリームを、シリンジポンプによって作動させ、上記エタノールおよび水相の混合を、上記チップの X 接合部 (1 0 0 μ m \times 1 0 5 μ m) において行った。3 つすべてのストリームの流量を、1 . 5 m L / 分において維持し、従って、全水性の流量 対 エタノールの流量の比は、2 : 1 であった。上記チューブ出口を、2 0 m L ガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した (攪拌しながら) 。上記攪拌子を取り出し、上記エタノール / 水性溶液を、室温へと 1 時間にわたって平衡化させた。次いで、上記混合物を 5 c c シリンジに入れ、これを、上記 P T F E チューブの別の 1 つにはめた ; 等しい長さの P T F E チューブ付きの別の 5 c c シリンジに、等容積の 1 0 0 m M クエン酸緩衝液 (p H 6) を入れた。上記 2 本のシリンジを、3 m L / 分の流量において、シリンジポンプを使用して作動させ、最終混合物を、2 0 m L ガラスバイアルに集めた (攪拌しながら) 。次に、(D) におけるように、T F F を使用して、リボソームを 2 m L に濃縮し、1 0 ~ 1 5 容積の 1 \times P B S に対して透析した。

【 0 1 8 2 】

(H) 上記 2 m L 作業脂質ストック溶液を、1 2 0 . 9 μ L の上記脂質ストックと 1 . 8 7 9 m L エタノールとを混合することによって作製したことを除いて、方法 (A) のとおり。また、上記 T ミキサーにおいて混合した後に、上記 2 0 m L バイアルからの上記リボソームを、P i e r c e S l i d e - A - L y z e r D i a l y s i s C a s s e t t e (T h e r m o S c i e n t i f i c , 特に強力 , 0 . 5 ~ 3 m L 容量) に入れ、オートクレーブしたプラスチック容器中、4 0 0 ~ 5 0 0 m L の 1 \times P B S に対して一晩 4 において透析し、その後、最終生成物を収集した。

【 0 1 8 3 】

(R S V 免疫原性)

R S V F タンパク質をコードする上記 v A 3 1 7 自己複製レプリコンを、以下のように、0 日目および 2 1 日目に B A L B / c マウス (4 匹もしくは 8 匹の動物 / 群) に、両側の筋肉内注射 (5 0 μ L / 脚) によって投与した : 上記レプリコン (1 μ g) 単独、または D l i n D M A (「 R V 0 1 」) もしくは D O T A P (「 R V 1 3 」) もしくは図 1 6 A ~ 1 6 M に示される脂質 (「 R V 0 5 」) でリボソームとして処方した上記レプリコン。上記 R V 0 1 リボソームは、4 0 % D l i n D M A 、1 0 % D S P C 、4 8 % コレステロールおよび 2 % P E G - D M G を有したが、R N A の量は異なった。上記 R V 0 5 リボソームは、4 0 % R V 0 5 、1 0 % D S P C 、4 8 % コレステロールおよび 2 % P E G - D M G 、または 6 0 % R V 0 5 、3 8 % コレステロールおよび 2 % P E G - D M G のいずれかを有した。上記 R V 1 3 リボソームは、4 0 % D O T A

10

20

30

40

50

P、10% DOPE、48% コレステロールおよび2% PEG-DMGを有した。比較のために、同じRSV-F抗原を発現する裸のプラスミドDNA(20 µg)を、エレクトロポレーションを使用して、またはRV01(10)リボソームと共に(0.1 µg DNA)のいずれかで送達した。4匹のマウスを、ナイーブコントロール群として使用した。

【0184】

リボソームを、方法(A)もしくは方法(B)によって調製した。方法(A)によって作製したいくらかのリボソームに関しては、RNAの倍量もしくは半量を使用した。Z平均粒子直径および多分散性指数は、以下であった。

【0185】

10

【数10】

| RV | Zav (nm) | pdl | 調製 |
|-----------|----------|-------|-----|
| RV01 (10) | 158.6 | 0.088 | (A) |
| RV01 (08) | 156.8 | 0.144 | (A) |
| RV01 (05) | 136.5 | 0.136 | (B) |
| RV01 (09) | 153.2 | 0.067 | (A) |
| RV01 (10) | 134.7 | 0.147 | (A) |
| RV05 (01) | 148 | 0.127 | (A) |
| RV05 (02) | 177.2 | 0.136 | (A) |
| RV13 (02) | 128.3 | 0.179 | (A) |

20

血清を、14日目、36日目および49日目に抗体分析のために集めた。脾臓を、49日目に、T細胞分析のためにマウスから採取した。

【0186】

F特異的血清IgG力価(GMT)は、以下のとおりであった：

【0187】

30

【数11】

| RV | 14 日目 | 36 日目 |
|---------------|-------|-------|
| 裸の DNA プラスミド | 439 | 6712 |
| 裸の A317 RNA | 78 | 2291 |
| RV01 (10) | 3020 | 26170 |
| RV01 (08) | 2326 | 9720 |
| RV01 (05) | 5352 | 54907 |
| RV01 (09) | 4428 | 51316 |
| RV05 (01) | 1356 | 5346 |
| RV05 (02) | 961 | 6915 |
| RV01 (10) DNA | 5 | 13 |
| RV13 (02) | 644 | 3616 |

40

サイトカイン陽性であり、かつRSV F51-66ペプチドに対して特異的なT細胞の割合は、以下のとおりであり、統計的に有意にゼロを上回る数字のみを示す：

【0188】

【数 1 2】

| RV | CD4+CD8- | | | | CD4-CD8+ | | | |
|---------------|--------------|------|-----|--------------|--------------|------|-----|--------------|
| | IFN γ | IL2 | IL5 | TNF α | IFN γ | IL2 | IL5 | TNF α |
| 裸の DNA プラスミド | 0.04 | 0.07 | | 0.10 | 0.57 | 0.29 | | 0.66 |
| 裸の A317 RNA | 0.04 | 0.05 | | 0.08 | 0.57 | 0.23 | | 0.67 |
| RV01 (10) | 0.07 | 0.10 | | 0.13 | 1.30 | 0.59 | | 1.32 |
| RV01 (08) | 0.02 | 0.04 | | 0.06 | 0.46 | 0.30 | | 0.51 |
| RV01 (05) | 0.08 | 0.12 | | 0.15 | 1.90 | 0.68 | | 1.94 |
| RV01 (09) | 0.06 | 0.08 | | 0.09 | 1.62 | 0.67 | | 1.71 |
| RV01 (10) DNA | | | | 0.03 | | | | 0.08 |
| RV13 (02) | 0.03 | 0.04 | | 0.06 | 1.15 | 0.41 | | 1.18 |

10

従って、上記リボソーム処方物は、増大した F 特異的 I g G 力価および T 細胞頻度によって決定される場合、上記裸の RNA コントロールと比較して免疫原性を顕著に増大した。リボソームと共に処方したか、またはエレクトロポレーションを使用して裸で送達されたプラスミド DNA は、リボソーム処方された自己複製 RNA より顕著に免疫原性が低かった。

20

【0 1 8 9】

さらなる RV01 リボソームを、上記 DMG に結合体化した短い PEG (2 kDa) もしくは長い (5 kDa) PEG のいずれかを使用して、150 μ g RNA (RSV の表面融合糖タンパク質をコードする vA375 レプリコン) を被包するかもしくは緩衝液のみを被包して、方法 (H) によって調製した。従って、これらリボソームは、40% D l i n D M A、10% D S P C、48% C h o l、および 2% P E G - D M G を有した。サイズおよび被包は、以下のとおりであった：

【0 1 9 0】

【数 1 3】

30

| RV | PEG | Zav (nm) | pdI | RNA | 被包 ⁿ |
|-----------|-------|----------|-------|-----|-----------------|
| RV01 (36) | 2 kDa | 152.1 | 0.053 | + | 92.5% |
| RV01 (36) | 2 kDa | 144 | 0.13 | - | - |
| RV01 (43) | 5 kDa | 134 | 0.136 | + | 71.6% |
| RV01 (43) | 5 kDa | 130.3 | 0.178 | - | - |

上記リボソームを、0 日目および 21 日目に、両側の筋肉内注射 (50 μ l / 脚) によって B A L B / c マウス (10 匹 / 群) に投与した。用量は、0.01 μ g、0.03 μ g、0.1 μ g、0.3 μ g もしくは 1 μ g であった。F 特異的血清 I g G および P R N T 60 力価 (G M T) は、以下のとおりであった (第 1 もしくは第 2 の注射の 2 週間後)：

40

【0 1 9 1】

【数 1 4】

| RV | RNA (μg) | 2wp1 | 2wp2 | PRNT60 (2wp2) |
|-----------|----------|------|--------|---------------|
| 緩衝液コントロール | 0 | — | — | 10 |
| RV01 (36) | 0 | — | — | 10 |
| RV01 (36) | 0.01 | 3399 | 50691 | 37 |
| RV01 (36) | 0.03 | 3446 | 53463 | 83 |
| RV01 (36) | 0.1 | 8262 | 76808 | 238 |
| RV01 (36) | 0.3 | 5913 | 82599 | 512 |
| RV01 (36) | 1 | 8213 | 85138 | 441 |
| RV01 (43) | 0 | — | — | 10 |
| RV01 (43) | 0.01 | 3959 | 37025 | 51 |
| RV01 (43) | 0.03 | 5842 | 50763 | 180 |
| RV01 (43) | 0.1 | 7559 | 122555 | 314 |
| RV01 (43) | 0.3 | 5712 | 126619 | 689 |
| RV01 (43) | 1 | 9434 | 199991 | 1055 |

10

20

(リボソーム - 被包の必要性)

図 10 を参照して上記で言及されるように、被包は、強力な発現に必須である。さらなる実験は、3 種の異なる RNA を使用した：(i) R S V - F (すなわち、R S V の表面融合糖タンパク質) を発現する「v A 3 1 7」レプリコン；(i i) G F P を発現する「v A 1 7」レプリコン；および(i i i) 複製欠損性でありかつ G F P をコードする「v A 3 3 6」。RNA を、裸でもしくは方法(D)によって作製したリボソームと共に、のいずれかで送達した。空のリボソームを、方法(D)によって、ただし、いかなる RNA もなしで作製した。リボソーム処方物は、これらの特徴を有した：

30

【0 1 9 2】

【数 1 5】

| RNA | 粒子サイズ Zav (nm) | 多分散性 | RNA 被包 |
|-------|----------------|-------|--------|
| vA317 | 155.7 | 0.113 | 86.6% |
| vA17 | 148.4 | 0.139 | 92% |
| vA336 | 145.1 | 0.143 | 92.9% |
| 空 | 147.9 | 0.147 | - |

B A L B / c マウス(1 群あたり 5 匹の動物) に、0 日目および 2 1 日目に、両側の筋肉内ワクチン接種(5 0 μ L / 脚) を与えた：

40

群 1 裸の自己複製性 R S V - F RNA (v A 3 1 7 , 0 . 1 μ g)

群 2 リボソーム中に被包された自己複製性 R S V - F RNA (v A 3 1 7 , 0 . 1 μ g)

群 3 空のリボソームに添加された自己複製性 R S V - F RNA (v A 3 1 7 , 0 . 1 μ g)

群 4 F サブユニットタンパク質(5 μ g) 。

【0 1 9 3】

血清を、1 4 日目、3 5 日目および 5 1 日目に、抗体分析のために集めた。F 特異的血清 I g G 力価(G M T) を測定した；個々の動物が力価 < 2 5 (検出限界) を有した場合

50

、それには力価 5 を割り当てた。さらに、5 1 日目に T 細胞分析のために脾臓をマウスから採取して、サイトカイン陽性かつ R S V F 5 1 - 6 6 ペプチド (C D 4 +) もしくは R S V F ペプチド F 8 5 - 9 3 および F 2 4 9 - 2 5 8 (C D 8 +) に対して特異的である細胞を決定した。

【 0 1 9 4 】

I g G 力価は、1 0 群においておよび非免疫化コントロールマウスにおいて以下のとおりであった：

【 0 1 9 5 】

【 数 1 6 】

| 日数 | 1 | 2 | 3 | 4 | - |
|----|-----|-------|----|-------|---|
| 14 | 22 | 1819 | 5 | 5 | 5 |
| 35 | 290 | 32533 | 9 | 19877 | 5 |
| 51 | 463 | 30511 | 18 | 20853 | 5 |

10

5 1 日目で R S V 血清中和力価は、以下のとおりであった：

【 0 1 9 6 】

【 数 1 7 】

| 日数 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----|----|----|----|----|
| 51 | 35 | 50 | 24 | 38 |

20

5 1 日目に R S V F 特異的 C D 4 + 脾臓 T 細胞を示す動物は、以下のとおりであった。ここで数字 (% 陽性細胞) は、上記刺激された応答が統計的に有意にゼロを上回った場合にのみ与える：

【 0 1 9 7 】

【 数 1 8 】

| サイトカイン | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|------|------|---|------|
| IFN- γ | | 0.04 | | |
| IL2 | 0.02 | 0.06 | | 0.02 |
| IL5 | | | | |
| TNF α | 0.03 | 0.05 | | |

30

5 1 日目に R S V F 特異的 C D 8 + 脾臓 T 細胞を示す動物は、以下のとおりであった。ここで数字は、上記刺激された応答が統計的に有意にゼロを上回った場合にのみ与える：

40

【 0 1 9 8 】

【数 1 9】

| サイトカイン | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|------|------|---|------|
| IFN- γ | 0.37 | 0.87 | | |
| IL2 | 0.11 | 0.40 | | 0.04 |
| IL5 | | | | |
| TNF α | 0.29 | 0.79 | | 0.06 |

従って、上記リボソーム内のRNAの被包は、高い免疫原性に必要である。なぜなら、RNAおよび上記リボソームの単純な混合（群3）は、免疫原性ではなかったからである（実際に、裸のRNAより免疫原性が低かった）。

10

【0 1 9 9】

（V A 3 1 7 R S Vレプリコンを伴った様々なカチオン性脂質）

さらなる実験では、4種の異なるカチオン性脂質（D l i n D M A、R V 0 2、R V 0 4およびR V 0 7）を比較した。全てのリボソームは、2% P E G - D M G 2 0 0 0を含んだが、残りの脂質組成は異なった。上記組成および物理的特徴は、以下のとおりであった：

【0 2 0 0】

【数 2 0】

20

| 名称 | 脂質 1 | 他の脂質 | Zav 直径 (nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|--------------|-----------------------|-------------|-------|-------------------|
| A | DlinDMA, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 158.6 | 0.088 | 90.7 |
| B | RV02, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 146.8 | 0.084 | 97.5 |
| C | RV04, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 136.7 | 0.165 | 67.3 |
| D | RV04, 60% | 38% コレステロール | 176.3 | 0.157 | 55.2 |
| E | RV07, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 144.9 | 0.204 | 82 |
| F | RV07, 60% | 38% コレステロール | 124.1 | 0.195 | 80 |

30

B A L B / c マウス（8匹/群）に、0日目および21日目に、以下を両側の筋肉内ワクチン接種によって与えた（50 μ L / 脚）：裸のレプリコン（1 μ g）もしくは0.1 μ g 被包RNA。これらの2回の注射の2週間後のF特異的血清IgG力価（GMT）は、以下のとおりであった：

【0 2 0 1】

40

【数 2 1】

| リポソーム | 14 日目 | 35 日目 |
|-------------|-------|-------|
| 裸の A317 RNA | 111 | 469 |
| A | 1834 | 30519 |
| B | 1050 | 5681 |
| C | 430 | 4127 |
| D | 779 | 4693 |
| E | 586 | 6424 |
| F | 121 | 2568 |

10

RV07 に関しては、DSPC がないことから、免疫原性の大きな低下が引き起こされた。

【0202】

さらなる脂質 (RV03、RV08、RV09、RV14 [42]) を、同じように試験した：

【0203】

【数 2 2】

20

| 名称 | 脂質 1 | 他の脂質 | Zav 直径(nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|--------------|-----------------------|------------|-------|-------------------|
| G | DlinDMA, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 158.6 | 0.088 | 90.7 |
| H | RV03, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 150.3 | 0.188 | 83.1 |
| I | RV03, 60% | 38% コレステロール | 161.1 | 0.239 | 68.4 |
| J | RV08, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 191.1 | 0.227 | 51.7 |
| K | RV09, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 161.6 | 0.209 | 64.5 |
| L | RV09, 60% | 38% コレステロール | 170.7 | 0.121 | 82.4 |
| M | RV14, 60% | 30% DSPC | 155.5 | 0.238 | 63.3 |
| N | RV01, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 96.14 | 0.087 | 92 |

30

【0204】

【数 2 3】

| リポソーム | 14 日目 | 35 日目 |
|-------------|-------|-------|
| 裸の A317 RNA | 35 | 457 |
| G | 2421 | 10757 |
| H | 15 | 52 |
| I | 16 | 85 |
| J | 991 | 1921 |
| K | 1082 | 1421 |
| L | 146 | 286 |
| M | 27 | 212 |
| N | 4695 | 19773 |

10

リポソーム M (D C - コレステロールあり) は、裸の R N A コントロールをさらに下回って、不十分にしか機能しなかった。対照的に、残りのカチオン性脂質は、有用な結果を与えた。リポソーム N は、リポソーム G (方法 (D)) とは異なる混合法 (マイクロ流体チップを用いた方法 (G)) によって調製した。そしてこのより小さなリポソームは、ほぼ同じ被包でよりよい結果を与えた。

20

【 0 2 0 5 】

さらなる脂質 (R V 0 1 、 R V 1 0 、 R V 1 1 、 R V 1 5) を、同じように試験した：

【 0 2 0 6 】

【数 2 4】

| 名称 | 脂質 1 | 他の脂質 | Zav 直径 (nm) | pdI | % 被包 ⁿ |
|----|--------------|-----------------------|-------------|-------|-------------------|
| P | DlinDMA, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 158.6 | 0.088 | 90.7 |
| Q | RV10, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 123.6 | 0.14 | 80.3 |
| R | RV11, 40% | 10% DSPC, 48% コレステロール | 137.1 | 0.155 | 81 |
| S | RV11, 60% | 38% コレステロール | 135.4 | 0.175 | 79.7 |
| T | RV15, 40% | 38% コレステロール | 111 | 0.167 | 76.4 |

30

【 0 2 0 7 】

【数 2 5】

| リポソーム | 14 日目 | 35 日目 |
|-------------|-------|-------|
| 裸の A317 RNA | 185 | 982 |
| P | 2787 | 27416 |
| Q | 24 | 161 |
| R | 633 | 1715 |
| S | 405 | 2733 |
| T | 761 | 2459 |

40

リポソーム Q を除いて、これらリポソームの各々は、上記コントロールより良好に機能した。リポソーム Q における上記 R V 1 0 脂質は、 pK_a 7 . 8 6 を有し、これは、高すぎてインピボで有用ではないようであった。しかし、有用な pK_a 範囲 5 . 0 ~ 7 .

50

6 の中であっても、結果は良好であったが、一方にアルキルテールおよび一方にステロイド含有テールを有する上記脂質はいずれも、RV01ほど良好な結果を与えなかった。

【0208】

さらなるリポソームを、RV05で作製した。上記リポソームは全て、40% RV05および2% PEG化脂質を有したが、残りの成分は異なった（しかし、コレステロールは常に含まれた）。物理的特徴は、以下であった：

【0209】

【数26】

| 名称 | PEG 化脂質 | 他の成分 | Zav (nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|---------|------------------------------------|----------|-------|-------------------|
| U | DMG | 10% DSPC, 48% chol | 102.2 | 0.12 | 76.81 |
| V | コレステロール | 10% DSPC, 46% chol, 2% α GC | 103.7 | 0.107 | 72.58 |
| W | DMG | 10% DPyPE, 48% chol | 99.6 | 0.115 | 78.34 |
| X | DMG | 10% 18:3 PC, 48% chol | 130 | 0.14 | 87.92 |
| Y | DMG | 10% 18:2 PC, 48% chol | 101.1 | 0.133 | 76.64 |
| Z | DMG | 30% 18:2 PC, 28% chol | 134.3 | 0.158 | 57.76 |

10

α GC = α -ガラクトシルセラミド

20

BALB/cマウスを、前のように試験した：

【0210】

【数27】

| 注射 | 14日目 | 35日目 |
|-------|------|------|
| 裸のRNA | 321 | 915 |
| U | 551 | 955 |
| V | 342 | 2531 |
| W | 1127 | 3881 |
| X | 364 | 1741 |
| Y | 567 | 5679 |
| Z | 1251 | 5303 |

30

非対称脂質テール（アルキル＋コレステロール）を有するカチオン性脂質に関しては、中性脂質を、DSPC（飽和C18脂質テール）から18:2もしくは18:3 PC（テール1つあたり2個および3個の不飽和二重結合を有する）へと変更したところ、全IgG力価が増大した。同等の結果が、DSPCをDPyPEと交換することによって認められた。

40

【0211】

（VA317 RSVレプリコンを有する、さらなる異なるカチオン性脂質）

参考文献43において開示されるカチオン性脂質をまた、上記VA317レプリコンのためのリポソームを調製するために使用した。これらカチオン性脂質は、5.8～6.1のpKaを有する。比較のために、DODMA、DlindMAおよびDOTMAもまた、試験した。カチオン性脂質は、40%において常に存在させた。全てのリポソームは、コレステロールおよび2% PEG化DMG（PEG2000, PEG5000を有するリポソームEを除いて）を含み、方法（H）によって作製した。物理的特徴は、以下のとおりであった：

50

【 0 2 1 2 】

【 数 2 8 】

| | カチオン性脂質 | 他の脂質 | Zav (nm) | pdl | 被包 ⁿ % |
|---|---------|---------------------------------|----------|-------|-------------------|
| A | DlinDMA | 10% DSPC, 48% chol | 122.3 | 0.068 | 95.23 |
| B | RV16 | 10% DSPC, 48% chol | 148.5 | 0.088 | 69.34 |
| C | RV17 | 10% DSPC, 48% chol | 138 | 0.098 | 67.99 |
| D | DODMA | 10% DSPC, 48% chol | 107.4 | 0.151 | 96.61 |
| E | DlinDMA | 10% DSPC, 48% chol | 106.1 | 0.136 | 61.61 |
| F | DOTMA | 10% DSPC, 48% chol | 89.32 | 0.164 | 98.87 |
| G | DlinDMA | 10% 18:2 PC, 48% chol | 115.8 | 0.111 | 95.67 |
| H | DlinDMA | 10% LPC, 48% chol | 116.7 | 0.143 | 94.84 |
| I | DlinDMA | 10% DPyPE, 48% chol | 134 | 0.163 | 96.33 |
| J | RV05 | 10% 18:2 PC, 8% chol, 40% DPyPE | 124.7 | 0.17 | 61.51 |

10

これらリボソームを使用して、BALB/cマウスを前のようにワクチン接種した。F 20
特異的血清 I g G 力価 (G M T) は、以下のとおりであった：

【 0 2 1 3 】

【 数 2 9 】

| 群 | 14 日目 | 35 日目 |
|--------|-------|-------|
| 裸の RNA | 28 | 721 |
| A | 2237 | 12407 |
| B | 1107 | 13981 |
| C | 2109 | 22147 |
| D | 2175 | 24881 |
| E | 5654 | 39927 |
| F | 285 | 6362 |
| G | 1058 | 3467 |
| H | 1475 | 10211 |
| I | 557 | 1363 |
| J | 703 | 1732 |

30

40

従って、上記 RV05 リボソームは、裸の RNA よりも免疫原性であったが、RV01 リボソームよりは免疫原性が低かった。

【 0 2 1 4 】

T 細胞分析のために、49 日目に脾臓を採取した。全てのリボソームは、F 特異的サイトカイン陽性 T 細胞頻度 (C D 4 + および C D 8 +) を与えた (これは、統計的に有意にゼロを上回った)。

【 0 2 1 5 】

(種々の脂質および P E G 長)

上記 v A 3 1 7 レプリコンを、種々の異なる脂質と異なる P E G 長を有するリボソーム 50

中で投与した。上記リポソームは全て、40% D l i n D M A、10% D S P C および 48% コレステロールを有したが、残りの2%は異なり、異なる P E G 化脂質（例えば、図 18 A ~ 18 E）および異なる P E G 長を有した。

【0216】

上記リポソーム（方法（H）によって作製した）の物理的特徴は、以下であった：

【0217】

【数30】

| 名称 | PEG 化脂質 | PEG 長 | Zav (nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|---------|-------|----------|-------|-------------------|
| A | DMG | 2000 | 136.3 | 0.087 | 85.35 |
| B | DMG | 3000 | 120.9 | 0.087 | 72.06 |
| C | DMG | 1000 | 175.9 | 0.111 | 92.52 |
| D | 図 18A | 2000 | 157.9 | 0.094 | 97.44 |
| E | 図 18D | 2000 | 122.2 | 0.122 | 77.84 |
| F | 図 18E | 2000 | 129.8 | 0.125 | 82.57 |
| G | コレステロール | 2000 | 122.9 | 0.087 | 87.1 |
| H | 図 18C | 2000 | 138 | 0.137 | 78.48 |
| I | 図 18B | 2000 | 113.4 | 0.091 | 89.12 |

B A L B / c マウス（8匹/群）に、0日目および21日目に、裸で（1 μ g）もしくは被包して（0.1 μ g）のいずれかで、上記レプリコンを両側の筋肉内にワクチン接種した（50 μ L / 脚）。14日目および35日目に、抗体分析のために血清を集めた。

【0218】

F 特異的血清 I g G 力価（G M T）は、以下のとおりであった（2回の注射の2週間後（2 w p 1））：

【0219】

【数31】

| RV | 2wp1 | 2wp2 |
|--------|------|-------|
| 裸の RNA | 216 | 1356 |
| A | 3271 | 15659 |
| B | 3860 | 22378 |
| C | 1691 | 7412 |
| D | 1025 | 1767 |
| E | 1618 | 9536 |
| F | 2684 | 11221 |
| G | 3514 | 10566 |
| H | 4142 | 22810 |
| I | 952 | 10410 |

結果は、より高分子量の P E G 頭部がより免疫原性である傾向を示す。D M G 結合体化 P E G の長さが、1000 D a から 3000 D a へと増大するにつれて、2 w p 2 F 特異的 I g G 力価は、7412 から 15659 ~ 22378 まで増大する。

【 0 2 2 0 】

リンカー領域を、エステルからエーテルへと変更したところ、上記力価には実質的に影響しなかった。また、同じ分子量の頭部（ 2 0 0 0 ）において、脂質テールの長さを増大させたところ、力価は低下するという傾向があった（ C 1 4 ジアルキルを有する H 対 C 1 8 ジアルキルを有する I ）。 P E G ジアルキル脂質テールをコレステロールで置換しても、免疫原性にはほとんど影響がなかった（ D M Gを有する A 対 コレステロールを有する G ）。

【 0 2 2 1 】

類似の実験を、 2 k D a の P E G を、 2 × 1 k D a 基に分割した異なる脂質で行った（図 1 7 ）。上記 v A 3 1 7 レプリコンを再び使用して、 B A L B / c マウス（ 8 匹 / 群 ）に、 0 日目および 2 1 日目に、 1 μ g 裸の R N A もしくは 0 . 1 μ g リボソーム被包 R N A を、両側の筋肉内にワクチン接種した（ 5 0 μ L / 脚 ）。上記リボソームは全て、 4 0 % カチオン性脂質（ D l i n D M A ）、 1 0 % D S P C および 4 8 % コレステロールを有したが、残り 2 % は異なり、様々な P E G 化脂質を有した（ただし、全て 2 k D a P E G を有する）。それらを、方法（ H ）によって作製した。

【 0 2 2 2 】

上記リボソームの物理的特徴は、以下であった：

【 0 2 2 3 】

【 数 3 2 】

| 名称 | PEG 化脂質 | Zav (nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|-------------------|----------|-------|-------------------|
| A | DMG | 121 | 0.101 | 84.84 |
| B | 分割; R= C14 飽和 | 141.3 | 0.049 | 95.41 |
| C | 分割; R= C16 飽和 | 114.6 | 0.101 | 96.79 |
| D | 分割; R= C18 飽和 | 116.5 | 0.088 | 98.63 |
| E | 分割; R= C18, 1 不飽和 | 129.4 | 0.149 | 93.37 |

さらなるリボソームを、 R V 0 5 で作製した。上記リボソームは全て、 4 0 % カチオン性脂質（ R V 0 5 ）および 2 % P E G 化脂質（ 2 k D a P E G ）を有したが、残りの成分は異なった（しかし、コレステロールは常に含めた）。上記リボソームを、 p H 5 を有することを除いて、方法（ H ）によって作製した。物理的特徴は、以下であった：

【 0 2 2 4 】

【 数 3 3 】

| 名称 | PEG 化脂質 | 他の成分 | Zav (nm) | pdl | % 被包 ⁿ |
|----|---------|----------------------------|----------|-------|-------------------|
| F | DMG | 10% DSPC, 48% chol | 102.2 | 0.12 | 76.81 |
| G | コレステロール | 10% DSPC, 46% chol, 2% αGC | 103.7 | 0.107 | 72.58 |
| H | DMG | 10% DPyPE, 48% chol | 99.6 | 0.115 | 78.34 |
| I | DMG | 10% 18:3 PC, 48% chol | 130 | 0.14 | 87.92 |
| J | DMG | 10% 18:2 PC, 48% chol | 101.1 | 0.133 | 76.64 |
| K | DMG | 30% 18:2 PC, 28% chol | 134.3 | 0.158 | 57.76 |

αGC = α - ガラクトシルセラミド

B A L B / c マウス（ 8 匹 / 群 ）に、 0 日目および 2 1 日目に、裸で（ 1 μ g ）もしくは被包して（ 0 . 1 μ g ）のいずれかで、上記レプリコンを両側の筋肉内ワクチン接種で与えた（ 5 0 μ L / 脚 ）。 1 4 日目および 3 5 日目に、抗体分析のために血清を集めた。 F 特異的血清 I g G 力価（ G M T ）は、以下のとおりであった（ 2 回の注射の 2 週間後（

2wp1)) :
 【 0 2 2 5 】
 【 数 3 4 】

| RV | 2wp1 | 2wp2 |
|--------|------|-------|
| 裸の RNA | 321 | 915 |
| A | 2761 | 17040 |
| B | 866 | 3657 |
| C | 1734 | 5209 |
| D | 426 | 2079 |
| E | 2696 | 15794 |
| F | 551 | 955 |
| G | 342 | 2531 |
| H | 1127 | 3881 |
| I | 364 | 1741 |
| J | 567 | 5679 |
| K | 1251 | 5303 |

10

20

このように上記 PEG 頭部を分割すると、インビボでの力価が低下した。PEG 脂質テールに二重結合を含めたところ（アルキルテール 1 つあたり 1 不飽和度（degree of insaturation））、14 日目に 6 倍、および 35 日目に 7 倍に IgG 力価が増大した。非対称脂質テール（アルキル + コレステロール）を有するカチオン性脂質に関しては、中性脂質を、DSPC（飽和 C18 脂質テール）から 18 : 2 もしくは 18 : 3 PC（テール 1 つあたり 2 個もしくは 3 個の不飽和二重結合を有する）に変更したところ、全 IgG 力価が増大した。DSPC を DPyPE で置換して、同等の結果が認められた。

30

【 0 2 2 6 】

（CMV 免疫原性）

DLinDMA をカチオン性脂質として有する RV01 リボソームを使用して、サイトメガロウイルス（CMV）糖タンパク質をコードする RNA レプリコンを送達した。「vA160」レプリコンは、全長糖タンパク質 H および L（gH / gL）をコードするのに対して、「vA322」レプリコンは、可溶性形態（gHsol / gL）をコードする。上記 2 種のタンパク質は、単一のレプリコンにおいて別個のサブゲノムプロモーターの制御下にある；2 つの別個のベクター（一方は、gH をコードし、一方は gL をコードする）の共投与は、良好な結果を与えなかった。

40

【 0 2 2 7 】

BALB / c マウス（10 匹 / 群）に、0 日目、21 日目および 42 日目に、gH / gL を発現する VRP（ 1×10^6 IU）、gHsol / gL を発現する VRP（ 1×10^6 IU）およびコントロールとして PBS を、両側の筋肉内ワクチン接種で与えた（50 μ L / 脚）。2 つの試験群に、リボソーム（40 % DLinDMA、10 % DSPC、48 % Chol、2 % PEG - DMG；方法（D）を使用して作製（ただし 150 μ g RNA パッチサイズで））中に処方した 1 μ g の上記 vA160 レプリコンもしくは vA322 レプリコンを与えた。

【 0 2 2 8 】

上記 vA160 リボソームは、Zav 直径 168 . 8 nm、pdI 0 . 144、お

50

よび 87.4% 被包を有した。上記 v A 3 2 2 リボソームは、Z a v 直径 162 nm、p d I 0.131、および 90% 被包を有した。

【0229】

上記レプリコンは、単一ベクターから 2 種のタンパク質を発現できた。

【0230】

血清を、63日目(3wp3)に免疫学的分析のために集めた。CMV 中和力価(コントロールと比較して、陽性ウイルスフォーカス/ウェルの数において 50% 低下を生じる血清希釈の逆数)は、以下のとおりであった：

【0231】

【数35】

10

| gH/gL VRP | gHsol/gL VRP | gH/gL リボソーム | gHsol/gL リボソーム |
|-----------|--------------|-------------|----------------|
| 4576 | 2393 | 4240 | 10062 |

全長もしくは可溶性形態の CMV g H / g L 複合体のいずれかを発現する RNA は、従って、上皮細胞でアッセイされる場合、高い力価の中和抗体を誘発した。上記リボソーム被包 RNA によって誘発された平均力価は、その対応する V R P についてのものと少なくとも同程度に高かった。

【0232】

反復実験から、上記レプリコンが、単一のベクターから 2 種のタンパク質を発現できることが確認された。上記 RNA レプリコンは、V R P での 3 w p 3 力価 5516 と比較して、3 w p 3 力価 11457 を与えた。

20

【0233】

本発明は、例示によって記載されてきたに過ぎず、本発明の範囲および趣旨内に留まりながら、改変が行われ得ることは、理解される。

【0234】

表 1：有用なリン脂質

| | |
|---------|---|
| DDPC | 1, 2 - ジデカノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン |
| DEPA | 1, 2 - ジエルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート |
| DEPC | 1, 2 - エルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン |
| DEPE | 1, 2 - ジエルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン |
| DEPG | 1, 2 - ジエルコイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) |
| DLOPC | 1, 2 - リノレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン |
| DLP A | 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート |
| D L P C | 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン |
| D L P E | 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン |
| D L P G | 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) |
| D L P S | 1, 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン |
| D M G | 1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン |
| D M P A | 1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート |
| D M P C | 1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン |
| D M P E | 1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン |
| D M P G | 1, 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) |

30

40

50

| | | | |
|--------------|--|--|----|
| D M P S | 1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン | | |
| D O P A | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート | | |
| D O P C | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | | |
| D O P E | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン | | |
| D O P G | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) | | |
| D O P S | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン | | |
| D P P A | 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート | | |
| D P P C | 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | 10 | |
| D P P E | 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン | | |
| D P P G | 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) | | |
| D P P S | 1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン | | |
| D P y P E | 1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン | | |
| D S P A | 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート | | |
| D S P C | 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | | |
| D S P E | 1 , 2 - ジステアロイル (D i o s t e a r p y l) - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン | 20 | |
| D S P G | 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール . . .) | | |
| D S P S | 1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン | | |
| E P C | 卵 - P C | | |
| H E P C | 水素化卵 P C | | |
| H S P C | 高純度水素化ダイズ P C | | |
| H S P C | 水素化ダイズ P C | | |
| L Y S O P C | M Y R I S T I C | 1 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | 30 |
| L Y S O P C | P A L M I T I C | 1 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| L Y S O P C | S T E A R I C | 1 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| ミルクスフィンゴミエリン | M P P C | 1 - ミリストイル , 2 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| M S P C | | 1 - ミリストイル , 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| P M P C | | 1 - パルミトイル , 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | 40 |
| P O P C | | 1 - パルミトイル , 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| P O P E | | 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン | |
| P O P G | | 1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 [ホスファチジル - r a c - (1 - グリセロール) . . .] | |
| P S P C | | 1 - パルミトイル , 2 - ステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | |
| S M P C | | 1 - ステアロイル , 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン | 50 |

S O P C 1 - ステアロイル , 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチ
ジルコリン
S P P C 1 - ステアロイル , 2 - パルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファ
チジルコリン
【 0 2 3 5 】

【 数 3 6 】

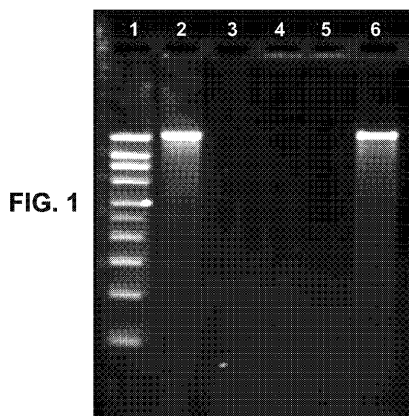
参考文献

- [1] Johanning *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes *et al.* (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] WO2005/121348.
- [4] *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols.* (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology*, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes).* (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002. 10
- [7] Jeffs *et al.* (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [8] WO2005/113782.
- [9] WO2011/005799.
- [10] El Ouahabi *et al.* (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [11] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.
- [12] WO2009/016515.
- [13] WO02/34771.
- [14] WO2005/032582. 20
- [15] WO2010/119343.
- [16] WO2006/110413.
- [17] WO2005/111066.
- [18] WO2005/002619.
- [19] WO2006/138004.
- [20] WO2009/109860.
- [21] WO02/02606.
- [22] WO03/018054.
- [23] WO2006/091517.
- [24] WO2008/020330. 30
- [25] WO2006/089264.
- [26] WO2009/104092.
- [27] WO2009/031043.
- [28] WO2007/049155.
- [29] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [30] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [31] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [32] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press). 40
- [33] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [34] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- [35] *Molecular Biology Techniques: an intensive laboratory course* (Ream, eds. 1998 Academic Press)
- [36] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds. 1997, Springer Verlag)
- [37] Yoneyama & Fujita (2007) *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18:545-51.
- [38] Maurer *et al.* (2001) *Biophysical Journal*, 80: 2310-2326.
- [39] Perri *et al.* (2003) *J Virol* 77:10394-10403.

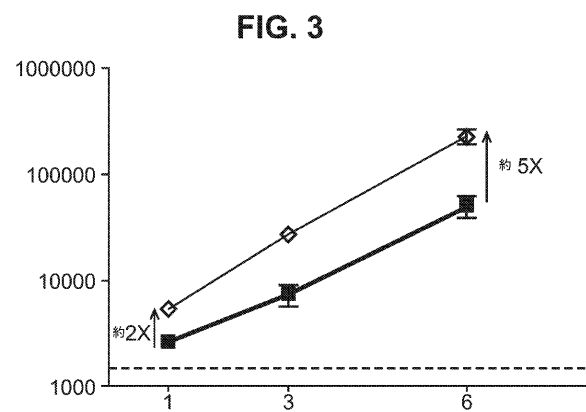
【 数 3 7 】

- [40] Boxus *et al.* (2007) *J Virol* 81:6879-89.
 [41] Taylor *et al.* (2005) *Vaccine* 23:1242-50.
 [42] WO2011/076807.
 [43] WO2011/057020.

【 図 1 】

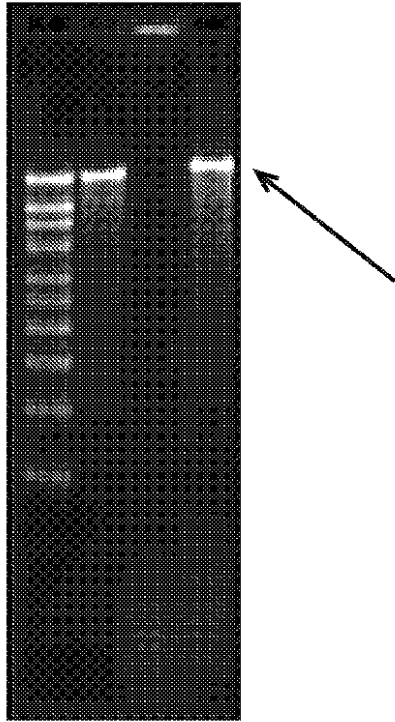


【 図 3 】



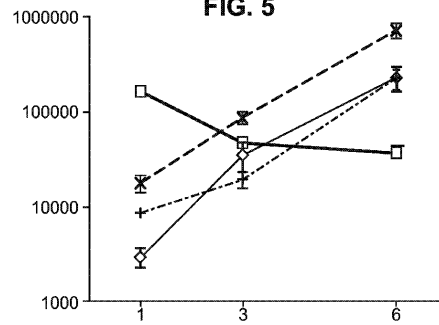
【 図 4 】

FIG. 4



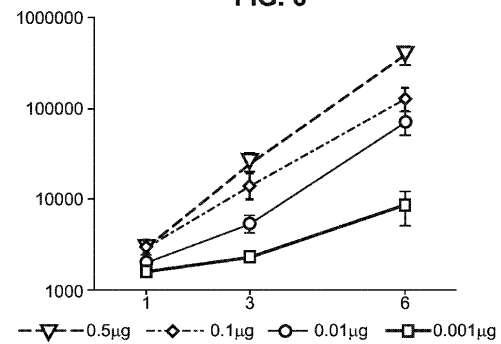
【 図 5 】

FIG. 5



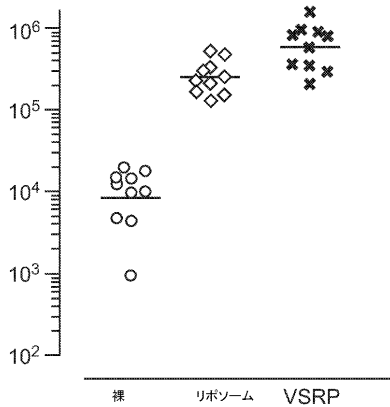
【 図 6 】

FIG. 6



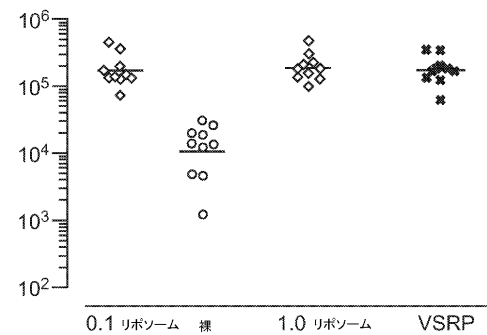
【 図 7 】

FIG. 7



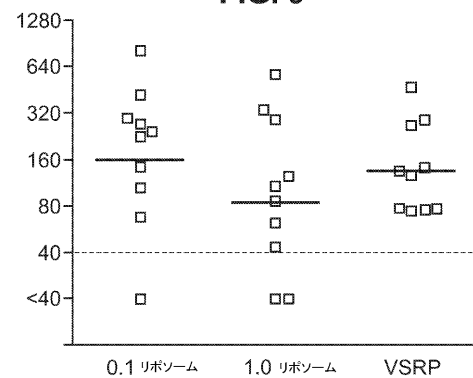
【 図 8 】

FIG. 8



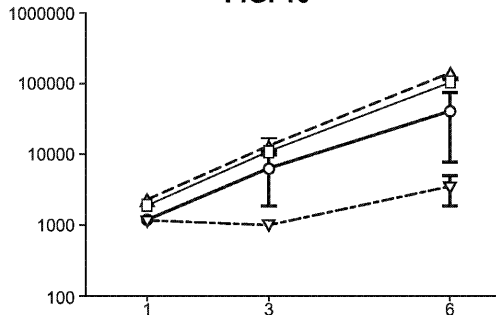
【 図 9 】

FIG. 9



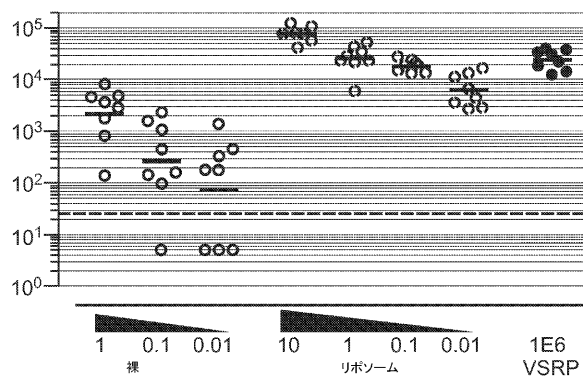
【図 10】

FIG. 10



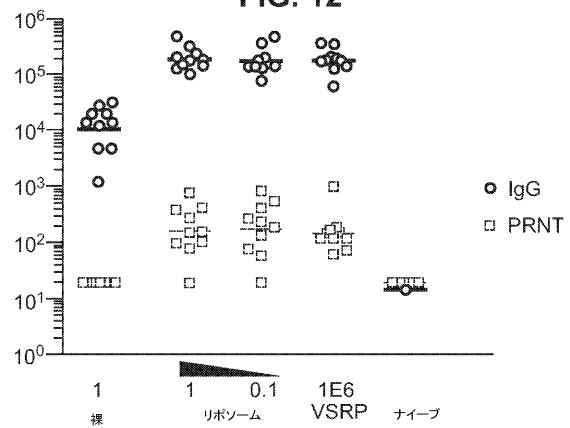
【図 11】

FIG. 11



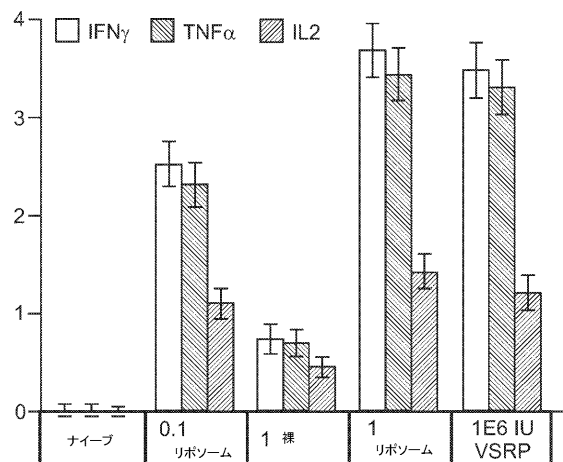
【図 12】

FIG. 12

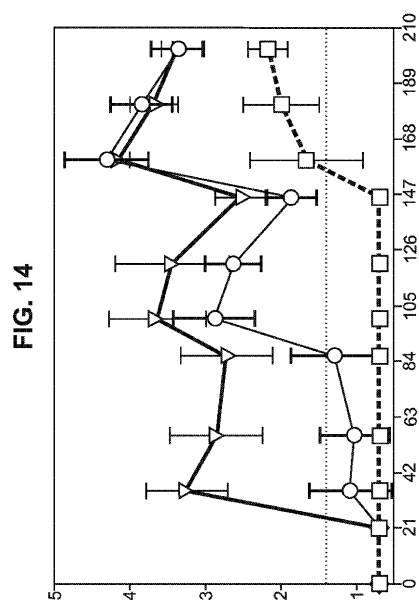


【図 13】

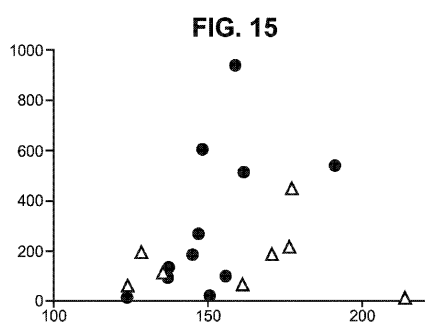
FIG. 13



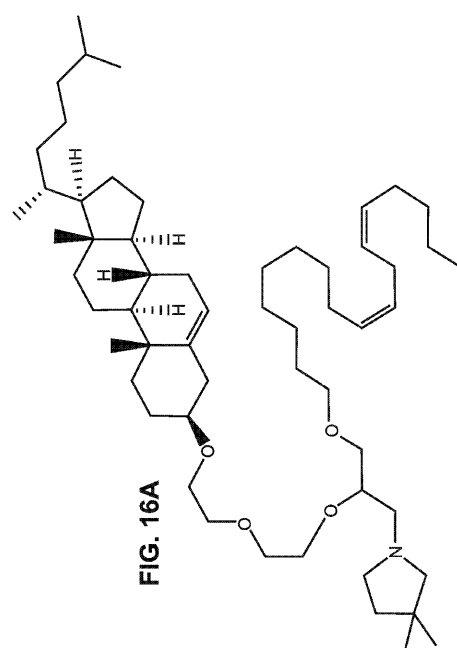
【図 14】



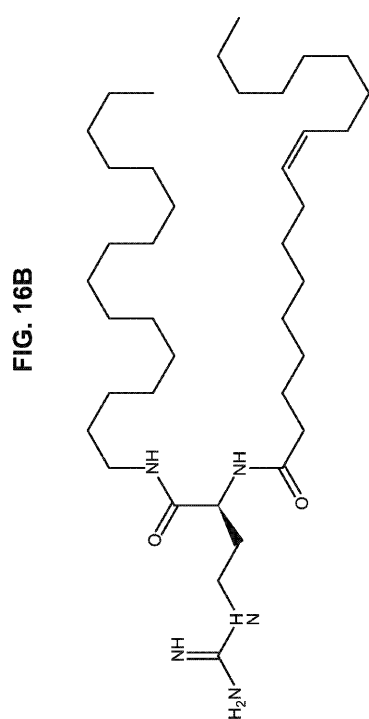
【 図 1 5 】



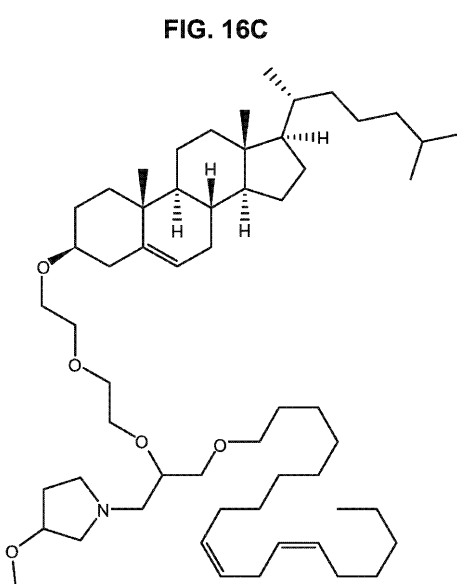
【 図 1 6 A 】



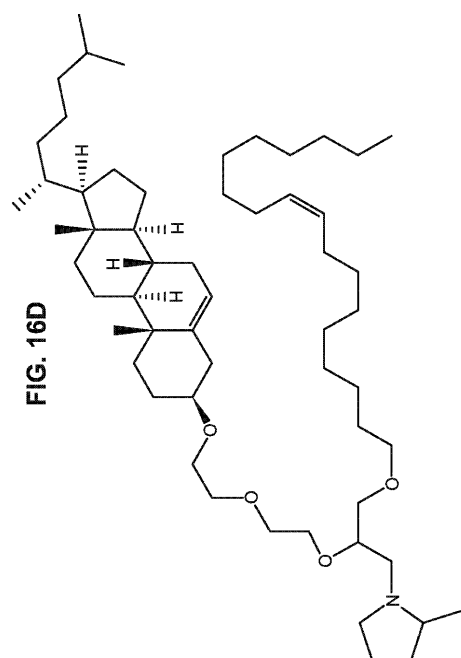
【 図 1 6 B 】



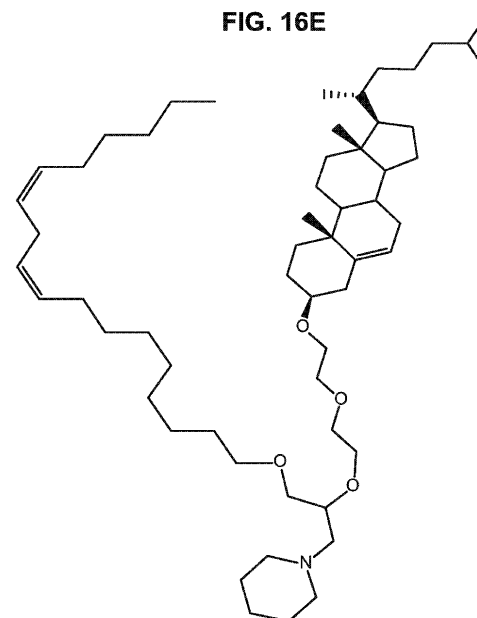
【 図 1 6 C 】



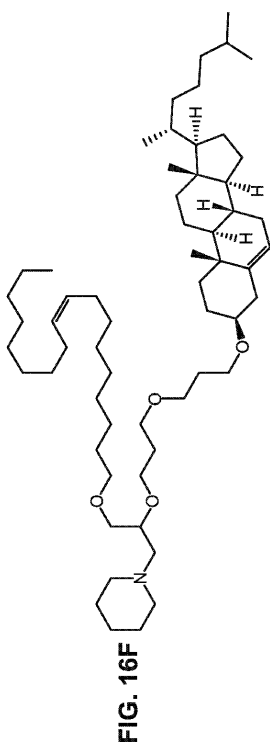
【 図 1 6 D 】



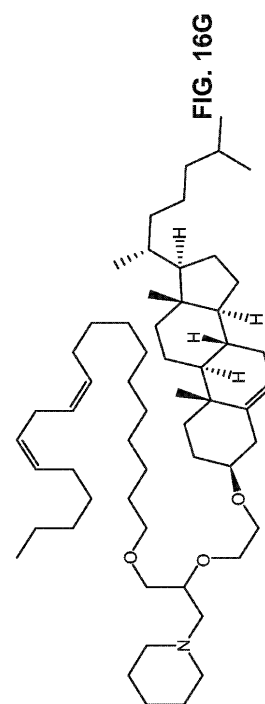
【 図 1 6 E 】



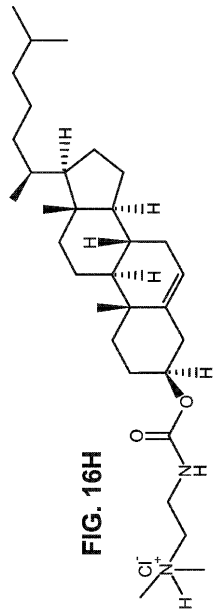
【 図 1 6 F 】



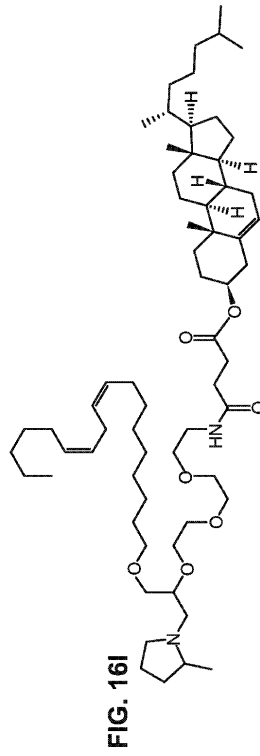
【 図 1 6 G 】



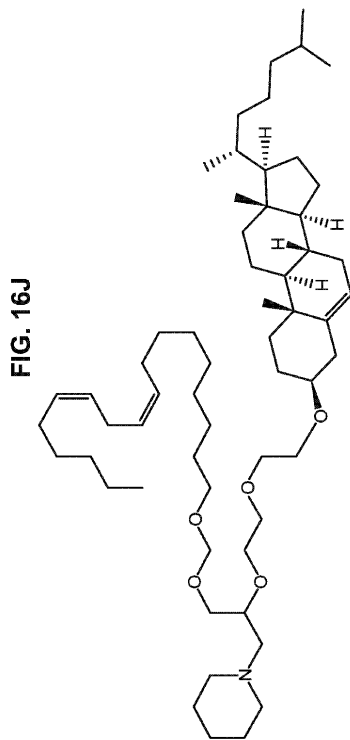
【 図 1 6 H 】



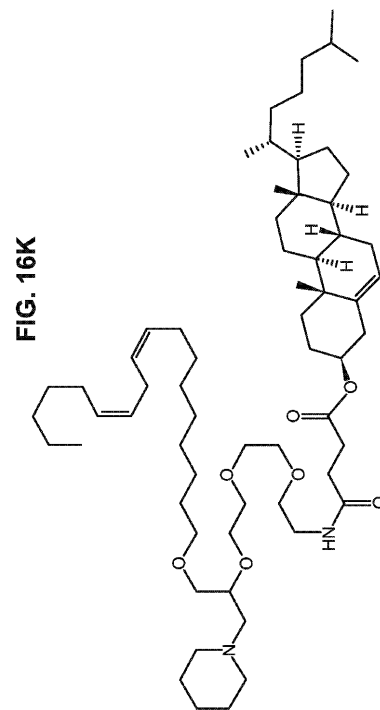
【 図 1 6 I 】



【 図 1 6 J 】

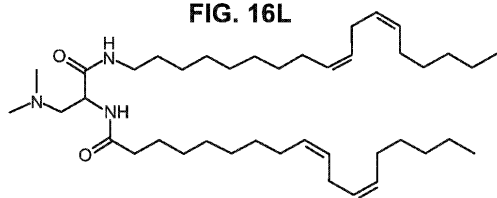


【 図 1 6 K 】



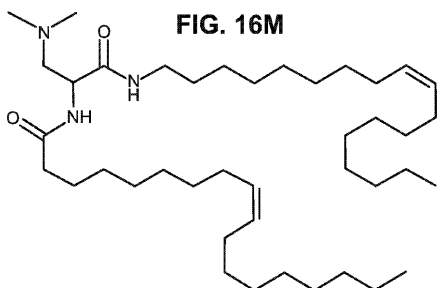
【 図 1 6 L 】

FIG. 16L



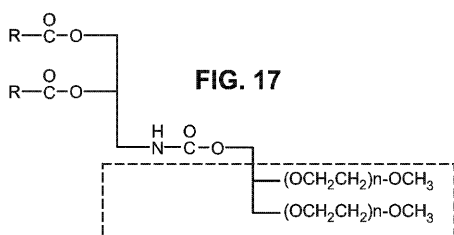
【 図 1 6 M 】

FIG. 16M



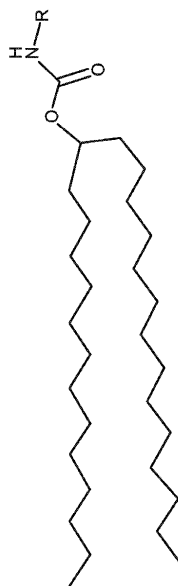
【 図 1 7 】

FIG. 17



【 図 1 8 A 】

FIG. 18A



【 図 1 8 B 】

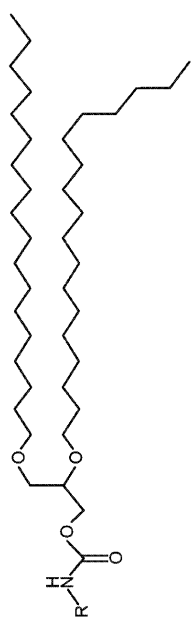


FIG. 18B

【 図 1 8 C 】

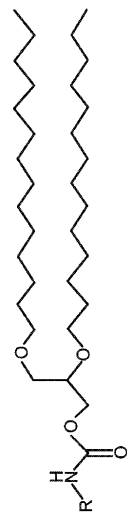
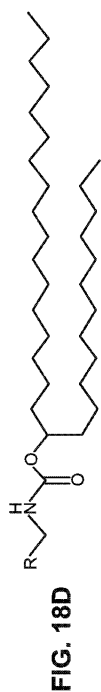
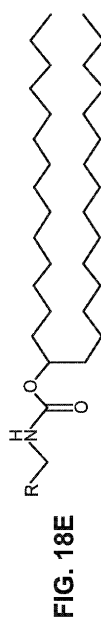


FIG. 18C

【 図 18 D 】

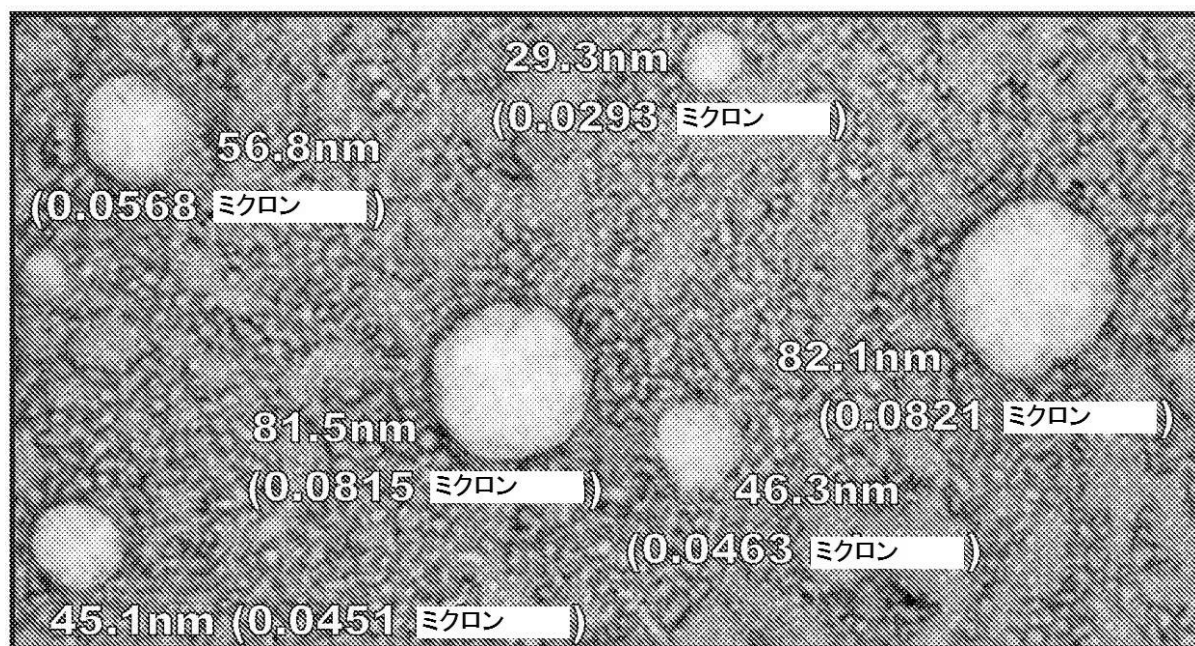


【 図 18 E 】



【 図 2 】

FIG. 2



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/049873

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K48/00 A61K9/127 A61K39/00 A61K9/00 ADD. | | |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 1 637 144 A1 (NIPPON SHINYAKU CO LTD [JP]) 22 March 2006 (2006-03-22) examples 1,4 claims 1-12 | 1-12 |
| X | JP 2007 112768 A (UNIV KYOTO; GENECARE RES INST CO LTD) 10 May 2007 (2007-05-10) abstract | 1-12 |
| X | EP 0 786 522 A2 (RIBOZYME PHARM INC [US] RIBOZYME PHARM INC) 30 July 1997 (1997-07-30) claims 1-11 | 1-12 |
| X | US 5 750 390 A (THOMPSON JAMES D [US] ET AL) 12 May 1998 (1998-05-12) claims 1-11 | 1-12 |
| | ----- -/- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 30 November 2011 | | 07/12/2011 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Schifferer, Hermann |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/049873

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5 972 704 A (DRAPER KENNETH G [US] ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) claims 1-22 ----- | 1-12 |
| X | WO 99/52503 A2 (WAYNE JOHN CANCER INST [US]) 21 October 1999 (1999-10-21) examples 1-6 claims 1-60 ----- | 1-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/049873

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 1637144 | A1 | 22-03-2006 | CA 2527301 A1 | 09-12-2004 |
| | | | EP 1637144 A1 | 22-03-2006 |
| | | | JP 4623426 B2 | 02-02-2011 |
| | | | KR 20060063788 A | 12-06-2006 |
| | | | US 2007042979 A1 | 22-02-2007 |
| | | | US 2009123532 A1 | 14-05-2009 |
| | | | WO 2004105774 A1 | 09-12-2004 |
| ----- | | | | |
| JP 2007112768 | A | 10-05-2007 | NONE | |
| ----- | | | | |
| EP 0786522 | A2 | 30-07-1997 | EP 0786522 A2 | 30-07-1997 |
| | | | EP 1251170 A2 | 23-10-2002 |
| ----- | | | | |
| US 5750390 | A | 12-05-1998 | NONE | |
| ----- | | | | |
| US 5972704 | A | 26-10-1999 | NONE | |
| ----- | | | | |
| WO 9952503 | A2 | 21-10-1999 | AT 296618 T | 15-06-2005 |
| | | | AU 3472299 A | 01-11-1999 |
| | | | DE 69925618 D1 | 07-07-2005 |
| | | | DE 69925618 T2 | 27-04-2006 |
| | | | EP 1119346 A2 | 01-08-2001 |
| | | | US 6432925 B1 | 13-08-2002 |
| | | | US 6472375 B1 | 29-10-2002 |
| | | | WO 9952503 A2 | 21-10-1999 |
| ----- | | | | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|--|----------------|---------------|
| A 6 1 K 39/02 (2006.01) | | A 6 1 K 39/00 | K |
| A 6 1 K 39/12 (2006.01) | | A 6 1 K 39/02 | |
| A 6 1 K 39/002 (2006.01) | | A 6 1 K 39/12 | |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01) | | A 6 1 K 39/00 | Z |
| A 6 1 P 31/12 (2006.01) | | A 6 1 K 39/002 | |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01) | | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 31/10 (2006.01) | | A 6 1 P 31/12 | |
| A 6 1 P 33/00 (2006.01) | | A 6 1 P 31/04 | |
| | | A 6 1 P 31/10 | |
| | | A 6 1 P 33/00 | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(72)発明者 ベルマ, アユシュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エメリービル, ピー・オー・ボックス 8 0 9 7, ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA07 BA31 CA11 DA02 EA10 FA20 GA11 HA17
 4C076 AA19 AA95 CC06 CC32 CC34 CC35 DD15 DD63F DD70F EE23F
 FF34 FF43
 4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 CA53 DC28 NA05 NA11 NA13 ZB05
 ZB09 ZB33 ZB35 ZB37
 4C085 AA03 BA01 BA02 BA07 BA49 BA51 BB11 CC21 DD62 EE01
 GG01 GG03