

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年6月20日(20.06.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/128201 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C07K 14/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01) C12N 15/11 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/044270

(22) 国際出願日: 2023年12月11日(11.12.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-198116 2022年12月12日(12.12.2022) JP

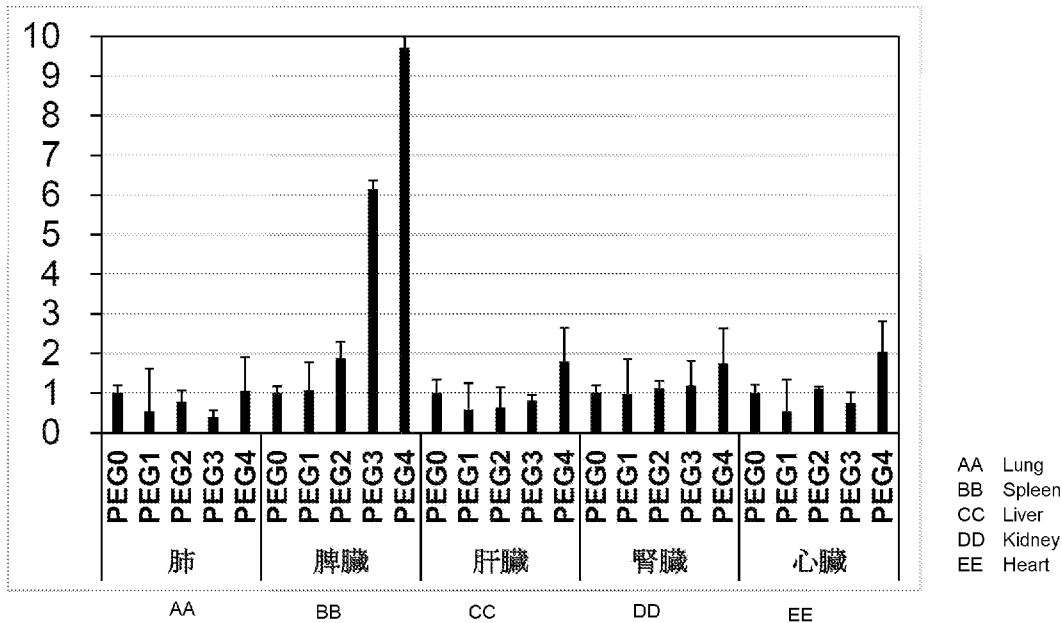
(71) 出願人: 京都府公立大学法人
(KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町4 6 5 Kyoto (JP). 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3 番 1 号 Tokyo (JP). 公益財団法人 川崎市産業振興財団 (KAWASAKI INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROMOTION) [JP/JP]; 〒2120013 神奈川県川崎市幸区堀川町6 6 番地2 0 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 内田 智士(UCHIDA Satoshi); 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町4 6 5 番地 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 鈴木 美紀(SUZUKI

(54) Title: MRNA VACCINE

(54) 発明の名称: mRNAワクチン

[図4]



(57) Abstract: Provided is an mRNA vaccine that includes mRNA encoding an antigen, at least one RNA oligomer hybridized to the mRNA, and a cationic polymer encapsulating the mRNA. The RNA oligomer includes (a) an RNA sequence comprising a sequence of 12-40 bases that are complementary to the mRNA sequence or (b) an RNA sequence that has at least 90% identity with a sequence of 12-40 bases that are complementary to the mRNA sequence and hybridizes to the mRNA. The RNA oligomer includes a polyethylene glycol modification. Through said configuration, the present

Miki); 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通
広小路上る梶井町4 6 5 番地 京都府公立大学
法人 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 宮田 完
二郎(MIYATA Kanjiro); 〒1138654 東京都文京
区本郷七丁目3 番 1 号 国立大学法人東京大
学内 Tokyo (JP). 山田 幸貴(YAMADA Kohki);
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3 番 1 号
国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). ヨム ジ
ョンミン(YUM Jongmin); 〒1138654 東京都文
京区本郷七丁目3 番 1 号 国立大学法人東京
大学内 Tokyo (JP). 内藤 瑞(NAITO Mitsuru);
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3 番 1 号
国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小 林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et
al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目
8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・
片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

invention provides a novel mRNA vaccine.

(57) 要約: ここでは、抗原をコードする mRNA と、当該 mRNA にハイブリダイズした少なくとも1
つの RNA オリゴマーと、前記 mRNA を内包するカチオン性ポリマーを含む mRNA ワクチンであ
って、RNA オリゴマーは、(a) mRNA の配列に相補的な12~40塩基の配列からなるRNA配
列、又は(b) mRNA の配列に相補的な12~40塩基の配列と90%以上の同一性を有し、かつm
RNA にハイブリダイズするRNA配列を含み、かつRNAオリゴマーはポリエレングリコール修飾を
含む、mRNA ワクチンが提供される。これにより、新たなmRNA ワクチンが提供される。

明 細 書

発明の名称： m R N A ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、m R N A ワクチンなどに関する。

背景技術

[0002] 病原体の病原性を弱めて用いる従来の生ワクチンは病原性の復帰により副作用が生じる恐れがある。また、病原体の病原性をなくして用いる従来の不活化ワクチンは感染細胞が出現しないため細胞性免疫を誘導しにくいという問題がある。

[0003] D N A ワクチン、m R N A ワクチンなどの核酸ワクチンでは、抗原タンパク質を提示するために核酸を用いる。すなわち、核酸ワクチンは、投与した核酸を抗原提示細胞の核内又は細胞質に移行させて抗原タンパク質を発現させ、抗原タンパク質を提示させることによって免疫を誘導する。核酸ワクチンは、病原性の復帰の問題がないため生ワクチンと比較して安全性が高いと考えられている。また、核酸ワクチンでは抗原提示細胞の細胞質内で抗原タンパク質を産生するため細胞性免疫を誘導することが可能であり、このため、核酸ワクチンは、がんや慢性感染症への展開が可能である。さらに、核酸ワクチンでは配列を変えるだけで比較的自由的な核酸の設計が可能であり、このため、核酸ワクチンには、がんの個別化治療に用いることができること、ウイルス変異にも迅速に対応可能あることからパンデミックへの素早い対応が可能であること、などの利点もある。

[0004] このうちD N A ワクチンでは、ホストゲノムへのランダムな挿入による変異誘発のリスクがあると考えられている。その一方で、抗原タンパク質を提示するためにm R N A を用いるm R N A ワクチンは、ホストゲノムへの変異誘発のリスクがないと考えられており、近年注目を集められている。

[0005] m R N A ワクチンでは、脂質性m R N A 送達キャリアが主に用いられてい

る（非特許文献1：Nature（2016）534，p. 396－401）。脂質性mRNA送達キャリアにおいて、カチオン性脂質やpH応答性脂質が強い免疫賦活化作用を有し、非特異的炎症が生じる可能性があることが知られている。また、脂質性粒子は強い肝臓への指向性を有し、肝臓にて抗原を発現させる可能性がある。さらに、脂質代謝産物の体内への蓄積も懸念される。

[0006] 脂質性mRNA送達キャリアに代えてmRNA送達キャリアとしてカチオン性ポリマーを用いることも考えられるが、高分子と核酸の複合体は、血液中で血小板等と結合し、数 μ m以上の凝集体を形成することが知られている（非特許文献2：J. Control. Release（2011）151，p. 104－0109）。このように大きな凝集体は、肺等の毛細血管を閉塞する恐れがある。

[0007] ここで、特許文献1（国際公開第2018／124181号）には、mRNAと、mRNAにハイブリダイズした少なくとも1つのRNAオリゴマーとを含む二本鎖RNAを含む、機能化mRNAが記載されており、この機能化mRNAを用いたmRNAワクチンも記載されている。

[0008] また、非特許文献3および4（Biomaterials 197 255－267 2019、Advanced Healthcare Materials 11 2102016 2022）には、mRNA機能化によるmRNAの生体内導入効率の向上が記載されている。非特許文献5（Biomaterials 150 162－170 2018）には、mRNA機能化によるmRNAワクチンへの応用が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2018／124181号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Nature（2016）534，p. 396－401

非特許文献2：J. Control. Release（2011）151，p.

104-0109

非特許文献3: Biomaterials 197 255-267 2019

非特許文献4: Advanced Healthcare Materials 11 2102016 2022

非特許文献5: Biomaterials 150 162-170 2018

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] このような状況のもと、新たなmRNAワクチンが求められていた。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、抗原をコードするmRNAと、当該mRNAにハイブリダイズした少なくとも1つのRNAオリゴマーと、前記mRNAを内包するカチオン性ポリマーを含み、前記少なくとも1つのRNAオリゴマーがポリエチレングリコール修飾されているmRNAワクチンが、mRNAワクチンとして有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] ここでは、以下のmRNAワクチン等が提供される。

[1] 抗原をコードするmRNAと、当該mRNAにハイブリダイズした少なくとも1つのRNAオリゴマーと、前記mRNAを内包するカチオン性ポリマーを含むmRNAワクチンであって、

RNAオリゴマーは、

(a) mRNAの配列に相補的な12～40塩基の配列からなるRNA配列、又は

(b) mRNAの配列に相補的な12～40塩基の配列と90%以上の同一性を有し、かつmRNAにハイブリダイズするRNA配列

を含み、かつRNAオリゴマーはポリエチレングリコール修飾を含む、mRNAワクチン。

[2] 前記RNA配列が15～23塩基の配列からなる、上記[1]に記

載のmRNAワクチン。

[2a] 前記RNA配列が12～30塩基の配列からなる、上記[1]に記載のmRNAワクチン。

[3] 前記RNA配列が17塩基の配列からなる、上記[1]に記載のmRNAワクチン。

[4] 前記ポリエングリコール修飾は、オーバーハング配列を介さずにRNAオリゴマーの配列の5'末端又は3'末端になされたものである、上記[1]～[3]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、1つ又は2つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5a] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、1～7つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5b] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、1～4つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5c] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、1～3つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5d] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、4つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5e] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、3つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

[5f] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、2つのRNAオリゴマーである、上記[1]～[4]のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

。

〔6〕 前記ポリエレングリコールが、重量平均分子量1,000～3,000の直鎖状ポリエレングリコールである、上記〔1〕～〔5f〕のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

〔6a〕 前記ポリエレングリコールが、重量平均分子量1,000～80,000の直鎖状ポリエレングリコールである、上記〔1〕～〔5f〕のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

〔6b〕 前記ポリエレングリコールが、重量平均分子量1,000～20,000の直鎖状ポリエレングリコールである、上記〔1〕～〔5f〕のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

〔6c〕 前記カチオン性ポリマーが、直鎖状もしくは分枝状ポリエチレンジイミン、ポリリジン、ポリアルギニン、キトサン誘導体、ポリメタクリル酸誘導体、側鎖にカチオン性残基を有するポリアミノ酸誘導体、ポリエーテル誘導体両親媒性ポリアミノ酸誘導体、両親媒性ポリアミノ酸と親水性ポリマーとのブロックコポリマーから選択される、上記〔1〕～〔6b〕のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

〔7〕 疾患の予防又は治療を必要とする対象において当該疾患の予防又は治療に用いるための、上記〔1〕～〔6c〕のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。

発明の効果

〔0014〕 ここでは、新たなmRNAワクチンが提供される。当該mRNAワクチンは、好ましくは、以下の少なくとも1つの特徴を有する。

- ーカチオン性ポリマーの免疫原性が低い。
- ーカチオン性ポリマーに生分解性を付与できる。
- ー肝臓への集積の恐れが少ない。
- ー肺血管を閉塞される恐れが少ない。
- ー脾臓へ効果的にmRNAを送達することが可能である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]高分子ナノ粒子を樹状細胞株（DC2.4）へ導入し、ルシフェラーゼ発現量を確認した結果を示す図である。

[図2]高分子ナノ粒子を用いた無細胞翻訳試験の結果を示す図である。

[図3]高分子ナノ粒子をマウスに投与し、各組織（脾臓、右肺、左肺および肝臓）でのルシフェラーゼ発現量を確認した結果を示す図である。

[図4]高分子ナノ粒子（ポリアスパルタミド）をマウスに投与し、各組織（脾臓、肺および肝臓）でのルシフェラーゼ発現量を確認した結果を示す図である。ルシフェラーゼ発現量は、PEG0に対する相対ルシフェラーゼ発現量で示している。

[図5]高分子ナノ粒子をマウスに投与し、血管および肺血管への影響を確認した結果を示す図である。試料投与後40秒、2分および5分後の血管の蛍光画像および肺切片の蛍光画像を示した。

[図6]高分子ナノ粒子をマウスに投与し、肺の炎症反応を確認した結果を示す図である。

[図7]モデル抗原（OVA）を発現するmRNAを搭載した高分子ナノ粒子をマウスに投与した際のワクチン効果を示す図である。投与から細胞数定量までの手順（左図）、及びワクチンを受けたマウスの脾細胞の中で、抗原（OVA）と反応するIFN- γ 産生細胞数（右図）。

[図8]毒性試験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明するが、以下の実施の形態は本発明を説明するための例示であり、本発明はその要旨を逸脱しない限りさまざまな形態で実施することができる。また、本明細書において引用した全ての刊行物、例えば、先行技術文献及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、その全体が本明細書において参照として組み込まれる。

ここでは、例えば、以下のmRNAワクチンが提供され得る。

抗原をコードする mRNA と、当該 mRNA にハイブリダイズした少なくとも 1 つの RNA オリゴマーと、前記 mRNA を内包するカチオン性ポリマーを含む mRNA ワクチンであって、

RNA オリゴマーは、

(a) mRNA の配列に相補的な 12 ～ 40 塩基の配列からなる RNA 配列、又は

(b) mRNA の配列に相補的な 12 ～ 40 塩基の配列と 90 % 以上の同一性を有し、かつ mRNA にハイブリダイズする RNA 配列

を含み、かつ RNA オリゴマーはポリエングリコール修飾を含む、mRNA ワクチン。

[0017] 1. mRNA

mRNA は、メッセンジャー RNA を意味し、通常、5' 非翻訳領域 (5' UTR) とコード領域と 3' 非翻訳領域 (3' UTR) とを含む。mRNA は、さらに、通常、5' 末端のキャップ構造 (5' Cap) と 3' 末端の poly A 配列を含む。

mRNA ワクチンに用いる mRNA は、次のいずれかのものであってよい。

[0018] (1) 5' Cap、5' UTR、コード領域、3' UTR、及び poly A をこの順に含む mRNA。

(2) 5' Cap、5' UTR、コード領域、及び poly A をこの順に含む mRNA。

(3) 5' UTR、コード領域、3' UTR、及び poly A をこの順に含む mRNA。

(4) 5' UTR、コード領域、及び poly A をこの順に含む mRNA。

[0019] mRNA ワクチンに用いる mRNA は、公知の方法により、目的タンパク質をコードするテンプレート DNA を *in vitro* 環境下で転写するこ

とで作製することができる。例えば、Blood 108 (13) (2006) 4009-17に記載の方法に従って、作製することができる。具体的には、目的タンパク質のコード配列の下流にpoly A/T鎖が組み込まれた鋳型DNAをpoly A/T鎖のすぐ下流で切断し、翻訳酵素、ヌクレオシド、5' キャップアナログを含むバッファー溶液中にてin vitro転写を行い、その後、mRNAを精製することで作製する。

[0020] mRNAのコード領域によってコードされる目的蛋白質、すなわち抗原としては、免疫応答を誘発するのに好適な公知の抗原から任意に選択することができる。抗原としては、より具体的には、腫瘍抗原、ウイルス由来抗原、細菌由来抗原、真菌由来抗原、原生生物由来抗原、動物由来抗原、植物由来抗原、自己免疫疾患の自己抗原などが挙げられる。mRNAにコードされる抗原は、1つの抗原であってもよいし、あるいは、2つ以上（例えば、2つ、3つ、4つ又は5つ以上）の同一又は異なる抗原であってもよい。いくつかの態様では、mRNAのコードされる抗原は、1つの抗原である。

[0021] mRNAのpoly A配列の長さは、例えば、10～500塩基であり、好ましくは、30～300塩基であり、より好ましくは、60～250塩基である。

[0022] mRNAの5' UTRと3' UTRの配列は、天然に生じる配列と100%の配列同一性を有するものとしてよく、あるいは、部分的又はその全体を他の5' UTR及び／又は3' UTRの配列と置換してもよい。他の5' UTR及び／又は3' UTRの配列としては、例えば、グロビン、hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 4、又はアルブミンをコードするmRNAの5' UTR及び／又は3' UTRの配列が挙げられる。

[0023] いくつかの態様では、mRNAは修飾されていない。この場合、mRNA自体は天然のものであるため翻訳の過程はほとんど障害されないことが期待できる。

[0024] 別のいくつかの態様では、mRNAをさらに安定化させるためにmRNA

は修飾されている。mRNAの修飾としては、mRNAの塩基の化学修飾、mRNAのコード領域のG/C含量の修飾、mRNAのCap構造の修飾などが挙げられる。

[0025] mRNAの塩基の化学修飾は、例えば、mRNAの酵素耐性を向上させることが知られているものである。そのようなmRNA自体の化学修飾塩基は、例えば、メチル化塩基（例えば、5-メチルシトシン）、硫黄修飾塩基（例えば、2-チオウリジン）、シュドウリジン、N1メチルシュドウリジン及び5-メトキシウリジンが挙げられる。

[0026] mRNAのコード領域のG/C含量の修飾は、G（グアニン）/C（シトシン）の含有量が多くなるように修飾することであり、これにより、より安定なmRNAとすることができる。

[0027] mRNAのCap構造の修飾は、5'側の1番目もしくは2番目のリボースの2位をメトキシ基とすることであり、これにより、発現効率が向上することも知られている。

[0028] mRNAの修飾は、公知の方法又はそれに準ずる方法により行うことができる。

[0029] 2. RNAオリゴマー

mRNAには、少なくとも1つのRNAオリゴマーがハイブリダイズしている。また、当該RNAオリゴマーは、ポリエチレングリコール修飾を含むものである。

すなわち、RNAオリゴマーは、例えば、

(a) mRNAの配列に相補的な12~40塩基の配列からなるRNA配列、又は

(b) mRNAの配列に相補的な12~40塩基の配列と90%以上の同一性を有し、かつmRNAにハイブリダイズするRNA配列

を含み、かつRNAオリゴマーはポリエチレングリコール修飾を含むものである。

- [0030] 「９０％以上の同一性を有するRNA配列」における「９０％以上」の範囲は、例えば、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．１％以上、９９．２％以上、９９．３％以上、９９．４％以上、９９．５％以上、９９．６％以上、９９．７％以上、９９．８％以上、又は９９．９％以上である。上記同一性の数値は、一般的に大きいほど好ましい。なお、RNA配列の同一性は、BLAST（例えば、Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol. 215, 403 (1990) 参照）等の解析プログラムを用いて決定できる。BLASTを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。
- [0031] 「mRNAにハイブリダイズする」とは、後述のハイブリダイズ条件で、RNAオリゴマーがmRNAにハイブリダイズすることを意味する。
- [0032] RNAオリゴマーは、mRNAの連続する１２～４０塩基の配列にハイブリダイズするように設計されている。いくつかの態様では、RNAオリゴマーのmRNAの配列に相補的な配列は、mRNAの配列に相補的な１２～３０塩基の配列からなる。より好ましくは、RNAオリゴマーのmRNAの配列に相補的な配列は、mRNAの配列に相補的な１５～２３塩基の配列からなるものである。さらに好ましくは、RNAオリゴマーのmRNAの配列に相補的な配列は、mRNAの配列に相補的な１７塩基の配列からなるものである。
- [0033] RNAオリゴマーをハイブリダイズさせるmRNA中の位置は、５' UTR、コード領域、３' UTR、及びpoly A配列のいずれの位置でもよい。RNAオリゴマーは、mRNAの２次構造を予測し、mRNA鎖が２次構造を持たない部分に対してハイブリダイズするようにRNAオリゴマーを設計するのが望ましい。すなわち、RNAオリゴマーは、mRNA全配列のうち２次構造を持たない部分に対してハイブリダイズするように設計するのが好ましい。mRNAの２次構造を予測するソフトウェアとしては、例えば、後述の実施例に記載のものが挙げられる。

- [0034] いくつかの態様では、RNAオリゴマーは、mRNAの、5' UTR、コード領域、および3' UTRの配列の少なくとも1つの領域、例えば、コード領域にハイブリダイズするように設計する。
- [0035] RNAオリゴマーのポリエングリコール修飾は、オーバーハング配列を介さずに行ってもよく、あるいは、オーバーハング配列を介して行ってもよい。ここで、「オーバーハング配列」は、mRNAにハイブリダイズしない配列である。
- [0036] ポリエングリコール修飾は、オーバーハング配列を介さずに行う場合、RNAオリゴマーは、好ましくは、前記(a)又は(b)のRNA配列のみからなる。この場合、ポリエングリコール修飾は、RNAオリゴマーの配列の例えば5'末端又は3'末端に行う。
- [0037] 一方、ポリエングリコール修飾は、オーバーハング配列を介して行う場合、RNAオリゴマーは、好ましくは、前記(a)又は(b)のRNA配列とオーバーハング配列からなる。この場合、ポリエングリコール修飾は、RNAオリゴマーの前記(a)又は(b)のRNA配列の5'末端又は3'末端に、例えば、1～5塩基のオーバーハング配列を介して行う。
- [0038] RNAオリゴマーに関して、オーバーハング配列を介して前記(a)又は(b)のRNA配列の5'末端及び3'末端のどちらの末端をポリエングリコール修飾してもよい。
- [0039] ここで、カチオン性ポリマーと核酸の複合体は、血液中で大きな凝集体を形成し、肺血管を閉塞させる恐れがある。ワクチンでは、全身投与により脾臓を標的化することで高い効果が期待できるところ、複合体が肺移行すると、複合体の脾臓への送達が妨げられる可能性がある。ここで提供されるmRNAワクチンは、RNAオリゴマーのポリエングリコール修飾により、凝集体の形成を抑えて肺移行を最小限に抑え、ワクチンに必要な脾臓への送達が可能となる。
- [0040] また、ポリエチングリコール(PEG)による修飾を行うと、mRNA輸送担体にmRNAを搭載した際、輸送担体がポリエチングリコール鎖に

より覆われ、そのステルス性により安定化されることに加え、ポリエチレングリコール鎖のシールディング効果により表面電位が減少し、カチオン性タンパク質である分解酵素からの認識を抑えることができる。その結果、mRNAの酵素分解を防ぐことができることが期待できる。

[0041] ポリエチレングリコールによる修飾は、公知の方法又はそれに準ずる方法にて行うことができる。例えば、5'末端アミノ化RNAオリゴマーを、NHS活性化エステル-PEG（例えば、SUNBRIGHT（登録商標）CS, GS, AS, PS, HS及びTS Series（NHS active esters/carbonate）, YUKA SANGYO CO., LTD）と反応させることで、PEG化RNAオリゴマーを得ることができる。あるいは、ポリエチレングリコールによる修飾は、例えば、文献M. Oishi, et al., ChemBioChem 6 (4), 2005, 718-725に記載の方法又はそれに準ずる方法にて行うこともできる。より具体的には、DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER（GLENRESEARCH）などの開始剤を用いてRNAオリゴマーを合成し、脱保護することで5'末端アミノ化RNAオリゴマーを得る。この5'末端アミノ化RNAオリゴと例えばPEG-N-hydroxysuccinimideと反応させることでPEG化RNAオリゴマーを得ることができる。用いるポリエチレングリコールとしては、例えば、重量平均分子量1,000~80,000、好ましくは、重量平均分子量1,000~20,000、より好ましくは、重量平均分子量1,000~3,000、特に好ましくは、重量平均分子量1,000~2,0000の直鎖状のPEGや、同分子量の2分岐型、4分岐型、8分岐型などの分岐状のPEGなどが挙げられる。

あるいは、用いるポリエチレングリコールとしては、例えば、重量平均分子量1,000~80,000、好ましくは、重量平均分子量1,000~20,000、より好ましくは、重量平均分子量1,000~15,000の直鎖状のPEGや、同分子量の2分岐型、4分岐型、8分岐型などの分

岐状のPEGなどが挙げられる。

あるいは、用いるポリエチレングリコールとしては、例えば、重量平均分子量1,000～80,000、好ましくは、重量平均分子量8,000～20,000、より好ましくは、重量平均分子量10,000～15,000の直鎖状のPEGや、同分子量の2分岐型、4分岐型、8分岐型などの分岐状のPEGなどが挙げられる。

[0042] 1つのmRNAにハイブリダイズさせるポリエチレングリコール修飾RNAオリゴマーの数は、少なくとも1つであり、好ましくは1～5個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは、1～2個であり、特に好ましくは、2個である。

あるいは、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、少なくとも1つであり、好ましくは1～7個であり、より好ましくは1～4個である。

別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、4個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、3個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、2個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、1個である。

[0043] ここで、1つのmRNAにハイブリダイズさせるポリエチレングリコール修飾RNAオリゴマーの数、用いるポリエチレングリコールの重量平均分子量などを制御することにより、mRNAワクチンの脾臓選択性をある程度制御することも可能である。具体的には、図1に示したように、用いるポリエチレングリコールの重量平均分子量12kのPEGではmRNAからのタンパク質翻訳活性がやや低下する傾向にある。一方で2kのPEGでは、翻訳活性ある程度保たれる。すなわち、PEG鎖長が長くなればなるほどmRNA

からのタンパク質翻訳活性が低下し、PEG鎖長が短くなると（例えば、2 k）翻訳活性が高く保たれる傾向にあるので、用いるポリエチレングリコールの重量平均分子量を適切に調整することで、翻訳活性を適当に維持することができる。また、図3に示したように、mRNAの肺への送達を抑制しながら、脾臓へ効率的に送達するためのPEGの本数の最適値は、PEGの鎖長により異なる。例えば、PEG 2 kの時は、2本や4本が好ましく、一方で、PEG 12 kの時は、1本が好ましい（図3）。また、PEG 2 kで、2本や4本の時は肺血管の閉塞もない（図5）。さらに、1つのmRNAにハイブリダイズさせるポリエチレングリコール修飾RNAオリゴマーの数に関して、2本の場合は（すなわち、PEG 2の場合は）、0本の場合（PEG 0）に迫るワクチン効果を示している（図7）。このように、mRNA複合体の肺血管閉塞を抑制しながら、ワクチン効果を得るための最適値を見出すことも可能である。

[0044] 複数のポリエチレングリコール修飾RNAオリゴマーをmRNAにハイブリダイズさせる場合、いくつかの態様では、それぞれのポリエチレングリコール修飾RNAオリゴマーがmRNA上で重ならないようにRNAオリゴマーを設計する。

[0045] 3. 二本鎖RNA

二本鎖RNAは、mRNAとRNAオリゴマーのハイブリダイゼーションにより調製することができる。ハイブリダイゼーションは、より具体的には、後述の実施例に記載の条件又はそれに準ずる条件にて行うことができる。

1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、少なくとも1つであり、好ましくは1～5個であり、より好ましくは1～3個であり、さらに好ましくは、1～2個であり、特に好ましくは、2個である。

あるいは、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、少なくとも1つであり、好ましくは1～7個であり、より好ましくは1～4個である。

別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、4個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、3個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、2個である。

また、別の態様では、1つのmRNAにハイブリダイズさせるRNAオリゴマーの数は、1個である。

[0046] RNAオリゴマーのmRNAへのハイブリダイズは、公知の方法及び条件により行うことができる。ハイブリダイズでは、加温して、一定時間静置したのち、徐々に温度を低下させる。加温は、mRNAやオリゴマーの分子内、分子間にあらかじめ存在する相補的結合を解くことで、mRNAとオリゴマーをより効率的に結合させることを目的として行う。適切なハイブリダイズが保証されるならば、その温度時間は適宜調整可能である。温度低下は緩やかな方がハイブリダイズの特異性が増す。また、オリゴマー鎖長は、ハイブリダイズの条件設定に大きく影響しない。ハイブリダイズ効率を評価しながら、適宜条件を設定すべきである。例えば、後述の実施例に記載の方法及び条件が挙げられる。

[0047] いくつかの態様では、二本鎖RNAは、RNAオリゴマーの5'末端のトリリン酸構造を有する。RNAオリゴマーの5'末端のトリリン酸構造を有するものとすることで、より強い炎症反応を惹起することができる。

別のいくつかの態様では、二本鎖RNAは、RNAオリゴマーの5'末端のトリリン酸構造を有さない。トリリン酸化を除く方法は、公知の方法又はそれに準ずる方法で行うことができる。トリリン酸化を除く方法としては、例えば、Antarctic phosphatase (New England Biolabs, cat. no. M0289S) を用いる方法が挙げられる。

[0048] 二本鎖RNAは、例えば、輸送担体に内包される形態である。輸送担体は

、二本鎖mRNAを内包して、対象の体内の好適な箇所に送達することができるものである。輸送担体は、具体的には、カチオン性ポリマーである。脂質性mRNA送達キャリアに代えてmRNA送達キャリアとしてカチオン性ポリマーを用いることで、免疫原性の軽減や、肝臓への集積の抑制が期待される。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、生分解性であり、別のいくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、非生分解性である。

[0049] カチオン性ポリマーは、mRNA送達キャリアとして用いることができる限り特に限定されないが、例えば、直鎖状もしくは分枝状ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリアルギニン、キトサン誘導体、ポリメタクリル酸誘導体、側鎖にカチオン性残基を有するポリアミノ酸誘導体、ポリエーテル誘導体などが挙げられる。

あるいは、カチオン性ポリマーは、mRNA送達キャリアとして用いることができる限り特に限定されないが、例えば、直鎖状もしくは分枝状ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリアルギニン、キトサン誘導体、ポリメタクリル酸誘導体、側鎖にカチオン性残基を有するポリアミノ酸誘導体、ポリエーテル誘導体、両親媒性ポリアミノ酸誘導体、両親媒性ポリアミノ酸と親水性ポリマーとのブロックコポリマーなどが挙げられる。

より具体的には、カチオン性ポリマーとしては、例えば、リニアポリエチレンイミン、両親媒性ポリアスパルタミドなどが挙げられる。両親媒性ポリアミノ酸誘導体および両親媒性ポリアミノ酸と親水性ポリマーとのブロックコポリマーとしては、例えば、国際公開第2020/067142号に記載されているものが挙げられ、これを用いることができる。

[0050] これらの輸送担体は、公知の方法又はそれに準ずる方法にて調製することができる。

[0051] 4. アジュバント

いくつかの好ましい態様では、RNAワクチンは、アジュバントと共に用いない。

別のいくつかの態様では、RNAワクチンは、アジュバントと共に用いる。アジュバントと共に用いる場合、RNAワクチンは、アジュバントと共に製剤化されてもよい。アジュバントは、免疫反応を増強するのに好適な任意の化合物である。そのようなアジュバントは公知であり、当業者であれば、任意のアジュバントの中から適切なものを選択することができる。

[0052] 5. 疾患の予防又は治療

mRNAワクチンは、疾患の予防又は治療を必要とする対象において当該疾患の予防又は治療に用いることができる。

[0053] 予防又は治療する疾患は、例えば、がん、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌感染症、原生生物感染症、及び自己免疫疾患を挙げることができる。前述のmRNAのコード領域がコードする抗原を、予防又は治療する疾患に応じて適切に選択することで、当該疾患を予防又は治療することができる。

[0054] 「対象」は、ヒト、又はヒト以外の生物、例えば、トリ及び非ヒト哺乳動物（例えば、ウシ、サル、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、イヌ、ウサギ、ヒツジ、及びウマ）である。

[0055] mRNAワクチンは、常法に従って製剤化することができる。いくつかの態様では、mRNAワクチンは、医薬的に許容される添加剤を含む。医薬的に許容される添加剤としては、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬的に許容される界面活性剤等が挙げられる。

[0056] 上記添加剤は、mRNAワクチンの剤形に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された二本鎖RNAを溶剤（例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等）に溶解し、これにTween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えばマンニトール、ブドウ糖、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール等の糖類、トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモまたは他の植物由来のデンプン等のデンプン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース、アラビアゴム、トラガカントゴム等のゴム、ゼラチン、コラーゲン等などが挙げられる。

[0057] mRNAワクチンの投与量は、対象の年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤形などによって適宜選択することができる。mRNAワクチンの有効投与量は、疾患の兆候又は状態を軽減するワクチンの量である。このようなmRNAワクチンの治療効果及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順、例えば、ED50（集団の50%において治療的に有効な用量）、及びLD50（集団の50%に対して致死性である用量）によって決定することができる。いくつかの態様では、mRNAワクチンの投与量は、成人に対して、1日当たり10ng～1g、100ng～100mg、1μg～10μg、又は30μg～300μgのmRNAの範囲とする。

[0058] mRNAワクチンの投与経路は適切に選択することができ、例えば、経皮、鼻腔内、経気管支、経肺、筋内、腹腔内、静脈内、皮内、皮下、直腸内、及び膣内の経路を含むが、これらの経路に限定されるものではない。

[0059] mRNAワクチンの投与回数は、1回、又は副作用が臨床上許容される範囲内である限り複数回とすることができる。

[0060] いくつかの態様では、mRNAワクチン投与における抗体価又は細胞性免疫活性を測定する。例えば、抗体価は、生体より血液を採取し、血清中のI

g Gを定量することにより評価できる。細胞性免疫活性は、生体よりリンパ球を分離及び培養し、 ^3H -チミジンの取り込みを測定することにより評価できる。

[0061] 6. キット

ここで提供されるキットは、前記mRNAワクチンを含むことを特徴とするものである。当該キットは、例えば、前記RNAワクチンを用いた前記各種疾患の治療方法に好ましく用いることができる。

[0062] キットにおいて、前記mRNAワクチンの保存状態は、限定はされず、その安定性（保存性）及び使用容易性等を考慮して溶液状又は粉末状等の状態を選択できる。

キットは、前記mRNAワクチン以外に、他の構成要素を含んでいてもよい。他の構成要素としては、例えば、各種バッファー及び使用説明書（使用マニュアル）を挙げることができる。キットには、アジュバントを含めてもよいし、含めなくてもよい。好ましくは、キットは、アジュバントを含めない。

[0063] 以下の実施例により本発明を更に詳述するが、本発明はこれら実施例に限定して理解されるべきものではない。

実施例

[0064] 実施例1：mRNAの体内分布

1. 1 ポリエチレングリコール（PEG）化mRNAの作製

mRNAは、Trilink製社よりfLuc mRNA（CleanCap（登録商標） fLuc mRNA-（L-7602））を購入して使用した（fLuc mRNAのコード配列：https://www.trilinkbiotech.com/media/folio3/productattachments/product_insert/fluc

__o r f__c a t n o__l-7202__l-7602__l-7702__1
. t x t)。

f L u c m R N A (T r i l i n k) を使用して P E G 化 m R N A を、
以下のように作製した。RNA 2 次構造予測ソフトウェア ([http://
rtips.dna.bio.keio.ac.jp/ipknot/](http://rtips.dna.bio.keio.ac.jp/ipknot/)) に
て、f L u c m R N A の 2 次構造を予測し、RNA 鎖が 2 次構造を持たな
い部分に対して RNA オリゴマーを設計した。RNA オリゴマーは、5' 末
端の P E G 修飾を含めて、ジーンデザイン社にて、依頼合成した。ここで、
重量平均分子量 2, 0 0 0 または 1 2, 0 0 0 0 の直鎖 P E G を用いた。そ
して、以下の 5' 末端 P E G 修飾 RNA オリゴマーをジーンデザイン社より
購入した。重量平均分子量 2, 0 0 0 の直鎖 P E G 修飾も、重量平均分子量
1 2, 0 0 0 0 の直鎖 P E G 修飾も、同じ配列の RNA オリゴマーに対して
行われた。これらの RNA オリゴマーは、m R N A のコード領域にハイブリ
ダイズする。

[0065] 配列 p 1 (配列番号 1) : G G G G C C C U U C U U G A U G U

配列 p 2 (配列番号 2) : U C G U U G U A G A U G U C G U U

配列 p 3 (配列番号 3) : C A C G U U C A G G A U C U U C U

配列 p 4 (配列番号 4) : A U G G C G G U G U C G G G G A U

配列 p 5 (配列番号 5) : G G G U G C U C U U G G C G A A G

配列 p 6 (配列番号 6) : U U G U C G U C G C C C U C G G G

配列 p 7 (配列番号 7) : U A C U U G A U C A G G C U C U U

[0066] m R N A に対して 1 当量の RNA オリゴマーを加え、6 5 ° C で 5 分加熱し
、1 0 分かけて 3 0 ° C まで冷却することで、ハイブリダイゼーションを行っ
た。これにより、P E G 化 m R N A を作製した。

[0067] 以下の実施例では、RNA オリゴマーの本数 1、2、3、4 および 7 の P
E G 化 m R N A (それぞれ、P E G 1、P E G 2、P E G 3、P E G 4 およ
び P E G 7) ために、以下の配列の RNA オリゴマーを用いた。

PEG 1 : 配列 p 4

PEG 2 : 配列 p 2 , p 6

PEG 3 : 配列 p 1 , p 4 , p 7

PEG 4 : 配列 p 1 , p 3 , p 5 , p 7

PEG 7 : 配列 p 1 ~ p 7

尚、RNAオリゴマーの本数0本のPEG化mRNA (PEG 0) は、ハイブリダイゼーションを行っていない。

[0068] 1. 2 高分子ナノ粒子の調製

高分子ナノ粒子を、PEG化mRNAとポリカチオンを混合することにより調製した。具体的には、ポリカチオンとして、リニアポリエチレンジイミン (LPEI) (製品名: *in vivo jetPEI*, PolyPlus社) またはアスパラギン酸の側鎖にジエチルトリアミンまたはシクロヘキシルエチルを付加したポリアスパライド (国際公開第2020/067142号に開示された方法に従い、PA sp (DET/CHE) 重合度26を製造した) を用いた。具体的には、ポリカチオン中のアミノ基の数 (N) と mRNA 中のリン酸基数 (P) の比 (N/P比) が4となるように混合して高分子ナノ粒子を調製した。

[0069] 1. 3 高分子ナノ粒子の調製時の物性

LPEIを用いた高分子ナノ粒子の調製時の物性を測定した。具体的には、高分子ナノ粒子を限界ろ過することで、塩濃度を20 mM以下にして、メビウス (Waters社) を用いて、動的光散乱法及び位相分析光散乱により、粒径及びゼータ電位を計測した。

その結果を、表1に粒径及び表2にゼータ電位を示す。

[0070]

[表1]

表 1. 粒径

PEGの本数 (mRNA 1本あたり)	粒径 (d, nm)	
	PEG2000	PEG12000
0	111.2	
1	100.8	98.8
2	102.3	97.2
4	100.6	99.2
7	110.4	91.2

[0071] [表2]

表 2. ゼータ電位

PEGの本数 (mRNA 1本あたり)	ゼータ電位 (mV)	
	PEG2000	PEG12000
0	21.6	
1	18.3	0.0
2	9.9	0.1
4	-0.1	-0.1
7	0.0	0.0

[0072] PEG2000では、PEGの本数を少し変化させるだけで、大きくゼータ電位が変化した。このことは、ナノ粒子の物性を制御する上で、PEG密度を精密に制御することが重要であることを示している。

ここで、mRNAにPEGを結合させる本手法では、加えたPEGが全て粒子に結合するため、粒子のPEG化を精密に制御することができる。表2に示すように、このような本手法によるPEG化の精密制御は、ゼータ電位などのナノ粒子の物性を制御する上で極めて重要である。

[0073] 1. 4. 1 PEGの鎖長の影響の評価(1)

PEGの鎖長の影響を、培養細胞を用いて評価した。具体的には、96wellプレートにDC2.4細胞を5,000個/well播種し、24時間後に、1wellあたりのfLuc mRNA量が100 ngとなるよう上述のナノ粒子を添加した。その24時間後に、ルシフェリン基質(

luciferase assay system (Promega社) と、ルミノメーター (Lumat 3 LB9508 luminometer、Berthold Technologies社) を用いてルシフェラーゼ発現量を定量した。

[0074] その結果を、図1に示す。図1に示されているように、重量平均分子量2,000と12,000のPEGを比較したところ、重量平均分子量12,000のPEGでは発現がやや低下する一方で、重量平均分子量2,000のPEGでは発現が比較的高いレベルで保たれることが分かった。

[0075] 1.4.2 PEGの鎖長の影響の評価(2)

PEGの鎖長の影響を、無細胞翻訳試験にて評価した。無細胞翻訳試験では、400 ngのfLuc mRNAを含むポリプレックスを、Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製) を用いて30℃で1.5時間翻訳した。

その結果を図2に示す。図2に示されているように、PEG鎖長およびPEG鎖数によりタンパク質への翻訳活性は低下しないことが分かった。

[0076] 1.5 mRNAの体内分布の測定

mRNAの体内分布を測定した。具体的には、実施例1の1.2で調製したfLucのmRNAからなる高分子ナノ粒子を、5 ug mRNAを含む200 μ Lの10 mM Hepes, 150 mM NaCl溶液として、マウスの尾静脈より投与した。投与4時間後にマウスを犠死させ、各臓器を摘出した。Passive Lysis Buffer (Promega社) 中でホモジェナイズし、ルシフェリン基質 (luciferase assay system (Promega社)) と、ルミノメーター (Lumat 3 LB9508 luminometer、Berthold Technologies社) を用いてルシフェラーゼ発現量を定量した。BCA Protein Assay (Thermo Fisher社) を用いてタンパク質量を測定し、その量にてルシフェラーゼ発現量の補正を行った。

ポリカチオンとしてLEPIを用いたときの高分子ナノ粒子の結果を、図

3に示す。図3に示されているように、mRNAの肺への送達を抑制しながら、脾臓へ効率的に送達するためのPEGの本数の最適値は、PEGの鎖長により異なる。例えば、PEG 2kの時は、2本や4本が好ましく、一方で、PEG 12kの時は、1本が好ましい。PEG鎖長が短いと、PEG鎖数の増加により、脾臓の分布は維持しつつ、肺への分布は抑制された。PEG鎖長が長いと、PEG鎖数の減少により、脾臓の分布は維持しつつ、肺への分布は抑制された。PEG化により、肺へのmRNAの分布が抑制され、また、脾臓への分布がPEG化後もある程度維持された。

高分子ナノ粒子として、側鎖にジエチレントリアミン(DET)と2-シクロヘキシルエチルアミン(CHE)が導入されたポリアスパルタミド誘導体PAsp(DET/CHE)アスパルタミドでPEG2000を用いた時の結果を図4に示す。肺、肝臓、腎臓及び心臓では、PEGの本数は集積度に影響をほとんど与えないが、脾臓におけるルシフェラーゼ発現量は、mRNA当たりのPEGの導入本数の増加とともに増加し、4本のPEGを導入したmRNAは、PEGを導入していないmRNAと比べて10倍近く高いルシフェラーゼ発現につながる事が明らかになった。一方、脾臓以外の組織に関しては、PEGの導入によるルシフェラーゼ発現量の有意な優位な変化は認められなかった。以上より、本PEG化技術は、脾臓へのmRNAデリバリー効率を選択的に増加させることが示された。

[0077] ここで図3中、 $p < 0.0001$ はPEG0と比べた場合に統計学的有意差があることを示す。統計処理はANOVA検定ののち、PEG0をコントロールとしたDunnett検定を行った。

[0078] 1.6 血管および肺血管への影響

試薬調整方法：

Cy5標識mRNA：fLuc mRNAをLabel IT (登録商標) Tracker (商標) Intracellular Nucleic Acid Localization Kit (Mirus社)を用いてCy5標識した。

試料：

Cy5標識mRNAから実施例2と同様にして高分子ナノ粒子を調製した。

ここで用いた高分子ナノ粒子は、重量平均分子量2,000の直鎖PEGを用いたものである。

試験方法：

BALB/cマウス（雌、7週齢）をイソフルランで麻酔し、Airyscan[®]共焦点顕微鏡（ニコン社）の顕微鏡ステージに固定した。上述のfLucのmRNAからなる高分子ナノ粒子を、5 μ g mRNAを含む200 μ Lの10mM HEPES, 150mM NaCl溶液として、マウスの尾静脈から注射して、耳たぶ真皮の静脈をビデオモードで蛍光画像を記録した。試料投与後30分後にマウスの肺を摘出し、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察した。図5（A）～（C）に、試料投与後、40秒、2分および5分後の耳たぶ真皮の静脈の蛍光画像および図5（D）～（F）に肺切片の蛍光画像を示した。PEG化していないmRNAは血液中で凝集して、肺の毛細血管を閉塞させるが、PEG化mRNAは血液中での凝集が抑制され、肺の毛細血管を閉塞させないことがわかる。

[0079] 1.7 肺の炎症反応

肺の炎症反応を調べた。具体的には、1.2で調製したfLucのmRNAからなる高分子ナノ粒子を、5 μ g mRNAを含む200 μ Lの10mM HEPES, 150mM NaCl溶液として、マウスの尾静脈より投与した。投与4時間後にマウスを犠死させ、肺を摘出した。RNeasy mini kit（Qiagen社）を用いてtotal RNAを抽出し、ReverTra Ace（登録商標）qPCR RT Master Mix（Toyobo社）を用いて逆転写したのち、taqman gene expression assay（applied biosystems）、Mic qPCR Cycler（Bio Molecular Systems社）を用いて、定量PCRを行い、IFN β 量をAc

t i n β 量を対照として求めた。

ここで用いた高分子ナノ粒子は、重量平均分子量 2, 000 の直鎖 PEG を用いたものである。

その結果を、図 6 に示す。図 6 に示されているように、肺の炎症反応が、PEG0 と比べて、PEG2、PEG4 で軽減することが分かった。

[0080] ここで図 6 中、「**」及び「*」は PEG0 と比べた場合、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ という統計学的有意差があることを示す。統計処理は ANOVA 検定ののち、Tukey 検定を行った。

[0081] 実施例 2：ワクチン効果

2. 1 ポリエチレングリコール (PEG) 化 mRNA の作製

mRNA は、Trilink 製社より OVA mRNA (CleanCap (登録商標) OVA mRNA-(L-7610)) を購入して使用した (OVA mRNA のコード配列: https://www.trilinkbiotech.com/media/folio3/product_attachments/product_insert/ova_orf_catno_l-7210_l-7610.txt)

OVA mRNA の PEG 化 mRNA を、以下のように作製した。RNA 2 次構造予測ソフトウェア (<http://rtips.dna.bio.keio.ac.jp/ipknot/>) にて、OVA mRNA の 2 次構造を予測し、RNA 鎖が 2 次構造を持たない部分に対して RNA オリゴマーを設計した。RNA オリゴマーは、5' 末端の PEG 修飾を含めて、ジーンデザイン社にて、依頼合成した。ここで、重量平均分子量 2, 000 の直鎖 PEG を用いた。そして、以下の 5' 末端 PEG 修飾 RNA オリゴマーをジーンデザイン社より購入した。これらの RNA オリゴマーは、mRNA のコード領域にハイブリダイズする。

[0082] 配列 p8 (配列番号 8) : GGUUCAGGAUGUCCCGC

配列 p9 (配列番号 9) : GUCCUCGUCCUUGAAGG

配列 p10 (配列番号 10) : GCUUCUCGAAGUUGAUG

配列 p 1 1（配列番号 1 1）：GGCGAUGUGCUUGAUGC

[0083] mRNAに対して1当量のRNAオリゴマーを加え、65℃で5分加熱し、10分かけて30℃まで冷却することで、ハイブリダイゼーションを行った。これにより、PEG化mRNAを作製した。

以下の実施例では、RNAオリゴマーの本数2および4のPEG化mRNA（それぞれ、PEG2およびPEG4）ために、以下の配列のRNAオリゴマーを用いた。

PEG2：配列 p 8, p 1 0

PEG4：配列 P 8～P 1 1

尚、RNAオリゴマーの本数0本のPEG化mRNA（PEG0）は、ハイブリダイゼーションを行っていない。

[0084] 2. 2 高分子ナノ粒子の調製

高分子ナノ粒子を、PEG化mRNAとポリカチオンを混合することにより調製した。具体的には、PEG化mRNAとリニアポリエチレンジイミン（LPEI）（製品名：in vivo jetPEI, PolyPlus社）を、LPEI中のアミノ基の数（N）とmRNA中のリン酸基数（P）の比（N/P比）が4となるように混合した。

[0085] 2. 3 ワクチン効果の確認試験

図7の左図に実験の手順を示す。まず、OVA mRNA 5μgを含む200μLの10mM Hepes, 150mM NaCl溶液をC57BL/6Nマウスの尾静脈内へ0日目と14日目に投与した。14日目の投与の7日後、脾臓細胞を回収し、IFN-γ ELISpot PLUS、Mouse（-）HRPキット（MABTECH社）にてEnzyme-Linked ImmunoSpot（ELISPOT）アッセイを行った。ここでは、96well plateに500,000cells/well蒔いた。最終OVA濃度10μg/mLで24時間培養したのち、IFN-γ産生細胞数を計測した。

[0086] その結果を図7の右図に示す。図7の右図の縦軸は、OVAに反応してI

F N- γ を産生した脾細胞の数を示し、細胞性免疫の指標となる。図7の右図に示されているように、1本鎖のOVA mRNAを用いたカチオン性ポリマー複合体(PEG0)では、細胞性免疫では細胞性免疫を高く誘導できたものの、肺血管の閉塞があり、炎症反応の問題から、この形での臨床応用は困難である。一方で、PEG修飾RNAオリゴマーをハイブリダイズさせたOVA mRNAを用いたカチオン性ポリマー複合体(PEG2およびPEG4)では、肺血管の閉塞が見られず、安全である。さらに、PEG2、PEG4では、PEG未修飾の1本鎖OVA mRNAを用いたカチオン性ポリマー複合体(PEG0)と比較しても、十分な細胞性免疫反応が観察された。

[0087] このように、PEG修飾RNAオリゴマーをハイブリダイズさせたOVA mRNAを用いたカチオン性ポリマー複合体により、強い細胞性免疫を誘導することができることが分かった。

[0088] 実施例3：毒性試験

試料

高分子ナノ粒子として、実施例1で調製したものをを用いた。ここで用いた高分子ナノ粒子は、ポリカチオンはLPEI、重量平均分子量2,000の直鎖PEGである。

操作方法

BALB/cマウス(雌、7週齢)に、5 μ gのfLuc mRNAを含む試料200 μ Lの10mM HEPES, 150mM NaClポリプレックス溶液を尾静脈から注射した。注射後24時間に下大静脈から採血し、遠心分離して血漿を得た。アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、乳酸脱水素酵素(LDH)、血中尿素窒素(BUN)およびクレアチニン(CRE)の濃度を、Dri-Chem 7000IZ(富士フィルム社)を用いて測定した。

[0089] その結果を図8に示す。いずれの項目においても、PEG0、PEG2、PEG4のいずれもNTと比較して有意な差は認められなかった。ここで、

N T は、無処置群を意味する。

配列表フリーテキスト

[0090] 配列番号 1 ～ 8 : 合成 R N A

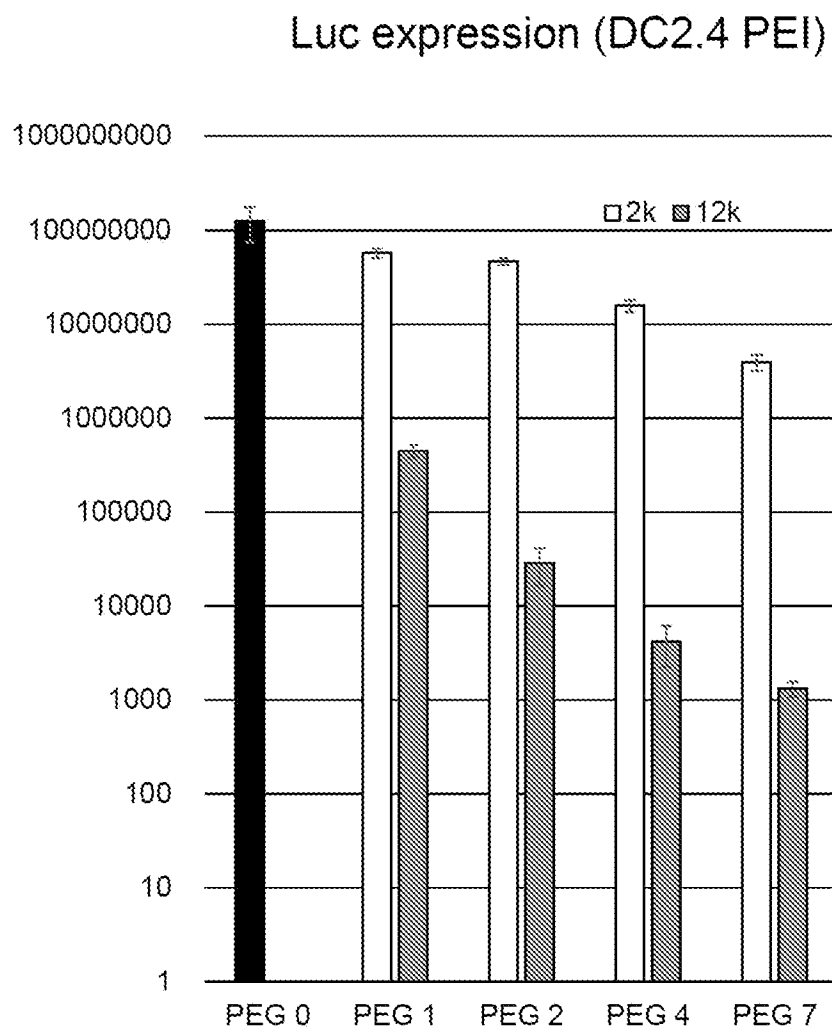
請求の範囲

- [請求項1] 抗原をコードするmRNAと、当該mRNAにハイブリダイズした少なくとも1つのRNAオリゴマーと、前記mRNAを内包するカチオン性ポリマーを含むmRNAワクチンであって、
RNAオリゴマーは、
(a) mRNAの配列に相補的な12～40塩基の配列からなるRNA配列、又は
(b) mRNAの配列に相補的な12～40塩基の配列と90%以上の同一性を有し、かつmRNAにハイブリダイズするRNA配列を含み、かつRNAオリゴマーはポリエングリコール修飾を含む、mRNAワクチン。
- [請求項2] 前記RNA配列が12～30塩基の配列からなる、請求項1に記載のmRNAワクチン。
- [請求項3] 前記RNA配列が17塩基の配列からなる、請求項3に記載のmRNAワクチン。
- [請求項4] 前記ポリエングリコール修飾は、オーバーハング配列を介さずにRNAオリゴマーの配列の5'末端又は3'末端になされたものである、請求項1～3のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。
- [請求項5] 前記少なくとも1つのRNAオリゴマーが、1～7つのRNAオリゴマーである、請求項1～4のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。
- [請求項6] 前記ポリエングリコールが、重量平均分子量1,000～20,000の直鎖状ポリエングリコールである、請求項1～5のいずれか1項に記載のmRNAワクチン。
- [請求項7] 前記カチオン性ポリマーが、直鎖状もしくは分枝状ポリエチレンジアミン、ポリリジン、ポリアルギニン、キトサン誘導体、ポリメタクリル酸誘導体、側鎖にカチオン性残基を有するポリアミノ酸誘導体、ポリエーテル誘導体両親媒性ポリアミノ酸誘導体、両親媒性ポリアミノ

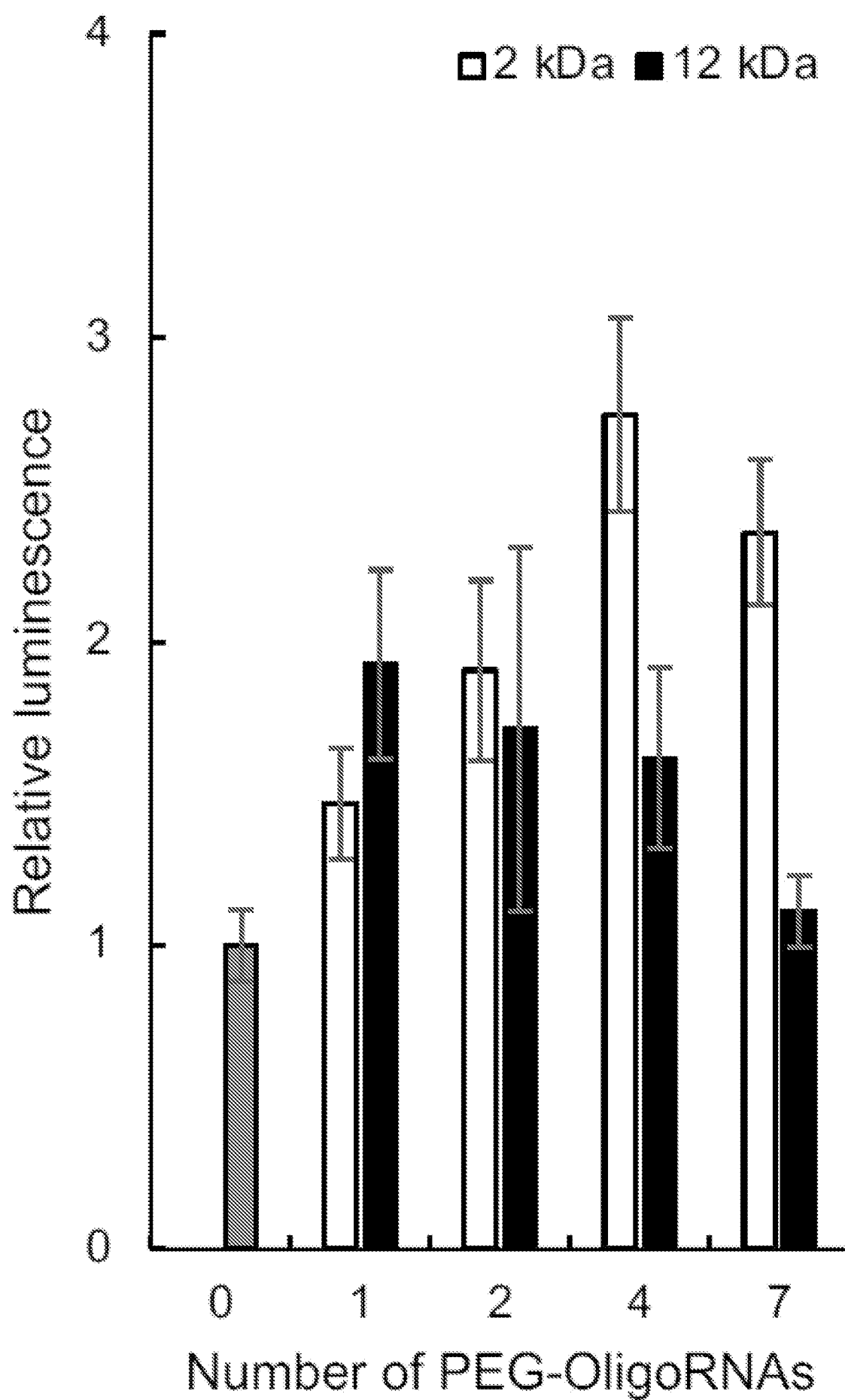
酸と親水性ポリマーとのブロックコポリマーから選ばれる、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の mRNA ワクチン。

[請求項 8] 疾患の予防又は治療を必要とする対象において当該疾患の予防又は治療に用いるための、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の mRNA ワクチン。

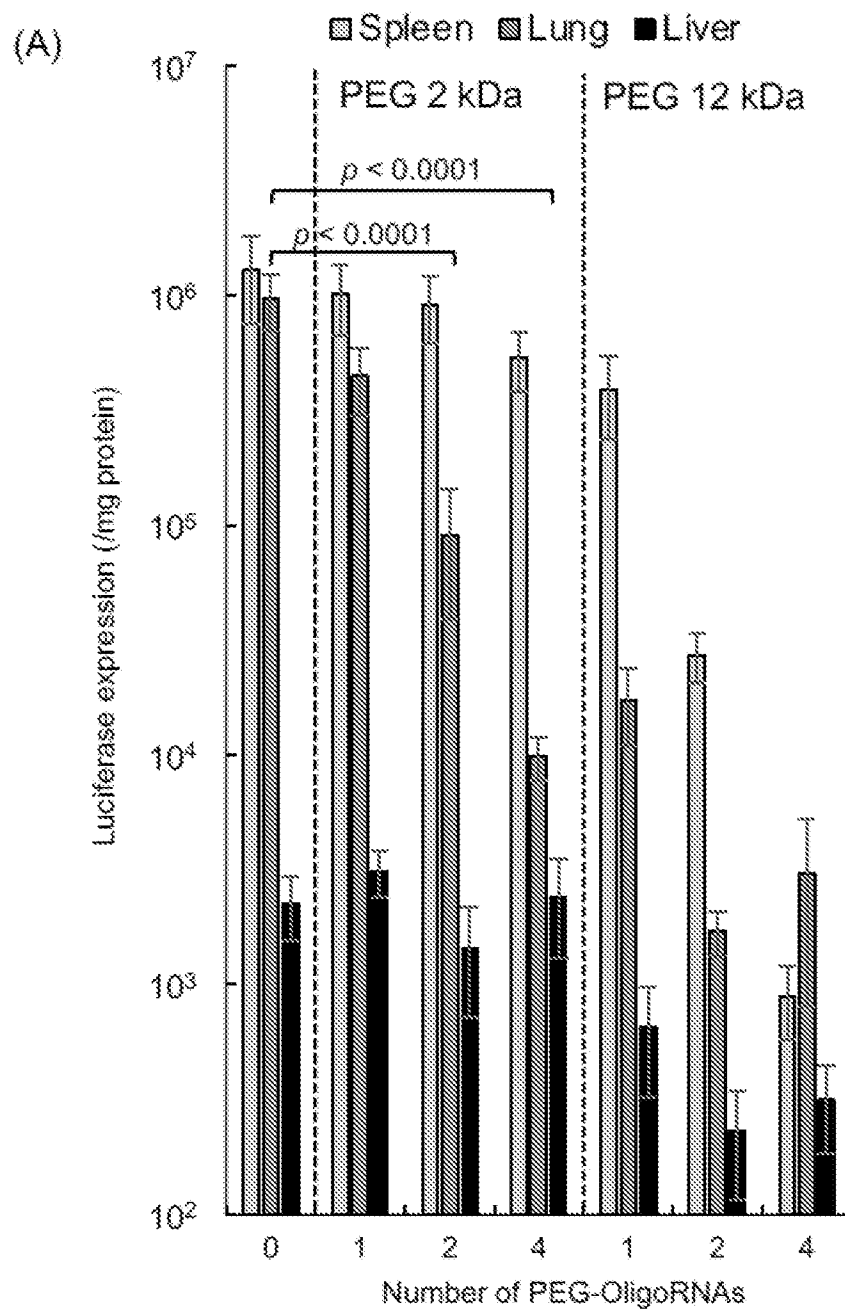
[図1]



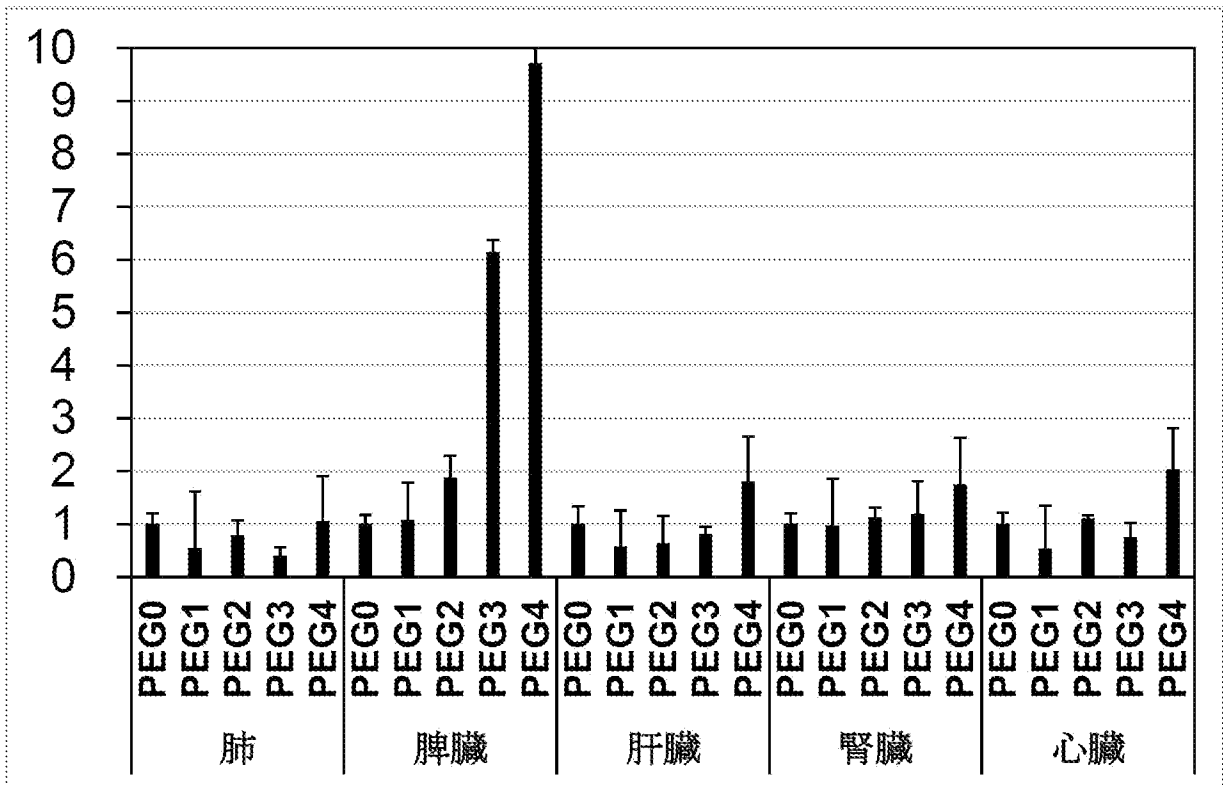
[図2]



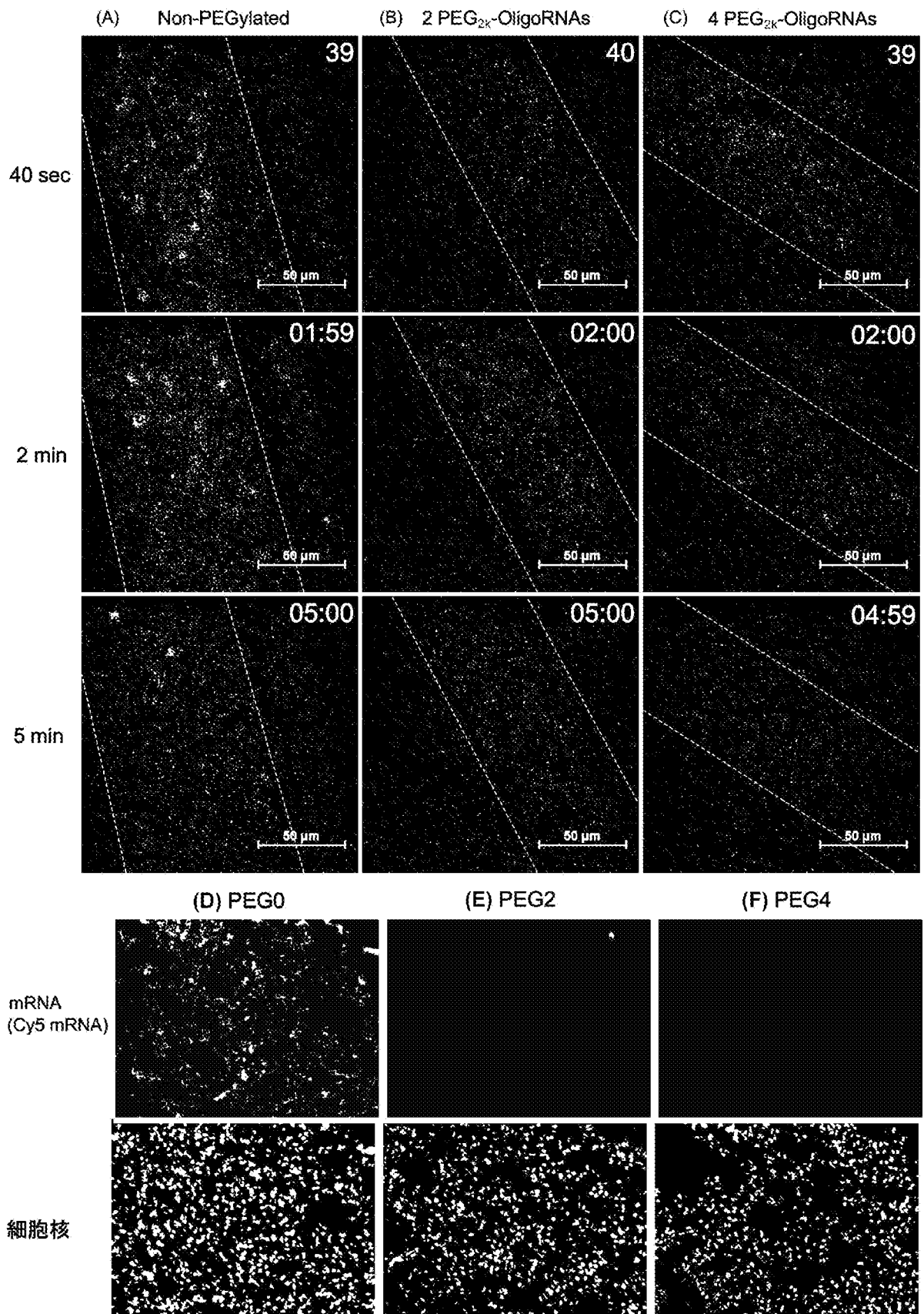
[図3]



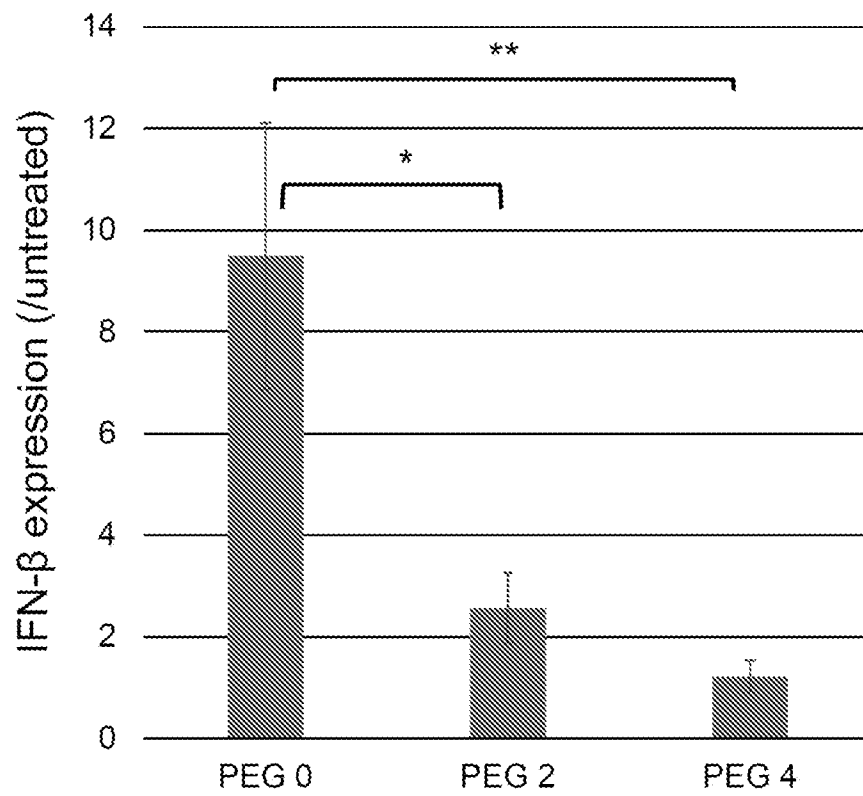
[図4]



[図5]



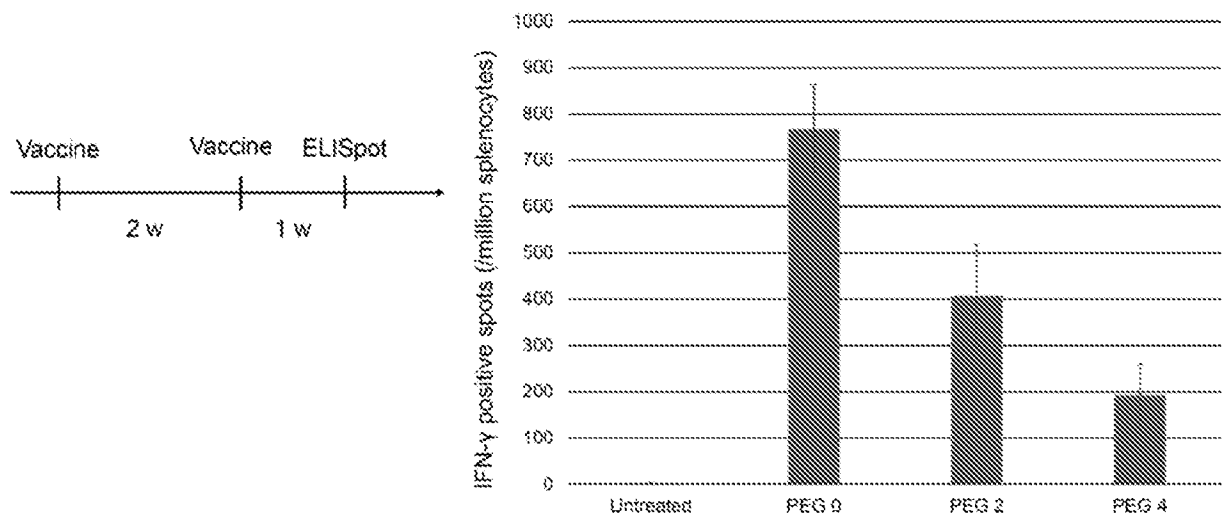
[図6]



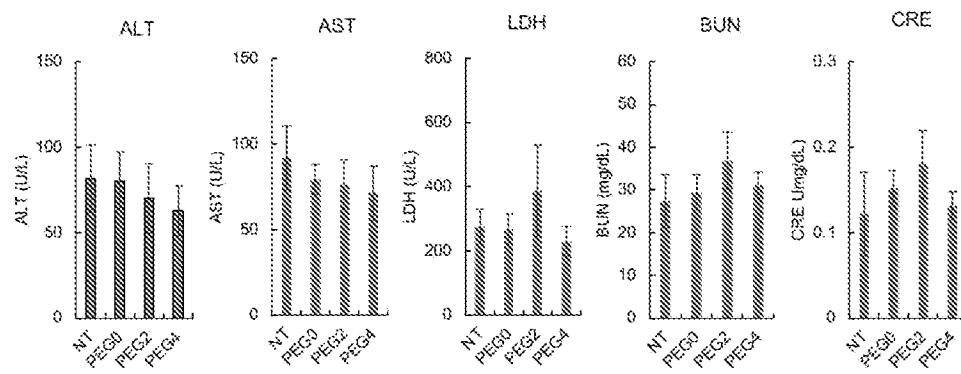
[図7]

Vaccination effect

OVA mRNA, ELISpot



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; **A61K 31/713**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61K 47/34**(2017.01)i; **A61K 47/60**(2017.01)i; **A61P 37/04**(2006.01)i; **C07K 14/435**(2006.01)n; **C07K 14/46**(2006.01)n; **C12N 15/09**(2006.01)n; **C12N 15/11**(2006.01)n; **C12N 15/12**(2006.01)n

FI: A61K48/00; A61K31/713; A61K39/00 G; A61K47/34; A61K47/60; A61P37/04; C07K14/435; C07K14/46; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z ZNA; C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K48/00; A61K31/713; A61K39/00; A61K47/34; A61K47/60; A61P37/04; C07K14/435; C07K14/46; C12N15/09; C12N15/11; C12N15/12

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/124181 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 05 July 2018 (2018-07-05) claims, paragraphs [0041]-[0044], [0069]-[0070], examples, etc.	1-8
A	KURIMOTO, S. et al. PEG-OligoRNA Hybridization of mRNA for Developing Sterically Stable Lipid Nanoparticles toward In Vivo Administration. Molecules. 2019, vol. 24, article no. 1303, pp. 1-16, ISSN 1420-3049 abstract, etc.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2024

Date of mailing of the international search report

27 February 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044270

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/044270

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/124181	A1	05 July 2018	US 2019/0328769 A1 claims, paragraphs [0110]- [0113], [0150]-[0152], examples US 2022/0296632 A1 EP 3564375 A1 KR 10-2019-0102041 A CN 110168090 A CN 116949050 A JP 18-124181 A1 JP 2021-35377 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)n; C07K 14/46(2006.01)n; C12N 15/09(2006.01)n; C12N 15/11(2006.01)n; C12N 15/12(2006.01)n FI: A61K48/00; A61K31/713; A61K39/00 G; A61K47/34; A61K47/60; A61P37/04; C07K14/435; C07K14/46; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z ZNA; C12N15/12		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K48/00; A61K31/713; A61K39/00; A61K47/34; A61K47/60; A61P37/04; C07K14/435; C07K14/46; C12N15/09; C12N15/11; C12N15/12 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2018/124181 A1 (国立大学法人東京大学) 05.07.2018 (2018-07-05) 請求の範囲、[0041]-[0044]、[0069]-[0070]、実施例、等	1-8
A	KURIMOTO, S. et al., PEG-OligoRNA Hybridization of mRNA for Developing Sterically Stable Lipid Nanoparticles toward In Vivo Administration, Molecules, 2019, Vol. 24, Article No. 1303, pp. 1-16, ISSN 1420-3049 Abstract、等	1-8
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.02.2024	国際調査報告の発送日 27.02.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 伊藤 基章 4U 4146 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/044270

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/124181	A1	05.07.2018	US	2019/0328769	A1	
				Claims、[0110]-[0113]、			
				[0150]-[0152]、Examples			
				US	2022/0296632	A1	
				EP	3564375	A1	
				KR	10-2019-0102041	A	
				CN	110168090	A	
				CN	116949050	A	
				JP	18-124181	A1	
				JP	2021-35377	A	
