

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-517275

(P2023-517275A)

(43)公表日 令和5年4月25日(2023.4.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全47頁) 最終頁に続く		

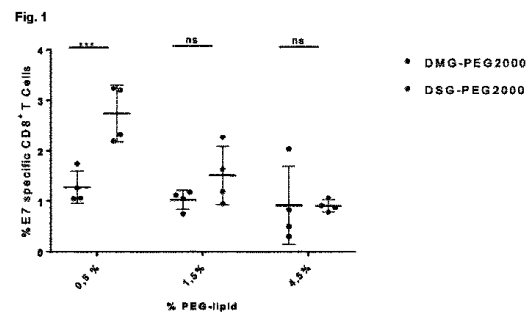
(21)出願番号	特願2022-544069(P2022-544069)	(71)出願人	520265930
(86)(22)出願日	令和3年1月21日(2021.1.21)		イーザールエヌーエー イムノセラピ
(85)翻訳文提出日	令和4年9月12日(2022.9.12)		ーズ エンヴェー
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/051290		ベルギー, 2 8 4 5 ニール, ガリレイ
(87)国際公開番号	WO2021/148511		ラン 1 9
(87)国際公開日	令和3年7月29日(2021.7.29)	(71)出願人	596099561
(31)優先権主張番号	20152938.5		プレイエ・ユニバージテイト・ブリュッセル
(32)優先日	令和2年1月21日(2020.1.21)		VRIJE UNIVERSITEIT
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		BRUSSEL
(31)優先権主張番号	20152995.5		ベルギー王国、1 0 5 0 ブリュッセル
(32)優先日	令和2年1月21日(2020.1.21)		、ブレインラン、2
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100088904
(31)優先権主張番号	20179434.4		弁理士 庄司 隆
	最終頁に続く	(74)代理人	100124453
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質ナノ粒子

(57)【要約】

本発明は、脂質ナノ粒子（LNP）、より具体的にはイオン性脂質と、リン脂質と、ステロールと、PEG脂質と、1つ以上の核酸とを含む脂質ナノ粒子（LNP）の分野に関する。本発明のLNPは、約1mol%未満のC18-PEG2000脂質を含むことを特徴とする。本発明は、核酸分子、具体的にはmRNAの免疫原性送達のためのLNPの使用を提供し、それによって、LNPがワクチンでの使用、例えば癌又は感染性疾患の治療に非常に適したものとなる。最後に、そのようなLNPを調整する方法を提供する。

【選択図】 図1



10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上の脂質ナノ粒子を含むmRNAワクチンであって、脂質ナノ粒子が、
 約45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
 約4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
 ステロールと、
 PEG脂質と、
 1つ以上のmRNA分子と、
 を含み、
 前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の
 前記PEG脂質を含むことを特徴とする、mRNAワクチン。 10

【請求項 2】

mRNAワクチン接種に使用される脂質ナノ粒子（LNP）であって、前記LNPが、
 約45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
 約4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
 ステロールと、
 PEG脂質と、
 1つ以上のmRNA分子と、
 を含み、
 前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の
 前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子。 20

【請求項 3】

脂質ナノ粒子（LNP）であって、
 約45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
 約4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
 ステロールと、
 PEG脂質と、
 1つ以上の核酸分子と、
 を含み、
 前記PEG脂質が、C18-PEG2000脂質であること、及び前記LNPが、約1 mol%未満
 の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴
 とする、脂質ナノ粒子。 30

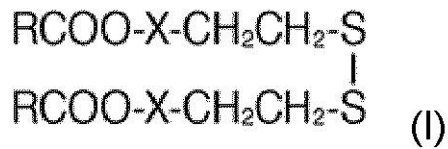
【請求項 4】

前記C18-PEG2000脂質が、（ジステアロイル系）-PEG2000脂質、例えばDSG-PE
 G2000脂質若しくはDSPE-PEG2000脂質、又は（ジオレオイル系）-PEG2000脂質、
 例えばDOG-PEG2000脂質若しくはDOPE-PEG2000脂質を含むリストから選択される
 、請求項3に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 5】

前記イオン性脂質が、
 1,1'-((2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシド
 デシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オー
 ル))(C12-200)、
 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、
 式（I）の化合物： 40

【化 1】



(式中、
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、Xは、

10

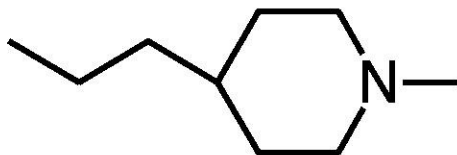
【化 2】



を含むリストから選択される) を含むリストから選択され、
好ましくは、前記イオン性脂質が、式 (I) の脂質 (式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

20

【化 3】



30

である) である、請求項3又は4に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 6】

前記リン脂質が、DOPE、DOPC及びそれらの混合物を含むリストから選択される、請求項3～5のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 7】

前記ステロールが、コレステロール、エルゴステロール、カンペステロール、オキシステロール、アントロステロール、デスモステロール、ニカステロール、シトステロール及びスチグマステロールを含むリストから選択され、好ましくはコレステロールである、請求項3～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

40

【請求項 8】

脂質ナノ粒子であって、
60 mol%を超える前記イオン性脂質と、
約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項 9】

脂質ナノ粒子であって、
約64 mol%の前記イオン性脂質と、

50

約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、
前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項10】

脂質ナノ粒子であって、
約64 mol%の前記イオン性脂質と、
約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

10

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項11】

前記1つ以上の核酸分子が、mRNA及びDNAを含むリストから選択され、好ましくはmRNAである、請求項3～10のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項12】

前記1つ以上のmRNA分子が、免疫調節ポリペプチドをコードするmRNA及び／又は抗原をコードするmRNAの群から選択される、請求項3～11のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項13】

前記免疫調節ポリペプチドをコードするmRNAが、CD40L、CD70及びcaTLR4をコードするmRNA分子を含むリストから選択される、請求項12に記載の脂質ナノ粒子。

20

【請求項14】

請求項3～13のいずれか一項に記載の1つ以上の脂質ナノ粒子と、許容される薬学的担体とを含む、薬学的組成物又はワクチン。

【請求項15】

人間医学又は獣医学において使用される、例えば、癌又は感染性疾患の治療に使用される、請求項3～13のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子、又は請求項14に記載の薬学的組成物若しくはワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、脂質ナノ粒子（LNP）、より具体的にはイオン性脂質と、リン脂質と、ステロールと、PEG脂質と、1つ以上の核酸とを含む脂質ナノ粒子（LNP）の分野に関する。本発明のLNPは、約1mol%未満のPEG脂質（例えばジC18-PEG2000脂質）を含むことを特徴とする。本発明は、核酸分子、具体的にはmRNAの免疫原性送達のためのLNPの使用を提供し、それによって、LNPがワクチンでの使用、例えば癌又は感染性疾患の治療に非常に適したものとなる。最後に、そのようなLNPを調整する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

生物活性物質の標的化送達の分野における大きな課題の1つは、多くの場合、それらの不安定性及び低い細胞透過能である。これは、具体的には核酸分子、特に（m）RNA分子の送達の場合である。したがって、適したパッケージングが適切な保護及び送達のために極めて重要である。したがって、核酸等の生物活性物質のパッケージングのための方法及び組成物が引き続き必要とされている。

40

【0003】

その点において、リポプレックス及びリポソーム等の脂質ベースのナノ粒子組成物が、細胞及び／又は細胞内区画への輸送を可能にする生物活性物質のパッケージングビヒクルとして使用されている。これらの脂質ベースのナノ粒子組成物は、典型的には、カチオン性脂質、イオン性脂質、リン脂質、構造脂質（ステロール又はコレステロール等）、PEG（ポリエチレングリコール）脂質等の種々の脂質の混合物を含む（非特許文献1に概説

50

される)。

【0004】

カチオン性又はイオン性脂質、リン脂質、ステロール及びPEG化脂質の4つの脂質の混合物から構成される脂質ベースのナノ粒子が、全身投与後の肝臓へのsiRNA及びmRNAの非免疫原性送達のために開発されている。そのような脂質組成物の多くは当該技術分野において既知であるが、*in vivo*でのmRNA送達に使用されるものは、典型的には少なくとも1.5 mol%のPEG脂質のレベルを含み、非常に多くの場合、ジC14ベースのPEG脂質(DMG-PEG脂質)を含有する。

【0005】

しかしながら、現在、驚くべきことに、LNP中に少量(すなわち、約1 mol%未満)で存在するPEG脂質が、LNPの全身注射によるmRNAの免疫原性送達に非常に適したナノ粒子をもたらすことを見出した。さらに、これらの効果は、ジC18-PEG脂質等の長鎖PEG脂質について更により顕著である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Reichmuth et al., 2016

【発明の概要】

【0007】

第1の態様において、本発明は、1つ以上の脂質ナノ粒子を含むmRNAワクチンであって、脂質ナノ粒子が、
イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、
前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%~0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、mRNAワクチンを提供する。

【0008】

更なる態様において、本発明は、mRNAワクチン接種に使用される脂質ナノ粒子(LNP)であって、前記LNPが、
イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、
前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%~0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0009】

また更なる態様において、本発明は、脂質ナノ粒子(LNP)であって、
イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上の核酸分子と、
を含み、
前記PEG脂質が、ジC18-PEG2000脂質であること、及び前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0010】

本発明の特定の実施の形態において、前記ジC18-PEG2000脂質は、（ジステアロイル系）-PEG2000脂質、例えばDSG-PEG2000脂質若しくはDSPE-PEG2000脂質、又は（ジオレオイル系）-PEG2000脂質、例えばDOG-PEG2000脂質若しくはDOPE-PEG2000脂質を含むリストから選択される。

【0011】

本発明の更に特定の実施の形態において、前記LNPは、約0.5 mol%の前記PEG脂質を含む。

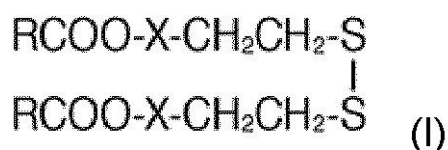
【0012】

本発明の別の特定の実施の形態において、前記イオン性脂質は、

1,1'-((2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、

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、式(I)の化合物：

【化1】



(式中、

RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、Xは、

【化2】

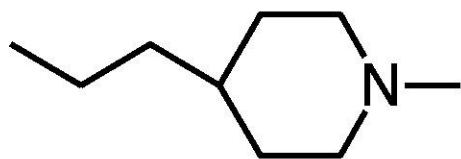


を含むリストから選択される)を含むリストから選択される。

【0013】

好ましい実施の形態において、前記イオン性脂質は、式(I)の脂質(式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

【化3】



である)である。

【0014】

本発明のまた更なる実施の形態において、前記リン脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グ

リセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) 及びそれらの混合物を含むリストから選択される。

【0015】

本発明のまた更なる実施の形態において、前記ステロールは、コレステロール、エルゴステロール、カンペステロール、オキシステロール、アントロステロール、デスモステロール、ニカステロール (nicasterol)、シトステロール及びスチグマステロールを含むリストから選択され、好ましくはコレステロールである。

【0016】

更に特定の実施の形態において、前記LNPは、30 mol%～70 mol%の前記イオン性脂質を含み、好ましくは45 mol%～65 mol%である。

10

【0017】

本発明のまた更なる実施の形態において、前記LNPは、約45 mol%又はそれ未満の前記ステロールを含む。

【0018】

更なる実施の形態において、前記LNPは、5 mol%～25 mol%のリン脂質を含み、好ましくは4 mol%～15 mol%である。

【0019】

本発明の特定の実施の形態において、前記LNPは、
約45 mol%～65 mol%の前記イオン性脂質と、
約4 mol%～15 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、
前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

20

【0020】

本発明の非常に具体的な実施の形態において、前記LNPは、
約64 mol%の前記イオン性脂質と、
約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、
前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

30

【0021】

本発明の別の非常に具体的な実施の形態において、前記LNPは、
約64 mol%の前記イオン性脂質と、
約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、
前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

【0022】

本発明の別の非常に具体的な実施の形態において、前記LNPは、
約50 mol%の前記イオン性脂質と、
約6 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、
前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

40

【0023】

本発明の別の非常に具体的な実施の形態において、前記LNPは、
約50 mol%の前記イオン性脂質と、
約8 mol%の前記リン脂質と、
約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

50

前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

【0024】

本発明の別の非常に具体的な実施の形態において、前記LNPは、

約60 mol%の前記イオン性脂質と、

約12 mol%の前記リン脂質と、

約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、

を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

【0025】

本発明の別の実施の形態において、前記1つ以上の核酸分子は、mRNA及びDNAを含むリストから選択され、好ましくはmRNAである。

10

【0026】

より具体的な実施の形態において、前記1つ以上のmRNA分子は、免疫調節ポリペプチドをコードするmRNA及び／又は抗原をコードするmRNAを含むリストから選択される。前記免疫調節ポリペプチドをコードするmRNAは、例えば、CD40L、CD70及びcaTLR4をコードするmRNA分子を含むリストから選択され得る。

【0027】

また更なる態様において、本発明は、本明細書に記載の1つ以上の脂質ナノ粒子と、許容される薬学的担体とを含む、薬学的組成物又はワクチンを提供する。

【0028】

本発明はまた、人間医学又は獣医学において使用される、特に癌又は感染性疾患の治療で使用される本明細書に記載の脂質ナノ粒子、薬学的組成物、又はワクチンを提供する。

20

【0029】

これより図面を具体的に参照するが、示される詳細は、例として、本発明の種々の実施形態の例示的な説明のみを目的とするものであることが強調される。これらの図面は、本発明の原理及び概念的態様の最も有用で容易な説明であると考えられるものを提供するために提示される。この点に関して、本発明の基礎的理解に必要とされるものよりも詳細に本発明の構造的詳細を示す試みはなされていない。この説明は、図面とともに本発明のいくつかの形態を実際に具体化し得る方法を当業者に明らかとするものである。

【図面の簡単な説明】

30

【0030】

【図1】LNP組成において異なる割合のDMG-PEG2000及びDSG-PEG2000で配合したmRNA LNPによる最初の静脈内免疫化後に測定したE7特異的CD8 T細胞応答の大きさを示す図である。Tukeyの多重比較検定を用いた双方向ANOVA。ns、有意差なし；*
** $p < 0.001$ 。

【図2】一定の割合のDMG-PEG2000、DPG-PEG2000又はDSG-PEG2000 LNPで配合したmRNA LNPによる2回目の静脈内免疫化後に測定したE7特異的CD8 T細胞応答の大きさを示す図である。

【図3】mRNA LNP又は合成長鎖ペプチドによる4回目の静脈内免疫化後に測定したE7特異的CD8 T細胞応答の大きさを示す図である。Tukeyの多重比較検定を用いた一方向ANOVA。ns、** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ 。

40

【図4】最大のT細胞応答のためのLNP組成のDOE主導の最適化を示す図である。A、DOEライブラリーのE7 mRNA LNPによる3回の免疫化（週間隔）後の血液中のE7特異的T細胞。B、DSG-PEG2000（%）の関数におけるE7特異的CD8 T細胞応答を示すグラフ。3回目の免疫化後のPEG-脂質（%）とE7特異的CD8 T細胞応答の大きさとの間に非常に有意な負の相関関係が観察された。C、予測された最適（LNP36）及び非最適DSG-PEG2000 LNP（LNP37）による3回の免疫化（週間隔）後の血液中のE7特異的T細胞。平均±SDが示されている。統計はSidakの多重比較検定を用いた一方向ANOVAにより評価した。*** $p < 0.001$

【図5】最適化されたmRNA LNPワクチンは、定性的なT細胞応答及び強い抗腫瘍効果

50

を誘導することを示す図である。A, 血液中のE7特異的CD8⁺T細胞の動態。B, 反復免疫化により増加する血清中のIFN- γ 。C, 3回の免疫化後の脾臓における脾臓CD8⁺E7特異的T細胞によるIFN- γ 及びTNF- α の産生。

【図5-1】D, LNP36免疫化マウスにおける平均TC-1腫瘍増殖。E, LNP36免疫化マウスの生存。F, LNP36による2回の免疫化後のTC-1腫瘍浸潤リンパ球(TIL)。G, TILのE7特異性。A, F, G 平均 $\pm$ SDが示されている。B, 箱ひげ図。D, 平均 $\pm$ SEMが示されている。F, G, 統計はTukeyの多重比較検定を用いた一方向ANOVAにより評価した。E, 統計はMantel-Coxログランク検定により評価した。**, $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns=有意差なし

【図6】LNPは種々の(自然)免疫細胞に取り込まれ、それらを活性化することを示す図である。A. 総ルシフェラーゼ活性に対する腎臓、肺、心臓、肝臓及び脾臓におけるルシフェラーゼ活性の%。B. TBSバッファ注射マウスと比較したLNP注射マウスにおけるCy5 MFIの差によって測定した複数の細胞型におけるLNPの取り込み。C. 総ルシフェラーゼ活性に対する腎臓、肺、心臓、肝臓及び脾臓におけるルシフェラーゼ活性の%。最適LNP36は、非最適LNP37と比較して、脾臓におけるルシフェラーゼ活性の増加を示した。

10

【図6-1】D. 最適LNP36の細胞取り込みは、非最適LNP37と比較して高い。

【図6-2】E. 脾臓に蓄積されたかなりの量のE7 mRNA。F. 血清中のIFN- α 、及びIP-10サイトカインの一過性の増加が観察された(LNP投与の6時間後と24時間後とを比較した)。G. cDC1及びcDC2でのCD86発現は、非最適LNP37によってわずかに上方制御され、最適LNP36によって強く上方制御される。A, B; C, D, E, F. 平均 $\pm$ SDが示されている。

20

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書の上に既に詳述の通り、本発明は、1つ以上の脂質ナノ粒子を含むmRNAワクチンであって、脂質ナノ粒子が、

イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、

30

1つ以上のmRNA分子と、

を含み、

前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%~0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、mRNAワクチンを提供する。

【0032】

特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の脂質ナノ粒子を含むmRNAワクチンであって、脂質ナノ粒子が、

約45 mol%~65 mol%のイオン性脂質と、
約4 mol%~15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、

40

1つ以上のmRNA分子と、

を含み、

前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%~0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、mRNAワクチンを提供する。

【0033】

本発明はまた、mRNAワクチン接種に使用される脂質ナノ粒子(LNP)であって、
イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、

50

PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、
前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0034】

特定の実施形態において、本発明は、mRNAワクチン接種に使用される脂質ナノ粒子（LNP）であって、前記LNPが、
約45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
約4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、
前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0035】

したがって、本発明は、比較的少量（例えば、約1 mol%未満、特に約0.5 mol%～0.9 mol%）で存在するPEG脂質を含むLNPを提供し、これについて、驚くべきことに、これらが核酸、特にmRNAの免疫原性送達に非常に適していることが見出された。特に、この効果は、C18-PEG脂質、更により具体的にはC18-PEG2000脂質等の長鎖のPEG脂質を含むLNPについてより顕著であることが判明した。「核酸分子の免疫原性送達」は、細胞への核酸分子の送達を意味し、それによって、前記核酸分子の細胞との接触、細胞内での内在化及び／又は発現が免疫応答の誘導をもたらす。

【0036】

したがって、更なる態様において、本発明は、脂質ナノ粒子（LNP）であって、
イオン性脂質と、
リン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上の核酸分子、特にmRNA分子と、
を含み、
前記PEG脂質が、C18-PEG2000脂質であること、及び前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0037】

特定の実施形態において、本発明は、脂質ナノ粒子（LNP）であって、
約45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
約4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上の核酸分子と、
を含み、
前記PEG脂質が、C18-PEG2000脂質であること、及び前記LNPが、約1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子を提供する。

【0038】

脂質ナノ粒子（LNP）は、異なる脂質の組み合わせから構成されるナノサイズ粒子として一般に知られている。多くの異なるタイプの脂質がそのようなLNPに含まれ得るが、本発明のLNPは、典型的には、イオン性脂質、リン脂質、ステロール及びPEG脂質の組み合わせから構成される。

【0039】

本出願の文脈において、本明細書に開示される脂質ナノ粒子に関して特定の実施形態が提供されている場合は常に、そのような実施形態において提供される制限は、特許請求されるmRNAワクチンの一部としての、又はmRNAワクチン接種での使用が意図される脂質ナノ粒子に等しく適用される。

【0040】

本明細書で使用される場合、「ナノ粒子」という用語は、粒子を特に核酸の全身投与、特に静脈内投与に適したものにする直径を有し、典型的には、1000ナノメートル（nm）未満、好ましくは500 nm未満、更により好ましくは200 nm未満、例えば、50 nm～200 nm等の直径を有する任意の粒子を指し、好ましくは80 nm～160 nmである。

10

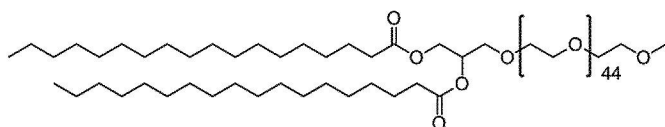
【0041】

本発明の文脈において、「PEG脂質」又は代替的には「PEG化脂質」という用語は、PEG（ポリエチレングリコール）基で修飾された任意の好適な脂質であることを意味する。本発明の文脈において特に好適なPEG脂質は、ジC18-PEG脂質であることを特徴とする。本発明の文脈において、C18-PEG脂質という用語が使用される場合、これは、ジC18-PEG脂質、すなわち、2つのC18脂質尾部を有する脂質であることを意味する。しかしながら、より短鎖のPEG脂質、例えばジC14-PEG脂質（例えば、DMG-PEG、より具体的にはDMG-PEG2000、又はDMPE-PEG、より具体的にはDMPE-PEG2000）又はジC16-PEG脂質も好適に使用することができる。ジC18-PEG脂質は、脂質の分子量を規定するポリエチレングリコール部分と、18個のC原子を有する脂肪酸尾部とを含有する。特定の実施形態において、前記ジC18-PEG2000脂質は、（ジステアロイル系）-PEG2000脂質、例えばDSG-PEG2000脂質（2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000）若しくはDSPE-PEG2000脂質（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]）、又は（ジオレオイル系）-PEG2000脂質、例えばDOG-PEG2000脂質（1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール）若しくはDOPE-PEG2000脂質（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ（ポリエチレングリコール）-2000]）を含むリストから選択される。

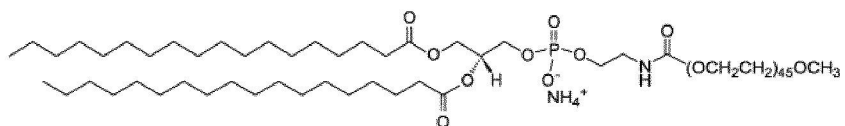
20

【化4】

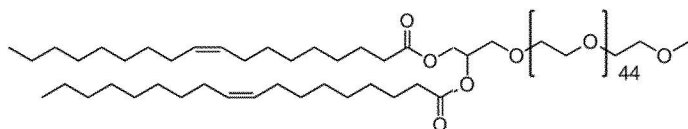
30



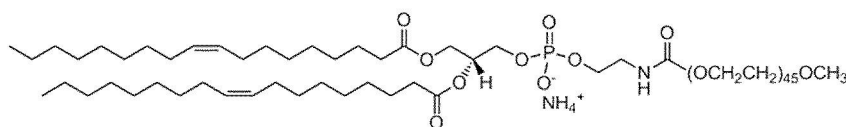
DSG-PEG2000



DSPE-PEG2000



DOG-PEG2000



DOPE-PEG2000

40

50

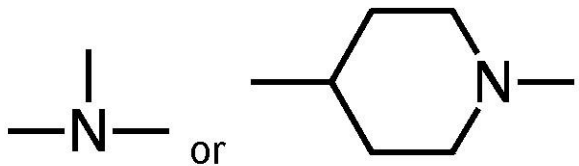
【0042】

本発明の文脈において、化合物又は脂質との関連における「イオン性」（又は代替的にはカチオン性）という用語は、イオン（通常は H^+ イオン）を得て、それ自体が正電荷を有するようになることで解離することが可能な前記化合物又は脂質中の任意の非荷電基の存在を意味する。代替的には、前記化合物又は脂質中の任意の非荷電基は、電子を得て、負電荷を有するようになってよい。

【0043】

本発明の文脈において、任意のタイプのイオン性脂質を好適に使用することができる。具体的には、好適なイオン性脂質は、S-S結合を介して連結した2つの同一の又は異なる尾部を含み、前記尾部のそれぞれが、

【化5】

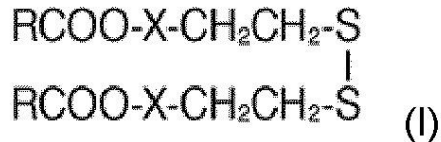


で表されるようなイオン性アミンを含むイオン性アミノ脂質である。

【0044】

特定の実施形態において、前記イオン性脂質は、式（I）：

【化6】



の化合物であり、

式中、

RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、

Xは、

【化7】



を含むリストから選択される。

【0045】

そのようなイオン性脂質は、具体的には、以下の式：

10

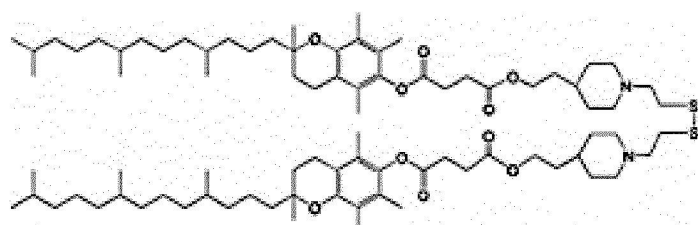
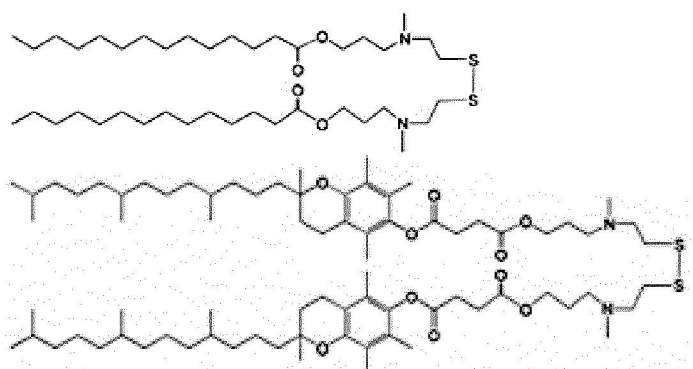
20

30

40

50

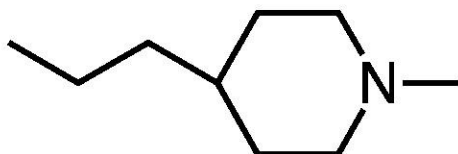
10



20

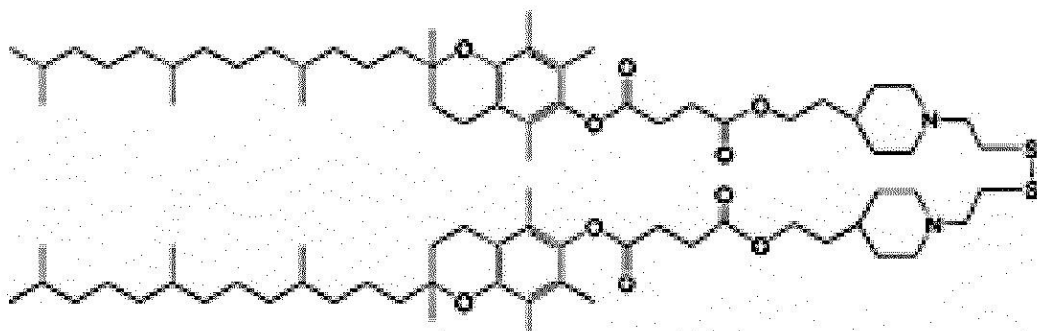
【 0 0 4 6 】

【化 9】



30

【化 1 0】



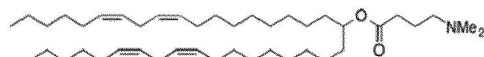
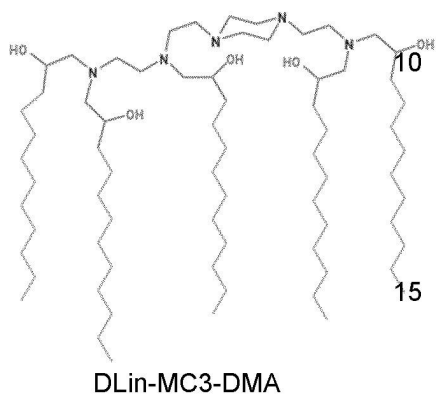
40

【 0 0 4 7 】

50

他の好適なイオン性脂質は、1,1'-((2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール) (C12-200)、及び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) から選択されてもよい。

【化 1 1】



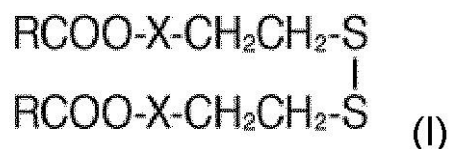
10

【0048】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、
式 (I) のイオン性脂質：

20

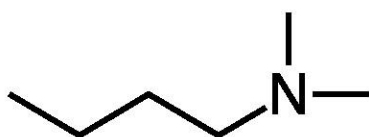
【化 1 2】



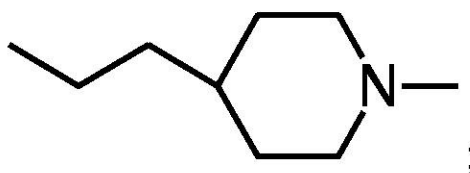
30

(式中、
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、
Xは、

【化 1 3】



and

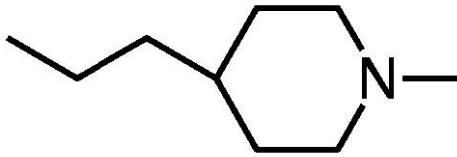


40

を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

50

【化 1 4】



である式 (I) の脂質と、
 リン脂質と、
 ステロールと、
 約 1 mol% 未満で存在するジ C18-PEG2000 脂質と、
 1 つ以上の核酸分子と、
 を含む脂質ナノ粒子を提供する。

10

【0049】

本発明の文脈において、「リン脂質」という用語は、2 つの疎水性脂肪酸「尾部」と、リン酸基からなる親水性「頭部」とからなる脂質分子であることを意味する。これら 2 つの成分は、ほとんどの場合、グリセロール分子によって結合されるため、本発明のリン脂質においては、好ましくはグリセロール-リン脂質である。さらに、リン酸基は、多くの場合、単純な有機分子で修飾され、例えばコリン（すなわち、ホスホコリンにする）又はエタノールアミン（すなわち、ホスホエタノールアミンにする）で修飾される。

20

【0050】

本発明の文脈内で好適なリン脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DMPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1,2-ジ-O-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (18:0 Diether PC)、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (O ChemsPC)、1-ヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (C 16 Lyso PC)、1,2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (ME 16.0 PE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)ナトリウム塩 (DOPG)、スフィンゴミエリン、及びそれらの混合物を含むリストから選択することができる。

30

40

【0051】

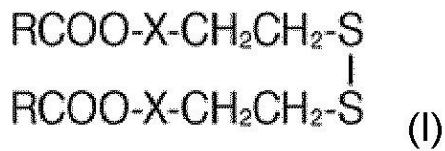
より具体的な実施形態において、前記リン脂質は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) 及びそれらの混合物を含むリストから選択される。

【0052】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、
 式 (I) のイオン性脂質：

50

【化 1 5】

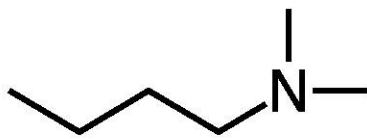


(式中、

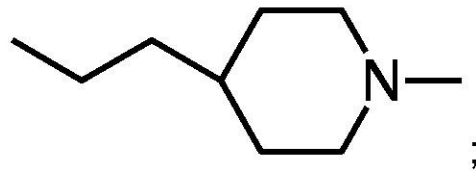
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、

Xは、

【化 1 6】



and

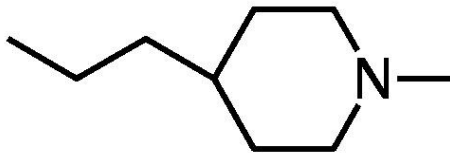


10

20

を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

【化 1 7】



30

である式 (I) の脂質と、

DOPC及びDOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、

ステロールと、

約1 mol%未満で存在するジC18-PEG2000脂質と、

1つ以上の核酸分子と、

を含む脂質ナノ粒子を提供する。

【0053】

本発明の文脈において、ステロイドアルコールとしても既知の「ステロール」という用語は、植物、動物及び真菌において天然に存在するか、又はいくつかの細菌によって産生され得るステロイドの亜群である。本発明の文脈において、任意の好適なステロール、例えばコレステロール、エルゴステロール、カンベステロール、オキシステロール、アントロステロール、デスモステロール、ニカステロール、シトステロール及びスチグマステロールを含むリストから選択されるステロールを使用することができ、好ましくはコレステロールである。

40

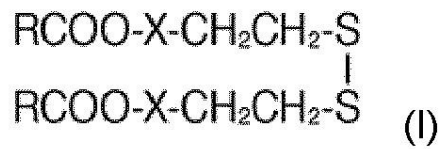
【0054】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、

式 (I) のイオン性脂質：

50

【化 1 8】



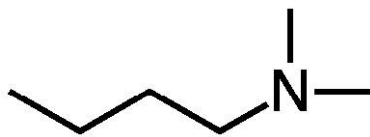
(式中、

RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、

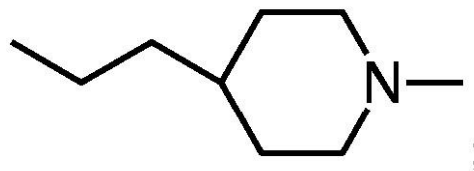
10

Xは、

【化 1 9】



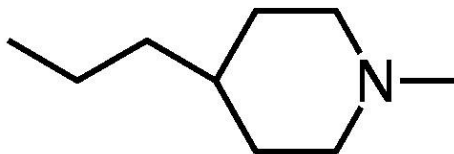
and



20

を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

【化 2 0】



30

である式 (I) の脂質と、

DOPC及びDOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、

コレステロールと、

約1 mol%未満で存在するジC18-PEG2000脂質と、

1つ以上の核酸分子と、

を含む脂質ナノ粒子を提供する。

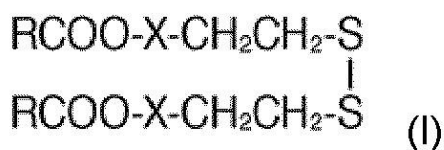
【0055】

本発明の非常に具体的な実施形態において、前記脂質ナノ粒子は、

式 (I) のイオン性脂質：

40

【化 2 1】

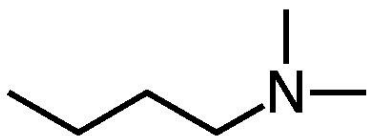


(式中、

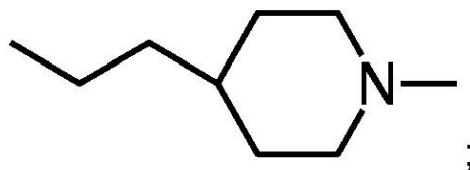
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオ

50

イルを含むリストから選択され、
Xは、
【化 2 2】

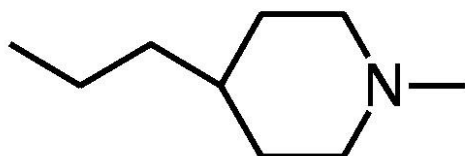


and



10

を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、
【化 2 3】



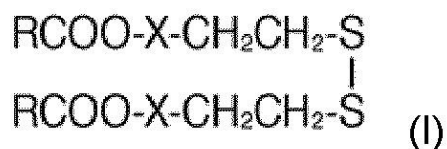
20

である式 (I) の脂質と、
DOPC及びDOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、
コレステロールと、
約1 mol%未満で存在するジDSG-PEG2000脂質と、
1つ以上の核酸分子と、
を含む。

【0056】

本発明の別の非常に具体的な実施形態において、前記脂質ナノ粒子は、
式 (I) のイオン性脂質：

【化 2 4】



40

(式中、
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、
Xは、

50

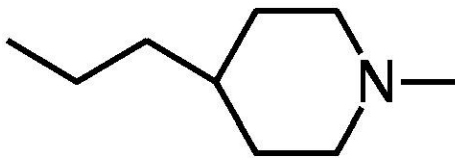
【化 2 5】



を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

10

【化 2 6】



20

である式 (I) の脂質と、

DOPC及びDOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、

コレステロールと、

約1 mol%未満で存在するDSPE-PEG2000脂質と、

1つ以上の核酸分子と、

を含む。

【0057】

本発明の特定の実施形態において、前記LNPは、約8:1、代替的には約6:1、約4:1又は約2:1のイオン性脂質対リン脂質の比を含む。

【0058】

更に特定の実施形態において、前記LNPは、約30 mol%~70 mol%の前記イオン性脂質を含み、好ましくは約45 mol%~65 mol%、例えば約65 mol%、約45 mol%又はそれ以上、約50 mol%又はそれ以上、約55 mol%又はそれ以上、約60 mol%又はそれ以上である。

30

【0059】

更なる実施形態において、前記LNPは、4 mol%~25 mol%のリン脂質を含み、好ましくは4 mol%~15 mol%、例えば、約4 mol%、約5 mol%、約6 mol%、約7 mol%、約8 mol%、約9 mol%、約10 mol%、約11 mol%、約12 mol%、約13 mol%、約14 mol%、又は約15 mol%等であり、好ましくは約6 mol%~9 mol%である。

【0060】

40

したがって、本発明の特定の実施形態において、以下：

前記LNPは、約45 mol%~65 mol%の前記イオン性脂質を含む；

前記LNPは、約4 mol%~15 mol%の前記リン脂質を含む；

前記LNPは、約0.5 mol%~0.9 mol%の前記PEG脂質を含む；

のうちの1つ以上が適用され、

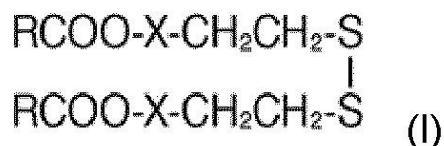
前記ステロールの量によってバランスが保たれる。

【0061】

したがって、本発明の非常に具体的な実施形態において、前記LNPは、約45 mol%~65 mol%の式 (I) のイオン性脂質：

50

【化 2 7】



(式中、

RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、

10

Xは、

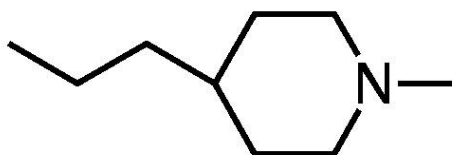
【化 2 8】



20

を含むリストから選択される)、特に、式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

【化 2 9】



30

である式 (I) の脂質と、

約 4 mol% ~ 15 mol% の DOPC 及び DOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、

バランスを保つためのコレステロールと、

約 0.5 mol% ~ 0.9 mol% の DSG-PEG2000 脂質又は DSPE-PEG2000 脂質と、

1つ以上の核酸分子と、

を含む。

【0062】

本発明の文脈において、mol% が使用される場合、それは、空のナノ粒子、すなわち、核酸を含まないナノ粒子に対する特定の成分の mol% であることを意味する。これは、成分の mol% が、前記 LNP 中に存在するイオン性脂質、リン脂質、ステロール及び PEG 脂質の総量に対して計算されることを意味する。

40

【0063】

また更なる特定の実施形態において、本発明は、

60 mol% を超える前記イオン性脂質と、

約 8 mol% の前記リン脂質と、

約 0.5 mol% ~ 0.9 mol% の前記 PEG 脂質と、

を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた脂質ナノ粒子を提供する。

【0064】

50

より詳細には、本発明は、
 約64 mol%の前記イオン性脂質と、
 約8 mol%の前記リン脂質と、
 約0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
 を含み、
 前記ステロールの量によってバランスが保たれた脂質ナノ粒子を提供する。

【0065】

より詳細には、本発明は、
 約64 mol%の前記イオン性脂質と、
 約8 mol%の前記リン脂質と、
 約0.5 mol%の前記PEG脂質と、
 を含み、
 前記ステロールの量によってバランスが保たれた脂質ナノ粒子を提供する。

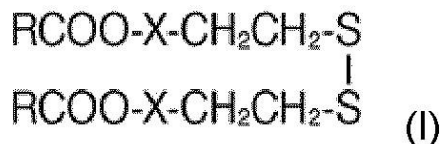
【0066】

本発明の非常に具体的な実施形態において、前記LNPは、
 約64.4 mol%の前記イオン性脂質と、
 約8 mol%の前記リン脂質と、
 約27.1 mol%の前記ステロールと、
 約0.5 mol%の前記PEG脂質と、
 を含む。

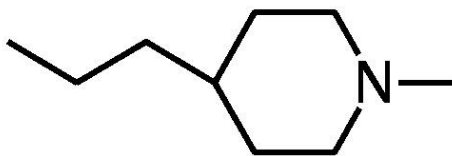
【0067】

したがって、本発明の非常に具体的な実施形態において、前記LNPは、
 約64.4 mol%の式(I)のイオン性脂質：

【化30】



(式中、
 RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、
 【化31】



である)と、
 約8 mol%のDOPC及びDOPE、又はそれらの混合物から選択されるリン脂質と、
 約27.1 mol%の前記コレステロールと、
 約0.5 mol%のDSG-PEG2000脂質又はDSPE-PEG2000脂質と、
 1つ以上の核酸分子と、
 を含む。

【0068】

本発明の文脈における他の特に好適なLNPの組成を表1に示す。

【0069】

表1：好適なLNPの組成

10

20

30

40

50

【表 1】

番号	イオン性脂質 (mol%)	リン脂質 (mol%)	コレステロール (mol%)	C18-PEG2000 脂質 (mol%)
1	50	6	43,5	0.5
2	50	9	40,5	0.5
3	50	12	37,5	0.5
4	50	15	34,5	0.5
5	50	18	31,5	0.5
6	50	21	28,5	0.5
7	50	6	43,3	0.7
8	50	9	40,3	0.7
9	50	12	37,3	0.7
10	50	15	34,3	0.7
11	50	18	31,3	0.7
12	50	21	28,3	0.7
13	50	6	43,1	0.9
14	50	9	40,1	0.9
15	50	12	37,1	0.9
16	50	15	34,1	0.9
17	50	18	31,1	0.9
18	50	21	28,1	0.9
19	55	6	38,5	0.5
20	55	9	35,5	0.5
21	55	12	32,5	0.5
22	55	15	29,5	0.5
23	55	18	26,5	0.5
24	55	21	23,5	0.5
25	55	6	38,3	0.7
26	55	9	35,3	0.7
27	55	12	32,3	0.7
28	55	15	29,3	0.7
29	55	18	26,3	0.7
30	55	21	23,3	0.7
31	55	6	38,1	0.9
32	55	9	35,1	0.9
33	55	12	32,1	0.9
34	55	15	29,1	0.9
35	55	18	26,1	0.9
36	55	21	23,1	0.9
37	60	6	33,5	0.5
38	60	9	30,5	0.5
39	60	12	27,5	0.5
40	60	15	24,5	0.5
41	60	18	21,5	0.5
42	60	21	18,5	0.5
43	60	6	33,3	0.7
44	60	9	30,3	0.7
45	60	12	27,3	0.7
46	60	15	24,3	0.7
47	60	18	21,3	0.7
48	60	21	18,3	0.7
49	60	6	33,1	0.9
50	60	9	30,1	0.9
51	60	12	27,1	0.9
52	60	15	24,1	0.9
53	60	18	21,1	0.9
54	60	21	18,1	0.9
55	65	6	28,5	0.5
56	65	9	25,5	0.5
57	65	12	22,5	0.5
58	65	15	19,5	0.5
59	65	6	28,3	0.7
60	65	9	25,3	0.7
61	65	12	22,3	0.7
62	65	15	19,3	0.7
63	65	6	28,1	0.9
64	65	9	25,1	0.9
65	65	12	22,1	0.9
66	65	15	19,1	0.9

10

20

30

40

【0 0 7 0】

他の特に好適なLNPは、

6 4 . 4 / 8 / 2 7 . 1 / 0 . 5

5 8 / 1 4 . 5 / 2 7 / 0 . 5

4 8 / 2 5 . 5 / 2 7 / 0 . 5

5 3 / 1 7 . 6 7 / 2 8 . 5 8 / 0 . 7 5

のイオン性脂質／リン脂質／ステロール／C18-PEG2000脂質比を特徴とする。

【0 0 7 1】

本発明者らは、本発明のLNPが、核酸の免疫原性送達に特に好適であることを見出し

50

た。したがって、本発明は、1つ以上の核酸分子、例えばDNA又はRNA、より具体的にはmRNAを含むLNPを提供する。

【0072】

前記LNP中の核酸の量は、典型的には、N/P比、すなわち、核酸中のリン酸基に対するイオン性脂質中の窒素原子の比で表される。本発明の文脈において、LNPのN/P比は、約4:1~16:1である。

【0073】

本発明の文脈における「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）又は好ましくはリボ核酸（RNA）、より好ましくはmRNAである。核酸には、本発明によれば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換えによって作製された分子及び化学的に合成された分子が含まれる。核酸は、本発明によれば、一本鎖又は二本鎖であり、線状又は共有結合閉環状（closed covalently to form a circle）である分子の形態であり得る。核酸は、例えば、DNA鋳型からin vitro転写によって作製され得るRNAの形態で細胞への導入、すなわち、細胞のトランスフェクションに用いることができる。RNAは、更に、配列の安定化、キャッピング、及び／又はポリアデニル化によって、適用前に修飾することができる。

【0074】

本発明の文脈において、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含み、好ましくは完全に、又は実質的にリボヌクレオチド残基から構成されている分子に関する。「リボヌクレオチド」は、β-D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関する。この用語には、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離RNA、例えば部分的に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換えによって作製されたRNA、並びに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変化によって天然に存在するRNAとは異なる修飾RNAが含まれる。そのような変化としては、例えばRNAの末端（複数の場合もある）への、又は内部での、例えば、RNAの1つ以上のヌクレオチドでの非ヌクレオチド物質の付加を挙げることができる。RNA分子中のヌクレオチドは、非標準ヌクレオチド、例えば天然に存在しないヌクレオチド、又は化学的に合成されたヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドもまた含むことができる。これらの変化したRNAは、アナログと称される場合がある。核酸は、ベクターに含まれていてもよい。本明細書で使用される「ベクター」という用語には、プラスミドベクター、コスミドベクター、λファージ等のファージベクター、アデノウイルスベクター若しくはバキュロウイルスベクター等のウイルスベクター、又は細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体等の人工染色体ベクター、又は天然に存在するRNAのアナログを含む当業者に既知の任意のベクターが含まれる。

【0075】

本発明によれば、「RNA」という用語は、「mRNA」を含み、好ましくは「mRNA」に関し、「mRNA」は、「メッセンジャーRNA」を意味し、鋳型としてDNAを使用して作製することができ、ペプチド又はタンパク質をコードする「転写物」に関する。mRNAは、典型的には、5'非翻訳領域（5'-UTR）、タンパク質又はペプチドのコード領域及び3'非翻訳領域（3'-UTR）を含む。mRNAは、細胞内及びin vitroで限られた半減期を有する。好ましくは、mRNAは、DNA鋳型を使用したin vitro転写によって作製される。本発明の一実施形態において、RNAは、in vitro転写又は化学合成によって得られる。in vitro転写の方法論は、当業者に既知である。例えば、様々な市販のin vitro転写キットがある。

【0076】

本発明の特定の実施形態において、前記mRNA分子は、免疫調節タンパク質をコードするmRNA分子である。

【0077】

本発明の文脈において、「免疫調節タンパク質をコードするmRNA分子」という用語は、抗原提示細胞、より具体的には樹状細胞の機能性を変更するタンパク質をコードするmRNA分子であることを意味する。そのような分子は、CD40L、CD70、caTLR4、IL-

12p70、EL-セレクトイン、CCR7、及び／又は4-1 BBL、ICOSL、OX40L、IL-21を含むリストから選択される場合があり、より具体的にはCD40L、CD70及びcaTLR4のうちの1つ以上である場合がある。本発明の方法において使用される免疫刺激因子の好ましい組み合わせは、CD40L及びcaTLR4（すなわち、「DiMix」）である。別の好ましい実施形態において、本明細書において「TriMix」とも呼ばれるCD40L、CD70及びcaTLR4免疫刺激分子の組み合わせが使用される。

【0078】

別の特定の実施形態において、前記mRNA分子は、抗原特異的及び／又は疾患特異的タンパク質をコードするmRNA分子である。

【0079】

本発明によれば、「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす及び／又はそれに対して免疫応答が指向される少なくとも1つのエピトープを含む任意の分子、好ましくはペプチド又はタンパク質を含み、したがって、抗原という用語はまた、抗原からの最小エピトープを包含することを意味する。本明細書で定義される「最小エピトープ」は、免疫応答を引き起こすことができる最小構造であることを意味する。好ましくは、本発明の文脈における抗原は、任意にプロセッシング後に、好ましくは抗原又は抗原を発現する細胞に特異的である免疫応答を誘導する分子である。特に、「抗原」は、任意にプロセッシング後にMHC分子によって提示され、Tリンパ球（T細胞）と特異的に反応する分子に関する。

【0080】

特定の実施形態において、抗原は、腫瘍抗原、又は細菌抗原、ウイルス抗原若しくは真菌抗原であり得る標的特異的抗原である。前記標的特異的抗原は、標的細胞（複数の場合もある）から単離された全mRNA、1つ以上の特定の標的mRNA分子、標的細胞（複数の場合もある）のタンパク質溶解物、標的細胞（複数の場合もある）に由来する特定のタンパク質、又は合成標的特異的ペプチド若しくはタンパク質、及び標的特異的抗原若しくはその誘導ペプチドをコードする合成mRNA若しくはDNAのいずれか1つに由来し得る。

【0081】

あらゆる誤解を避けるために、本発明のLNPは、単一のmRNA分子を含んでいてもよく、又は複数のmRNA分子、例えば免疫調節タンパク質をコードする1つ以上のmRNA分子、及び／又は抗原特異的及び／又は疾患特異的タンパク質をコードする1つ以上のmRNA分子の組み合わせを含んでいてもよい。

【0082】

非常に具体的な実施形態において、免疫調節分子をコードする前記mRNA分子を、抗原特異的及び／又は疾患特異的タンパク質をコードする1つ以上のmRNA分子と組み合わせることができる。例えば、本発明のLNPは、抗原特異的及び／又は疾患特異的タンパク質をコードする1つ以上のmRNA分子と組み合わせられた免疫刺激分子CD40L、CD70及び／又はcaTLR4（Dimix又はTrimix等）をコードするmRNA分子を含み得る。したがって、非常に具体的な実施形態において、本発明のLNPは、抗原特異的及び／又は疾患特異的タンパク質をコードする1つ以上のmRNA分子と組み合わせられたCD40L、CD70及び／又はcaTLR4をコードするmRNA分子を含む。

【0083】

更なる態様において、本発明は、本明細書で定義される1つ以上のLNPを含む薬学的組成物を提供する。そのような薬学的組成物は、ワクチンとして特に好適である。したがって、本発明は、本発明による1つ以上のLNPを含むワクチンもまた提供する。

【0084】

本発明の文脈において、本明細書で使用される「ワクチン」という用語は、疾患に対する適応免疫（抗体及び／又はT細胞応答）をもたらすことを意図した任意の調製物であることを意味する。その目的で、本明細書において意図されるワクチンは、適応免疫応答が開始される抗原をコードする少なくとも1つのmRNA分子を含有する。この抗原は、弱毒化したか、若しくは死んだ状態の微生物、タンパク質若しくはペプチド、又は抗原をコードする核酸の形で存在し得る。本発明の文脈における抗原は、宿主の免疫系によって異物

10

20

30

40

50

として認識され、それによって、そのような抗原に対抗する目的で、それらに対する抗体の産生を刺激するタンパク質又はペプチドであることを意味する。ワクチンは、予防ワクチン（例えば、任意の天然又は「野生」病原体による将来の感染の影響を防止又は改善する）、又は治療ワクチン（例えば、進行中の疾患の症状を積極的に治療又は軽減する）であり得る。ワクチンの投与は、ワクチン接種と呼ばれる。

【0085】

本発明のワクチンは、免疫応答、特に疾患関連抗原又は疾患関連抗原を発現する細胞に対する免疫応答、例えば癌に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。したがって、ワクチンは、疾患関連抗原又は疾患関連抗原を発現する細胞、例えば癌が関与する疾患の予防処置及び／又は治療処置に使用することができる。前記免疫応答は、T細胞応答であることが好ましい。一実施形態において、疾患関連抗原は腫瘍抗原である。本明細書に記載のナノ粒子中に含まれるRNAによってコードされる抗原は、好ましくは疾患関連抗原であるか、又は疾患関連抗原若しくは疾患関連抗原を発現する細胞に対する免疫応答を引き起こす。

【0086】

本発明のLNP及びワクチンは、具体的には、静脈内投与、すなわち、静脈への液体物質の直接注入を意図している。静脈内経路は、流体及び薬剤を体全体、すなわち、全身的に送達するための最速の方法である。したがって、本発明は、静脈内ワクチン、並びに静脈内投与用の開示のワクチン及びLNPの使用を提供する。したがって、本発明のワクチン及びLNPは、静脈内投与することができる。本発明は、本発明によるワクチン及びLNPの使用もまた提供し、このワクチンは静脈内投与される。

【0087】

本発明は、人間医学又は獣医学において使用される本発明によるLNP、薬学的組成物及びワクチンもまた提供する。人間医学又は獣医学のための本発明によるLNP、薬学的組成物及びワクチンの使用もまた意図される。最後に、本発明は、本発明によるLNP、薬学的組成物及びワクチンを、それらを必要とする対象に投与することによる、ヒト及び動物の障害の予防方法及び治療方法を提供する。

【0088】

本発明は更に、前記1つ以上の核酸分子の免疫原性送達のための本発明によるLNP、薬学的組成物又はワクチンの使用を提供する。そのため、本発明のLNP、薬学的組成物及びワクチンは、いくつかのヒト及び動物の障害の治療において非常に有用である。したがって、本発明は、癌又は感染性疾患の治療に使用される本発明のLNP、薬学的組成物及びワクチンを提供する。

【0089】

本発明の脂質ナノ粒子は、実施例の部分に明記されているプロトコールに従って調製することができる。より一般的には、LNPは、

前記イオン性脂質、前記リン脂質、前記ステロール、前記PEG脂質、及び好適なアルコール溶媒を含む第1のアルコール組成物を調製することと、

前記1つ以上の核酸及び水性溶媒を含む第2の水性組成物を調製することと、

前記第1の組成物及び第2の組成物をマイクロ流体混合装置内で混合することと、を含む方法を使用して調製することができる。

【0090】

更に詳細には、脂質成分は、エタノール等のアルコール性ビヒクル中で好適な濃度で組み合わせられる。そこへ、核酸を含む水性組成物を添加し、続いてマイクロ流体混合装置に投入する。

【0091】

マイクロ流体混合の目的は、マイクロスケール装置での複数の試料（すなわち、脂質相及び核酸相）の完全及び迅速な混合を達成することである。そのような試料混合は、典型的には、異なる種の流れ間の拡散効果を高めることによって達成される。そこへ、例えば、Leeら、2011に概説されるようないくつかのマイクロ流体混合装置を使用することが

できる。本発明による特に好適なマイクロ流体混合装置は、Precision NanosystemsのNanoAssemblrである。

【0092】

本発明のLNPを調製するのに好適な他の技術には、好適な分散媒体、例えば、水性溶媒及びアルコール溶媒中に成分を分散させること、並びに以下の方法：エタノール希釈法、単純水和法、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フレンチプレス法、コール酸法、 Ca^{2+} 融合法、凍結融解法、逆相蒸発法、T字管混合（T-junction mixing）、マイクロ流体力学的フォーカシング（Microfluidic Hydrodynamic Focusing）、スタッガードヘリングボーン混合（Staggered Herringbone Mixing）等のうちの1つ以上を適用することが含まれる。

10

【実施例】

【0093】

実施例1及び2の材料及び方法

マウス

雌のC57BL/6マウスをCharles River Laboratories（フランス）から購入し、標準的な床敷材及びケージエンリッチメントを有する個別に換気されたケージで飼育した。動物を、動物実験のための機関（ブリュッセル自由大学（Vrije Universiteit Brussel））及び欧州連合のガイドラインに従って維持し、処置した。マウスは餌及び水を自由に摂取することができた。実験は、マウスが生後6週～10週になったときに開始した。マウスの体重を2日毎にモニターした。

20

【0094】

ADPGK合成長鎖ペプチド（SLP）によるワクチン接種の場合において、マウスに200 μl のPBS中の50 μg のADPGK SLP（GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVVFPT（配列番号3）、Genscript）、50 μg の抗CD40 Mab（クローンFJK 45、BioXCell）及び100 μg のpIC HMW（InvivoGen）の組み合わせを同一の時間間隔で腹腔内注射した。

【0095】

mRNAの合成及び精製

キャッピングされた非ヌクレオシド修飾E7及びADPGK mRNAは、国際公開第2015071295号に記載されているプロトコルに従って、eTherNAプラスミドpEthernAからのin vitro転写（IVT）により、eTherNAによって調製された。HPV16-E7又はADPGKタンパク質をコードする配列を、ヒトDC-LAMPのシグナル配列と膜貫通領域及び細胞質領域との間にインフレームでクローニングした。このキメラ遺伝子を、5'末端の翻訳エンハンサー及び3'末端のRNA安定化配列で強化されたpEthernAプラスミド中にクローニングした。IVT後に、dsRNAをセルロース精製により除去した。セルロース粉末はSigmaから購入し、16%のエタノールを含む1×STE（塩化ナトリウム-トリス-EDTA）バッファー中で洗浄した。IVT mRNA（16%のエタノールを含む1×STEバッファー中）を、洗浄したセルロースペレットに添加し、室温で20分間振盪した。次いで、この溶液を真空フィルター（Corning）にかけた。溶出液は、ssRNA画分を含有しており、これを全ての実験に使用した。mRNA品質は、キャピラリーゲル電気泳動（Agilent、ベルギー）によってモニターした。

30

40

【0096】

mRNAの脂質ベースのナノ粒子の生成

脂質ベースのナノ粒子は、酢酸ナトリウムバッファー（100 mM、pH4）中のmRNA溶液と脂質溶液とを2:1の体積比で9 mL／分の速度でNanoAssemblr Benchtop（Precision Nanosystems）を使用してマイクロ流体混合することによって製造した。脂質溶液は、Coatsome-EC（NOF corporation）、DOPE（Avanti）、コレステロール（Sigma）及び以下のPEG脂質の1つ：DMG-PEG2000（C14脂質）（Sunbright GM-020、NOF corporation）、DPG-PEG2000（C16脂質）（Sunbright GP-020、NOF corporation）、DSG-PEG2000（C18脂質）（Sunbright GS-020、NOF corporation）。

50

corporation) の混合物を含有していた。4種の脂質を異なるモル比で混合した。LNPを、slide-a-lyzer透析カセット (20K MWCO、3 mL、ThermoFisher) を使用して、TBS (TBS容量はLNP容量よりも10000倍多い) に対して透析した。Zetasizer Nano (Malvern) を用いて、サイズ、多分散度及びゼータ電位を測定した。mRNA封入の%は、リボグリーンアッセイ (ThermoFisher) によって測定した。

【0097】

フローサイトメトリー

免疫化後の約6日目に、処置マウス及び対照マウスから血液を採取した。赤血球を溶解し、残りの白血球を、製造業者の取扱説明書 (MBL International) に従って、APC標識E7 (RAHYNIVTF) -四量体 (配列番号1) 又はADPGK (ASMTNMELM) -四量体 (配列番号2) で染色した。過剰な四量体は洗い流した。その後、表面分子に対する抗体混合物 (表2に記載) を細胞に添加し、4℃で30分間インキュベートした。LSR Fortessa又はAttuneサイトメーターでデータを取得し、Flow Joソフトウェアで分析した。

【0098】

表2: E7特異的及びAdpgk特異的T細胞の数/割合のフローサイトメトリー分析に使用された抗体のリスト

【表2】

抗体	蛍光色素	クローン	会社
生存性色素	Zombie Aqua	n.a.	BioLegend
CD3	PerCPeF710	17A2	eBioscience (Thermo Fisher)
CD8	V450	53-6.7	BD Horizon

【0099】

結果

C18-PEG2000及び低%PEGの選択

実施例1-E7抗原

マウスにLNP (50/10/(40-x)/xのイオン性脂質/DOPE/コレステロール/PEG-脂質) にパッケージ化された10 µgのE7 mRNAを単回 (図1) 又は2回 (図2) 静脈内投与した。血液中のE7特異的CD8⁺T細胞の割合を、免疫化後6日目に決定した。図1は、低い割合のPEG (0.5%) を有するLNPが、中間の割合のPEG (1.5%) 又は高い割合のPEG (4.5%) を有するLNPよりも強い抗原特異的免疫応答を誘導することを示す。図1及び図2の両方は、免疫応答の誘発において、DSG-PEG2000 (C18) が、DMG-PEG2000 (C14) 及びDPG-PEG2000 (C16) のようなより短い炭素鎖PEG脂質よりも優れていることを示している。

【0100】

実施例2-ADPGK抗原

マウスに低割合PEG LNP (50/10/39.5/0.5のイオン性脂質/DOPE/コレステロール/PEG-脂質) にパッケージ化された10 µgのADPGK mRNA又は50 µgのADPGK合成鎖ペプチド (SLP) を4回静脈内投与した。血液中のADPGK特異的CD8⁺T細胞の割合を、4回目の免疫化後6日目に決定した。DSG-PEG2000 (C18) LNPは、抗原特異的免疫応答の誘発において、DMG-PEG2000 (C14) LNPよりも優れている (図3)。どちらのLNPも、SLPよりも免疫原性が高い。

【0101】

実施例3~6の材料及び方法

動物

全てのマウス実験は、UMCユトレヒトのユトレヒト動物福祉団体 (Utrecht Animal Welfare Body) 又はゲント大学の動物倫理委員会による承認を得て実施された。動物の管理は、定められたガイドラインに従った。全てのマウスは、水及び標準的な実験動物用飼料を無制限に摂取できた。雌のC57Bl/6Jマウスは、Charles River Laboratories, Inc. (ドイツ/フランス) から入手した。µMTマウスは、Jackson Laboratory (米国) から入手した。非ヒト霊長類における非GLP試験は、地方の規則に従って、Ch

ares River Laboratories (フランス) で実施された。

【0102】

mRNAの合成及び精製

コドン最適化E7、TriMix及びルシフェラーゼmRNAは、eTheRNAプラスミドからのin vitro転写 (IVT) により、eTheRNAによって調製された。ヌクレオチド修飾は使用しなかった。DoEで使用したE7 mRNAは、ARCAキャッピングした。その後の全ての実験は、CleanCapでキャッピングされたmRNA (CleanCapped mRNAs) を使用して実施した。IVT後に、dsRNAをセルロース精製により除去した。mRNA品質は、キャピラリーゲル電気泳動 (Agilent、ベルギー) によってモニターした。

【0103】

LNPの製造及び特性評価

生体内分布及び細胞取り込み試験では、LNPにホタルルシフェラーゼ (Fluc) をコードするmRNA (eTheRNA免疫療法NV) とCleanCap (商標) Cy5標識Fluc mRNA (TriLink Biotechnologies) との混合物を1:1の比で搭載した。DoE免疫原性試験では、LNPにE7 mRNAを搭載した。他の全ての試験は、E7、CD40L、CD70及びTLR4 mRNAの混合物を3:1:1:1の比で用いて実施した。mRNAを100 mMの酢酸ナトリウムバッファー (pH4) に希釈し、脂質をエタノールに溶解し、希釈した。mRNA及び脂質溶液を、NanoAssemblr Benchtopマイクロ流体混合システム (Precision Nanosystems) を使用して混合し、続いてトリス緩衝生理食塩水 (TBS、20 mMのトリス、0.9 %のNaCl、pH7.4) に対して一晩透析した。LNPの濃縮には、Amicon超遠心フィルター (10 kD) を使用した。Zetasizer Nano (Malvern) を用いて、サイズ、多分散指数及びゼータ電位を測定した。mRNA封入効率は、リボグリーンアッセイ (ThermoFisher) により決定した。全てのLNPの組成を、実施例3の表3に要約する。

【0104】

生体内分布及び細胞取り込み

マウスに選択したLNP配合物中の10 µgのmRNAを、尾静脈を介して静脈内注射した。4時間後、マウスを250 µLのペントバルビタール (6 mg/mL) で麻酔した。血液試料は、ゲル凝固因子 (Sarstedt) を含むチューブに採取した。続いて、胸腔を開き、門脈を切断し、マウスを、右心室を介し7 mLのPBSで灌流した。臓器を摘出し、液体窒素中で瞬間凍結した。肝臓及び脾臓組織については、臓器の一部をフローサイトメトリー分析用に氷冷PBS中に保存した。

【0105】

細胞取り込み

肝臓及び脾臓組織を、それぞれ1 mg/mLのコラゲナーゼA (Roche) 又は20 µg/mLのリペラーゼ (商標) (Roche)、及び10 µg/mLのDNase I、グレードII (Roche) を含有するRPMI 1640培地を含むペトリ皿に入れた。組織を、外科用メスを使用して細切し、37°Cで30分間インキュベートした。続いて、組織懸濁液を100 µmのナイロンセルストレーナーに通過させた。肝臓懸濁液を70×gで3分間遠心分離して、実質細胞を除去した。上清及び脾臓懸濁液を500×gで7分間遠心分離して、細胞をペレット化した。赤血球を5分間ACKバッファー (Gibco) 中で溶解し、PBSで不活性化し、続いて100 µmのセルストレーナーに通過させた。細胞を、1%ウシ胎児血清 (FBS) を含有するRPMI 1640で洗浄し、トリプンブルーと混合し、Luna-II自動セルカウンター (Logos Biosystems) を使用して計数した。3×10⁵ (肝臓) 又は6×10⁵ (脾臓) の生細胞を96ウェルプレートに播種し、500×gで5分間ペレット化し、50%のBrilliant Stain Buffer (BD Biosciences) 及び2 µg/mLのTruStain FcX (BioLegend) を含有するPBS (2%のPBSA) 中の2%のBSA中に再懸濁した。細胞を氷上で10分間インキュベートし、適用可能な抗体カクテル (合計で3つ) を含有する2%のPBSAと1:1で2回混合した。細胞を振盪器にて室温で15分間インキュベートし、2%のPBSAで2回洗浄し、0.25 µg/mLの7-AAD Viability Stain (BioLegend) を含有する2%のPBSA中に再懸濁した。試料を4レーザーBD LSRFortessaフローサイトメーターで取得した。分析はFlo

10

20

30

40

50

wJoソフトウェア使用して行った。

【0106】

全身分布

約50 mg~100 mgの各組織を切断し、重量を測定し、約5 mmの1.4 mmセラミックビーズ (Qiagen) の層を有する2 mLマイクロチューブに入れた。組織の各mgについて、3 μ Lの冷Cell Culture Lysis Reagent (Promega) を添加し、Mini-BeadBeater-8 (BioSpec) を使用して、4°Cで60秒間、フルスピードで組織をホモジナイズした。ホモジネートを-80°Cで保存し、解凍し、4°Cで10分間10,000 $\times$ gで遠心分離してビーズ及びデブリを除去し、上清を再度-80°Cで保存した。10マイクロリットルの各溶解物を、白色の96ウェルプレートに2回分取した。インジェクターを備えたSpectraMax iD3プレートリーダーを使用して、50 μ LのLuciferase Assay Reagent (Promega) を混合しながら各ウェルに分注し、続いて2秒待ち、10秒間ルシフェラーゼ発光を記録した。ルシフェラーゼ活性を、TBSを注射したマウスの臓器溶解物から得られたバックグラウンドシグナルに対して正規化した。

10

【0107】

T細胞応答

マウスを週間隔で選択したLNP中の10 μ gのmRNAで尾静脈を介して静脈内免疫化した。フローサイトメトリー染色のための血液を、免疫化後5日目~7日目に採取した。赤血球の溶解後、細胞をFcRブロック及び生存性色素とともにインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、APC標識E7 (RAHYNIVTF) -四量体を添加し、室温で30分間インキュベートした。過剰な四量体を洗い流し、表面分子CD3、CD8に対する抗体混合物を細胞に添加し、4°Cで30分間インキュベートした。試料を、3レーザーAtuneNxtフローサイトメーター又は4レーザーBD LSRFortessaフローサイトメーターで取得した。

20

【0108】

脾臓における細胞内サイトカイン産生を、3回目の免疫化後7日目に決定した。脾臓を破碎し、赤血球を溶解し、試料を40 μ Mのセルストレーナーで濾過することによって、脾細胞の単一細胞懸濁液を調製した。200,000細胞/ウェル/試料を、96ウェルプレートに2回播種した。細胞を37°Cでインキュベートする前に、4 μ gのE7ペプチド (Genscript) を刺激のために添加した。ペプチド刺激の1時間後、GolgiPlug (BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences)) を添加した。細胞を更に4時間インキュベートした。その後、細胞をFcRブロック及び生存性色素とともにインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、APC標識E7 (RAHYNIVTF) -四量体を添加し、室温で30分間インキュベートした。過剰なデキストラマーを洗い流し、表面分子CD3及びCD8に対する抗体混合物を細胞に添加し、4°Cで30分間インキュベートした。更なる工程は、BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) の製造業者の取扱説明書に従った。透過処理後、細胞をIFN- γ 及びTNF- α について染色した。試料を4レーザーBD LSRFortessaフローサイトメーターで取得した。分析はFlowJoソフトウェアを使用して行った。

30

【0109】

免疫細胞活性化

マウスに選択したLNP中の5 μ gのmRNAを、尾静脈を介して静脈内注射した。脾臓をフローサイトメトリー染色のために4時間後に摘出した。脾細胞の単一細胞懸濁液を調製し、消化バッファー (DNase-1及びコラゲナーゼ-IIIを含むDMEM) とともに20分間、規則的に振盪しながらインキュベートした。その後、試料をFcブロック及び生存性色素とともにインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、細胞を細胞系統マーカー及び活性化マーカーで染色した。試料を3レーザーAtuneNxtフローサイトメーターで取得した。分析はFlowJoソフトウェアを使用して行った。

40

【0110】

TC-1腫瘍実験

TC-1細胞は、ライデン大学医療センターから入手した。50 μ LのPBS中の50万個のTC-1細胞を、マウスの右脇腹に皮下注射した。腫瘍測定は、ノギスを使用して実施した

50

。腫瘍体積は、（最小直径2×最大直径）/2として計算した。Ant-PD-1及びアイソタイプ対照抗体を、新たにPBS中でマウス当たり200 μL中200 μgの濃度まで希釈し、腹腔内注射した。マウスに抗PD-1抗体（単剤療法又はmRNA LNP免疫化との併用）か、又はアイソタイプ対照（LNP免疫化との併用）のいずれかを投与した。抗体は、最初のmRNA LNP免疫化後3日目から開始し、最後のLNP注射後2週間で終了するまで、3日～4日毎に注射した。腫瘍浸潤リンパ球の分析のために、腫瘍を2回目のmRNA LNP免疫化後3日目に単離し、MACS組織保存バッファー（Miltenyi Biotec）で満たされた24ウェルプレートに入れた。腫瘍を細切し、消化バッファー中で1時間、定期的に振盪しながらインキュベートした。その後、赤血球を溶解し、全ての試料を70 μMのセルストレーナーで濾過した。リンパ球は、染色に進む前に、ficoll-paque密度勾配精製によって濃縮した。最初に、細胞をFcRブロック及び生存性色素とともにインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、APC標識E7（RAHYNIVTF）-四量体を添加し、室温で30分間インキュベートした。過剰な四量体を洗い流し、表面分子CD45及びCD8に対する抗体混合物を細胞に添加し、4℃で30分間インキュベートした。試料を3レーザーAtuneNxtフローサイトメーターで取得した。分析はFlowJoソフトウェアを使用して行った。

10

【0111】

炎症性サイトカイン

血液試料は、ゲル凝固因子（Sarstedt）を含むチューブに採取した。凝固した血液試料を10,000 gで5分間遠心分離して血清を得た。血清試料は分析まで-80℃で保存した。ProcartaPlexマルチプレックスアッセイ（ThermoFisher）を使用して、IFN-γ、TNF-α、IP-10等の炎症性サイトカインの濃度を決定した。血清試料をアッセイバッファーで3倍に希釈し、蛍光標識ビーズとともに120分間インキュベートした。更なる工程をプロトコールに従って実施した。試料はMagPix instrument（Luminex）で取得した。データはProcartaPlex Analystソフトウェアを使用して分析した。

20

【0112】

実施例3-最大のT細胞応答のためのLNP組成のDOE主導の最適化

LNPライブラリーは、市販のイオン性脂質Coatsome SS-ECを、コレステロール、DOPE及びPEG化脂質と組み合わせることにより作成した。DOPEは、既に、いくつかの認可されたりボソーム製品及び研究中のmRNAワクチンの一部である。本実験では、DSG-PEG2000脂質を含む異なるLNP組成物を調査した。PEG-脂質の異なる挙動は、静脈内投与時のsiRNA LNPの薬物動態及び薬力学に強い影響を与えることが記載された。

30

【0113】

最初のLNPライブラリーは、脂質のモル比及びPEG-脂質の化学的性質が、静脈内mRNA-LNPワクチン接種によって誘発されるT細胞応答に実際に影響を与えるかどうか、したがってワクチン効力を改善するために最適化することができる変数を表すかどうかを検討するために設計された。SS-EC、DOPE及びPEG-脂質のモル百分率は独立変数として見なされ、これに対して、コレステロールは100%までのモル百分率のバランスを保つためのフィラー脂質であると見なされた。DOE法を使用することにより、11のLNPを含む実験計画を作成した（表3の組成を参照）。

40

【0114】

表3：DoE実験におけるDSG-PEG2000 LNPの組成

【表3】

LNP番号	脂質比	
	CoatsomeSS-EC/DOPE	コレステロール/PEG脂質
DSG-PEG2000	LNP12	50/15/33.75/1.25
	LNP13	50/5/43.75/1.25
	LNP14	40.5/12.24/46.48/0.78
	LNP15	59.5/12.24/27.48/0.78
	LNP16	40.5/12.24/45.54/1.72
	LNP17	59.5/12.24/26.54/1.72
	LNP18	36.6/7.76/54.38/1.25
	LNP19	63.4/7.76/27.58/1.25
	LNP20	50/7.76/41.66/0.58
	LNP21	50/7.76/40.33/1.92
	LNP22	50/10/38.75/1.25

【0115】

50

11の脂質比は、実験領域において均一に分配されていた（データは示されていない）。免疫原性スクリーニングでは、3回の静脈内免疫化後の血液中のE7特異的CD8 T細胞の割合が、最大となる応答変数であると見なされた。この目的のために、全てのLNPは、抗原としてヒトパピローマウイルス16（HPV16）腫瘍性タンパク質E7をコードするmRNAをパッケージ化した。結果は、CD8 T細胞応答の大きさがLNP組成に強く依存するという仮定を裏付ける。いくつかのmRNA-LNPワクチンは、50%を超えるE7特異的CD8 T細胞応答を引き起こしたが、他のmRNA-LNPワクチンは、ほとんど応答を誘導しなかった（図4a）。PEG-脂質の化学的性質及びPEG-脂質のモル%は、E7特異的CD8 T細胞応答の大きさに関連する重要なパラメータとして特定された。最大のT細胞応答を達成するためには低モル百分率のPEG-脂質が必要であり（図4b）、DSG-PEG2000ベースのLNPについてはイオン性脂質の割合も免疫原性に対する大きな影響を及ぼした。

10

【0116】

ベイズ回帰モデリングをデータに適用して、或る特定のLNP組成の免疫原性を予測できる応答曲面モデル（データは示されていない）を作成した。PEG-脂質の化学的性質のそれぞれについての応答曲面モデルのクオリティは、決定係数 R^2 によって反映され、これは、入力変数（SS-EC、DOPE及びPEG-脂質の%）に基づくT細胞応答における変動性を説明するモデルの能力を示した。DSG-PEG2000 LNPについて、0.74の平均 R^2 値が得られ、モデルの予測値を検証するために、2つの新しいLNP組成物（表4）を評価した。

20

【0117】

表4：DoE実験におけるDSG-PEG2000 LNPの組成

【表4】

LNP番号	脂質比
	CoatsomeSS-EC/DOPE/コレステロール/DSG-PEG2000
LNP36	64/8/27.5/0.5
LNP37	42/12/44.5/1.5

【0118】

LNP36（DSG-PEG2000）で免疫化したマウスは、30%を超えるE7特異的CD8 T細胞を誘発する90%を超える確率を有し（最適LNP）、これに対して、LNP37（DSG-PEG2000）は不十分なT細胞応答を生じることが予測された（非最適LNP）（図4c）。実験データは予測とほぼ一致したため、モデルの検証に成功した。予測された最適LNPで免疫化した全てのマウスは、実際に30%を超えるE7特異的CD8 T細胞応答を示したが、LNP37で免疫化したマウスはこの閾値を超えるT細胞応答を誘発しなかった（図4c）。

30

【0119】

実施例4-高度の大きさのT細胞応答を誘導する最適mRNA LNPワクチン

癌免疫療法の成功は、T細胞の表現型、機能性及び腫瘍浸潤を含む、多数の因子により影響される。最初に、最適LNPによって引き起こされるT細胞応答のクオリティ及びブースト可能性（boostability）を評価した。この目的のために、マウスを、0日目、7日目及び14日目に3回プライム免疫化させ、続いて50日目に最終免疫化させた。E7 mRNAは、T細胞応答の強度を高める3つの免疫刺激mRNAの混合物であるTriMix（Bonehillら、2008）で補足された。

40

【0120】

E7-TriMixによる3回の免疫化の後、70%を超えるE7特異的T細胞が血液中に存在した（図5a）。3回目の免疫化後5週間、E7特異的CD8 T細胞の割合は非常に高いままであった。最後の追加免疫の投与により、E7特異的エフェクターT細胞の急速な増殖が観察されたため、ワクチンがブースト可能であることが実証された（図5a）。血清中のより高濃度のIFN- γ を免疫化毎に測定し（図5b）、これは、E7特異的T細胞の数の増加を反映する。

【0121】

T細胞の機能性を評価するために、LNP36による3回の免疫化後に細胞内サイトカイン

50

染色を実施した。2つ以上のサイトカインを同時に産生する多機能性CD8 T細胞は、感染性疾患及び腫瘍のより優れた制御と関連しており、E7特異的CD8 T細胞の約30%を占める（図5c）。

【0122】

実施例5-腫瘍縮小を誘導する最適mRNA LNPワクチン

治療的抗腫瘍効果を、HPV16 E6/E7抗原を用いたレトロウイルス形質導入により作製した同系マウス腫瘍モデルTC-1で評価した。LNP36により送達された5 µgのE7-TriMixによる治療は、腫瘍が平均直径55 mm³に達したときに開始された。さらに、マウスを抗PD-1（又はアイソタイプ対照抗体）で処置した。PD-1は活性化T細胞に発現し、PD-L1との相互作用によりT細胞の機能を阻害し、寛容を誘導する。PD-1チェックポイント阻害はT細胞の反応性を維持し、転移性又は切除不能な再発性HNSCC患者の一次治療として承認されている。LNP36ワクチン接種はTC-1腫瘍の著明な後退（図5d）及び生存期間の有意な延長（図5e）をもたらしたが、治療の中止後に腫瘍が再発した。抗PD1単剤療法は、TC-1担持マウスにいかなる治療効果ももたらさなかった。抗PD-1と併用したLNP36免疫化は、腫瘍増殖制御を改善した。

10

【0123】

最後に、腫瘍床に到達するワクチン誘発T細胞の能力を評価した。それぞれのmRNA-LNPワクチンによる2回のワクチン接種は、CD8⁺腫瘍浸潤T細胞の腫瘍への強い浸潤をもたらした（図5f）、70%超がE7に特異的であった（図5g）。ワクチン治療への抗PD-1の添加は、腫瘍に侵入するE7特異的CD8 T細胞の割合を有意に変化させなかった。

20

【0124】

実施例6-脾臓における取り込みを増加させ、免疫細胞を活性化する最適LNP

引き起こされたT細胞応答の大きさと、臓器及び細胞型レベルでのmRNAの取り込み及び発現の生体内分布との間に相関関係が存在するかどうかを検討するために、以前に免疫原性についてスクリーニングしたDSG-PEG2000 LNP中にCy5標識ホタルルシフェラーゼmRNAを封入した。ルシフェラーゼ活性を、LNP注射後4時間で摘出した肝臓、脾臓、肺、心臓及び腎臓で測定した。予測通り、LNP組成は、mRNA発現の強度及び臓器特異性に強い影響を及ぼした。肝臓は主要な標的器官であり、続いて脾臓であったが、肝臓対脾臓比はLNP間で大きく異なった（図6a）。3回目の免疫化後のE7特異的CD8 T細胞応答の大きさは、脾臓の発現と正の相関があった（データは示されていない）。

30

【0125】

次に、免疫原性が脾臓における早期mRNA取り込み及び特異的免疫細胞型の活性化に関連しているかどうかを評価した。LNPは主に、マクロファージ及び単球に蓄積した（図6b）。T細胞応答と、脾臓マクロファージ、単球、形質細胞様DC（pDC）及びB細胞によるLNP取り込みとの間には、強い全体的な相関関係が存在した（データは示されていない）。

【0126】

脾臓におけるmRNA取り込み及び発現の重要性を更に検証するために、最適で免疫原性の高いLNP（LNP36）の生体内分布及び細胞取り込みプロファイルを、非最適で免疫原性の不十分なLNP（LNP37）と比較した。非最適LNPと比較して、LNP36は脾臓におけるmRNA発現（図6c）並びに脾臓単球、マクロファージ及びDCによる取り込み（図6d）を劇的に増加させた。

40

【0127】

1.5%のDSGPEG2000で配合したLNP37と比較して、最適mRNA LNP組成のLNP36は、血液中のより高レベルの炎症性サイトカインを誘発し、脾臓DCサブセットでのCD86の発現を上昇させ（図6g）、生得的活性化（innate activation）の増加を示した（図6f）。

【0128】

最近、非ヒト霊長類（NHP）におけるパイロット試験が実行されて、最適LNP（LNP36）の並進的価値（translational value）が評価され、NHPにおいて、脾臓が組織1

50

g 当たり最も高い E7 mRNA の蓄積を示し、続いて肝臓及び骨髄であった (図 6e)。

【0129】

結論

LNP 組成は、mRNA ワクチンの全身投与により引き起こされる T 細胞応答の重要な決定因子である。LNP 安定化 PEG-脂質として DSG-PEG2000 を有する LNP は、DPG-PEG2000 及び DMG-PEG2000 を含有する LNP と比較して、T 細胞応答の増加を誘発した。さらに、DSG-PEG2000 のモル百分率を 0.5%~0.9% に減少させると、T 細胞応答が大幅に増加した。そのような最適化された LNP 組成物によって送達された mRNA ワクチンは、反復投与によってブーストされ、マウス同系腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果を付与することができる、高度の大きさ／高いクオリティの T 細胞応答を誘導する。機構的に、最適な LNP 組成物は、種々の抗原提示細胞型による mRNA 取り込みの増加が関与する、脾臓における mRNA 発現の増加によって特徴付けられる。最適な LNP 配合物は、脾臓樹状細胞の活性化の増加を誘発し、血液中の IFN- α 及び IP-10 の放出を亢進させる。

10

【0130】

図面記

図 1

% E7 specific CD8⁺T Cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

% PEG-lipid PEG-脂質 (%)

図 2

% E7 specific CD8⁺T Cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

20

図 3

% ADPGK specific CD8⁺ cells ADPGK 特異的 CD8⁺ 細胞 (%)

図 4

A

% E7-specific CD8⁺T cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

LNP number LNP 番号

B

% E7 specific CD8⁺T cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

% PEG-lipid PEG-脂質 (%)

p value p 値

30

C

% E7-specific CD8⁺T cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

図 5

A

% E7 specific CD8⁺T Cells E7 特異的 CD8⁺T 細胞 (%)

Time (days) 時間 (日数)

B

Time (days) 時間 (日数)

C

Cytokine production サイトカイン産生

40

% of E7 specific splenic CD8⁺ T cells E7 特異的脾臓 CD8⁺T 細胞 (%)

D

Tumor volume (mm³) 腫瘍体積 (mm³)

No treatment 治療なし

anti-PD-1 抗 PD-1

LNP36 + isotype LNP36 + アイソタイプ

LNP36 + anti-PD-1 LNP36 + 抗 PD-1

Days post TC-1 inoculation TC-1 接種後の日数

E

Percent survival 生存率

50

No treatment 治療なし

anti-PD-1 抗PD-1

LNP36 + isotype LNP36 + アイソタイプ

LNP36 + antiPD-1 LNP36 + 抗PD-1

Start treatment 治療開始

Days post TC-1inoculation TC-1接種後の日数

F

% CD45⁺CD3⁺ (TILs) of live cells 生細胞のCD45⁺ CD3⁺ (TIL) (%)

Untreated 未治療

anti-PD-1 抗PD-1

LNP36 + isotype LNP36 + アイソタイプ

LNP36 + anti-PD-1 LNP36 + 抗PD-1

G

% E7 specific cellsof CD8⁺ TILs CD8⁺ TILのE7特異的細胞 (%)

LNP36 + isotype LNP36 + アイソタイプ

LNP36 + anti-PD-1 LNP36 + 抗PD-1

図6

A

Relative luciferaseactivity 相対ルシフェラーゼ活性

(% of totalluciferase activity in all analysed organs) (分析した全ての臓器における総ルシフェラーゼ活性の%) 20

Spleen 脾臓

Kidneys 腎臓

Liver 肝臓

Lungs 肺

Heart 心臓

B

Cellular LNPassociation 細胞のLNP会合

Resident monocytes 常在性単球

Inflammatorymonocytes 炎症性単球

Granulocytes 顆粒球

T cells T細胞

B cells B細胞

Macrophages マクロファージ

C

Relative luciferaseactivity 相対ルシフェラーゼ活性

(% of totalluciferase activity in all analysed organs) (分析した全ての臓器における総ルシフェラーゼ活性の%)

Spleen 脾臓

Kidneys 腎臓

Liver 肝臓

Lungs 肺

Heart 心臓

LNP36 (optimal) LNP36 (最適)

LNP37 (non-optimal) LNP37 (非最適)

D

Cellularassociation 細胞会合

Macrophages マクロファージ

LNP36 (optimal) LNP36 (最適)

LNP37 (not optimal) LNP37 (非最適)

10

20

30

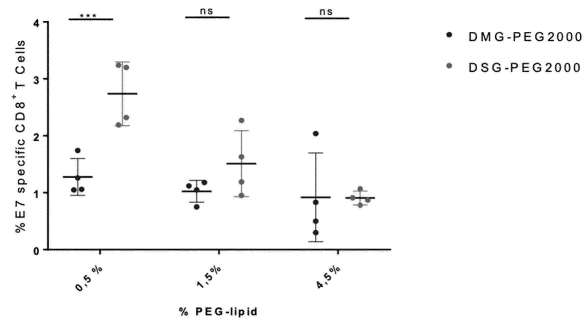
40

50

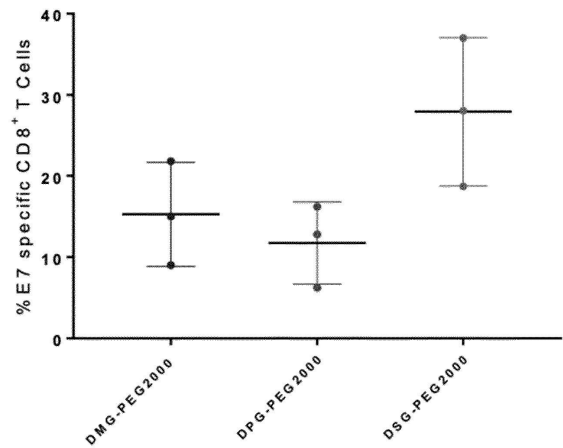
B cells B細胞
E
E7 (pg mRNA/g tissue) E7 (pgmRNA/組織1 g)
Liver 肝臓
Spleen 脾臓
Lung 肺
Heart 心臓
Brain 脳
Kidney 腎臓
Bone Marrow 骨髓
Adrenal Gland 副腎
Lymph Node リンパ節
F
6 hours 6時間
24 hours 24時間

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

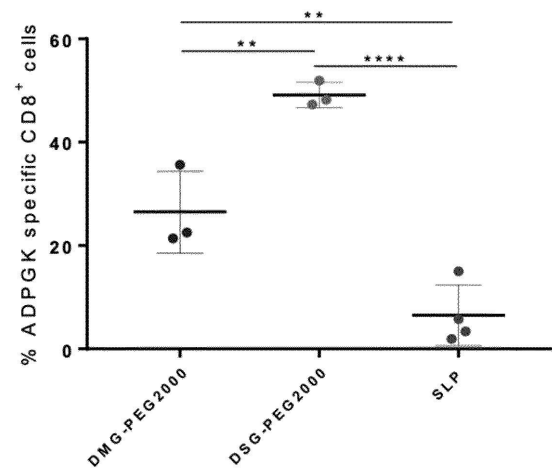
20

30

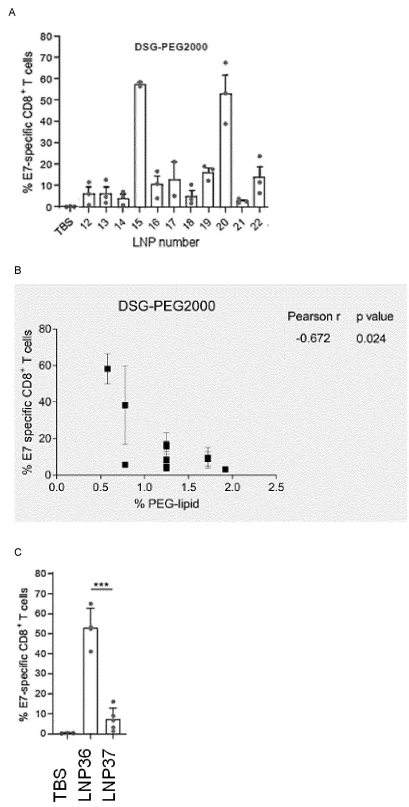
40

50

【図 3】



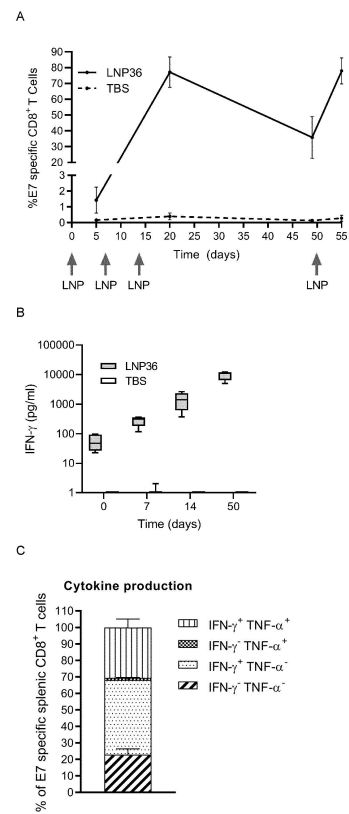
【図 4】



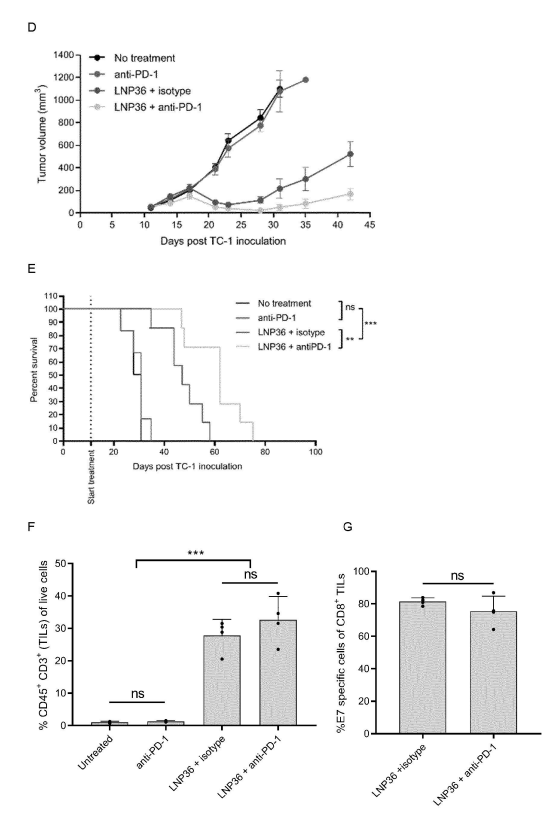
10

20

【図 5】



【図 5 - 1】

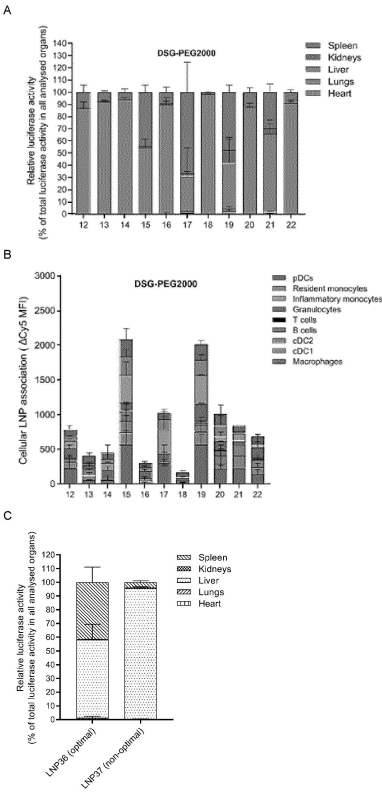


30

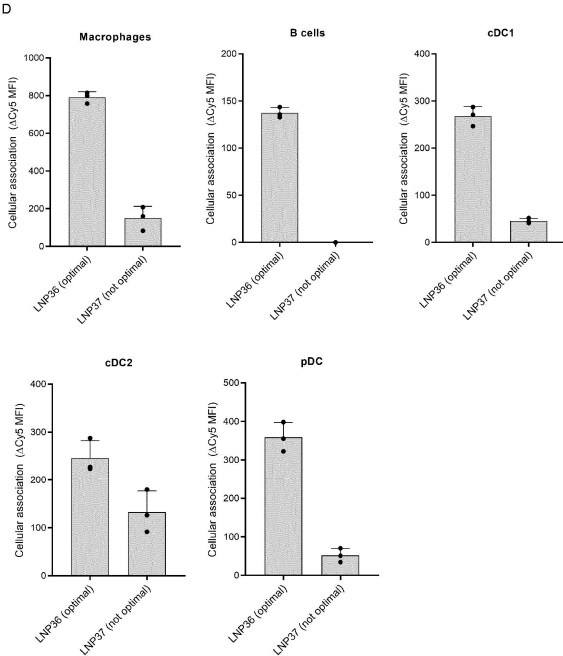
40

50

【図 6】



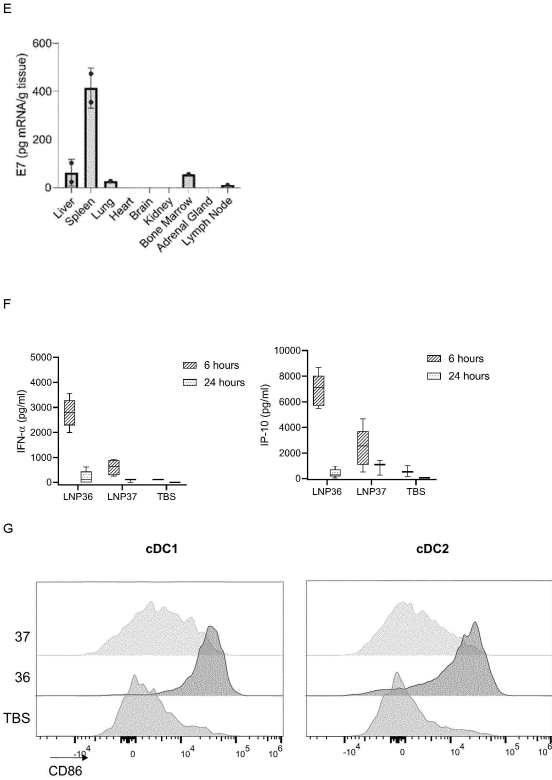
【図 6 - 1】



10

20

【図 6 - 2】



30

40

50

【配列表】

2023517275000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和3年9月27日(2021.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上の脂質ナノ粒子を含むmRNAワクチンであって、脂質ナノ粒子が、
45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、

前記LNPが、1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、mRNAワクチン。

【請求項2】

mRNAワクチン接種に使用される脂質ナノ粒子(LNP)であって、前記LNPが、
45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上のmRNA分子と、
を含み、

前記LNPが、1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子。

【請求項3】

脂質ナノ粒子(LNP)であって、
45 mol%～65 mol%のイオン性脂質と、
4 mol%～15 mol%のリン脂質と、
ステロールと、
PEG脂質と、
1つ以上の核酸分子と、
を含み、

前記PEG脂質が、C18-PEG2000脂質であること、及び前記LNPが、1 mol%未満の前記PEG脂質、好ましくは0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質を含むことを特徴とする、脂質ナノ粒子。

【請求項4】

前記C18-PEG2000脂質が、(ジステアロイル系)-PEG2000脂質、例えばDSG-PEG2000脂質若しくはDSPE-PEG2000脂質、又は(ジオレオイル系)-PEG2000脂質、例えばDOG-PEG2000脂質若しくはDOPE-PEG2000脂質を含むリストから選択される、請求項3に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項5】

前記イオン性脂質が、
1,1'-((2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール))(C12-200)、

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、

10

20

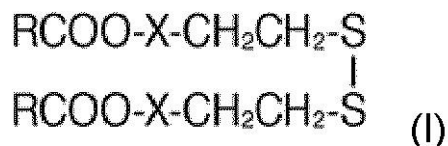
30

40

50

式 (I) の化合物：

【化 1】



10

(式中、
RCOOは、ミリストイル、 α -D-トコフェロールスクシノイル、リノレオイル及びオレオイルを含むリストから選択され、Xは、

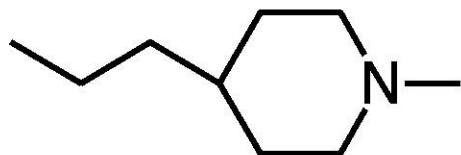
【化 2】



20

を含むリストから選択される)を含むリストから選択され、
好ましくは、前記イオン性脂質が、式 (I) の脂質 (式中、RCOOが α -D-トコフェロールスクシノイルであり、Xが、

【化 3】



30

である)である、請求項3又は4に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 6】

前記リン脂質が、DOPE、DOPC及びそれらの混合物を含むリストから選択される、請求項3～5のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項 7】

前記ステロールが、コレステロール、エルゴステロール、カンペステロール、オキシステロール、アントロステロール、デスモステロール、ニカステロール、シトステロール及びスチグマステロールを含むリストから選択され、好ましくはコレステロールである、請求項3～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

40

【請求項 8】

脂質ナノ粒子であって、

60 mol%を超える前記イオン性脂質と、

8 mol%の前記リン脂質と、

0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、

を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項 9】

脂質ナノ粒子であって、

50

6.4 mol%の前記イオン性脂質と、
8 mol%の前記リン脂質と、
0.5 mol%～0.9 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項10】

脂質ナノ粒子(LNP36)であって、

6.4 mol%の前記イオン性脂質と、
8 mol%の前記リン脂質と、
0.5 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項11】

脂質ナノ粒子(LNP15)であって、

59.5 mol%の前記イオン性脂質と、
12.24 mol%の前記リン脂質と、
0.78 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項12】

脂質ナノ粒子(LNP20)であって、

50 mol%の前記イオン性脂質と、
7.76 mol%の前記リン脂質と、
0.58 mol%の前記PEG脂質と、
を含み、

前記ステロールの量によってバランスが保たれた、脂質ナノ粒子。

【請求項13】

前記1つ以上の核酸分子が、mRNA及びDNAを含むリストから選択され、好ましくはmRNAである、請求項3～12のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項14】

前記1つ以上のmRNA分子が、免疫調節ポリペプチドをコードするmRNA及び／又は抗原をコードするmRNAの群から選択される、請求項3～13のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項15】

前記免疫調節ポリペプチドをコードするmRNAが、CD40L、CD70及びcaTLR4をコードするmRNA分子を含むリストから選択される、請求項14に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項16】

請求項3～15のいずれか一項に記載の1つ以上の脂質ナノ粒子と、許容される薬学的担体とを含む、薬学的組成物又はワクチン。

【請求項17】

人間医学又は獣医学において使用される、例えば、癌又は感染性疾患の治療に使用される、請求項3～15のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子、又は請求項16に記載の薬学的組成物若しくはワクチン。

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/051290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/00 A61K9/127 A61K9/51 A61K47/14 A61K47/24 A61K38/00 A61K39/00 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) A61K 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, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/141814 A1 (ETHERNA IMMUNOTHERAPIES NV [BE]) 25 July 2019 (2019-07-25) page 3, line 23 - line 27 page 3, line 18 - line 21 page 6, line 16 - line 10 example 5 claims 1-14 -----	1-15
X	WO 2016/118725 A1 (MODERNA THERAPEUTICS INC [US]) 28 July 2016 (2016-07-28) example 2 claims 1-42 -----	1-15
Y	WO 2012/170889 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES [US]; HEARTLEIN MICHAEL [US] ET AL.) 13 December 2012 (2012-12-13) example 11 ----- -/--	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 26 May 2021		Date of mailing of the international search report 04/06/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schüle, Stefanie

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/051290

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/110857 A1 (DEROSA FRANK [US] ET AL) 23 April 2015 (2015-04-23) table 6 -----	1-15

2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/051290

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ 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 13ter.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 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/051290

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019141814 A1	25-07-2019	CA	3088485 A1	25-07-2019
		CN	111971066 A	20-11-2020
		EP	3740241 A1	25-11-2020
		JP	2021511376 A	06-05-2021
		US	2020345641 A1	05-11-2020
		WO	2019141814 A1	25-07-2019

WO 2016118725 A1	28-07-2016	EP	3247398 A1	29-11-2017
		US	2018085474 A1	29-03-2018
		WO	2016118725 A1	28-07-2016

WO 2012170889 A1	13-12-2012	AU	2012267578 A1	19-12-2013
		CA	2838063 A1	13-12-2012
		CN	103748078 A	23-04-2014
		CN	107095849 A	29-08-2017
		DK	2718269 T3	09-04-2018
		DK	3336082 T3	27-04-2020
		EP	2718269 A1	16-04-2014
		EP	3336082 A1	20-06-2018
		EP	3354644 A1	01-08-2018
		EP	3674292 A1	01-07-2020
		ES	2663360 T3	12-04-2018
		ES	2795110 T3	20-11-2020
		JP	6022557 B2	09-11-2016
		JP	2014523870 A	18-09-2014
		JP	2017019857 A	26-01-2017
		JP	2018141006 A	13-09-2018
		US	2014288160 A1	25-09-2014
		US	2018008543 A1	11-01-2018
		US	2018169020 A1	21-06-2018
		US	2019314284 A1	17-10-2019
		US	2020237671 A1	30-07-2020
		WO	2012170889 A1	13-12-2012

US 2015110857 A1	23-04-2015	AU	2014340149 A1	12-05-2016
		AU	2021201220 A1	11-03-2021
		CA	2928040 A1	30-04-2015
		CN	105658800 A	08-06-2016
		EA	201690588 A1	30-09-2016
		EP	3060671 A1	31-08-2016
		JP	2016539916 A	22-12-2016
		JP	2019065047 A	25-04-2019
		JP	2021073313 A	13-05-2021
		US	2015110857 A1	23-04-2015
		US	2018028445 A1	01-02-2018
		WO	2015061461 A1	30-04-2015

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/20 (2006.01)	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88	Z

(32)優先日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(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,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100183656

弁理士 庄司 晃

(74)代理人 100224786

弁理士 大島 卓之

(74)代理人 100225015

弁理士 中島 彩夏

(72)発明者 デ コケル, ステファン

ベルギー, 2 8 4 5 ニール, ガリレイラ ン 1 9

(72)発明者 ビーバース, サンネ

ベルギー, 2 8 4 5 ニール, ガリレイラ ン 1 9

(72)発明者 シッフフェラーズ, レイモンド, ミッシェル

オランダ, 3 5 8 4 C M ユトレヒト, ヤーレラ ン 4 0, ユーエムシー ユトレヒト ホールディング ビー. ブイ.

(72)発明者 コーユマンズ, サンダー, アレクサンダー, アントニウス

オランダ, 3 5 8 4 C M ユトレヒト, ヤーレラ ン 4 0, ユーエムシー ユトレヒト ホールディング ビー. ブイ.

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA65 AA95 BB13 BB16 CC06 CC31 CC50 DD55 DD63

DD70 EE23 FF32 FF65 GG21

4C085 AA03 CC33 EE01 GG03

4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA24 MA38 MA66 NA13 ZB26

ZB31

【要約の続き】

