(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-520506
(P2023-520506A)
(43)公表日　令和5年5月17日(2023.5.17)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/215(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/215		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*31/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14	ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		

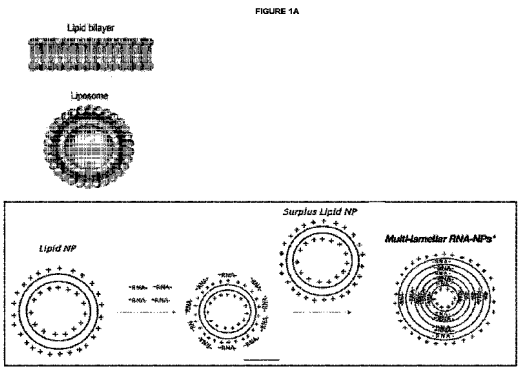
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全85頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-560168(P2022-560168)
(86)(22)出願日　令和3年3月31日(2021.3.31)
(85)翻訳文提出日　令和4年11月9日(2022.11.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/025222
(87)国際公開番号　WO2021/202772
(87)国際公開日　令和3年10月7日(2021.10.7)
(31)優先権主張番号　63/003,766
(32)優先日　令和2年4月1日(2020.4.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/022,999
(32)優先日　令和2年5月11日(2020.5.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/128,600
最終頁に続く

(71)出願人　507371168
ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファンデーション インコーポレーティッド
アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビル グリンター ホール ２２３
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100125070
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】　ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２に対する多層ＲＮＡナノ粒子ワクチン

(57)【要約】
本開示は、正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置され、ナノ粒子が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードするＲＮＡ分子を含む、ナノ粒子を提供する。そのようなナノ粒子を作製する方法は、本明細書中で更に提供される。更に、ここで開示されるナノ粒子を含む、関連細胞、細胞の集団、医薬組成物が提供される。対象における腫瘍に対する免疫応答を増加させる方法、対象の腫瘍内微小環境、リンパ節、及び／又は細網内皮器官にＲＮＡ分子を送達する方法、並びに疾患を有する対象を治療する方法が、更に提供される。
【選択図】図１Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置され、前記ナノ粒子が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードするＲＮＡ分子を含む、ナノ粒子。
【請求項２】
少なくとも３つの核酸層を含み、前記核酸層のそれぞれがカチオン性脂質二重層の間に配置されている、請求項１に記載のナノ粒子。
【請求項３】
少なくとも４つの核酸層を含み、前記核酸層のそれぞれがカチオン性脂質二重層の間に配置されている、請求項２に記載のナノ粒子。
【請求項４】
５つ以上の核酸層を含み、前記核酸層のそれぞれがカチオン性脂質二重層の間に配置されている、請求項３に記載のナノ粒子。
【請求項５】
前記ナノ粒子の最外層が、カチオン性脂質二重層を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項６】
表面が、前記カチオン性脂質二重層の前記カチオン性脂質の複数の親水性部分を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項７】
前記コアが、カチオン性脂質二重層を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項８】
前記コアが、約０．５重量％未満の核酸を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項９】
前記ナノ粒子の直径が、直径で約５０ｎｍ～約２５０ｎｍ、任意選択で、直径で約７０ｎｍ～約２００ｎｍである、請求項１～８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１０】
約４０ｍＶ～約６０ｍＶ、任意選択で、約４５ｍＶ～約５５ｍＶのゼータ電位を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１１】
約５０ｍＶのゼータ電位を含む、請求項１０に記載のナノ粒子。
【請求項１２】
核酸分子とカチオン性脂質とを、約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１５又は約１対約７．５の比率で含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１３】
前記カチオン性脂質が、ＤＯＴＡＰ又はＤＯＴＭＡである、請求項１～１２のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１４】
前記核酸分子が、ＲＮＡ分子である、請求項１～１３のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１５】
前記ＲＮＡ分子が、ｍＲＮＡである、請求項１４に記載のナノ粒子。
【請求項１６】
前記ｍＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質又はその断片をコードする、請求項１～１５のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１７】
前記Ｓタンパク質が、図２０に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１６に記載のナノ

粒子。
【請求項１８】
前記ｍＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２膜タンパク質、エンベロープタンパク質、又はヌクレオキャプシドタンパク質をコードする、請求項１～１７のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項１９】
前記リポソームが、前記核酸分子及び前記カチオン性脂質を、約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１５のＲＮＡ：カチオン性脂質比で混合することによって調製される、請求項１～１８のいずれか一項に記載のナノ粒子。
【請求項２０】
正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子を作製する方法であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置され、前記ナノ粒子が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードするＲＮＡ分子を含み、前記方法が、
（Ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードする核酸分子及びリポソームを、約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１５の核酸：リポソーム比で混合して、核酸被覆リポソームを得ることであって、前記リポソームが、カチオン性脂質及び有機溶媒を含む脂質混合物を、前記有機溶媒を真空下で蒸発させることにより乾燥させることを含む、リポソームを作製するプロセスで作製される、核酸被覆リポソームを得ることと、
（Ｂ）前記核酸被覆リポソームを、余剰量のリポソームと混合することと、を含む、ナノ粒子を作製する方法。
【請求項２１】
前記脂質混合物が、前記カチオン性脂質及び前記有機溶媒を、１ｍＬの有機溶媒当たり約４０ｍｇのカチオン性脂質～１ｍＬの有機溶媒当たり約６０ｍｇのカチオン性脂質の比率、任意選択で、１ｍＬの有機溶媒当たり約５０ｍｇのカチオン性脂質の比率で含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
リポソームを作製する前記プロセスが、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し、次に前記再水和脂質混合物を攪拌、休止、及びサイジングすることを更に含む、請求項２０又は２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記再水和脂質混合物をサイジングすることが、前記再水和脂質混合物を超音波処理、押し出し、及び／又は濾過することを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
実施例１の工程を含む、請求項２０～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記ナノ粒子が、約４０ｍＶ～約６０ｍＶ、任意選択で、約４５ｍＶ～約５５ｍＶのゼータ電位を有する、請求項２０～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ナノ粒子の前記コアが、約０．５重量％未満の核酸を含み、かつ／又は前記コアがカチオン性脂質二重層を含む、請求項２０～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ナノ粒子の最外層が、カチオン性脂質二重層を含み、かつ／又は前記ナノ粒子の表面が、前記カチオン性脂質二重層の前記カチオン性脂質の複数の親水性部分を含む、請求項２０～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記ｍＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質又はその断片をコードする、請求項２０～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記Ｓタンパク質が、図２０に示されるアミノ酸配列を含む、請求項２８に記載の方法

。
【請求項３０】
前記ｍＲＮＡが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２膜タンパク質、エンベロープタンパク質、又はヌクレオキャプシドタンパク質をコードする、請求項２０～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
請求項２０～３０のいずれか一項に記載の方法によって作製された、ナノ粒子。
【請求項３２】
請求項１～１９のいずれか一項又は請求項３１に記載のナノ粒子を含む、細胞。
【請求項３３】
抗原提示細胞（ＡＰＣ）、任意選択で、樹状細胞（ＤＣ）である、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３４】
細胞の集団であって、前記集団の少なくとも５０％が、請求項３２又は３３に記載の細胞である、細胞の集団。
【請求項３５】
請求項１～１９又は請求項３１のいずれか一項に記載の複数のナノ粒子、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項３６】
前記組成物が、１ｍＬ当たり約10^{10}のナノ粒子～１ｍＬ当たり約10^{15}のナノ粒子、任意選択で、１ｍＬ当たり約10^{12}のナノ粒子±１０％を含む、請求項３５に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、前記対象に、請求項３５又は３６に記載の医薬組成物を投与することを含む、対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する免疫応答を誘導する方法。
【請求項３８】
前記核酸分子が、ｍＲＮＡである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記組成物が、前記対象に全身投与される、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記組成物が、静脈内投与される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記医薬組成物が、前記対象における樹状細胞（ＤＣ）を活性化するのに有効である量で投与される、請求項３７～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記免疫応答が、Ｔ細胞媒介性免疫応答である、請求項３７～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記免疫応答が、液性免疫応答である、請求項３７～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記免疫応答が、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２タンパク質に対する抗体の産生を含む、請求項４３記載の方法。
【請求項４５】
前記組成物の単回用量が、約０．０００５０ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇの核酸を含む、請求項３７～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記核酸が約０．００８ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇのリポソーム材料にカプセル化される、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】
組成物の単回用量が、約０．０００６２５ｍｇ／ｋｇ～約０．０８ｍｇ／ｋｇの核酸を含む、請求項４５又は請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
組成物の単回用量が、約０．０００６２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．００１２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．００２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．００５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．０１ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．０２ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、約０．０４ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ、又は約０．０８ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡを含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
約１８ヶ月の治療期間にわたって、前記対象に複数用量の医薬組成物を投与することを含む、請求項３７～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
（ａ）各投与が２週間の間隔である、前記医薬組成物の用量の最初のセットを投与し、続いて（ｂ）それぞれ月に１回投与される、医薬組成物の用量のその後のセットを投与することを含む、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
３用量の前記最初のセットが約４週間の最初の治療期間にわたって投与され、用量の前記その後のセットが、その後の約１２ヶ月の治療期間にわたって投与される、請求項５０に記載の方法。
【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、２０２０年４月１日に出願された米国仮特許出願第６３／００３，７６６号、２０２０年５月１１日に出願された米国仮特許出願第６３／０２２，９９９号、及び２０２０年１２月２１日に出願された米国仮特許出願第６３／１２８，６００号に対する優先権の利益を主張し、それらの開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる。
（電子的に提出された資料の参照による組込み）
【０００２】
本明細書と同時に提出され、２０２１年３月３１日に作成された、以下、「５５５４４＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」という名前の２５１，６６６０バイトのＡＳＣＩＩ（テキスト）ファイルとして特定されるコンピューターで読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が参照により組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）は、エンベロープウイルスのコロナウイルス科に属する新しいウイルスである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、コウモリコロナウイルスと遺伝的類似性を持つポジティブセンスの一本鎖ＲＮＡウイルスであり、２０２０年１月に中国の武漢の患者から初めて単離された（Ｈｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｊ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　９１：２６４－２６６（２０２０））。現在までに、７５０，０００人以上がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染し、３５，０００人以上がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染によって引き起こされる疾患であるコロナウイルス疾患２０１８（ＣＯＶＩＤ－１９）で死亡している。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２関連の死亡者数を減らすには、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫を安全に誘導するワクチンが必要である。
【０００４】
ワクチンとしてｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子が研究されてきた。例えば、Ｒｅｉｃｈｍｕｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅｒ　Ｄｅｌｉｖ　７（５）：３１９－３３４（２０１６）を参照されたい。ＲＮＡワクチンには、従来のモダリティに比べていくつかの利点がある

。ＲＮＡは、自然免疫系及び獲得免疫系の両方に強力な影響を及ぼす。ＲＮＡは、強力なＴＬＲ依存性自然免疫を誘導する受容体３、７、及び８についてのトル様受容体（ＴＬＲ）アゴニストとして機能する。ＲＮＡはまた、細胞内病原体認識受容体（すなわち、黒色腫分化抗原５（ＭＤＡ－５）及びレチノイン酸誘導性遺伝子Ｉ（ＲＩＧ－Ｉ））を刺激し、ヘルパーＣＤ４及び細胞傷害性ＣＤ８　Ｔ細胞応答の両方の活性化で最高点に達することができる。細胞膜及び核膜の両方を通過する必要があることによって苦境に陥るＤＮＡワクチンとは異なり、ＲＮＡは、宿主ゲノムに組み込まれ得ないため、細胞質へのアクセスのみを必要とし、顕著な安全性の優位性を有する。特定のＨＬＡハプロタイプ（例えば、ＨＬＡ－Ａ２）のためにのみ開発された多くのペプチドワクチンと異なり、ＲＮＡは、ＭＨＣクラス制限をバイパスして、一般の人々に活用され得る。

【０００５】

安全かつ効果的にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫を誘導するために、材料及び方法が必要である。

【発明の概要】

【０００６】

ナノ粒子は、正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含み、各核酸層がカチオン性脂質二重層の間に配置されており、樹状細胞（ＤＣ）の末梢及び腫瘍内活性化を媒介する。これらの多層ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ）もアニオン性ＬＰＸ及びＲＮＡ　ＬＰＸと比較して、多層腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰの優れた有効性を実証し、ＤＣを全身的に活性化し、抗原特異的免疫を誘導し、インビボで抗腫瘍効果を引き出す能力を実証した。疾患を有する動物（例えば、担癌マウス）への多層ＲＮＡ　ＮＰの投与も、これらの動物の生存率の増加を導いた。特定の理論に拘束されるものではないが、本開示の多層ＲＮＡナノ粒子は、安全かつ効果的にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫を誘導する。

【０００７】

本開示は、正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置され、ナノ粒子が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質、任意選択でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質をコードするＲＮＡ分子を含む、ナノ粒子を提供する。例示的な実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも３つの核酸層を含み、それらの各々は、カチオン性脂質二重層間に配置される。例示的な態様では、ナノ粒子は、少なくとも４つ又は５つ以上の核酸層を含み、それらの各々は、カチオン性脂質二重層間に配置される。様々な態様において、ナノ粒子の最外層は、カチオン性脂質二重層を含む。様々な例において、表面は、カチオン性脂質二重層のカチオン性脂質の複数の親水性部分を含む。例示的な態様では、コアは、カチオン性脂質二重層を含む。任意選択で、コアは、約０．５重量％未満の核酸を含む。ナノ粒子の直径は、様々な態様において、直径で約５０ｎｍ～約２５０ｎｍであり、任意選択で、直径で約７０ｎｍ～約２００ｎｍである。例示的な例では、ナノ粒子は、約＋４０ｍＶ～約＋６０ｍＶ、任意選択で、約＋４５ｍＶ～約＋５５ｍＶのゼータ電位によって特徴付けられる。様々な例におけるナノ粒子のゼータ電位は、約５０ｍＶである。いくつかの態様では、核酸分子は、約１対約５～約１対約２５、例えば約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１５、約１対約１０、又は約１対約７．５の核酸分子：カチオン性脂質比で存在する。様々な態様において、核酸分子は、ＲＮＡ分子であり、任意選択で、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。

【０００８】

本明細書に記載の技術の癌関連態様では、ｍＲＮＡは、インビトロ転写されたｍＲＮＡであり、インビトロ転写鋳型は、試料から抽出されたＲＮＡから作製されたｃＤＮＡである。

【０００９】

本開示はまた、正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子を作製する方法であって、ここで、各核酸層がカチオン性

脂質二重層の間に配置され、ナノ粒子がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質、任意選択でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質をコードするＲＮＡ分子を含み、当該方法は、（Ａ）核酸分子及びリポソームを、１対約５～約１対約２５、例えば約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１５、約１対約１０、又は約１対約７．５のＲＮＡ：リポソーム比で混合して、ＲＮＡ被覆リポソームを得ることであって、リポソームが、カチオン性脂質及び有機溶媒を含む脂質混合物を、有機溶媒を真空下で蒸発させることにより乾燥させることを含む、リポソームを作製するプロセスで作製される、ＲＮＡ被覆リポソームを得ることと、（Ｂ）ＲＮＡ被覆リポソームを、余剰量のリポソームと混合することと、を含む、方法を提供する。例示的な態様では、脂質混合物は、カチオン性脂質及び有機溶媒を、１ｍＬの有機溶媒当たり約４０ｍｇのカチオン性脂質～１ｍＬの有機溶媒当たり約６０ｍｇのカチオン性脂質の比率、任意選択で、有機溶媒１ｍＬ当たり約５０ｍｇのカチオン性脂質の比率で含む。様々な例において、リポソームを作製するプロセスは、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し、次に再水和脂質混合物を撹拌、休止、及びサイジングすることを更に含む。任意選択で、再水和脂質混合物のサイジングは、再水和脂質混合物を超音波処理、押し出し、及び／又は濾過することを含む。例示的な態様では、ＲＮＡ分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードするｍＲＮＡであり、任意選択で、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質をコードするｍＲＮＡである。

【００１０】

本明細書では、ここで開示されるナノ粒子の作製方法によって作製されたナノ粒子が更に提供される。本明細書では、本開示のナノ粒子を含む細胞が更に提供される。任意選択で、細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、例えば樹状細胞（ＤＣ）である。本開示はまた、細胞の集団を提供し、ここで、集団の少なくとも５０％は、本開示による細胞である。本開示のナノ粒子を含むそのような細胞、又はそのような細胞の集団を含む医薬組成物が、本明細書で提供される。細胞又は細胞集団は、様々な態様において、対象への投与に適している。

【００１１】

本開示は、本開示による複数のナノ粒子、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。様々な態様において、組成物は、１ｍＬ当たり約10^{10}ナノ粒子～１ｍＬ当たり約10^{15}ナノ粒子、任意選択で、１ｍＬ当たり約10^{12}ナノ粒子±１０％を含む。

【００１２】

対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する免疫応答を誘発又は増加させる方法が、本開示によって提供される。例示的な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を対象に投与することを含む。例示的な態様では、核酸分子はｍＲＮＡである。任意選択で、組成物は、対象に全身投与される。例えば、組成物は、静脈内投与される。様々な態様において、医薬組成物は、対象の樹状細胞（ＤＣ）を活性化するのに有効な量で投与される。様々な例において、免疫応答は、Ｔ細胞媒介性免疫応答である。任意選択で、Ｔ細胞媒介性免疫応答は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）による活性を含む。

【００１３】

本開示はまた、対象の肺にＲＮＡ分子を送達する方法を提供する。本開示はまた、ＲＮＡ分子をリンパ節及び／又は細網内系器官（例えば、脾臓又は肝臓）に送達する方法を提供する。例示的な実施形態では、この方法は、ここで開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。

【００１４】

疾患又は障害を有する対象を治療する方法が、本明細書中で更に提供される。例示的な実施形態では、方法は、対象の疾患又は障害を治療するのに有効な量で、本開示の医薬組成物を対象に投与することを含む。様々な例で、対象はＣＯＶＩＤ－１９に感染しているか、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染するリスクがある。

【００１５】

ここで開示される医薬組成物及び方法の追加の実施形態及び態様を、以下に提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１Ａ】図１Ａは、脂質二重層、リポソーム、及び多層（ＭＬ）ＲＮＡ　ＮＰ（囲み）につながる一般的なスキームの一連の図解である。

【図１Ｂ】図１Ｂは、未複合体化ＮＰ（左）及びＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（右）のＣＥＭ画像のペアである。

【図２Ａ】図２Ａは、カチオン性ＲＮＡリポプレックス（ＬＰＸ）を導く一般的なスキームの図解である。

【図２Ｂ】図２Ｂは、アニオン性ＲＮＡリポプレックスを導く一般的なスキームの図解である。

【図２Ｃ】図２Ｃは、ＣＥＭ画像である。図２Ｃは、未複合体化ＮＰのＣＥＭ画像である。

【図２Ｄ】図２Ｄは、ＣＥＭ画像である。図２Ｄは、ＲＮＡ　ＬＰＸのＣＥＭ画像である。

【図２Ｅ】図２Ｅは、ＣＥＭ画像である。図２Ｅは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰのＣＥＭ画像である。

【図２Ｆ】図２Ｆは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ）、ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性ＬＰＸ、又は未処置のマウスの脾臓に存在するＣＤ１１ｃ＋ＭＨＣクラスＩＩ＋脾細胞の％ＣＤ８６＋のグラフである。

【図２Ｇ】図２Ｇは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ）、ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性ＬＰＸ、又は未処置のマウスの脾臓に存在するＣＤ８＋脾細胞の％ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ＋のグラフである。

【図２Ｈ】図２Ｈは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ）、ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性ＬＰＸ、又は未処置のマウスの脾臓に存在するＣＤ４＋脾細胞の％ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌのグラフである。

【図２Ｉ】図２Ｉは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ）、ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性ＬＰＸで処置されたマウス、又は未処置のマウスの生存率のグラフである。

【図２Ｊ】図２Ｊは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ）、ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性ＬＰＸで処置したマウスで産生された、又は未処置のマウスのＩＦＮ－αの量のグラフである。

【図３Ａ】図３Ａは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処置したマウス又は未処置のマウスの肺の写真のペアである。

【図３Ｂ】図３Ｂは、腫瘍特異的ＲＮＡをロードしたＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ又は非特異的ＲＮＡ（ＧＦＰ　ＲＮＡ）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ又は未処置のマウスに存在する％セントラルメモリーＴ細胞（ＣＤ３＋細胞のＣＤ６２Ｌ＋ＣＤ４４＋）のグラフである。

【図３Ｃ】図３Ｃは、腫瘍特異的ＲＮＡをロードしたＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ又は非特異的ＲＮＡ（ＧＦＰ　ＲＮＡ）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処理したマウス又は未処置のマウスの生存率のグラフである。

【図３Ｄ】図３Ｄは、腫瘍特異的ＲＮＡをロードしたＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ又は非特異的ＲＮＡ（ＧＦＰ　ＲＮＡ）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処理したマウス又は未処置のマウスの生存率のグラフである。このモデルは、図３Ｃのデータを取得するために使用されたモデルとは異なる。

【図４Ａ】図４Ａは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの投与後の時間の関数としてプロットされた、ＣＤ３＋細胞のＣＤ８又はＣＤ４４及びＣＤ８の発現％のグラフである。

【図４Ｂ】図４Ｂは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの投与後の時間の関数としてプロットされた、ＣＤ１１ｃ＋細胞のＰＤＬ１、ＭＨＣ　ＩＩ、ＣＤ８６、又はＣＤ８０の発現％のグラフである。

【図４Ｃ】図４Ｃは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの投与後の時間の関数としてプロットされた、ＣＤ３＋細胞のＣＤ４４及びＣＤ８の発現％のグラフである。

【図４Ｄ】図４Ｄは、生存期間の中央値（点線）と比較したＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処置さ

れたイヌの生存率％のグラフである。
【図５】図５は、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰのＣＥＭ画像であり、矢印は複数の層を有する例を示している。
【図６】図６は、腫瘍ｍＲＮＡをロードしたＮＰを例として使用して、パーソナライズされたＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの生成を説明するイラストである。わずか１００～５００個の生検された脳腫瘍細胞から、全ＲＮＡが抽出され、ｃＤＮＡライブラリーが生成されて、このライブラリーから、大量のｍＲＮＡ（パーソナライズされた腫瘍特異的トランスクリプトームを表す）を増幅できる。次に、負に帯電したｍＲＮＡは、正に帯電した脂質ＮＰにカプセル化される。ＮＰは静電相互作用を介してＲＮＡを封入し、細網内皮器官（すなわち、肝脾臓及びリンパ節）の樹状細胞（ＤＣ）による取り込みのために静脈内投与（ｉｖ）される。次に、ＣＤ４及びＣＤ８＋Ｔ細胞を活性化するＭＨＣクラスＩ及びＩＩ分子にペプチドを提示するために、ＲＮＡをＤＣの細胞内機構によって翻訳及び処理する。
【図７Ａ】図７Ａは、インビボ試験に関する図である。長期生存者治療のタイムラインである。１回目及び２回目の腫瘍接種が示されている。
【図７Ｂ】図７Ｂは、インビボ試験に関する図である。マウスの３つの群の各々についての２回目の腫瘍接種後の動物の生存率パーセントのグラフである。非特異的ＲＮＡ（対象の腫瘍に特異的ではないＲＮＡ）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰでの２回目の腫瘍接種の前に処置された２つの群、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）若しくはｐｐ６５）及び２回目の腫瘍接種前に腫瘍特異的ＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処置した１つの群又は２回目の腫瘍接種前に未処置の動物。対照群の生存率は「未処置」として示される。
【図８】図８は、投与時のマウスにおけるアニオン性ＬＰＸの局在を図示する一連の画像である。
【図９Ａ】様々なＲＮＡロード脂質ＮＰ製剤の図である。脂質－ＮＰ又はリポソームは、インビボ核酸送達を保護するために開発された。図９Ａは、ＲＮＡリポプレックスは、ｍＲＮＡが脂質コアに保存され、正味の正電荷が外表面にある状態で最初に開発されたことを示す。
【図９Ｂ】様々なＲＮＡロード脂質ＮＰ製剤の図である。脂質－ＮＰ又はリポソームは、インビボ核酸送達を保護するために開発された。図９Ｂは、二層リポソームの表面につながれた過剰なＲＮＡを含むアニオン性リポプレックスである。
【図９Ｃ】様々なＲＮＡロード脂質ＮＰ製剤の図である。脂質－ＮＰ又はリポソームは、インビボ核酸送達を保護するために開発された。図９Ｃは、正／負の電荷の層が交互に重なったしっかりとしたコイル状のリポソーム内に含まれるｍＲＮＡのいくつかの層を持つ多層ＲＮＡ－ＮＰの図である。既存のＮＰ設計では、コアの反発する電荷及び表面積の制限により、ＲＮＡパッケージの量が制限される。多層ＲＮＡ－ＮＰは、粒子当たりにより多くのＲＮＡをパッケージし、所望のターゲットに対する免疫応答を高める。
【図１０】図１０は、多層ＲＮＡ　ＮＰが、ｍＲＮＡを多層ベシクルに巻き付けてペイロード送達を促進する複雑な構造を形成することを示す。棒グラフは、アニオン性ＲＮＡ－ＬＰＳ（左側の最初のバー）、ＲＮＡ－リポプレックス（２番目のバー）、ＲＮＡ－ＮＰ（低）（３番目のバー）、及びＲＮＡ－ＮＰ（高）（４番目のバー）の遺伝子発現（発光）を示す。
【図１１】図１１は、多層ＲＮＡ　ＮＰが、ＤＣ活性化及びＩＦＮ－α放出の増加を媒介することを示す。ＲＮＡ／アニオン性リポプレックス（ＬＰＸ）又はＲＮＡ－ＮＰを静脈内投与した。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに週１回（ｘ３）（静脈内）投与し、活性化ＤＣの評価のために、１週間後に脾臓を採取した（左）。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮ－α評価のための最初の処置の６時間後に、血清を採取した（右）。
【図１２】図１２は、抗原特異的Ｔ細胞の誘発において、多層ＲＮＡ－ＮＰが、ＬＰＸ及びペプチドベースのワクチンよりも優れていることを示す。完全Ｆｒｅｕｎｄアジュバント（ＣＦＡ）で製剤化されたＲＮＡ／アニオン性リポプレックス（ＬＰＸ）（左）又はペプチドベースワクチン（右）を、ＯＶＡ特異的ＲＮＡ－ＮＰと比較した。動物（ｎ＝５～８／群）は、最後のワクチンの１週間後の四量体陽性（ＯＶＡ特異的）Ｔ細胞の評価の前

に、10^7ＯＴ－Ｉを受けた。
【図１３】図１３は、ＲＮＡ－ＮＰがＣＭＶマトリックスタンパク質ｐｐ６５に対して記憶再刺激応答を誘導することを示す。毎週、ｐｐ６５　ＲＮＡ－ＮＰ（ｘ３）をナイーブＣ５７／Ｂｌ／６マウスに投与し、１週間後に脾細胞を採取して、ｐｐ６５ペプチドプールが重複する培養及びＩＦＮ－γの評価を行った（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、Ｍａｎｎ　Ｗｈｉｔｎｅｙ）。
【図１４】図１４は、多層腫瘍特異的ｍＲＮＡ－ＮＰが、優れた有効性を媒介することを示す図である。異なるリポプレックス（ＬＰＸ）又はＲＮＡ－ＮＰに腫瘍特異的ｍＲＮＡをロードし、処置用肺癌モデル（Ｋ７Ｍ２）で比較した（ｎ＝８／群）。各ワクチンを、毎週静脈内投与した（ｘ３）。＊＊ｐ＜０．０１、Ｇｅｈａｎ－Ｗｉｌｃｏｘｏｎ検定。
【図１５】図１５は、ＲＮＡ－ＮＰがイヌにおいてほぼ即時のＩＦＮ－αサージ、ＰＢＭＣ辺縁趨向、及び末梢ＤＣ活性化を誘発することを示す図である。最初のＲＮＡ－ＮＰ投与から２時間以内に、ＩＦＮ－αの増加（左）、ＰＢＭＣの最初の減少（中央、排出前の抗原教育のためのリンパ節ホーニングを示唆）、及びＣＤ１１ｃ＋ＤＣの活性化（右）が観察された。
【図１６】図１６は、ＲＮＡ－ＮＰが終末神経膠腫を有するイヌの生存期間中央値を改善することを実証し、本明細書に記載の組成物がインビボで臨床的に意味のある免疫応答を誘発する能力を実証する図である。支持療法及び毎週の腫瘍ＲＮＡ－ＮＰ（ｘ３）（切除なしの腫瘍生検後）のみを受けた末期神経膠腫と診断された９～１１歳（ｎ＝５）のイヌ（ボクサー種）の生存。点線で示された生存期間の中央値（２９日）は、支持療法のみを受けたイヌの脳星状細胞腫の以前の研究から報告されている。別の研究の平均生存期間は６０～８０日である。不確実性を説明するためのブートストラップを使用した、ｏｎｅ－ｓｉｄｅｄ　ｅｘａｃｔ　ｌｏｇ検定のｐ値分布の中央値：＊ｐ＝０．０２１。
【図１７】図１７は、ＫＲ１５８ｂに対する腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰのＧＬＰ毒性研究結果を示す。試験の０、１４、及び２８日目に、１．０ｍｇ／ｋｇのＫＲ１５８及びｐｐ６５　ｍＲＮＡ＋１５．０ｍｇ／ｋｇの脂質ＮＰをマウスの尾静脈に静脈内注射すると、研究に関する肉眼的又は顕微鏡的試験品関連の所見は得られなかった。
【図１８Ａ】図１８Ａは、電荷修飾されたＲＮＡ－ＮＰが、例えば、肺又は脾臓に指向され得ることを実証する。カチオン性（～＋４０ｍＶ、左）対アニオン性（～－３０ｍＶ、右）ルシフェラーゼをコードするＲＮＡ－ＮＰを、静脈内尾静脈注射によりＢａｌｂ／ｃマウスに投与した。ＲＮＡ－ＮＰの６時間後にマウスにルシフェリンを腹腔内注射し、ＩＶＩＳイメージングにより生物発光を画像化した。肺の局在化のためにＲＮＡ－ＮＰを操作する能力は、ＣＯＶＩＤ－１９防御に特に関連している。
【図１８Ｂ】図１８Ｂは、電荷修飾されたＲＮＡ－ＮＰが、例えば、肺又は脾臓に指向され得ることを実証する。ＲＮＡ－ＮＰを、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した（ｎ＝３～４／群）。細網内皮器官（リンパ節、脾臓、及び肝臓）を２４時間以内に採取し、リンパ節（図１８Ｂ）、脾臓細胞（図１８Ｃ）、又は肝細胞（図１８Ｄ）から活性化マーカＣＤ８６（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）を発現するＣＤ１１ｃ細胞を評価した。データは、本開示の構築物が、例えば、ウイルス性病原体（コロナウイルス等）に対するほぼ即時の肺保護のために、たった１回の投与で影響を及ぼすことができることを立証する。
【図１８Ｃ】図１８Ｃは、電荷修飾されたＲＮＡ－ＮＰが、例えば、肺又は脾臓に指向され得ることを実証する。ＲＮＡ－ＮＰを、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した（ｎ＝３～４／群）。細網内皮器官（リンパ節、脾臓、及び肝臓）を２４時間以内に採取し、リンパ節（図１８Ｂ）、脾臓細胞（図１８Ｃ）、又は肝細胞（図１８Ｄ）から活性化マーカＣＤ８６（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）を発現するＣＤ１１ｃ細胞を評価した。データは、本開示の構築物が、例えば、ウイルス性病原体（コロナウイルス等）に対するほぼ即時の肺保護のために、たった１回の投与で影響を及ぼすことができることを立証する。
【図１８Ｄ】図１８Ｄは、電荷修飾されたＲＮＡ－ＮＰが、例えば、肺又は脾臓に指向さ

れ得ることを実証する。ＲＮＡ－ＮＰを、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内注射した（ｎ＝３～４／群）。細網内皮器官（リンパ節、脾臓、及び肝臓）を２４時間以内に採取し、リンパ節（図１８Ｂ）、脾臓細胞（図１８Ｃ）、又は肝細胞（図１８Ｄ）から活性化マーカＣＤ８６（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）を発現するＣＤ１１ｃ細胞を評価した。データは、本開示の構築物が、例えば、ウイルス性病原体（コロナウイルス等）に対するほぼ即時の肺保護のために、たった１回の投与で影響を及ぼすことができることを立証する。

【図１９】図１９は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質（例えば、スパイク、膜、エンベロープ、ヌクレオキャプシド）及びポリ（Ａ）テールをコードするヌクレオチド配列を含む例示的なｍＲＮＡの図である。

【図２０】図２０は、配列表で提供される配列の表である。

【図２１Ａ】図２１Ａは、実施例１１の試験の結果を示すグラフである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドによる再刺激時（スパイクペプチド再刺激－白丸）又は再刺激なし（刺激なし、灰色の塗りつぶし丸）の場合のエフェクターメモリーＴ細胞の数のグラフである（ＣＤ３＋ＣＤ８＋ＣＤ４４＋細胞／ウェル）。マウスに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の全長スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡをロードした多層（ＭＬ）ＲＮＡナノ粒子（ＮＰ）を投与した。マウスは、１週間以内に合計３回のワクチン接種を受けた。マウスからＰＭＢＣを採取し、次いでＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に応答するエフェクターメモリーＴ細胞の数を調べた。

【図２１Ｂ】図２１Ｂは、実施例１１の試験の結果を示すグラフである。刺激されていない細胞（白いバー）及びスパイクペプチドで再刺激された細胞（黒いバー）から放出されたＭＩＰ１－α（ｐｇ／ｍＬ）を示すグラフである。

【図２２Ａ】図２２Ａは、本開示のナノ粒子に関連するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の配列である。

【図２２Ｂ】図２２Ｂは、本開示のナノ粒子に関連するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のベクターマップである。

【図２２Ｃ】図２２Ｃは、本開示のナノ粒子に関連するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の配列である。

【図２３】図２３は、実施例１４の試験における対象の選択基準である。

【図２４】図２４は、実施例１４の試験における対象の除外基準である。

【図２５】図２５は、実施例で参照される患者評価のカレンダーである。

【図２６】図２６は、未治療の対象とＲＮＡ－ＮＰ治療の対象（ｘ軸）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＩｇＧ（吸光度）（ｙ軸）を比較する棒グラフであり、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスは、全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクｍＲＮＡをコードするＲＮＡ－ＮＰを毎週ワクチン接種された。ＥＬＩＳＡによるスパイク特異的抗体の評価のために血清を１ヶ月で採取した。

【図２７Ａ】図２７Ａは、スパイクペプチド再刺激後のエフェクターメモリーＴ細胞増殖を示す棒グラフである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＮＡ－ＮＰを投与されたマウスは、ワクチン接種後にエフェクターメモリーＴ細胞が増加し、メモリー想起が大幅に拡大した。ＮＰにロードされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクｍＲＮＡは、ナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウス（ｎ＝７－８）に静脈内投与され、血液は、およそ１０日目に採取された。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を刺激せずに放置するか、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク糖タンパク質から１１ａａが重複する１５ｍｅｒの重複ペプチドミックス（ＰｅｐＭｉｘ（商標）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｓｐｉｋｅ　Ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ）、ＪＰＴペプチド）２００ｎｇで再刺激した。細胞を３６時間培養してから採取し、ＣＤ３＋ＣＤ８＋ＣＤ４４＋サブセットによってエフェクターメモリー細胞を染色した。これらは、未処置マウスのＰＢＭＣと比較した。

【図２７Ｂ】図２７Ｂは、スパイクペプチド再刺激後のＭＩＰ－１ａ産生を示す棒グラフである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＮＡ－ＮＰを投与されたマウスは、ワクチン接種後にエフェクターメモリーＴ細胞が増加し、メモリー想起が大幅に拡大した。ＮＰにロ

ードされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクｍＲＮＡは、ナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウス（ｎ＝７－８）に静脈内投与され、血液は、およそ１０日目に採取された。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を刺激せずに放置するか、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク糖タンパク質から１１ａａが重複する１５ｍｅｒの重複ペプチドミックス（ＰｅｐＭｉｘ（商標）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｓｐｉｋｅ　Ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ）、ＪＰＴペプチド）２００ｎｇで再刺激した。上清を回収し、Ｅｖｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによる多重サイトカイン検出について評価した。（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）。

【図２８】図２８は、スパイクタンパク質の再刺激後のＩＦＮ－γの産生を示す棒グラフである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＮＡ－ＮＰを投与されたマウスは、エクスビボでメモリー想起応答を示す。ＮＰにロードされた毎週のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクｍＲＮＡをナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウス（ｎ＝７－８）に静脈内投与し、１６日目に血液を採取した。ＰＢＭＣを刺激しないままにするか、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクｍＲＮＡをエレクトロポレーションしたＤＣ２．４ｓの細胞株で再刺激し、未処置マウスのＰＢＭＣと比較した。上清をＩＦＮ－γ分析のために回収した（＊ｐ＜０．０５、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）。

【図２９Ａ】図２９Ａは、αグロビンの５’及び３’ＵＴＲが四量体＋Ｔ細胞のパーセンテージ及び長期生存利益を増強することを示す図である。ＮＰ、ＲＮＡ－ＮＰ、及びＵＴＲを有するＲＮＡ－ＮＰで処置された対象からの％ＯＶＡ四量体陽性ＣＤ８＋ＣＤ３＋細胞を比較するグラフである。

【図２９Ｂ】図２９Ｂは、αグロビンの５’及び３’ＵＴＲが四量体＋Ｔ細胞のパーセンテージ及び長期生存利益を増強することを示す図である。α－グロビンの５’及び３’ＵＴＲを含むＯＶＡｍＲＮＡをコードするＲＮＡ－ＮＰを、ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞を含むナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウスに静脈内投与し、四量体＋Ｔ細胞の評価のために１週間後に脾臓を採取した。修飾されていないＯＶＡ　ＲＮＡ－ＮＰと比較して、αグロビン修飾ＲＮＡ－ＮＰは、抗原特異的Ｔ細胞の割合を増加させる。腫瘍移植後のこれらの群における生存率を示すグラフである。ＵＴＲ　ＲＮＡ－ＮＰ治療を受けた対象は、生存率の向上を示した（移植後３５日までに約５０％）。

【図３０】図３０は、ＨＣＶの５’ＩＲＥＳ及び３’ポリＵＵＵテールを有するＲＮＡ－ＮＰが抗原特異的Ｔ細胞を増加させることを示す図である。ＯＶＡ　ｍＲＮＡをコードし、ＨＣＶの５’ＩＲＥＳ及び３’ポリＵＵＵテールを含むｍＲＮＡを含むＲＮＡ－ＮＰを、ナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウス（ｎ＝３－４／群）に静脈内投与した。ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞及び脾臓は、四量体＋Ｔ細胞の評価のために１週間後に採取された。ＨＣＶ修飾ＲＮＡ－ＮＰは、抗原特異的Ｔ細胞の割合を増加させる。

【図３１】図３１は、全長ＬＡＭＰコンジュゲートｐｐ６５が、より高い割合の抗原特異的Ｔ細胞を誘導するように見えることを示す。ｐｐ６５の完全長ＬＡＭＰコンジュゲートＲＮＡをナイーブマウス（ｎ＝５／群）に週１回（ｘ３）静脈内投与し、脾臓を採取して、ｐｐ６５ペプチドプールをオーバーラップさせて再刺激した（＊ｐ＜０．０５、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）。グラフは、ＮＰ単独、ＲＮＡ－ＮＰ、又はＬＡＭＰ　ＲＮＡ－ＮＰを投与された対象のＩＦＮ－γ産生を比較している。

【図３２Ａ】図３２Ａは、ＮＰ単独を投与された対象におけるＯＶＡ特異的テトラマー＋ＣＤ８細胞の割合、及びＭＤＡＳノックアウト対象におけるＲＮＡ－ＮＰを図示するグラフである。Ｔ細胞単独。

【図３２Ｂ】図３２Ｂは、ＮＰ単独を投与された対象におけるＯＶＡ特異的テトラマー＋ＣＤ８細胞の割合、及びＭＤＡＳノックアウト対象におけるＲＮＡ－ＮＰを図示するグラフである。Ｂ１６Ｆ１０－ＯＶＡを使用した再刺激アッセイ後。特定の理論に拘束されることを望んでいるが、多層ＲＮＡ－ＮＰの免疫原性は、既存のｍＲＮＡナノ脂質プラットフォームとは対照的に、ＭＤＡ－５等の細胞内病原体認識受容体に依存していると思われる。

【発明を実施するための形態】

【００１７】
本開示は、カチオン性脂質及び核酸を含むナノ粒子に関する。本明細書で使用される場合、「ナノ粒子」という用語は、直径が約１０００ｎｍ未満である粒子を指す。本開示のナノ粒子は、リポソーム形成を誘導するように処理されたカチオン性脂質を含むので、様々な態様でここに開示されるナノ粒子は、リポソームを含む。リポソームは、人工的に調製されたベシクルであり、例示的な態様では、主に脂質二重層から構成される。様々な例におけるリポソームは、栄養素及び医薬品の投与のための送達媒体として使用される。様々な態様において、本開示のリポソームは異なるサイズであり、組成物は、（ａ）直径数百ナノメートルであり得、狭い水性コンパートメントによって分離された一連の同心二重層を含み得る多層ベシクル（ＭＬＶ）、（ｂ）直径５０ｎｍ未満であり得る小さな単細胞ベシクル（ＳＵＶ）、及び（ｃ）直径５０～５００ｎｍであり得る大きな単細胞ベシクル（ＬＵＶ）のうちの１つ以上を含み得る。様々な例におけるリポソームは、不健康な組織へのリポソームの付着を改善するために、又はエンドサイトーシス（これに限定されない）等の事象を活性化するために、オプソニン又はリガンドを含むように設計される。例示的な態様では、リポソームは、製剤の送達を改善するために、低又は高ｐＨを含む。様々な例において、リポソームは、封入された製剤及びリポソーム成分、脂質ベシクルが分散される媒体の性質、封入された物質の有効濃度及びその潜在的な毒性、ベシクルの用途及び／又は送達中に関与する追加のプロセス、目的の用途のためのベシクルの最適化サイズ、多分散性及び貯蔵寿命、並びに安全かつ効率的なリポソーム製品の大規模生産のバッチ間の再現性及び可能性に応じて配合されるが、これらに限定されない。

【００１８】
例示的な実施形態では、ナノ粒子は、表面並びに（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層、任意選択で、３つ以上の核酸層を含む内部を含む。例示的な例では、各核酸層は、脂質層、例えば、カチオン性脂質層の間に配置される。例示的な態様では、ナノ粒子は、核酸及び脂質の交互の層を含む多層である。例示的な実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも３つの核酸層を含み、それらの各々は、カチオン性脂質二重層間に配置される。例示的な態様では、ナノ粒子は、少なくとも４つ又は５つの核酸層を含み、それらの各々は、カチオン性脂質二重層間に配置される。例示的な態様では、ナノ粒子は、少なくとも５つを超える（例えば、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はそれ以上）核酸層を含み、それらの各々は、カチオン性脂質二重層間に配置される。本明細書で使用される場合、「カチオン性脂質二重層」という用語は、カチオン性脂質又はそれらの混合物を含む、それらから本質的になる、又はそれらからなる脂質二重層を意味する。好適なカチオン性脂質は、本明細書に記載されている。本明細書で使用される場合、「核酸層」という用語は、核酸、例えば、ＲＮＡを含む、それから本質的になる、又はそれからなる、ここで開示されるナノ粒子の層を意味する。

【００１９】
本開示のナノ粒子の固有の構造は、多層ナノ粒子（ＭＬ－ＮＰ）が生物学的効果を発揮する方法におけるメカニズム違いをもたらす。以前に記載されたＲＮＡベースのナノ粒子は、少なくとも部分的に、トル様受容体７（ＴＬＲ７）経路を介して、それらの効果を発揮する。驚くべきことに、本開示の多層ナノ粒子は、ＴＬＲ７とは無関係に有効性を媒介する。特定の理論に拘束されることを望まないが、ＭＤＡ－５等の細胞内病原体認識受容体（ＰＲＲ）は、ＴＬＲよりも多層ナノ粒子の生物活性に関連しているようである。これにより、ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰは、単一のＴＬＲ（すなわち、エンドソーム内のＴＬＲ７）とは反対に、複数の細胞内ＰＲＲ（すなわち、ＲＩＧ－Ｉ、ＭＤＡ－５）を刺激して、Ｉ型インターフェロンのより多くの放出及びより強力な先天性免疫の誘導を達成することができる可能性がある。これにより、ＲＮＡ－ＮＰは、長期的なサバイバーの利益を伴う優れた有効性を示すことができる。

【００２０】
様々な態様において、ここで開示されるナノ粒子は、正に帯電した表面を含む。いくつ

かの例では、正に帯電した表面は、脂質層、例えばカチオン性脂質層を含む。様々な態様において、ナノ粒子の最外層は、カチオン性脂質二重層を含む。任意選択で、カチオン性脂質二重層はＤＯＴＡＰを含む。様々な例において、表面は、カチオン性脂質二重層のカチオン性脂質の複数の親水性部分を含む。いくつかの態様では、コアは、カチオン性脂質二重層を含む。いくつかの例では、コアの最外領域は、ＤＯＴＡＰを含むカチオン性脂質二重層を含む。様々な例において、コアは核酸を欠き、任意選択で、コアは約０．５重量％未満の核酸を含む。

【００２１】

例示的な態様では、ナノ粒子は、ナノメートル範囲内で、本明細書において「ナノリポソーム」又は「リポソーム」と呼ばれる特定の場合に従って、直径を有する。例示的な態様では、ナノ粒子は、約５０ｎｍ～約５００ｎｍ、例えば、約５０ｎｍ～約４５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約４００ｎｍ、約５０ｎｍ～約３５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、約５０ｎｍ～約２５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約２００ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、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の直径を有する。例示的な態様では、ナノ粒子は、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、例えば、約１００ｎｍ～約２５０ｎｍ、約１１０ｎｍ±５ｎｍ、約１１５ｎｍ±５ｎｍ、約１２０ｎｍ±５ｎｍ、約１２５ｎｍ±５ｎｍ、約１３０ｎｍ±５ｎｍ、約１３５ｎｍ±５ｎｍ、約１４０ｎｍ±５ｎｍ、約１４５ｎｍ±５ｎｍ、約１５０ｎｍ±５ｎｍ、約１５５ｎｍ±５ｎｍ、約１６０ｎｍ±５ｎｍ、約１６５ｎｍ±５ｎｍ、約１７０ｎｍ±５ｎｍ、約１７５ｎｍ±５ｎｍ、約１８０ｎｍ±５ｎｍ、約１９０ｎｍ±５ｎｍ、約２００ｎｍ±５ｎｍ、約２１０ｎｍ±５ｎｍ、約２２０ｎｍ±５ｎｍ、約２３０ｎｍ±５ｎｍ、約２４０ｎｍ±５ｎｍ、約２５０ｎｍ±５ｎｍ、約２６０ｎｍ±５ｎｍ、約２７０ｎｍ±５ｎｍ、約２８０ｎｍ±５ｎｍ、約２９０ｎｍ±５ｎｍ、約３００ｎｍ±５ｎｍの直径を有する。例示的な態様では、ナノ粒子は、直径で約５０ｎｍ～約２５０ｎｍである。いくつかの態様では、ナノ粒子は、直径が約７０ｎｍ～約２００ｎｍである。

【００２２】

例示的な態様では、ナノ粒子は、直径、例えば、直径約５０ｎｍ～約５００ｎｍ又は約５０ｎｍ～約２５０ｎｍの範囲のナノ粒子の不均一な混合物を含む医薬組成物中に存在する。任意選択で、医薬組成物は、直径で約７０ｎｍ～約２００ｎｍの範囲のナノ粒子の不均一な混合物を含む。

【００２３】

例示的な例では、ナノ粒子は、約＋４０ｍＶ～約＋６０ｍＶ、例えば、約＋４０ｍＶ～約＋５５ｍＶ、約＋４０ｍＶ～約＋５０ｍＶ、約＋４０ｍＶ～約＋５０ｍＶ、約＋４０ｍＶ～約＋４５ｍＶ、約＋４５ｍＶ～約＋６０ｍＶ、約＋５０ｍＶ～約＋６０ｍＶ、又は約＋５５ｍＶ～約＋６０ｍＶのゼータ電位によって特徴付けられる。例示的な態様では、ナノ粒子は、約＋４５ｍＶ～約＋５５ｍＶのゼータ電位を有する。様々な例におけるナノ粒子のゼータ電位は、約＋５０ｍＶである。様々な態様において、ゼータ電位は、＋３０ｍＶ又は＋３５ｍＶを超えている。ゼータ電位は、本開示のナノ粒子と、Ｓａｙｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　６（１）：ｅ１２５６５２７（２０１６）に記載されるナノ粒子とを区別する１つのパラメータである。

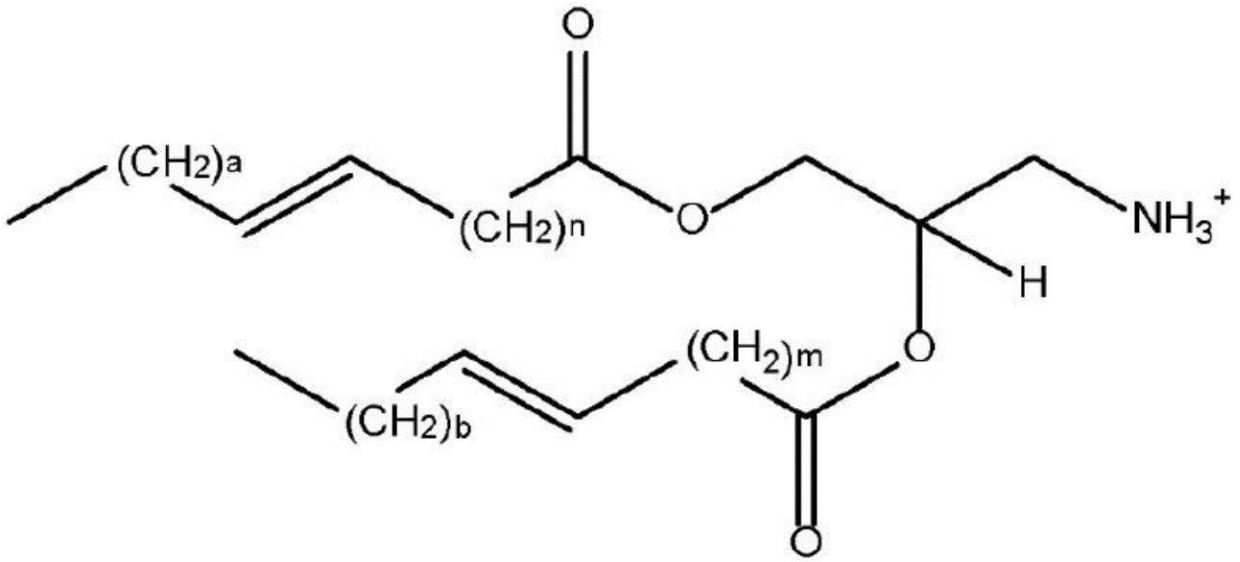
【００２４】

例示的な実施形態では、ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、米国特許出願第２０１３００９０３７２号（その内容は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）に記載されているもの等の低分子量カチオン性脂質である。例示的な例におけるカチオン性脂質は、カチオン性脂肪酸、カチオン性グリセロリン脂質、カチオン性グリセロリン脂質、カチオン性スフィンゴ脂質、カチオン性ステロール脂質、カチオン性プレノール脂質、カチオン性糖脂質、又はカチオン性ポリケチドである。例示的な態様では、カチオン性脂質は、２つの脂肪アシル鎖を含み、その各鎖

は、独立して飽和又は不飽和である。いくつかの例では、カチオン性脂質は、ジグリセリドである。例えば、いくつかの例では、カチオン性脂質は、式Ｉ又は式ＩＩのカチオン性脂質であり得る。

【００２５】

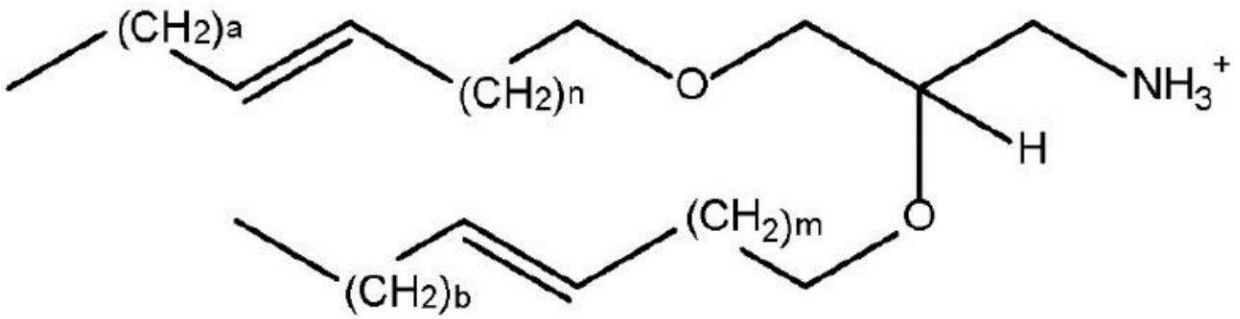
【化１】



［式Ｉ］

【００２６】

【化２】



［式ＩＩ］

【００２７】

ここで、ａ、ｂ、ｎ、及びｍの各々は、独立して、２～１２（例えば、３～１０）の整数である。いくつかの態様では、カチオン性脂質は、式Ｉのカチオン性脂質であり、ここで、ａ、ｂ、ｎ、及びｍの各々は、独立して、３、４、５、６、７、８、９、及び１０から選択される整数である。例示的な例では、カチオン性脂質は、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）、又はその誘導体である。例示的な例では、カチオン性脂質は、ＤＯＴＭＡ（１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン）、又はその誘導体である。

【００２８】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）リポソームから形成されたリポソーム、Ｍａｒｉｎａ Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，Ｗａｓｈ．）からのＤｉＬａ２リポソーム、１，２－ジリノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、及びＭＣ３（ＵＳ２０１００３２４１２０、参照によりその全体が本明

細書中に組み込まれる）を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、インビトロ及びインビボでのオリゴヌクレオチド送達に好適であることが以前に記載及び示された安定化プラスミド脂質粒子（ＳＰＬＰ）又は安定化核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）の合成から形成されたリポソームを含む。いくつかの態様におけるナノ粒子は、核酸分子に加えて、３～４個の脂質成分で構成されている。例示的な態様では、リポソームは、Ｊｅｆｆｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．２００５；２２（３）：３６２－７２によって報告されているように、５５％のコレステロール、２０％のジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、１０％のＰＥＧ－Ｓ－ＤＳＧ、及び１５％の１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）を含む。例示的な例では、リポソームは、Ｈｅｙｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ ２００５；１０７（２）：２７６－８７によって報告されているように、４８％のコレステロール、２０％のＤＳＰＣ、２％のＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ、及び３０％のカチオン性脂質を含み、カチオン性脂質は、１，２－ジステアルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）、ＤＯＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、又は１，２－ジリノレニルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）であり得る。

【００２９】

いくつかの実施形態では、リポソームは、約２５．０％コレステロール～約４０．０％コレステロール、約３０．０％コレステロール～約４５．０％コレステロール、約３５．０％コレステロール～約５０．０％コレステロール、及び／又は約４８．５％コレステロール～約６０％コレステロールを含む。いくつかの実施形態では、リポソームは、２８．５％、３１．５％、３３．５％、３６．５％、３７．０％、３８．５％、３９．０％、及び４３．５％からなる群から選択される百分率のコレステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、リポソームは、約５．０％～約１０．０％のＤＳＰＣ及び／又は約７．０％～約１５．０％のＤＳＰＣを含み得る。

【００３０】

いくつかの実施形態では、リポソームは、ＤｉＬａ２リポソーム（Ｍａｒｉｎａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｏｔｈｅｌｌ，Ｗａｓｈ．）、ＳＭＡＲＴＩＣＬＥＳ（登録商標）（Ｍａｒｉｎａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｏｔｈｅｌｌ，Ｗａｓｈ．）、中性ＤＯＰＣ（１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）ベースのリポソーム（例えば、卵巣癌のためのｓｉＲＮＡ送達（Ｌａｎｄｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｙ ２００６ ５（１２）１７０８－１７１３）、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）及びヒアルロナン被覆リポソーム（Ｑｕｉｅｔ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｉｓｒａｅｌ）である。

【００３１】

様々な例において、カチオン性脂質は、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、又はジ（（Ｚ）－ノン－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）を含み、更に中性脂質、ステロール、及び粒子凝集を低減できる分子、例えば、ＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質を含む。

【００３２】

様々な態様におけるリポソームは、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＰＬＧＡ、ＰＥＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ化脂質及びアミノアルコール脂質を含む。いくつかの態様では、リポソームは、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ及びアミノアルコール脂質等のカチオン性脂質を含むが、これらに限定されない。アミノアルコールカチオン性脂質は、いくつかの態様では、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第２０１３０１５０６２５号に記載されている脂質及び／又は記載されている方法によって作製された脂質を含む。非限定的な例として、特定の態様におけるカチオ

ン性脂質は、２－アミノ－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ，２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（米国特許出願公開第２０１３０１５０６２５号における化合物１）、２－アミノ－３－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３／０１５０６２５における化合物２）、２－アミノ－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－［（オクチルオキシ）メチル］プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５における化合物３）、及び２－（ジメチルアミノ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－２－｛［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］メチル｝プロパン－１－オール（ＵＳ２０１３０１５０６２５における化合物４）、又はその任意の薬学的に許容される塩若しくは立体異性体である。

【００３３】

様々な実施形態では、リポソームは、（ｉ）２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、及びジ（（Ｚ）－ノン－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）からなる群から選択される少なくとも１つの脂質と、（ｉｉ）ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、及びＳＭから選択される中性脂質と、（ｉｉｉ）ステロール、例えば、コレステロールと、（ｉｖ）ＰＥＧ－脂質、例えば、約２０～６０％のカチオン性脂質：５～２５％の中性脂質：２５～５５％のステロール：０．５～１５％のＰＥＧ脂質のモル比のＰＥＧ－ＤＭＧ又はＰＥＧ－ｃＤＭＡと、を含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、リポソームは、モル基準で約２５％～約７５％の、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、及びジ（（Ｚ）－ノン－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）から選択されるカチオン性脂質を含み、例えば、モル基準で約３５～約６５％、約４５～約６５％、約６０％、約５７．５％、約５０％、又は約４０％含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、リポソームは、モル基準で約０．５％～約１５％の中性脂質を含み、例えば、モル基準で約３～約１２％、約５～約１０％又は約１５％、約１０％、又は約７．５％含む。中性脂質の例には、ＤＳＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ及びＳＭが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は中性脂質を含まない。いくつかの実施形態では、製剤は、ステロールのモル基準で約５％～約５０％（例えば、モル基準で約１５～約４５％、約２０～約４０％、約４０％、約３８．５％、約３５％、又は約３１％）を含む。例示的なステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、コレステロール等のステロールを含まない。いくつかの実施形態では、製剤は、ＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質を、モル基準で約０．５％～約２０％（例えば、モル基準で約０．５～約１０％、約０．５～約５％、約１．５％、約０．５％、約１．５％、約３．５％、又は約５％）含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質は、平均分子量が２，０００ＤａのＰＥＧ分子を含む。他の実施形態では、ＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質は、平均分子量が２，０００未満、例えば、約１，５００Ｄａ、約１，０００Ｄａ、又は約５００ＤａのＰＥＧ分子を含む。ＰＥＧ修飾脂質の例には、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）（本明細書ではＰＥＧ－Ｃ１４又はＣ１４－ＰＥＧとも称される）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ（Ｒｅｙｅｓ ｅｔａｌ．Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１０７、２７６－２８７（２００５）で更に考察され、その内容は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３６】
例示的な態様では、カチオン性脂質は、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメミルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－９－アミン、（１Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６、１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメイヒロクタコサ－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１　Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１　Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコス－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－１－ノニリコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコス－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１７－エン－１０－アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコント－２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコント－２２－エン－１０－アミン、（１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコス－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオ

キシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－［（５Ｚ）－オクタ－５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン；（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデカ－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メトイルロクチル）オキシル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクリルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン及び（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミン若しくはその薬学的に許容される塩又は立体異性体から選択され得る。

【００３７】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質－ポリカチオン複合体を含む。脂質－ポリカチオン複合体の形成は、当該技術分野で既知の方法によって、及び／又は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１２０１７８７０２号に記載されている方法によって達成され得る。非限定的な例として、ポリカチオンは、例えば、ポリリジン、ポリオルニチン及び／又はポリアルギニン等であるがこれらに限定されないカチオン性ペプチド又はポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、組成物は、脂質－ポリカチオン複合体を含み得、これは、コレステロール又はジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）等であるがこれらに限定されない非カチオン性脂質を更に含み得る。

【００３８】

様々な態様において、カチオン性リポソームは、任意選択で、非カチオン性脂質を含まない。中性分子は、いくつかの態様では、サイズが２００ｎｍを超えるＲＮＡ／ＤＮＡ負

荷リポソームをもたらす多層ＮＰのコイル化／凝縮を妨害し得る。ヘルパー分子なしで生成されるカチオン性リポソームは、約７０～２００ｎｍ（又はそれ未満）のサイズを含み得る。これらの構築物は、負に帯電した核酸を有するカチオン性脂質からなり、粒子の酸化（周囲環境に曝露された場合）を防ぐ密封されたロータリー真空エバポレーターで製剤化され得る。この実施形態では、ヘルパー脂質が存在しないことにより、各ＮＰが粒子当たりにより多くの量の核酸を含む密にパッケージ化された多層ＮＰへのｍＲＮＡコイル形成が最適化される。粒子当たりの核酸ペイロードが増加されるため、これらの多層ＲＮＡ－ＮＰは、免疫系を調節するための有効性の重要な予測因子である、顕著に大きな自然免疫応答を駆動する。

【００３９】

本開示されるナノ粒子は、正に帯電した表面と、（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含み、各核酸層がカチオン性脂質二重層の間に配置されている。核酸層は核酸分子を含む。

【００４０】

いくつかの態様では、核酸分子は、約１対約５～約１対約２５、例えば約１対約５～約１対約２０、任意選択で約１対約１８、約１対約１７、約１対約１５、約１対約１０、又は約１対約７．５の核酸分子：カチオン性脂質比で存在する。本明細書で使用される場合、「核酸分子：カチオン性脂質比」という用語は、質量比を意味し、ここで、核酸分子の質量は、カチオン性脂質の質量に対して相対的である。また、例示的な態様では、「核酸分子：カチオン性脂質比」という用語は、本開示のＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰを作製するプロセス中にカチオン性脂質を含むリポソームに添加される核酸分子、例えば、ＲＮＡの質量の比率を意味する。例示的な態様では、ナノ粒子は、１５０μｇの脂質混合物当たり約１０μｇ未満又は約１０μｇのＲＮＡ分子を含む。例示的な態様では、ナノ粒子は、約１０μｇのＲＮＡを約１５０μｇ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、ナノ粒子は、脂質混合物の質量当たりより多くのＲＮＡ分子を含む。例えば、ナノ粒子は、１５０μｇのリポソーム当たり１０μｇ超のＲＮＡ分子を含み得る。いくつかの例では、ナノ粒子は、１５０μｇのリポソーム又は脂質混合物当たり１５μｇ超のＲＮＡ分子を含む。

【００４１】

様々な態様において、核酸分子は、ＲＮＡ分子、例えば、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、及び／又はメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。様々な態様において、ＲＮＡ分子は、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｍＲＮＡ、又はそれらの組合わせを含む。様々な態様において、ＲＮＡは細胞から単離された全ＲＮＡである。例示的な態様では、ＲＮＡは、例えば、腫瘍細胞又は癌細胞又は感染細胞等の罹患細胞から単離された全ＲＮＡである。全腫瘍ＲＮＡを取得する方法は、当該技術分野で既知であり、本明細書中の実施例１に記載され、ナノ粒子に組み込むための核酸を取得する方法の実施例を表す。

【００４２】

例示的な例では、ＲＮＡ分子は、ｍＲＮＡである。様々な態様において、ｍＲＮＡは、インビトロ転写されたｍＲＮＡである。様々な例において、ｍＲＮＡ分子は、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって生成される。ＩＶＴを実施するための好適な技術が、当該技術分野で既知である。例示的な態様では、ＩＶＴキットが使用される。例示的な態様では、キットは、１つ以上のＩＶＴ反応試薬を含む。本明細書で使用される場合、「インビトロ転写（ＩＶＴ）反応試薬」という用語は、ＩＶＴ反応で機能する任意の分子、化合物、因子、又は塩を指す。例えば、キットは、外因性ＤＮＡテンプレートからタンパク質を合成するための真核生物又は原核生物抽出物を伴う原核生物ファージＲＮＡポリメラーゼ及びプロモーター（Ｔ７、Ｔ３、又はＳＰ６）を含み得る。

【００４３】

例示的な態様では、ＲＮＡは、インビトロ転写されたｍＲＮＡであり、インビトロ転写テンプレートは、ウイルス又は感染細胞から抽出されたＲＮＡから作製されたｃＤＮＡで

ある。

【００４４】

様々な態様において、癌の治療において、本開示のナノ粒子は有用であり、これらの実施形態において、ナノ粒子は任意選択で、ヒトの腫瘍、任意選択で、悪性脳腫瘍、任意選択で、膠芽腫、髄芽腫、びまん性内因性橋神経膠腫、又は中枢神経系への転移性浸潤を伴う末梢腫瘍から単離されたＲＮＡであるＲＮＡの混合物を含む。

【００４５】

様々な態様において、ＲＮＡは、ポリ（Ａ）テールをコードする配列を含み、その結果、インビトロ転写されたＲＮＡ分子は、３’末端にポリ（Ａ）テールを含む。様々な態様において、ナノ粒子を作製する方法は、例えば、インビトロ転写されたＲＮＡ分子をキャッピングする等の追加の処理工程を含む。

【００４６】

様々な態様において、本開示のナノ粒子は、ウイルスによって発現されるタンパク質をコードするＲＮＡを含む。例示的な態様では、ＲＮＡは、ウイルスによって発現されるタンパク質、例えばウイルスタンパク質をコードするｍＲＮＡである。例示的な態様では、ウイルスタンパク質は、ニドウイルス目（Ｎｉｄｏｖｉｒａｌｅｓ）、任意選択で、Ｃｏｒｎｉｄｏｖｉｒｉｎａｅａのウイルスによって発現される。例示的な態様では、ウイルスタンパク質は、コロナウイルス科ファミリ、任意選択で、Ｏｒｔｈｏｃｏｒｎｏａｖｉｒｉｎａｅサブファミリーのウイルスによって発現される。例示的な例では、ウイルスタンパク質は、ベータコロナウイルス属、任意選択で、サルベコウイルスサブファミリーのウイルスによって発現される。様々な態様において、ウイルスタンパク質はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２種によって発現される。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、コウモリコロナウイルスと遺伝的類似性を持つポジティブセンスの一本鎖ＲＮＡウイルスであり、２０２０年１月に中国の武漢の患者から初めて単離された（Ｈｕｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ９１：２６４－２６６（２０２０））。

【００４７】

任意選択で、ウイルスタンパク質は、ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２ウイルスによってコードされ、発現されるもの、例えば、ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２タンパク質である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の完全なゲノム配列は、アメリカ国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のウェブサイト（ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）のＧｅｎＢａｎｋデータベースで、オンラインで公開されている。例示的なゲノム配列には、以下のＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号を有するものが含まれる：ＭＮ９８８６６８、ＮＣ＿０４５５１２）、ＭＮ９３８３８４．１、ＭＮ９７５２６２．１、ＭＮ９８５３２５．１、ＭＮ９８８７１３．１、ＭＮ９９４４６７．１、ＭＮ９９４４６８．１、ＭＮ９９７４０９．１、ＭＮ９８８６６８。ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿０４５５１２の完全なゲノム配列、及びコードされたタンパク質のアミノ酸配列は、本明細書に提供される配列表に提供される。図２０は、配列表の様々な配列を列挙する表を提供する。例示的な態様では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、スパイクタンパク質、膜タンパク質、エンベロープタンパク質、又はヌクレオキャプシドタンパク質である。例示的な態様では、ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２タンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質又はその断片である。例示的な実施形態では、本開示のＮＰは、ＲＮＡ分子の混合物を含む。例示的な態様では、ＲＮＡ分子の混合物は、Ｓタンパク質又はその一部をコードするｍＲＮＡを含む。例示的な例では、ＲＮＡ分子の混合物は、ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２ゲノムによってコードされる他のタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。適切なＳＡＲＳ ＣｏＶ－２タンパク質には、ＯＲＦ１ａｂポリタンパク質（ＱＩＱ５００９１．１）、ＯＲＦ３ａタンパク質（ＱＩＱ５００９３．１）、エンベロープタンパク質（ＱＩＱ５００９４．１）、膜糖タンパク質（ＱＩＱ５００９５．１）、ＯＲＦ６タンパク質（ＱＩＱ５００９６．１）、ＯＲＦ７ａタンパク質（ＱＩＱ５００９７．１）、ＯＲＦ８タンパク質（ＱＩＱ５００９８．１）、ヌクレオキャプシドタンパク質（ＱＩＱ５００９９．１）、及びＯＲＦ１０タンパク質（ＱＩ

Ｑ５０１００．１）が含まれるが、これらに限定されない。
【００４８】
様々な例において、ｍＲＮＡは、配列表に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な態様において、ヌクレオチド配列はアミノ酸配列をコードし、配列表に記載されているアミノ酸配列に対して、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８５％、少なくとも９０％、又は９０％を超える配列同一性（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％）を有する。様々な態様において、ヌクレオチド配列は、１～１０個のアミノ酸置換、例えば、約１～９個、約１～８個、約１～７個、約１～６個、約１個～５個、約１個～４個、約１個～３個、約１個～２個のアミノ酸置換、又は１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０のアミノ酸置換を有する配列表に示されるアミノ酸配列をコードする。あるいは、ｍＲＮＡは、配列表に提供されるヌクレオチド配列を含む。様々な態様において、ＮＰペイロードのヌクレオチド配列は、配列表に記載されているヌクレオチド配列に対して、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８５％、少なくとも９０％、又は９０％を超える配列同一性（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％）を有する。あるいは、ｍＲＮＡは、配列表に示されるＤＮＡ配列によってコードされる。
【００４９】
様々な態様において、ナノ粒子は、ウイルスタンパク質又はウイルスタンパク質の混合物をコードするヌクレオチド配列を含むＲＮＡ分子、及び３’末端にポリ（Ａ）テールを含む。様々な例において、ナノ粒子は、本質的に図１９に示されるようなＲＮＡ分子を含み、任意選択で、図２０で参照される配列を含む。
【００５０】
様々な態様において、本開示のナノ粒子のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）によってコードされるウイルスタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の全長スパイク（Ｓ）タンパク質である。例示的な例では、ウイルスタンパク質は、配列番号３の配列、又は配列番号３と少なくとも７５％同一である配列（例えば、配列番号３と少なくとも８０％同一、配列番号３と少なくとも８５％同一、配列番号３と少なくとも９０％同一、配列番号３と少なくとも９５％同一、配列番号３と少なくとも９８％同一、又はそれを超えて同一）を含む。様々な態様において、ｍＲＮＡは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の全長スパイク（Ｓ）タンパク質をコードするｃＤＮＡ配列のインビトロ転写産物である。様々な態様において、ｍＲＮＡは、配列番号３の配列又は配列番号３と少なくとも７５％同一である配列（例えば、配列番号３と少なくとも８０％同一、配列番号３と少なくとも８５％同一、配列番号３と少なくとも９０％同一、配列番号３と少なくとも９５％同一、配列番号３と少なくとも９８％同一、又はそれを超えて同一）を有するウイルスタンパク質をコードするｃＤＮＡ配列のインビトロ転写産物である。様々な態様において、ｍＲＮＡは、図２２に示されるｐＧＥＭ４ｚ－ＳｐｉｋｅのｃＤＮＡ配列又はそれに非常に類似する配列（例えば、少なくとも９０％同一）のインビトロ転写産物である。例示的な例では、本開示のナノ粒子は、図２２に示されるｐＧＥＭ４ｚ－ＳｐｉｋｅのｃＤＮＡ配列又はそれに非常に類似した配列によってコードされるｍＲＮＡを含む。様々な態様において、ナノ粒子は、配列番号２３～３１に示される配列を含む。
【００５１】
様々な例において、ウイルスタンパク質をコードするＲＮＡは、リソソーム関連膜タンパク質（ＬＡＭＰ）をコードするＲＮＡに融合される。ＬＡＭＰは、プロリンリッチヒンジ領域、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインによって分離された相同なリソソーム管腔ドメインを含む、リソソームに特異的な膜タンパク質である。ＬＡＭＰに関するレビューは、Ｓｃｈｗａｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒａｆｆｉｃ（２０１３）ｋｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１１１／ｔｒａ．１２０５６に提供されている。特定の態様では、ＬＡＭＰタンパク質は、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、ＬＡＭＰ３、ＬＡＭＰ４、又はＬＡＭＰ５タンパク質で

ある。そのようなＬＡＭＰタンパク質の配列は、当技術分野で知られている。例えば、ＬＡＭＰ１前駆体のｍＲＮＡ配列は、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００５５６１．４として入手可能であり、ＬＡＭＰ１前駆体のアミノ酸配列はＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００５５５２．３として入手可能である。また、例えば、ＬＡＭＰ２アイソフォームＣ前駆体のｍＲＮＡ配列は、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿００１１２２６０６．１として入手可能であり、ＬＡＭＰ２アイソフォームＣ前駆体のアミノ酸配列は、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１１１６０７８．１として入手可能である。ＬＡＭＰ３前駆体のｍＲＮＡ配列はＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿０１４３９８．４として入手可能であり、ＬＡＭＰ３前駆体のアミノ酸配列はＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０５５２１３．２として入手可能である。前述のアクセッション番号の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【００５２】

ナノ粒子は、例えば、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０／４２６０６号に更に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、これは特に、正に帯電した表面と、コア及び少なくとも２つの核酸層を含む内部と、を含むナノ粒子であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層の間に位置する、ナノ粒子、及び製造方法に関する。

【００５３】

作製方法

【００５４】

本開示はまた、正に帯電した表面並びに（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含む内部を含むナノ粒子を作製する方法であって、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置される方法を提供し、当該方法は、（Ａ）核酸分子及びリポソームを、例えば約１対５～約１対約２０等の約１対約５～約１対約２５の比率、任意選択で、約１対約１５の核酸（例えば、ＲＮＡ）：本明細書に記載のリポソーム比で混合して、核酸（例えば、ＲＮＡ）被覆リポソームを得ることを含む。リポソームは、カチオン性脂質及び有機溶媒を含む脂質混合物を真空下で有機溶媒を蒸発させることによって乾燥させること、並びに（Ｂ）ＲＮＡ被覆リポソームを余剰量のリポソームと混合することを含むリポソームを作製するプロセスによって作製される。

【００５５】

例示的な態様では、ここで開示される方法によって作製されたナノ粒子は、本明細書に記載されるここで開示されるナノ粒子の説明と一致する。例えば、ここで開示される方法によって作製されたナノ粒子は、約＋４０ｍＶ～約＋６０ｍＶ、任意選択で、約＋４５ｍＶ～約＋５５ｍＶのゼータ電位を有する。任意選択で、ここで開示される方法によって作製されたナノ粒子のゼータ電位は、約＋５０ｍＶである。様々な態様において、本開示の方法によって作製されたナノ粒子のコアは、約０．５重量％未満の核酸を含み、かつ／又はコアは、カチオン性脂質二重層を含み、かつ／又はナノ粒子の最外層は、カチオン性脂質二重層を含むか、かつ／又は、ナノ粒子の表面は、カチオン性脂質二重層のカチオン性脂質の複数の親水性部分を含む。

【００５６】

例示的な態様では、脂質混合物は、カチオン性脂質及び有機溶媒を、１ｍＬの有機溶媒当たり約４０ｍｇのカチオン性脂質～１ｍＬの有機溶媒当たり約６０ｍｇのカチオン性脂質の比率、任意選択で、有機溶媒１ｍＬ当たり約５０ｍｇのカチオン性脂質の比率で含む。様々な例において、リポソームを作製するプロセスは、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し、次に再水和脂質混合物を撹拌、休止、及びサイジングすることを更に含む。任意選択で、再水和脂質混合物のサイジングは、再水和脂質混合物を超音波処理、押し出し、及び／又は濾過することを含む。

【００５７】

正に帯電した表面並びに（ｉ）コア及び（ｉｉ）少なくとも２つの核酸層を含み、各核酸層がカチオン性脂質二重層間に配置される内部を含むナノ粒子を作製する例示的な方法は、本明細書、実施例１で説明される。実施例１に記載されている工程のいずれか１つ以

上を、ここで開示される方法に含めることができる。例えば、いくつかの実施形態では、この方法は、リポソームと複合体を形成する前にＲＮＡを調製するために必要とされる１つ以上の工程を含む。例示的な態様では、この方法は、対象、例えば、ヒトに投与するためのナノ粒子を調製するための下流の工程を含む。例示的な例では、この方法は、静脈内注射用のＮＰを処方することを含む。この方法は、様々な態様において、１つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を添加することを含み、任意選択で、得られた組成物を容器、例えば、バイアル、注射器、バッグ、アンプル等に包装することを含む。いくつかの態様における容器は、すぐに使用できる容器であり、任意選択で、使い捨て用である。

【００５８】

本明細書では、ここで開示されるナノ粒子の作製方法によって作製されたナノ粒子が更に提供される。

【００５９】

細胞及びそれらの集団

【００６０】

加えて、本明細書では、本開示のナノ粒子を含む（例えば、これでトランスフェクトされた）細胞（例えば、単離された細胞又はエクスビボ細胞）が提供される。例示的な態様では、細胞は、本開示のナノ粒子を含有し得る任意の型の細胞である。いくつかの態様における細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、又は藻類である。代替的な態様では、細胞は、原核細胞、例えば、細菌又は原生動物である。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、接着細胞又は浮遊細胞、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、リポ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」又は「ＡＰＣ」は、特定のＴ細胞による認識のために抗原をプロセシングし、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、又は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、対象に対して同種異系である。

【００６１】

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。

【００６２】

また、本開示により、細胞の集団であって、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％、又は少なくとも９５％が、本開示のナノ粒子を含む（例えば、このナノ粒子でトランスフェクトされた）細胞である、細胞の集団が提供される。いくつかの態様における細胞の集団は、不均一な細胞集団であるか、代替的に、いくつかの態様では、実質的に均一な集団であり、この集団は、本開示のナノ粒子を含む細胞を主に含む。

【００６３】

医薬組成物

【００６４】

本明細書において、本開示のナノ粒子、本開示のナノ粒子を含む細胞、本開示の細胞の集団、又はそれらの任意の組合わせ、及び薬学的に許容される担体、賦形剤若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、本開示による複数のナノ粒子及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を含み、ヒトへの投与を目的とする医薬組成物である。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、本開示の複数のナノ粒子を含む。任意選択で、複数のうちの少なくとも５０％

のナノ粒子は、約１００ｎｍ～約２５０ｎｍの直径を有する。様々な態様において、組成物は、１ｍＬ当たり約10^{10}ナノ粒子～１ｍＬ当たり約10^{15}ナノ粒子、任意選択で、１ｍＬ当たり約10^{12}ナノ粒子±１０％を含む。

【００６５】

例示的な態様では、本開示の組成物は、ナノ粒子、ナノ粒子を含む細胞、又は細胞の集団以外の、追加の成分を含み得る。組成物は、様々な態様において、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、パスティル基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、保存剤、封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、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、又は湿潤剤、を含む、任意の薬学的に許容される成分を含む。例えば、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組み込まれる）、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組み込まれる）を参照されたい。

【００６６】

本開示の組成物は、非経口及び皮下経路を含む、任意の許容可能な経路による投与に好適であることができる。他の経路としては、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、節内及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。

【００６７】

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され得る。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、又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、又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、又は投与前に再構成又は希釈される形態（例えば、凍結乾燥された）のいずれかで保存され得る。

【００６８】

使用

【００６９】

特定の理論に拘束されることなく、本明細書で初めて開示されるデータは、対象のＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２ウイルスに対する免疫応答を誘導及び増加させるための、本明細書で開示されるＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの使用を支持する。図２１に示すように、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードするＲＮＡを含む多層ＲＮＡナノ粒子（ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ）をワクチン接種したマウスでは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで処理されていないマウスで増加するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に特異的なメモリーＴ細胞の数と比較して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に特異的なエフェクターメモリーＴ細胞の数が増加する。したがって、対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する免疫応答を誘発又は増加させる方法が、本開示によって提供される。例示的な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を対象に投与することを含む。例示的な態様では、核酸分子はｍＲＮＡである。任意選択で、組成物は、対象に全身投与される。例えば、組成物は、静脈内投与される。様々な態様において、医薬組成物は、対象の樹状細胞（ＤＣ）を活性

化するのに有効な量で投与される。様々な例において、免疫応答は、例えば中和抗体等の抗体の産生を含む、Ｂ細胞媒介性免疫応答である。様々な例において、免疫応答は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質に特異的な抗体、任意選択で、ＩｇＭ及び／又はＩｇＧ抗体の産生の増加を伴う。様々な例において、免疫応答は、Ｔ細胞媒介性免疫応答、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞媒介性免疫応答である。任意選択で、Ｔ細胞媒介性免疫応答は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に特異的なエフェクターメモリーＴ細胞の増加を含む。様々な態様において、Ｔ細胞媒介性免疫応答は、ＣＤ３＋ＣＤ８＋ＣＤ４４＋細胞の増加を含む。例示的な態様では、免疫応答は、自然免疫応答である。任意選択で、免疫応答は、顆粒球、単球、マクロファージ、及びナチュラルキル（ＮＫ）細胞のうちの１つ以上が関与する自然免疫応答である。様々な態様で、現在開示されている多層ＲＮＡ　ＮＰは、対象のＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２ウイルスに対する免疫応答を誘導又は増加させるために対象に投与され、ＤＣは活性化されるか、Ｂ細胞はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和抗体を産生するか、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に特異的なエフェクターメモリーＴ細胞の数が増加するか、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する自然免疫応答が活性化されるか、又はそれらの組合わせである。任意選択で、本明細書で開示される多層ＲＮＡ　ＮＰは、ＩＦＮ－αレベル又は他のＩ型インターフェロンを増加させるために対象に投与される。

【００７０】

また、本明細書に提供されるデータは、対象における樹状細胞（ＤＣ）活性化を増加させるための本開示のＲＮＡ　ＮＰの使用を裏付ける。したがって、対象においてＤＣを活性化するか、又はＤＣ活性化を増加させる方法が更に提供される。例示的な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を対象に投与することを含む。例示的な態様では、核酸分子はｍＲＮＡである。任意選択で、組成物は、対象に全身投与される。例えば、組成物は、静脈内投与される。様々な態様において、医薬組成物は、対象の腫瘍に対する免疫応答を増加させるのに有効な量で投与される。様々な例において、免疫応答は、Ｔ細胞媒介性免疫応答である。例示的な態様では、免疫応答は、自然免疫応答である。

【００７１】

任意選択で、本開示の様々な態様において、Ｔ細胞媒介性免疫応答は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）による活性を含む。

【００７２】

本明細書で使用される場合、「増加する」という用語及びそれから派生する語は、１００％又は完全な増加ではない場合がある。むしろ、当業者が潜在的な利点又は治療効果を有すると認識する様々な程度の増加がある。例示的な実施形態では、この方法により提供される増加は、少なくとも又は約１０％の増加（例えば、少なくとも又は約２０％の増加、少なくとも又は約３０％の増加、少なくとも又は約４０％の増加、少なくとも又は約５０％の増加、少なくとも又は約６０％の増加、少なくとも又は約７０％の増加、少なくとも又は約８０％の増加、少なくとも又は約９０％の増加、少なくとも又は約９５％の増加、又は少なくとも又は約９８％の増加）である。様々な態様において、「増加」は、本開示のナノ粒子を投与しない（例えば、投与前に）ベースライン測定値（例えば、ベースライン免疫、感受性、又は活性化）に関連する。

【００７３】

本開示はまた、対象の肺に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、この方法は、ここで開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。本明細書では、肺の細胞にＲＮＡを送達する方法であって、本開示の組成物を静脈内投与することを含み、組成物は、ナノ粒子を含む、方法が提供される。また、本明細書では、肺の細胞にＲＮＡを送達する方法が提供される。例示的な実施形態では、この方法は、本開示の組成物を全身（例えば、静脈内）投与することを含み、組成物は、ナノ粒子を含む。本開示はまた、肺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、この方法は、ここで開示された組成物を全身（例えば、静脈内）投与することを含み、組成物は、ＮＰを含む。様々な実施形態において、ナノ粒子は、吸入又は鼻腔内投与によって対象に投与される。

【００７４】
例示的な実施形態では、本明細書に記載の方法は、本開示の組成物を、対象の疾患又は障害を治療するか、又は所望の生物学的効果（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫応答）を達成するのに有効な量で投与することを含む。例えば、様々な態様において、ＲＮＡ－ＮＰは、樹状細胞（ＤＣ）を活性化するのに有効な量で投与される。治療薬の用量を表す１つの手段は、患者の体重又は質量（通常はｍｇ／ｋｇで表される）である。様々な態様において、投与されるナノ粒子の量は、約０．０００５０ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ等のＲＮＡ）を対象に投与するのに十分である（すなわち、医薬組成物の用量は、約０．０００５０ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇの核酸を対象に送達する）。核酸は、対象に核酸を投与するために、任意の適切な量のリポソームにカプセル化され得る。上で説明したように、様々な実施形態において、核酸分子は、約１対約５～約１対約２５、例えば、約１対約５～約１対約２０、任意選択で、約１対約１８、約１対約１７、約１対約１５、約１対約１０、又は約１対約７．５の核酸分子：カチオン性脂質比でナノ粒子中に存在し得る。様々な態様において、投与のための核酸の量は、リポソーム材料（「ＬＰ」）の約０．００８ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇにカプセル化される。様々な態様において、医薬組成物の用量は、約０．０００６２５ｍｇ／ｋｇ～約０．０８ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ等のＲＮＡ）を含み、これは任意選択で約０．００９３７５ｍｇ／ｋｇ～約１．２ｍｇ／ｋｇのＬＰにカプセル化される。本開示の文脈で使用するのに適した用量の例には、約０．００９３７５ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．０００６２５ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、約０．０１８７５ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．００１２５ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、約０．０３７５ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．００２５ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、約０．０７５ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．００５ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、０．１５ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．０１ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、約０．３ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．０２ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、約０．６ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．０４ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）、及び１．２ｍｇ／ｋｇのＬＰに任意選択でカプセル化されていてもよい約０．０８ｍｇ／ｋｇの核酸（例えば、ｍＲＮＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

【００７５】
ナノ粒子又は組成物は、特定の実施形態に適した任意の治療レジメンに従って投与することができる。特定の患者のために選択された治療レジメンに応じて、用量の投与の間隔をあけて、ナノ粒子又は組成物の複数用量を投与することが有利であり得る。ナノ粒子又は組成物は、約１８ヶ月以下、約１６ヶ月以下、約１４ヶ月以下、又は約１年（１２ヶ月以下）以下（例えば、約９ヶ月以下、約６ヶ月以下、又は約３ヶ月以化）の期間にわたって、定期的に投与され得る。投与レジメンの例には、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）、週に３回、週に２回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、毎週（つまり、週に１回）、２週間毎、３週間毎、毎月、又は隔月の用量を投与することを含む。様々な態様において、ナノ粒子又は組成物の用量は、週１回対象に投与される。様々な態様において、ナノ粒子又は組成物の用量は、約２週間毎に（すなわち、約１４日毎に）対象に投与される。様々な態様において、ナノ粒子又は組成物の用量は、対象に約１ヶ月に１回（すなわち約３０日毎）投与される。

【００７６】
様々な態様において、治療レジメンは、最初の治療期間にわたってナノ粒子又は組成物をより頻繁に投与し、その後、より長い期間にわたって間隔をあけて投与することを含む。例えば、用量は、約２週間、約４週間、約６週間、約８週間、約１０週間、又は約１２週間の初期治療期間にわたって投与され得、その間、複数用量は、例えば、週に１回又は２週間毎に投与される。治療レジメンは次いで、その後の治療期間を含んでもよく、この

場合、複数容量は、例えば、２週間毎、３週間毎、４週間毎（すなわち月１回）、５週間毎、６週間毎等、投与間のより長い間隔で投与される。その後の治療期間は、約４週間、約５週間、約６週間、約７週間、約８週間、約３ヶ月、約４ヶ月、約５ヶ月、約６ヶ月、約７ヶ月、約８ヶ月、約９ヶ月、約１０ヶ月、約１１ヶ月、約１２ヶ月、又はそれを超えるものを含み得る。最初の治療期間とその後の治療期間との長さは、同じであっても同じでなくてもよい（最初の治療期間とその後の治療期間との間隔は異なるであろう）。本開示の例示的な態様では、ナノ粒子又は組成物の用量は、約４週間の初期治療期間（合計３回の初期用量）の間、約２週間毎に投与され、その後、ナノ粒子又は組成物の用量が、約１２ヶ月の期間月に約１回投与される。

【００７７】

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、細胞を本開示のＮＰとインキュベートすることを含む。例示的な例では、細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、任意選択で、樹状細胞（ＤＣ）である。様々な例において、ＡＰＣ（例えば、ＤＣ）は、対象から得られる。特定の態様において、ＲＮＡ分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質、例えば、スパイクタンパク質、膜タンパク質、エンベロープタンパク質、若しくはヌクレオキャプシドタンパク質、又はそれらの組合わせをコードする。実際、本開示の任意の態様において、ＮＰは、異なる標的抗原をコードする異なるＲＮＡ分子の集団を含み得る。

【００７８】

ＲＮＡが細胞に送達されると、細胞は、疾患（例えば、感染症）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。いくつかの態様では、ＲＮＡ分子は、エクスビボで細胞に送達され、細胞は、対象に投与される。代替的に、本方法は、リポ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。例示的な態様において、疾患はＣＯＶＩＤ－１９である。例示的な態様では、組成物は、リポソームを含み、任意選択で、リポソームを含む組成物は、対象に静脈内投与されるか、あるいは吸入又は鼻腔内投与される。代替的な態様では、組成物は、リポソームでトランスフェクトされた細胞を含む。任意選択で、組成物の細胞は、ＡＰＣであり、任意選択で、ＤＣである。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、任意選択で、ＷＢＣは、白血球除去を介して得られる。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「治療する」という用語、並びにそれに関連する語は、必ずしも１００％又は完全な治療を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有するものとして認識する様々な程度の治療がある。この点で、本開示の疾患を治療する方法は、任意の量又は任意のレベルの治療を提供し得る。更に、本方法によって提供される治療は、治療される疾患の１つ以上の状態又は症状又は兆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又は軽減し得る。ＣＯＶＩＤ－１９の症状の例には、例えば、発熱又は悪寒、咳、息切れ又は呼吸困難、疲労、体の痛み、頭痛、味覚又は嗅覚の喪失、喉の痛み、鼻づまり又は鼻水、吐き気、嘔吐、及び下痢が含まれる。「治療」には、ウイルス量の減少も含まれる。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。

【００８０】

「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又は再発を遅延させ得る。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、又はそれ以上遅延させる。予防的治療には、疾患のリスクを軽減すること（すなわち、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の生産的感染のリスクを軽減すること）が含まれる。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、又はそれ以上、低減する。
【００８１】
特定の態様において、疾患を治療する方法は、疾患又はその症状を阻害する方法と見なされ得る。本明細書で使用される場合、「阻害する」という用語及びそれから派生する語は、１００％又は完全な阻害ではない場合がある。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有するものとして認識する様々な程度の阻害がある。ここで開示される方法は、疾患又はその症状の発症又は再発を、任意の量又はレベルまで阻害し得る。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、少なくとも又は約１０％の阻害（例えば、少なくとも又は約２０％の阻害、少なくとも又は約３０％の阻害、少なくとも又は約４０％の阻害、少なくとも又は約５０％の阻害、少なくとも又は約６０％の阻害、少なくとも又は約７０％の阻害、少なくとも又は約８０％の阻害、少なくとも又は約９０％の阻害、少なくとも又は約９５％の阻害、少なくとも又は約９８％の阻害）である。
【００８２】
前述の方法に関して、ＮＰ又はそれを含む組成物は、一部の態様で、対象に全身投与される。任意選択で、この方法は、非経口投与によるリポソーム又は組成物の投与を含む。様々な例において、リポソーム又は組成物は、対象に静脈内投与される。
【００８３】
対象
【００８４】
対象は、マウス及びハムスター等の齧歯目の哺乳動物、並びにウサギ等の兎形目の哺乳動物、ネコ科の動物（ネコ）及びイヌ科の動物（イヌ）を含む食肉目の哺乳動物、ウシ科の動物（ウシ）及びイノシシ科の動物（ブタ）を含む偶蹄目の哺乳動物、又はウマ科の動物（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哺乳動物である。いくつかの態様では、哺乳動物は、霊長目、Ｃｅｂｏｉｄ目又はＳｉｍｏｉｄ目（サル）に属するか、又は真猿亜目（ヒト及び類人猿）に属する。代表的な態様では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの態様では、ヒトは、１８歳以上の成人である。いくつかの態様では、ヒトは、１７歳以下の子供である。
【００８５】
癌に関連する本明細書に記載の方法の様々な態様において、対象は高リスク脳癌患者である。
【００８６】
様々な態様において、対象は、ＣＯＶＩＤ－１９と診断された、又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２への曝露のリスクがあるヒト対象である。様々な態様において、組成物は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による感染のリスクを低減する、又はウイルス力価を低減又は最小化する、感染時間を短縮する、及び／又はＣＯＶＩＤ－１９の症状の重症度を低減するのに有効な量で対象に提供される。
【００８７】
以下の実施例は、単に本発明を例示すために提供され、その範囲を如何様にも限定するためではない。
【実施例】
【００８８】
実施例１
【００８９】
この実施例は、本開示のナノ粒子を作製する方法を説明する。
【００９０】
ＤＯＴＡＰリポソームの調製
【００９１】
１日目に、ドラフト内で次の工程を実行した。ロータベーパー浴に水を加えた。クロロホルム（２０ｍＬ）を滅菌ガラスメスシリンダーに注いだ。１ｇのＤＯＴＡＰを含むバイアルを開けた後、ガラスピペットを使用して、５ｍＬのクロロホルムをＤＯＴＡＰバイア

ルに加えた。次に、一定量のクロロホルム及びＤＯＴＡＰを、１Ｌの蒸発フラスコに移した。２番目の体積５ｍＬのクロロホルムをＤＯＴＡＰバイアルに加えてバイアル中に残存するＤＯＴＡＰを溶解し、この量のクロロホルムをＤＯＴＡＰバイアルから蒸発フラスコに移すことによって、ＤＯＴＡＰバイアルを洗浄した。メスシリンダー内の全てのクロロホルムが使用されるまで、この洗浄工程を更に２回繰り返した。次に、蒸発フラスコをＢｕｃｈｉロータベーパーに入れた。水浴の電源を入れて、２５℃に調整した。蒸発フラスコを、水浴に触れるまで下に動かした。ロータベーパーの回転速度を、２に調整した。真空システムの電源を入れて、４０ｍｂａｒに調整した。１０分後、真空システムの電源を切り、クロロホルムをコレクターフラスコから収集した。採取したクロロホルムの量を測定した。一旦コレクターフラスコの位置を変えると、真空を再びオンにし、クロロホルムが完全に蒸発するまで、蒸発フラスコの内容物を一晩乾燥させた。

【００９２】

２日目に、滅菌メスシリンダーを使用して、ＰＢＳ（２００ｍＬ）を、室温に維持された新しい滅菌５００ｍＬのＰＢＳボトルに添加した。ＤＯＴＡＰを収集するために、２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを準備した。Ｂｕｃｈｉロータベーパー水浴を、５０℃に設定した。ＰＢＳ（５０ｍＬ）を、２５ｍＬの使い捨て血清ピペットを使用して、蒸発フラスコに加えた。蒸発フラスコをＢｕｃｈｉロータベーパーに配置し、フラスコの１／３が水浴に沈むまで、下に動かした。ロータベーパーの回転速度を２に設定し、１０分間回転させた後、回転を止めた。蒸発フラスコからのＤＯＴＡＰを含む５０ｍＬのＰＢＳを、２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルに移した。ＰＢＳボトル内のＰＢＳの全量が使用されるまで、この工程を（３回）繰り返した。２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルの最終容量は、４００ｍＬであった。２番目の５００ｍＬＰＢＳボトルの脂質溶液を３０秒間ボルテックスした後、５０℃で１時間インキュベートした。１時間のインキュベーションの間、ボトルを１０分毎にボルテックスした。２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを室温で一晩放置した。

【００９３】

３日目に、ＰＢＳ（２００ｍＬ）を、ＤＯＴＡＰ及びＰＢＳを含む２番目の５００ｍＬＰＢＳボトルに加えた。２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを、超音波浴に入れた。水を超音波浴に満たし、２番目の５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを５分間超音波処理した。押出機をＰＢＳ（１００ｍＬ）で洗浄し、この洗浄工程を繰り返した。０．４５μｍ孔のフィルターを濾過ユニットに取り付け、新しい（３番目の）５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを、押出機の出力チューブ内に配置した。生物学的安全キャビネット中で、３番目のＰＢＳボトルの約７０％が満たされるまで、ＤＯＴＡＰ－ＰＢＳ混合物を押出機にロードした。次に、押出機の電源を入れ、全ての混合物が押出機を通過するまで、ＤＯＴＡＰ　ＰＢＳ混合物を加えた。続いて、０．２２μｍ孔のフィルターを濾過ユニットに取り付け、新しい（３番目の）５００ｍＬ　ＰＢＳボトルを、押出機の出力チューブに配置した。以前にフィルタリングされたＤＯＴＡＰ－ＰＢＳ混合物をロードし、全体にわたって再度実行した。次に、ＰＢＳ中にＤＯＴＡＰ脂質ナノ粒子（ＮＰ）を含む試料を、４℃で保存した。

【００９４】

ＲＮＡ調製

【００９５】

ＮＰに組み込む前に、ＲＮＡを次のように調製する。

【００９６】

ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡの調製

【００９７】

プラスミド、例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター及びＲＮＡを分解から保護する長さ６４ヌクレオチドのポリＡテール（ｐＳＰ７３－Ｓｐｈ／Ａ６４）を含有する修飾ｐｓＰ７３ベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を得、全長ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡをコードするｃＤＮＡを含むように作製した。制限酵素（すなわち、ＳｐｅＩ）を使用してプラスミドを線形化し、Ｑｉａｇｅｎ　ＰＣＲ　Ｍｉｎ

ｉＥｌｕｔｅキットで精製した。続いて、製造元のプロトコルに従って、ｍＭＥＳＳＡＧＥ ｍＭＡＣＨＩＮＥ Ｔ７（商標）転写キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、線状化されたＤＮＡをインビトロで転写した。次に、転写されたｍＲＮＡをＲＮＡ Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してクリーンアップした。

【００９８】

例示的な態様では、ｍＲＮＡは、例えば、配列番号３のアミノ酸配列を含むＳタンパク質をコードする。例示的な態様では、スパイクタンパク質ｍＲＮＡをコードするｃＤＮＡは、図２２に示される一連の配列の一番上の行として示される配列を有した。例示的な態様では、Ｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の他のタンパク質をコードするｍＲＮＡ、例えば、本明細書に記載の又は当技術分野で知られているものと混合される。例示的な態様では、ｍＲＮＡは図１９に示される通りである。

【００９９】

実施例２～１０のためのＲＮＡの調製

【０１００】

ＮＰに組み込む前に、ＲＮＡを、いくつかの方法（Ａ）～（Ｃ）のうちの１つで調製した。全腫瘍ＲＮＡを、腫瘍細胞から全ＲＮＡ（ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｍＲＮＡを含む）を単離することによって調製した。全腫瘍ＲＮＡの逆転写によって生成されたｃＤＮＡテンプレートを使用してインビトロ転写反応を実行することにより、インビトロ転写されたｍＲＮＡを調製した。腫瘍抗原特異的及び非特異的ＲＮＡは、社内で作製するか、又は販売会社から購入した。

【０１０１】

（Ａ）全腫瘍ＲＮＡ：腫瘍細胞からの全腫瘍由来ＲＮＡ（例えば、Ｂ１６Ｆ０、Ｂ１６Ｆ１０、及びＫＲ１５８－ｌｕｃ）は、市販のＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、製造業者の説明書に基づいて単離した。

【０１０２】

（Ｂ）インビトロ転写されたｍＲＮＡ：簡単には、ＲＮＡは、製造業者の指示に従って市販のＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して単離し、ｃＤＮＡライブラリーは、ＲＴ－ＰＣＲによって生成した。ＳＭＡＲＴＳｃｒｉｂｅ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅキット（Ｔａｋａｒａ）を使用して、ｃＤＮＡライブラリーを生成するために、ＰＣＲによる逆転写酵素反応を、全腫瘍ＲＮＡに対して実行した。次に、得られたｃＤＮＡを、Ｔ７／ＳＭＡＲＴ及びＣＤＳ ＩＩＩプライマーを含むＴａｋａｒａ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ２Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｍｉｘを使用して増幅し、増幅サイクルの総数を、ゲル電気泳動で決定した。製造業者の指示に従って、Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲ精製キットを使用して、ｃＤＮＡの精製を行った。各ＲＮＡナノ粒子ワクチンで使用するのに十分なｍＲＮＡを単離するために、Ｔ７酵素ミックスを有するｍＭＥＳＡＧＥ ｍＭＡＣＨＩＮＥ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）キットを使用して、ｃＤＮＡライブラリー上でインビトロ転写を一晩行った。転写の忠実度を確保するため、ハウスキーピング遺伝子を評価した。次に、得られたｍＲＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙ Ｍａｘｉキットで精製して、最終的なｍＲＮＡ産物を得た。

【０１０３】

（Ｃ）腫瘍抗原特異的及び非特異的ｍＲＮＡ：

【０１０４】

腫瘍抗原特異的ＲＮＡ（例えば、ｐｐ６５、ＯＶＡをコードするＲＮＡ）及び非特異的ＲＮＡ（例えば、Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ（ＧＦＰ）、ルシフェラーゼをコードするＲＮＡ）をコードするＤＮＡを含むプラスミドを、制限酵素（すなわち、ＳｐｅＩ）を用いて線形化し、Ｑｉａｇｅｎ ＰＣＲ ＭｉｎｉＥｌｕｔｅキットで精製した。続いて、線形化されたＤＮＡを、ｍｍＲＮＡインビトロ転写キット（Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して転写し、ＲＮＡ Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してクリーンアップした。別の方法では、非特異的ＲＮＡは、Ｔｒｉｌｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、

ＣＡ）から購入する。
【０１０５】
多層ＲＮＡナノ粒子（ＮＰ）の調製
【０１０６】
ＤＯＴＡＰ脂質ＮＰをＲＮＡと複合体化して、正に帯電した表面及び空のコアを備えた密にコイル状のリポソーム内に含まれるｍＲＮＡのいくつかの層を持つように設計された多層ＲＮＡ－ＮＰを作成した（図１Ａ）。簡単に説明すると、安全キャビネット中で、ＲＮＡを－８０℃から解凍してから氷上に置き、ＰＢＳ及びＤＯＴＡＰを含む試料（ＤＯＴＡＰ脂質ＮＰ等）を室温に戻した。一旦成分を調製すると、滅菌チューブ内で、目的の量のＲＮＡをＰＢＳと混合した。ＲＮＡ及びＰＢＳの混合物を含む滅菌チューブに、適切な量のＤＯＴＡＰ脂質ＮＰを、物理的に混合せずに（例えば、チューブを逆さにせずに、ボルテックスせずに、攪拌せずに）添加した。ＲＮＡ、ＰＢＳ、及びＤＯＴＡＰの混合物を、約１５分間インキュベートして、多層ＲＮＡ－ＮＰを形成させた。１５分後、チューブを繰り返し反転させることにより、混合物を穏やかに混合した。次に、混合物を、全身（すなわち、静脈内）投与の準備ができていると見なした。
【０１０７】
上記の調製に使用されるＲＮＡ及びＤＯＴＡＰ脂質ＮＰ（リポソーム）の量を、事前に決定又は事前に選択する。いくつかの例では、約１μｇのＲＮＡ当たり約１５μｇのリポソームの比率が使用された。例えば、約５μｇのＲＮＡ当たり約７５μｇのリポソームが使用されるか、又は約２５μｇのＲＮＡ当たり約３７５μｇのリポソームが使用される。他の例では、１μｇのＲＮＡ当たり約７．５μｇのリポソームが使用された。したがって、例示的な例では、使用される全てのμｇのＲＮＡに対して、約１μｇ～約２０μｇのリポソームが使用される。
実施例２
【０１０８】
この例は、本開示のナノ粒子の特徴付けを説明する。
【０１０９】
極低温電子顕微鏡（ＣＥＭ）
【０１１０】
実施例１に記載のように調製された多層ＲＮＡ－ＮＰ並びに「ＲＮＡ調製」及び「多層ＲＮＡナノ粒子（ＮＰ）の調製」の工程以外は実施例１の全ての工程に従って作製したＲＮＡを含まない対照ＮＰ（未複合体化ＮＰ）の構造を、ＣＥＭを使用して分析した。ＣＥＭは、Ｓａｙｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ　１７（３）１３２６－１３３５（２０１６）に本質的に記載されているように実行した。簡単に説明すると、多層ＲＮＡ－ＮＰ又は対照ＮＰを含む試料を、Ｖｉｔｒｏｂｏｔ（及びクライオＴＥＭ用の自動プランジフリーザー、これは、温度、相対湿度、ブロッティング条件及び凍結速度を制御することにより、氷晶の形成なしに試料を凍結する）中にロードして瞬間冷凍する前に、氷上に保持する。次に、試料を、Ｇａｔａｎ　ＵｌｔｒａＳｃａｎ　４０００（４ｋｘ４ｋ）ＣＣＤカメラを備えたＴｅｃｎａｉ　Ｇ２　Ｆ２０　ＴＷＩＮ　２００ｋＶ／ＦＥＧ透過型電子顕微鏡で画像化した。得られるＣＥＭ画像を、図１Ｂに示す。右のパネルは、多層ＲＮＡ－ＮＰのＣＥＭ画像であり、左のパネルは対照ＮＰ（未複合体化ＮＰ）のＣＥＭ画像である。図１Ｂに示すように、対照ＮＰは最大２層を含んでいたが、多層ＲＮＡ　ＮＰは、複数の層を含んでいた。図５は、例示的な多層ＲＮＡ　ＮＰの別のＣＥＭ画像を示す。ここでは、脂質層と交互になっているＲＮＡ層の複数の層が特に明白である。
【０１１１】
ゼータ電位
【０１１２】
多層ＲＮＡ　ＮＰのゼータ電位は、Ｓａｙｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ　１７（３）１３２６－１３３５（２０１６）に本質的に記載されるように、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　ＺｅｔａＰｌｕｓ装置（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｃ

ｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｈｏｌｔｓｖｉｌｌｅ，ＮＹ）を用いて、位相分析光散乱（ＰＡＬＳ）によって測定した。簡単に説明すると、未複合体化ＮＰ又はＲＮＡ－ＮＰ（２００μＬ）をＰＢＳ（１．２ｍＬ）に再懸濁し、機器にロードした。試料を、試料毎に５回、各実行で２５サイクル、Ｓｍｏｌｕｃｈｏｗｓｋｉモデルを使用して実行した。

【０１１３】

実施例１に記載されるように調製された多層ＲＮＡ　ＮＰのゼータ電位を、約＋５０ｍＶで測定した。興味深いことに、多層ＲＮＡ　ＮＰのこのゼータ電位は、Ｓａｙｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　６（１）：ｅ１２５６５２７（２０１６）に記載されている、＋２７ｍＶ付近で測定されたものよりもはるかに高かった。特定の理論に縛られることなく、クロロホルムを蒸発させるための真空シール法を含む多層ＲＮＡ　ＮＰの作製に使用するためにＤＯＴＡＰ脂質ＮＰを作成する方法（実施例１）は、ＤＯＴＡＰ脂質ＮＰの少ない環境酸化をもたらし、これにより、より多量のＲＮＡがＤＯＴＡＰ　ＮＰと複合体を形成し、かつ／又はＤＯＴＡＰ脂質ＮＰへのＲＮＡの取り込みがより増加することが可能になり得る。

【０１１４】

ゲル電気泳動によるＲＮＡの取り込み：

【０１１５】

ＭＬリポソームに組み込まれたＲＮＡの量を測定するために、ゲル電気泳動実験を行った。この実験に基づき、実施例１に記載された手順で使用されたＲＮＡの、全てではないにしても、ほぼ全てが、ＤＯＴＡＰ脂質ＮＰに組み込まれたことが定性的に示された。ＲＮＡ取り込みの程度を特徴付ける追加の実験は、ＲＮＡ－ＮＰ密度を測定し、このパラメータをリポプレックスのパラメータと比較することによって実行される。

実施例３

【０１１６】

本実施例は、全身投与時のＲＮＡ－ＮＰのインビボ局在部位及びそのＲＮＡ　ＮＰが、ＤＣの末梢及び腫瘍内活性化を媒介することを示す。

【０１１７】

実施例１に本質的に記載されるように作製されたＤＯＴＡＰ脂質ＮＰを、ＣｒｅリコンビナーゼをコードするｍＲＮＡと複合体化して、Ｃｒｅをコードするｍ－ＮＰを作製する。これらの多層ＲＮＡ－ＮＰを、ｌｏｘＰが隣接するＳＴＯＰカセットを搭載したＡｉ１４トランスジェニックマウスに投与する。ＳＴＯＰカセットは、Ｃｒｅ－リコンビナーゼが発現するまで、ｔｄＴｏｍａｔｏの転写を防ぐ。ＲＮＡ－ＮＰを投与してから１週間後、トランスジェニックマウスのリンパ節、脾臓及び肝臓を採取し、切片化し、ＤＡＰＩで染色する。ｔｄＴｏｍａｔｏの発現を、Ｓａｙｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２０１８に本質的に記載されている手順に従って、蛍光顕微鏡で分析する。Ｃｒｅ－ｍＲＮＡ－ＮＰは、肝臓、脾臓、リンパ節等のリンパ器官にインビボで局在すると予想される。

【０１１８】

実施例１に本質的に記載されるように作製されたＤＯＴＡＰ脂質ＮＰを、非特異的ＲＮＡ（例えば、腫瘍抗原特異的ではなかったＲＮＡ、オボアルブミン（ＯＶＡ）ｍＲＮＡ）と複合体化させ、皮下Ｂ１６Ｆ１０腫瘍を有するＣ５７Ｂｌ／６マウス（ｎ＝３～４／群）に静脈内注射する。リンパ節、脾臓、肝臓、骨髄及び腫瘍を２４時間以内に採取し、ＣＤ１１ｃ細胞により（＊ｐ＜０．０５　Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）検定）、樹状細胞（ＤＣ）活性化マーカＣＤ８６の発現を分析する。ＯＶＡ　ｍＲＮＡ－ＮＰは、リンパ節、脾臓、肝臓、骨髄、及び腫瘍への広範なインビボ局在を示し、その中のＤＣを活性化すると予想される（ＣＤ１１ｃ＋細胞上での活性化マーカＣＤ８６の増加した発現によって示される）。活性化されたＤＣは抗原特異的Ｔ細胞応答を準備し、いくつかの腫瘍モデルで抗腫瘍効率（ＴＩＬの増加を伴う）につながるため、多層ＲＮＡ　ＮＰの抗腫瘍効果を試験した。

実施例４

【０１１９】
この実施例は、本開示のナノ粒子の、カチオン性ＲＮＡリポプレックス及びアニオン性ＲＮＡリポプレックスとの比較を記載する。
【０１２０】
カチオン性リポプレックス（ＬＰＸ）を、外表面上にある正味の正電荷によってシールドされた脂質コアのｍＲＮＡを使用して最初に開発した（図２Ａ）。アニオン性ＲＮＡリポプレックス（図２Ｂ）を、二層リポソームの表面につながれた過剰なＲＮＡを用いて開発した。ＲＮＡ及び脂質ＮＰを、電荷を均等化する比率で混合することによって、ＲＮＡ－ＬＰＸを作製した。ＲＮＡ及び脂質ＮＰを、負電荷を有する脂質ＮＰを過飽和させる比率で混合することによって、アニオン性ＲＮＡ－ＮＰを作製した。次に、ＲＮＡ－ＬＰＸ及びアニオン性ＲＮＡ　ＬＰＸの様々な態様を、上記の実施例に記載した多層ＲＮＡ　ＮＰと比較した。
【０１２１】
クライオ電子顕微鏡法（ＣＥＭ）を使用して、ＲＮＡ　ＬＰＸ及び実施例１に記載されているように調製された多層ＲＮＡ－ＮＰの構造を比較した。未複合体化ＮＰを、対照として使用した。ＣＥＭを、実施例２に本質的に記載されているように実施した。図２Ｃは、未複合体化ＮＰのＣＥＭ画像、図２Ｄは、ＲＮＡ　ＬＰＸのＣＥＭ画像（リポソームのＲＮＡに対するその質量比は３．７５：１である）、図２Ｅは、多層ＲＮＡ－ＮＰのＣＥＭ画像（リポソームのＲＮＡに対するその質量比は１５：１である）である。これらのデータは、ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰによってより多くのＲＮＡが保持されることを支持する。追加のデータは、ＲＮＡ　ＬＰＸに対してより多くのＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰ複合体化を有する濃縮液滴が、質量又は電荷で等量のＲＮＡ及び脂質ＮＰ（すなわち、それぞれＲＮＡ－ＬＰＸ及びアニオン性ＲＮＡ－ＬＰＸ）を単純に混合することによっては観察されないＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの多層形成を裏付けることを示す。このことは、ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰによってより多くのＲＮＡが「保持」されることを支持する。
【０１２２】
また、アニオン性ＬＰＸがマウスへの投与時にどこに局在するかを決定するために、実験を行った。図８に示すように、アニオン性ＬＰＸは、投与時に動物の脾臓に局在し、以前の研究と一致している（Ｋｒａｎｔｚ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　５３４：３９６－４０１（２０１６））。
【０１２３】
ＲＮＡ　ＬＰＸ、アニオン性リポプレックス（ＬＰＸ）、又は多層ＲＮＡ－ＮＰをマウスに投与し、活性化ＤＣの評価のために１週間後に脾臓を採取した（＊ｐ＜０．０５対応のないｔ検定）。この実験で使用したＲＮＡは、Ｋ７Ｍ２腫瘍骨肉腫細胞株に由来する腫瘍由来のｍＲＮＡであった。図２Ｆに示すように、多層ＲＮＡ　ＮＰで処置されたマウスは、最高レベルの活性化ＤＣを示した。
【０１２４】
アニオン性腫瘍ｍＲＮＡ－リポプレックス、腫瘍ｍＲＮＡ－リポプレックス、及び多層腫瘍ｍＲＮＡをロードしたＮＰを、治療用肺癌モデル（Ｋ７Ｍ２）で比較した（ｎ＝５～８／群）。各ワクチンを、毎週静脈内投与した（ｘ３）（＊＊ｐ＜０．０１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）。ＣＤ８＋脾細胞の％ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ＋を図２Ｇに示し、ＣＤ４＋脾細胞の％ＣＤ４４＋ＣＤ６２Ｌ＋を図２Ｈに示す。また、図２Ｊは、多層（ＭＬ）ＲＮＡ－ＮＰが、生来の抗ウイルスサイトカインである実質的に増加したＩＦＮ－αを媒介することを示す。このことは、ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰが、非抗原特異的ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰからでさえも有効性を促進するのに十分な、実質的により大きな自然免疫を可能にすることを示す。まとめると、これらの図は、アニオン性ＬＰＸ及びＲＮＡ　ＬＰＸと比較して、多層腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰの優れた有効性を示す。
【０１２５】
アニオン性腫瘍ｍＲＮＡ－リポプレックス、陽イオン性腫瘍ｍＲＮＡ－リポプレックス、及び多層腫瘍ｍＲＮＡをロードしたＮＰを、治療用肺癌モデル（Ｋ７Ｍ２）で比較した

（ｎ＝８／群）。各ワクチンを毎週静脈内投与した（ｘ３）、＊ｐ＜０．０５、Ｇｅｈａｎ　Ｂｒｅｓｌｏｗ－Ｗｉｌｃｏｘｏｎ検定。生存率を、Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ曲線分析によって測定した。図２Ｉに示すように、多層腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰは、カチオン性ＲＮＡリポプレックス及びアニオン性ＲＮＡリポプレックスと比較して、生存率を高めるための優れた有効性を媒介した。

【０１２６】

ここで、生理学的に関連する腫瘍抗原を標的とする多層ＲＮＡ－ＮＰ製剤は、アニオン性ＬＰＸ及びＲＮＡ　ＬＰＸと比較して、免疫原性が高く（図２Ｆ～図２Ｈ、図２Ｊ）、かつ、有意により有効である（図２Ｉ）ことが示されている。特定の理論に縛られることなく、ＲＮＡ－脂質比を変更し、ゼータ電位を上昇させることにより、緊密に巻かれたｍＲＮＡの多層リングで構成される新しいＲＮＡ－ＮＰデザインが開発された（図１Ｃ）が、この多層デザインは、粒子の免疫原性を高め、かつインビボ局在化を末梢及び腫瘍微小環境（ＴＭＥ）へ広げるために、ｍＲＮＡのＮＰ取り込みの増加（正／負の電荷を交互に繰り返すことによって濃縮される）を促進すると考えられる。これらの多層ＲＮＡ－ＮＰの全身投与は、リンパ節、細網内皮器官（すなわち、脾臓及び肝臓）並びにＴＭＥに局在化し、そこでＤＣを活性化する（ＣＤ１１ｃ＋細胞での活性化マーカＣＤ８６の発現の増加に基づいて）。これらの活性化されたＤＣは、抗原特異的Ｔ細胞応答を準備し、いくつかの腫瘍モデルで抗腫瘍効果（ＴＩＬの増加を伴う）をもたらす。

実施例５

【０１２７】

本実施例は、ＤＣを全身的に活性化し、抗原特異的免疫を誘導し、かつ抗腫瘍効果を引き出す多層ＲＮＡ－ＮＰの能力を示す。

【０１２８】

多層ＲＮＡ　ＮＰの効果を、２番目のモデルで試験した。ここでは、Ｋ７Ｍ２肺腫瘍を接種したＢＡＬＢ／ｃマウス（群当たり８匹のマウス）に、多層ＲＮＡ－ＮＰを週に３回ワクチン接種した。マウスの対照群は、未処置であった。腫瘍内メモリーＴ細胞の分析のために、３回目のワクチンの１週間後に肺を採取した（＊＊＊ｐ＜０．００１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）。図３Ａは、ＲＮＡ－ＮＰで処置された肺（左）及び未処置の肺（右）の写真のペアを提供する。図３Ｂは、未処置のマウス、ＧＦＰ　ＲＮＡで多層ＲＮＡ　ＮＰを処置したマウス、及び腫瘍特異的ＲＮＡで多層ＲＮＡ　ＮＰを処置したマウスの採取した肺の％中央メモリーＴ細胞（ＣＤ３＋細胞のＣＤ６２Ｌ＋ＣＤ４４＋）のグラフである。

【０１２９】

また、ＢＡＬＢ／ｃマウス又はＢＡＬＢ／ｃ　ＳＣＩＤ（Ｆｏｘ　Ｃｈａｓｅ）マウス（群当たり８匹のマウス）にＫ７Ｍ２肺腫瘍を接種し、ＧＦＰ　ＲＮＡ又は腫瘍特異的ＲＮＡを含む多層ＲＮＡ－ＮＰを、週に３回静脈内ワクチン接種した。マウスの対照群は、未処置であった。％生存率を、Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ曲線にプロットした（＊＊＊ｐ＜０．０００１、Ｇｅｈｅｎ－Ｂｒｅｓｌｏｗ－Ｗｉｌｃｏｘ）。図３Ｃに示すように、腫瘍特異的ＲＮＡを含む多層ＲＮＡ　ＮＰで処置されたＢＡＬＢ／ｃマウスの生存率は、３つの群の中で最も高かった。興味深いことに、ＧＦＰ　ＲＮＡを含む多層ＲＮＡ　ＮＰで処置されたＢＡＬＢ／ｃ　ＳＣＩＤ（Ｆｏｘ　Ｃｈａｓｅ）マウスの生存率は、腫瘍特異的ＲＮＡを含む多層ＲＮＡ　ＮＰで処置されたマウスとほぼ同じであった（図３Ｄ）。

【０１３０】

まとめると、図３Ａ～図３Ｄのデータは、ＧＦＰ　ＲＮＡ又は腫瘍特異的ＲＮＡを含むＲＮＡ－ＮＰによる単剤療法が、免疫担当動物及びＳＣＩＤマウスの転移性肺腫瘍に対する顕著な抗腫瘍効果を媒介することを示す。転移性肺腫瘍を有するＢＡＬＢ／ｃマウス（図３Ａ～図３Ｄ）では、ＧＦＰ（対照）及び腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰの両方が、自然免疫及び抗腫瘍活性を媒介する。ただし、腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰのみが、腫瘍内メモリーＴ細胞の増加及び長期サバイバーの転帰を媒介する（図３Ａ～図３Ｄ）。頭蓋内悪性腫瘍を有するマウスにおけるＲＮＡ－ＮＰの抗腫瘍活性もまた実証された（データは示されてい

ない）。

【０１３１】

これらのデータは、多層ＲＮＡ－ＮＰが全身的にＤＣを活性化し、抗原特異的免疫を誘導し、抗腫瘍効果を誘発することを示す。図３Ａ～図３Ｄは、対照ＲＮＡ－ＮＰが、腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰほど堅牢ではないいくつかの有効性で先天性応答を誘発することを示す。未処置のマウスと比較して、未複合体化ＮＰの効果は観察されていないが、多層ＲＮＡ　ＮＰに組み込まれた場合、非特異的（ＧＦＰ　ＲＮＡ）及び腫瘍特異的ＲＮＡの両方が自然免疫を媒介するが、ただし、腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰのみが長期的な生存の利益をもたらす適応免疫を誘発する（図３Ａ～図３Ｄ）。上記のデータは抗腫瘍応答に関するものであるが、データは、本開示のＲＮＡ－ＮＰが一般的に抗原特異的免疫を誘導する能力を示している。

実施例６

【０１３２】

この例は、パーソナライズされた腫瘍ＲＮＡ－ＮＰが、トランスレーショナルイヌモデルにおいて活性であることを示す。

【０１３３】

多層ＲＮＡ－ＮＰの安全性及び活性を、悪性神経膠腫又は骨肉腫と診断されたクライアント所有のイヌ（ペットのイヌ）で評価した。イヌの悪性神経膠腫又は骨肉腫を、最初に、パーソナライズされた腫瘍ＲＮＡ－ＮＰワクチンの生成のために生検した。

【０１３４】

パーソナライズされた多層ＲＮＡ　ＮＰを生成するために、各患者の生検から全ＲＮＡ材料を抽出した。次に、抽出した全ＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを調整し、次に、ｃＤＮＡライブラリーからｍＲＮＡを増幅した。次に、ｍＲＮＡをＤＯＴＡＰ脂質ＮＰと複合体化し、実施例１に実質的に記載されている多層ＲＮＡ－ＮＰにした。ＣＤ１１ｃ＋細胞上のＰＤ－Ｌ１、ＭＨＣＩＩ、ＣＤ８０、及びＣＤ８６を評価するために、ベースラインで採血し、次に、ワクチン接種の２時間後及び６時間後に採血した。ＰＤ－Ｌ１、ＭＨＣ－ＩＩ、ＰＤＬ１／ＣＤ８０、及びＰＤ－Ｌ１／ＣＤ８６のＣＤ１１ｃ発現を、イヌの最初の観察期間中に経時的にプロットする。ＣＤ３＋細胞を、イヌの最初の観察期間中にＣＤ４及びＣＤ８の割合について経時的に分析し、これらのサブセットを、活性化マーカ（すなわち、ＣＤ４４）の発現について評価した。これらのデータから、多層ＲＮＡ－ＮＰは、１）末梢ＤＣの活性化を示すＣＤ１１ｃ$^{+}$末梢血細胞上のＣＤ８０及びＭＨＣＩＩの増加、並びに２）活性化Ｔ細胞の増加を誘発することが示された。

【０１３５】

興味深いことに、投与後数時間以内に、腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰは、末梢血単核細胞の辺縁趨向を誘発し、この辺縁趨向は、治療後数日及び数週間で増加したが、このことは、ＲＮＡ－ＮＰが放出前に免疫細胞集団のリンパ球ホーニングを媒介することを示唆している。

【０１３６】

これらのデータは、パーソナライズされたｍＲＮＡ－ＮＰが、トランスレーショナルイヌ疾患モデルで安全かつアクティブであることを示す。

【０１３７】

この方法で評価されたイヌの特定のデータを示す。３１ｋｇの雄のアイリッシュセッターを、多層ＲＮＡ－ＮＰを投与されることに飼い主の同意を得て、研究に登録した。腫瘍生検後、腫瘍ｍＲＮＡを首尾よく抽出及び増幅した。免疫応答を、最初のワクチンに対してプロットした。データは、ＣＤ１１ｃ＋細胞（ＤＣ）での経時的な活性化マーカの増加を示す（図４Ａ）。データは、ＲＮＡ－ＮＰワクチン接種後の最初の数時間以内に活性化されるＣＤ８＋細胞（ＣＤ４４＋ＣＤ８＋細胞）の増加を示す。これらのデータは、多層ＲＮＡ－ＮＰが、雄のアイリッシュセッターで免疫学的に活性であることを裏付ける。悪性神経膠腫と診断された雄のボクサーを、ＲＮＡ－ＮＰを投与されることに飼い主の同意を得て、研究に登録した。腫瘍生検後、腫瘍ｍＲＮＡを首尾よく抽出及び増幅した。免疫

応答を、最初のワクチンに対してプロットする（図４Ｂ）。データは、ＣＤ１１ｃ＋細胞（ＤＣ）での経時的な活性化マーカの増加を示す。図４Ｃに示すように、ＲＮＡ－ＮＰワクチン接種後の最初の数時間以内に、活性化Ｔ細胞（ＣＤ４４＋ＣＤ８＋細胞）の増加が観察された。これらのデータは、多層ＲＮＡ－ＮＰが雄のボクサー犬で免疫学的に活性であることを裏付けている。

【０１３８】

毎週ＲＮＡ－ＮＰ（×３）を投与された後、悪性神経膠腫と診断されたイヌは、着実な経過をたどった。ワクチン接種後のＭＲＩは、増加した腫れ及び増強（いくつかの場合で）を伴う安定した腫瘍負荷を示したが、このことは、無症候性のイヌの免疫療法反応からの偽進行とより一致し得る。支持療法及び腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰ（切除なしの腫瘍生検後）のみを受けている悪性神経膠腫と診断されたイヌの生存率を図４Ｄに示す。図４Ｄでは、生存期間の中央値（点線で示されている）は約６５日であり、これは対症療法のみを受けているイヌの脳腫瘍患者のメタアナリシスから報告された。以前の研究では、イヌの脳星状細胞腫は７７日の全生存期間の中央値を有すると報告されている。パーソナライズされた多層ＲＮＡ　ＮＰは、２００日を超える生存を可能にした。

【０１３９】

ワクチン接種の６時間後に初日に微熱が急増したことを除いて、パーソナライズされた腫瘍ＲＮＡ－ＮＰ（１ｘ）は、安定した血球数、差、腎機能及び肝機能検査で良好な耐容性を有した。これまでに、我々は、悪性脳腫瘍と診断された４匹のクライアント所有のイヌを治療してきた。これらのイヌは、悪性腫瘍に対して他の治療的介入（すなわち、手術、放射線又は化学療法）を受けておらず、評価された全ての患者が、偽進行又は安定した若しくはより小さな腫瘍を伴う免疫応答の発生を評価したことを強調することが重要である。臨床症状、身体検査所見、及び実験室試験に基づいて、１倍の用量でのヒトにおける調査を妨げるようなイヌの重大な毒性を評価していない。ＲＮＡ－ＮＰワクチン接種後に、１匹のイヌを剖検した。この患者では、介入剤に関連すると考えられる毒性はなかった。

【０１４０】

これらの結果は、他の抗腫瘍治療介入を受けていない対象について、悪性脳腫瘍を有するクライアント所有のイヌにおける腫瘍特異的ＲＮＡ－ＮＰの安全性及び活性を示唆する。

実施例７

【０１４１】

この実施例は、Ｃ５７ＢＬ／６マウスへの静脈内送達後にＤＯＴＡＰリポソームにカプセル化されたマウス神経膠腫ｍＲＮＡ及びｐｐ６５　ｍＲＮＡの毒性研究を示す。

【０１４２】

この研究の目的は、Ｃ５７ＢＬ／６マウスに静脈内送達した場合の、ＤＯＴＡＰリポソームによってカプセル化されたｐｐ６５　ｍＲＮＡの安全性を評価することであった。病理学調査に適用可能な実験手順を、表１に要約する。全ての中間期の動物を、３５±１日目に剖検のために提出した。表２に列挙されている組織試料を収集し、眼及び精巣組織を除いて、１０％中性緩衝ホルマリン中に固定し、これをダビッドソン溶液中に固定し、早期に死亡した動物の組織を、１０％中性緩衝ホルマリン中に固定した。

【０１４３】

【表１】

表１

			マウスの数					
			３５日目±１日		５６日目±２日		１１２日目±３日	
		総用量	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	ビヒクル	0	5	5	5	5	5	5
2	ＬＰ	０＋１５．０	5	5	5	5	5	5
3	ＲＮＡ＋ＬＰ	０．２＋３．０	5	5	5	5	5	5
4	ＲＮＡ＋ＬＰ	１．０＋１５．０	5	5	5	5	5	5

【０１４４】

【表２】

表２　組織の収集及び検査

Ｐｒｏｖａｎｔｉｓ組織用語	プロトコル組織用語	収集	顕微鏡評価
骨、大腿骨	骨髄を有する大腿骨（右）	X	X
骨髄		X	X
骨、胸骨	胸骨	X	X
脳	脳幹	X	X
	小脳		
	大脳		
精巣上体	精巣上体	X	X
食道	食道	X	X
眼	視神経を有する眼（右）	X	X
神経、視神経		X	X
腺、副腎	副腎（右）	X	X
腺、副甲状腺	甲状腺／副甲状腺	X	X
腺、甲状腺		X	X
腺、下垂体	下垂体	X	X
腺、前立腺	前立腺	X	X
腺、唾液腺	唾液腺（右、下顎）	X	X
腺、精嚢	精嚢	X	X
心臓	心臓	X	X
腎臓	腎臓（右）	X	X
大腸、盲腸	盲腸	X	X
大腸、結腸	結腸	X	X
大腸、直腸	直腸	X	X
肝臓	肝臓	X	X
肺	肺	X	X
リンパ節、腸間膜	リンパ節（腸間膜）	X	X
筋肉、横隔膜	横隔膜	X	X
筋肉、大腿四頭筋	大腿四頭筋（右）	X	X
神経、坐骨神経	坐骨神経（右）	X	X
卵巣	性腺（卵巣、右）	X	X
膵臓	膵臓	X	X
サイト、注射	尾（注射部位）	X	X
肌	肌	X	X
小腸、十二指腸	十二指腸	X	X
小腸、回腸	回腸	X	X
小腸、空腸	空腸	X	X
脊髄	脊髄、頸髄、腰髄、胸椎	X	X
脾臓	脾臓	X	X
胃	胃	X	X
精巣	性腺（睾丸、右）	X	X
胸腺	胸腺	X	X
舌	舌	X	X
膀胱	膀胱	X	X
子宮	子宮	X	X
膣	膣	X	X
－	肉眼的病変	X	X

【０１４５】

顕微鏡評価に必要な組織は、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｓｋｏｋｉｅ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓにより、トリミングされ、定期的に処理され、パラフィンに包埋され、ヘマトキシリン及びエオシンで染色された。光学顕微鏡による評価は、群１及び４の全ての動物、及び早期死亡動物からのプロトコルで指定された全ての組織について、理事会認定の獣医病理学者である寄稿者により実施された。

【０１４６】

プロトコル毎に顕微鏡で評価されるはずだったがスライド上で入手できなかった（したがって評価されなかった）組織は、病理学レポートの「個別動物データ」に、「存在せず

」として列挙されている。各処置群から検査された組織の数は解釈するのに十分であったため、これらの欠落した組織は、研究の病理学部分の結果又は解釈に影響を与えなかった。

【０１４７】

肉眼的病理学：試験品に関連する肉眼的所見は認められなかった。観察された肉眼的所見は、この系統及びマウスの年齢で一般的に観察される性質に付随するものと見なされ、かつ／又は対照及び処置動物で同様の発生率であったので、ＤＯＴＡＰリポソーム中の１：１比のｐｐ６５　ｍＲＮＡ及びＫＲ１５８ｍＲＮＡの投与とは無関係であると見なされた。

【０１４８】

組織病理学：試験品に関連する顕微鏡所見は認められなかった。注射部位に炎症性細胞浸潤を有する動物が数匹いたが、この所見は注射部位に一般的であり、研究のこの時点では、曖昧であると考えられた。観察された顕微鏡所見は、この系統及びマウスの年齢で一般的に観察される性質に付随するものであると見なされ、かつ／又は対照及び処置動物で同様の発生率及び重症度であったので、ＤＯＴＡＰリポソーム中の１：１比のｐｐ６５　ｍＲＮＡ及びＫＲ１５８ｍＲＮＡの投与とは無関係であると見なされた。

【０１４９】

研究０、１４、及び２８日目に、１．０ｍｇ／ｋｇ　ＫＲ１５８及びｐｐ６５　ｍＲＮＡ＋１５．０ｍｇ／ｋｇ　ＤＯＴＡＰリポソームをマウスの尾静脈に静脈内注射しても、３５日±１日目に、研究に関する肉眼的又は顕微鏡的試験品関連の所見は得られなかったと結論付けられた。注射部位には少量の炎症性細胞浸潤があり、これは注射部位の一般的な所見である。この発見は曖昧であった。

実施例８

【０１５０】

この実施例では、多層ＲＮＡ－ＮＰでトランスフェクトされたｐＤＣの抗原特異的Ｔ細胞プライミングに対する影響を決定することを目的とした研究について記載されている。

【０１５１】

ｐＤＣは、自然免疫及びＩ型ＩＦＮの周知の刺激因子であるが、それらはまた、腫瘍内獲得免疫に対する重大な影響も媒介する。それらは、１）腫瘍特異的Ｔ細胞のプライミングのための抗原を直接提示し得、２）他のＤＣサブタイプのケモカイン補充を介して（ケモカインＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＸＣＬ１０を介して）適応応答を支援し得、３）ＩＬ－１２分泌を介してＴｈ１免疫を極性化し得、かつ／又は４）ＤＣローディング及びＴ細胞プライミングのために（サイトカイン、ＴＲＡＩＬ若しくはグランザイムＢを介して）腫瘍抗原の放出を媒介し得る。これらのエフェクター機能にもかかわらず、ｐＤＣは、また、免疫調節分子（ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、及びＩＤＯ）の放出及び制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の促進により免疫を弱め得る。この研究の目的は、獲得免疫及び抗原特異的Ｔ細胞プライミングに対するＲＮＡ－ＮＰトランスフェクトｐＤＣの影響を解明することである。ＲＮＡ－ＮＰ活性化ｐＤＣは、抗原特異的免疫の直接プライマーとして機能し、エフェクターＴ細胞応答の促進において古典的ＤＣ（ｃＤＣ）及び／又は骨髄由来ＤＣ（ｍＤＣ）を支援すると仮定される。これらの実験は、ＲＮＡ－ＮＰ媒介免疫に必要なｐＤＣの活性化状態及び免疫療法効果の強化に採用され得る経時的な枯渇に、新たな光を当てることである。

【０１５２】

統計解析

【０１５３】

生存率が重要である実施例９．１の研究では、ログランク検定を使用して、処置群と対照群との間でＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ生存曲線を比較する。我々の腫瘍モデルの経験は、未処置の対照マウスの全生存期間の中央値は約３０日であり、生存期間は形状パラメータｋ＝６のＷｅｉｂｕｌｌ分布に従うことを示す。例として、２つの担癌群（処置及び未処置）に各々１０匹のマウスを使用し、０．０５の有意性で評価された片側ログランク検

定を使用した生存曲線の比較は、未処置群と比較した処置群の８日間の生存期間の中央値の改善を検出するための少なくとも８０％の力がある。この効果量は、対立仮説効果量の下で形状パラメータｋ＝６の１０００のＷｅｉｂｕｌｌ分布生存データセットをシミュレートすることによって決定され、ｐ＜０．０５で有意であったこれらのデータセットのログランク検定の割合を観察した。実施例９．２～９．４の研究では、異なる時間に観察される応答を、治療と観察時間との間に相互に排他的な群が分散された双方向ＡＮＯＶＡモデルを使用して分析し、一般化線形混合効果モデル（ＧＬＭＭ）を使用して経時的な免疫応答パラメータの変化を評価する。少なくとも１回完全に複製された実験についての応答変数は、ＧＬＭＭを使用して分析される。実験的複製は、「バッチ」又は「実験日」の変動性を説明するランダム効果としてモデル化される。処置群及び対照群を、固定効果としてモデル化し、混合効果モデリングフレームワーク内にネストされたＡＮＯＶＡタイプの設計を使用して比較する。

【０１５４】

実施例８．１

【０１５５】

本実施例は、野生型及びｐＤＣ　ＫＯマウスにおけるＲＮＡ－ＮＰの抗腫瘍効果を測定するために設計された実験を説明する。

【０１５６】

ＫＲ１５８ｂ－ｌｕｃ、ＧＬ２６１－ｌｕｃ、及びマウスＨ３．３Ｋ２７Ｍ変異細胞株の腫瘍形成能が設定されている。ＫＲ１５８ｂ－ｌｕｃ及びＧＬ２６１－ｌｕｃは両方ともルシフェラーゼでトランスフェクトされるため、生物発光イメージングを使用して腫瘍の成長を監視し得る。ＫＲ１５８ｂ－ｌｕｃ及びＨ３Ｋ２７Ｍ変異ラインの腫瘍原性用量は、1×10^4細胞である。ＧＬ２６１－ｌｕｃの腫瘍原性用量は、1×10^5個の細胞である。ＧＬ２６１及びＫＲ１５８を、Ｃ５７Ｂｌ／６の大脳皮質に注入する（前項の右側２ｍｍの部位で脳の深さ３ｍｍ）。Ｈ３Ｋ２７Ｍ神経膠腫細胞は正中線に注入される。腫瘍ｍＲＮＡを、３７５μｇの本発明者等のカスタム脂質－ＮＰ製剤（マウス１匹当たり）と複合体化される２５μｇの腫瘍特異的ｍＲＮＡの静脈内（ｉｖ）注射からなるワクチン製剤のために、親細胞株（すなわち、ルシフェラーゼを含まないＫＲ１５８ｂ）から抽出する。これらを、ＮＰのみ及び非特異的（すなわち、ｐｐ６５　ｍＲＮＡ）ＲＮＡ－ＮＰを投与された１０匹の陰性対照マウスと同時に比較する。マウスを、腫瘍移植の５日後から７日間隔で３回ワクチン接種する。ＩＦＮ－αレベルを、連続した時点（５日、１２日、及び１９日）で、野生型及びｐＤＣ　ＫＯマウスの血清から評価する。治療反応を示すが疾患に屈する野生型マウスでは、腫瘍における免疫学的回避メカニズム（すなわち、チェックポイントリガンドの発現、ＩＤＯ、ＭＨＣクラスＩのダウンレギュレーション）及び腫瘍微小環境内（すなわち、ＭＤＳＣ、Ｔｒｅｇ、及びＴＡＭ）が調査される。

【０１５７】

これらのモデルにおけるＲＮＡ－ＮＰの抗腫瘍活性を示す前臨床データに基づいて、抗腫瘍活性はｐＤＣ　ＫＯマウスで無効になると予想される。

【０１５８】

実施例８．２

【０１５９】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰによる活性化後のｐＤＣ表現型及び機能を決定するために設計された実験を説明する。

【０１６０】

ｐＤＣ表現型を評価するために、ＫＲ１５８ｂを有するＣ５７Ｂｌ／６マウスに、３７５μｇのＦＩＴＣ標識ＤＯＴＡＰ（Ａｖａｎｔｉ）及び２５μｇのＴＴＲＮＡ（ＫＲ１５８ｂに由来し、静脈内送達）から構成されるＴＴＲＮＡ－ＮＰをワクチン接種する。ワクチン接種の２４時間後、脾臓、腫瘍排出リンパ節（ｔｄＬＮ）及び腫瘍の収集のために、レシピエントマウスを安楽死させる（ＣＯ２で人道的に殺す）。臓器を単一細胞懸濁液に消化させ、３７℃で５分間インキュベートする前に、ＲＢＣ溶解（ＰｈａｒｍＬｙｓｅ、

ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）させる。Ｆｉｃｏｌｌ勾配を用いて、実質細胞からＷＢＣを分離する。界面の細胞を、収集し、洗浄し、分析する。ｐＤＣを、ＣＤ１１ｃ、Ｂ２２０、及びＧｒ－１（エビオサイエンス（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ））のために染色する。異なるｐＤＣサブセットを、ＣＣＲ９、ＳＣＡ１、及びＬｙ４９ｑの示差染色によって識別する。活性化状態を、共刺激分子（すなわち、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６）ケモカイン（すなわち、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＸＣＬ１０）及びケモカイン受容体（すなわち、ＣＣＲ２、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７）の発現に基づいて評価する。検出二次抗体は、ＦＩＴＣ検出用にＡｌｅｘａＦｌｏｕｒ（登録商標）４８８（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と複合体化させたウサギＩｇＧである。エフェクター対調節機能を、エフェクター（すなわち、ＩＦＮ－Ｉ、ＩＬ－１２）対調節性サイトカイン（すなわち、ＴＧＦ－β、ＩＬ－１０）の細胞内染色によって決定する。分析は、マルチパラメータフローサイトメトリ（ＬＳＲ、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）及び免疫組織化学（ＩＨＣ）によって実施されるであろう。

【０１６１】

末梢及び腫瘍内臓器におけるｐＤＣの実質的な増加を示す我々の予備データに基づいて、脾臓、ｔｄＬＮ、及び頭蓋内腫瘍におけるＦＩＴＣ陽性ｐＤＣを特定することが期待される。

【０１６２】

実施例８．３

【０１６３】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰトランスフェクトｐＤＣが抗原特異的Ｔ細胞の直接的又は間接的な活性化を媒介するかどうかを決定するために設計された実験を説明する。

【０１６４】

ｐＤＣは、自然免疫及びＩ型ＩＦＮの周知の刺激因子であるが、抗原特異的応答に対するそれらの累積的な影響はまだ明らかにされていない。それらはＭＨＣクラスＩＩを発現するので、ＡＰＣ能力を有するが、ｃＤＣの対応物と比較すると、それらは、抗原特異的免疫の弱い直接プライマーであると考えられている。本実験は、ＲＮＡ－ＮＰという観点から、抗原特異的免疫の直接プライマー又は促進剤のいずれかとしてのｐＤＣのより良い理解を生み出すことを目的とする。抗原特異的Ｔ細胞に対するｐＤＣの効果を決定するために、ＫＲ１５８ｂ保有マウスに、脾臓、ｔｄＬＮ及び頭蓋内腫瘍（上記の通り）由来のＦＩＴＣ標識ＮＰ（Ａｖａｎｔｉ）、及びＦＡＣＳｏｒｔ（ＢＤ　Ａｒｉａ　ＩＩ）関連ＦＩＴＣ＋ｐＤＣにカプセル化されたＴＴＲＮＡ（マウス神経膠腫株ＫＲ１５８ｂ由来）をワクチン接種する。次に、ＲＮＡ－ＮＰトランスフェクトｐＤＣを、磁気的に分離したナイーブＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞と共培養し、Ｔ細胞を、増殖、表現型（エフェクター対中央メモリー）、機能及び細胞傷害性について評価する。ｐＤＣからの間接的な影響を、ナイーブＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を有するＴＴＲＮＡをロードしたＤＣ（マウス骨髄からエクスビボで成熟）とのエクスビボ共培養によって評価する。エクスビボ共培養は、ＣＦＳＥ（Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で標識されたナイーブＴ細胞（４００，０００個のＴ細胞を含む４０，０００個のＲＮＡ－ＮＰトランスフェクトｐＤＣ）を含む９６ウェルプレートで７日間、３回行う。Ｔ細胞の増殖は、フローサイトメトリーによってＣＦＳＥ希釈を測定することによって決定される。エフェクター及び中央メモリー集団の表現型は、ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの示差染色によって決定される。これらのＴ細胞は、ビーズアレイ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によるＴｈ１サイトカイン（すなわち、ＩＬ－２、ＴＮＦ－α、及びＩＦＮ－γ）の検出のために上清を回収する前に、合計２サイクル再刺激される。刺激されたＴ細胞は、ＫＲ１５８ｂ（ＧＦＰで安定的にトランスフェクトされた）又は対照腫瘍（Ｂ１６Ｆ１０－ＧＦＰ）の存在下でもインキュベートされ、細胞毒性を誘導する能力について評価される。生存腫瘍細胞の代用としての、各共培養におけるＧＦＰの量は、フローサイトメトリーによって定量的に測定される。

【０１６５】

ＦＡＣＳｏｒｔされたＲＮＡ－ＮＰトランスフェクトｐＤＣのインビボ効果は、これらの細胞（２５０，０００細胞／マウス）を担癌マウス（毎週ｘ３）に養子移入し、ＩＦＮ－γレポーターマウス（ＧＲＥＡＴマウス、Ｂ６トランスジェニック、ＩＲＥＳ－ｅＹＦＰレポーターを有するＩＦＮ－γプロモーターを含む、Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｓ）でのＹＦＰ発現によって抗原特異的Ｔ細胞を評価するために、１週間後に脾臓、ｔｄＬＮ、及び腫瘍を採取することによって決定する。別の実験では、１週間後にＹＦＰ発現によって抗原特異的Ｔ細胞を測定するために脾臓、ｔｄＬＮ、及び頭蓋内腫瘍を採取する前に、ＩＦＮ－γレポーターマウスに、ｐＤＣ枯渇ｍＡｂ有り又は無しでＴＴＲＮＡ－ＮＰをワクチン接種する。Ｔ細胞機能アッセイを、上記のように実施する。

【０１６６】

これらのｐＤＣは、直接的及び／又は間接的な手段のいずれかを介して抗原特異的Ｔ細胞をプライミングするために必要であると予想される。

【０１６７】

実施例８．４

【０１６８】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰで活性化されたｐＤＣが、ｃＤＣ及び／又はｍＤＣからの抗原特異的Ｔ細胞プライミングを促進するかどうかを決定するために設計された実験を説明する。

【０１６９】

ｐＤＣからのＩＦＮ－Ｉ放出は、ｃＤＣ及びｍＤＣの活性化マーカを増加させることが知られているが、ｃＤＣ／ｍＤＣからの直接Ｔ細胞プライミングにおけるｐＤＣの役割はあまり明確ではない。この実験は、活性化されたｐＤＣの存在下又は非存在下で抗原特異的Ｔ細胞をプライミングするＲＮＡトランスフェクトｃＤＣ及びｍＤＣの能力を解明することを目的としている。他のＤＣサブセットに対するｐＤＣの効果を決定するために、Ｃ５７Ｂｌ／６及びｐＤＣノックアウト（ＫＯ）マウス（ＢＤＣＡ２－ＤＴＲ、Ｂ６トランスジェニックマウス、Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｓ）を有するＫＲ１５８ｂにワクチンを接種し、ｃＤＣ及びｍＤＣからのＴ細胞プライミングを評価する。ＦＩＴＣ＋ｃＤＣ及びｍＤＣ集団は、静脈内投与ＴＴＲＮＡ－ＮＰ（ＦＩＴＣ標識）の２４時間以内にＦＡＣＳｏｒｔを介して識別され、増殖、機能及び細胞毒性アッセイに基づいて、ナイーブＴ細胞応答をインビトロでプライミングする能力について評価される。常駐及び移動性ｃＤＣを、それぞれＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１０３＋ＭＨＣＩＩ＋細胞及びＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１１ｂ＋ＭＨＣＩＩ＋細胞によって識別し、ｍＤＣを、ＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１４＋ＭＨＣＩＩ＋細胞によって識別する。サイトカイン、ケモカイン及び活性化マーカを、実施例９．１に記載されているように分析する。これらのｃＤＣ／ｍＤＣのインビボ効果を、実施例９．２に記載されるように、細胞移動実験において実施する。簡単に説明すると、ＴＴＲＮＡ－ＮＰワクチン接種Ｃ５７Ｂｌ／６マウス又はｐＤＣ　ＫＯマウスからのＦＡＣＳｏｒｔされたｃＤＣ及びｍＤＣを、１週間後にＩＦＮ－γレポーターマウスにおけるＹＦＰ発現による抗原特異的Ｔ細胞を評価するために脾臓、ｔｄＬＮ、及び頭蓋内腫瘍を採取する前に、担癌マウス（週１回ｘ３）に養子移入する（２５０，０００細胞／マウス）。増殖、機能及び細胞毒性のアッセイを実施する。

【０１７０】

ＭＬ　ＲＮＡ－ＮＰは、活性化表現型を増強し、ｃＤＣ及びｍＤＣからのＴ細胞の直接プライミングを促進するｐＤＣを活性化すると予想される。

【０１７１】

ｃＤＣ及び／又はｍＤＣに対するｐＤＣからの間接的な影響がない場合、ＮＫ細胞に対するｐＤＣの影響は、それらの活性化状態、機能、及び細胞毒性を含めて評価される。

【０１７２】

実施例８．５

【０１７３】

本実施例は、ｐＤＣが腫瘍内微小環境内で時間の経過とともにエフェクター／制御性Ｔ

細胞にどのように影響するかを決定するために設計された実験を説明する。

【０１７４】

腫瘍へのｐＤＣの動員は、通常、ＩＤＯ、ＦｏｘＰ３＋Ｔｒｅｇの増加、及び免疫調節性サイトカインの分泌を特徴とする調節表現型に関連する。本実験では、ＲＮＡ－ＮＰ活性化ｐＤＣが、腫瘍微小環境でＴ細胞を経時的に活性化することによって明確に機能するかどうかを決定する。ｐＤＣの腫瘍内効果を決定するために、ＴＴＲＮＡ－ＮＰを、ｐＤＣ枯渇ｍＡｂ（Ｂｉｏｘｃｅｌｌ）の有無にかかわらず、ＩＦＮ－γレポーターマウスを有するＫＲ１５８ｂに投与する。活性化及び制御性Ｔ細胞を、連続した時点（６時間、１日、７日、及び２１日）で、腫瘍内微小環境で経時的に評価する。エフェクターＴ細胞が特徴付けられ、Ｔｒｅｇは、ＦｏｘＰ３、ＣＤ２５、及びＣＤ４の発現を通じて表現型が決定される。枯渇していない動物からのｐＤＣは、これらの部位からＦＡＣＳｏｒｔされ、サイトカイン、ケモカイン、活性化マーカ（すなわち、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ４０）、細胞溶解マーカ（すなわち、ＴＲＡＩＬ、グランザイムｂ）及び調節マーカ（すなわち、ＩＬ－１０、ＴＧＦ－β、ＩＤＯ）のために表現型が決定される。腫瘍細胞による免疫表現型の変化も経時的に評価する（すなわち、ＭＨＣ－Ｉ、ＰＤ－Ｌ１、ＳＩＲＰα）。

実施例９

【０１７５】

本実施例では、ＲＮＡ－ＮＰで活性化されたＴ細胞の排出、輸送、及び機能に対するＩ型インターフェロンの役割を評価することを目的とした研究について説明する。

【０１７６】

統計分析：腫瘍を有するマウスを、介入治療を受ける前にランダム化する。群当たり１０匹の動物を選択すると、関心のある効果を検出するのに十分な力が得られるはずである。例として、特定の時間に観察された７つの処置群を有するＡＮＯＶＡ設計内で、ＡＮＯＶＡフレームワーク内で実行された対比較は、０．０５の両側有意水準で８０％の力で１．２７ＳＤユニットに等しい効果サイズを検出し得る。いくつかの観察時間に実験群で観察された免疫パラメータ応答を、通常又は負の二項応答誤差を有する一般化線形モデル（ＧＬＭ）を使用して分析する。応答を、相互に排他的な群が処理及び観察時間に分散された双方向ＡＮＯＶＡ設計で編成する。少なくとも１回完全に複製された実験についての応答変数は、ＧＬＭＭを使用して分析される。実験的複製は、「バッチ」又は「実験日」の変動性を説明するランダム効果としてモデル化される。処置群及び対照群を、固定効果としてモデル化し、混合効果モデリングフレームワーク内にネストされたＡＮＯＶＡタイプの設計を使用して比較する。

【０１７７】

実施例９．１

【０１７８】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰワクチン接種後の抗原特異的Ｔ細胞のケモカイン受容体、Ｓ１Ｐ１、及びＶＬＡ－４／ＬＦＡ－１発現プロファイルを決定するために設計された実験を説明する。

【０１７９】

リンパ器官からのＴ細胞の退出に必要なスフィンゴシン－１－リン酸受容体１（Ｓ１Ｐ１）に対するＩＦＮ－Ｉの効果、及びＢＢＢを通過するＴ細胞の移動に必要なインテグリン（すなわちＶＬＡ－４、ＬＦＡ－１）を評価する。ＩＦＮ－γレポーターマウスを有するＫＲ１５８ｂ、又はＩＦＮＡＲ１ブロッキングｍＡｂ（Ｂｉｏｘｃｅｌｌ）を投与されているＩＦＮ－γレポーターマウスに、ＴＴＲＮＡ－ＮＰを移植する。２５μｇのＴＴＲＮＡを有する３７５μｇのＤＯＴＡＰ（Ａｖａｎｔｉ）で構成されるＲＮＡ－ＮＰ（ＫＲ１５８ｂから抽出して静脈内投与）は、週に１回（ｘ３）投与され、移植から５日後に開始される。最後のワクチン接種から１週間後、レシピエントマウスを安楽死させ（CO_2で人道的に殺す）、脾臓、ｔｄＬＮ、骨髄、及び頭蓋内腫瘍を採取する。臓器を消化させ、脾臓、リンパ節、骨髄及び腫瘍からの抗原特異的Ｔ細胞を、ＹＦＰ発現並びにエフェク

ター及び中央メモリーＴ細胞（すなわち、ＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４４）についての示差染色によって連続した時点（７、１４及び２１日目）で識別する。ＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞からのＴｈ１関連ケモカイン受容体（すなわち、ＣＣＲ２、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７及びＣＸＣＲ３）、Ｓ１Ｐ１発現、ＶＬＡ－４、及びＬＦＡ－１発現（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を、マルチパラメータフローサイトメトリ及びＩＨＣによって評価する。

【０１８０】

ＬＦＡ－１及びＣＣＲ２は、ＲＮＡ－ＮＰ投与後に活性化Ｔ細胞に発現すると予想される。ＩＦＮＡＲ１　ｍＡｂ後の活性化Ｔ細胞のケモカイン発現パターン、Ｓ１Ｐ１、インテグリンに変化がない場合、ＩＦＮＡＲ１　ｍＡｂ有り又は無しで処置されたマウスのＦＡＣＳソートＴ細胞（ＹＦＰ＋細胞）でＲＮＡ－ｓｅｑ分析を行い、免疫関連遺伝子の変化を評価する。

【０１８１】

実施例９．２

【０１８２】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰ活性化Ｔ細胞のインビトロ及びインビボ遊走に対するＩＦＮ－Ｉの効果を決定するために設計された実験を説明する。

【０１８３】

ＩＦＮＡＲ１遮断後に末梢臓器における抗原特異的Ｔ細胞が増加したが、抗腫瘍効果が欠如したことを示す我々のデータに基づき、ＲＮＡ－ＮＰ活性化Ｔ細胞遊走に対するＩＦＮ－γの効果を決定する。ＫＲ１５８ｂを有するＩＦＮ－γレポーターマウス、又はＩＦＮＡＲ１、ＬＦＡ－１、又はＣＣＲ２ブロッキング抗体を投与されるＩＦＮ－γレポーターマウスに、静脈内ＴＴＲＮＡ－ＮＰを週に１回（ｘ３）ワクチン接種する。ＢＢＢのインビボ横断を、連続した時点（ＲＮＡ－ＮＰ後５日、１０日、１５日、２０日）での頭蓋内腫瘍（脾臓、リンパ節、骨髄と比較して）中のＴ細胞の百分率及び絶対数から評価する。

【０１８４】

Ｔ細胞の遊走能をまた、インビトロ培養を介して分析する。ＫＲ１５８ｂ腫瘍を有するナイーブな、ＩＮＦＡＲ１、ＬＦＡ－１、又はＣＣＲ２　ＫＯ動物（Ｂ６　ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ、Ｊａｃｋｓｏｎ）に、静脈内ＴＴＲＮＡ－ＮＰをワクチン接種する。Ｔ細胞を、ＢＤ　Ａｒｉａ　ＩＩ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｅｒを介して５０～１００％ＦＢＳ溶液にＦＡＣＳｏｒｔする。これらのＴ細胞を、トランスウェルアッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で遊走能について評価する。簡単に説明すると、Ｔ細胞を、ＫＲ１５８ｂ－ＧＦＰ腫瘍細胞の層の間に透過膜を有する細胞培養インサートの上層に配置する。遊走を、レイヤー間を移動するセルの数によって評価する。Ｔ細胞を、ＥＬＩＳＡ（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）によりＩＦＮ－γを決定する前に、腫瘍細胞（４ｘ１０^{6}／ｍＬ）（ｘ４８時間）との共培養のために、ＩＬ－２（１マイクログラム／ｍＬ）有り又は無しで、１ｍＬ当たり４ｘ１０^{6}の濃度で、Ｔ細胞培地中でプレーティングする。生存腫瘍細胞の代用として、各共培養におけるＧＦＰの量を、フローサイトメトリー分析によって定量的に測定する。

【０１８５】

ＢＢＢを通過する活性化Ｔ細胞の輸送には、Ｉ型ＩＦＮが必要であると予想される。抗原特異的Ｔ細胞を適切に定義できない場合、生理学的に関連するＧＢＭ抗原であるｐｐ６５（我々の腫瘍ｍＲＮＡコホートにスパイクされる）に対する応答を、脾臓、ｔｄＬＮ及び頭蓋内腫瘍中でのＣＤ８＋細胞のテトラマー染色によるｐｐ６５－ＨＬＡ－Ａ２制限エピトープＮＴＵＤＧＤＤＮＮＤＶの分析により、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスで、重複ペプチドプール再刺激アッセイによって追跡する。

【０１８６】

実施例９．３

【０１８７】

本実施例は、ＲＮＡ－ＮＰ後の抗原特異的Ｔ細胞機能に対するＩＦＮ－Ｉの寄与を説明

する。

【０１８８】

ＩＦＮ－Ｉは、Ｔｒｅｇを促進し、エフェクター及びメモリーＣＤ８＋細胞（５６）を調節することが示されており、ＲＮＡ－ＮＰワクチン接種後の活性化Ｔ細胞応答の促進にも不可欠である。これらの明確な効果により、ＲＮＡ－ＮＰワクチン投与後の抗原特異的Ｔ細胞機能に対するＩＦＮ－Ｉの寄与が決定される。ＫＲ１５８ｂを有するＩＦＮ－γレポーターマウス、又はＩＦＮＡＲ１　ｍＡｂを投与されているＩＦＮ－γレポーターマウスに、週に１回（ｘ３）静脈投与ＴＴＲＮＡ－ＮＰをワクチン接種する。抗原特異的Ｔ細胞を、ＹＦＰ＋細胞により評価する。脾臓、リンパ節、骨髄及び腫瘍からのＹＦＰ＋Ｔ細胞を、それらの活性化状態（すなわち、ＣＤ１０７ａ、パーフォリン、グランザイム）、増殖（ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔで標識された養子移入細胞の蛍光希釈による）、分化（エフェクター及び中央メモリーサブセットへ、及び細胞毒性について評価する。Ｔ細胞の細胞傷害性を、ＫＲ１５８ｂ（安定してＧＦＰでトランスフェクトされた）又は対照腫瘍（Ｂ１６Ｆ１０）の存在下で決定する。Ｉ型ＩＦＮは、腫瘍微小環境内でＴ細胞の増殖及び機能を増強することもまた期待される。

【０１８９】

Ｉ型ＩＦＮの遮断後に抗原特異的Ｔ細胞の移動能力又は機能に変化がない場合、Ｔ細胞枯渇の調節に対するＩ型ＩＦＮの効果を評価する。免疫チェックポイント（すなわち、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３）及び腫瘍細胞及びＡＰＣ（すなわち、ＰＤ－Ｌ１、ガレクチン－９）に対するそれらのリガンドの発現に対するＩ型ＩＦＮの効果も評価する。

実施例１０

【０１９０】

本実施例は、非抗原特異的多層（ＭＬ）ＲＮＡ　ＮＰが、記憶を与え、腫瘍の再チャレンジをかわすのに十分な長さの抗原特異的免疫を媒介することを示す。

【０１９１】

腫瘍接種により合計２回チャレンジされたが、ＧＦＰ　ＲＮＡ若しくはｐｐ６５　ＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰ（各々腫瘍に非特異的である）、又は腫瘍特異的ＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで毎週１回（ｘ３）のみ処置された長期生存マウス（例えば、約１００日間生存したマウス）を用いて、実験を行った。処置は、最初の腫瘍接種の直後及び２回目の腫瘍接種の約１００日前に行われた。対照マウス（未処置のマウス）はいずれも１００日まで生存しなかったため、同じタイプのマウスにＫ７Ｍ２腫瘍を接種することにより、新しい対照群のマウスを作成した。元の対照マウスと同様に、新しい対照群は、何の処置も受けなかった。長期生存者もまた、２回目の腫瘍接種後に処置を受けなかった。この実験のイベントのタイムラインを、図７Ａに示す。

【０１９２】

注目すべきことに、３つの群全てのマウスは、２回目の腫瘍チャレンジを生き延びた長期生存者を含んでいた。図７Ｂ（２回目の接種後の期間のみを示す）に示すように、３つの群全てのマウスには、腫瘍移植後４０日まで生存する長期生存者が含まれていた（腫瘍接種の２回目の例）。興味深いことに、非特異的ＲＮＡ（ＧＦＰ　ＲＮＡ又はｐｐ６５　ＲＮＡ）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで以前に治療された長期生存マウスの百分率は、腫瘍特異的ＲＮＡ（２回目の腫瘍チャレンジの前に処置）を含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰで治療された群に匹敵する、２回目の腫瘍接種後４０日まで生存した。

【０１９３】

これらのデータは、対象の腫瘍に非特異的なＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰが、腫瘍に特異的なＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰにより提供される治療的処置に匹敵する治療的処置を腫瘍に提供し、動物の生存率の増加した百分率につながることを裏付けている。

実施例１１

【０１９４】

この実施例は、本開示のナノ粒子がＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２に対する免疫応答を誘発する能力を実証する。

【０１９５】
多層ＲＮＡ　ＮＰは、基本的に実施例１に記載されているように作製する。ナイーブマウスに、多層ＲＮＡ　ＮＰｓを注入する。マウスを実施例５に本質的に記載したように評価して、肺へのＲＮＡ　ＮＰの局在を決定する。注射されたマウスから得られた血液は、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質に特異的な中和抗体についてアッセイする。具体的には、ＲＮＡ　ＮＰの投与後１、６、１０、１４、及び２１日で、マウスから血液試料を取得する。Ｍａｔｓｕｂａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　８（７）：ｅ６５２８１（２０１３）に記載されている技術に従って、試料をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する中和抗体についてアッセイする。

【０１９６】
結合抗体は、コロナウイルスＣＯＶＩＤ－１９　ＩｇＧ　ＥＬＩＳＡアッセイキット（Ｅａｇｌｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ａｍｈｅｒｓｔ　ＮＨ，ＳＫＵ：ＫＴ－１０３２から市販）を使用して、ワクチン接種された患者のヒト血清からも評価する。中和は、偽型ウイルスを使用して評価する。ＭＬＶベースの偽型（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を含む）は、Ｍｉｌｌｅｔ　ａｎｄ　Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ，Ｂｉｏ　Ｐｒｏｔｏｃ．２０１６　Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　５；６（２３）（ｄｏｉ：１０．２１７６９／ＢｉｏＰｒｏｔｏｃ．２０３５）に以前に記載されたように調製する。簡単に説明すると、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクをコードするプラスミド、ＭＬＶ　Ｇａｇ－Ｐｏｌパッケージング構築物、及びルシフェラーゼレポーターをコードするＭＬＶトランスファーベクターと同時トランスフェクトする。細胞をトランスフェクション培地とともに３７℃で５時間インキュベートする。次に、細胞をＤＭＥＭで２回洗浄し、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭを６０時間添加する。上清を回収し、０．４５ｍｍ膜で濾過し、３０ｋＤａ膜で３，０００ｒｐｍで１０分間濃縮し、次いで－８０℃で凍結する。

【０１９７】
次に、ＡＣＥ２を安定的にトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、ヒト血清の存在下で調製した偽型ウイルスを感染させる。ＡＣＥ２発現２９３Ｔ細胞を２４ウェルプレートに２．５×10^5細胞／ウェルでコンフルエントになるまで播種する。次に、ウェルに２００μｌの偽型ウイルス溶液を接種するか、又はワクチン接種患者からのヒト血清を有する場合及び有さない場合で、感染していない対照条件（ウェル当たり２００μｌのＤＭＥＭ－Ｃ溶液）で維持する。細胞を３７℃、５％CO_2で１～２時間インキュベートした後、３００μｌのＤＭＥＭ－Ｃを添加する。細胞を、３７℃、５％CO_2で７２時間インキュベートする。上清を吸引する。ルシフェリン基質の添加後、バイオルミノメータを使用して、上清及び細胞の両方をルシフェラーゼ発現について評価する。中和の成功は、対照条件と比較して、ヒト血清の添加によるルシフェラーゼ発現の統計的に有意な減少に基づいて決定する。

実施例１２

【０１９８】
この実施例は、本開示のナノ粒子をヒト対象に投与する方法を記載する。

【０１９９】
多層ＲＮＡ－ＮＰは、ＧＭＰ条件下で実施例１に記載のように作製する。ＮＰは、注射によって２５ｍｃｇ、１００ｍｃｇ、又は２５０ｍｃｇでヒト対象に投与する。以下の主要アウトカム指標が決定される。

＊要請された局所反応原性有害事象（ＡＥ）の頻度［時間枠：ワクチン接種後７日間まで］

＊診療を要した有害事象（ＭＡＡＥ）の頻度［時間枠：１日目～３９４日目］

＊新たに発症した慢性病状（ＮＯＣＭＣ）の頻度［時間枠：１日目～３９４日目］

＊重篤な有害事象（ＳＡＥ）の頻度［時間枠：１日目～３９４日目］

＊自発的有害事象（ＡＥ）の頻度［時間枠：ワクチン接種後２８日まで］

＊要請された全身性反応原性有害事象（ＡＥ）の頻度［時間枠：ワクチン接種後７日まで］

＊自発的有害事象（ＡＥ）のグレード［時間枠：ワクチン接種後２８日まで］
＊要請された局所反応原性有害事象（ＡＥ）のグレード［時間枠：ワクチン接種後７日まで］
＊要請された全身性反応原性有害事象（ＡＥ）のグレード［時間枠：ワクチン接種後７日まで］

【０２００】

この試験は、本開示のＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰの安全性、反応原性及び免疫原性を評価するために設計されている。

実施例１３

【０２０１】

この実施例は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫応答をインビボで誘導するために、本開示の多層ＲＮＡ　ＮＰを投与する方法を記載する。

【０２０２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクｍＲＮＡの機能活性を確認するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクをコードするｍＲＮＡを含むＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰをナイーブＣ５７Ｂｌ／６マウスに投与した。１週間以内に３回のワクチンがマウスに投与された。

【０２０３】

ワクチン投与の約１０日後、マウスから末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を採取し、重複するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドによる再刺激時のエクスビボエフェクターメモリーＴ細胞の拡大を測定することによる、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰに対する記憶想起応答を評価した。簡単に言えば、ＰＢＭＣをＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク糖タンパク質からの１１－ａａ重複を含む１５－ｍｅｒの２００ｎｇのオーバーラップペプチドミックス（ＰｅｐＭｉｘ（商標）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｓｐｉｋｅ　Ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ）、ＪＰＴペプチド）で再刺激した。対照ＰＢＭＣは刺激されていなかった。未処置のマウス（ワクチン未接種のマウス）から採取したＰＢＭＣを別の対照として使用した。３６時間培養した後、ＰＢＭＣを回収し、ＣＤ３＋ＣＤ８＋ＣＤ４４＋サブセットを染色することによりエフェクターメモリー細胞を染色した。染色されたＰＢＭＣのサブセットを、未処置マウスから採取したＰＢＭＣのサブセットと比較した（＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ検定）。結果を図２１Ａ及び図２１Ｂに示す。

【０２０４】

図２１Ａに示すように、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰは、ＭＬ　ＲＮＡ　ＮＰを投与されなかったマウスと比較して、ワクチン接種後により多くのエフェクターメモリーＴ細胞を有し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対して重複するペプチドミックスによるインビトロでの再刺激後、記憶想起が大幅に拡大した。（図２１Ａの右側の黒丸を参照）。有効なメモリーＴ細胞の数は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質での再刺激時に、タンパク質で刺激されていない場合と比較して増加し、これは、Ｔ細胞の増加がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的応答であると示唆している。共培養アッセイウェルの上清もサンプリングした。マルチプレックス分析の後、ＭＩＰ－１－α（すなわち、ＣＣＬ３）の放出の増加が再刺激細胞で観察されたが、これは、Ｔｈ１を介した記憶想起を強く示唆している。図２１Ｂを参照されたい。ＭＩＰ－１－αは、ワクチン接種による記憶想起に関与している。要約すると、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＮＡ－ＬＰを投与されたマウスは、ワクチン接種後により多くのエフェクターメモリーＴ細胞を有し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の重複ペプチドミックスによるインビトロ再刺激後に記憶想起が大幅に拡大した。

実施例１４

【０２０５】

この実施例は、本開示のナノ粒子をヒト対象に投与する方法を記載する。特に、この実施例では、成人におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＮＡ－ＬＰワクチンの安全性及び免疫学的活性を特徴付ける研究について説明する（例：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的中

和抗体、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的Ｔ細胞、及びワクチン接種患者における経時的な記憶想起応答の存在）。

【０２０６】

この試験は、新たに診断された成人ＭＧＭＴ非メチル化膠芽腫（ＧＢＭ）に対するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク／腫瘍ＲＮＡ－ＬＰワクチンのヒト第Ｉ相研究としては初めてのものである。この試験には、最大耐性量（ＭＴＤ）を効率的に特定するために、最初に埋め込まれた加速漸増デザイン（ＡＴＤ）を備えたＢＯＩＮデザインを使用した用量漸増試験が含まれる。１つの目的は、製造の実現可能性及び安全性を実証し、新たに診断されたＭＧＭＴ非メチル化ＧＢＭの成人患者におけるＲＮＡ－ＬＰワクチンのＭＴＤを決定することである。膠芽腫（ＧＢＭ）の患者は、この疾患及びその治療で見られる重大なリンパ球減少症を考えると、ＣＯＶＩＤ－１９感染のリスクが高くなる。ＣＯＶＩＤ－１９から保護すると同時に、疾患に対する治療効果を媒介するワクチンは、大きな利益をもたらすであろう。

【０２０７】

この試験は、手術、放射線、免疫療法の３つの部分からなる。

【０２０８】

手術：潜在的に適格な対象は、ＲＮＡ抽出、増幅、及び脂質粒子（ＬＰ）のローディングに適した方法での腫瘍材料の無菌回収に関するスクリーニングコンセントに登録される。腫瘍材料はフロリダ大学（ＵＦ）に一晩送られる。確認病理学的診断（現地の施設で）を伴う外科的切除の後、インフォームドコンセントが得られた後、患者は試験に登録される。一方、研究実施者は、登録サイトに返送される腫瘍特異的ＲＮＡ－ＬＰワクチンを生成する。

【０２０９】

放射線：放射線療法は、手術後４週間（＋／－１４日）以内又は施設の判断により、より早くに開始する必要がある。標準的な外部ビームＲＴは、ＴＭＺと同時に投与される（Ｓｔｒａｔｕｍ１のみ）。ＧＢＭを有する対象に対する外部ビームＲＴの投与に関する施設内の慣行に従うことができる。テモゾロミド（ＴＭＺ）７５ｍｇ／ｍ^2／日の４２回の投与は、放射線治療の遅れを考慮して、放射線治療中最大４９日間連続して行われる。進行中の臨床及び実験室での評価、及び付随するＴＭＺの忍容性のために、ＴＭＺの遅延又は中止が必要になる場合がある。適格性はＭＧＭＴ非メチル化初代成人型ＧＢＭに限定されているため、患者はテモゾロミドのアジュバントサイクルを受けない。

【０２１０】

標準的な外部ビームＲＴが投与される。成人のＭＧＭＴ非メチル化ＧＢＭ対象に対する外部ビームＲＴの投与については、施設内の慣行に従うことができる。それ以外の場合は、次のガイドラインを使用するべきである、

【０２１１】

標的体積の定義：（ａ）肉眼的腫瘍体積（ＧＴＶ）：ＧＴＶには、ＭＲ画像及び手術報告によって定義される全ての肉眼的残存腫瘍及び／又は腫瘍床が含まれる。多くの場合、ＧＴＶは収縮又は崩壊した腫瘍床を伴う。外科的アプローチに起因する組織欠損は、以前に腫瘍に関与していなかった場合、ＧＴＶの一部として含まれない。（ｂ）臨床標的体積（ＣＴＶ）：ＣＴＶは無症状の顕微鏡的疾患を治療することを意図しており、ＧＴＶの解剖学的に制約された５～１０ｍｍのマージンであり、必要に応じてＴ２／ＦＬＡＩＲ変化の、手術前の腫瘍関与の疑いのある領域を包含するために追加の拡張が行われる。ＣＴＶは、該当する場合、骨の頭蓋冠、大脳鎌、及びテントの範囲に限定され、腫瘍の拡大又は浸潤が確実に発生していない神経解剖学的構造までは拡張するが、それを超えて拡張しない。ＧＴＶが解剖学的コンパートメントの境界に近づくと、ＣＴＶは境界まで伸び、境界を含む。

【０２１２】

計画標的体積１（ＰＴＶ１）：ＣＴＶ＋３ｍｍ；計画標的体積２（ＰＴＶ２）：ＧＴＶ＋３ｍｍ。

【０２１３】
総線量：ＰＴＶ１－２Ｇｙ／フラクションで４６Ｇｙ又は１．８Ｇｙ／フラクションで４５－５０．４Ｇｙ；ＰＴＶ２－５９．４－６０Ｇｙ．
【０２１４】
フラクション当たりの線量：毎日１．８～２．０Ｇｙ／ｆｘ、週５日。ＰＴＶ１及びＰＴＶ２は、３０～３３回のフラクションで連続した段階で送達する必要がある。
【０２１５】
免疫療法：ＲＮＡ－ＬＰの投与は、末梢血球数が回復するまで待機し（すなわち、ＡＮＣ＞１５００／Ｌ、血小板＞１５０／Ｌ）、及び放射線照射後のＭＲＩの評価後（ベースライン用）、放射線照射後４週間以内に開始する。ＲＮＡ－ＮＰの投与を繰り返すと末梢血の血球減少症が誘発される可能性があるため、より高いしきい値を設定する。放射線照射後、患者は２週間毎に３回のＲＮＡ－ＬＰワクチンを受け、その後、月１回のアジュバントＲＮＡ－ＬＰワクチンの１２サイクルを開始し、合計１５回の投与を行う。
【０２１６】
対象：最大２８人の成人患者が、最初に埋め込まれた加速漸増デザイン（ＡＴＤ）を含むベイズ最適間隔（ＢＯＩＮ）デザインを使用した用量漸増試験に登録される。選択及び除外基準を図２３及び図２４に示す。
【０２１７】
薬剤投与
【０２１８】
ＴＭＺ：対象は、放射線照射中に（経口で）テモゾロミド（ＴＭＺ）、７５ｍｇ／ｍ^2／日を投与される（層１のみ）。投与は１日目の放射線療法で行われ、最大４２日間進行する。一般に、ＴＭＺは空腹時（少なくとも食事の１時間前又は２時間後）に、毎日の放射線照射及び放射線照射中の週末のほぼ同じ時間に服用する。実際、ＴＭＺの吸収は食物の影響を受けるため、食物に対する投与の一貫性が示唆されている。吐き気と嘔吐を軽減し、吸収を改善するために、空腹時の就寝時（少なくとも食前１時間又は食後２時間）に投与することが好ましい。たとえ複数のカプセルサイズで構成されていたとしても、全量を毎日ほぼ同じ時間に一度に服用する必要がある．テモゾロミドの投与は、施設内の慣行に従って実施する必要がある（例：計算された用量の＋／－５～１０％）。各テモゾロミド投与の３０分前に制吐薬を投与することが推奨される。所定の用量を服用してから２０分以内に嘔吐が発生した場合は、用量を１回繰り返すことができる。２０分後に嘔吐が発生した場合は、服用を繰り返すべきではない。カプセルを飲み込めない場合は、経口懸濁液を配合することができる。ＴＭＺを受けている間、対象は施設のガイドラインに従ってＰＣＰ予防を受ける必要がある。
【０２１９】
テモゾロミドの投与とは関係のない技術的又は医学的な理由で放射線療法を一時的に中断する必要がある場合は、毎日のテモゾロミドによる治療を継続する必要がある。放射線療法を永久に中断する必要がある場合は、毎日のテモゾロミドによる治療を中止する必要がある。
【０２２０】
ＲＴの終了日に関係なく、４２日間のテモゾロミドを投与する必要がある。一定量のテモゾロミドが投与され、鎮静又は技術的な問題のために放射線療法が実施されない場合、テモゾロミドの用量を補うべきではない（つまり、テモゾロミドの４２回を超える用量を投与すべきではない）。
【０２２１】
ＲＮＡ－ＬＰ：ＲＮＡ－ＬＰワクチンの有効な免疫療法構成要素は、パーソナライズされた腫瘍ｍＲＮＡ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクｍＲＮＡ、及びＤＯＴＡＰリポソームである。これらは、本明細書ではＲＮＡ－ＬＰと呼ばれる。ＲＮＡ－ＬＰは静脈内（ＩＶ）に投与される。ＲＮＡ－ＬＰの用量は、６週間続く治療の初期期間、２週間毎に投与され（任意に治療の１、１５、及び２９日目に６週間にわたって３回投与）、その後、毎月

１２サイクルのアジュバントＲＮＡ－ＬＰ投与が続いて、合計１５回の投与となる。ＲＮＡ－ＬＰの用量を、０．０４ｍｇ／ｋｇ／ｈｒの速度で、適切なフラッシュ体積でＩＶ投与する。

【０２２２】

対象は、投与毎に表３のＲＮＡ－ＬＰの用量の１つを受ける。

【０２２３】

【表３】

表３

用量	用量
用量－４	０．００９３７５ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．０００６２５ｍｇ／ｋｇのｍＲＮＡ
用量－３	０．０１８７５ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．００１２５ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量－２	０．０３７５ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．００２５ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量－１	０．０７５ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．００５ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量０	０．１５ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．０１ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量＋１	０．３ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．０２ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量＋２	０．６ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．０４ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ
用量＋３	１．２ｍｇ／ｋｇ　ＬＰにカプセル化された０．０８ｍｇ／ｋｇ　ｍＲＮＡ

【０２２４】

用量０（又は用量制限毒性（ＤＬＴ）が観察されたより低い用量）で、３人の成人患者を合計３回のＲＮＡ－ＬＰ投与で治療し、化学放射線療法後、２週間毎の間隔で投与する。ＤＬＴ期間の完了後（最初の３回のＲＮＡ－ＬＰ投与の完了から２週間後）、安全上の懸念がなければ、用量０で小児コホートの登録が開始される。安全上の懸念がある場合（すなわち、１つ以上のＤＬＴが観察された場合）、用量－１への段階的縮小が行われ、安全上の懸念がない限り、その用量が層２（小児対象）の開始用量として使用される。毒性評価により小児層を開始することができる場合、小児及び成人の第Ｉ相試験は、ＢＯＩＮデザインを使用して個別の用量漸増に従い、ＭＴＤ及び毒性の個別の評価が行われる。

【０２２５】

最初のＤＬＴ期間は、最初の３回のＲＮＡ－ＬＰ投与の完了から２週間後に評価されるが、用量漸増（個々の層内）の前に、ＤＬＴは投与の過程を通じて監視される。

【０２２６】

支持療法には、抗生物質、制吐薬、止瀉薬、局所治療、血液製剤、静脈内又は経口輸液、電解質補充が含まれるが、これらに限定されず、臨床的に必要に応じて使用される。疑似進行の兆候及び症状については、施設のガイドラインに従ってベバシズマブによる治療を行うことで、腫れを最小限に抑えることができる。

【０２２７】

用量制限毒性

【０２２８】

ＤＬＴは、ＣＴＣＡＥ５．０に従って、免疫療法に関連する（可能性がある、可能性が高い、又は明確な）ものとして定義される。１）グレード３以上の非神経学的、非血液学的毒性。２）７日以内にグレードＩＩ以上に改善しないグレード３の神経毒性、又は１４日以内にグレード２以上に改善しないグレード３～４の血液毒性。３）グレード３の自己免疫性脳脊髄炎。又は４）グレード４の神経毒性。神経学的毒性が次の投与の前にベースラインに戻った場合、次の投与はスケジュール通りに投与できる。神経学的症状が７日以内にグレード２以下に改善された（したがってＤＬＴではない）が、次回の予定されたワクチンまでにベースラインに戻らない場合、投与を最大４週間保留することができる。発症から７日以内に事象を元に戻すこと（グレード２以上に改善）ができない場合、その患者に対してＤＬＴが宣言され、それ以上の投与は行われない（ＤＬＴウィンドウは、最初

の３回の投与の完了から２週間後である）。事象が逆転したものの、その後のワクチン接種で上記の毒性が再び認められた場合、患者はＤＳＭＣと審議するまで、更なるワクチン接種が控えられる。

【０２２９】

脳浮腫毒性の例外：ＣＴＣＡＥ５．０基準は、脳浮腫をグレード３（新規発症；ベースラインからの悪化）、グレード４（生命を脅かす結果；緊急の介入が必要）及びグレード５（死亡）に分類する。脳浮腫は通常、悪性神経膠腫の患者に疾患過程の一部として現れ、標準治療の化学療法及び放射線療法によって悪化する可能性がある。更に、効果的な抗腫瘍免疫応答には、浸潤性腫瘍細胞における炎症反応及び浮腫が関与している可能性がある。したがって、脳浮腫毒性は、ＣＴＣＡＥ５．０基準でグレード３～４にランク付けされているが、患者が安定しているか、臨床的に改善されている場合、ＤＬＴとは見なされない。臨床的に衰退している患者に脳浮腫が観察された場合、それが明らかに治験薬に起因するものであり、患者が臨床管理から７日以内に改善を示さない場合、その事象はＤＬＴと見なされる。腫瘍の進行はＤＬＴとは見なされない。

【０２３０】

ＲＮＡ負荷ＤＣベースの免疫療法に関連するグレード３以上の毒性はまれである。悪性黒色腫患者における腫瘍浸潤リンパ球及び高用量ＩＬ－２を使用した養子Ｔ細胞療法、及び抗ＣＬＴＡ－４モノクローナル抗体遮断による治療は、治療に関連する毒性を最も頻繁に伴う免疫療法レジメンである。この治療に関連する可能性のある毒性を評価するための最も保守的なアプローチを取るために、試験実行者等は、ＣＮＳに固有の自己免疫毒性に加えて、この治療に関連する同様の毒性に注意する必要がある。初期段階の試験で免疫療法を受けた患者で観察された可能性のある免疫介在性障害には、皮膚（白斑及び皮膚白血球破砕性血管炎）、甲状腺（自己免疫性甲状腺炎）、肝臓（自己免疫性肝炎）、及び下垂体（下垂体炎）が関与している。免疫介在の可能性がある異常な検査結果には、血清リパーゼ及びアミラーゼの上昇、並びに肝機能検査が含まれる。患者が自己免疫抗体に関連すると考えられるＡＥ（甲状腺炎、肝炎、血小板減少症等）を患っている場合、サイトＰＩは施設の基準に従って適切な自己免疫抗体検査のために血液試料を送付する。特定の自己抗体が存在する場合、ベースラインで採取された血清試料は、それらの自己抗体の存在についてテストされる。

【０２３１】

評価

【０２３２】

特に明記されていない限り、全ての評価には＋／－３日のウィンドウが許可される。１サイクルは４週間（２８日）である。更なる詳細については、観察及び手順並びに長期フォローアップのセクションを参照されたい。評価のカレンダーを図２５に示し、評価のリストを以下に示す。

【０２３３】

標準治療の切除／生検：スクリーニングインフォームドコンセント（（手術前；標準治療の切除／生検から２８日以内）；外科的切除／組織採取による生検；脳のＭＲＩ（手術前のＭＲＩは手術の２８日以内に実施する必要があり、手術と術後のＭＲＩは施設の標準治療に従って実施する必要がある）。

【０２３４】

治療への登録前のスクリーニング（手術後）（別段の指示がない限り、登録から２８日以内）：病理学による疾患の確認。治療放射線療法前の治療のインフォームドコンセント；理学的及び神経学的検査；バイタルサイン（身長と体重を含む）；ベースラインの症状、以前の治療歴、以前の治療に関連する残留毒性を含む完全な病歴；パフォーマンスステータス評価；脳ＭＲＩ（術後ＭＲＩが登録から２８日以内に完了した場合、繰り返す必要はない）；臨床検査手順（妊娠可能年齢の女性の血清妊娠検査、分画及び血小板数を含むＣＢＣ、ＣＤ４／ＣＤ８パネル及び比率、ＰＴ／ＩＮＲ及びＰＴＴ、ＡＳＴ／ＡＬＴ、ＢＵＮ、総ビリルビン及びクレアチニンを含む完全代謝パネル（ＣＭＰ）、ＨＩＶ、Ｂ型肝

炎、Ｃ型肝炎、ＣＭＶを含む感染症検査、循環腫瘍ＤＮＡ研究用の血液。
【０２３５】
標準放射線治療（４週間（手術後＋／－２週間）又は施設の判断に基づいてより早く開始する）：ＴＭＺの投与、プロトコル又はＧＢＭの施設ガイドラインによる放射線
【０２３６】
放射線照射の終了（＋１４日）：放射線照射後のＭＲＩ
【０２３７】
投与＃１－３（血液学的回復後２週間毎＋／－３日（ＡＮＣ＞１５００／Ｌ、血小板＞１５０／Ｌ）：ＲＮＡ－ＬＰワクチンの投与、理学的及び神経学的検査、バイタルサイン（身長と体重を含む）、パフォーマンスステータス、有害事象の評価、併用薬、検査手順（鑑別及び血小板数を含むＣＢＣ、ＡＳＴ／ＡＬＴ、ＢＵＮ、総ビリルビン及びクレアチニンを含む、完全な代謝パネル（ＣＭＰ）、ＣＤ４／ＣＤ８パネル及び比率（投与＃１及び＃３）、ワクチン接種前２４時間以内、ワクチン接種後２時間及び６時間以内の免疫モニタリング用の末梢血、循環腫瘍ＤＮＡ試験）
【０２３８】
サイクル１＋、１日目（＋／－１週間）、ＲＮＡ－ＬＰ投与＃４－１５（最初の３回の投与に続く各サイクルの１日目に投与）（血液学的回復が観察されたら、投与＃３の４週間後に開始する（ＡＮＣ＞１５００／Ｌ、血小板＞１５０／Ｌ）：ＲＮＡ－ＬＰワクチンの投与、理学的及び神経学的検査、バイタルサイン（身長と体重を含む）、有害事象の評価、併用薬、パフォーマンスステータス、脳ＭＲＩ（投与＃４、６、８、１０、１２、１４の２週間以内）、検査手順（鑑別及び血小板数を含むＣＢＣ、ＡＳＴ／ＡＬＴ、ＢＵＮ、総ビリルビン及びクレアチニンを含む完全代謝パネル（ＣＭＰ）、ＣＤ４／ＣＤ８パネル及び比率（投与＃５、１０、及び１５）、ワクチン接種前２４時間以内、ワクチン接種後３及び６時間以内の免疫モニタリング用の末梢血、循環腫瘍ＤＮＡ試験用の血液）
【０２３９】
治療訪問の終了（この期間内に以前に評価されていない場合は＋／－１４日）：理学的及び神経学的検査、バイタルサイン、有害事象の評価、併用薬、パフォーマンスステータス、脳ＭＲＩ
【０２４０】
３０日間の毒性チェック（＋／－７日）：有害事象の評価に関連するＡＥは、解決又はベースラインに戻るまで引き続き追跡する必要がある。併用薬
【０２４１】
長期／生存フォローアップ手順：患者は、何らかの原因で死亡するまで追跡される。これらの患者の標準治療の一環として、腫瘍が進行すると、対象は定位生検又は切除を受ける場合がある。これは試験手順ではないため、別途コンセントを得るものとする。組織が得られれば、組織学的に腫瘍の進行を確認し、再発病変における免疫学的細胞浸潤及び抗原発現プロファイルを評価するために使用される。
【０２４２】
対象は、最初の１２ヶ月間は３ヶ月毎（＋／－１４日）に追跡され、その後、何らかの原因による死亡まで、次の２年間は６～１２ヶ月毎に追跡される。
【０２４３】
１年目（全ての手順は３ヶ月毎に実施する必要がある）：理学的及び神経学的検査、バイタルサイン（身長と体重を含む）、病歴、ＭＲＩ（＋／－１４日）、有害事象の評価、併用薬。任意選択で－実行可能な場合：鑑別及び血小板数を伴うＣＢＣ、ＣＤ４／ＣＤ８パネル及び比率、ＡＳＴ／ＡＬＴ、ＢＵＮ、総胆汁及びクレアチンを含む完全な代謝パネル、免疫療法実験、免疫モニタリング用の末梢血
【０２４４】
２～３年目：６～１２ヶ月毎のＭＲＩ、４～６ヶ月毎の有害事象評価、４～６ヶ月毎の併用薬。任意選択で－実行可能な場合：鑑別及び血小板数を伴うＣＢＣ、ＣＤ４／ＣＤ８パネル及び比率、ＡＳＴ／ＡＬＴ、ＢＵＮ、総胆汁及びクレアチンを含む完全な代謝パネ

ル、免疫療法実験、免疫モニタリング用の末梢血
【０２４５】
オフ治療基準：この試験の目的のために、「オフ治療」は、治験薬の最後の用量が投与される日として定義される。治療は、最大１４ヶ月間、又は次の基準のいずれかが適用されるまで継続する場合がある。疾患の進行、試験実行者の判断において更なる治療を対象が受容できなくなる対象の状態、許容できない有害事象。対象、親又は法定後見人がこのプロトコルでの更なる治療を拒否する、妊娠。
【０２４６】
オフ試験基準：対象は、次の理由で試験外と見なされる：対象が不適格であると判断された、対象、親又は法定後見人が継続的な参加への同意を撤回した、試験中に対象が死亡した、プロトコル固有のフォローアップ期間が終了した
【０２４７】
試験に登録された全ての対象は、たとえ治療前に試験から外されたとしても、治療の意図に基づいてデータ分析に含まれる。ただし、対象は次の理由で安全性評価のために交換される。（ｉ）ＲＮＡ－ＬＰワクチンが生成されたが、放出基準を満たさないか、又は対象となり、次いで試験にとどまり、資格のある生成物を受けたが、安全性評価の目的で置き換えられる。（ｉｉ）最初のワクチン接種時に生理学的レベルを超える用量を必要とするように、鼻又は吸入ステロイドを除いて、コルチコステロイドの増加を必要とする対象は、試験に残る場合があるが、ステロイドの使用の増加は、自己免疫毒性のリスクを覆い隠す可能性があるため、安全性の評価のために置き換えられる。（ｉｉｉ）毒性のない３回未満のワクチンを受け取った対象は、安全性評価のために交換される。
実施例１５
【０２４８】
この実施例は、本開示のＲＮＡ－ＬＰを特徴付ける更なる研究を記載する。
【０２４９】
効果的なＣＯＶＩＤ－１９ワクチンは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の細胞リザーバ及びそのゲノムの不均一性（すなわち、変異）の両方を克服する（世界的な大流行の状況で）ほぼ即時の防御応答を引き出すことが望ましい。ＣＯＶＩＤ－１９に対する現在の予防戦略は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ゲノムの小さな断片を標的とするｍＲＮＡワクチンを利用しているが、これらは十分に強力ではないか、十分に迅速に免疫を誘導しない可能性がある。これらのワクチンは中和抗体の生成に依存しており、これには数回の追加免疫が必要である。しかし、ウイルスリザーバは宿主細胞に存在するため、これらのリザーバを排除するためのＴ細胞免疫と、活性なウイルス粒子を中和する抗体と、の両方を付与する新しい技術が必要になる可能性がある。
【０２５０】
ＲＮＡ－ＮＰ技術は、例えば、完全長のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２構造遺伝子を標的とし、変異の不均一性を克服することにより、これらの懸念のそれぞれに対処でき、双方向の適応免疫を誘導し、ほぼ即時の免疫活性化を誘発する（数時間以内）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２全長スパイクＲＮＡ－ＮＰを投与されたマウスは、より多くのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的抗体（図２６）と、重複するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドミックスによるインビトロ再刺激後の記憶想起の有意な拡大を伴うワクチン接種後のエフェクターＴ細胞を有していた（図２７Ａ、図２８Ｂ、及び図２８）。ＲＮＡ－ＮＰ活性は、非ＴＬＲ７依存的な方法での形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）からのＩＦＮ－γ依存性自然免疫と関係している。
【０２５１】
ヒト肺外植片を用いた更なる研究が行われ、外植片がＨＣｏＶ－ＯＣ４３及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２等のコロナウイルスに感染する可能性があることが示された。４８時間培養する前にコロナウイルスにさらされた肺組織は、レムデシビルのような抗ウイルス薬で弱めることができる用量依存的なウイルス転写の証拠を示している．
【０２５２】

ＲＮＡ－ＬＰの特性決定に適した研究に関する追加情報を以下に示す。

【０２５３】

中和Ａｂ研究

【０２５４】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク、膜、エンベロープ、及びヌクレオキャプシドタンパク質のＤＮＡ配列は、Ｔ７プロモーター及び遺伝子挿入のｐｏｌｙＡＡＡテール隣接領域が埋め込まれたｐＧＥＭ－４Ｚプラスミドバックボーンにクローニングされる。プラスミドを大腸菌に形質転換し、抗生物質（ｐＧＥＭ４ｚはアンピシリン耐性）の存在下で増殖させて、形質転換された大腸菌を選択し、ＤＮＡ抽出、線形化、及び精製のために回収する。その後、ＤＮＡはｍＲＮＡに転写され、多層ＲＮＡ－ＮＰにロードするために精製される。ＤＯＴＡＰ（Ａｖａｎｔｉ）バックボーンで構成される脂質ＮＰは、多層小胞に積層される。簡単に説明すると、回転加熱のための水溶液への再懸濁、バス超音波処理、押し出し及び特定の質量比１：１５のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡでの層状化（μｇ投与、ＲＮＡ対ＮＰ）の前に、回転真空蒸発を使用して、有機溶媒を除去し、３７５μｇの脂質ＮＰ製剤を、２５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡ、又は対照（非特異的）ｐｐ６５　ｍＲＮＡと複合体化する。Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、週に１回（ｘ３）静脈内ワクチン接種し、結合及び中和抗体の評価のために、３回目のワクチン接種の２週間後に血清を採取する。結合抗体は、カスタマイズされたコロナウイルスＣＯＶＩＤ－１９ＩｇＧ　ＥＬＩＳＡキットを使用して、ワクチン接種したマウスの血清から評価する。中和は、以下に説明するように、ＭＬＶベースの偽型（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を含む）を使用して評価する。

【０２５５】

偽型ウイルスシステム：簡潔には、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク、膜、又はエンベロープコードプラスミド、ＭＬＶ　Ｇａｇ－Ｐｏｌパッケージング構築物、及びルシフェラーゼレポーターをコードするＭＬＶトランスファーベクターと同時トランスフェクトされる。細胞をトランスフェクション培地とともに３７℃で５時間インキュベートする。次に、細胞をＤＭＥＭで２回洗浄し、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭを６０時間添加する。上清を回収し、０．４５ｍｍ膜で濾過し、３０ｋＤａ膜で３，０００ｒｐｍで１０分間濃縮し、次いで－８０℃で凍結する。ＡＣＥ２（ｃｒｅａｔｉｖｅ－ｂｉｏｇｅｎｅ．ｃｏｍ）で安定にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、マウス血清の存在下で調製した偽型ウイルスに感染させる。ＡＣＥ２発現２９３Ｔ細胞を２４ウェルプレートに２．５×１０^{5}細胞／ウェルでコンフルエントになるまで播種し、２００μｌの偽型ウイルス溶液又は非感染対照条件（ウェル当たり２００μｌのＤＭＥＭ－Ｃ溶液）を、ワクチン接種された動物からの血清含む場合、及び含まない場合で接種する。インキュベーションは、３７℃、５％CO_2で１～２時間行い、その後３００μｌのＤＭＥＭ－Ｃを加えて７２時間インキュベーションする。上清を吸引し、ルシフェリン基質の添加後、バイオルミノメータを使用して、ルシフェラーゼ発現について上清及び細胞の両方を評価／定量化する。中和の成功は、対照条件に対するマウス血清の添加後のルシフェラーゼ発現の統計的に有意な減少に基づいて決定される。結果は、ＲＮＡ－ＮＰを接種した動物の血清と共培養した肺外植片を使用した３Ｄ培養システムで確認できる。

【０２５６】

応答メモリーＴ細胞解析

【０２５７】

スパイク、膜タンパク質、エンベロープ、及びヌクレオキャプシド遺伝子をコードするＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ＲＮＡ－ＮＰは、Ｃ５７Ｂｌ／６マウス及びヒト化ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスに別々に投与する。ＲＮＡ－ＮＰは、０日目、７日目、１４日目に静脈内注射によって投与し、続いて毎週血液／血清を評価する。ビーズアレイ（ＢＤ）によるＴｈ１サイトカイン（すなわち、ＣＣＬ３、ＴＮＦ－α、及びＩＦＮ－γ）の検出について血清を分析し、活性化マーカ（すなわち、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ６９、ＣＤ１５４、ＰＤ－１）の存在についてＴ細胞を評価する。スパイク及びヌクレオキャプシド

構造タンパク質に対する抗原特異性は、ＨＬＡ＊２ＭＨＣ－クラスＩ五量体染色（Ｐｒｏ－Ｉｍｍｕｎｅ）、及びエクスビボ記憶想起応答によって決定する。想起応答性Ｔ細胞は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的構造タンパク質をコードするｍＲＮＡをパルスした骨髄由来の樹状細胞（ナイーブマウス由来）と、ｐｐ６５（ヒトＣＭＶマトリックスタンパク質）をコードする対照ｍＲＮＡでパルスされた樹状細胞と、に由来する骨髄を有するワクチンを接種した動物のＰＢＭＣのエクスビボ再刺激アッセイに基づいて識別する。これらのＤＣは、ワクチン接種されたマウスから磁気分離されたＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞と共培養され、増殖、表現型（ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの示差染色によるエフェクター対セントラルメモリー）、機能、及び細胞毒性についてＴ細胞の評価を行う。９６ウェルプレートで４８時間、エクスビボ共培養を３回行う（ウェル当たり4×10^4のＤＣを4×10^5のＴ細胞とエクスビボ共培養する）。Ｔ細胞はフローサイトメトリーによる増殖の評価のためにＣＦＳＥ（Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ）で標識され、上清及び細胞を回収する前に培養で再刺激する。共培養後の細胞毒性を決定するために、Ｔ細胞を、ルシフェラーゼバイオレポーターを含むＡＣＥ２発現２９３Ｔ細胞（上記のように偽型ウイルスに感染）又は１０：１のエフェクター／標的比で４８時間培養した対照細胞の存在下でインキュベートし、生物発光を評価する。各共培養からの生物発光は、生細胞の代理として、ＩＶＩＳイメージングによって定量的に測定される。

【０２５８】

生来のシグナル伝達機構の試験

【０２５９】

ＲＮＡ－ＮＰからの活性は、形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）からのＩＦＮ－γ（Ｉ型インターフェロン）に依存する。興味深いことに、ＴＬＲ７ＫＯマウスでは有効性が損なわれていないため、ＲＮＡ－ＮＰの生得的な免疫調節効果は、ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）刺激によって駆動されるようには思われない。この試験では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ＲＮＡ－ＮＰがＩＦＮ－γ依存的な方法で双方向の適応応答を誘発するかどうかを調査し、関与する細胞の種類及びシグナル伝達経路を識別する。ＲＮＡ－ＮＰは、ｐＤＣからの非ＴＬＲ依存性細胞内ＰＲＲを介してＩＦＮＡＲ１シグナル伝達をリセットする可能性がある。ＲＩＧ－Ｉ、ＭＤＡ－５、又はＳＴＩＮＧがＩＦＮ－γシグナル伝達に関与している可能性がある。

【０２６０】

ＳＡＲＳ－Ｃｏ－Ｖ－２特異的ＲＮＡ－ＮＰ、ｐｐ６５　ＲＮＡ－ＮＰ、又はＮＰ単独を、上記のようにマウスに投与する。ワクチンは週に１回（ｘ３）投与する。マウスを、７日間隔で３回ワクチン接種する。血液を採取し、ＤＣ亜集団について評価する。ｐＤＣは、ＣＤ１１ｃ、Ｂ２２０、及びＧｒ－１（ｅｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）について染色され、異なるｐＤＣサブセットは、ＣＣＲ９、ＳＣＡ１、及びＬｙ４９ｑの示差染色によって識別される。レジデント／移動性古典的ＤＣ（ｃＤＣ）は、ＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１０３＋ＭＨＣＩＩ＋細胞及びＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１１ｂ＋ＭＨＣＩＩ＋細胞によって識別され、骨髄性ＤＣ（ｍＤＣ）は、ＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１４＋ＭＨＣＩＩ＋細胞によって識別される。活性化状態は、サイトカイン（すなわち、ＩＦＮ－Ｉ／ＩＩ、ＩＬ－１２）及び共刺激分子（すなわち、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６）の発現に基づいて評価される。分析は、マルチパラメータフローサイトメトリ（ＬＳＲ，ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって行う。対象の先天的経路（すなわち、ＲＩＧ－Ｉ、ＭＤＡ－５、及びＳＴＩＮＧ）は、ＰＣＲによってこれらの細胞サブセットで調査される。結果は、上記のように、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和及び適応想起と相関している可能性がある。結果が細胞内ＰＲＲのＩＦＮ－Ｉ（すなわち、ＩＦＮ－α／ＩＦＮ－β）に依存しているかどうかを確認するために、野生型及びノックアウト（ＫＯ）マウスに目的の経路（すなわち、ＩＦＮＡＲ１、ＲＩＧ－Ｉ、ＭＤＡ－５、及びＳＴＩＮＧ、全てＪａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｓから入手可能）に対してワクチン接種する。ＩＦＮ－Ｉ（すなわち、ＩＦＮ－α／ＩＦＮ－β）レベルは、ワクチン接種の２４時間後にＥＬＩＳＡによって血清から測定され、上記の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２免疫原性試験の結果と比較する。

【０２６１】
多層ＲＮＡ－ＮＰの免疫原性は、既存のｍＲＮＡナノ脂質プラットフォームとは対照的に、ＭＤＡ－５等の細胞内病原体認識受容体に依存しているようである。図３２Ａ及び図３２Ｂ。
【０２６２】
遺伝子発現と免疫原性との関係を調べる
【０２６３】
Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）の５’内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）は、キャップに依存しない翻訳及びＲＮＡゲノムの非常に迅速かつ広範な翻訳をもたらし、その３’ポリＵＵＵテールはＲＩＧ－Ｉ及びＭＤＡ５経路を含むＰＲＲによって認識され、自然免疫系の激しい誘発及びＩ型インターフェロンの産生を導く。α－グロビンＵＴＲ（図２９Ａ及び図２９Ｂ）並びにＨＣＶ由来の５’及び３’ＵＴＲ（図３０）の付加は、ＲＮＡ－ＮＰの活性を増強する。この研究では、ＨＣＶの５’ＵＴＲが単独で、又は３’ＵＴＲと組み合わせて、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＲＮＡ－ＮＰ構築物のＲＮＡ安定性／免疫原性を高めるかどうかを調べる。
【０２６４】
５’αグロビンＵＴＲ、ＨＣＶの５’ＩＲＥＳ、及び３’ＨＣＶポリＵＵＵテールは、制限消化及びライゲーションによってｐＧＥＭ４ｚプラスミドベクターに組み込まれ、これらの配列は、ルシフェラーゼのＤＮＡプラスミドにクローニングされ、これは、修飾が安定した遺伝子発現を増強するかどうかを判断するために使用される。ＲＮＡ鋳型は、ゲル電気泳動によって単離され、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔを使用して精製されたＰＣＲ産物を使用して作製する。得られたＰＣＲ断片を制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ及びＥｃｏＲＩで消化し、Ｔ７プロモーター及び６４残基のポリＡテールを持つインビトロ転写ＲＮＡの生成を可能にする６４Ｔヌクレオチドを有するプラスミドのＨｉｎｄＩＩ及びＥｃｏＲＩ部位にクローニングする。プラスミドをＳｐｅＩで直線化し、ｍＭｅｓｓａｇｅ　ｍＭａｃｈｉｎｅ　Ｔ７（Ａｍｂｉｏｎ）を使用してインビトロ転写（ＩＶＴ）し、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製し、分光測光法で定量化し、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒで分析して、全長ｍＲＮＡの品質及び合成を確認する。
【０２６５】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＮＡ－ＮＰ構築物の免疫原性試験を伴うルシフェラーゼベースの構築物の発現は、上記のアッセイを使用して、未修飾のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＮＡ－ＮＰ構築物と比較される。
【０２６６】
ＬＡＭＰコンジュゲートＲＮＡ－ＮＰの試験
【０２６７】
ＬＡＭＰ－１及びＤＣ－ＬＡＭＰ標的化は、Ｔ細胞応答の増加をもたらし、最も顕著なのは、ＭＨＣクラスＩＩ提示経路への抗原のチャネリングによるＣＤ４＋Ｔ細胞の「ヘルプ」の増加である。これにより、ＣＤ４＋応答のレパートリーが広がり、体液性免疫及び多機能性Ｔ細胞応答が強化される。ＣＤ４＋免疫応答は、ウイルス感染に対する能動免疫の誘導及び維持に不可欠であるため、ＬＡＭＰコンジュゲート抗原は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する双方向の応答を増強すると予想される。ＲＮＡ－ＮＰへのＬＡＭＰの組込みは、記憶想起応答を大幅に増加させる可能性がある（図３１）。
【０２６８】
ＬＡＭＰ－１及びＤＣ－ＬＡＭＰ構築物は、ｐＧＥＭ－４ｚベクターにクローニングする前に、ＬＡＭＰの管腔ドメイン及び膜貫通ドメイン及び細胞質尾部の間にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的遺伝子を挿入することによって作製する。変更されたＬＡＭＰの免疫学的効果は、次の点で未変更のＲＮＡ－ＮＰと比較される。１）対照ＲＮＡ－ＮＰ。２）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を標的とするＬＡＭＰ－１を組み込むＲＮＡ－ＮＰ。３）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を標的とするＤＣ－ＬＡＭＰを組み込むＲＮＡ－ＮＰ。４）上記のアッ

セイを使用して、ＤＣ－ＬＡＭＰ及びＬＡＭＰ－１標的抗原（等モル比）の組合わせを組み込んだＲＮＡ－ＮＰ。

【０２６９】

双方向適応免疫

【０２７０】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２構造ｍＲＮＡは、未修飾の標的と比較する。非修飾ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＮＡ－ＮＰは、ＵＴＲ修飾ＲＮＡ－ＮＰ、ＬＡＭＰ修飾ＲＮＡナノ粒子ワクチン、及びＵＴＲ＋ＬＡＭＰ修飾ＲＮＡ－ＮＰと比較する。抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２適応反応に関して、少量で頻度の低い投薬の効果を調べる。用量を減らした場合（すなわち、１０μｇ、５μｇ、２．５μｇ、１μｇ）と、標準の２５μｇの用量を単回ワクチンとして投与した場合と、又は週１回の複数回のワクチン（ｘ３）として投与した場合と、の効果を比較する。免疫原性は上記のように検査され、結果はＨＬＡ－Ａ２及びＡＣＥ２トランスジェニック動物で裏付けられ得る。複数のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２構造タンパク質を標的とするＵＴＲ及びＬＡＭＰ改変ワクチンは、低用量での単回投与として、より効果的な防御を引き出す可能性がある。

【０２７１】

製剤研究

【０２７２】

ＲＮＡ－ＮＰは、薄い脂質層が残るまで蒸発する前に、クロロホルムに再懸濁する。インビボ調製では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡをＤＯＴＡＰ　ＮＰに１：１５ｍｇの多層比で添加する。この混合物を１５～２０分間室温に保ち、ＲＮＡ－ＮＰ複合体を形成させる。多層複合体形成後、内容物をｔｅｒｔ－ブタノールと混合し、ボルテックスし、－８０℃で一晩凍結した後、凍結乾燥（Ｌａｂｃｏｎｃｏ）し、－２０℃で保存する。凍結乾燥製剤の検証は、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を介した体液性及び細胞性応答に基づいて、新たに生成されたＲＮＡ－ＮＰと比較して評価する。粒子は、ゼータ電位測定及びサイズ測定によって検証する。

【０２７３】

追加のインビボ研究

【０２７４】

ネコ科の大規模動物研究では、安全性及び毒性を定義するためにＲＮＡ－ＮＰを静脈内注射する。ＲＮＡ－ＮＰの開始（低）用量には、０．７５ｍｇ／ｋｇのＤＯＴＡＰナノリポソームでカプセル化されたＲＮＡ（０．０５ｍｇ／ｋｇ）が含まれる。これらは、１．５ｍｇ／ｋｇのＤＯＴＡＰナノリポソームでカプセル化された０．１ｍｇ／ｋｇのＲＮＡの中用量（１００％増加）と比較され、これは、マウス（１ｍｇ／ｋｇ）の（体表面積に基づいた）ネコ科同等用量である。高用量投与（１００％増加）には、３ｍｇ／ｋｇのＤＯＴＡＰナノリポソームでカプセル化された０．２ｍｇ／ｋｇのＲＮＡが含まれる。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡ産生の実現可能性は、ゲル電気泳動、ナノドロップ分光光度法、生物分析によるＲＮＡの品質、濃度、完全性に基づいて決定される。複数回投与を受けるように無作為化された動物は、１週間間隔で３回のＲＮＡ－ＮＰを投与される。末梢実験は、登録時、各ＲＮＡ－ＮＰの直前、及び治療後１ヶ月のフォローアップ中にネコから監視される。完全な血球カウント（鑑別を伴う）、包括的な化学検査、脂質パネル、及び腎／肝機能検査が監視される。サイトカイン放出症候群の症状を評価するために、注入後に血清サイトカインを採取する（すなわち、ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＴＮＦ－ａ）。標準的な３＋３研究デザインでは、グレード３～４の有害事象及び最大耐性量（ＭＴＤ）等の用量制限毒性（ＤＬＴ）を定義するために、増加する用量で静脈内のＲＮＡ－ＮＰが注射される。３つのグループ（３ネコ科／群）がある。ＲＮＡ－ＮＰに起因するＤＬＴが３匹のうちの１匹のネコで起こった場合、追加の３匹のネコを同じ用量で割り当てることになる。３匹のネコのいずれもＤＬＴを経験していない場合、又は６匹のネコの１匹がＤＬＴを経験した場合、その後発生したネコの用量は増加することになる。２匹以上のネコがＲＮＡ－ＮＰに起因するＤＬＴを経験した場合、その群に対しては停止され、すぐに低

い用量レベルがＭＴＤと見なされる。各群の３＋３研究からの対象全体の免疫反応に基づいて、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＮＡ－ＮＰの最低有効用量が選択されて、拡大コホートに進む（１群当たり最大２０対象）。

【０２７５】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ＲＮＡ－ＮＰがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的中和抗体の増加を媒介し、大型動物で持続するメモリーＴ細胞を想起することを確認するため、各治療の直前及び治療後のフォローアップ中（最後のワクチンの３０日後、６ヶ月及び１２ヶ月）、１０ｍＬのネコの末梢血をバキュテナチューブに採取する。ＰＢＭＣは、ｆｉｃｏｌｌを介した密度勾配遠心分離によって分離する。ＤＣ及びＴ細胞は、活性化マーカ（すなわち、ＣＤ１１ｃ＋細胞上のＣＤ８０、ＣＤ８６、及びＭＨＣＩＩ並びにＣＤ４及びＣＤ８＋細胞上のＣＤ４４）の決定のために末梢血から評価される。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的ｍＲＮＡ（又は対照ｐｐ６５ｍＲＮＡ）でエレクトロポレーションされたＰＢＭＣは、ＥＬＩＳＡによる上清からのＩＦＮ－γ及びＭＩＰ－１－α（すなわち、ＣＣＬ３）の評価の前に、ＣＤ３選択Ｔ細胞と共培養する。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対するＴ細胞の細胞毒性を評価する。動物からの血清は、３Ｄ肺外植片における中和の評価のために、最後のワクチン接種の１、６、及び１２ヶ月後に採取される。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２及び３ＤでのＨｃｏＶ－ＯＣ４３等の関連するコロナウイルスに対する中和は、肺外植片で評価する。

【０２７６】

本明細書において援用される、刊行物、特許出願及び特許を含む、全ての参考文献は、各々の参考文献が参照により組み込ま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、参照により本明細書中に組み込まれる。

【０２７７】

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「ある（ａ）」及び「ある（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」という用語並びに同様の指示物は、本明細書に別の記述がなければ、又は明らかに文脈と矛盾しない限り、単数及び複数の両方を包含すると解釈されるべきである。「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」及び「含有する」という用語は、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、「～を含むがこれらに限定されない」を意味する）。

【０２７８】

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、その範囲及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、各々の別個の値及び各端点は、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込まれる。

【０２７９】

本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において特に指定のない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実行され得る。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、又は例示的な言葉（例えば「等」）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。

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全ての改変及び同等物を含む。更に、本明細書において特に指示がない限り、又は文脈と明らかに矛盾しない限り、全ての可能な変形形態における上記要素の任意の組合わせが本開示に包含される。

【図面】

【図１Ａ】

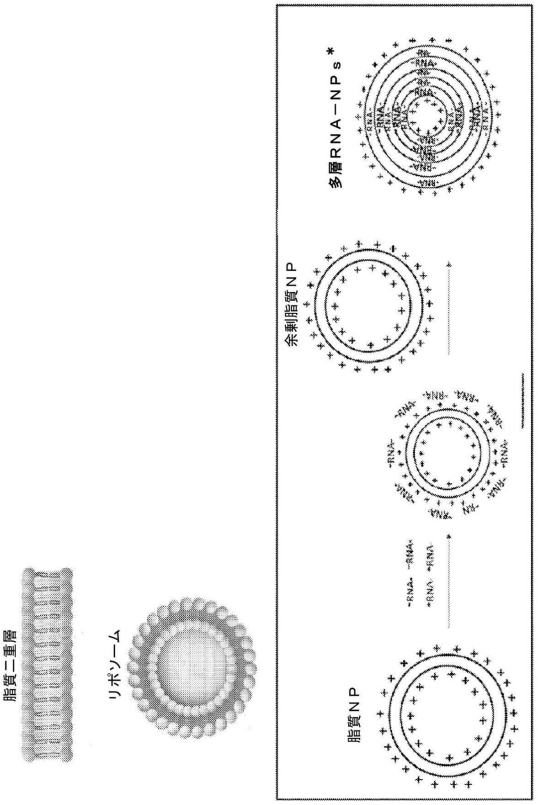


図１Ａ

【図１Ｂ】

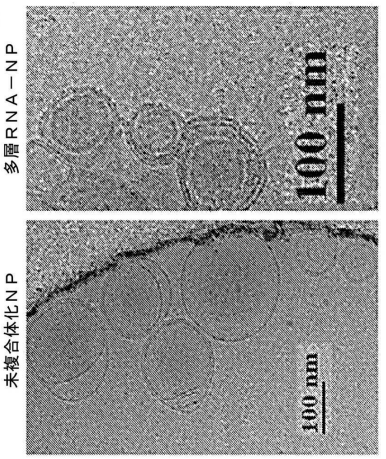


図１Ｂ

【図２Ａ】

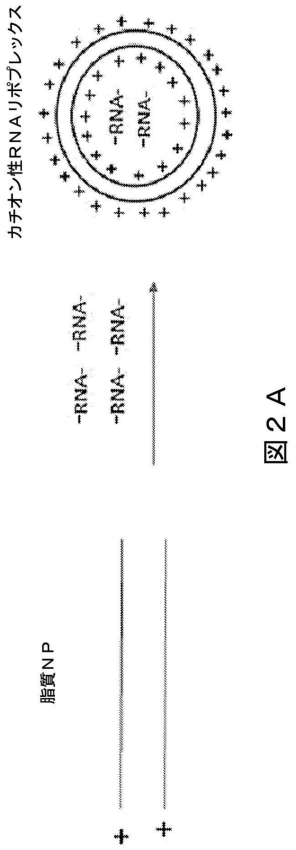


図２Ａ

【図２Ｂ】

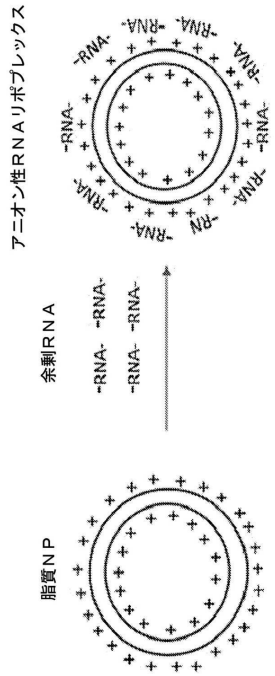


図２Ｂ

【図２Ｃ】

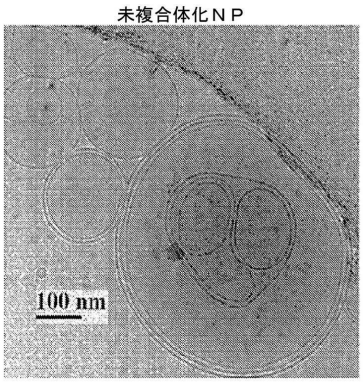


図２Ｃ

【図２Ｄ】

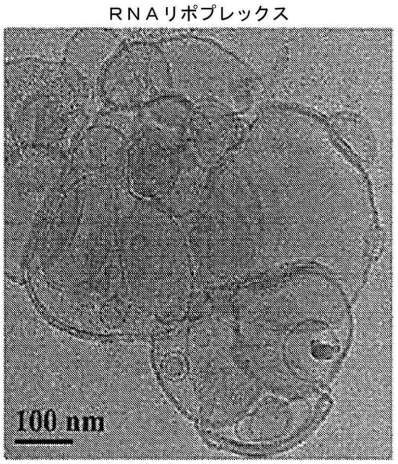


図２Ｄ

【図２Ｅ】

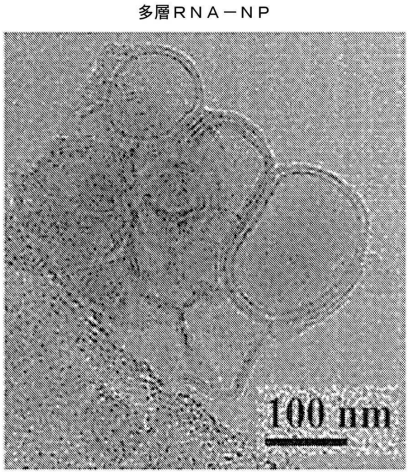


図２Ｅ

【図２Ｆ】

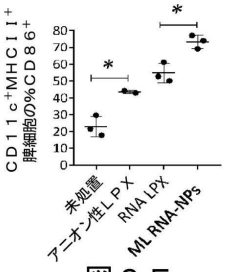


図２Ｆ

【図２Ｇ】

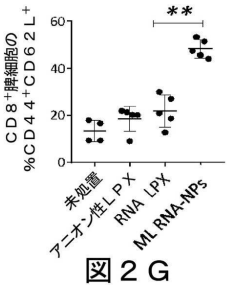


図２Ｇ

【図２Ｈ】

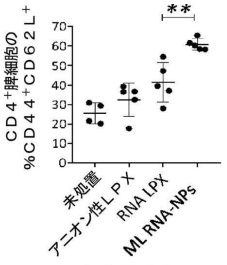


図２Ｈ

【図２Ｉ】

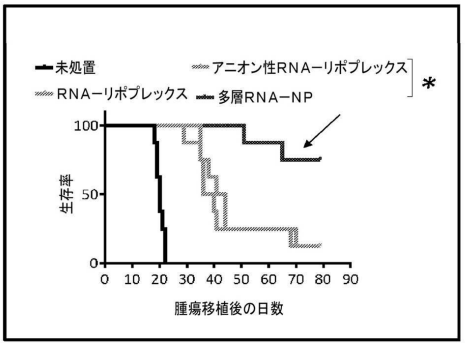


図２Ｉ

【図２Ｊ】

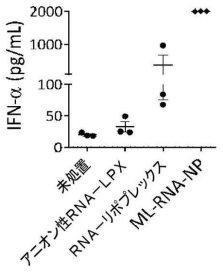


図２Ｊ

【図３Ａ】

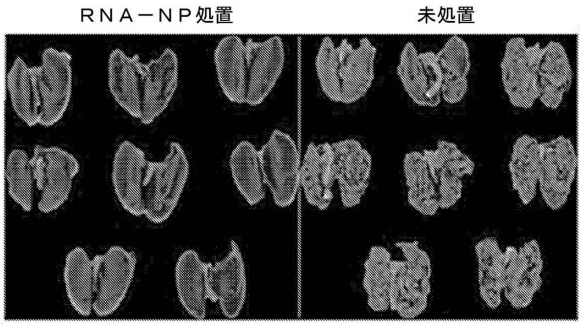


図３Ａ

【図３Ｂ】

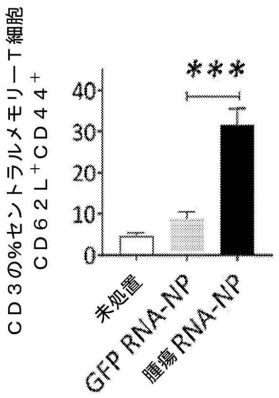


図３Ｂ

【図３Ｃ】

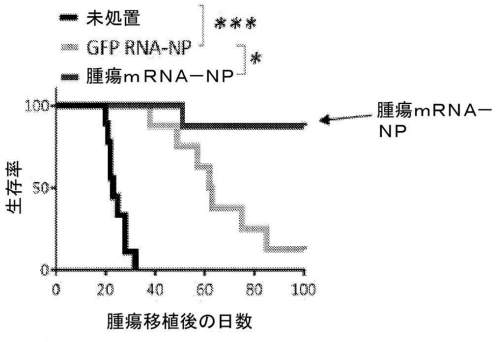


図３Ｃ

【図３Ｄ】

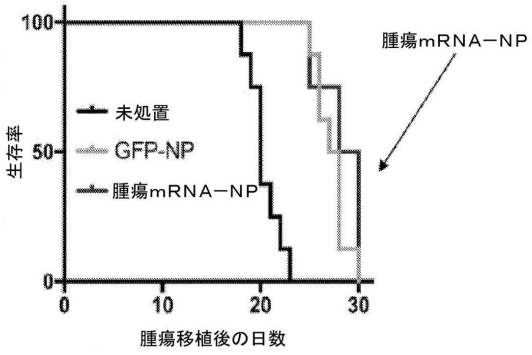


図３Ｄ

【図４Ａ】

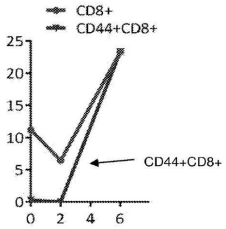


図４Ａ

【図４Ｂ】

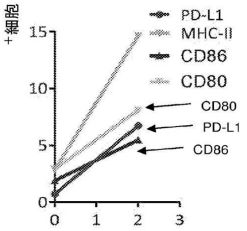


図４Ｂ

【図４Ｃ】

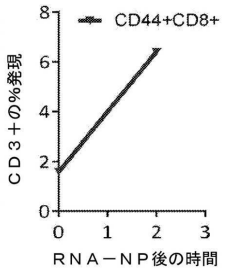


図４Ｃ

【図４Ｄ】

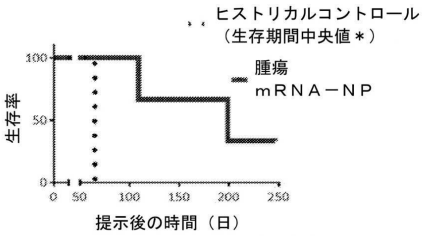


図４Ｄ

【図５】

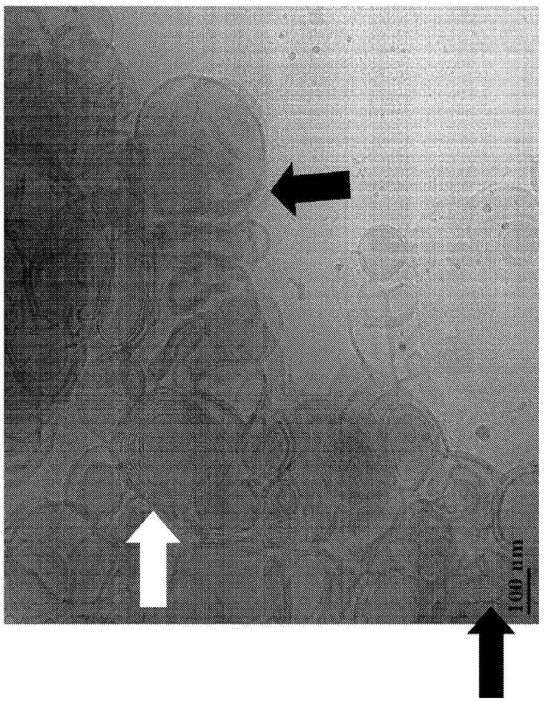


図５

【図６】

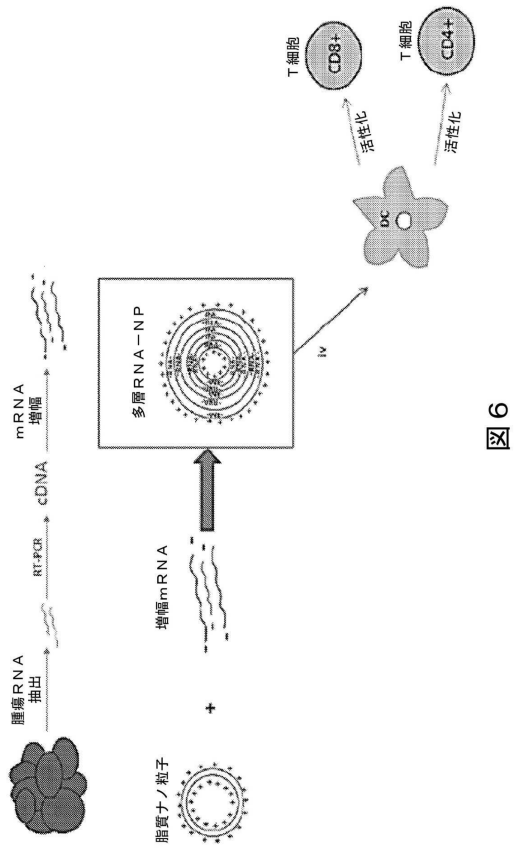


図６

【図７】

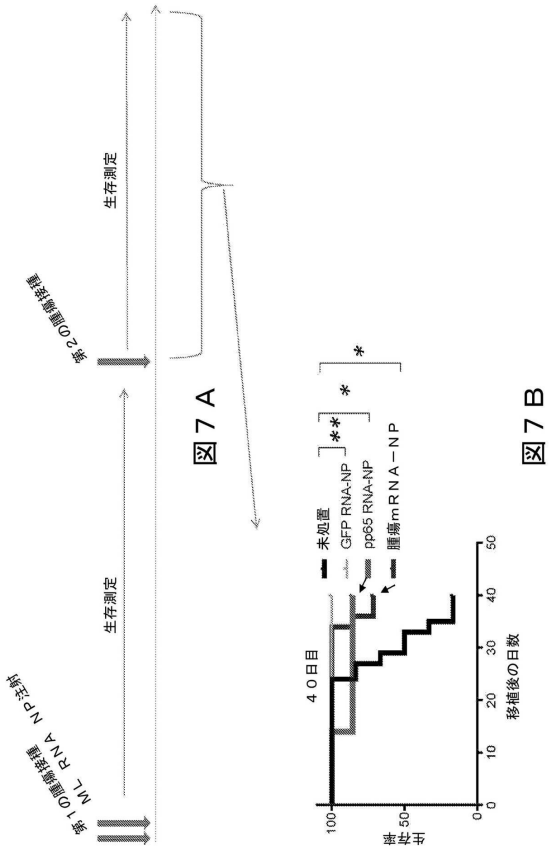


図７Ａ

図７Ｂ

【図８】

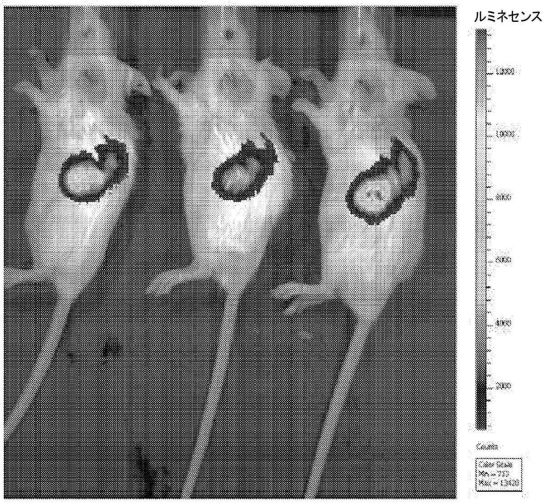


図８

【図９Ａ】

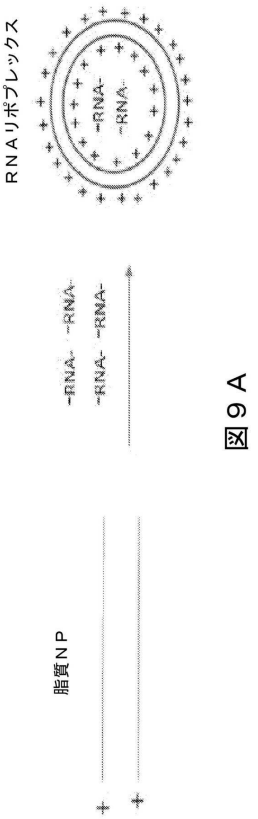


図９Ａ

【図９Ｂ】

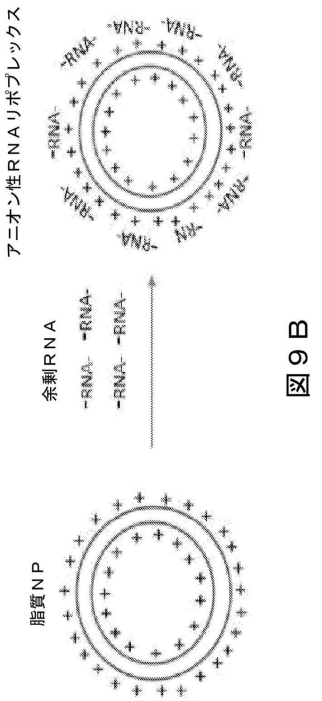


図９Ｂ

【図９Ｃ】

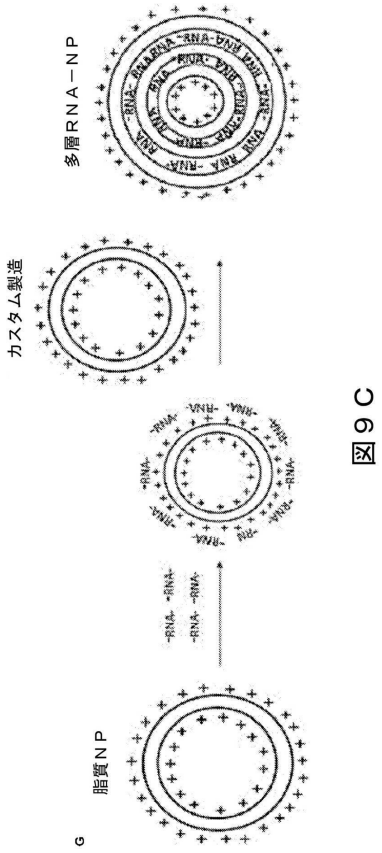


図９Ｃ

【図１０】

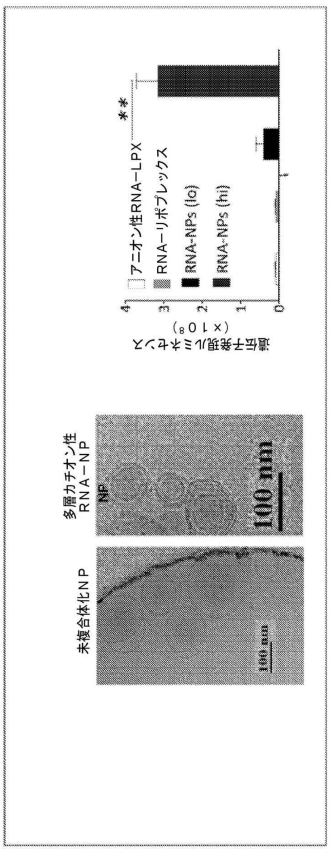


図１０

【図１１】

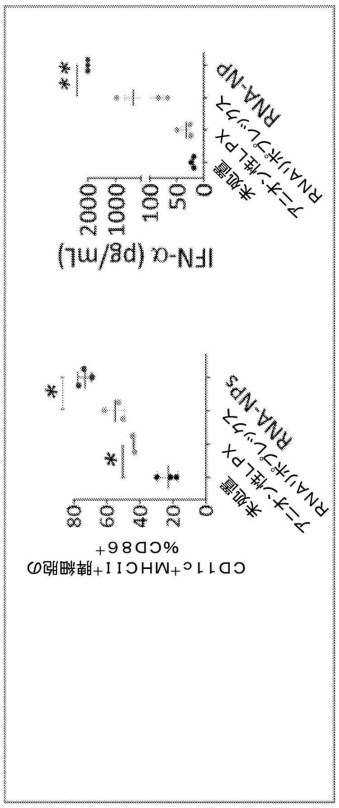


図１１

【図１２】

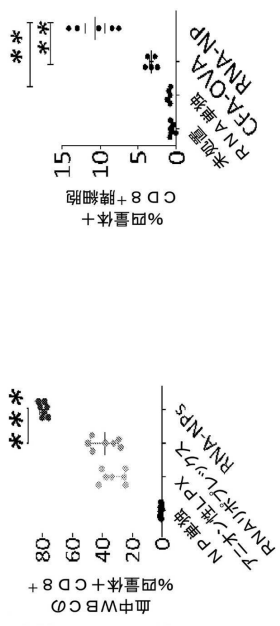


図１２

【図１３】

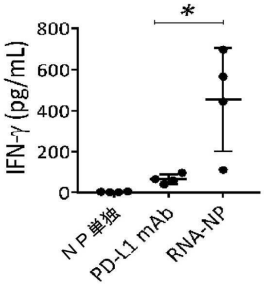


図１３

【図１４】

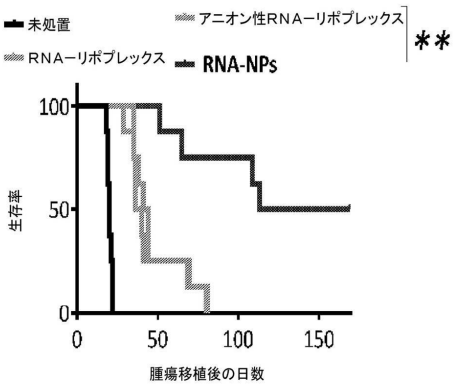


図１４

【図１５】

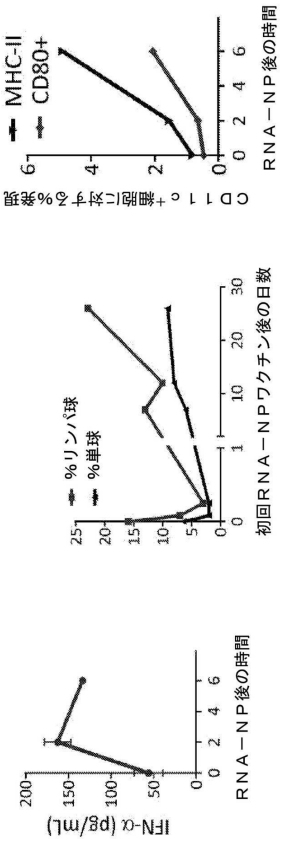


図１５

【図１６】

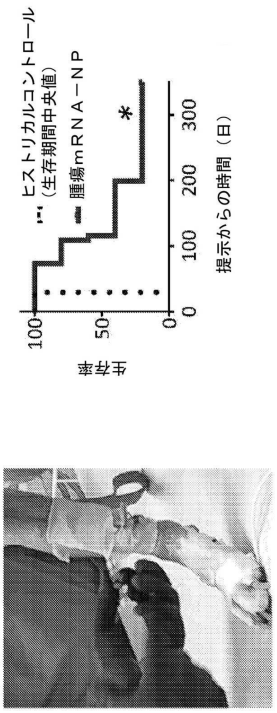


図１６

【図１７】



図１７

【図１８Ａ】

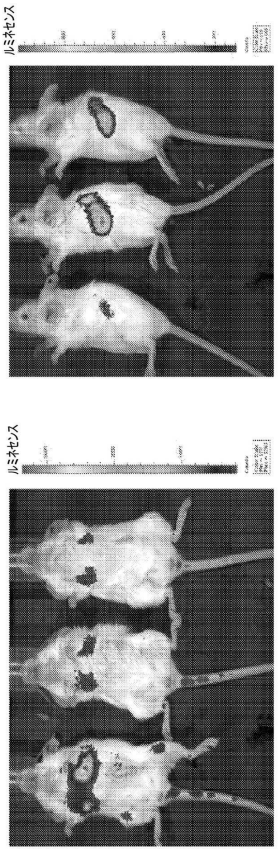


図１８Ａ

【図１８Ｂ】

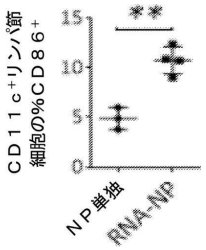


図１８Ｂ

【図１８Ｃ】

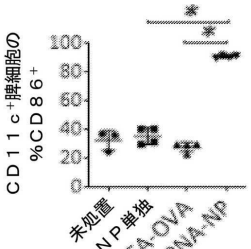


図１８Ｃ

【図１８Ｄ】

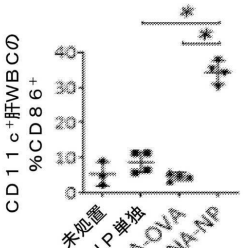


図１８Ｄ

【図１９】

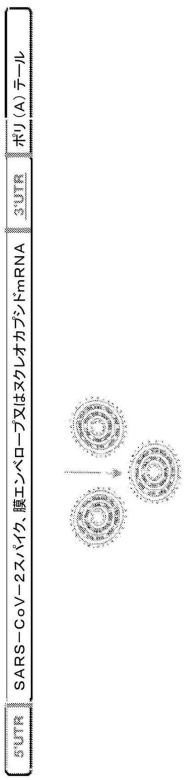


図１９

【図２０】

配列	
1	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のORF1abポリタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009725297.1）
2	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1の完全ゲノム配列（GenBankアクセッション番号NC_045512）
3	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のスパイク糖タンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724390.1）
4	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のORF1abポリタンパク質の完全アミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009725295.1）
5	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のOrf3aタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724391.1）
6	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のエンベロープタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724392.1）
7	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1の膜糖タンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724393.1）
8	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のORF6タンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724394.1）
9	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のOrf7aタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724395.1）
10	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のOrf7bタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009725318.1）
11	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のOrf8タンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724396.1）
12	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のスクレオカプシドリンタンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009724397.2）
13	SARS－CoV－2単離Wuhan－Hu－1のOrf10タンパク質のアミノ酸配列（GenBankアクセッション番号YP_009725255.1）

図２０

【図２１Ａ】

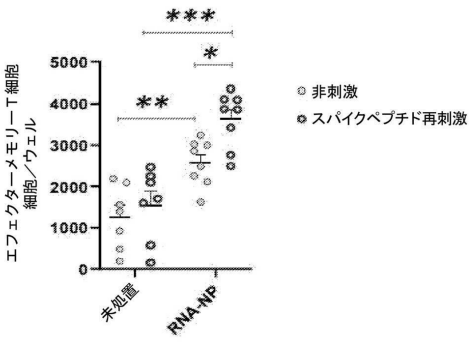


図２１Ａ

【図２１Ｂ】

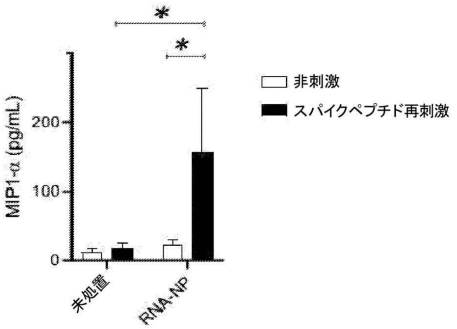


図２１Ｂ

【図２２Ａ－１】

p19GEM4Z－スパイク配列

```
TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG   60
CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAGCATT GGTAACTGTC AGACCAAGTT TACTCATATA  120
TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTTT AATTTAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT  180
TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTTC GTTCCACTGA GCGTCAGACC  240
CCGTAGAAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGAG ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT  300
TGCAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG TGGTTTGTTT GCCGGATCAA GAGCTACCAA  360
CTCTTTTTCC GAAGGTAACT GGCTTCAGCA GAGCGCAGAT ACCAAATACT GTTCTTCTAG  420
TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC  480
TGCTAATCCT GTTACCAGTG GCTGCTGCCA GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGTTGG  540
ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC AGCGGTCGGG CTGAACGGGG GGTTCGTGCA  600
CACAGCCCAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA CCGAACTGAG ATACCTACAG CGTGAGCTAT  660
GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA AGGCGGACAG GTATCCGGTA AGCGGCAGGG  720
TCGGAACAGG AGAGCGCACG AGGGAGCTTC CAGGGGGAAA CGCCTGGTAT CTTTATAGTC  780
CTGTCGGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC  840
GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG CCTTTTTACG GTTCCTGGCC TTTTGCTGGC  900
CTTTTGCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT CCCCTGATTC TGTGGATAAC CGTATTACCG  960
CCTTTGAGTG AGCTGATACC GCTCGCCGCA GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA 1020
GCGAGGAAGC GGAAGAGCGC CCAATACGCA AACCGCCTCT CCCCGCGCGT TGGCCGATTC 1080
ATTAATGCAG CTGGCACGAC AGGTTTCCCG ACTGGAAAGC GGGCAGTGAG CGCAACGCAA 1140
TTAATGTGAG TTAGCTCACT CATTAGGCAC CCCAGGCTTT ACACTTTATG CTTCCGGCTC 1200
GTATGTTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTCACAC AGGAAACAGC TATGACCATG 1260
ATTACGCCAA GCTCTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACAA GCTTGGTACC ATGTTTGTGT 1320
TCCTGGTGCT GCTGCCACTG GTGTCCAGCC AGTGTGTGAA CCTGACCACC AGGACCCAAC 1380
TTCCTCCTGC CTACACCAAC TCCTTCACCA GGGGAGTCTA CTACCCTGAC AAGGTGTTCA 1440
GGTCCTCTGT GCTGCACAGC ACCCAGGACC TGTTCCTGCC AATGTGACCT 1500
GGTTCCATGC CATCCATGTG TCTGGCACCA ATGGCACCAA GAGGTTTGAC AACCCTGTGC 1560
TGCCATTCAA TGATGGAGTC TACTTTGCCA GCACAGAGAA GAGCAACATC ATCAGGGGCT 1620
GGATTTTTGG CACCACCCTG GACAGCAAGA CCCAGTCCCT GCTGATTGTG AACAATGCCA 1680
CCAATGTGGT GATTAAGGTG TGTGAGTTCC AGTTCTGTAA TGACCCATTC CTGGGAGTCT 1740
ACTACCACAA GAACAACAAG TCCTGGATGG AGTCTGAGTT CAGGGTCTAC TCCTCTGCCA 1800
ACAACTGTAC CTTTGAATAT GTGAGCCAAC CATTCCTGAT GGACTTGGAG GGCAAGCAGG 1860
GCAACTTCAA GAACCTGAGG GAGTTTGTGT TCAAGAACAT TGATGGCTAC TTCAAGATTT 1920
ACAGCAAACA CACACCAATC AACCTGGTGA GGGACCTGCC ACAGGGCTTC TCTGCCTTGG 1980
AACCACTGGT GGACCTGCCA ATTGGCATCA ACATCACCAG GTTCCAGACC CTGCTGGCTC 2040
TGCACAGGTC CTACCTGACA CCTGGAGACT CCTCCTCTGG CTGGACAGCA GGAGCAGCAG 2100
CCTACTATGT GGGCTACCTC CAACCAAGGA CCTTCCTGCT GAAATACAAT GAGAATGGCA 2160
CCATCACAGA TGCTGTGGAC TGTGCCCTGG ACCCACTGTC TGAGACCAAG TGTACCCTGA 2220
AATCCTTCAC AGTGGAGAAG GGCATCTACC AGACCAGCAA CTTCAGGGTC CAACCAACAG 2280
AGAGCATTGT GAGGTTTCCA AACATCACCA ACCTGTGTCC ATTTGGAGAG GTGTTCAATG 2340
CCACCAGGTT TGCCTCTGTC TATGCCTGGA ACAGGAAGAG GATTAGCAAC TGTGTGGCTG 2400
ACTACTCTGT GCTCTACAAC TCTGCCTCCT TCAGCACCTT CAAGTGTTAT GGAGTGAGCC 2460
CAACCAAACT GAATGACCTG TGTTTCACCA ATGTCTATGC TGACTCCTTT GTGATTAGGG 2520
GAGATGAGGT GAGACAGATT GCCCCTGGAC AAACAGGCAA GATTGCTGAC TACAACTACA 2580
AACTGCCTGA TGACTTCACA GGCTGTGTGA TTGCCTGGAA CAGCAACAAC CTGGACAGCA 2640
AGGTGGGAGG CAACTACAAC TACCTCTACA GACTGTTCAG GAAGAGCAAC CTGAAACCAT 2700
TTGAGAGGGA CATCAGCACA GAGATTTACC AGGCTGGCAG CACACCATGT AATGGAGTGG 2760
AGGGCTTCAA CTGTTACTTT CCACTCCAAT CCTATGGCTT CCAACCAACC AATGGAGTGG 2820
GCTACCAACC ATACAGGGTG GTGGTGCTGT CCTTTGAACT GCTCCATGCC CCTGCCACAG 2880
TGTGTGGACC AAAGAAGAGC ACCAACCTGG TGAAGAACAA GTGTGTGAAC TTCAACTTCA 2940
ATGGACTGAC AGGCACAGGA GTGCTGACAG AGAGCAACAA GAAGTTCCTG CCATTCCAAC 3000
AGTTTGGCAG GGACATTGCT GACACCACAG ATGCTGTGAG GGACCCACAG ACCTTGGAGA 3060
TTCTGGACAT CACACCATGT TCCTTTGGAG GAGTGTCTGT GATTACACCT GGCACCAACA 3120
CCAGCAACCA GGTGGCTGTG CTCTACCAGG ATGTGAACTG TACTGAGGTG CCTGTGGCTA 3180
TCCATGCTGA CCAACTTACA CCAACCTGGA GGGTCTACAG CACAGGCAGC AATGTGTTCC 3240
```

図２２Ａ

【図２２Ａ－２】

```
AGACCAGGGC TGGCTGTCTG ATTGGAGCAG AGCATGTGAA CAACTCCTAT GAGTGTGACA 3300
TCCCAATTGG AGCAGGCATC TGTGCCTCCT ACCAGACCCA GACCAACAGC CCAAGGAGGG 3360
CAAGGTCTGT GGCAAGCCAG AGCATCATTG CCTACACAAT GAGTCTGGGA GCAGAGAACT 3420
CTGTGGCCTA CAGCAACAAC AGCATTGCCA TCCCAACCAA CTTCACCATC TCTGTGACCA 3480
CAGAGATTCT GCCTGTGAGT ATGACCAAGA CCTCTGTGGA CTGTACAATG TATATCTGTG 3540
GAGACAGCAC AGAGTGTAGC AACCTGCTGC TCCAATATGG CTCCTTCTGT ACCCAACTTA 3600
ACAGGGCTCT GACAGGCATT GCTGTGGAAC AGGACAAGAA CACCCAGGAG GTGTTTGCCC 3660
AGGTGAAGCA GATTTACAAG ACACCTCCAA TCAAGGACTT TGGAGGCTTC AACTTCAGCC 3720
AGATTCTGCC TGACCCAAGC AAGCCAAGCA AGAGGTCCTT CATTGAGGAC CTGCTGTTCA 3780
ACAAGGTGAC CCTGGCTGAT GCTGGCTTCA TCAAGCAATA TGGAGACTGT CTGGGAGACA 3840
TTGCTGCCAG GGACCTGATT TGTGCCCAGA AGTTCAATGG ACTGACAGTG CTGCCTCCAC 3900
TGCTGACAGA TGAGATGATT GCCCAATACA CCTCTGCCCT GCTGGCTGGC ACCATCACCT 3960
CTGGCTGGAC CTTTGGAGCA GGAGCAGCCC TCCAAATCCC ATTTGCTATG CAGATGGCTT 4020
ACAGGTTCAA TGGCATTGGA GTGACCCAGA ATGTGCTCTA TGAGAACCAG AAACTGATTG 4080
CCAACCAGTT CAACTCTGCC ATTGGCAAGA TTCAGGACTC CCTGTCCAGC ACAGCCTCTG 4140
CCCTGGGCAA ACTCCAAGAT GTGGTGAACC AGAATGCCCA GGCTCTGAAC ACCCTGGTGA 4200
AGCAACTTTC CAGCAACTTT GGAGCCATCT CCTCTGTGCT GAATGACATC CTGAGCAGAC 4260
TGGACAAGGT GGAGGCTGAG GTCCAGATTG ACAGACTGAT TACAGGCAGA CTCCAATCCC 4320
TCCAAACCTA TGTGACCCAA CAACTTATCA GGGCTGCTGA GATTAGGGCA TCTGCCAACC 4380
TGGCTGCCAC CAAGATGAGT GAGTGTGTGC TGGGACAAAG CAAGAGGGTG GACTTCTGTG 4440
GCAAGGGCTA CCACCTGATG AGTTTTCCAC AGTCTGCCCC TCATGGAGTG GTGTTCCTGC 4500
ATGTGACCTA TGTGCCTGCC CAGGAGAAGA ACTTCACCAC AGCCCCTGCC ATCTGCCATG 4560
ATGGCAAGGC TCACTTTCCA AGGGAGGGAG TGTTTGTGAG CAATGGCACC CACTGGTTTG 4620
TGACCCAGAG GAACTTCTAT GAACCACAGA TTATCACCAC AGACAACACC TTTGTGTCTG 4680
GCAACTGTGA TGTGGTGATT GGCATTGTGA ACAACACAGT CTATGACCCA CTCCAACCTG 4740
AACTGGACTC CTTCAAGGAG GAACTGGACA AATACTTCAA GAACCACACC AGCCCTGATG 4800
TGGACCTGGG AGACATCTCT GGCATCAATG CCTCTGTGGT GAACATCCAG AAGGAGATTG 4860
ACAGACTGAA TGAGGTGGCT AAGAACCTGA ATGAGTCCCT GATTGACCTC CAAGAACTGG 4920
GCAAATATGA ACAATACATC AAGTGGCCAT GGTACATCTG GCTGGGCTTC ATTGCTGGAC 4980
TGATTGCCAT TGTGATGGTG ACCATAATGC TGTGTTGTAT GACCTCCTGT TGTTCCTGTC 5040
TGAAAGGCTG TTGTTCCTGT GGCTCCTGTT GTAAGTTTGA TGAGGATGAC TCTGAACCTG 5100
TGCTGAAAGG AGTGAAACTG CACTACACCT GAATCTAGAG CGGCCGCCGA ATTCTTAATT 5160
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 5220
AACTAGTGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC 5280
ATATGGTGCA CTCTCAGTAC AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA GCCCCGACAC 5340
CCGCCAACAC CCGCTGACGC GCCCTGACGG GCTTGTCTGC TCCCGGCATC CGCTTACAGA 5400
CAAGCTGTGA CCGTCTCCGG GAGCTGCATG TGTCAGAGGT TTTCACCGTC ATCACCGAAA 5460
CGCGCGAGAC GAAAGGGCCT CGTGATACGC CTATTTTTAT AGGTTAATGT CATGATAATA 5520
ATGGTTTCTT AGACGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCGCGGAAC CCCTATTTGT 5580
TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG 5640
CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT 5700
CCCTTTTTTG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA 5760
AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC 5820
GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTC CAATGATGAG CACTTTTAAA 5880
GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC 5940
CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT 6000
ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT 6060
GCGGCCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC 6120
AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA 6180
CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAACTA 6240
TTAACTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGGCG 6300
GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT 6360
AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT 6420
AAGCCCTCCC GTA                                                    6433
```

図２２Ａ －続き

【図２２Ｂ】

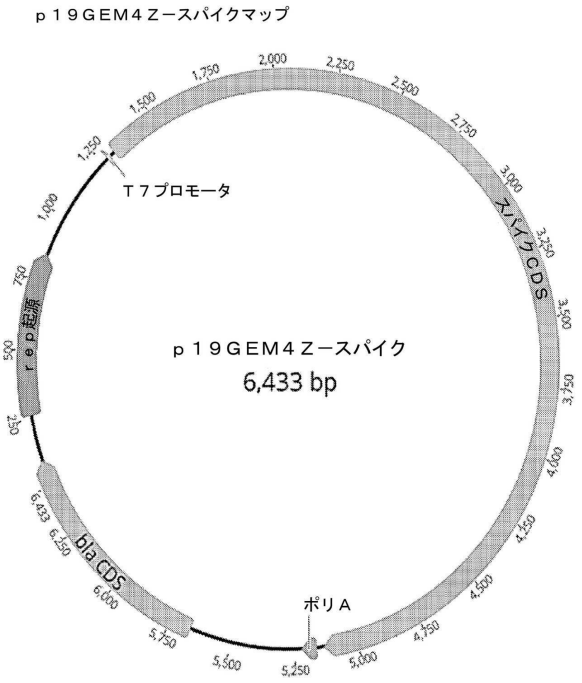


図２２Ｂ

【図２２Ｃ－１】

```
p19GEM4Z-Spike                  TCCTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG   60
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA  120
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) -NNNNTGNNNANNNGNNNCNNNNNTGNTAGCNTGNTAANTGTCAGNNCNAAGTTANTNNN   59
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  TACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT  180
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) NNNTNCTTAGNTGATTNAAAANTCATTTTNATTNAAAAGGATCTAGGNNGAAGATCCTTT  119
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACC  240
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) TTGATAATNTCATGACCAAAANCC-TTAACGTGAGTTTTCGTTCCNCTGAGCGTCAGACC  178
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  CCCTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT  300
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) CN-TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT  237
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
```

図２２Ｃ

【図２２Ｃ－２】

```
p19GEM4Z-Spike                  TGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA  360
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) TGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA  297
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  CTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG  420
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) CTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG  357
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC  480
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC  417
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG  540
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG  477
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------

p19GEM4Z-Spike                  ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA  600
sq15_14-GMCSF_R3.ab1 (リバース) ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA  537
sq13_4-GMCSF_F2.ab1             ------------------------------------------------------------
sq14_3-GMCSF_F1.ab1             ------------------------------------------------------------
sq15_8-SBSpike_F1.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_2-SBSpike_R1.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_9-SBSpike_F2.ab1           ------------------------------------------------------------
sq15_10-SBSpike_F3.ab1          ------------------------------------------------------------
sq15_13-GMCSF_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_11-SBSpike_F4.ab1          ------------------------------------------------------------
sq16_4-SBSpike_R3.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
sq15_12-GMCSF_F3.ab1            ------------------------------------------------------------
sq16_1-SBSpike_F5.ab1           ------------------------------------------------------------
sq16_3-SBSpike_R2.ab1 (リバース) ------------------------------------------------------------
```

図２２Ｃ －続き

【図２２Ｃ－３】

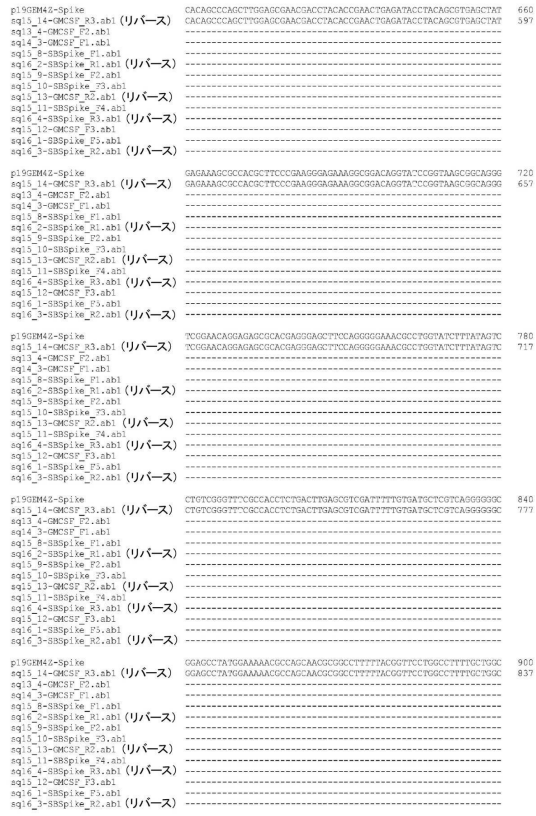


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－４】

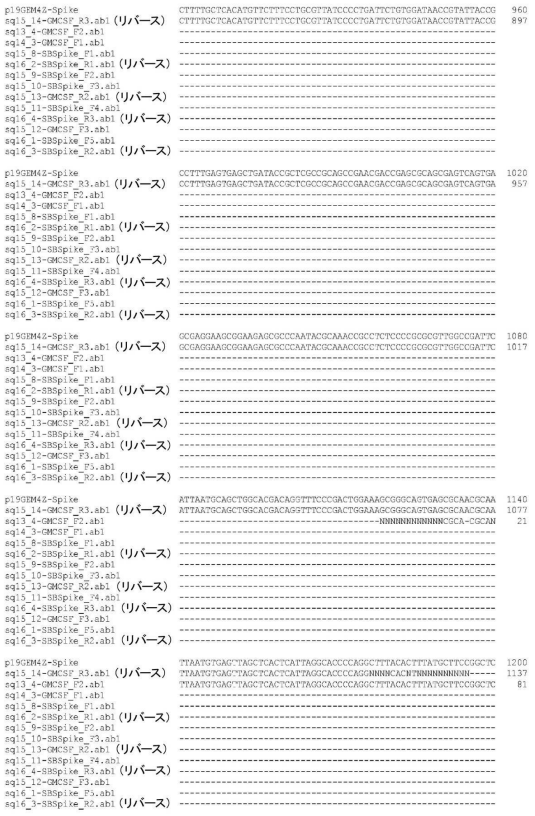


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－５】

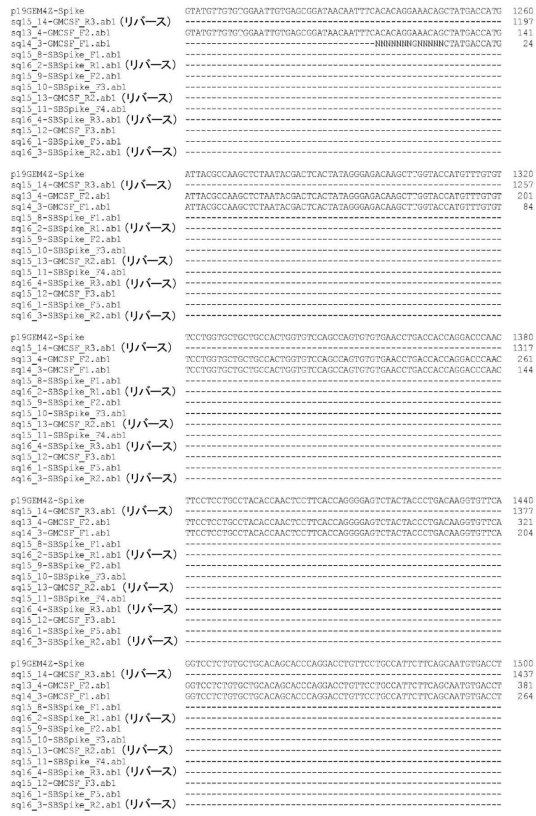


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－６】

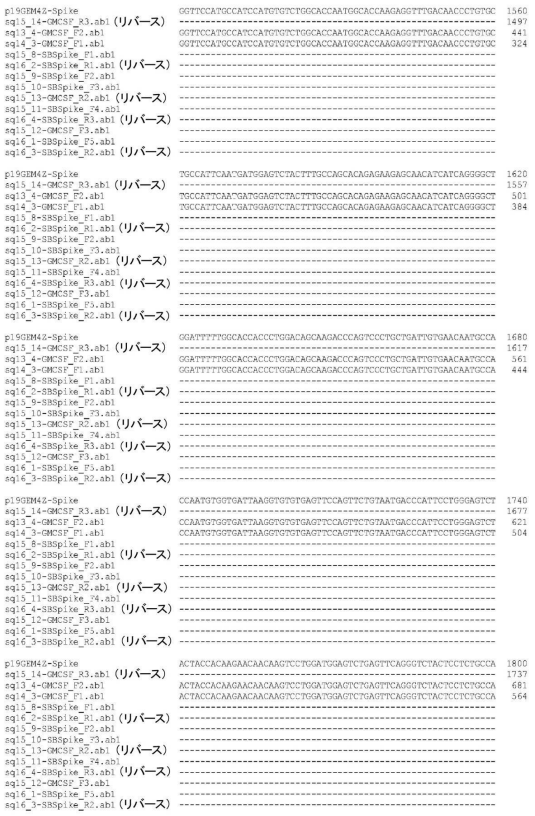


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－７】

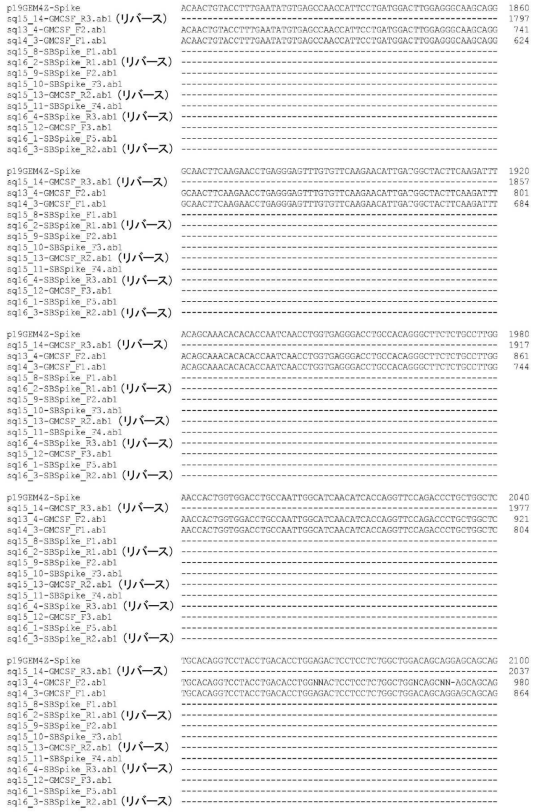


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－８】

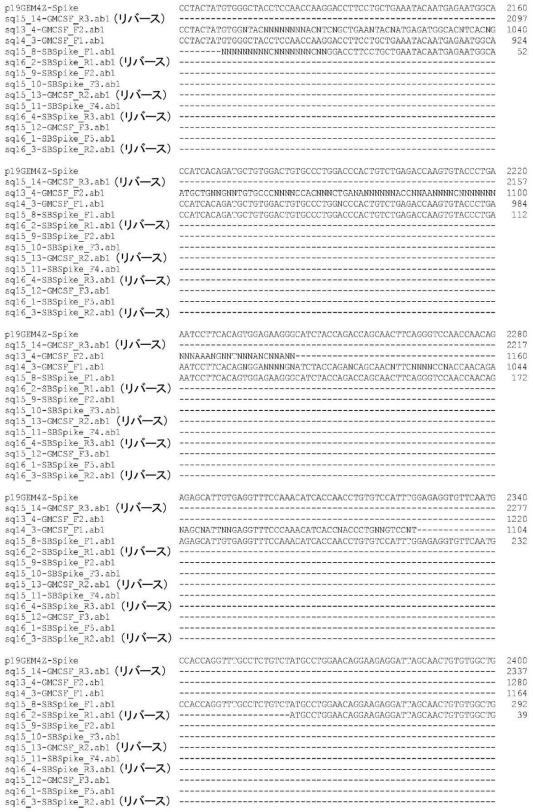


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－９】

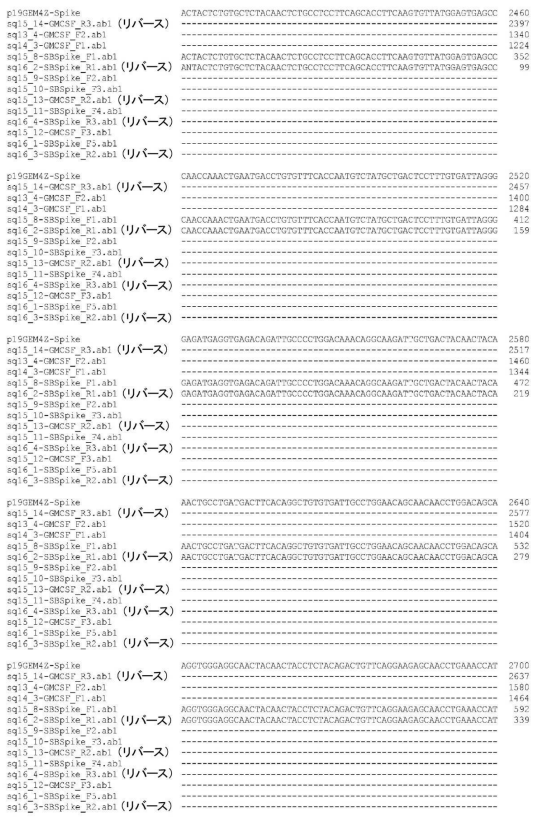


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１０】

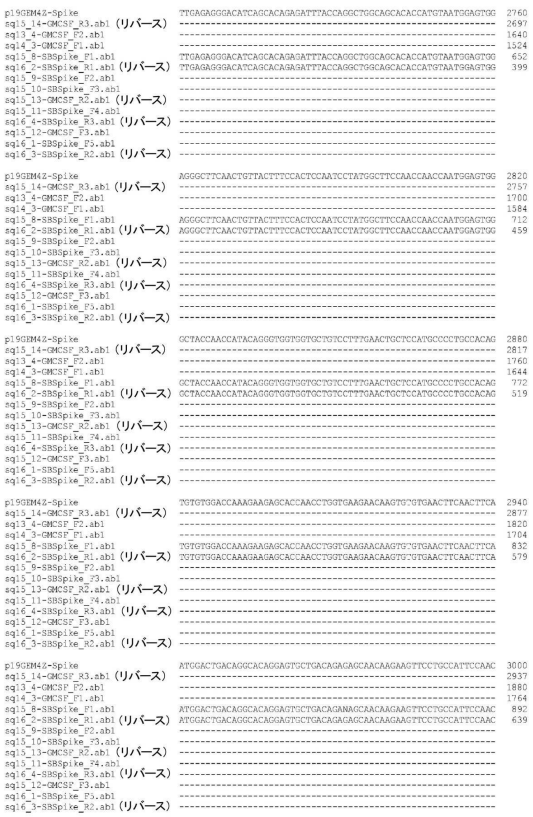


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１１】

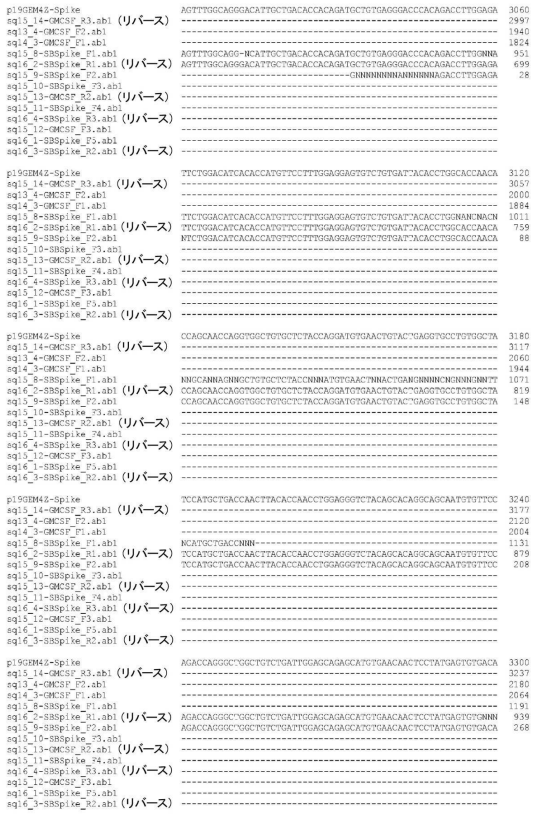


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１２】

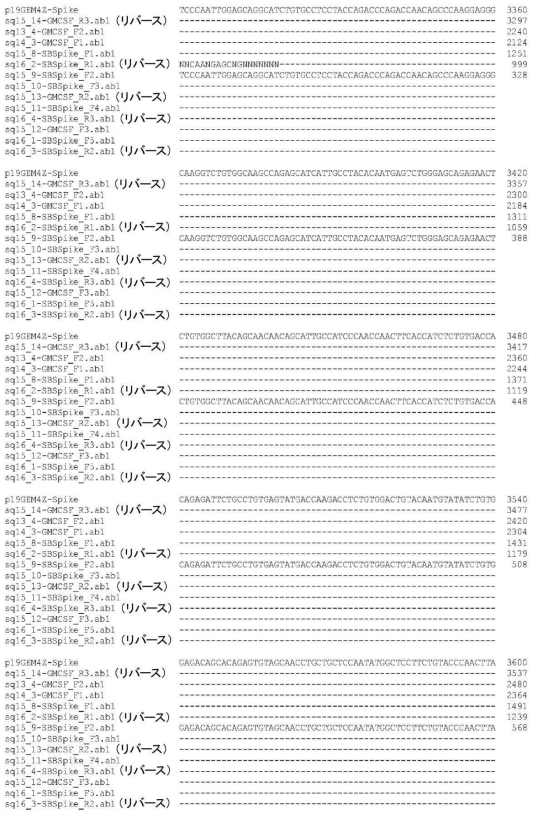


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１３】

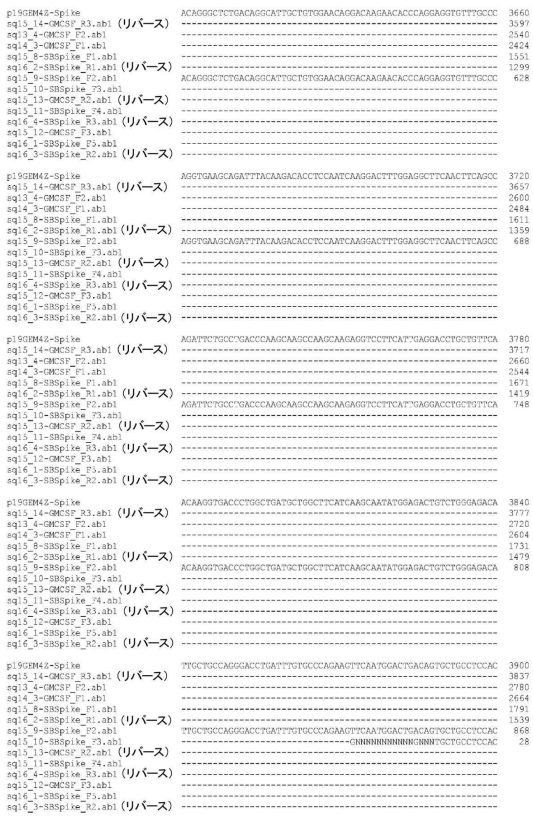


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１４】

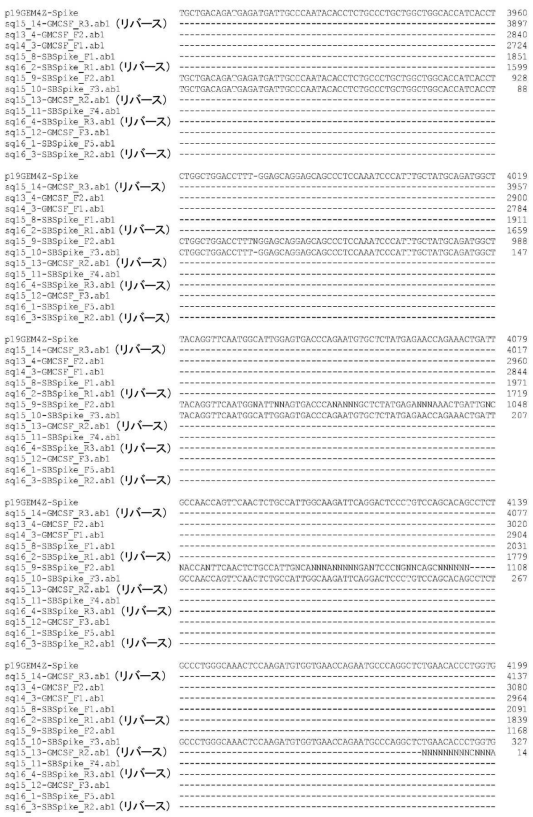


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１５】

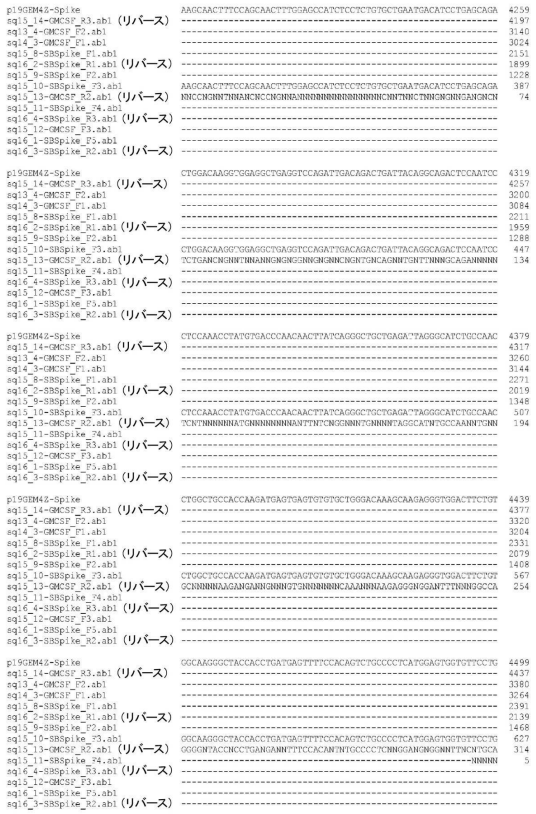


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１６】

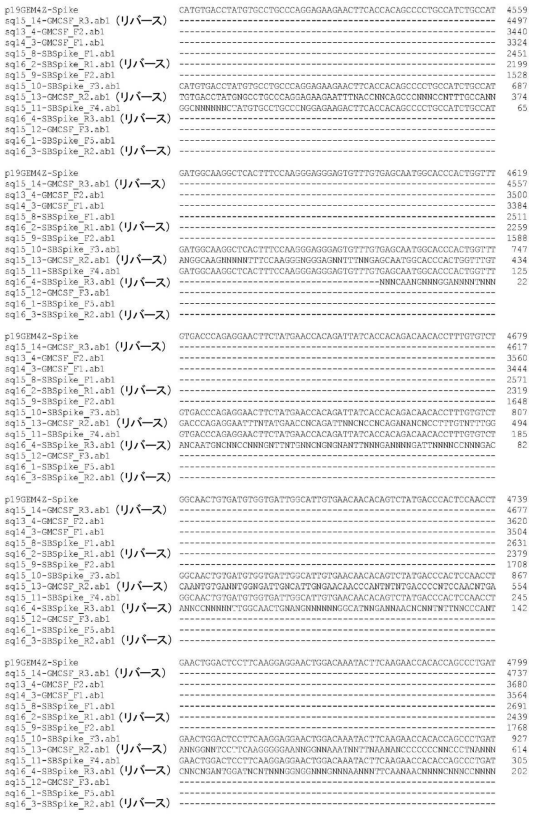


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１７】

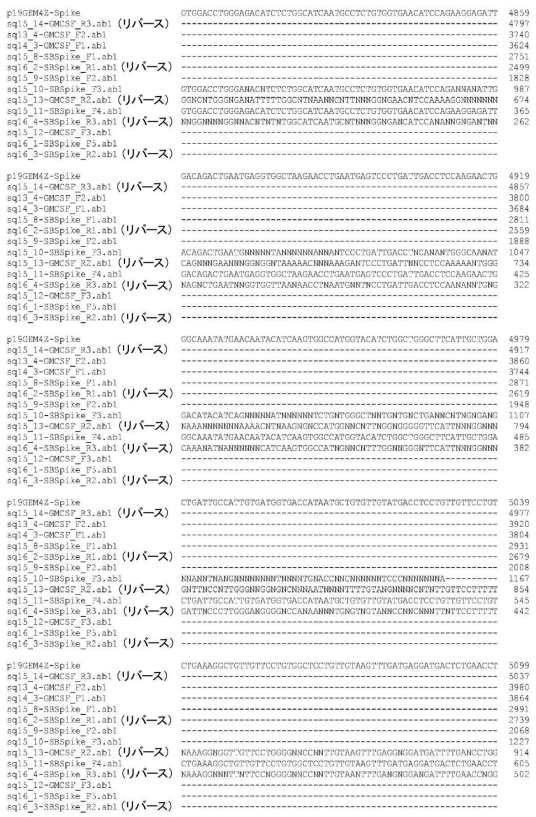


図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－１８】

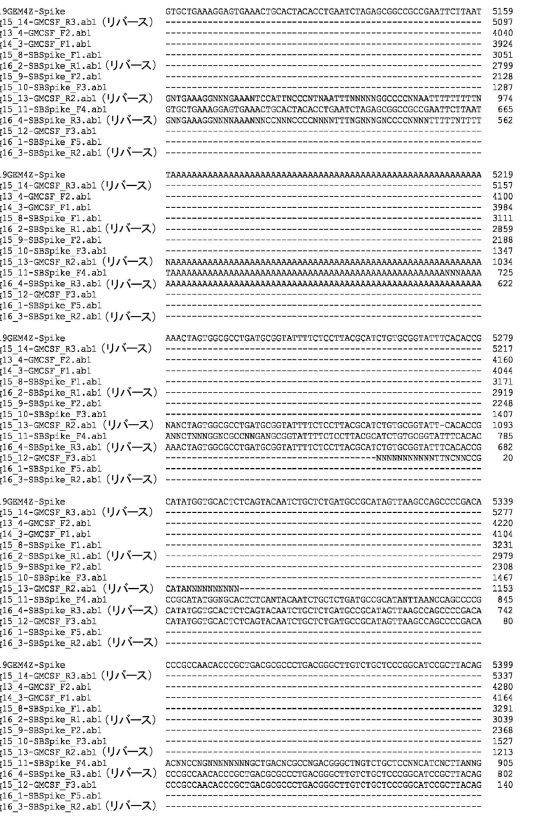
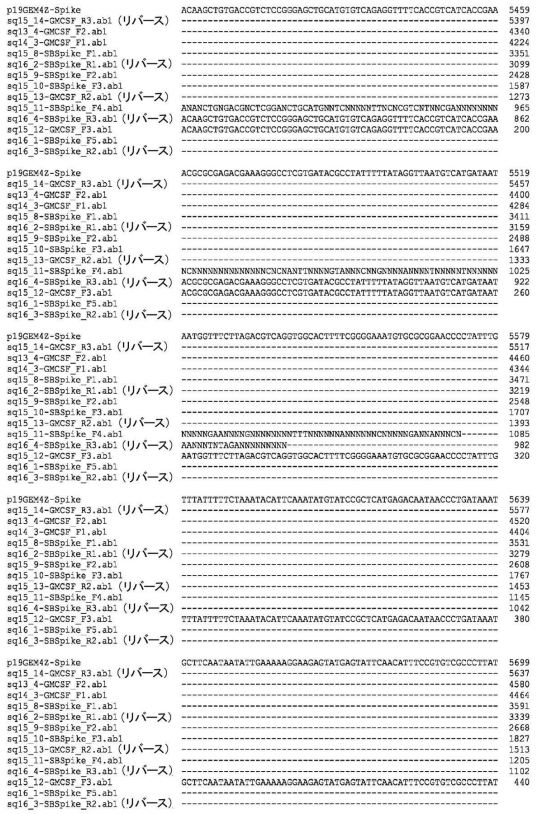
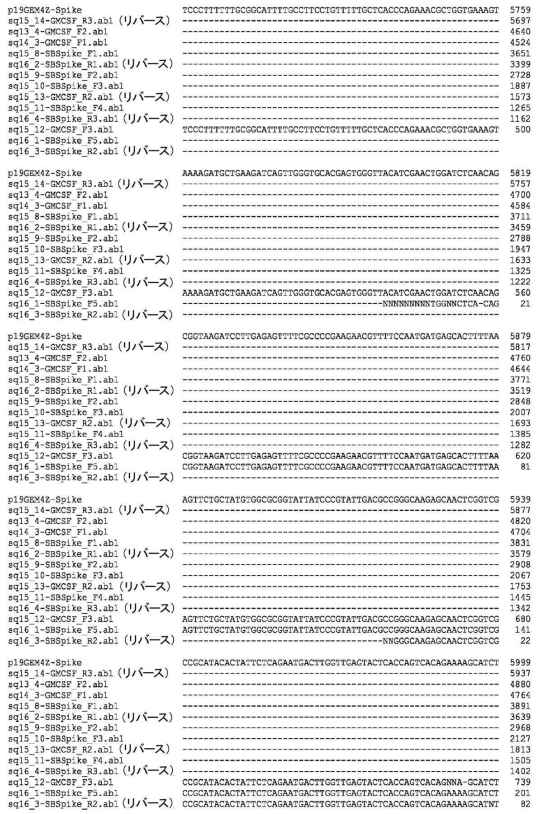


図２２Ｃ－続き

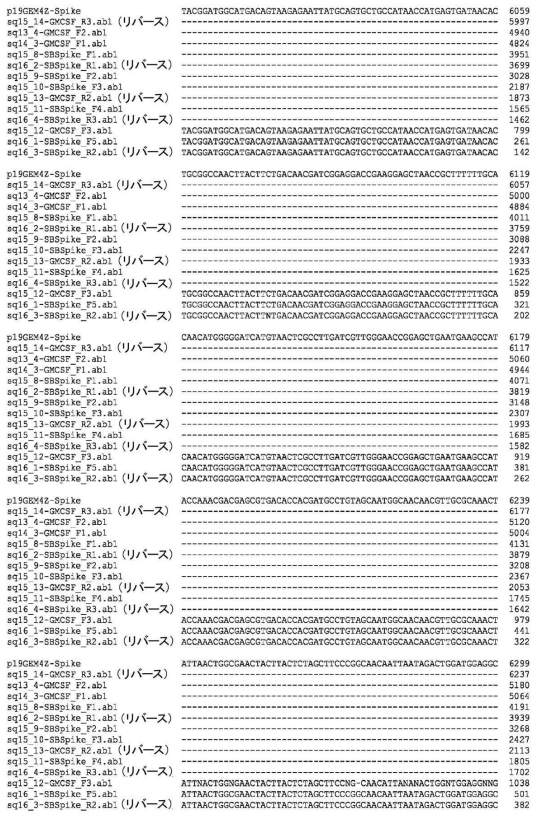
【図２２Ｃ－１９】



【図２２Ｃ－２０】



【図２２Ｃ－２１】



【図２２Ｃ－２２】

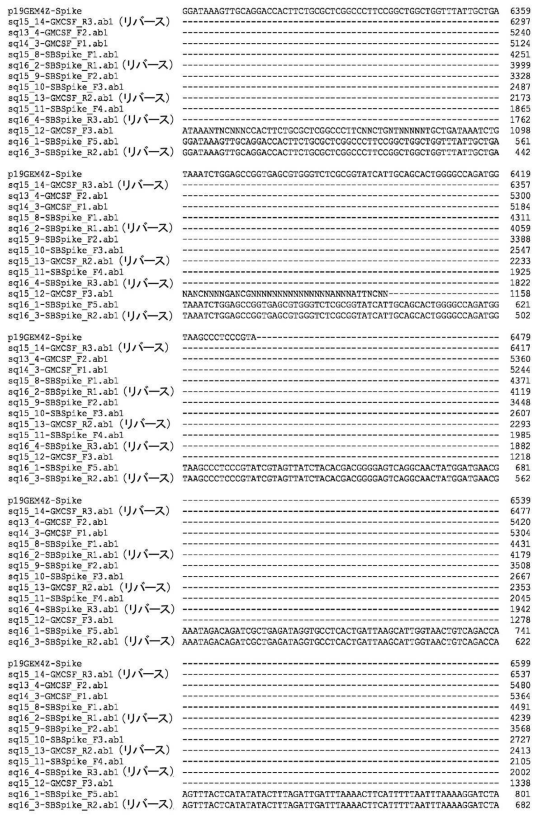


図２２Ｃ－続き

図２２Ｃ－続き

図２２Ｃ－続き

図２２Ｃ－続き

【図２２Ｃ－２３】

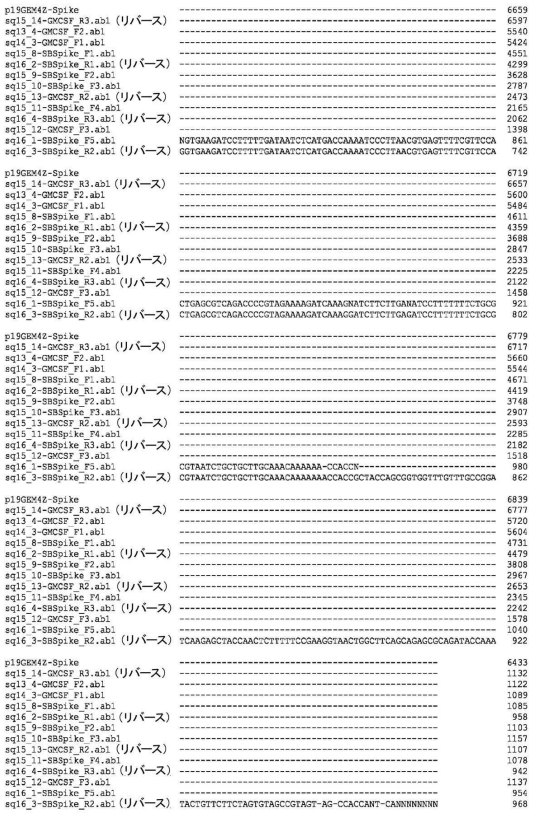


図２２Ｃ－続き

【図２３】

登録は被験者が標準の放射線療法を受ける前に行われなければならない。被験者を登録するためには、以下の選択基準を満たす必要がある。

・年齢は、２１歳以上。
・ＭＧＭＴ非メチル化である、ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＧＢＭ（ＷＨＯグレードＩＶ神経膠腫）（二次性ＧＢＭは適格なし）であると新しく診断されたことが病理組織学的に証明されている。
・腫瘍は、テント上の構成要素でなければならない。
・術後ＭＲＩの腫瘍の最長垂直方向の直径によって規定される３ｃｍ未満の残留術後疾病負荷。
・患者はスクリーニングコンセントによって登録されなければならず、ＲＮＡ抽出、増幅、及び脂質粒子（ＬＰ）のローディングに適した様式で腫瘍の材料の滅菌回収がされなければならない。
・患者は、手術、術後感染症、及び他の合併症から回復していなければならない。
・脳の診断的造影ＭＲＩは、術前及び術後に実施されなければならない。術後ＭＲＩは、試験登録前に２８日以内に実施されなければならない。登録の２８日以内の術後ＭＲＩが入手できなかった場合、新たな脳ＭＥＩを取得して、残留負荷及び適格性を決定しなければならない。術前及び術後の走査は、同じ種類でなければならない。
・カルノフスキーパフォーマンスステータス（ＫＰＳ）は６０以上。
・骨髄：ａ．ＡＮＣ（好中球絶対数）は、１５００μｌ以上（支持されていない）。ｂ．血小板は、１５０，０００／μｌ（少なくとも３日間支持されていない）。ｃ．ヘモグロビンは、８ｇ／ｄＬ超。
・腎臓：ａ．ＢＵＮ２５ｍｇ／ｄｌ以下。ｂ．クレアチニン１．７ｍｇ／ｄｌ以下。
・肝臓：ａ．ビリルビン２．０ｍｇ／ｄｌ以下。ｂ．ＡＬＴは、年齢に対する施設における正常の上限の５倍以下。ｃ．ＡＳＴは、年齢に対する施設における正常の上限の５倍以下。
・インフォームドコンセントに署名。患者の精神状態により、インフォームドコンセントを得ることが不可能な場合、インフォームドコンセントの署名は、法的に承認された代理人が行ってもよい。
・妊娠可能な女性（ＷＯＣＢＰ）の場合、登録時の妊娠検査の陰性血清／尿（検査は、層１患者においてＴＭＺが開始する前に、７２時間以内に繰り返される）。
・ＷＯＣＢＰは、試験を通して及び試験薬物の最終投与後少なくとも２４週間は、妊娠を回避するために、許容される避妊法を使用する意思がなければならない。ＷＯＣＢＰの定義及び許容される避妊法については、付録Ｅを参照。
・妊娠可能な女性パートナを有する男性は、試験を通して、外科医承認の避妊法（例えば、禁欲、コンドーム、精管切除）を使用することに同意しなければならず、試験薬物の最終投与後の２４週間は妊娠を避けなければならない。

図２３

【図２４】

・疾患を有していない期間が３年以上でない限り、以前の浸潤性悪性腫瘍（非黒色腫性皮膚癌を除く）（例えば、乳房、口腔、及び子宮頸部の上皮内癌は許容される）
・ＭＧＭＴメチル化腫瘍
・小脳テント下又は頭蓋冠を超えた転移の検出及び軟膜病変。
・再発性又は多巣性悪性神経膠腫。
・転移性又は軟髄膜疾患。
・ＭＲＩの最長垂直方向の直径によって規定される３ｃｍ超の残留術後疾病負荷。
・ＨＩＶ、Ｂ型肝炎、又はＣ型肝炎血清陽性。
・既知の活動性感染症又は免疫抑制疾患。
・頭頸部の癌に対する放射線増感剤（Ｇｌｉａｄｅｌ　ｗａｆｅｒを含む）、ＧＢＭに対する放射線照射の間のＴＭＺ処方以外の照射（異なる癌に対する化学療法前は許容可能）。
・頭頸部に対する放射線療法の前に、照射領域の重複が生じる。放射線外科治療は許可されていない。
・重度、活動性併存症は以下に規定する。
o不安定なアンギナ及び／又は入院を必要とするうっ血性心不全。
o６ヶ月以内の不安定な不整脈、異常、又は貫壁性心筋梗塞。
oＸＲＴ／ＴＭＺの開始時に、抗生物質の静脈内投与を必要とする急性細菌又は真菌感染症。
oＸＲＴ／ＴＭＺの開始時に、入院を必要とするか、又は試験療法を妨げる慢性閉塞性肺疾患の悪化又は他の呼吸器疾患。
o臨床的黄疸及び／又は凝固を生じる肝不全。
o現在のＣＤＣ規定に基づく後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）。このプロトコルに関与する治療は、顕著に免疫抑制である可能性があるため、ＡＩＤＳを有する患者はこのプロトコルから除外する必要がある。
o免疫抑制剤による医療的管理を必要とする自己免疫疾患を有する患者。
o検査官の意見において、主要な疾患又は精神的な障害は、プロトコル療法の投与又は完了を妨げる。
o狼瘡又は強皮症等の活動性結合組織障害は、検査官の意見で、患者を放射線毒性の高いリスクに置く。
o妊婦又は妊娠可能な女性、及び性的に活動的であり、試験期間全体にわたって許容される避妊法を使用することを望まない又は使用できない男性。本試験に関与する治療は顕著に催奇性である可能性があるため、この除外は必要である。
・妊娠可能な女性は、妊娠又は授乳してはいけない。
・腕神経炎又はギラン・バレー症候群の既往歴。
・ワクチン接種の１週間以内に、生理学的用量を超えるコルチコステロイドを必要とするか、又は生理学的用量にする意思がない被験者。
・試験参加の３０日以内にいずれかの他の治験薬を投与されたか、又はいずれかの他の治療用臨床プロトコルで治療された被験者。

図２４

【図２５】

試験日／訪問	手術	治療コンセント＆スクリーニング	標準的な放射線療法	ワクチン＃１－３（２週毎）	サイクル１＋、１日目（ワクチン＃４－１５）	治療の終了	３０日毒性	フォローアップ
臨床的手順								
スクリーニングコンセントフォーム	X							
コンセントフォーム		X						
身体的＆神経的検査		X		X	X	X	X	X
バイタルサイン		X		X	X	X	X	X
病歴		X		X	X	X	X	X
毒性評価				X	X	X	X	X
パフォーマンスステータス		X		X	X			
併用薬				X	X	X	X	X
手術	X							
放射線照射			X					
生存								X
治療投与								
RNA-LPワクチン				X	X			
実験室の手順								
CBC w/ Diff		X		X	X	X	X	X
CD4/CD8		X		X[1]	X	X	X	
包括的代謝パネル		X		X	X	X	X	X
CMV力価		X						
血清又は尿の妊娠検査		X		X	X			
画像化手順								
脳MRI	X	X	X	X	X			X
ECHO/ EKG		X						
試験片回収								
免疫モニタリングのための血液				X	X	X	X	X
ctDNAのための血液		X		X	X			
腫瘍組織回収	X							

図２５

【図２６】

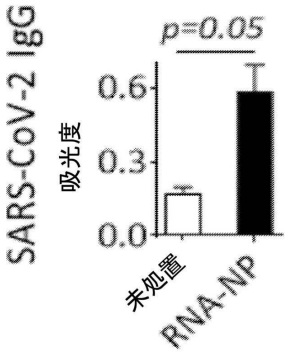


図２６

【図２７Ａ】

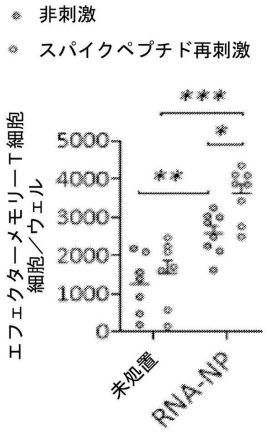


図２７Ａ

【図２７Ｂ】

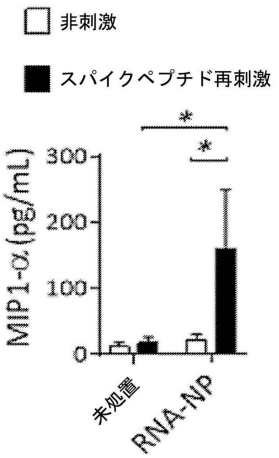


図２７Ｂ

【図２８】

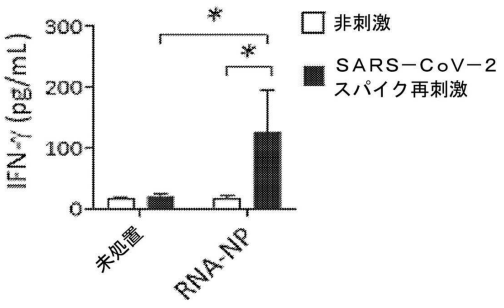


図２８

【図２９Ａ】

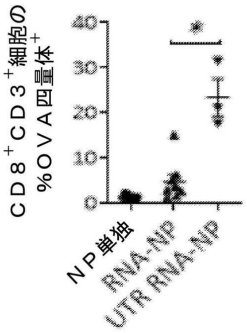


図２９Ａ

【図２９Ｂ】

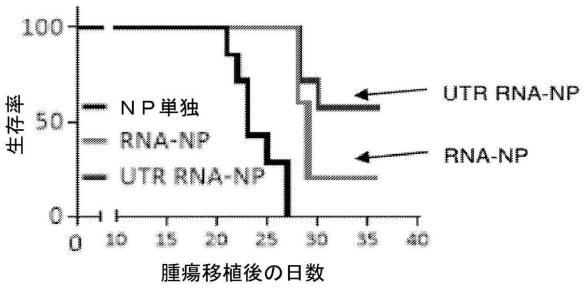


図２９Ｂ

【図３０】

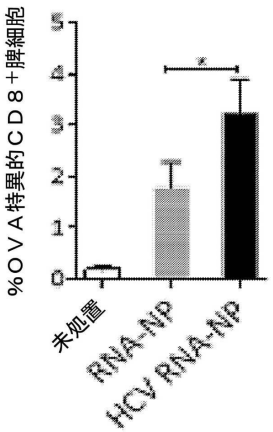


図３０

【図３１】

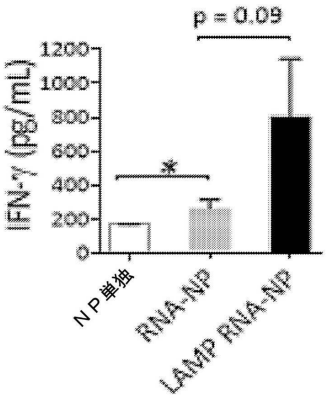


図３１

【図３２Ａ】

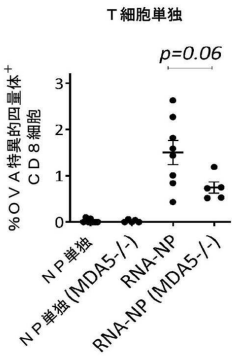


図３２Ａ

【図３２Ｂ】

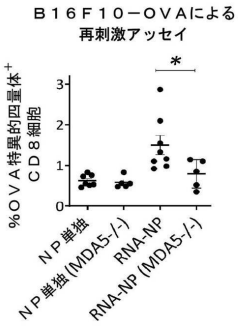


図３２Ｂ

【配列表】

2023520506000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/025222

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 A61P31/14
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEZER OKAY ET AL: "Nanoparticle-based delivery platforms for mRNA vaccine development", AIMS BIOPHYSICS, vol. 7, no. 4, 1 January 2020 (2020-01-01) , pages 323-338, XP055768438, ISSN: 2377-9098, DOI: 10.3934/biophy.2020023 abstract page 324, paragraph 3 figure 1 figure 2 Item 2.5 page 331, paragraph 1 ----- -/--	1-51

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 July 2021	29/07/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Rojo Romeo, Elena

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025222

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/006842 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GEALL ANDREW [US]) 10 January 2013 (2013-01-10) paragraphs [0184], [0193] claims 11, 12, 31, 32, 51, 52	1-51
Y,P	WO 2021/016106 A1 (UNIV FLORIDA [US]) 28 January 2021 (2021-01-28) paragraph [0007] paragraph [0008] paragraph [0015] paragraph [0046] - paragraph [0047] paragraph [0096] paragraph [0097] paragraph [0098] - paragraph [00100] paragraph [00137] - paragraph [00139] paragraph [00220] paragraph [00224] - paragraph [00225] claims 1, 14, 31 paragraph [00229] - paragraph [00230] paragraph [00231] - paragraph [00232]	1-51
X	WO 2019/077001 A1 (CUREVAC AG [DE]) 25 April 2019 (2019-04-25) page 123, paragraph 2 - paragraph 7 page 130, paragraph 3 - page 131, paragraph 2 page 157, paragraph 3 - page 158, paragraph 1	1-51
Y	WO 2015/088445 A1 (UNIV NANYANG TECH [SG]; SINGAPORE HEALTH SERV PTE LTD [SG]) 18 June 2015 (2015-06-18) paragraph [0015] - paragraph [0016] paragraph [0053] - paragraph [0056] paragraph [0057] - paragraph [0064] paragraph [0092] - paragraph [0094]	1-51
Y	SAYOUR ELIAS ET AL: "Cancer Vaccine Immunotherapy with RNA-Loaded Liposomes", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 19, no. 10, 23 September 2018 (2018-09-23), page 2890, XP055824391, DOI: 10.3390/ijms19102890 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6213933/pdf/ijms-19-02890.pdf> Item 3 Fig. 1	1-51

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025222

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ELIAS J. SAYOUR ET AL: "Systemic activation of antigen-presenting cells via RNA-loaded nanoparticles", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 6, no. 1, 2 January 2017 (2017-01-02), page e1256527, XP055641375, DOI: 10.1080/2162402X.2016.1256527 cited in the application the whole document	1-51
A	ELIAS J SAYOUR ET AL: "Bridging infectious disease vaccines with cancer immunotherapy: a role for targeted RNA based immunotherapeutics", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 3, no. 1, 21 April 2015 (2015-04-21), page 13, XP021216038, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/S40425-015-0058-0 the whole document	1-51

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/025222

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013006842 A2	10-01-2013	CA 2841047 A1	10-01-2013
		EP 2729168 A2	14-05-2014
		EP 3508219 A1	10-07-2019
		JP 2014520807 A	25-08-2014
		JP 2017025103 A	02-02-2017
		US 2014242152 A1	28-08-2014
		WO 2013006842 A2	10-01-2013
WO 2021016106 A1	28-01-2021	NONE	
WO 2019077001 A1	25-04-2019	AU 2018351481 A1	12-03-2020
		BR 112020004351 A2	08-09-2020
		CA 3073634 A1	25-04-2019
		CN 111630173 A	04-09-2020
		EP 3697912 A1	26-08-2020
		JP 2021501572 A	21-01-2021
		KR 20200071081 A	18-06-2020
		SG 11202002186V A	28-05-2020
		WO 2019077001 A1	25-04-2019
WO 2015088445 A1	18-06-2015	CN 107073028 A	18-08-2017
		EP 3079705 A1	19-10-2016
		JP 2017500312 A	05-01-2017
		SG 10201805073V A	30-07-2018
		SG 11201604763P A	28-07-2016
		US 2016319280 A1	03-11-2016
		WO 2015088445 A1	18-06-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/88 (2006.01)		C12N	15/88	Z	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		
B82Y 5/00 (2011.01)		B82Y	5/00		
A61K 47/18 (2017.01)		A61K	47/18		
C12N 15/50 (2006.01)		C12N	15/50		
C12N 5/0784(2010.01)		C12N	5/0784		

(32)優先日　令和2年12月21日(2020.12.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100137729
弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100151301
弁理士　戸崎 富哉
(74)代理人　100152308
弁理士　中 正道
(74)代理人　100201558
弁理士　亀井 恵二郎
(72)発明者　セイヤー、エリアス
アメリカ合衆国、３２６０７－４９９９ 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 ８８１９
(72)発明者　メンデス－ゴメス、ヘクター、ルーベン
アメリカ合衆国、３２６０５－４６４６ フロリダ州、ゲインズヴィル、ノースウェスト サーティーナインス ドライヴ １２４７
(72)発明者　カスティロ カーロ、ポール、アントニオ
アメリカ合衆国、３２６０８ フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト セヴンティーフィフス ストリート ５３３３、アパートメント エイチエイチ１９９
(72)発明者　ジョーンズ、ノア、トーマス
アメリカ合衆国、３２６０７ フロリダ州、ゲインズヴィル、サウスウェスト フィフス プレイス ３７１６
(72)発明者　ミッチェル、デュエイン、エー.
アメリカ合衆国、３２６０６ フロリダ州、ゲインズヴィル、ノースウェスト ワンハンドレッドアンドサーティーエイス テラス ２９６１

Fターム（参考）　4B065　AA90X AA95Y AB01 BA05 CA24 CA45
4C076　AA19 BB13 DD49H
4C085　AA03 BA71 EE01 GG02
4C086　AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA66 NA14 ZB09 ZB33