

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月31日(31.05.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/103151 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/11 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *C07K 17/02* (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01) *C07K 7/08* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 47/62 (2017.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/043528

(22) 国際出願日: 2018年11月27日(27.11.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2017-227192 2017年11月27日(27.11.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

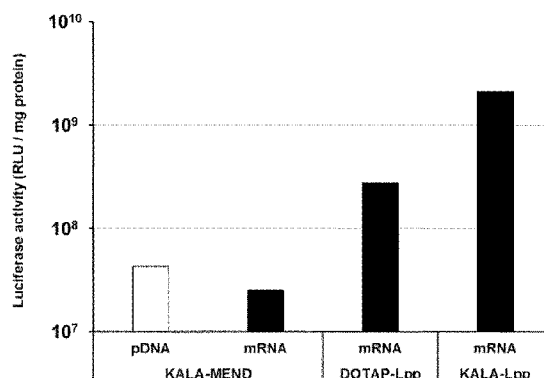
(72) 発明者: 秋田 英万(AKITA Hidetaka); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 三浦 尚也(MIURA Naoya); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学薬学府 Chiba (JP). 館下 菜穂(TATESHITA Naho); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学薬学府 Chiba (JP). 田中 浩揮(TANAKA Hiroki); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人IPアシスト特許事務所(IP-ASSIST PATENT OFFICE); 〒0600002

(54) Title: LIPID MEMBRANE STRUCTURE FOR DELIVERING NUCLEIC ACID TO WITHIN CELL

(54) 発明の名称: 核酸を細胞内に送達するための脂質膜構造体

【図1】



(57) Abstract: [Problem] The purpose of the present invention is to provide a novel intracellular delivery means for delivering a nucleic acid to within a cell and thereby causing a desired function to be exhibited more efficiently, namely, for delivering a nucleic acid to within an antigen-presenting cell and thereby increasing the antigen presentation strength of a transfected cell. [Solution] Provided is a lipid membrane structure that is for delivering a nucleic acid to within a cell, in which a lipid membrane is modified by at least one polypeptide having 12-50 amino acid residues including at least three K-A-L-A repeating units within the peptide chain thereof (wherein K may be R in one or more of the repeating units, and/or the A sandwiched between K and L may be H in one or more of the repeating units), and wherein a nucleic acid is held on the surface of the lipid membrane structure.

北海道札幌市中央区北2条西3丁目1番地
太陽生命札幌ビル7階 Hokkaido (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約: 【課題】 本発明は、核酸を細胞内に送達させて所望の機能をより効率的に発揮させるための、特に抗原提示細胞内に核酸を送達させてトランスフェクションされた細胞の抗原提示強度をより高めるための、新たな細胞内送達手段を提供することを目的とする。 【解決手段】 ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個含む(ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個又は2個以上においてKがRとなってもよく、及び/又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい) アミノ酸残基数が12~50個のポリペプチドの1種以上により脂質膜が修飾された、細胞内に核酸を送達するための脂質膜構造体であって、核酸をその表面に保持した、前記脂質膜構造体を提供される。

明 細 書

発明の名称：核酸を細胞内に送達するための脂質膜構造体

技術分野

[0001] 本発明は、核酸を細胞内に導入するための脂質膜構造体に関する。

背景技術

[0002] 近年、免疫応答を誘導又は増強することで疾患を治療する免疫療法が、がんの治療を中心に注目されている。免疫療法の主な態様において、抗原性物質を生体に投与したり又は分離された免疫細胞に導入したりすることによる、抗原性物質に対する特異的免疫応答を誘導することが求められる。抗原性物質がポリペプチドである場合、ポリペプチドそのものに代えて、ポリペプチドをコードするDNAを利用して所望の免疫応答を誘導することも可能である。このようなDNAは、一般にDNAワクチンと呼ばれる。

[0003] DNAワクチンを用いた免疫療法では、DNAからのポリペプチドの発現効率を高めることが重要である。DNAからmRNAへの転写は細胞核内で行われることから、DNAを細胞核内に効率よく送達するための脂質膜構造体、特にDNAを封入したりリポソームの利用が提唱されている。例えば、特許文献1には、免疫細胞、特に樹状細胞の核内にDNAを送達するための、脂質膜がKALAペプチドと称される特定のペプチドで修飾された、DNAを封入したりリポソームが開示されている。

[0004] KALAペプチドは、K-A-L-A（Kはリジン、Aはアラニン、Lはロイシン）というアミノ酸配列の繰り返し単位を含む短鎖のポリペプチドである。なお本願では、配列表を除き、アミノ酸配列は一文字表記で表す。KALAペプチドは、DNAとコンプレックスを形成することが知られているペプチドである（非特許文献1）が、特許文献1においては、リポソームの核内移行能を促進するための機能性ペプチドとして利用されている。また、特許文献2には、KALAペプチドの核内移行促進機能を維持した改変ペプチドで修飾された、DNAを封入したりリポソームが開示されている。

[0005] 特許文献1及び特許文献2に開示されているリポソームはいずれも、DNAとポリカチオン性物質との複合体を脂質膜で封入したリポソームの形態を例示している。リポソームを用いたトランスフェクションでは、エンドサイトーシスによる細胞内へのリポソームの取り込み、エンドソームから細胞質へのリポソームの脱出、細胞核内へのリポソームの移行と細胞核内での前記複合体の放出、核酸の転写、タンパク質の翻訳、さらに細胞表面への抗原提示等、送達された核酸の機能の発揮までに多数のプロセスが要求される。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開W02011/132713

特許文献2：国際公開W02015/098907

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Wyman, T. B. et al., Biochemistry, 1997, 36, 3008-17

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明者らは、抗原性ポリペプチドをコードするmRNAを抗原提示細胞内に送達し、DNAからmRNAの転写を省略することで免疫応答誘導能を高めることを目的として、mRNAを封入した特許文献1に記載の脂質膜構造体を調製し、これを抗原提示細胞にトランスフェクションした。しかしながら、トランスフェクションされた細胞の抗原提示強度は、比較対象としてDNAを封入した特許文献1に記載の脂質膜構造体によってトランスフェクションされた細胞のそれと殆ど変わらないことが、新たに確認された。

[0009] 本発明は、核酸を細胞内に送達させて所望の機能をより効率的に発揮させるための、特に抗原提示細胞内に核酸を送達させてトランスフェクションされた細胞の抗原提示強度をより高めるための、新たな細胞内送達手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、脂質膜の表面にmRNAを保持した脂質膜構造体を抗原提示細胞にトランスフェクションすることで、DNAを封入した脂質膜構造体を導入したときと比較してトランスフェクション細胞の抗原提示強度を高めることができることを見出し、以下の発明を完成させた。

[0011] (1) ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～50個のポリペプチドの1種以上により脂質膜が修飾された、細胞内に核酸を送達するための脂質膜構造体であって、核酸をその表面に保持した、前記脂質膜構造体。

(2) ポリペプチドが、ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を3又は4個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～30個のポリペプチドである、(1)に記載の脂質膜構造体。

(3) ポリペプチドが下記a)～g)に示されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドである、(1)又は(2)に記載の脂質膜構造体。

a) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA（配列番号1）

b) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA（配列番号2）

c) WEAKLAKALAKALAKHLAKALA（配列番号3）

d) WEAKLAKALAKALAKHLA（配列番号4）

e) KALAKALAKALAKALA（配列番号5）

f) KALAKALAKALA（配列番号6）

g) WEARLARALARALARHLARALARALRA（配列番号7）

(4) 脂質膜構造体がりボソームである、(1)～(3)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。

(5) ポリペプチドが疎水性基で修飾されており、前記疎水性基が脂質膜に

挿入されてなる、(1)～(4)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。

(6) 核酸が核酸アジュバント及び／又は抗原性ポリペプチドをコードするmRNAである、(1)～(5)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。

(7) 脂質アジュバントをさらに含む、(1)～(6)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。

(8) 免疫細胞の細胞質に核酸を送達するための、(1)～(7)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。

(9) 免疫細胞と(1)～(8)のいずれか一項に記載の脂質膜構造体とをインキュベーションする工程を含む、免疫療法に用いるためのトランスフェクションされた免疫細胞をインビトロで製造する方法。

発明の効果

[0012] 本発明によると、KALAペプチド又はそのバリエーションにより修飾された脂質膜構造体を用いて細胞内に核酸を送達することで、核酸に求められる機能を効率的に発揮させることができる。例えば、抗原性ポリペプチドをコードするmRNAを抗原提示細胞内に送達することで、当該抗原提示細胞における抗原提示強度を高めることができ、所望の抗原性ポリペプチドを標的とした免疫療法において利用可能な免疫細胞を製造することができるようになる。また、核酸をその表面に保持したKALAペプチド又はそのバリエーションにより修飾された脂質膜構造体は、脂質膜の内側に核酸を封入した脂質膜構造体と比較して、所望の機能の発揮に必要とされる核酸の使用量を減らすことができ、製造コストの低減及び望ましくない副作用等の回避等において有利である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]ルシフェラーゼをコードするプラスミドDNA (pDNA) 又はmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞におけるルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

[図2]OVAをコードするpDNA又はmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞における抗原提示量を示すグラフである。

[図3]OVAをコードするmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞による抗原特異的CD8⁺T細胞誘導を示すグラフである。

[図4]OVAをコードするmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞によるCTL活性誘導を示すグラフである。

[図5]OVAをコードするmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームの膜融合性を示すグラフである。

[図6]OVAをコードするmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームのmRNA放出を示すグラフである。

[図7]がん抗原NY-ESO-1をコードするmRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞による、腫瘍細胞CT26/NY-ESO-1が皮下移植されたマウスにおける腫瘍増殖の抑制を示すグラフである。

[図8]ルシフェラーゼをコードするmRNAをその表面に保持し、脂質アジュバントであるモノホスホリルリピドA（MPLA）を脂質膜に含むKALAペプチド修飾リポソームでトランスフェクションされた樹状細胞における、ルシフェラーゼ活性及びインターロイキン-6の産生量を示すグラフである。

[図9]異なる量のOVA mRNAをその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームを皮下投与又は静脈投与したときの、CTL活性誘導を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の第1の態様は、ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～50個のポリペプチドの1種以上により脂質膜が修飾された、細胞内に核酸を送達するための脂質膜構造体であって、核酸をその表面に保持した、前記脂質膜構造体に関する。

[0015] 本発明において使用されるポリペプチドは、ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～50個のポリペプチドである。

[0016] 本発明において使用されるポリペプチドは、ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個、例えば3～10個、好ましくは3～7個、より好ましくは3又は4個含む。また、該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上、好ましくは1～3個、より好ましくは1個においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい。また、ポリペプチドのアミノ酸残基数は12～50個、好ましくは12～40個、より好ましくは12～30個である。

[0017] 本発明において使用されるポリペプチドの典型例は、下記 a) ～ g) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

- a) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA（配列番号1）
- b) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA（配列番号2）
- c) WEAKLAKALAKALAKHLAKALA（配列番号3）
- d) WEAKLAKALAKALAKHLA（配列番号4）
- e) KALAKALAKALAKALA（配列番号5）
- f) KALAKALAKALA（配列番号6）
- g) WEARLARALARALARHLARALARALRA（配列番号7）

[0018] a) は、前出の非特許文献1（Wyman, T. B. et al., Biochemistry, 1997, 36, 3008-17；この文献は、その全てが参照により本明細書に組み込まれる）に開示されたKALAペプチドである。KALAペプチドは、pH7.4前後の中性条件下では前記繰り返し単位を1周期とするいわゆる α ヘリックス構造を、またpH5.0前後の弱酸性条件下ではランダムコイル構造をそれぞれ呈することが知られている。KALAペプチドは、前出の特許文献1（国際公開W02011/132713）に開示されるように、脂質膜構造体の表面に配置されることで、脂質膜構造

体の細胞核内への移行能を高める機能を有する。また、複数のLys残基によってペプチド全体が正に荷電しており、負に荷電しているDNAとコンプレックスを形成する機能を有することも知られている（国際公開W02011/132713）。

[0019] b) は、前記KALAペプチドのC末端に3アミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであり、KALAペプチドと同様に、pHに依存して α ヘリックス構造とランダムコイル構造を呈する性質、脂質膜構造体の細胞核内への移行能を高める機能、及び核酸とのコンプレックス形成能を有する。c) はKALAペプチドのC末端のKALKAが欠失したアミノ酸配列からなるペプチド、d) はc) のアミノ酸配列からなるペプチドのC末端からK-A-L-Aの繰り返し単位が1個欠失したアミノ酸配列からなるペプチド、e) 及びf) はK-A-L-Aの繰り返し単位がそれぞれ4又は3個繰り返されたアミノ酸配列からなるペプチド、g) はa) のアミノ酸配列においてKが全てRに置換されたアミノ酸配列からなるペプチドである。c) ～ f) は、前出の特許文献2（国際公開W02015/098907）に開示されているペプチドであり、KALAペプチドと同様の機能を有する。国際公開W02011/132713及びこれに対応する米国出願公開US2013/0122054、並びに国際公開W02015/098907は、その全てが参照により本明細書に組み込まれる。

[0020] 本発明においては、以下のポリペプチドも使用することができる：

前記a) ～ f) に示されるアミノ酸配列においてK-A-L-Aの繰り返し単位のうちのいずれか1個又は2個以上においてKがRとなっているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

前記e) 又はf) に示されるアミノ酸配列においてK-A-L-Aの繰り返し単位のいずれか1個においてKとLに挟まれるAがHとなっているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

前記a) ～ d) に示されるアミノ酸配列においてK-H-L-AがK-A-L-Aとなっているアミノ酸配列からなるポリペプチド；

前記g) に示されるアミノ酸配列においてR-H-L-AがR-A-L-Aとなっているアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0021] 本発明において特に好ましいポリペプチドは、前記 a) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、c) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、e) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び g) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。以下、特に個別に示さない限り、本発明で使用されるポリペプチドを纏めてKALAペプチドバリエーションと表す。

[0022] KALAペプチドバリエーションは、当業者に利用可能な各種の遺伝子組み換え技術を利用し、適当な宿主ベクター系を用いて生物学的に調製することができる。KALAペプチドバリエーションは、固相合成法その他のペプチド合成反応を利用した有機化学的方法又はペプチドシンセサイザー等のペプチド自動合成装置を利用して調製してもよい。

[0023] 本発明において「ポリペプチドの1種以上により脂質膜が修飾された」脂質膜構造体とは、KALAペプチドバリエーションの1種又はそれ以上を脂質膜の表面に有する脂質膜構造体、具体的にはこれらが他の物質と接触可能な状態で脂質膜の表面に、特に脂質膜構造体がりボソームの形態であるときは脂質膜の外表面に存在している脂質膜構造体を意味し、KALAペプチドバリエーションの全てが脂質二重層の層内に埋没している脂質膜構造体、又はKALAペプチドバリエーションの全てが脂質膜で閉鎖された内部空間に存在する、いわゆるポリペプチドが封入された脂質膜構造体とは区別される。ただし、KALAペプチドバリエーションが脂質膜の表面に存在する限り、脂質二重層の内部、脂質膜で閉鎖される脂質膜構造体の内部空間、又はこの内部空間に向けた脂質膜の内側の面にもポリペプチドが存在することは差し支えない。

[0024] KALAペプチドバリエーションは、ステアシル基、コレステシル基その他の任意の疎水性基を有する誘導体、特にポリペプチドのN末端のアミノ基と中鎖以上の鎖長を有する脂肪酸のカルボン酸基との間の脱水反応によって調製される脂肪酸誘導体の形態で使用されることが好ましい。KALAペプチドバリエーションの誘導体は、その疎水性基が脂質膜構造体の脂質膜に埋没することで、ポリペプチド部分が脂質膜の表面に残るようにポリペプチドを脂質膜の表面にア

ンカリングさせることができる。

- [0025] 本発明において使用される核酸は、DNA又はRNAのほか、これらの類似体又は誘導體（例えば、ペプチド核酸（PNA）やホスホロチオエートDNA等）が包含される。核酸は一本鎖又は二本鎖のいずれであってもよく、線状又は環状のいずれであってもよい。また、STING ligandであるcGAMP（AMPとGMPの二量体）等のヌクレオチド化合物であってもよい。核酸の長さは、特に限定されない。
- [0026] 本発明において好ましい核酸は、細胞内、特に細胞質内に送達されることが望まれる核酸であり、例として、dsRNA、cGAMP、CpG ODN、polyIC等の核酸アジュバント、抗原性ポリペプチドをコードするmRNA、及びアンチセンス核酸、siRNA等の阻害性核酸を挙げることができる。2種以上の核酸を同時に脂質膜構造体に保持させることもできる。
- [0027] 第1の態様の脂質膜構造体は、免疫細胞、特に抗原提示細胞の細胞質内に核酸を送達する機能に優れており、この目的で使用される核酸としては、抗原性ポリペプチドをコードするmRNAが好ましく、該mRNAと核酸アジュバントとを組み合わせてもよい。抗原性ポリペプチドは、抗原性を有する任意のポリペプチドを選択することができる。
- [0028] 本発明において「核酸をその表面に保持した」脂質膜構造体とは、核酸を脂質膜の表面に有する脂質膜構造体、具体的には核酸が他の物質と接触可能な状態で脂質膜の表面に存在している脂質膜構造体、特に脂質膜構造体がりポソームの形態であるときは脂質膜の外表面に存在している脂質膜構造体を意味し、核酸が脂質膜で閉鎖された内部空間に存在する、いわゆる核酸が封入された脂質膜構造体とは区別される。ただし、核酸が脂質膜の表面に存在する限り、脂質膜で閉鎖された内部空間にも核酸が存在することは差し支えない。また、核酸は主に脂質膜構造体表面のKALAペプチドバリエーションと静電的に結合して存在するが、目的とする機能を損なわない限り、他の態様により脂質膜の表面に結合していてもよい。
- [0029] 遊離のKALAペプチドバリエーションは核酸と静電的相互作用によりコンプレッ

クスを形成するが、このコンプレックスをそのまま細胞に導入しても、脂質膜を持たないことから突破すべき生体膜との融合が困難であり、結果として細胞質への核酸の送達に不適であると考えられる。実際に遊離のKALAペプチドとpDNAとのコンプレックスを樹状細胞に加えても、細胞質内核酸センサーに認識されずにサイトカイン産生が認められないことが示されている (Miura, N. et al., Nucleic Acids Res., 2015, 43, 1317-31)。これに対し、第1の態様の脂質膜構造体は膜融合性のある脂質を有することから、細胞内に効率的に核酸を送達し、その機能を発揮させることができるものと期待される。

[0030] 第1の態様における脂質膜構造体の形態は特に限定されず、例えばリポソーム、O/W型エマルション、W/O/W型エマルション、球状ミセル、ひも状ミセル、又は不定型の層状構造物等を挙げることができる。脂質膜構造体の好ましい形態はリポソームである。以下、脂質膜構造体をリポソームを例として説明することがあるが、第1の態様の脂質膜構造体はリポソームには限定されない。

[0031] 脂質膜構造体の脂質膜を構成する脂質としては、例えば、リン脂質、糖脂質、ステロール、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸等が挙げられる。

[0032] リン脂質及びリン脂質誘導体としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、1,2-ジミリスチル-1,2-デオキシホスファチジルコリン、プラスマロゲン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸等を挙げることができ、これらは1種又は2種以上を組み合わせる用いることができる。これらリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されないが、例えば、炭素数12~20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂

脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチン等の天然物由来のリン脂質を用いることもできる。

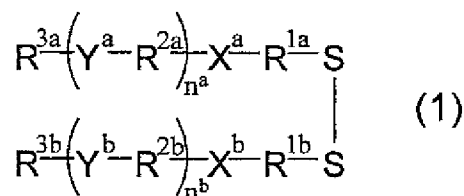
[0033] 糖脂質としては、例えば、グリセロ糖脂質（例えば、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド）、スフィンゴ糖脂質（例えば、ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド）等が挙げられる。

[0034] ステロールとしては、例えば、動物由来のステロール（例えば、コレステロール、コレステロールコハク酸、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール）、植物由来のステロール（フィトステロール）（例えば、スチグマステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール）、微生物由来のステロール（例えば、チモステロール、エルゴステロール）等が挙げられる。

[0035] 飽和又は不飽和の脂肪酸としては、例えば、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸等の炭素数12～20の飽和又は不飽和の脂肪酸が挙げられる。

[0036] 第1の態様の脂質膜構造体では、脂質成分として第3級アミン及びジスルフィド結合を有する脂質を用いることもできる。このような脂質は、例えば国際公開W02013/73480に開示されており、分子内に第3級アミン及びジスルフィド結合を有することによりpH応答性及び還元的環境下における膜不安定化作用を有することが知られている。上記国際公開に開示された下記式(1)で表される脂質は脂質膜構造体の構成脂質として好ましい。

[化1]



（式中、 X^a 及び X^b は独立して、 X^1 又は X^2 であり；

である。上記国際公開及びこれに対応する米国出願公開US2014/0335157の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

[0038] 上記の脂質の使用量は特に限定されないが、一般的には脂質膜構造体を構成する全脂質に対して5~50重量%程度の量とすることができる。また、これらのPalm類については応用例が知られているので (Immunity, 21(4), pp.527-538, 2004; Int. Immunol., 21(4), pp.361-377, 2009; Blood, 115(10), p.p.1958-1968, 2010)、これらの刊行物を参照しつつ適宜のPalm類を目的に応じて選択することができる。

[0039] 第1の態様の脂質膜構造体の脂質膜を構成する特に好ましい脂質としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルセリン (PS)、カルジオリピン (CL) を挙げることができる。また、国際公開W02016/121942、国際公開W02016/027699、国際公開W02013/073480に記載された細胞内環境応答性を示す脂質様材料も挙げることが出来る。それらの混合量は、KALAペプチドバリエーションの添加量、KALAペプチドバリエーションの電荷量、KALAペプチドバリエーションと核酸の電荷比に応じて、核酸と静電的に結合することができる脂質膜構造体を構成し得る範囲で適宜調整することができる。

[0040] 第1の態様の脂質膜構造体は、ステロール、又はグリセリン若しくはその脂肪酸エステル等の膜安定化剤、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、又はブチル化ヒドロキシトルエン等の抗酸化剤、荷電物質、及び膜ポリペプチド等からなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を、脂質膜の構成成分又は脂質膜で封入される成分として有していてもよい。

[0041] 正電荷を付与する荷電物質としては、例えば、ステアリルアミン、オレイルアミン等の飽和又は不飽和脂肪族アミン；ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン等の飽和又は不飽和カチオン性合成脂質；あるいはカチオン性ポリマー等を挙げることができ、負電荷を付与する荷電物質としては、例えば、ジセチルホスフェート、コレステリルヘミスクシネート、ホスファチ

ジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸等を挙げることができる。膜ポリペプチドとしては、例えば、膜表在性ポリペプチド、又は膜内在性ポリペプチド等が挙げられる。これらの物質の配合量は特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。

[0042] また、第1の態様の脂質膜構造体には、例えば、温度変化感受性機能、膜透過機能、遺伝子発現機能、及びpH感受性機能等のいずれか1つ又は2つ以上の機能を付与することができる。これらの機能を適宜付加することにより、例えば遺伝子を含む核酸等を内包する脂質膜構造体の血液中での滞留性を向上させ、肝臓や脾臓等の細網内皮系組織による捕捉率を低下させるとともに、標的細胞におけるエンドサイトーシスの後にエンドソームから効率的に脂質膜構造体を脱出させることが可能になる。

[0043] 温度変化感受性機能を付与することができる温度変化感受性脂質誘導体としては、例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン等を挙げることができる。また、pH感受性機能を付与することができるpH感受性脂質誘導体としては、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン等を挙げることができる。

[0044] 第1の態様の脂質膜構造体は、その血中滞留性を高めることができるグリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトールその他の脂質誘導体又はポリアルキレングリコールその他の親水性ポリマー、エンドソーム脱出能を促進するGALAペプチド、生体適合性を高めるMPCポリマー、対象となる細胞表面の受容体や抗原に対して特異的に結合可能な抗体、連続した複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド、脂質膜の構造破壊を促進するINF7等を、その表面に有していてもよい。

[0045] また、使用目的に応じて、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤等の任意の医薬の有効成分のほか、例えばリピドA、モノホスホリルリピドA (MPLA)、Endocine (Eurocine社)、グルコピラノシル脂質アジュバントといった脂質アジュバントその他のアジュバント、糖類、ペプチド類、低分子化合物、金属化合物等を脂質膜構成成分として、又は脂質膜内に封入される

成分として有していてもよい。本発明において特に好ましい脂質アジュバントはMPLAである。脂質膜構造体における脂質アジュバントの含有量は、総脂質量のおよそ0.0003～3重量%であればよく、好ましくは総脂質量の0.001～1重量%、より好ましくは0.003～0.3重量%である。

[0046] 脂質膜構造体の好ましい形態であるリポソームの製造は、当業者に一般的な任意の方法に基づいて製造することができる。例えば水和法による場合、脂質膜を構成する脂質成分をクロロホルム等の有機溶媒に溶解した溶液を乾燥させて脂質混合物を形成した後、水系溶媒を乾燥した脂質混合物に添加して、ホモジナイズ、超音波処理又は高圧噴射等を行って乳化する等で、水系溶媒を封入したリポソームを調製する。次に、リポソームに前述のKALAペプチドバリエーションの誘導体を添加してインキュベートし、リポソームの表面にKALAペプチドバリエーションの誘導体をアンカリングさせた後、核酸をさらに加えることで、第1の態様の好ましい形態であるリポソームを製造することができる。リポソームは、水和法以外の公知の方法、例えば逆相蒸発法等によって調製してもよい。第1の態様の好ましい形態であるリポソームは、一枚膜リポソーム又は多重膜リポソームのいずれでもよいが、一枚膜リポソームが好ましい。

[0047] また、上記の水和法に基づいた方法において、KALAペプチドバリエーションの誘導体を脂質膜を構成する脂質成分とともにクロロホルム等の有機溶媒に溶解し、KALAペプチドバリエーションの誘導体を含む脂質混合物を形成してから、水系溶媒を添加する等してリポソームを調製し、核酸をさらに加えることで第1の態様の好ましい形態であるリポソームを製造してもよい。

[0048] 第1の態様の脂質膜構造体の製造において、KALAペプチドバリエーションの誘導体の添加量は、脂質膜構造体の総脂質量に対して、1～50モル%、好ましくは5～30モル%であることが好ましい。また、核酸の添加量は特に制限は無いが、脂質膜構造体1重量部に対して、1～20%重量部の範囲で適宜調節すればよい。

[0049] 第1の態様の脂質膜構造体において、その内部に封入される水系溶媒（分

散媒)は、脂質膜構造体を安定に分散させることができるものであれば、その組成は特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液等の緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地等を挙げることができる。これら水系溶媒(分散媒)は、さらに単糖類、二糖類、三糖類、多糖類、糖アルコール、多価アルコール(水溶液)等を含んでいてもよい。また必要に応じて、薬物、タンパク質その他の生理活性物質を含んでいてもよい。

[0050] 第1の態様の好ましい形態であるリポソームは、脂質膜封入体又は製造後のリポソームを高圧下でメンブランフィルターに通してエクストルージョンすることで、その大きさを揃えることもできる。大きさは特に限定されないが、その平均粒子径は50 nm~5 μ m程度、好ましくは50 nmから400 nm程度、より好ましくは50 nmから300 nm程度、さらに好ましくは100 nmから250 nm程度であればよい。

[0051] 第1の態様の好ましい形態であるリポソームとしては、水系溶媒に分散した形態又は水性分散物を凍結乾燥又は噴霧乾燥した形態である一枚膜リポソーム又は多重層リポソーム等を挙げることができる。水性分散物の形態又は乾燥物の形態にあるリポソームは、当業者に一般的な方法によって調製することができる。脂質膜構造体の好ましい形態は、水性分散物の形態又は乾燥物の形態にある一枚膜リポソームである。

[0052] 第1の態様の脂質膜構造体によって核酸を送達する対象となる細胞の種類は特に限定されず、核酸に期待される機能又は送達目的等に応じて、適宜の細胞を標的とすることができる。細胞として、好ましくは免疫細胞を挙げることができ、免疫細胞のなかでもマクロファージ、樹状細胞、B細胞等の抗原提示細胞が特に好ましく、特に樹状細胞が最も好ましい。

[0053] 例えば、第1の態様の脂質膜構造体を用いて、樹状細胞等の抗原提示細胞の細胞質内に抗原性ポリペプチドをコードするmRNAを送達することで、抗原提示細胞はmRNAから翻訳されたポリペプチドを抗原提示細胞の表面に提示し、生体は当該ポリペプチドに対する免疫を獲得することができるので、所望

の抗原性ポリペプチドを標的とした有効な免疫療法を行うことができるようになる。

[0054] 本発明は、免疫細胞と前述の第1の態様である脂質膜構造体とをインキュベーションする工程を含む、免疫療法用のトランスフェクションされた免疫細胞をインビトロで製造する方法を、別の態様として提供する。免疫細胞としては、マクロファージ、樹状細胞、B細胞等の抗原提示細胞が特に好ましく、特に樹状細胞が最も好ましい。

[0055] 例えば、抗原性タンパク質をコードするmRNAを保持した第1の態様の脂質膜構造体と生体から分離した免疫細胞、好ましくは抗原提示細胞とを適当な培地中でインキュベーションすることで、当該抗原性タンパク質に関する抗原提示能を有するトランスフェクションされた抗原提示細胞を製造することができる。さらには、上記脂質膜構造体に代えて、抗原性ポリペプチドをコードするmRNA及び核酸アジュバントの両方を保持した脂質膜構造体又は抗原性ポリペプチドをコードするmRNAを保持した脂質膜構造体と核酸アジュバントを保持した脂質膜構造体との混合物を用いることで、免疫誘導能がさらに高められた抗原提示細胞を製造することもできる。トランスフェクションされた免疫細胞を免疫療法を必要とする対象に投与する場合、免疫細胞は当該対象から採取したものをを用いることが好ましい。

[0056] 本態様により製造されるトランスフェクションされた免疫細胞は、当該抗原性ポリペプチドを標的とした免疫療法を必要とする対象、好ましくはヒト、特にがん患者に対して、当該抗原性タンパク質に特異的な免疫応答を誘導することができ、免疫療法、特にがんの免疫療法において使用することができる。したがって本発明は、免疫細胞と前述の第1の態様である脂質膜構造体とをインキュベーションして免疫細胞をトランスフェクションする工程、及びトランスフェクションされた免疫細胞の有効量を免疫療法を必要とする対象に投与する工程を含む免疫療法もさらなる別の態様として提供するものである。

[0057] また、第1の態様の脂質膜構造体を用いた細胞、好ましくは免疫細胞への

核酸の送達は、生体に脂質膜構造体を直接投与して行うこともできる。本発明は、したがって、第1の態様の脂質膜構造体を有効成分として含む医薬組成物をさらなる態様として提供する。上記態様の医薬組成物において用いられる脂質膜構造体は、前出の国際公開W02011/132713及びW02015/098907に記載された、脂質膜融合体の生体適合性や血中滞留性を向上させる手段を採用することが好ましい。

[0058] 上記態様の医薬組成物は、リポソーム医薬又は製剤として一般に知られている剤形、用法、用量等に準じて利用することができる。例えば、医薬組成物は、注射剤、点滴剤等の非経口製剤の形態で用いられることができ、このような非経口製剤に用いることができる担体としては、例えば、生理食塩水や、ブドウ糖、D-ソルビトール等を含む等張液といった水性担体が挙げられる。

[0059] 上記態様の医薬組成物はさらに、薬学的に許容される緩衝剤、安定剤、保存剤その他の添加剤といった成分を含み得る。薬学的に許容される成分は当業者において周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、例えば第十七改訂日本薬局方その他の規格書に記載された成分から製剤の形態に応じて適宜選択して使用することができる。

[0060] 例えば、抗原性タンパク質をコードするmRNAを保持した第1の態様の脂質膜構造体を有効成分として含む上記態様の医薬組成物は、当該抗原性ポリペプチドを標的とした免疫療法を必要とする対象、好ましくはヒト、特にがん患者に投与されることで、その体内の免疫細胞に対して当該抗原性タンパク質に特異的な免疫応答を誘導することができ、免疫療法、特にがんの免疫療法において好適に使用される。したがって、有効量の上記態様の医薬組成物を、免疫療法を必要とする対象に投与する工程を含む免疫療法も、本発明のさらなる別の態様として提供される。

[0061] 医薬組成物の投与方法は、特に制限されないが、非経口製剤である場合は、例えば血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与等を挙げることができる。好ましい実施形態の一つにおいて、医薬

組成物は、静脈内投与により生体に投与される。

[0062] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。遺伝子導入能評価、免疫誘導能評価等のリポソームの活性評価の方法は、国際公開W02011/132713及びW02015/098907に記載されたものを参照することができる。

実施例

[0063] 実施例 1 リポソームの調製

(1) 核酸をその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソームの調製

2mM DOPE (エタノール溶液) 45 μ L、2mM PA (クロロホルム : エタノール = 1 : 1) 10 μ L及びクロロホルム45 μ Lを試験管内で混合し、DOPE : PA = 9 : 2 (クロロホルム : エタノール = 1 : 1) とした後、真空デシケーターで溶媒を留去して、脂質混合物の薄膜を形成した。

[0064] 200 μ Lの10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) を脂質混合物に添加し、室温で15分静置してから浴槽型ソニケーターで30秒間超音波処理することで、脂質濃度に換算して0.55mM相当のリポソーム懸濁液を調製した。100 μ Lのリポソーム懸濁液と100 μ LのHEPES緩衝液 (pH7.4) を混合し、ボルテックスミキサーで攪拌しながら、8.25 μ Lの1mM STR-KALAペプチド (配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるKALAペプチドのN末端がステアリル化されたもの) を素早く添加して、脂質膜表面にKALAペプチドを配置させた。さらにボルテックスミキサーで攪拌しながら100 μ Lの40 μ g/mLのpDNA又はmRNA溶液を滴下することで、核酸をその表面に保持したKALAペプチド修飾リポソーム (脂質終濃度 : 0.183mM、核酸終濃度 : 0.013mg/mL、核酸脂質比 4 μ g 核酸 / 55 nmol 脂質 ; 以下、pDNA KALA-Lipoplex又はmRNA KALA-Lipoplexと表す) を製造した。

[0065] (2) 核酸を封入したKALAペプチド修飾リポソームの調製

2mM DOPE (エタノール溶液) 42.8 μ L、2mM PA (クロロホルム : エタノール = 1 : 1) 12.2 μ L、クロロホルム 42.8 μ Lを試験管内で混合し、DOPE : PA = 7 : 2 (クロロホルム : エタノール = 1 : 1) とした後、真空デシケーターで溶媒を留去して、脂質混合物の薄膜を形成した。

[0066] 0.12mg/mL 硫酸プロタミン溶液（10mM HEPES緩衝液、pH7.4）100 μ Lを1.5mLチューブへ加え、ボルテックスミキサーで攪拌しながら、0.15mg/mLのpDNA又はmRNA溶液（10mM HEPES緩衝液、pH7.4）100 μ Lをそれぞれ滴下して、プロタミンとpDNAとからなるコア粒子及びプロタミンとmRNAとからなるコア粒子の各懸濁液を調製した。前記脂質混合物に各コア粒子懸濁液200 μ Lを添加し、室温で10分静置してから浴槽型ソニケーターで30秒間超音波処理することで、脂質濃度に換算して0.55mM相当のリポソーム懸濁液を調製した。100 μ Lのリポソーム懸濁液と100 μ LのHEPES緩衝液（pH7.4）とを混合し、ボルテックスミキサーで攪拌しながら、5.5 μ Lの1mM STR-KALAペプチドを素早く添加して脂質膜表面にKALAペプチドを配置させることで、核酸をその内部に封入したKALAペプチド修飾リポソーム（脂質終濃度：0.275mM、核酸終濃度：0.020mg/mL；以下、pDNA KALA-MEND又はmRNA KALA-MEND等と表す）を製造した。

[0067] （3）比較用カチオン性リポソームの調製

4mM DOTAP（エタノール溶液） 13.8 μ L、2mM DOPE（エタノール溶液） 27.5 μ L、クロロホルム 41.3 μ Lを試験管内で混合し、DOTAP：DOPE＝1：1（クロロホルム：エタノール＝1：1）とした後、真空デシケーターで溶媒を留去して、脂質混合物の薄膜を形成した。

[0068] 200 μ Lの10mM HEPES緩衝液（pH7.4）を脂質混合物に添加し、室温で15分静置してから浴槽型ソニケーターで30秒間超音波処理することで、脂質濃度に換算して0.55mM相当のリポソーム懸濁液を調製した。100 μ Lのリポソーム懸濁液と100 μ LのHEPES緩衝液（pH7.4）を混合し、ボルテックスミキサーで攪拌しながら、100 μ Lの40 μ g/mLのmRNA溶液を滴下することで、DOTAPを構成脂質とし、KALAペプチドを有しない比較用カチオン性リポソーム（脂質終濃度：0.183mM、mRNA終濃度：0.013mg/mL；以下、mRNA DOTAP-Lipoplexと表す）を製造した。

[0069] （1）及び（2）においてOVAをコードするmRNA（1239ヌクレオチド、調製方法は実施例3（2）に記載）を核酸として用いて製造したリポソームの粒度分布及びゼータ電位を測定した結果を表1に示す。粒子径、 ζ （ゼータ）

電位及び多分散指数 (Pdl) のいずれについても両リポソーム間に大きな差は認められなかった。

[表1]

	KALA-Lipoplex	KALA-MEND
粒子径	150.9 ± 11.0	157.3 ± 7.3
ζ-電位	30.4 ± 0.9	26.3 ± 0.3
Pdl	0.10 ± 0.03	0.15 ± 0.03

[0070] 実施例2 KALA-Lipoplexの樹状細胞に対する遺伝子導入能評価

(1) マウス骨髓由来樹状細胞の誘導

500mLのRPMI-1640 (Sigma-aldrich) 培地に対し、5mLの1M HEPES (ナカライテスク)、5mLの100mM Sodium Pyruvate (ナカライテスク)、500 μ Lの2-Mercaptoethanol (Gibco)、5mLの10000 μ g/mL Penicillin+10000U/mL Streptomycin (ナカライテスク)、50mLの非働化FCSを添加して完全培地を調製した。頸椎脱臼により安楽死させたC57BL/6Jマウス又はBalb/cマウス (6~8週齢メス) から大腿骨・脛骨を摘出し、70%エタノールで消毒後、滅菌シャーレ内で20mLのPBS (-) に浸した。骨の両端を切断し、26G注射針 (テルモ) を装着した1mLシリンジを用いて、20mLの完全培地を用いて骨髓細胞をシャーレ中に押し出した。細胞懸濁液を40 μ mセルストレイナー (Falcon) を通して、50mLコニカルチューブへ回収し、4℃、500g、5分で遠心した。上清を除き、残った細胞ペレットを1mLのACK Lysing buffer (Lonza) で懸濁し、室温、5分インキュベートすることで、赤血球を破壊した。9mLの完全培地を加え、混合した後、4℃、500g、5分で遠心した。上清を除き、残った細胞ペレットを10mLの完全培地で懸濁し、4℃、500g、5分で遠心した。同様の操作をもう一度行った後、10mLの完全培地で懸濁後、100mm培養ディッシュへ播種し、37℃、5% CO₂下でインキュベートした。4時間以上経過した後、上清でディッシュ底を軽く洗浄することで、非接着細胞を回収した。セルカウントの後、 1.0×10^6 cells/mLとなるように、10ng/mL mGM-CSF (R&D systems) 含有完全培地 (BMDC用完全培地) で懸濁し、24well plateへ1mL/wellとなるように播種した。播種

から2日後及び4日後に細胞の凝集塊を残して浮遊細胞を除去した後、1mLのBMDC用完全培地を各wellに添加した。播種から6日後に、各wellの浮遊細胞および弱接着細胞をピペティングにより回収し、未成熟樹状細胞（Bone Marrow-derived Dendritic Cell、BMDC）として実験に用いた。

[0071] （2）レポーター遺伝子を用いた遺伝子導入能評価

LuciferaseをコードするpDNA（pCpGfree-MCS（invivogen）にLuciferaseをコードするDNA断片を挿入し、Endofree Plasmid Giga Kitを用いて大腸菌より調製した）又はmRNA（T7 promoterの下流にLuciferaseをコードする配列を有するpDNAを、mMESSAGE mMACHINE（商標） T7 ULTRA Transcription Kit（ThermoFischer Scientific）によりin vitro転写する事で調製した（1924ヌクレオチド））を核酸として用いて、実施例1に示した方法により、4種類のリポソームmRNA KALA-Lipoplex、pDNA KALA-MEND、mRNA KALA-MEND、及びmRNA DOTAP-Lipoplexを調製した。

[0072] C57BL/6Jマウス由来のBMDCと上記の各リポソームとを、 4.0×10^5 cellsのBMDC/pDNA又はmRNA量で0.4 μ g相当の各リポソーム/500 μ Lの血清不含BMDC用完全培地となるように1.5mLチューブ内で混合し、これを24 well plateに播種して、3時間インキュベートした。1000 μ LのBMDC用完全培地を各wellに添加して更に3時間インキュベートした後に、上清1000 μ Lを1.5mLチューブに回収し、4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。各wellに残った上清を対応する1.5mLチューブに回収後、wellを1000 μ LのPBS（-）で洗浄し、対応する1.5mLチューブに回収した。wellにはReporter Lysis Buffer（Promega）をDDWで5倍希釈したものを75 μ Lずつ添加した。上清を入れた1.5mLチューブを4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。生じた細胞ペレットを、対応するwell内のLysis buffer 40 μ Lで懸濁し、元のwellに戻した。-80℃で30分以上インキュベートした。室温で融解し、セルスクレイパーで細胞をはがした後、well内のLysis bufferを1.5mLチューブに回収し、4℃、20000g、2分で遠心した。上清を別の1.5mLチューブに分注した。上清20 μ LをLuciferase assay system（Promega）50 μ Lと混合した際の発光量（RLU）をGLOMAX（Promega）により定

量した。上清20 μ L中のタンパク質量 (mg) をTaKaRa BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ) を用いて定量した。得られた発光量 (RLU) をタンパク質量 (mg) で除することで、Luciferase activity (RLU/mg protein) として算出した。

[0073] 図1に示されるように、同量のpDNA又はmRNAを使用した場合において、mRNA KALA- LipoplexでトランスフェクションされたBMDCが最も高いルシフェラーゼ活性を示すことが確認された。

[0074] 実施例3 KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCの抗原提示強度評価

オボアルブミン (OVA) をコードするpDNA (pCpGfree-MCS (invivogen)にOVAをコードするDNA断片を挿入し、Endofree Plasmid Giga Kitを用いて大腸菌より調製した) 又はmRNA (T7 promoterの下流にOVAをコードする配列を有するpDNAを、mMESSAGE mMACHINE (商標) T7 ULTRA Transcription Kit (ThermoFischer Scientific)によりin vitro転写する事で調製した) を核酸として用いて、実施例1に示した方法により、pDNA KALA- Lipoplex、mRNA KALA- Lipoplex、pDNA KALA-MEND、mRNA KALA-MEND、及びmRNA DOTAP-Lipoplexをそれぞれ調製した。また、実施例1(1)においてSTR-KALAを同量のSTR-オクタアルギニン (R8) に代えてmRNA R8- Lipoplexを調製した。

[0075] C57BL/6Jマウス由来のBMDCと上記の各リポソームとを、 2.0×10^6 cellsのBMDC/pDNA又はmRNA量で0.25~1.0 μ g相当の各リポソーム/1000 μ Lの血清不含BMDC用完全培地となるように1.5mLチューブ内で混合し、これを12 well plateに播種して、2時間インキュベートした。1000 μ LのBMDC用完全培地を添加して更に21時間インキュベートした後に、細胞をピペティングにより回収し、4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。1000 μ Lの完全培地で2回細胞を洗浄した。400 μ Lの完全培地で細胞を懸濁後、細胞濃度を測定した。 2.0×10^5 cellsのBMDCと 1.0×10^5 cellsのB3Z細胞 (OVA₂₅₇₋₂₆₄を特異的に認識するT細胞レセプターを発現するT細胞ハイブリドーマ。OVA₂₅₇₋₂₆₄を提示する抗原提示細胞との相互作用により活性化されると β -Galを発現する) を200 μ Lの完全培地中で

混合し、96well plateに播種後、37℃、5%CO₂下で16時間インキュベートした。各wellの上清を1.5mLチューブへ回収し、200μLのPBS (-) で洗浄し、対応する1.5mLチューブに回収した。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。各wellに50μLのCPRG bufferを加えると同時に、1.5mLチューブ中の細胞ペレットを50μLのCPRG bufferで懸濁し、対応するwellに加えた。37℃で4時間インキュベート後、各wellの595nmにおける吸光度を測定した。吸光度が1を超える場合は、CPRG diluentを用いて希釈し測定した。

[0076] 図2に示されるように、同量例えば1.0μgのpDNA又はmRNAを使用した場合において、mRNA KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCが最も高い抗原提示強度を示すこと、1μg相当のpDNA KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCよりも0.25μg相当のmRNA KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCの方が高い抗原提示強度を示すこと、mRNA KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCの抗原提示強度は、mRNAの量に依存して上昇すること等が確認された。

[0077] 実施例4 KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCの免疫誘導能評価

(1) KALA-Lipoplexにより抗原遺伝子を導入されたBMDCの免疫

C57BL/6Jマウス由来のBMDCと実施例3で調製したmRNA KALA-Lipoplex、mRNA KALA-MEND及びmRNA DOTAP-Lipoplexの各リポソームとを、 2.0×10^6 cellsのBMDC/ mRNA量で0.025~2.0μg相当の各リポソーム/1000μLの血清不含BMDC用完全培地となるように1.5mLチューブ内で混合し、これを12well plateへ播種して2時間インキュベートした。1000μLの完全培地を添加して更に4時間インキュベートした後に、細胞をピペティングにより回収し、4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。1000μLのPBS (-) で2回細胞を洗浄した。400μLのPBSで細胞を懸濁後、細胞濃度を測定した。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた後、 125×10^5 cells/mLとなるように細胞をPBS (-) で懸濁し、氷中へ移して、トランスフェクションされた3種のBMDCを用意した。このBMDC又はPBSをC57BL/6Jマウス (6~8週齢メス) の両足裏皮下に20μLずつ投与すること

で免疫処置を行った。1回目の免疫の1週間後に2回目の免疫処置を同様に行った。

[0078] (2) 細胞内IFN γ 染色による抗原特異的CD8⁺T細胞の誘導能評価

2回目の免疫から1週間後に、各マウスより脾臓を摘出し、完全培地中に加えた。脾臓内部の脾臓細胞を完全培地中に出し、ピペティングにより細胞塊をほぐした後、40 μ mセルストレイナーに通して50mLコニカルチューブへ回収した。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。1mLのACK Lysing bufferにより懸濁し、室温、5分インキュベートすることで、赤血球を破壊した。9mLの完全培地を加え、混合した後、4℃、500g、5分で遠心した。上清を除き、残った細胞ペレットを5mLの完全培地で2回洗浄した。5mLの完全培地で懸濁後、細胞濃度を測定した。15 $\times 10^6$ cellsの脾臓細胞を1500 μ Lの1 μ g/mL OVA₂₅₇₋₂₆₄含有完全培地で懸濁し、6well plateに播種した後、37℃、5%CO₂下で1時間インキュベートした。1000 μ Lの2.5 μ L/mL Goldi Plug (BD)、1 μ g/mL OVA₂₅₇₋₂₆₄含有完全培地をwellに加え、ピペティングにより懸濁した。37℃、5%CO₂下で6時間インキュベートすることで脾臓細胞をOVA刺激した。wellからピペティングにより細胞を回収し、5mLの氷冷完全培地で2回洗浄した。5mLの氷冷完全培地に懸濁し、細胞濃度を測定した。

[0079] 1.0 $\times 10^6$ cellsのOVAペプチド処理脾臓細胞を4℃、500g、5分で遠心後、上清を除き、1mLのFACS buffer (2.5% BSA、0.5% NaN₃)で2回洗浄した。50 μ Lの10 μ g/mL anti-mouse CD16/32 antibodyで細胞を懸濁し、4℃、10分インキュベートすることでブロッキングを行った。50 μ LのAPC anti-mouse CD3 (4 μ g/mL)、FITC anti-mouse CD8a (10 μ g/mL)を各細胞に添加し、タッピングにより混和後、4℃、30分インキュベートすることで細胞表面分子の染色を行った。1mLのFACS bufferで2回洗浄した。250 μ LのTF Fix/Perm Buffer (BD)で細胞を懸濁し、ボルテックスミキサーで3秒間攪拌後、4℃、45分インキュベートすることで、膜透過処理及び固定処理を行った。500 μ LのTF Perm/Wash buffer (BD)で2回洗浄した。50 μ Lの1.2 μ g/mL PE anti-mouse IFN γ で細胞を懸濁し、4℃、30分インキュベートすることで、細胞内染色を行った。50

0 μ LのTF Perm/Wash buffer (BD) で2回洗浄し、500 μ LのFACS bufferで懸濁し、フローサイトメーターにより解析し、CD3⁺CD8⁺細胞におけるインターフェロン γ (IFN γ) 産生細胞の割合を測定した。

[0080] 図3に示されるように、mRNA KALA-Lipoplexを投与したマウスにおいて、最も効率的に抗原特異的CD8⁺T細胞が誘導されることが確認された。

[0081] (3) in vivo CTLアッセイによる抗原特異的細胞傷害性活性評価

上記(1)と同様にC57BL/6Jマウスに3種類のBMDCのいずれかを1回免疫し、免疫から1週間後に以下の方法で調製した標的細胞を投与した。まずC57BL/6Jマウスより脾臓を摘出し、完全培地中に加えた。脾臓内部の脾臓細胞を完全培地中に出し、ピペティングにより細胞塊をほぐした後、40 μ mセルストレイナーを通して50mLコニカルチューブへ回収した。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。脾臓1つあたり1mLのACK Lysing bufferにより懸濁し、室温、5分インキュベートすることで、赤血球を破壊した。5倍量の完全培地を加え、混合した後、4℃、500g、5分で遠心した。上清を除き、残った細胞ペレットを10mLの完全培地で洗浄した。30mLの完全培地で懸濁後、細胞濃度を測定した。40 μ mのセルストレイナーを通して脾臓細胞を2群に分けた(ペプチド処理群、及び非処理群)。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除き、 1.0×10^7 cells/mLとなるように完全培地で懸濁した。ペプチド処理群に、2mM OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドを培地量の1/400量を添加し素早く懸濁した。ペプチド処理群、及び非処理群を37℃、5%CO₂下で1時間インキュベートした。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除き、10mLの完全培地で2回洗浄した。10mLのPBS (-) で洗浄した。 3.0×10^7 cells/mLとなるように、ペプチド処理群を1 μ M CFSE/PBSで、非処理群を0.1 μ M CFSE/PBSで懸濁し、遮光しながら37℃の水浴で10分間インキュベートした。10mLの完全培地を添加し、4℃、500g、5分で遠心後、上清を除去後、10mLの完全培地、及び10mLのPBS (-) で洗浄した。10mLのPBS (-) で細胞を懸濁し、細胞濃度を測定した。 5.0×10^7 cells/mLとなるようにPBS (-) で懸濁し、ペプチド処理群と非処理群を100 μ Lずつ混合したものを標的細胞として、免疫マウスの尾静脈より投与した。

[0082] 標的細胞投与の20時間後、マウスより脾臓を摘出し、完全培地中に加えた。脾臓内部の脾臓細胞を完全培地中に出し、ピペティングにより細胞塊をほぐした後、ナイロンメッシュを通して1.5mLチューブへ回収した。4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。1mLのACK Lysing bufferにより懸濁し、室温、5分インキュベートすることで、赤血球を破壊した。9mLのFACS bufferで希釈し、4℃、500g、5分で遠心後、上清を除いた。5mLのFACS bufferで細胞を洗浄後、5mLのFACS bufferで細胞を懸濁した。フローサイトメーターを用いて、ペプチド処理群と非処理群の比から、CTL活性を算出した。

[0083] 図4に示されるように、いずれのリポソームでトランスフェクションされたBMDCも、mRNAの量に依存した抗原特異的CTL活性を示した。特にmRNA KALA-LipoplexでトランスフェクションされたBMDCは、mRNA KALA-MENDに封入されたmRNA量の1/10以下の量でも、生体において抗原特異的な細胞傷害活性を誘導することができることが確認された。

[0084] 実施例5 KALA-Lipoplexの膜融合性評価

ICRマウス（4～6週齢オス）よりヘパリン存在下で採取した血液を、氷冷生理食塩水と混合して10mLとした。4℃、400g、10分で遠心後、上清を除いた。同様の操作を3回繰り返し、赤血球懸濁液とした。Triton-X100/PBS（Triton-X100終濃度:0.02%（w/v））と適当量の赤血球懸濁液を混合して250 μ Lとし、ボルテックスミキサーで攪拌後、200 μ Lを96well plateへ加え、540nmにおける吸光度を測定した。540nmにおける吸光度が1.0となる赤血球懸濁液量を算出した。その量の赤血球懸濁液と、実施例3で調製したmRNA KALA-Lipoplex、mRNA KALA-MEND、mRNA DOTAP-Lipoplex、及びmRNA R8-Lipoplex（脂質換算終濃度:2.5、5.0、10 μ M）、及び20mM リンゴ酸/PBS（pH5.5、6.5、7.4）を混合し、250 μ Lとした。37℃、1600rpmの条件で30分間攪拌しながらインキュベートした。4℃、400g、5分で遠心後、200 μ Lの上清を透明96well plateへ加え、540nmの吸光度を測定した。0.02%（w/v）Triton-X100中での吸光度を100%Lysis時の値として、緩衝液中での吸光度を0%Lysisの値として、それぞれのリポソームの溶血活性（%Lysis）を算出した。

[0085] 図5に示されるように、いずれのリポソームもpH5.5において溶血活性を示した一方、pH6.5及びpH7.4では溶血はあまり認められなかった。なかでもmRNA KALA-Lipoplexは特に高い溶血活性を示していたことから、酸性条件であるエンドライソソームにおいてmRNA KALA-Lipoplexはその高い生体膜融合能により脱出効率に優れる可能性が示唆された。

[0086] 実施例6 KALA-LipoplexのmRNA放出能評価

0.1 μ g mRNAに相当する量の実施例3で調製したmRNA KALA-Lipoplex、mRNA KALA-MEND若しくはmRNA DOTAP-Lipoplex、又は0.1 μ gのOVA mRNAを含む懸濁液10 μ Lを、0.031~10mg/mL Poly- (α , β) -DL-aspartic acid sodium salt mol wt 2,000-11,000 (Sigma) 8 μ L、1.45M NaCl 2 μ Lと混合し、37℃、30分間インキュベートした。6×Loading dye (T0Y0B0) 4 μ Lを混合し、10,000倍希釈Gel Red (Biotium) 含有1%アガロースゲルに全量をアプライした。4℃で2時間電気泳動し、Gel Doc EZ (Bio-rad) により撮影し、各リポソームからのmRNA放出量を比較した。

[0087] 図6に示されるように、mRNA KALA-Lipoplexは、mRNA KALA-MEND又はmRNA DOTAP-Lipoplexと比較してmRNAを効率的に放出することが確認された。

[0088] 実施例7 NY-ESO-1をコードするmRNAを表面に有するKALA-Lipoplexの抗腫瘍効果

(1) NY-ESO-1 mRNA搭載KALA-Lipoplexの調製

T7 promoterの下流にがん抗原NY-ESO-1をコードするcDNA (配列番号8) を有するpDNAを元に、mMESSAGE mMACHINE (商標) T7 ULTRA Transcription Kit (ThermoFischer Scientific) によりin vitro転写することで調製したmRNA (UTRを含む814ヌクレオチド、NYESO1 mRNAと表す) を核酸として用いて、実施例1 (1) に示した方法により、NYESO1 mRNAを表面に保持したKALA-Lipoplex (NYESO1 mRNA KALA-Lipoplex; 脂質終濃度: 0.183mM、核酸終濃度: 0.013mg/mL、核酸脂質比 4 μ g 核酸/55nmol 脂質) を作製した。

[0089] (2) アジュバントを含むKALA-Lipoplexの調製

CpG ODN 0.06 μ g: NYESO1 mRNA 3.94 μ g (CpG ODN/mRNA =1/64)、pDNA .

(pCpGfree-NewMCS) 12 μ g : NYESO1 mRNA 3.88 μ g (pDNA/mRNA = 1/32)、及びtpRNA 2.00 μ g : NYESO1 mRNA 2.00 μ g (tpRNA/mRNA = 1/1) の各混合物を核酸として用いて、実施例 1 (1) に示した方法により、NYESO1 mRNAと各核酸アジュバントとを表面に保持したKALA-Lipoplex (mRNA+CpG-ODN、mRNA+pDNA、mRNA+tpRNA、脂質終濃度 : 0.183mM、核酸終濃度 : 0.013mg/mL、核酸脂質比 4 μ g 核酸/55nmol 脂質) を作製した。

[0090] さらに、NYESO1 mRNAと、2mM DOPE (エタノール溶液) 45 μ L、2mM PA (クロロホルム : エタノール=1 : 1) 10 μ L、0.09 mg/mL MPLA (クロロホルム : メタノール=75 : 25) をクロロホルムで16倍希釈した0.0056 mg/mL MPLA 6.25 μ L及びクロロホルム45 μ Lを試験管内で混合して調製される脂質混合物の薄膜とを用いて、実施例 1 (1) と同様の操作を行い、NYESO1 mRNAを表面に保持し、脂質膜にMPLAを含むKALAペプチド修飾リポソーム (NYESO1/MPLA KALA-Lipoplex ; 脂質終濃度 : 0.183 mM、核酸終濃度 : 0.01 mg/mL、核酸脂質比 3 μ g 核酸/55nmol 脂質) を製造した。

[0091] NYESO1 mRNA KALA-Lipoplex、mRNA+CpG-ODN、mRNA+pDNA、mRNA+tpRNA及びNYESO1/MPLA KALA-Lipoplexの粒子径、 ζ 電位及び多分散指数 (Pdl) を表 2 に示す。

[表2]

	粒子径 (d.nm)	ζ -電位(mV)	多分散指数Pdl
NYESO1 mRNA KALA-Lipoplex	153$\pm$15	31.4$\pm$3.0	0.12$\pm$0.02
mRNA + CpG-ODN	149$\pm$9	34.5$\pm$3.0	0.10$\pm$0.02
mRNA + pDNA	148$\pm$13	33.5$\pm$2.7	0.11$\pm$0.02
mRNA + tpRNA	158$\pm$15	34.1$\pm$3.1	0.10$\pm$0.03
NYESO1/MPLA KALA-Lipoplex	122$\pm$8	31.2$\pm$3.2	0.11$\pm$0.02

[0092] (3) NYESO1 mRNAを表面に保持したKALA-Lipoplexの抗腫瘍効果

実施例 2 (1) で誘導したBalb/cマウス由来の未成熟樹状細胞 (BMDC) と上記 (1) で製造したKALA-Lipoplexとを用いて、実施例 4 の (1) と同様の操作を行い、NYESO1 mRNA KALA-Lipoplex 及びNYESO1/MPLA KALA-Lipoplexで

トランスフェクションされたBMDCをそれぞれ作製した。

[0093] 6～8週齢のBalb/cマウス (n=5) にNY-ES0-1を発現しているCT26腫瘍細胞 (1.0×10^6 cells) を皮下移植し (0日)、7日目に腫瘍サイズを測定した。7日目と14日目に上記BMDC (各 1.0×10^6 cells、mRNA量 $1.0 \mu\text{g}$) をそれぞれ足裏皮下に投与して免疫処置を行い、30日目まで腫瘍サイズを経時的に測定した。結果を図7に示す。

[0094] BMDCに代えてPBSを足裏皮下に投与したコントロールマウス群 (図7のPBS) と比較して、NYES01 mRNA KALA-Lipoplex 又はNYES01/MPLA KALA-Lipoplex でトランスフェクションされたBMDCを投与した群 (図7のmRNA及びmRNA/MPLA) では移植腫瘍の増殖が抑制されることが、特にNYES01/MPLA KALA-Lipoplex でトランスフェクションされたBMDCを投与した群では腫瘍の増殖が強く抑制されることが確認された。

[0095] (4) MPLAによるアジュバント効果の確認

本実施例7 (1) の操作に準じて、NYES01 mRNAに代えて同量のLuciferase mRNAを表面に保持し、さらに脂質膜に含まれるMPLAの含有量を0、 $0.0015 \mu\text{g}$ 、 $0.0059 \mu\text{g}$ 、 $0.023 \mu\text{g}$ 又は $0.094 \mu\text{g}$ にそれぞれ調節したKALA-Lipoplex (Luc/MPLA KALA Lipoplex) を製造した。実施例2 (1) で誘導したBalb/cマウス由来の未成熟樹状細胞 (BMDC) とLuc/MPLA KALA Lipoplexとを用いて、実施例2 (2) と同様の操作を行って、トランスフェクションしたBMDCにおけるLuciferase activityを測定した。また、BMDCのinterleukin-6 (IL-6) 産生量を、Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D systems) を用いて測定した。結果を図8に示す。

[0096] 脂質膜中のMPLA含有量を増加させてもLuciferase activityの変化は殆ど見られなかった一方、IL-6産生量はMPLA含有量と共に増加することが確認された。

[0097] 実施例8 OVA mRNAを表面に保持したKALA-Lipoplexの抗原特異的細胞傷害性活性評価

実施例3に示される操作に準じて、OVA mRNAを表面に保持したmRNA KALA-

LipoplexのmRNA含有量を $8\mu\text{g}/55\text{ nmol}$ 脂質、 $10\mu\text{g}/55\text{ nmol}$ 脂質又は $12\mu\text{g}/55\text{ nmol}$ 脂質としたOVA mRNAを表面に保持したKALA-Lipoplex (OVA mRNA KALA-Lipoplex 8~12、脂質終濃度： 0.183 mM 、核酸終濃度： 0.013mg/mL 、 0.017mg/mL 、 0.020mg/mL))を製造した。OVA mRNA KALA-Lipoplex 8~12の粒子径、 ζ 電位及び多分散指数 (Pdl) を表3に示す。

[表3]

	粒子径 (d.nm)	ζ -電位(mV)	多分散指数Pdl
OVA mRNA KALA-Lipoplex 8	180.0	-23.9	0.25
OVA mRNA KALA-Lipoplex 10	150.1	-33.2	0.13
OVA mRNA KALA-Lipoplex 12	139.9	-35.0	0.15

[0098] 実施例4 (3) のin vivo CTLアッセイにおいてBMDCの代わりにOVA mRNA KALA-Lipoplex 8~12を静脈内投与 (iv、投与量 $1\mu\text{g mRNA}/\text{匹}$) 又は皮下投与 (sc、投与量 $2\mu\text{g mRNA}/\text{匹}$) したときの抗原特異的細胞傷害性活性 (CTL activity) を測定した。結果を図9に示す。

[0099] PBSを投与したコントロール群のCTL activityは10%未満であるのに対して、OVA mRNA KALA-Lipoplex 8~12を投与した群ではいずれもCTL activityの上昇が確認され、特にOVA mRNA KALA-Lipoplex 8を静脈投与した群においてCTL activityの顕著な上昇が確認された。

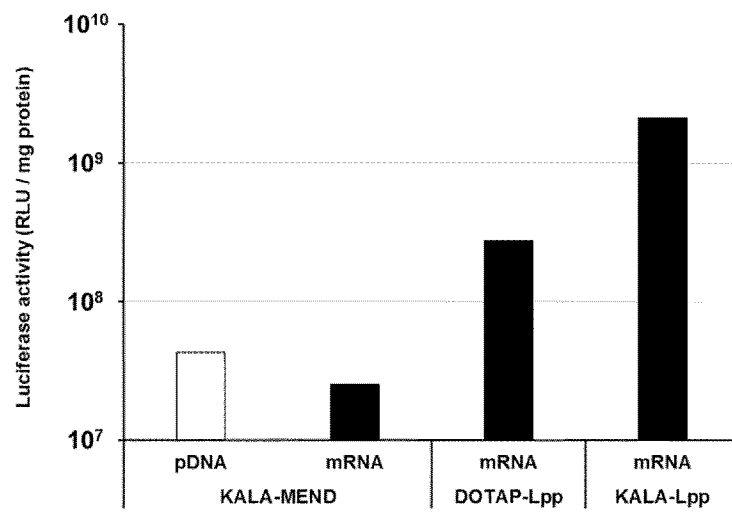
請求の範囲

- [請求項1] ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を少なくとも3個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～50個のポリペプチドの1種以上により脂質膜が修飾された、細胞内に核酸を送達するための脂質膜構造体であって、核酸をその表面に保持した、前記脂質膜構造体。
- [請求項2] ポリペプチドが、ペプチド鎖中にK-A-L-Aの繰り返し単位を3又は4個含む（ただし該繰り返し単位のうちのいずれか1個若しくは2個以上においてKがRとなってもよく、及び／又は該繰り返し単位のうちのいずれか1個においてKとLに挟まれるAがHとなってもよい）アミノ酸残基数が12～30個のポリペプチドである、請求項1に記載の脂質膜構造体。
- [請求項3] ポリペプチドが下記a)～g)に示されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドである、請求項1又は2に記載の脂質膜構造体。
- a) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA（配列番号1）
 - b) WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA（配列番号2）
 - c) WEAKLAKALAKALAKHLAKALA（配列番号3）
 - d) WEAKLAKALAKALAKHLA（配列番号4）
 - e) KALAKALAKALAKALA（配列番号5）
 - f) KALAKALAKALA（配列番号6）
 - g) WEARLARALARALARHLARALARALRA（配列番号7）
- [請求項4] 脂質膜構造体がりポソームである、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項5] ポリペプチドが疎水性基で修飾されており、前記疎水性基が脂質膜に挿入されてなる、請求項1～4のいずれか一項に記載の脂質膜構造

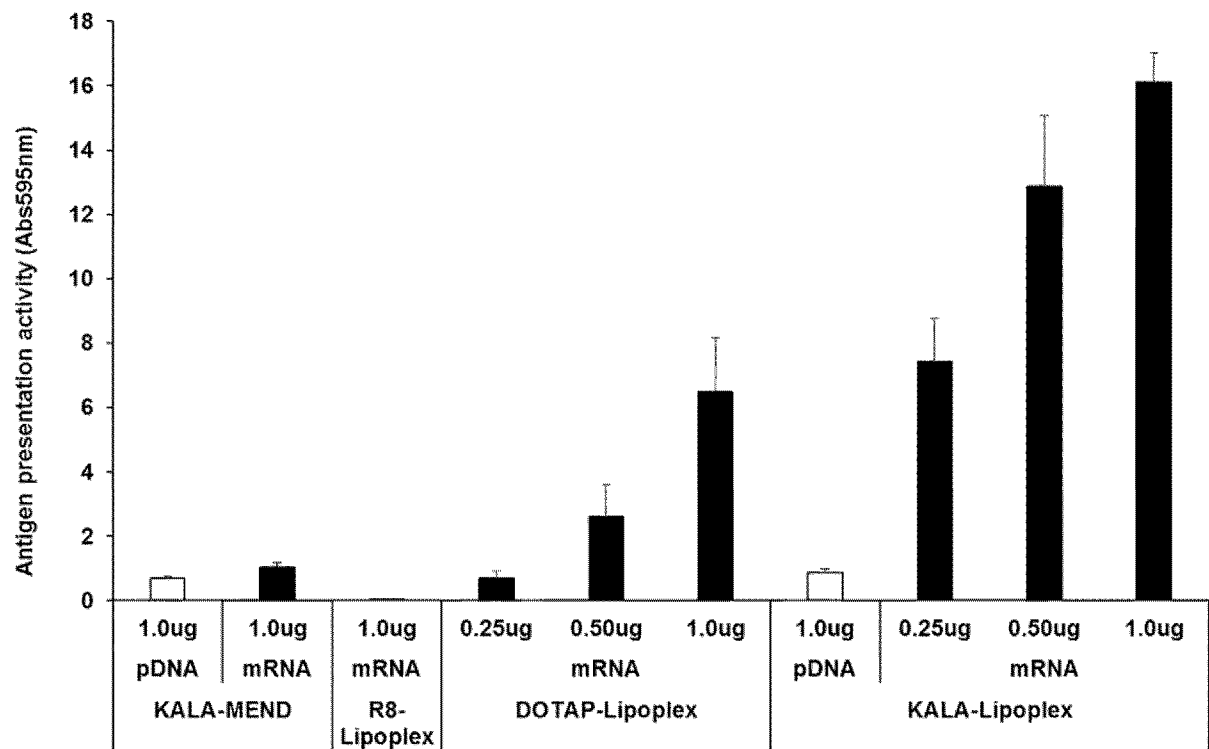
体。

- [請求項6] 核酸が核酸アジュバント及び／又は抗原性ポリペプチドをコードするmRNAである、請求項1～5のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項7] 脂質アジュバントをさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項8] 免疫細胞の細胞質に核酸を送達するための、請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質膜構造体。
- [請求項9] 免疫細胞と請求項1～8のいずれか一項に記載の脂質膜構造体とをインキュベーションする工程を含む、免疫療法に用いるためのトランスフェクションされた免疫細胞をインビトロで製造する方法。

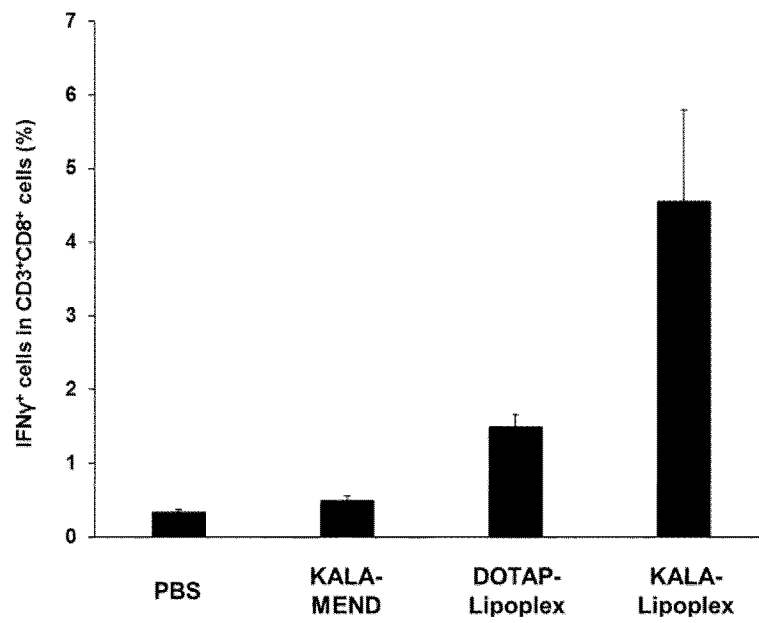
[図1]



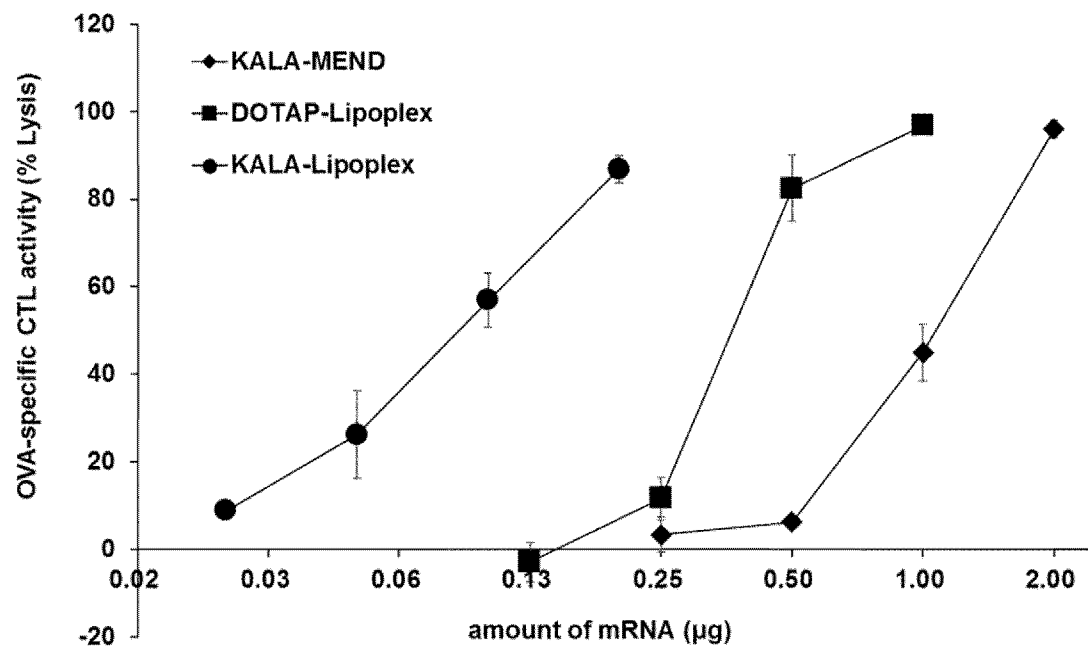
[図2]



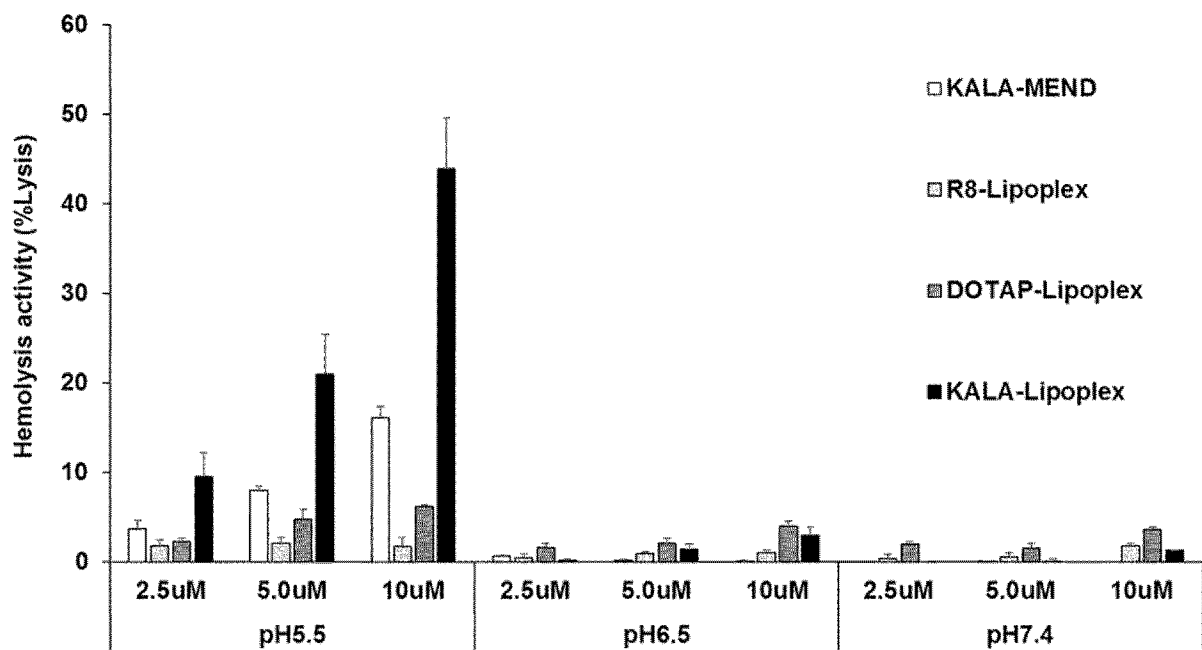
[図3]



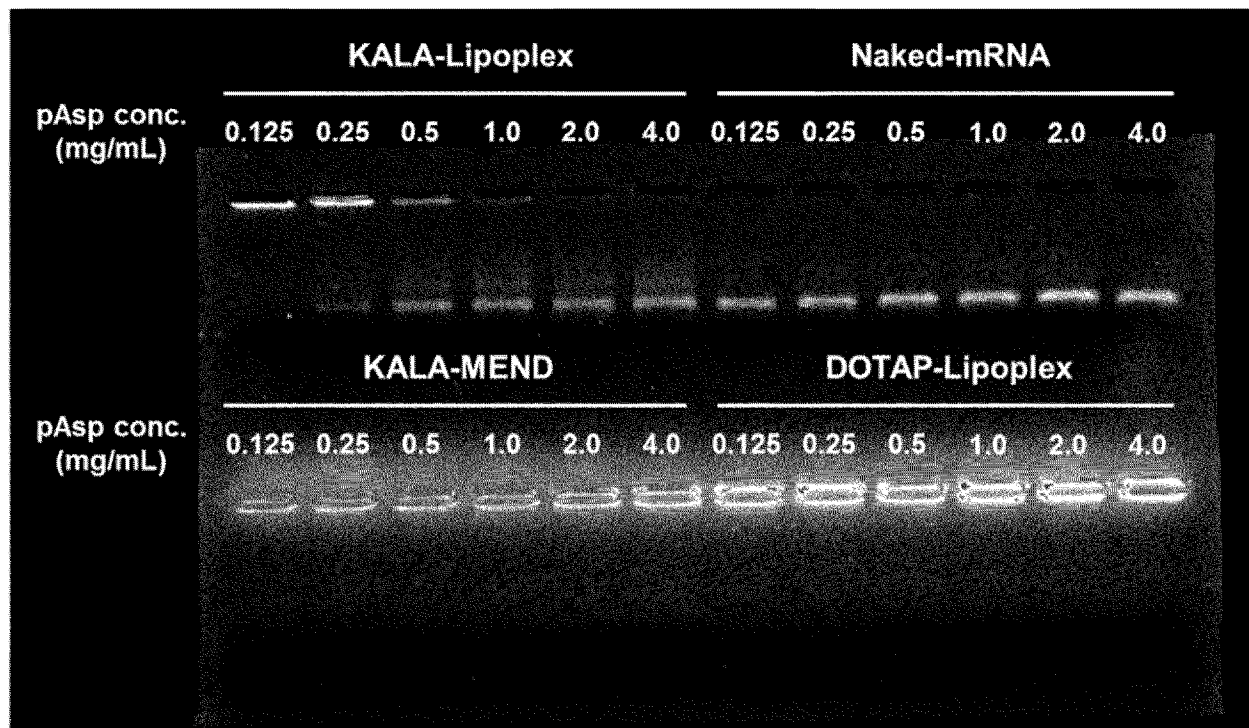
[図4]



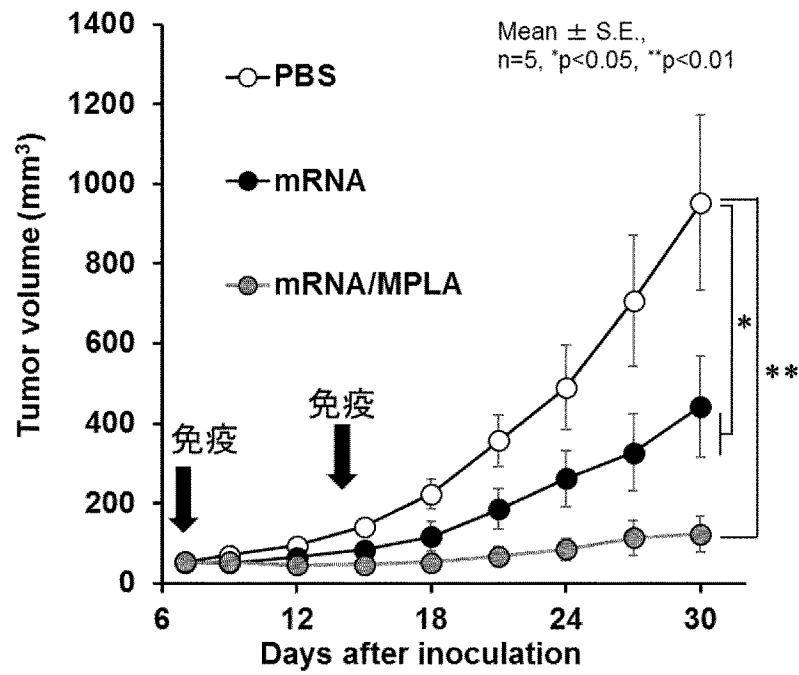
[図5]



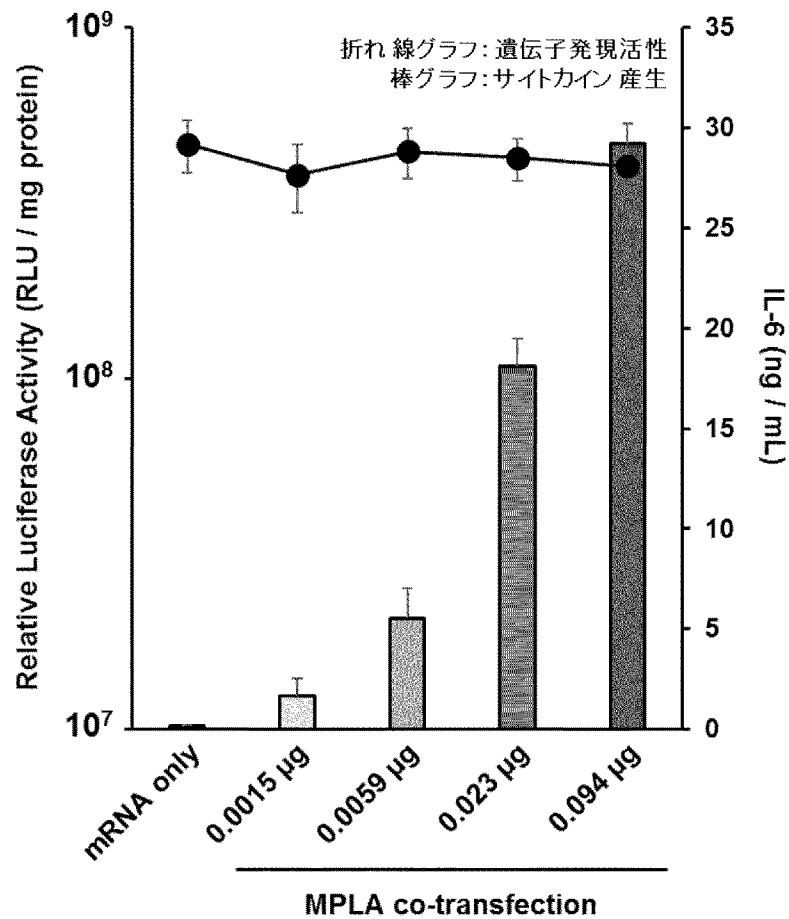
[図6]



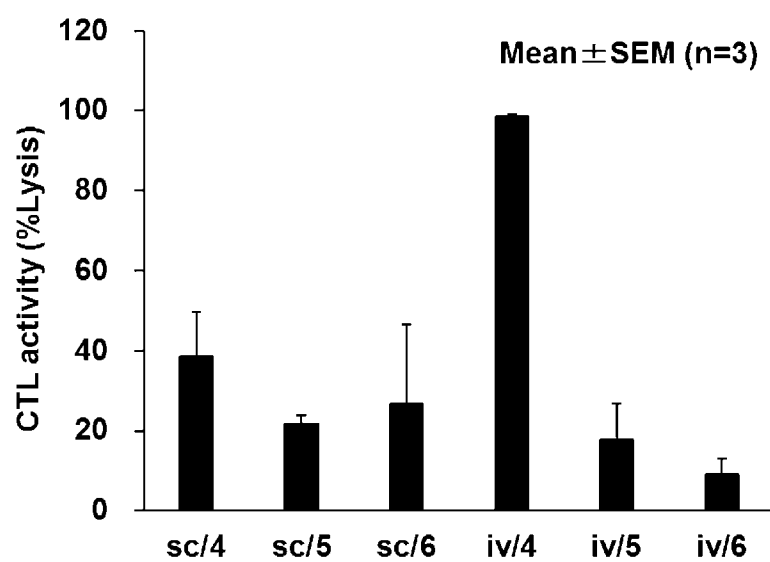
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. See extra sheet

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)

Int.Cl. C12N15/11, A61K9/127, A61K35/15, A61K39/00, A61K39/39, A61K47/62, A61K47/69, A61P37/04, C07K17/02, C07K7/08, C07K14/00, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	三浦尚也, ナノ DNA ワクチンを基盤とした樹状細胞エンジニアリングと難治性癌治療への展開, 科学研究費助成事業データベース 2015 年度実績報告書 [オンライン], 27 December 2016, [retrieval date 24 January 2019], Internet <URL:https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-15J01221/15J012212015jisseki/>, summaries of research achievements, plans for promoting future researches, non-official translation (MIYAURO, Naoya, "Dendritic cell engineering based on nano-DNA vaccine, and its deployment for refractory cancer treatment", Grants-in-Aid for Scientific Research Database, 2015 Fiscal Year Annual Research Report [online])	1-4, 6, 8, 9 1-9



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 application or patent 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

"I" 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
31 January 2019 (31.01.2019)

Date of mailing of the international search report
12 February 2019 (12.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/132713 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 27 October 2011, claim 4, paragraph [0001] & US 2013/0122054 A1, claim 4, paragraph [0001] & EP 2572706 A1 & CN 103037840 A	1-9
Y	WO 2015/098907 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 02 July 2015, claim 8, paragraph [0001] (Family: none)	1-9
Y	WO 2016/190940 A1 (CZERNIECKI, Brian, J.) 01 December 2016, page 35, line 14, page 36, line 23 & JP 2018-515421 A & US 2017/0216421 A1 & EP 3302539 A1 & CN 107206061 A	1-9
Y	VERBEKE, R. et al., "Co-delivery of nucleoside-modified mRNA and TLR agonists for cancer immunotherapy: Restoring the immunogenicity of immunosilent mRNA", Journal of Controlled Release, 05 October 2017, vol. 266, pp. 287-300, abstract, page 289, left column, lines 2-5	1-9
Y	HEIDARI, Z. et al., "Impact of the Charge Ratio on the In Vivo Immunogenicity of Lipoplexes", Pharm Res, 30 May 2017, vol. 34, pp. 1796-1804, page 1798, right column, lines 25-36, table I, abstract	1-9
Y	WO 2005/120574 A1 (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 22 December 2005, claim 5, paragraph [0013] & US 2007/0104776 A1, claim 5, paragraph [0068] & EP 1767216 A1 & CN 1997395 A & KR 10-2007-0026796 A	1-9
Y	MASSEY, A. S. et al., "Potentiating the Anticancer Properties of Bisphosphonates by Nanocomplexation with the Cationic Amphipathic Peptide, RALA", Molecular Pharmaceutics, 2016, vol. 13, pp. 1217-1228, fig. 1, RALA peptide	1-9
P, X P, A	三浦尚也, KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤としたワクチン技術の開発とがん免疫療法への応用, 北海道大学学術成果コレクション [オンライン], 22 March 2018, [retrieval date 24 January 2019], Internet <URL:http://hdl.handle.net/2115/69964>, entire text, non-official translation (MIURA, Naoya, "Development of vaccine technology based on KALA peptide modified nanoparticles and its application to cancer immunotherapy", Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers [online])	1-4, 6-9 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/073480 A1 (NOF CORPORATION) 23 May 2013, entire text & US 2014/0335157 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043528

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/11 (2006.01) i,	A61K9/127 (2006.01) i,	A61K35/15 (2015.01) i,
A61K39/00 (2006.01) i,	A61K39/39 (2006.01) i,	A61K47/62 (2017.01) i,
A61K47/69 (2017.01) i,	A61P37/04 (2006.01) i,	C07K17/02 (2006.01) i,
C07K7/08 (2006.01) n,	C07K14/00 (2006.01) n,	C12N5/10 (2006.01) n,
C12N15/09 (2006.01) n		

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/11, A61K9/127, A61K35/15, A61K39/00, A61K39/39, A61K47/62, A61K47/69, A61P37/04, C07K17/02, C07K7/08, C07K14/00, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	三浦尚也, ナノ DNA ワクチンを基盤とした樹状細胞エンジニアリングと難治性癌治療への展開, 科学研究費助成事業データベース 2015年度 実績報告書 [オンライン], 2016. 12. 27, [検索日 2019. 01. 24], インターネット<URL: https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-15J01221/15J012212015jisseki/ >, 研究実績の概要, 今後の研究の推進方策	1-4, 6, 8, 9 1-9

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 01. 2019

国際調査報告の発送日

12. 02. 2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

関 景輔

4 B

3842

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/132713 A1 (国立大学法人北海道大学) 2011.10.27, 請求項 4, 段落[0001] & US 2013/0122054 A1, claim 4, [0001], & EP 2572706 A1 & CN 103037840 A	1-9
Y	WO 2015/098907 A1 (国立大学法人北海道大学) 2015.07.02, 請求項 8, 段落[0001] (ファミリーなし)	1-9
Y	WO 2016/190940 A1 (CZERNIECKI, Brian, J.) 2016.12.01, 35 頁 14 行, 36 頁 23 行 & JP 2018-515421 A & US 2017/0216421 A1 & EP 3302539 A1 & CN 107206061 A	1-9
Y	VERBEKE R. et al., Co-delivery of nucleoside-modified mRNA and TLR agonists for cancer immunotherapy: Restoring the immunogenicity of immunosilent mRNA, Journal of Controlled Release, 2017.10.05, Vol. 266, p. 287-300, ABSTRACT, 289 頁左 欄 2-5 行	1-9
Y	HEIDARI Z. et al., Impact of the Charge Ratio on the In Vivo Immunogenicity of Lipoplexes, Pharm Res, 2017.05.30, Vol. 34, p. 1796-1804, 1798 頁右欄 25-36 行, Table I, ABSTRACT	1-9
Y	WO 2005/120574 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2005.12.22, 請求項 5, 段落[0013] & US 2007/0104776 A1, claim 5, [0068], & EP 1767216 A1 & CN 1997395 A & KR 10-2007-0026796 A	1-9
Y	MASSEY A. S. et al., Potentiating the Anticancer Properties of Bisphosphonates by Nanocomplexation with the Cationic Amphipathic Peptide, RALA, Molecular Pharmaceutics, 2016, Vol. 13, p. 1217-1228, Figure 1 の RALA peptide	1-9
P, X P, A	三浦尚也, KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤としたワクチン技術の 開発とがん免疫療法への応用, 北海道大学学術成果コレクション [オンライン], 2018.03.22, [検索日 2019.01.24], インターネット <URL: http://hdl.handle.net/2115/69964 >, 全文	1-4, 6-9 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2013/073480 A1 (日油株式会社) 2013.05.23, 全文 & US 2014/0335157 A1 & EP 2781507 A1 & CN 103930398 A	1-9

発明の属する分野の分類

C12N15/11(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K35/15(2015.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K39/39(2006.01)i, A61K47/62(2017.01)i, A61K47/69(2017.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C07K17/02(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)n, C07K14/00(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n