

(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 1		テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	A	4 B 02 4
<b>A 61 K 9/127</b> (2006.01)	A 61 K 9/127		4 C 07 6
<b>A 61 K 39/00</b> (2006.01)	A 61 K 39/00	G	4 C 08 4
<b>A 61 K 48/00</b> (2006.01)	A 61 K 48/00		4 C 08 5
<b>A 61 K 38/53</b> (2006.01)	A 61 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)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成23年8月31日 (2011.8.31)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成25年4月23日 (2013.4.23)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/049873	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02012/030901	(72) 発明者	ジアール, アンドリュー アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 62-8097, エメリービル, ピー オー ボックス 8097, ノバルティ ス バクシング 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
(87) 國際公開日	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)		

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りポソーム

## (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のインピ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。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

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

**【請求項 2】**

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

**【請求項 3】**

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

**【請求項 4】**

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

**【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ポソーム。

**【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

をコードする、請求項 5 に記載のリポソーム。

**【請求項 7】**

前記 RNA 分子は、2 個のオーブンリーディングフレームを有し、該 2 個のオーブ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 個のオーブ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 に記載のリポソーム。

**【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ポソーム。

**【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ポソーム。

**【請求項 10】**

前述の請求項のいずれかに記載のリポソームを含む、薬学的組成物。

**【請求項 11】**

リポ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ポソームの平均直径は、60 nm および 180 nm も含めた 60 nm ~ 180 nm 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 に記載のリポ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。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2010 年 8 月 31 日に出願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の分野にある。

10

20

30

40

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ベクターの使用（またはさらには「裸の」ワクチンにおいて、送達ベクターなし）、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。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ップシドの直径約40nmと匹敵する。小さなリポソームと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を中心に被包しているリポソームを提供し、ここで上記リポソームは、60～180nmの範囲の直径を有する。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含有リポ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、上記脂質がリポソーム（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】****(リポソーム)**

本発明は、免疫原コードRNAを中心に被包しているリポソームを利用する。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）。上記リポ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。上記リポソームは、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、上記リポソームのコア中に被包される。リポ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、予め形成されたリポ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含有水性コアをリポ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ポソームの形成は、1960年代にさかのぼり、カチオン性リポソーム形成脂質は、1990年代以来研究してきた。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（D O T A P）、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（D S D M A）、1，2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン（D O D M A）、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（D O T 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（D l i n D M A）、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（D L e n D M A）。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：D P P C、D O P C、D S P C、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（D O P E）、および1，2-ジフィタノイル（d i p h y t a n o y l）-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（D P y P E）。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、R V 0 5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16AおよびC～Kもまた参照のこと）。

10

20

30

40

## 【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、60～180nm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。

## 【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、D S P C（両性イオン性、飽和）、D l i n D M A（カチオン性、不飽和）、および／もしくはD M G（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）。

## 【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D M G（必要に応じて、P E G化される）および／もしくはD S P C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。

## 【0013】

リポソームは、親水性部分がP E G化されている（すなわち、ポリエチレンギ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、P E Gに結合体化され得る。P E G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P E Gが使用され得る（例えば、0.5～8kDa）。

## 【0014】

従って、リポソームは、カチオン性脂質（例えば、D l i n D M A、R V 0 5）、両性

50

イオン性脂質（例えば、D S P C、D P y P E）、コレステロール、およびP E G化脂質から形成され得る。D S P C、D l i n D M A、P E G - D M G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（M L V）；小さな単層小胞（S U V）；および大きな単層小胞（L U V）。M L V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。S U VおよびL U Vは、水性コアを被包する单一の二重層を有する；S U Vは、代表的には、直径 5 0 n mを有し、L U Vは、直径 > 5 0 n mを有する。本発明のリポソームは、理想的には、6 0 ~ 1 8 0 n mの範囲、好ましくは、8 0 ~ 1 6 0 n mの範囲の直径を有するL U V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。

#### 【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8 0 %は、6 0 ~ 1 8 0 n mの範囲、および好ましくは、8 0 ~ 1 6 0 n m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、6 0 ~ 1 8 0 n mの範囲、および好ましくは、8 0 ~ 1 6 0 n mの範囲にある。

#### 【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单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 / R N A複合体は、6 0 0 ~ 8 0 0 n m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/もしくは单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Accusizer<sup>TM</sup>およびN i c o m p<sup>TM</sup>シリーズの機器、またはMalvern Instruments（UK）のZetasizer<sup>TM</sup>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、单一粒子サイズ（リポソーム直径）が想定され、单一指數関数的あてはめが、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。

#### 【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R N A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。

10

20

30

40

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)

本発明のリポソームは、免疫原をコードするRNA分子(sirNAとは異なる)を含む。上記粒子のインビオ投与後、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。

10

【0022】

好みのプラス鎖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(collarinear)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。

20

【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してきた[8])。

30

【0024】

好みの自己複製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。

40

【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み。従って、好みの自己複製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

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ビ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。

20

#### 【0029】

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。

20

#### 【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ア付加反応は、必要時に使用され得る(しかし、上記レプリコンのポリアは、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メ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

## 【0034】

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:m5C(5'-メチルシチジン)、m5U(5'-メチルウリジン)、m6A(N6-メチルアデノシン)、s2U(2'-チオウリジン)、Um(2'-O-メチルウリジン)、m1A(1'-メチルアデノシン);m2A(2'-メチルアデノシン);Am(2'-O-メチルアデノシン);ms2m6A(2'-メチルチオ-N6-メチルアデノシン);i6A(N6-イソペンテニルアデノシン);ms2i6A(2'-メチルチオ-N6イソペンテニルアデノシン);i06A(N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン);ms2i06A(2'-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン);g6A(N6-グリシニルカルバモイルアデノシン);t6A(N6-スレオニルカルバモイルアデノシン);ms2t6A(2'-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン);m6t6A(N6-メチル-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン);hn6A(N6.-ヒドロキシノルバリカルバモイルアデノシン);ms2hn6A(2'-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリカルバモイルアデノシン);Ar(p)(2'-O-リボシリアルアデノシン(ホスフェート));I(イノシン);m11(1'-メチルイノシン);m'Im(1',2'-O-ジメチルイノシン);m3C(3'-メチルシチジン);Cm(2T-O-メチルシチジン);s2C(2'-チオシチジン);ac4C(N4-アセチルシチジン);f5C(5'-ホルミル(fonny1)シチジン);m5Cm(5',2'-O-ジメチルシチジン);ac4Cm(N4アセチル2TOメチルシチジン);k2C(リシジン);m1G(1'-メチルグアノシン);m2G(N2-メチルグアノシン);m7G(7-メチルグアノシン);Gm(2'-O-メチルグアノシン);m22G(N2,N2-ジメチルグアノシン);m2Gm(N2,2'-O-トリメチルグアノシン);Gr(p)(2'-O-リボシリルグアノシン(ホスフェート));yW(ワイプトシン);o2yW(ペルオキシワイプトシン);OHyW(ヒドロキシワイプトシン);imG(ワイオシン);mimG(メチルグアノシン);Q(キューオシン);oQ(エポキシキューオシン);galQ(ガラクトシル(galactosyl)-キューオシン);manQ(マンノシル-キューオシン);preQo(7'-シアノ-7'-デアザグアノシン);preQi(7'-アミノメチル-7'-デアザグアノシン);G\*(アルカエオシン(archaeosine));D(ジヒドロウリジン);m5Um(5',2'-O-ジメチルウリジン);s4U(4'-チオウリジン);m5s2U(5'-メチル-2'-チオウリジン);s2Um(2'-チオ-2'-O-メチルウリジン);acp3U(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロビル)ウリジン);ho5U(5'-ヒドロキシウリジン);mo5U(5'-メトキシウリジン);cmo5U(ウリジン5'-オキシ酢酸);mcmo5U(ウリジン5'-オキシ酢酸メチルエステル);chm5U(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);mcmm5U(5'-メトキシカルボニルメチルウリジン);mcmm5Um(S-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン);mcmm5s2U(5'-メトキシカルボニルメチル-2'-チオウリジン);nm5s2U(5'-アミノメチル-2'-チオウリジン);mnmm5U(5'-メチルアミノメチルウリジン);mnmm5s2U(5'-メチルアミノメチル-2'-チオウリジン);mnmm5se2U(5'-メチルアミノメチル-2'-セレノウリジン);ncm5U(5'-カルバモイルメチルウリジン);ncm5Um(5'-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン);cmnm5U(5'-カルボキシメチルアミノメチルウリジン);cnmm5Um(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);cmnm5s2U(5'-カルボキシメチルアミノメチル-2'-チオウリジン);m62A(N6,N6-ジメチルアデノシン);Tm(2'-O-メチルイノシン);m4C(N4-メチルシチジン);m4Cm(N4,2'-O-ジメチルシチジン);hm5C(5'-ヒドロキシメチ

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、シユードウラシル、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 - ブロモウラシル、5 - ヒドロキシトシン、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 - ブロモシトシン、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、シユ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。  
10  
20  
30  
30

### 【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、リポソームは、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、リポソームは、単一のRNA種を含み、すなわち、上記リポソーム中の全てのRNA分子は、同じ配列および同じ長さを有する。  
40

### 【0037】

リポソーム1つあたりのRNAの量は、変動し得る。リポソーム1つあたりの個々の自己複製RNA分子の数は、代表的には、リポソーム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。上記リポソームの投与後に、上記RNAは、インビオで翻訳され、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

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。

10

## 【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ポソームの最適な直径は、免疫化目的のためのリポ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。

20

## 【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:

30

*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。

40

## 【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】

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リポプロテイン）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。

10

【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。

20

【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。

30

【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(difffusely adhesion)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)および膿膜炎／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]。

40

【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】

## 【化1】

*Staphylococcus epidermidis*

*Clostridium perfringens* もしくは *Clostridium botulinum*s

*Legionella pneumophila*

*Coxiella burnetii*

*Brucella*, 例えば *B.abortus*, *B.canis*, *B.melitensis*, *B.neotomae*, *B.ovis*, *B.suis*, *B.pinnipediae*.

10

*Francisella*, 例えば *F.novicida*, *F.phiomiragia*, *F.tularensis*.

*Neisseria gonorrhoeae*

*Treponema pallidum*

*Haemophilus ducreyi*

*Enterococcus faecalis* もしくは *Enterococcus faecium*

*Staphylococcus saprophyticus*

20

*Yersinia enterocolitica*

*Mycobacterium tuberculosis*

*Rickettsia*

*Listeria monocytogenes*

*Vibrio cholerae*

*Salmonella typhi*

30

*Borrelia burgdorferi*

*Porphyromonas gingivalis*

*Klebsiella*

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M2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、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15もしくはH16）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）、ルプラウイルス（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。

【0058】

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、ヘルパルナウイルス、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、EV71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

【0059】

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。

【0060】

ヘルパルナウイルス：ウイルス免疫原としては、ヘルパルナウイルス（例えば、A型肝炎ウイルス（HAV））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

【0061】

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（ザイールエボラウイルス、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。

【0062】

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。

【0063】

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（TBE）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、ウェ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

【0064】

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（BVDV）、豚コレラ（CSFV）もしくはボーダー病（BDV））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

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（HBsAg）を含み得る。

40

【0066】

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。

【0067】

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（VSV））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

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（ISAV）、サケ臍臓病ウイルス（SPDV）、伝染性臍臓壊死症ウイルス（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 floccosum*,  
*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 quinckeum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoides*, 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 carriionii*, *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 *Brachiolia* 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 beigelii*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffei*, *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

10

20

30

40

50

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ゲン(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ゲンは、Fagales、Oleales、Pinaceaeの分類学上の目およびスズカケノキ科 (platanaeae) (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ゲンは、属DermatophagoïdesおよびEuroglyphusのチリダニ類、コナダニ類(storage mite)(例えば、Leptidoglyphys、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、毒液のアレルゲン(刺咬昆虫(stinging or biting insect)に由来するようなもの、例えば、Hymenopteraの分類学上の目(蜂(Apidae)、スズメバチ(Vespidae)、およびアリ(Formicidae)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-精巣(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)、CIA 0205(例えば、膀胱がんと関連)、HLA-A2-R1701、-カテン(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-abl(例えば、慢性骨髓性白血病と関連)、トリオースホスフェートイソメラーゼ、KIA 0205、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)、プロティナーゼ3(例えば、慢性骨髓性白血病と関連)、WT 1(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、結腸がんと関連)、ならびにがん胎児性抗原(例えば、乳がん、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/Melan A、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: p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタイン・バー・ウイルス抗原、EBNA、ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原(E6およびE7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、

【0083】

【化4】

10

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, ペータ-HCG, BCAL225, 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

(Mac-2結合タンパク質/シクロフィリンC関連タンパク質)、TAAAL6、TAG72、TLR、TPSなど。

【0084】

(薬学的組成物)

本発明のリポソームは、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、上記リポソームに加えて、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29において入手可能である。

【0085】

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、TLR2アゴニスト(例えば、Pam3CSK4)、TLR4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、E6020))、TLR7アゴニスト(例えば、イミキモド)、TLR8アゴニスト(例えば、レシキモド)および/もしくはTLR9アゴニスト(例えば、IC31)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<2000Da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RNAと共にリポ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。

【0086】

本発明の薬学的組成物は、上記リポソームを、ただの水(plain water)(例えば、w.f.i.)もしくは緩衝液(例えば、リン酸緩衝液、Tris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、5~20mM範囲において含まれる。

【0087】

本発明の薬学的組成物は、5.0~9.5(例えば、6.0~8.0)のpHを有し得る。

【0088】

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。 $10 \pm 2 \text{ mg / ml}$  NaClの濃度が代表的である(例えば、約9mg/ml)。

【0089】

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、RNA安定性を延長し得る。従って、組成物は、EDTA、EGTA、BAPTA、ペンテト酸などのうちの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、10~500μM(例えば、0.1m

10

20

30

40

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、200mOsM/kg~400mOsM/kg(例えば、240~360mOsM/kg、もしくは290~310mOsM/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、チオメルサールもしくは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。

10

#### 【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<1EU(エンドトキシンユニット、標準尺度)、および好ましくは、1用量あたり<0.1EU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、0.1~1.0ml(例えば、約0.5ml)の容積を有し得る。

20

#### 【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ポソーム、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、非ヒト靈長類、靈長類など)、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ポソームおよび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、100μg RNA(例えば、10~100μg(例えば、約10μg、25μg、50μg、75μgもしくは100μg))を有するが、発現は、遙かに低いレベル、例えば、1μg/用量、100ng/用量、10ng/用量、1ng/用量などにおいてみられ得る。

30

#### 【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。

40

#### 【0099】

本発明のリポソームは、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、本発明のリポ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オでの使用のものであ

50

る。

【0101】

本発明は、本発明のリポ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ポ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ポ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。上記リポ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、膣、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、0.5ml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。

30

## 【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、先天的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、先天的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、先天的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、先天的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 poly peptide 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 もしくは黑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。

10

20

30

40

50

#### 【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、先天的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)裸のレブリコン、(3)RNase 処理後のレブリコン、(4)リポソームに被包されたレブリコン、(5)RNase 処理後のリポソーム、(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ポソーム、を示す。

【図 2】図 2 は、リポ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) リポソームにおいて 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)裸のレブリコン、(3)リポソームに被包されたレブリコン、(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ポソームを示す。

【図 5】図 5 は、ビリオンパッケージングされたレブリコン (四角) として、裸の RNA (菱形) として、もしくはリポソーム中 (+ = 0.1 μg、× = 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、リポソーム被包 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  $1 \mu\text{g}$  リポソーム被包 RNA を与えられた動物における抗 F IgG 力値を示す。

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

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

【図 10】図 10 は、裸の RNA (丸)、リポソーム被包 RNA (三角および四角)、またはリポプレックス (l i p o p l e x) (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。 10

【図 11】図 11 は、レプリコンを裸の RNA として ( $0.01 \sim 1 \mu\text{g}$ )、リポソーム被包 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 IgG 力値 (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 ( $1 \mu\text{g}$ )、リポソーム被包 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 IgG 力値 (丸) および PRNT 力値 (四角) を示す。ナイーブマウスの力値もまた、示す。実線は、幾何平均を示す。 20

【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、CD8 + CD4 - 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 IgG 力値 (平均  $10\text{ g}_1$  力値  $\pm$  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 隆性コントロール；リポソーム送達 RNA；および「Triangle 4」製品である。 30

【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 力値発現 (相対的) を示す。上記力値は、リポソーム 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。 40

【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。 40

【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。 50

【図16F】図16A～16M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16G】図16A～16M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16H】図16A～16M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

【図16I】図16A～16M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16J】図16A～16M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。 20

【図16K】図16A～16M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16L】図16A～16M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。 30

【図16M】図16A～16M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、試験されたリポソームにおいて2000である。

【図18A】図18A～18E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18B】図18A～18E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18C】図18A～18E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18D】図18A～18E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18E】図18A～18E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レブリコン）

種々のレブリコンは、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

10

20

30

40

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-mVEEV-F-L.RSVFもしくはA317；pT7-mVEEV-SEAPもしくはA306；pSP6-VCR-GFP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、SEAPもしくはGFP）または免疫原（例えば、全長RSV-Fタンパク質）のいずれか）によって置き換えるので、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SP6）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(HDV)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HDV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SP6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(Ambion)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(ATP、CTP、GTPおよびUTP)の各々の7.5 mM(T7 RNAポリメラーゼ)もしくは5 mM(SP6 RNAポリメラーゼ)の存在下で、37°C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、TURBO DNase(Ambion)で消化した。上記レプリコンRNAを、LiCl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、ScriptCap m7Gキャッピングシステム(Epicentre Biotechnologies)を使用して、ユーチュ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(VCE)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、vA317は、VCEによってキャップされたA317レプリコンである）。転写後キャップされたRNAを、LiCl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、OD<sub>260 nm</sub>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

#### 【0124】

（リポソーム被包）

RNAを、参考文献7および38の方法によって作製したリポソーム中に被包した。上記リポソームを、10%DSPC(両性イオン性)、40%DlinDMA(カチオン性)、48%コレステロールおよび2%PEG結合体化DMG(2kDa PEG)から作製した。これら割合は、全リポソーム中の%モルに言及する。30

#### 【0125】

DlinDMA(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。DSPC(1,2-ジアステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)を、Genzymeから購入した。コレステロールを、Sigma-Aldrichから得た。PEG結合体化DMG(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(ポリエチレンリコール),アンモニウム塩]、DOTAP(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DC-chol(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、Avanti Polar Lipidsからであった。40

50

## 【0126】

簡潔には、脂質をエタノール(2ml)中に溶解し、RNAレプリコンを、緩衝液(2ml, 100mM クエン酸ナトリウム, pH 6)中に溶解し、これらを2ml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6mlの緩衝液で希釈し、次いで、濾過した。得られた生成物は、リポソームを含み、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。37mgのD1 in DMA、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。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、755μLの上記ストックを、1.245mL 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。この脂質量を使用して、250μg RNAを有するリポソームを形成した。RNAの2mL 作業溶液をまた、100mM クエン酸緩衝液(pH 6)中の約1μg / μLのストック溶液から調製した。3つの20mL ガラスバイアル(攪拌子有り)を、RNase Away 溶液(Molecular Bioproducts)ですすぎ、使用前に多量のMilli Q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、3cc ルアーロックシリンジに入れた。2mL クエン酸緩衝液(pH 6)を、別の3cc 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; 使用したすべてのFEPチューブは、2mm内径および3mm外径を有した; Index Health Scienceから得た)を使用して、Tミキサー(PEEK<sup>TM</sup> 500μm ID接合部, Index Health Science)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つのチューブに接続した。次いで、すべてのシリンジを、流量7mL / 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、20mL 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4mlを、5cc シリンジに入れ、これを、FEPチューブの1つに接続し、別の5cc シリンジを、等しい長さのFEPチューブに接続し、等量の100mM 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7mL / 分の流量において作動させ、最終の混合物を、20mL 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(リポソーム)から集めた上記混合物を、Mustang Q膜(Pall Corporation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。上記リポソームに関してこの膜を使用する前に、4mLの1M NaOH、4mLの1M NaClおよび10mLの100mM クエン酸緩衝液(pH 6)が、連続してこの膜を通過した。リポソームを、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、リポソームを2mL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。上記FFFシステムおよび中空ファイバー濾過膜を、Spectrum Labs(Rancho Dominguez)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。100kD孔サイズカットオフおよび8cm<sup>2</sup> 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ト実験に関しては、処方物を、1×PBS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ポソームの例示的な電子顕微鏡写真を示す。これらリポソームは、被包された、全長RSV 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141nm(強度で)もしくは78nm(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ポソームRNA標準を使用して、標準曲線を作成した。リポソームを、 $1 \times$  TE緩衝液(キットから)中で、 $10 \times$ もしくは $100 \times$ に希釈し、その後、色素を添加した。別個に、リポソームを、0.5% Triton Xを含む $1 \times$  TE緩衝液中で $10 \times$ もしくは $100 \times$ に希釈し、その後、色素を添加した(上記リポ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 $180 \mu\text{L}$ 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。すべてのリポソーム処方物を、被包されたRNAの量に基づいて、インビボで投与した。

10

【0130】

リポ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、 $3.8 \text{ mAU}$ のRNase A/ $\mu\text{g}$  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、 $12\text{k RPM}$ 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( $400 \text{ ng}$  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 Milleniumマーカーを使用して、上記RNA構築物の分子量を概算した。上記ゲルを、 $90\text{V}$ 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)、これらリポソームがRNaseで処理されても全く変化が認められない(レーン4)。RNase処理リポ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、リポソーム被包RNAは安定である。

20

【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、上記レブ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、 $1 \times$  Phospho-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、 $0.1 \mu\text{g}$ もしくは $1 \mu\text{g}$  RNA用量で $50 \mu\text{l}$ /脚を筋肉内に注射した。同じベクターを、 $1 \mu\text{g}$ において上記リポソームなしで(RNase非含有 $1 \times$  PBS中で)も投与した。ビリオンパッケージングされたレブリコンもまた、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ブリコン(「VRP」と呼ぶ)を、参考文献39の方法によって得た。ここでアルファイルスレブリコンは、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細胞へと共エレクトロポレーション(co-electroporation)することによってパッケージングした。

30

40

50

## 【0132】

図5に示されるように、被包は、 $1 \mu\text{g}$ 用量においてS E A Pレベルを約1/2対数増大させ、6日目において、 $0.1 \mu\text{g}$ 被包用から発現は、 $1 \mu\text{g}$ 非被包用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、V R Pで達成されたものを超えた(四角)。従って、発現は、裸のR N Aコントロールと比較して、 $10 \times$ 低用量においてすら、上記R N Aが上記リポ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V R P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R N Aの送達は、上記裸のR N A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、リポソームでのものより低かった。

10

## 【0133】

上記リポソーム群において認められる効果が、上記リポ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、 $0.1 \mu\text{g}$  R N A)において、または上記リポソーム形成後に混合して(非被包化「リボプレックス(lipoplex)」、 $0.1 \mu\text{g}$  R N A)、または裸のR N A( $1 \mu\text{g}$ )として投与した。図10は、上記リボプレックスが、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。

20

## 【0134】

さらなるS E A P実験から、インビボで明らかな用量応答が示された。発現は、 $1 \text{ng}$ ほどのR N A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、 $0.01 \mu\text{g}$ 被包R N Aは、 $1 \mu\text{g}$ の裸のR N Aに等しいことが示された。R N Aの $0.5 \mu\text{g}$ 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； $0.1 \mu\text{g}$ 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。

30

## 【0136】

さらなる実験では、D l i n D M AをD O T A Pで置換した。D O T A Pリポソームは、裸のレプリコンより良好な発現を与えたが、それらは、D l i n D M Aリポ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】

インビ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、R Sウイルス(R S V)に由来する全長Fタンパク質を発現させた。これを、裸( $1 \mu\text{g}$ )、リポソーム中に被包( $0.1$ もしくは $1 \mu\text{g}$ )、またはビリオン中でパッケージング( $10^6$  I U；「V R P」)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I g G力値を示す。上記リポソームは、明らかに免疫原性を増強する。図8は、2週間後の力値を示す。この時点までに、 $0.1 \mu\text{g}$ の上記被包R N Aと、 $1 \mu\text{g}$ の上記被包R N Aと、上記V R P群との間に統計学的差異はわらなかった。中和力値(60%のブラーク減少として測定、「P R N T 6 0」)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I g G力値およびP R N T力値の両方を示す。

40

## 【0138】

図13は、上記R N Aが堅調なC D 8 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、V R P、 $0.1 \mu\text{g}$ リポソーム被包R N A、もしくは $1 \mu\text{g}$ リポソーム被包R N Aを与えられたマウスにおけるF特異的I g G力値を比較した。2回目の用量の後の種々の時点での力値比(V R P : リポソーム)は、以下のとおりであつ

50

た：

【0140】

【数1】

	2週間	4週間	8週間
0.1μg	2.9	1.0	1.1
1μg	2.3	0.9	0.9

従って、上記リポソーム被包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。

10

【0141】

さらなる実験から、優れたF特異的IgG応答が10μg用量で示され、これは、1μgおよび0.1μg用量についての応答と等しく、0.01μg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ポソームにおいて、もしくはVRP(10<sup>6</sup>I.U.)として、上記レプリコンを与えた動物におけるIgG力値を示す。1μgリポソーム被包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、10μg

リポソーム被包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)。

20

【0142】

さらなる研究から、上記0.1μgのリポソーム被包RNAは、0.1μg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(Electroporation DNA Delivery System, Inovio)によって送達された、上記F抗原をコードする20μgプラスミドDNAより免疫原性であることが確認された。

【0143】

(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。1μg用量において、リポソーム被包は、裸のRNAと比較してF特異的IgG力値を8.3倍増大させ、PRNT力値を9.5倍増大させた。抗体応答の大きさは、5×10<sup>6</sup>I.U.VRPによって誘導されたものに等しかった。裸のRNAおよびリポソーム被包RNAはともに、上記コットンラットをRSVチャレンジ(1×10<sup>5</sup>plaques forming units)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。

30

【0144】

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100μL)：方法(D)によって(ただし150μg 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ポソーム中に処方した、2種の用量(1.0μgおよび0.1μg)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(5μg)(8匹の動物/群)、全長RSV-Fを発現するVRP(1×10<sup>6</sup>I.U., 8匹の動物/群)、もしくはナイープコントロール(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。

40

【0145】

50

21日目および34日目のF特異的血清IgG力価およびRSV血清中和抗体力価は、以下であった：

【0146】

【数2】

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

10

20

30

この研究において評価した4種全てのレブリコン(vA317、vA318、vA142、vA140)は、リポ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VRPによって誘導されるものの、多くとも1/10であった。上記リポソーム/RNAワクチンは、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 μg レブリコンでの上記第2のワクチン接種後のF特異的IgG力価は、0.1 μg レブリコンでの上記第2のワクチン接種後より2~3倍高かった。上記4種のレブリコンは、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RSV-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。

【0147】

コットンラットにおけるさらなる研究は、再び、上記vA317、vA318およびvA142レブリコンを使用した。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21日目に、以下を筋肉内にワクチン接種した(一方の脚に100 μL):方法(D)によって(ただし150 μg RNAバッチサイズで)作製されたRV01リポソーム(P EG-2000を有する)中に被包されたレブリコン(0.1 μgもしくは1 μg)。コントロール群に、アラムをアジュバント添加した上記RSV-Fサブユニットタンパク質ワクチン(5 μg)、もしくは全長RSV-Fを発現するVRP(1×10<sup>6</sup> IU, 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RSV-Fサブユニットタンパク質ワクチン(5 μg)で第3のワクチン接種を行った(56日目)。さらに、ナイープ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56日目に、リポソーム中の1 μg vA317 RNAを両側の筋肉内にワクチン接種(50 μL/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。

40

【0148】

0日目、21日目、35日目、56日目、70日目に、上記追加の群については、加えて、14日目、28日目および42日目に、抗体分析のために血清を集めた。F特異的血清IgG力価(GMT)は、以下のとおりであった:

【0149】

## 【数3】

	21日目	35日目	56日目	70日目
1 μg vA318	260	1027	332	14263
0.1 μg vA318	95	274	144	2017
1 μg vA142	483	1847	1124	11168
0.1 μg vA142	314	871	418	11023
1 μg vA317	841	4032	1452	13852
1×10 <sup>6</sup> VRP (F-完全)	2075	3938	1596	14574
5 μg F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）：

## 【0150】

## 【数4】

20

	21日目	35日目	56日目	70日目
1 μg vA318	58	134	111	6344
0.1 μg vA318	41	102	63	6647
1 μg vA142	77	340	202	5427
0.1 μg vA142	35	65	56	2223
1 μg vA317	19	290	200	4189
1×10 <sup>6</sup> VRP (F-完全)	104	1539	558	2876
5 μg F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：

## 【0151】

## 【数5】

40

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

従って、上記レブリコンは、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 μg レブリコンでの上記第2のワクチン接種後のF特異的IgG力価は、0.1 μg レブリコンでの上記第2のワクチン接種後より1.5～4倍高かった。

## 【0152】

上記第3のワクチン接種（56日目でのタンパク質）は、F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、レブ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回のレブ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。  
10

#### 【0154】

さらなる実験は、ウイルスチャレンジを含む。上記vA368レブリコンは、EV71IRES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）、または同じレブリコンを有するVRP。上記リポソームは、DMGに結合体化された2kDaPEGを含む。コントロール群に、 $5 \mu\text{g}$  アラムアジュvant添加タンパク質を与え、ナイープコントロール群もまた、含めた。  
20

#### 【0155】

全ての群に、最後の免疫化の4週間後に、 $1 \times 10^6$  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
<b>F特異的血清IgG力価 (GMT)</b>				
<b>21日目</b>	370	1017	28988	5
<b>35日目</b>	2636	2002	113843	5
<b>中和力価 (GMT)</b>				
<b>21日目</b>	47	65	336	10
<b>35日目</b>	308	271	5188	10
<b>肺ウイルス負荷 (pfu/g 肺)</b>				
<b>54日目</b>	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。  
40

#### 【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ブリコン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。上記レブリコンを、方法（E）によって（ただし $1.5 \text{mg}$  RNAバッチサイズで）作製したリポソームの中に処

10

20

30

40

50

方した；それらは、40% D1 in DMA、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15μg 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、BRSVとRSV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値を有した場合、それには、力値5を割り当てた。

20

#### 【0161】

図14は、210日間にわたるF特異的IgG力値を示す。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値を与えた。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、力値は、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日目までの力値は、以下のとおりであった：

30

#### 【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

RSV血清中和抗体力値は、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のリポ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、良好な中和抗体力値を有した。さらに、上記RNAワクチンは、F特異的血清IgG力を誘発し、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vant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値をブーストできた。

#### 【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66μgのRNAで誘導されたことは、非常に有望である。

20

#### 【0167】

##### (リポソーム直径の効果)

より小さなリポソームを得るために、上記シリング/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DlinDMA、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グの中に入れた。RNAおよび脂質を含むシリングを、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, (Syrries))を使用して、MitosDropelt接合チップ(Syrries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、シリング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シリングに入れ、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シリングに、等容積の100mMクエン酸緩衝液(pH6)

30

40

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、リポソームを 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 cm<sup>2</sup> 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トロ実験のために、処方物を、 1 × PBS で、必要とされる RNA 浓度へと希釈した。

#### 【 0169 】

上記シリンジ / チューブ法を使用して、 75 µg RNA で調製したリポソームは、 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 を有するリポソームを与えた。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。リポソームを、 1 × PBS で希釈し、その後、測定した。

#### 【 0170 】

上記リポソームを、 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 SEAP 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、小さなリポソームによって、 SEAP 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。

#### 【 0171 】

また、 2 種の異なる方法によって調製したリポソームを、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 力値 (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、力値 < 25 (検出限界) を有した場合、それには力値 5 に割り当てた。データを、各群の幾何平均力値として以下に示す：

#### 【 0172 】

#### 【 数 9 】

10

20

30

処方物	裸	シリンジ / チューブ リポソーム	チップ リポソーム
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ポソームは、 2wp1 および 2wp2 において、約 2 倍高いGMT であった。

#### 【 0173 】

また、異なる直径を有する種々の異なるリポソームを使用して、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 力値を、図 15 においてリポソーム直径に対してプロットする。

#### 【 0174 】

##### ( リポソーム製造法 )

一般に、 8 つの異なる方法を、本発明に従うリポ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 DlinDMA

40

50

、 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 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 μL 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 μg RNA と共にリポソームを形成した。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 μg / μL から調製した。 3 つの 20 mL ガラスバイアル ( 搅拌子有り ) を、 RNase Away 溶液 ( Molecular Bioproducts , San Diego , CA ) ですすぎ、 使用前に多量の Milli Q 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 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、 3cc 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 3cc 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 × 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 ( PEEK™ 500 μm 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、 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 ( 搅拌しながら ) 。上記搅拌子を取り出し、 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、 5cc シリンジに入れ、 これを、 FEP チューブの 1 つに接続し、 別の 5cc 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 ( 搅拌しながら ) 。次に、 第 2 の混合工程 ( リポソーム ) 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。上記リポソームを通過させる前に、 4 mL の 1M NaOH 、 4 mL の 1M 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。リポソームを、 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、 リポソームを 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。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 × PBS で、 必要とされる RNA 濃度へと希釈した。  
 。

#### 【 0176 】

( B ) 振盪後、 上記ストックのうちの 226.7 μL 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、 リポソームが、 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  
 50

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Mustang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Mustang濾過を省略したので、リポソームが、上記20mL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( A )のとおり。

#### 【 0 1 8 1 】

( G )RNAの4mL作業溶液を、100mMクエン酸緩衝液( pH 6 )中の約1<sup>10</sup>  
 $\mu$ g/ $\mu$ 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20mL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RNA作業溶液( 各バイアル中2mL )に使用し、他のものを、( C )のように、上記脂質およびRNA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、RNAおよび脂質を含むシリングを、Mitos Droplet接合チップ( Syrrisから得られるガラス製マイクロ流体( microfluidic )デバイス( 部品番号 3000158 ) )に、PTFEチューブ( 0.03インチ内径 × 1 / 16インチ外径 )を使用して、4ウェイエッジコネクタ( Syrris )を使用して接続した。2つのRNAストリームおよび1つの脂質ストリームを、シリング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( 100  $\mu$ m × 105  $\mu$ m )において行つた。<sup>20</sup> 3つすべてのストリームの流量を、1.5mL/分において維持し、従つて、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、20mLガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した( 搅拌しながら )。上記搅拌子を取り出し、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シリングに入れ、これを、上記PTFEチューブの別の1つにはめた；等しい長さのPTFEチューブ付きの別の5ccシリングに、等容積の100mMクエン酸緩衝液( pH 6 )を入れた。上記2本のシリングを、3mL/分の流量において、シリングポンプを使用して作動させ、最終混合物を、20mLガラスバイアルに集めた( 搅拌しながら )。次に、( D )におけるように、TFFを使用して、リポソームを2mLに濃縮し、10 ~ 15容積の1×PBSに対して透析した。<sup>30</sup>

#### 【 0 1 8 2 】

( H )上記2mL作業脂質ストック溶液を、120.9  $\mu$ Lの上記脂質ストックと1.879mL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20mLバイアルからの上記リポソームを、Pierce Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette( Thermo Scientific, 特に強力, 0.5 ~ 3mL容量 )に入れ、オートクレーブしたプラスチック容器中、400 ~ 500mLの1×PBS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 】

( RSV免疫原性 )

RSV Fタンパク質をコードする上記vA317自己複製レプリコンを、以下のように、0日目および21日目にBALB/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( 50  $\mu$ L / 脚 )によって投与した：上記レプリコン( 1  $\mu$ g )単独、またはDlinDMA( 「 RV01 」 )もしくはDOTAP( 「 RV13 」 )もしくは図16A ~ 16Mに示される脂質( 「 RV05 」 )でリポソームとして処方した上記レプリコン。上記RV01リポソームは、40% DlinDMA、10% DSPC、48%コレステロールおよび2% PEG-DMGを有したが、RNAの量は異なった。上記RV05リポソームは、40% RV05、10% DSPC、48%コレステロールおよび2% PEG-DMG、または60% RV05、38%コレステロールおよび2% PEG-DMGのいずれかを有した。上記RV13リポソームは、40% DOTAP  
<sup>40</sup>  
<sup>50</sup>

P、10% D O P E、48% コレステロールおよび2% P E G - D M G を有した。比較のために、同じ R S V - 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)リポソームと共に(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】

リポソームを、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ポソームに関しては、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】

## 【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)

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力値(GMT)は、以下のとおりであった：

## 【0187】

## 【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

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】

10

20

30

40

【数12】

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$
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

従って、上記リポソーム処方物は、増大した F 特異的 IgG 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。リポ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、リポ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。

【0189】

さらなる RV01 リポソームを、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 μg 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、これらリポソームは、40% DlinDMA、10% DSPC、48% Chol、および 2% PEG - DMG を有した。サイズおよび被包は、以下のとおりであった：

【0190】

【数13】

RV	PEG	Zav (nm)	pdl	RNA	被包 <sup>n</sup>
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	-	-

上記リポソームを、0日目および21日目に、両側の筋肉内注射 (50 μl / 脚) によって BALB/c マウス (10匹 / 群) に投与した。用量は、0.01 μg、0.03 μg、0.1 μg、0.3 μg もしくは 1 μg であった。F 特異的血清 IgG および PRNT<sub>60</sub> 力価 (GMT) 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) :

【0191】

10

20

30

40

【数14】

RV	RNA ( $\mu$ g)	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

## (リポソーム - 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)RSV-F(すなわち、RSVの表面融合糖タンパク質)を発現する「vA317」レブリコン；(ii)GFPを発現する「vA17」レブリコン；および(iii)複製欠損性でありかつGFPをコードする「vA336」。RNAを、裸でもしくは方法(D)によって作製したリポソームと共に、のいずれかで送達した。空のリポソームを、方法(D)によって、ただし、いかなるRNAもなしで作製した。リポソーム処方物は、これらの特徴を有した：

【0192】

30

【数15】

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	-

BALB/cマウス(1群あたり5匹の動物)に、0日目および21日目に、両側の筋肉内ワクチン接種(50 $\mu$ L/脚)を与えた：

群1 裸の自己複製性RSV-F RNA(vA317, 0.1 $\mu$ g)

群2 リポソーム中に被包された自己複製性RSV-F RNA(vA317, 0.1 $\mu$ g)

群3 空のリポソームに添加された自己複製性RSV-F RNA(vA317, 0.1 $\mu$ g)

群4 Fサブユニットタンパク質(5 $\mu$ g)。

【0193】

血清を、14日目、35日目および51日目に、抗体分析のために集めた。F特異的血清IgG力値(GMT)を測定した；個々の動物が力値<25(検出限界)を有した場合

40

50

、それには力値 5 を割り当てた。さらに、51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RSV F51-66ペプチド(CD4+)もしくはRSV FペプチドF85-93およびF249-258(CD8+)に対して特異的である細胞を決定した。

## 【0194】

IgG力値は、10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：

## 【0195】

## 【数16】

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

10

51日目でのRSV血清中和力値は、以下のとおりであった：

## 【0196】

## 【数17】

日数	1	2	3	4
<b>51</b>	35	50	24	38

20

51日にRSV F特異的CD4+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：

## 【0197】

## 【数18】

30

サイトカイン	1	2	3	4
IFN- $\gamma$		0.04		
IL2	0.02	0.06		0.02
IL5				
TNF $\alpha$	0.03	0.05		

51日にRSV F特異的CD8+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

## 【0198】

## 【数19】

サイトカイン	1	2	3	4
IFN- $\gamma$	0.37	0.87		
IL2	0.11	0.40		0.04
IL5				
TNF $\alpha$	0.29	0.79		0.06

従って、上記リポソーム内のRNAの被包は、高い免疫原性に必要である。なぜなら、RNAおよび上記リポ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

## 【0199】

（vA317 RSV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（DlinDMA、RV02、RV04およびRV07）を比較した。全てのリポソームは、2% PEG-DMG 2000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：

## 【0200】

## 【数20】

20

名称	脂質1	他の脂質	Zav 直径 (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
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

BALB/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（50μL/脚）：裸のレプリコン（1μg）もしくは0.1μg 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力値（GMT）は、以下のとおりであった：

## 【0201】

30

40

## 【数21】

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

R V 0 7 に関しては、 D S P C 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 ( R V 0 3 、 R V 0 8 、 R V 0 9 、 R V 1 4 [ 4 2 ] ) を、 同じように試験した :

## 【0203】

## 【数22】

10

20

30

名称	脂質 1	他の脂質	Zav 直径(nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
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

## 【0204】

## 【数23】

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

20

30

リポソームM(DC-コレステロールあり)は、裸のRNA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。

## 【0205】

さらなる脂質(RV01、RV10、RV11、RV15)を、同じように試験した:

## 【0206】

## 【数24】

名称	脂質1	他の脂質	Zav 直径 (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
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

## 【0207】

## 【数25】

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RV10脂質は、pKa 7.86を有し、これは、高すぎてインビボで有用ではないようであった。しかし、有用なpKa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たなかった。

【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 <sup>n</sup>
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% $\alpha$ 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

$\alpha$ GC =  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド

10

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IG力値が増大した。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】

（vA317RSVレブリコンを有する、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レブ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：

40

50

【 0 2 1 2 】

【 数 2 8 】

	カチオン性脂質	他の脂質	Zav (nm)	pdl	被包 %
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

これらリポソームを使用して、BALB/cマウスを前のようにワクチン接種した。F 特異的血清 IgG 力価 (GMT) 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

従って、上記 RV05 リポソームは、裸の RNA よりも免疫原性であったが、RV01 リポ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。全てのリポソームは、F 特異的サイトカイン陽性 T 細胞頻度 (CD4+ および CD8+) 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PEG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 PEG 長を有するリポソーム

10

20

30

40

50

中で投与した。上記リポソームは全て、40% DlinDMA、10% DSPC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PEG化脂質（例えば、図18A～18E）および異なるPEG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 <sup>n</sup>
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

10

20

30

BALB/cマウス（8匹/群）に、0日目および21日目に、裸で（1μg）もしくは被包して（0.1μg）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（50μL/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IgG力価（GMT）は、以下のとおりであった（2回の注射の2週間後（2wp1））：

## 【0219】

## 【数31】

40

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PEG頭部がより免疫原性である傾向を示す。DMG結合体化PEGの長さが、1000Daから3000Daへと増大するにつれて、2wp2 F特異的IgG力価は、7412から15659～22378まで増大する。

50

## 【0220】

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(2000)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(C14ジアルキルを有するH 対 C18ジアルキルを有するI)。PEG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(DMGを有するA 対 コレステロールを有するG)。

## 【0221】

類似の実験を、2kDaのPEGを、2×1kDa基に分割した異なる脂質で行った(図17)。上記vA317レプリコンを再び使用して、BALB/cマウス(8匹/群)に、0日目および21日目に、1μg裸のRNAもしくは0.1μgリポソーム被包RNAを、両側の筋肉内にワクチン接種した(50μL/脚)。上記リポソームは全て、40%カチオン性脂質(DlinDMA)、10%DSPCおよび48%コレステロールを有したが、残り2%は異なり、様々なPEG化脂質を有した(ただし、全て2kDa PEGを有する)。それらを、方法(H)によって作製した。

10

## 【0222】

上記リポソームの物理的特徴は、以下であった:

## 【0223】

## 【数32】

20

名称	PEG化脂質	Zav(nm)	pdl	%被包 <sup>n</sup>
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

30

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%カチオン性脂質(RV05)および2%PEG化脂質(2kDa PEG)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)。上記リポソームを、pH5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:

## 【0224】

## 【数33】

40

名称	PEG化脂質	他の成分	Zav(nm)	pdl	%被包 <sup>n</sup>
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% $\alpha$ GC	103.7	0.107	72.58
H	DMG	10%DPyPE, 48%chol	99.6	0.115	78.34
I	DMG	10%18:3PC, 48%chol	130	0.14	87.92
J	DMG	10%18:2PC, 48%chol	101.1	0.133	76.64
K	DMG	30%18:2PC, 28%chol	134.3	0.158	57.76

$\alpha$ GC= $\alpha$ -ガラクトシルセラミド

BALB/cマウス(8匹/群)に、0日目および21日目に、裸で(1μg)もしくは被包して(0.1μg)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(50μL/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。F特異的血清IgG力価(GMT)は、以下のとおりであった(2回の注射の2週間後)

50

2 w p 1 ) ) :  
 【 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

30

40

このように上記 P E G 頭部を分割すると、インビボでの力価が低下した。P E G 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（d e g r e e o f i n s t a u r a t i o n ））、14 日目に 6 倍、および 35 日目に 7 倍に I g G 力価が増大した。非対称脂質テール（アルキル + コレスチロール）を有するカチオン性脂質に関しては、中性脂質を、D S P C（飽和 C 18 脂質テール）から 18 : 2 もしくは 18 : 3 P C（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 I g G 力価が増大した。D S P C を D P y P E で置換して、同等の結果が認められた。

#### 【 0 2 2 6 】

（ C M V 免疫原性）

D L i n D M A をカチオン性脂質として有する R V 0 1 リポソームを使用して、サイトメガロウイルス（C M V ）糖タンパク質をコードする R N A レブリコンを送達した。「v A 1 6 0 」レブリコンは、全長糖タンパク質 H および L ( g H / g L ) をコードするのに對して、「v A 3 2 2 」レブリコンは、可溶性形態 ( g H s o l / g L ) をコードする。上記 2 種のタンパク質は、單一のレブ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、g H をコードし、一方は g L をコードする）の共投与は、良好な結果を与えたなかった。

#### 【 0 2 2 7 】

B A L B / c マウス（10 匹 / 群）に、0 日目、21 日目および 42 日目に、g H / g L を発現する V R P ( 1 × 1 0 <sup>6</sup> I U ) 、g H s o l / g L を発現する V R P ( 1 × 1 0 <sup>6</sup> I U ) およびコントロールとして P B S を、両側の筋肉内ワクチン接種で与えた ( 5 0 μ L / 腿 ) 。2 つの試験群に、リポソーム ( 4 0 % D L i n D M A 、 1 0 % D S P C 、 4 8 % C h o l 、 2 % P E G - D M G ; 方法 ( D ) を使用して作製（ただし 1 5 0 μ g R N A バッヂサイズで）) 中に処方した 1 μ g の上記 v A 1 6 0 レブリコンもしくは v A 3 2 2 レブリコンを与えた。

#### 【 0 2 2 8 】

上記 v A 1 6 0 リポソームは、Z a v 直径 1 6 8 . 8 n m 、 p d I 0 . 1 4 4 、お

50

および 87.4% 被包を有した。上記 V A 322 リポソームは、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 中和力値(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 リポソーム	gHsol/gL リポソーム
4576	2393	4240	10062

全長もしくは可溶性形態の CMV gH / gL 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、高い力値の中和抗体を誘発した。上記リポソーム被包 RNA によって誘発された平均力値は、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 3wp3 力値 5516 と比較して、3wp3 力値 11457 を与えた。

【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

D D P C	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	20
D E P A	1, 2 - ジエルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D E P C	1, 2 - エルコイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D E P E	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	
D E P G	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 . . . )	
D L O P C	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	30
D L P 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 . . . )	40
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 . . . )	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 - ジパルミトイール - s n - グリセロ - 3 - ホスフェート	10	
D P P C	1 , 2 - ジパルミトイール - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン		
D P P E	1 , 2 - ジパルミトイール - 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 - ジパルミトイール - 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 - ジパルミトイール - 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	
L Y S O P C	P A L M I T I C	1 - パルミトイール - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	30
L Y S O P C	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 - パルミトイール - 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 - パルミトイール , 2 - ミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
P O P C		1 - パルミトイール , 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	40
P O P E		1 - パルミトイール - 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 - パルミトイール , 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 - パルミトイール - s n - グリセロ - 3 - ホスファ  
チジルコリン  
【 0 2 3 5 】

## 【数36】

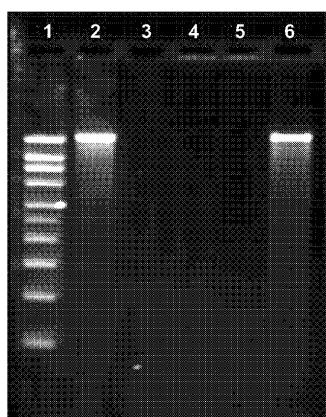
## 参考文献

- [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.* (cds) (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37】

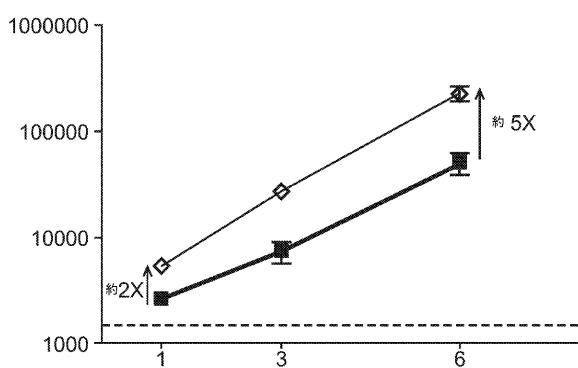
- [40] Boxus *et al.* (2007) *J Virol* 81:6879-89.
- [41] Taylor *et al.* (2005) *Vaccine* 23:1242-50.
- [42] WO2011/076807.
- [43] WO2011/057020.

## 【図1】

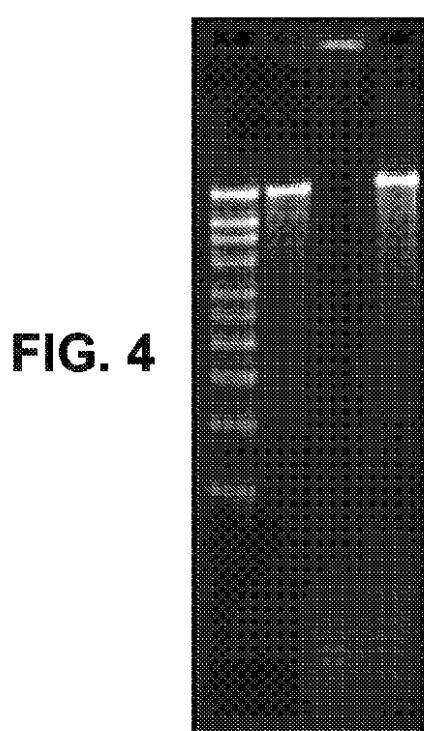


## 【図3】

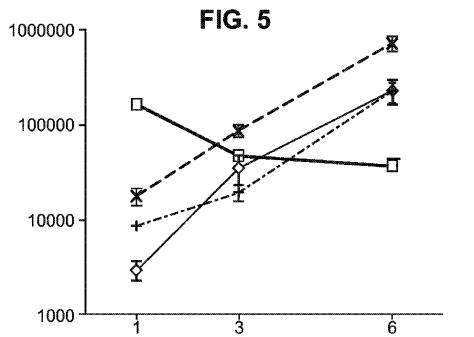
FIG. 3



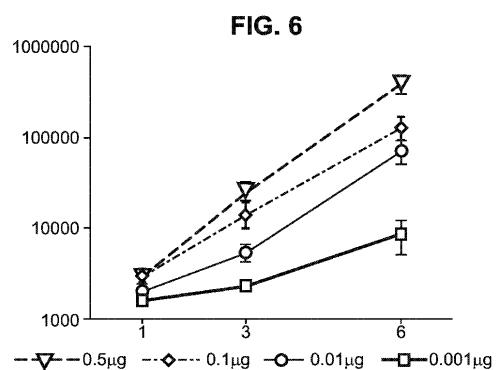
【図4】



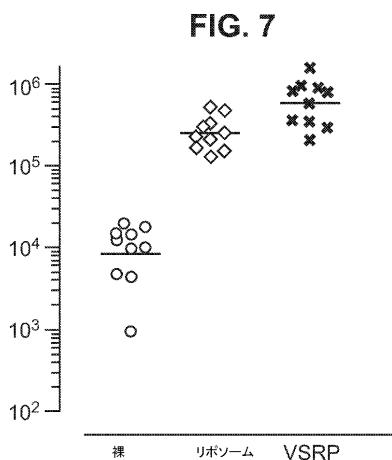
【図5】



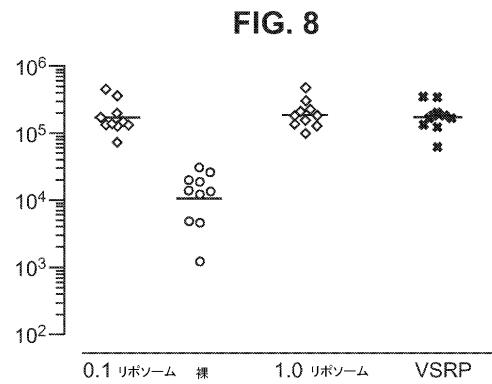
【図6】



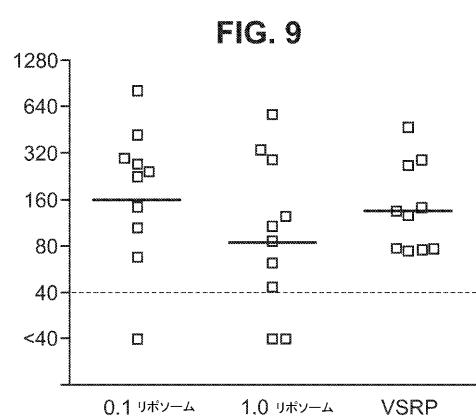
【図7】



【図8】

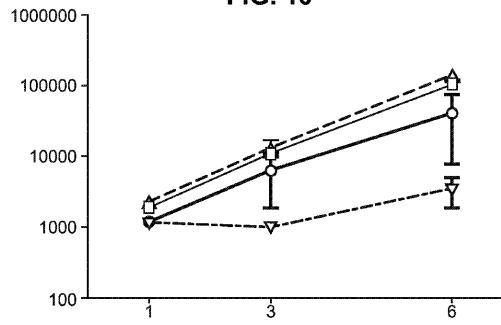


【図9】



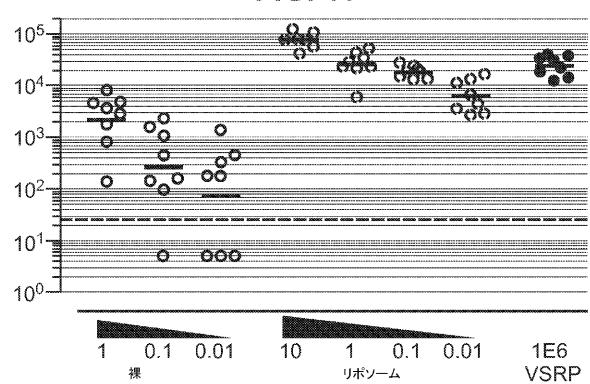
【図 1 0】

FIG. 10



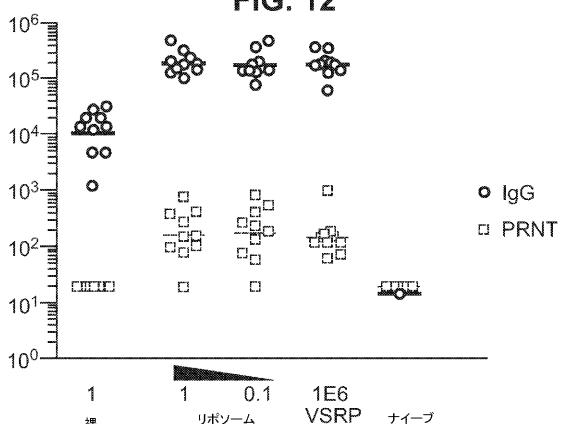
【図 1 1】

FIG. 11



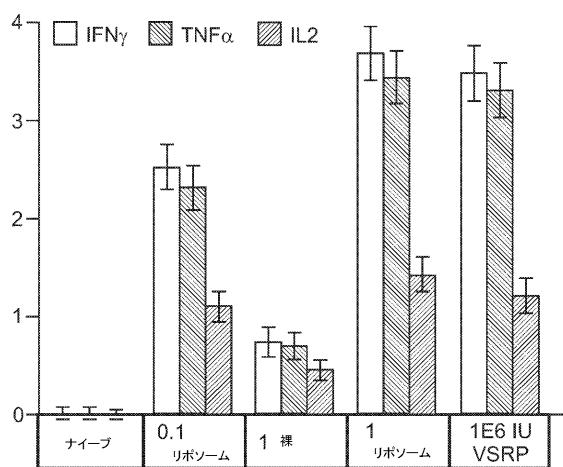
【図 1 2】

FIG. 12

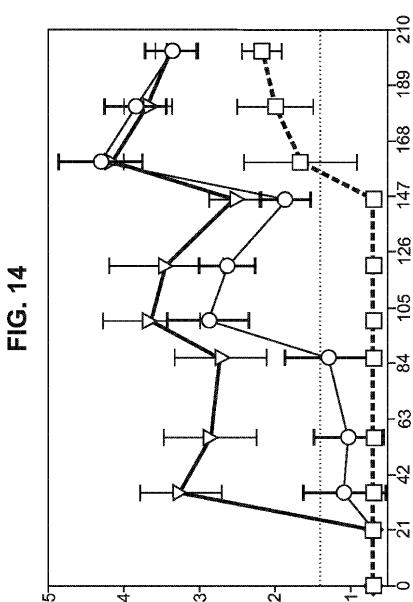


【図 1 3】

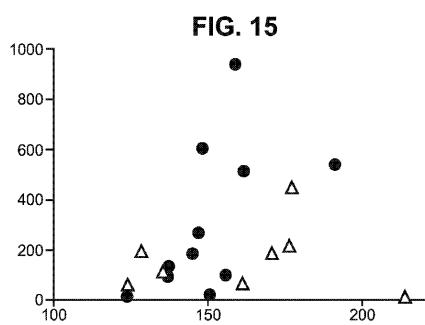
FIG. 13



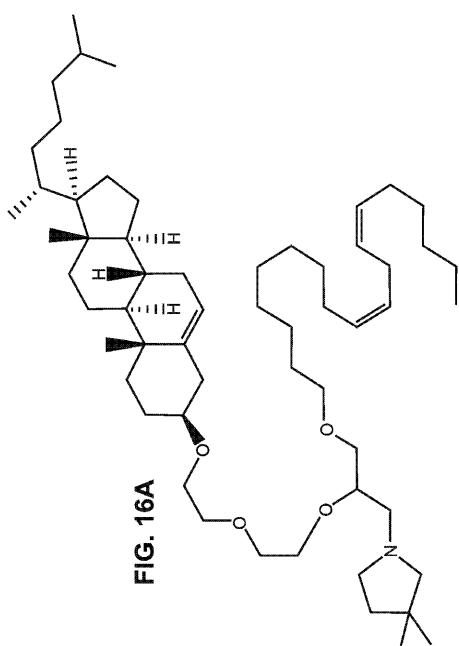
【図 1 4】



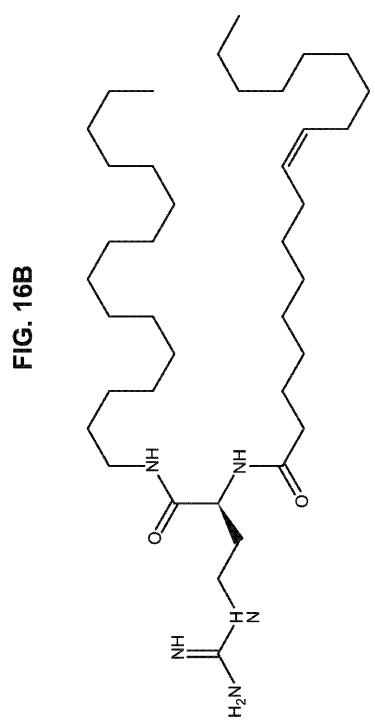
【図 15】



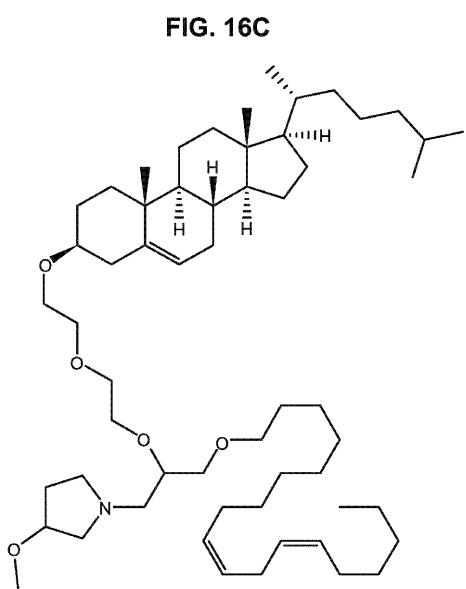
【図 16A】



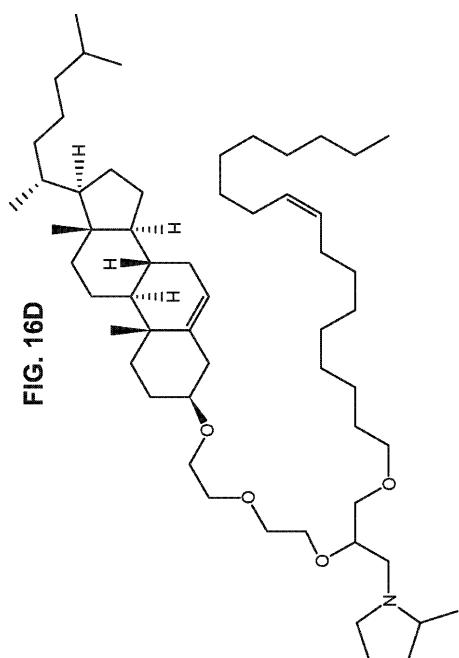
【図 16B】



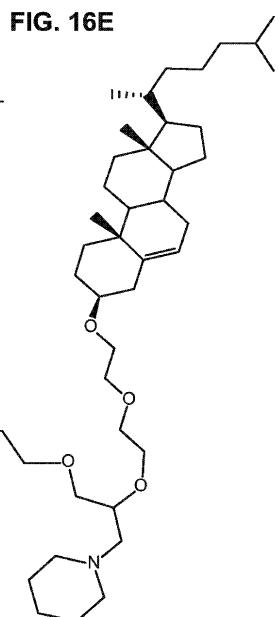
【図 16C】



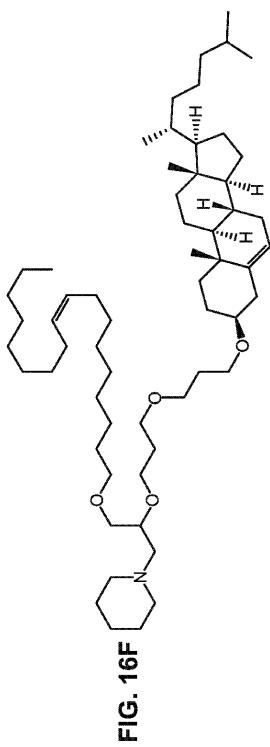
【図 16D】



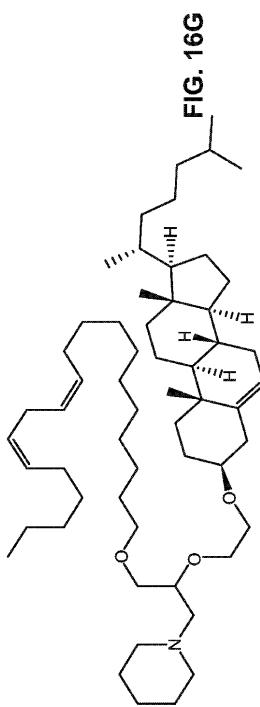
【図 16E】



【図 16F】



【図 16G】



【図 16H】

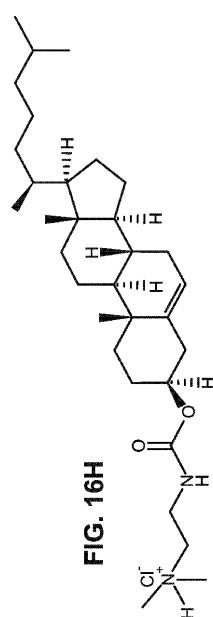


FIG. 16H

【図 16I】

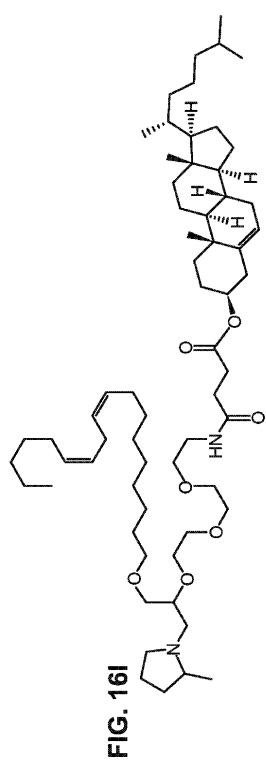


FIG. 16I

【図 16J】

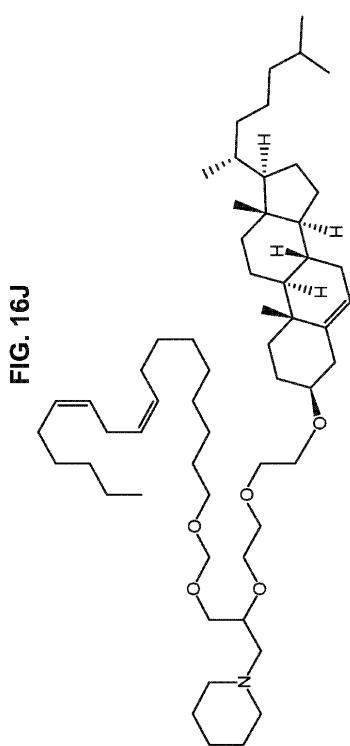


FIG. 16J

【図 16K】

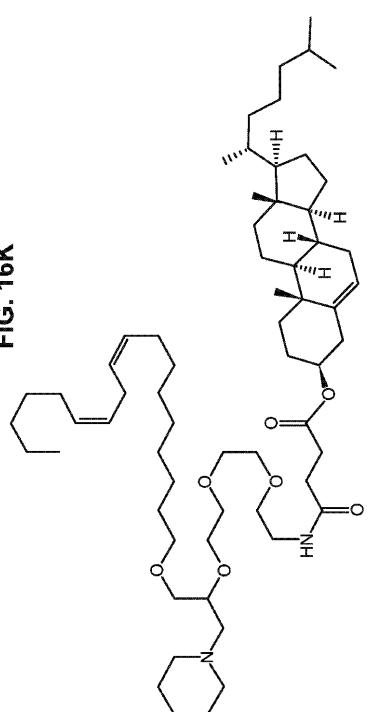
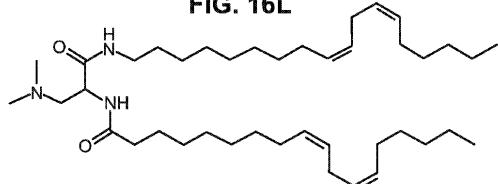


FIG. 16K

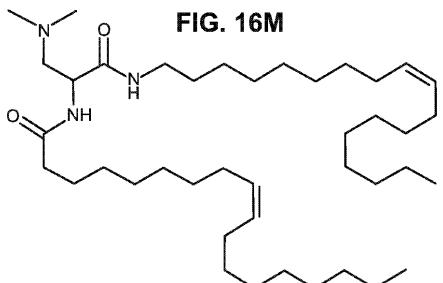
【図 16 L】

FIG. 16L



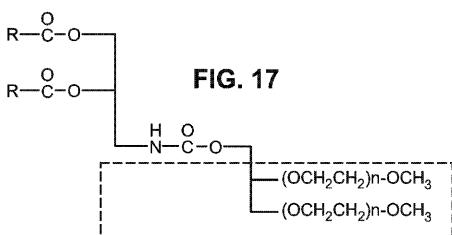
【図 16 M】

FIG. 16M



【図 17】

FIG. 17



【図 18 A】

FIG. 18A

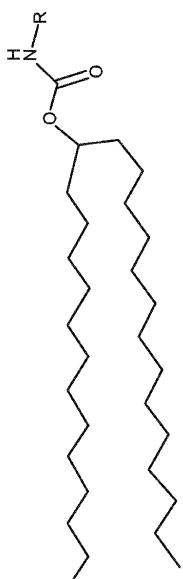


FIG. 18A

【図 18 B】

FIG. 18B

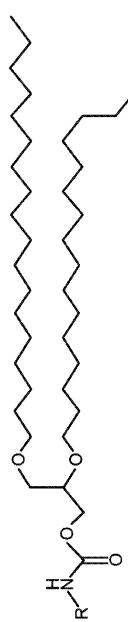


FIG. 18B

【図 18 C】

FIG. 18C

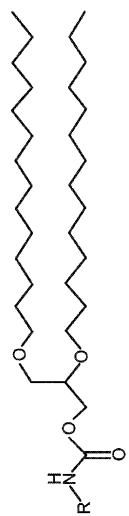


FIG. 18C

【図 18D】

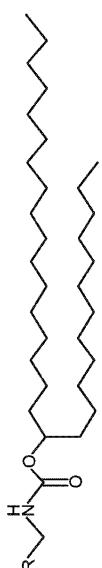


FIG. 18D

【図 18E】

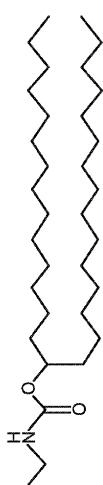
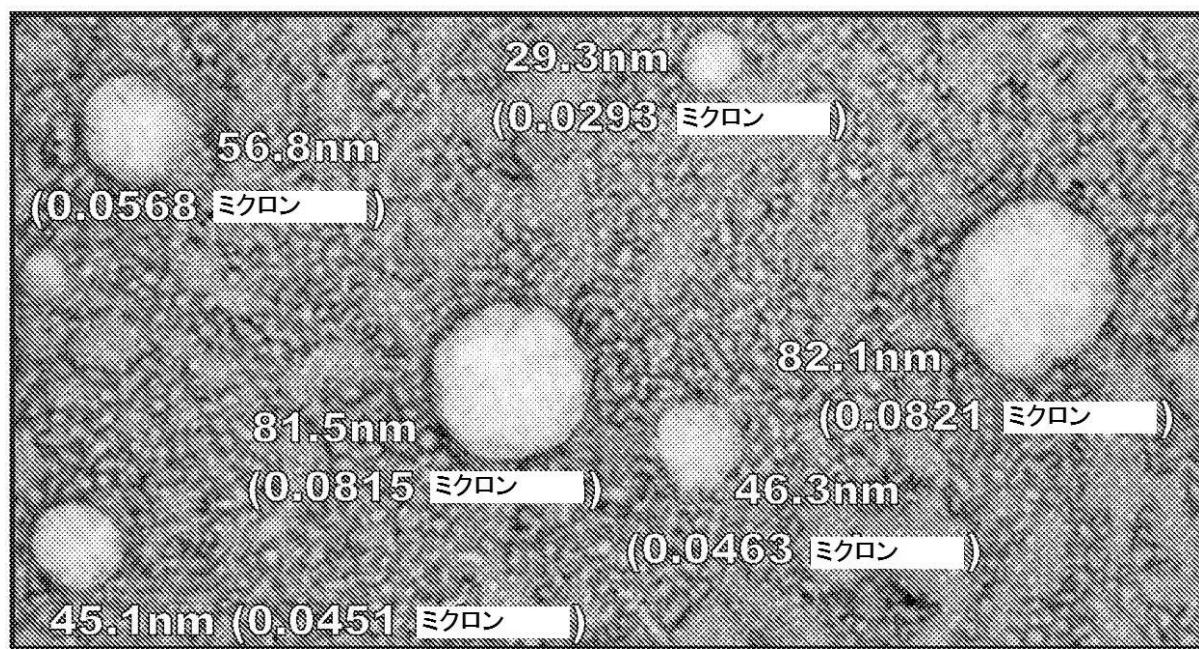


FIG. 18E

【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

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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
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
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,R,S,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,ID,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-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