

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7525162号
(P7525162)

(45)発行日 令和6年7月30日(2024.7.30)

(24)登録日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
請求項の数 51 (全111頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-562639(P2020-562639)	(73)特許権者	507371168
(86)(22)出願日	令和1年5月8日(2019.5.8)		ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ
(65)公表番号	特表2021-523145(P2021-523145		ファンデーション インコーポレーティ
	A)		ッド
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)		アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
(86)国際出願番号	PCT/US2019/031385		ル グリンター ホール 2 2 3
(87)国際公開番号	WO2019/217593	(74)代理人	100080791
(87)国際公開日	令和1年11月14日(2019.11.14)		弁理士 高島 一
審査請求日	令和4年3月31日(2022.3.31)	(74)代理人	100136629
(31)優先権主張番号	62/668,608		弁理士 鎌田 光宜
(32)優先日	平成30年5月8日(2018.5.8)	(74)代理人	100125070
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 土井 京子
		(74)代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74)代理人	100174296
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 磁性リポソームおよび関連する治療ならびにイメージング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

リボ核酸（RNA）分子と、D O T A Pおよびコレステロールを含む前記脂質混合物と、約60nm～約140nmの直径を有する、酸化鉄ナノ粒子（IONP）のコアと、を含むリポソームであって、前記コレステロールが、前記脂質混合物の前記総脂質量の12%超、37%未満である、リポソーム。

【請求項2】

前記IONPの質量が、総リポソーム質量の約1%～約30%である、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項3】

前記IONPの前記質量が、前記総リポソーム質量の約10%～約15%である、請求項2に記載のリポソーム。

【請求項4】

約80nm～約500nmの直径を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項5】

約90nm～約300nmの直径を有する、請求項4に記載のリポソーム。

【請求項6】

約20mV～約50mVの全体的な表面正味電荷を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 7】

約 40 mV ～ 約 50 mV の全体的な表面正味電荷を有する、請求項 6 に記載のリポソーム。

【請求項 8】

前記コレステロールが、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 15 % ～ 約 35 % である、請求項 1 に記載のリポソーム。

【請求項 9】

前記コレステロールが、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 20 % ～ 約 30 % である、請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 10】

前記コレステロールが、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 25 % ± 3 % である、請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 11】

前記 DOTAP が、前記脂質混合物の前記総脂質質量の少なくとも 50 % である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 12】

前記 DOTAP が、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 63 % ～ 約 88 % である、請求項 11 に記載のリポソーム。

【請求項 13】

前記 DOTAP が、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 75 % ± 5 % である、請求項 11 に記載のリポソーム。

【請求項 14】

前記脂質混合物が、DOTAP およびコレステロールとは異なる第 3 の脂質を含む場合、前記第 3 の脂質が、前記脂質混合物の前記総脂質質量の約 10 % 未満、または約 5 % 未満である、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 15】

前記脂質混合物が、本質的に DOTAP およびコレステロールからなる、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 16】

前記 RNA 分子が、タンパク質をコードするか、またはアンチセンス分子である、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 17】

前記タンパク質が、腫瘍抗原、サイトカイン、および共刺激分子からなる群から選択される、請求項 16 に記載のリポソーム。

【請求項 18】

前記 RNA 分子が、アンチセンス分子であり、前記アンチセンス分子が、siRNA、shRNA、miRNA、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 16 に記載のリポソーム。

【請求項 19】

RNA 分子の混合物を含む、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 20】

前記 RNA の混合物が、ヒトの腫瘍から単離された RNA である、請求項 19 に記載のリポソーム。

【請求項 21】

前記腫瘍が、悪性脳腫瘍である、請求項 20 に記載のリポソーム。

【請求項 22】

リポソームの作製方法であって、
(A) DOTAP およびコレステロールを混合して、脂質混合物を形成することであって、前記コレステロールが、前記脂質混合物の前記総脂質質量の 12 % 超、37 % 未満である、形成すること、

10

20

30

40

50

(B) 前記脂質混合物を乾燥させること、
(C) 前記脂質混合物を再水和溶液で再水和して、再水和脂質混合物を形成すること、および
(D) 前記再水和脂質混合物を約 40℃超の温度でインキュベートし、前記再水和脂質混合物を断続的にボルテックスして、リポソームを形成すること
を含み、
ここで、前記方法は、前記脂質混合物または前記再水和溶液に IONP を添加することをさらに含む、方法。

【請求項 23】

(i) ステップ (D) 後に前記リポソームを 12 時間超インキュベートすること、並びに／あるいは

(ii) (a) 前記リポソームを超音波処理すること、および／または前記リポソームを少なくとも 150 nm のフィルターを通して濾過すること、および (b) 前記リポソームを RNA 分子とインキュベートすること
をさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

(i) ステップ (D) 後に前記リポソームを 12 時間超インキュベートすることを含み、前記リポソームを約 20℃～約 30℃または約 2℃～約 6℃で 12 時間超インキュベートすることをさらに含み、並びに／あるいは (ii) (a) 前記リポソームを 200 nm フィルターおよび／または 450 nm フィルターを通して濾過することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

(i) 約 7.5 mg ± 0.75 mg の DOTAP および約 2.5 mg ± 0.25 mg のコレステロールを混合して、前記脂質混合物を形成する、(ii) DOTAP およびコレステロールをクロロホルムに溶解して、前記脂質混合物を形成する、(iii) 窒素ガスを使用して、前記脂質混合物を乾燥させる、(iv) 前記再水和溶液が緩衝液である、(v) 前記再水和脂質混合物を水浴中で約 50℃の温度でインキュベートし、約 10 分ごとにボルテックスして、リポソームを形成する、(vi) またはそれらの組み合わせである、請求項 22 または請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

約 60 nm～約 140 nm の直径を有する IONP のコアを形成する、請求項 22～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載のリポソームを含む細胞。

【請求項 28】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載のリポソーム、もしくは請求項 27 に記載の細胞、またはそれらの任意の組み合わせ、ならびに薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤、を含む組成物。

【請求項 29】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載のリポソームと細胞をインビトロでインキュベートすることを含む、RNA 分子を細胞に送達する方法。

【請求項 30】

前記細胞が、磁場の存在下で、前記リポソームとインキュベートされる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記磁場が、静磁場または振動磁場である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞が、磁場の存在下で、約 2 時間未満または約 1 時間未満の時間、前記リポソームとインキュベートされる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞が、磁場の存在下で、約30分±10分間、前記リボソームとインキュベートされる、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

疾患を有する対象を治療するために使用するための、請求項1～21のいずれか一項に記載のリボソーム。

【請求項35】

疾患を有する対象を治療するために使用するための、請求項27に記載の細胞。

【請求項36】

前記疾患が、癌である、請求項34に記載のリボソーム。

【請求項37】

前記対象が、脳に位置する腫瘍を有する、請求項34に記載のリボソーム。

【請求項38】

前記腫瘍が、低悪性度神経膠腫または高悪性度神経膠腫である、請求項37に記載のリボソーム。

【請求項39】

前記腫瘍が、グレードIII星状細胞腫または膠芽腫、髄芽腫またはびまん性内在性橋脚腫である、請求項38に記載のリボソーム。

【請求項40】

前記疾患が癌である、請求項35に記載の細胞。

【請求項41】

前記腫瘍が、低悪性度神経膠腫または高悪性度神経膠腫である、請求項40に記載の細胞。

【請求項42】

前記腫瘍が、グレードIII星状細胞腫または膠芽腫、髄芽腫またはびまん性内在性橋脚腫である、請求項41に記載の細胞。

【請求項43】

前記リボソームを含む前記細胞が、前記対象に皮内投与される、請求項35、40または41に記載の細胞。

【請求項44】

前記使用が、前記対象内の前記リボソームを含む細胞の遊走を追跡することをさらに含む、請求項34および36～38のいずれか一項に記載のリボソーム。

【請求項45】

前記追跡が、核磁気共鳴画像法(MRI)を含む、請求項44に記載のリボソーム。

【請求項46】

前記追跡が、前記対象の1つ以上のリンパ節に対してMRIを行うことを含む、請求項45に記載のリボソーム。

【請求項47】

(i) IONPを含むリボソームでトランスフェクトされた細胞を含む前記リンパ節のT2*強調MRI強度を、対照の未処置リンパ節の前記T2*強調MRI強度と、比較すること、および／または

(ii) MRIを介して前記対象のリンパ節サイズを測定することを含む、請求項45に記載のリボソーム。

【請求項48】

対象においてリンパ節への樹状細胞(DC)の遊走を追跡するために使用するための、請求項1～21のいずれか一項に記載のリボソームであって、前記追跡が、前記対象の1つ以上のリンパ節に対して核磁気共鳴画像法(MRI)を用いて行われる、リボソーム。

【請求項49】

対象における樹状細胞(DC)ワクチン接種療法に対する対象の治療応答を決定するために使用するための、請求項1～21のいずれか一項に記載のリボソームであって、前記使用が、前記対象の1つ以上のリンパ節に対する核磁気共鳴法(MRI)を用いてリンパ

10

20

30

40

50

節へのDC遊走を追跡することを含み、処置リンパ節のT2*強調MRI強度が減少した場合、前記DCワクチン接種療法が、前記対象において正の治療応答をもたらすと決定される、リボソーム。

【請求項50】

前記リボソームが、免疫チェックポイント経路のタンパク質を標的とするsiRNAを含む、請求項34および36～38のいずれか一項に記載のリボソーム。

【請求項51】

脳腫瘍の微小環境における抗原提示細胞を活性化するため、対象におけるリンパ節への樹状細胞（DC）遊走を増加させるため、または対象における腫瘍または癌に対する免疫応答を増強するための、請求項1～21のいずれか一項に記載のリボソーム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年5月8日に出願された米国仮特許出願第62／668，608号の優先権を主張し、その内容の全体が参照により援用される。

【0002】

助成金の開示

本発明は、米国国立衛生研究所により授与されたCA195563の下で、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

癌ワクチンは、個別化された癌免疫療法への有望なアプローチであるが、治療に対する患者の応答における有意義なバイオマーカーの欠如は、それらの開発を制限する。無作為化二重盲検プラセボ対照試験では、RNA-パルス状樹状細胞（DC）は、神経膠芽腫を有する患者において、無進行生存期間および全生存期間を延長することが報告された（Mitchell et al, Nature 519:366-369（2015））。さらに、SPECT／CTイメージングによって評価されたリンパ節へのDC遊走は、臨床結果と強く相関することが実証された。この知見は、DCワクチンに応答するための新規なイメージングバイオマーカーを提供することができるが、放射性標識細胞の核医学に基づくイメージングの複雑さおよび規制要件は、この技術の広範な利用を制限する。したがって、当技術分野では、放射能を用いずにリンパ節へのDC遊走を追跡する方法、およびワクチン接種応答を改善するために遊走を増強する方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

本明細書において、リンパ節へのDC遊走を増強し、インビボでのDC遊走のMRIに基づく追跡を可能にする、二機能性RNA負荷ナノ粒子（RNA-NP）の開発につながるデータが、初めて提示される。したがって、本開示は、リボ核酸（RNA）分子と、DOTAPおよびコレステロールを含む脂質混合物とを含むリボソームを提供する。様々な実施形態では、リボソームは酸化鉄ナノ粒子（IONP）を含む。様々な態様では、DOTAPおよびコレステロールは、約3：1のDOTAP：コレステロール質量比で脂質混合物中に存在する。本開示のリボソームの様々な利点を、以下でさらに詳細に説明する。

【0005】

本開示はまた、本開示のリボソームを含む細胞、例えば、本開示のリボソームを含む免疫細胞（例えば、抗原提示細胞、樹状細胞）を提供する。様々な態様では、細胞は、リボソームでトランスフェクトされる。様々な例では、細胞は、本開示のリボソームを、エンドサイトーシスまたはピノサイトーシスによって取り込んでいる。本開示のリボソームを含む細胞は、細胞によってリボソームが取り込まれるいずれの特定のメカニズムにも限定されない。また、細胞の集団も提供され、集団の少なくとも50％は、本開示のリボソームを含む細胞、例えば、本開示のリボソームでトランスフェクトされた細胞、である。

【0006】

本開示はさらに、組成物を提供し、本開示の、リポソーム、細胞（例えば、樹状細胞）、または細胞の集団、あるいはそれらの任意の組み合わせ、および薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む。

【0007】

本開示はさらに、リポソームを作製する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、（A）DOTAPおよびコレステロールを約3：1のDOTAP：コレステロール質量比で混合して、脂質混合物を形成することと、（B）脂質混合物を乾燥することと、（C）脂質混合物を再水和溶液で再水和して、再水和脂質混合物を形成することと、（D）再水和脂質混合物を約40℃超の温度でインキュベートし、再水和脂質混合物を断続的にボルテックスしてリポソームを形成することと、を含む。本開示の方法によって作製されたリポソームも提供される。本開示の方法によって作製されたリポソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞が、本明細書でさらに提供される。また、細胞の集団も提供され、集団の少なくとも50%は、本開示の方法によって作製されたリポソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞である。本開示は、本開示の方法によって作製されたリポソーム、リポソームを含む細胞、または本明細書に記載の細胞集団、またはそれらの任意の組み合わせ、ならびに薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む、組成物を提供する。

【0008】

本開示は、さらに、細胞にRNA分子を送達する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、細胞を本開示のリポソームとインキュベートすることを含む。様々な態様では、細胞は、免疫細胞である。様々な例では、免疫細胞は、抗原提示細胞、例えば、樹状細胞である。様々な態様では、免疫細胞は、腫瘍微小環境、例えば、脳腫瘍の腫瘍環境に位置する。一部の態様における本開示のリポソームは、免疫細胞を活性化する。様々な例では、RNA分子は、免疫チェックポイント経路のタンパク質を標的とするアンチセンス分子、例えば、siRNAである。例えば、免疫チェックポイント経路のタンパク質は、PD-L1であってもよい。したがって、様々な態様では、PD-L1を標的とするsiRNAは、微小環境の免疫細胞に送達される。特定の理論に拘束されることなく、リポソームは、微小環境の免疫細胞を活性化し、免疫チェックポイント経路のタンパク質の発現を減少させて、腫瘍に対する免疫応答を増強する。様々な態様では、RNA分子は、タンパク質、例えば、腫瘍抗原をコードする。様々な態様では、RNA分子は、腫瘍抗原をコードするmRNAである。

【0009】

本開示により、疾患を有する対象を治療する方法が提供される。例示的な実施形態では、本方法は、細胞にRNA分子を送達する本開示の方法によって、対象の細胞にRNA分子を送達することを含む。他の例示的な実施形態では、本方法は、本明細書に記載のリポソーム、細胞、細胞の集団、またはそれらの任意の組み合わせを含む本開示の組成物を、対象における疾患の治療に有効な量で投与することを含む。

【0010】

本開示はさらに、対象における腫瘍または癌に対する免疫応答を増強する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、対象における免疫応答を増強するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。例示的な態様では、増強された免疫応答は、樹状細胞の活性化の増加によって明らかであり、これは、例えば、DC活性化に関連する遺伝子の発現の増強、DCの表面上の共刺激分子の発現の増強、抗ウイルス性サイトカイン（例えば、IFN α ）の産生の増加、T細胞刺激の増加（例えば、活性化DCとの接触時のT細胞によるIFN- γ 産生の増加によって示される）、リンパ節への遊走の増加、および腫瘍増殖の阻害の増強、によって実証される。したがって、本開示は、DCの活性化を増加させるか、またはDCを活性化する方法を、さらに提供する。例示的な実施形態では、本方法は、DCの活性化を増加させるのに有効な量で、またはDCを活性化するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。したがって、

本開示はまた、抗ウイルス性サイトカイン（例えば、 $IFN\alpha$ ）の産生を増加させる方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、対象において抗ウイルス性サイトカインの産生を増加させるのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。さらに、対象においてT細胞刺激を増加させる方法が提供される。例示的な実施形態では、本方法は、対象においてT細胞刺激を増加させるのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。様々な態様では、T細胞刺激の増加は、 $IFN-\gamma$ のT細胞産生の増加から明らかである。本開示はさらに、 $IFN-\gamma$ のT細胞産生を増加させる方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、T細胞を、本開示の樹状細胞（DC）と接触させることを含み、任意選択的に、リポソームは、IONPを含み、DCは、磁場の存在下でリポソームでトランスフェクトされる。さらに、対象においてリンパ節への樹状細胞（DC）の遊走を増加させる方法が、本明細書で提供される。例示的な実施形態では、本方法は、リンパ節へのDC遊走を増加させるのに有効な量で、本開示の組成物を対象に投与することを含む。腫瘍増殖を阻害する方法が、本明細書でさらに提供される。例示的な実施形態では、本方法は、対象において腫瘍増殖を阻害するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。

【0011】

本開示はまた、対象においてリンパ節への樹状細胞（DC）の遊走を追跡する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、（i）本開示の治療方法に従って、対象を治療することであって、細胞がDCであり、リポソームがIONPを含む、治療することと、（ii）対象の1つ以上のリンパ節で核磁気共鳴画像法（MRI）を行うことと、を含む。例示的な態様では、本方法は、1つ以上のリンパ節の $T2^*$ 強調（ $T2^*weighted$ ）MRI強度を決定することを含み、対照の未処置リンパ節の $T2^*$ 強調MRI強度と比較して、 $T2^*$ 強調MRI強度の減少を示すリンパ節は、DCが遊走したリンパ節を表す。例示的な実施形態では、対象においてリンパ節へのDC遊走を追跡する方法は、対象から得られたDCを本開示のリポソームとインキュベートし、リポソームを含むDCを対象に投与することを含む。本方法は、対象へのDCの投与に続いて、対象の1つ以上のリンパ節に対してMRIを行うことをさらに含む。様々な態様では、MRIは、投与後約2日で行われる。本明細書でさらに説明されるように、一部の態様における方法は、処置リンパ節の $T2^*$ 強調MRI強度を測定し、 $T2^*$ 強調MRI強度を、対象にDCを投与する前の強度と比較することを含む。様々な例では、 $T2^*$ 強調MRI強度の減少は、DC投与の正の結果（例えば、正の治療応答）に関連する。したがって、対象における樹状細胞（DC）ワクチン接種療法に対する対象の治療応答を決定する方法が、本開示により提供される。例示的な実施形態では、本方法は、（i）本開示の治療方法に従って、対象を治療することであって、細胞がDCであり、リポソームがIONPを含む、治療することと、（ii）DC遊走を追跡する本開示の方法に従って、リンパ節へのDC遊走を追跡することであって、処置リンパ節の $T2^*$ 強調MRI強度が減少する場合、DCワクチン接種療法が対象において正の治療応答をもたらすと決定される、追跡することと、を含む。

【0012】

本開示はまた、対象における樹状細胞（DC）ワクチン接種療法に対する治療応答をモニタリングする方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、第1時点および第2時点でのリンパ節へのDC遊走を追跡する本開示の方法に従って、リンパ節へのDC遊走を追跡することを含み、第2時点での処置リンパ節の $T2^*$ 強調MRI強度が、第1時点での処置リンパ節の $T2^*$ 強調MRI強度と比較して減少する場合に、DCワクチン接種療法に対する治療応答が有効である。

【0013】

本開示は、腫瘍、任意選択的に、脳腫瘍、の微小環境内の細胞にRNAを送達する方法を提供し、本開示の組成物を静脈内投与することを含み、組成物は、リポソームを含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】異なる量のコレステロールを含むリポソームを含有するGFP RNAでトランスフェクトされたDCのパーセンテージのグラフである。

【図1B】0%コレステロール(Std-RNA-NP)または25%コレステロール(Chol-RNA-NP)を含むリポソームによって送達されたRNAが負荷された樹状細胞の%のグラフである。

【図1C】0%コレステロール(Std-RNA-NP)または25%コレステロール(Chol-RNA-NP)を含むリポソームによって送達されたRNAが負荷された生存樹状細胞の%のグラフである。

【図1D】0%コレステロールおよび腫瘍由来RNAを含むリポソーム(Std-RNA-NP DC)でトランスフェクトされた樹状細胞、または25%コレステロールおよび腫瘍由来RNAリポソームを含むリポソーム(Chol-RNA-NP DC)でトランスフェクトされた樹状細胞、とインキュベートされたT細胞によって生成されたIFN γ のグラフである。対照として、トランスフェクトされていないDC(未処置DC)およびT細胞を、この実験で使用した。

【図2A】皮質の免疫蛍光画像である。

【図2B】腫瘍の免疫蛍光画像である。

【図2C】KR158B-ルシフェラーゼ腫瘍を有し、25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)、RNAのみを注射したマウス、または未処置のマウスの脳腫瘍におけるCy5+細胞のグラフである。

【図2D】GL261腫瘍を有し、25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)を注射したマウス、または未処置のマウスの脳腫瘍におけるCy5+細胞のグラフである。

【図3】KR158B-ルシフェラーゼ腫瘍を有し、1%、12.5%、25%、または37%のコレステロールを含むリポソームを注射したマウスの腫瘍におけるCy3+細胞のグラフであり、コレステロール含有量の関数としてプロットされている。

【図4】腫瘍または皮質の一連の蛍光顕微鏡画像であり、CD31蛍光抗体(左の列)またはCy3標識RNA(中央の列)を含むリポソームで染色された画像、あるいは重ね合わせた画像(右の列)である。

【図5A】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)、RNAのみを注射したマウス、または未処置のマウスの脳腫瘍におけるCy5+CD45+細胞のグラフである。

【図5B】25%コレステロール(Chol-RNA-NP)または0%コレステロール(RNA-NP)を含むリポソームを注射したマウスの脳腫瘍におけるCy5+であるCD45+細胞の%のグラフである。

【図5C】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、または0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)を注射したマウスの脳腫瘍におけるCy5+であるMHCクラスII+CD45+細胞のグラフである。

【図6A】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)、未処置またはRNAのみ(Cy5)を注射したマウスの肺におけるCy5+細胞のグラフである。

【図6B】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)、未処置またはRNAのみ(Cy5)を注射したマウスの脾臓におけるCy5+細胞のグラフである。

【図6C】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP)、未処置またはRNAのみ(Cy5)を注射したマウスの肝臓におけるCy5+細胞のグラフである。

【図6D】25%コレステロールを含むリポソーム(Chol-RNA-NP、○)、0%コレステロールを有するリポソーム(RNA-NP、□)を注射したマウスの脳腫瘍におけるCy5+細胞のグラフであり、肺におけるCy5+細胞の関数としてプロットされ

10

20

30

40

50

ている。

【図 6 E】25%コレステロールを含むリポソーム (Chol-RNA-NP、○)、または0%コレステロールを有するリポソーム (RNA-NP、□) を注射したマウスの脳腫瘍における Cy5+細胞のグラフであり、脾臓における Cy5+細胞の関数としてプロットされている。

【図 6 F】25%コレステロールを含むリポソーム (Chol-RNA-NP、○)、または0%コレステロールを有するリポソーム (RNA-NP、□) を注射したマウスの脳腫瘍における Cy5+細胞のグラフであり、肝臓における Cy5+細胞の関数としてプロットされている。

【図 7 A】酸化鉄ナノ粒子を含むリポソームを作製するための基本的なステップの概略図である。

【図 7 B】酸化鉄リポソームのクライオ-TEM 画像である。

【図 7 C】粒子径の関数としてプロットされた粒子の濃度のグラフである。

【図 7 D】アガロースゲルの画像であり、様々な量の酸化鉄を含有する IO-RNA-NP が、ウェルに負荷されている。この画像では、明るいバンドは、非結合 mRNA の存在を示している。カラムにバンドが存在しないことは、すべての RNA が、その粒子製剤によって結合されたことを示している。

【図 7 E】酸化鉄を有する (IO-RNA-NP) または酸化鉄なし (RNA-NP) の緑色蛍光タンパク質 (GFP) RNA を含むリポソーム、酸化鉄粒子のみ、ナノ粒子のみでトランスフェクトされた細胞、または未処置の細胞の%のグラフである。

【図 7 F】酸化鉄およびコレステロール (Chol-IO-RNA-NP) または酸化鉄を含むがコレステロールを含まない (IO-RNA-NP) リポソームでトランスフェクトされた DC の%のグラフである。

【図 7 G】Cy3 標識 IO-RNA-NP でトランスフェクトされた DC の明視野像である。

【図 7 H】Cy3 標識 IO-RNA-NP でトランスフェクトされた DC の蛍光画像である。

【図 7 I】コレステロールおよび異なる量のカルボキシル化酸化鉄ナノ粒子を含むリポソームを含有する GFP RNA でトランスフェクトされた DC のパーセンテージのグラフである。

【図 8 A】磁場の存在下 (磁石) または不存下 (磁石なし) で、酸化鉄リポソームを含有する GFP RNA でトランスフェクトされた DC のパーセンテージのグラフである。

【図 8 B】磁場の存在下で、様々な量の酸化鉄を有する酸化鉄リポソームを含有する GFP RNA でトランスフェクトされた DC のパーセンテージのグラフである。

【図 8 C】30 分間の磁場の存在下 (30 分間+磁石)、または30分間の磁場の不在下 (30 分間)、あるいは一晩の磁場の不在下 (18 時間) で、磁性リポソームを含有する GFP RNA でトランスフェクトされた DC のパーセンテージのグラフである。

【図 8 D】磁気分離器上に30分間配置された DC を含む管の写真であり、磁場が最大である管の側面に引き付けられた細胞の目に見える塊を示す。

【図 8 E】磁場の存在下 (静的磁石) または不在下 (磁石なし) で、磁性リポソームとインキュベートされた Cy5+陽性骨髄 DC の%のグラフである。

【図 8 F】30 分間の磁場の存在下 (静的磁石)、または30分間の磁場の不在下 (磁石なし)、あるいは一晩の磁場の不在下 (磁石なし、一晩) で、IOリポソームを含有する GFP RNA でトランスフェクトされた DC のパーセンテージのグラフである。

【図 9 A】RNA を負荷した磁性リポソームが、サイトカイン産生に対する効果を示す経路の図である。

【図 9 B】GFP RNA (Electro) でエレクトロポレーションされた DC、RNA-および IO 負荷リポソーム (GFP mRNA+NP) とインキュベートされた DC、未処置または単にナノ粒子 (NP のみ) で処置された DC、により産生された IFN α のグラフである。

10

20

30

40

50

【図 9 C】RNA 負荷リボソームとインキュベートされた DC で刺激された T 細胞または未刺激 T 細胞により産生された IFN γ のグラフである。

【図 9 D】エレクトロポレーション（左）または IO-RNA-NP（右）を介して、Cy3 標識 OVA RNA（18 時間）または Cy3 標識 GFP RNA が負荷された DsRed DC を注射されたマウスのリンパ節における DsRed+細胞の、18、48 または 72 時間後のグラフである。

【図 10 A】イメージングパラメータの各セットについての、TR/TE が 207/17 である T2*強調画像、および T2-RARE 強調画像における、処置および未処置リンパ節の代表的な画像である。

【図 10 B】図 10 A のデータの定量化である。

【図 10 C】脂肪飽和を用いた T2*強調画像における強度の相対変化に対してプロットされた各リンパ節における細胞の数のグラフである。

【図 10 D】リンパ節サイズの平均相対変化のグラフである。

【図 11 A】未処置のマウスまたは IO-RNA-NP で処置されたマウスにおける腫瘍移植後の日数の関数としてプロットされた、腫瘍サイズのグラフである。

【図 11 B】未処置のマウスまたは IO-RNA-NP で処置されたマウスを応答者と非応答者の 2 つのグループに分けて腫瘍移植後の日数の関数としてプロットされた、腫瘍サイズのグラフである。

【図 11 C】IO-RNA-NP で処置されたマウスにおける 27 日目の応答者および非応答者の腫瘍サイズのグラフである。

【図 11 D】IO RNA NP で処置されたマウスにおける 2 日目の応答者および非応答者の T2*脂肪抑制（T2*fat sat）画像強度のグラフである。

【図 11 E】生存率と相関しなかったシーケンスの表である。

【図 11 F】27 日目の腫瘍体積の関数としてプロットされた、2 日目の T2*脂肪抑制画像強度のグラフである。

【図 12 A】Chol-RNA-NP が、mRNA を脳腫瘍に送達することを示している。図 12 A は、Cy3 標識 Chol-RNA-NP を注射して 24 時間後の、KR158 b-ルシフェラーゼ腫瘍の代表的な免疫蛍光顕微鏡画像である。図 12 B~12 C は、Cy5 標識リボソームを注射して 24 時間後の、頭蓋内 KR158 b（図 12 B）または GL261（図 12 C）腫瘍における、Cy5 標識 RNA のフローサイトメトリーに基づく定量化のグラフである。図 12 D は、様々な量のコレステロールを含む RNA-NP でワクチン接種した後の、脳腫瘍への RNA 送達のグラフである。

【図 12 B】Chol-RNA-NP が、mRNA を脳腫瘍に送達することを示している。図 12 A は、Cy3 標識 Chol-RNA-NP を注射して 24 時間後の、KR158 b-ルシフェラーゼ腫瘍の代表的な免疫蛍光顕微鏡画像である。図 12 B~12 C は、Cy5 標識リボソームを注射して 24 時間後の、頭蓋内 KR158 b（図 12 B）または GL261（図 12 C）腫瘍における、Cy5 標識 RNA のフローサイトメトリーに基づく定量化のグラフである。図 12 D は、様々な量のコレステロールを含む RNA-NP でワクチン接種した後の、脳腫瘍への RNA 送達のグラフである。

【図 12 C】Chol-RNA-NP が、mRNA を脳腫瘍に送達することを示している。図 12 A は、Cy3 標識 Chol-RNA-NP を注射して 24 時間後の、KR158 b-ルシフェラーゼ腫瘍の代表的な免疫蛍光顕微鏡画像である。図 12 B~12 C は、Cy5 標識リボソームを注射して 24 時間後の、頭蓋内 KR158 b（図 12 B）または GL261（図 12 C）腫瘍における、Cy5 標識 RNA のフローサイトメトリーに基づく定量化のグラフである。図 12 D は、様々な量のコレステロールを含む RNA-NP でワクチン接種した後の、脳腫瘍への RNA 送達のグラフである。

【図 12 D】Chol-RNA-NP が、mRNA を脳腫瘍に送達することを示している。図 12 A は、Cy3 標識 Chol-RNA-NP を注射して 24 時間後の、KR158 b-ルシフェラーゼ腫瘍の代表的な免疫蛍光顕微鏡画像である。図 12 B~12 C は、Cy5 標識リボソームを注射して 24 時間後の、頭蓋内 KR158 b（図 12 B）または G

10

20

30

40

50

L 2 6 1 (図 1 2 C) 腫瘍における、C y 5 標識 R N A のフローサイトメトリーに基づく定量化のグラフである。図 1 2 D は、様々な量のコレステロールを含む R N A - N P でワクチン接種した後の、脳腫瘍への R N A 送達のグラフである。

【図 1 3 A】C h o l - R N A - N P が、血管周囲の T A M にトランスフェクトすることを示している。図 1 3 A は、C y 3 標識 C h o l - R N A - N P で処置されたマウスの K R 1 5 b 腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図 1 3 B ~ 1 3 H は、蛍光標識 C h o l - R N A - N P でワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内 G L 2 6 1 (1 3 B 、 1 3 D 、 1 3 F 、 1 3 H) または K R 1 5 8 b - ルシフェラーゼ (1 3 C 、 1 3 E 、 1 3 G) を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍 (C h o l (バルク)) 、および処置腫瘍内の R N A + 細胞 (C h o l (R N A +)) についての、C D 4 5 + である全細胞のパーセンテージ (図 1 3 B 、 1 3 C) 、マクロファージである C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 D ~ 1 3 E) 、抗原提示細胞である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 F ~ G) および C D 1 1 b + L y 6 G / 6 C + である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 H) として示されている。

10

【図 1 3 B】C h o l - R N A - N P が、血管周囲の T A M にトランスフェクトすることを示している。図 1 3 A は、C y 3 標識 C h o l - R N A - N P で処置されたマウスの K R 1 5 b 腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図 1 3 B ~ 1 3 H は、蛍光標識 C h o l - R N A - N P でワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内 G L 2 6 1 (1 3 B 、 1 3 D 、 1 3 F 、 1 3 H) または K R 1 5 8 b - ルシフェラーゼ (1 3 C 、 1 3 E 、 1 3 G) を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍 (C h o l (バルク)) 、および処置腫瘍内の R N A + 細胞 (C h o l (R N A +)) についての、C D 4 5 + である全細胞のパーセンテージ (図 1 3 B 、 1 3 C) 、マクロファージである C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 D ~ 1 3 E) 、抗原提示細胞である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 F ~ G) および C D 1 1 b + L y 6 G / 6 C + である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 H) として示されている。

20

【図 1 3 C】C h o l - R N A - N P が、血管周囲の T A M にトランスフェクトすることを示している。図 1 3 A は、C y 3 標識 C h o l - R N A - N P で処置されたマウスの K R 1 5 b 腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図 1 3 B ~ 1 3 H は、蛍光標識 C h o l - R N A - N P でワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内 G L 2 6 1 (1 3 B 、 1 3 D 、 1 3 F 、 1 3 H) または K R 1 5 8 b - ルシフェラーゼ (1 3 C 、 1 3 E 、 1 3 G) を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍 (C h o l (バルク)) 、および処置腫瘍内の R N A + 細胞 (C h o l (R N A +)) についての、C D 4 5 + である全細胞のパーセンテージ (図 1 3 B 、 1 3 C) 、マクロファージである C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 D ~ 1 3 E) 、抗原提示細胞である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 F ~ G) および C D 1 1 b + L y 6 G / 6 C + である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 H) として示されている。

30

【図 1 3 D】C h o l - R N A - N P が、血管周囲の T A M にトランスフェクトすることを示している。図 1 3 A は、C y 3 標識 C h o l - R N A - N P で処置されたマウスの K R 1 5 b 腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図 1 3 B ~ 1 3 H は、蛍光標識 C h o l - R N A - N P でワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内 G L 2 6 1 (1 3 B 、 1 3 D 、 1 3 F 、 1 3 H) または K R 1 5 8 b - ルシフェラーゼ (1 3 C 、 1 3 E 、 1 3 G) を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍 (C h o l (バルク)) 、および処置腫瘍内の R N A + 細胞 (C h o l (R N A +)) についての、C D 4 5 + である全細胞のパーセンテージ (図 1 3 B 、 1 3 C) 、マクロファージである C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 D ~ 1 3 E) 、抗原提示細胞である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 F ~ G) および C D 1 1 b + L y 6 G / 6 C + である C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ (図 1 3 H) として示さ

40

50

れている。

【図13E】Chol-RNA-NPが、血管周囲のTAMにトランスフェクトすることを示している。図13Aは、Cy3標識Chol-RNA-NPで処置されたマウスのKR15b腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図13B～13Hは、蛍光標識Chol-RNA-NPでワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内GL261（13B、13D、13F、13H）またはKR158b-ルシフェラーゼ（13C、13E、13G）を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍（Chol（バルク））、および処置腫瘍内のRNA+細胞（Chol（RNA+））についての、CD45+である全細胞のパーセンテージ（図13B、13C）、マクロファージであるCD45+細胞のパーセンテージ（図13D～13E）、抗原提示細胞であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13F～G）およびCD11b+Ly6G/6C+であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13H）として示されている。

10

【図13F】Chol-RNA-NPが、血管周囲のTAMにトランスフェクトすることを示している。図13Aは、Cy3標識Chol-RNA-NPで処置されたマウスのKR15b腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図13B～13Hは、蛍光標識Chol-RNA-NPでワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内GL261（13B、13D、13F、13H）またはKR158b-ルシフェラーゼ（13C、13E、13G）を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍（Chol（バルク））、および処置腫瘍内のRNA+細胞（Chol（RNA+））についての、CD45+である全細胞のパーセンテージ（図13B、13C）、マクロファージであるCD45+細胞のパーセンテージ（図13D～13E）、抗原提示細胞であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13F～G）およびCD11b+Ly6G/6C+であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13H）として示されている。

20

【図13G】Chol-RNA-NPが、血管周囲のTAMにトランスフェクトすることを示している。図13Aは、Cy3標識Chol-RNA-NPで処置されたマウスのKR15b腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図13B～13Hは、蛍光標識Chol-RNA-NPでワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内GL261（13B、13D、13F、13H）またはKR158b-ルシフェラーゼ（13C、13E、13G）を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍（Chol（バルク））、および処置腫瘍内のRNA+細胞（Chol（RNA+））についての、CD45+である全細胞のパーセンテージ（図13B、13C）、マクロファージであるCD45+細胞のパーセンテージ（図13D～13E）、抗原提示細胞であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13F～G）およびCD11b+Ly6G/6C+であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13H）として示されている。

30

【図13H】Chol-RNA-NPが、血管周囲のTAMにトランスフェクトすることを示している。図13Aは、Cy3標識Chol-RNA-NPで処置されたマウスのKR15b腫瘍および皮質の代表的な免疫蛍光画像である。図13B～13Hは、蛍光標識Chol-RNA-NPでワクチン接種された、またはされていない腫瘍のフローサイトメトリーのグラフである。データは、頭蓋内GL261（13B、13D、13F、13H）またはKR158b-ルシフェラーゼ（13C、13E、13G）を有するマウスの、未処置腫瘍、処置腫瘍（Chol（バルク））、および処置腫瘍内のRNA+細胞（Chol（RNA+））についての、CD45+である全細胞のパーセンテージ（図13B、13C）、マクロファージであるCD45+細胞のパーセンテージ（図13D～13E）、抗原提示細胞であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13F～G）およびCD11b+Ly6G/6C+であるCD45+細胞のパーセンテージ（図13H）として示されている。

40

【図14A】Chol-RNA-NPが、脳腫瘍においてCD45+細胞を活性化するこ

50

とを示している。図14A～14Dは、ワクチン接種して24時間後の、頭蓋内KR158b腫瘍における抗原提示細胞上の活性化マーカーのフローサイトメトリーのグラフである。図14A、F4/80+CD45+でのMHCII発現、図14B、MHCII+CD45+細胞でのCD80発現、図14C、MHCII+CD45+細胞でのCD86発現。

【図14B】Chol-RNA-NPが、脳腫瘍においてCD45+細胞を活性化することを示している。図14A～14Dは、ワクチン接種して24時間後の、頭蓋内KR158b腫瘍における抗原提示細胞上の活性化マーカーのフローサイトメトリーのグラフである。図14A、F4/80+CD45+でのMHCII発現、図14B、MHCII+CD45+細胞でのCD80発現、図14C、MHCII+CD45+細胞でのCD86発現。

10

【図14C】Chol-RNA-NPが、脳腫瘍においてCD45+細胞を活性化することを示している。図14A～14Dは、ワクチン接種して24時間後の、頭蓋内KR158b腫瘍における抗原提示細胞上の活性化マーカーのフローサイトメトリーのグラフである。図14A、F4/80+CD45+でのMHCII発現、図14B、MHCII+CD45+細胞でのCD80発現、図14C、MHCII+CD45+細胞でのCD86発現。

【図15A】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とする siRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP (15A) およびPDL1 (15B) の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C (MDSC) の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

20

【図15B】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とする siRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP (15A) およびPDL1 (15B) の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C (MDSC) の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

30

【図15C】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とする siRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP (15A) およびPDL1 (15B) の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C (MDSC) の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

40

【図15D】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とする siRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP (15A) およびPDL1 (15B) の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C (MDSC) の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

【図15E】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを

50

示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とするsiRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP(15A)およびPDL1(15B)の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C(MDSC)の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

【図15F】Chol-RNA-NPが、PDL1 siRNAを脳腫瘍に送達することを示している。図15A～15B、GFP mRNAおよびPDL1を標的とするsiRNAを有するChol-RNA-NPでDC2.4をトランスフェクションして48時間後の、GFP(15A)およびPDL1(15B)の発現。図15C、Chol-RNA-NPを静脈内注射して24時間後の、KR158b脳腫瘍におけるCy5標識PDL1-siRNAの取り込み。図15D～15F、MHCII、F4/80、およびCD11bおよびLy6G/6C(MDSC)の発現によって、トランスフェクトされた細胞を特徴付けるフローサイトメトリー。

10

【図15G】KLuc脳腫瘍において、siPDL1がPDL1の発現を減少させることを示している。図15G～15I、siPDL1を有するChol-RNA-NPでワクチン接種して24時間後の、CD45+MHCII+細胞でのPDL1発現。図15J、siPDL1を有するChol-RNA-NPで1日3回のワクチン接種を終えて24時間後の、頭蓋内KR158b-ルシフェラーゼ腫瘍中のCD11b+Ly6G/6C+細胞(MDSC)でのPDL1発現。

20

【図15H】KLuc脳腫瘍において、siPDL1がPDL1の発現を減少させることを示している。図15G～15I、siPDL1を有するChol-RNA-NPでワクチン接種して24時間後の、CD45+MHCII+細胞でのPDL1発現。図15J、siPDL1を有するChol-RNA-NPで1日3回のワクチン接種を終えて24時間後の、頭蓋内KR158b-ルシフェラーゼ腫瘍中のCD11b+Ly6G/6C+細胞(MDSC)でのPDL1発現。

【図15I】KLuc脳腫瘍において、siPDL1がPDL1の発現を減少させることを示している。図15G～15I、siPDL1を有するChol-RNA-NPでワクチン接種して24時間後の、CD45+MHCII+細胞でのPDL1発現。図15J、siPDL1を有するChol-RNA-NPで1日3回のワクチン接種を終えて24時間後の、頭蓋内KR158b-ルシフェラーゼ腫瘍中のCD11b+Ly6G/6C+細胞(MDSC)でのPDL1発現。

30

【図15J】KLuc脳腫瘍において、siPDL1がPDL1の発現を減少させることを示している。図15G～15I、siPDL1を有するChol-RNA-NPでワクチン接種して24時間後の、CD45+MHCII+細胞でのPDL1発現。図15J、siPDL1を有するChol-RNA-NPで1日3回のワクチン接種を終えて24時間後の、頭蓋内KR158b-ルシフェラーゼ腫瘍中のCD11b+Ly6G/6C+細胞(MDSC)でのPDL1発現。

【図16】市販のIONPおよび腫瘍抗原をコードするmRNAを、mRNA送達およびDC活性化に例外的な能力を有する以前に翻訳された脂質の組み合わせと、組み合わせることによって、IONPが生成されたことを示す模式図である。磁場の存在下または不在下で、これらの粒子をDCとインキュベーションすると、RNA発現の劇的な変化と抗原特異的T細胞を刺激する増強された能力とを特徴とする、著しいDC活性化がもたらされた。IONPは、マウス腫瘍モデルにおける生存率と直接関連するリンパ節へのDC遊走のMRIに基づく検出を可能にした。

40

【図17A】酸化鉄を負荷したRNAナノ粒子の開発および特性評価を示している。図17A、酸化鉄(FeO)を有するまたは有さないRNA-NPの代表的なクライオTEM。図17B、Nanosightによって評価された、FeO(100μg FeO:1mg脂質)を有するおよび有さないRNA-NPのサイズ分布。図17C、SQUID磁力計

50

で評価された、 IO-RNA-NP ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) の飽和磁化。図 17 D、異なる脂質: RNA 比で、RNA と 15 分間インキュベーションした後の、 IO-RNA-NP の異なる製剤 (脂質 mg あたりの各製剤における IONP の質量として標識されている) に結合した RNA を実証する、アガロースゲル電気泳動。図 17 E、様々な量の酸化鉄を含有する RNA-NP の RNA 結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とテューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図 17 F、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、DC2.4 の生存率 ($n=3$)。図 17 G、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と一晩インキュベーションした後の、DC2.4 による Cy5 標識 RNA の取り込み ($n=3$)。

10

【図 17 B】酸化鉄を負荷した RNA ナノ粒子の開発および特性評価を示している。図 17 A、酸化鉄 (IO) を有するまたは有さない RNA-NP の代表的なクライオ-TEM。図 17 B、*Nanosight* によって評価された、 IO ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) を有するおよび有さない RNA-NP のサイズ分布。図 17 C、*SQUID* 磁力計で評価された、 IO-RNA-NP ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) の飽和磁化。図 17 D、異なる脂質: RNA 比で、RNA と 15 分間インキュベーションした後の、 IO-RNA-NP の異なる製剤 (脂質 mg あたりの各製剤における IONP の質量として標識されている) に結合した RNA を実証する、アガロースゲル電気泳動。図 17 E、様々な量の酸化鉄を含有する RNA-NP の RNA 結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とテューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図 17 F、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、DC2.4 の生存率 ($n=3$)。図 17 G、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と一晩インキュベーションした後の、DC2.4 による Cy5 標識 RNA の取り込み ($n=3$)。

20

【図 17 C】酸化鉄を負荷した RNA ナノ粒子の開発および特性評価を示している。図 17 A、酸化鉄 (IO) を有するまたは有さない RNA-NP の代表的なクライオ-TEM。図 17 B、*Nanosight* によって評価された、 IO ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) を有するおよび有さない RNA-NP のサイズ分布。図 17 C、*SQUID* 磁力計で評価された、 IO-RNA-NP ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) の飽和磁化。図 17 D、異なる脂質: RNA 比で、RNA と 15 分間インキュベーションした後の、 IO-RNA-NP の異なる製剤 (脂質 mg あたりの各製剤における IONP の質量として標識されている) に結合した RNA を実証する、アガロースゲル電気泳動。図 17 E、様々な量の酸化鉄を含有する RNA-NP の RNA 結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とテューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図 17 F、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、DC2.4 の生存率 ($n=3$)。図 17 G、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と一晩インキュベーションした後の、DC2.4 による Cy5 標識 RNA の取り込み ($n=3$)。

30

【図 17 D】酸化鉄を負荷した RNA ナノ粒子の開発および特性評価を示している。図 17 A、酸化鉄 (IO) を有するまたは有さない RNA-NP の代表的なクライオ-TEM。図 17 B、*Nanosight* によって評価された、 IO ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) を有するおよび有さない RNA-NP のサイズ分布。図 17 C、*SQUID* 磁力計で評価された、 IO-RNA-NP ($100\mu\text{g}$ IO : 1mg 脂質) の飽和磁化。図 17 D、異なる脂質: RNA 比で、RNA と 15 分間インキュベーションした後の、 IO-RNA-NP の異なる製剤 (脂質 mg あたりの各製剤における IONP の質量として標識されている) に結合した RNA を実証する、アガロースゲル電気泳動。図 17 E、様々な量の酸化鉄を含有する RNA-NP の RNA 結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とテューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図 17 F、フローサイトメトリーにより評価された、 RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、DC2.4 の生存率 ($n=3$)。図 17 G、フローサイトメトリーにより評

40

50

価された、RNA-NPと一晚インキュベーションした後の、DC2.4によるCy5標識RNAの取り込み（ $n=3$ ）。

【図17E-17F】酸化鉄を負荷したRNAナノ粒子の開発および特性評価を示している。図17A、酸化鉄（IO）を有するまたは有さないRNA-NPの代表的なクライオ-TEM。図17B、Nanosightによって評価された、IO（ $100\mu\text{g}$ IO： 1mg 脂質）を有するおよび有さないRNA-NPのサイズ分布。図17C、SQUID磁力計で評価された、IO-RNA-NP（ $100\mu\text{g}$ IO： 1mg 脂質）の飽和磁化。図17D、異なる脂質：RNA比で、RNAと15分間インキュベーションした後の、IO-RNA-NPの異なる製剤（脂質 mg あたりの各製剤におけるIONPの質量として標識されている）に結合したRNAを実証する、アガロースゲル電気泳動。図17E、様々な量の酸化鉄を含有するRNA-NPのRNA結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とチューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図17F、フローサイトメトリーにより評価された、RNA-NPと24時間インキュベーションした後の、DC2.4の生存率（ $n=3$ ）。図17G、フローサイトメトリーにより評価された、RNA-NPと一晚インキュベーションした後の、DC2.4によるCy5標識RNAの取り込み（ $n=3$ ）。

10

【図17G】酸化鉄を負荷したRNAナノ粒子の開発および特性評価を示している。図17A、酸化鉄（IO）を有するまたは有さないRNA-NPの代表的なクライオ-TEM。図17B、Nanosightによって評価された、IO（ $100\mu\text{g}$ IO： 1mg 脂質）を有するおよび有さないRNA-NPのサイズ分布。図17C、SQUID磁力計で評価された、IO-RNA-NP（ $100\mu\text{g}$ IO： 1mg 脂質）の飽和磁化。図17D、異なる脂質：RNA比で、RNAと15分間インキュベーションした後の、IO-RNA-NPの異なる製剤（脂質 mg あたりの各製剤におけるIONPの質量として標識されている）に結合したRNAを実証する、アガロースゲル電気泳動。図17E、様々な量の酸化鉄を含有するRNA-NPのRNA結合能力。グラフ上の数値は、一元配置分散分析とチューキーの検定から得られた p 値であり、グループあたり $n=4$ である。図17F、フローサイトメトリーにより評価された、RNA-NPと24時間インキュベーションした後の、DC2.4の生存率（ $n=3$ ）。図17G、フローサイトメトリーにより評価された、RNA-NPと一晚インキュベーションした後の、DC2.4によるCy5標識RNAの取り込み（ $n=3$ ）。

20

【図18A】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図18A、脂質 1mg あたり様々な量の酸化鉄で合成されたRNA-NPと24時間インキュベーションした後の、DC2.4におけるGFP発現の代表的な画像。図18B、フローサイトメトリーを用いた（a）からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とチューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図18C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄（IO-リポソーム）、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有するGFP-RNA負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMDC中の蛍光。統計分析には、チューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図18D~18E、RNA-NPまたはIO-RNA-NPを介してOVA RNAが負荷されたDCを、OT1マウス由来のナイーブ脾細胞（d）または抗原を経験したOVA T細胞（e）と組み合わせた2日間の共培養後に、産生されたIFN- γ のELISA。図18F、磁場の存在下または不在下で、IO-RNA-NPと30分間インキュベートした後のDC2.4におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図18G、磁場の存在下または不在下で、IO-RNA-NPと30分間インキュベートして24時間後の、BMDCの生存率。図18H、磁場の存在下または不在下で、IO-RNA-NP（ $100\mu\text{g}$ IONP： 1mg 脂質）と、いずれか30分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMDCにおけるGFP発現。統計分析には、チューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図18I、磁場の存在下で、いずれか一晚または30分間、抗原ナイーブOT1 T細胞とOVA mRNAを有す

30

40

50

る I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 B】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2. 4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

10

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2. 4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

20

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

30

【図 18 C】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2. 4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2. 4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

40

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する

50

る I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 D】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

10

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

20

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

30

【図 18 E】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

40

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

50

【図 18 E】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 E】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

る I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 F】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

10

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

20

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

30

【図 18 G】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

40

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

50

【図 18 G】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 G】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2.4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2.4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A mRNA を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

る I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 18 H】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2. 4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

10

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。

図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2. 4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

20

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下

で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A m R N A を有する I O-RNA-NP で処置された BMD C との共培養の 2 日間に産生された、I F N- γ の E L I S A。すべての実験で、 $n=3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

30

【図 18 I】酸化鉄が、樹状細胞のトランスフェクションおよび活性化を増強することを示している。図 18 A、脂質 1 m g あたり様々な量の酸化鉄で合成された RNA-NP と 24 時間インキュベーションした後の、D C 2. 4 における G F P 発現の代表的な画像。図 18 B、フローサイトメトリーを用いた (a) からのトランスフェクション効率の定量化。統計分析には、ピアソンの相関とテューキーの検定を使用した分散分析を使用した。

図 18 C、酸化鉄を含まない、リポソーム内にカプセル化された酸化鉄 (I O-リポソーム)、またはリポソームの外側の培地に添加された酸化鉄、を有する G F P-RNA 負荷リポソームでトランスフェクションした後の、BMD C 中の蛍光。統計分析には、テューキーの検定を伴う分散分析を使用した。図 18 D ~ 18 E、RNA-NP または I O-RNA-NP を介して O V A RNA が負荷された D C を、O T 1 マウス由来のナイーブ脾細胞 (d) または抗原を経験した O V A T 細胞 (e) と組み合わせた 2 日間の共培養後に、産生された I F N- γ の E L I S A。

40

図 18 F、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートした後の D C 2. 4 におけるトランスフェクション効率。統計分析には、ピアソンの相関係数を使用した。図 18 G、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP と 30 分間インキュベートして 24 時間後の、BMD C

の生存率。図 18 H、磁場の存在下または不在下で、I O-RNA-NP (100 μ g I O N P : 1 m g 脂質) と、いずれか 30 分間インキュベーションした後の、あるいは磁場の不在下で、一晚インキュベーションした後の、BMD C における G F P 発現。統計分析には、テューキーの検定を伴う一元配置分散分析を使用した。図 18 I、磁場の存在下

50

で、いずれか一晚または 30 分間、抗原ナイーブ O T 1 T 細胞と O V A m R N A を有する

る I O - R N A - N P で処置された B M D C との共培養の 2 日間に産生された、I F N - γ の E L I S A 。すべての実験で、 $n = 3$ であり、エラーバーは平均からの標準偏差を表し、数値は、適宜、両側の対応のない 2 群の t 検定またはテューキーの検定から計算された P 値である。図 18 A ~ 18 C および 18 F ~ 18 I の結果は、それぞれ、少なくとも 2 回の反復実験を表している。 $n s$ = 有意差なし。

【図 19 A】I O - R N A - N P が、エレクトロポレーションと比較して、D C 活性化および遊走を増強することを示している。図 19 A、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P ($n = 3$) を介して G F P R N A で B M D C をトランスフェクションして 24 時間後の、代表的なフローサイトメトリープロット (左)、トランスフェクション効率 (中央) および幾何平均蛍光強度 (右)。図 19 B、C y 3 標識 R N A - N P と一晚インキュベートした D C 2 . 4 の蛍光顕微鏡画像。図 19 C、I O - R N A - N P、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して 24 時間後の、B M D C における R N A 発現を比較するヒートマップ。図 19 D ~ 19 E、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P で処置して 24 時間後の、B M D C についての、フローサイトメトリーにより評価された活性化の表現型マーカー (図 19 D) および E L I S A により評価された I F N - α 放出 (図 19 E)。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図 19 F、皮内注射後の様々な時点での I O - R N A - N P 負荷 B M D C の V D L N への遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定 ($n > 4$) またはスチューデントの対応のある t 検定 ($n < 4$) で完了した。図 19 G、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P を介して O V A m R N A でパルスした 500, 000 個の B M D C、および 10, 000, 000 個のナイーブ O T 1 T 細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下 B 16 F 10 - O V A 腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖 (未処置: $n = 6$ 、エレクトロポレーション: $n = 6$ 、I O - R N A - N P: $n = 13$)。データは、2 つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図 19 A、19 B、および 19 D ~ 19 G の結果は、少なくとも 2 回の反復実験を表している。グラフ上の数値は P 値である

【図 19 B】I O - R N A - N P が、エレクトロポレーションと比較して、D C 活性化および遊走を増強することを示している。図 19 A、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P ($n = 3$) を介して G F P R N A で B M D C をトランスフェクションして 24 時間後の、代表的なフローサイトメトリープロット (左)、トランスフェクション効率 (中央) および幾何平均蛍光強度 (右)。図 19 B、C y 3 標識 R N A - N P と一晚インキュベートした D C 2 . 4 の蛍光顕微鏡画像。図 19 C、I O - R N A - N P、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して 24 時間後の、B M D C における R N A 発現を比較するヒートマップ。図 19 D ~ 19 E、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P で処置して 24 時間後の、B M D C についての、フローサイトメトリーにより評価された活性化の表現型マーカー (図 19 D) および E L I S A により評価された I F N - α 放出 (図 19 E)。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図 19 F、皮内注射後の様々な時点での I O - R N A - N P 負荷 B M D C の V D L N への遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定 ($n > 4$) またはスチューデントの対応のある t 検定 ($n < 4$) で完了した。図 19 G、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P を介して O V A m R N A でパルスした 500, 000 個の B M D C、および 10, 000, 000 個のナイーブ O T 1 T 細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下 B 16 F 10 - O V A 腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖 (未処置: $n = 6$ 、エレクトロポレーション: $n = 6$ 、I O - R N A - N P: $n = 13$)。データは、2 つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図 19 A、19 B、および 19 D ~ 19 G の結果は、少なくとも 2 回の反復実験を表している。グラフ上の数値は P 値である

【図 19 C】I O - R N A - N P が、エレクトロポレーションと比較して、D C 活性化および遊走を増強することを示している。図 19 A、エレクトロポレーションまたは I O - R N A - N P ($n = 3$) を介して G F P R N A で B M D C をトランスフェクションして

10

20

30

40

50

24時間後の、代表的なフローサイトメトリプロット（左）、トランスフェクション効率（中央）および幾何平均蛍光強度（右）。図19B、Cy3標識RNA-NPと一晚インキュベートしたDC2.4の蛍光顕微鏡画像。図19C、IO-RNA-NP、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して24時間後の、BMDCにおけるRNA発現を比較するヒートマップ。図19D~19E、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、BMDCについての、フローサイトメトリにより評価された活性化の表現型マーカー（図19D）およびELISAにより評価されたIFN- α 放出（図19E）。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図19F、皮下注射後の様々な時点でのIO-RNA-NP負荷BMDCのVDLNへの遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定（ $n > 4$ ）またはスチューデントの対応のあるt検定（ $n < 4$ ）で完了した。図19G、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPを介してOVA mRNAでパルスした500,000個のBMDC、および10,000,000個のナイーブOT1 T細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖（未処置： $n = 6$ 、エレクトロポレーション： $n = 6$ 、IO-RNA-NP： $n = 13$ ）。データは、2つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図19A、19B、および19D~19Gの結果は、少なくとも2回の反復実験を表している。グラフ上の数値はP値である

【図19D】IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションと比較して、DC活性化および遊走を増強することを示している。図19A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NP（ $n = 3$ ）を介してGFP RNAでBMDCをトランスフェクションして24時間後の、代表的なフローサイトメトリプロット（左）、トランスフェクション効率（中央）および幾何平均蛍光強度（右）。図19B、Cy3標識RNA-NPと一晚インキュベートしたDC2.4の蛍光顕微鏡画像。図19C、IO-RNA-NP、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して24時間後の、BMDCにおけるRNA発現を比較するヒートマップ。図19D~19E、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、BMDCについての、フローサイトメトリにより評価された活性化の表現型マーカー（図19D）およびELISAにより評価されたIFN- α 放出（図19E）。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図19F、皮下注射後の様々な時点でのIO-RNA-NP負荷BMDCのVDLNへの遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定（ $n > 4$ ）またはスチューデントの対応のあるt検定（ $n < 4$ ）で完了した。図19G、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPを介してOVA mRNAでパルスした500,000個のBMDC、および10,000,000個のナイーブOT1 T細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖（未処置： $n = 6$ 、エレクトロポレーション： $n = 6$ 、IO-RNA-NP： $n = 13$ ）。データは、2つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図19A、19B、および19D~19Gの結果は、少なくとも2回の反復実験を表している。グラフ上の数値はP値である

【図19E】IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションと比較して、DC活性化および遊走を増強することを示している。図19A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NP（ $n = 3$ ）を介してGFP RNAでBMDCをトランスフェクションして24時間後の、代表的なフローサイトメトリプロット（左）、トランスフェクション効率（中央）および幾何平均蛍光強度（右）。図19B、Cy3標識RNA-NPと一晚インキュベートしたDC2.4の蛍光顕微鏡画像。図19C、IO-RNA-NP、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して24時間後の、BMDCにおけるRNA発現を比較するヒートマップ。図19D~19E、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、BMDCについての、フローサイトメトリにより評価された活性化の表現型マーカー（図19D）およびELISAにより評価されたIFN- α 放出（図19E）。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使

用した。図19F、皮内注射後の様々な時点でのIO-RNA-NP負荷BMDCのVDLNへの遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定 ($n > 4$) またはスチューデントの対応のあるt検定 ($n < 4$) で完了した。図19G、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPを介してOVA mRNAでパルスした500, 000個のBMDC、および10, 000, 000個のナイーブOT1 T細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖（未処置：n=6、エレクトロポレーション：n=6、IO-RNA-NP：n=13）。データは、2つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図19A、19B、および19D~19Gの結果は、少なくとも2回の反復実験を表している。グラフ上の数値はP値である

【図19F】IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションと比較して、DC活性化および遊走を増強することを示している。図19A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NP (n=3) を介してGFP RNAでBMDCをトランスフェクションして24時間後の、代表的なフローサイトメトリープロット（左）、トランスフェクション効率（中央）および幾何平均蛍光強度（右）。図19B、Cy3標識RNA-NPと一晚インキュベートしたDC2.4の蛍光顕微鏡画像。図19C、IO-RNA-NP、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して24時間後の、BMDCにおけるRNA発現を比較するヒートマップ。図19D~19E、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、BMDCについての、フローサイトメトリーにより評価された活性化の表現型マーカー（図19D）およびELISAにより評価されたIFN- α 放出（図19E）。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図19F、皮内注射後の様々な時点でのIO-RNA-NP負荷BMDCのVDLNへの遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定 ($n > 4$) またはスチューデントの対応のあるt検定 ($n < 4$) で完了した。図19G、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPを介してOVA mRNAでパルスした500, 000個のBMDC、および10, 000, 000個のナイーブOT1 T細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖（未処置：n=6、エレクトロポレーション：n=6、IO-RNA-NP：n=13）。データは、2つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用した。図19A、19B、および19D~19Gの結果は、少なくとも2回の反復実験を表している。グラフ上の数値はP値である

【図19G】IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションと比較して、DC活性化および遊走を増強することを示している。図19A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NP (n=3) を介してGFP RNAでBMDCをトランスフェクションして24時間後の、代表的なフローサイトメトリープロット（左）、トランスフェクション効率（中央）および幾何平均蛍光強度（右）。図19B、Cy3標識RNA-NPと一晚インキュベートしたDC2.4の蛍光顕微鏡画像。図19C、IO-RNA-NP、エレクトロポレーション、または培地のみで処置して24時間後の、BMDCにおけるRNA発現を比較するヒートマップ。図19D~19E、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、BMDCについての、フローサイトメトリーにより評価された活性化の表現型マーカー（図19D）およびELISAにより評価されたIFN- α 放出（図19E）。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図19F、皮内注射後の様々な時点でのIO-RNA-NP負荷BMDCのVDLNへの遊走。統計分析は、ウィルコクソンのマッチドペア順位和検定 ($n > 4$) またはスチューデントの対応のあるt検定 ($n < 4$) で完了した。図19G、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPを介してOVA mRNAでパルスした500, 000個のBMDC、および10, 000, 000個のナイーブOT1 T細胞で単回ワクチン接種した後の、皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖（未処置：n=6、エレクトロポレーション：n=6、IO-RNA-NP：n=13）。データは、2つの独立した実験からプールされている。統計分析には、二元配置分散分析を使用

10

20

30

40

50

した。図19A、19B、および19D～19Gの結果は、少なくとも2回の反復実験を表している。グラフ上の数値はP値である

【図20A】IO-RNA-NPが、MRIによる定量的な細胞追跡を可能にすることを示している。図20A、左鼠径部にIO-RNA-NP負荷DsRed+ DCをワクチン接種して48時間後の、T2*強調MRI画像。黄色の境界線は、処置（右）側と未処置（左）側のリンパ節を示す。図20B、リンパ節におけるDsRed+細胞でのゲーティングを実証する例示的なフローサイトメトリプロット。図20C、処置および未処置リンパ節との間の相対リンパ節サイズの相関、ならびにそのリンパ節におけるDCの絶対数。データは、2つの独立した実験から組み合わされている。図20D、処置および未処置のリンパ節における相対T2*強調MRI強度と標識細胞の絶対数との相関。データは、2回の反復実験を表している。p値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

10

【図20B】IO-RNA-NPが、MRIによる定量的な細胞追跡を可能にすることを示している。図20A、左鼠径部にIO-RNA-NP負荷DsRed+ DCをワクチン接種して48時間後の、T2*強調MRI画像。黄色の境界線は、処置（右）側と未処置（左）側のリンパ節を示す。図20B、リンパ節におけるDsRed+細胞でのゲーティングを実証する例示的なフローサイトメトリプロット。図20C、処置および未処置リンパ節との間の相対リンパ節サイズの相関、ならびにそのリンパ節におけるDCの絶対数。データは、2つの独立した実験から組み合わされている。図20D、処置および未処置のリンパ節における相対T2*強調MRI強度と標識細胞の絶対数との相関。データは、2回の反復実験を表している。p値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

20

【図20C】IO-RNA-NPが、MRIによる定量的な細胞追跡を可能にすることを示している。図20A、左鼠径部にIO-RNA-NP負荷DsRed+ DCをワクチン接種して48時間後の、T2*強調MRI画像。黄色の境界線は、処置（右）側と未処置（左）側のリンパ節を示す。図20B、リンパ節におけるDsRed+細胞でのゲーティングを実証する例示的なフローサイトメトリプロット。図20C、処置および未処置リンパ節との間の相対リンパ節サイズの相関、ならびにそのリンパ節におけるDCの絶対数。データは、2つの独立した実験から組み合わされている。図20D、処置および未処置のリンパ節における相対T2*強調MRI強度と標識細胞の絶対数との相関。データは、2回の反復実験を表している。p値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

【図20D】IO-RNA-NPが、MRIによる定量的な細胞追跡を可能にすることを示している。図20A、左鼠径部にIO-RNA-NP負荷DsRed+ DCをワクチン接種して48時間後の、T2*強調MRI画像。黄色の境界線は、処置（右）側と未処置（左）側のリンパ節を示す。図20B、リンパ節におけるDsRed+細胞でのゲーティングを実証する例示的なフローサイトメトリプロット。図20C、処置および未処置リンパ節との間の相対リンパ節サイズの相関、ならびにそのリンパ節におけるDCの絶対数。データは、2つの独立した実験から組み合わされている。図20D、処置および未処置のリンパ節における相対T2*強調MRI強度と標識細胞の絶対数との相関。データは、2回の反復実験を表している。p値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

30

【図21A】MRIで検出されたDC遊走が、DCワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下B16F10-OVA腫瘍を有するマウスは、オボアルブミンmRNAを有するIO-RNA-NPを負荷したBMDCで処置された。図21A、処置マウス（n=7）と未処置マウス（n=5）との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のない学生t検定により計算されたP値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図21B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図21C、2日目と27日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、MRI検出リンパ節強度の相対変化の相関（相対LN強度）。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。下位25パーセンタイルにおける相対VDLN強度により示される大幅なMRI予測DC遊走を有するマウスからのデータポイントは、図21Eおよび図21EのXであり、中央の50パーセンタイルにおける中程度のVDLN強度を有するマウス

40

50

スからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 1 B】M R I で検出された D C 遊走が、D C ワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下 B 1 6 F 1 0 - O V A 腫瘍を有するマウスは、オボアルブミン m R N A を有する I O - R N A - N P を負荷した B M D C で処置された。図 2 1 A、処置マウス (n = 7) と未処置マウス (n = 5) との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントの t 検定により計算された P 値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図 2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図 2 1 C、2 日目と 2 7 日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、M R I 検出リンパ節強度の相対変化の相関 (相対 L N 強度)。点線は、リンパ節相対 M R I 強度の 2 5 パーセンタイルと 7 5 パーセンタイルを示している。下位 2 5 パーセンタイルにおける相対 V D L N 強度により示される大幅な M R I 予測 D C 遊走を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 E および図 2 1 E の X であり、中央の 5 0 パーセンタイルにおける中程度の V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 1 C】M R I で検出された D C 遊走が、D C ワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下 B 1 6 F 1 0 - O V A 腫瘍を有するマウスは、オボアルブミン m R N A を有する I O - R N A - N P を負荷した B M D C で処置された。図 2 1 A、処置マウス (n = 7) と未処置マウス (n = 5) との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントの t 検定により計算された P 値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図 2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図 2 1 C、2 日目と 2 7 日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、M R I 検出リンパ節強度の相対変化の相関 (相対 L N 強度)。点線は、リンパ節相対 M R I 強度の 2 5 パーセンタイルと 7 5 パーセンタイルを示している。下位 2 5 パーセンタイルにおける相対 V D L N 強度により示される大幅な M R I 予測 D C 遊走を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 E および図 2 1 E の X であり、中央の 5 0 パーセンタイルにおける中程度の V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 1 D】M R I で検出された D C 遊走が、D C ワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下 B 1 6 F 1 0 - O V A 腫瘍を有するマウスは、オボアルブミン m R N

10

20

30

40

50

Aを有するI O-RNA-NPを負荷したBMD Cで処置された。図2 1 A、処置マウス（ $n=7$ ）と未処置マウス（ $n=5$ ）との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントのt検定により計算されたP値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図2 1 C、2日目と27日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、MRI検出リンパ節強度の相対変化の相関（相対LN強度）。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。下位25パーセンタイルにおける相対VDLN強度により示される大幅なMRI予測DC遊走を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Eおよび図2 1 EのXであり、中央の50パーセンタイルにおける中程度のVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの点であり、上位75パーセンタイルにおける高いVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの四角である。図2 1 D~2 1 E、2日目のMRI検出DC遊走と、腫瘍サイズ（d）および生存率（ $n=10$ ）（e）との相関。グラフc~eの数値は、ピアソンの相関係数（r）とP値（p）を表している。図2 1 F~2 1 H、ワクチン接種後2日目のMRI強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線（図2 1 F）、要約データ（図2 1 G）、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析（図2 1 G）および両側の対応のないt検定（図2 1 H）から計算されたp値である。

【図2 1 E】MRIで検出されたDC遊走が、DCワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下B16 F10-OVA腫瘍を有するマウスは、オボアルブミンmRNAを有するI O-RNA-NPを負荷したBMD Cで処置された。図2 1 A、処置マウス（ $n=7$ ）と未処置マウス（ $n=5$ ）との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントのt検定により計算されたP値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図2 1 C、2日目と27日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、MRI検出リンパ節強度の相対変化の相関（相対LN強度）。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。下位25パーセンタイルにおける相対VDLN強度により示される大幅なMRI予測DC遊走を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Eおよび図2 1 EのXであり、中央の50パーセンタイルにおける中程度のVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの点であり、上位75パーセンタイルにおける高いVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの四角である。図2 1 D~2 1 E、2日目のMRI検出DC遊走と、腫瘍サイズ（d）および生存率（ $n=10$ ）（e）との相関。グラフc~eの数値は、ピアソンの相関係数（r）とP値（p）を表している。図2 1 F~2 1 H、ワクチン接種後2日目のMRI強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線（図2 1 F）、要約データ（図2 1 G）、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析（図2 1 G）および両側の対応のないt検定（図2 1 H）から計算されたp値である。

【図2 1 F】MRIで検出されたDC遊走が、DCワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下B16 F10-OVA腫瘍を有するマウスは、オボアルブミンmRNAを有するI O-RNA-NPを負荷したBMD Cで処置された。図2 1 A、処置マウス（ $n=7$ ）と未処置マウス（ $n=5$ ）との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントのt検定により計算されたP値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図2 1 C、2日目と27日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、MRI検出リンパ節強度の相対変化の相関（相対LN強度）。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。下位25パーセンタイルにおける相対VDLN強度により示される大幅なMRI予測DC遊走を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Eおよび図2 1 EのXであり、中央の50パーセンタイルにおける中程度のVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの点であり、上位75パーセンタイルにおける高いVDLN強度を有するマウスからのデータポイントは、図2 1 Dおよび図2 1 Eの四角である。図2 1 D~2 1 E、2日目のMRI検出DC遊走と、腫瘍サイズ（d）および生存率（ $n=10$ ）（e）との相関。グラフc~eの数値は、ピアソンの相関係数（r）とP値（p）を表している。図2 1 F~2 1 H、ワクチン接種後2日目のMRI強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線（図2 1 F）、要約データ（図2 1 G）、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析（図2 1 G）および両側の対応のないt検定（図2 1 H）から計算されたp値である。

スからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 1 G】M R I で検出された D C 遊走が、D C ワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下 B 1 6 F 1 0 - O V A 腫瘍を有するマウスは、オボアルブミン m R N A を有する I O - R N A - N P を負荷した B M D C で処置された。図 2 1 A、処置マウス (n = 7) と未処置マウス (n = 5) との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントの t 検定により計算された P 値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図 2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図 2 1 C、2 日目と 2 7 日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、M R I 検出リンパ節強度の相対変化の相関 (相対 L N 強度)。点線は、リンパ節相対 M R I 強度の 2 5 パーセンタイルと 7 5 パーセンタイルを示している。下位 2 5 パーセンタイルにおける相対 V D L N 強度により示される大幅な M R I 予測 D C 遊走を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 E および図 2 1 E の X であり、中央の 5 0 パーセンタイルにおける中程度の V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 1 H】M R I で検出された D C 遊走が、D C ワクチンに対する応答を予測することを示している。皮下 B 1 6 F 1 0 - O V A 腫瘍を有するマウスは、オボアルブミン m R N A を有する I O - R N A - N P を負荷した B M D C で処置された。図 2 1 A、処置マウス (n = 7) と未処置マウス (n = 5) との間の経時的な腫瘍増殖。グラフ上の数値は、対応のないスチューデントの t 検定により計算された P 値である。経時的な腫瘍増殖の比較は、二元配置分散分析で評価されている。図 2 1 B、「応答者」と「非応答者」に分けられた、個々の処置された腫瘍増殖。図 2 1 C、2 日目と 2 7 日目の腫瘍サイズでの未処置リンパ節と比較した処置リンパ節における、M R I 検出リンパ節強度の相対変化の相関 (相対 L N 強度)。点線は、リンパ節相対 M R I 強度の 2 5 パーセンタイルと 7 5 パーセンタイルを示している。下位 2 5 パーセンタイルにおける相対 V D L N 強度により示される大幅な M R I 予測 D C 遊走を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 E および図 2 1 E の X であり、中央の 5 0 パーセンタイルにおける中程度の V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の点であり、上位 7 5 パーセンタイルにおける高い V D L N 強度を有するマウスからのデータポイントは、図 2 1 D および図 2 1 E の四角である。図 2 1 D ~ 2 1 E、2 日目の M R I 検出 D C 遊走と、腫瘍サイズ (d) および生存率 (n = 1 0) (e) との相関。グラフ c ~ e の数値は、ピアソンの相関係数 (r) と P 値 (p) を表している。図 2 1 F ~ 2 1 H、ワクチン接種後 2 日目の M R I 強度によって分離された複数の時点での、個々の腫瘍増殖曲線 (図 2 1 F)、要約データ (図 2 1 G)、および腫瘍サイズ。グラフ上の数値は、分散分析 (図 2 1 G) および両側の対応のない t 検定 (図 2 1 H) から計算された p 値である。

【図 2 2 A】ワクチン後 2 日目の M R I 検出 D C 遊走が、治療用 D C ワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図 2 2 A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側

10

20

30

40

50

腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

10

【図22B】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

20

【図22C】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

30

【図22D】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個の

40

50

BMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

10

【図22E】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

20

【図22F】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存を追跡した。図22B、死亡前のすべての処置マウス(n=9)についての、個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。図22C~22D、2日目のT2*強調MRI強度と、14日目(c)および17日目(図22D)の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対MRI強度の25パーセンタイルと75パーセンタイルを示している。図22E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線(左)および要約データ(右)。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算されたp値である。図22F、2日目のT2*強調MRI強度と生存率の相関。図22G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算されたp値である。図22C、22D、および22FのP値とr値は、ピアソン相関から導出されている。

30

【図22G】ワクチン後2日目のMRI検出DC遊走が、治療用DCワクチンの抗腫瘍効果を予測することを示している。図22A、処置スケジュールの概略図。マウスは、外側腹部に1,000,000個のB16F10-OVA細胞の皮下注射を受けた。5日目に、マウスは、OVA RNAを有する10-RNA-NPを負荷した500,000個のBMDCの皮内(i.d.)注射と、10,000,000個のOT1 T細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。2日後にマウスをMRIでイメージングし、腫瘍増殖と生存

40

50

を追跡した。図 2 2 B、死亡前のすべての処置マウス（ $n = 9$ ）についての、個々の腫瘍増殖曲線（左）および要約データ（右）。図 2 2 C ~ 2 2 D、2 日目の T 2 * 強調 M R I 強度と、1 4 日目（c）および 1 7 日目（図 2 2 D）の腫瘍サイズとの相関。点線は、リンパ節相対 M R I 強度の 2 5 パーセントイルと 7 5 パーセントイルを示している。図 2 2 E、すべての処置マウスの死亡を通じた個々の腫瘍増殖曲線（左）および要約データ（右）。グラフの数値は、有意性について、二元配置分散分析を使用して計算された p 値である。図 2 2 F、2 日目の T 2 * 強調 M R I 強度と生存率の相関。図 2 2 G、すべての処置されたマウスの生存曲線。グラフ上の数値は、対数順位検定を使用して計算された p 値である。図 2 2 C、2 2 D、および 2 2 F の P 値と r 値は、ピアソン相関から導出されている。

10

【図 2 3】未処置マウス、または C h o l - R N A - N P、R N A - N P、もしくは C y 5 標識 R N A のみで処置されたマウスの、肺（上段）、脾臓（中段）、または肝臓（下段）で検出された、C y 5 + 細胞（左列）、または C D 4 5 + M H C クラス I I + C y 5 + 細胞（右列）の一連のグラフである。

【図 2 4】未処置マウス、または C h o l - R N A - N P もしくは C h o l - s i R N A - N P で処置されたマウスについての、% G F P（左）または % P D L 1（右）の一对のグラフである。

【図 2 5 A】翻訳可能なナノ粒子がトランスフェクトされ、D C を活性化することを示している。図 2 5 A、各 R N A を負荷した粒子と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C における G F P 発現。図 2 5 B、各粒子構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C での C D 4 0、C D 8 0、および C D 8 6 の共発現。図 2 5 C、各構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C の生存率。図 2 5 D、B M D C に O V A R N A を有する I O - R N A - N P を負荷し、O V A 特異的 O T 1 T 細胞とインキュベートした。T 細胞の活性化は、E L I S A により評価された I F N - γ として示されている。図 2 5 E、D O T A P のスコアに正規化された各製剤について、生存率、トランスフェクション効率、活性化、および T 細胞刺激の平均値の積として計算された相対活性化スコア。

20

【図 2 5 B】翻訳可能なナノ粒子がトランスフェクトされ、D C を活性化することを示している。図 2 5 A、各 R N A を負荷した粒子と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C における G F P 発現。図 2 5 B、各粒子構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C での C D 4 0、C D 8 0、および C D 8 6 の共発現。図 2 5 C、各構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C の生存率。図 2 5 D、B M D C に O V A R N A を有する I O - R N A - N P を負荷し、O V A 特異的 O T 1 T 細胞とインキュベートした。T 細胞の活性化は、E L I S A により評価された I F N - γ として示されている。図 2 5 E、D O T A P のスコアに正規化された各製剤について、生存率、トランスフェクション効率、活性化、および T 細胞刺激の平均値の積として計算された相対活性化スコア。

30

【図 2 5 C】翻訳可能なナノ粒子がトランスフェクトされ、D C を活性化することを示している。図 2 5 A、各 R N A を負荷した粒子と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C における G F P 発現。図 2 5 B、各粒子構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C での C D 4 0、C D 8 0、および C D 8 6 の共発現。図 2 5 C、各構築物と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C の生存率。図 2 5 D、B M D C に O V A R N A を有する I O - R N A - N P を負荷し、O V A 特異的 O T 1 T 細胞とインキュベートした。T 細胞の活性化は、E L I S A により評価された I F N - γ として示されている。図 2 5 E、D O T A P のスコアに正規化された各製剤について、生存率、トランスフェクション効率、活性化、および T 細胞刺激の平均値の積として計算された相対活性化スコア。

40

【図 2 5 D】翻訳可能なナノ粒子がトランスフェクトされ、D C を活性化することを示している。図 2 5 A、各 R N A を負荷した粒子と 2 4 時間インキュベーションした後の、B M D C における G F P 発現。図 2 5 B、各粒子構築物と 2 4 時間インキュベーションした

50

後の、BMDCでのCD40、CD80、およびCD86の共発現。図25C、各構築物と24時間インキュベーションした後の、BMDCの生存率。図25D、BMDCにOVA RNAを有するIO-RNA-NPを負荷し、OVA特異的OT1 T細胞とインキュベートした。T細胞の活性化は、ELISAにより評価されたIFN- γ として示されている。図25E、DOTAPのスコアに正規化された各製剤について、生存率、トランスフェクション効率、活性化、およびT細胞刺激の平均値の積として計算された相対活性化スコア。

【図25E】翻訳可能なナノ粒子がトランスフェクトされ、DCを活性化することを示している。図25A、各RNAを負荷した粒子と24時間インキュベーションした後の、BMDCにおけるGFP発現。図25B、各粒子構築物と24時間インキュベーションした後の、BMDCでのCD40、CD80、およびCD86の共発現。図25C、各構築物と24時間インキュベーションした後の、BMDCの生存率。図25D、BMDCにOVA RNAを有するIO-RNA-NPを負荷し、OVA特異的OT1 T細胞とインキュベートした。T細胞の活性化は、ELISAにより評価されたIFN- γ として示されている。図25E、DOTAPのスコアに正規化された各製剤について、生存率、トランスフェクション効率、活性化、およびT細胞刺激の平均値の積として計算された相対活性化スコア。

【図26A】IO-RNA-NPが、抗原特異的なDC活性化を誘導することを示している。図26A、ゲーティング戦略。陽性集団は、蛍光マイナス1 (fluorescence minus one、FMO) 対照を使用して選択された。図26B、RNA-NPまたはIO-RNA-NPと24時間インキュベーションした後の、BMDCでのCD86の発現およびCD80とCD86の共発現。データは、幾何平均蛍光強度およびパーセンテージとしてプロットされている。統計比較には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。グラフ上の数値は、P値である。図26C、BMDCに、OVA RNAまたはGFP RNAのいずれかを有するIO-RNA-NPを負荷し、OVA特異的OT1 T細胞とインキュベートした。T細胞の活性化は、ELISAにより評価されたIFN- γ として示されている。

【図26B】IO-RNA-NPが、抗原特異的なDC活性化を誘導することを示している。図26A、ゲーティング戦略。陽性集団は、蛍光マイナス1 (fluorescence minus one、FMO) 対照を使用して選択された。図26B、RNA-NPまたはIO-RNA-NPと24時間インキュベーションした後の、BMDCでのCD86の発現およびCD80とCD86の共発現。データは、幾何平均蛍光強度およびパーセンテージとしてプロットされている。統計比較には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。グラフ上の数値は、P値である。図26C、BMDCに、OVA RNAまたはGFP RNAのいずれかを有するIO-RNA-NPを負荷し、OVA特異的OT1 T細胞とインキュベートした。T細胞の活性化は、ELISAにより評価されたIFN- γ として示されている。

【図26C】IO-RNA-NPが、抗原特異的なDC活性化を誘導することを示している。図26A、ゲーティング戦略。陽性集団は、蛍光マイナス1 (fluorescence minus one、FMO) 対照を使用して選択された。図26B、RNA-NPまたはIO-RNA-NPと24時間インキュベーションした後の、BMDCでのCD86の発現およびCD80とCD86の共発現。データは、幾何平均蛍光強度およびパーセンテージとしてプロットされている。統計比較には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。グラフ上の数値は、P値である。図26C、BMDCに、OVA RNAまたはGFP RNAのいずれかを有するIO-RNA-NPを負荷し、OVA特異的OT1 T細胞とインキュベートした。T細胞の活性化は、ELISAにより評価されたIFN- γ として示されている。

【図27-1】IO-RNA-NPが、抗ウイルス遺伝子セットの発現を誘導することを示している。IO-RNA-NPまたはエレクトロポレーションのいずれかを介してGFP mRNAで処置して24時間後の、初代BMDCにおけるRNAの取り込みおよびブ

10

20

30

40

50

ロセシングに関連する8つの遺伝子セットの遺伝子セットエンリッチメントプロット。

【図27-2】IO-RNA-NPが、抗ウイルス遺伝子セットの発現を誘導することを示している。IO-RNA-NPまたはエレクトロポレーションのいずれかを介してGFP mRNAで処置して24時間後の、初代BMD CにおけるRNAの取り込みおよびプロセシングに関連する8つの遺伝子セットの遺伝子セットエンリッチメントプロット。

【図27-3】IO-RNA-NPが、抗ウイルス遺伝子セットの発現を誘導することを示している。IO-RNA-NPまたはエレクトロポレーションのいずれかを介してGFP mRNAで処置して24時間後の、初代BMD CにおけるRNAの取り込みおよびプロセシングに関連する8つの遺伝子セットの遺伝子セットエンリッチメントプロット。

【図27-4】IO-RNA-NPが、抗ウイルス遺伝子セットの発現を誘導することを示している。IO-RNA-NPまたはエレクトロポレーションのいずれかを介してGFP mRNAで処置して24時間後の、初代BMD CにおけるRNAの取り込みおよびプロセシングに関連する8つの遺伝子セットの遺伝子セットエンリッチメントプロット。

【図28A】IO-RNA-NPが、BMD Cの活性化を増強することを示している。図28A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、フローサイトメトリーにより評価されたBMD Cでの活性化の表現型マーカー。データは、幾何平均蛍光強度として表されている。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図28B、自動セルカウンターにより評価された、エレクトロポレーション、またはRNA-NPもしくはIO-RNA-NPとインキュベーションして24時間後の、BMD C生存率。

【図28B】IO-RNA-NPが、BMD Cの活性化を増強することを示している。図28A、エレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処置して24時間後の、フローサイトメトリーにより評価されたBMD Cでの活性化の表現型マーカー。データは、幾何平均蛍光強度として表されている。統計分析には、一元配置分散分析およびテューキーの検定を使用した。図28B、自動セルカウンターにより評価された、エレクトロポレーション、またはRNA-NPもしくはIO-RNA-NPとインキュベーションして24時間後の、BMD C生存率。

【図29A】脂質ライブラリの要約データを示す表である。特に断らない限り、リポソームは、列挙された成分から1:1の比率で形成された。各粒子構築物について、GFP mRNAを有するBMD Cとインキュベーションして24時間後に、またはOVAでトランスフェクトされたBMD CをOVA特異的OT1 T細胞とインキュベーションして48時間後に得られた要約データを示す。活性化スコアは、トランスフェクトされた細胞(GFP(%))、活性化された細胞(CD40+CD80+CD86+(%))、生存率(%）、およびT細胞刺激能力(IFN- γ (pg/mL))の積として計算されている。相対活性化スコアは、(活性化スコア試料)/(活性化スコアDOTAP)として計算されている。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、Chol=コレステロール、DOPE=1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、DMPC=1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DPPC=1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、DOTMA=1, 2-ジ- α -オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン。*リポソームMPLは、コレステロール:DMPG:DPPC:MPLAの比率が5.2:1.1:8.7:0.15の脂質とアジュバントモノホスホリルリピドA(MPLA)の混合物である。

【図29B】酸化鉄を負荷したRNAナノ粒子の特性評価を示す表である。ゼータ電位およびサイズ(Nanosightで測定)は、平均+/-標準偏差として表示されている。結果は、各ゼータ電位について3回の反復実験、および各サイズについて4回測定した代表的な要約データである。サイズ測定は、リポソームに結合したRNAを用いて完了した。ゼータ電位は、RNAを含まないリポソームについて測定された。

【発明を実施するための形態】

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書において、リンパ節へのDC遊走を増強し、広く利用可能なMRIに基づくイメージングモダリティを使用してインビボでの遊走を追跡する、二機能性RNA負荷ナノ粒子(RNA-NP)の開発につながるデータが、初めて提示される。本明細書に記載されるように、酸化鉄ナノ粒子コアを有するカチオン性リポソームを、mRNAとインキュベートした。得られた酸化鉄負荷RNA-NP(IONP-RNA-NP)を使用して、磁場の存在下、エクスピボで、DsRed+DCをトランスフェクトした。IONP-RNA-NP負荷DCを、次いでC57BL/6マウスに皮内注射し、T2*強調11T MRIで非侵襲的に追跡した。MRI強度は、酸化鉄含有量のプルシアンブルー染色と、および各リンパ節のDsRed+細胞の絶対数のフローサイトメトリーと、相関していた。RNA-NP中に酸化鉄が存在しても、サイズ、電荷、RNA結合能力、およびDCのトランスフェクションを含む粒子特性は、有意に変化しなかった。さらに、RNA-NP内に酸化鉄を含めることで、外部磁場の適用を通して、磁気的に増強されたRNA送達およびトランスフェクション効率が可能になった。RNAエレクトロポレーションと比較して、IONP-RNA-NP負荷は、抗ウイルス性サイトカイン(IFN- α)の産生とリンパ節へのDC遊走を増強した。IONP-RNA-NPはまた、T2*強調MRI強度の減少、およびMRIで検出されたリンパ節サイズの増加ももたらし、処置リンパ節の酸化鉄負荷細胞の数と直接相関した。ワクチン接種の2日後に測定されたT2*強調MRI強度は、マウス腫瘍モデルにおける腫瘍増殖の阻害と相関した。これらのデータは、IONP-RNA-NPが、DC活性化を増強し、MRIによる非侵襲的な細胞追跡を可能にすることを示唆している。特定の理論に拘束されることなく、これらのデータは、抗腫瘍免疫応答を予測し、ワクチンの有効性のバイオマーカーとしてMRIで検出されたDC遊走を使用するための、IONP-RNA-NPの使用を支持する。

【0016】

リポソーム、細胞、および組成物

本開示は、リボ核酸(RNA)分子と、DOTAPおよびコレステロールを含む脂質混合物と、を含むリポソームを提供する。様々な実施形態では、リポソームは、RNA分子と、DOTAPおよびコレステロールを含む脂質混合物と、酸化鉄ナノ粒子(IONP)と、を含み、任意選択的に、DOTAPおよびコレステロールは、約3:1のDOTAP:コレステロール質量比で脂質混合物中に存在する。様々な実施形態では、本開示のリポソームは、RNA分子、ならびにDOTAPおよびコレステロールを含む脂質混合物を含み、DOTAPおよびコレステロールは、約3:1のDOTAP:コレステロール質量比で脂質混合物中に存在する。本明細書で使用される場合、「DOTAP」という用語は、N-(2,3-ジオレオイルオキシ-1-プロピル)トリメチルアンモニウムメチルサルフェートを意味する。

【0017】

例示的な態様では、リポソームは、約80nm~約500nmの直径を有し、例えば、約80nm~約450nm、約80nm~約400nm、約80nm~約350nm、約80nm~約300nm、約80nm~約250nm、約80nm~約200nm、約90nm~約500nm、約100nm~約500nm、約150nm~約500nm、約200nm~約500nm、約250nm~約500nm、約300nm~約500nm、約350nm~約500nm、約400nm~約500nmである。例示的な態様では、リポソームは、約90nm~約300nmの直径を有し、例えば、約100nm~約250nm、約110nm $\pm$ 5nm、約115nm $\pm$ 5nm、約120nm $\pm$ 5nm、約125nm $\pm$ 5nm、約130nm $\pm$ 5nm、約135nm $\pm$ 5nm、約140nm $\pm$ 5nm、約145nm $\pm$ 5nm、約150nm $\pm$ 5nm、約155nm $\pm$ 5nm、約160nm $\pm$ 5nm、約165nm $\pm$ 5nm、約170nm $\pm$ 5nm、約175nm $\pm$ 5nm、約180nm $\pm$ 5nm、約190nm $\pm$ 5nm、約200nm $\pm$ 5nm、約210nm $\pm$ 5nm、約220nm $\pm$ 5nm、約230nm $\pm$ 5nm、約240nm $\pm$ 5nm、約250nm $\pm$ 5nm、約260nm $\pm$ 5nm、約270nm $\pm$ 5nm、約280nm $\pm$ 5nm、約290nm $\pm$ 5nm、約300nm $\pm$ 5nmである。例示的な態様では、リポソームは

、約20mV～約50mVの全体的な表面正味電荷を有する（例えば、約20mV～約45mV、約20mV～約40mV、約20mV～約35mV、約20mV～約30mV、約20mV～約25mV、約25mV～約50mV、約30mV～約50mV、約35mV～約50mV、約40mV～約50mV、または約45mV～約50mV。例示的な態様では、リポソームは、約40mV～約50mVの全体的な表面正味電荷を有する。

【0018】

例示的な態様では、コレステロールの質量は、本開示のリポソームの脂質混合物の総脂質質量の12%超、37%未満である。例えば、コレステロールの質量は、総脂質質量の15%超、35%未満である。例示的な態様では、コレステロールの質量は、脂質混合物の総脂質質量の約15%～約30%である。例示的な態様では、コレステロールの質量は、脂質混合物の総脂質質量の約20%～約30%である。例示的な態様では、コレステロールの質量は、脂質混合物の総脂質質量の約25%±3%である。例示的な態様では、DOTAPの質量は、脂質混合物の総脂質質量の少なくとも50%である。例えば、DOTAPの質量は、脂質混合物の総脂質質量の約63%～約88%である。例示的な例では、DOTAPの質量は、脂質混合物の総脂質質量の約75%±5%である。一部の態様では、脂質混合物が、DOTAPおよびコレステロールとは異なる第3の脂質を含む場合、第3の脂質の質量は、脂質混合物の総脂質質量の約10%未満、任意選択的に、脂質混合物の総脂質質量の約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満である。特定の態様では、脂質混合物は、本質的にDOTAPおよびコレステロールからなる。

【0019】

例示的な態様では、リポソームは、一本鎖または二本鎖、合成または天然源から得られたもの（例えば、単離および／または精製された）であり得るRNA分子（または「RNA」）を含み、天然、非天然または改変されたヌクレオチドを含有することができ、天然、非天然または改変されたヌクレオチド間結合を含有することができる。例示的な態様では、核酸分子は、1つ以上の修飾ヌクレオチド、例えば、5-フルオロウラシル、5-ブromoウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリドメ、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N⁶-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアンモメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルケノシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（ν）、ワイプトキソシン、シュードウラチル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、および2,6-ジアミノプリン、などを含む。例示的な態様では、RNAは、天然に存在するDNA分子またはRNA分子のヌクレオチド間に見出されるホスホジエステル結合の代わりに、ホスホロアミデート結合またはホスホロチオエート結合などの、1つ以上の非天然または改変されたヌクレオチド間結合を含む。例示的な態様では、RNAは、挿入、欠失、反転、および／または置換を含まない。しかし、本明細書で議論されるように、場合によっては、RNAが1つ以上の挿入、欠失、反転、および／または置換を含むことが好適であり得る。一部の態様では、RNA分子は、イントロンを欠く成熟mRNAまたはプロセシングされたmRNAである。例示的な態様では、RNA分子は、5'キャップ、ポリ（A）テール、または両方の組み合わせを含む。様々な態様における5'キャップは、7-メチルグアニレートを含み、5'対5'の三リン酸結合を介してRNA分子の5'末端に結合している。様々な態様では、5'キャップは化学付加反応を介してRNA分子に付加されている。例示的な実施形態では、

RNA分子は、当該技術分野で既知の手順を使用して、化学合成および／または酵素的ライゲーション反応に基づいて構築される。例えば、Sambrook et al.（上記参照）およびAusubel et al.（上記参照）を参照されたい。様々な態様では、RNA分子はインビトロ転写技術を介して細胞外で産生される。様々な態様では、RNA分子はインビトロ転写によって産生される合成RNA分子である。

【0020】

例示的な態様では、リポソームは、150 μgの脂質混合物あたり約10 μg未満または約10 μgのRNA分子を含む。例示的な態様では、リポソームは、約10 μgのRNAを約150 μgのリポソームとインキュベートすることによって作製される。別の態様では、リポソームは、脂質混合物の質量あたりより多くのRNA分子を含む。例えば、リポソームは、150 μgのリポソームあたり10 μg超のRNA分子を含んでもよい。場合によっては、リポソームは、150 μgのリポソームまたは脂質混合物あたり15 μg超のRNA分子を含む。一部の態様では、RNA分子は、タンパク質をコードするか、またはアンチセンス分子である。タンパク質は、一部の態様では、腫瘍抗原、共刺激性分子、サイトカイン、増殖因子、リンホカイン、（例えば、腫瘍転移を阻害するのに有効なサイトカインおよび増殖因子、少なくとも1つの細胞集団に対して抗増殖効果を有することが示されているサイトカインまたは増殖因子を含む）からなる群から選択される。このようなサイトカイン、リンホカイン、増殖因子、または他の造血因子としては：M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNFα、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンが含まれるが、これらに限定されない。本明細書における使用のための追加の増殖因子としては、アンジオゲニン、骨形態形成タンパク質-1、骨形態形成タンパク質-2、骨形態形成タンパク質-3、骨形態形成タンパク質-4、骨形態形成タンパク質-5、骨形態形成タンパク質-6、骨形態形成タンパク質-7、骨形態形成タンパク質-8、骨形態形成タンパク質-9、骨形態形成タンパク質-10、骨形態形成タンパク質-11、骨形態形成タンパク質-12、骨形態形成タンパク質-13、骨形態形成タンパク質-14、骨形態形成タンパク質-15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子受容体αサブユニット、サイトカイン誘導性好中球走化因子1、サイトカイン誘導性好中球、走化因子2α、サイトカイン誘導性好中球走化因子2β、β内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮由来好中球誘引物質、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質α、増殖関連タンパク質β、増殖関連タンパク質γ、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体α、神経増殖因子神経増殖因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング増殖因子α、トランスフォーミング増殖因子β、トランスフォーミング増殖因子β1、トランスフォーミング増殖因子β1.2、トランスフォーミング増殖因子β2、トランスフォーミング増殖因子β3、トランスフォーミング増殖因子β5、潜在性トランスフォーミング増殖因子β1、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質I、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質II、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質III、腫瘍壊死因子受容体I型、腫瘍壊死因子受容体II、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体、ならびにキメラタンパク質およびその生物学的または免疫学的に活性な断片が挙げられる。例示的な態様では、腫瘍抗原は、ウイルスタンパク質に由来する抗原、点突然変異に由来する抗原、または癌-生殖系列遺伝子によってコードされる抗原である。例示的な態様では、腫瘍抗原は、pp65、p53、KRAS、NRAS、MAGEA、MAGEB

10

20

30

40

50

、MAGEC、BAGE、GAGE、LAGE／NY-ESO1、SSX、チロシナーゼ、gp100／pml17、Melan-A／MART-1、gp75／TRP1、TRP2、CEA、RAGE-1、HER2／NEU、WT1である。例示的な態様では、共刺激性分子は、CD80およびCD86からなる群から選択される。

【0021】

特定の例では、RNA分子は、アンチセンス分子をコードするか、アンチセンス分子であり、任意選択的に、siRNA、shRNAまたはmiRNAである。アンチセンス分子は、RNA干渉(RNAi)を媒介するものであり得る。当業者に既知であるように、RNAiは、植物および動物における遺伝子調節の普遍的な機構であり、標的mRNAが、配列特異的な様式で分解される(Sharp, Genes Dev., 15, 485-490 (2001)、Hutvagner et al., Curr. Opin. Genet. Dev., 12, 225-232 (2002)、Fire et al., Nature, 391, 806-811 (1998)、Zamore et al., Cell, 101, 25-33 (2000))。天然RNA分解プロセスは、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼDicerによって開始され、長鎖dsRNA前駆体を21~25ヌクレオチド長の二本鎖断片への切断を促進し、低分子干渉RNAと称される(siRNA; 短鎖干渉RNAとしても知られている)(Zamore, et al., Cell, 101, 25-33 (2000)、Elbashir et al., Genes Dev., 15, 188-200 (2001)、Hammond et al., Nature, 404, 293-296 (2000)、Bernstein et al., Nature, 409, 363-366 (2001))。siRNAは、標的mRNAを認識して切断する大きなタンパク質複合体に組み込まれる(Nykanen et al., Cell, 107, 309-321 (2001))。哺乳動物細胞へのdsRNAの導入は、効率的なDicer媒介性のsiRNA生成にはつながらず、したがって、RNAiを誘導しないことが報告されている(Caplen et al., Gene 252, 95-105 (2000)、Ui-Tei et al., FEBS Lett, 479, 79-82 (2000))。様々な哺乳動物細胞におけるトランスフェクトされたおよび内因性遺伝子の発現を阻害する合成21ヌクレオチドsiRNA二本鎖を導入することによって、細胞でのsiRNAの成熟におけるDicerの必要性を回避することができる(Elbashir et al., Nature, 411: 494-498 (2001))。

【0022】

これに関して、一部の態様におけるRNA分子は、RNAiを媒介し、一部の態様では、タンパク質の発現を阻害するのに特異的なsiRNA分子である。本明細書で使用される「siRNA」という用語は、RNAiを誘導または媒介することができる約10~約50ヌクレオチド(またはヌクレオチド類似体)を含むRNA(またはRNA類似体)を指す。例示的な実施形態では、siRNA分子は、約15~約30ヌクレオチド(またはヌクレオチド類似体)または約20~約25ヌクレオチド(またはヌクレオチド類似体)、例えば、21~23ヌクレオチド(またはヌクレオチド類似体)を含む。siRNAは、二本鎖または一本鎖、好ましくは二本鎖であり得る。

【0023】

代替的な態様では、RNA分子は、代替的に、タンパク質の発現を阻害するのに特異的な短いヘアピンRNA(shRNA)分子である。本明細書で使用される「shRNA」という用語は、一本鎖RNAが、部分的にパリンドローム塩基配列を含有し、その中で二本鎖構造(すなわち、ヘアピン構造)を形成する、約20以上の塩基対の分子を指す。shRNAは、ヘアピン構造に折り畳まれたsiRNA(またはsiRNA類似体)であり得る。shRNAは、典型的には、ヘアピンの約21ヌクレオチドアンチセンスおよびセンス部分、約2~約6ヌクレオチド長の非ループ側の任意選択的なオーバーハング、および、例えば約3~10ヌクレオチド長であり得るループ部分、を含む約45~約60ヌクレオチドを含む。shRNAは、化学的に合成することができる。あるいは、shRNAは、DNA配列のセンス鎖とアンチセンス鎖を逆方向に連結し、DNAを鋳型として使用

してT7 RNAポリメラーゼを用いてインビトロでRNAを合成することによって、産生することができる。

【0024】

いかなる理論または機構に拘束されることを望むものではないが、shRNAが細胞に導入された後、shRNAは、約20塩基以上（例えば、代表的には、21、22、23塩基）に分解され、RNAiを引き起こし、阻害効果をもたらす。したがって、shRNAは、RNAiを誘発するため、本開示の有効な構成要素として使用され得る。shRNAは、好ましくは3'突出末端を有してもよい。二本鎖部分の長さは、特に限定されないが、好ましくは10ヌクレオチド以上、より好ましくは20ヌクレオチド以上である。ここで、3'-突出末端は、好ましくはDNAであり、より好ましくは、長さが少なくとも2ヌクレオチドのDNAであり、さらに好ましくは、長さが2〜4ヌクレオチドのDNAである。

10

【0025】

例示的な態様では、アンチセンス分子は、マイクロRNA (miRNA) である。本明細書で使用される場合、「マイクロRNA」という用語は、翻訳抑制または標的分解を介して遺伝子発現をサイレンシングするためにmRNA分子と塩基対を形成する小さな（例えば、15〜22ヌクレオチド）非コードRNA分子を指す。マイクロRNAおよびその治療上の可能性は、当該技術分野において報告されている。例えば、Mulligan, MicroRNA: Expression, Detection, and Therapeutic Strategies, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, 2011、Bader and Lammers, "The Therapeutic Potential of microRNAs" Innovations in Pharmaceutical Technology, pages 52-55 (March 2011) を参照されたい。

20

【0026】

特定の例では、RNA分子は、アンチセンス分子であり、任意選択的に、siRNA、shRNAまたはmiRNAであり、免疫チェックポイント経路のタンパク質を標的として、発現を減少させる。様々な態様では、免疫チェックポイント経路のタンパク質は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、TIGIT、LAG3、CD112、TIM3、BTLA、または共刺激受容体：ICOS、OX40、41BB、またはGITRである。免疫チェックポイント経路のタンパク質は、特定の例では、CTLA4、PD-1、PD-L1、B7-H3、B7H4、またはTIM3である。免疫チェックポイントシグナル伝達経路は、Pardoll, Nature Rev Cancer 12 (4): 252-264 (2012) に概説されている。

30

【0027】

例示的な例では、リポソームは、RNA分子、例えば、ヒト由来の細胞から単離されたRNA、の混合物を含む。一部の態様では、ヒトは、腫瘍を有し、RNAの混合物は、ヒトの腫瘍から単離されたRNAである。例示的な態様では、ヒトは、癌、任意選択的に、本明細書に記載の任意の癌を有する。任意選択的に、RNAが単離される腫瘍は、神経膠腫、（限定されないが、膠芽腫を含む）、髄芽腫、びまん性内在性橋膠腫、または中枢神経系への転移性浸潤を伴う末梢腫瘍（例えば、黒色腫または乳癌）からなる群から選択される。例示的な態様では、RNAが単離される腫瘍は、癌の腫瘍、例えば、本明細書に記載のこれらの癌のいずれかである。

40

【0028】

本開示の例示的な態様では、リポソームは、酸化鉄ナノ粒子 (IONP) をさらに含む。任意選択的に、IONPは、リポソームのコア中に存在する。例示的な態様では、IONPを含むリポソームは、IONPを含むために磁性である。したがって、一部の態様では、IONPを含むリポソームは、「磁性リポソーム」または「マグネトリポソーム」と呼ばれる。特定の例では、IONPは、総リポソーム質量の約1%〜約20%、例えば、約5%〜約20%、約10%〜約20%、約15%〜約20%、約1%〜約15%、約1

50

%～約10%、約1%～約5%である。一部の態様におけるIONPは、総リボソーム質量の約5%～約15%である。一部の例では、IONPはリボソームの総質量の約12%±3%である。コア中の各IONPは、例示的な態様では、約10nm～約200nmの直径を有する。一部の例では、各IONPは、または約20nm、約30nm、約40nm、約50nm、約150nm、約160nm、約170nm、約180nm、約190nm、約200nm、または約60nm～約140nmの直径を有する（例えば、約65nm、約70nm、約80nm、約90nm、約100nm、約110nm、約120nm、約130nm、または約140nm）。例示的な態様では、各IONPは、約130nm±5nmの直径を有する。

【0029】

本開示のリボソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞が、本明細書でさらに提供される。例示的な態様では、細胞は、本開示のリボソームを含有することができる任意のタイプの細胞である。一部の態様における細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、または藻類である。代替的な態様では、細胞は、原核細胞、例えば、細菌または原生動物である。例示的な態様では、細胞は、培養細胞である。代替的な態様では、細胞は、初代細胞、すなわち、生物（例えば、ヒト）から直接単離された、初代細胞である。細胞は、接着細胞または浮遊細胞、すなわち浮遊状態で増殖する細胞であってもよい。例示的な態様における細胞は、哺乳動物細胞である。最も好ましくは、細胞は、ヒト細胞である。細胞は、任意の細胞型であり得、任意の型の組織に由来し得、任意の発達段階であり得る。例示的な態様では、リボソームを含む細胞は、抗原提示細胞（APC）である。本明細書で使用される場合、「抗原提示細胞」または「APC」は、特定のT細胞による認識のために抗原をプロセッシングし、提示することによって、細胞の免疫応答を媒介する免疫細胞を指す。例示的な態様では、APCは、樹状細胞、マクロファージ、ランゲルハンス細胞、またはB細胞である。例示的な態様では、APCは、樹状細胞（DC）である。例示的な態様では、細胞が、対象、例えば、ヒトに投与される場合、細胞は、対象に対して自己由来である。例示的な例では、免疫細胞は、腫瘍関連マクロファージ（TAM）である。

【0030】

また、本開示により提供される細胞の集団は、集団の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、本開示のリボソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞である。一部の態様における細胞の集団は、不均一な細胞集団であり、あるいは、一部の態様では、実質的に均一な集団であり、その集団は、本開示のリボソームを含む細胞を主に含む。

【0031】

本明細書において、本開示のリボソーム、本開示のリボソームを含む細胞、本開示の細胞の集団、またはそれらの任意の組み合わせ、および薬学的に許容される担体、賦形剤もしくは希釈剤、を含む組成物が提供される。例示的な態様では、組成物は、ヒトへの投与を意図した医薬組成物である。例示的な態様では、組成物は、無菌組成物である。例示的な例では、組成物は、本開示の複数のリボソームを含む。任意選択的に、複数のリボソームの少なくとも50%は、約100nm～約250nmの直径を有し、任意選択的に、IONPを含むコアを有する。

【0032】

例示的な態様では、本開示の組成物は、リボソーム、リボソームを含む細胞、または細胞の集団以外の、追加の成分を含んでもよい。組成物は、様々な態様では、例えば、酸性化剤、添加剤、吸着剤、エアロゾル噴射剤、空気置換剤、アルカリ化剤、固化防止剤、抗凝固剤、抗菌保存剤、抗酸化剤、防腐剤、基剤、結合剤、緩衝剤、キレート剤、コーティング剤、着色剤、乾燥剤、洗浄剤、希釈剤、消毒剤、崩壊剤、分散剤、溶解促進剤、染料、軟化剤、乳化剤、乳化安定剤、充填剤、被膜形成剤、風味増強剤、香味剤、流動促進剤、ゲル化剤、顆粒化剤、保湿剤、潤滑剤、粘膜付着剤、軟膏基剤、軟膏、油性媒体、有機基剤、パステル基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、保存剤、封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤

10

20

30

40

50

、溶媒、安定化剤、坐剤基剤、界面活性剤、界面活性剤、懸濁剤、甘味剤、治療剤、増粘剤、張化剤、毒性剤、増粘剤、吸水剤、水混和性共溶媒、水軟化剤、または湿潤剤、を含む、任意の薬学的に許容される成分を含む。例えば、以下を参照されたい、the Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000)、その全体が参照により援用される。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)、その全体が参照により援用される。

【0033】

本開示の組成物は、非経口および皮下を含む、任意の許容可能な経路による投与に好適であり得る。他の経路としては、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、節内および脾臓内が挙げられる。例示的な態様では、組成物がリポソーム（リポソームを含む細胞ではない）を含む場合、組成物は、全身（例えば、静脈内）投与に好適である。例示的な態様では、組成物がリポソームを含む（細胞外のリポソームではない）細胞を含む場合、組成物は皮内投与に好適である。

【0034】

組成物が対象への投与を意図した形態である場合、それは、意図した投与部位と等張であるようにすることができる。例えば、溶液が非経口投与を意図した形態である場合、それは血液と等張であり得る。組成物は、典型的には無菌である。特定の実施形態では、これは、滅菌濾過膜を介した濾過によって達成され得る。特定の実施形態では、非経口組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、静脈内溶液バッグ、または皮下注射針によって穿刺可能なストッパを有するバイアル、またはプレフィルド注射器、に入れられる。特定の実施形態では、組成物は、調製済の形態、または投与前に再構成または希釈される形態（例えば、凍結乾燥された）のいずれかで保存され得る。

【0035】

製造方法

本開示は、リポソームを作製する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、（A）DOTAPおよびコレステロールを約3：1のDOTAP：コレステロール質量比で混合して、脂質混合物を形成することと、（B）脂質混合物を乾燥することと、（C）脂質混合物を再水和溶液で再水和して、再水和された脂質混合物を形成することと、（D）再水和脂質混合物を約40℃超の温度でインキュベートし、再水和脂質混合物を断続的にボルテックスしてリポソームを形成することと、を含む。例示的な態様では、本方法は、ステップ（D）後、リポソームを12時間以上インキュベートすることをさらに含み、任意選択的に、リポソームを超音波処理することをさらに含む。例示的な態様では、本方法は、ステップ（D）後、約20℃～約30℃または約2℃～約4℃で、リポソームを12時間以上インキュベートすることをさらに含む。典型的な例では、本方法は、少なくとも150nmのフィルターを通してリポソームを濾過することをさらに含み、任意選択的に、リポソームは、200nmフィルターおよび／または450nmフィルターを通して濾過される。一部の態様では、リポソームは、450nmフィルターおよび200nmフィルターを通して濾過され、任意選択的に、リポソームは、450nmフィルター、続いて200nmフィルターを通して順次濾過される。例示的な例では、本方法は、リポソームをRNA分子とインキュベートすることをさらに含む。一部の態様では、本方法は、約7.5μg±0.75μgのDOTAPおよび約2.5μg±0.25μgのコレステロールを混合して、脂質混合物を形成することを含む。一部の態様では、DOTAPおよびコレステロールをクロロホルムに溶解して、脂質混合物を形成する。一部の態様では、窒素ガスを使用して、脂質混合物を乾燥させる。例示的な態様における再水和溶液は、緩衝剤、任意選択的に、リン酸緩衝食塩水（PBS）である。例示的な例では、再水和された脂質混合物を、水浴中で約50℃の温度でインキュベートし、約10分毎にボルテックスしてリポソームを形成する。例示的な態様では、脂質混合物または再水和溶液は、酸化鉄

10

20

30

40

50

ナノ粒子（IONP）をさらに含む。任意選択的に、再水和溶液は、カルボキシル化酸化鉄ナノ粒子の溶液を含み、各カルボキシル化酸化鉄ナノ粒子は、約50nm～約150nmの直径を有する。例示的な例では、本方法は、IONPを脂質混合物または再水和溶液に添加することをさらに含む。一部の態様では、各IONPは、約10nm～約200nmの直径を有する。任意選択的に、各IONPは、約60nm～約140nmまたは約10nm～約30nmの直径を有する。一部の態様では、脂質混合物または再水和溶液は、10mgの脂質混合物あたり少なくとも約1μgのIONP、10mgの脂質混合物あたり少なくとも約100μgのIONP、10mgの脂質混合物あたり少なくとも約1mgのIONP、または10mgの脂質混合物あたり少なくとも約1.5mgのIONPを含み、任意選択的に、脂質混合物または再水和溶液は、10mgの脂質混合物あたり約5mg以下のIONPを含む。一部の例では、本方法は、リポソームをRNA分子とインキュベートすることを含む。一部の態様におけるRNA分子は、本明細書に記載されるもののいずれかであり、例えば、腫瘍抗原、サイトカイン、アンチセンス分子をコードするRNA分子である。一部の例では、RNA分子は、対象から得られた腫瘍細胞について単離される。一部の態様では、約5μgのRNA分子は、リポソームの約75μgの脂質ごとにインキュベートされる。一部の態様では、本方法は、リポソームをRNA分子と、約1:15のRNA分子:DOTAP質量比でインキュベートすることを含む。例示的な例では、リポソームがIONPを含む場合、約10μgのRNA分子は、約150μgのリポソームごとにインキュベートされる。

【0036】

本明細書に記載のリポソームを作製する方法のいずれかによって作製されたリポソームは、本開示によって提供される。リポソームは、細胞をトランスフェクトするために使用してもよい。したがって、本明細書に記載のリポソームを作製する方法のいずれかによって作製されたリポソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞が、本開示により提供される。例示的な例では、細胞は、本明細書に記載の細胞のいずれかであり、抗原提示細胞（APC）を含むが、これに限定されない。例示的な例では、細胞は樹状細胞（DC）である。例示的な実施形態では、細胞は、細胞集団の一部である。したがって、本明細書に記載のリポソームを作製する方法のいずれかによって作製されたリポソームを含む（トランスフェクトされた）細胞を含む細胞の集団が提供される。一部の態様では、細胞集団の少なくとも50%は、リポソームを含む（例えば、トランスフェクトされた）細胞である。

【0037】

本明細書に記載のリポソームを作製する方法のいずれかによって作製されたリポソーム、リポソームを含む細胞、リポソームを含む細胞を含む細胞の集団、またはそれらの任意の組み合わせ、ならびに薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤、を含む組成物も、本明細書に提供される。例示的な態様では、組成物は、上記の組成物に従ってもよい。一部の態様では、組成物は、複数のリポソームを含み、リポソームの少なくとも50%は、約100nm～約250nmの直径を有する。

【0038】

使用方法

本明細書に示されるように、RNAエレクトロポレーションと比較して、IONPおよびRNAを含む本開示の磁性リポソームは、抗ウイルス性サイトカイン（IFN-α）の産生を増強し、リンパ節へのDC遊走を引き起こした。このようなリポソームはまた、T2*強調MRI強度の減少、および処置リンパ節における酸化鉄負荷細胞の数と直接相関するMRI検出リンパ節サイズの増加をもたらした。これらのデータは、IONPおよびRNAを含む本開示の磁性リポソームが、DCの活性化を増強し、MRIによる非侵襲的細胞追跡を可能にすることを示唆している。特定の理論に拘束されることなく、これらのデータは、抗腫瘍免疫応答を予測し、ワクチン有効性のバイオマーカーとしてMRI検出DC遊走を使用するための、IONPおよびRNAを含む本開示の磁性リポソームの使用を支持する。

【0039】

本明細書において、腫瘍、例えば、脳腫瘍の細胞にRNAを送達する方法が提供され、本開示の組成物を静脈内投与することを含み、組成物は、リボソームを含む。また、腫瘍、任意選択的に、脳腫瘍の微小環境中の細胞にRNAを送達する方法も本明細書で提供される。例示的な実施形態では、本方法は、本開示の組成物を静脈内投与することを含み、組成物は、リボソームを含む。一部の態様では、リボソームは、免疫チェックポイント経路のタンパク質、任意選択的に、PD L1を標的とするsiRNAを含む。様々な態様では、微小環境中の細胞は、抗原提示細胞（APC）であり、任意選択的に、腫瘍関連マクロファージである。本開示はまた、脳腫瘍微小環境において抗原提示細胞を活性化する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、本開示の組成物を静脈内投与することを含み、組成物は、リボソームを含む。

10

【0040】

本開示は、RNA分子を細胞に送達する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、リボ核酸（RNA）分子と、DOTAPおよびコレステロールを含む脂質混合物とを含むリボソームと、細胞をインキュベートすることを含み、DOTAPおよびコレステロールは、約3：1のDOTAP：コレステロール質量比で脂質混合物中に存在する。例示的な態様では、リボソームは、本明細書に記載されるIONPを含む。例示的な例では、細胞は、磁場の存在下で、リボソームとインキュベートされる。例示的な態様では、磁場は、静磁場である。例示的な態様では、磁場は、振動磁場である。例示的な態様では、磁場は、約100mTの強度を有する磁場である。例示的な例では、細胞は、磁場の存在下で、約2時間未満または約1時間未満の時間、リボソームとインキュベートされ、任意選択的に、細胞は、磁場の存在下で、約30分間±10分間、リボソームとインキュベートされる。例示的な例では、細胞は、抗原提示細胞（APC）、任意選択的に、樹状細胞（DC）である。様々な例で、APC（例えば、DC）は、対象が得られる。特定の態様では、RNA分子は、対象、例えば、ヒトから得られた腫瘍細胞から単離される。特定の態様では、RNA分子は、アンチセンス分子であり、目的のタンパク質を標的として発現を減少させる。例示的な態様では、RNA分子は、siRNA分子であり、免疫チェックポイント経路のタンパク質を標的とする。免疫チェックポイント経路の好適なタンパク質は、当該技術分野で既知であり、本明細書にも記載されている。様々な例では、siRNAは、PD L1を標的とする。

20

30

【0041】

RNAが細胞に送達されると、細胞は、疾患の治療のために対象に投与され得る。したがって、本開示は、疾患を有する対象を治療する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、RNA分子を細胞に送達する上記の方法に従って、RNA分子を対象の細胞に送達することを含む。一部の態様では、RNA分子は、エキソビボで細胞に送達され、細胞は、対象に投与される。あるいは、本方法は、リボソームを対象に直接投与することを含む。例示的な実施形態では、疾患を有する対象を治療する方法は、対象において疾患を治療するのに有効な量で、本開示の組成物を投与することを含む。例示的な態様では、疾患は癌であり、一部の態様では、癌は、血液脳関門を越えて位置し、および／または対象は脳に位置する腫瘍を有する。一部の態様では、腫瘍は、神経膠腫、低悪性度神経膠腫または高悪性度神経膠腫、具体的には、グレードIIIの星状細胞腫または神経膠芽腫である。あるいは、腫瘍は、髄芽腫またはびまん性内在性橋神経膠腫であり得る。別の実施例では、腫瘍は、非中枢神経系腫瘍、例えば、乳癌、黒色腫、または肺癌からの転移性浸潤であり得る。例示的な態様では、組成物は、リボソームを含み、任意選択的に、リボソームを含む組成物は、対象に静脈内投与される。代替的な態様では、組成物は、リボソームでトランスフェクトされた細胞を含む。任意選択的に、組成物の細胞は、APCであり、任意選択的に、DCである。例示的な態様では、リボソームを含む細胞を含む組成物は、対象に皮内投与され、任意選択的に、組成物は、対象の鼠径部に皮内投与される。例示的な例では、DCは、対象から得られた白血球（WBC）から単離され、任意選択的に、WBCは、白血球除去を介して得られる。一部の態様では、RNA分子は腫瘍抗原をコー

40

50

ドする。一部の態様では、RNA分子は、腫瘍細胞から単離され、例えば、腫瘍細胞は、対象の腫瘍の細胞である。例示的な態様におけるリポソームは、IONPを含み、本方法は、対象内のリポソームを含む細胞の遊走を追跡することをさらに含む。例示的な態様における追跡は、核磁気共鳴画像法(MRI)を含む。例えば、追跡は、対象の1つ以上のリンパ節に対してMRIを行うことを含む、任意選択的に、組成物または細胞の投与前および投与後に、リンパ節に対してMRIを行う。例示的な態様では、治療の方法は、IONPを含むリポソームでトランスフェクトされたDCを含むリンパ節のT2*強調MRI強度を、対照の未処置リンパ節のT2*強調MRI強度と比較することを含む。本方法は、任意選択的に、MRIを介して、対象のリンパ節サイズを測定することを含む。また、任意選択的に、本方法は、IONPを含むリポソームでトランスフェクトされたDCを含むリンパ節のリンパ節サイズを、対照の未処置リンパ節のリンパ節サイズと比較することを含む。

10

【0042】

「治療する」、「治療すること」、「治療」という用語は、本明細書に記載の炎症性障害に関連する事象、疾患または状態の臨床症状、兆候または進行のいずれかを、部分的または完全に、一時的または永続的に排除、低減、抑制、または寛解することを指す。関連分野で認識されているように、治療剤として使用される薬物は、所与の病状の重症度を低減する可能性があるが、有用な治療剤と見なされるために、疾患のすべての兆候を消失させる必要はない。同様に、予防的に投与される治療は、実行可能な予防剤を構成するために、症状の発症を防ぐのに完全に効果的である必要はない。単に疾患の影響を低減する(例えば、症状の数や重症度を低減する、別の治療の有効性を高める、または別の有益な効果を生み出すことにより)、または対象において疾患が発症または悪化する可能性を低減することで、十分である。本発明の一実施形態は、治療の有効性を決定するための方法に関し、特定の障害の重症度を反映する指標のベースラインを超える持続的な改善を誘導するのに十分な量および時間で、患者に治療剤を投与することを含む。

20

【0043】

本明細書で使用される場合、「治療する」という用語、ならびにそれに関連する言葉は、必ずしも100%または完全な治療を意味するものではない。むしろ、様々な程度の治療があり、当業者は、潜在的な利益または治療効果を有するものとして認識している。この点で、本開示の癌を治療する方法は、任意の量または任意のレベルの治療を提供することができる。さらに、本方法によって提供される治療は、治療される疾患の1つ以上の状態または症状または徴候の治療を含み得る。例えば、本開示の治療方法は、疾患の1つ以上の症状を抑制し得る。また、本開示の方法によって提供される治療は、疾患の進行を遅らせることを包含し得る。「治療する」という用語はまた、疾患の予防的治療を包含する。したがって、本開示の方法によって提供される治療は、予防的に治療される疾患の発症または再発を遅延することができる。例示的な態様では、本方法は、疾患の発症を、1日、2日、4日、6日、8日、10日、15日、30日、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、1年、2年、4年、またはそれ以上遅延させる。予防的治療は、治療される疾患のリスクを低減することを包含する。例示的な態様では、本方法は、疾患のリスクを、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、またはそれ以上、低減する。

30

40

【0044】

前述の方法に関して、リポソームまたはそれを含む組成物を、一部の態様では、対象に全身投与される。任意選択的に、本方法は、非経口投与によるリポソームまたは組成物の投与を含む。様々な例では、リポソームまたは組成物は、対象に静脈内投与される。

【0045】

様々な態様では、リポソームまたは組成物は、例えば、毎日(1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、1日6回)、週3回、週2回、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、毎週、隔週、3週間毎、毎月、または隔月、を含む任意のレジメンに従って投与される。様々な態様では、リポソームまたは組成物は、週1回対象に投与される。

【0046】

50

「治療上有効量」という用語は、疾患または障害に関連する疾患の症状または徴候を改善または軽減するのに有効な治療剤の量を指す。

【0047】

例示的な態様では、疾患の治療は、対象において疾患に対する免疫応答を増強することによって達成される。したがって、本開示は、対象において、疾患、例えば、腫瘍または癌に対する免疫応答を増強する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、疾患、例えば腫瘍または癌に対する対象の免疫応答を増強するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。例示的な態様では、増強された免疫応答は、樹状細胞の活性化の増加によって明らかであり、これは、例えば、DC活性化に関連する遺伝子の発現の増強、DCの表面上の共刺激分子の発現の増強、抗ウイルス性サイトカイン（例えば、 $IFN\alpha$ ）の産生の増加、T細胞刺激の増加（例えば、活性化DCとの接触時のT細胞による $IFN-\gamma$ 産生の増加によって示される）、リンパ節への遊走の増加、および腫瘍増殖の阻害の増強、によって実証される。したがって、本開示は、DCの活性化を増加させるか、またはDCを活性化する方法を、さらに提供する。例示的な実施形態では、本方法は、DCの活性化を増加させるのに有効な量で、またはDCを活性化するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。したがって、本開示はまた、抗ウイルス性サイトカイン（例えば、 $IFN\alpha$ ）の産生を増加させる方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、対象において抗ウイルス性サイトカインの産生を増加させるのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。さらに、対象においてT細胞刺激を増加させる方法が提供される。例示的な実施形態では、本方法は、対象においてT細胞刺激を増加させるのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。様々な態様では、T細胞刺激の増加は、 $IFN-\gamma$ のT細胞産生の増加から明らかである。本開示はさらに、 $IFN-\gamma$ のT細胞産生を増加させる方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、T細胞を、本開示の樹状細胞（DC）と接触させることを含み、任意選択的に、リポソームは、IONPを含み、DCは、磁場の存在下でリポソームでトランスフェクトされる。対象においてリンパ節への樹状細胞（DC）の遊走を増加させる方法がさらに提供される。例示的な実施形態では、本方法は、リンパ節へのDC遊走を増加させるのに有効な量で、本開示の組成物を対象に投与することを含む。本明細書で使用される場合、「増加する」という用語およびそれから派生する語は、100%または完全な増加ではない場合がある。むしろ、様々な程度の増加または増強があり、当業者は、潜在的な利益または治療効果を有するものとして認識している。例示的な実施形態では、本開示の方法により提供される増加または増強は、少なくともまたは約10%の増加または増強（例えば、少なくともまたは約20%の増加または増強、少なくともまたは約30%の増加または増強、少なくともまたは約40%の増加または増強、少なくともまたは約50%の増加または増強、少なくともまたは約60%の増加または増強、少なくともまたは約70%の増加または増強、少なくともまたは約80%の増加または増強、少なくともまたは約90%の増加または増強、少なくともまたは約95%の増加または増強、少なくともまたは約98%の増加または増強）である。

【0048】

本開示はさらに、対象のリンパ節への樹状細胞（DC）の遊走を増加させる方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、リンパ節へのDC遊走を増加させるのに有効な量で、本開示の組成物を対象に投与することを含む。本開示はさらに、対象において樹状細胞（DC）を活性化する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、対象においてDCを活性化するのに有効な量で、本開示の組成物を対象に投与することを含む。様々な例では、DCは、腫瘍増殖の優れた阻害をもたらす。したがって、本開示は、対象において腫瘍増殖を阻害する方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、対象において腫瘍増殖を阻害するのに有効な量で、本開示のリポソームを対象に投与することを含む。様々な態様では、本方法は、対象においてDCを活性化するのに有効な量で、本開示の組成物を対象に投与することを含む。これらの方法の様々な態様では、本方法は、対象から得られたDCを本開示のリポソームとインキュベートし、リポソームを含むDCを対

10

20

30

40

50

象に投与することを含む。様々な例における方法は、MRIを使用して、対象においてリンパ節へのリボソームを含むDCの遊走を追跡することを含む。様々な実施形態におけるDCの追跡を使用して、リボソームを含むDCを用いた療法に対する対象の応答を予測することができる。本明細書で使用される場合、「阻害する」という用語およびそれから派生する語は、100%または完全な阻害ではない場合がある。むしろ、様々な程度の阻害があり、当業者は、潜在的な利益または治療効果を有するものとして認識している。例示的な実施形態では、本開示の方法によって提供される阻害は、少なくともまたは約10%の阻害（例えば、少なくともまたは約20%の阻害、少なくともまたは約30%の阻害、少なくともまたは約40%の阻害、少なくともまたは約50%の阻害、少なくともまたは約60%の阻害、少なくともまたは約70%の阻害、少なくともまたは約80%の阻害、少なくともまたは約90%の阻害、少なくともまたは約95%の阻害、少なくともまたは約98%の阻害）である。

【0049】

対象のリンパ節への樹状細胞（DC）の遊走を追跡する方法が、本開示によって提供される。例示的な実施形態では、本方法は、（i）本明細書に記載される疾患を有する対象を治療する本開示の方法に従って、対象を治療することであって、細胞がDCであり、リボソームがIONPを含む、治療することと、（ii）対象の1つ以上のリンパ節に対して核磁気共鳴画像法（MRI）を行うことと、を含む。例示的な態様では、本方法は、1つ以上のリンパ節のT2*強調（T2*weighted）MRI強度を決定することを含み、対照の未処置リンパ節のT2*強調MRI強度と比較して、T2*強調MRI強度の減少を示すリンパ節は、DCが遊走したリンパ節を表す。特定の態様では、1つ以上のリンパ節は、対象の鼠径部リンパ節であり、任意選択的に、組成物は、対象の鼠径部に皮内投与される。例示的な例では、MRIは、組成物または細胞の投与前および投与後にリンパ節で行われ、任意選択的に、MRIは、投与前および投与約48時間後に行われ、任意選択的に、投与約72時間後に行われる。一部の態様では、本方法は、IONPを含むリボソームでトランスフェクトされたDCを含むリンパ節のT2*強調MRI強度を、対照の未処置リンパ節のT2*強調MRI強度と比較することを含む。例示的な態様では、本方法は、MRIを介して対象のリンパ節サイズを測定することを含み、任意選択的に、IONPを含むリボソームでトランスフェクトされたDCを含むリンパ節のリンパ節サイズを、対照の未治療のリンパ節のリンパ節サイズと比較することをさらに含む。

【0050】

本開示により、対象における樹状細胞（DC）のワクチン接種療法に対する対象の治療応答を決定する方法も提供される。例示的な実施形態では、本方法は、（i）本開示の治療方法に従って、対象を治療することであって、細胞がDCであり、リボソームがIONPを含む、治療することと、（ii）DC遊走を追跡する本開示の方法のいずれかに従って、リンパ節へのDC遊走を追跡することと、を含む。一部の態様では、処置リンパ節のT2*強調MRI強度が減少した場合、DCワクチン接種療法が、対象において正の治療応答をもたらすと決定される。例示的な例では、正の治療応答は、療法の投与後少なくとも4週間の対象の無増悪期間および全生存期間の延長を含む。一部の態様では、正の治療応答は、療法の投与後少なくとも8～12週間の対象の無増悪期間および全生存期間の延長を含む。

【0051】

本開示はまた、対象における樹状細胞（DC）ワクチン接種療法に対する治療応答をモニタリングする方法を提供する。例示的な実施形態では、本方法は、第1時点および第2時点で本開示の追跡方法のいずれか一つに従って、リンパ節へのDC遊走を追跡することを含み、第2時点での処置リンパ節のT2*強調MRI強度が、第1時点での処置リンパ節のT2*強調MRI強度と比較して減少する場合、DCワクチン接種療法に対する治療応答が有効である。

【0052】

また、IFN- γ のT細胞産生を増加させる方法が提供され、本開示のリボソームを含

むかまたはそれでトランスフェクトされた本開示の樹状細胞（DC）とT細胞を接触させることを含み、任意選択的に、リポソームは、IONPを含み、DCは、磁場の存在下で、リポソームでトランスフェクトされる。

【0053】

癌

本明細書に開示される方法によって治療可能な癌は、任意の癌、例えば、リンパ系または血流を通じて身体の他の部分に広がる可能性のある異常かつ制御されない細胞分裂によって引き起こされる任意の悪性増殖または腫瘍であり得る。一部の実施形態では、癌は、インテグリンおよびGタンパク質 α サブユニットが細胞の表面に発現される癌である。

【0054】

一部の態様における癌は、急性リンパ球性癌、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨癌、脳癌、乳癌、肛門癌、肛門管癌、または肛門直腸癌、眼癌、肝内胆管癌、関節の癌、頸部癌、胆嚢癌、または胸膜の癌、鼻、鼻腔、または中耳の癌、口腔の癌、外陰部癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膀胱癌、腹膜、大網、および腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌（RCC））、小腸癌、軟部組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、および膀胱癌、からなる群から選択されるものである。特定の態様では、癌は、頭頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌および食道癌、膀胱癌、胃腸癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌および大腸癌、肝細胞癌、膠芽腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）、細気管支肺胞癌、からなる群から選択される。

【0055】

対象

代表的実施形態では、本開示の方法の対象は、マウスおよびハムスターなどの齧歯目の哺乳動物、およびウサギなどのロゴモルファ目の哺乳動物、ネコ科の動物（ネコ）およびイヌ科の動物（イヌ）を含むネコ目の哺乳動物、ウシ科の動物（ウシ）およびイノシシ科の動物（ブタ）を含む偶蹄目の哺乳動物、またはウマ科の動物（ウマ）を含む奇蹄目の哺乳動物を含むが、これらに限定されない。一部の態様では、哺乳動物は、霊長目、Ceboid目またはSimoid目（サル）に属するか、または真猿亜目（ヒトおよび類人猿）に属する。代表的な態様では、哺乳動物は、ヒトである。一部の態様では、ヒトは、18歳以上の成人である。一部の態様では、ヒトは、17歳以下の子供である。

【0056】

このように一般的に記載される本発明は、例示として提供され、本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照することによって、より容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0057】

実施例1

この実施例は、本開示のコレステロール含有リポソームを作製する例示的な方法、および樹状細胞（DC）へのRNA送達のためのその使用を実証する。

【0058】

DCへのRNA送達に非常に効率的なコレステロール含有リポソームを作製するために、一連の実験が行われた。コレステロールを含まない対照リポソームは、Sayour et al., Oncoimmunology 6(1): e1256527 (2017) に本質的に記載されているように作製された。

【0059】

リポソームは、様々な薄膜再水和技術を使用して、様々な量のコレステロールで作製された。各製剤には、合計10mgの脂質が含まれた。作製された組成の概要を以下の表に示す。

【0060】

10

20

30

40

50

【表 1】

組成	DOTAP (mg)	コレステロール (mg)	DOTAP:コレステ ロール比 (質量)	%コレステロール
1	7.5	2.5	3:1	25
2	8.75	1.25	6:1	12.5
3	6.25	3.75	2:1	37
4	10	0	データなし	0

10

【0061】

簡単には、各組成について、DOTAPおよびコレステロール（またはDOTAPのみ）をクロロホルムに溶解し、ホウケイ酸ガラス管に加えた。クロロホルムを窒素ガス（N₂）で蒸発させ、次いで窒素なしで蒸発させた後、PBSで再水和した。次に、粒子を2 mLのPBSで再水和し、50℃の水浴でインキュベートし、10分ごとにボルテックスして、1時間、リポソームを形成させた。次に、リポソームを、室温で一晩放置した。翌日、リポソームを室温で5分間超音波処理し、450 nmフィルター、続いて200 nmフィルターで濾過した。

【0062】

コレステロールを含有するリポソームのトランスフェクション効率を、フローサイトメトリーでDC2.4と呼ばれる樹状細胞の不死化細胞株を使用してコレステロールを欠くりポソームのトランスフェクション効率と比較した。緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするRNA（GFP RNA）は、緩衝液中で約75 μgのリポソームを約5 μgのRNAとインキュベートすることによって、各タイプのリポソームに負荷した。混合物を、室温で15～20分間維持して、RNAを負荷したDOTAPリポソームを形成させた。細胞のトランスフェクションについては、約27 μgのRNA負荷DOTAPリポソームを、約200,000個のDC2.4細胞と一晩インキュベートした。GFP陽性（GFP⁺）細胞の割合は、フローサイトメトリーを介して評価した。簡単には、トランスフェクトされた細胞を、PBSで洗浄した後、約300 μLの0.05%トリプシンを加えた。5分後、血清含有培地を使用してトリプシンを中和し、細胞を、蛍光活性化セルソーティング（FACS）チューブに移した。これらの細胞を、PBSで洗浄し、FACS CaliburでのGFP発現のフローサイトメトリー分析のために、FACS緩衝液に再懸濁した。

20

30

【0063】

図1Aに示すように、DOTAPリポソームにコレステロールを添加すると、細胞トランスフェクションのレベルが大幅に増強した。フローサイトメトリーで測定したところ、12～37%のコレステロールを含むリポソームは、GFP⁺細胞の少なくとも3倍の増加が得られた。最高レベルの細胞トランスフェクションは、25%コレステロール含有量で配合されたリポソームで得られたが、37%コレステロール含有量で配合されたリポソームを使用した細胞トランスフェクションのレベルも、コレステロールを欠くりポソームよりも有意に大きかった。25%のコレステロール含有量を含有するリポソームを、その後の研究に使用した。

40

【0064】

別の実験では、GFP RNAをArcturus Turboラベリングキットを介してCy5で標識し、本質的に上記のように作製した0%または25%のコレステロールを、DOTAPリポソームに組み込んだ。リポソームを、DC2.4樹状細胞と一晩インキュベートし、フローサイトメトリーを介して分析した。コレステロールを含有するリポソーム（Chol-RNA-NP）は、生存率を減少させることなく、標準的なRNA-リポソームよりも有意に高い割合の細胞にRNAを送達した（図1Bおよび1C）。

【0065】

50

マウス神経膠腫細胞株から単離されたRNAを負荷した初代骨髄由来DC (BMDC) を使用して、コレステロールを含有するリポソームのトランスフェクション効率を、コレステロールを欠くリポソームのトランスフェクション効率と比較した。簡単には、腫瘍細胞からの全腫瘍由来RNA (KR158b-フルシフェラーゼ) は、市販のRNeasyミニキット (Qiagen) を使用して、製造元の説明書に基づいて単離した。本質的に上記のように作製された0%または25%コレステロールのいずれかを含むリポソームに、KR158b-フルシフェラーゼ腫瘍細胞からのRNAを負荷した。次いで、これらの細胞を、他のワクチン接種された動物由来のKR158b-フルシフェラーゼ特異的T細胞と2日間インキュベートした。48時間後、T細胞活性化の特徴としてのIFN- γ 産生を評価するために、上清を収集した。IFN- γ 産生は、IFN- γ ELISA (Invitrogen、BMS606) を介して、製造元の説明書に従って決定した。

【0066】

図1Dに示すように、コレステロール含有リポソームは、T細胞からより多くのIFN- γ 産生を誘発し、コレステロール負荷リポソームが、T細胞応答を活性化する主要なDC機能を増加させたことを示している。

【0067】

これらの結果は、コレステロールを含むリポソームが、コレステロールを含まないリポソームと比較して、より高い効率で、RNAを細胞に送達することを示している。データは、DOTAPおよびコレステロールの質量比が3:1で、リポソームの優れたトランスフェクション効率もたらされ、非常に効率的にDCをトランスフェクトすることができ、トランスフェクトされたDCが、次いでT細胞を活性化してIFN γ を産生することを示している。ここに提示された結果は、T細胞を活性化するためのDCワクチン接種戦略の一部としての、コレステロール含有リポソームの臨床的な有用性を示唆する。

【0068】

実施例2

この例は、コレステロール含有リポソームが、脳腫瘍の免疫細胞を標的とし得ることを示している。

【0069】

0%コレステロールまたは25%コレステロール (3:1のDOTAP:コレステロール比でDOTAPで作製された) を有するリポソームは、実施例1に記載されるように作製された。リポソームに、オポアルブミンをコードするCy3またはCy5標識RNA (OVA RNA) を負荷し、KR158b-フルシフェラーゼ腫瘍を有するマウスに静脈内注射した。KR158b-フルシフェラーゼは、テモゾロミドおよび放射線耐性のマウス神経膠腫株であり、周囲の脳組織への浸潤を含むヒト神経膠芽腫の特徴的な所見を再現している。24時間後、3匹のマウスから脳を抽出し、免疫蛍光イメージングのために保存した。図2Aは、皮質の免疫蛍光画像を表し、図2Bは、腫瘍の免疫蛍光画像を表す。腫瘍を別個のセットのマウスから抽出し、各腫瘍のCy5標識細胞の数を、フローサイトメトリーを介して分析した。未処置のマウスおよびCy5標識RNAのみで処置されたマウスは、陰性対照として機能した。図2Cに示すように、脳腫瘍におけるCy5+細胞の数は、コレステロールを含有するリポソームで最も多かった。

【0070】

異なる脳腫瘍モデルを試験した。25%コレステロールを含むまたは含まないRNA-リポソーム (3:1のDOTAP:コレステロール比でDOTAPで作製) にCy5標識RNAを負荷し、GL261腫瘍を有するマウスに静脈内注射した。GL261は、ヒト膠芽腫を表す治療モデルとして一般的に使用されるマウス膠肉腫である。24時間後、腫瘍を採取して、フローサイトメトリーでCy5標識細胞の数を評価した。KR158b-フルシフェラーゼ腫瘍を有するマウスの場合と同様に、コレステロールを有するリポソームのみが、Cy3またはCy5で標識されたmRNAをGL261腫瘍中の細胞に送達した (図2D)。これらの結果は、脳腫瘍のすぐ周囲の領域にあるこれらの標準的な免疫抑制細胞を操作できることを示唆しており、それによって、これらのリポソームを使用したワ

クチン接種戦略に前例のない利点を提供するため、重要であった。

【0071】

様々な量のコレステロール（0%、12.5%、25%、または37%）を含むDOTAPリポソームを、上記のように作製し、Cy3標識OVA RNAを負荷した。次に、RNA負荷リポソームを、KR158b-ヘルシフェラーゼ腫瘍を有するC57BL/6マウスに静脈内注射した。マウスから腫瘍を24時間後に採取し、フローサイトメトリーで評価した。図3に示すように、リポソーム中のコレステロールの量には、明確な依存性があった。25%のコレステロールを負荷したリポソームは、腫瘍中で最高量のCy3+細胞を示した。

【0072】

特定の細胞型にRNAを送達するリポソームの傾向を決定するために、さらなる研究を行った。図2Cのマウス由来の脳腫瘍スライス、内皮細胞マーカーCD31に対する免疫蛍光抗体で染色した。次に、蛍光顕微鏡で画像を撮影して、送達されたRNAと内皮血管との間の関係を評価した。図4に示すように、コレステロールを含有するRNA負荷リポソームは、CD31を発現する細胞と正確に共局在しなかった。これらの結果は、RNAが血管を取り巻く細胞に送達されるが、内皮細胞自体には送達されないことを示唆している。

【0073】

注射時にリポソームが標的とした細胞を特徴付けるために、さらなる実験を行った。C57BL/6マウスは、10,000個のKR158b-ヘルシフェラーゼ細胞の頭蓋内注射を受けた。3週間後、マウスは25%コレステロールと75%DOTAPから構成され、Cy5標識RNAを負荷したリポソームの静脈内注射を受けた。翌日、腫瘍を切除し、パインで解離し、単細胞懸濁液へと濾し、FACS緩衝液中で、Live/Dead Dye (LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit、Invitrogen L10119) およびCD45の抗体 (PerCP-Cy5.5、BioLegend) およびMHCIIの抗体 (FITC、ThermoFisher) で、フローサイトメトリー用に染色した。次いで、細胞を、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、BD LSRIIフローサイトメーターで評価した。図5A~5Cに示すように、コレステロールを含有するRNA負荷リポソームは、脳腫瘍のCD45+細胞にほぼ独占的に見出された。さらに、これらの細胞の約半分が、MHCIIクラスII陽性であった。この実験は、GL61腫瘍で繰り返され、ほぼ同じ結果が得られた。CD45は骨髄由来細胞の普遍的なマーカーであり、MHCIIは抗原提示細胞にのみ見られる抗原提示機構の不可欠な部分であるため、この証拠は、コレステロールを有するRNAリポソームが、脳腫瘍の免疫細胞（その約半分が、MHCII+抗原提示細胞である）にRNAを効率的に送達することを示している。CD45区画は、腫瘍増殖が抗腫瘍免疫応答を阻害することを支持するために採用されていることが知られているため、いずれかのCD45+集団へのRNA送達は治療の観点から興味深いものである。腫瘍中のMHCII+抗原提示細胞は、抗原特異的免疫寛容を誘導すると考えられているが、MHCII-細胞には、サイトカインを産生し、抗腫瘍免疫応答をさらに阻害する共抑制分子を発現することが知られている、骨髄由来抑制細胞が含まれる。

【0074】

この増強されたRNA送達が脳腫瘍に特異的であるかどうかを評価するために、コレステロール含有するRNA負荷リポソームが、末梢器官へのRNA送達も増強するかどうかを調べるための研究を実施した。C57BL/6マウスは、25質量%のコレステロールを有するCy5標識RNAリポソームの静脈内注射を受けた。脾臓、肝臓、および肺を、24時間で切除し、単細胞懸濁液へと濾し、溶解し、フローサイトメトリー用にCD45 (PerCP-Cy5.5) およびMHCII (FITC) で染色した。図6A~6Cに示すように、コレステロールを含有するRNA負荷リポソームは、0%のコレステロールを含有するRNA負荷リポソームよりも、肝臓のCD45+細胞でより多く見出された。肺と脾臓では、コレステロールを含有するRNA負荷リポソームは、0%のコレステロール

10

20

30

40

50

を含有するRNA負荷リポソームとほぼ同程度であることがわかった。これらの末梢器官のそれぞれにおけるRNAの取り込みを、脳腫瘍（6D～F）における取り込みに対してプロットした。この分析では、1つの臓器への取り込みと脳腫瘍への取り込みとの間の直接的な関係から、両方の部位での取り込みに類似するまたは関連するメカニズムが示唆されるであろう。いずれの場合も、その臓器への取り込みと脳腫瘍への取り込みとの間に有意な関係はなかった。これらのデータは、脳腫瘍におけるコレステロール含有RNA-リポソームの取り込みが、コレステロール含有RNA-リポソームが、肺、脾臓、または肝臓に取り込まれるメカニズムとは異なるメカニズムを通して起こることを示唆している。これらのデータはまた、コレステロール含有RNA-リポソームが、肺および肝臓の腫瘍を治療するためのワクチンとして魅力的な候補であることを示唆している。

10

【0075】

実施例3

この実施例は、本開示の磁性リポソームを作製するプロセスを実証する。

【0076】

酸化鉄（IO）を負荷したDOTAPリポソームを樹状細胞（DC）へのRNA送達に有用にし、核磁気共鳴画像法（MRI）の造影剤として有用にすることを目的とした、いくつかの実験を設計および実施した。

【0077】

実施例1に記載の対照リポソームを作製するためのプロトコルは、酸化鉄を含むように修正された。最初の一連の実験では、クロロホルム中の出発物質を超音波処理し、再水和物質で再水和した後、超音波処理した。表1に、IOを負荷したDOTAPリポソームを作製するために試験した様々な材料と条件の詳細を示す。IOは、社内で作製され、オレイン酸でコーティングされている。実験#1～5の場合、DOTAPは、少なくとも350 μ gの濃度で存在し、出発物質には、クロロホルム、ポリエチレングリコール（PEG）、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、およびオレイン酸中に1つ以上のIOが含まれていた。実験#6～7の場合、45 μ gのDOTAPと10 μ Lの30mg/mL IO溶液が出発物質であった。実験#8および9では、DOTAPが唯一の出発物質であり、実験10では、DOTAPはまったく含まれなかった。実験#1～7の場合、酸化鉄が出発物質であった。実験#8～10では、酸化鉄を再水和物質として使用した。

20

【0078】

30

40

50

【表 2】

表 1

実験#	出発物質 (クロロホルム中)	超音波処理、 クロロホルム中	再水和物質	再水和超音波 処理	超音波処理後の 処理
1	出発物質 (クロロホルム中)	RT、1 時間	1 mL の蒸留水	60°C で 20 分	磁気分離
2	350 µg DOTAP 9000 µg オレイン酸 420 µg PEG 300 µg IO、クロロホルム中	RT、1 時間	1 mL 蒸留水	60°C、20 分	磁気分離
3	475 µg DOTAP 300 µg IO、クロロホルム中 10 µl オレイン酸	RT、1 時間	1 mL 蒸留水	60°C、20 分	-20 で凍結、磁気分離器で融解
4	350 µg DOTAP 9000 µg オレイン酸 420 µg PEG 300 µg IO、クロロホルム中	RT、7 時間	1 mL 蒸留水	1 時間	磁気分離
5	2975 µg DOTAP 9000 µg オレイン酸 50 µL NMP 300 µg IO、クロロホルム中	RT、7 時間	1 mL 蒸留水	1 時間	磁気分離
6	2975 µg DOTAP 1920 µg PEG 9000 µg オレイン酸 50 µL NMP 300 µg IO、クロロホルム中	0.5 時間	1 mL 蒸留水	60°C、20 分	
7	20 µL DOTAP 300 µg IO	0.5 時間	1 mL 蒸留水	60°C、20 分	
8	2500 µg DOTAP		1 mL 鉄塩 溶液 4.5 mL	50°C、1 時間	翌日： 4.5mL NH ₃ ・H ₂ O 振盪 60°C、1 時間
9	2500 µg DOTAP		1 mL 鉄塩 溶液 4.5 mL	50°C、1 時間	翌日： 4.5mL NH ₃ ・H ₂ O 超音波処理 60°C、 1 時間
10	なし		1 mL 鉄塩 溶液 4.5 mL	50°C、1 時間	翌日： 4.5mL NH ₃ ・H ₂ O 振盪 60°C、1 時間

RT=室温、IO=酸化鉄、NMP=

【0079】

得られた粒子を、透過型電子顕微鏡（TEM）で分析した。実験#1～5の場合、TEM画像は、酸化鉄が、リポソームではなく、オレイン酸に含まれていることを示した。実験#6の場合、酸化鉄は、リポソームの外側に存在した。実験#7の場合、多くのリポソームには、IOが、ほとんどまたはまったくなかった。実験#8～10の場合、IOを有するリポソームが作製されなかった。

【0080】

2番目の一連の実験では、異なるソースから作製されたDOTAPとIOが使用された。いくつかの実験では、オレイン酸が出発物質であった。表2に、IOを負荷したDOT

A P リポソームを作製するために試験した様々な物質の詳細を示す。これらの各実験の条件は、実験 # 2 と同じであった。得られた粒子を、T E M を介して分析した。

【 0 0 8 1 】

【表 3】

表 2

実験 #	出発物質 (クロロホルム中)
1 1	4 7 5 μ g DOTAP 9 0 0 0 μ g オレイン酸 3 0 0 μ g IO (バッチ J)
1 2	4 7 5 μ g DOTAP 9 0 0 0 μ g オレイン酸 3 m g IO (バッチ A)
1 3	4 7 5 μ g DOTAP 9 0 0 0 μ g オレイン酸 3 0 0 μ g IO (バッチ A)
1 4	4 7 5 μ g DOTAP 2 0 μ L オレイン酸 6 m g IO (バッチ A)
1 5	4 7 5 μ g DOTAP 3 0 0 μ g IO (バッチ A)
1 6	2 5 0 0 μ g DOTAP 6 0 0 μ g IO (バッチ J)

【 0 0 8 2 】

実験 # 1 1 ~ 1 5 のそれぞれで、リポソームは、T E M で検出されなかった。実験 # 1 6 の場合、リポソームと酸化鉄粒子が、別々の実体として検出された。

【 0 0 8 3 】

3 番目の一連の実験では、出発物質を超音波処理し、精製蒸留水で再水和し、1 0 分ごとに超音波処理しながら 5 0 °C で 1 時間インキュベートした。次いで、粒子を一晩放置した後、5 分間超音波処理し、続いて 4 5 0 n m の W h a t m a n フィルターおよび 2 0 0 n m の P A L L フィルターで濾過した。IO は、出発物質として、または再水和物質として添加され、あるいは濾過後に添加された。表 3 に、IO を負荷した D O T A P リポソームを作製するために試験した様々な物質の詳細を示す。得られた粒子を、透過型電子顕微鏡 (T E M) で分析した。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3

実験#	出発物質、クロロホルム中	再水和物質
17	10 mg DOTAP 10 nM のオレイン酸でコーティング された IO ナノ粒子	4 mL PBS
18	10 mg DOTAP	4 mL PBS、400 μ g の 10 nm PEG 化 IO ナノ 粒子 (Sigma) を含む
19	10 mg DOTAP	4 mL PBS、200 μ g の 10 nm PEG 化 IO ナノ 粒子 (Sigma) を含む
20	10 mg DOTAP	2 mL PBS、後に 2 mL の PBS 中の 400 μ g の 10 nm PEG 化 IO ナノ粒子 (Sigma) へと濾過

【0085】

実験#17～20の場合、5 μ g の RNA を、75 μ g の各リボソーム組成の試料に加えた。次いで、これらの RNA 負荷リボソームを、電気泳動ゲルに負荷し、80 mV の電圧で泳動して、非結合 RNA の量を評価した。次いで、これらの RNA 負荷リボソームをクライオ TEM で評価して、酸化鉄がリボソーム内に結合しているかどうかを判定した。実験#20からのリボソームで、非結合 RNA が同定された。実験#17～19の場合、各粒子構築物は、RNA と結合したが、リボソーム中に IO が検出されなかった。

【0086】

4 番目の一連の実験では、様々な量の PEG 化酸化鉄ナノ粒子（直径 10 nm、200 μ g、400 μ g、1 mg、または 1.5 mg）または 400 μ g のフェラヘム（FH）を脂質ケーキに加えた。FH は、30 nm のデキストランでコーティングされた IO ナノ粒子からなる造影剤である。表 4 に、使用した物質の詳細を示す。

【0087】

【表 5】

表 4

実験#	DOTAP	コレステロール	IO ナノ粒子	FH
21	10 mg			
22	7.5 mg	2.5 mg		
23	7.5 mg	2.5 mg	200 μ g	
24	7.5 mg	2.5 mg	400 μ g	
25	7.5 mg	2.5 mg	1 mg	
26	7.5 mg	2.5 mg	1.5 mg	
27	10 mg	2.5 mg		400 μ g
28	7.5 mg	2.5 mg		400 μ g

【0088】

実験#25～26の場合、リボソームは効率的な RNA 結合能力とトランスフェクション効率を示した。しかし、IO ナノ粒子は、リボソーム内に検出されなかった。実験#27～28の場合、リボソームは、トランスフェクション効率が低いことを実証した。

【0089】

5 番目の一連の実験では、リボソームを、クロロホルム中の酸化鉄と混合し（実験 30～31）、4 mL の室温の PBS で再水和するか、クロロホルム相で酸化鉄なしで放置し、100 μ L の PBS 中で 2.5 mg の市販の IO ナノ粒子で再水和した。すべての試料

を、55℃の開始温度で1時間超音波処理し、次いで室温で一晩放置した後、450 nm Whatman フィルターおよび200 nmのPALL フィルターで濾過した。表5に、使用した物質の詳細を示す。

【0090】

【表6】

表5

実験#	DOTAP	コレステロール	IO ナノ粒子	手順
29	1.8	0.6	2.5 mg	900 μ L の PBS を含む 100 μ L IO で再水和
30	7.5	2.5	10 mg (オレイン酸コーティング)	IONP とともにクロロホルム中で1時間超音波処理
31	7.5	2.5	10 mg (オレイン酸コーティング)	IONPs を、N ₂ 下で 20 μ L ずつ蒸発させて、クロロホルム中の脂質にゆっくり加えた。

【0091】

実験#29では、酸化鉄は、リポソームの外側で検出された。実験#30～31では、酸化鉄の大量の凝集体が検出された。

【0092】

6番目の一連の実験では、7.5 mg の DOTAP と 2.5 mg の コレステロールを含む脂質ケーキを、IO ナノ粒子を含む溶液で再水和した。1つの実験では、2 mg のカルボキシル化 IO ナノ粒子（直径10 nm）を使用した。3つの実験では、様々な量の130 nmカルボキシル化酸化鉄ナノ粒子（NanoMag）を使用して、リポソームコア内に様々な量の酸化鉄を含むリポソームを作製した。脂質ケーキを2 mg のカルボキシル化10 nm酸化鉄ナノ粒子または10 μ g、100 μ g、または1 mg の NanoMag で再水和することによって形成されたリポソームは、Sayour et al., Oncology 6 (1): e1256527 (2015) に記載されたプロトコルに従って、RNA 結合およびトランスフェクション効率について試験した。4セットのリポソームは、すべてRNAに結合し、細胞をトランスフェクトすることができた。1 mg の IONP を有するリポソームは、最高レベルのトランスフェクション効率を示した。これらのリポソームは、クライオ-TEMによってリポソーム内にIOを有することが示され、有利なことに、これらのリポソームは、腫瘍モデルにおいて抗腫瘍免疫を刺激した。

【0093】

実施例4

この実施例は、磁性リポソームを作製する例示的な方法およびその特徴付けを実証する。

【0094】

カチオン性リポソームは、実施例1に記載の薄膜再水和技術のバリエーションを使用して生成した。図7Aに、基本的なステップの概略図を示す。技術の1つのバリエーションでは、酸化鉄ナノ粒子（IONP）がステップ3に追加されている。簡単には、7.5 mg の DOTAP と 2.5 mg の コレステロールをクロロホルムに溶解し、ホウケイ酸ガラス管に加えた（ステップ1）。クロロホルムをN₂で蒸発させ（ステップ2）、1時間乾燥させた後、高密度の酸化鉄溶液（200 μ L/mLの5 mg の NanoMag（登録商標））で再水和した（ステップ3）。次いで、粒子を、50℃の水浴でインキュベートし、10分ごとにボルテックスして1時間、リポソームを形成させた。次に、リポソームを、室温で一晩放置した。翌日、リポソームを、室温で5分間超音波処理し、450 nmおよび200 nmフィルターで濾過した（ステップ4）。

【0095】

技術の2番目のバリエーションでは、ステップ1で、IOを加えた。簡単には、7.5

mg の D O T A P と 2 . 5 mg の コレステロールを、オレイン酸でコーティングされた酸化鉄とともにクロロホルムに溶解し、ホウケイ酸ガラス管に加えた（ステップ 1）。クロロホルムを N₂ で蒸発させ（ステップ 2）、1 時間乾燥させた後、P B S で再水和した（ステップ 3）。次いで、粒子を、5 0 °C の水浴でインキュベートし、1 0 分ごとにボルテックスして 1 時間、リポソームを形成させた。次に、リポソームを、室温で一晩放置した。翌日、リポソームを、室温で 5 分間超音波処理し、4 5 0 nm および 2 0 0 nm フィルターで濾過した（ステップ 4）。

【 0 0 9 6 】

最も有効なナノ粒子は、再水和ステップ（ステップ 3）中にカルボキシル化酸化鉄ナノ粒子を加えるステップを含む方法で作製されることが判明し、高密度（ $\geq 1 \text{ mg} / \text{mL}$ ）の酸化鉄ナノ粒子の溶液（P B S の代わりに）が、再水和物質として使用された。ステップ 1 でカルボキシル化酸化鉄ナノ粒子を添加することを含むプロセスでも、ステップ 3 で I O を添加した場合と比較して、程度は低いものの、効果的なナノ粒子が生成された。

【 0 0 9 7 】

上記の方法で生成された磁性リポソームに、G F P RNA を、5 μg RNA : 7 5 μg 脂質比で負荷した。リポソームを、N a n o s i g h t N S 3 0 0 機器で分析した。これらの磁性リポソームは、クライオー T E M によってリポソーム内に I O を有することが示され（図 7 B）、主に 1 0 0 nm ~ 3 0 0 nm の範囲にあるように見え、3 7 0 nm の別の隆起は、複数の粒子の凝集を示している可能性がある（図 7 C）。したがって、磁性リポソームは、確かにナノ粒子（NP）であることが確認された。本開示を通して、酸化鉄 - RNA ナノ粒子（I O - RNA - NP）は、磁性リポソームと同義である。

【 0 0 9 8 】

I O NP の 1 mg / mL 以上の溶液を再水和物質として使用した上記の方法、または実施例 3 に記載の方法、によって生成された I O - RNA - NP に、G F P RNA を、5 μg RNA : 7 5 μg 脂質比で負荷した。各リポソームを、1 % アガロースゲルのウェルに加えた。図 7 D に示すように、各条件でバンドの不在は、すべての方法で、これらの条件で負荷された RNA が 1 0 0 % 結合するリポソームが得られたことを示している。

【 0 0 9 9 】

酸化鉄を含むまたは含まない RNA - NP を使用して、D C 2 . 4 を G F P RNA でトランスフェクトした。I O - RNA - NP は、酸化鉄を含まない標準的な RNA - NP のトランスフェクション効率よりも高い、有意なトランスフェクション効率を示した（図 7 E）。

【 0 1 0 0 】

I O とコレステロールを負荷した RNA - NP（C h o l - I O - RNA - NP）を使用して D C 2 . 4 をトランスフェクトし、標準的な I O を負荷した RNA - NP（0 % コレステロール）と比較した。G F P + 細胞をフローサイトメトリーで測定した。図 7 F に示すように、コレステロールの存在は、コレステロールを含まない I O を負荷した NP と比較して、トランスフェクション効率を 2 倍以上に向上させた。この結果は、D O T A P およびコレステロールの比率が 3 : 1 の場合、酸化鉄を負荷したリポソームに、最適なトランスフェクション効率を提供することを示している。トランスフェクトされた D C の明視野画像を撮影した（図 7 G）。トランスフェクトされた D C の蛍光イメージングを行い（図 7 H）、D C の核周囲領域に C y 3 標識 RNA が存在することが実証された。この領域への局在化は、酸化鉄またはコレステロール含有量に関係なく発生するように見えた。

【 0 1 0 1 】

様々な量のカルボキシル化 I O（直径 1 3 0 nm）を除いて、I O 負荷リポソームは、上記のように作製した。脂質（1 0 mg、7 . 5 mg D O T A P および 2 . 5 mg コレステロール）を様々な量のカルボキシル化酸化鉄（2 0 0 μg 、4 0 0 μg 、1 mg、または 1 . 5 mg）とともにクロロフォームに再水和して、最終酸化鉄含有量が 0 . 5 $\mu \text{g} / \text{uL}$ 、1 $\mu \text{g} / \text{uL}$ 、2 . 5 $\mu \text{g} / \text{uL}$ または 3 . 7 5 $\mu \text{g} / \text{uL}$ の粒子を得た。これらの粒子に、C y 5 標識 G F P RNA を負荷し、D C 2 . 4 をトランスフェクトするのに

使用した。24時間でのフローサイトメトリーは、酸化鉄含有量が増加すると、トランスフェクション効率を増加することを示した（図7E）。この増強は、どの細胞タイプについても今まで報告されたことはなく、この観察結果は、細胞、例えば、DCのトランスフェクションを増強するための酸化鉄負荷リポソームの新規の用途を支持し得る。

【0102】

実施例5

この実施例は、磁性リポソームに対する磁場の効果を示している。

【0103】

磁性リポソームがRNAを細胞に送達する能力に対する、101mTの磁場の効果を試験した。実施例1に記載のように、いずれか0%または25%のコレステロールを有する磁性リポソームに、GFP RNAを負荷した。GFP RNAを負荷した磁性リポソームを、磁場の存在下または不在下で、DC2.4樹状細胞と30分間インキュベートした。1セットの細胞では、MagneFect-Nano II 24ウェルマグネットアレイによって生成された磁場の不在下で、RNA負荷磁性リポソームを、DC2.4樹状細胞と一晚インキュベートした。30分後、粒子を含有する培地を除去し、新鮮な培地と交換した。遺伝子送達は、24時間でのフローサイトメトリーにより、GFPの発現として評価された。図8Aに示すように、GFP⁺DCの数は、磁場が存在しない場合と比較して、磁場が存在する場合の方がより多かった。これらのデータは、磁場を使用してDCへのRNA送達を増強できることを支持する。

【0104】

10mgの脂質あたり、様々な量の酸化鉄（0μg、10μg、100μg、1000μg）で合成されたコレステロール負荷磁性リポソームに、Cy5標識GFP RNAを負荷した。次いで、RNAを負荷した磁性リポソームを使用して、静磁場の存在下で、DC2.4樹状細胞を30分間トランスフェクトした。図8Bに示すように、リポソーム内の酸化鉄の存在は、用量依存的に%GFP⁺DCを増加させた。最小量のIOは、%GFP⁺DCにおいて2倍の差をもたらし、最大量のIOは、%トランスフェクト細胞において5倍の増加をもたらした。これらのデータは、酸化鉄含有量が、磁場への応答性と、それに続く樹状細胞のトランスフェクションとを、増強することを支持する。

【0105】

磁性リポソーム（10mgの脂質あたり1mgのIO）に、Cy3標識RNAを負荷し、続いて磁場の存在下または不在下でDC2.4樹状細胞と30分間、または磁場の不在下で一晚インキュベートした。GFP⁺細胞の%を決定するために、磁気曝露の24時間後に、フローサイトメトリーを行った。図8Cに示すように、%GFP⁺細胞は、磁場の不在下で、IO不含リポソームに一晚（18時間）曝露した細胞で最も高かった。ただし、リポソームがIOを含み、RNAと細胞のインキュベーション期間中に磁場にさらされた場合、同じレベルのトランスフェクションは、ごく一部の時間（30分）でしか得られなかった。これらの結果は、磁性リポソームのトランスフェクション効率が、磁場の存在下で6倍高かったことを示唆している。カチオン性リポソームとの一晚のインキュベーションは、細胞毒性と関連していることから、時間の大幅な短縮（30分対18時間）は重要である。したがって、RNAと細胞のインキュベーション時間を95%超短縮することで、患者一人あたりで産生されるトランスフェクトされた細胞の数が増加するものと考えられる。

【0106】

細胞内の酸化鉄の存在は、磁場で細胞を操作するさらなる機会を提供する。この手法の1つの用途は、酸化鉄ナノ粒子を取り込んだ細胞と、取り込んでいない細胞とを区別することである。この用途を試験するために、上に記載のように、BMDCを、RNA負荷マグネトリポソームと一晚インキュベートした。18時間後、DCをエッペンドルフチューブに移し、37℃で30分間磁気分離器に置いた。図8Dに見られるように、BMDCの目に見える塊が、磁場強度が最大であるエッペンドルフチューブの側面に引き付けられた。

【0107】

10

20

30

40

50

初代骨髄由来樹状細胞（BMD C）は、臨床研究で使用する患者由来樹状細胞よりも代表的である。ある研究では、磁性リポソームを使用した細胞トランスフェクション効率に対する磁場の効果を、初代BMD Cを使用して試験した。1mgのIO（10質量%）を有するまたは有さない、3：1のDOTAP：コレステロール比でDOTAPおよびコレステロールを含むリポソームに、Cy5標識GFP RNAを負荷した。次いで、RNA負荷リポソームを、初代BMD Cとともに、磁場の存在下または不在下で30分間、または磁場の不在下で一晩インキュベートした。図8Eに示すように、細胞を磁場の存在下でRNAとインキュベートした場合、標識されたBMD Cの割合がより高かった。フローサイトメトリーによって評価されたGFP発現、および、図8Fに示すように、静的磁石の存在下でIOを含むリポソームでトランスフェクトされた初代BMD C細胞は、IOを欠くリポソームまたはIOを含むが磁石の不在下でインキュベートされたリポソームでトランスフェクトされた細胞と比較して、%GFP+細胞がほぼ2倍の増加をもたらした。これらの結果は、磁場の存在下での酸化鉄負荷ナノ粒子を30分間インキュベーションした場合、その磁場の不在下で一晩インキュベーションした場合と比較して、トランスフェクション効率で100%の増加が十分に達成されることを示している。

【0108】

実施例6

この実施例は、RNA負荷磁性リポソームが、DCの活性化とリンパ節への遊走を刺激することを示している。

【0109】

樹状細胞は、抗ウイルス性免疫応答の重要な要素である。これらの細胞の主な役割の1つは、ウイルス感染の特徴である外来核酸の感受に応答してI型インターフェロン（IFN- α またはIFN- β ）を産生することである。これらの抗原経験（antigen-experienced）DCは、CD8⁺T細胞にウイルス抗原を提示する。共刺激分子の存在下でDC上の抗原に結合するT細胞は、刺激されてIFN- γ を放出する。図9Aに、これらの経路の図を示す。

【0110】

これらのサイトカイン刺激経路を考慮して、24ウェルプレートに、1.33 μ gのRNA：25 μ gのリポソーム：200,000個の細胞の比率で、GFP RNAが負荷されたリポソーム（GFP mRNA+NP）とインキュベートしたDC、GFP RNAでエレクトロポレーションしたDC（エレクトロ）、RNAが負荷されていないリポソームとインキュベートしたDC、および未処置のDC、によるIFN- α の放出を測定した。インキュベーションを開始して20時間後に上清を回収し、ELISAで、IFN- α の産生を分析した。図9Bに示すように、IFN- α のレベルは、DCを、GFP-RNA負荷リポソームとインキュベートしたときに最も高くなった。磁性リポソームで得られたIFN- α 産生のこの増加は、同様のワクチン接種モデルで抗腫瘍免疫応答に不可欠であることが示されているように、臨床上で関連性がある。

【0111】

RNA-NP負荷DCのT細胞刺激能力を試験するために、オボアルブミン特異的OT1トランスジェニックT細胞を、オボアルブミンRNAを有する磁性リポソームを負荷したBMD Cとインキュベートした。48時間後に上清を除去し、ELISAを実行して、これらの細胞からのIFN- γ の放出を評価した。図9Cに示すように、磁性リポソームを負荷したBMD Cは、T細胞の活性化を誘導した。

【0112】

膠芽腫を有するヒトにおける以前の研究は、RNAがパルスされた樹状細胞のリンパ節への遊走が、良好な免疫化と直接相関することを示している（Mitchell et al., Nature 519:366-369 (2015)）。したがって、現在の至適基準であるDCトランスフェクション技術（エレクトロポレーション）と比較して、樹状細胞の遊走能力に対する磁性リポソームの効果を評価しようとした。ナイーブOT1（18時間の時点）またはC57BL6マウス（48時間および72時間の時点）は、エレクト

10

20

30

40

50

トロポレーションまたは磁性リポソーム（反対側に）を介して、OVA RNA（18時間）またはCy3標識GFP RNA（48時間および72時間）が負荷されたDsRed DCの皮内注射を受けた。両側のリンパ節を18、48、または72時間で採取し、コラゲナーゼで解離した。次いで、フローサイトメトリーを実行して、各動物の各リンパ節に遊走した細胞の数を定量化した。図9Dに示すように、磁性リポソームが負荷された樹状細胞は、DCにRNAをエレクトロポレーションした場合のリンパ節（lymph node、LN）へのDC遊走と比較して、LNへの遊走が、2日目で80%超、3日目で25%超、増強された。この増強された遊走能力は、マグネトリポソームが負荷されたDCが、エレクトロポレーションされたDCとは根本的に異なり、抗腫瘍免疫応答に対して特有の利点を提供できることを示唆している。

10

【0113】

この実施例は、磁性リポソームが、DC活性化を増強できることを示した。

【0114】

実施例7

この実施例は、磁性リポソームが、MRIに基づく細胞追跡を可能にすることを示している。

【0115】

マグネトリポソームにOVA RNAを負荷し、BMDCとインキュベートした。次いで、これらのDCを、C57BL6マウスの左鼠径部に皮内注射した。48時間後、これらのマウスは、様々なMRIイメージングシーケンスを使用して、11TのMRIでイメージングされた。これらのシーケンスには、T2*強調シーケンス：繰り返し時間（TR）／エコー時間（TE）比が、脂肪飽和がある場合とない場合で90／3、脂肪飽和がある場合で3500／12、脂肪飽和がある場合で207／17、および脂肪がある場合で90／5、ならびにT2 RARE強調シーケンス：TR／TEが、脂肪飽和がある場合とない場合で500／14、が含まれた。これらの画像シーケンスのすべてのスライスで、リンパ節の周囲に領域が描画された。TR／TEが207／17であるT2*強調画像、およびイメージングパラメータの各セットのT2 RARE強調画像における、処置リンパ節と未処置リンパ節との間の強度の変化が、図10Aでは、代表的な画像で表示され、図10Bでは、定量化されている。画像とデータは、処置されたリンパ節におけるT2*強調画像のシグナル強度の減少を示すもので、酸化鉄の予想される効果である。

20

30

【0116】

イメージング後、リンパ節を採取し、DsRed⁺細胞についてフローサイトメトリーで分析した。次いで、各リンパ節の細胞の数を、脂肪飽和を伴うT2*強調画像における強度の相対変化（図10C）、および上記の異なるイメージングシーケンスにわたって未処置リンパ節と比較したリンパ節サイズの平均相対変化（図10D）、に対してプロットした。リンパ節サイズの平均増加を決定するとき、各鼠径部リンパ節（処置および未処置）の体積は、各MRIスライスの各リンパ節周囲の目的の領域を描くことによって見出した。次に、ImageJを使用して、これらの各スライスの面積を計算した。これらの領域に、各スライスの幅を乗算して、そのスライスの体積を決定した。次いで、これらの体積は、リンパ節を含有するその画像セット内のすべてのスライスについて合計され、各イメージングシーケンスのMRI検出リンパ節の体積が生成された。次いで、各シーケンスのリンパ節サイズの相対的な変化は、処置リンパ節の体積を、各シーケンスの反対側の未処置リンパ節の体積で除算することによって見出した。次いで、リンパ節サイズの全体的な平均変化は、上記の7つのイメージングシーケンスにわたって計算されたリンパ節体積のすべての相対変化の平均を取ることによって求めた。

40

【0117】

図10Cおよび10Dに示すように、各リンパ節の酸化鉄負荷樹状細胞の数と、T2*強調MRI画像の強度（10C）およびリンパ節サイズ（10D）の間には、明らかな定量的関係があった。相関関係は、驚くほど信頼できるように見えた。リンパ節への樹状細胞の遊走を定量化する以前の試みでは、シグナル対ノイズ比の比較的複雑な計算または

50

「ボイドボリューム」内の強度の比較が必要であった (de Chickera S, et al., Int Immunol. 2012; 24 (1): 29-41. doi: 10.1093/intimm/dxr095. PubMed PMID: 22190576、および Zhang et al., Radiology 274 (1): 192-200 doi: 10.1148/radiol.14132172)。

【0118】

T2*強調MRI強度とリンパ節サイズの両方が、流入領域リンパ節であるワクチン接種部位におけるマグネトリボソーム負荷樹状細胞の数と、直接相関しているという知見は、比較的未熟な観察者が非常に単純な分析技術を用いてワクチン接種戦略の成功率を評価できることから、著しい進歩である。さらに、他には樹状細胞の遊走とMRI出力との間の関係が示されているが、DCに抗原を送達し、それらのDCを活性化し、MRIに基づくこれらの細胞の追跡を可能にし得る多機能粒子を利用したものはない。したがって、本明細書に記載の磁性リボソームは、(1) RNAを高効率でDCに送達し、(2) DCを活性化してIFN α を放出させ、(3) 外部磁場の適用によりトランスフェクション効率の増強を可能にし、(4) リンパ節への樹状細胞の遊走を半定量的に評価するためにMRIシグナルに十分な変化を生成する、能力を有する最初が多機能粒子である。線形回帰を使用して最適な線を生じ、ピアソンの相関を使用して、適合度を計算した。ここでは、カウントされた細胞とMRI強度との間の関係を評価するp値として表示している。

【0119】

実施例 8

この実施例は、MRIで検出されたDCの遊走が、腫瘍増殖の抑制を予測することを示している。

【0120】

C57BL/6マウスに、0日目に1,000,000個の細胞の皮下投与を介して、B16F10-OVA腫瘍を投与した。同日、マウスは、オボアルブミン(OVA)をコードするRNAを有する500,000個の骨髓由来樹状細胞を、2,000,000個の細胞ごとに10 μ gのRNAに対して150 μ gの磁性リボソームの比率で皮内注射を受け、および10,000,000個のOT1 T細胞を静脈内注射を受けた。2日後、実施例7に記載の6つのMRIシーケンスの特有なセットを使用して、マウスを11T MRIで画像化した。

【0121】

最初の実験では、腫瘍を有するC57BL/6マウスを、上記のように処置するか、処置せずに放置した。腫瘍増殖を20日以上測定し、その結果を図11Aに示す。この図に示すように、腫瘍サイズは、未処置マウスと比較して、OVA RNAを含む磁性リボソームを負荷したBMDCで処置されたマウスの方がかなり小さかった。

【0122】

2番目の実験では、腫瘍を有するC57BL/6マウスを、上記のように処置し、腫瘍増殖を30日間測定した(図11B)。腫瘍が急速に増殖したマウスのサブセットを「非応答者」に指定し、腫瘍が増殖しなかったサブセットを「応答者」に指定した。図11Cに示すように、応答者と非応答者は、27日目に有意に異なる腫瘍体積を示した。図11Dは、これらのマウスの2日目のMRIシーケンスの分析を示している。図11Dに示すように、MRIシーケンスは、2つのグループ間で、T2*脂肪抑制画像強度に有意差があることを示している。この分析に使用したT2*脂肪抑制シーケンスは一意である。理論的に類似した他の6つのシーケンスを評価したが、2日目のMRI強度と腫瘍増殖との間に定量的な関係を提供するものはなかった。例えば、図11Eを参照されたい。27日目の腫瘍体積を、2日目のMRI強度に対してプロットすると、有意な線形関係が示された。これを、図11Fに示す。

【0123】

これらのデータは、磁性リボソームが、処置2日後の樹状細胞遊走のMRIに基づく検出を可能にし、処置4週間後にどのマウスが処置に応答するのかを正確に予測することを

10

20

30

40

50

示唆している。これは、多機能粒子による腫瘍増殖の抑制とMRI強度との相関関係の最初の実証である。MRIの予測効果は、他の1つのグループによってのみ示されている（Zhang Z, Li W, Prociassi D, Li K, Sheu AY, Gordon AC, Guo Y, Khazaie K, Huan Y, Han G, Larson AC. Antigen-loaded dendritic cell migration: MR imaging in a pancreatic carcinoma model. Radiology. 2015; 274 (1): 192-200. doi: 10.1148/radiol.14132172. PubMed PMID: 25222066; PMCID: PMC4314117）。ただし、このグループは、前後の画像のシグナル対ノイズ比に依存する、あまり直接的なアプローチを使用していなかった。このグループも、多機能粒子を使用していなかった。本明細書に記載の単純化された方法は、単純だが特有のMRIシーケンスを使用して、同じ動物のワクチン未接種のリンパ節に対する定量化および比較を可能にする。

【0124】

実施例 9

この実施例は、本開示の磁性リポソームを含むDCワクチンでヒト患者を治療する方法、および治療に対する応答を予測する方法を実証する。

【0125】

酸化鉄を負荷した磁性リポソームは、実施例 7 B に本質的に記載されているように作製される。癌患者から腫瘍を切除し、腫瘍細胞からRNAを単離する。次いで、RNAを、cDNAライブラリへの逆転写、PCRを用いたそのcDNAライブラリへの増幅、およびインビトロ転写、を介して増幅し、実施例 8 に本質的に記載されるように、磁性リポソームに負荷した。別の実施形態では、特定の腫瘍関連抗原をコードするRNAを生成し、実施例 8 に本質的に記載されるように、磁性リポソームに負荷した。白血球は、白血球アフェレーシスを介して、同じ癌患者から分離した。WBCを、IL-4とGM-CSFで処置すると、樹状細胞を生成する。DCは、実施例 8 に本質的に記載されるように、RNAとともに調製された磁性リポソームが負荷される。RNAを有する磁性リポソームを含む約 2×10^7 個の樹状細胞が、患者の鼠径部に皮内注射される。エコー時間が5ミリ秒のT2*強調画像を含む様々なMRI画像は、ワクチン接種の直前、およびワクチン接種の24、48、および72時間後に撮影される。

【0126】

治療の前後に得られたMRIを使用して、各患者のリンパ節サイズとT2*強調リンパ節強度の変化を決定する。次に、実施例 8 に記載されるように、Image J で処理するために、各鼠径部リンパ節周囲の目的の領域が描画される。簡単には、7つのイメージングシーケンスにわたる平均リンパ節体積と、処置後1、2、および3日目のT2*強調画像上のリンパ節内の平均強度を、悪性神経腫瘍を有する患者の無増悪期間と全生存期間に対してプロットする。次いで、リンパ節のサイズまたは低強度と、無増悪期間または全生存期間との間の強い相関を使用して、ワクチン接種から数日以内の治療に対する患者の応答を予測する。

【0127】

実施例 10

この実施例は、免疫調節核酸を、末梢および悪性脳腫瘍内の免疫細胞に送達する方法を示している。

【0128】

悪性脳腫瘍を有する患者は、原発腫瘍部位の外科的切除または生検を受ける。その腫瘍由来のRNAは、実施例 9 に記載されるように、単離および増幅される。腫瘍抗原をコードする増幅されたmRNAは、25 μ g のRNA: 375 μ g のリポソームの比率で、約75% DOTAP と25% コレステロールで構成されたリポソームに結合する。別の実施形態では、mRNAは、腫瘍関連抗原に特異的なmRNAを含み、任意選択的に、サイトメガロウイルス抗原 pp65を含む。別の実施形態では、RNAは、免疫調節タンパク質

、例えば、CD86のような共刺激分子、CCL3のような走化性因子、または顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）のような活性化サイトカインをコードするmRNAを含む。別の実施形態では、RNAは、トランスフェクトされた細胞の免疫機能を調節するように設計されたsiRNAまたはshRNAを含む。siRNAまたはshRNA送達の実験調節標的の例は、プログラム細胞死リガンド1（PD-L1）である。別の実施形態では、RNAは、免疫機能を活性化または阻害するのに有用な他の核酸を含む。別の実施形態では、RNAは、併用療法において上記に列挙されたRNA構築物のうちの2つ以上を含む。例えば、腫瘍に由来するmRNAは、PD-L1のsiRNAの有無を問わずpp65mRNAと組み合わせられる。別の実施形態では、リポソームは、10mgの脂質あたり1mgの酸化鉄を含む。次いで、これらのリポソームを、定期的に患者に静脈内注射する。一実施形態では、この間隔は、6回の注射の場合は週に2回、さらに6回の注射の場合は月に2回、または疾患が進行するまでである。別の実施形態では、患者は、連続的なワクチンで異なるRNA構築物を受容する。例えば、患者は、腫瘍由来のmRNAを負荷したリポソームを3週間受容し、次いで、腫瘍由来のmRNAとPD-L1 siRNAを隔月で6回注射する。

【0129】

酸化鉄を含有するリポソームでワクチン接種された患者の場合、ワクチン接種前と接種24時間後に、T2*強調MRIシーケンスが取得される。ワクチン接種前後のMRI強度の変化を、無増悪期間と全生存期間に対してプロットして、MRIで検出された脳腫瘍への粒子の局在が、治療に対する患者の応答と相関するかどうかを評価する。

【0130】

実施例11

この実施例は、粒子の局在化に対する脂質組成の効果とRNAが負荷された細胞の特徴付けを示している。

【0131】

本発明者らは、以前、腫瘍抗原をコードするmRNAを負荷したカチオン性リポソーム（RNA-NP）が、黒色腫の前臨床モデルで皮下および頭蓋内腫瘍を排除するのに十分な、末梢器官で強力な免疫活性化を誘導したことを報告した^{9, 10}。しかし、これらの粒子は、正電荷のために主として肺に蓄積する（図24）⁹。この肺への取り込みを回避するために、リポソーム表面の正電荷の濃縮を減少させる試みとして、コレステロールを含むように脂質組成を修飾した。この修飾は、肺と脾臓への粒子の局在を変えることはできなかったが、肝臓へのRNA-NPの局在を増加させた（図23）。次いで、頭蓋内KR158b-シフェラーゼ、放射線療法、化学療法、およびチェックポイント阻害剤耐性マウス神経腫瘍株を用いて、マウスにおける粒子の局在を試験した。驚くべきことに、リポソームの注射24時間後の免疫蛍光顕微鏡法で、これらの修飾リポソームは、脳腫瘍に蓄積したが、周囲の正常な皮質には蓄積しなかったことが明らかになった（図12A）。しかし、コレステロールを含まないリポソームは、いずれの領域にも蓄積しなかった。

【0132】

この結果に興味を抱き、この観察を繰り返し、動物のより大きなコホートで、フローサイトメトリーを使用して、KR158b-シフェラーゼとGL261における粒子の取り込みを定量化した。本発明者らは、コレステロールの存在で、両方の腫瘍においてリポソームの取り込みが増強され（図12B～C）、この効果が、25質量%のコレステロール濃度で、最も顕著であることを発見した（図12D）。まとめると、この証拠は、コレステロールを有するリポソームが、免疫調節核酸を、脳腫瘍に誘導するための単純なツールであり得ることを示している。

【0133】

本発明者らは、次いで、脳腫瘍でRNAが負荷された細胞の特徴付けをしようとした。リポソームは、正常な脳ではなく腫瘍にのみ蓄積するため、腫瘍関連の血管内皮に浸潤している可能性があるかと仮定した。RNAが負荷された細胞は、脳腫瘍の内皮の近くにロアライズしたが、免疫蛍光顕微鏡法とフローサイトメトリーの両方で、これらの細胞がCD

31を欠いていることが示された(図2A)。しかし、約50%のCD45+であったバルク腫瘍とは対照的に、GL261とKR158bの両方のRNA標識細胞は、ほぼ100%がCD45+であった(図13B、C)。さらに、KR158bおよびGL261におけるRNA標識CD45+細胞は、不均衡に、F4/80+、MHCI+、CD11b+、およびLy6G/6C+であった(図13D~G)。この興味深い結果は、Chol-RNA-NPが、腫瘍関連マクロファージ(TAM)で構成される脳腫瘍微小環境中の抗原提示細胞に、核酸を直接送達していることを示唆している。

【0134】

実施例12

この実施例は、RNAが負荷された細胞に対するChol-RNA-NPの効果を実証する。

【0135】

TAMは、抗腫瘍免疫応答を抑制することが知られているが、MHCI、CD80、およびCD86の発現増加を特徴とする抗腫瘍表現型へと再プログラムすることができる(6, 11)。本発明者らは、RNA-NPが末梢器官の自然免疫細胞を活性化することを以前に示したので、次に、これらのリポソームが、脳腫瘍微小環境中のTAMも活性化できるかどうかを評価した。本発明者らは、再びリポソームに蛍光標識mRNAを負荷し、これらをマウスに全身的に注射した。本発明者らは、24時間後、Chol-RNA-NPを取り込んだF4/80+細胞が、MHCIの発現を有意に上方制御することを見出した(図14A)。さらに、本発明者らは、これらのCy5標識MHCI+細胞も、高レベルのCD80およびCD86を発現していることを見出した(図14B、C)。興味深いことに、本発明者らはまた、RNAを含有しないバルク集団中のTAMでのCD80の増加を見出した。

【0136】

実施例13

この実施例は、Chol-RNA-NPによるPDL1 siRNAの送達を示している。

【0137】

この仮説を試験するために、Chol-RNA-NPを細胞特異的チェックポイント遮断剤と組み合わせようとした。最初に、公開された文献から抗PDL1 siRNAのライブラリを生成し、トランスフェクション効率を損なうことなく、トランスフェクション後2、3、および4日目のDCにおけるPDL1の発現を抑制する能力についてスクリーニングした。このスクリーニングを通して、GFP発現を減少させることなく、PDL1の発現を有意に減少させるsiRNA種(s iPDL1)を同定した(図24)。

【0138】

次いで、Chol-RNA-NPが、このsiRNAを頭蓋内脳腫瘍に送達できるかどうかを試験した。mRNAを送達する我々の結果を支持するように、Chol-RNA-NPが、頭蓋内腫瘍中のCD45+MHCI+細胞へのCy3標識siRNAの送達を有意に増加させることを、本発明者らは見出した(図15A~C)。mRNAが負荷された細胞と同様に、これらの細胞の多くは、APCマーカーMHCI、F4/80、およびCD11bを発現していた(図15D~F)。

【0139】

本発明者らは、次いで、これらの細胞でのPDL1発現について染色することによって、Chol-RNA-NPにより送達されたsiRNAが、機能的に活性であるかどうかを試験した。これらの実験では、対照として非コードsiRNA(s iCTRL)を利用した。s iPDL1を有するChol-RNA-NPの単回注射で、未処置腫瘍中の細胞、および処置腫瘍のバルク(bulk、大部分)の細胞と比較して、siRNAを負荷した抗原提示細胞でのPDL1発現が減少していることがわかった(図15G~I)。本発明者らは、次いで、この効果が、追加の投与で拡大され得ることを実証した。本発明者らは、Chol-RNA-NPを介したs iPDL1の1日3回の投与は、未処置細胞(未

10

20

30

40

50

処置：60.06+/-22.24、Cy5+siPDL1：16.7+/-19.23、 $p=0.0255$ ）、腫瘍におけるバルクの細胞（バルク：45.82+/-17.04、Cy5+siPDL1：16.7+/-19.23、 $p=0.047$ ）、および対照siRNAで処置された細胞（CTRL：77.14+/-28、Cy5+siPDL1：16.7+/-19.23、 $p=0.0081$ ）と比較して、トランスフェクトされたMDSCでのPDL1発現を、劇的に減少させることがわかった（図15J）。まとめると、この証拠は、Chol-RNA-NPを使用して、腫瘍内免疫細胞を活性化し、免疫調節核酸で細胞の挙動を改変できることを示している（図15K）。

【0140】

実施例14

この実施例は、実施例11～13の実験で使用された材料と方法を示している。

【0141】

RNAの調製と標識：GFPとOVAのmRNAは、前述のように、インビトロ転写を介して生成した¹²。PDL1とCTRLのsiRNAは、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。核酸のラベリングは、製造元の説明書（ThermoFisher Scientific）に従って、Arcturus Turbo Labeling Kitsを使用して完了した。

【0142】

細胞培養：DC2.4とKR158b-1シフェラーゼは、デューク大学のJohn Sampson氏からの好意的な寄贈による¹³。GL261は、EMD Milliporeから購入した。DC2.4とKR158b-1シフェラーゼは、10%熱不活性化ウシ胎児血清（FBS）および1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Life Technologies）を補充したビルビン酸を含む高グルコースDMEM中で、5%CO₂、37℃で培養した。GL261は、Glutamax、10%FBS、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Life Technologies）を含むDMEM/F-12で培養した。

【0143】

RNA-NPの合成：（1）リポソームの合成：リポソームは、以前に記載されているように調製した¹²。簡単には、脱水したDOTAPおよびコレステロール700000P（Avanti Polar Lipids）をクロロホルムに懸濁し、DOTAP：コレステロール比が、4：0、3.5：0.5、3：1、または2.5：1.5で混合した。次に、クロロホルムを、窒素の存在下で蒸発させた。次いで、脂質ケーキを、リン酸緩衝食塩水（PBS）で2.5mg/mLの濃度にし、10分ごとにボルテックスしながら1時間、50℃で加熱し、室温で一晩放置した。次いで、脂質を、5分間超音波処理し、450および200nmフィルター（それぞれWhatmanおよびPALL）で濾過した。（2）RNA-NP複合体の形成：Chol-RNA-NPは、RNA-NPについて前述のように調製した¹²。簡単には、375ugの脂質を、マウスあたり25ugのmRNAまたはsiRNAと組み合わせ、注射の前に15分間インキュベートした。

【0144】

インビトロトランスフェクション：DC2.4を、24ウェルプレートに、ウェルあたり100,000細胞でプレーティングした。24時間後、RNA-NPを、ウェルあたり1.667ugのmRNAで、ウェルに加えた。トランスフェクションは、24、48、72、および96時間にフローサイトメトリーで評価した。

【0145】

C57BL/6マウスは、Jackson Laboratoriesから購入した。動物処置は、フロリダ大学の動物実験委員会（UF IACUC 201607966）によって承認された。

【0146】

フローサイトメトリー分析：フローサイトメトリーは、BD Biosciences、Biolegend、およびInvitrogenの抗体を使用して、BD Bios

10

20

30

40

50

ciencesのFACS Canto-IIを使用して行った。インビトロ実験では、DCを回収し、PBSで洗浄し、20分間染色した。次いで、試料を、PBSで2回洗浄し、FACS緩衝液に懸濁した。細胞カウントと生存率は、Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) で評価した。インビボ実験については、リンパ節を、冷PBSに採取し、かみそりの刃でさいの目に切り、パパインで37℃で20分間消化した後、70µmセルストレーナーで濾過し、PBSで洗浄し、適切な抗体で20分間染色した。フロー分析の直前に、カウントビーズを各チューブに加えた。

【0147】

免疫蛍光法：頭蓋内脳腫瘍を有するマウスを犠牲にし、蛍光標識RNA-NPを注射して24時間後に、PBSと4%ホルマリンで灌流した。次に、脳を採取し、4%ホルマリンで固定し、4%ショ糖溶液に一晩移し、PBSに保存した。LeicaRM2235ミクロトームでスライスを完成させた。Olympus IX70倒立型蛍光顕微鏡で、画像を撮影した。

【0148】

統計分析：データは、平均±標準偏差として表されている。スチューデントのt検定が、統計分析に使用されている。対応のあるt検定は、対応のあるデータに使用されている。分析は、GraphPadPrismバージョン8を使用して行った。

引用文献：以下の参考文献は、実施例11~14の全体を通して引用されている。(1) Hilf, N., et al. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245 (2019); (2) Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69–74 (2015); (3) Grobner, S. N., et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 555, 321–327 (2018); (4) Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* 59, 1169–1180 (2011); (5) Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605–612 (2006); (6) Poon, C. C., Sarkar, S., Yong, V. W. & Kelly, J. J. P. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain* 140, 1548–1560 (2017); (7) Morantz, R. A., Wood, G. W., Foster, M., Clark, M. & Gollahon, K. Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg* 50, 305–311 (1979); (8) Abbott, N. J., Ronnback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53 (2006); (9) Sayour, E. J., et al. Systemic activation of antigen-presenting cells via RNA-loaded nanoparticles. *Oncoimmunology* 6, e1256527 (2017); (10) Sayour, E. J., et al. Personalized Tumor RNA Loaded Lipid-Nanoparticles Prime

10

20

30

40

50

the Systemic and Intratumoral Milieu for Response to Cancer Immunotherapy. Nano Lett (2018); (11) Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 8, 958–969 (2008); (12) Sayour, E. J., et al. Systemic activation of antigen presenting cells via RNA-loaded nanoparticles. OncoImmunology, 00–00 (2016); (13) Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K. L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. J Immunol 158, 2723–2730 (1997).

【0149】

実施例15

この実施例は、樹状細胞（DC）を活性化する磁性ナノ粒子が、MRIによる抗腫瘍応答の早期予測を可能にすることを示している。

【0150】

要約：癌ワクチンは、患者のサブセットで、抗腫瘍応答を惹起するが、治療応答を予測するための臨床的に有意義なバイオマーカーの欠如で、それらの開発が制限されている。ここで、本発明者らは、強力な抗腫瘍免疫を開始させ、治療応答の初期のMRIに基づくイメージングバイオマーカーとして機能する、多機能なRNA負荷磁性リボソームを設計する。これらの粒子は、エレクトロポレーションよりも効果的にDCを活性化し、治療モデルにおける腫瘍増殖の優れた阻害をもたらす。酸化鉄の含有で、DCトランスフェクションが増強され、MRIでDC遊走の追跡が可能になる。本発明者らは、リンパ節でのT2*強調MRIの低強度は、DCの輸送と強く関連し、抗腫瘍応答の早期予測因子であることを示す。前臨床腫瘍モデルでは、ワクチン接種の2日後に特定されたMRI予測の「応答者」は、治療後2～5週間で有意により小さい腫瘍を有し、MRI予測の「非応答者」よりも100%長く延命した。したがって、これらの研究は、強力な抗腫瘍免疫応答を生成し、MRIによる個々の治療結果を予測するためのシンプルで拡張可能なナノ粒子製剤を提供する。

【0151】

癌免疫療法は、従来の治療が何ら利益ももたらさない状況で、印象的な腫瘍退縮をもたらした¹。しかし、最も効果的な免疫療法戦略でさえ、患者のほんのサブセットの生存を延長する^{2～6}。複数の治療前バイオマーカーは免疫療法に対して感受性であることが示唆されているが、現在、臨床応答を予測する強力なマーカーは存在しない^{7～9}。有望な癌免疫療法の将来的な開発には、腫瘍が進行する前に、応答患者と非応答患者を区別するための動的バイオマーカーが必要になる⁹。

【0152】

本発明者らは以前、ワクチン接種のわずか2日後のインジウム¹¹¹標識DCのSPECT/CTイメージングによって評価されたワクチン部位の流入領域リンパ節（VDLN）へのDC遊走が、RNAパルスDCワクチンで治療されたGBM患者の全生存の初期バイオマーカーを提供する可能性があることを示した¹⁰。しかしながら、PETおよびSPECTの放射性細胞標識は煩雑であり、臨床現場で広く利用できない¹¹。このバイオマーカーの臨床評価には、追加の細胞処理なしでDC遊走を高感度で追跡するための広く利用可能な方法が必要になる。MRIは、広く利用可能なイメージング手法であり、ヒトにおいて多数の細胞を定性的に追跡するために使用されているが、リンパ節への細胞遊走のMRIに基づく定量化は依然として困難である^{12～18}。

【0153】

さらに、エレクトロポレーションは、臨床試験でDCにRNAを送達するために広く使

用されているが^{10, 19~23}、エレクトロポレーションの免疫刺激的置換は、治療効果をさらに高める可能性がある。ナノ材料は、非ウイルス性のmRNA送達に関して魅力的であるが²⁴、大規模な臨床グレードの製造が複雑であるため、クリニックに普及するナノ粒子はほとんどない^{7, 25, 26}。ここで、本発明者らは、DCをRNAで効率的にトランスフェクトし、著しいDC活性化を刺激し、DCワクチンに対する抗腫瘍応答のバイオマーカーとして、MRI検出DC遊走を確立する、以前に翻訳された材料に基づく拡張可能な多機能ナノリポソームでこの制限を克服する（図16）。

【0154】

この研究では、最初に、ヒトにおいて証明された安全性プロファイルを有する脂質粒子のライブラリをスクリーニングして、インビトロでのDC活性化に最適化された脂質ナノ粒子製剤を開発する。本発明者らは、次いで、酸化鉄ナノ粒子（IONP）のT₂MRIコントラスト増強効果と、これらの免疫刺激性RNA負荷カチオン性ナノリポソーム（RNA-のNP）を組み合わせる。得られた酸化鉄を負荷したRNA-NP（IO-RNA-NP）は、RNAをDCに送達し、それらのDCを活性化し、MRIによる腫瘍退縮の予測を可能にする。本発明者らは、IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションと比較して、DCにおける遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させ、共刺激マーカーの発現の増加、炎症性サイトカイン（例えば、IFN-α）の産生、リンパ節への遊走の促進、をもたらすことを見出した。重要なことに、本発明者らはまた、IO-RNA-NPを介して腫瘍抗原をコードするRNAを負荷したDCが、RNAでエレクトロポレーションされたDCでは利益がもたらされない治療モデルにおいて、腫瘍増殖を阻害することも実証する。IONP負荷DCによる定性的なMRI変化を実証する以前の研究とは対照的に^{13, 27~29}、本発明者らは、そこで、MRIで検出されたDC輸送が、マウス腫瘍モデルにおいて、腫瘍増殖の長期阻害と生存を予測することを実証する。ワクチン接種の2日後の処置リンパ節におけるT₂*強調MRI強度の大幅な減少は、ワクチン接種して2~5週間後の腫瘍サイズの減少と強く相関し、この変化を有さない処置マウスと比較して、生存期間中央値で100%の増加を予測する。まとめると、我々の発見は、これらのDC活性化IO-RNA-NPが、腫瘍増殖の強力な阻害を刺激し、広く利用可能なイメージング手法でDCワクチンに対する抗腫瘍応答の早期予測を可能にすることを示している。

【0155】

免疫刺激性酸化鉄を負荷したリポソームの設計：本発明者らは、最初に、mRNAをDCに送達し、MRIでそれらの動きを追跡するための、単純で翻訳可能な方法を開発しようとした。IONPは、臨床的有用性が証明されているため、魅力的なMRI造影剤であるが、前臨床現場でのRNA送達のためにIONPを最適化する現在の方法では、ヒトにおいて確かな安全記録がないポリマー（例：ポリエチレンイミン）を利用している。カチオン性リポソームは、単純で拡張可能な合成と、動物およびヒトでの好ましい安全性プロファイルにより、臨床現場でのmRNA送達に魅力的な薬剤であるが^{30~32}、臨床評価における現在の脂質ナノ粒子組成物は、インビボでの標的化mRNA送達に最適化されているが、DCの活性化には最適化されていない^{30, 32~34}。さらに、インビトロでのDC活性化のためのカチオン性リポソームを開発する以前の試みは、機能的結果（例えば、トランスフェクトされたDCが抗原特異的T細胞を活性化する能力）の代わりに、活性化マーカーの発現に評価を限定した³⁵。ここで、本発明者らは、臨床試験で確立された安全性プロファイルを伴う市販の材料を使用して脂質ナノ粒子のライブラリを作製し⁷、基本的な試験（つまり、トランスフェクション効率、生存率）と機能的な試験の両方を使用して、インビトロで骨髄由来DC（BMDC）をトランスフェクトし、活性化する、それらの能力を評価した（図29A）。これを行うために、本発明者らは、BMDCトランスフェクション、生存率、共刺激マーカー（CD80、CD86、CD40）の発現、およびインビトロでの抗原特異的T細胞を刺激する能力、に基づくスコアリングシステムを開発した（図25A~25E）。本発明者らは、1, 2-ジオレオイル-3-トリメチランモニウムプロパン（DOTAP）リポソームに、コレステロールを含めると、マウスDCのトランスフェクションと活性化に最も効果的な粒子が生成され、コレステロールを

10

20

30

40

50

含まないDOTAPリポソームよりも、活性化スコアが18倍高いことを見出した（図25A～25E）。

【0156】

本発明者らは、次いで、市販のIONPを、これらのDC活性化カチオン性リポソームに組み込んで、合成の複雑性を著しく増加させることなく、MRI追跡を可能にする方法を開発した。本発明者らは、カチオン性リポソームが、正に帯電した内部を持っているため、粒子形成中に負に帯電したIONPを加えると、固体酸化鉄コアを有するリポソームを生成することができると考えた。したがって、本発明者らは、カチオン性脂質を様々な濃度のカルボキシル化IONP（1mgの脂質あたり0、1、10、100、または150ugのIONP）で再水和し、得られたリポソームをmRNAとインキュベートして、IONPなし（RNA-NP）またはIONPあり（IO-RNA-NP）のRNAリポプレックスを生成した。IONPの含有により、クライオ-TEMにより、明瞭な脂質二重層とIONPの固体コアを有する100～300nmのリポソームが形成された（図17a）。リポソーム内のIONPカプセル化と一致して、粒子サイズ（0ug：207.9±67.2nm、100ug：208.7±92.3nm）および電荷（0ug：44.1±4.5meV、100ug：40.2±7.58meV）は、IONP含有量とは関係なく、一致したままであった（図17b、図29B）。しかし、酸化鉄を含む粒子は、実質的な磁気特性を示した（飽和磁化=233938A/m）（図17c）。

【0157】

本発明者らは、次いで、IONPの含有が、RNAの結合と送達を妨げるかどうかを試験した。実験条件下で、すべての粒子は、利用可能なRNAと100%結合し（脂質：RNA比が15：1）（図17d）、過剰RNAの条件では、粒子は、IONP含有量が増加すると、わずかに高いRNA結合能力を示した（0ug：0.36μgRNA/μg脂質、100μg：0.54μgRNA/μg脂質、p=0.0010）（図17e）。重要なことに、粒子を、DC³⁶の不死化細胞株であるDC2.4と一晚インキュベートすると、さらにより多量のIONPを含有しても、毒性が増加せず（図17f）、RNA送達が減少しない（図17g）ことが実証された。まとめると、この証拠は、負に帯電したIONPの存在下でカチオン性脂質を再水和すると、IONPの磁気特性とカチオン性リポソームのRNA結合能力とを備えた、IO-RNA-NPが生成されることを示唆している。

【0158】

IONPは、DCトランスフェクションと活性化を増加させる：次に、IONPが、トランスフェクション効率とDC活性化を阻害しないことを確認しようとした。興味深いことに、蛍光画像とフローサイトメトリーでは、DCの不死化細胞株であるDC2.4（0ug：10.6%、150ug：33.0%、p=0.0009；ピアソンr=0.8696、p=0.054）（図18a～b）、および初代BMDC（0ug：7.0%、100ug：9.9%、p=0.001）（図18c）の酸化鉄含有量の増加に伴う、粒子のトランスフェクション効率の用量依存的な増加が明らかになった。しかし、以前にカチオン性リポソームと複合体を形成していなかった非結合IONPを添加しても、利益はもたらされなかった（RNA-NP：7.0%±0.96、RNA-NPs+IONP：5.8%±0.05、p=0.244）（図18c）。これらの結果は、IONPは、トランスフェクション効率を高めるが、リポソーム内に組み込まれた場合のみであることを示唆している。

【0159】

本発明者らは、次いで、このトランスフェクションの増加が、DCの活性化と機能の増強を伴っているかどうかを評価した。RNA-NPは、炎症性サイトカインIL-4およびGM-CSFで得られる発現を超えて、共刺激分子CD80およびCD86の発現をわずかに増加させたが、IO-RNA-NPは、CD86の発現および両方の分子の共発現をさらに増強した（図26A～26C）。本発明者らは、IONPがより活性化したDC表現型に寄与するというこの示唆を考慮して、DC機能に対するIONPの影響を評価し

た。骨髓由来樹状細胞 (BMDC) は、オボアルブミン (OVA) をコードする mRNA を有する RNA-NP または IO-RNA-NP で処理し、ナイーブ OVA 特異的 OT1 T細胞または抗原経験 OVA T細胞とインキュベートした。両方の粒子構築物は、48 時間での IFN- γ 産生によって測定されるように、大幅な T細胞の活性化を誘導したが、RNA-NP 内の IONP の含有により、抗原経験 T細胞の活性化 (RNA-NP DC: $2611.8 \pm 67.06 \text{ pg/mL}$ 、IO-RNA-NP DC: $3653.5 \pm 216.8 \text{ pg/mL}$ 、 $p = 0.0014$) (図 18 d) およびナイーブ T細胞のプライミングが (RNA-NP DC: $319.0 \pm 41.29 \text{ pg/mL}$ 、IO-RNA-NP DC: $874.6 \pm 23.9 \text{ pg/mL}$ 、 $p < 0.0001$) (図 18 e)、抗原特異的な様式で、有意に増強された (図 26 A~26 C)。これらの予想外の結果は、リポソームに IONP を含めると、BMDC の活性化と抗腫瘍 T細胞応答のプライミングが増強されることを示している。本発明者らは、次に、IONP 媒介 DC トランスフェクションが、外部磁場の適用で、さらに増強され得るかどうかを評価した^{37, 38}。磁場を加えると、リポソーム内の IONP の濃度に依存する様式で、DC のトランスフェクション効率が増強され (図 18 f)、IONP の最高試験濃度でのトランスフェクション効率を、生存率を損なうことなく、倍増させた (-磁石: $5.8 \pm 0.7\%$ 、+磁石: $10.3 \pm 0.9\%$ 、 $p = 0.0014$) (図 18 g~h)。重要なことに、磁場の影響下で、IO-RNA-NP との 30 分間のインキュベーションは、初代 BMDC との一晚のインキュベーションと比較して、2 倍のトランスフェクション効率をもたらした (-一晚: $5.5 \pm 0.97\%$ 、30 分+磁石: $10.3 \pm 0.85\%$ 、 $p = 0.0010$) (図 18 h)、同等の T細胞プライミング能力につながった (-一晚: $3653.5 \pm 216.8 \text{ pg/mL}$ 、30 分+磁石: $3070.4 \pm 536.1 \text{ pg/mL}$ 、 $p = 0.16$) (図 18 i)。したがって、磁場を使用して、高レベルのトランスフェクション効率を維持しながら、トランスフェクション時間を大幅に短縮することができる。

【0160】

IO-RNA-NP は、エレクトロポレーションよりも効果的に DC を活性化する。リポソームを介した RNA 送達、インビボで強力な DC 活性化をもたらすものの^{7, 30, 31}、エレクトロポレーションは、他の非ウイルス性トランスフェクション法と比較して、そのトランスフェクション効率の高さのために (BMDC の 60~80%)、臨床現場では、エクスピボで DC に RNA を送達するための好ましい技術であり続けている^{10, 19~23, 39, 40}。実際、エレクトロポレーションは、IO-RNA-NP よりも高い割合の BMDC をトランスフェクトした (エレクトロポレーション: 81.1% 、IO-RNA-NP: 17.733% 、 $p < 0.0001$) (図 19 a)。しかし、エレクトロポレーションは、エンドソームおよびファゴリソームでの天然の抗原プロセッシングを回避することにより、DC 活性化に寄与するパターン認識受容体を迂回する^{41~43}。これらのトランスフェクション法における明らかな違いは、Cy3 標識 RNA の送達後の DC の蛍光顕微鏡で明らかになる (図 19 b)。IO-RNA-NP によって送達された RNA は、エンドソームおよびファゴリソームと一致する明るい細胞内区画にクラスター化されるが、エレクトロポレーションによって送達された RNA は、サイトゾル全体に希薄化している (図 19 b)。本発明者らは、この自然な抗原の取り込みにより、IO-RNA-NP が、エレクトロポレーションよりも効果的に、DC を活性化させているものと仮定した。この仮説を試験するために、遺伝子発現、共刺激分子のアップレギュレーション、炎症性サイトカインの分泌、リンパ節への細胞遊走、および抗腫瘍免疫応答を含む DC 活性化に対する、エレクトロポレーションおよび IO-RNA-NP を介したトランスフェクションの効果を評価した。

【0161】

本発明者らは、最初に、各トランスフェクション法が遺伝子発現に与える影響を評価した。IO-RNA-NP で処理された BMDC は、未処理またはエレクトロポレーションと比較して、24 時間後の RNA 発現プロファイルに有意な変化を示し (図 19 c)、抗ウイルス防御、I 型インターフェロンの産生、tol l 様受容体 (TLR) シグナル伝達

10

20

30

40

50

、および抗原のプロセッシングと提示に関連する遺伝子セットの発現の増強が含まれた（図27）。フローサイトメトリーにより、両方の処理で、共刺激分子の発現が増加したが、IO-RNA-NPは、これらのマーカーのより高い共発現を誘導した（図19d、図28A～28B）。次に、この活性化表現型が、IFN- α 分泌の増加を伴うかどうかを評価した。IFN- α は、全身性のRNA-NPに対する抗腫瘍免疫応答を開始するために必要であることを、我々および他が、以前に示した^{30, 31}。我々のRNAシーケンスデータから、IO-RNA-NPが、IFN- α の産生を増加させることが見出された（IO-RNA-NP DC: 13.1 ± 3.4 pg; 未処置DC: 7.6 ± 1.3 pg, $p = 0.0369$ ）（図19e）。対照的に、エレクトロポレーションでは、対照と比較して、IFN- α の産生が有意に減少しなかった（エレクトロポレーションされたDC: 4.45 ± 1.1 pg, 未処理のDC 7.6 ± 1.0 pg, $p = 0.2879$ ）（図19e）。この結果は、IO-RNA-NPが、エレクトロポレーションされた細胞には存在しない、IFN- α 依存性の抗腫瘍免疫応答を刺激することを示唆する。

【0162】

本発明者らは以前、VDLNへのRNA負荷DCワクチンの増強された遊走が、GBMを有する患者で生存率の改善と相関することを、盲検および無作為パイロット臨床試験で報告している¹⁰。したがって、本発明者らは、DCがGM-CSFおよびIL-4の条件で調製される我々の臨床プロトコルのマウスモデルにおいて、IO-RNA-NPまたはエレクトロポレーションで負荷されたDCの遊走能力を比較した¹⁰。この実験では、各マウスは、RNAエレクトロポレーションまたはIO-RNA-NPで処理されたDsRed+DCの、反対側皮内注射を受けた。3つの別々の実験で、それぞれ異なる時点を評価すると、IO-RNA-NPが負荷されたDCは、エレクトロポレーションで処理されたDCよりも、効率的にリンパ節に遊走した（18時間: $p = 0.003$, $n = 3$; 24時間: $p = 0.0313$, $n = 6$; および72時間: $p = 0.16$, $n = 2$ ）（図19f）。

【0163】

本発明者らは、次いで、確立された腫瘍モデルにおける腫瘍増殖の阻害に対するIO-RNA-NPとエレクトロポレーションの影響を評価した。本発明者らは、腫瘍接種の5日後に、IO-RNA-NPを介してOVAmRNAを負荷したDCを単回ワクチン接種すると、皮下B16F10-OVA腫瘍の増殖が有意に阻害されることを見出した（IO-RNA-NP対未処置: $p = 0.0057$ 、IO-RNA-NP対エレクトロポレーション: $p = 0.0044$ ）（図19g）。対照的に、OVA RNAのエレクトロポレーションで処理されたDCは、治療効果を提供しなかった（エレクトロポレーション対未処置: $p = 0.8$ ）（図19g）。

【0164】

まとめると、本発明者らは、IO-RNA-NPが、免疫関連遺伝子シグネチャー、共刺激分子の発現、炎症性サイトカイン（IFN- α ）の分泌、およびリンパ節への遊走の促進を特徴とする、強力なDC活性化を誘導することを実証した。このDC活性化は、RNAのエレクトロポレーションが利益をもたらさない治療モデルで、腫瘍増殖を阻害するのに十分である。これらの結果は、IO-RNA-NPが、DCワクチンのためのエレクトロポレーションの有望な代替手段であることを示唆している。

【0165】

MRIによる細胞追跡：本発明者らは、次に、MRIによるDC追跡のための、IO-RNA-NPの有用性を評価しようとした。DsRed+BMDcを、IO-RNA-NPで処理し、ナイーブマウスの鼠径部に皮内注射した。2日後、MRI画像から、複数の画像パラメータにわたって、処置リンパ節の体積に目に見える増加が明らかになった（図20a）。フローサイトメトリー（図20b）は、反対側の未処置リンパ節と比較して、VDLNのサイズにおける相対増加が、処置リンパ節のDsRed+細胞の絶対数と強く相関していることを明らかにした（ $r = 0.9134$, $p < 0.0001$ ）（図20c）。さらに、最適化されたT₂*強調MRIシーケンスは、高濃度の酸化鉄と一致する反対

10

20

30

40

50

側の未処置リンパ節と比較して、VDLNの強度の減少を検出した（VDLNの相対強度）。MRI強度のこれらの減少は、処置リンパ節の絶対細胞数と強く相関していた（ $r = -0.6842$ 、 $p = 0.0613$ ）（図20d）。この結果は、MRIが、高濃度および低濃度のIONP負荷DCを有するリンパ節を区別する能力を実証する。

【0166】

微小残存病変および確立された腫瘍モデルの条件における抗腫瘍応答の早期バイオマーカーとして、MRIは、IO-RNA-NPが、強力なDC活性化を刺激し、リンパ節でのMRI強度に一貫した変化をもたらすことを示したことから、本発明者らは、抗腫瘍免疫応答を予測するためのバイオマーカーとして、MRIで検出されるDC遊走の有用性を評価した。本発明者らは、最初に、ワクチン接種によって様々な抗腫瘍応答をもたらす微小残存病変（MRD）のモデルを開発した。腫瘍移植の同じ日に、OVA mRNAを有するIO-RNA-NPが負荷されたDCの皮内注射は、未処置の対照と比較して、皮下B16F10-OVA腫瘍の増殖を有意に阻害した（19日目： $p = 0.0376$ 、23日目： $p = 0.0351$ 、25日目： $p = 0.0328$ ）（図21a）。しかしながら、処置されたマウスは、不均一な腫瘍増殖の阻害を示した（図21b）。これらの違いは、27日目で顕著になり、マウスのサブセットには明らかな腫瘍があり、他のマウスには腫瘍がなかった（図21b）。2日目のMRI画像の比較により、「応答者」は「非応答者」と比較して、未処置リンパ節に対する処置リンパ節のT2*強調MRI強度が顕著に減少し、処置リンパ節における酸化鉄負荷DCの濃度の増加と一致することが明らかになった（ $r = 0.9324$ 、 $p = 0.0209$ ）（図21c）。このバイオマーカーの予測値は、その後の実験で確認され、処置の2日後のT2*強調MRI強度の減少が、27日目の腫瘍サイズ（ $r = 0.6577$ 、 $p = 0.0542$ ）（図21d）、および全生存期間（ $r = -0.6957$ 、 $p = 0.0374$ ）（図21e）の両方と直接相関することが実証された。

【0167】

次に、処置リンパ節のMRI強度を使用して、処置マウスを意味のあるグループに分けて、治療結果を予測できるかどうかを評価した。本発明者らは、下位25パーセンタイルのMRI強度によって示される高いDC遊走を有するマウスが、上位75パーセンタイルの強度を有するマウスよりも、有意に小さい腫瘍を有していたことを、分析を通して（ $P = 0.0131$ ）（図21f～g）、ならびに17日目（ $p = 0.0086$ ）、22日目（ $p = 0.0256$ ）、および26日目（ $p = 0.0118$ ）を含む個々の日において（図21h）、見出した。これらの結果は、処置2日後にMRIで検出されたDC遊走が、抗腫瘍免疫応答の早期動的バイオマーカーであるという強力な証拠を提供する。

【0168】

MRDモデルでの有用性を確立した後、確立された腫瘍の条件で、MRI検出DC遊走の予測能力を調べた。この実験では、IO-RNA-NPを負荷したDCで処置する前に、すべてのマウスに触知可能な皮下腫瘍があった（図22a）。ここでは、はるかに速い腫瘍増殖が観察されたが、DCワクチン接種に応答するコホートでは依然として不均一な有効性が記録された（図22b）。ワクチン接種の2日後に取られたMRIと腫瘍増殖曲線との相関では、処置リンパ節の強度の初期の減少が、腫瘍増殖の将来の阻害と強く相関することが再び明らかになった（14日目の腫瘍サイズ： $r = 0.7235$ 、 $p = 0.0276$ 、17日目の腫瘍サイズ： $r = 0.7323$ 、 $p = 0.0248$ ）（図22c、図22d）。処置リンパ節でT2*強調MRI強度が高いマウスでは、かなりの腫瘍があったが、強度が低いマウスでは腫瘍がなかった。この証拠は、ワクチン接種のわずか2日後のMRIイメージングが、DCワクチンに対するその後の抗腫瘍免疫応答を予測するのに十分な感度があることを示唆している。

【0169】

本発明者らは、次いで、これらの動物を引き続き観察して、MRI検出DC遊走が、より臨床的に関連する結果である生存率を予測するかどうかを判断した。注目すべきことに、処置リンパ節における2日目のMRI強度は、腫瘍増殖の長期阻害と強く相関し（中央

10

20

30

40

50

50%対下位25パーセンタイル： $p=0.0023$ 、上位75パーセンタイル番目下位25パーセンタイル： $p=0.0001$ ）および生存率と強く相関した（ $r=-0.8557$ 、 $p=0.0033$ ）（図22e、22f）。2日目の25パーセンタイル未満の相対MRI強度で明らかにされたリンパ節への大幅なDC遊走を有するマウスは、中央50パーセンタイルのMRI強度で示された中程度のDC遊走を有するマウスよりも、有意に長く生存し（ $p=0.0338$ 、対数順位解析）、上位75パーセンタイルの相対MRI強度で示されたDC遊走を欠くマウスの2倍長く生存した（ $p=0.0896$ 、対数順位解析）（上位25パーセンタイル： 25 ± 7.0 日、中央50%： 34 ± 2.049 日、下位25パーセンタイル： 52.5 ± 3.5 日）（図22g）。これらの結果は、DC追跡のMRIイメージングを、ワクチン接種のわずか2日後に、IO-RNA-NP負荷DCワクチンに対する長期抗腫瘍応答を識別するための相関性が高いバイオマーカーとして使用することができることを示す。

【0170】

実施例16

この実施例は、実施例15で使用された材料と方法を実証する。

【0171】

粒子の特性評価：サイズ：IO-RNA-NPを冷PBSで2000倍に希釈し、NanoSight NS300（Malvern）で測定した。粒子サイズは、試料ごとに5回の取得、取得ごとに60秒を使用して、1400フレーム超から計算された。データは、NTA3.3 Dev Build 3.3.104（カメラタイプ：sCMOS）を使用して処理した。選択したプロットとデータは、各粒子構築物の4つの独立したバッチを表している。電荷：ゼータ電位は、Nicomp ZLSZ3000で評価した。報告される測定値は、3つの独立したバッチを表す各粒子の5サイクルの平均である。磁性：磁性の測定は、Quantum Design MPMS-3超伝導量子干渉素子（SQUID）磁力計を使用して行った。粒子を調製し、 2.5 mg/mL のPBS中で分析した。磁化曲線は、4K～345Kの様々な温度で10 Oe（ 0.8 kA/m ）の磁場を適用することによって得られた。RNA結合：リボソームに、RNAを、リボソーム：RNA比が15：1、10：1、5：1、1：1、または0：1で負荷し、15分間インキュベートしてリボソームを形成させた後、RNA負荷緩衝液で染色した。次いで、20 μL のIO-RNA-NPを、1%アガロースゲルの各ウェルに負荷し、80Vで20分間電気泳動した。遊離RNAは、ChemIDocイメージングシステム（Bio-Rad）およびImage Labソフトウェア（Bio-Rad）を使用して評価した。各粒子の相対RNA結合容量は次のように計算した：結合RNA（%）*トータルRNA（ μg ）、ここで、「結合RNA」は、 $1 - (\text{試料バンド強度} / \text{RNAのみバンド強度})$ として計算されている。低温電子顕微鏡法：低温透過型電子顕微鏡法（クライオ-TEM）の試料調製は、フロリダ大学のInterdisciplinary Center for Biotechnology ResearchのElectron Microscopy Coreで行われた。3マイクロリットルアリコート懸濁リボソームをC-flat holey carbon grid（Protochips Inc.）に適用し、コントロールチャンバー内で、湿度約90%、4℃で動作するVitrobot（商標）Mark IV（FEI Co.）を使用してガラス化した。ガラス化した試料を液体窒素下で保存し、イメージングのためにGatanクライオホルダー（モデル626/70）に移した。試料は、低線量条件（約 $20 \text{ e} / \text{\AA}^2$ ）を使用して200kVの電圧で動作するTecnaï（FEI Co.）G2F20-TWIN透過型電子顕微鏡で、 $4 \text{ k} \times 4 \text{ k}$ CCDカメラ（Gatan Inc.）を使用して検査した。

【0172】

RNAの調製と標識緑色蛍光タンパク質（GFP）とOVA RNAは、前述のように生成された³¹。単離したRNAは、市販のArcturus Turbo Labelingキット（ThermoFisher Scientific）を使用して、製造元の説明書に従って、Cy3およびCy5色素で標識した。

10

20

30

40

50

【0173】

細胞培養DC2.4は、不死化樹状細胞株であり、デューク大学のJohn Sampson氏から好意的に寄贈された³⁶。B16F10-OVAは、ニワトリオボアルブミン遺伝子(OVA)を発現するマウス黒色腫細胞株であり、Mayo ClinicのRichard G. Vile博士から好意的な寄贈で入手した。両方の細胞型は、37℃、5%CO₂で、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies)を補充したピルビン酸を含む高グルコースDMEM中で培養した。

【0174】

IO-RNA-NPの合成 リポソーム合成：リポソームは、以前に記載されたように調製した³¹。簡単には、カチオン性リポソームのDOTAPは、Avanti, Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA) から脱水形態で入手した。25~100mgの脱水リポソームを、クロロホルム中で、3:1のDOTAP: コレステロールの比率でコレステロール700000P (Avanti Polar Lipids) と混合した。クロロホルムを、窒素ガスチャンバーで蒸発させ、脂質の薄層を得た。次いで、この脂質を、PBSで2.5mg/mLに再水和した。IO-RNA-NPの場合、脂質ケーキは、代わりに10mg/mLの高濃度のカルボキシル化IONP (NanoMag) の高密度溶液で再水和した後、DPBSで2.5mg脂質/mLにした。再水和したリポソームを、次いで50℃の水浴に入れ、10分ごとに1時間ボルテックスした。次いで、リポソームを、室温で一晩保存した後、ボルテックスし、バスソニケータに5分間入れ、0.45μmシリンジフィルター(Whatman Puradisc)を通して濾過し、その後、0.20μmシリンジフィルター(Supor膜を有するPALL Acrodiscシリンジフィルター)で濾過した。IO-RNA-NP複合体の形成：IO-RNA-NPは、RNA-NPについて前述したように調製した³¹。PBS緩衝液中の150μgのIO-RNA-NP(2,000,000個の細胞あたり)に、10μgのmRNAを加えた。混合物を、室温で15分間インキュベートして、複合体形成を確かめた後、DCに添加した。

【0175】

DCのIO-RNA-NPトランスフェクション 一晩のトランスフェクション：IO-RNA-NPを、160ugのIO-RNA-NP: 2,000,000個のDCで、培養中のDCに加えた。30分間のトランスフェクション：IO-RNA-NPを加える前に、100rcfで1分間の遠心分離によって、DCを、24ウェルプレートの底に引き下ろした。粒子は、ネオジウム鉄ボロン(Nd₂Fe₁₄B)永久磁気ディスクによって生成された磁場の存在下または不在下で、30分間媒体に放置された。30分後、プレートを再び100rcfで1分間遠心分離した後、IO-RNA-NPを除去し、新鮮な培地と交換した。

【0176】

マウスC57BL/6、OT1トランスジェニック(C57BL/6-Tg(TcrαTcrβ)1100Mjb/J)およびDsRed(B6.Cg-Tg(CAG-DsRed)*MST)1Nagy/J)マウスは、Jackson Laboratories から購入した。動物処置は、フロリダ大学の動物実験委員会(UFIACUC201607966)によって承認された。

【0177】

樹状細胞の生成 DCは、以前に確立された方法に基づいて、マウス骨髄から単離された⁵⁰。簡単には、脛骨と大腿骨をC57BL/6またはDsRedマウスから採取し、血清含有培地を含む25ゲージの注射器を使用して骨髄を洗い流した。赤血球を10mLのPharmlyse(BD Bioscience)で溶解した後、単核細胞を、完全DC培地(RPMI-1640、5%FBS、1MのHEPES[Life Technologies]、55mMのb-メルカプトエタノール[Life Technologies]、100mMのピルビン酸ナトリウム[Life Technologies]、10

10

20

30

40

50

mMの非必須アミノ酸 [Life Technologies]、200mMのL-グルタミン [Life Technologies]、10mgのGM-CSF [R&D Systems]、10mgのIL4 [R&D Systems]、1%ペニシリン/ストレプトマイシン [Life Technologies] に懸濁した。次いで、細胞を、3mL/ウェルの総容量、 8×10^5 細胞/mLの濃度で、6ウェルプレートで培養した。非附着性細胞は廃棄し、培地は3日目に交換した。7日目に、非附着性細胞を収集し、5mL/皿の総容量で、 10^6 細胞/mLの密度で、100mmの培養皿に再プレーティングした。24時間後、非附着性細胞を収集し、エレクトロポレーション、RNAのみ、RNA-NP、またはIO-RNA-NPを介してmRNAをトランスフェクトし、一晩放置した。

10

【0178】

T細胞の生成 ナイーブOVA特異的T細胞：OVAペプチドエピトープ257~264に特異的なT細胞は、OT1トランスジェニックマウス (C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β)1100Mjb/J) の脾臓から生成された。OT1脾細胞は、RBCの溶解により分離し、共培養または処置においてすぐに使用できるように、PBSに懸濁した。抗原経験T細胞：抗原経験T細胞は、前述のように調製した⁴。簡単には、C57BL/6マウスは、OVAパルスDCによる皮内ワクチン接種を受けた。ワクチン接種の1週間後、これらのマウス由来の脾細胞を単離し、4,000,000:400,000の脾細胞:DC比で、IL-2を含むT細胞培地中で、OVAパルスBMDCとともに5日間培養した。活性化されたT細胞は、コンフルエンスに達してから、新しいウェルに分けられた。

20

【0179】

共培養アッセイ DCは、エレクトロポレーション、共培養 (RNA-のみ)、RNA-NP、またはIO-RNA-NPを介して、OVAまたはGFP mRNAでトランスフェクトされた。24時間後、処理されたDCを、96ウェルプレートで、400,000:40,000のT細胞:DC比で、ナイーブOT1脾細胞または抗原経験OVA T細胞と共培養した。48時間後に上清を回収し、ELISAでインターフェロン- γ (e bioscience) を評価した。

【0180】

フローサイトメトリー分析：フローサイトメトリーは、BD Biosciences、Biolegend、およびInvitrogenの抗体を使用して、BD BiosciencesのFACS Canto-IIを使用して行った。インビトロ実験では、DCを回収し、PBSで洗浄し、20分間染色した。次いで、試料を、PBSで2回洗浄し、FACS緩衝液に懸濁した。細胞カウントと生存率は、Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) で評価した。インビボ実験については、リンパ節を、冷PBSに採取し、かみそりの刃でさいの目に切り、パパインで37°Cで20分間消化した後、70 μ mセルストレーナーで濾過し、PBSで洗浄し、適切な抗体で20分間染色した。フロー分析の直前に、カウントビーズを各チューブに加えた。

30

【0181】

MRIイメージングと分析画像取得：MRIイメージングは、鼠径部にIO-RNA-NP負荷DCを皮内注射して18~72時間後に、UFAMRIIS施設で、特注の30mmID直交バードケージ送受信ボリュームコイルを使用して、Bruker AV3HDコンソールとParavision6.01ソフトウェアを搭載した11T MRIマグネット (Magnex Scientific、11.1T/40cmボア) で行った。マウスは、イソフルラン麻酔下でイメージングし、UFIACUC201607966に従って、体温と呼吸の連続測定を介してモニタリングした。体温を維持するために、温度制御温水ヒータからの循環温水を使用した。画像サイズが192x192、視野が25.08mmx25.921mm、切片厚が1.0mmで、様々な画像パラメータについて6切片の2次元MRIシーケンスを、呼吸同期を使用して収集した。T2*強調画像は、リ

40

50

リンパ節の低強度のIONP依存性変化を評価するために、次のパラメータを使用して収集した：繰り返し時間（TR）＝90ミリ秒、エコー時間（TE）＝5ミリ秒、フリップ角＝10°（脂肪飽和あり）。リンパ節のサイズを評価するために、一連の他の5つのイメージングシーケンスを取得した。シーケンス1（T2*）：TR＝90ミリ秒、TE＝3ミリ秒、フリップ角＝10°。シーケンス2（T2*、脂肪飽和あり）：TR＝90ミリ秒、TE＝3ミリ秒、フリップ角＝10°、脂肪飽和。シーケンス3（T2_407/17）：TR＝407.204ミリ秒、TE＝17ミリ秒、エコー間隔＝4.25、RAREファクター＝4、脂肪飽和あり。シーケンス4（T2、脂肪飽和）：TR＝500ミリ秒、TE＝14ミリ秒、エコー間隔＝7ミリ秒、RAREファクター＝4。シーケンス5（T2）：TR＝3000ミリ秒、TE＝28ミリ秒、エコー間隔＝3ミリ秒、RAREファクター＝8、脂肪飽和あり。

10

【0182】

画像分析：画像分析はImageJ（NIH）を使用して完了した。処置グループを知らされていない研究者は、リンパ節が現れたスライスごとに、各リンパ節周囲の関心領域を、手動で作成した。各リンパ節のMRI強度は、T2*強調MRIシーケンスでリンパ節が現れたすべてのスライスにわたるリンパ節の強度の平均として計算された。リンパ節の体積は、スライスの厚さ（1mm）と各スライスの各リンパ節の合計面積の積として計算された（例：V＝スライスの厚さ×（面積スライス1＋面積スライス2＋面積スライス3…＋面積スライスn））。相対的なサイズは、処置リンパ節の体積を反対側の未処置リンパ節の体積で割ることによって、各イメージングシーケンスについて計算した。相対体積は、6つのイメージングシーケンスすべてについて計算され、イメージングシーケンスにわたる平均相対体積として報告された。相対強度は、T2*強調MRI画像について、処置リンパ節のMRI強度を未処置リンパ節のMRI強度で割ることによって計算した。

20

【0183】

治療モデル 腫瘍移植：B16F10-OVA細胞を、0.05%トリプシン（Gibco）を用いて回収し、血清含有培地で1回洗浄し、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水（DPBS）で1回洗浄した。細胞ペレットを、 10^7 細胞/mLの濃度でDPBSに再懸濁した。1,000,000個のB16F10-OVA細胞を、イソフルランで麻酔したC57BL/6マウスの左側腹部に、25ゲージの注射器で皮下注射した。皮下腫瘍は、WESTWARD Digital Caliperを使用して、2～4日ごとに測定した。人道的エンドポイントに達した皮下腫瘍を有する動物は、安楽死させた。養子細胞療法：ナイーブまたは抗原経験T細胞を、上記のように生成し、100,000,000/mLでPBSに懸濁し、マウス1匹あたり100μLで癌を有するマウスに注射した。DCワクチン：上記のように調製されたRNAパルスDCを収集し、 1×10^7 細胞/mLの最終濃度でPBSに懸濁した。各処置マウスの鼠径部に、50μLを皮内投与した。

30

【0184】

免疫蛍光DC2.4を、Cy3標識mRNAとインキュベーションして24時間後、PBS中でイメージングした。Olympus IX70倒立型蛍光顕微鏡で、画像を撮影した。

【0185】

遺伝子発現分析BMDcは、2,000,000個の細胞あたり10μgのmRNAで、エレクトロポレーション、RNA-NP、またはIO-RNA-NPを介してGFP mRNAをトランスフェクションしてから24時間後に、処置グループごとに3つの独立した試料から回収した。次に、製造元の説明書に従って、市販のRNeasyミニキット（Qiagen、カタログ番号74104）を使用して各試料からRNAを単離し、NanoDrop 2000分光光度計（ThermoFisher Scientific）およびAgilent 2100BioAnalyzerを使用して純度を分析した。RNAは、フロリダ大学Interdisciplinary Center for Biotechnology Research（ICBR）のIllumina RNA配列決定ライブラリ（ポリA）を使用して、方向性配列決定用に調製した。Illumin

40

50

a HiSeq3000を使用して、2レーンで100サイクルのペアエンドRNAシーケンスを完了した。遺伝子セットエンリッチメントは、Broad Institute (genepattern.broadinstitute.org) から入手可能な遺伝子セットエンリッチメント分析 (GSEA) ソフトウェアを使用して評価された。エンドソームでのRNAの取り込みがtolll様受容体依存性のDC活性化表現型を開始するという仮説に基づいて、C7 Immunologic Signatures 遺伝子セットコレクションから、9つの遺伝子セットを選択した。

【0186】

統計分析データは、インビトロ実験については平均±標準偏差、および腫瘍増殖実験については平均±標準誤差として、要約されている。対応のないデータは、両側の対応のないスチューデントのt検定、または多重比較のためのテューキーの検定を伴う分散分析で分析されている。対応のあるデータは、 $n > 3$ の実験についてウィルコクソンマッチドペア順位和検定と、 $n \leq 3$ の場合は両側の対応のあるスチューデントのt検定で分析されている。経時的な腫瘍増殖は、二元配置分散分析で測定されている。生存率は、対数順位検定で測定されている。統計分析は、GraphPad Prismバージョン6を使用して行った。統計的有意性は、 $p < 0.05$ として定義した。線形相関は、ピアソンの相関係数で評価された。

【0187】

引用文献：以下の参考文献は、実施例15および16全体で引用されている。(1) Rosenberg, S. A., et al., Clin Cancer Res 17, 4550-4557 (2011); (2) Schadendorf, D., et al., J Clin Oncol 33, 1889-1894 (2015); (3) van der Burg, et al., Rev Cancer 16, 219-233 (2016); (4) Garon et al., N Engl J Med 372, 2018-2028 (2015); (5) Larkin, J., et al., N Engl J Med 373, 23-34 (2015); (6) Hellmann, M. D., et al., Lancet Oncol 18, 31-41 (2017); (7) Grippin et al., Translational Nanoparticle Engineering for Cancer Vaccines. OncoImmunology, 00-00 (2017). (8) Nishino et al., Nat Rev Clin Oncol 14, 655-668 (2017); (9) Lesterhuis, W. J., et al., Nat Rev Drug Discov 16, 264-272 (2017); (10) Mitchell, D. A., et al., Nature 519, 366-369 (2015); (11) Srinivas, M., et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 62, 1080-1093 (2010); (12) de Vries, I. J., et al., Nat Biotechnol 23, 1407-1413 (2005); (13) Verdijsk, P., et al., Int J Cancer 120, 978-984 (2007); (14) Noh et al., Biomaterials 32, 6254-6263 (2011); (15) Cho et al., Nat Nanotechnol 6, 675-682 (2011); (16) Mou et al., Int J Nanomedicine 6, 2633-2640 (2011); (17) de Chickera, S., et al., Int Immunol 24, 29-41 (2012); (18) Zhang, Z., et al., Radiology 274, 192-200 (2015); (19) Batich, K. A., et al., Clin Cancer Res 23, 1898-1909 (2017); (20) Anguille, S., et al., Blood 130, 1713-1721 (2017); (21) Wilgenhof, S., et al., J Clin Oncol 34, 1330-1338 (2016); (22) Bol, K. F., et al., Oncoimmunology 4, e1019197 (2015); (23) Aarntzen, E. H., et al., Clin Cancer Res 18, 5460-54

10

20

30

40

50

70 (2012) ; (24) Phua, K. K. L. , et al. , Nanoscale 6, 7715–7729 (2014) ; (25) Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic. Bioengineering Transl Med 1, 10–29 (2016) ; (26) Shi, J. , et al. , Nat Rev Cancer 17, 20–37 (2017) ; (27) de Vries, I. J. M. , et al. , Nat Biotech 23, 1407–1413 (2005) ; (28) Ahrens, E. T. & Bulte, J. W. M. Nat Rev Immunol 13, 755–763 (2013) ; (29) Bulte, J. W. M. American Journal of Roentgenology 193, 314–325 (2009) ; (30) Kranz, L. M. , et al. , Nature 534, 396–401 (2016) ; (31) Sayour, E. J. , et al. OncoImmunology, 00–00 (2016) ; (32) Sayour, E. J. , et al. Nano Lett (2018) ; (33) Kauffman, K. J. , et al. Nano Lett 15, 7300–7306 (2015) ; (34) Sayour, E. J. , et al. Oncoimmunology 6, e1256527 (2017) ; (35) Soema, P. C. , Willems, G. J. , Jiskoot, W. , Amorij, J. P. & Kersten, G. F. Eur J Pharm Biopharm 94, 427–435 (2015) ; (36) Shen, Z. , Reznikoff, G. , Dranoff, G. & Rock, K. L. J Immunol 158, 2723–2730 (1997) . (37) Scherer, F. , et al. Gene Ther 9, 102–109 (2002) . (38) Mah, C. , et al. Mol Ther 6, 106–112 (2002) . (39) Gilboa, E. & Vieweg, J. Immunol Rev 199, 251–263 (2004) ; (40) Van Tendeloo, V. F. , et al. Blood 98, 49–56 (2001) ; (41) Blasius, A. L. & Beutler, B. Immunity 32, 305–315 (2010) ; (42) Crozat, K. & Beutler, B. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 6835–6836 (2004) ; (43) de Lima, M. C. , et al. Mol. Membr. Biol. 16, 103–109 (1999) ; (44) Lim, Y. T. , et al. Small 4, 1640–1645 (2008) ; (45) Jin, H. , et al. Theranostics 6, 2000–2014 (2016) ; (46) Mackay, P. S. , et al. Nanomedicine 7, 489–496 (2011) ; (47) Wang, Z. , et al. Immunity 49, 80–92 e87 (2018) ; (48) Zanganeh, S. , et al. Nat Nanotechnol 11, 986–994 (2016) ; (49) Ragelle, H. , Danhier, F. , Preat, V. , Langer, R. & Anderson, D. G. Expert Opin Drug Deliv 14, 851–864 (2017) ; (50) Flores, C. , et al. OncoImmunology 4, e994374 (2015) .

【0188】

本明細書において援用される、刊行物、特許出願および特許を含む、すべての参考文献は、各々の参考文献が参照により組み入れられるように個々にかつ具体的に示されかつその全体が本明細書に記載されているのと同程度まで、参考として本明細書に組み込まれる。

【0189】

本開示を説明する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）使用される用語「ある（a）」および「ある（an）」および「その（the）」ならびに同様の指示物は、本明細書に別の記述がなければ、または明らかに文脈と矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する」、「含む（including）」および「含有する」は、別途注記のない限り、開放型専門用語として解釈されるべきである（すなわち、「～を含むがこ

10

20

30

40

50

れらに限定されない」を意味する)。

【0190】

本明細書において特に指定のない限り、本明細書中の値の範囲の記載は、その範囲および各端点に入る各々の別個の値を個々に指す略記方法として役立つことを意図したものであるにすぎず、各々の別個の値および各端点は、それが本明細書中に個々に記載されているかのように本明細書に組み入れられる。

【0191】

本明細書に記載されるすべての方法は、本明細書において特に指定のない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行することができる。特に要求されない限り、本明細書中に提供されるあらゆる例、または例示的な言葉（例えば「など」）の使用は、本開示をより上手く説明することを意図したものにすぎず、本開示の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書における言語は、本開示の実施に不可欠な任意の非請求要素を示すと解釈されるべきではない。

【0192】

本開示を実施するための発明者に知られている最良の形態を含む、本開示の好ましい実施形態が本明細書に記載されている。これらの好ましい実施形態の変形形態は、前述の説明を読むことで当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がそのような変形形態を適切に使用することを期待し、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されている以外の方法で本開示が実施されることを意図する。したがって、本開示は、適用法で許可されるように、本明細書に添付された特許請求の範囲に列挙された主題のすべての改変および同等物を含む。さらに、本明細書において特に指示がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、すべての可能な変形形態における上記要素の任意の組み合わせが本開示に包含される。

10

20

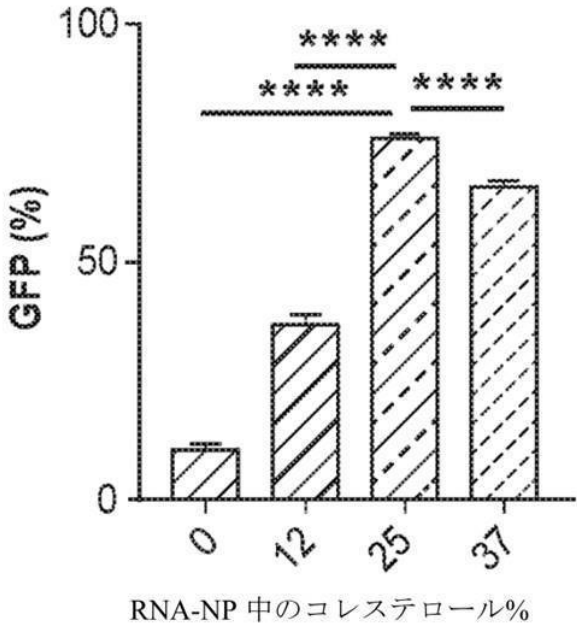
30

40

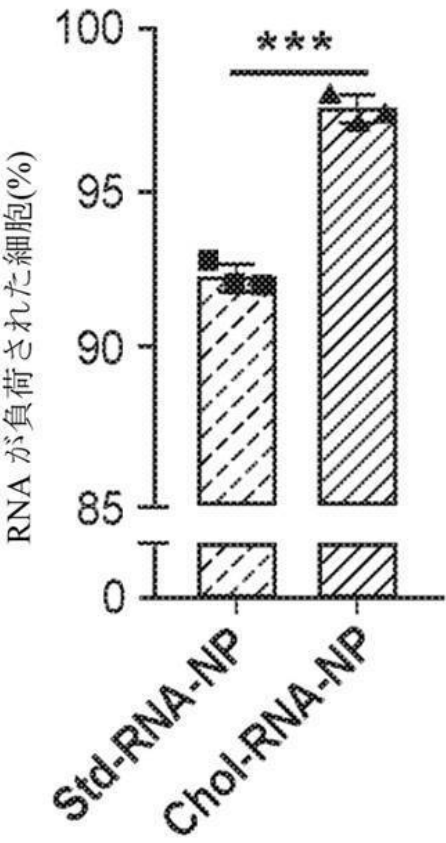
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

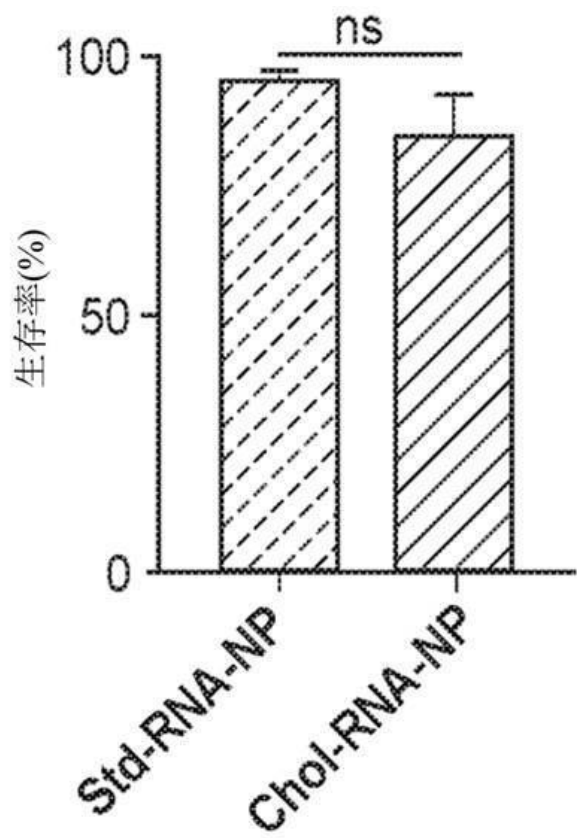
20

30

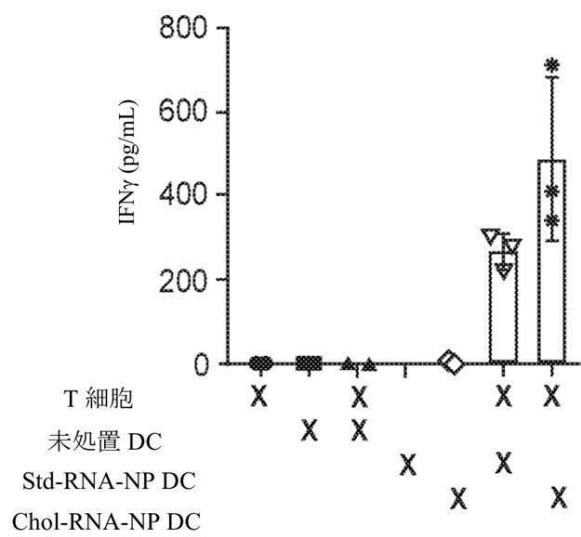
40

50

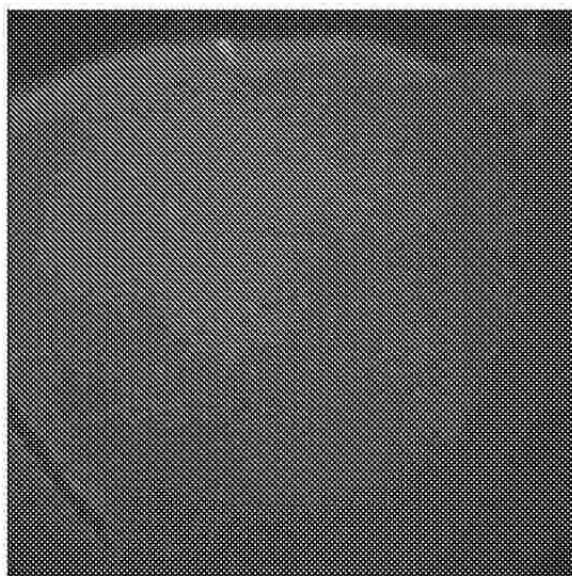
【図 1 C】



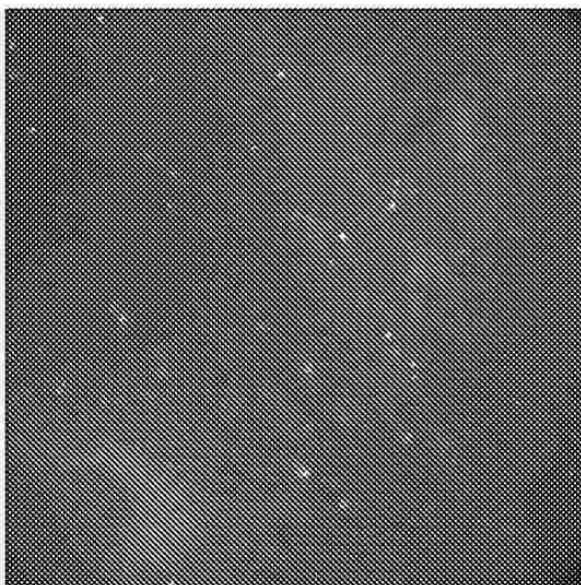
【図 1 D】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

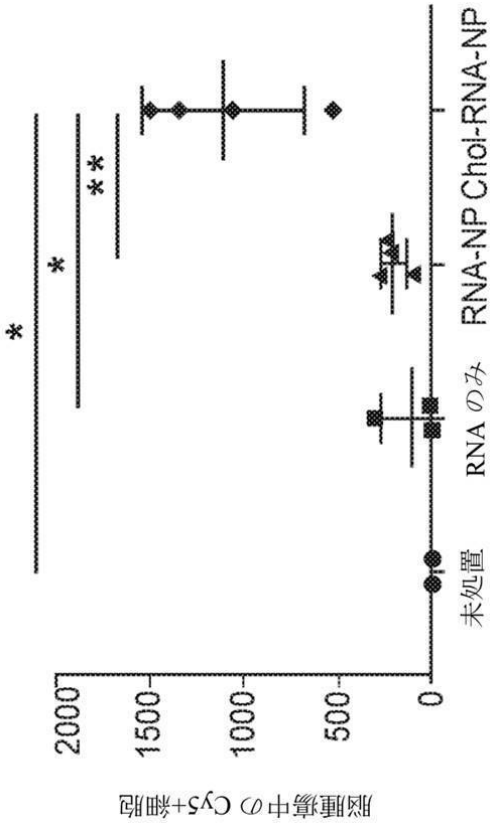
20

30

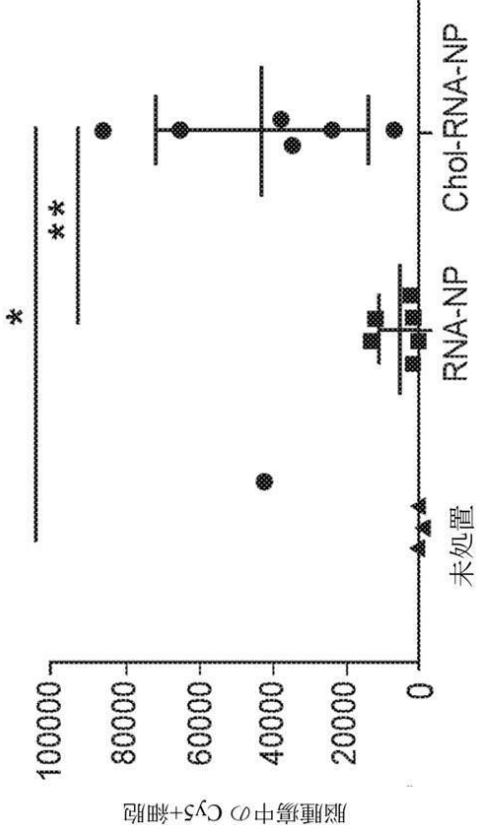
40

50

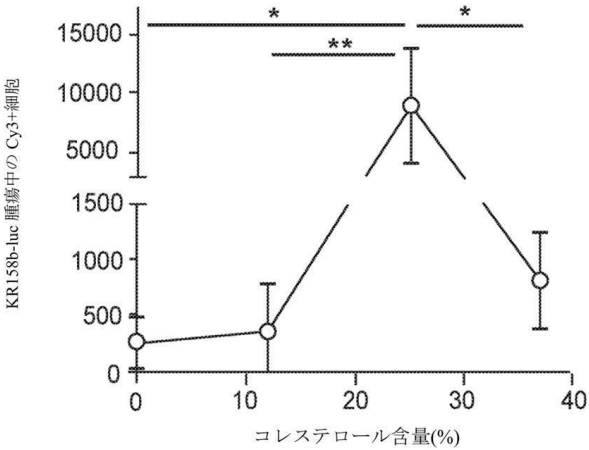
【図 2 C】



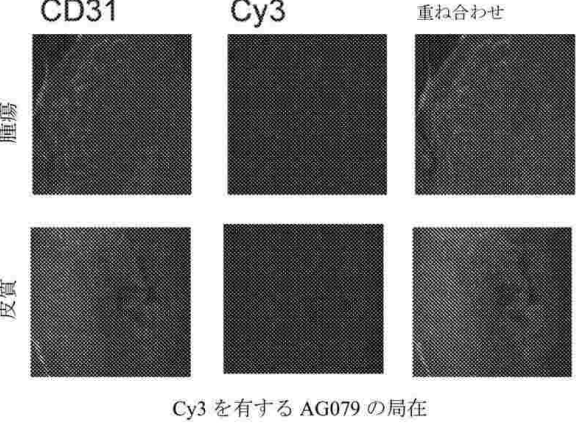
【図 2 D】



【図 3】



【図 4】



10

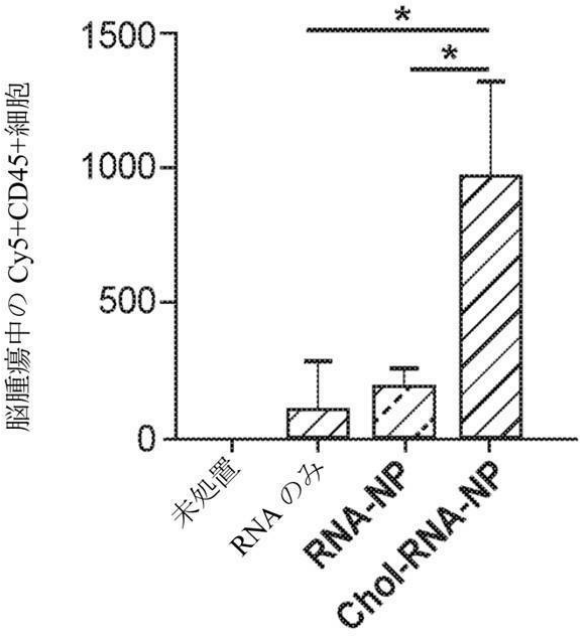
20

30

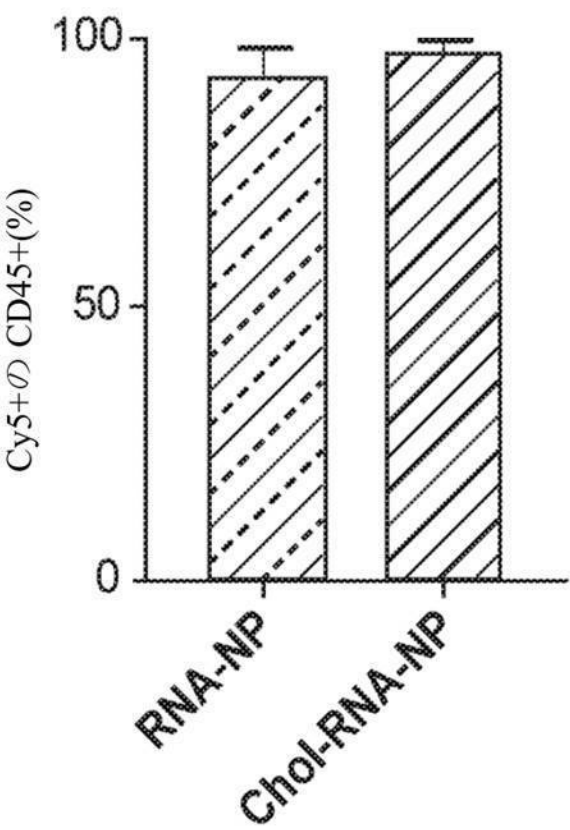
40

50

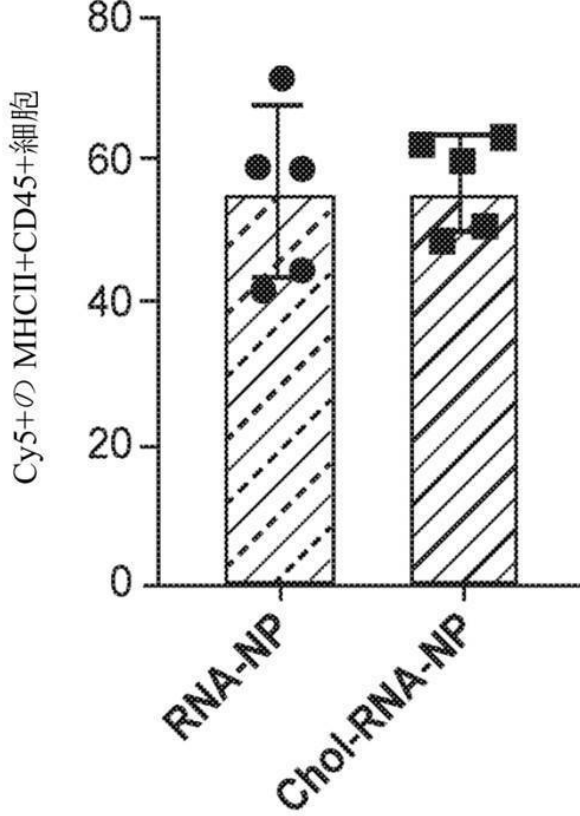
【図 5 A】



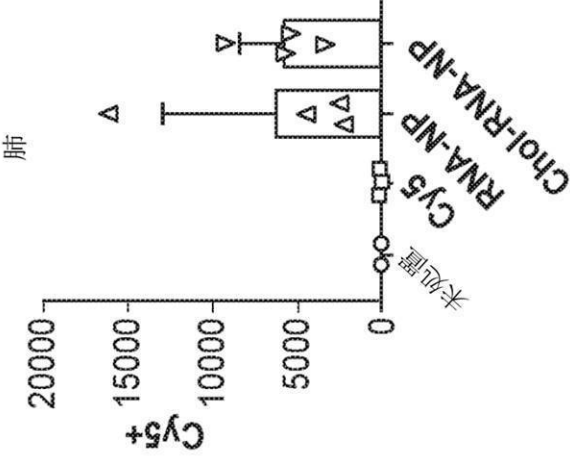
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6 A】



10

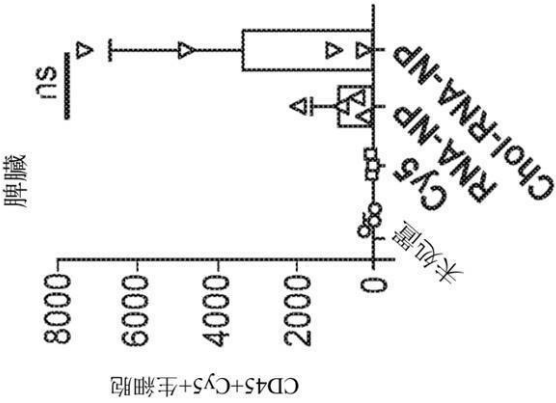
20

30

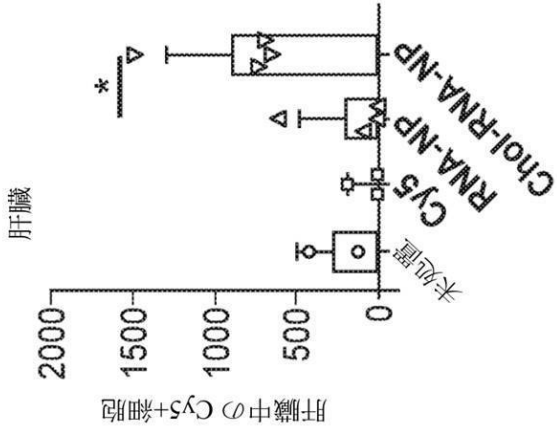
40

50

【図 6 B】



【図 6 C】



10

【図 6 D】

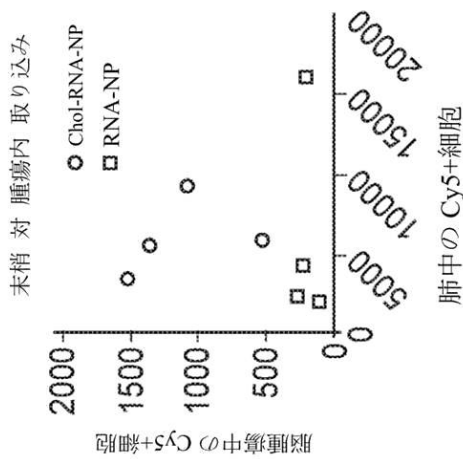


図 6 D

【図 6 E】

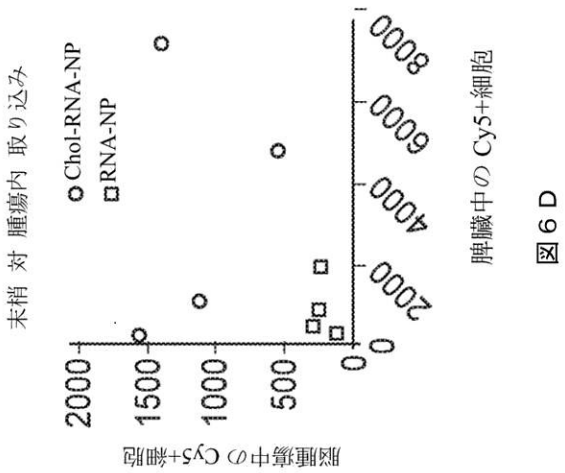


図 6 D

20

30

40

50

【図 6 F】

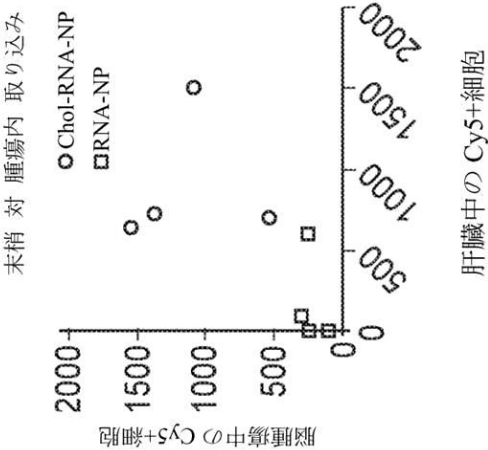
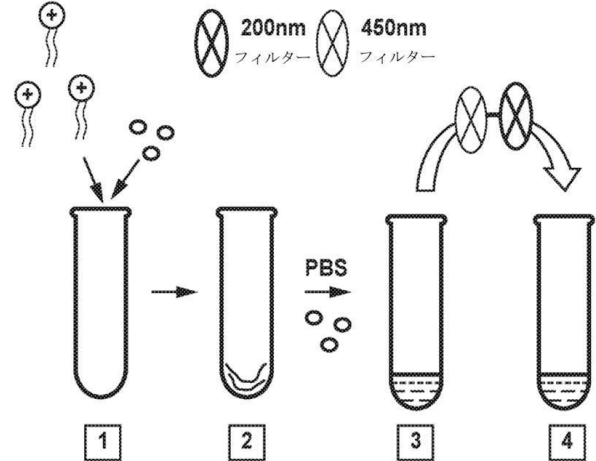


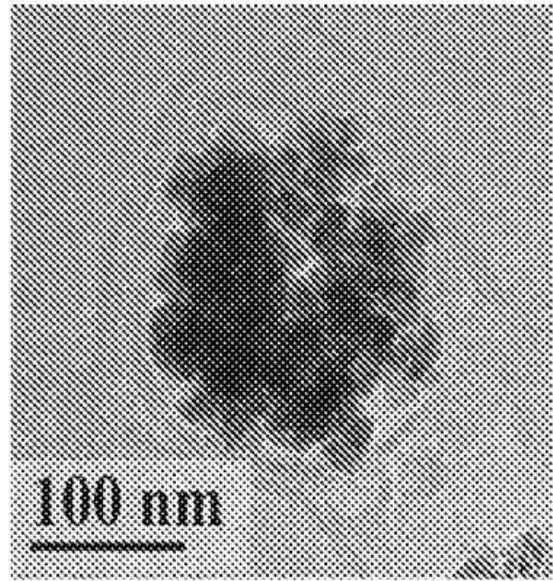
図 6 D

【図 7 A】

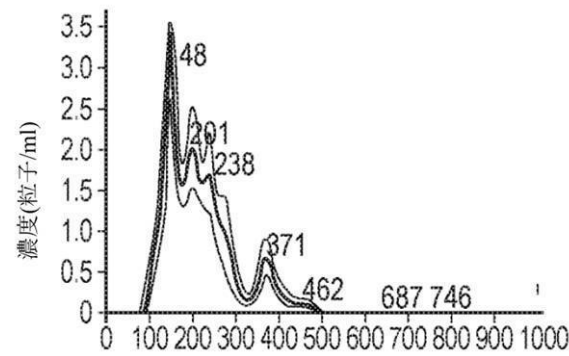


10

【図 7 B】



【図 7 C】



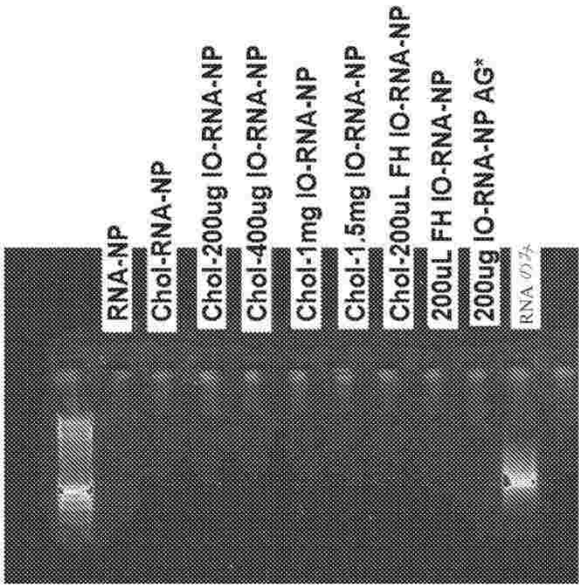
20

30

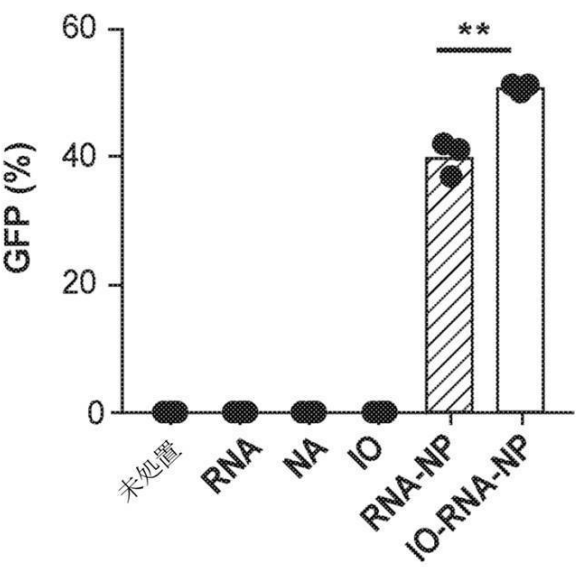
40

50

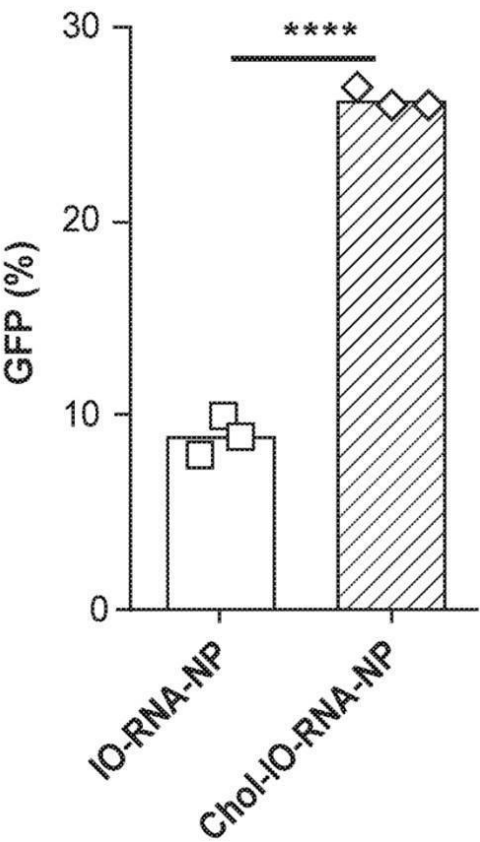
【図 7 D】



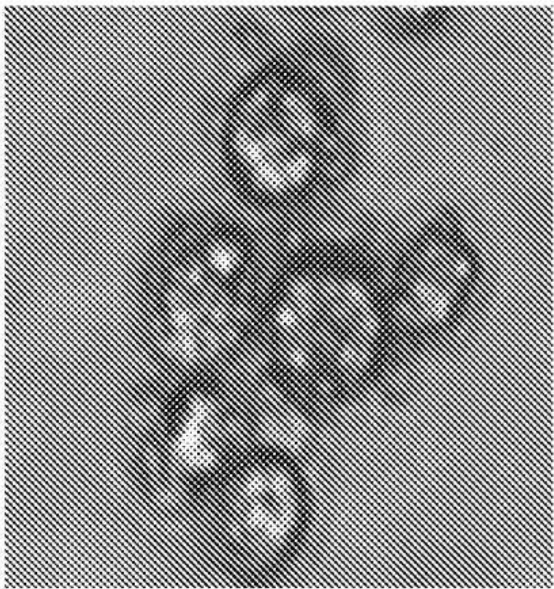
【図 7 E】



【図 7 F】



【図 7 G】



10

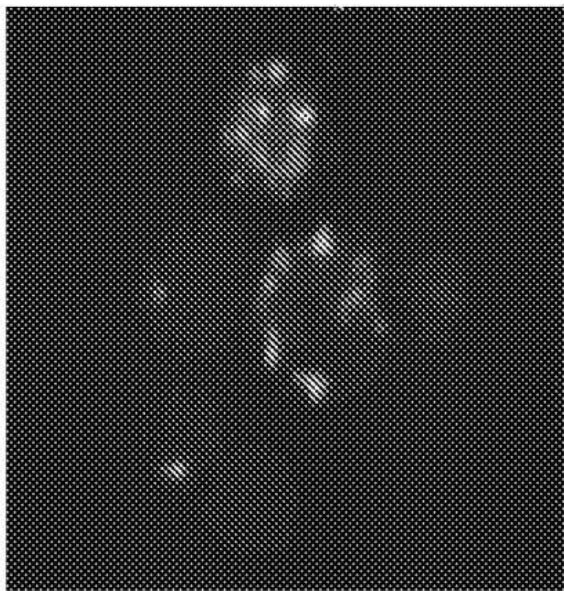
20

30

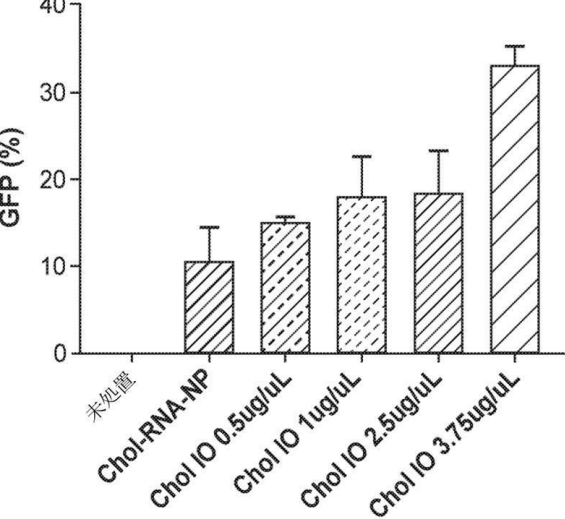
40

50

【図 7 H】

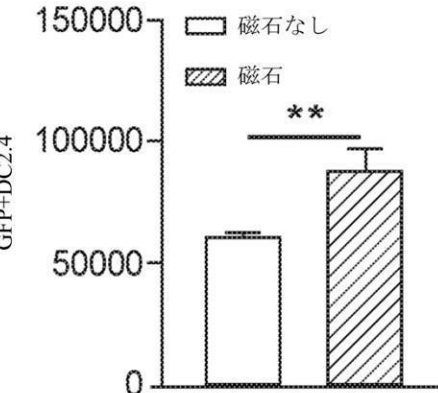


【図 7 I】

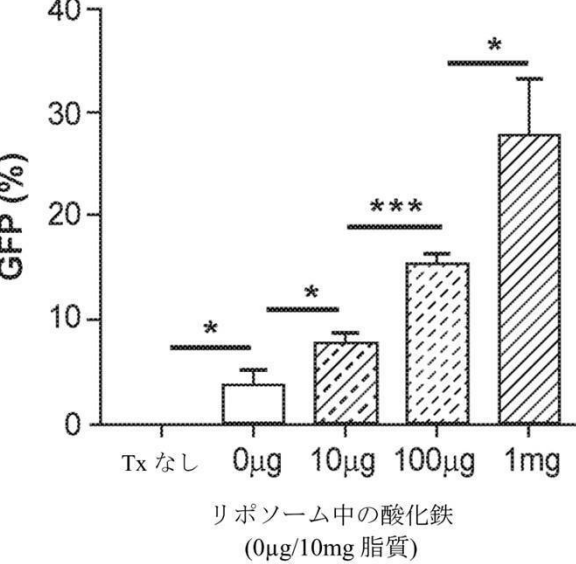


10

【図 8 A】



【図 8 B】



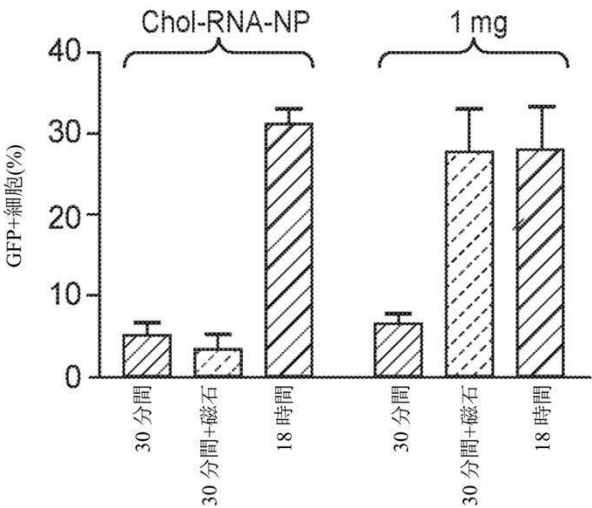
20

30

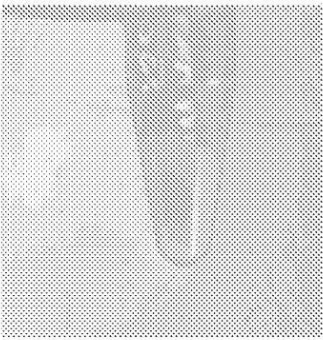
40

50

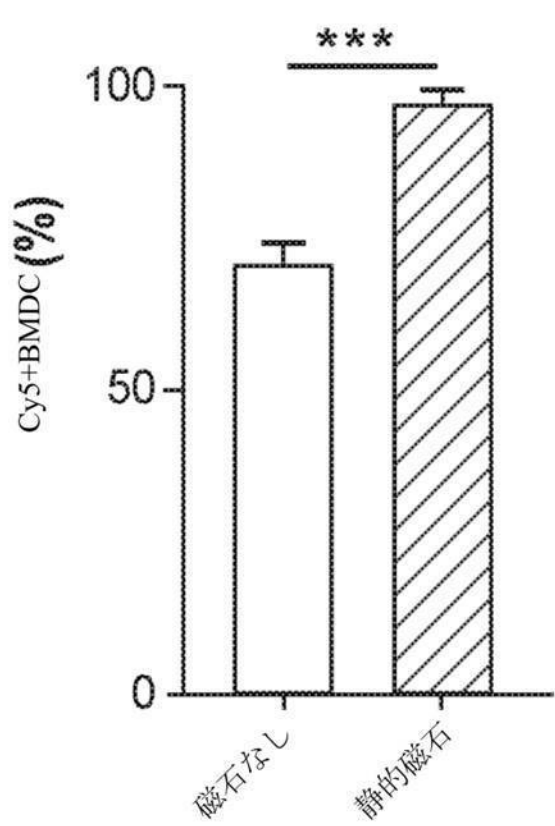
【図 8 C】



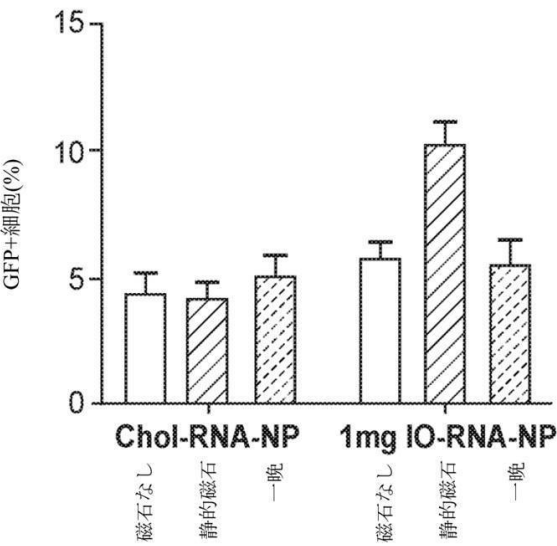
【図 8 D】



【図 8 E】



【図 8 F】



10

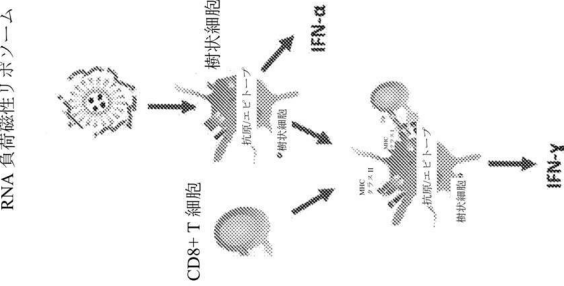
20

30

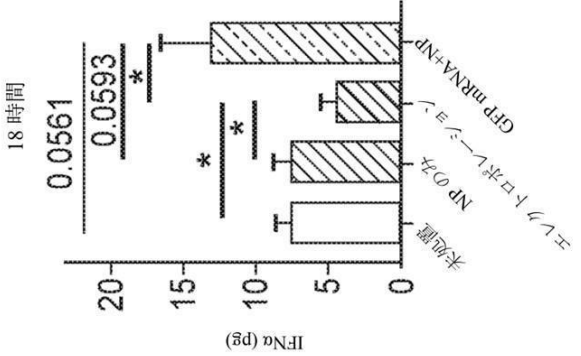
40

50

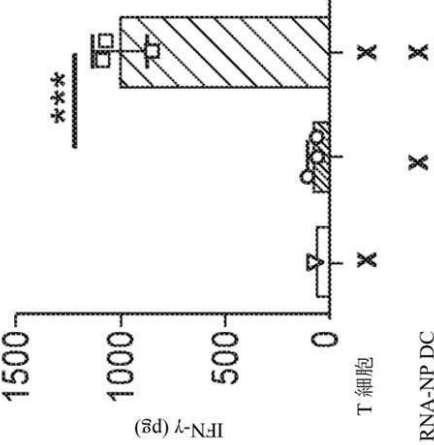
【図 9 A】



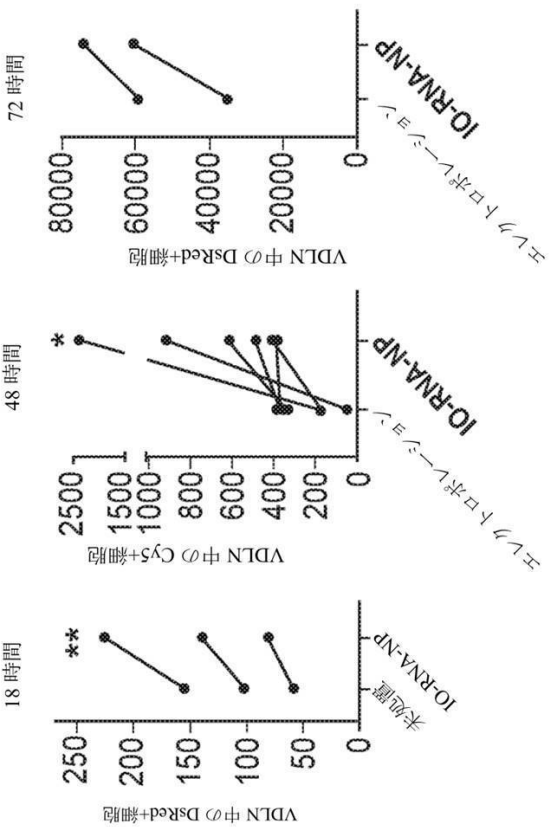
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 9 D】



10

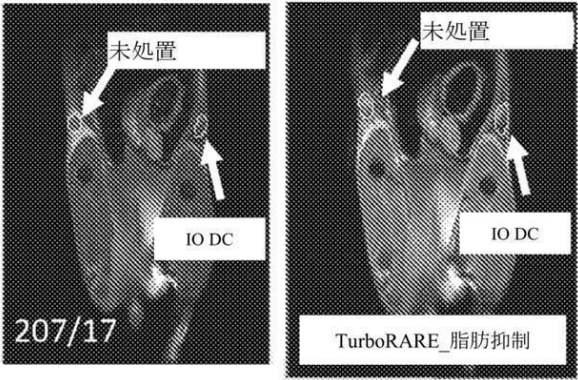
20

30

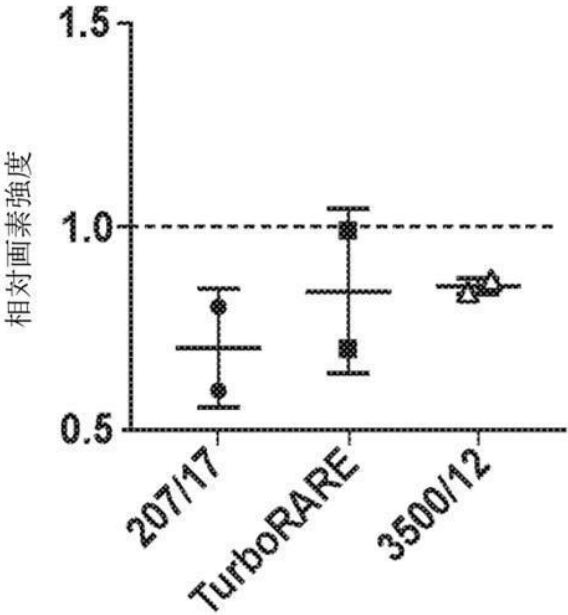
40

50

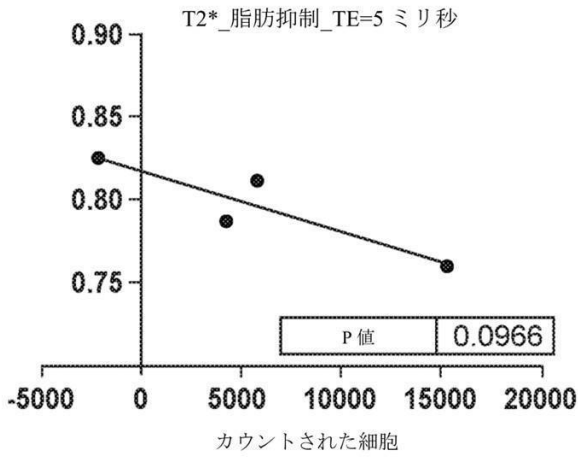
【図 1 0 A】



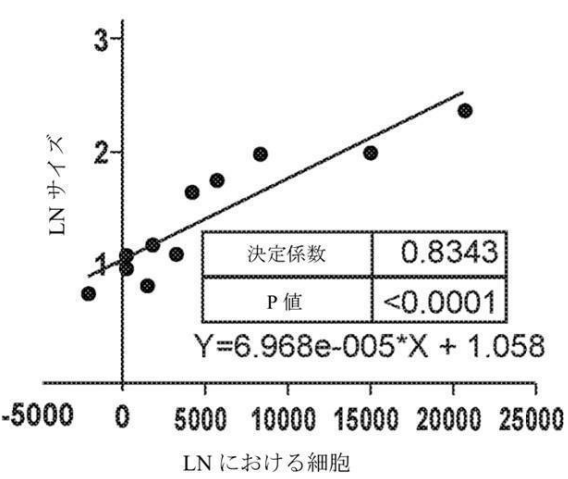
【図 1 0 B】



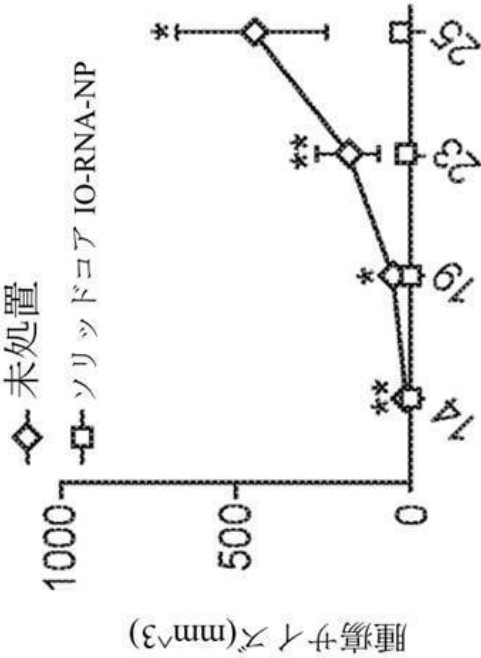
【図 1 0 C】



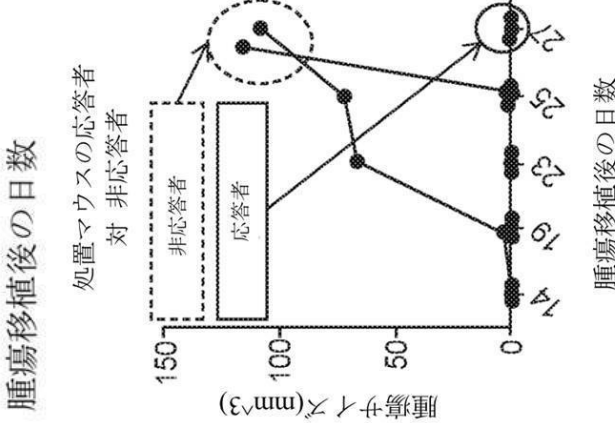
【図 1 0 D】



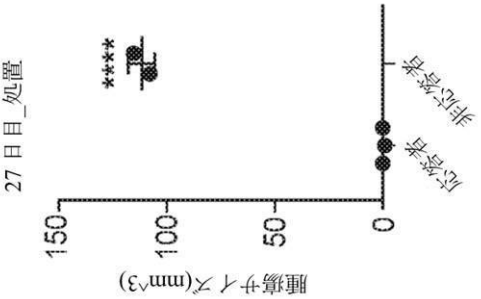
【図 1 1 A】



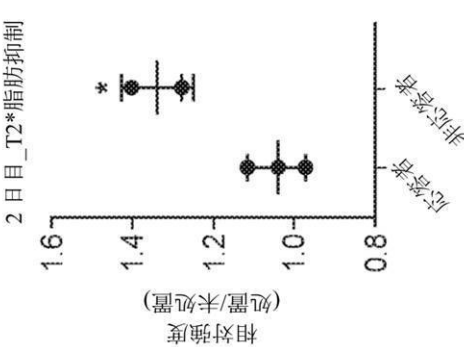
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



10

20

30

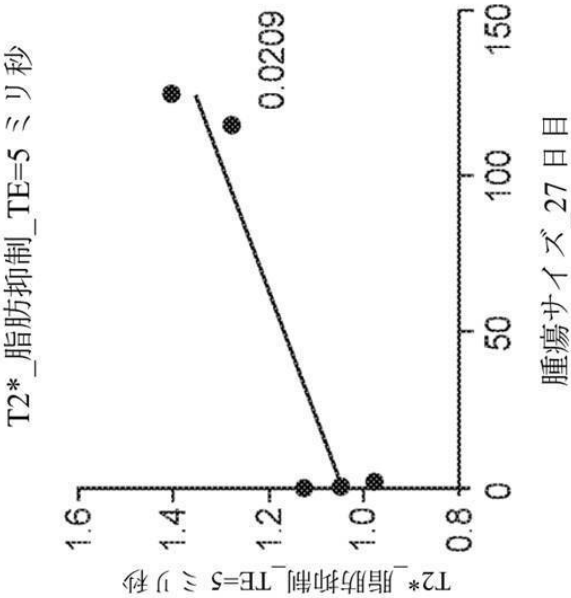
40

50

【図 1 1 E】

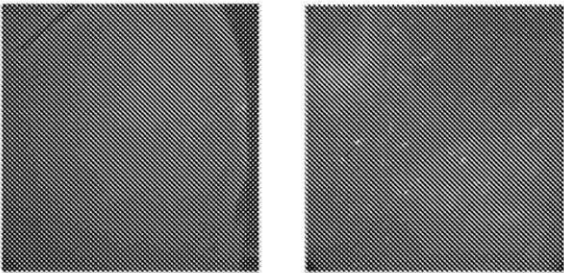
失敗したシーケンス-生存率と相関しなかった				faset	フリップ角
シーケンス		TR	TE		
T2 Flash		90	3		10
T2 Flash 脂肪抑制		90	3	有	10
3500/12_脂肪抑制		3500	12	有	
207/17_脂肪抑制		207	17	有	
TurboRare		500	14		
TurboRare_脂肪抑制		3000	28	有	

【図 1 1 F】

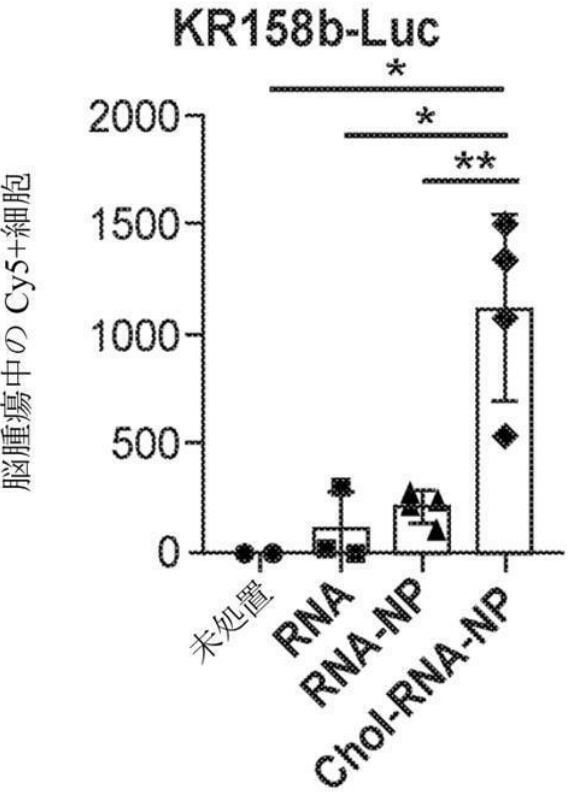


【図 1 2 A】

皮質



【図 1 2 B】



10

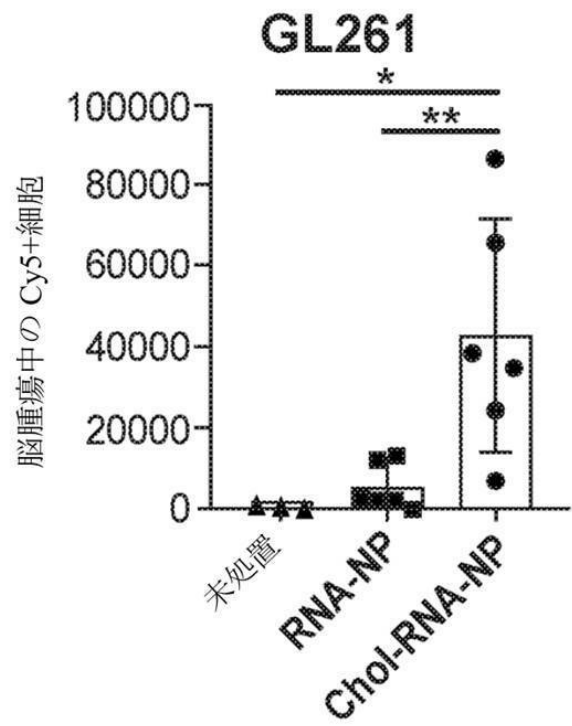
20

30

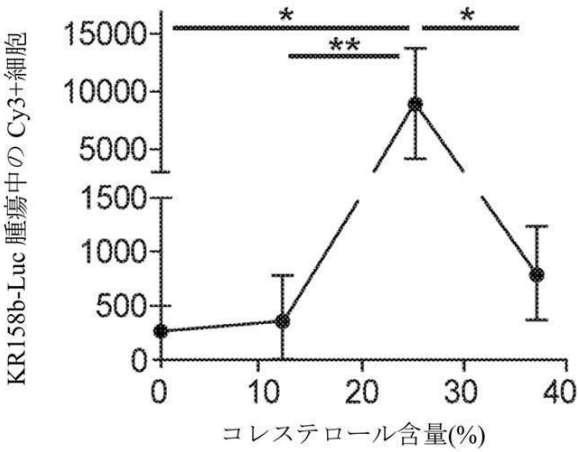
40

50

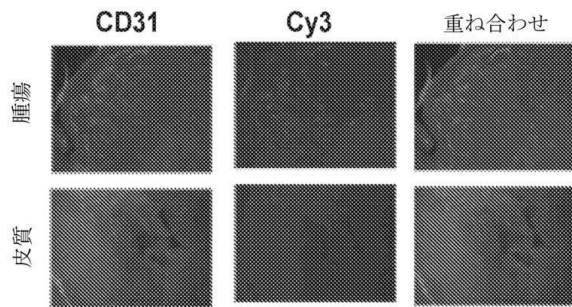
【図 1 2 C】



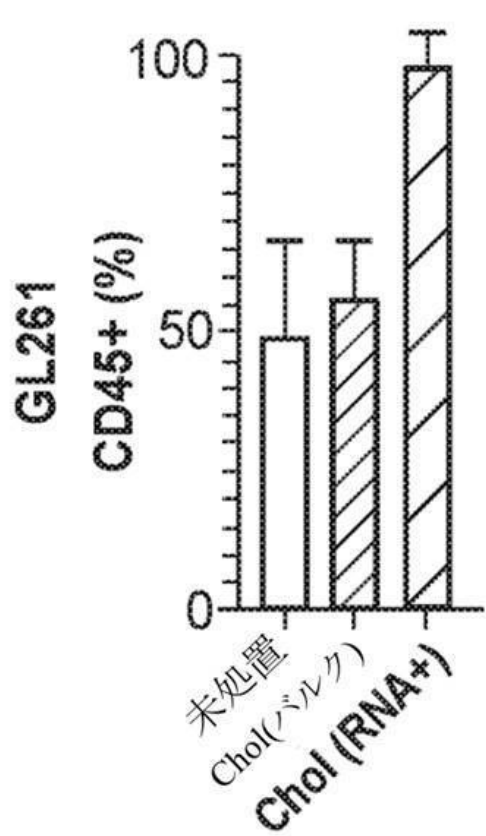
【図 1 2 D】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

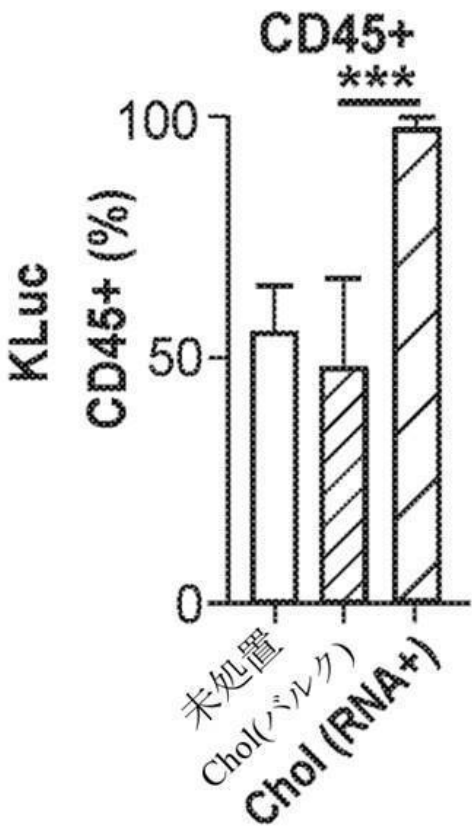
20

30

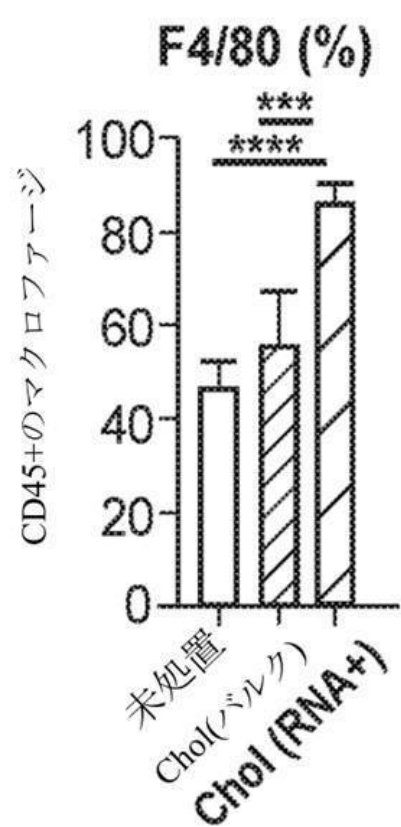
40

50

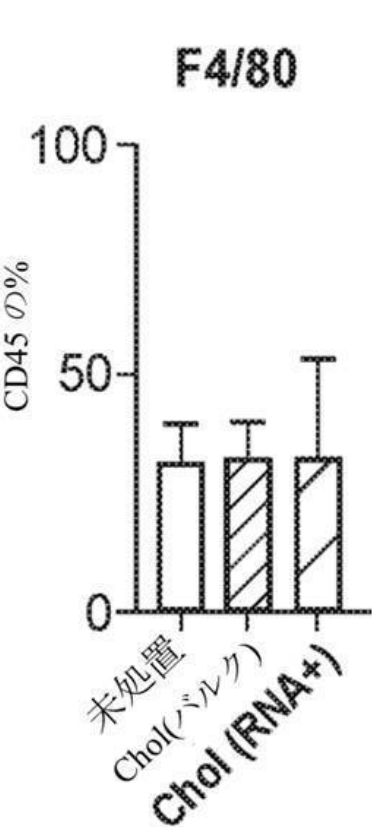
【図 1 3 C】



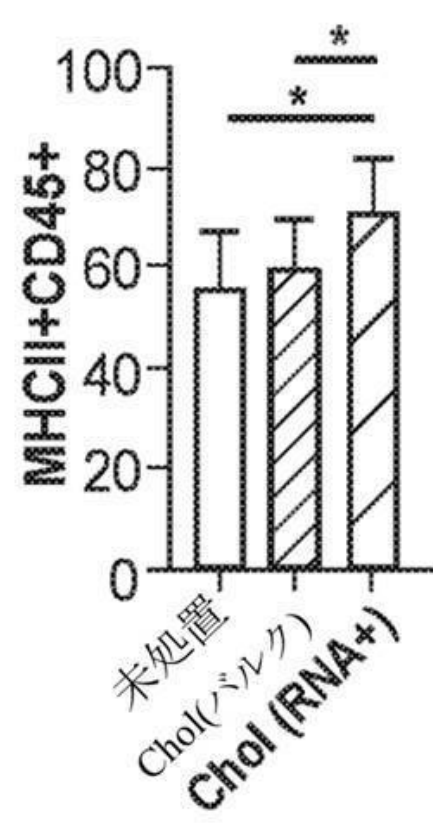
【図 1 3 D】



【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



10

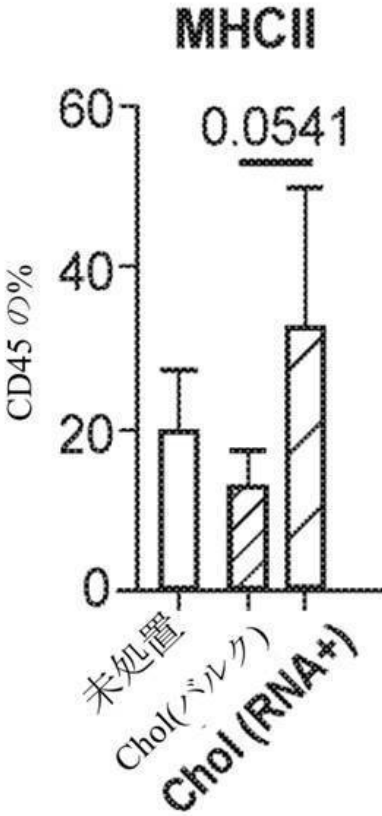
20

30

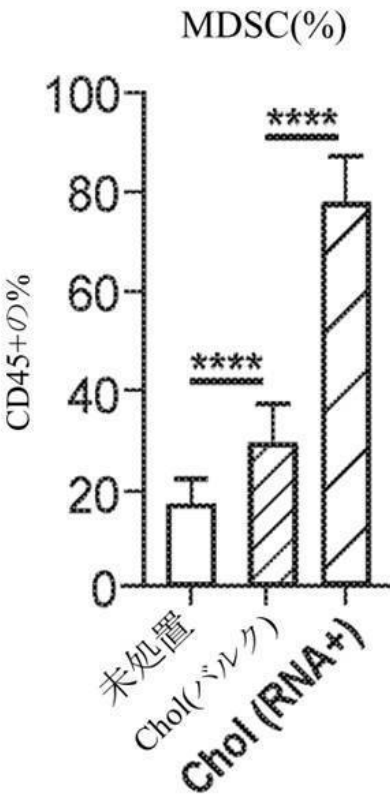
40

50

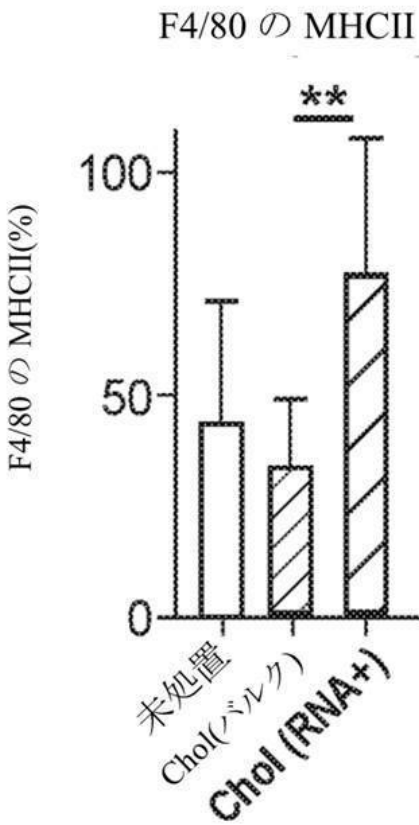
【図 1 3 G】



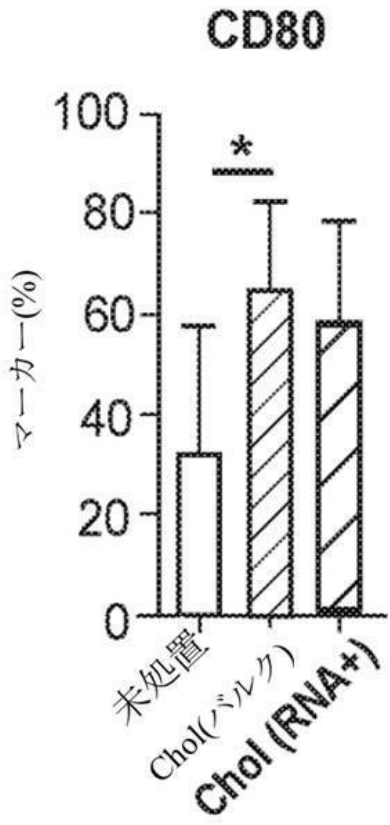
【図 1 3 H】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

20

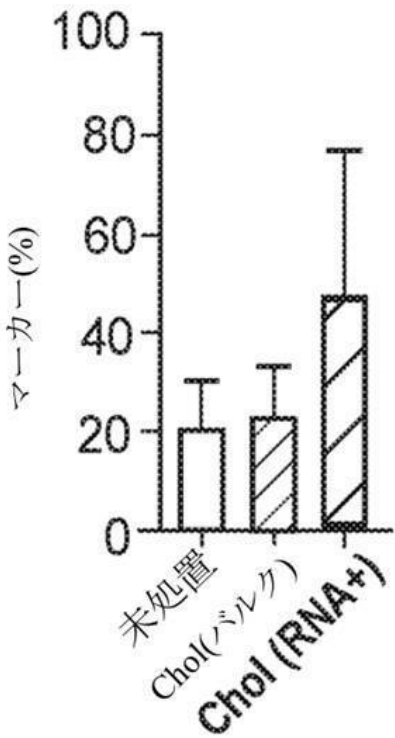
30

40

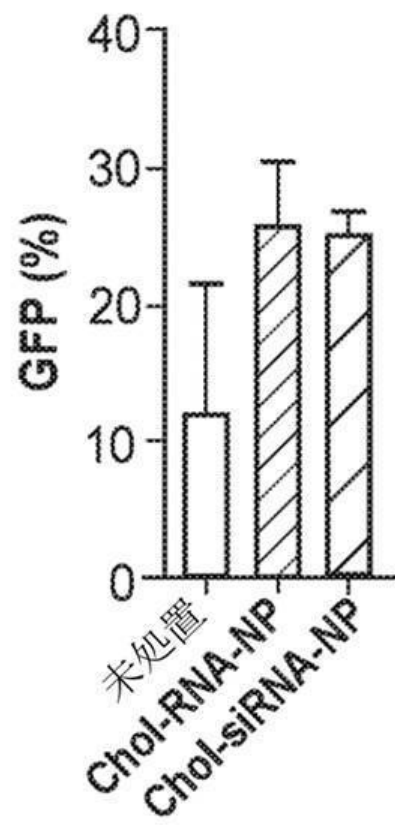
50

【図 1 4 C】

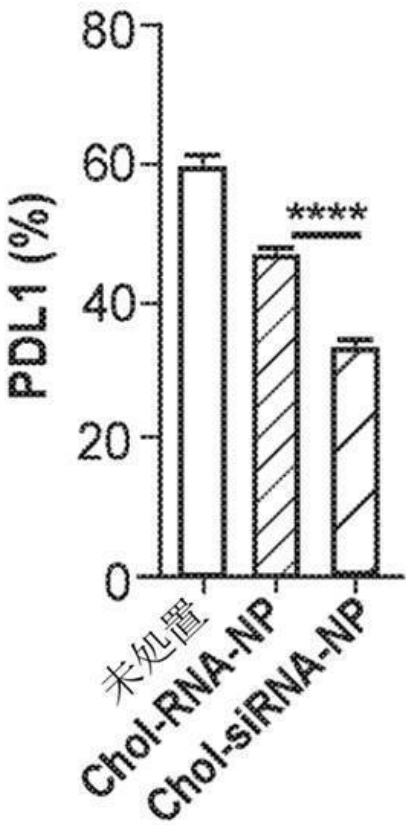
MHCII+の CD86+



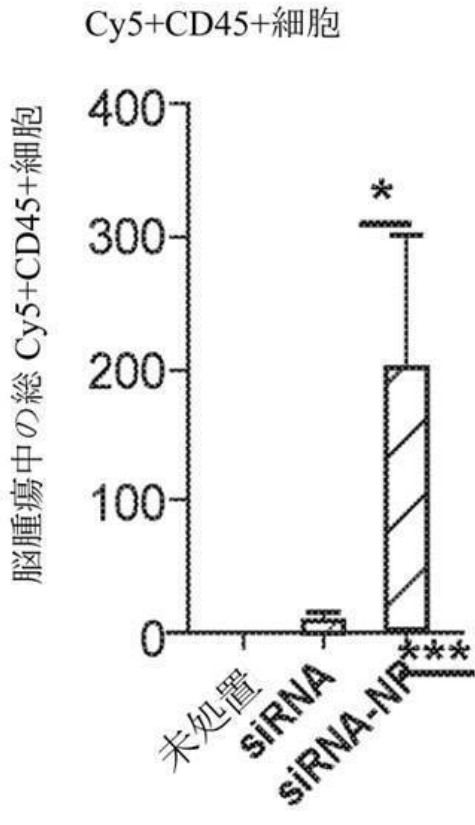
【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



10

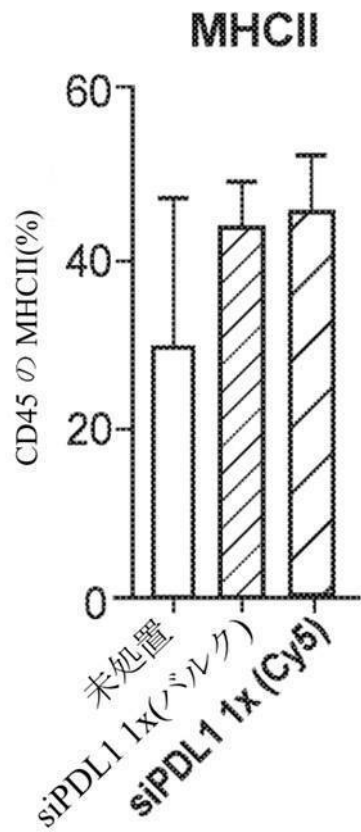
20

30

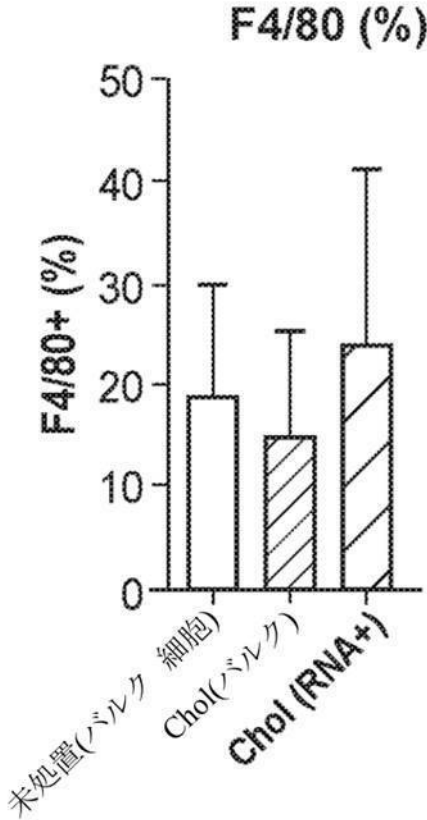
40

50

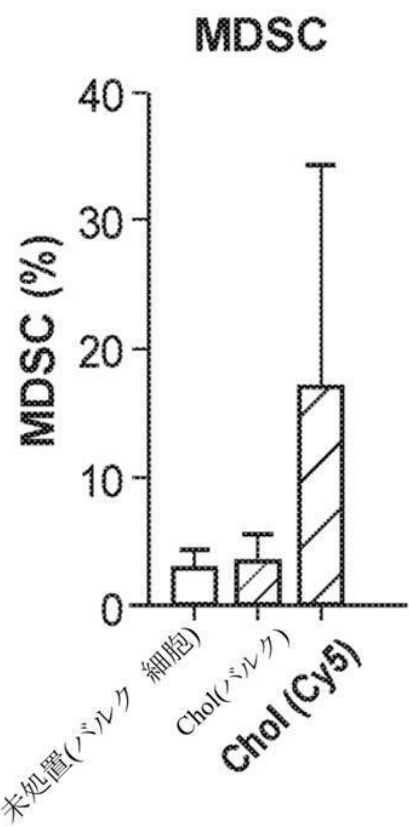
【図 1 5 D】



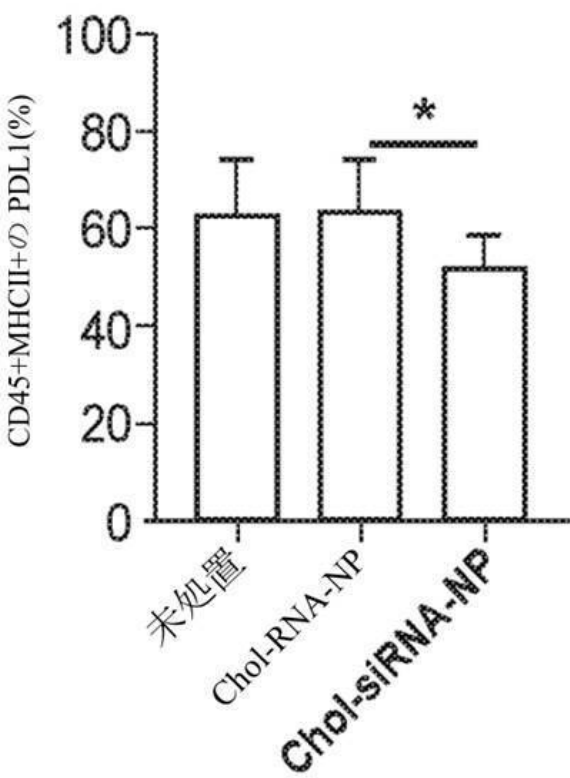
【図 1 5 E】



【図 1 5 F】



【図 1 5 G】



10

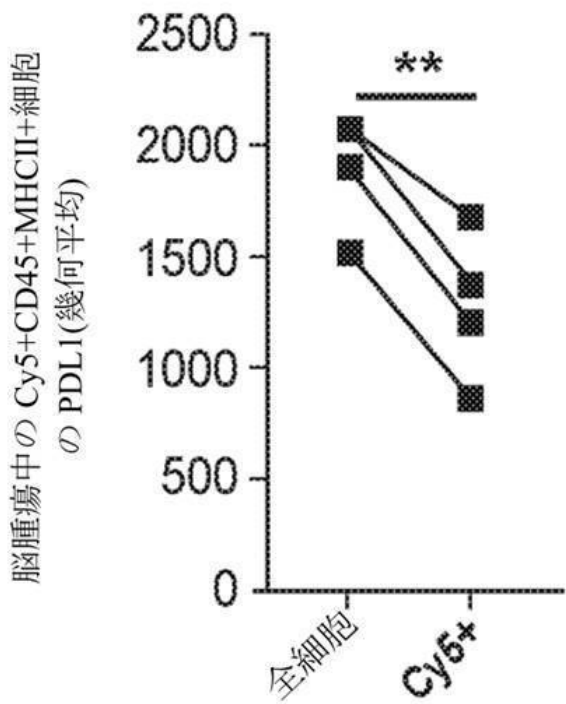
20

30

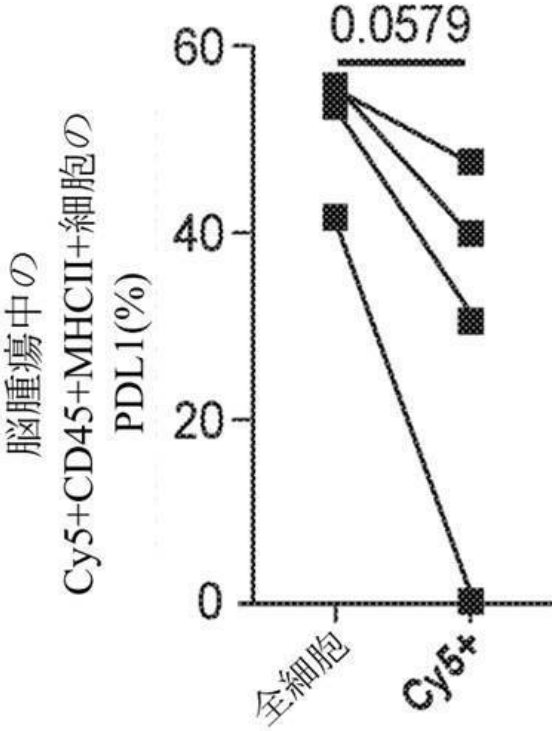
40

50

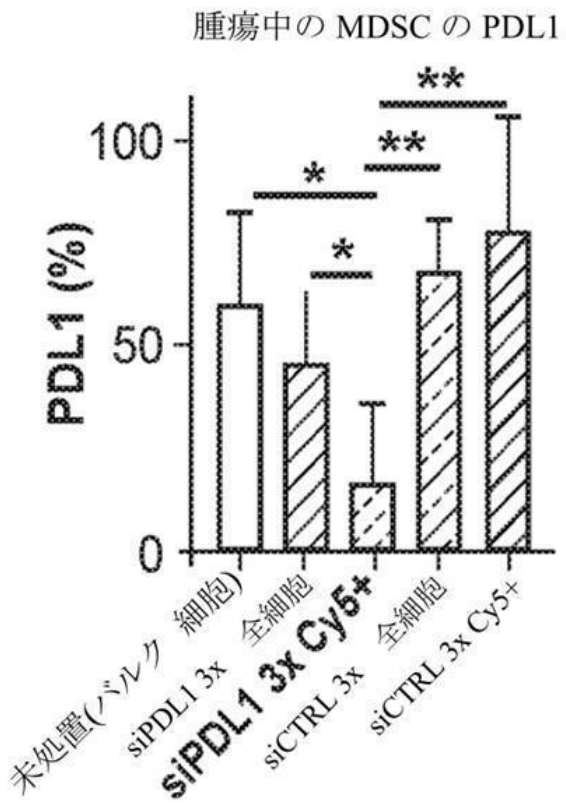
【図 1 5 H】



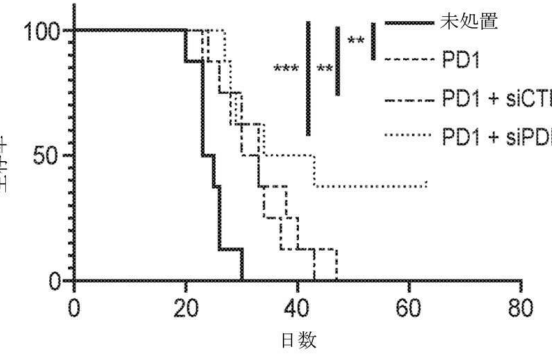
【図 1 5 I】



【図 1 5 J】



【図 1 5 K】



10

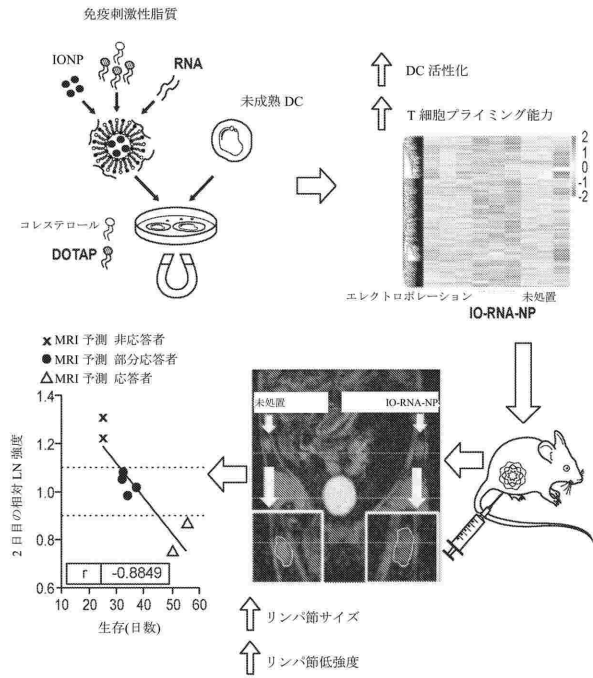
20

30

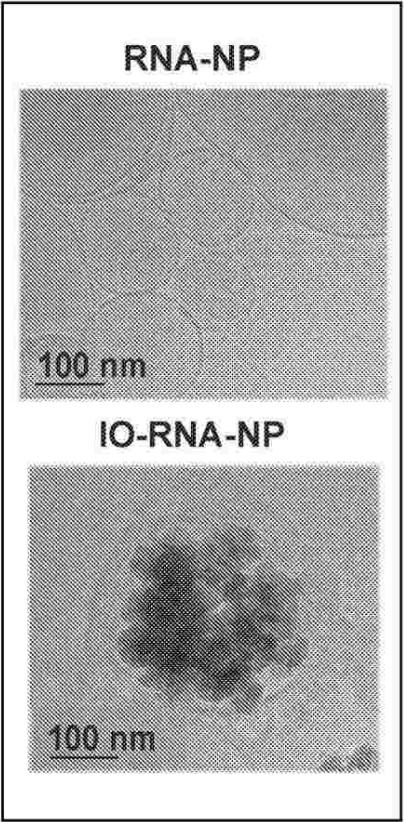
40

50

【図 1 6】



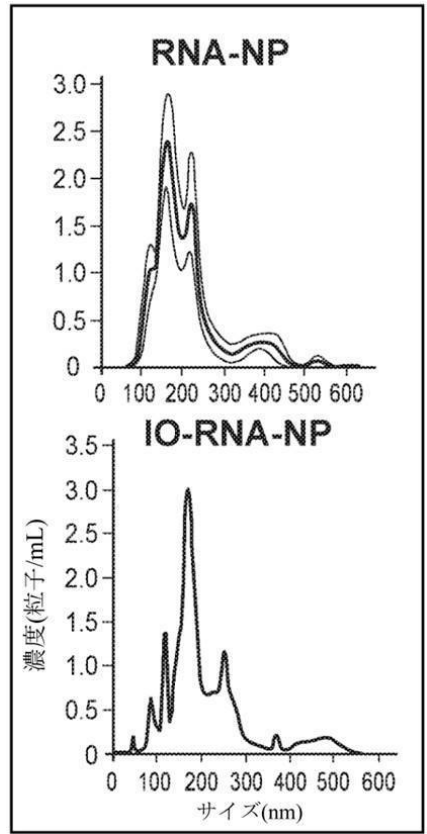
【図 1 7 A】



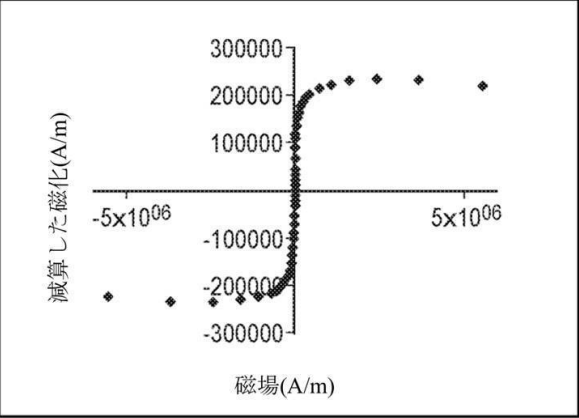
10

20

【図 1 7 B】



【図 1 7 C】

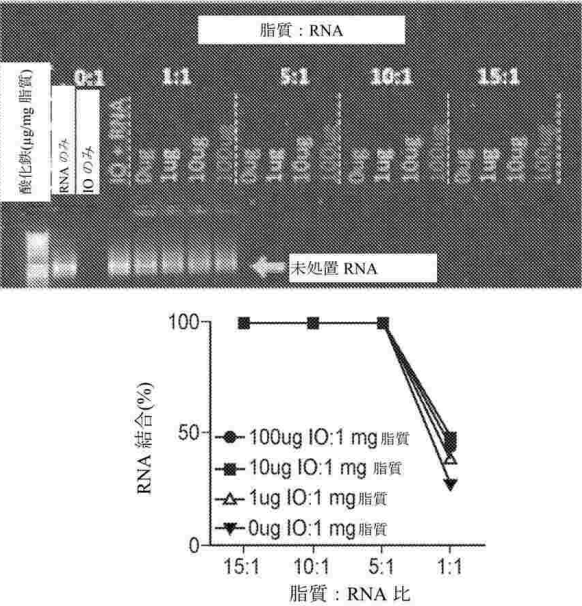


30

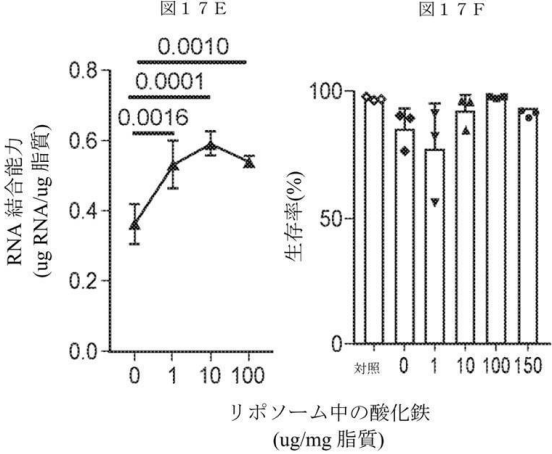
40

50

【図 1 7 D】

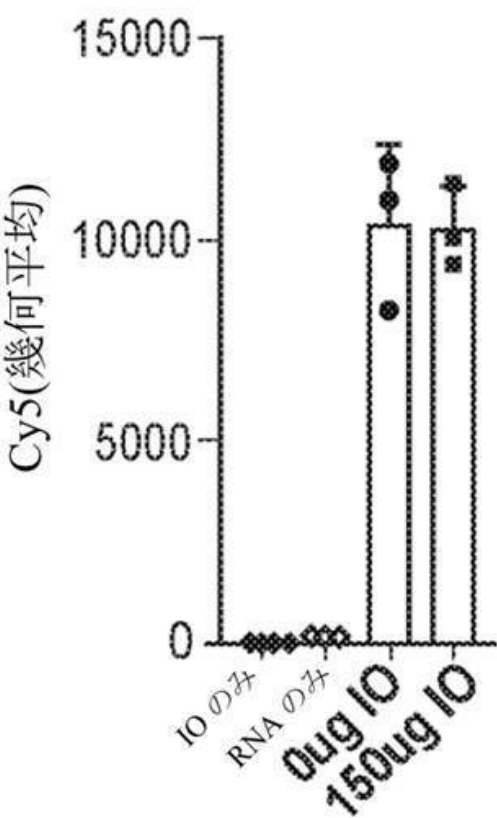


【図 1 7 E - 1 7 F】

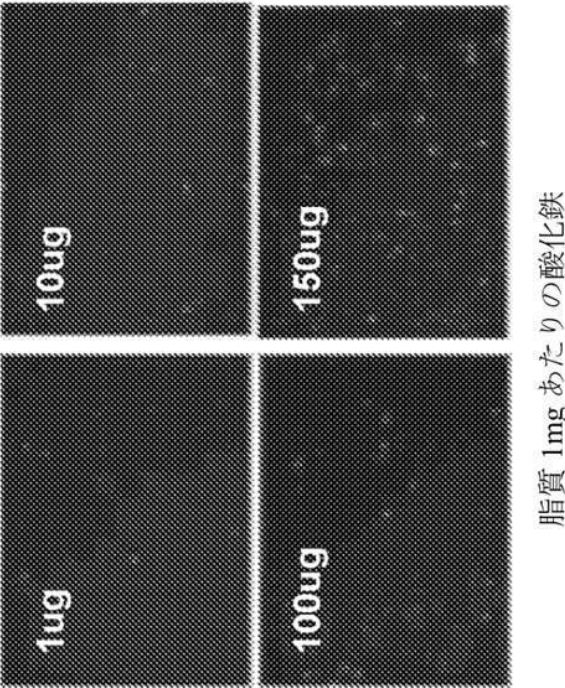


10

【図 1 7 G】



【図 1 8 A】



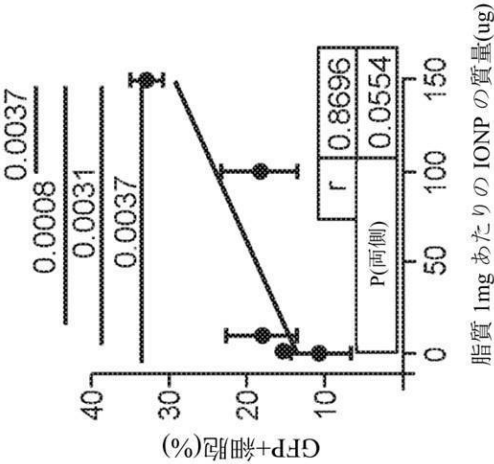
20

30

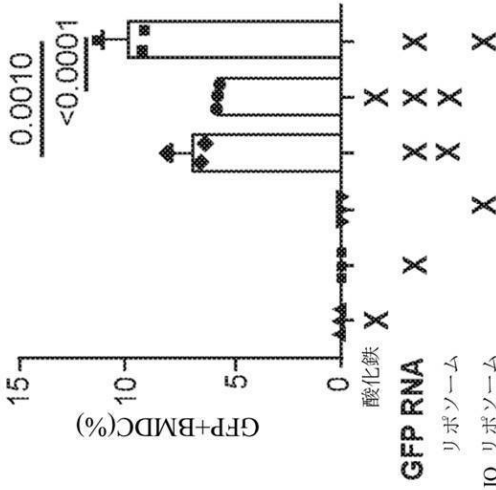
40

50

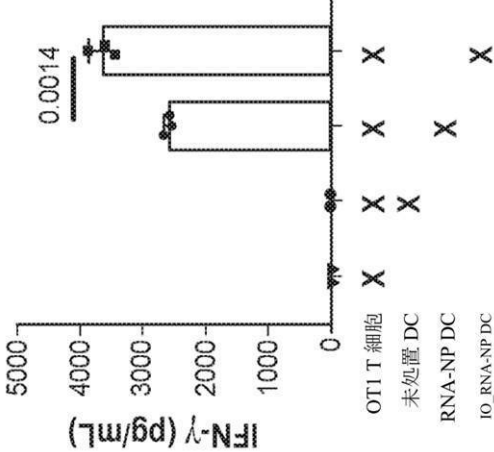
【図 1 8 B】



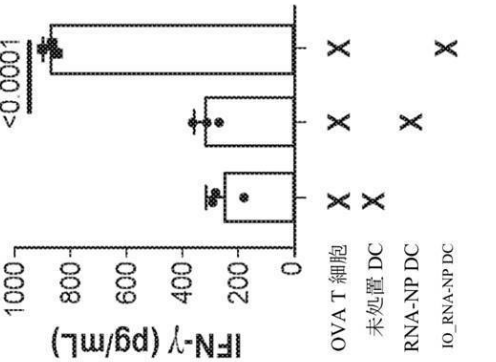
【図 1 8 C】



【図 1 8 D】



【図 1 8 E】



10

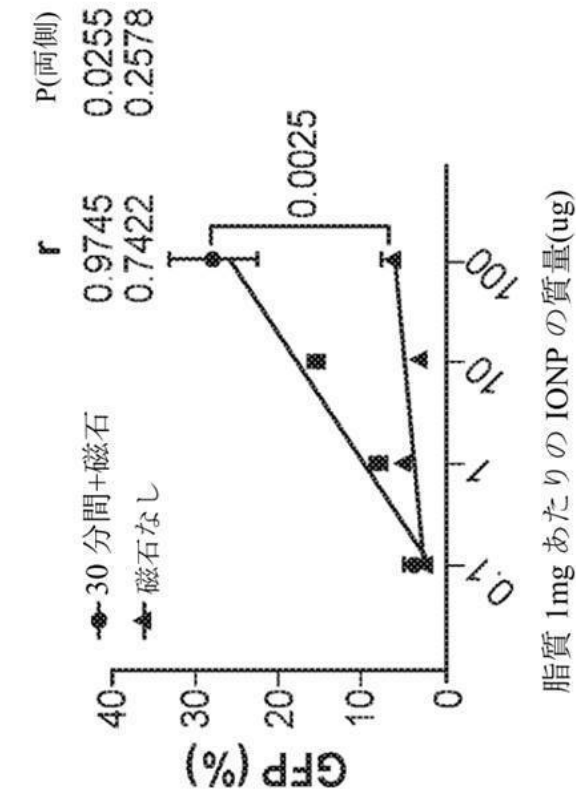
20

30

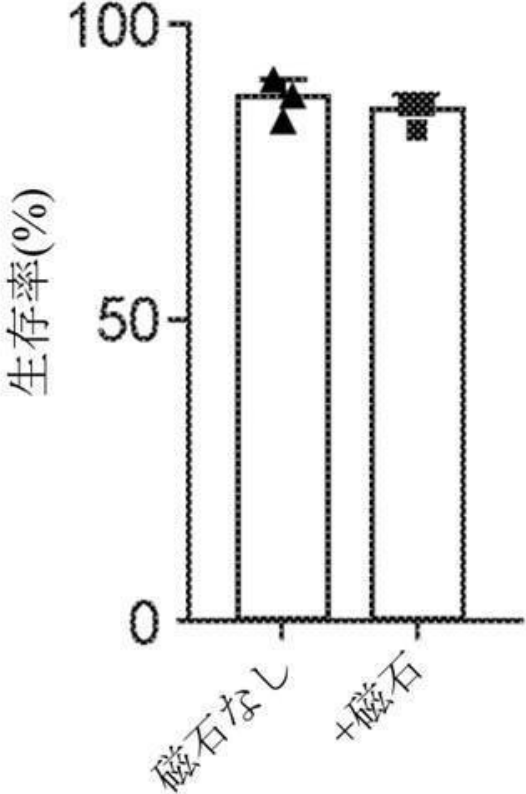
40

50

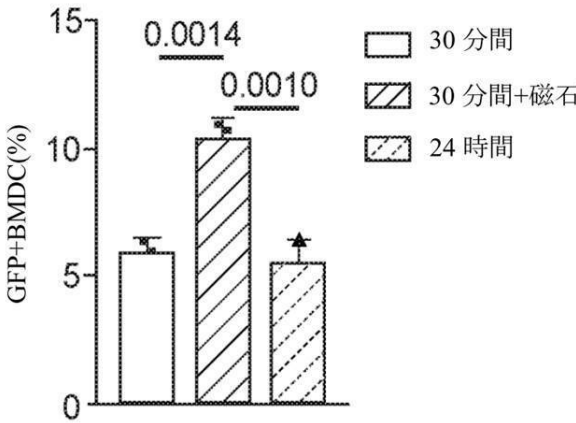
【図 1 8 F】



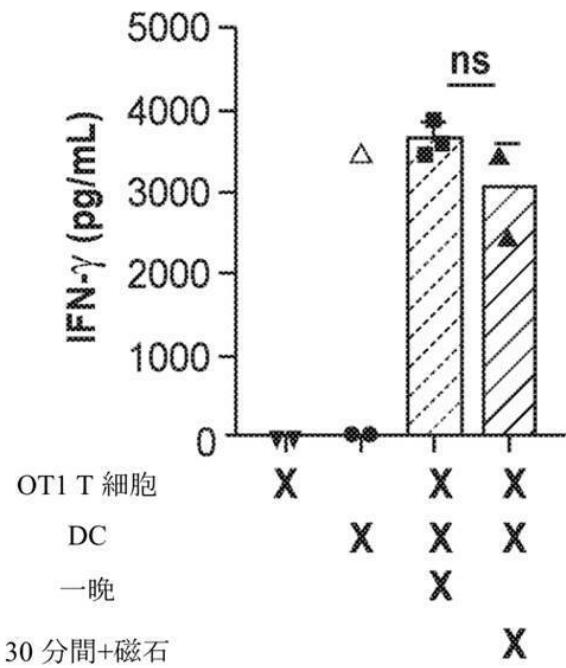
【図 1 8 G】



【図 1 8 H】



【図 1 8 I】



10

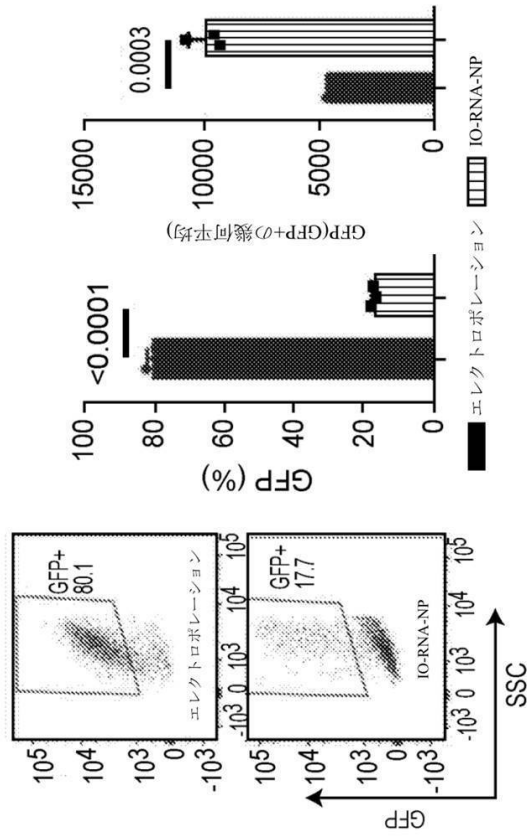
20

30

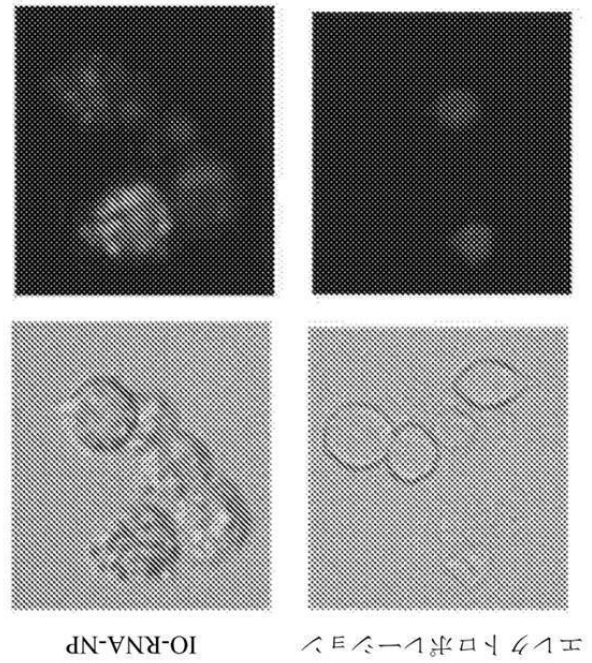
40

50

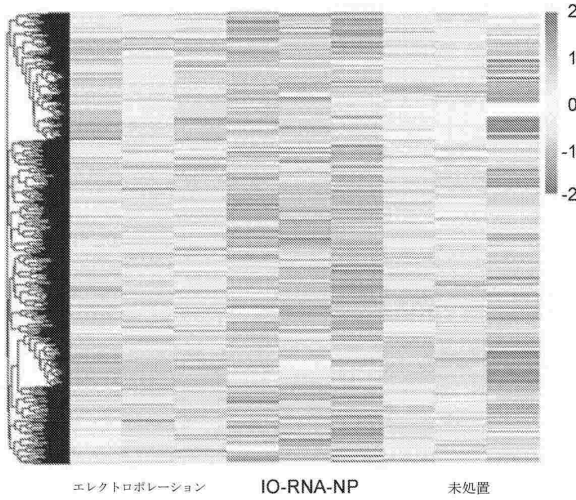
【図 19 A】



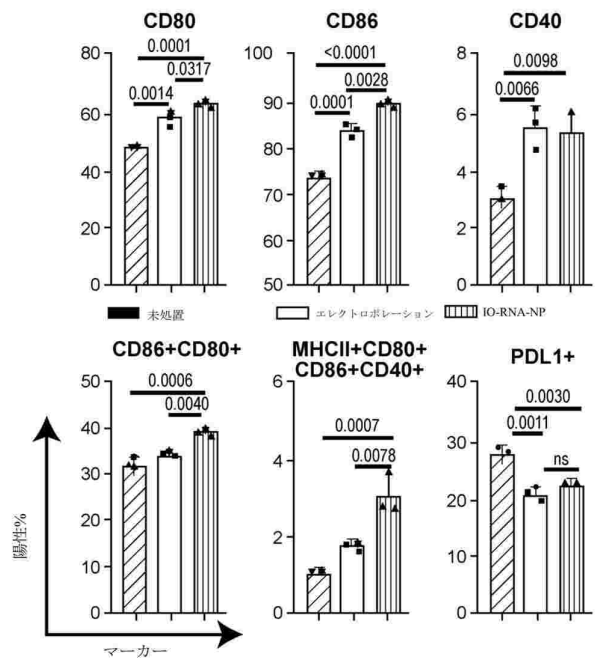
【図 19 B】



【図 19 C】



【図 19 D】



10

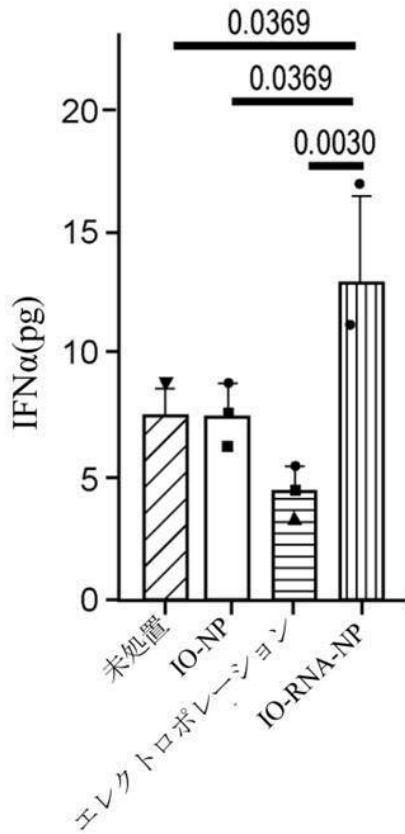
20

30

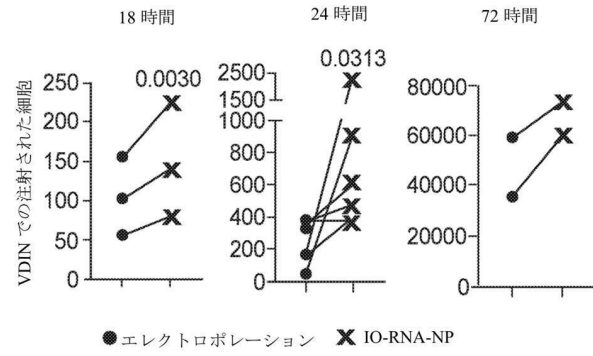
40

50

【図 19 E】



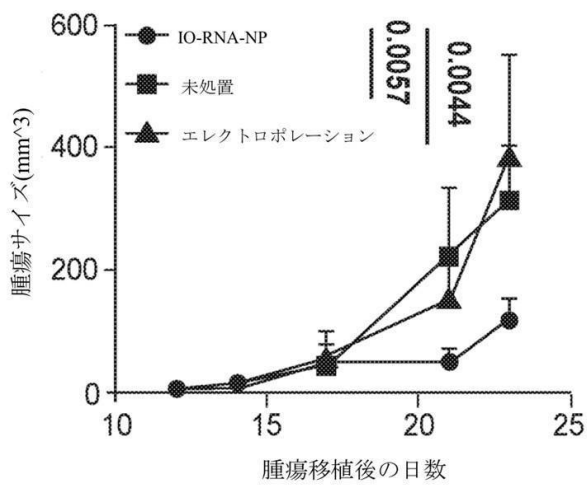
【図 19 F】



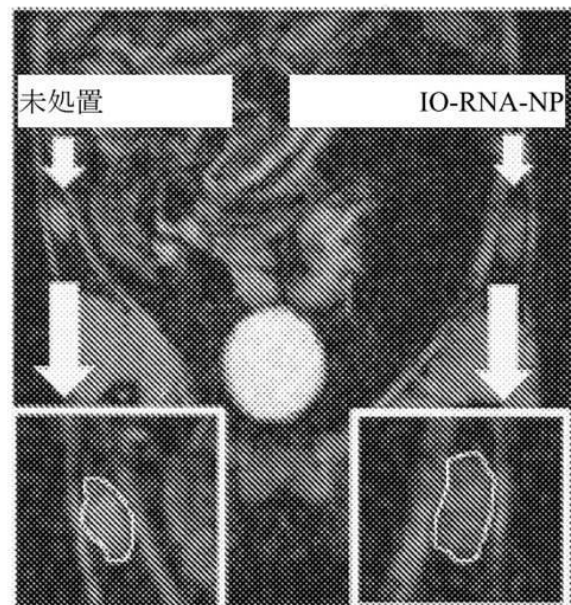
10

20

【図 19 G】



【図 20 A】

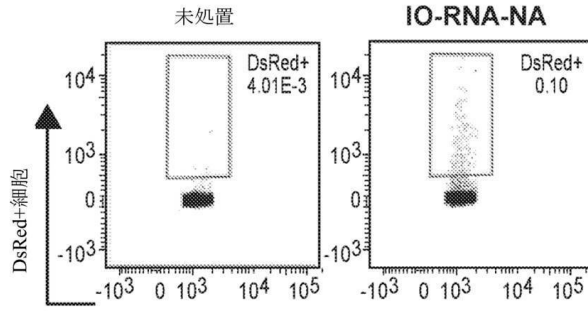


30

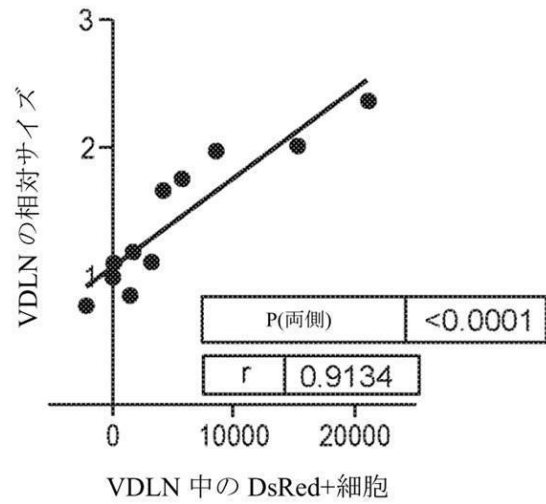
40

50

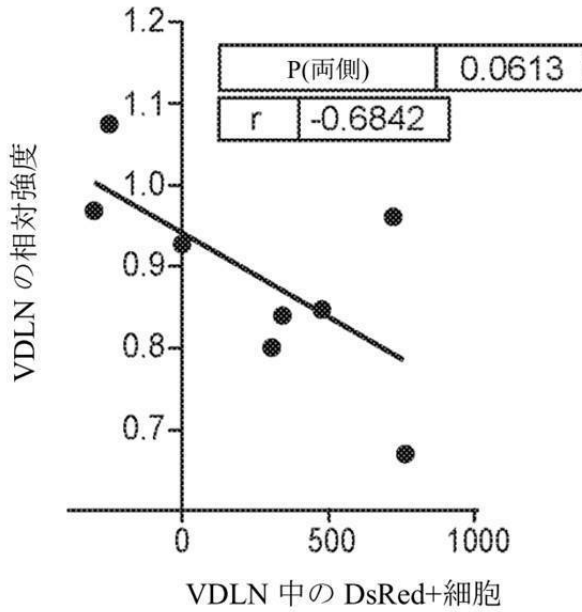
【図 20 B】



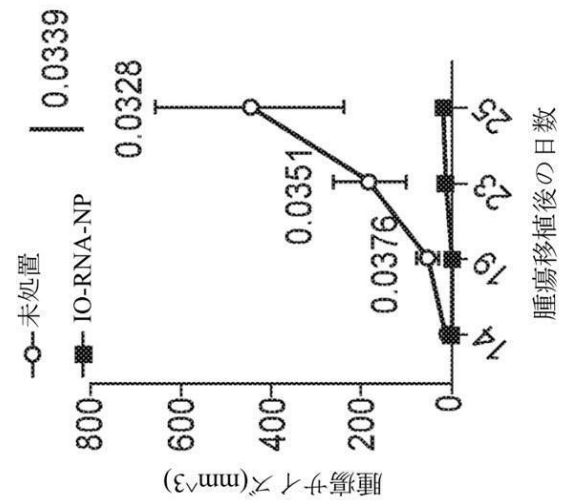
【図 20 C】



【図 20 D】



【図 21 A】



10

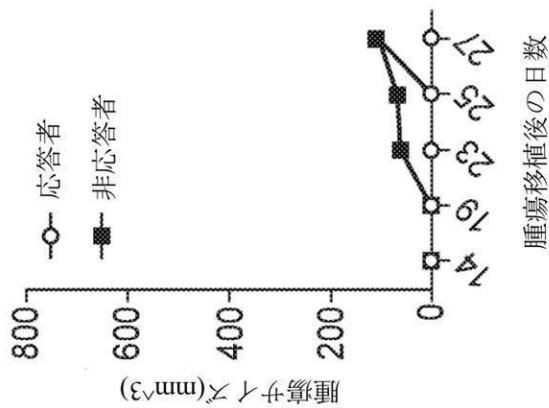
20

30

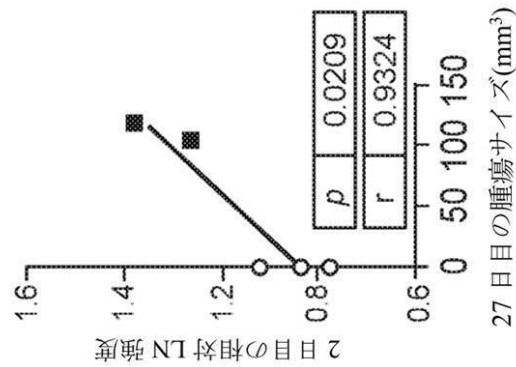
40

50

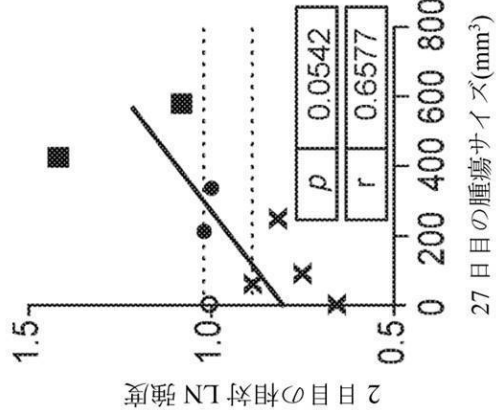
【図 2 1 B】



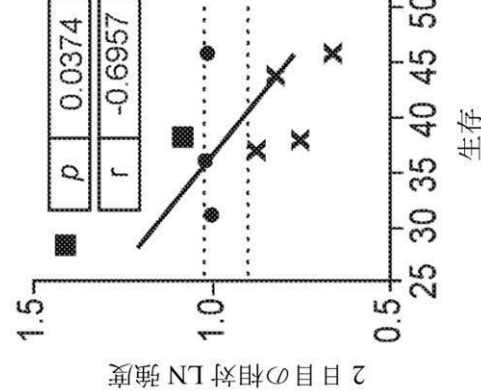
【図 2 1 C】



【図 2 1 D】



【図 2 1 E】



10

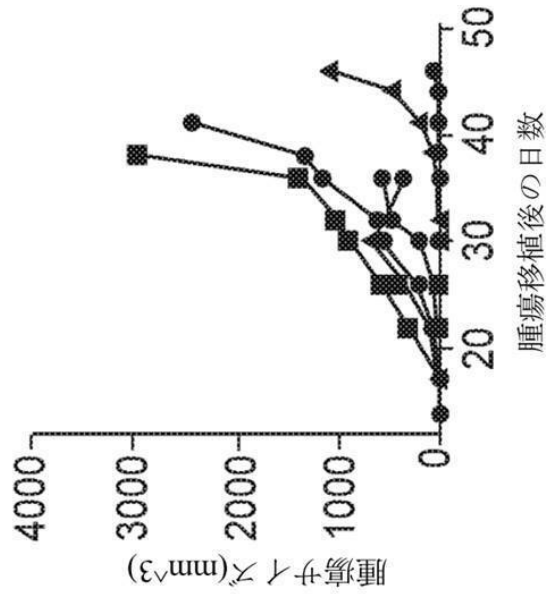
20

30

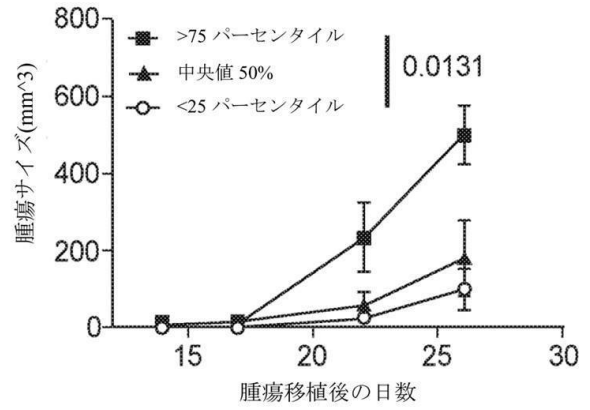
40

50

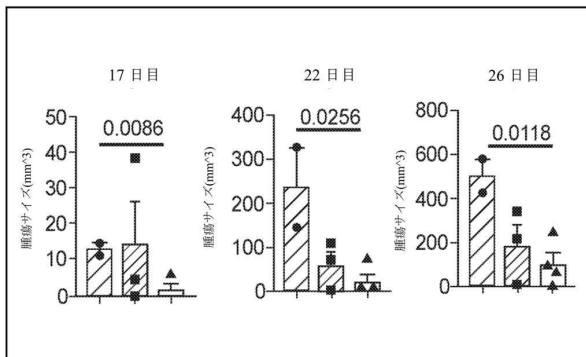
【図 2 1 F】



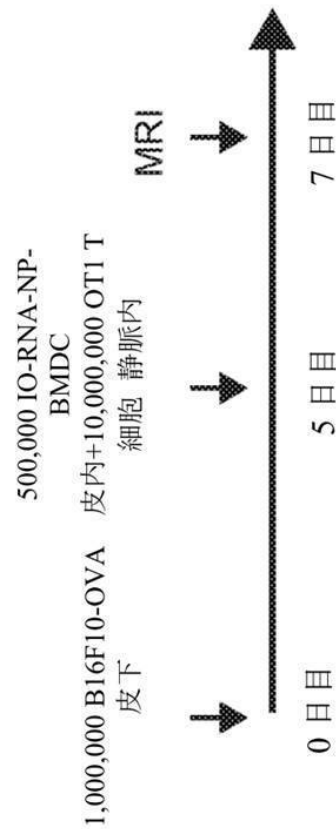
【図 2 1 G】



【図 2 1 H】



【図 2 2 A】



10

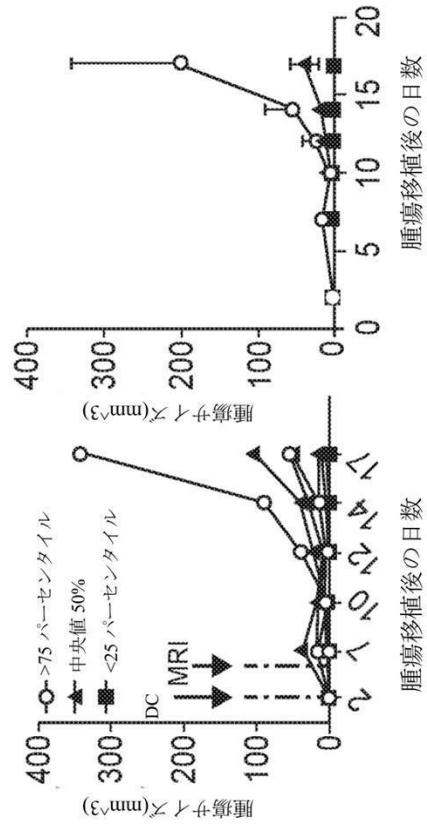
20

30

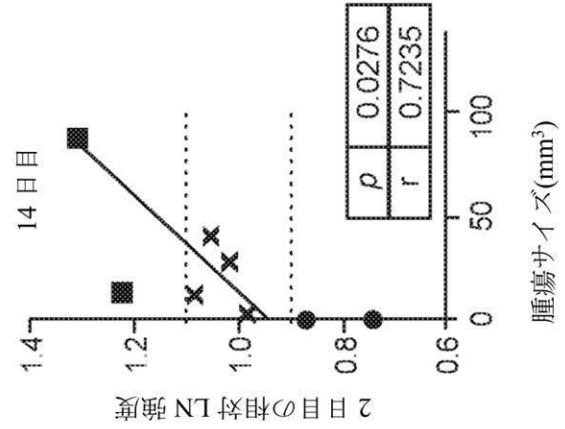
40

50

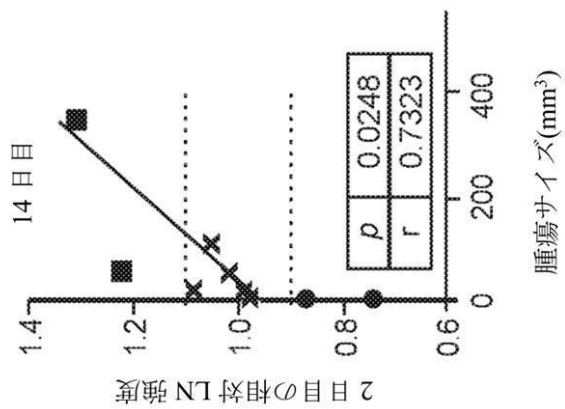
【図 2 2 B】



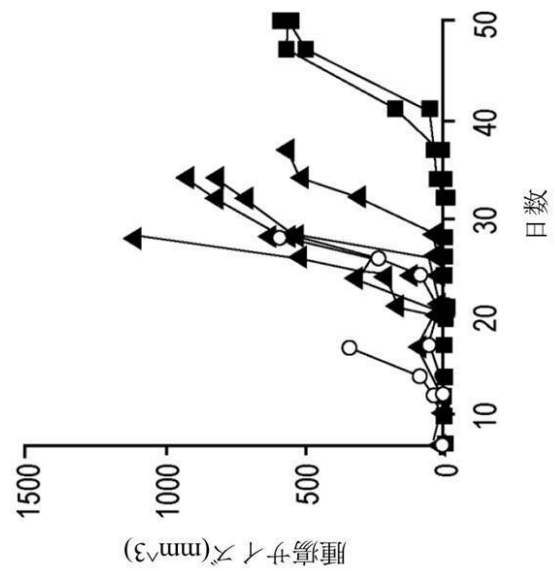
【図 2 2 C】



【図 2 2 D】



【図 2 2 E】



10

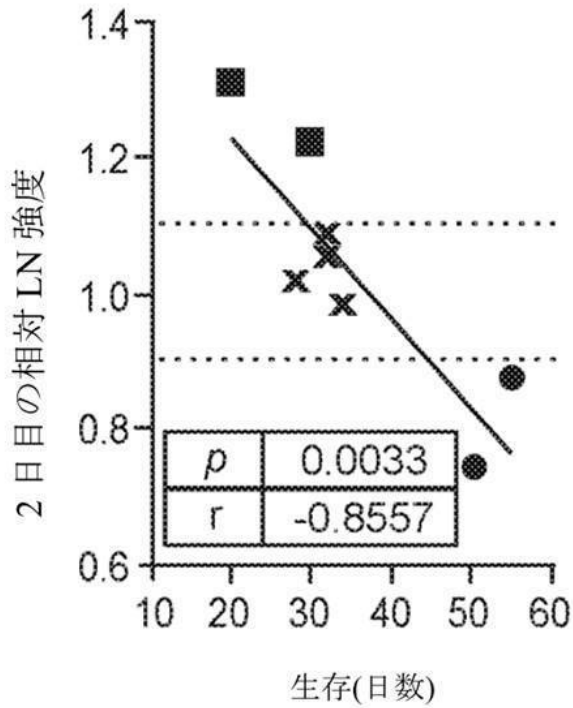
20

30

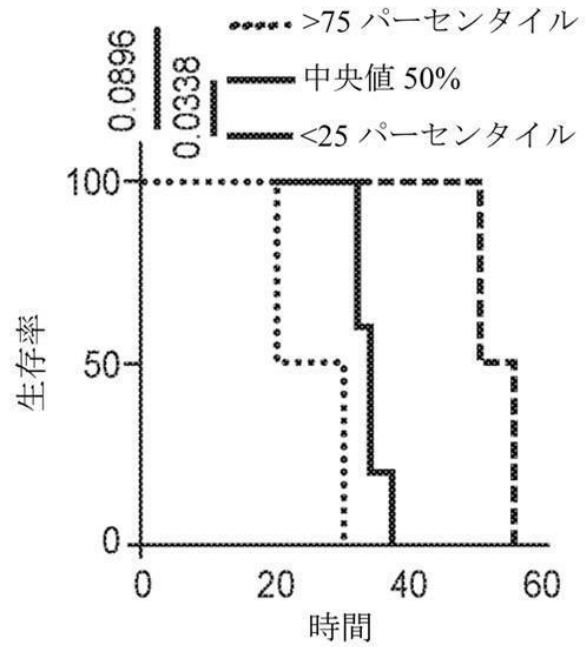
40

50

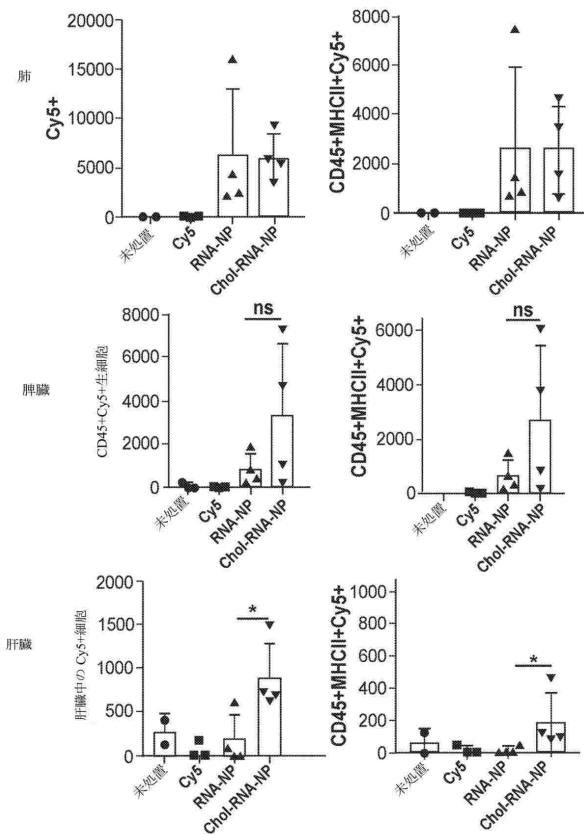
【図 2 2 F】



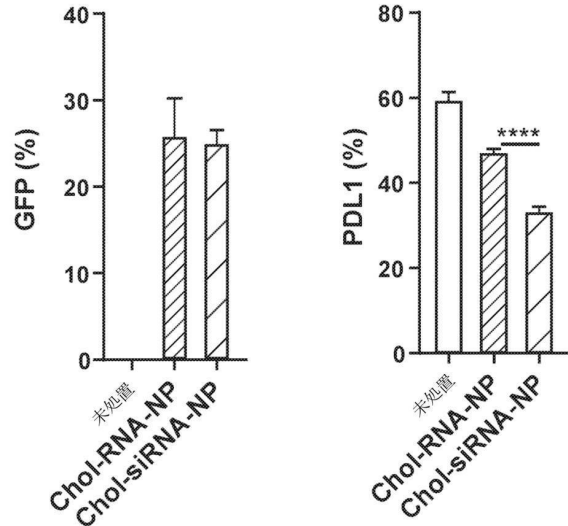
【図 2 2 G】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

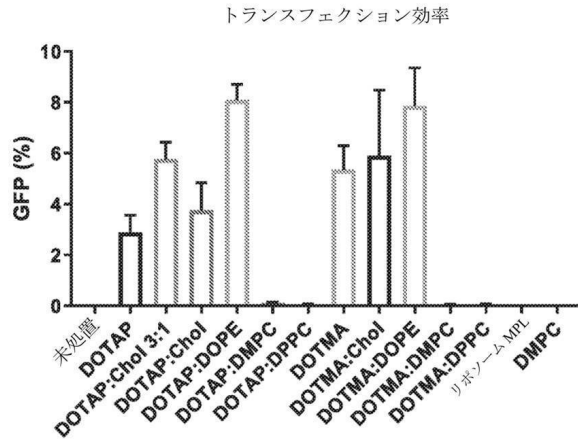
20

30

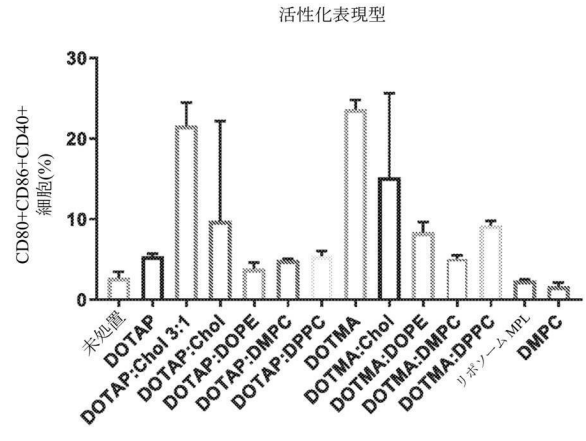
40

50

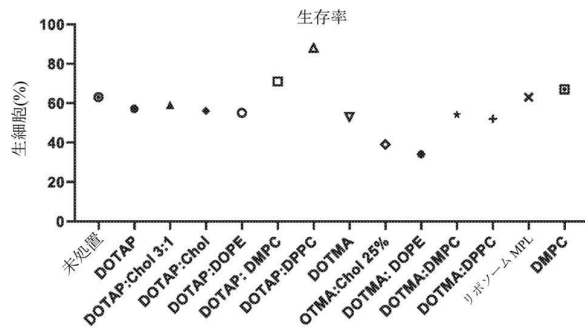
【図 2 5 A】



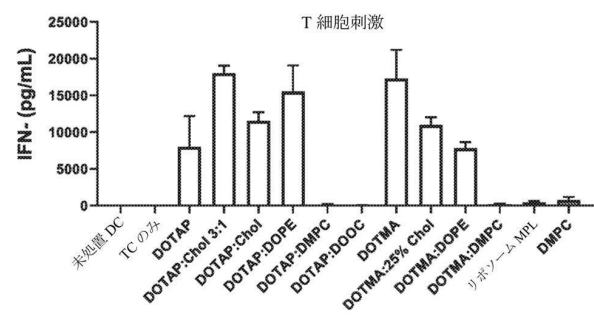
【図 2 5 B】



【図 2 5 C】



【図 2 5 D】



10

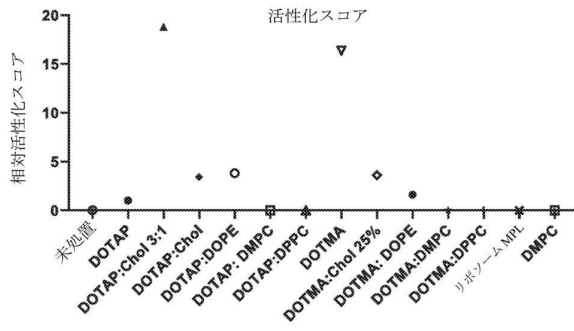
20

30

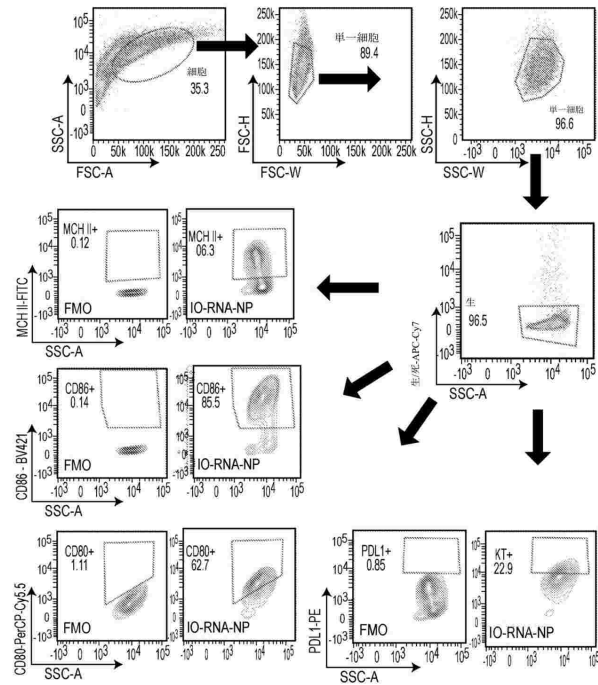
40

50

【図 2 5 E】



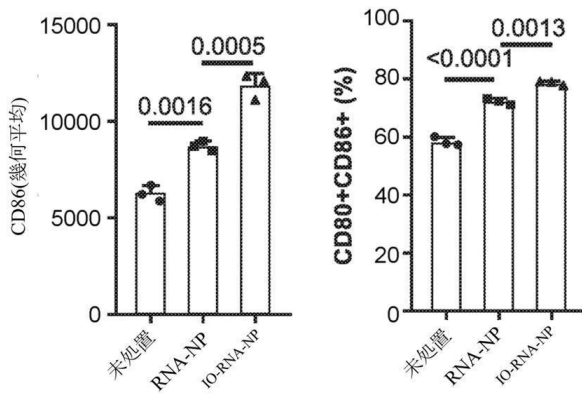
【図 2 6 A】



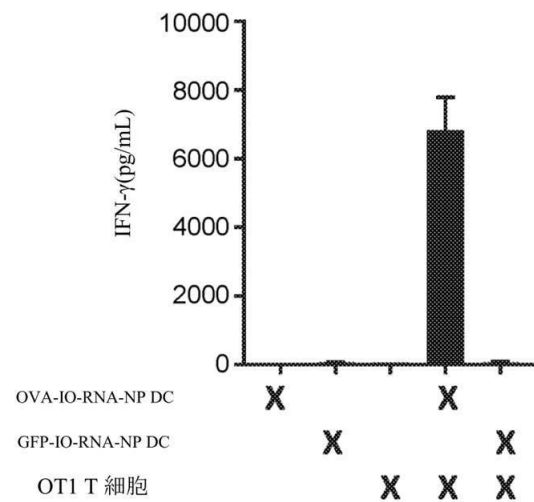
10

20

【図 2 6 B】



【図 2 6 C】

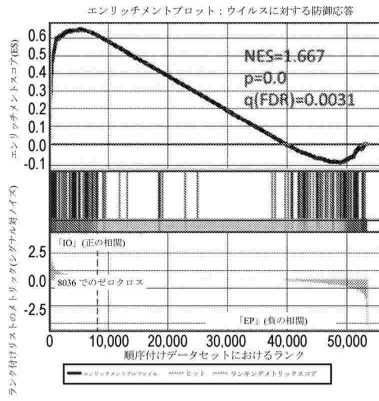


30

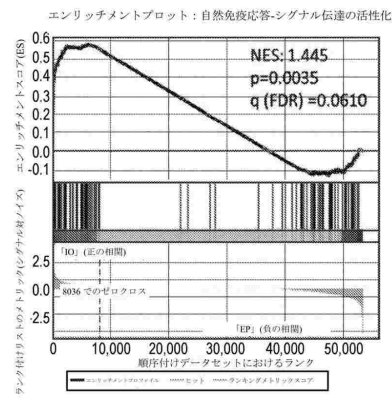
40

50

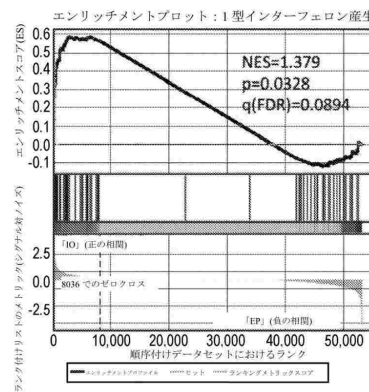
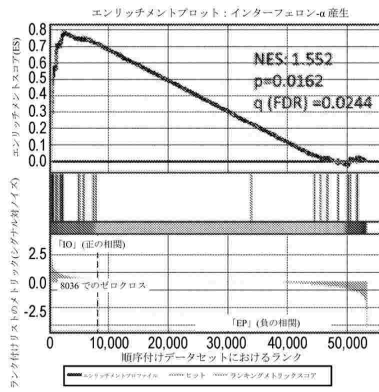
【図 27-1】



【図 27-2】

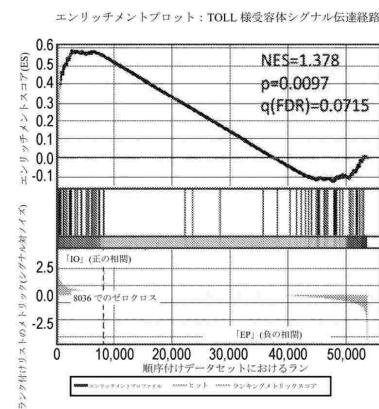


10

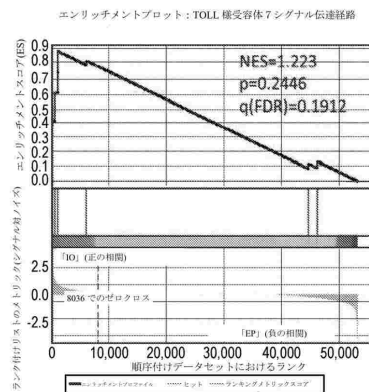


20

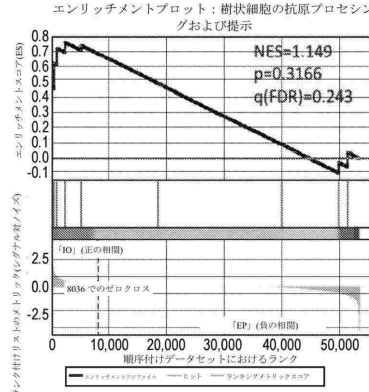
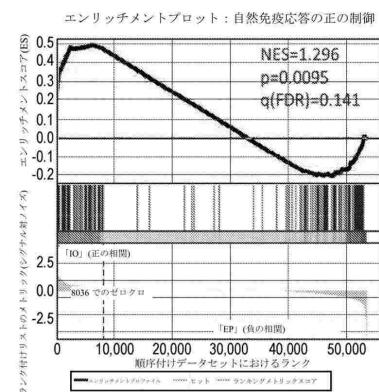
【図 27-3】



【図 27-4】



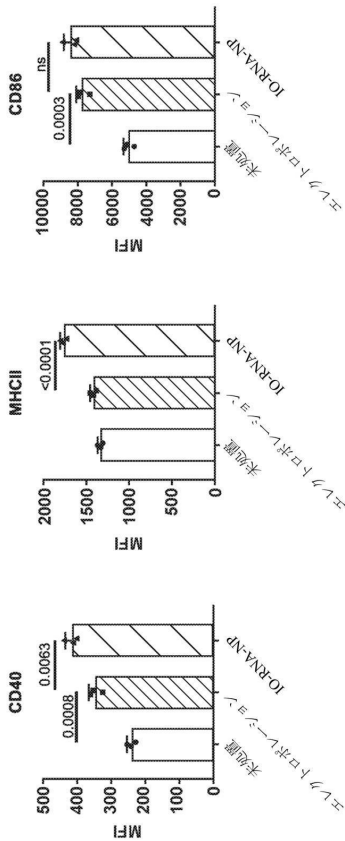
30



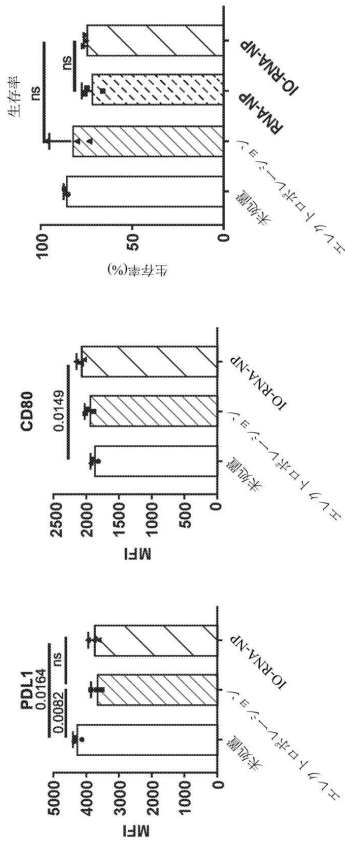
40

50

【図 2 8 A】



【図 2 8 B】



【図 2 9 A】

組成	GFP (%)	CD40+CD80+ CD86+ (%)	IFN-γ (pg/mL)	生存率 (%)	活性化 スコア	相対活性化 スコア
DOTAP	2.9	5.4	7971	57	27891	1.0
DOTAP:Chol (3:1)	5.8	21.6	18004	59	523963	18.8
DOTAP:Chol	3.8	9.8	11502	56	93794	3.4
DOTAP:DOPE	8.1	3.9	15502	55	105249	3.8
DOTAP:DMPC	0.1	4.9	120	71	17	0.0
DOTAP:DPPC	0.0	5.4	44	88	2	0.0
DOTMA	5.4	23.7	17268	53	458035	16.4
DOTMA:Chol (3:1)	5.9	15.2	10962	39	101083	3.6
DOTMA:DOPE	7.9	8.4	7805	34	45989	1.6
DOTMA:DMPC	0.0	5.1	184	54	5	0.0
DOTMA:DPPC	0.0	9.2	440	52	22	0.0
リポソーム MPL*	0.0	2.4	766	63	0	0.0
DMPC	0.0	1.6	38	67	0	0.0
未処置	0.0	2.7	98	63	0	0.0

【図 2 9 B】

酸化鉄 (ug:1mg 脂質)	サイズ(nm)	ゼータ電位(meV)
0	207.9 +/- 67.2	44.14 +/- 4.54
1	224.2 +/- 71.2	43.93 +/- 1.07
10	216.9 +/- 78.1	43.15 +/- 2.60
100	208.7 +/- 92.3	40.2 +/- 7.58

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K	47/18	(2017.01)	F I	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	49/06	(2006.01)		A 6 1 K	49/06	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)		A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)		A 6 1 P	35/04	
G 0 1 N	24/00	(2006.01)		G 0 1 N	24/00	1 0 0 B

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 グリビン、アダム、ジェイ、

アメリカ合衆国、3 2 6 0 8 フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト トゥウェンティーエ
イス テラス 3 9 1 9

(72)発明者 ミッチェル、デュアン

アメリカ合衆国、3 2 6 0 6 フロリダ州、ゲインズヴィル、ノースウェスト 1 3 8 テラス 2
9 6 1

(72)発明者 ドブソン、ジョン、ピー、

アメリカ合衆国、3 2 6 0 8 フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト フォーティーナイン
ス レーン 1 0 2 0 3

(72)発明者 セイヤー、イライアス

アメリカ合衆国、3 2 6 0 7 フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト フォーティーン
ス アヴェニュー 8 8 1 9

(72)発明者 モンサルヴェ、アダム

アメリカ合衆国、3 2 6 0 1 フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト セカンド アヴェニ
ュー 7 4 7、ユニバーシティ オブ フロリダ内

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 3 6 7 9 8 2 (US, A1)

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 8 2 6 2 7 (US, A1)

国際公開第 2 0 1 1 / 1 1 2 5 9 7 (WO, A1)

特表 2 0 0 9 - 5 1 2 7 1 2 (JP, A)

特表 2 0 0 0 - 5 1 6 6 3 0 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 4 9 / 0 0 - 4 9 / 2 2

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

G 0 1 R 3 3 / 5 6 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)