(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年4月3日(03.04.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/070702 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/08 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/034593

(22) 国際出願日： 2024年9月27日(27.09.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-164924 2023年9月27日(27.09.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社(**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 (JP).

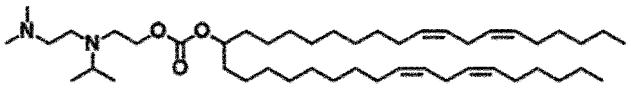
(72) 発明者: 二田原 達也 (**NITABARU Tatsuya**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 (JP). 中村 直人(**NAKAMURA Naoto**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 (JP). 十塚 祐輔(**TOTSUKA Yusuke**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 (JP). 福永 広文(**FUKUNAGA Hirofumi**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス(**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 (JP).

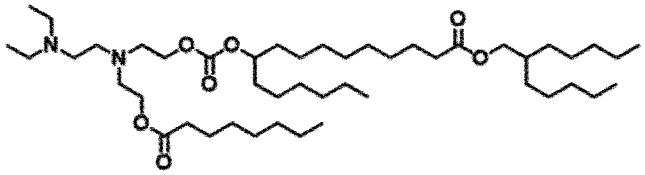
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING ANTIBODY, AND LIPID COMPOSITION FOR USE IN METHOD FOR PRODUCING ANTIBODY

(54) 発明の名称： 抗体の産生方法、および抗体の産生方法において使用するための脂質組成物



（１）



（２）

(57) **Abstract:** The problem addressed by the present invention is to provide a method for producing an antibody using a lipid composition optimized for immunity without using mRNA having poor expression persistence of antigen protein, and to provide a lipid composition optimized for immunity without using mRNA having poor expression persistence of antigen protein. The present invention provides a method for producing an antibody, the method including administering to a non-human animal a lipid composition containing one or more compounds represented by formula (1) or formula (2) and DNA encoding an antigen protein.

(57) 要約：本発明の課題は、抗原タンパクの発現持続性が劣るｍＲＮＡを用いることなく、免疫に最適化された脂質組成物を用いた、抗体の産生方法；並びに抗原タンパクの発現持続性が劣るｍＲＮＡを用いることなく免疫に最適化された脂質組成物を提供することである。本発明によれば、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与することを含む、抗体の産生方法が提供される。

WO 2025/070702 A1

［続葉有］

CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

抗体の産生方法、および抗体の産生方法において使用するための脂質組成物

技術分野

[0001]　本発明は、抗原タンパク質をコードするＤＮＡを含む脂質組成物を非ヒト動物に投与することを含む、抗体の産生方法に関する。本発明はさらに、上記抗体の産生方法において使用するための脂質組成物に関する。

背景技術

[0002]　抗体を産生するためには、抗原タンパク質または抗原タンパク質をコードする核酸を動物に投与して免疫することが一般に行われている。抗原タンパク質または抗原タンパク質をコードする核酸を動物に投与する際には、カチオン性脂質を用いて投与することが知られている。

[0003]　例えば、特許文献１には、ｍＲＮＡとカチオン性脂質を用いて作製した脂質ナノ粒子を非ヒト動物に投与することによって抗体を産生することが記載されている。特許文献２には、ポリヌクレオチドとカチオン性脂質を複合化して動物に投与し、免疫応答を引き起こす方法が記載されている。

[0004]　一方、特許文献３には、所定の構造を有する化合物を使用して調製した脂質粒子が高い核酸内包率および優れた核酸送達を示すことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２０２２－１６０６７４号公報

特許文献2：特表平９－５０００１３号公報

特許文献3：国際公開ＷＯ２０１９／２３５６３５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献１に記載の方法においては、ｍＲＮＡを用いており、投与から翻訳までの時間は速いものの、抗原発現の持続性においてＤＮＡに劣るという問題があった。また、ｍＲＮＡはその分解しやすさから品質管理が難しいという問題、並びにＤＮＡからｍＲＮＡを合成する必要があり製造工程が煩雑であるという問題がある。特許文献２の実施例においては、市販のカチオン性脂質（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ）を用いているが、カチオン性脂質は、ＤＮＡによる抗原発現および免疫誘導のために最適化されていない。

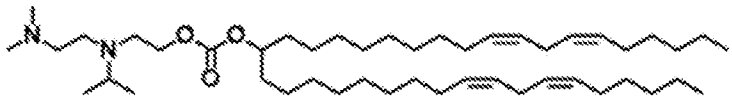
[0007] かかる状況に鑑み、本発明は、抗原タンパクの発現持続性が劣るｍＲＮＡを用いることなく、免疫に最適化された脂質組成物を用いた、抗体の産生方法を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、抗原タンパクの発現持続性が劣るｍＲＮＡを用いることなく、免疫に最適化された脂質組成物を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

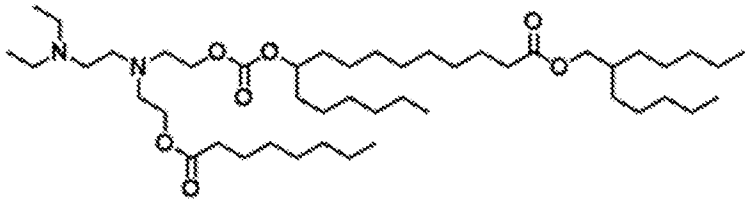
[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、下記の式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与することによって、抗体を高い産生量で産生できることを見出した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0009] ＜１＞ 式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与することを含む、抗体の産生方法。

[化1]



式（１）



式（２）

＜２＞　脂質組成物が、さらにリン脂質を含む、＜１＞に記載の抗体の産生方法。

＜３＞　リン脂質が、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびステアロイルオレオイルホスファチジルコリンからなる群より選択される少なくとも１種である、＜２＞に記載の抗体の産生方法。

＜４＞　化合物が、式（１）で示される化合物である、＜１＞に記載の抗体の産生方法。

＜５＞　脂質組成物が、さらにステロールを含む、＜１＞～＜４＞のいずれか一に記載の抗体の産生方法。

＜６＞　脂質組成物が、さらに非イオン性親水性高分子鎖を有する脂質を含む、＜１＞～＜４＞のいずれか一に記載の抗体の産生方法。

＜７＞　投与方法が局所投与である、＜１＞～＜４＞のいずれか一に記載の抗体の産生方法。

＜８＞　脂質組成物を投与した非ヒト動物から取得した抗体産生細胞と増殖性細胞とを融合させてハイブリドーマを樹立し、上記ハイブリドーマを培養することをさらに含む、＜１＞～＜４＞の何れか一に記載の抗体の産生方法。

＜９＞　式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパ

ク質をコードするＤＮＡとを含む、＜１＞～＜４＞の何れか一に記載の抗体の産生方法において使用するための脂質組成物。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、所定の化合物およびＤＮＡを含む脂質組成物を動物に投与することにより、上記ＤＮＡが細胞内に導入され、上記ＤＮＡにコードされた抗原タンパク質が発現し、上記抗原タンパク質に対する抗体を産生させることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、ウサギ抗体産生の測定結果を示す。

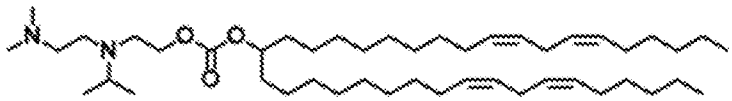
発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明について詳細に説明する。

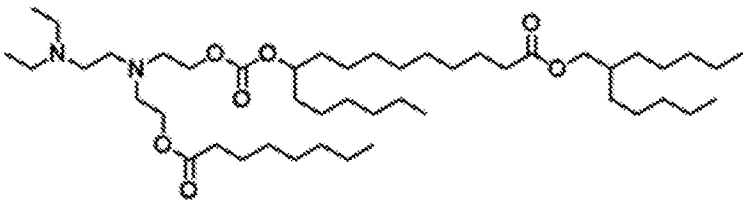
本明細書において「～」は、その前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0013] 本発明による抗体の産生方法は、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与することを含む。

[化2]



式（１）



式（２）

[0014] ＜脂質組成物の構成＞

脂質組成物は、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物を含む。

式（１）で示される化合物及び式（２）で示される化合物は、国際公開ＷＯ２０１９／２３５６３５号公報の実施例２５及び実施例１２５にそれぞれ記載されている化合物である。

[0015] 式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物としては、式（１）で示される化合物を使用することが好ましい。

[0016] 脂質組成物において、式（１）又は式（２）で示される１種類以上の化合物の配合量は、全脂質量に対して２０ｍｏｌ％～８０ｍｏｌ％であることが好ましく、３５ｍｏｌ％～７０ｍｏｌ％であることがより好ましく、４０ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％であることがさらに好ましい。

[0017] 脂質組成物は、抗原タンパク質をコードするＤＮＡを含む。

抗原タンパク質としては、任意の抗原タンパク質を使用することができるが、特に、膜貫通型タンパク質であることが好ましい。また、抗原タンパク質としては、がん抗原または腫瘍抗原であることが好ましい。

[0018] がん抗原および腫瘍抗原のリストを以下に示すが、これらに限定されるものではない。下記の抗原又はその部分ペプチドを、抗原タンパク質として使用することができる。

[0019] ＣＤ２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２７、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ７０、ＣＤ７９、ＣＤ１３７、４－ＩＢＢ、５Ｔ４、ＡＧＳ－５、ＡＧＳ－１６、アンジオポエチン２、Ｂ７．１、Ｂ７．２、Ｂ７ＤＣ、Ｂ７Ｈ１、Ｂ７Ｈ２、Ｂ７Ｈ３、ＢＴ－０６２、ＢＴＬＡ、ＣＡＩＸ、癌胎児抗原、ＣＴＬＡ４、クリプト（Ｃｒｉｐｔｏ）、ＥＤ-Ｂ、ＥｒｂＢＩ、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＥＧＦＬ７、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐｈＡ３、ＥｐｈＢ２、ＦＡＰ、フィブロネクチン、葉酸受容体、ガングリオシドＧＭ３、ＧＤ２、グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子受容体（ＧＩＴＲ）、ｇｐＩＯＯ、ｇｐＡ３３、ＧＰＮＭＢ、ＩＣＯＳ、ＩＧＦ１Ｒ、インテグリンａｖ、インテグリンαｖβ、ＬＡＧ-３、ルイスＹ、メソテリン、ｃ-ＭＥＴ、ＭＮ炭酸脱水酵素ＩＸ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ネクチン-４、ＮＫＧＤ２

、ＮＯＴＣＨ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＰＤ-１、ＰＤＬ１、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＡＮＫＬ、ＲＯＲ１、ＲＯＲ２、ＳＬＣ４４Ａ４、シンデカン-１、ＴＡＣＩ、ＴＡＧ-７２、テネイシン、ＴＩＭ３、ＴＲＡＩＬＲＩ、ＴＲＡＩＬＲ２、ＶＥＧＦＲ-１、ＶＥＧＦＲ-２、ＶＥＧＦＲ-３、及びそれらの変異体。

[0020] 抗原タンパク質をコードするＤＮＡの形態は特に限定されないが、一例としては、真核細胞中で抗原タンパク質を発現させるためのプラスミド発現ベクターである。なお、プラスミド発現ベクターとしては、従来のプラスミドよりも小さいナノプラスミド（Nanoplasmid）を使用することもできる。真核細胞用の発現ベクターは、一般的には、４つの要素を含む。第一の要素は、複製起点をコードする配列である。これにより、宿主内でのプラスミドの増殖が可能になる。第二の要素は、転写の開始を制御する要素であり、具体的にはプロモーター配列および所望によりエンハンサー配列である。第三の要素は、ポリアデニル化配列などの転写物のプロセシングに関与する配列である。第四の要素は、抗原タンパク質をコードする配列である。抗原タンパク質をコードするＤＮＡ（ｃＤＮＡでもよい）は発現ベクター中に機能的に連結させることができる。２つのＤＮＡ配列（プロモーター配列と抗原タンパク質をコードする配列）の間の連結が、（１）フレームシフト変異の導入をもたらさないか、（２）免疫原コード遺伝子配列の転写を指令するプロモーター配列の能力を妨げないか、または（３）抗原タンパク質をコードする配列がプロモーター配列によって転写される能力を妨げない場合に、これら２つのＤＮＡ配列は機能的に連結しているということができる。

[0021] プロモーターとしては、ウイルス（たとえばアデノウイルス、ウシパピローマウイルス、シミアンウイルスなど）に由来するものでもよいし、アクチン、コラーゲン又はミオシンのプロモーターなど哺乳動物由来のプロモーターでもよいし、原核細胞のプロモーター（バクテリオファージＴ３　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターなど）でもよい。プロモーターとしては、例えば、マウスメタロチオネインＩ遺伝子のプロモーター、ヘルペスウイルスのＴ

Ｋプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、およびサイトメガロウイルスプロモーターなど挙げられる。

[0022] 脂質組成物において、抗原タンパク質をコードするＤＮＡの配合量は、全脂質量に対して、例えば０．０１～５０重量％、好ましくは０．１～３０重量％、より好ましくは０．５～１５重量％である。

[0023] 脂質組成物は、好ましくは、さらにリン脂質を含む。

リン脂質としては、特に限定されないが、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンなどが挙げられ、ホスファチジルコリンが好ましい。また、リン脂質としては、単独でも、複数の異なるリン脂質を組み合わせても良い。

[0024] ホスファチジルコリンとしては、特に限定されないが、大豆レシチン（ＳＰＣ）、水添大豆レシチン（ＨＳＰＣ）、卵黄レシチン（ＥＰＣ）、水添卵黄レシチン（ＨＥＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ステアロイルオレオイルホスファチジルコリン（ＳＯＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）などが挙げられる。

[0025] ホスファチジルエタノールアミンとしては特に限定されないが、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＬｏＰＥ）、ジフィタノイルホスファチジルエタノールアミン（Ｄ（Ｐｈｙ）ＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジテトラデシルホスファチジルエタノールアミン、ジヘキサデシルホスファチジルエタノールアミン、ジオクタデシルホスファチジルエタノールアミン、ジフィタニルホスファチジルエタノールアミンなどが挙

げられる。

[0026] スフィンゴミエリンとしては、特に限定されないが、卵黄由来スフィンゴミエリン、牛乳由来スフィンゴミエリンなどが挙げられる。

[0027] 上記の中でも、リン脂質としては、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびステアロイルオレオイルホスファチジルコリンからなる群より選択される少なくとも１種であることが好ましく、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが特に好ましい。

[0028] 脂質組成物において、リン脂質の配合量は、構成脂質成分全量に対して３ｍｏｌ％以上５５ｍｏｌ％以下であることが好ましい。

[0029] 脂質組成物は、好ましくは、さらにステロールを含む。脂質組成物にステロールを含むことで、膜流動性を低下させ、脂質組成物の安定化効果を得ることができる。

ステロールとしては、特に限定されないが、コレステロール、フィトステロール（シトステロール）、スチグマステロール、フコステロール、スピナステロール、ブラシカステロールなど）、エルゴステロール、コレスタノン、コレステノン、コプロスタノール、コレステリル－２’－ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル－４’－ヒドロキシブチルエーテルなどを挙げることができる。これらの中でも、コレステロールが好ましい。

[0030] 脂質組成物において、ステロールの配合量は、全脂質量に対して１０ｍｏｌ％～６０ｍｏｌ％であることが好ましく、２０ｍｏｌ％～５５ｍｏｌ％であることがより好ましく、２５ｍｏｌ％～５０ｍｏｌ％であることがさらに好ましい。

[0031] 脂質組成物は、好ましくは、さらに非イオン性親水性高分子鎖を有する脂質を含む。脂質組成物が非イオン性親水性高分子鎖を有する脂質を含むことで、脂質組成物の分散安定化効果を得ることができる。

[0032] 非イオン性親水性高分子の例としては、特に限定されないが、非イオン性のビニル系高分子、非イオン性ポリアミノ酸、非イオン性ポリエステル、非

イオン性ポリエーテル、非イオン性天然高分子、非イオン性改変天然高分子、これらの２種以上の高分子を構成単位とするブロック重合体またはグラフト共重合体が挙げられる。

[0033] これらの非イオン性親水性高分子のうち、好ましくは非イオン性ポリエーテル、非イオン性ポリエステル、非イオン性ポリアミノ酸もしくは非イオン性合成ポリペプチドであり、さらに好ましくは非イオン性ポリエーテルまたは非イオン性ポリエステル、さらに好ましくは非イオン性ポリエーテルまたは非イオン性モノアルコキシポリエーテルであり、特に好ましくはポリエチレングリコール（ポリエチレングリコールは、以下においてＰＥＧとも称する）である。

[0034] 非イオン性親水性高分子を有する脂質としては、特に限定されないが、ＰＥＧ修飾ホスホエタノールアミン、ジアシルグリセロールＰＥＧ誘導体、ジアルキルグリセロールＰＥＧ誘導体、コレステロールＰＥＧ誘導体、セラミドＰＥＧ誘導体などが挙げられる。これらの中でも、ジアシルグリセロールＰＥＧが好ましい。

上記非イオン性親水性高分子誘導体のＰＥＧ鎖の重量平均分子量は、５００～５０００が好ましく、７５０～３０００がより好ましい。

非イオン性親水性高分子鎖は分岐していてもよく、ヒドロキシメチル基のような置換基を有していてもよい。

[0035] 脂質組成物において、非イオン性親水性高分子鎖を有する脂質の配合量は、全脂質量に対して０．２５ｍｏｌ％～１２ｍｏｌ％であることが好ましく、０．５ｍｏｌ％～６ｍｏｌ％であることがより好ましく、１ ｍｏｌ％～３ｍｏｌ％であることがさらに好ましい。

[0036] 式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物は、本発明による抗体の産生方法において使用するために使用することができる。即ち、本発明によれば、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む、本発明による抗体の産生方法において使用するための脂

質組成物が提供される。

[0037] ＜脂質組成物の製造方法＞

脂質組成物の製造方法について説明する。

脂質組成物の製造方法は限定されないが、脂質組成物の構成成分全てまたは一部の油溶性成分を有機溶媒等に溶解させ油相とし、ＤＮＡなどの水溶性成分を水に溶解させ水相とし、油相と水相を混合して製造することができる。混合にはマイクロミキサーを使用してもよく、ホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等により乳化してもよい。

[0038] あるいは、脂質を含む溶液から、エバポレータなどによる減圧乾固または噴霧乾燥機などによる噴霧乾燥などにより脂質を含む乾燥した混合物を調製し、この混合物を水系溶媒に添加し、さらに前述の乳化機などで乳化することで製造することもできる。

[0039] ＤＮＡを含む脂質組成物の製造方法の一例としては、

脂質組成物の構成成分を有機溶媒に溶解して油相を得る工程（ａ）；

工程（ａ）で得た油相と、ＤＮＡを含む水相と、を混合する工程（ｂ）；

工程（ｂ）で得た油相および水相を含む混合液を希釈して、脂質粒子の分散液を得る工程（ｃ）；

工程（ｃ）で得られた脂質粒子の分散液から上記有機溶媒を除去する工程（ｄ）；および

工程（ｄ）で得られた脂質粒子の分散液の濃度を調節する工程（ｅ）；

を含む方法が挙げられる。

[0040] 工程（ａ）においては、脂質に分類される構成成分を、有機溶媒（エタノールなどのアルコール、またはエステルなど）に溶解させることを含む。有機溶媒に溶解させた後の総脂質濃度は特に限定されないが、一般的には１ｍｍｏｌ／Ｌ～１００ｍｍｏｌ／Ｌであり、好ましくは５ｍｍｏｌ／Ｌ～５０ｍｍｏｌ／Ｌであり、より好ましくは１０ｍｍｏｌ／Ｌ～３０ｍｍｏｌ／Ｌである。

[0041] 工程（ｂ）において、水相は、ＤＮＡを、水または緩衝液に溶解すること

で得ることができる。ＤＮＡの濃度は特に限定されないが、１～１０００μｇ／ｍＬが好ましく、１０～５００μｇ／ｍＬがより好ましい。必要に応じてｐＨ調整のための緩衝成分や酸化防止剤などの成分を添加することができる。水相のｐＨは２．０～７．０であることが好ましく、３．０～６．０であることがより好ましい。上記ｐＨに調整するために緩衝成分として酢酸、クエン酸、リンゴ酸、リン酸、ＭＥＳ、ＨＥＰＥＳなどが好ましく用いられ、必要に応じて塩強度を調整することを目的に、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの塩や、浸透圧を調整することを目的に、スクロース、トレハロース、マンニトールなどの糖や糖アルコールを添加してもよい。

[0042] 工程（ｂ）において、油相と水相は任意の方法で混合してよく、バッチ式でも流路デバイスを用いたインライン方式でもよい。インライン方式としてはマイクロ流路デバイスを用いることが好ましく、用いるマイクロ流路デバイスとしては、Ｙ字ミキサー、Ｔ字ミキサー、ヘリンボーンミキサー、リングマイクロミキサー、インピンジメントジェットミキサーなどを用いることができる。水相と油相を混合する比率（体積比）は、５：１～１：１が好ましく、４：１～２：１がより好ましい。

[0043] 工程（ｃ）において、脂質粒子の分散液を希釈溶液と混合することにより、有機溶媒の含有率を下げ、脂質粒子を安定化することができる。希釈溶液は、水でもよいが、ｐＨや塩強度を調整することを含んでもよい。希釈溶液に含まれる成分は目的に応じて任意に選択することができる。例えば、ｐＨを調整する目的で、緩衝液（例えばクエン酸緩衝液、クエン酸緩衝生理食塩水、酢酸緩衝液、酢酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝液、ＭＥＳ緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液など）を用いてもよい。また、塩強度や浸透圧を調整することを目的として塩化ナトリウム、塩化カリウム、スクロース、トレハロース、フルクトースまたはマンニトールなどを含んでもよく、上記緩衝液にこれらの添加剤をさらに添加したものも使用できる。

[0044] 脂質粒子の分散液と希釈溶液は任意の方法で混合してよく、バッチ式でも流路デバイスを用いたインライン方式でもよい。混合時に用いる流路デバイ

スは、Ｙ字ミキサー、Ｔ字ミキサーなどを用いることができる。

脂質粒子の分散液と希釈溶液を混合する比率（液量比）は、１：０．５～１：１０が好ましく、１：１～１：５がより好ましい。

[0045] いくつかの実施形態では、工程（ｃ）において脂質粒子の分散液は目的に応じて複数回希釈溶液と混合してもよい。また用いる希釈溶液は同一であっても異なっていてもよい。脂質粒子の分散液では、ｐＨによって脂質粒子の粒径が変化することがあり、分散液のｐＨ調整は重要となる。そのため、例えば希釈溶液との混合後の脂質粒子の分散液のｐＨを調整するために、それに適した濃度およびｐＨを有する緩衝液や、さらに他の成分を含む緩衝液を用いてもよい。

[0046] さらに、複数の希釈工程は連続的に実施してもよく、希釈工程と次の希釈工程の間隔を任意に設定することができ、例えば、その間隔は１０秒、３０秒、１分、５分、１０分、３０分、１時間、２時間、３時間、４時間、６時間、１２時間または２４時間であってもよい。

また、工程（ｃ）を行った後の脂質粒子の分散液のｐＨはｐＨ３．０～１０．０が好ましく、ｐＨ３．５～ｐＨ９．０がより好ましく、ｐＨ４．０～ｐＨ８．５が特に好ましい。

[0047] 脂質粒子には、必要に応じてサイジングを施すことができる。サイジングの方法は、特に限定されないが、エクストルーダーなどを用いて粒子径を小さくすることができる。

また、脂質粒子を含む分散液には、一般的な方法により、凍結や凍結乾燥を施すことができる。

[0048] 工程（ｄ）において、脂質粒子の分散液から有機溶媒を除去する方法としては、特に限定されず、一般的な手法を使用することができるが、例えば、透析液としてリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝液などのｐＨ緩衝液を用いて透析を行うことにより有機溶媒を除去することができる。必要に応じて浸透圧の調整や凍結からの保護を目的として任意の塩や糖などの添加剤を加えることができる。

[0049] 工程（ｅ）において、工程（ｄ）で得られた分散液の濃度を調整することができる。希釈する場合は、リン酸緩衝生理食塩水、生理食塩水もしくはトリス塩酸緩衝液、などを希釈液として用いて適切な濃度に希釈することができる。濃縮する場合は、工程（ｄ）で得られた分散液を限外ろ過膜を用いた限外ろ過などにより濃縮することができる。濃縮した分散液をそのまま用いても好ましく、濃縮した後に上記希釈液を用いて所望の濃度に調整しても好ましい。

[0050] また、いくつかの実施形態では、接線流ろ過（ＴＦＦ）を用いて有機溶媒除去工程（工程（ｄ））、濃度調整工程（工程（ｅ））を連続的に行うことができる。本工程において有機溶媒除去工程と濃度調整工程を任意の順番で実施してもよい。必要に応じて有機溶媒除去工程と濃度調整工程をそれぞれ複数回ずつ実施してもよい。

[0051] 工程（ｄ）における透析や、工程（ｅ）における希釈において用いることのできる溶液には、賦形剤、凍結保護剤、緩衝剤や酸化防止剤を添加してもよい。賦形剤や凍結保護剤としては、特に限定されないが、糖類や糖アルコール類が挙げられる。糖類としては、例えばスクロース、トレハロース、マルトース、グルコース、ラクトース、フルクトースなどが、糖アルコール類としては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール、キシリトールなどが挙げられる。緩衝剤としては、特に限定されないが、例えば、ＡＣＥＳ、ＢＥＳ、Ｂｉｃｉｎｅ、ＣＡＰＳ、ＣＨＥＳ、ＤＩＰＳＯ、ＥＰＰＳ、ＨＥＰＥＳ、ＨＥＰＰＳＯ、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、ＴＡＰＳ、ＴＡＰＳＯ、ＴＥＳ、Ｔｒｉｃｉｎｅ、トリス、リン酸、酢酸、クエン酸などが挙げられる。酸化防止剤としては、ＥＤＴＡ、アスコルビン酸、トコフェロールなどが挙げられる。

[0052] 脂質粒子の分散液をがんの治療剤とするために、無菌ろ過を行うことが好ましい。ろ過の方法としては、中空糸膜、逆浸透膜、メンブレンフィルターなどを用いて、脂質粒子の分散液から不要なものを除去することができる。本発明では、特に限定されないが、滅菌できる孔径を有するフィルター（好

ましくは０．２μｍのろ過滅菌フィルター）によってろ過することが好ましい。また、無菌ろ過を行うのは、工程（ｃ）もしくは工程（ｄ）または工程（ｅ）の後が好ましい。

さらに必要に応じて脂質粒子の分散液に、凍結乾燥を施すことができる。

[0053] ＜脂質組成物の形態＞

脂質組成物は、脂質粒子でもよい。脂質粒子とは、脂質から構成される粒子を意味し、脂質が凝集している脂質凝集体、ミセル、リポソームから選択されるいずれかの構造を有する組成物が含まれるが、脂質を含む組成物である限り脂質粒子の構造はこれらに限定されない。リポソームとしては、脂質二重層構造を有し、内部に水相を有し、二重膜が単層のリポソーム、多数層状に重なった多重相リポソームがある。本発明にはどちらのリポソームが含まれてもよい。

[0054] 脂質粒子の形態は、電子顕微鏡観察またはエックス線を用いた構造解析などにより確認できる。例えば、Ｃｒｙｏ透過型電子顕微鏡観察（ＣｒｙｏＴＥＭ法）を用いた方法により、リポソームのように脂質粒子が脂質二分子膜構造（ラメラ構造）および内水層を持つ構造であるか、粒子内部に電子密度が高いコアを持ち、脂質をはじめとする構成成分が詰まった構造を有しているか、などが確認できる。エックス線小角散乱（ＳＡＸＳ）測定によっても、脂質粒子についての脂質二分子膜構造（ラメラ構造）の有無を確認できる。

[0055] 脂質粒子の粒子径は特に限定されないが、好ましくは１０～１０００ｎｍであり、より好ましくは３０～５００ｎｍであり、さらに好ましくは５０～２５０ｎｍである。脂質粒子の粒子径は、一般的な方法（例えば、動的光散乱法、レーザー回折法など）により測定することができる。

[0056] ＜脂質組成物の非ヒト動物への投与＞

本発明においては、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与する。

なお、式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物は、ヒトに投与してもよい。

[0057] 脂質組成物は単独でまたは投与媒体（例えば、生理食塩水または緩衝液など）と混合して、生体に投与することができる。

[0058] 非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物が好ましく、例えば、ウサギ、マウス、ラットおよびサルなどが挙げられ、ウサギおよびマウスが好ましい。

非ヒト動物への投与方法としては、全身投与または局所投与が挙げられるが、局所投与が好ましい。局所投与としては、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射などが挙げられる。

[0059] 非ヒト哺乳動物への脂質組成物の投与量としては、内包されるＤＮＡの投与量が１～１０００μｇ／ｈｅａｄとなるような投与量であることが好ましく、３～５００μｇ／ｈｅａｄとなるような投与量であることがより好ましい。また、投与は１～４週間に１回投与することが好ましい。

[0060] 脂質組成物を投与した非ヒト動物の体内において、抗原タンパク質に対する抗体が産生される。従って、脂質組成物を投与した非ヒト動物から採血し、産生した抗体を回収することができる。

[0061] あるいは、脂質組成物を投与した非ヒト動物から取得した抗体産生細胞と増殖性細胞とを融合させてハイブリドーマを樹立し、上記ハイブリドーマを培養することによって抗体を産生させてもよい。

[0062] 本明細書において、抗体は、最も広い意味で使用され、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも１つの抗原認識部位を介して、抗原タンパク質を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。

抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもよく、多鎖もしくは一本鎖又はインタクトな免疫グロブリンのいずれでもよい。

インタクトな抗体は、典型的には、ジスルフィド結合により相互に結合した、少なくとも２つの重鎖（Ｈ）及び２つの軽鎖（Ｌ）を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨと略す）及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３を含む

。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬと略す）及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬから構成される。ＶＨ及びＶＬ領域を、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域（フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存された領域が散在している）にさらに細分することができる。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシル末端に、下記順序で配置された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲから構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

[0063] 重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原タンパク質と相互作用する結合ドメインを含有する。

抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を含む、ホストの組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

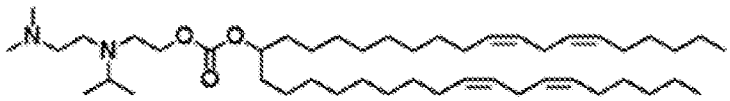
[0064] 抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）又はサブクラスのいずれでもよい。

[0065] 次に本発明について実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

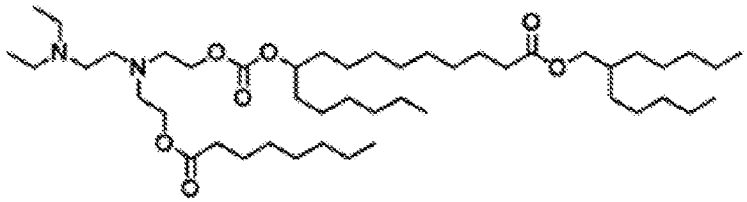
実施例

[0066] 以下の試験例においては、以下の化合物を使用した。

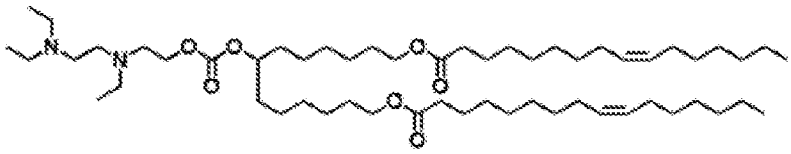
[化3]



式（1）



式（2）



式（3）

[0067] 試験例１：プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子の調製とマウスにおける抗体産生の測定

＜使用したリン脂質＞

ＤＯＰＥ（Ｌ－α－ジオレオイル　ホスファチジルエタノールアミン）およびＳＯＰＣ　（１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－フォスフォコリン）は日油株式会社より購入した。

[0068] ＜プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子の調製＞

表１に記載の化合物、表１に記載のリン脂質、コレステロール（製品名：Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ　ＨＰ；日本精化株式会社）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－（メチルポリオキシエチレン２０００）（以下、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）（製品名：ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（Ｒ）ＧＭ－０２０；ＮＯＦ　ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、イオン化脂質：リン脂質：コレステロール：ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００＝５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、総脂質濃度が１２．５ｍｍｏｌ／Ｌとなるようにエタノールに溶解させ，油相を得た。

[0069] [表1]

	イオン化脂質	リン脂質
実施例１	化合物　式（１）	DOPE
実施例２	化合物　式（２）	SOPC
比較例２	化合物　式（３）	DOPE

[0070] ｈＥｐｈＡ２（Erythropoietin producing hepatoma receptor-A2）をコードするプラスミドＤＮＡ（富士フイルム和光純薬）をｐＨ４．０の５０ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸バッファーで、総脂質濃度のプラスミドＤＮＡ濃度に対する重量比が約２０：１になるように希釈して水相を得た。つづいて水相と油相の体積比が水相：油相＝３：１となるようにＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ）を使用して混合し、混合液をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）もしくは水で２倍希釈してプラスミドＤＮＡ脂質ナノ粒子の分散液を得た。この分散液を、８％スクロースを含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液にて透析カセット（Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｇ２、ＭＷＣＯ：１０ｋＤ、　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて透析することによりエタノールの除去を行ったのち、限外ろ過フィルター（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１００ｋＤａ，Ｍｅｒｃｋ）を用いて濃縮し、プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子を得た。

[0071] ＜粒子径・ゼータ電位の測定＞

プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子の粒子径は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で２０倍希釈したのち、粒径測定装置ＮａｎｏＳＡＱＬＡ（大塚電子）を用いて測定した。ゼータ電位は、ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）もしくはＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．５）で希釈したのち、ゼータ電位測定装置ＥＬＳ－Ｚ２（大塚電子）で測定した。結果を表２に示す。

[0072] ＜プラスミドＤＮＡの内包率の評価＞

（総プラスミドＤＮＡ濃度定量）

プラスミドＤＮＡをＭｉｌｌｉＱ水で希釈して１００μｇ／ｍＬから３．１μｇ／ｍＬまでの2倍希釈系列で希釈サンプルを調製し、検量線溶液を調製

した。検量線溶液もしくはＭｉｌｌｉＱ水で１０倍に希釈したプラスミドＤＮＡ脂質ナノ粒子５０μＬをメタノール４５０μＬと混合して測定溶液を調製した。

[0073] UVプレートリーダー（Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　Ｇｏ、Ｔｈｅｒｍｏ　ｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて各測定溶液の２６０ｎｍおよび３３０ｎｍにおける吸光度を測定し，２６０ｎｍの吸光度から３３０ｎｍの吸光度を差し引き，各測定溶液の吸光度とした。各サンプル測定溶液の吸光度を用いて，検量線から全水相核酸濃度を算出した。

[0074]（外水相におけるプラスミドＤＮＡ濃度の定量）

Ｑｕａｎｔ－ｉＴ　ＲｉｂｏＧｒｅｅｎ　ＲＮＡ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用い，標準添加法により外水相核酸濃度を定量した。まず，上述のキットに含まれる２０×ＴＥバッファーを水で希釈し，１×ＴＥバッファーとした。なお，ＴＥは，Ｔｒｉｓ／ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）を示す。プラスミドＤＮＡを終濃度が０～４００ ｎｇ/ｍＬになるようにＴＥバッファーで希釈し，核酸希釈系列を調製した。ＴＥバッファーで２５倍希釈したプラスミドＤＮＡ脂質ナノ粒子を１０μＬと核酸希釈系列９０μＬを９６ウェルプレートで混合後，ＴＥバッファーで２００倍に希釈したＲｉｂｏＧｒｅｅｎ試薬１００μＬを各ウェルに加え，蛍光プレートリーダー（Ｉｎｆｉｔｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ　Ｍ　ｎａｎｏ　＋、ＴＥＣＡＮ）を用いて蛍光（励起波長：４８５ｎｍ、蛍光波長：５３５　ｎｍ）を測定した。得られた結果から標準添加法に則り，各測定溶液の外水相核酸濃度を算出した。

[0075]（核酸内包率の算出）

上述の工程で得られた総プラスミドＤＮＡ濃度および外水相でのプラスミドＤＮＡ濃度の定量結果を用いて，下記式に従って，プラスミドＤＮＡ脂質ナノ粒子の核酸（プラスミドＤＮＡ）内包率を算出した。結果を表２に示す。

核酸内包率（％）＝（総プラスミドＤＮＡ濃度－外水相におけるプラスミド

ＤＮＡ濃度）÷総プラスミドＤＮＡ濃度×１００

[0076] [表2]

核酸内包脂質ナノ粒子の粒子径，多分散指数（ＰｄＩ），核酸内包率，ゼータ電位

実施例番号	粒子径 (nm)	PdI	核酸内包率 (%)	ゼータ電位（mV）	
				pH7.5	pH5.5
実施例１	109	0.161	100%	-13.9	31.3
実施例２	216	0.209	95%	-10.2	44.7
比較例２	166	0.119	94%	-2.8	25.1

[0077] ＜マウス抗体の産生の測定＞

マウス（Ｂａｌｂ／ｃ、メス、６週齢）を購入後１週間馴化させたのち、上記＜プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子の調製＞において調製したプラスミドＤＮＡ脂質ナノ粒子の分散液、もしくは比較例１としてＣａＬｉＶａｘ（ＯＺ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，　ＣＶ０２０００）を推奨プロトコルに従いプラスミドＤＮＡと混合したものを、プラスミドＤＮＡ投与量として４２もしくは１４μｇ／ｈｅａｄになるように皮内に投与した（０週；以下Ｗ００と表記する）。その後、Ｗ０８まで，２週間おきに同様に投与を繰り返した。Ｗ０７、１１のタイミングで尾静脈より採血を行い、血清を採取した。得られた血清を２００倍希釈したのち、ＣＨＯ細胞（ＭＯＣＫ）及びｈＥｐｈＡ２タンパクを発現させたＣＨＯ細胞に添加し３０分反応後、蛍光ラベル化された二次抗体（ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ，１０３０－０９）を添加した。ＭＯＣＫ細胞への血清及び二次抗体添加は，非特異的な吸着を定量するために用いた。その後、上記の処理したＣＨＯ細胞の１細胞当たりの蛍光強度中央値（Ｍｅｄｉａｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ；ＭＦＩ）をフローサイトメトリー（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，　ＣｙｔｏＦｌｅｘ）によって定量した。得られたＭＦＩについて、ｈＥｐｈＡ２タンパクを発現させたＣＨＯ細胞のＭＦＩからＭｏｃｋ細胞のＭＦＩを差し引くことで、各実施例のＭＦＩ値を算出し、比較例を１とした時のＭＦＩの比率を相対的抗体産生量とした。

[0078] 本試験は被験製剤を２分割してそれぞれ実施し，１回目（比較例１と実施

例１）の結果を表３に示し、２回目（実施例１、２、比較例２）の結果を表４に示す。

[0079] [表3]

LNP 投与後Ｗ１１における抗体産生

使用した化合物	投与量 (DNA として)	相対的抗体産生量 (対 実施例１ 14μg/head)
比較例１	42 μg/head, biweekly	０．１３
実施例１	42 μg/head, biweekly	０．６０
実施例１	14 μg/head, biweekly	１．００

[0080] [表4]

LNP 投与後Ｗ０７における抗体産生

使用した化合物	投与量 (DNA として)	相対的抗体産生量 (対 実施例１)
実施例１	14 μg/head, biweekly	１．００
実施例２	14 μg/head, biweekly	０．４４
比較例２	14 μg/head, biweekly	０．１６

[0081] ＜ウサギ抗体産生測定＞

ウサギ（Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｗｈｉｔｅ Ｒａｂｂｉｔ、メス、１２週齢）を購入後１週間馴化させたのち、上記＜プラスミドＤＮＡ内包脂質ナノ粒子の調製＞において調製した実施例１もしくは比較例３としてＣＮＥ－ＣＰＯ（ＯＺ ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＣＮＥ－１０００）を、プラスミドＤＮＡ投与量として２００μｇ／ｈｅａｄになるように背中の皮内もしくは大腿筋肉内に投与した（０週；以下Ｗ００と表記する）。その後Ｗ１０まで、２週間おきに同様に投与を繰り返した。Ｗ０３、０５、０７、０９、１１のタイミングで耳静脈より採血を行い、血清を採取した。得られた血清を１０００倍希釈したのち、ＣＨＯ細胞（ＭＯＣＫ）及びｈＥｐｈＡ２タンパクを発現させたＣＨＯ細胞に添加し３０分反応後、蛍光ラベル化された二次抗体（ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ，４０３０－０９）を添加した。ＭＯＣＫ細胞への血清及び二次抗体添加は、非特異的な吸着を定量するために用いた。その後、上記の処理したＣＨＯ細胞の１細胞当たりの蛍光強度中央値（

Ｍｅｄｉａｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ；ＭＦＩ）をフローサイトメトリー（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，ＣｙｔｏＦＬｅｘ）によって定量した。得られたＭＦＩについて、ｈＥｐｈＡ２タンパクを発現させたＣＨＯ細胞のＭＦＩからＭｏｃｋ細胞のＭＦＩを差し引くことで、各実施例のＭＦＩ値を算出し、抗体産生量とした。実施例１の物性値を表５に、抗体産生量の結果を表６及び図１に示す。

[0082] [表5]

ウサギに投与した実施例１の粒子径，多分散指数（ＰｄＩ），核酸内包率，ゼータ電位

実施例番号	粒子径 (nm)	PdI	核酸内包率 (%)	ゼータ電位 (mV)	
				pH7.5	pH5.5
実施例１	99	0.157	99	-1.9	33.0

[0083] [表6]

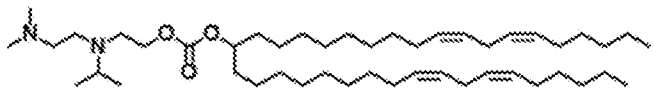
ウサギにおける抗体産生

投与サンプル	Week					
	0	3	5	7	9	11
比較例３（皮内投与）	326	355	320	336	366	385
実施例１（皮内投与）	337	685	1126	2377	3741	4452
実施例１（筋肉内投与）	383	1267	3879	6880	11927	12468

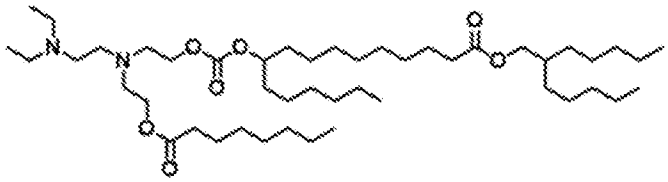
請求の範囲

[請求項1] 式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む脂質組成物を、非ヒト動物に投与することを含む、抗体の産生方法。

[化1]



式（１）



式（２）

[請求項2] 脂質組成物が、さらにリン脂質を含む、請求項１に記載の抗体の産生方法。

[請求項3] リン脂質が、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびステアロイルオレオイルホスファチジルコリンからなる群より選択される少なくとも１種である、請求項２に記載の抗体の産生方法。

[請求項4] 化合物が、式（１）で示される化合物である、請求項１に記載の抗体の産生方法。

[請求項5] 脂質組成物が、さらにステロールを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体の産生方法。

[請求項6] 脂質組成物が、さらに非イオン性親水性高分子鎖を有する脂質を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体の産生方法。

[請求項7] 投与方法が局所投与である、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体の産生方法。

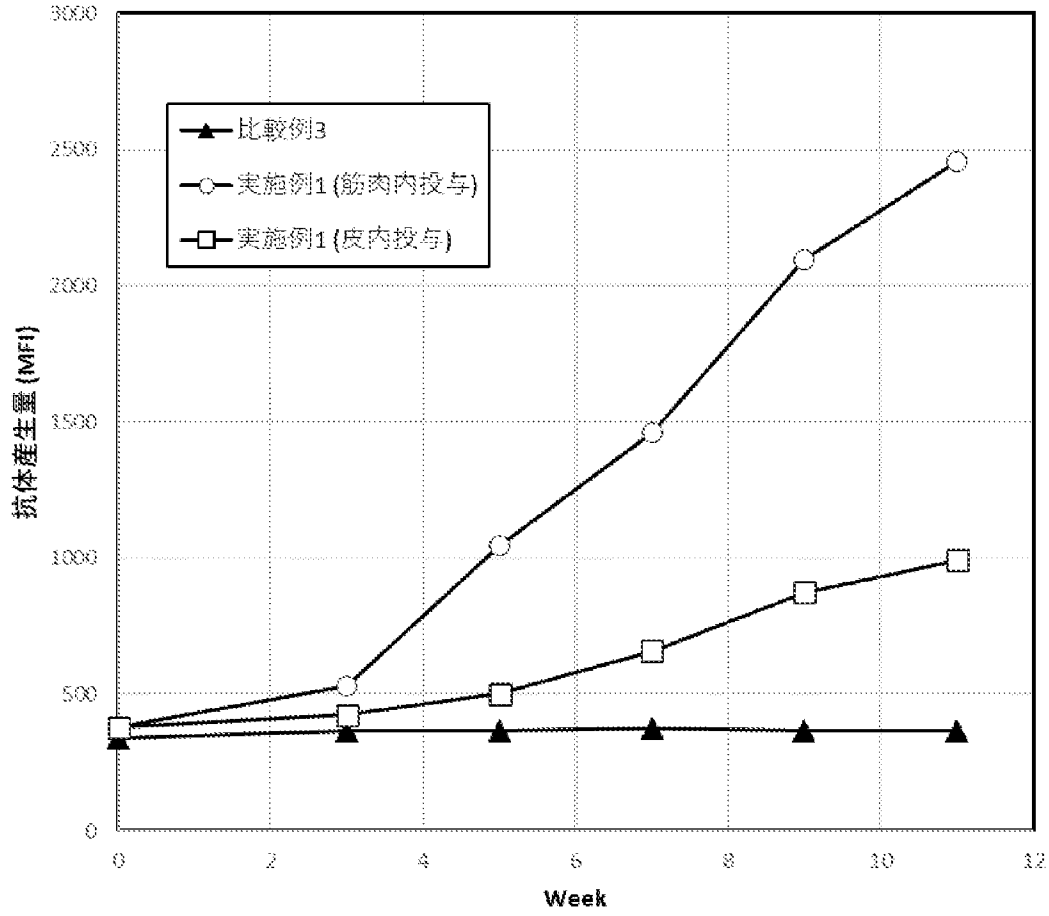
[請求項8] 脂質組成物を投与した非ヒト動物から取得した抗体産生細胞と増殖性

細胞とを融合させてハイブリドーマを樹立し、前記ハイブリドーマを培養することをさらに含む、請求項１～４の何れか一項に記載の抗体の産生方法。

[請求項9] 式（１）又は式（２）で示される１種以上の化合物と、抗原タンパク質をコードするＤＮＡとを含む、請求項１～４の何れか一項に記載の抗体の産生方法において使用するための脂質組成物。

WO 2025/070702 PCT/JP2024/034593

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/034593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/08(2006.01)i; ***C07K 16/00***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i
FI: C12P21/08; C07K16/00; C12N15/12; C12N15/13

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)

C12P21/08; C07K16/00; C12N15/12; C12N15/13

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

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

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

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-500013 A (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 07 January 1997 (1997-01-07) pp. 5, 8, 18, 20, 28-29	1-9
Y	WO 2021/095876 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 20 May 2021 (2021-05-20) paragraphs [0002], [0088], [0093]-[0096], [0114], [0159], [0323]	1-9
A	WO 2019/235635 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 12 December 2019 (2019-12-12) entire text, all drawings	1-9
A	WO 2020/246581 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 10 December 2020 (2020-12-10) entire text, all drawings	1-9
A	JP 2019-528312 A (NOVARTIS AG) 10 October 2019 (2019-10-10) entire text, all drawings	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 December 2024	**17 December 2024**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/034593

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 9-500013 A	07 January 1997	US 2002/0077305 A1 paragraphs [0001], [0008], [0018], [0084], [0132], [0137]-[0140]	
WO 2021/095876 A1	20 May 2021	US 2022/0273817 A1 paragraphs [0003], [0297]-[0298], [0306]-[0312], [0345]-[0347], [0500]-[0506], [1090]-[1092] CN 114728016 A KR 10-2022-0082885 A	
WO 2019/235635 A1	12 December 2019	US 2021/0085604 A1 entire text, all drawings CN 112262122 A KR 10-2021-0015948 A	
WO 2020/246581 A1	10 December 2020	US 2022/0096381 A1 entire text, all drawings CN 113924128 A KR 10-2022-0007121 A	
JP 2019-528312 A	10 October 2019	US 2021/0283262 A1 entire text, all drawings CN 109562153 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/034593

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 21/08(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i
FI: C12P21/08; C07K16/00; C12N15/12; C12N15/13

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P21/08; C07K16/00; C12N15/12; C12N15/13

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 9-500013 A (ライフ・テクノロジーズ・インコーポレイテッド) 07.01.1997 (1997-01-07) pp.5,8,18,20,28-29	1-9
Y	WO 2021/095876 A1 (富士フイルム株式会社) 20.05.2021 (2021-05-20) [0002],[0088],[0093]-[0096],[0114],[0159],[0323]	1-9
A	WO 2019/235635 A1 (富士フイルム株式会社) 12.12.2019 (2019-12-12) 全文全図	1-9
A	WO 2020/246581 A1 (富士フイルム株式会社) 10.12.2020 (2020-12-10) 全文全図	1-9
A	JP 2019-528312 A (ノバルティス アーゲー) 10.10.2019 (2019-10-10) 全文全図	1-9

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
03.12.2024	17.12.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

鉢呂　健 4N 1213

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/034593

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 9-500013 A	07.01.1997	US 2002/0077305 A1 [0001],[0008],[0018], [0084],[0132],[0137]- [0140]	
WO 2021/095876 A1	20.05.2021	US 2022/0273817 A1 [0003],[0297]-[0298], [0306]-[0312],[0345]- [0347],[0500]-[0506], [1090]-[1092] CN 114728016 A KR 10-2022-0082885 A	
WO 2019/235635 A1	12.12.2019	US 2021/0085604 A1 全文全図 CN 112262122 A KR 10-2021-0015948 A	
WO 2020/246581 A1	10.12.2020	US 2022/0096381 A1 全文全図 CN 113924128 A KR 10-2022-0007121 A	
JP 2019-528312 A	10.10.2019	US 2021/0283262 A1 全文全図 CN 109562153 A	