(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7650873号
(P7650873)

(45)発行日　令和7年3月25日(2025.3.25)

(24)登録日　令和7年3月14日(2025.3.14)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7105
Ａ６１Ｋ　9/14　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/14
Ａ６１Ｋ　47/10　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/10
Ａ６１Ｋ　47/18　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/18
Ａ６１Ｋ　47/28　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/28

ＦＩ

請求項の数　57　（全62頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-521307(P2022-521307)
(86)(22)出願日　令和2年10月9日(2020.10.9)
(65)公表番号　特表2022-552286(P2022-552286A)
(43)公表日　令和4年12月15日(2022.12.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/054952
(87)国際公開番号　WO2021/072172
(87)国際公開日　令和3年4月15日(2021.4.15)
審査請求日　令和5年10月6日(2023.10.6)
(31)優先権主張番号　62/913,035
(32)優先日　令和1年10月9日(2019.10.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　517316797
トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１．ウォルサム．ウェスト・ストリート２００
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　コバー， クリスティアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　メッセンジャーＲＮＡの組成物、方法および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１つ以上の脂質ナノ粒子内に封入された、それぞれがタンパク質またはペプチドをコードする２つ以上のｍＲＮＡを含む、がんを治療するための方法で使用する組成物であって、前記方法は、それを必要とする対象に該組成物を投与することを含み、前記２つ以上のｍＲＮＡのうちの２つは、それぞれ、ＳＴＩＮＧとＩＬ－１２をコードする、組成物。

【請求項２】

前記２つ以上のｍＲＮＡが、第１の脂質ナノ粒子内に封入された第１のタンパク質またはペプチドをコードする第１のｍＲＮＡと、第２の脂質ナノ粒子に封入された第２のタンパク質またはペプチドをコードする第２のｍＲＮＡとを含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも３つのｍＲＮＡを含む、請求項１または２に記載の組成物。

【請求項４】

前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３ＬおよびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項１または２に記載の組成物。

【請求項５】

前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項１または２に記載の組成

物。
【請求項６】
前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項７】
前記ＳＴＩＮＧが、前記ＳＴＩＮＧの変異体型である、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記変異体型が、前記ＳＴＩＮＧが構成的活性型になることを可能にする、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記投与が、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記投与が、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、６０％超、７０％超、または８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物　。
【請求項１１】
前記投与が、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超、８５％超、または９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記組成物の前記投与が、対照と比較して、１５％未満、１０％未満、または５％未満の前記対象における体重の変化率をもたらす、請求項１～１１のいずれか一項に記載組成物。
【請求項１３】
前記対照が、治療を受けていない同等の疾患状態を有する対象である、請求項１０または１１に記載の組成物。
【請求項１４】
前記対照が、前記組成物の前記投与前の前記対象の体重である、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１５】
前記脂質ナノ粒子が、１種以上のカチオン性脂質、１種以上の非カチオン性脂質、および１種以上のＰＥＧ修飾脂質を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６】
前記脂質ナノ粒子が、コレステロールまたは１種以上のコレステロールベースの脂質をさらに含む、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記第１の脂質ナノ粒子が、第１のカチオン性脂質を含み、前記第２の脂質ナノ粒子が、第２のカチオン性脂質を含み、前記第１のカチオン性脂質が、前記第２のカチオン性脂質とは異なる、請求項２に記載の組成物。
【請求項１８】
前記組成物が、腫瘍内投与されることを特徴とする、請求項１～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９】
前記組成物が、皮下投与されることを特徴とする、請求項１～１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０】
前記組成物が、皮内投与されることを特徴とする、請求項１～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１】
前記組成物が、静脈内投与されることを特徴とする、請求項１～２０のいずれか一項に

記載の組成物。
【請求項２２】
前記組成物が、肺内投与によって投与されることを特徴とする、請求項１～２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】
前記組成物が、噴霧によって投与される、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２４】
前記投与が、単回用量を注射することを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
前記投与が、複数回用量を定期的に注射することを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６】
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ～１００ｍｇのｍＲＮＡの範囲である、請求項２４または２５に記載の組成物。
【請求項２７】
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ～５０ｍｇ、０．１μｇ～２５ｍｇ、０．１μｇ～１０ｍｇ、１μｇ～１ｍｇ、または１μｇ～１００μｇのｍＲＮＡの範囲である、請求項２４または２５に記載の組成物。
【請求項２８】
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ、０．３μｇ、０．５μｇ、１μｇ、５μｇ、１０μｇ、２５μｇ、５０μｇ、または１００μｇから選択される、請求項２４または２５に記載の組成物。
【請求項２９】
前記単回用量または前記複数回用量が、０．０１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である、請求項２４または２５に記載の組成物。
【請求項３０】
前記単回用量または前記複数回用量が、０．０１μｇ／ｋｇ～８ｍｇ／ｋｇ、０．０１μｇ／ｋｇ～６ｍｇ／ｋｇ、０．０１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、または０．１μｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である、請求項２４または２５に記載の組成物。
【請求項３１】
前記複数回用量の各々が、同じ投薬量のｍＲＮＡを含む、請求項２５～３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２】
前記複数回用量の各々が、異なる投薬量のｍＲＮＡを含む、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
前記複数回用量の各々が、１日～３週間の間隔を空けて注射される、請求項２５～３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記複数回用量の各々が、毎週注射される、請求項２５～３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記ｍＲＮＡが、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～３４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６】
前記ｍＲＮＡが、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）および／または３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）を含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項３７】
前記組成物の前記投与が、前記対象においてＴ細胞を活性化する、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
前記対象に、チェックポイント阻害剤を含む組成物と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項１～３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
前記対象に、チェックポイント阻害剤を含む組成物が投与されないことを特徴とする、請求項１～３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０】
前記チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４１】
１つ以上の脂質ナノ粒子が、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－００，ＯＦ－０１、ＯＦ－０２，およびＯＦ－０３から選択されるカチオン性脂質を含む少なくとも１つの脂質ナノ粒子を含む、請求項１～４０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
ＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする、少なくとも２つのｍＲＮＡを含む医薬組成物であって、前記少なくとも２つのｍＲＮＡが１つ以上の脂質ナノ粒子内に封入され、前記少なくとも１つ以上の脂質ナノ粒子は、それぞれ、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロールベースの脂質、およびＰＥＧ修飾脂質を含み、そして、前記少なくとも１つ以上の脂質ナノ粒子の少なくとも１つは、カチオン性脂質として、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－００、ＯＦ－０１、ＯＦ－０２、またはＯＦ－０３を含む、医薬組成物。
【請求項４３】
前記組成物が、チェックポイント阻害剤をコードする追加のｍＲＮＡをさらに含む、請求項４２に記載の医薬組成物。
【請求項４４】
前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも３つのｍＲＮＡを含む、請求項４２または４３に記載の医薬組成物。
【請求項４５】
前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３Ｌ、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項４２または４３に記載の医薬組成物。
【請求項４６】
前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項４２または４３に記載の医薬組成物。
【請求項４７】
前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、請求項４２または４３に記載の医薬組成物。
【請求項４８】
前記ＳＴＩＮＧが、前記ＳＴＩＮＧの変異体型である、請求項４２～４７のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項４９】
前記変異体型が、前記ＳＴＩＮＧが構成的活性型になることを可能にする、請求項４８に記載の医薬組成物。
【請求項５０】

免疫反応を調節しないタンパク質またはペプチドをコードする追加のｍＲＮＡをさらに含む、請求項４２～４９のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５１】
前記チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する、請求項４３～５０のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５２】
第２の脂質ナノ粒子であって、ｃＫＫ－Ｅ１２を含まず、かつ、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２４）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、第２の脂質ナノ粒子をさらに含む、請求項４２～５１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５３】
前記投与が、アスコパル（ａｓｃｏｐａｌ）効果をもたらす、請求項１～４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５４】
前記投与が、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５５】
前記投与が、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、６０％超、７０％超、または８０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５６】
前記投与が、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超、８５％超、または９０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５７】
前記投与が、がんを有する対象の生存を増加させる、請求項１～４１または５３～５６のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年１０月９日に出願された米国仮特許出願第６２／９１３，０３５号に対するその利益および優先権を主張するものであり、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
がんは、世界の多くの地域で最も一般的な死因であり、毎年２５０万人を超えるがん症例が世界中で診断されている。がんの分子生物学的な理解における最近の進歩は、がんが、罹患細胞の異常な増殖を引き起こす遺伝的障害であることを示している。手術、化学療法、放射線療法、遺伝子療法、ならびに小分子およびタンパク質分子を含む、多くのがん

治療が存在する。しかしながら、これらの治療は、多くの場合、細胞標的との非特異的な相互作用によって機能し、望ましくない副作用を引き起こし、疾患の根本を治療しない。がんは、現在利用可能な治療法に対して依然として高い耐性を示す。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００３】

本発明は、がんの治療のための改善されたｍＲＮＡ治療薬を提供する。特に、本明細書に記載の方法は、がん免疫療法（ｉｍｍｕｎｅ－ｏｎｃｏｌｏｇｙ）に有用な、免疫調節タンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡの効果的なインビボ送達を提供する。

【０００４】

一態様では、本発明は、とりわけ、がんを治療する方法であって、腫瘍のサイズが低減するまたは腫瘍の増殖が阻害されるような有効用量および投与間隔で脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡを含む組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与することを含む、方法を提供する。

【０００５】

別の態様では、本発明は、がんを治療する方法であって、腫瘍のサイズが低減するまたは腫瘍の増殖が阻害されるような有効用量および投与間隔で、１つ以上の脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドを各々コードする２つ以上のｍＲＮＡを含む組成物を、がんの治療を必要とする対象に、投与することを含み、２つ以上のｍＲＮＡのうちの少なくとも２つは、各々、他のｍＲＮＡとは異なるタンパク質またはペプチドをコードする、方法を提供する。

【０００６】

いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡは、第１の脂質ナノ粒子内に封入された第１のタンパク質またはペプチドをコードする第１のｍＲＮＡと、第２の脂質ナノ粒子で封入された第２のタンパク質またはペプチドをコードする第２のｍＲＮＡとを含む。

【０００７】

いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドのうちの少なくとも１つは、免疫反応を調節する。いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドのうちの少なくとも１つは、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１５、ＳＴＩＮＧ、ＭＣＰ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＬＴ－３Ｌ、ＮＬＲＰ３、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＮＬＲＰ１、ＣＣＬ５、またはそれらの組み合わせである。

【０００８】

いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡのうちの２つは、それぞれＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする。いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡは、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも３つのｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡは、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３Ｌ、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡは、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、２つ以上のｍＲＮＡは、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ＳＴＩＮＧは、ＳＴＩＮＧの変異体型である。いくつかの実施形態では、変異体形態は、ＳＴＩＮＧが構成的活性型になることを可能にする。

【００１０】

いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドのうちの少なくとも１つは、免疫反応を調節しない。

【００１１】

いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１

０日後に対照と比較して、６０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、７０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。

【００１２】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、１５％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、１０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、５％未満の対象における体重の変化率をもたらす。

【００１３】

いくつかの実施形態では、対照は、治療をしていない同等の疾患状態を有する対象である。いくつかの実施形態では、対照は、組成物の投与前の対象の体重である。

【００１４】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上の非カチオン性脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、コレステロールまたは１種以上のコレステロールベースの脂質を含む。

【００１５】

いくつかの実施形態では、第１の脂質ナノ粒子は、第１のカチオン性脂質を含み、第２の脂質ナノ粒子は、第２のカチオン性脂質を含み、第１のカチオン性脂質は、第２のカチオン性脂質とは異なる。

【００１６】

いくつかの実施形態では、１種以上のカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２４）、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、１種以上のカチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１２を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、組成物は、腫瘍内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、皮下投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、皮内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、肺内投与によって投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、噴霧によって投与される。

【００１８】

いくつかの実施形態では、方法は、単回用量を注射することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数回用量を定期的に注射することを含む。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ～１００ｍｇのｍＲＮＡの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ～５０ｍｇのｍＲＮＡ

の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ～２５ｍｇのｍＲＮＡの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ～１０ｍｇのｍＲＮＡの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１μｇ～１ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１μｇ～１００μｇのｍＲＮＡの範囲である。

【００１９】

いくつかの実施形態では、単回用量は、０．１μｇであるか、または複数回用量は、０．１μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、０．３μｇであるか、または複数回用量は、０．３μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、０．５μｇであるか、または複数回用量は、０．５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、１μｇであるか、または複数回用量は、１μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、５μｇであるか、または複数回用量は、５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、１０μｇであるか、または複数回用量は、１０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、２５μｇであるか、または複数回用量は、２５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、５０μｇであるか、または複数回用量は、５０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量は、１００μｇであるか、または複数回用量は、１００μｇである。

【００２０】

いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．０１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．０１μｇ／ｋｇ～８ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．０１μｇ／ｋｇ～６ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．０１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、約０．１μｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である。

【００２１】

いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、同じ投薬量のｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、異なる投薬量のｍＲＮＡを含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、１日～３週間の間隔で注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、毎日注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、３日間隔で注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、毎週注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、１０日間隔で注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、隔週で注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、毎月注射される。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、隔月で注射される。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）および／または３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）を含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対象においてＴ細胞を活性化する。いくつかの実施形態では、方法は、チェックポイント阻害剤を含む組成物を対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、チェックポイント阻害剤を含む組成物を対象に投与することを含まない。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は

、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ１を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ－４を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、Ｂ７を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＢＴＬＡを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＨＶＥＭを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＴＩＭ－３を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＧＡＬ－９を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＬＡＧ３を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＶＩＳＴＡを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＫＩＲを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、２Ｂ４を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＣＤ１６０を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＣＧＥＮ－１５０４９を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤はＣＨＫ１を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＣＨＫ２を阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、Ａ２ａＲを阻害する。

【００２５】

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、同じ脂質ナノ粒子内に封入される。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、別個の脂質ナノ粒子内に封入される。

【００２６】

一態様では、本発明は、がんを治療するための医薬組成物を提供し、それぞれＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１５、ＳＴＩＮＧ、ＭＣＰ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＬＴ－３Ｌ、ＮＬＲＰ３、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＮＬＲＰ１、ＣＣＬ５、またはそれらの組み合わせをコードする１つ以上のｍＲＮＡを含み、この１つ以上のｍＲＮＡは、カチオン性脂質としてｃＫＫ－Ｅ１２を含む少なくとも１つの脂質ナノ粒子を含む１種以上の脂質ナノ粒子内に封入される。

【００２７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３Ｌ、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。

【００２８】

いくつかの実施形態では、組成物は、チェックポイント阻害剤をコードする追加のｍＲＮＡをさらに含む。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する。

【００２９】

いくつかの実施形態では、方法は、アスコパル（ａｓｃｏｐａｌ）効果をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、アブスコパル効果をもたらす。

【００３０】

いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす。

【００３１】

いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、６０

％超、７０％超、または８０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす。
【００３２】
いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超、８５％超、または９０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす。
【００３３】
いくつかの実施形態では、方法は、がんを有する対象の生存を増加させる。
【００３４】
図面は、例示を目的とするものであり、限定するためのものではない。
本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。
（項目１）
がんを治療する方法であって、腫瘍のサイズが低減するまたは腫瘍の増殖が阻害されるような有効用量および投与間隔で、脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡを含む組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。
（項目２）
がんを治療する方法であって、腫瘍のサイズが低減するまたは腫瘍の増殖が阻害されるような有効用量および投与間隔で、１つ以上の脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドを各々コードする２つ以上のｍＲＮＡを含む組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与することを含み、前記２つ以上のｍＲＮＡのうちの少なくとも２つは、各々、他のｍＲＮＡとは異なるタンパク質またはペプチドをコードする、方法。
（項目３）
前記２つ以上のｍＲＮＡが、第１の脂質ナノ粒子内に封入された第１のタンパク質またはペプチドをコードする第１のｍＲＮＡと、第２の脂質ナノ粒子に封入された第２のタンパク質またはペプチドをコードする第２のｍＲＮＡとを含む、項目２に記載の方法。
（項目４）
前記タンパク質または前記ペプチドのうちの少なくとも１つが、免疫反応を調節する、項目１～３のいずれか一項に記載の方法。
（項目５）
前記タンパク質または前記ペプチドが、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１５、ＳＴＩＮＧ、ＭＣＰ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＬＴ－３Ｌ、ＮＬＲＰ３、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＮＬＲＰ１、ＣＣＬ５、またはそれらの組み合わせである、項目４に記載の方法。
（項目６）
前記２つ以上のｍＲＮＡのうち２つが、それぞれＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする、項目２または３に記載の方法。
（項目７）
前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも３つのｍＲＮＡを含む、項目２または３に記載の方法。
（項目８）
前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３ＬおよびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目２または３に記載の方法。
（項目９）
前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目２または３に記載の方法。
（項目１０）
前記２つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目２または３に記載の方法。
（項目１１）
前記ＳＴＩＮＧが、前記ＳＴＩＮＧの変異体型である、項目５～１０のいずれか一項に記載の方法。

（項目１２）
前記変異体型が、前記ＳＴＩＮＧが構成的活性型になることを可能にする、項目１１に記載の方法。
（項目１３）
前記タンパク質またはペプチドのうちの少なくとも１つが、免疫反応を調節しない、項目１～１２のいずれか一項に記載の方法。
（項目１４）
前記方法が、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目１～１３のいずれか一項に記載の方法。
（項目１５）
前記方法が、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、６０％超、７０％超、または８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目１～１４のいずれか一項に記載の方法。
（項目１６）
前記方法が、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超、８５％超、または９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目１～１５のいずれか一項に記載の方法。
（項目１７）
前記組成物の前記投与が、対照と比較して、１５％未満、１０％未満、または５％未満の前記対象における体重の変化率をもたらす、項目１～１６のいずれか一項に記載の方法。
（項目１８）
前記対照が、治療を受けていない同等の疾患状態を有する対象である、項目１５または１６に記載の方法。
（項目１９）
前記対照が、前記組成物の前記投与前の前記対象の体重である、項目１７に記載の方法。
（項目２０）
前記脂質ナノ粒子が、１種以上のカチオン性脂質、１種以上の非カチオン性脂質、および１種以上のＰＥＧ修飾脂質を含む、項目１～１９のいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
前記脂質ナノ粒子が、コレステロールまたは１種以上のコレステロールベースの脂質をさらに含む、項目２０に記載の方法。
（項目２２）
前記第１の脂質ナノ粒子が、第１のカチオン性脂質を含み、前記第２の脂質ナノ粒子が、第２のカチオン性脂質を含み、前記第１のカチオン性脂質が、前記第２のカチオン性脂質とは異なる、項目３に記載の方法。
（項目２３）
前記組成物が、腫瘍内投与される、項目１～２２のいずれか一項に記載の方法。
（項目２４）
前記組成物が、皮下投与される、項目１～２３のいずれか一項に記載の方法。
（項目２５）
前記組成物が、皮内投与される、項目１～２４のいずれか一項に記載の方法。
（項目２６）
前記組成物が、静脈内投与される、項目１～２５のいずれか一項に記載の方法。
（項目２７）
前記組成物が、肺内投与によって投与される、項目１～２６のいずれか一項に記載の方法。
（項目２８）
前記組成物が、噴霧によって投与される、項目１～２７のいずれか一項に記載の方法。
（項目２９）
前記方法が、単回用量を注射することを含む、項目１～２８のいずれか一項に記載の方法。
（項目３０）

前記方法が、複数回用量を定期的に注射することを含む、項目１～２８のいずれか一項に記載の方法。
（項目３１）
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ～１００ｍｇのｍＲＮＡの範囲である、項目２９または３０に記載の方法。
（項目３２）
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ～５０ｍｇ、０．１μｇ～２５ｍｇ、０．１μｇ～１０ｍｇ、１μｇ～１ｍｇ、または１μｇ～１００μｇのｍＲＮＡの範囲である、項目２９または３０に記載の方法。
（項目３３）
前記単回用量または前記複数回用量が、０．１μｇ、０．３μｇ、０．５μｇ、１μｇ、５μｇ、１０μｇ、２５μｇ、５０μｇ、または１００μｇから選択される、項目２９または３０に記載の方法。
（項目３４）
前記単回用量または前記複数回用量が、０．０１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である、項目２９または３０に記載の方法。
（項目３５）
前記単回用量または前記複数回用量が、０．０１μｇ／ｋｇ～８ｍｇ／ｋｇ、０．０１μｇ／ｋｇ～６ｍｇ／ｋｇ、０．０１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇ、または０．１μｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇ（ｍＲＮＡ／体重）の範囲である、項目２９または３０に記載の方法。
（項目３６）
前記複数回用量の各々が、同じ投薬量のｍＲＮＡを含む、項目３０～３５のいずれか一項に記載の方法。
（項目３７）
前記複数回用量の各々が、異なる投薬量のｍＲＮＡを含む、項目３０～３６のいずれか一項に記載の方法。
（項目３８）
前記複数回用量の各々が、１日～３週間の間隔を空けて注射される、項目３０～３７のいずれか一項に記載の方法。
（項目３９）
前記複数回用量の各々が、毎週注射される、項目３０～３８のいずれか一項に記載の方法。
（項目４０）
前記ｍＲＮＡが、１つ以上の修飾ヌクレオチドを含む、項目１～３９のいずれか一項に記載の方法。
（項目４１）
前記ｍＲＮＡが、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）および／または３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）を含む、項目１～４０のいずれか一項に記載の方法。
（項目４２）
前記組成物の前記投与が、前記対象においてＴ細胞を活性化する、項目１～４１のいずれか一項に記載の方法。
（項目４３）
前記方法が、前記対象に、チェックポイント阻害剤を含む組成物を投与することをさらに含む、項目１～４２のいずれか一項に記載の方法。
（項目４４）
前記方法が、前記対象に、チェックポイント阻害剤を含む組成物を投与することを含まない、項目１～４２のいずれか一項に記載の方法。
（項目４５）
前記チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ

、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する、項目４２に記載の方法。

（項目４６）

がんを治療するための医薬組成物であって、それぞれＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１５、ＳＴＩＮＧ、ＭＣＰ－３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＬＴ－３Ｌ、ＮＬＲＰ３、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＮＬＲＰ１、ＣＣＬ５、またはそれらの組み合わせを各々コードする、１つ以上のｍＲＮＡを含み、前記１つ以上のｍＲＮＡが、カチオン性脂質として、ｃＫＫ－Ｅ１２を含む少なくとも１つの脂質ナノ粒子を含む１つ以上の脂質ナノ粒子内に封入される、医薬組成物。

（項目４７）

前記組成物が、チェックポイント阻害剤をコードする追加のｍＲＮＡをさらに含む、項目４６に記載の医薬組成物。

（項目４８）

前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする少なくとも２つのｍＲＮＡを含む、項目４６または４７に記載の医薬組成物。

（項目４９）

前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも３つのｍＲＮＡを含む、項目４６または４７に記載の医薬組成物。

（項目５０）

前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３Ｌ、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目４６または４７に記載の医薬組成物。

（項目５１）

前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目４６または４７に記載の医薬組成物。

（項目５２）

前記１つ以上のｍＲＮＡが、それぞれＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする少なくとも４つのｍＲＮＡを含む、項目４６または４７に記載の医薬組成物。

（項目５３）

前記ＳＴＩＮＧが、前記ＳＴＩＮＧの変異体型である、項目４６～５２のいずれか一項に記載の医薬組成物。

（項目５４）

前記変異体型が、前記ＳＴＩＮＧが構成的活性型になることを可能にする、項目５３に記載の医薬組成物。

（項目５５）

免疫反応を調節しないタンパク質またはペプチドをコードする追加のｍＲＮＡをさらに含む、項目４６～５４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

（項目５６）

前記チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する、項目４７～５５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

（項目５７）

前記脂質ナノ粒子が、１つ以上の非カチオン性脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質をさらに含む、項目４６～５６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

（項目５８）

コレステロールまたはコレステロールベースの脂質をさらに含む、項目５７のいずれか

一項に記載の医薬組成物。
（項目５９）
第２の脂質ナノ粒子であって、ｃＫＫ－Ｅ１２を含まず、かつ、ＯＦ－０２、Ｃ１２－２００、ＭＣ３、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎｋＣ２ＤＭＡ、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ４００３、ＤＯＤＡＣ、ＤＤＡＢ、ＤＭＲＩＥ、ＤＯＳＰＡ、ＤＯＧＳ、ＤＯＤＡＰ、ＤＯＤＭＡおよびＤＭＤＭＡ、ＤＯＤＡＣ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＭＲＩＥ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、３－（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）－６－（４－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ブチル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２３）、３－（５－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－６－（５－（（２－ヒドロキシドデシル）（２－ヒドロキシウンデシル）アミノ）ペンタン－２－イル）－１，４－ジオキサン－２，５－ジオン（ターゲット２４）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、第２の脂質ナノ粒子をさらに含む、項目４６～５８のいずれか一項に記載の医薬組成物。
（項目６０）
前記方法が、アスコパル（ａｓｃｏｐａｌ）効果をもたらす、項目１～４５のいずれか一項に記載の方法。
（項目６１）
前記方法が、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目６０に記載の方法。
（項目６２）
前記方法が、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、６０％超、７０％超、または８０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目６０に記載の方法。
（項目６３）
前記方法が、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超、８５％超、または９０％超の未治療腫瘍の腫瘍増殖阻害率をもたらす、項目６０に記載の方法。
（項目６４）
前記方法が、がんを有する対象の生存を増加させる、項目１～４５または６０～６３のいずれか一項に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１】インビボでの抗腫瘍活性における様々なｍＲＮＡ－ＬＮＰの有効性に関する比較データを示すグラフである。表２に示すような用量および頻度に従って、ＭＣ３８マウスへのｍＲＮＡ－ＬＮＰの腫瘍内投与後、試験全体を通して各群の平均腫瘍体積を測定した。
【図２】対照群であるＡ群と比較した、Ｂ～Ｉ群の平均腫瘍体積パーセントを示すグラフである。
【図３】対照群であるＡ群と比較した、Ｂ～Ｉ群の腫瘍体積の平均阻害率を示すグラフである。
【図４】４６日目の各群における個々のマウスの腫瘍体積を示す散布図である。各群の平均腫瘍体積が示されている。
【図５Ａ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｂ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。

【図５Ｃ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｄ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｅ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｆ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｇ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｈ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図５Ｉ】各々Ａ群（図５Ａ）、Ｂ群（図５Ｂ）、Ｃ群（図５Ｃ）、Ｄ群（図５Ｄ）、Ｅ群（図５Ｅ）、Ｆ群（図５Ｆ）、Ｇ群（図５Ｇ）、Ｈ群（図５Ｈ）、およびＩ群（図５Ｉ）の個々のマウスの腫瘍体積（mm^3）を示す一連の表である。平均値および標準偏差値が、最後の２行に示される。空白は死亡を示す。各群の標本サイズは１０であった。
【図６】１日目の体重と比較した、試験期間中の体重の平均変化率を示すグラフである。
【図７】脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ　ｍＲＮＡ、陰性対照、またはビヒクル対照をＭＣ３８マウスがんモデルマウスに投与した後の腫瘍増殖を示すグラフである。
【図８】１）脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ　ｍＲＮＡおよび抗ＰＤ－１抗体、２）陰性対照ｍＲＮＡおよび抗ＰＤ－１抗体、または３）ビヒクル対照を投与されたＭＣ３８がんマウスと比較する、１）脂質封入、構成的活性型ＳＴＩＮＧ　ｍＲＮＡおよびアイソタイプ対照抗体、２）陰性対照ｍＲＮＡおよびアイソタイプ対照抗体、または３）ビヒクル対照の投与後のＭＣ３８がんマウスの生存を示す一連のグラフである。
【００３６】
定義
本発明がより容易に理解されるように、ある特定の用語を最初に以下に定義する。以下の用語および他の用語の追加の定義は、明細書全体を通して定められている。
【００３７】
動物：本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発育段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」とは、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および／またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物には、哺乳動物、鳥、爬虫類、両生類、魚、昆虫、および／または寄生虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、および／またはクローンであり得る。
【００３８】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、目的とする１つ以上の値に適用される「およそ」または「約」という用語は、明記された参照値と同様の値を指す。ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段明記されない限り、または文脈から別段明らかでない限り（そのような数が、可能性のある値の１００％を超える場合を除いて）、明記された参照値のいずれかの方向（より大きいかまたはより小さい）で、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満内に収まる値の範囲を指す。

【００３９】

送達：本明細書で使用される際に、「送達」という用語は、局所送達および全身送達の両方を包含する。例えば、ｍＲＮＡの送達は、ｍＲＮＡが標的組織に送達され、そのコードされたタンパク質が発現され、そしてその標的組織内で保持される状況（「局所分布」または「局所送達」とも称される）、ｍＲＮＡが標的組織に送達され、そのコードされたタンパク質が発現され、そして患者の循環系（例えば、血清）内に分泌され、そして全身に分布され、他の組織によって取り込まれる状況（「全身分布」または「全身送達」とも称される）を包含する。

【００４０】

封入：本明細書で使用される場合、「封入」という用語、または文法的等価物は、ナノ粒子内に個々のｍＲＮＡ分子を閉じ込めるプロセスを指す。

【００４１】

発現：本明細書で使用される場合、核酸配列の「発現」とは、ｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳、複数のポリペプチドのインタクトなタンパク質（例えば、酵素）への集合、および／またはポリペプチドもしくは完全に集合したタンパク質（例えば、酵素）の翻訳後修飾を指す。この用途において、用語「発現」および「産生」ならびに文法的等価物は互換的に使用される。

【００４２】

半減期：本明細書で使用される場合、用語「半減期」は、核酸またはタンパク質の濃度または活性などの量が、ある期間の開始時に測定された値の半分まで下がるのに要する時間である。

【００４３】

改善する、増加させる、または低減する：本明細書で使用される場合、「改善する」、「増加させる」、もしくは「低減させる」、または文法的同義語は、ベースライン測定、例えば、本明細書に記載の治療の開始前の同じ個体における測定、または本明細書に記載の治療の不在下での対照対象（または複数の対照対象）における測定と比較した値を示す。「対照対象」とは、治療されている対象と同じ疾患形態に罹患しており、治療されている対象とほぼ同じ年齢の対象である。

【００４４】

インビトロ：本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、多細胞生物内というよりむしろ、人工環境下で、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養下などで生じる事象を指す。

【００４５】

インビボ：本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。細胞型系の文脈において、該用語は、生細胞内で生じる事象を意味するのに（例えば、インビトロ系の対語として）使用され得る。

【００４６】

局所分布または局所送達：本明細書において使用される場合、「局所分布」、「局所送達」という用語、または文法的等価物は、組織特異的な送達または分布を指す。典型的には、局所分布または局所送達は、細胞内で翻訳および発現される、または分泌が限定的で、患者の循環系へ入ることを回避する、ｍＲＮＡにコードされるタンパク質（例えば酵素）を必要とする。

【００４７】
メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）：本明細書で使用される場合、「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」という用語は、少なくとも１つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。本明細書で使用されるｍＲＮＡは、修飾および未修飾の両方のＲＮＡを包含する。ｍＲＮＡは１つ以上のコード領域および非コード領域を含み得る。ｍＲＮＡは、自然源から精製されてもよく、組換え発現系を用いて産生されてもよく、また任意選択的に精製、化学合成などをされてもよい。必要に応じて、例えば、化学合成された分子の場合、ｍＲＮＡは、化学修飾された塩基または糖類、骨格修飾などを有する類似体といった、ヌクレオシド類似体を含み得る。ｍＲＮＡ配列は、別途指示されない限り、５’から３’の方向に提示される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、天然のヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）；ヌクレオシド類似体（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ－５プロピニル－シチジン、Ｃ－５プロピニル－ウリジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、および２－チオシチジン）；化学的に修飾された塩基；生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）；介在塩基（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｅｄ　ｂａｓｅ）；修飾された糖類（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）；ならびに／または修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエートおよび５’－Ｎ－ホスホルアミダイト結合）を含む。
【００４８】
患者：本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、例えば、実験、診断、予防、美容、および／または治療目的のために、提供される組成物が投与され得る任意の生物を指す。典型的な患者には、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、および／またはヒトなどの哺乳動物）が含まれる。いくつかの実施形態では、患者は、ヒトである。ヒトには、出生前形態および出生後形態が含まれる。
【００４９】
薬学的に許容される：本明細書で使用される際に、用語「薬学的に許容される」は、妥当な医学的判断の範囲内で、過度な毒性、炎症刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、合理的なベネフィット／リスクの比率に相応で、ヒトおよび動物の組織に接触させて使用することに適した物質を指す。
【００５０】
対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を指す。ヒトには、出生前形態および出生後形態が含まれる。多くの実施形態では、対象は、ヒトである。対象は、患者であり得、疾患の診断または治療のために医療提供者を受診するヒトを指す。「対象」という用語は、本明細書で「個体」または「患者」と互換的に使用される。対象は、疾患または障害に罹患し得るか、またはそれに罹り易いが、疾患または障害の症状を呈する場合も呈さない場合もある。
【００５１】
実質的に：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、目的とする特徴または特性の全またはほぼ全範囲または程度を呈する質的状態を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的および化学的現象が、完了すること、および／または完了に至ること、または絶対的結果を達成もしくは回避することが、仮にあったとしてもめったにないことを理解するであろう。したがって、用語「実質的に」は、本明細書において、多くの生物学的および化学的現象に固有の潜在的な完全性の欠如を捉えるのに用いられる。
【００５２】
全身分布または全身送達：本明細書で使用される場合、「全身分布」、「全身送達」と

いう用語、または文法的同義語は、全身または生物全体に影響する送達または分布機構またはアプローチを指す。典型的には、全身分布または全身送達は、身体の循環系、例えば、血流を介して成し遂げられる。「局所分布または局所送達」の定義と比較される。

【００５３】

標的組織：本明細書で使用される場合、「標的組織」という用語は、治療される疾患に影響される任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織には、疾患に関連する病態、症状、または特徴を呈する組織が含まれる。

【００５４】

治療有効量：本明細書で使用される場合、治療薬の「治療有効量」という用語は、疾患、障害、および／または状態に罹患しているか、またはそれに罹り易い対象に投与されたときに、その疾患、障害、および／または状態の症状を治療する、診断する、予防する、および／またはその発症を遅延させるのに十分な量を意味する。当業者であれば、治療有効量が、典型的には、少なくとも１つの単位用量を含む投薬レジメンにより投与されることを理解する。

【００５５】

治療すること：本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、または「治療すること」という用語は、特定の疾患、障害、および／もしくは状態の１つ以上の症状もしくは特徴を部分的にまたは完全に緩和する、改善する、軽減する、抑制する、予防する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、および／またはその発生率を低減するために使用される任意の方法を指す。治療は、疾患の徴候を呈していない対象、および／または疾患の初期の徴候のみを呈している対象に、その疾患に関連する病態を発症させるリスクを減少させることを目的として施され得る。

【発明を実施するための形態】

【００５６】

本発明は、がんの治療のための改善されたｍＲＮＡ治療薬を提供する。特に、本明細書に開示される方法は、有効用量および投与間隔にて、免疫反応を直接的または間接的に調節するタンパク質またはペプチドをコードする１つ以上のｍＲＮＡを含む組成物を投与することによって、それを必要とする対象における腫瘍のサイズ、質量、および／または体積を低減または減少させるか、または腫瘍増殖を阻害または遅延させるのに有効である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、生存を増加させる。

【００５７】

本発明の様々な態様は、以下のセクションで詳細に記載される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味しない。各セクションは、本発明の任意の態様に適用することができる。本出願において、「または」の使用は、別段の記述がない限り、「および／または」を意味する。

【００５８】

がん

がん細胞は、非がん性細胞または組織によっては一般的に発現しない抗原を発現する。これらのがん抗原は、ウイルス抗原と同様の様式で、すなわち抗原を異質として分類するＭＨＣ－１分子と関連して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって提示されないが、細胞傷害性Ｔ細胞は、変異型自己抗原を分化し特定することが可能で、変異型抗原を有する細胞を捜して破壊する固有の特性を有する。したがって、がんの免疫療法の１つの目的は、変異型抗原に対して向けられる細胞傷害性Ｔ細胞の最適な活性化を達成することである。本発明による方法および組成物は、腫瘍細胞を破壊するために必要な免疫反応を生成するために、対象自身の細胞傷害性Ｔ細胞を誘導するのに有効である。

【００５９】

正常な組織の恒常性は、高度に制御された細胞増殖および細胞死のプロセスである。細胞または細胞死の増殖の不均衡は、がん性状態となり得る（Ｓｏｌｙａｎｉｋｅｔ ａｌ．，１９９５、Ｓｔｏｋｋｅｅｔ ａｌ．，１９９７、Ｍｕｍｂｙａｎｄ Ｗａｌｔｅｒ，１９９１、Ｎａｔｏｌｉｅｔ ａｌ．，１９９８、Ｍａｇｉ－Ｇａｌｌｕｚｚｉｅｔ ａｌ

．，１９９８）。例えば、子宮頸がん、腎臓がん、肺がん、膵がん、結腸直腸がんおよび脳がんは、発生する可能性のある多くのがんのほんの一例である（Ｅｒｌａｎｄｓｓｏｎ，１９９８、Ｋｏｌｍｅｌ，１９９８、Ｍａｎｇｒａｙａｎｄ Ｋｉｎｇ，１９９８、Ｇｅｒｔｉｇ ａｎｄ Ｈｕｎｔｅｒ，１９９７、Ｍｏｕｇｉｎｅｔ ａｌ．，１９９８）。実際にはがんの発生は非常に高いため、米国では年間５０万人以上の死者が、がんに起因する。

【００６０】

細胞増殖および細胞死の維持は、がん原遺伝子によって少なくとも部分的に調節されている。がん原遺伝子は、細胞増殖を誘導するタンパク質（例えば、ｓｉｓ、ｅｒｂＢ、ｓｒｃ、ｒａｓおよびｍｙｃ）、細胞増殖を阻害するタンパク質（例えば、Ｒｂ、ｐ５３、ＮＦ１およびＷＴ１）、またはプログラム細胞死（例えばｂｃｌ－２）を調節するタンパク質をコードすることができる（Ｏｃｈｉｅｔ ａｌ．，１９９８、Ｊｏｈｎｓｏｎ ａｎｄ Ｈａｍｄｙ，１９９８、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎｎｅｔ ａｌ．，１９９８）。しかしながら、これらのがん原遺伝子に対する遺伝子再配列または変異は、がん原遺伝子をがんを引き起こす強力ながん遺伝子に変換させる。多くの場合、単一の点変異が、がん原遺伝子をがん遺伝子に変換するのに十分である。例えば、Ｋ－ｒａｓ遺伝子におけるコドン１２または１３の変異は、がん原遺伝子をがん遺伝子に変換することができる。

【００６１】

現在、多くの一般的ながんの治療に有効な選択肢はほとんどない。特定の個人に対する治療の方針は、診断、疾患が発症した段階、および患者の年齢、性別および全体的な健康などの要因によって異なる。がん治療の最も通常の選択肢は、手術、放射線療法と化学療法である。手術はがんの診断と治療において重要な役割を果たす。典型的には、生検およびがん性増殖の除去には外科的アプローチが必要である。ただし、がんが転移し、広範囲に広がっている場合、手術では治癒する可能性が低く、別のアプローチを取る必要がある。放射線療法、化学療法および免疫療法は、がんの外科的治療にかわるものである（Ｍａｙｅｒ，１９９８、Ｏｈａｒａ １９９８、Ｈｏｅｔ ａｌ．，１９９８）。放射線療法は、高エネルギー放射線を正確に標的にしてがんを破壊することを含み、外科手術の細胞と同様に、転移ではなく、主に局在性がん細胞の治療に有効である。放射線療法の副作用には、皮膚刺激、嚥下困難、口渇、悪心、下痢、抜け毛と活力の喪失が含まれる（Ｃｕｒｒａｎ，１９９８、Ｂｒｉｚｅｌ，１９９８）。

【００６２】

抗がん剤によるがん治療である化学療法は、がん治療の別の方法である。すべての固形腫瘍（ｅｌ－Ｋａｒｅｈ ａｎｄ Ｓｅｃｏｍｂ，１９９７）で薬物投与を達成することは困難であるため、抗がん剤療法の有効性はしばしば制限される。化学療法戦略は、固形腫瘍の増殖に基づき、標的のがん細胞が急速に分裂しているところから抗がん剤が選択される。ほとんどの化学療法アプローチは、様々ながんの奏効率を高めることが示されている複数の抗がん剤の組み合わせが含まれる。化学療法薬の主な副作用は、正常な組織細胞にも影響を及ぼし、細胞が急速に分裂して影響を受ける可能性が高いことである（例えば、骨髄、消化管、生殖系、および毛包）。化学療法薬の他の副作用は口の中の潰瘍、嚥下困難、口渇、悪心、下痢、嘔吐、疲労、出血、脱毛および感染症である。その他の形態の化学療法は、非がん性過剰増殖性障害を治療するために使用することができる。これらは、関節リウマチおよび乾癬などの過剰増殖性疾患のためのメトトレキサートおよびシクロホスファミドなどの従来の化学療法剤の使用を含む。足（ｐａｗ）化学療法増殖性疾患はまた、ステロイド、アザチオプリン、シクロスポリンなどの免疫抑制剤、およびフマル酸誘導体などの免疫調節剤も含むことができる。

【００６３】

がん研究の急速に発展している分野である免疫療法は、特定の種類のがんを治療するためのさらに別の選択肢である。例えば、免疫系は、腫瘍細胞を異質物として識別し、したがって、免疫系による破壊の標的として選択される。残念なことに、応答は通常、ほとんどの腫瘍増殖を防ぐのに十分ではない。しかしながら、最近では、免疫療法の分野で、免

疫系の天然防御機構を増強または補完する方法を開発することに焦点が当てられている。
【００６４】
前述したように、がん原遺伝子はがん生物学において重要な役割を果たしている。例えば、Ｒｂ腫瘍抑制因子、ｐ５３、ＮＦ１、およびＷＴ１は、細胞の非腫瘍形成表現型の維持に不可欠である（Ｓｏｄｄｕ ａｎｄ Ｓａｃｃｈｉ，１９９８による概説）。全がんの約５０％が、ｐ５３遺伝子の変異と関連し、腫瘍抑制因子ｐ５３としての特性が喪失されることが分かっている（Ｌｅｖｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，１９９１、Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｋｉｎｚｌｅｒ，１９９２、Ｈａｒｔｍａｎｎ ｅｔ ａｌ，１９９６ａ、Ｈａｒｔｍａｎｎ ｅｔ ａｌ，１９９６ｂ）を参照されたい。がんにおけるｐ５３遺伝子の変異の発生率が高いため、多くの研究グループが、遺伝子導入または置換を介したがん治療の経路としてｐ５３を調査するようになった。細胞増殖を誘発するタンパク質をコードするｓｉｓがん原遺伝子、ｅｒｂＢ、ｓｒｃ、ｒａｓ、およびｍｙｃ、ならびにプログラム細胞死を調節するＢｃｌ－２ファミリーのがん原遺伝子もまた、細胞の非腫瘍形成表現型において重要な役割を果たしている。
【００６５】
いくつかの実施形態では、がんは、頭部がん、頸部がん、卵巣がん、乳がん、結腸がん、前立腺がん、肝がん、白血病、神経膠腫、黒色腫、膵がん、精巣がん、黒色腫、膀胱がん、肺がん、肉腫、扁平上皮がん、小細胞肺がん、乳腺管がん、乳腺浸潤性小葉型がん、乳管内がん、乳腺粘液がん、末梢血中の前骨髄球性白血病、卵巣腺がん、腹腔内に転移した卵巣腺がん、前立腺腺がん、膀胱移行上皮がん、膵管の類上皮がん（ａｎ ｅｐｉｔｈｅｌｉｏｄ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｉｎ ａ ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｄｕｃｔ）、膵管の腺がん、子宮頸部上皮の腺がん、子宮頸がん、消化器がん、泌尿生殖器がん、脳がん、中皮腫、腎細胞がん、婦人科系がん、または子宮内膜がんである。
【００６６】
がん治療
一態様では、本発明は、がんを治療する方法を提供する。本明細書に開示される方法は、有効用量および投与間隔にて、免疫反応を直接的または間接的に調節するタンパク質またはペプチドをコードする１つ以上のｍＲＮＡを含む組成物を投与することによって、それを必要とする対象における腫瘍のサイズ、質量、および／または体積を低減または減少させるか、または腫瘍増殖を阻害または遅延させるのに有効である。本明細書に開示される方法はまた、対象の生存を増加させるのに有効である。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物は、がんに罹患する対象の生存を、約１か月～１２か月、１年および５年、５年および１０年、１０年および１５年間、増加させることができる。
【００６７】
一態様では、本発明は、がん免疫療法（ＩＯ）に有用な免疫調節タンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡの投与を介してがんを治療する方法に関する。免疫調節タンパク質またはペプチドには、インターロイキン１（ＩＬ－１）、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５／１５Ｒ、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ）－Ｉβ、ＭＩＰ－ｌａ、単球走化性タンパク質（ＭＣＰ）－１ ＭＣＰ－３、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＲＡＮＴＥＳ（ＣＣＬ５）、インターフェロン（ＩＦＮ）－γ、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、分化抗原群（ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）（ＣＤ）８０、ＣＤ８６、ＥＦＮα、ＩＦＮｐ、ＩＦＮ、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、ＮＬＲファミリーパイリンドメイン含有１（ＮＬＲＰ１）、ＮＬＲＰ３、インターフェロン遺伝子刺激因子（ＳＴＩＮＧ）、黒色腫２（ＡＩＭ２）に存在しない、パイリン、ＩＦＮ誘導性タンパク質１６（ＩＦＩ１６）、およびＯＸ４０Ｌを含む。
【００６８】

腫瘍サイズ

本明細書に開示されるがんを治療する方法は、対照と比較して、それを必要とする対象における腫瘍のサイズを低減させるのに有効である。いくつかの実施形態では、対照は、同等の疾患状態を有する未治療の対象である。いくつかの実施形態では、対照は、治療前の対象である。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも５％～９９％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも１０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも１５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも２０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも２５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも３０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも３５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも４０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも４５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも５０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも６０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも７０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも８０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも８５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも９０％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも９５％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、腫瘍のサイズを少なくとも９９％低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、腫瘍の消失をもたらす。

【００６９】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与１日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与２日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与４日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与５日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与７日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与１０日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与１２日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与１５日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与１８日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与２０日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与２５日後に腫瘍のサイズを低減させる。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、投与３０日後に腫瘍のサイズを低減させる。

【００７０】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、治療期間中、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、５日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、７日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、１０日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、１５日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、２０日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、２５日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたら

す。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、３０日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、３５日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、４０日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、４５日間、対照と比較して腫瘍サイズの低減をもたらす。

【００７１】

腫瘍増殖阻害

本明細書に開示されるがんを治療するための方法は、腫瘍の増殖を阻害するまたは遅延させるのに有効である。腫瘍増殖阻害率は、次のように計算される：（平均（Ｃ）－平均（Ｔ））／平均（Ｃ）＊１００％、式中、Ｔは試験群腫瘍体積であり、Ｃは対照群腫瘍体積であり、対照は未治療の対象である。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して５％～９９％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して１０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して１５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して２０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して２５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して３０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して３５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して４０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して４５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して６０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して７０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して７５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して９５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、対照と比較して９９％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。

【００７２】

いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の３日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の５日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１５日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２５日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の３０日後に腫瘍増殖の阻害をもたらす。

【００７３】

いくつかの実施形態では、組成物の投与は、治療期間中、対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、１日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、５日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、７日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、１０日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、１５日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、２０日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの

実施形態では、組成物の投与は、２５日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、３０日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、３５日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、４０日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、４５日間対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらす。

【００７４】

いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の５日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の５日後に対照と比較して、６０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、６０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、５０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の５日後に対照と比較して、７０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、７０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、７０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の５日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１０日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１５日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２５日後に対照と比較して、８０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１５日後に対照と比較して、８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２５日後に対照と比較して、８５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１５日後に対照と比較して、９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２５日後に対照と比較して、９０％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の７日後に対照と比較して、９５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の１５日後に対照と比較して、９５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２０日後に対照と比較して、９５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、初回用量の投与の２５日後に対照と比較して、９５％超の腫瘍増殖阻害率をもたらす。

【００７５】

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載される組成物を投与することによって、抗腫瘍効果（例えば、Ｔ細胞増殖を誘導する、腫瘍にＴ細胞浸潤を誘導する、メモリーＴ細胞応答を誘導する、Ｋ細胞の数を増加させるなど）を促進するのに有効である。一実施形態では、本発明は、Ｔ細胞の活性化を必要とする対象においてＴ細胞を活性化する方法、Ｔ細胞増殖の誘導を必要とする対象においてＴ細胞増殖を誘導する方法、腫瘍にＴ細胞浸潤の誘導を必要とする対象の腫瘍にＴ細胞浸潤を誘導する方法、および／またはメ

モリーＴ細胞応答の誘導を必要とする対象においてメモリーＴ細胞応答を誘導する方法であって、本明細書に開示される組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の投与は、対象においてＴ細胞を活性化する。Ｔ細胞活性化は、当該技術分野で公知の任意の方法で特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、活性化Ｔ細胞は、ＣＤ４を発現する。いくつかの実施形態では、活性化Ｔ細胞は、ＣＤ８を発現する。特定の実施形態では、活性化Ｔ細胞は、ＣＤ４およびＣＤ８を発現する。特定の実施形態では、活性化Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、またはＣＤ４$^+$Ｔ細胞およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞の両方を含む。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞活性化は、腫瘍浸潤性Ｔ細胞の数を増加させることを含む。特定の実施形態では、腫瘍内の腫瘍浸潤性Ｔ細胞の数が、組成物の投与前の腫瘍内の腫瘍浸潤性Ｔ細胞の数と比較して、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約５０倍、または少なくとも約１００倍増加している。

【００７６】

体重変化

体重減少は、がんの対象によくみられる。体重減少を含む副作用の緩和は、がんのケアと治療の重要な部分である。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して６０％～１％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、対照は、組成物の投与前の対象の体重である。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、６０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、５０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、４０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、３０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、２５％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、２０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、１５％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、１０％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、５％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、１％未満の対象における体重の変化率をもたらす。いくつかの実施形態では、組成物の投与は、対照と比較して、対象における体重の実質的に変化をもたらさない。

【００７７】

完全奏功

がん治療では、長期的な有効性が別の重要な要素である。いくつかの実施形態では、本方法は、完全寛解、部分寛解、安定的疾患、部分奏功、または完全奏功をもたらす。いくつかの実施形態では、完全奏功は、がんの徴候が消失しているか、または腫瘍増殖の阻害が維持されていることを意味する。いくつかの実施形態では、部分奏功は、治療に応答して複数の腫瘍の損傷の程度が、低減していることを意味する。完全奏功率は、組成物の投与後に完全奏功を示す対象のパーセンテージである。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、５０％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、６０％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、７０％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、８０％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、８５％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、９０％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、９５％超である。いくつかの実施形態では、完全奏効率は、９９％超である。

【００７８】

用量および投与間隔

本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」は、主として、本発明のワクチン組成

物に含まれるｍＲＮＡの総量に基づいている。概して、治療有効量は、対象に対して意義のある利益（例えば、がんまたはその症状を治療、調節、治癒、阻害予防するおよび／または遅延させる）を達成するのに十分な量である。例えば、治療有効量は、所望の治療的および／または予防的効果を達成するのに十分な量であり得る。概して、治療を必要とする対象に投与される治療剤（例えば、治療用タンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡ）の量は、その対象の特徴によって異なる。このような特徴には、対象の状態、疾患重篤度、全般的健康、年齢、性別および体重が含まれる。当業者は、これらおよび他の関連因子に応じて適切な投薬量を容易に決定することができるであろう。さらに、最適な投薬量範囲を特定するために、客観的および主観的アッセイの両方を任意に用いることができる。

【００７９】

ｍＲＮＡを含む送達ビヒクルは、対象の臨床状態、投与の部位および投与方法（例えば、腫瘍内、静脈内、および注射によるものを含む、局所的および全身的）、投与スケジュール、対象の年齢、性別、体重、ならびに当該技術分野の臨床医に関連する他の要因を考慮して、現在の医療行為に従い投与および投薬され得る。本明細書における目的に適う「有効量」は、実験臨床研究、薬理学、臨床、および医療分野の当業者に既知のこうした関連する考慮すべき事項により決定され得る。いくつかの実施形態では、投与される量は、症状の少なくともいくらか安定化、改善、または排除（例えば、腫瘍サイズの低減および／または腫瘍増殖の阻害）を、ならびに当業者によるがんの進行、退行、または改善の適切な尺度として選択される他の指標を、達成するのに有効である。

【００８０】

いくつかの実施形態では、方法は、単回用量を注射することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数回用量を定期的に注射することを含む。

【００８１】

いくつかの実施形態では、好適な用量は、０．１μｇ～１００ｍｇのｍＲＮＡの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．１μｇ～５０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．１μｇ～２５ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．１μｇ～１０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１μｇ～１ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１μｇ～１００μｇのｍＲＮＡの範囲である。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．１μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．３μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、０．５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、７．５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、２０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、２５μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、３０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、４０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、５０μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１００μｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、５ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、７．５ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１０ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、２０ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、３０ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、５０ｍｇである。いくつかの実施形態では、単回用量または複数回用量は、１００ｍｇである。

【００８２】
いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～５００ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～４００ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～３００ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～２００ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～１００ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～９０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～８０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～７０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～６０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～５０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～４０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～３０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～２５ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～２０ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～１５ｍｇの範囲である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．００５ｍｇ～１０ｍｇの範囲である。
【００８３】
いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．１ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約０．５ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約１．０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約３ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約５ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約１０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約１５ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約２０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約３０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約４０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約５０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約６０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約７０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約８０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約９０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約１００ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約１５０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約２００ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約２５０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約３００ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約３５０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約４００ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約４５０ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、組成物の治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、約５００ｍｇより大きい。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、体重１ｋｇ当たり、１．０ｍｇである。いくつかの実施形態では、体重１

ｋｇ当たり、１．０ｍｇの治療有効用量が、皮下、筋肉内または静脈内に投与される。
【００８４】
本発明の提供される方法は、本明細書に記載される治療剤の治療有効量の単回投与ならびに複数回投与を企図する。組成物は、腫瘍のサイズ、転移の進行、またはがんの病期など、対象の状態の性質、重症度および程度に応じて、一定の間隔で投与することができる。いくつかの実施形態では、本発明の組成物の治療有効量は、一定の間隔で（例えば、毎日、週に２回、４日に１回、週に１回、１０日に１回、隔週、毎月、隔月、月２回、３０日に１回、２８日に１回、または連続的に定期的に投与されてもよい。
【００８５】
いくつかの実施形態では、提供されるリポソームおよび／または組成物は、その中に含まれるｍＲＮＡの徐放に適するように製剤化される。こうした徐放性組成物は、投薬間隔を延長させて対象に適宜投与することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、１日２回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、１日２回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、毎日対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、１日おきに対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、週に２回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、週に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、７日に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、１０日に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、１４日に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、２８日に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、３０日に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、２週間に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、３週間に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、４週間に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、月に２回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、６週間に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、８週間に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、隔月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、３か月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、４か月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、６か月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、８か月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、９か月に１回対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、毎年対象に投与される。長期間にわたるｍＲＮＡの送達または放出のいずれかを行うために、デポー投与（例えば、筋肉内、皮下、硝子体内）用に製剤化される組成物およびリポソームも企図される。好ましくは、採用される徐放手段は、安定性を強化するためにｍＲＮＡに施される修飾と組み合わされる。
【００８６】
治療有効量は、複数の単位用量を含み得る投薬レジメンで一般的に投与される。任意の特定のワクチンについて、治療有効量および投与間隔（および／または有効な投薬レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路に応じて、他の医薬品との組み合わせに応じて変化し得る。また、任意の特定の患者に固有の治療有効量（および／または単位用量）は、治療される障害および障害の重篤度；採用される特定のワクチン剤の活性；採用される特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食事；投与時間、投与経路、および／または採用される特定のタンパク質の排出または代謝速度；治療期間；ならびに医療分野において周知の類似要因を含む様々な要因に依存し得る。
【００８７】
いくつかの実施形態では、初回用量と後続の用量とは、同じ量である。いくつかの実施形態では、初回用量と後続の用量とは、異なる量である。いくつかの実施形態では、初回用量は、後続の用量よりも大きい。いくつかの実施形態では、初回用量は、後続の用量よりも少ない。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、同じ投薬量のｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、複数回用量の各々は、異なる投薬量のｍＲＮＡを含む。

【００８８】
発明の組成物
一態様では、本発明は、脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドをコードする１つ以上のｍＲＮＡを含む組成物の投与を介してがんを治療する方法に関する。一態様では、本発明は、それぞれ免疫調節タンパク質またはペプチドをコードする１つ以上のｍＲＮＡを含み、１つ以上のｍＲＮＡが脂質ナノ粒子内に封入される、がんを治療するための医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、１つ以上のチェックポイント阻害剤をコードする２つ以上のｍＲＮＡを含む。
【００８９】
ｍＲＮＡ
いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、がん免疫療法（ＩＯ）に有用な免疫調節タンパク質またはペプチドをコードする。免疫調節タンパク質またはペプチドには、インターロイキン１（ＩＬ－１）、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５／１５Ｒ、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ）－Ｉβ、ＭＩＰ－ｌａ、単球走化性タンパク質（ＭＣＰ）－１　ＭＣＰ－３、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＲＡＮＴＥＳ（ＣＣＬ５）、インターフェロン（ＩＦＮ）－γ、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、分化抗原群（ｃｌｕｓｔｅｒ　ｏｆ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）（ＣＤ）８０、ＣＤ８６、ＥＦＮα、ＩＦＮｐ、ＩＦＮ、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、ＮＬＲファミリーパイリンドメイン含有１（ＮＬＲＰ１）、ＮＬＲＰ３、インターフェロン遺伝子刺激因子（ＳＴＩＮＧ）、黒色腫２（ＡＩＭ２）に存在しない、パイリン、ＩＦＮ誘導性タンパク質１６（ＩＦＩ１６）、およびＯＸ４０Ｌを含む。
【００９０】
いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、コドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質またはペプチドは、野生型である。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質またはペプチドは、変異または修飾を含有する。いくつかの実施形態では、ＳＴＩＮＧは、Ｒ２９３Ｍ変異を含有する。いくつかの実施形態では、ＮＬＲＰ３は、Ｄ３０１Ｎ変異を含有する。
【００９１】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質またはペプチドは、免疫反応を調節する。いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドは、断片または完全長サイトカインである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－３である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－４である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－５である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－６である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－７である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－８である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１０である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１１である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１３である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１５／１５Ｒである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＬ－２７である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＭＩＰ－Ｉβである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質また

はペプチドは、ＭＩＰ－ｌａである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、単球走化性タンパク質（ＭＣＰ）－１である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＭＣＰ－３である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、Ｍ－ＣＳＦである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＧＭ－ＣＳＦである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＲＡＮＴＥＳまたはＣＣＬ５である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＦＮ－γである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＴＮＦ－αである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、Ｇ－ＣＳＦである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＣＤ８０である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＣＤ８６である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＥＦＮαである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＦＮｐである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＦＮである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＦＬＴ３Ｌである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＮＬＲＰ１である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＮＬＲＰ３である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＳＴＩＮＧである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＡＩＭ２である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、パイリンである。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＩＦＩ１６である。いくつかの実施形態では、好適なタンパク質またはペプチドは、ＯＸ４０Ｌである。

【００９２】

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＩＬ－１２およびＳＴＩＮＧをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、およびＧＭ－ＣＳをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＦＬＴ－３Ｌ、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＮＬＲＰ３、およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、ＳＴＩＮＧ、ＩＬ－１２、ＩＬ－２およびＧＭ－ＣＳＦをコードする。

【００９３】

一態様では、本発明は、がんを治療する方法であって、腫瘍のサイズが低減するまたは腫瘍の増殖が阻害されるような有効用量および投与間隔で、脂質ナノ粒子内に封入されたタンパク質またはペプチドを各々コードする２つ以上のｍＲＮＡを含む組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、この２つ以上のｍＲＮＡは各々、免疫調節酵素および／またはチェックポイント阻害剤をコードする。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせを阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＰＤ１を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ－４を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、Ｂ７を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＢＴＬＡを阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＨＶＥＭを阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＴＩＭ－３を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＧＡＬ－９を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＬＡＧ３を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＶＩＳＴＡを阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＫＩＲを阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、２Ｂ４を阻害する。

いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＣＤ１６０を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＣＧＥＮ－１５０４９を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＣＨＫ１を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、ＣＨＫ２を阻害する。いくつかの実施形態では、適切なチェックポイント阻害剤は、Ａ２ａＲを阻害する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、Ｂ７、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ－３、ＧＡＬ－９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、またはそれらの組み合わせに対する拮抗薬である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、抗体またはその断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、ヒト化されている。いくつかの実施形態では、組成物は、チェックポイント阻害剤を含む。

【００９４】

ｍＲＮＡの合成

本発明によるｍＲＮＡは、様々な既知の方法のうちのいずれかに従って合成され得る。例えば、本発明によるｍＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）を介して合成され得る。簡潔に述べると、ＩＶＴは多くの場合、プロモーターを含む直線状または環状のＤＮＡ鋳型、リボヌクレオチド三リン酸のプール、ＤＴＴおよびマグネシウムイオンを含み得る緩衝系、ならびに適切なＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）、ＤＮＡｓｅＩ、ピロホスファターゼ、ならびに／またはＲＮＡｓｅ阻害剤を用いて行われる。正確な条件は、具体的な用途によって変動するであろう。

例示的なｍＲＮＡのコンストラクト設計

コンストラクト設計：

Ｘ－ｍＲＮＡコード領域－Ｙ

５’および３’ＵＴＲ配列：

Ｘ（５’ＵＴＲ配列）＝

ＧＧＡＣＡＧＡＵＣＧＣＣＵＧＧＡＧＡＣＧＣＣＡＵＣＣＡＣＧＣＵＧＵＵＵＵＧＡＣＣ
ＵＣＣＡＵＡＧＡＡＧＡＣＡＣＣＧＧＧＡＣＣＧＡＵＣＣＡＧＣＣＵＣＣＧＣＧＧＣＣＧ
ＧＧＡＡＣＧＧＵＧＣＡＵＵＧＧＡＡＣＧＣＧＧＡＵＵＣＣＣＣＧＵＧＣＣＡＡＧＡＧＵ
ＧＡＣＵＣＡＣＣＧＵＣＣＵＵＧＡＣＡＣＧ（配列番号１）

Ｙ（３’ＵＴＲ配列）＝

ＣＧＧＧＵＧＧＣＡＵＣＣＣＵＧＵＧＡＣＣＣＣＵＣＣＣＣＡＧＵＧＣＣＵＣＵＣＣＵＧ
ＧＣＣＣＵＧＧＡＡＧＵＵＧＣＣＡＣＵＣＣＡＧＵＧＣＣＣＡＣＣＡＧＣＣＵＵＧＵＣＣ
ＵＡＡＵＡＡＡＡＵＵＡＡＧＵＵＧＣＡＵＣＡＡＧＣＵ（配列番号２）

または

ＧＧＧＵＧＧＣＡＵＣＣＣＵＧＵＧＡＣＣＣＣＵＣＣＣＣＡＧＵＧＣＣＵＣＵＣＣＵＧＧ
ＣＣＣＵＧＧＡＡＧＵＵＧＣＣＡＣＵＣＣＡＧＵＧＣＣＣＡＣＣＡＧＣＣＵＵＧＵＣＣＵ
ＡＡＵＡＡＡＡＵＵＡＡＧＵＵＧＣＡＵＣＡＡＡＧＣＵ（配列番号３）

【００９５】

本発明を使用して、様々な長さのｍＲＮＡを送達することができる。いくつかの実施形態では、本発明を使用して、長さ約１ｋｂ、１．５ｋｂ、２ｋｂ、２．５ｋｂ、３ｋｂ、３．５ｋｂ、４ｋｂ、４．５ｋｂ、５ｋｂ、６ｋｂ、７ｋｂ、８ｋｂ、９ｋｂ、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、１５ｋｂ、または２０ｋｂ以上のインビトロで合成されたｍＲＮＡを送達することができる。いくつかの実施形態では、本発明を使用して、長さ約１～２０ｋｂ、約１～１５ｋｂ、約１～１０ｋｂ、約５～２０ｋｂ、約５～１５ｋｂ、約５～１２ｋｂ、約５～１０ｋｂ、約８～２０ｋｂ、または約８～１５ｋｂの範囲のインビトロで合成されたｍＲＮＡを送達することができる。

【００９６】

いくつかの実施形態では、本発明によるｍＲＮＡの調製のために、ＤＮＡ鋳型がインビトロで転写される。好適なＤＮＡ鋳型は、典型的には、インビトロ転写のためのプロモーター、例えば、Ｔ３、Ｔ７、またはＳＰ６プロモーター、続いて、所望のｍＲＮＡの所望

のヌクレオチド配列および終結シグナルを有する。

【００９７】

ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを使用するｍＲＮＡの合成

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを使用して産生される。ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、ＳＰ６プロモーター配列に対して高い配列特異性を有するＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼである。ＳＰ６ポリメラーゼは、そのプロモーターの下流にある一本鎖ＤＮＡまたは二本鎖ＤＮＡのいずれかで、ＲＮＡの５’→３’インビトロ合成を触媒し、天然リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドおよび／または標識リボヌクレオチドを重合転写物に組み込む。かかる標識リボヌクレオチドの例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、アミノアリル、および同位体標識ヌクレオチドが挙げられる。

【００９８】

バクテリオファージＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼの配列は、最初に以下のアミノ酸配列を有するものとして記載されていた（ＧｅｎＢａｎｋ：Ｙ００１０５．１）。ＭＱＤＬＨＡＩＱＬＱＬＥＥＥＭＦＮＧＧＩＲＲＦＥＡＤＱＱＲＱＩＡＡＧＳＥＳＤＴＡＷＮＲＲＬＬＳＥＬＩＡＰＭＡＥＧＩＱＡＹＫＥＥＹＥＧＫＫＧＲＡＰＲＡＬＡＦＬＱＣＶＥＮＥＶＡＡＹＩＴＭＫＶＶＭＤＭＬＮＴＤＡＴＬＱＡＩＡＭＳＶＡＥＲＩＥＤＱＶＲＦＳＫＬＥＧＨＡＡＫＹＦＥＫＶＫＫＳＬＫＡＳＲＴＫＳＹＲＨＡＨＮＶＡＶＶＡＥＫＳＶＡＥＫＤＡＤＦＤＲＷＥＡＷＰＫＥＴＱＬＱＩＧＴＴＬＬＥＩＬＥＧＳＶＦＹＮＧＥＰＶＦＭＲＡＭＲＴＹＧＧＫＴＩＹＹＬＱＴＳＥＳＶＧＱＷＩＳＡＦＫＥＨＶＡＱＬＳＰＡＹＡＰＣＶＩＰＰＲＰＷＲＴＰＦＮＧＧＦＨＴＥＫＶＡＳＲＩＲＬＶＫＧＮＲＥＨＶＲＫＬＴＱＫＱＭＰＫＶＹＫＡＩＮＡＬＱＮＴＱＷＱＩＮＫＤＶＬＡＶＩＥＥＶＩＲＬＤＬＧＹＧＶＰＳＦＫＰＬＩＤＫＥＮＫＰＡＮＰＶＰＶＥＦＱＨＬＲＧＲＥＬＫＥＭＬＳＰＥＱＷＱＱＦＩＮＷＫＧＥＣＡＲＬＹＴＡＥＴＫＲＧＳＫＳＡＡＶＶＲＭＶＧＱＡＲＫＹＳＡＦＥＳＩＹＦＶＹＡＭＤＳＲＳＲＶＹＶＱＳＳＴＬＳＰＱＳＮＤＬＧＫＡＬＬＲＦＴＥＧＲＰＶＮＧＶＥＡＬＫＷＦＣＩＮＧＡＮＬＷＧＷＤＫＫＴＦＤＶＲＶＳＮＶＬＤＥＥＦＱＤＭＣＲＤＩＡＡＤＰＬＴＦＴＱＷＡＫＡＤＡＰＹＥＦＬＡＷＣＦＥＹＡＱＹＬＤＬＶＤＥＧＲＡＤＥＦＲＴＨＬＰＶＨＱＤＧＳＣＳＧＩＱＨＹＳＡＭＬＲＤＥＶＧＡＫＡＶＮＬＫＰＳＤＡＰＱＤＩＹＧＡＶＡＱＶＶＩＫＫＮＡＬＹＭＤＡＤＤＡＴＴＦＴＳＧＳＶＴＬＳＧＴＥＬＲＡＭＡＳＡＷＤＳＩＧＩＴＲＳＬＴＫＫＰＶＭＴＬＰＹＧＳＴＲＬＴＣＲＥＳＶＩＤＹＩＶＤＬＥＥＫＥＡＱＫＡＶＡＥＧＲＴＡＮＫＶＨＰＦＥＤＤＲＱＤＹＬＴＰＧＡＡＹＮＹＭＴＡＬＩＷＰＳＩＳＥＶＶＫＡＰＩＶＡＭＫＭＩＲＱＬＡＲＦＡＡＫＲＮＥＧＬＭＹＴＬＰＴＧＦＩＬＥＱＫＩＭＡＴＥＭＬＲＶＲＴＣＬＭＧＤＩＫＭＳＬＱＶＥＴＤＩＶＤＥＡＡＭＭＧＡＡＡＰＮＦＶＨＧＨＤＡＳＨＬＩＬＴＶＣＥＬＶＤＫＧＶＴＳＩＡＶＩＨＤＳＦＧＴＨＡＤＮＴＬＴＬＲＶＡＬＫＧＱＭＶＡＭＹＩＤＧＮＡＬＱＫＬＬＥＥＨＥＶＲＷＭＶＤＴＧＩＥＶＰＥＱＧＥＦＤＬＮＥＩＭＤＳＥＹＶＦＡ（配列番号４）。

【００９９】

本発明に適したＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、バクテリオファージＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼと実質的に同じポリメラーゼ活性を有する任意の酵素であってもよい。したがって、いくつかの実施形態では、本発明に適したＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、配列番号４から改変される。例えば、好適なＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、１つ以上のアミノ酸置換、欠失、または付加を含有してもよい。いくつかの実施形態では、好適なＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、配列番号４と約９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７５％、７０％、６５％、または６０％同一または相同であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、好適なＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、トランケートタンパク質（Ｎ末端、Ｃ末端、または内部から）であるが、ポリメラーゼ活性は保持されるものであってもよい。いくつかの実施形態では、好適なＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは融合タンパク質である。

【０１００】

本発明に適したＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、例えば、Ａｌｄｅｖｒｏｎ、Ａｍｂｉｏｎ、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ）、Ｐｒｏｍｅｇａ、およびＲｏｃｈｅからの市販製品であってもよい。ＳＰ６は、本明細書に記載される配列番号４のアミノ酸配列、または配列番号４のバリアントに従って、市販の供給源もしくは非市販の供給源から注文および／またはカスタム設計されてもよい。ＳＰ６は、標準忠実度のポリメラーゼであってもよく、または、ＲＮＡポリメラーゼ活性を促進するために改変された（例えば、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の変異、またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ自体の翻訳後修飾）高忠実度／高効率／高能力のものであってもよい。こうした改変ＳＰ６の例としては、ＡｍｂｉｏｎのＳＰ６　ＲＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ－Ｐｌｕｓ（商標）、ＮＥＢのＨｉＳｃｒｉｂｅ　ＳＰ６、およびＰｒｏｍｅｇａのＲｉｂｏＭＡＸ（商標）およびＲｉｂｏｐｒｏｂｅ（登録商標）システムが挙げられる。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、好適なＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは融合タンパク質である。例えば、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼは、酵素の単離、精製、または溶解性を促進するための１つ以上のタグを含み得る。適切なタグは、Ｎ末端、Ｃ末端、および／または内部に配置され得る。好適なタグの非限定的な例としては、カルモジュリン結合タンパク質（ＣＢＰ）、Ｆａｓｃｉｏｌａ　ｈｅｐａｔｉｃａ　８－ｋＤａ抗原（Ｆｈ８）、ＦＬＡＧタグペプチド、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ヒスチジンタグ（例えば、ヘキサヒスチジンタグ（Ｈｉｓ６））、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、Ｎ－利用物質（ＮｕｓＡ）、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）融合タグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＴＲＥＰ）、タンデムアフィニティ精製（ＴＡＰ）、およびチオレドキシン（ＴｒｘＡ）が挙げられる。本発明では他のタグを使用することができる。これらおよび他の融合タグは、例えば、Ｃｏｓｔａ　ｅｔ　ａｌ．Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　５（２０１４）：６３およびＰＣＴ／ＵＳ１６／５７０４４に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、Ｈｉｓタグは、ＳＰ６のＮ末端に位置する。

【０１０２】

ＳＰ６プロモーター

ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼによって認識され得る任意のプロモーターが、本発明で使用され得る。典型的には、ＳＰ６プロモーターは、５’ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧ－３’（配列番号５）を含む。ＳＰ６プロモーターのバリアントは、そのプロモーターに対するＳＰ６の認識および／または結合を最適化するように発見および／または作製されている。非限定的なバリアントには、以下が含まれるが、これらに限定されない。５’－ＡＴＴＴＡＧＧＧＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＡＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＧＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＧＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＧＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＡ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＡＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＧＧ－３’、５’－ＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧＡＡＧＮＧ－３’、および５’－ＣＡＴＡＣＧＡＴＴＴＡＧＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＡＧ－３’（配列番号６～配列番号１５）。

【０１０３】

さらに、本発明に適したＳＰ６プロモーターは、配列番号５～配列番号１５のうちのいずれか１つと約９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、または７０％同一または相同であり得る。さらに、本発明に有用なＳＰ６プロモーターは、本明細書に記載されるプロモーター配列のいずれかに対して、１つ以上の追加のヌクレオチド５’および／または３’を含み得る。

【０１０４】

ＤＮＡ鋳型

典型的には、ＤＮＡ鋳型は、完全に二本鎖であるか、または二本鎖ＳＰ６プロモーター

配列を有するほぼ一本鎖のいずれかである。
【０１０５】
線形化プラスミドＤＮＡ（１つ以上の制限酵素を介して線形化）、線形化ゲノムＤＮＡ断片（制限酵素および／または物理的手段を介して）、ＰＣＲ産物、および／または合成ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、転写されるＤＮＡ配列の上流に（および正しい向きで）二本鎖ＳＰ６プロモーターを含有することを条件に、ＳＰ６を用いたインビトロ転写の鋳型として使用することができる。
【０１０６】
いくつかの実施形態では、線形化ＤＮＡ鋳型は、平滑末端を有する。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、転写されるＤＮＡ配列は、より効率的な転写および／または翻訳を促進するために最適化されてもよい。例えばＤＮＡ配列は、シス調節エレメント（例えば、ＴＡＴＡボックス、終結シグナル、およびタンパク質結合部位）、人工組換え部位、Ｃｈｉ部位、ＣｐＧジヌクレオチド含量、ネガティブＣｐＧアイランド、ＧＣ含量、ポリメラーゼのずれ部位、および／もしくは転写に関連する他の要素に関して最適化することができ；ＤＮＡ配列は、隠れた（ｃｒｙｐｔｉｃ）スプライス部位、ｍＲＮＡ二次構造、ｍＲＮＡの安定的な自由エネルギー、反復配列、ＲＮＡ不安定性モチーフ、および／もしくはｍＲＮＡの処理と安定性に関連する他の要素に関して最適化することができ；ＤＮＡ配列は、コドン使用頻度バイアス、コドン適応性、内部Ｃｈｉ部位、リボソーム結合部位（例えば、ＩＲＥＳ）、早期（ｐｒｅｍａｔｕｒｅ）ポリＡ部位、Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ（ＳＤ）配列、および／もしくは翻訳に関連するその他の要素に関して最適化することができ；ならびに／またはＤＮＡ配列は、コドンコンテキスト、コドン－アンチコドン相互作用、翻訳休止部位（ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ ｐａｕｓｅ ｓｉｔｅ）、および／もしくはタンパク質フォールディングに関連する他の要素に関して最適化することができる。当技術分野で既知の最適化方法、例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒによるＧｅｎｅＯｐｔｉｍｉｚｅｒおよびＯｐｔｉｍｕｍＧｅｎｅ（商標）が、本発明で使用されてもよく、これらはＵＳ２０１１／００８１７０８に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０１０８】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、５’および／または３’非翻訳領域を含む。いくつかの実施形態では、５’非翻訳領域は、ｍＲＮＡの安定性または翻訳に影響を及ぼす１つ以上の要素、例えば、鉄応答要素を含む。いくつかの実施形態では、５’非翻訳領域は、約５０～５００ヌクレオチド長であり得る。
【０１０９】
いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル、細胞におけるｍＲＮＡの位置安定性に影響するタンパク質の結合部位、またはｍｉＲＮＡの１つ以上の結合部位のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、５０～５００ヌクレオチド長以上であり得る。
【０１１０】
例示的な３’および／または５’ＵＴＲ配列は、センスｍＲＮＡ分子の安定性を増加させるために、安定したｍＲＮＡ分子（例えば、グロビン、アクチン、ＧＡＰＤＨ、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素）から得ることができる。例えば、５’ＵＴＲ配列は、ヌクレアーゼ耐性を改善するおよび／またはポリヌクレオチドの半減期を改善するために、ＣＭＶ前初期１（ＩＥ１）遺伝子の部分配列またはその断片を含み得る。ポリヌクレオチドをさらに安定させるために、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）をコードする配列またはその断片のポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）の３’末端または非翻訳領域への包含も企図される。概して、これらの修飾は、ポリヌクレオチドの安定性および／または薬物動態特性（例えば、半減期）を、それらの修飾されていない対応物と比較して改善し、例えば、かかるポリヌクレオチドのインビボヌクレアーゼ消化に対する耐性を改善するために行われる修飾を含む。

【０１１１】
大規模なｍＲＮＡ合成
本発明は、野生型またはコドン最適化されたｍＲＮＡの大規模な産生に関する。いくつかの実施形態では、本発明による方法は、単回バッチで少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、５００ｍｇ、６００ｍｇ、７００ｍｇ、８００ｍｇ、９００ｍｇ、１ｇ、５ｇ、１０ｇ、２５ｇ、５０ｇ、７５ｇ、１００ｇ、２５０ｇ、５００ｇ、７５０ｇ、１ｋｇ、５ｋｇ、１０ｋｇ、５０ｋｇ、１００ｋｇ、１０００ｋｇ、またはそれ以上のｍＲＮＡを合成する。本明細書で使用される場合、用語「バッチ」は、一度に合成される、例えば、単回の製造設定に従って産生される、ｍＲＮＡの数量（ｑｕａｎｔｉｔｙ）または量（ａｍｏｕｎｔ）を指す。バッチは、１セットの条件下での連続合成のために、酵素の単回アリコートおよび／またはＤＮＡ鋳型の単回アリコートを介して発生する、１回の反応で合成されたｍＲＮＡの量を指す場合がある。単一バッチで合成されたｍＲＮＡは、所望の量を達成するために組み合わされる異なる時点で合成されたｍＲＮＡを含まない。概して、反応混合物は、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ、線形ＤＮＡ鋳型、およびＲＮＡポリメラーゼ反応緩衝液（リボヌクレオチドを含む場合もあれば、またはリボヌクレオチドの添加を必要とする場合がある）を含む。

【０１１２】
本発明によれば、典型的には、産生されたｍＲＮＡの１グラム（ｇ）当たり１～１００ｍｇのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、産生されたｍＲＮＡの１グラム当たり約１～９０ｍｇ、１～８０ｍｇ、１～６０ｍｇ、１～５０ｍｇ、１～４０ｍｇ、１０～１００ｍｇ、１０～８０ｍｇ、１０～６０ｍｇ、１０～５０ｍｇのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、約１グラムのｍＲＮＡを産生するために約５～２０ｍｇのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、約１００グラムのｍＲＮＡを産生するために約０．５～２グラムのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、約１キログラムのｍＲＮＡのために約５～２０グラムのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１グラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも５ｍｇのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１００グラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも５００ｍｇのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１キログラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも５グラムのＳＰ６ポリメラーゼが使用される。いくつかの実施形態では、産生されたｍＲＮＡの１グラム当たり約１０ｍｇ、２０ｍｇ、３０ｍｇ、４０ｍｇ、５０ｍｇ、６０ｍｇ、７０ｍｇ、８０ｍｇ、９０ｍｇ、または１００ｍｇのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、約１グラムのｍＲＮＡを産生するために約１０～３０ｍｇのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、約１００グラムのｍＲＮＡを産生するために約１～３グラムのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、約１キログラムのｍＲＮＡのために約１０～３０グラムのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１グラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも１０ｍｇのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１００グラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも１グラムのプラスミドＤＮＡが使用される。いくつかの実施形態では、少なくとも１キログラムのｍＲＮＡを産生するために少なくとも１０グラムのプラスミドＤＮＡが使用される。

【０１１３】
いくつかの実施形態では、反応混合物中のＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼの濃度は、約１～１００ｎＭ、１～９０ｎＭ、１～８０ｎＭ、１～７０ｎＭ、１～６０ｎＭ、１～５０ｎＭ、１～４０ｎＭ、１～３０ｎＭ、１～２０ｎＭ、または約１～１０ｎＭであり得る。特定の実施形態では、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼの濃度は、約１０～５０ｎＭ、２０～５０ｎＭ、または３０～５０ｎＭである。１００～１００００ユニット／ｍｌのＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼの濃度を使用することができ、例として、１００～９０００ユニット／ｍｌ、１００～８０００ユニット／ｍｌ、１００～７０００ユニット／ｍｌ、１００～６

０００ユニット／ｍｌ、１００～５０００ユニット／ｍｌ、１００～１０００ユニット／ｍｌ、２００～２０００ユニット／ｍｌ、５００～１０００ユニット／ｍｌ、５００～２０００ユニット／ｍｌ、５００～３０００ユニット／ｍｌ、５００～４０００ユニット／ｍｌ、５００～５０００ユニット／ｍｌ、５００～６０００ユニット／ｍｌ、１０００～７５００ユニット／ｍｌ、および２５００～５０００ユニット／ｍｌの濃度を使用することができる。

【０１１４】

反応混合物中の各リボヌクレオチド（例えば、ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＧＴＰ、およびＣＴＰ）の濃度は、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭであり、例えば、約１ｍＭ～約１０ｍＭ、約２ｍＭ～約１０ｍＭ、約３ｍＭ～約１０ｍＭ、約１ｍＭ～約８ｍＭ、約１ｍＭ～約６ｍＭ、約３ｍＭ～約１０ｍＭ、約３ｍＭ～約８ｍＭ、約３ｍＭ～約６ｍＭ、約４ｍＭ～約５ｍＭである。いくつかの実施形態では、各リボヌクレオチドは、反応混合物中、約５ｍＭである。いくつかの実施形態では、反応に使用されるｒＮＴＰ（例えば、ＡＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰおよびＵＴＰの組み合わせ）の総濃度は、１ｍＭ～４０ｍＭの範囲である。いくつかの実施形態では、反応に使用されるｒＮＴＰ（例えば、ＡＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰおよびＵＴＰの組み合わせ）の総濃度は、１ｍＭ～３０ｍＭ、または１ｍＭ～２８ｍＭ、または１ｍＭ～２５ｍＭ、または１ｍＭ～２０ｍＭの範囲である。いくつかの実施形態では、総ｒＮＴＰｓ濃度は、３０ｍＭ未満である。いくつかの実施形態では、総ｒＮＴＰｓ濃度は、２５ｍＭ未満である。いくつかの実施形態では、総ｒＮＴＰｓ濃度は、２０ｍＭ未満である。いくつかの実施形態では、総ｒＮＴＰｓ濃度は、１５ｍＭ未満である。いくつかの実施形態では、総ｒＮＴＰｓ濃度は、１０ｍＭ未満である。

【０１１５】

ＲＮＡポリメラーゼ反応緩衝液は、典型的には、塩／緩衝剤、例えば、Ｔｒｉｓ、ＨＥＰＥＳ、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸カリウム　リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、および塩化マグネシウムを含む。

【０１１６】

反応混合物のｐＨは、約６～８．５、６．５～８．０、７．０～７．５の間であってもよく、いくつかの実施形態では、ｐＨは７．５である。

【０１１７】

線形または線形化ＤＮＡ鋳型（例えば、上述のように、および所望の量のＲＮＡを提供するのに十分な量／濃度で）、ＲＮＡポリメラーゼ反応緩衝液、およびＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを組み合わせて、反応混合物を形成する。反応混合物を、約３７℃～約４２℃で、３０分～６時間、例えば、約６０～約９０分間インキュベートする。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、好適なＲＮＡポリメラーゼ反応緩衝液（約７．５の最終反応混合物ｐＨ）中の、約５ｍＭのＮＴＰ、約０．０５ｍｇ／ｍＬのＳＰ６ポリメラーゼ、および約０．１ｍｇ／ｍｌのＤＮＡ鋳型を、約３７℃～約４２℃で６０～９０分間インキュベートする。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、反応混合物は、ＳＰ６ポリメラーゼ特異的プロモーター、ＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ、ＲＮａｓｅ阻害剤、ピロホスファターゼ、２９ｍＭのＮＴＰ、１０ｍＭのＤＴＴ、および反応緩衝液（１０ｘの場合、８００ｍＭのＨＥＰＥＳ、２０ｍＭのスペルミジン、２５０ｍＭの$MgCl_2$、ｐＨ７．７）とともに線形化二本鎖ＤＮＡ鋳型、ならびにＲＮａｓｅを含まない水で所望の反応体積にする十分な量（ＱＳ）を含有し、次いで、この反応混合物を３７℃で６０分間インキュベートする。次に、ポリメラーゼ反応をＤＮａｓｅ　ＩおよびＤＮａｓｅ　Ｉ緩衝液（１０ｘの場合－１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$および２５ｍＭの$CaCl_2$、ｐＨ７．６）を添加することによりクエンチして、精製のための調製で二本鎖ＤＮＡ鋳型の消化を促進した。この実施形態は、１００グラムのｍＲＮＡを産生するのに十分であることが示されている。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、反応混合物は、１～１０ｍＭの範囲の濃度のＮＴＰ、０．０１～０．５ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度のＤＮＡ鋳型、および０．０１～０．１ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度のＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを含み、例えば、反応混合物は、５ｍＭの濃度のＮＴＰ、０．１ｍｇ／ｍｌの濃度のＤＮＡ鋳型、および０．０５ｍｇ／ｍｌの濃度のＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを含む。

【０１２１】

ヌクレオチド

様々な天然由来のまたは修飾されたヌクレオシドを使用して、本発明によるｍＲＮＡを産生してもよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン）、ヌクレオシド類似体（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ－５プロピニル－シチジン、Ｃ－５プロピニル－ウリジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、プソイドウリジン（例えば、Ｎ－１－メチル－プソイドウリジン）、２－チオウリジンおよび２－チオシチジン）、化学修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）、介在塩基（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｅｄ　ｂａｓｅ）、修飾された糖（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）、および／もしくは修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエートおよび５’－Ｎ－ホスホルアミダイト結合）であるか、またはそれを含む。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、１つ以上の非標準的なヌクレオチド残基を含む。非標準的なヌクレオチド残基は、例えば、５－メチル－シチジン（“５ｍＣ”）、プソイドウリジン（“ψＵ”）、および／または２－チオ－ウリジン（“２ｓＵ”）を含み得る。このような残基およびそのｍＲＮＡへの組み込みについての考察については、例えば、米国特許第８，２７８，０３６号またはＷＯ２０１１／０１２３１６を参照されたい。ｍＲＮＡは、Ｕ残基の２５％が２－チオ－ウリジンであり、Ｃ残基の２５％が５－メチルシチジンであるＲＮＡと定義される、ＲＮＡであってもよい。ＲＮＡの使用に関する教示は、米国特許出願公開第２０１２／０１９５９３６号および国際公開第２０１１／０１２３１６号に開示されており、それら両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。非標準的なヌクレオチド残基の存在は、ｍＲＮＡを、同じ配列を有するが標準的な残基のみを含有する対照ｍＲＮＡよりも、より安定かつ／またはより少ない免疫原性にすることができる。さらなる実施形態では、ｍＲＮＡは、イソシトシン、プソイドイソシトシン、５－ブロモウラシル、５－プロピニルウラシル、６－アミノプリン、２－アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および２－クロロ－６－アミノプリンシトシン、ならびにこれらの修飾および他の核酸塩基修飾の組み合わせから選択される１つ以上の非標準的なヌクレオチド残基を含み得る。いくつかの実施形態は、フラノース環または核酸塩基への追加の修飾をさらに含み得る。追加的な修飾は、例えば、糖修飾または置換（例えば、２’－Ｏ－アルキル修飾、ロックド核酸（ＬＮＡ）のうちの１つ以上）を含み得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、追加のポリヌクレオチドおよび／またはペプチドポリヌクレオチド（ＰＮＡ）と複合体化またはハイブリダイズされてもよい。糖修飾が２’－Ｏ－アルキル修飾であるいくつかの実施形態では、このような修飾には、２’－デオキシ－２’－フルオロ修飾、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－メトキシエチル修飾、および２’－デオキシ修飾を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、これらの修飾のいずれかは、ヌクレオチドの０～１００％で、例えば、構成ヌクレオチドの０％、１％、１０％、２５％、５０％、７５％、８５％、９０％、９５％、または１００％超を個別にまたは組み合わせて存在し得る。

【０１２３】

合成後処理
典型的には、５’キャップおよび／または３’テールは、合成後に添加されてもよい。キャップの存在は、大半の真核細胞にみられるヌクレアーゼへの耐性を提供する上で重要である。「テール」の存在は、ｍＲＮＡをエキソヌクレアーゼ分解から保護する役割を果たす。
【０１２４】
５’キャップは、典型的には、以下のように付加される。最初に、ＲＮＡ末端ホスファターゼが、５’ヌクレオチドから末端リン酸基のうちの１つを除去し、２つの末端リン酸を残す。次いで、グアノシン三リン酸（ＧＴＰ）が、グアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸に付加され、５’５’５三リン酸結合をもたらす。次いで、グアニンの７－窒素が、メチルトランスフェラーゼによってメチル化される。キャップ構造の例としては、以下に限定されないが、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’（Ａ，Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）ＡおよびＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ）が挙げられる。追加のキャップ構造は、公開された米国特許出願第２０１６／００３２３５６号および２０１７年２月２７日に出願された米国仮特許出願第６２／４６４，３２７号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。
【０１２５】
テール構造は典型的に、ポリ（Ａ）テールおよび／またはポリ（Ｃ）テールを含む。ｍＲＮＡの３’末端上のポリＡテールまたはポリＣテールは、典型的には、少なくとも５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも１５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも２００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも２５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも３００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも３５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも４００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも４５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも５００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも５５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも６５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも７００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも７５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも８００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも８５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも９００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、少なくとも９５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、または少なくとも１ｋｂのアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチドをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、ポリＡテールまたはポリＣテールはそれぞれ、約１０～８００個のアデノシンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチド（例えば、約１０～２００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～３００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～４００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～５００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～５５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約５０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１００～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１５０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約２００～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約２５０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約３００～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約３５０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約４００～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約４５０～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシ

ンヌクレオチド、約５００～６００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～１５０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約１０～１００個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、約２０～７０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド、または約２０～６０個のアデノシンヌクレオチドもしくはシトシンヌクレオチド）であり得る。いくつかの実施形態では、テール構造は、本明細書に記載の様々な長さを有するポリ（Ａ）テールおよびポリ（Ｃ）テールの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、テール構造は、少なくとも５０％、５５％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のアデノシンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、テール構造は、少なくとも５０％、５５％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９２％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のシトシンヌクレオチドを含む。

【０１２６】

本明細書に記載されるように、５’キャップおよび／または３’テールの添加は、キャッピングおよび／またはテーリングなしでは、それらの早期に中止した（ｐｒｅｍａｔｕｒｅｌｙ　ａｂｏｒｔｅｄ）ｍＲＮＡ転写物のサイズが検出するには小さすぎる場合があるため、インビトロ合成中に生成された不全型（ａｂｏｒｔｉｖｅ）転写物の検出を容易にする。したがって、いくつかの実施形態では、５’キャップおよび／または３’テールは、ｍＲＮＡが純度（例えば、ｍＲＮＡ中に存在する不全型転写物のレベル）について試験される前に、合成ｍＲＮＡに加えられる。いくつかの実施形態では、５’キャップおよび／または３’テールは、本明細書に記載されるようにｍＲＮＡが精製される前に合成ｍＲＮＡに付加される。いくつかの実施形態では、５’キャップおよび／または３’テールは、本明細書に記載されるようにｍＲＮＡが精製された後に合成ｍＲＮＡに付加される。

【０１２７】

本発明に従って合成されたｍＲＮＡは、さらなる精製を行うことなく使用され得る。特に、本発明に従って合成されたｍＲＮＡは、ショートマー（ｓｈｏｒｔｍｅｒ）を除去する工程なしに使用され得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って合成されたｍＲＮＡは、さらに精製されてもよい。本発明に従って合成されたｍＲＮＡを精製するために様々な方法を使用することができる。例えば、ｍＲＮＡの精製は、遠心分離、濾過、および／またはクロマトグラフィー法を使用して実行することができる。いくつかの実施形態では、合成されたｍＲＮＡは、エタノール沈殿もしくは濾過もしくはクロマトグラフィー、またはゲル精製もしくは任意の他の好適な手段により精製される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ＨＰＬＣにより精製される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、当業者に周知の標準的なフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール溶液で抽出される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、接線流濾過を使用して精製される。好適な精製方法には、ＵＳ２０１６／００４０１５４、ＵＳ２０１５／０３７６２２０、２０１８年２月２７日に出願された「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＰＵＲＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＭＥＳＳＥＮＧＥＲ　ＲＮＡ」と題されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ１８／１９９５４、および２０１８年２月２７日に出願された「ＭＥＴＨＯＤＳ　ＦＯＲ　ＰＵＲＩＦＩＣＡＴＩＯＮ　ＯＦ　ＭＥＳＳＥＮＧＥＲ　ＲＮＡ」と題されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ１８／１９９７８に記載されている方法が含まれ、それらすべてが参照により本明細書に組み込まれ、本発明を実施するために使用することができる。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、キャッピングおよびテーリングの前に精製される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、キャッピングおよびテーリングの後に精製される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、キャッピングおよびテーリングの前および後に精製される。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、遠心分離により、キャッピングとテーリングの前もしくは後のいずれか、またはキャッピングとテーリングの前および後の両方で精製さ

れる。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、濾過により、キャッピングとテーリングの前もしくは後のいずれか、またはキャッピングとテーリングの前および後の両方で精製される。
【０１３１】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、接線流濾過（ＴＦＦ）により、キャッピングとテーリングの前もしくは後のいずれか、またはキャッピングとテーリングの前および後の両方で精製される。
【０１３２】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、クロマトグラフィーにより、キャッピングとテーリングの前もしくは後のいずれか、またはキャッピングとテーリングの前および後の両方で精製される。
【０１３３】
ｍＲＮＡの特性評価
ｍＲＮＡの全長転写物または不全型転写物は、当技術分野で利用可能な任意の方法を使用して検出および定量化されてもよい。いくつかの実施形態では、合成されたｍＲＮＡ分子は、ブロッティング、キャピラリー電気泳動、クロマトグラフィー、蛍光、ゲル電気泳動、ＨＰＬＣ、銀染色、分光法、紫外線（ＵＶ）、またはＵＰＬＣ、またはそれらの組み合わせを使用して検出される。本発明には、当該技術分野で公知の他の検出方法が含まれる。いくつかの実施形態では、合成されたｍＲＮＡ分子は、キャピラリー電気泳動による分離を伴うＵＶ吸収分光法を使用して検出される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ゲル電気泳動の前にグリオキサール染料によって最初に変性される（「グリオキサールゲル電気泳動」）。いくつかの実施形態では、合成ｍＲＮＡは、キャッピングまたはテーリング前に特性評価される。いくつかの実施形態では、合成ｍＲＮＡは、キャッピングおよびテーリング後に特性評価される。
【０１３４】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法によって生成されるｍＲＮＡは、完全長ｍＲＮＡ以外、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満、１％未満、０．５％未満、０．１％未満の不純物を含む。不純物は、ＩＶＴ汚染物質、例えば、タンパク質、酵素、遊離ヌクレオチド、および／またはショートマーを含む。
【０１３５】
いくつかの実施形態では、本発明に従って産生されるｍＲＮＡは、ショートマーまたは不全型転写物を実質的に含まない。特に、本発明に従って産生されるｍＲＮＡは、キャピラリー電気泳動またはグリオキサールゲル電気泳動によって、検出不可能なレベルのショートマーまたは不全型転写物を含有する。本明細書で使用される場合、用語「ショートマー」または「不全型転写物」は、完全長よりも小さい任意の転写物を指す。いくつかの実施形態では、「ショートマー」または「不全型転写物」は、長さが１００ヌクレオチド未満、長さが９０ヌクレオチド未満、長さが８０ヌクレオチド未満、長さが７０ヌクレオチド未満、長さが６０ヌクレオチド未満、長さが５０ヌクレオチド未満、長さが４０ヌクレオチド未満、長さが３０ヌクレオチド未満、長さが２０ヌクレオチド未満、または長さが１０ヌクレオチド未満である。いくつかの実施形態では、５’－キャップ、および／または３’－ポリＡテールを付加した後に、ショートマーを検出または定量化する。
【０１３６】
送達ビヒクル
本発明によると、本明細書に記載されるタンパク質またはペプチド（例えば、タンパク質またはペプチドの完全長、断片、もしくは一部）をコードするｍＲＮＡは、裸のＲＮＡ（パッケージされていない）として送達されてもよく、または送達ビヒクルを介して送達されてもよい。本明細書で使用される場合、「送達ビヒクル」、「移送ビヒクル」、「ナノ粒子」という用語、または文法的同義語は、互換的に使用される。

【０１３７】
送達ビヒクルは、１つ以上の追加の核酸、担体、標的化リガンドもしくは安定化試薬と組み合わせて、または好適な賦形剤と混合されている薬理組成物中で製剤化されてもよい。薬物の製剤化および投与の技術は、”Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，”Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，ｌａｔｅｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎで知ることができる。特定の送達ビヒクルは、標的細胞への核酸のトランスフェクションを促進するその能力に基づいて選択される。
【０１３８】
いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡを含む送達ビヒクルは、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、硬膜外、髄腔内、または例えば、噴霧を含む肺送達によって投与される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、送達ビヒクルが投与された組織で発現される。肺送達および噴霧化の追加的な教示は、「ＮＯＶＥＬ ＩＣＥ－ＢＡＳＥＤ ＬＩＰＩＤ ＮＡＮＯＰＡＲＴＩＣＬＥ ＦＯＲＭＵＬＡＴＩＯＮ ＦＯＲ ＤＥＬＩＶＥＲＹ ＯＦ ＭＲＮＡ」と題された出願人によって２０１７年１１月１０日に出願された関連する国際出願ＰＣＴ／ＵＳ１７／６１１００、および米国仮特許出願第６２／５０７，０６１号に記載されており、これらの各々が参照によりその全体が組み込まれる。
【０１３９】
いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡは、単一の送達ビヒクルを介して送達されてもよい。いくつかの実施形態では、タンパク質またはペプチドをコードするｍＲＮＡは、各々異なる組成の１つ以上の送達ビヒクルを介して送達されてもよい。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡが、同じ脂質ナノ粒子内に封入される。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡは、別個の脂質ナノ粒子内に封入される。
【０１４０】
様々な実施形態によると、好適な送達ビヒクルとして、以下に限定されないが、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、脂質ナノ粒子、およびリポソームなどのポリマー系担体、ナノリポソーム、セラミド含有ナノリポソーム、プロテオリポソーム、天然および合成由来の両方のエキソソーム、天然層状体、合成層状体、および半合成層状体、ナノ粒子、カルシウムリン－ケイ酸塩ナノ粒子、リン酸カルシウムナノ粒子、二酸化ケイ素ナノ粒子、ナノ結晶性微粒子、半導体ナノ粒子、ポリ（Ｄ－アルギニン）、ゾルゲル、ナノデンドリマー、デンプンベース送達系、ミセル、エマルジョン、ニオソーム、マルチドメインブロックポリマー（ビニルポリマー、ポリプロピルアクリル酸ポリマー、動的多抱合体）、乾燥粉末製剤、プラスミド、ウイルス、リン酸カルシウムヌクレオチド、アプタマー、ペプチド、ならびに他のベクトルタグ（ｖｅｃｔｏｒｉａｌ ｔａｇ）が挙げられる。また、好適な輸送ビヒクルとして、バイオナノカプセルおよび他のウイルスキャプシドタンパク質アセンブリの使用も企図される。（Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ；１９（９）：８８７－９５を参照されたい。
【０１４１】
リポソーム送達ビヒクル
いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、リポソーム送達ビヒクルであり、例えば、脂質ナノ粒子である。本明細書で使用される場合、リポソーム送達ビヒクル、例えば、脂質ナノ粒子は、通常、１つ以上の二重層の膜によって外部媒体から隔離された内部水空間を有する微視的ベシクルであるとして特徴付けられる。リポソームの二重層膜は、典型的には、空間的に分離された親水性ドメインおよび疎水性ドメインを含む合成起源または天然起源の脂質等の両親媒性分子によって形成される（Ｌａｓｉｃ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１６：３０７－３２１，１９９８）。リポソームの二重層膜は、両親媒性ポリマーおよび界面活性剤（例えば、ポリメロソーム、ニオソーム等）によって形成される場合もある。本発明との関連で、リポソーム送達ビヒクルは、典型的には、所望のｍＲＮＡを標的細胞または組織に輸送する役割を果たす。いくつかの実施形態では、ナノ粒子送達ビヒクルは、リポソームである。いくつかの実施形態では、リポソームは

、１つ以上のカチオン性脂質、１つ以上の非カチオン性脂質、１つ以上のコレステロールベースの脂質、および１つ以上のＰＥＧ修飾脂質を含む。いくつかの実施形態では、リポソームは、３つ以下の別個の脂質成分を含む。いくつかの実施形態では、１つの別個の脂質成分は、ステロールベースのカチオン性脂質である。

【０１４２】

カチオン性脂質

いくつかの実施形態では、リポソームは、１つ以上のカチオン性脂質を含み得る。本明細書で使用される場合、語句「カチオン性脂質」は、生理学的ｐＨなどの選択されたｐＨで正味の正電荷を有する多数の脂質種のいずれかを指す。いくつかのカチオン性脂質は文献に記載されており、それらの多くは市販されている。本発明の組成物および方法に使用するのに好適なカチオン性脂質は、国際特許公開第２０１０／０５３５７２号（例えば、段落［００２２５］に記載されているＣＩ　２－２００）および同第２０１２／１７０９３０に記載されているものを含み、これらの両方の文献は、参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、例えば、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－ｌ－イル）テトラコサ－１５，１８－ジエン－１－アミン（ＨＧＴ５０００）、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－４，１５，１８－トリエン－ｌ－アミン（ＨＧＴ５００１）、および（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－６－（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イル）テトラコサ－５，１５，１８－トリエン－１－アミン（ＨＧＴ５００２）など、２０１２年３月２９日に出願された米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたイオン化可能なカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子を用いる。

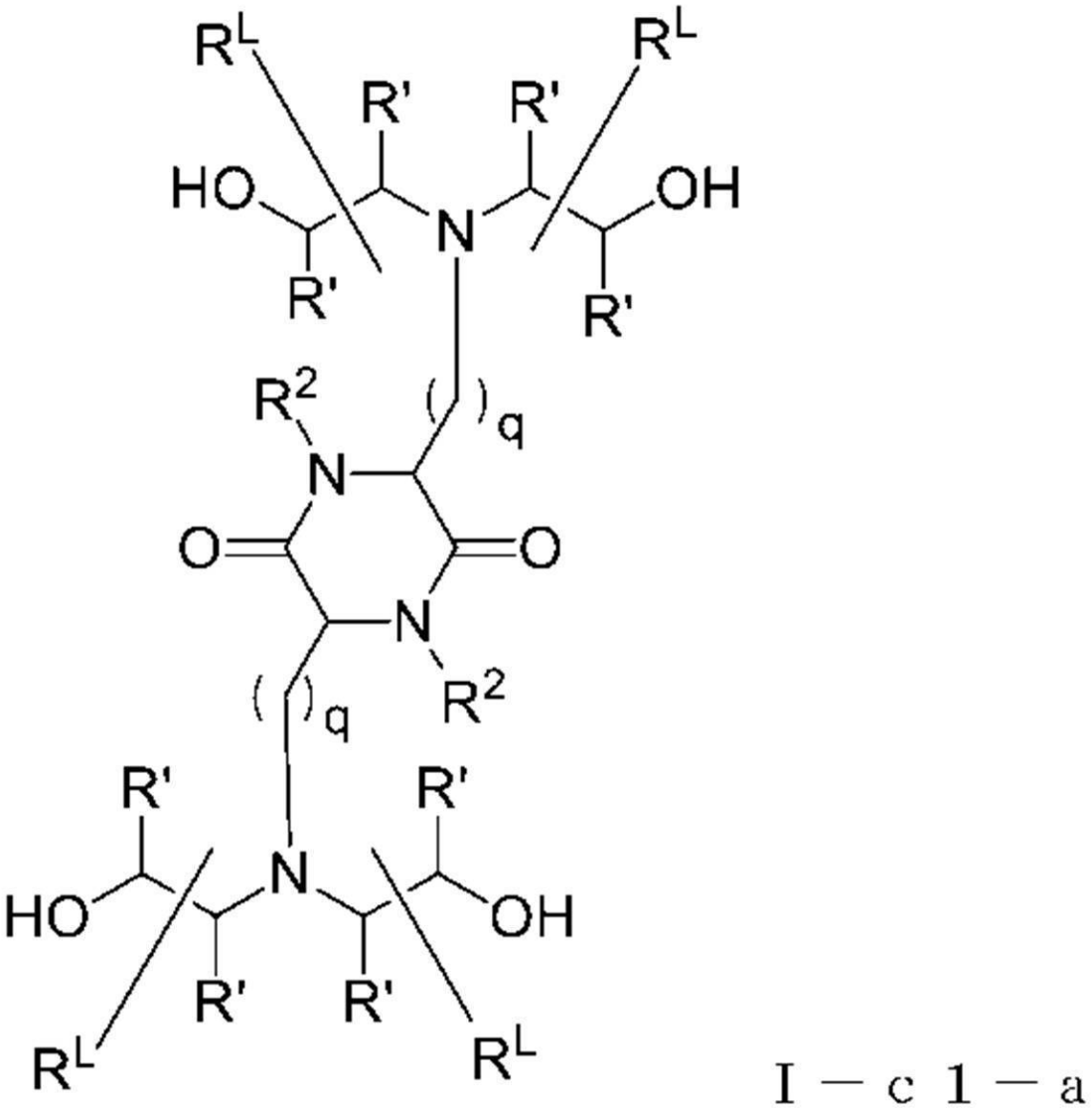
【０１４３】

いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、ＷＯ２０１３／０６３４６８と、「Ｌｉｐｉｄ　Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　Ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　ＲＮＡ」と題する同日付けで本願と同時に出願された米国仮出願とに記載されるカチオン性脂質を含み、これらの両方の文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、以下の式Ｉ－ｃ１－ａの化合物：

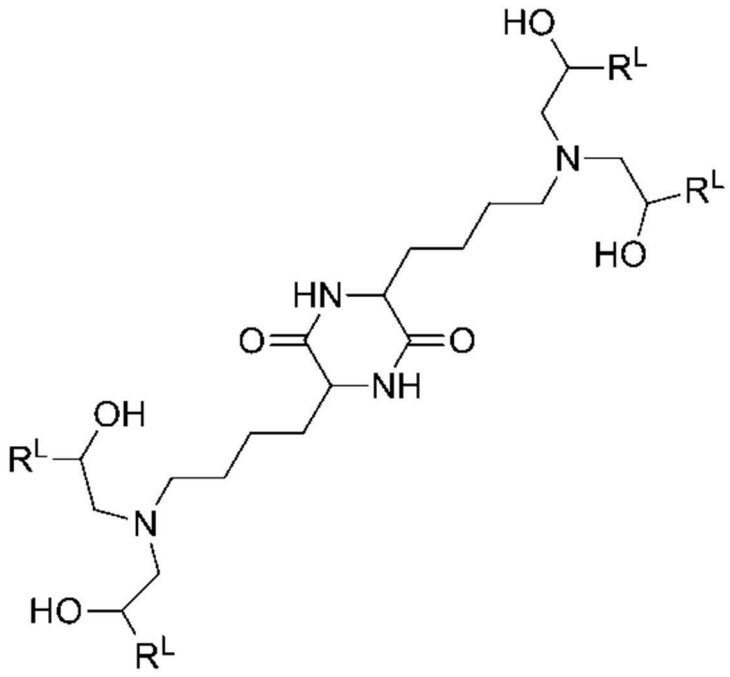
【化１】



Ｉ－ｃ１－ａ

、
またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中、
各Ｒ^{2}は、独立して、水素またはＣ$_{1-3}$アルキルであり、
各ｑは、独立して、２～６であり、
各Ｒ’は、独立して、水素またはＣ$_{1-3}$アルキルであり、
各Ｒ^{Ｌ}は、独立して、Ｃ$_{8-12}$アルキルである。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、各Ｒ^{2}は、独立して、水素、メチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、各Ｒ^{2}は、独立して、水素またはメチルである。いくつかの実施形態では、各Ｒ^{2}は、水素である。
【０１４６】
いくつかの実施形態では、各ｑは、独立して、３～６である。いくつかの実施形態では、各ｑは、独立して、３～５である。いくつかの実施形態では、各ｑは、４である。
【０１４７】
いくつかの実施形態では、各Ｒ’は、独立して、水素、メチル、またはエチルである。いくつかの実施形態では、各Ｒ’は、独立して、水素またはメチルである。いくつかの実施形態では、各Ｒ’は、独立して、水素である。

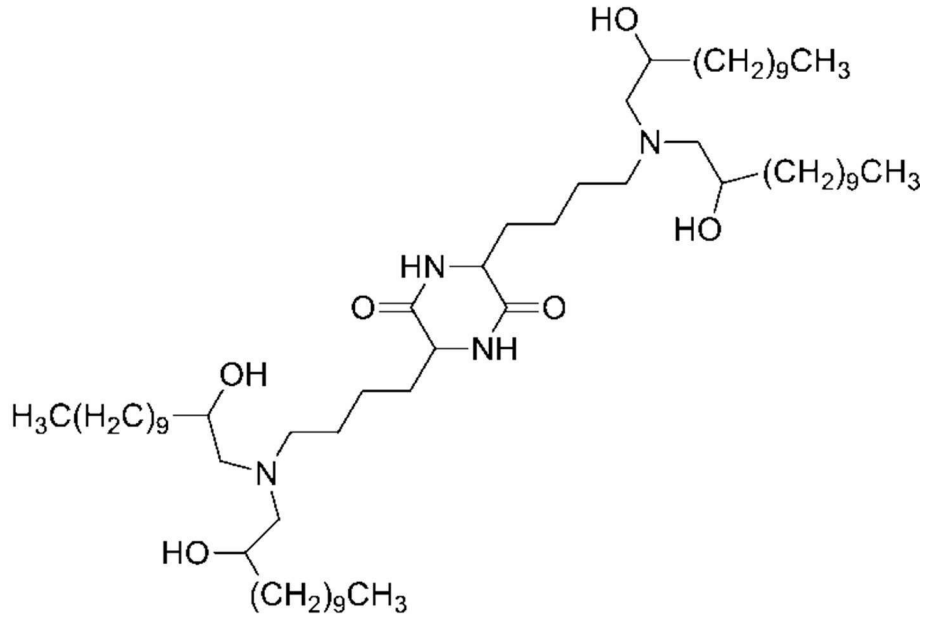
【０１４８】
いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、C_{8-12}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、n－C_{8-12}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、C_{9-11}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、n－C_{9-11}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、C_{10}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、n－C_{10}アルキルである。
【０１４９】
いくつかの実施形態では、各R^2は独立して水素またはメチルであり、各ｑは独立して３～５であり、各Ｒ’は独立して水素またはメチルであり、各R^Lは独立してC_{8-12}アルキルである。
【０１５０】
いくつかの実施形態では、各R^2は水素であり、各ｑは独立して３～５であり、各Ｒ’は水素であり、各R^Lは独立してC_{8-12}アルキルである。
【０１５１】
いくつかの実施形態では、各R^2は水素であり、各ｑは４であり、各Ｒ’は水素であり、各R^Lは独立してC_{8-12}アルキルである。
【０１５２】
いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｉ－ｇの化合物：
【化２】



Ｉ－ｇ

、
またはその薬学的に許容可能な塩を含み、式中、各R^Lは独立してC_{8-12}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、n－C_{8-12}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、C_{9-11}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、n－C_{9-11}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、独立して、C_{10}アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^Lは、n－C_{10}アルキルである。
【０１５３】
特定の実施形態では、提供されるリポソームは、カチオン性脂質ｃＫＫ－Ｅ１２または（３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン）を含む。ｃＫＫ－Ｅ１２の構造が以下に示される。

【化３】

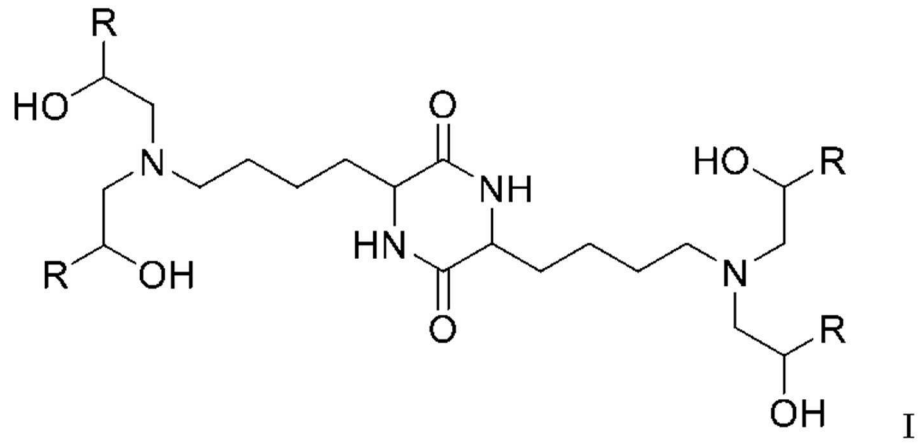


。

【０１５４】

さらなる例示的なカチオン性脂質は、式Ｉのカチオン性脂質：

【化４】



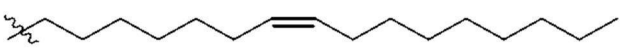
Ｉ

およびその薬学的に許容される塩を含み、

式中、

Ｒは

【化５】

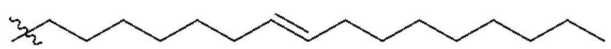


（「ＯＦ－００」）

であるか、

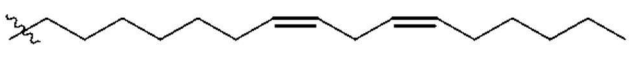
Ｒは

【化６】

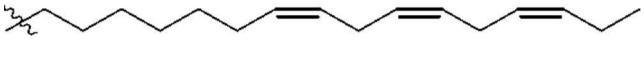


（「ＯＦ－０１」）

であるか、
Ｒは
【化７】


（「ＯＦ－０２」）

であるか、または
Ｒは
【化８】


（「ＯＦ－０３」）

である
（例えば、Ｆｅｎｔｏｎ，Ｏｗｅｎ　Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．”Ｂｉｏｉｎｓｐｉｒｅｄ　Ａｌｋｅｎｙｌ　Ａｍｉｎｏ　Ａｌｃｏｈｏｌ　Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　Ｌｉｐｉｄ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　ｆｏｒ　Ｈｉｇｈｌｙ　Ｐｏｔｅｎｔ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　ｍＲＮＡ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ．”Ａｄｖａｎｃｅｄ　ｍａｔｅｒｉａｌｓ（２０１６）を参照のこと）。
【０１５５】
　いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、Ｎ－［ｌ－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリドすなわち「ＤＯＴＭＡ」（Ｆｅｉｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４，７４１３（１９８７）、米国特許第４，８９７，３５５号）であってもよい。ＤＯＴＭＡは、単独で製剤化されてもよく、または中性脂質、ジオロイルホスファチジル－エタノールアミンすなわち「ＤＯＰＥ」、もしくは他のカチオン性脂質または非カチオン性脂質と組み合わせてリポソーム移送ビヒクルもしくは脂質ナノ粒子に製剤化されてもよく、かかるリポソームは、標的細胞への核酸の送達を増強するために使用され得る。他の好適なカチオン性脂質としては、例えば、５－カルボキシスペルミルグリシンジオクタデシルアミドすなわち「ＤＯＧＳ」、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミン－カルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－ｌ－プロパンアミニウムすなわち「ＤＯＳＰＡ」（Ｂｅｈｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６，６９８２（１９８９）、米国特許第５，１７１，６７８号、米国特許第５，３３４，７６１号）、ｌ，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパンすなわち「ＤＯＤＡＰ」、ｌ，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパンすなわち「ＤＯＴＡＰ」が挙げられる。
【０１５６】
　さらなる例示的なカチオン性脂質として、ｌ，２－ジステアリルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンすなわち「ＤＳＤＭＡ」、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンすなわち「ＤＯＤＭＡ」、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンすなわち「ＤＬｉｎＤＭＡ」、ｌ，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパンすなわち「ＤＬｅｎＤＭＡ」、Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリドすなわち「ＤＯＤＡＣ」、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミドすなわち「ＤＤＡＢ」、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロプ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミドすなわち「ＤＭＲＩＥ」、３－ジメチルアミノ－２－（コレスト－５－エン－３－ベーターオキシブタン－４－オキシ）－ｌ－（シス，シス－９，１２－オクタデカジエノキシ）プロパンすなわち「ＣＬｉｎＤＭＡ」、２－（５’－（コレスト－５－エン－３－ベーターオキシ）－３’－オキサペントキシ）－３－ジメチル－ｌ－（シス，シス－９’，ｌ－２’－オクタデカジエノキシ）プロパンすなわち「ＣｐＬｉｎＤＭＡ

」、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３，４－ジオレイルオキシベンジルアミンすなわち「ＤＭＯＢＡ」、１，２－Ｎ，Ｎ’－ジオレイルカルミバル－３－ジメチルアミノプロパンすなわち「ＤＯｃａｒｂＤＡＰ」、２，３－ジリノレオイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロピルアミンすなわち「ＤＬｉｎＤＡＰ」、ｌ，２－Ｎ，Ｎ’－ジリノレイルカルミバル－３－ジメチルアミノプロパンすなわち「ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ」、ｌ，２－ジリノレオイルカルミバル－３－ジメチルアミノプロパンすなわち「ＤＬｉｎＣＤＡＰ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［ｌ，３］－ジオキソランすなわち「ＤＬｉｎ－　－ＤＭＡ」、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［ｌ，３］－ジオキソランすなわち「ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ」、および２－（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，ｌ　２－ジエン－１－イル）－ｌ，３－ジオキソラン－４－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエタンアミン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ））（ＷＯ２０１０／０４２８７７；Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２８：１７２－１７６（２０１０）を参照されたい）、またはこれらの混合物が挙げられる。（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　１０７：２７６－２８７（２００５）、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ，ＤＶ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（８）：１００３－１００７（２００５）、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００５／１２１３４８Ａ１号）。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質のうちの１つ以上は、イミダゾール部分、ジアルキルアミノ部分、またはグアニジウム部分のうちの少なくとも１つを含む。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のカチオン性脂質は、ＸＴＣ（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）、ＭＣ３（（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート）、ＡＬＮＹ－１００（（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－アミン））、ＮＣ９８－５（４，７，１３－トリス（３－オキソ－３－（ウンデシルアミノ）プロピル）－Ｎ１，Ｎ１６－ジウンデシル－４，７，１０，１３－テトラアザヘキサデカン－１，１６－ジアミド）、ＤＯＤＡＰ（１，２－ジオレイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン）、ＨＧＴ４００３（ＷＯ２０１２／１７０８８９、その教示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＩＣＥ（ＷＯ２０１１／０６８８１０、その教示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＨＧＴ５０００（米国仮特許出願第６１／６１７，４６８号、その教示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）またはＨＧＴ５００１（シスまたはトランス）（仮特許出願第６１／６１７，４６８号）、ＷＯ２０１０／０５３５７２に開示されるリピドイド（ｌｉｐｉｄｏｉｄ）などのアミノアルコールリピドイド、ＤＯＴＡＰ（１，２－ジオレイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン）、ＤＯＴＭＡ（１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン）、ＤＬｉｎＤＭＡ（Ｈｅｙｅｓ，Ｊ．；Ｐａｌｍｅｒ，Ｌ．；Ｂｒｅｍｎｅｒ，Ｋ．；ＭａｃＬａｃｈｌａｎ，Ｉ．“Ｃａｔｉｏｎｉｃ　ｌｉｐｉｄ　ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ　ｉｎｆｌｕｅｎｃｅｓ　ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄｓ”Ｊ．Ｃｏｎｔｒ．Ｒｅｌ．２００５，１０７，２７６－２８７）、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（Ｓｅｍｐｌｅ，Ｓ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．“Ｒａｔｉｏｎａｌ　Ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　Ｃａｔｉｏｎｉｃ　Ｌｉｐｉｄｓ　ｆｏｒ　ｓｉＲＮＡ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０１０，２８，１７２－１７６）、Ｃ１２－２００（Ｌｏｖｅ，Ｋ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．“Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ　ｍａｔｅｒｉａｌｓ　ｆｏｒ　ｌｏｗ－ｄｏｓｅ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ”ＰＮＡＳ　２０１０，１０７，１８６４－１８６９）から選択され得る。

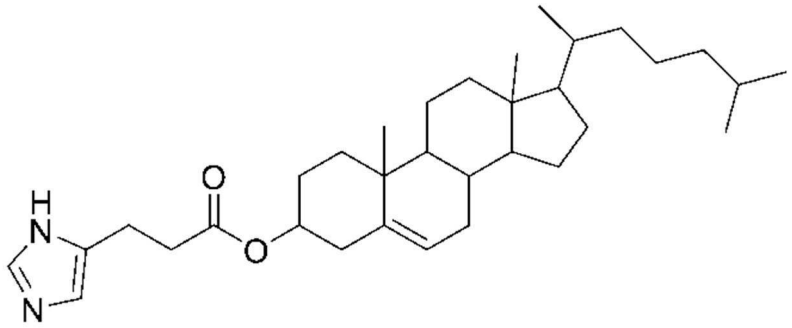
【０１５８】

ステロールカチオン性脂質

いくつかの実施形態では、ステロールベースのカチオン性脂質は、ジアルキルアミノ含

有ステロールベースのカチオン性脂質、イミダゾール含有ステロールベースのカチオン性脂質、およびグアニジニウム含有ステロールベースのカチオン性脂質である。例えば、ある特定の実施形態は、イミダゾールを含む１つ以上のステロールベースのカチオン性脂質、例えば、以下の構造（ＩＩ）により示される、イミダゾールコレステロールエステルすなわち「ＩＣＥ」脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエートを含む、組成物を対象とする。ある特定の実施形態では、機能性タンパク質をコードするＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）の送達のための脂質ナノ粒子は、１つ以上のイミダゾールベースのカチオン性脂質、例えば、構造（ＩＩ）により示される、イミダゾールコレステロールエステルすなわち「ＩＣＥ」脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエートを含み得る。

【化９】



（ＩＩ）

【０１５９】

いくつかの実施形態では、リポソーム中のカチオン性脂質のパーセンテージは、１０％超、２０％超、３０％超、４０％超、５０％超、６０％超、または７０％超であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、リポソームの約３０～５０重量％（例えば、約３０～４５重量％、約３０～４０重量％、約３５～５０重量％、約３５～４５重量％、または約３５～４０重量％）を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、ＩＣＥ脂質）は、モル比でリポソームの約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、または約５０％を構成する。

【０１６０】

非カチオン性／ヘルパー脂質

いくつかの実施形態では、提供されたリポソームは、１つ以上の非カチオン性（「ヘルパー」）脂質を含む。本明細書で使用される場合、語句「非カチオン性脂質」は、任意の中性脂質、双性イオン性脂質、またはアニオン性脂質を意味する。本明細書で使用される場合、語句「アニオン性脂質」は、生理学的ｐＨなどの選択されたＨで正味の負電荷を保有する多数の脂質種のいずれかを指す。非カチオン性脂質として、以下に限定されないが、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）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、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）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－ｌ－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホ

エタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、ガングリオシド、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、ｌ－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、またはこれらの混合物が挙げられる。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、こうした非カチオン性脂質は、単独で使用され得るが、好ましくは他の脂質、例えば、カチオン性脂質と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、リポソームに存在する総脂質の約５％～約９０％、または約１０％～約７０％のモル比率を含み得る。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、中性脂質、すなわち、組成物が製剤化および／または投与される条件下で正味の電荷を保有しない脂質である。いくつかの実施形態では、リポソーム中の非カチオン性脂質の割合は、５％超、１０％超、２０％超、３０％超、または４０％超であり得る。

【０１６２】

コレステロールベースの脂質

いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、１つ以上のコレステロールベースの脂質を含む。例として、好適なコレステロールベースのカチオン性脂質として、例えば、ＤＣ－Ｃｈｏｉ（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサミドコレステロール）、ｌ，４－ビス（３－Ｎ－オレイルアミノ－プロピル）ピペラジン（Ｇａｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１７９，２８０（１９９１）、Ｗｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２３，１３９（１９９７）、米国特許第５，７４４，３３５号）、またはＩＣＥが挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロールベースの脂質は、リポソームに存在する総脂質の約２％～約３０％、または約５％～約２０％のモル比率を含み得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子中のコレステロールベースの脂質のパーセンテージは、５％超、１０％超、２０％超、３０％超、または４０％超であり得る。

【０１６３】

ＰＥＧ修飾脂質

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾リン脂質、およびＮ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－［スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）－２０００］（Ｃ８　ＰＥＧ－２０００セラミド）を含めた誘導体化されたセラミド（ＰＥＧ－ＣＥＲ）などの誘導体化脂質の使用もまた、単独で、または好ましくは移送ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）を含む他の脂質製剤と組み合わされて、本発明によって企図される。企図されるＰＥＧ修飾脂質は、長さがC_6～C_{20}のアルキル鎖を有する脂質に共有結合された長さ最大ＳｋＤａのポリエチレングリコール鎖を含むが、これに限定されない。こうした成分の付加は、複合体の凝集を阻止することができ、また循環寿命を増加させ、脂質－核酸組成物の標的組織への送達を増加させるための手段を提供することができる（Ｋｌｉｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２６８（１）：２３５－２３７）。あるいは、これらの成分はインビボで製剤の外へと速やかに交換されるように選択され得る（米国特許第５，８８５，６１３号を参照のこと）。特定の有用な交換可能な脂質は、より短いアシル鎖（例えば、Ｃ１４またはＣ１８）を有するＰＥＧ－セラミドである。本発明のＰＥＧ修飾リン脂質および誘導体化された脂質は、リポソーム移送ビヒクルに存在する総脂質の約０％～約２０％、約０．５％～約２０％、約１％～約１５％、約４％～約１０％、または約２％のモル比率を含み得る。

【０１６４】

様々な実施形態によると、脂質ナノ粒子を含む、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および／またはＰＥＧ修飾脂質の選択、ならびにこれらの脂質の相互の相対モル比率の選択は、選択される脂質の特性、意図する標的細胞の性質、送達されるＭＣＮＡの特性に基づいて行われる。追加の考慮すべき事項は、例えば、選択される脂質のアルキル鎖の飽和度、ならびに大きさ、電荷、ｐＨ、ｐＫａ、融合性、および毒性を含む。したがって、モ

ル比率はそれらに応じて調節され得る。
【０１６５】
ポリマー
いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、担体としてポリマーを使用して、単独でまたは本明細書に記載される様々な脂質を含む他の担体と組み合わせて製剤化される。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるリポソーム送達ビヒクルは、ポリマーを含むナノ粒子も包含する。好適なポリマーとして、例えば、ポリアクリレート類、ポリアルキシアノアクリレート類、ポリラクチド、ポリラクチド－ポリグリコリドコポリマー類、ポリカプロラクトン類、デキストラン、アルブミン、ゼラチン、アルギネート、コラーゲン、キトサン、シクロデキストリン類、プロタミン、ＰＥＧ化プロタミン、ＰＬＬ、ＰＥＧ化ＰＬＬ、およびポリエチレンイミン（ＰＥＩ）が挙げられ得る。ＰＥＩを含む場合、ＰＥＩは１０～４０ｋＤａの範囲の分子量を有する分岐状ＰＥＩ、例えば、２５ｋＤａの分岐状ＰＥＩ（Ｓｉｇｍａ＃４０８７２７）であり得る。
【０１６６】
本発明に好適なリポソームは、本明細書に記載のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、コレステロール脂質、ＰＥＧ修飾脂質、および／またはポリマーのいずれかのうちの１つ以上を様々な割合で含み得る。非限定的な例として、好適なリポソーム製剤は、ｃＫＫ－Ｅ１２、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；Ｃ１２－２００、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＨＧＴ４００３、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；ＩＣＥ、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋ；またはＩＣＥ、ＤＯＰＥ、およびＤＭＧ－ＰＥＧ２Ｋから選択される組み合わせを含み得る。
【０１６７】
様々な実施形態では、カチオン性脂質（例えば、ｃＫＫ－Ｅ１２、Ｃ１２－２００、ＩＣＥ、および／またはＨＧＴ４００３）は、モル比でリポソームの約３０～６０％（例えば、約３０～５５％、約３０～５０％、約３０～４５％、約３０～４０％、約３５～５０％、約３５～４５％、または約３５～４０％）を構成する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質（例えば、ｃＫＫ－Ｅ１２、Ｃ１２－２００、ＩＣＥ、および／またはＨＧＴ４００３）のパーセンテージは、モル比率でリポソームの約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、または約６０％以上である。
【０１６８】
いくつかの実施形態では、カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロールベースの脂質：ＰＥＧ修飾脂質の比は、それぞれ約３０～６０：２５～３５：２０～３０：１～１５であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロールベースの脂質：ＰＥＧ修飾脂質の比率は、それぞれ、およそ４０：３０：２０：１０である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロールベースの脂質：ＰＥＧ修飾脂質の比率は、それぞれ、およそ４０：３０：２５：５である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロールベースの脂質：ＰＥＧ修飾脂質の比率は、それぞれ、およそ４０：３２：２５：３である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質：非カチオン性脂質：コレステロールベースの脂質：ＰＥＧ修飾脂質の比率は、およそ５０：２５：２０：５である。
【０１６９】
個別の脂質成分の比率
脂質ナノ粒子が脂質の３つ以下の別個の成分を含む実施形態では、総脂質含量の比率（すなわち、脂質成分（１）：脂質成分（２）：脂質成分（３）の比率）は、ｘ：ｙ：ｚとして表され得、
（ｙ＋ｚ）＝１００－ｘである。
【０１７０】
いくつかの実施形態では、「ｘ」、「ｙ」、および「ｚ」の各々は、脂質の３つの別個の成分のモルパーセントを表し、比率はモル比である。

【０１７１】
いくつかの実施形態では、「ｘ」、「ｙ」、および「ｚ」の各々は、脂質の３つの別個の成分の重量パーセントを表し、比率は重量比である。
【０１７２】
いくつかの実施形態では、変数「ｘ」で表される脂質成分（１）は、ステロールベースのカチオン性脂質である。
【０１７３】
いくつかの実施形態では、変数「ｙ」で表される脂質成分（２）は、ヘルパー脂質である。
【０１７４】
いくつかの実施形態では、変数「ｚ」で表される脂質成分（３）は、ＰＥＧ脂質である。
【０１７５】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）のモルパーセントを表す変数「ｘ」は、少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％である。
【０１７６】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）のモルパーセントを表す変数「ｘ」は、約９５％以下、約９０％以下、約８５％以下、約８０％以下、約７５％以下、約７０％以下、約６５％以下、約６０％以下、約５５％以下、約５０％以下、約４０％以下、約３０％以下、約２０％以下、または約１０％以下である。実施形態では、変数「ｘ」は、約６５％以下、約６０％以下、約５５％以下、約５０％以下、約４０％以下である。
【０１７７】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）のモルパーセントを表す変数「ｘ」は、少なくとも約５０％～約９５％未満、少なくとも約５０％～約９０％未満、少なくとも約５０％～約８５％未満、少なくとも約５０％～約８０％未満、少なくとも約５０％～約７５％未満、少なくとも約５０％～約７０％未満、少なくとも約５０％～約６５％未満、または少なくとも約５０％～約６０％未満である。実施形態では、変数「ｘ」は、少なくとも約５０％～約７０％未満、少なくとも約５０％～約６５％未満、または少なくとも約５０％～約６０％未満である。
【０１７８】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）の重量パーセントを表す変数「ｘ」は、少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％である。
【０１７９】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）の重量パーセントを表す変数「ｘ」は、約９５％以下、約９０％以下、約８５％以下、約８０％以下、約７５％以下、約７０％以下、約６５％以下、約６０％以下、約５５％以下、約５０％以下、約４０％以下、約３０％以下、約２０％以下、または約１０％以下である。実施形態では、変数「ｘ」は、約６５％以下、約６０％以下、約５５％以下、約５０％以下、約４０％以下である。
【０１８０】
いくつかの実施形態では、脂質成分（１）（例えば、ステロールベースのカチオン性脂質）の重量パーセントを表す変数「ｘ」は、少なくとも約５０％～約９５％未満、少なくとも約５０％～約９０％未満、少なくとも約５０％～約８５％未満、少なくとも約５０％～約８０％未満、少なくとも約５０％～約７５％未満、少なくとも約５０％～約７０％未満、少なくとも約５０％～約６５％未満、少なくとも約５０％～約６０％未満である。実施形態では、変数「ｘ」は、少なくとも約５０％～約７０％未満、少なくとも約５０％～

約６５％未満、または少なくとも約５０％～約６０％未満である。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）のモルパーセントを表す変数「ｚ」は、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、または２５％以下である。いくつかの実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）のモルパーセントを表す変数「ｚ」は、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％である。実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）のモルパーセントを表す変数「ｚ」は、約１％～約１０％、約２％～約１０％、約３％～約１０％、約４％～約１０％、約１％～約７．５％、約２．５％～約１０％、約２．５％～約７．５％、約２．５％～約５％、約５％～約７．５％、または約５％～約１０％である。
【０１８２】
いくつかの実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）の重量パーセントを表す変数「ｚ」は、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、または２５％以下である。いくつかの実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）の重量パーセントを表す変数「ｚ」は、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％である。実施形態では、脂質成分（３）（例えば、ＰＥＧ脂質）の重量パーセントを表す変数「ｚ」は、約１％～約１０％、約２％～約１０％、約３％～約１０％、約４％～約１０％、約１％～約７．５％、約２．５％～約１０％、約２．５％～約７．５％、約２．５％～約５％、約５％～約７．５％、または約５％～約１０％である。
【０１８３】
３つだけの別個の脂質成分を有する組成物については、変数「ｘ」、「ｙ」、および「ｚ」は、３つの変数の合計が総脂質含量の１００％になる限り、任意の組み合わせであってもよい。
【０１８４】
ｍＲＮＡを封入するリポソームの製剤化
本発明の組成物で使用するためのリポソーム移送ビヒクルは、当該技術分野において現在公知である様々な技術により調製することができる。提供される組成物で使用するためのリポソームは、当該技術分野において現在公知である様々な技術により調製することができる。例えば、多重層ベシクル（ＭＬＶ）は、適切な溶媒に脂質を溶解することにより、選択された脂質を好適な容器または器の内壁に堆積させ、次いで、溶媒を蒸発させて器の内側に薄膜を残すか、または噴霧乾燥させることなどによる、従来技術に従って調製され得る。続いて、水相を渦動運動させながら器に添加し、その結果として、ＭＬＶを形成することができる。次に、単層ベシクル（ＵＬＶ）を、多重層ベシクルのホモジナイゼーション、超音波処理、または押出により形成することができる。加えて、単層ベシクルを、界面活性剤除去技術により形成することができる。
【０１８５】
特定の実施形態では、提供される組成物はリポソームを含み、この場合においてｍＲＮＡはリポソームの両表面上で会合し、および同リポソーム内に封入される。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームは、静電相互作用によりｍＲＮＡと会合し得る。例えば、本発明の組成物の調製中に、カチオン性リポソームは、静電相互作用によりｍＲＮＡと会合し得る。
【０１８６】
いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法は、リポソームに封入されたｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡ種が、同一のリポソームに封入され得る。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡ種が、異なるリポソームに封入され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは１つ以上のリポソームに封入され、当該リポソームは、その脂質組成、脂質成分のモル比、大きさ、電荷（ゼータ電位）、標的化リガンド、および／またはそれらの組み合わせにおいて異なる。いくつかの実施形態で

は、１つ以上のリポソームは、ステロールベースのカチオン性脂質、中性脂質、ＰＥＧ修飾脂質、および／またはこれらの組み合わせの異なる組成を有し得る。いくつかの実施形態では、１つ以上のリポソームは、リポソームを作製するために使用されるコレステロールベースのカチオン性脂質、中性脂質、およびＰＥＧ修飾脂質の異なるモル比を有し得る。

【０１８７】

所望のｍＲＮＡをリポソーム内に組み込むプロセスは、「担持させる（ｌｏａｄｉｎｇ）」と称されることが多い。例示的な方法は、Ｌａｓｉｃ，ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，３１２：２５５－２５８，１９９２に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。リポソーム組み込まれた核酸は、リポソームの内部空間、つまりリポソームの二分子膜内に完全にもしくは部分的に位置するか、またはリポソーム膜の外表面と会合し得る。核酸のリポソーム内への組み込みは本明細書において「封入」とも称され、そこで、核酸がリポソームの内部空間内に完全に包含される。ｍＲＮＡを、例えばリポソームなどの移送ビヒクル内に組み込む目的はしばしば、核酸を分解する酵素もしくは化学物質、および／または核酸の急速排出をもたらす系もしくは受容体を含み得る環境から核酸を保護することである。したがって、いくつかの実施形態では、好適な送達ビヒクルは、その中に含まれるｍＲＮＡの安定性を強化することができ、および／または標的細胞もしくは標的組織へのｍＲＮＡの送達を容易にする。

【０１８８】

本発明による好適なリポソームは、様々なサイズで作製することができる。いくつかの実施形態では、提供されるリポソームは、従来から知られているｍＲＮＡ封入リポソームよりも小さく作製され得る。いくつかの実施形態では、リポソームの大きさが減少すると、ｍＲＮＡの送達効率が高くなる。適切なリポソームの大きさは、標的細胞または標的組織の部位を考慮し、また作製されるリポソームの用途をある程度考慮して選択することができる。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、適切な大きさのリポソームを選択して、ｍＲＮＡによりコードされる抗体の全身分布を促進する。いくつかの実施形態では、特定の細胞または組織へのｍＲＮＡのトランスフェクションを限定することが望ましい場合がある。例えば、肝細胞を標的とするには、リポソームは、その寸法が肝臓の肝類洞を覆う内皮層の開窓よりも小さくなるように寸法決定されてもよく、こうした場合、リポソームは、その内皮開窓を容易に貫通して、標的肝細胞に達することができようになる。

【０１９０】

代替的または追加的に、リポソームは、リポソームの寸法が特定の細胞もしくは組織内への分布を制限するか、または意図的に分布しないようにするのに十分な直径であるように寸法決定されてもよい。

【０１９１】

リポソーム集団の寸法決定に対して、当該技術分野において既知の様々な別の方法を利用することができる。こうした寸法決定方法の１つは、米国特許第４，７３７，３２３号に記載されており、この文献は参照によって本明細書に組み込まれる。バス超音波処理またはプローブ超音波処理のいずれかによるリポソーム懸濁液の超音波処理によって、直径が約０．０５マイクロメートル未満の小さいＵＬＶまでサイズ漸減する。ホモジナイゼーションは別の方法であり、大きいリポソームをより小さいものに断片化するのに剪断エネルギーを利用する。典型的なホモジナイゼーション手順において、ＭＬＶは、選択されたリポソームの大きさ、典型的には約０．１～０．５マイクロメートルの大きさが観察されるまで、標準的なエマルジョンホモジナイザーを用いて再循環される。リポソームの大きさは、Ｂｌｏｏｍｆｉｅｌｄ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．，１０：４２１－１５０（１９８１）（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載された準電気光散乱（ＱＥＬＳ）によって算出され得る。平均リポソーム直径を、形成されたリポソームを超音波処理することによって低減させることができる。断続的な超音波処理サイクルをＱＥＬＳ評価と交互に行って、効率的なリポソーム合成を導くことができる。

【実施例】
【０１９２】
本発明のある特定の化合物、組成物、および方法が、ある特定の実施形態に従って具体的に説明されているが、以下の実施例は、本発明の化合物を例証する役割のみを果たし、それを限定することを意図するものではない。
【０１９３】
実施例１．がん治療のためのｍＲＮＡ担持（ｌｏａｄｅｄ）ＬＮＰの製剤化
本実施例は、がん治療のインビボ有効性試験で使用される、例示的なｍＲＮＡ担持脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を提供する。
【０１９４】
表１に示すようにコドン最適化、野生型、または変異型ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＳＴＩＮＧ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＬＴ－３Ｌ、ＮＬＲＰ３、またはそれらの組み合わせをコードするメッセンジャーＲＮＡを、調製し、ｃＫＫ－Ｅ１２を含むＬＮＰ内に封入した。陰性対照として、ホタルルシフェラーゼ（ＦＦＬ）ｍＲＮＡをＬＮＰ内に封入した。
【表１】

表１．インビボ試験で使用されるｍＲＮＡコンストラクト

mRNA	構造	サイズ(テール/Cap1 を含む)bp	Cap1(%)
1	CO-mscIL-12	2284	-
2	キメラ H9 IL-2	1054	100
3	CO-mSTING(R283M)	1578	100
4	mGM-CSF	828	100
5	CO-mFLT3L	1142	100
6	CO-mNLRP3(D301N)	4000	100

＊ＣＯ：コドン最適化、ｍｓｃ：間葉系幹細胞、ｍ：マウス、括弧内：変異

【０１９５】
実施例２．ＭＣ３８マウスモデルにおけるｍＲＮＡ－ＬＮＰのインビボ有効性の試験デザイン
本実施例は、皮下ＭＣ３８マウス結腸がん同系マウスモデルの治療におけるｍＲＮＡ－ＬＮＰのインビボ治療有効性を、前臨床的に評価するための試験デザインを記載する。
【０１９６】
ＭＣ－３８（マウス結腸直腸がん細胞株）腫瘍を、免疫能力のあるマウスに皮下移植した。腫瘍接種の３～４日前に、および　　殺時に血清を採取した。移植された腫瘍が６０～８０（mm^3）（１日目、ｄ１）のサイズに増殖したとき、マウスに、実施例１に記載されるように調製された様々なｍＲＮＡ－ＬＮＰを腫瘍内注射した。表２に示すように、４日間の間隔で２０日間にわたって６回注射した。群ＢおよびＣは、単一の薬剤を投与されたのに対し、群Ｄ～Ｈは、薬剤の組み合わせを投与された。群ＡおよびＩは、陰性対照としてそれぞれ生理食塩水およびＦＦＬ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰを投与された。マウスをモニタリングし、試験全体を通じて、４６日目まで、または腫瘍サイズが３０００mm^3を超えるまで腫瘍体積を測定した。

【表２】

表２．ＭＣ－３８結腸直腸がんマウスモデルの試験デザイン

群	標的	マウスの数	投与量(μg)	頻度	原液
A	生理食塩水(陰性対照)	10	0	d1,d4,d8,d12,d16,d20	-
B	IL-12sc	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
C	IL-2†	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
D	STING*/IL-12sc	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
E	STING*/IL-12sc/GM-CSF	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
F	STING*/IL-12sc/FLT-3L/GM-CSF	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
G	STING*/IL-12sc/NLRP3#/GM-CSF	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
H	STING*/IL-12sc/IL-2†/GM-CSF	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml
I	FFL(陰性対照)	10	7.5	d1,d4,d8,d12,d16,d20	250μg/ml

＊：構成的活性型、†：キメラＨ９、＃：Ｄ３０１Ｎ変異

【０１９７】

実施例３．ＭＣ３８マウスモデルにおけるｍＲＮＡ－ＬＮＰのインビボ抗腫瘍有効性

本実施例は、腫瘍サイズの減少および腫瘍増殖の阻害において、本発明に従って作製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰのインビボ有効性を示す。

【０１９８】

腫瘍体積は、図１および表３に示すように、示された時点で測定された。試験のエンドポイントは、動物の死亡または腫瘍体積が３０００mm^3に達したことのいずれかであった。

【０１９９】

図１は、群Ｂ～Ｈのマウスの平均腫瘍体積が、グループＡまたはＩのマウスの平均腫瘍体積よりも有意に小さかったことを示す。群ＡおよびＩのマウスのほとんどが、試験完了前に死亡したか、または腫瘍体積が３０００mm^3を超えていた。試験終了時（ｄ４６）、完全奏功（ＣＲ）率は、群Ｂで１００％、群Ｃ　３０％、群Ｄで９０％、群Ｅで８０％、群Ｆで９０％、群Ｇで７０％、およびＨで７０％群であった（図５Ｂ～５Ｇを参照されたい）。特に、Ｂ～Ｈ群のマウスでは、陰性対照と比較して腫瘍増殖が有意に遅延した。表３～６を参照されたい。さらに、群Ｂ～Ｈの体重の変化率は、群ＡまたはＩと比較して有意に低かった（図６）。

【表３】

表３．異なる時点で測定された各群の平均腫瘍体積（ｍｍ３）

日	群								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	68.76	68.72	68.72	68.80	68.74	68.72	68.74	68.75	68.73
4	149.9	146.28	187.63	153.80	177.07	145.19	160.79	165.43	160.83
8	448.33	203.08	257.51	197.30	214.51	186.82	208.48	225.63	301.69
11	752.58	214.76	304.03	222.88	239.47	217.33	252.60	251.26	384.94
15	1684.07	240.17	342.13	243.75	260.22	234.69	270.32	268.23	616.28
18	1839.65	260.04	388.33	260.99	277.24	254.63	285.44	291.09	1000.56
22	3405.32	278.20	428.29	270.65	288.31	280.27	299.24	300.27	1592.15
25	-	288.30	484.10	292.17	296.94	301.04	313.14	319.13	2632.27
29	-	299.96	643.20	301.42	305.93	320.11	321.49	331.63	3830.06
32	-	295.75	689.31	313.28	312.87	329.47	315.87	338.34	-
36	-	253.02	800.21	311.35	228.34	188.95	183.35	219.10	-
39	-	142.56	663.73	368.06	180.43	156.69	162.95	160.06	-
43	-	83.82	952.53	119.75	213.11	124.22	73.88	162.78	-
46	-	80.70	1332.76	75.13	28.18	143.05	34.82	154.08	-

【０２００】

各群の平均腫瘍体積を、対照群（グループＡ）と比較した。具体的には、試験群の腫瘍体積（Ｔ）を、各時点における対照群の腫瘍体積（Ｃ）で割って、そのパーセンテージを図２に示すようにプロットした。さらに、腫瘍体積の阻害率を、以下のように各群について計算し：（平均（Ｃ）－平均（Ｔ））／平均（Ｃ））×１００％、図３および表４に示すようにプロットした。４６日目に測定されたグループＢ～Ｈの各マウスの腫瘍体積を、図４に示すようにプロットした。各群の平均値が示される。

【表４】

表４．異なる時点で測定された各群の腫瘍体積の平均阻害率（％）

群	試験日						
	1	4	8	11	15	18	22
B	0.07	2.41	54.70	71.46	85.74	85.86	91.83
C	0.06	-25.17	42.56	59.60	79.68	78.89	87.42
D	-0.06	-2.61	55.99	70.38	85.53	85.81	92.05
E	0.03	-18.13	52.15	68.18	84.55	84.93	91.53
F	0.06	3.14	58.33	71.12	86.06	86.16	91.77
G	0.03	-7.27	53.50	66.44	83.95	84.48	91.21
H	0.02	-10.36	49.67	66.61	84.07	84.18	91.18
I	0.05	-7.30	32.71	48.85	63.41	45.61	53.25

平均阻害％＝（平均（Ｃ）－平均（Ｔ））／平均（Ｃ）＊１００％

【表５】

表５．ΔＴ／ΔＣ％、異なる時点で測定された各群の腫瘍体積

群	試験日						
	1	4	8	11	15	18	22
B	100.00	95.60	35.40	21.36	10.61	10.80	6.28
C	100.00	146.56	49.74	34.41	16.93	18.05	10.78
D	100.00	104.76	33.85	22.53	10.83	10.85	6.05
E	100.00	133.52	38.40	24.97	11.85	11.77	6.58
F	100.00	94.24	31.11	21.73	10.27	10.50	6.34
G	100.00	113.45	36.81	26.89	12.48	12.24	6.91
H	100.00	119.16	41.33	26.69	12.35	12.56	6.94
I	100.00	113.53	61.38	46.24	33.90	52.62	45.66

ΔＴ／Ｃ％＝（平均（Ｔ）－平均（Ｔ０））／（平均（Ｃ）－平均（Ｃ０））＊１００％

Ｔ０－試験群の初期値

Ｃ０－対照群の初期値

【表６】

表６　平均阻害％ΔＴ／ΔＣ、異なる時点で測定された各群の腫瘍体積

群	試験日					
	4	8	11	15	18	22
B	4.40	64.60	78.64	89.39	89.20	93.72
C	-46.56	50.26	65.59	83.07	81.95	89.22
D	-4.76	66.15	77.47	89.17	89.15	93.95
E	-33.52	61.60	75.03	88.15	88.23	93.42
F	5.76	68.89	78.27	89.73	89.50	93.66
G	-13.45	63.19	73.11	87.52	87.76	93.09
H	-19.16	58.67	73.31	87.65	87.44	93.06
I	-13.53	38.62	53.76	66.10	47.38	54.34

平均Δ阻害％＝（（平均（Ｃ）－平均（Ｃ０））－（平均（Ｔ）－平均（Ｔ０））／（平均（Ｃ）－平均（Ｃ０））＊１００％

【０２０１】

全体として、本実施例は、本発明に従って作製されたｍＲＮＡ－ＬＮＰが、インビボでの抗腫瘍活性およびがんの治療に有効であることを実証している。

【０２０２】

μμ

実施例４．動物モデルにおいて、脂質ナノ粒子に封入した構成的活性型ＳＴＩＮＧ　ｍＲＮＡの投与により、腫瘍の増殖が遅延させ、生存が改善される

腫瘍増殖および動物に対する、脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ　ｍＲＮＡの投

与の効果を評価した。これらの研究のために、マウスモデル（Ｎ＝１０）にＭＣ３８腫瘍細胞を接種し、動物モデルで細胞を増殖させて腫瘍を形成させた。その後、動物モデルに、コドン最適化され、構成的活性型ＳＴＩＮＧを含む脂質封入されたｍＲＮＡを投与した。脂質ナノ粒子は、式Ｉのカチオン性脂質（上記の説明に示す）および１．５％のＰＥＧを用いて製剤化した。動物は、４日ごとに５μｇの脂質封入されたｍＲＮＡの腫瘍内用量投与を受けた。これらの試験からのデータを図７に示す。図７に示すように、構成的活性型ＳＴＩＮＧ ｍＲＮＡを投与された動物は、ビヒクルのみの対照と比較して、かつ追加の陰性対照と比較して、腫瘍増殖が少なかった。これらのデータは、脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧの投与により、腫瘍増殖が減少しおよび腫瘍増殖プロファイルが遅延することを示す。これらのデータは、構成的活性型ＳＴＩＮＧをコードする脂質封入されたｍＲＮＡが、がんの治療に対する有望なスタンドアロン型治療薬であることをさらに示す。

【０２０３】

上述のＭＣ３８マウス腫瘍モデルを使用して追加の試験を実行し、脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧを動物に投与した後の動物モデルの生存を評価した。これらの試験については、試験群には、次のものが含まれた：動物の１群に脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ ｍＲＮＡを投与し、マウスの別群にＰＤ－１モノクローナル抗体と組み合わせた構成的活性型ＳＴＩＮＧ ｍＲＮＡを投与した。これらの試験からのデータは、脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ ｍＲＮＡの投与が、ＰＤ－１モノクローナル抗体を添加することなく、動物モデルの生存を改善することを示した（図８）。全体として考えると、これらのデータは、脂質封入された構成的活性型ＳＴＩＮＧ ｍＲＮＡの投与が、腫瘍増殖を低減させ遅延させ、生存を改善することを示している。

【０２０４】

均等物

当業者は、日常的な実験作業を越えない手法を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識するか、または確認できるものとなる。本発明の範囲は、上記の記載に限定されることは意図されず、むしろ以下の特許請求の範囲に記述されるとおりである。

【図面】

【図１】

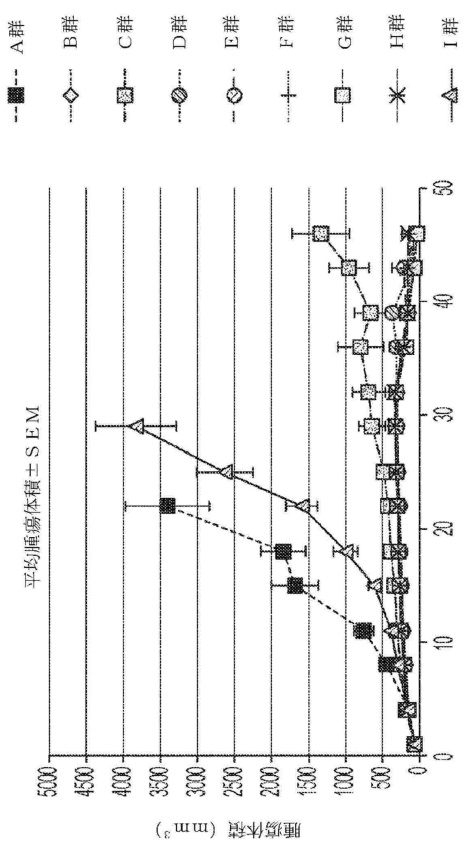
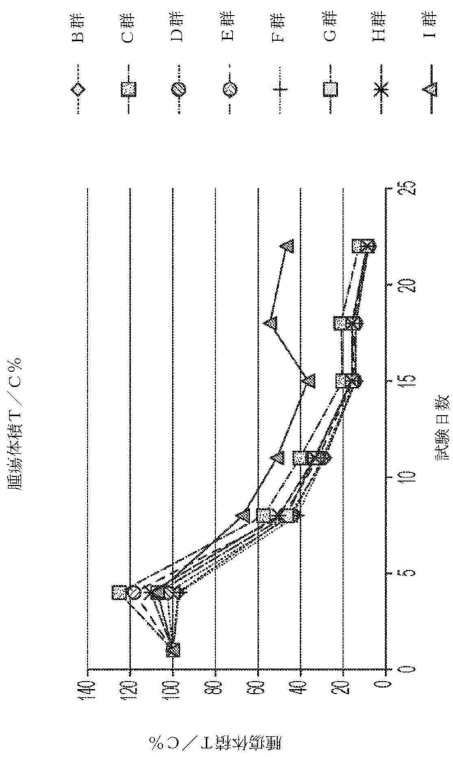


図１

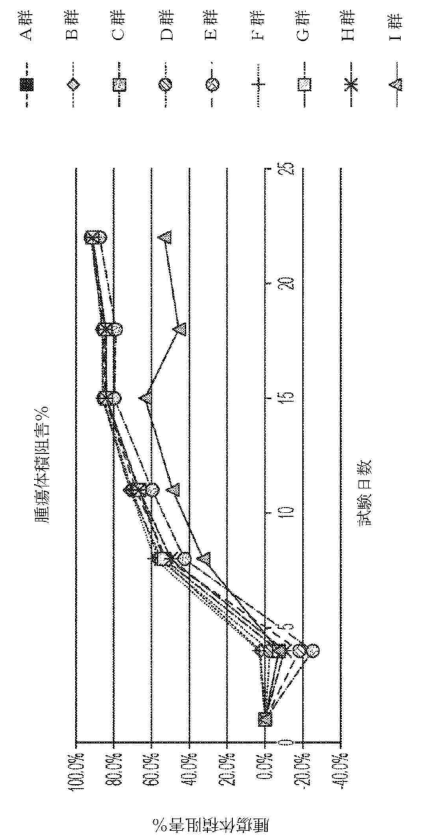
【図２】



Ｔ／Ｃ％＝平均（Ｔ）／平均（Ｃ）×１００
Ｔ＝試験群の腫瘍体積
Ｃ＝対照群の腫瘍体積

図２

【図３】



平均阻害％＝（平均（Ｃ）－平均（Ｔ））／平均（Ｃ）＊１００％
Ｔ＝試験群の腫瘍体積
Ｃ＝対照群の腫瘍体積

図３

【図４】

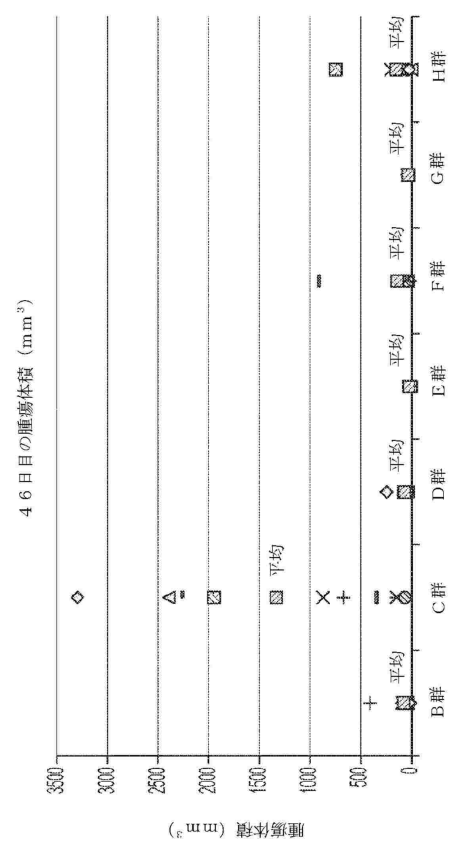


図４

【図５Ａ】

A群（生理食塩水、陰性対照）腫瘍体積							
	試験日						
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22
1	61.86	183.87	834.01	1536.05	3202.99		
2	63.82	140.47	595.70	1115.60	3235.12		
3	68.22	113.56	157.21	260.56	545.90	822.29	1315.92
4	73.75	188.57	373.79	801.79	1405.16	2659.10	3773.03
5	74.00	156.52	600.80	1079.65	2444.43	2906.31	6026.12
6	71.30	109.64	469.65	927.38	1401.70	1778.14	3931.31
7	62.60	109.39	255.72	545.84	1087.92	1663.22	2680.62
8	66.02	85.20	172.75	311.38	485.06	789.07	1799.20
9	56.90	130.89	317.48	377.30	1012.37	1287.74	2679.10
10	69.15	281.85	696.94	1100.24	2020.96	2791.29	5037.08
平均	68.76	149.90	448.33	762.58	1684.07	1839.55	3405.32
標準偏差	9.03	57.16	228.68	419.80	1005.69	963.77	1600.92

図５Ａ

【図５Ｂ】

B群（ＩＬ－１２）腫瘍体積															
	試験日														
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	70.03	166.37	190.16	196.70	207.54	251.16	258.13	258.81	260.81	186.49	94.65	29.45	21.29	11.65
2	66.17	163.52	196.87	217.43	224.18	247.18	254.03	255.53	273.61	277.19	223.80	118.45	44.31	35.87
3	61.68	118.36	199.66	212.88	230.05	257.18	277.24	285.91	298.04	302.04	166.13	100.33	90.93	86.43
4	71.02	128.21	172.68	178.92	182.62	187.18	191.30	214.19	215.44	221.82	185.87	162.18	71.19	36.11
5	69.11	147.70	171.90	182.62	226.07	240.54	311.23	326.04	332.29	333.76	279.88	162.24	97.04	94.70
6	76.56	140.09	174.36	182.73	192.15	207.47	218.19	226.81	247.77	249.26	251.17	196.47	122.84	30.70
7	56.99	146.63	267.11	296.64	305.46	341.09	346.29	362.17	368.30	369.19	370.77	239.81	208.91	407.79
8	79.49	124.68	185.51	194.56	320.27	323.52	337.39	340.70	344.55	349.83	283.19	105.17	46.70	32.16
9	63.89	102.57	235.98	241.49	254.36	274.59	283.31	291.79	335.21	340.04	342.05	150.77	70.10	42.95
10	72.21	224.70	236.58	243.59	259.04	270.50	304.93	312.02	323.62	327.86	332.86	160.79	64.95	21.62
平均	68.72	146.28	203.08	214.76	240.17	260.04	278.20	288.30	299.96	296.75	253.02	142.56	83.82	80.70
標準偏差	6.78	33.95	32.58	37.03	45.31	46.70	49.57	48.84	49.00	60.28	86.77	57.82	52.65	118.07

図５Ｂ

【図５Ｃ】

C群（ＩＬ－２）腫瘍体積															
	試験日														
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	64.11	190.33	284.66	315.74	357.14	451.13	492.85	585.96	1033.35	1232.77	1405.59	2151.34	2508.48	3294.45
2	81.90	228.62	287.83	312.63	378.79	448.73	591.12	643.11	752.98	833.90	864.50	1054.88	1383.02	1945.94
3	57.05	242.28	255.08	290.65	297.51	326.99	371.16	384.75	420.90	449.99	494.72	628.45	1435.17	2394.28
4	61.51	264.44	314.65	372.03	391.71	404.93	413.45	416.67	427.27	430.18	457.02	516.46	675.07	871.50
5	72.07	206.46	236.65	276.07	319.83	321.79	336.49	346.05	348.44	245.94	126.01	45.25	70.24	151.28
6	75.12	137.11	228.26	280.86	301.01	325.31	336.22	347.53	353.83	221.13	182.18	134.68	100.27	65.82
7	67.94	80.63	148.35	262.11	306.80	317.94	377.62	404.51	448.55	458.55	474.64	489.19	501.85	669.24
8	72.08	153.63	213.60	222.86	243.76	259.53	262.05	276.24	283.40	307.30	367.47	641.14	1563.60	2260.54
9	67.96	112.40	144.65	180.65	223.99	231.46	244.66	253.81	258.17	263.45	298.74	312.19	335.03	341.80
10	67.54	260.39	461.32	526.73	598.77	795.58	857.24	1182.38	2105.09	2449.94	3331.21			
平均	68.72	187.63	257.51	304.03	342.13	388.33	428.29	484.10	643.20	688.31	800.21	663.73	952.53	1332.76
標準偏差	7.07	64.15	90.88	93.98	104.78	160.57	182.27	274.46	566.04	694.17	964.30	633.04	819.97	1164.47

図５Ｃ

【図５Ｄ】

D群（ＳＴＩＮＧ／ＩＬ－１２）腫瘍体積															
	試験日														
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	74.06	120.97	131.67	142.33	164.52	169.64	177.38	237.27	239.61	299.25	233.68	174.55	100.67	59.50
2	65.28	170.84	207.39	235.71	254.08	258.91	266.92	280.01	283.83	300.66	317.30	325.94	204.44	80.22
3	71.00	120.12	178.13	185.84	212.17	258.10	266.11	265.66	297.10	261.28	131.15	114.40	102.06	36.51
4	57.78	130.89	153.41	162.69	217.81	229.54	245.54	251.46	256.56	208.61	175.35	139.03	83.40	68.03
5	92.81	229.84	289.21	323.60	341.54	348.94	357.24	379.45	390.71	325.74	222.18	205.66	75.30	58.84
6	63.32	186.52	312.91	333.62	354.00	369.25	382.21	387.48	391.78	393.85	217.35	107.41	78.69	47.50
7	60.98	128.96	157.96	198.12	210.23	218.12	223.96	236.84	241.20	243.49	142.54	123.84	75.63	30.80
8	73.82	175.48	193.09	211.92	221.52	250.59	265.70	324.15	354.84	364.38	263.05	141.28	118.28	48.24
9	65.16	140.67	181.96	230.38	265.04	302.72	308.70	318.74	331.46	507.75	1181.66	2112.23		
10	63.84	133.72	167.19	184.60	196.56	204.04	212.73	220.68	225.11	227.77	229.22	236.24	239.27	245.49
平均	68.80	153.80	197.30	222.88	243.75	260.99	270.85	292.17	301.42	313.28	311.35	388.06	119.75	75.13
標準偏差	9.98	36.81	59.90	61.74	61.53	63.01	63.52	59.13	62.65	90.23	310.70	616.52	60.28	66.04

図５Ｄ

【図５Ｅ】

E群（ＳＴＩＮＧ／ＩＬ－１２／ＧＭ－ＣＳＦ）腫瘍体積

	試験日															
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46		
1	69.89	208.42	248.13	258.89	281.54	288.35	290.46	296.27	302.81	304.69	175.98	118.58	27.39	18.93		
2	72.35	183.49	217.43	232.98	246.33	250.56	255.19	259.70	272.03	273.88	166.77	95.38	55.53	8.90		
3	70.13	180.67	203.35	245.75	250.63	264.07	285.41	297.11	304.97	311.31	224.01	118.42	49.63	30.56		
4	60.93	135.43	142.51	176.98	208.85	278.58	321.18	337.78	340.35	353.20	513.10	702.01	1499.48			
5	78.47	231.91	300.31	328.72	353.24	373.62	375.04	381.83	384.52	389.06	264.54	98.05	46.69	25.09		
6	59.11	167.57	230.40	251.52	259.60	276.98	278.56	284.23	291.45	294.14	176.40					
7	77.24	133.81	185.35	199.26	201.93	205.77	211.11	222.50	233.05	237.46	116.36	90.22	46.01	26.71		
8	67.21	170.98	187.02	212.92	261.27	276.06	277.91	288.28	315.55	317.16	191.23	118.41	67.84	41.56		
9	64.52	189.23	239.78	251.03	264.09	272.20	281.16	286.30	295.38	302.77	215.92	124.40	47.17	42.26		
10	67.58	169.18	190.80	239.67	274.67	286.23	307.08	316.37	319.22	344.99	237.06	158.36	58.22	31.44		
平均	68.74	177.07	214.51	239.47	260.22	277.24	288.31	296.94	305.93	312.87	228.34	180.43	213.11	28.18		
標準偏差	6.31	29.79	43.29	41.07	41.71	41.52	42.53	42.81	40.03	42.44	108.19	196.64	482.65	11.10		

図５Ｅ

【図５Ｆ】

F群（ＳＴＩＮＧ／ＩＬ－１２／ＦＬＴ－３Ｌ／ＧＭ－ＣＳＦ）腫瘍体積

	試験日															
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46		
1	67.01	162.80	185.74	200.35	234.93	289.48	311.72	336.84	358.23	360.32	210.48	184.42	75.05	35.91		
2	66.59	111.81	139.78	157.27	198.72	207.80	307.19	343.53	356.92	364.78	231.72	206.89	175.43	112.90		
3	60.62	174.01	240.23	281.27	295.98	306.58	314.27	324.59	328.27	330.82	112.01	88.25	38.20	33.20		
4	79.60	192.78	217.81	233.27	243.26	266.15	272.53	291.02	305.93	309.00	144.28	113.35	89.54	46.40		
5	74.86	93.27	119.71	177.25	187.28	211.52	249.07	275.03	289.76	339.35	236.84	186.63	81.14	51.39		
6	69.84	126.10	132.17	165.01	186.81	196.15	207.49	256.39	259.41	267.96	144.83	128.07	55.14	43.49		
7	73.47	158.17	274.49	285.50	310.69	355.27	366.37	376.06	377.15	382.89	172.56	108.69	67.99	18.73		
8	63.72	111.34	143.34	205.75	211.90	223.30	244.53	264.90	274.08	278.20	231.86	195.25	61.67	47.31		
9	67.19	190.65	202.14	228.89	234.18	256.00	259.87	282.52	322.66	337.51	239.27	233.42	465.84	906.62		
10	64.35	130.93	212.75	234.44	243.13	254.06	289.61	279.53	318.74	323.85	167.63	138.90	132.14	131.52		
平均	68.72	145.19	186.82	217.33	234.69	254.63	280.27	301.04	320.11	329.47	188.95	156.69	124.22	143.05		
標準偏差	5.77	35.22	51.64	45.14	42.21	49.03	45.24	41.22	37.35	36.63	46.37	52.59	126.54	271.72		

図５Ｆ

【図５Ｇ】

G群（ＳＴＩＮＧ／ＩＬ－１２／ＮＬＲＰ３／ＧＭ－ＣＳＦ）腫瘍体積

	試験日															
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46		
1	69.27	120.85	158.09	203.61	235.28	250.05	257.80	286.49	299.73	312.72	317.05	386.74				
2	64.95	173.21	225.42	236.95	252.82	258.21	274.77	290.70	294.08	302.20	128.90	111.90	57.49	29.62		
3	70.24	147.46	197.45	236.11	248.30	272.47	303.84	310.47	314.67	198.87	103.11	64.73	54.34	26.99		
4	95.85	152.26	173.13	252.31	270.16	283.30	298.76	317.04	323.00	339.69	196.75	172.01	92.73	39.53		
5	59.31	167.12	202.58	276.68	294.45	331.91	334.77	341.15	344.05	345.00						
6	60.57	228.38	292.01	305.62	329.88	339.29	345.13	365.20	369.88	376.21	192.61	164.40	92.27	41.32		
7	59.90	118.13	144.77	198.09	199.72	205.04	216.66	232.12	236.65	243.75	157.41	125.46	57.20	41.27		
8	62.77	190.01	200.00	278.73	299.50	317.05	338.86	343.53	347.74	348.96	198.05					
9	73.88	171.84	294.25	243.49	254.89	273.41	290.95	312.02	320.64	321.87	173.13	120.54	84.87	33.86		
10	70.70	138.67	257.06	294.42	318.16	323.66	330.87	342.70	364.49	369.47	183.14	157.84	78.28	31.19		
平均	68.74	160.79	208.48	262.60	270.32	285.44	299.24	313.14	321.49	315.87	183.35	162.95	73.88	34.82		
標準偏差	10.81	33.15	45.17	36.20	40.15	42.56	41.05	36.75	39.24	55.92	59.73	96.84	17.14	5.89		

図５Ｇ

【図５Ｈ】

H群（ＳＴＩＮＧ／ＩＬ－１２／ＩＬ－２／ＧＭ－ＣＳＦ）腫瘍体積

	試験日															
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46		
1	60.51	111.97	168.01	197.72	220.74	230.08	238.23	259.20	268.56	272.01	205.27	96.33	73.09	45.34		
2	60.29	354.39	364.30	392.33	409.85	431.30	434.07	466.62	470.95	477.10	310.32	306.28	550.55	744.58		
3	66.88	189.21	202.58	215.10	232.58	256.49	266.06	279.36	289.63	293.20	179.07	96.09	58.91	0.00		
4	71.95	153.18	224.42	233.73	245.45	260.94	278.63	308.56	315.93	318.69	295.06	269.45	255.69	207.01		
5	68.03	153.69	219.95	227.22	247.97	264.66	272.69	283.95	287.08	288.69	191.10	119.34	98.30			
6	72.09	132.09	203.93	268.16	283.50	294.86	307.77	329.21	339.79	341.33	257.34	225.24	186.81	105.36		
7	76.52	158.48	205.38	226.03	245.80	310.93	319.70	332.17	388.16	414.14	208.41	172.19	150.16	63.27		
8	64.39	126.62														
9	67.87	153.63	201.42	239.17	253.76	286.70	294.65	317.97	321.62	329.88	212.78	106.75	52.28	40.07		
10	78.96	121.04	240.69	261.89	274.39	283.86	290.63	295.16	302.92	310.08	112.55	48.91	39.21	26.98		
平均	68.75	165.43	225.63	251.26	268.23	291.09	300.27	319.13	331.63	338.34	219.10	160.06	162.78	154.08		
標準偏差	6.23	70.07	55.69	57.16	56.45	57.73	55.58	60.34	62.82	66.30	60.67	88.57	162.10	246.93		

図５Ｈ

【図５Ｉ】

Ｉ群（ＦＦＬ、陰性対照）腫瘍体積										
	試験日									
マウス番号	1	4	8	11	15	18	22	25	29	
1	74.02	127.84	208.52	272.21	598.29	1163.92	2231.68	3777.19		
2	60.39	179.69	282.22	290.51	368.68	406.25	727.81	1260.79	2490.43	
3	72.23	178.55	345.94	475.10	1002.96	1794.28	2281.77			
4	68.33	105.68	418.83	592.46	956.21	1748.66	2376.03	4325.58		
5	78.55	171.01	281.98	301.73	345.60	485.74	781.52	1572.18	3561.89	
6	60.41	138.07	228.61	269.84	417.26	616.47	1029.20	1860.45	3475.51	
7	65.00	124.49	324.10	424.06	613.24	787.73	1352.63	2600.39	3958.86	
8	62.02	147.49	310.65	370.08	544.69	833.21	1644.81	2775.43	5743.63	
9	69.05	245.99	317.27	385.11	484.74	686.29	1147.61	1804.93		
10	77.27	182.33	294.77	468.31	631.24	1483.05	2348.47	3913.47		
平均	68.73	163.83	301.69	384.94	616.28	1000.56	1592.15	2932.27	3830.06	
標準偏差	6.75	40.79	60.71	106.29	237.61	514.99	670.82	1144.27	1216.81	

図５Ｉ

【図６】

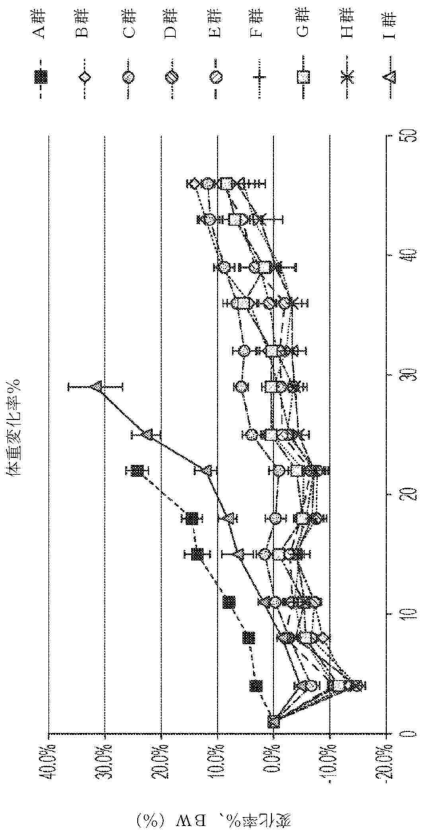


図６

【図７】

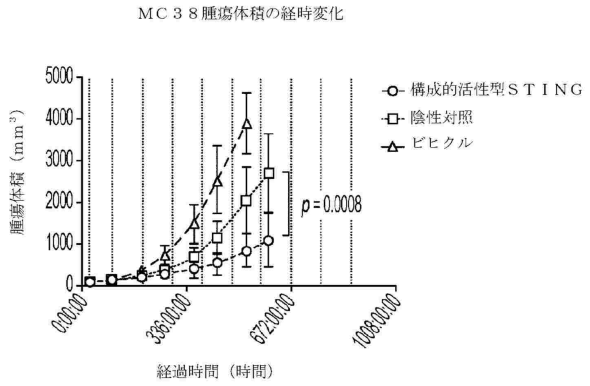


図７

【図８】

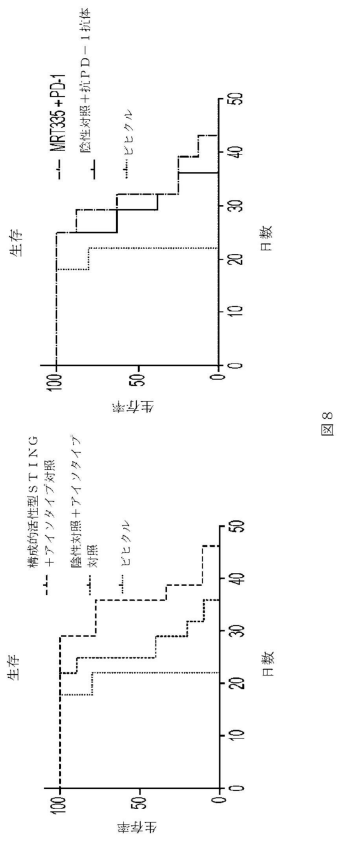


図８

【配列表】
0007650873000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	105
A61K	*9/08*	*(2006.01)*	A61K	9/08	
A61K	*9/12*	*(2006.01)*	A61K	9/12	
A61K	*38/20*	*(2006.01)*	A61K	38/20	
A61K	*38/19*	*(2006.01)*	A61K	38/19	
A61K	*38/21*	*(2006.01)*	A61K	38/21	
C12N	*15/24*	*(2006.01)*	C12N	15/24	ZNA
C12N	*15/27*	*(2006.01)*	C12N	15/27	
C12N	*15/22*	*(2006.01)*	C12N	15/22	
C12N	*15/28*	*(2006.01)*	C12N	15/28	

(72)発明者　ウースター， リチャード
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　デローサ， フランク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ディアス， アヌシャ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　カーブ， シュリラング
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， ハートウェル アベニュー ２９， トランスレイト バイオ， インコーポレイテッド 気付

審査官　濱田 光浩
(56)参考文献　特表２０１８－５１７６７４（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　４８／００
Ａ６１Ｐ　３５／００
Ａ６１Ｋ　９／００
Ａ６１Ｋ　４７／００
Ａ６１Ｋ　３８／１９
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）