

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年9月12日(12.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/185696 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)  
A61K 31/7115 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A61K 39/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/007794

(22) 国際出願日: 2024年3月1日(01.03.2024)

(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 2023-032739 2023年3月3日(03.03.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 岩▲崎▼ 正治 (IWASAKI, Masaharu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 橋爪 芽衣 (HASHIZUME, Mei); 〒5650871 大阪

府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

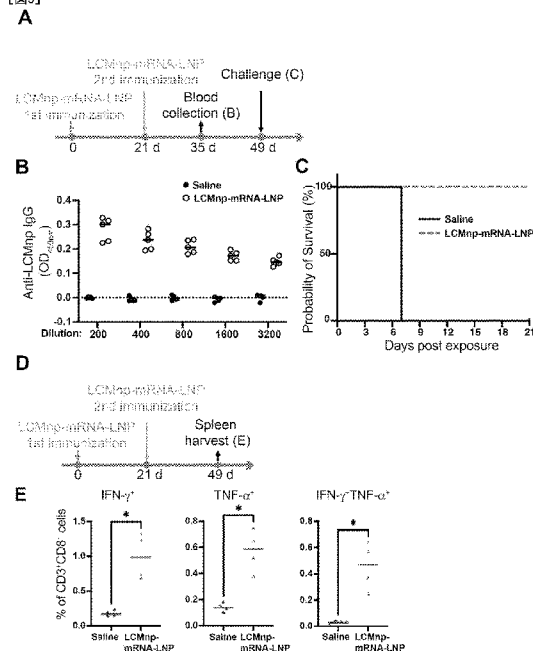
(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

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

(54) Title: ARENAVIRUS VACCINE

(54) 発明の名称: アレナウイルスワクチン

[図5]



(57) Abstract: Provided is a new vaccine against mammal arenavirus infections. This vaccine contains lipid nanoparticles each including mRNA encoding a nucleoprotein (NP) or a glycoprotein precursor (GPC) of arenavirus.

(57) 要約: 哺乳類アレナウイルス感染症に対する新規ワクチンを提供する。アレナウイルスの糖タンパク質前駆体 (GPC) 又はヌクレオプロテイン (NP) をコードする mRNA を内包する脂質ナノ粒子を含む、ワクチン。



WO 2024/185696 A1

(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：アレナウイルスワクチン

### 技術分野

[0001] 本発明はアレナウイルスワクチンに関する。

### 背景技術

[0002] 哺乳類アレナウイルスにはヒトに致死的なウイルス性出血熱を引き起こす病原体が複数存在する。中でも、ラッサ熱を引き起こすラッサウイルスは最も人類への影響が大きく、毎年西アフリカで推計約90万に感染し、入院が必要であった患者の致死率は約15%と非常に高い。非常に重要なヒトの病原体でありながら、ラッサウイルスに対する確立された予防法や治療法は存在しない。ラッサウイルスのコントロールにはウイルス特異的な細胞性免疫が重要な役割を果たすことが知られており、これまでは一回の接種で長期間の細胞性及び液性免疫を付与できる弱毒生ワクチンがラッサウイルスワクチン開発の中心であった。いくつかのラッサウイルス弱毒生ワクチン候補はラッサウイルスの動物感染モデルで有効性及び安全性が確認されており、中でもラッサウイルス糖タンパク質を発現する組換え水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus : VSV) ワクチンはphase Iの臨床試験が開始されている。しかし、弱毒生ワクチンの特性として免疫不全状態にある患者に対して安全上のリスクがある。特にラッサウイルスの流行地域では潜在的なHIV感染者も存在する。以上のことから、哺乳類アレナウイルス感染症に対する新規ワクチンの開発が求められていた。

[0003] 近年、パンデミックを引き起こしたCOVID-19に対して、SARS-CoV-2スパイクタンパク質 (SARS2-S) を発現するmRNAワクチン (SARS2-S-mRNA-LNP) が世界中で使用され、高い有効性を示している (特許文献1及び特許文献2)。興味深いことに、SARS2-S-mRNA-LNPは中和抗体だけでなく、SARS2-S特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞応答も誘導することが明らかになっており、中和抗体に加えウイルス特異的細胞性免疫も発症予防及び重症化予防に貢献していると考えられて

いる。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許出願公開第2020/0197510号

特許文献2：特開2019-216733号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、哺乳類アレナウイルス感染症に対する新規ワクチンを提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意検討を行ったところ、アレナウイルスの糖タンパク質前駆体（GPC）又はヌクレオプロテイン（NP）を発現するmRNAワクチンにより哺乳類アレナウイルス感染症を予防及び／又は治療し得ることを見出した。本発明はかかる知見に基づいてさらに検討を加えることにより完成したものであり、以下の態様を含む。

[0007] 項1.

アレナウイルスの糖タンパク質前駆体（GPC）又はヌクレオプロテイン（NP）をコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子を含む、ワクチン。

項2.

前記GPC及びNPが同一又は異なってラッサウイルス由来又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス由来である、項1に記載のワクチン。

項3.

前記GPC及びNPが天然型である、項1又は2に記載のワクチン。

項4.

アレナウイルスのGPCをコードするmRNAと、アレナウイルスのNPをコードするmRNAとをともに、又はそれぞれ内包する脂質ナノ粒子を含む、項1～3のいずれかに記載のワクチン。

## 項 5.

前記 mRNA が 5' キャップ構造、5' UTR、3' UTR、及び 3' ポリアデニル鎖をさらに含む、項 1～4 のいずれかに記載のワクチン。

## 項 6.

前記 5' UTR 及び 3' UTR が  $\beta$ -グロビン又は  $\alpha$ -グロビン由来である、項 5 に記載のワクチン。

## 項 7.

前記 3' ポリアデニル鎖が 200 ヌクレオチド長以下である、項 5 又は 6 に記載のワクチン。

## 項 8.

前記 mRNA に含まれるウリジンが 5-メトキシウリジンである、項 1～7 のいずれかに記載のワクチン。

## 項 9.

前記脂質ナノ粒子の個数平均粒子径が、70 nm～130 nm である、項 1～8 のいずれかに記載のワクチン。

## 項 10.

静脈内投与用又は筋肉内投与用の、項 1～9 のいずれかに記載のワクチン。

## 項 11.

アレナウイルスへの感染リスクのある対象に投与されるように用いられる、項 1～10 のいずれかに記載のワクチン。

## 項 12.

前記アレナウイルスがラッサウイルス及び／又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスである、項 11 に記載のワクチン。

## 項 13.

1回の投与あたりのワクチンに含まれる mRNA 量が、0.1  $\mu$ g～200  $\mu$ g となるように投与されるように用いられる、項 1～12 のいずれか一項に記載のワクチン。

#### 項 1 4 .

アレナウイルスのGPC又はNPをコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子を含むワクチンを投与する工程を含む、アレナウイルス感染症の予防方法。

#### 項 1 5 .

アレナウイルスのGPC又はNPをコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子の、ワクチンの製造のための使用。

### 発明の効果

[0008] 本発明によれば、哺乳類アレナウイルス感染症に対する新規ワクチンを提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]LASgpc又はLCMnpを発現するIVT-mRNAの合成を示す図である。(A) ウイルスタンパク質のORFをコードするIVT-mRNA合成の概略図。PCR増幅されたDNA断片を鋳型として、ヒトβ-グロビンの5'-UTR、ウイルスタンパク質のORF及びヒトβ-グロビンの3'-UTRを含むnaked RNAをin vitro転写合成した。naked RNAに5'キャップ構造を付加し、続いて3'末端をポリアデニル化した。(B) ポリA鎖あり又はなし(w/o)のIVT-mRNAをアガロースゲル電気泳動した。(C、D) 200 ngのLCMnp-mRNA (C) 又はLASgpc-mRNA (D) をHEK293T細胞に、Opti-MEMをmockとしてHEK293T細胞に導入した。導入後24時間経過後に、固定した細胞のLCMnp発現を、LCMnpに対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法によって調べ(C)、非溶解成分を除去した細胞溶解液中のLASgpcを、LASV GP2に対するポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロッティングによって調べた(D)。

[図2-1]C57BL/6マウスにおけるmRNA-LNPワクチンの静脈内投与による防御免疫付与を示す図である。(A) rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>ゲノム構造の概略図。(B) (C) 及び(D)の実験の概略図。(C) 6週齢のC57BL/6マウス(n = 5)にLASgpc-mRNA-LNP、LCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回静脈内投与した。2回目の投与後14日目に血漿中の抗LASgpc IgG(左)及び抗LCMnp IgG(右

) の量を測定した。

[図2-2]C57BL/6マウスにおけるmRNA-LNPワクチンの静脈内投与による防御免疫付与を示す図である。(D) 2回目の投与後28日目にC57BL/6マウスにrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を脳内接種し日々生存をモニターした。(E) (F) の実験の概略図。

(F) 6週齢のC57BL/6マウス (n = 5) にLCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回静脈内投与した。2回目の投与後28日目にNP396ペプチドに特異的に応答する脾臓CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン産生についてフローサイトメトリーにより調べた。データは平均値±SDを示す。\**p* < 0.01、\**p* < 0.05。

[図3]C57BL/6マウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による防御免疫付与を示す図である。(A) 実験の概略図。6週齢のC57BL/6マウスにLASgpc-mRNA-LNP (n = 5) 又は生理食塩水 (n = 4) を21日間隔で2回筋肉内投与した。(B) 2回目の投与後14日目に血漿中の抗LASgpc IgGの量を測定した。(C) 2回目の投与後28日目にC57BL/6マウスにrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を静脈内接種し血漿中のウイルス力価を測定した。データは平均値±SDを示す。LoDはlow limit of detection (検出下限) を示す。\**p* < 0.01。

[図4-1]CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫付与及び致死性rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果を示す図である。(A、B) 8週齢のCBAマウス (n = 4) にrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を静脈内接種した。体重変化 (A) 及び生存率 (B) を日々モニターした。(C) (D) から (G) の実験の概略図。(D) 6週齢のCBAマウス (n = 5) にLASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回筋肉内投与した。2回目の投与後14日目に血漿中の抗LASgpc IgGの量を測定した。

[図4-2]CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫付与及び致死性rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果を示す図である。(E、F) 2回目の投与後28日目にCBAマウスにrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を静脈内接種した。体重変化 (E) 及び生存率 (F) を日々モニターした。(G) ウイルス曝露後7日目に血漿中のウイルス力価を測定した。データは平均値±SDを示す。NDはnot detected (非検出) を示す。(H) (I) の実験の概略図。

(I) 6週齢のCBAマウス（各グループ  $n = 5$ ）にLASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回筋肉内投与した。2回目の投与後28日目にLASgpcペプチドカクテルに特異的に応答する脾臓CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン産生についてフローサイトメトリーにより調べた。 $**p < 0.01$ 。

[図5]FVBマウスにおけるLCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫付与と致死性出血性病状を引き起こすウイルス曝露に対する防御免疫効果を示す図である。(A) (B) 及び (C) の実験の概略図。(B) 6週齢のFVBマウス（各グループ  $n = 5$ ）にLCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回筋肉内投与した。2回目の投与後14日目に血漿中の抗LCMnp IgGの量を測定した。(C) 2回目の投与後28日目にFVBマウスに野生型のrLCMVを静脈内接種し、生存率を日々モニターした。(D) (E) の実験の概略図。(E) 6週齢のFVBマウス（各グループ  $n = 4$ ）にLCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を21日間隔で2回筋肉内投与した。2回目の投与後28日目にNP118ペプチドに特異的に応答する脾臓CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン産生についてフローサイトメトリーにより調べた。 $*p < 0.05$ 。

[図6]実施例11に示す方法で作製したLASgpc又はLASnpを発現するIVT-mRNAをアガロースゲル電気泳動した写真である。

[図7]実施例11の試験において、生理食塩水、又は各ワクチンのいずれかを筋肉内投与したCBAマウスについて、日々生存をモニターした結果を示すグラフである。

[図8]実施例12の試験において、生理食塩水、又は各ワクチンのいずれかを筋肉内投与したCBAマウスについて、日々生存をモニターした結果を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

### [0010] 1. 本発明のワクチン

本発明のワクチンは、アレナウイルスの糖タンパク質前駆体（GPC）又はヌクレオプロテイン（NP）をコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子を含む。本発明のワクチンは、GPCをコードするmRNAと、NPをコードするmRNAとをとも

に、又はそれぞれ内包する脂質ナノ粒子を含んでいてもよい。この場合、GPCをコードするmRNAのみを内包する脂質ナノ粒子を含む場合、又はNPをコードするmRNAのみを内包する脂質ナノ粒子を含む場合と比較して、免疫誘導の程度が相乗的に向上する。

[0011] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子に内包されるmRNAがコードするGPC又はNPは、アレナウイルス由来のタンパク質又はその部分タンパク質である。

[0012] GPC又はNPをコードするmRNAは、同一又は異なってラッサウイルス由来又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス由来であることが好ましく、ラッサウイルス由来のGPCをコードするmRNA又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス由来のNPをコードするmRNAであることがより好ましい。

[0013] GPC又はNPをコードするmRNAは、翻訳可能であればその構造は特に制限されないが、天然のmRNAのオープンリーディングフレーム (open reading frame ; ORF) と同様の構造を有していること、すなわち天然型であることが好ましい。「天然のmRNAのORFと同様の構造」には、後述するように、mRNAを構成するウリジンが化学修飾ウリジンに完全に置換されているものを含む。

[0014] GPC又はNPをコードするmRNAは、上記構造に加えて、5' キャップ構造、5' 非翻訳領域 (UTR) 、3' UTR、及び3' ポリアデニル鎖をさらに含んでいてもよい。

[0015] 5' キャップ構造は、キャップ1構造であることが好ましい。

[0016] 5' UTR及び3' UTRは、ヒト $\beta$ -グロビン又はヒト $\alpha$ -グロビン由来であることが好ましい。

[0017] 3' ポリアデニル鎖は、200ヌクレオチド長以下であることが好ましく、150ヌクレオチド長以下であることがより好ましい。

[0018] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子に内包されるmRNAは、例えば、mRNAの安定性の向上や自然免疫賦活化による翻訳阻害の軽減の観点から、ウリジンが化学修飾ウリジンに完全に置換されていることが好ましい。化学修飾ウリジンとしては、例えば、5-メトキシウリジン、シュードウリジン、N1-メ

チルシュードウリジン、2-チオウリジン等が挙げられる。中でも5-メトキシウリジンに完全に置換されていることが好ましい。

- [0019] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子に内包されるmRNAは、一般的に使用される分子細胞学的ツールを利用して常法により設計でき、公知の各種の方法で製造することができる。
- [0020] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子の個数平均粒子径は、70 nm~130 nmであることが好ましく、80 nm~120 nmであることがより好ましく、90 nm~110 nmであることがさらに好ましい。
- [0021] 脂質ナノ粒子の平均粒子径は、特に記載のない限り、動的光散乱法 (Dynamic light scattering ; DLS) により測定された個数平均粒子径を意味する。動的光散乱法による測定は、例えば、市販のDLS装置等を用いて行うことができる。
- [0022] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子は、例えば、脂質ナノ粒子100 mol%に対して、30~50 mol%のイオン化可能なカチオン性脂質 (pH感受性脂質)、35~50 mol%のステロール、0.5~3 mol%のPEG修飾脂質、10 mol%以下の中性リン脂質等から構成される。
- [0023] イオン化可能なカチオン性脂質としては、例えば、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチラート (DLin-MC3-DMA)、1,2-ジオレイル-3-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、[(4-ヒドロキシブチル)アザンジイル]ビス(ヘキサ-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカン酸エステル) (ALC-0315)、ヘプタデカン-9-イル 8-((2-ヒドロキシエチル)(6-オクソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル)アミノ)オクタノアート (SM-102)、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((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオアート (L319) 等が挙げられる。
- [0024] ステロールとしては、例えば、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、アルファートコフ

エロール等が挙げられる。

[0025] PEG修飾脂質としては、例えば、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロールメトキシポリエチレングリコール (PEG-DMG)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-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)] (PEG-DSP E)、PEG-ジステリルグリセロール (PEG-DSG)、PEG-ジパルメトレイル、PEG-ジオレイル、PEG-ジステアリル、PEG-ジアシルグリカミド (PEG-DAG)、PEG-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (PEG-DPPE)、PEG-1,2-ジミリストイルオキシプロピル-3-アミン (PEG-c-DMA) 等が挙げられる。

[0026] 中性リン脂質としては、例えば、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール (レゾルシノール)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ホスファチジルコリン (PLPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DAPC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジラウリロイルホスファチジルコリン (DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (MPPC)、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン (PMPC)、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン (PSPC)、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DBPC)、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (SPPC)、1,2-ジェイコセノイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DEPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、リソホスファチジルコリン、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コリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、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)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、リソホスファチジルエタノールアミン、及びそれらの組み合わせ等が挙げられる。

- [0027] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子の製造方法は、特に制限されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。例えば、市販のナノ粒子を作製する装置を用いてもよい。
- [0028] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子の形態は、特に制限されず、例えば、一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、不定型の層状構造物等が挙げられる。
- [0029] 本発明のワクチンに含まれる脂質ナノ粒子は、粒子内に、上述するmRNAに加えて、任意の他の成分を含んでいてもよい。他の成分としては、例えば、アジュバント、安定化剤、保存剤等が挙げられる。
- [0030] アジュバントとしては、例えば、アルミニウム塩等が挙げられ、アルミニウム塩としては、例えば、水酸化アルミニウム、リン化アルミニウム等が挙げられる。
- [0031] 安定化剤としては、例えば、精製白糖、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム二水和物、リン酸二水素カリウム、酢酸ナトリウム水和物、氷酢酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(別名：トロメタモール)、トロメタモール塩酸塩、L-ヒスチジン、L-ヒスチジン塩酸塩水和物、無水エタノール、オレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン(別名：ポリソルベート80)等が挙げられる。
- [0032] 保存剤としては、例えば、エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム(別名：チメロサル)、フェノキシエタノール等が挙げられる。
- [0033] 本発明のワクチンは、アレナウイルス感染症、特に哺乳類アレナウイルス感染症に適用できる。哺乳類アレナウイルス感染症が引き起こす疾病としては、ラッサ熱；ルジョ出血熱；アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ブラジル出血熱、ベネズエラ出血熱、チャパレ出血熱等の南米出血熱；リンパ球性脈絡髄膜炎等が挙げられる。哺乳類アレナウイルス感染症の病原体としては、ラッサウイルス、ルジョウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルス、サビアウイルス、ガナリトウイルス、チャパレウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス等が挙げられる。

[0034] 本発明のワクチンは、アレナウイルスに感染するリスクのある対象に投与される。中でもラッサウイルス及び／又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスに感染するリスクのある対象に投与されることが好ましい。「対象」とはヒト又は非ヒト動物を指す。「動物」は、哺乳類、げっ歯類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、及び虫類を含む。「非ヒト動物」は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、ブタ等の哺乳類である。

[0035] 本発明のワクチンの投与方法は、対象疾病、対象の状態等の条件に応じて適宜選択することができる。投与方法は、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経鼻投与、経口投与、リンパ節内投与、粘膜上投与等が挙げられる。中でも、静脈内投与又は筋肉内投与が好ましく、筋肉内投与がより好ましい。

[0036] 本発明のワクチンの投与回数及び投与間隔は、対象疾病、対象の状態、投与経路等の条件に応じて適宜選択することができる。本発明のワクチンの投与回数は、例えば、少なくとも2回であることが好ましい。また、本発明のワクチンの投与間隔は、例えば、少なくとも3週間間隔であることが好ましい。

[0037] 本発明のワクチンの投与量は、対象疾病、対象の状態、投与経路等の条件に応じて適宜選択することができる。本発明のワクチンの1回あたりの投与量は、対象の年齢及び性別、状態等に応じて、当業者に知られる方法によって適宜決定することができる。例えば、1回の投与あたりのワクチンに含まれるmRNA量が、 $0.1 \mu\text{g}$ ～ $200 \mu\text{g}$ となるように投与されることが好ましく、 $5 \mu\text{g}$ ～ $50 \mu\text{g}$ となるように投与されることがより好ましい。

## 実施例

[0038] 以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0039] 実施例1：in vitro転写 (IVT) mRNAの作製と培養細胞での発現確認

ラッサウイルス (Lassa virus ; LASV) の糖タンパク質前駆体 (glycoprotein precursor ; GPC) (以下、「LASgpc」という) 又はリンパ球性脈絡髄膜炎

ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus ; LCMV) のヌクレオプロテイン (nucleoprotein ; NP) (以下、「LCMnp」という) を発現するmRNA (以下、これらを「LASgpc-mRNA」及び「LCMnp-mRNA」という) をin vitroで合成し (図1 A 及び1 B)、培養細胞での発現を確認した (図1 C 及び1 D)。

[0040] 合成したLASgpc-mRNA及びLCMnp-mRNAにおいて、全てのウリジンは修飾ウリジンである5-メトキシウリジンに置換され、5'末端にキャップ構造及び3'末端にポリアデニル鎖がそれぞれ付加されている (図1 A)。

[0041] <mRNAの合成>

3'末端にGGG配列を有するT7プロモーター配列、ヒトβ-グロビン (NCBI Accession ID, NM\_00518.5) 5'-UTR配列、ヒトβ-グロビン、3'-UTR配列、及び、LASgpc (NCBI Accession ID, NC\_004296.1) 又はLCMnp (NCBI Accession ID, KY514256.1) のいずれかの、ストップコドンを有するオープンリーディングフレーム (ORF) から構成されるDNA断片をPCRにより増幅した。これらのDNA断片を鋳型に、T7 mScript standard mRNA Production System (Cell Script社製) を用いて5'末端にキャップ構造及び3'末端にポリアデニル構造を付加し、ウリジン5'三リン酸を5-メトキシウリジン5'三リン酸 (TriLink BioTechnologies社製) に置換したmRNAを合成した。IVT-mRNAをMonarch RNA cleanup kit (New England Biolabs社製) を用いて精製し、精製したIVT-mRNAの品質を、RNA High for Easy Electrophoresis (DynaMarker Laboratory社製) を用いて、非変性アガロースゲル電気泳動により調べた (図1 B)。

[0042] 実施例2 : mRNA-LNPの作製

実施例1で合成したLASgpc-mRNA又はLCMnp-mRNAを脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle ; LNP) に内包した (以下、LNPに内包されたLASgpc-mRNAを「LASgpc-mRNA-LNP」、LNPに内包されたLCMnp-mRNAを「LCMnp-mRNA-LNP」といい、これらをまとめて「mRNA-LNP」という)。

[0043] <mRNA-LNPの作製>

LNP製剤 (IVT-mRNA-LNPs) は、マイクロ流体ミキサーであるNanoAssemblr (登録商標) Ignite (Precision Nanosystems社製) を用いて、GenVoy-ILM (

Precision Nanosystems社製) とIVT-mRNAから調製した。N/P比(イオン性脂質のカチオン性アミンとmRNAの負荷電リン酸とのモル比)は4に設定した。得られたサンプルを1×Formulation Buffer 2 (Precision Nanosystems社製)で希釈し、アミコンウルトラ (Amicon Ultra) 遠心式フィルター (Millipore社製)により濃縮した後、メーカー (Precision Nanosystems社製)の推奨に従って、0.2 μmフィルターに通した。無菌濾過したmRNA-LNPは使用するまで4°Cで保存した。LNPに組み込まれたIVT-mRNAの濃度は、Quant-iT Ribogreen Assay Kit (ThermoFisher Scientific社製)により決定した。

[0044] 実施例3 : LASV-GPCを発現する組換えLCMV (rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>) の作製

LCMV-GPC遺伝子をV459KとK461Gの2つの変異を含むLASV-GPC遺伝子に置き換えた組換えLCMV (以下「rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>」という) を作製した (図2-1A)。

[0045] 10<sup>6</sup> focus forming units (FFU) のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>の接種後7日目のC57BL/6マウスでは、高いウイルス血症が確認された。また、10<sup>3</sup> FFUのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を脳内接種したC57BL/6マウスは、野生型rLCMV (WT rLCMV) を脳内接種した場合に比べてわずかに生存期間を延ばしたものの、全て死亡した。これらの結果から、rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>がLASV感染のマウスモデルとして使用可能であることが示された。そこで、以降の実験では、rLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を用いて、LASgpc-mRNA-LNP及びLCMnp-mRNA-LNPの、LASV感染に対する防御免疫効果を検証した。

[0046] 実施例4 : mRNA-LNPワクチンの静脈内投与による防御免疫の誘導可能性の検証

LASgpc-mRNA-LNP及びLCMnp-mRNA-LNPが防御免疫を誘導する可能性を検証するために、10 μgのIVT-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNP若しくはLCMnp-mRNA-LNP、又は生理食塩水をC57BL/6マウスの静脈内に3週間間隔で2回投与し (図2-1B)、2回目の投与後14日目の血漿中のLASgpc抗体及びLCMnp抗体のレベルを酵素結合免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assays ; ELISAs) により測定した。

[0047] 結果を図2-1Cに示す。LASgpc-mRNA-LNPを投与したC57BL/6マウスではL

ASgpc特異的な抗体がほぼ検出されなかった一方で、LCMnp-mRNA-LNPを投与したC57BL/6マウスでは強いLCMnp特異的な抗体産生が誘導された。

[0048] 実施例 5 : mRNA-LNPワクチンの致死的なウイルス曝露に対する防御免疫効果の検証

LASgpc-mRNA-LNP及びLCMnp-mRNA-LNPの、致死量のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果を検証するために、上記のLASgpc-mRNA-LNP若しくはLCMnp-mRNA-LNP、又は生理食塩水を静脈内に3週間間隔で2回投与したC57BL/6マウスに、2回目の投与後28日目に、致死量のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を脳内接種した。

[0049] 結果を図2-2Dに示す。生理食塩水を投与したC57BL/6マウスはウイルス曝露後12日以内にrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>感染により死亡した。一方で、LASgpc-mRNA-LNP又はLCMnp-mRNA-LNPを投与した全てのC57BL/6マウスは明白な臨床徴候を示すことなく生存した。このことから、LASgpc-mRNA-LNP及びLCMnp-mRNA-LNPが、致死量のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果を有することが示された。

[0050] LASgpc-mRNA-LNPを投与したC57BL/6マウスにおいてLASgpc特異的な抗体が著しく低レベルであったこと(図2-1C)、及びLCMnpは細胞内タンパク質であることを考慮すると、図2-2Dにおいて示されたLASgpc-mRNA-LNP及びLCMnp-mRNA-LNPのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果において、ウイルス抗原特異的な細胞性T細胞応答が重要な役割を果たしていることが示唆された。

[0051] 実施例 6 : LCMnp-mRNA-LNPワクチンのウイルス特異的なT細胞応答の誘導可能性の検証

LCMnp-mRNA-LNPのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果において、ウイルス抗原特異的なT細胞応答が重要な役割を果たしている可能性を検証するために、LCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を2回静脈内投与したC57BL/6マウスから得た赤血球フリー脾臓細胞を(図2-2E)、H-2d拘束性LCMnp T細胞エピートペプチド(NP396)の存在下で培養し、フローサイトメトリーにより細胞内サイトカインの発現を調べた。

[0052] 結果を図2-2Fに示す。LCMnp-mRNA-LNPを投与したマウスから得た脾臓細胞では、生理食塩水を投与したマウスから得た脾臓細胞に比べて、IFN- $\gamma$ 陽性、TNF- $\alpha$ 陽性、IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ 二重陽性CD8<sup>+</sup>T細胞の有意な上昇を認めた。この結果から、LCMnp-mRNA-LNPのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果において、ウイルス抗原特異的な細胞性T細胞応答が関連していることが示された。また、抗ウイルスCD8<sup>+</sup>T細胞としての多機能特性を有することが示された。

[0053] 実施例7：C57BL/6マウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫の誘導可能性及び致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果の検証

[0054] 実施例5で示されたLASgpc-mRNA-LNPの静脈内投与により誘導された防御免疫効果が、LASgpc-mRNA-LNPの筋肉内投与によっても確認されるかどうかを検証した。この検証のため、2  $\mu$ gのIVT-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水を、3週間間隔で2回、C57BL/6マウスの筋肉内に投与し、マウスから血液を採取して、防御免疫の誘導可能性及びウイルス曝露に対する防御免疫効果を調べた（図3A）。

[0055] LASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫の誘導可能性を検証した結果を図3Bに示す。実施例4で示す結果（図2-1C）と同様に、LASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水の2回目の投与後14日目にC57BL/6マウスから採取した血漿中において、LASgpc特異的抗体はほとんど検出されなかった。

[0056] C57BL/6マウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス曝露に対する防御免疫効果を検証した結果を図3Cに示す。LASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水の2回目の投与後28日目に、10<sup>6</sup> FFUのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を静脈内接種し、接種後7日目の血漿中のウイルス力価を測定した。生理食塩水を筋肉内投与したC57BL/6マウスの血漿中のウイルス力価は高かったのに対して、LASgpc-mRNA-LNPを筋肉内投与したC57BL/6マウスの血漿中のウイルス力価は検出下限（10<sup>2</sup> FFU/mL）程度まで著しく低下した。この結果から、LASgpc-m

RNA-LNPの筋肉内投与による、C57BL/6マウスにおけるウイルス曝露に対する防御免疫効果が示された。

[0057] 実施例8：CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与によるウイルス特異的免疫の誘導可能性及び致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果の検証

CBAマウスは、C57BL/6マウスに比べてLCMVに対する感受性が高いことが知られている。実施例6で示されたLASgpc-mRNA-LNPの筋肉内投与によるC57BL/6マウスにおける防御免疫の誘導が、CBAマウスにおいても起こるかどうかを検証した。

[0058] CBAマウスに対するrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>の適切な曝露量を決定するために、様々な量（1個体につき $10^2 \sim 10^5$  FFU）のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を、CBAマウスの静脈内に接種し、臨床徴候、体重変化、及び生存をモニターした。

[0059]  $10^5$  FFUのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>の接種により、実験終了（ウイルス接種後21日目）まで継続的に体重が減少し（図4-1A）、4分の3のマウスが安楽死の基準に達した（図4-1B）。一方、 $10^4$ FFU又はそれ以下のrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>の接種では体重減少は見られなかった。そこで、CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチン有効性の検証を目的とした以下の実験では、 $10^5$  FFUのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>をCBAマウスに接種することにした。

[0060]  $2 \mu\text{g}$ のIVT-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水をCBAマウスの筋肉内に3週間間隔で2回投与し（図4-1C）、2回目の投与後14日目のCBAマウスから採取した血漿中のLASgpc特異的抗体の量を調べた（4-1D）。CBAマウスの血漿中にはLASgpc特異的抗体がほぼ検出されなかった。

[0061] CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果を検証した結果を図4-2E~Gに示す。LASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水の2回目の投与後28日目に $10^5$  FFUのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>を静脈内接種し、接種後7日目にCBAマウスから血液を採取した（図4-1C）。生理食塩水を投与したCBAマウスでは全ての個体が著しい体重減少を示し、5分の4の個体は最終的には死亡又は安楽死の基準に達したのに対して、L

ASgpc-mRNA-LNPを投与した全てのCBAマウスは明らかな臨床徴候及び体重減少を示すことなく生存した（図4-2E及び図4-2F）。また、LASgpc-mRNA-LNPを投与したCBAマウス由来の血漿中のウイルス力価は、生理食塩水を投与したCBAマウス由来の血漿中のウイルス力価が約 $10^6$  FFU/mLと高かったのに比べて、最小検出レベル（ $10^3$  FFU/mL）以下まで抑制された（図4-2G）。これらの結果から、CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果が示された。

[0062] CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与により致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果が示された一方で、LASgpc特異的抗体応答が見られなかったことから、LASgpc-mRNA-LNPのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果において、ウイルス抗原特異的なT細胞応答が関与していることが示唆された。

[0063] 実施例9：CBAマウスにおけるLASgpc-mRNA-LNPワクチンのウイルス抗原特異的T細胞応答の誘導可能性の検証

LASgpc-mRNA-LNPワクチンによる致死性ウイルス曝露に対する防御免疫効果において、LASgpc特異的CD8<sup>+</sup>T細胞応答が関与しているかどうかを調べるために、LASgpc-mRNA-LNP又は生理食塩水を2回筋肉内投与したCBAマウスから得た赤血球フリーの脾臓細胞を（図4-2H）、LASgpcペプチドカクテルを用いて刺激し、フローサイトメトリーにより細胞内サイトカインの発現を調べた。

[0064] 結果を図4-2Iに示す。LASgpc-mRNA-LNPを投与したマウスから得た脾臓細胞では、生理食塩水を投与したマウスから得た脾臓細胞に比べて、IFN- $\gamma$ 陽性CD8<sup>+</sup>T細胞の著しい上昇を認めた。この結果から、LASgpc-mRNA-LNPのrLCMV/LASgpc<sup>2m</sup>曝露に対する防御免疫効果において、LASgpc特異的なT細胞応答が関連していることが示された。

[0065] 実施例10：FVBマウスにおけるLCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による液性及び細胞性免疫誘導と致死性出血性病状を引き起こすウイルス曝露に対する防御効果の検証

mRNA-LNPワクチンがラッサ熱様病状に対しても防御免疫効果を示すかどうかを調べるために、ラッサ熱に近い病態を示すLCMV感染マウスモデル（FVBマウス）を用いて、以下の実験を行った。

- [0066] 2 $\mu$ gのIVT-mRNAを含むLCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を、3週間間隔で2回、FVBマウスの筋肉内に投与し、2回目の投与後14日目にマウスから血液を採取した（図5 A）。LCMnp-mRNA-LNPを投与したFVBマウスは高レベルのLCMnp特異的抗体を産生した（図5 B）。この結果から、LCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による液性免疫の誘導が示された。
- [0067] LCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水の2回目の投与後28日目に通常は致死量のWT rLCMVを静脈内接種し（図5 A）、臨床徴候及び生存をモニターした。生理食塩水を投与したFVBマウスはWT rLCMVの接種後8日以内に死亡したのに対して、LCMnp-mRNA-LNPを投与した全てのFVBマウスは明らかな臨床徴候を示すことなく生存した（図5 C）。この結果から、LCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与が致死性的出血性病状を引き起こすウイルス曝露に対する防御効果を有することが示された。
- [0068] LCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による致死性的出血性病状を引き起こすウイルス曝露に対する防御効果におけるウイルス特異的T細胞応答の関与を調べるために、LCMnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を2回筋肉内投与したFVBマウスから得た赤血球フリーの脾臓細胞を（図5 D）、H-2q拘束性LCMnp特異的T細胞エピトープペプチド（NP118）を用いて刺激し、フローサイトメトリーにより細胞内サイトカインの発現を調べた。その結果、LCMnp-mRNA-LNPを投与したFVBマウスでは、生理食塩水を投与したFVBマウスに比べて、IFN- $\gamma$ 陽性、TNF- $\alpha$ 陽性、IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ 二重陽性CD8<sup>+</sup>T細胞の有意に上昇した（図5 E）。この結果から、LCMnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による細胞性免疫の誘導が示された。
- [0069] 実施例 1 1 : CBAマウスにおけるLASnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与による防御効果の検証

LASgpc-mRNA又はラッサウイルスのNP（以下、「LASnp」という）を発現す

るmRNA (LASnp-mRNA) を用いたmRNA-LNPワクチン (LASnp-mRNA-LNP) の筋肉内投与による防御免疫の誘導が、CBAマウスにおいて起こるかどうかを検証した。

[0070] LASgpcもしくはLASnpのORFをCloning Kit for mRNA Template (TaKaRa製、製品番号6143) のLinearized Template Vectorにクローニングし、プラスミドを作製した。作製したプラスミドを制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。アガロースゲル中のT7プロモーター、ヒト $\alpha$ -グロビン5'-UTR、ウイルスタンパク質のORF、ヒト $\alpha$ -グロビン3'-UTR、ポリA配列を含むDNA断片を含む部分を切り出し、DNAを精製した。精製したDNAを鋳型として、Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (TaKaRa製、製品番号6144) を用いてmRNAをin vitro転写合成した。このとき、UTPの代わりに5-メトキシウリジン (TriLink社、製品番号N-1093) を、5' キャップの材料としてCleanCap Reagent AG (TriLink社、製品番号N-7113) を用いた。作製したIVT-mRNAをMonarch RNA clean up kit (New England Biolabs社製) を用いて精製し、精製したIVT-mRNAの品質を、RNA High for Easy Electrophoresis (DynaMarker Laboratory社製) を用いて、非変性アガロースゲル電気泳動により調べた。

[0071] ウイルス曝露にはLASV弱毒生ワクチン候補株ML29を用いた。ML29は、LASV由来のS分節 (LASgpc遺伝子とLASnp遺伝子を含む) と、ヒトに無病原性とされるモペイアウイルス (MOPV) 由来のL分節からなる遺伝子再集合体である。

[0072] LNP製剤 (IVT-mRNA-LNPs) を、マイクロ流体ミキサーであるNanoAssemblr (登録商標) Ignite (Precision Nanosystems社製) を用いて、GenVoy-ILM (Precision Nanosystems社製) と図6で作製したIVT-mRNAから調製した。N/P比 (イオン性脂質のカチオン性アミンとmRNAの負荷電リン酸とのモル比) は4に設定した。得られたサンプルを1×Formulation Buffer 2 (Precision Nanosystems社製) で希釈し、アミコンウルトラ (Amicon Ultra) 遠心式フィルター (Millipore社製) により濃縮した後、0.2  $\mu$ mフィルターに通して無菌濾過した。精製したmRNA-LNPは使用するまで4°Cで保存した。LNPに組み込まれたIVT-mRNAの濃度は、Quant-iT Ribogreen Assay Kit (ThermoFisher Scient

ific社製)により決定した。2  $\mu\text{g}$ のIVT-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNP又はLASnp-mRNA-LNP又は生理食塩水を、3週間間隔で2回、CBAマウスの筋肉内に投与した。2回目の接種から4週間後に致死量のML29を脳内接種し、ウイルス曝露に対する防御効果を調べた。その結果を図7に示す。生理食塩水を投与した全てのマウスは8日以内に死亡した。一方、LASgpc-mRNA-LNPを投与した全てのマウスは生存し、LASnp-mRNAを投与した5匹中4匹のマウスが生存した。この結果から、LASgpc-mRNA-LNP又はLASnp-mRNA-LNPワクチンの筋肉内投与により致死性のウイルス曝露に対する防御免疫を付与することが示された。

[0073] 実施例12：CBAマウスにおけるmRNA-LNP混合ワクチンの筋肉内投与による防御効果の検証

LASgpc-mRNA-LNPワクチンとLASnp-mRNA-LNPワクチンとを組み合わせることにより、各ワクチンを単独で投与した場合と比較して相乗効果が得られるか否かを検証した。

[0074] 0.4  $\mu\text{g}$ のLASgpc-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNP、又は0.4  $\mu\text{g}$ のLASnp-mRNAを含むLASnp-mRNA-LNP、又は0.2  $\mu\text{g}$ のLASgpc-mRNAを含むLASgpc-mRNA-LNPと0.2  $\mu\text{g}$ のLASnp-mRNAを含むLASnp-mRNA-LNPを混合したもの、又は生理食塩水を、3週間間隔で2回、CBAマウスの筋肉内に投与した。2回目の接種から4週間後に致死量のML29を脳内接種し、ウイルス曝露に対する防御効果を調べた。その結果を図8に示す。生理食塩水を投与した全てのマウスは8日以内に死亡した。また、LASgpc-mRNA-LNP投与群では5匹中1匹のマウスが死亡し、LASnp-mRNA-LNP投与群では5匹中4匹のマウスが死亡した。一方、LASgpc-mRNA-LNPとLASnp-mRNA-LNPの混合ワクチンを接種した全てのマウスが生存した。LASgpc-mRNA-LNP又はLASnp-mRNA-LNP単独投与では100%のマウスが生存しなかったIVT-mRNA含有量(0.4  $\mu\text{g}$ )の半量(0.2  $\mu\text{g}$ )でもそれらを混合し投与することで100%のマウスが生存したことから、LASgpc-mRNA-LNPとLASnp-mRNA-LNPの混合による相乗効果が示された。

## 請求の範囲

- [請求項1] アレナウイルスの糖タンパク質前駆体（GPC）又はヌクレオプロテイン（NP）をコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子を含む、ワクチン。
- [請求項2] 前記GPC及びNPが同一又は異なってラッサウイルス由来又はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス由来である、請求項1に記載のワクチン。
- [請求項3] 前記GPC及びNPが天然型である、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項4] アレナウイルスのGPCをコードするmRNAと、アレナウイルスのNPをコードするmRNAとをともに、又はそれぞれ内包する脂質ナノ粒子を含む、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項5] 前記mRNAが5'キャップ構造、5'非翻訳領域（UTR）、3'UTR、及び3'ポリアデニル鎖をさらに含む、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項6] 前記5'UTR及び3'UTRがβ-グロビン又はα-グロビン由来である、請求項4に記載のワクチン。
- [請求項7] 前記3'ポリアデニル鎖が200ヌクレオチド長以下である、請求項4に記載のワクチン。
- [請求項8] 前記mRNAに含まれるウリジンが5-メトキシウリジンである、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項9] 前記脂質ナノ粒子の個数平均粒子径が、70 nm～130 nmである、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項10] 静脈内投与用又は筋肉内投与用の、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項11] アレナウイルスへの感染リスクのある対象に投与されるように用いられる、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項12] 前記アレナウイルスがラッサウイルス及び／又はリンパ球性脈絡髄

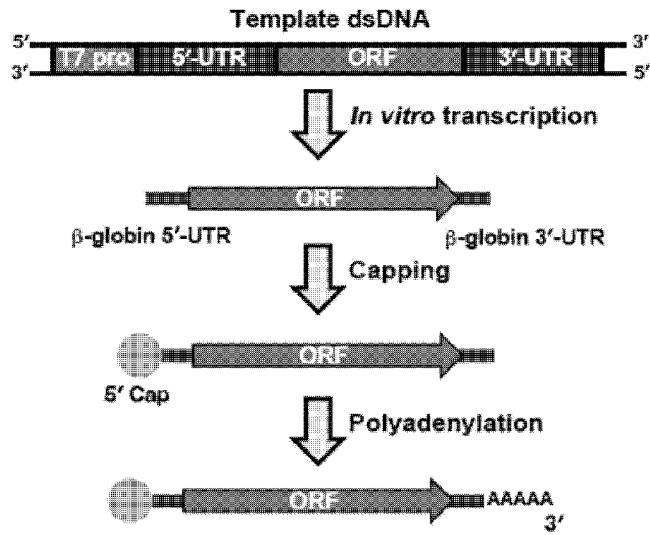
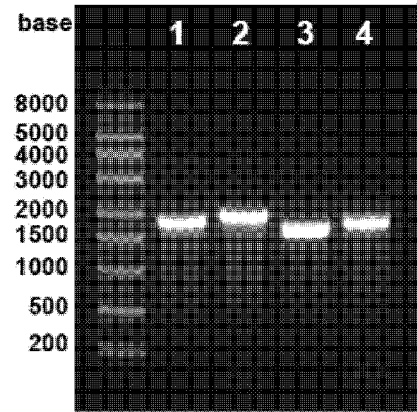
膜炎ウイルスである、請求項 1 1 に記載のワクチン。

[請求項13] 1回の投与あたりのワクチンに含まれるmRNA量が、 $0.1 \mu\text{g} \sim 200 \mu\text{g}$ となるように投与されるように用いられる、請求項 1 又は 2 に記載のワクチン。

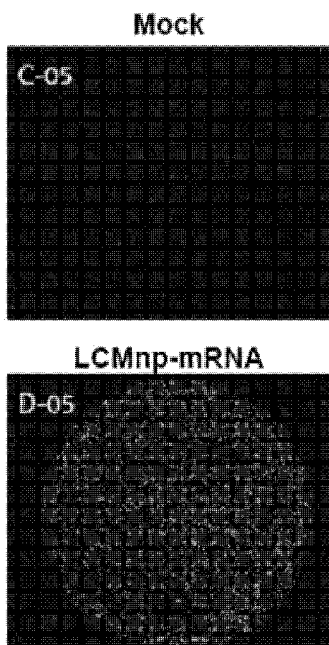
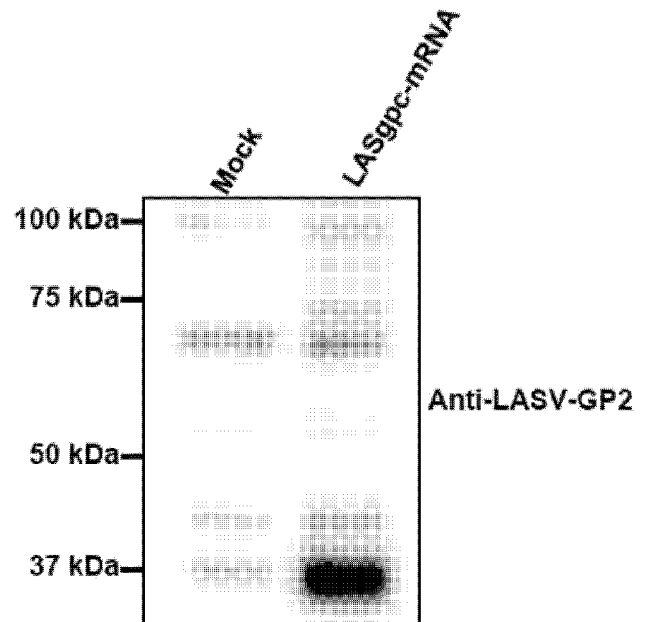
[請求項14] アレナウイルスのGPC又はNPをコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子を含むワクチンを投与する工程を含む、アレナウイルス感染症の予防方法。

[請求項15] アレナウイルスのGPC又はNPをコードするmRNAを内包する脂質ナノ粒子の、ワクチンの製造のための使用。

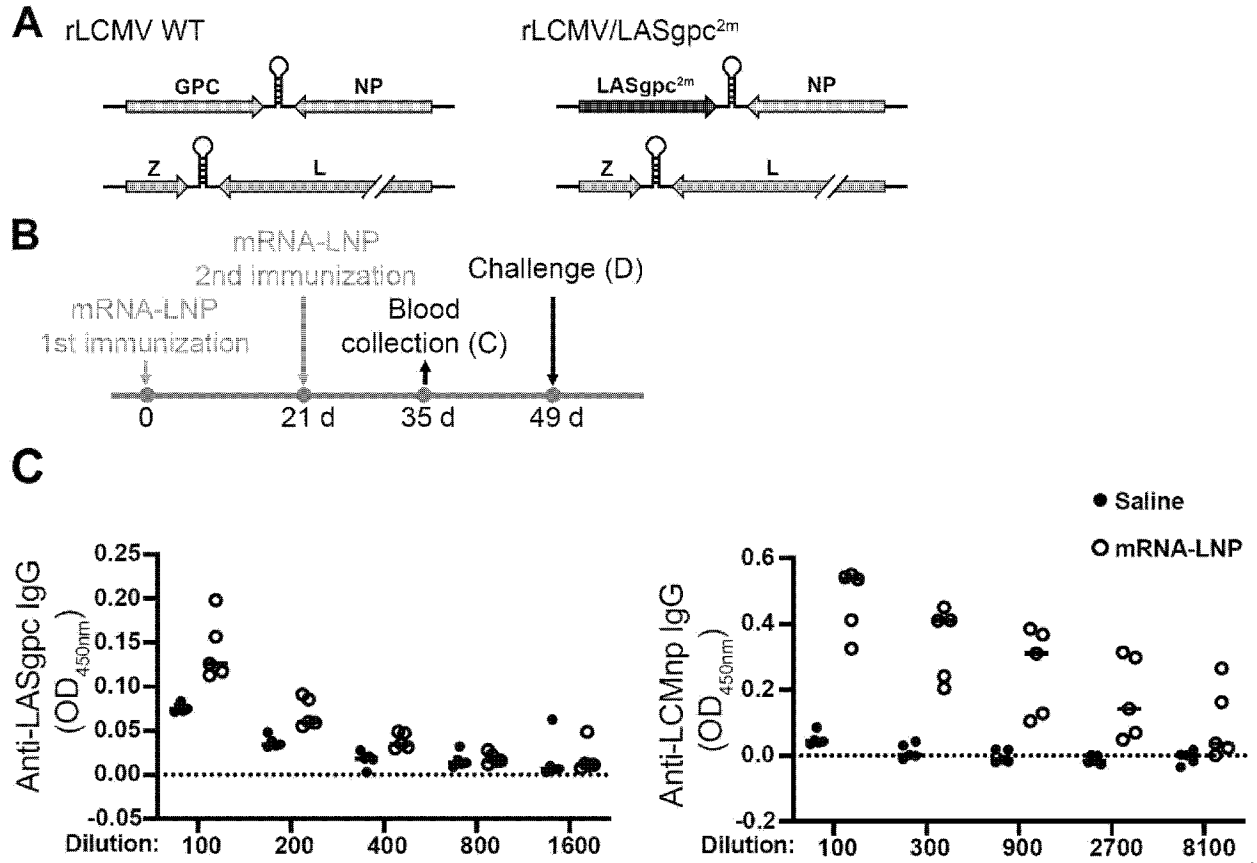
[図1]

**A****B**

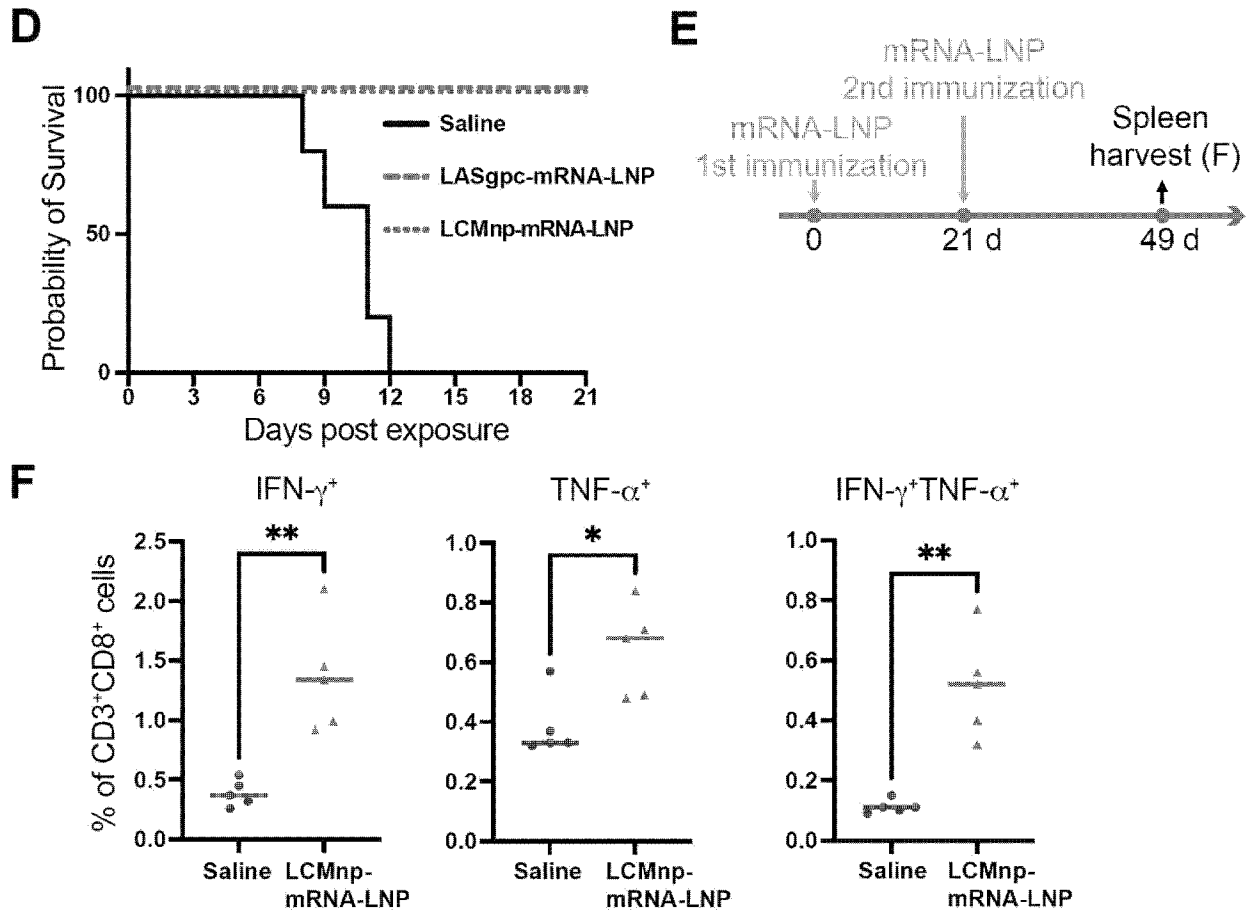
1: LCMnp-mRNA w/o poly(A)  
 2: LCMnp-mRNA  
 3: LASgpc-mRNA w/o poly(A)  
 4: LASgpc-mRNA

**C****D**

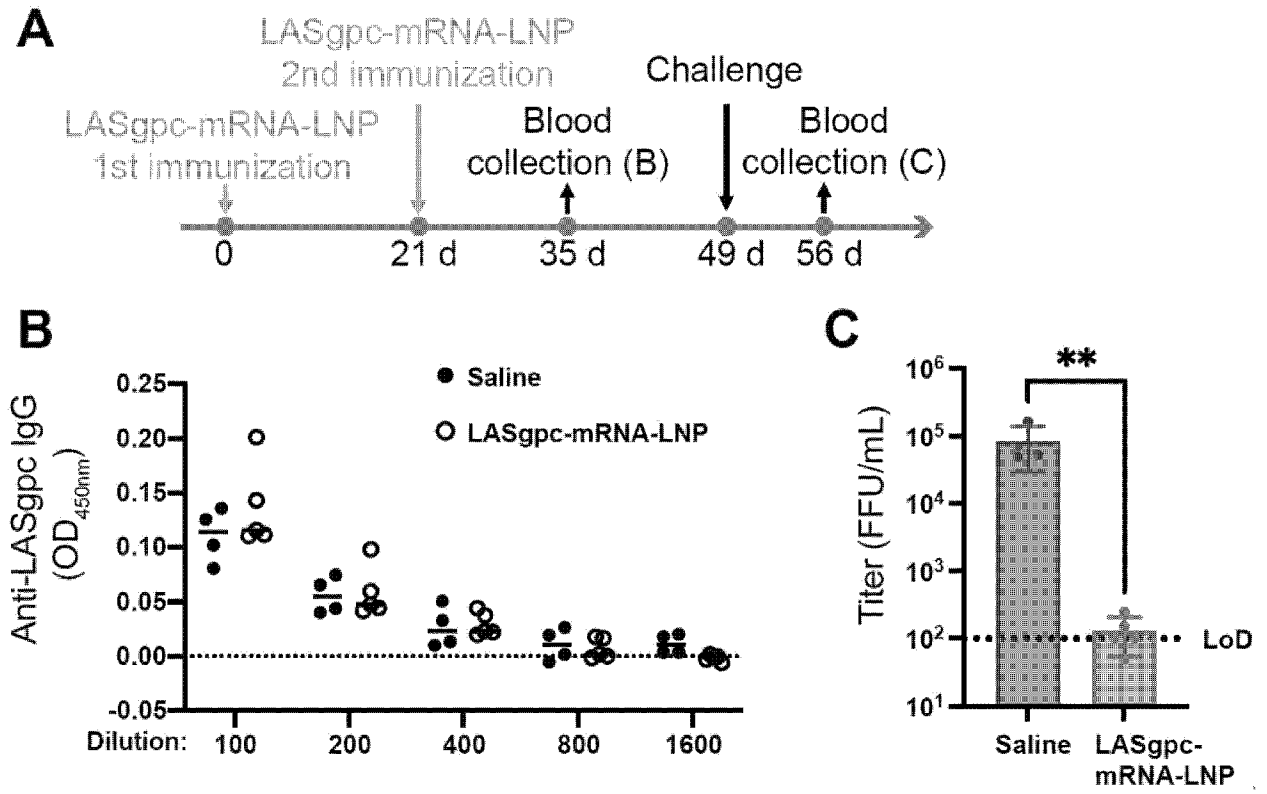
## [Figure 2-1]



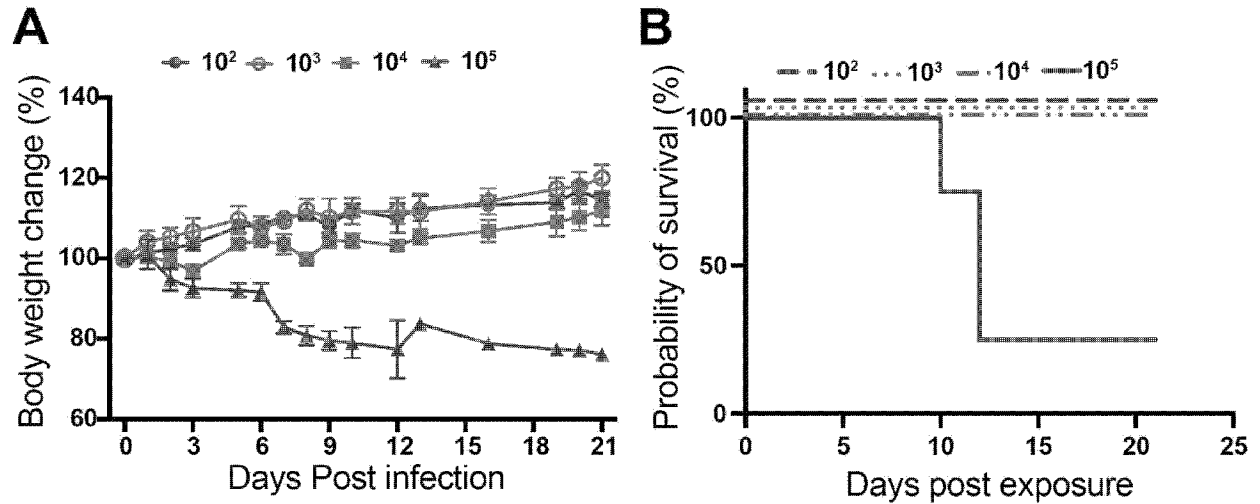
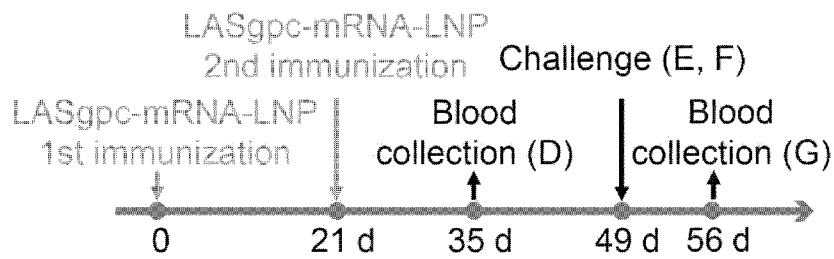
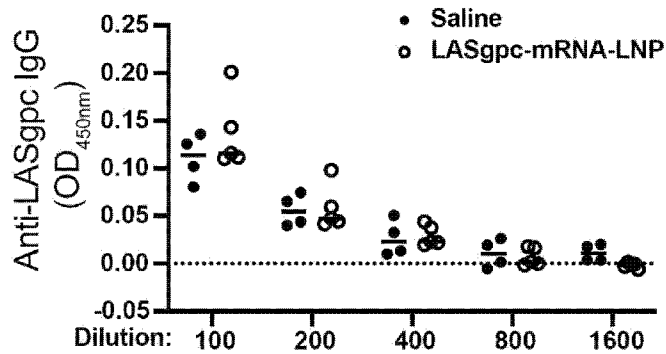
## [Figure 2-2]



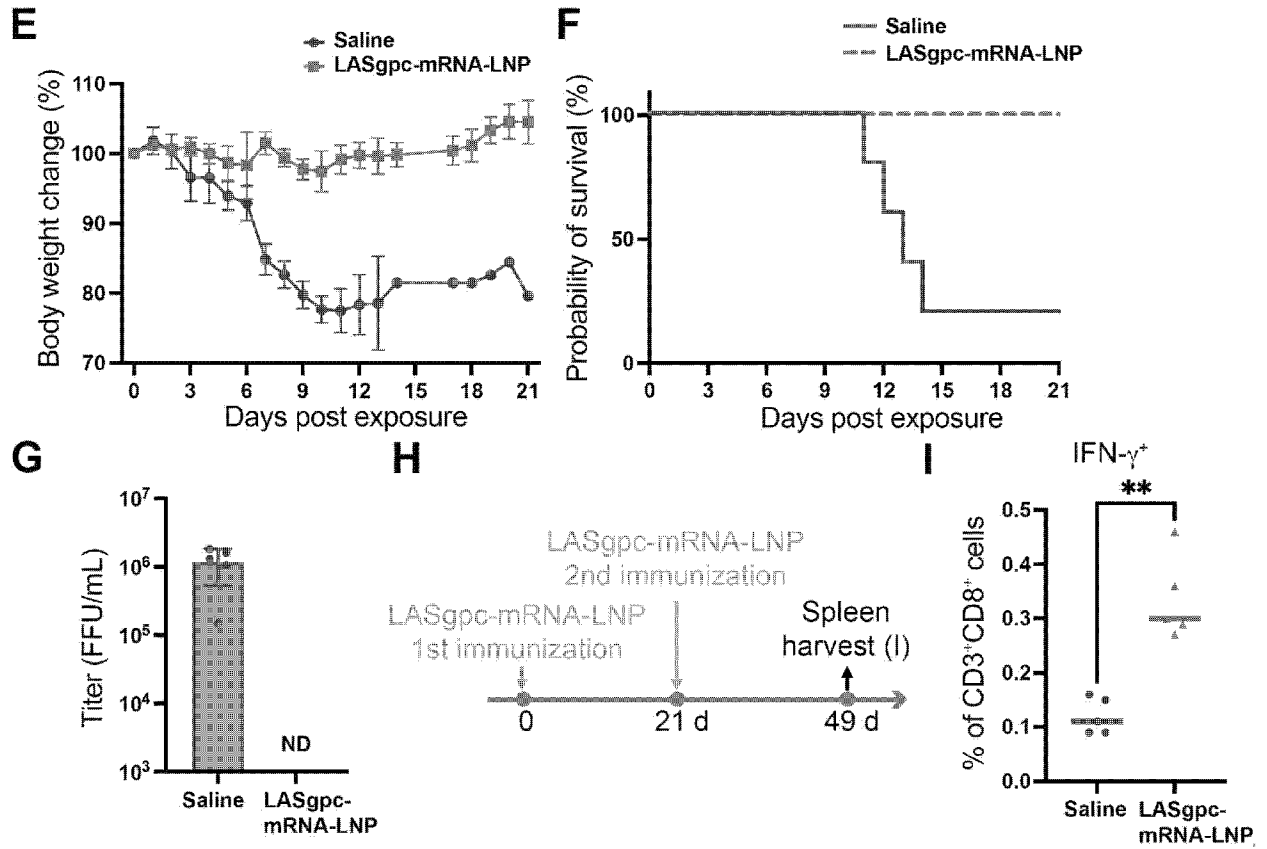
[圖3]



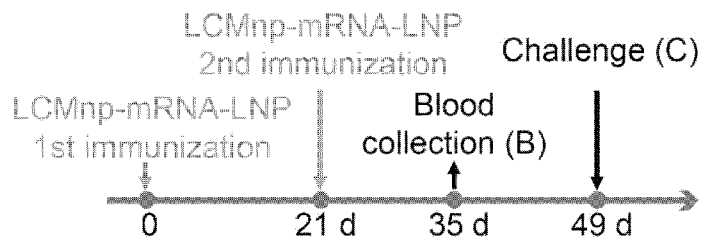
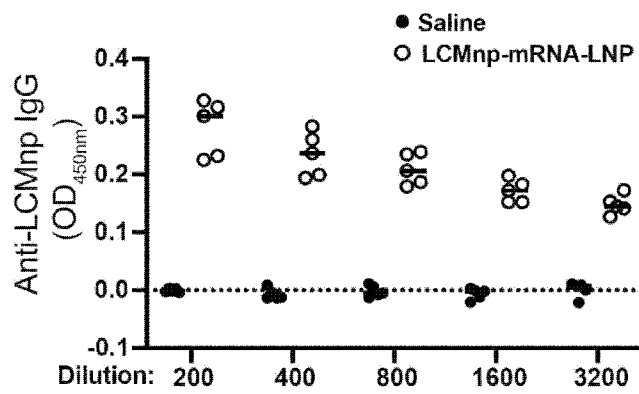
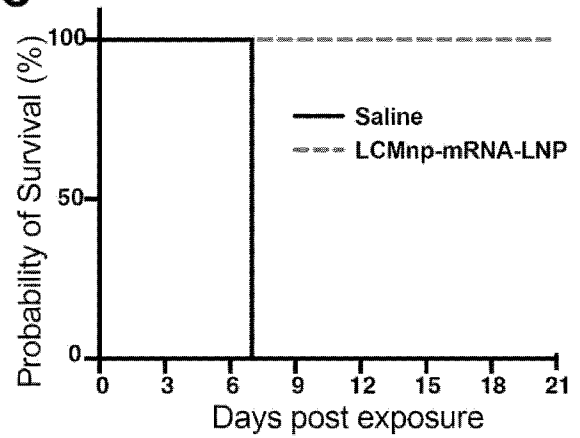
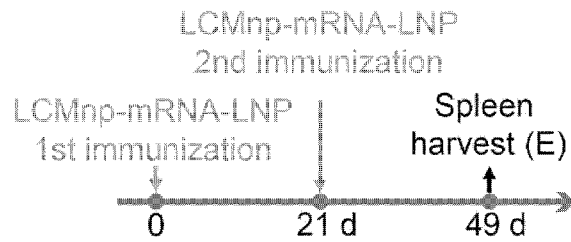
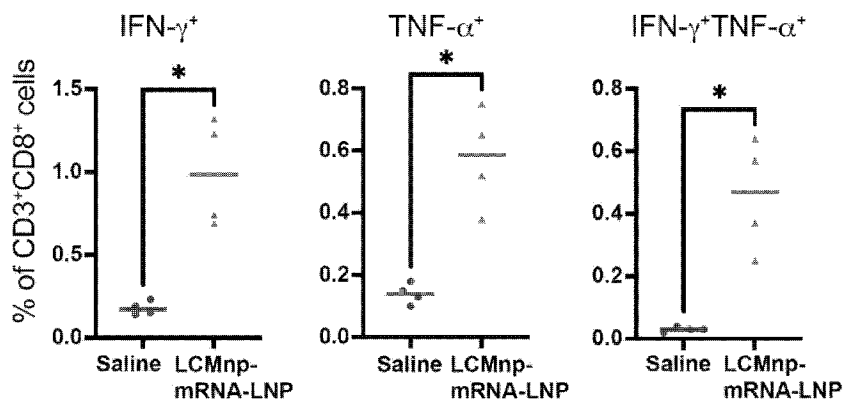
[Fig 4-1]

**C****D**

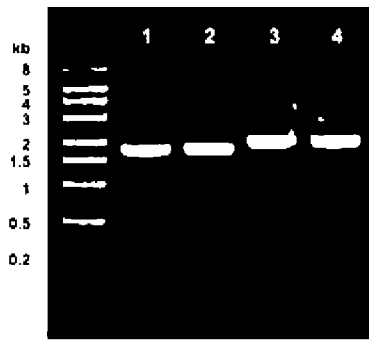
[Fig. 4-2]



[5]

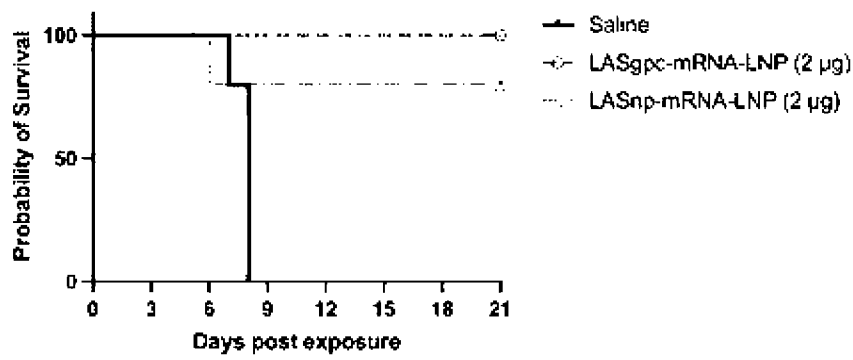
**A****B****C****D****E**

[図6]

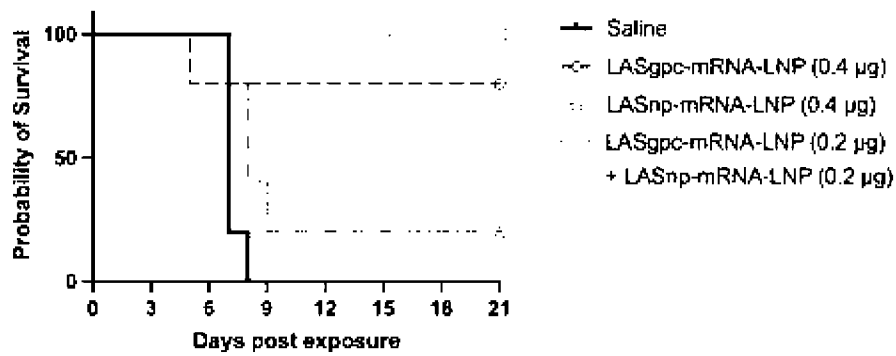


Lanes 1 and 2: LASgpc-mRNA  
Lanes 3 and 4: LASnp-mRNA

[図7]



[図8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/007794

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i FI: A61K31/7105; A61K31/7115; A61K39/12; A61P31/14; A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/7105; A61K31/7115; A61K39/12; A61P31/14; A61P37/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2019/0351044 A1 (CUREVAC AG) 21 November 2019 (2019-11-21) claims, paragraphs [0253]-[0309], examples	1-3, 5-15 4
Y A	KNUDSON, J. Cory et al., Lipid-nanoparticle-encapsulated mRNA vaccines induce protective memory CD8 T cells against a lethal viral infection, Molecular Therapy, 2021, vol. 29 no. 9, pp. 2769-2781, <a href="https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.011">https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.011</a> . abstract, p. 2769. left column, line 33 to p. 2770, left column, line 8, p. 2774, left column, line 3 to right column, line 12, p. 2777, left column, lines 1-6, fig. 5.F	1-3, 5-15 4
A	US 2020/0030432 A1 (MODERNATX, INC.) 30 January 2020 (2020-01-30) paragraphs [0011]-[0016], [0090], [0091], [0111], [0211], [0347]	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>03 April 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>23 April 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HASHIZUME, Mei et al., An mRNA-LNP-based Lassa virus vaccine induces protective immunity in mice, bioRxiv, 03 April 2023, pp. 1-37, doi: <a href="https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535313">https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535313</a> abstract	1-15
P, X	RONK, J. Adam et al., A Lassa virus mRNA vaccine confers protection but does not require neutralizing antibody in a guinea pig model of infection, Nature Communications, 12 September 2023, 14:5603, pp. 1-13, <a href="https://doi.org/10.1038/s41467-023-41376-6">https://doi.org/10.1038/s41467-023-41376-6</a> abstract	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2024/007794**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019/0351044	A1	21 November 2019	WO	2018/115525	A1	
US	2020/0030432	A1	30 January 2020	WO	2018/170347	A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i;                  A61P 37/04(2006.01)i                  FI: A61K31/7105; A61K31/7115; A61K39/12; A61P31/14; A61P37/04</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  A61K31/7105; A61K31/7115; A61K39/12; A61P31/14; A61P37/04</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table>			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
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									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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 A	US 2019/0351044 A1 (CUREVAC AG) 21.11.2019 (2019 - 11 - 21) 特許請求の範囲, [0253]-[0309], 実施例	1-3, 5-15 4								
Y A	KNUDSON J. Cory et al., Lipid-nanoparticle-encapsulated mRNA vaccines induce protective memory CD8 T cells against a lethal viral infection, Molecular Therapy, 2021, Vol. 29 No 9, pp.2769-2781, <a href="https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.011">https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.011</a> . Abstract, 第2769頁左欄33行目-第2770頁左欄8行目, 第2774頁左欄3行目-右欄12行目, 第2777頁左欄1-6行目, Figure 5.F	1-3, 5-15 4								
A	US 2020/0030432 A1 (MODERNATX, INC.) 30.01.2020 (2020 - 01 - 30) [0011]-[0016], [0090]-[0091], [0111], [0211], [0347]	1-15								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー                  “A” 特に関連のある文献ではなく、一般の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</p>										
<p>国際調査を完了した日 03.04.2024</p>		<p>国際調査報告の発送日 23.04.2024</p>								
<p>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</p>		<p>権限のある職員（特許庁審査官）                  愛清 哲 4C 1967                  電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>								

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
P, X	HASHIZUME Mei et al., An mRNA-LNP-based Lassa virus vaccine induces protective immunity in mice, bioRxiv, 2023.04.03, pp.1-37, doi: <a href="https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535313">https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535313</a> Abstract	1-15
P, X	RONK J. Adam et al., A Lassa virus mRNA vaccine confers protection but does not require neutralizing antibody in a guinea pig model of infection, Nature Communications, 2023.09.12, 14:5603, pp.1-13, <a href="https://doi.org/10.1038/s41467-023-41376-6">https://doi.org/10.1038/s41467-023-41376-6</a> Abstract	1-15

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/JP2024/007794

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2019/0351044 A1	21.11.2019	WO 2018/115525 A1	
US 2020/0030432 A1	30.01.2020	WO 2018/170347 A1	