

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-506429

(P2025-506429A)

(43)公表日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/69 (2017.01)	A 6 1 K	47/69	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	9/127(2025.01)	A 6 1 K	9/127	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	4 C 0 8 7	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全42頁) 最終頁に続く

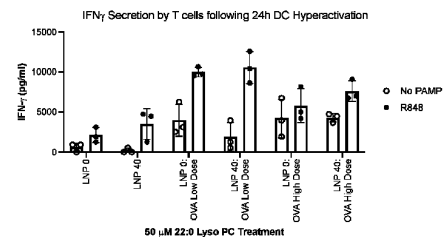
(21)出願番号	特願2024-546276(P2024-546276)	(71)出願人	523385846
(86)(22)出願日	令和5年2月6日(2023.2.6)		コーナー セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年9月20日(2024.9.20)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02472, ウォータータウン, ノースビーコン ストリート 300, ビルディング 39, スイート 202
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062063		
(87)国際公開番号	WO2023/150757	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和5年8月10日(2023.8.10)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	63/307,578	(74)代理人	100113413
(32)優先日	令和4年2月7日(2022.2.7)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100181641
	最終頁に続く		弁理士 飯田 貴敏
			弁理士 石川 大輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫原性mRNA送達ビヒクル

(57)【要約】

本開示は、ワクチン免疫原性を増強するためのリゾホスファチジルコリン(LPC)化合物を含む、mRNAワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルに関する。本開示はまた、mRNAワクチンの使用のための方法に関する。いくつかの有効なmRNA COVID-19ワクチンの迅速な生成が可能になったが、mRNAワクチンの送達のための脂質ベースの製剤には、改善の余地がある。具体的には、免疫原性がより高く、および／または反応源性がより低い製剤を提供し得る。

FIG. 6A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNAを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

【請求項 2】

脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNAおよびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

10

【請求項 3】

脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNA、およびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

20

【請求項 4】

脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

【請求項 5】

脂質ナノ粒子（LNP）およびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

30

【請求項 6】

前記少なくとも1つの脂質が、イオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、および構造的脂質を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記イオン化可能な脂質が、
 i) 8-[(2-ヒドロキシエチル)[6-オキソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル]アミノ]-オクタン酸、1-オクチルノニルエステル（SM-102）またはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは
 ii) 6-((2-ヘキシルデカノイル)オキシ)-N-(6-((2-ヘキシルデカノイル)オキシ)ヘキシル)-N-(4-ヒドロキシブチル)ヘキサ-1-アミニウム（ALC-0315）またはそのアナログもしくは誘導体
 を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 8】

前記ペグ化脂質が、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン（phosphatidylethanolamine）、PEG修飾ホスファチド酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール（dia

50

lkglycerol)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリスチルグリセロール [DMG] を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記構造的脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンブエステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、アルファートコフェロール、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 11】

前記構造的脂質が、コレステロールを含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記第 2 のリン脂質が、

i) ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンからなる群から選択される親水性頭部部分、ならびに

ii) ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン (phytanoic) 酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される 1 つまたは複数の脂肪酸尾部部分

20

を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記第 2 のリン脂質が、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC)、
 1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DMPC)、
 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、
 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、
 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、
 1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、
 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、
 1, 2-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

30

1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、
 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、
 1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、
 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、

40

スフィンゴミエリン、およびそれらの組合せ

50

からなる群から選択される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記第 2 のリン脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

少なくとも 1 種の賦形剤をさらに含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記賦形剤が、スクロースを含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

i) 1 つまたは複数の脂質と複合体化した mRNA (RNA-Lipoplex)、および

ii) 単一 C13 ～ C24 アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (LPC)

を含む組成物であって、

前記 mRNA が、抗原のコード領域を含み、前記 1 つまたは複数の脂質が、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

【請求項 18】

i) 1 つまたは複数の脂質と複合体化した mRNA (RNA-Lipoplex)、

ii) 単一 C13 ～ C24 アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (LPC)、および

iii) TLR7/8 アゴニスト

を含む組成物であって、

前記 mRNA が、抗原のコード領域を含み、前記 1 つまたは複数の脂質が、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

【請求項 19】

前記第 1 の脂質が、カチオン性脂質であり、前記第 2 の脂質が、中性またはアニオン性脂質である、請求項 17 または請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記カチオン性脂質が、

i) 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 (DOTMA) またはそのアナログもしくは誘導体、および

ii) 1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP) またはそのアナログもしくは誘導体

の一方または両方を含む、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記中性またはアニオン性脂質が、

i) 1, 2-ジ-(9*z*-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) またはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは

ii) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは

iii) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) またはそのアナログもしくは誘導体

を含む、請求項 19 または請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 LPC の前記アシル鎖が、C21 ～ C24 アシル鎖である、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 LPC の前記アシル鎖が、C22 アシル鎖である、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記 LPC の前記アシル鎖が、完全に飽和している、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の組成物。

【請求項 25】

前記 LPC が、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン [LPC (22:0)] を含む、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記 TLR7/8 アゴニストが、900 ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記 TLR7/8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 28】

前記 TLR7/8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記 LPC が、LPC (22:0) を含み、前記 TLR7/8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記腫瘍抗原が、ネオアンチゲンである、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 32】

前記抗原が、微生物抗原を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、または真菌抗原を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記微生物抗原が、表面抗原を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記 mRNA が、前記コード領域の 5' 末端に 5' 非翻訳領域 (5' UTR) を含み、前記コード領域の 3' 末端に 3' 非翻訳領域 (3' UTR) を含む、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 36】

前記 mRNA が、5' キャップ構造を含む、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 mRNA が、ポリ A テールを含む、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

リポ多糖 (LPS) もモノホスホリル脂質 A (MPLA) も含まない、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 39】

酸化 1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (oxPAPC) も oxPAPC 種も含まない、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

2-[[(2R)-2-[(E)-7-カルボキシ-5-ヒドロキシヘプタ-6-エノイル] オキシ-3-ヘキサデカノイルオキシプロポキシ]-ヒドロキシホスホリル] オキシエチルトリメチルアザニウム (HodA-PC)、[(2R)-2-[(E)-7-カルボキシ-5-オキソヘプタ-6-エノイル] オキシ-3-ヘキサデカノイルオキシ

50

プロピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (K O d i A - P C)、
 1- パルミトイル- 2- (5- ヒドロキシ- 8- オキソ- オクテノイル) - s n- グリ
 セロ- 3- ホスホリルコリン (H O O A - P C)、2- [[(2 R) - 2- [(E) - 5
 , 8- ジオキソオクタ- 6- エノイル] オキシ- 3- ヘキサデカノイルオキシプロポキシ
] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル- トリメチルアザニウム (K O O A - P C)、
 [(2 R) - 3- ヘキサデカノイルオキシ- 2- (5- オキソペンタノイルオキシ) プロ
 ピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (P O V P C)、[(2 R
) - 2- (4- カルボキシブタノイルオキシ) - 3- ヘキサデカノイルオキシプロピル]
 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (P G P C)、[(2 R) - 3-
 ヘキサデカノイルオキシ- 2- [4- [3- [(E) - [2- [(Z) - オクタ- 2- エ
 ニル] - 5- オキソシクロペンタ- 3- エン- 1- イリデン] メチル] オキシラン- 2-
 イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェ
 ート (P E C P C)、[(2 R) - 3- ヘキサデカノイルオキシ- 2- [4- [3- [(E)
) - [3- ヒドロキシ- 2- [(Z) - オクタ- 2- エニル] - 5- オキソシクロペン
 タイリデン] メチル] オキシラン- 2- イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2- (トリ
 メチルアザニウムイル) エチルホスフェート (P E I P C) および/または 1- パルミト
 イル- 2- アゼラオイル- s n- グリセロ- 3- ホスホコリン (P A z e P C) を含まな
 い、請求項 39 に記載の組成物。

10

【請求項 41】

抗原を含まない、請求項 1 ~ 40 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 42】

請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含
 む、医薬製剤。

【請求項 43】

過剰活性化された樹状細胞を生成するための方法であって、前記樹状細胞を、有効量の
 前記請求項のいずれかに記載の組成物と接触させて、過剰活性化された樹状細胞を生成す
 ることを含み、前記過剰活性化された樹状細胞が、曝露後約 48 時間以内に細胞死を受け
 ずに IL-1 ベータを分泌する、方法。

【請求項 44】

前記樹状細胞が、前記組成物と *in vivo* で接触させられる、請求項 43 に記載の
 方法。

30

【請求項 45】

前記樹状細胞が、前記組成物と *ex vivo* で接触させられる、請求項 43 に記載の
 方法。

【請求項 46】

請求項 45 に記載の方法によって生成された少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または
 10^6 の前記過剰活性化された樹状細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬
 製剤。

【請求項 47】

抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、有効量の請求項 42 または請求項 46
 に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答
 を刺激することを含む、方法。

40

【請求項 48】

がんを処置する方法であって、有効量の請求項 42 または請求項 46 に記載の医薬製剤
 を、それを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを含む、方法。

【請求項 49】

異常細胞増殖を阻害する方法であって、有効量の請求項 42 または請求項 46 に記載の
 医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、異常細胞増殖を阻害することを含む、方
 法。

【請求項 50】

50

感染性疾患を処置または防止する方法であって、有効量の請求項 4 2 に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置または防止することを含む、方法。

【請求項 5 1】

前記感染性疾患が、ウイルス性疾患である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記感染性疾患が、細菌性疾患である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記樹状細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 4 3 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法または医薬製剤。

【請求項 5 4】

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 5 3 に記載の方法または医薬製剤。

【請求項 5 5】

前記個体が、哺乳動物である、請求項 4 7 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記哺乳動物が、イヌまたはネコである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記組成物が、タンパク質を含まない、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、または方法、または使用。

【請求項 5 9】

前記 L N P が、約 5 0 0 ナノメートル未満、必要に応じて約 5 ～約 5 0 0 ナノメートル、必要に応じて約 1 0 ～約 4 0 0 ナノメートル、必要に応じて約 2 0 ～約 3 0 0 ナノメートル、または必要に応じて約 2 5 ～約 2 5 0 ナノメートルの有効径を有する、請求項 1 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 6 0】

前記 L N P が、約 2 5 0 ナノメートル未満の有効径を有する、請求項 5 9 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 6 1】

前記 L N P が、約 1 2 5 ナノメートル未満の有効径を有する、請求項 6 0 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 6 2】

前記 L N P が、約 2 0 ～約 1 2 0 ナノメートルの有効径を有する、請求項 6 1 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本出願は、2 0 2 2 年 2 月 7 日出願の米国仮特許出願第 6 3 / 3 0 7 , 5 7 8 号に基づく優先権および利益を主張するものであり、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

分野

本開示は、ワクチン免疫原性を増強するためのリゾホスファチジルコリン (L P C) 化合物を含む、m R N A ワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルに関する。本開示はまた、m R N A ワクチンの使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

10

20

30

40

50

mRNAワクチンは、従来のワクチンを上回るいくつかの利点を有している。例えば、mRNAワクチンは、急速に開発し、安価に生成し、安全に投与することができる (Pardi et al., Nat Reg Drug Discov, 17(4):261-279, 2018)。しかし、ネイキッドmRNAは不安定であり、投与後、急速に分解する。幸運にも、mRNA化学および送達系の進歩により、いくつかの有効なmRNA COVID-19ワクチンの迅速な生成が可能になった (Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021)。

そうとはいえ、mRNAワクチンの送達のための脂質ベースの製剤には、改善の余地がある。具体的には、免疫原性がより高く、および／または反応源性がより低い製剤が望ましい。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Pardi et al., Nat Reg Drug Discov, 17(4):261-279, 2018

【非特許文献2】 Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

簡単な要旨

本開示は、ワクチン免疫原性を増強するためのリゾホスファチジルコリン (LPC) 化合物を含む、mRNAワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルに関する。本開示はまた、mRNAワクチンの使用のための方法に関する。

20

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】 図1A～Bは、22:0 Lyso PCおよびmRNAの両方が負荷された脂質ナノ粒子 (LNP) が、ナノ粒子のサイズ (<125 nm) のままであり、直径が比較的均一である (PDI < 0.3) ことを示している。図1Aは、mRNAを負荷したLNPが、mRNAを欠いたLNPよりも大きいこと、および22:0 LPCをLNPに添加することにより、mRNAを負荷したLNPのサイズが増大することを示している。図1Bは、試験したすべての製剤が、比較的均一なサイズを有するLNPを含有していることを示している。

30

【0007】

【図2-1】 図2A～2Fは、LNPへの22:0 Lyso PCの負荷が、ヒト単球由来樹状細胞 (moDC) の過剰活性化を可能にすることによってLNP製剤の免疫原性を増大することを示している。R848単独 (例示的なPAMP) で処置したヒトmoDCと比べた、50 μMまたは100 μM 22:0 Lyso PCを負荷したLNPと共に培養したヒトmoDCの生存率は、それぞれ図2Aおよび図2Bに示されている。50 μMまたは100 μM 22:0 Lyso PCを負荷したLNPと共に、R848を添加した状態または添加していない状態で培養したヒトmoDCによるIL-1β分泌は、それぞれ図2Cおよび図2Dに示されている。50 μMまたは100 μM 22:0 Lyso PCを負荷したLNPと共に、R848を添加した状態または添加していない状態で培養したヒトmoDCによるIL-6分泌は、それぞれ図2Eおよび図2Fに示されている。LNPを、GFPをコードするmRNAを用いて、またはmRNAを用いずに調製し、種々のレベルの22:0 Lyso PC (LNP中0%、30%、40%モル比の22:0 Lyso PC) を用いて調製した。22:0 Lyso PCを負荷したLNPと同様の全脂質レベルが得られるように、22:0 Lyso PCを含まないLNP (LNP0) を投与した。mRNA用量は、製剤の種類にわたって同様であった (約5 μg/mL)。

40

【図2-2】 同上。

【0008】

50

【図3】図3A～3Dは、mRNAを含有するLNPに22:0 Lyso PCを負荷しても、mRNAの翻訳が防止されないことを示している。緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現を、それぞれ図3Aおよび図3Bに示されている通り、50 μ Mまたは100 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPの存在下で48時間培養した後のGFP陽性modCのパーセンテージとして評価した。GFPの発現も、それぞれ図3Cおよび図3Dに示されている通り、50 μ Mまたは100 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPの存在下で48時間培養した後のmodCにおける蛍光強度中央値（MFI）として評価した。LNPを、GFPをコードするmRNAを用いて、またはmRNAを用いずに調製し、LNPを、種々のレベルの22:0 Lyso PC（LNP中0%、30%、40%モル比の22:0 Lyso PC）を用いて調製した。22:0 Lyso PCを負荷したLNPと同様の全脂質レベルが得られるように、22:0 Lyso PCを含まないLNP（LNP0）を投与した。mRNA用量は、製剤の種類にわたって同様であった（約5 μ g/mL）。

10

【0009】

【図4-1】図4A～4Hは、mRNAを含有するLNPへの22:0 Lyso PCの負荷が、modCによる活性化マーカーおよび抗原提示分子の発現を増加することを示している。具体的には、LNPへの22:0 Lyso PCの負荷は、50 μ Mまたは100 μ M 22:0 Lyso PCで処置したmodCにおけるCD86発現（図4A～4B）、CD40発現（図4C～4D）、HLA-DR発現（図4E～4F）、およびHLA-ABC発現（図4G～4H）を増加する。LNPを、種々のレベルの22:0 Lyso PC（LNP中0%、30%、40%モル比の22:0 Lyso PC）を用いて調製した。22:0 Lyso PCを負荷したLNPと同様の全脂質レベルが得られるように、22:0 Lyso PCを含まないLNP（LNP0）を投与した。mRNA用量は、製剤の種類にわたって同様であった（約5 μ g/mL）。

20

【図4-2】同上。

【0010】

【図5】図5A～5Bは、22:0 Lyso PCおよびOVA mRNAを負荷したLNPが、OVAエпитープを認識するT細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスのナイーブT細胞（OT-I T細胞）の活性化を促進することを示している。図5Aは、50 μ Mまたは100 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPおよび0、少量、または多量のOVA mRNAと共に、R848の存在下または非存在下で培養したマウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）によるIL-1 β 分泌を示している。図5Bは、OVA mRNAを含有しており、50 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPを用いて48時間過剰活性化したBMDCと共に、R848を添加した状態または添加していない状態で72時間共培養した、OVA特異的OT-I T細胞によるIFN γ 分泌を示している。LNPを、種々のレベルの22:0 Lyso PC（LNP中0%、40%モル比の22:0 Lyso PC）を用いて調製した。22:0 Lyso PCを負荷したLNPと同様の全脂質レベルが得られるように、22:0 Lyso PCを含まないLNP（LNP0）を投与した。試験したOVA mRNA用量には、0、低用量（約0.25 μ g/mL）、および高用量（約2.5 μ g/mL）が含まれていた。

30

40

【0011】

【図6】図6A～Bは、22:0 Lyso PCおよびOVA mRNAを負荷したLNPが、OVAに対して予め免疫付与されたマウスからのOVA特異的T細胞を再活性化することを示している。図6Aは、OVAに予め曝露し、50 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPを用いて24時間過剰活性化したBMDCと共に、R848を添加した状態または添加していない状態で96時間共培養したT細胞によるIFN γ 分泌を示している。図6Bは、OVAに予め曝露し、50 μ M 22:0 Lyso PCを負荷したLNPを用いて48時間過剰活性化したBMDCと共に、R848を添加した状態または添加していない状態で96時間共培養したT細胞によるIFN γ 分泌を示している。LNPを、種々のレベルの22:0 Lyso PC（LNP中0%、40%モル比の2

50

2:0 Lys o P C) を用いて調製した。22:0 Lys o P Cを負荷した L N P と同様の全脂質レベルが得られるように、22:0 Lys o P Cを含まない L N P (L N P 0) を投与した。試験した O V A m R N A 用量には、0、低用量 (約 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、および高用量 (約 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が含まれていた。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

本開示は、ワクチン免疫原性を増強するためのリゾホスファチジルコリン (L P C) 化合物を含む、m R N A ワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルに関する。本開示はまた、m R N A ワクチンの使用のための方法に関する。

一般技術および定義

【0013】

本開示の実践では、別段指定されない限り、当業者が備えている技能の範囲内の分子生物学 (組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を用いる。

【0014】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その (the)」は、別段の指定がない限り、複数の言及対象を含む。例えば、「1種の (an)」賦形剤は、1種または複数の賦形剤を含む。

【0015】

「含む」という句は、本明細書で使用される場合、オープンエンドであり、そのような実施形態がさらなる要素を含み得ることを示す。それとは対照的に、「からなる」という句は、クローズドであり、そのような実施形態がさらなる要素を含まないことを示す (微量の不純物を除く)。「から本質的になる」という句は、部分的にクローズドであり、そのような実施形態が、そのような実施形態の基本的特徴を実質的に変化させることのない要素をさらに含み得ることを示す。

【0016】

「約」という用語は、本明細書で値に言及して使用される場合、その値の90%~110%を包含する (例えば、約900ダルトンの分子量は、810ダルトン~990ダルトンの分子量を指す)。

【0017】

物質の「有効量」または「十分な量」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に応じて決まる。例えば、免疫原性組成物を投与する状況では、有効量は、抗原に対する免疫応答 (例えば、抗原反応性抗体および/または細胞免疫応答) を刺激するのに十分な抗原、ならびにリゾホスファチジルコリン (L P C) 化合物および P R R アゴニストの一方または両方を含有している。

【0018】

「個体」および「対象」という用語は、哺乳動物を指す。「哺乳動物」には、ヒト、非ヒト霊長類 (例えば、サル)、家畜動物、スポーツ用動物、げっ歯類 (例えば、マウスおよびラット)、およびペット (例えば、イヌおよびネコ) が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、対象は、ヒト患者、例えば、がんおよび/または感染性疾患に罹患しているヒト患者である。

【0019】

「用量」という用語は、本明細書で免疫原性組成物に言及して使用される場合、いずれかの時点で対象によって摂取される (対象に投与されるまたは対象が受ける) 免疫原性組成物の測定された一部分を指す。

【0020】

「単離された」および「精製された」という用語は、本明細書で使用される場合、自然に関連している少なくとも1種の構成成分から除去される (例えば、その本来の環境から

10

20

30

40

50

除去される) 材料を指す。一例として、LPCに言及して使用される場合、単離されたLPCは、薄層クロマトグラフィー、またはガスクロマトグラフィーによって決定される通り、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%純粋である。さらなる例として、組換えタンパク質に言及して使用される場合、単離されたタンパク質は、タンパク質を生成した宿主細胞の培養培地から除去されたタンパク質を指す。

【0021】

「医薬製剤」および「医薬組成物」という用語は、活性成分の生物活性を有効にするような形態で存在しており、製剤または組成物が投与され得る個体に対して容認しがたく毒性になるさらなる構成成分を含有していない調製物を指す。そのような製剤または組成物は、無菌であることが意図される。

【0022】

「賦形剤」は、本明細書で使用される場合、用いられる投与量および濃度で曝露される細胞または哺乳動物に対して非毒性の、薬学的に許容される賦形剤、担体、ビヒクルまたは安定剤を含む。多くの場合、生理的に許容される賦形剤は、pH緩衝水溶液である。

【0023】

「抗原」という用語は、抗体またはT細胞抗原受容体によって特異的に認識され、結合される物質を指す。抗原には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、複合炭水化物、糖、ガングリオシド、脂質およびリン脂質、それらの一部ならびにそれらの組合せが含まれ得る。抗原は、本開示の組成物中に存在する場合、合成されるか、または自然から単離され得る。本開示の方法における投与に好適な抗原には、抗原特異的B細胞またはT細胞応答を誘発することができるあらゆる分子が含まれる。ハプテンは、「抗原」の範囲内に含まれる。「ハプテン」は、それ自体は免疫原性ではないが、一般により大きい免疫原性分子(担体)とコンジュゲートした場合に免疫原性にされる、低分子量化合物である。

【0024】

「ポリペプチド抗原」には、精製された天然ペプチド、合成ペプチド、組換えペプチド、粗ペプチド抽出物、または部分的に精製されたもしくは未精製の活性な状態のペプチド(例えば、弱毒化または不活化ウイルス、微生物または細胞の一部であるペプチド)、またはそのようなペプチドの断片が含まれ得る。ポリペプチド抗原は、好ましくは長さがアミノ酸残基少なくとも8個分である。

【0025】

「アゴニスト」という用語は、最も広範な意味で使用され、それには、受容体を介してシグナル伝達を活性化するあらゆる分子が含まれる。一部の実施形態では、アゴニストは、受容体に結合する。例えば、TLR8アゴニストは、TLR8受容体に結合し、TLR8-シグナル伝達経路を活性化する。

【0026】

「アルキル」は、一価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。Cxアルキルは、x個の炭素原子を有するアルキル基を指す。Cx~CyアルキルまたはCx~yアルキルは、両端を含みx個~y個の間の炭素原子を有するアルキル基を指す。

【0027】

「アルキレン」は、二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。

【0028】

「アルケニル」は、少なくとも1つの二重結合(>C=C<))を有する一価のヒドロカルビル基を指す。Cxアルケニルは、x個の炭素原子を有するアルケニル基を指す。Cx~CyアルケニルまたはCx~yアルケニルは、両端を含みx個~y個の間の炭素原子を有するアルケニル基を指す。

【0029】

応答またはパラメーターの「刺激」には、その応答またはパラメーターを、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合または代替的に別の条件と比較して、誘発および/または増強することが含まれる(例えば、TLRアゴニストが存在しない場

10

20

30

40

50

合と比較して、TLRアゴニストの存在下でTLRシグナル伝達が増大する)。例えば、免疫応答の「刺激」は、応答の増大を意味する。その増大は、測定されるパラメーターに応じて、2倍～2,000倍、または5倍～500倍もしくはそれより大きく、または2、5、10、50、または100倍～500、1,000、2,000、5,000、または10,000倍になり得る。

【0030】

それとは逆に、応答またはパラメーターの「阻害」には、その応答またはパラメーターを、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合または代替的に別の条件と比較して、低減および／または抑制することが含まれる(例えば、プラセボ組成物の投与または処置なしと比較して、LPC化合物、ならびに病原体認識受容体アゴニスト、抗原およびヒト樹状細胞の1つまたは複数を含む組成物の投与後に、異常細胞増殖が低減する)。例えば、免疫応答の「阻害」は、応答の低減を意味する。その低減は、測定されるパラメーターに応じて、2分の1～2,000分の1、または5分の1～500分の1もしくはそれより小さく、または2、5、10、50、または100分の1～500、1,000、2,000、5,000、または10,000分の1になり得る。

【0031】

「より高い」および「より低い」という相対的用語は、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合、または代替的に別の条件と比較して、それぞれ応答またはパラメーターの測定可能な増加または低下を指す。例えば、「より高いレベルのDC過剰活性化」は、処置条件(本開示のLPC化合物を含む)の結果としてのDC過剰活性化のレベルが、対照条件(例えば、LPC、PGPC、oxPAPCなどが無い)の結果としてのDC過剰活性化のレベルの、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10倍であることを指す。同様に、「より低いレベルのDC過剰活性化」は、処置条件(本開示のLPC化合物を含む)の結果としてのDC過剰活性化のレベルが、対照条件(例えば、LPC、PGPC、oxPAPCなどが無い)の結果としてのDC過剰活性化のレベルの、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10分の1であることを指す。

【0032】

本明細書で使用される場合、「免疫化」という用語は、抗原に対する哺乳動物対象の反応を増大し、それゆえに感染に抵抗するもしくはそれを克服する、および／または疾患に抵抗するその能力を改善するプロセスを指す。

【0033】

「ワクチン接種」という用語は、本明細書で使用される場合、哺乳動物対象の身体へのワクチンの導入を指す。

【0034】

「アジュバント」は、抗原を含む組成物に添加される場合、曝露時に哺乳動物レシピエントにおける抗原に対する免疫応答を増強または強化する物質を指す。

【0035】

疾患を「処置すること」または疾患の「処置」という用語は、個体において臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得ることを目指して、個体(ヒトまたはヒト以外)に1種または複数の治療剤を投与することを含み得るプロトコールを実行することを指す。有益なまたは所望の臨床結果には、疾患の1つまたは複数の徴候または症状の軽減または改善、疾患の程度の低下、病状の安定化(すなわち、悪化しないこと)、疾患の拡大の防止、疾患進行の遅延または緩和、病状の改善または緩和、および寛解(部分的であろうと完全であろうと)が含まれるが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けていない個体の予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することを意味することもできる。さらに、「処置すること」および「処置」は、一用量の1種もしくは複数の治療剤の投与によって生じ得るか、または一連の用量の1種もしくは複数の治療剤の投与の際に生じ得る。「処置すること」または「処置」は、徴候または症状の完全な軽減を必要とせず、治療を必要とせず、具体的には個体に対して緩和効果だけを有するプロトコールを含む。疾

患または障害を「緩和すること」は、予想される未処置の転帰と比較して、疾患もしくは障害の程度および／もしくは望ましくない臨床症状が減少すること、および／または疾患もしくは障害の進行の時間経過が緩徐されることを意味する。

I. リゾホスファチジルコリン化合物

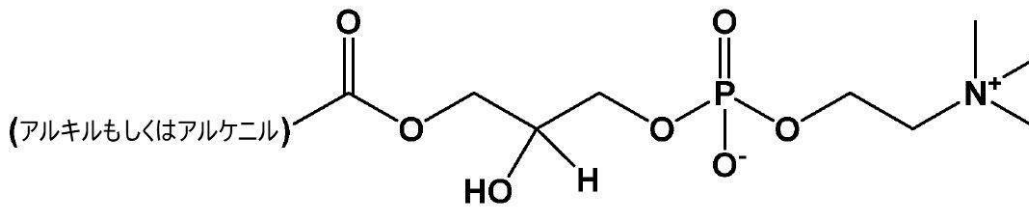
【0036】

「リゾホスファチジルコリン」(LPC)または「リゾホスファチジルコリン分子」は、グリセロールのヒドロキシ基上に1個のホスホコリン基を担持しており、グリセロールのその他の2つのヒドロキシ基のうちの1つの上に1個のアシル基を担持しているグリセロール分子を指す。残りのヒドロキシ基は置換されていない。

【0037】

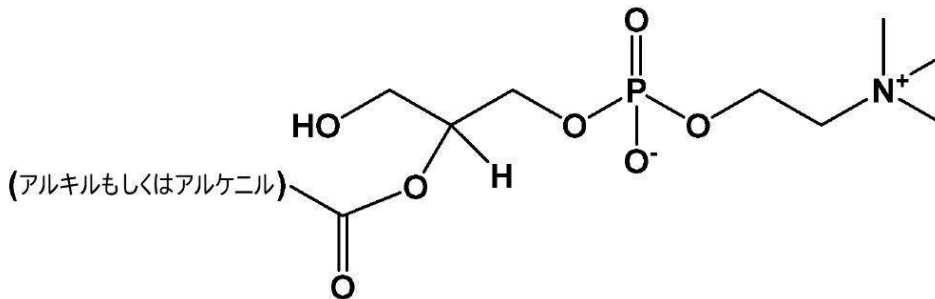
一部の実施形態では、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)は、形態

【化1】



または

【化2】



のものである。

【0038】

一部の実施形態では、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)は、形態

10

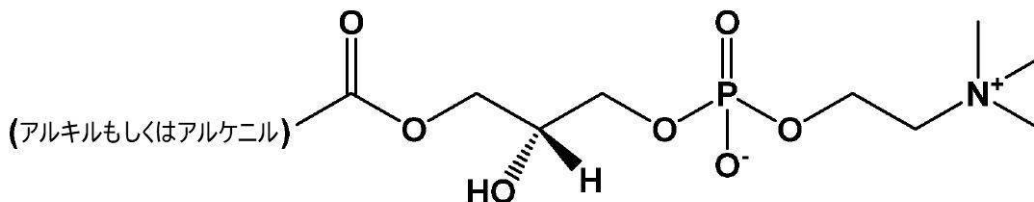
20

30

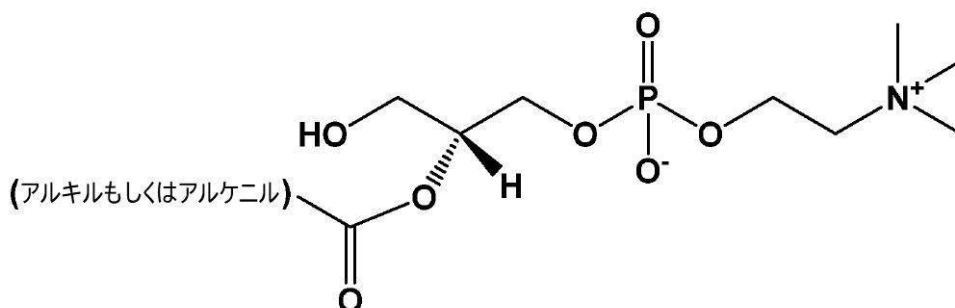
40

50

【化 3】



または



のものである。

【0039】

アルキルまたはアルケニル鎖は、カルボニル炭素と一緒にあって、アルキルまたはアルケニル鎖よりも炭素原子が1個分長いアシル鎖を形成する。例えば、(C23アルキル) - C(=O) - 基は、C24アシル鎖を形成する。したがって、「(アルキルまたはアルキレン)」基がC12～C23アルキル基（例えば、C12～C19アルキル基またはC20～C23アルキル基）である場合、(C12～C23アルキル - C(=O) - 基は、C13～C24アシル鎖（例えば、C13～C20アシル鎖またはC21～C24アシル鎖）を形成する。「(アルキルまたはアルキレン)」基がC12～C23アルケニル基（例えば、C12～C19アルケニル基またはC20～C23アルケニル基）である場合、(C12～C23アルケニル - C(=O) - 基は、C13～C24アシル鎖（例えば、C13～C20アシル鎖またはC21～C24アシル鎖）を形成する。アシル鎖は、アルキル含有アシル基とアルケニル含有アシル基とを区別するために、飽和アシルまたは不飽和アシルと呼ぶことができる。標準的なデルタ表示またはオメガ表示は、不飽和アシル鎖中の1つまたは複数の二重結合の位置を示すために使用され得る。

【0040】

本開示のリゾホスファチジルコリン(LPC)化合物は、アシル鎖がC13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖である単一アシル鎖を有する。一部の実施形態では、アシル鎖は、C18～C22アシル鎖またはC21～C24アシル鎖である。一部の好ましい実施形態では、アシル鎖は、C22アシル鎖である。本開示のLNPに包含するための例示的なLPC化合物の名称および構造、ならびにそれらのケミカルアブストラクトサービス(CAS)登録番号は、参照により本明細書に組み込まれる国際出願PCT/US2022/071664号の表Iの化合物番号30～43、必要に応じて番号30～42として列挙されている。リゾリン脂質を合成するためのいくつかの方法が公知である（例えば、D'Arrigo et al, "Synthesis of lysophospholipids," *Molecules*, 15(3):1354-77, 2010およびYang et al., "Lysophosphatidylcholine synthesis by lipase-catalyzed ethanolysis," *J Oleo Sci.*, 64(4):443-7, 2015、およびそれらに引用されている参考文献を参照されたい）。加えて、多くのリゾリン脂質が商業的に入手可能である。

II. 病原体認識受容体アゴニスト

【0041】

本開示の組成物および方法は、病原体認識受容体（PRR）アゴニストをさらに含む得る。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、*tol*様受容体（TLR）、NOD様受容体（NLR）、RIG-I様受容体（RLR）、またはC型レクチン受容体（CLR）のアゴニストを含む。他の実施形態では、PRRアゴニストは、細胞質DNAセンサー（CDS）またはIFN遺伝子の刺激因子（STING）を含む。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、TLR7／8アゴニストを含む。

A. TLR7／8アゴニスト

【0042】

「TLR7／8アゴニスト」という用語は、本明細書で使用される場合、TLR7および／またはTLR8のアゴニストを指す。一態様では、TLR7／8アゴニストは、TLR7アゴニストである。別の態様では、TLR7／8アゴニストは、TLR8アゴニストである。さらなる態様では、TLR7／8アゴニストは、TLR7およびTLR8の両方のアゴニストである。本開示のTLR7／8アゴニストは、LPCの存在下でヒト樹状細胞を過剰活性化するのに好適である。

【0043】

一部の態様では、TLR7／8アゴニストは、小分子である。一部の実施形態では、TLR7／8アゴニストは、900ダルトンもしくはそれ未満の分子量を有する小分子またはその塩である。すなわち、小分子TLR7／8アゴニストは、米国FDAの生物製剤評価研究センター（Center for Biologics Evaluation and Research）によって規制可能な組換えタンパク質または合成オリゴヌクレオチドなどの大型分子ではない。むしろ、小分子TLR7／8アゴニストは、FDAの薬物評価センター（Center for Drug Evaluation and Research）によって規制可能である。一部の実施形態では、小分子は、約90～約900ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、TLR7／8アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む。一部の好ましい実施形態では、TLR7／8アゴニストは、レシキモド（R848）を含む。

B. 他のPRRアゴニスト

【0044】

一部の態様では、病原体認識受容体（PRR）アゴニストは、TLRアゴニストがTLR7／8アゴニストを含まないという条件で、*tol*様受容体（TLR）アゴニストを含む。一部の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9およびTLR13の1つまたは複数のアゴニストを含む。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、TLR2／6アゴニスト、例えば、Pam2CSK4である。他の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR4アゴニスト、例えば、モノホスホリル脂質A（MPLA）である。しかし、好ましい実施形態では、TLRアゴニストは、TLR2、TLR4および／またはTLR9のアゴニストではない。例えば、好ましい実施形態では、TLR9アゴニストは、TLR4リガンド、例えば、LPS（エンドトキシン）ではない。

【0045】

他の態様では、PRRアゴニストは、NOD様受容体（NLR）アゴニストを含む。さらなる態様では、PRRアゴニストは、RIG-I様受容体（RLR）アゴニストを含む。さらなる態様では、PRRアゴニストは、C型レクチン受容体（CLR）アゴニストを含む。またさらなる態様では、PRRアゴニストは、CDSアゴニストまたはSTINGアゴニストを含む。

III. 抗原をコードするmRNA

【0046】

本開示の組成物および方法は、抗原をコードするmRNAを含むか、またはそうでなければ抗原をコードするmRNAを含む製剤との併用に好適である。一部の実施形態では、抗原は、タンパク質抗原である。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、

10

20

30

40

50

本明細書では、少なくとも8アミノ酸長のペプチド鎖を含む抗原に言及して、互換的に使用される。一部の実施形態では、抗原は、8～1800アミノ酸、9～1000アミノ酸、または10～100アミノ酸長である。ポリペプチドは、例えば、リン酸化、ヒドロキシル化、スルホン化、パルミトイル化、および／またはグリコシル化によって翻訳後修飾され得る。

【0047】

一部の実施形態では、抗原は、少なくとも1つの全長タンパク質のアミノ酸配列またはその断片を含む腫瘍抗原である。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍性タンパク質由来のアミノ酸配列またはその断片を含む。一部の実施形態では、哺乳動物抗原は、ネオアンチゲンであるか、または哺乳動物対象からの正常細胞中に存在する遺伝子に対して、突然変異を含む遺伝子によってコードされる。ネオアンチゲンは、T細胞ががん細胞と非がん細胞とを区別できるようにするのに特に有用であると考えられている（例えば、Schumacher and Schreiber, Science, 348:69-74, 2015を参照されたい）。他の実施形態では、腫瘍抗原は、ウイルス抗原、例えば、がんを引き起こすウイルスの抗原を含む。

10

【0048】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、2つまたはそれよりも多いポリペプチドを含む融合タンパク質であり、ここで各ポリペプチドは、異なる腫瘍抗原由来のアミノ酸配列または同じ腫瘍抗原由来の非連続アミノ酸配列を含む。これらの実施形態のいくつかでは、融合タンパク質は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、同じ腫瘍抗原由来の非連続アミノ酸配列を含む。

20

【0049】

一部の実施形態では、抗原は、微生物抗原である。一部の実施形態では、微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、真菌抗原、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、微生物抗原は、微生物の表面タンパク質または他の抗原サブユニットを含む。

【0050】

一部の好ましい実施形態では、mRNAは、コード領域の5'末端に5'非翻訳領域（5'UTR）を含み、コード領域の3'末端に3'非翻訳領域（3'UTR）を含む。一部の好ましい実施形態では、mRNAは、5'キャップ構造およびポリAテール的一方または両方を含む。

30

IV. 脂質ベースの送達ビヒクル

【0051】

本開示の組成物および方法は、mRNAワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルを含む。一部の実施形態では、ビヒクルは、脂質ナノ粒子（LNP）である。他の実施形態では、ビヒクルは、mRNAと複合体を形成する脂質（RNA-Lipoplex）である。

【0052】

一部の実施形態では、LNPは、第1のリン脂質（単一C13～C24アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン[LPC:C13～C24]、ならびにイオン化可能な脂質、カチオン性脂質、第2のリン脂質、PEG化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、イオン化可能な脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、第2のリン脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、PEG化脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、構造的脂質を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの脂質は、イオン化可能な脂質、第2のリン脂質、PEG化脂質、および構造的脂質を含む。

40

【0053】

一部の実施形態では、RNA-Lipoplexの脂質構成成分は、1つまたは複数の

50

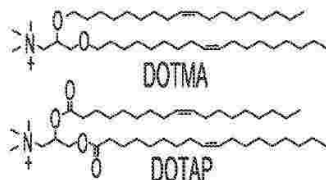
脂質を含む。一部の好ましい実施形態では、1つまたは複数の脂質は、第1の脂質および第2の脂質を含み、ここで第1の脂質は、第2の脂質とは異なる。一部の実施形態では、第1の脂質は、カチオン性脂質であり、第2の脂質は、中性またはアニオン性脂質である。

【0054】

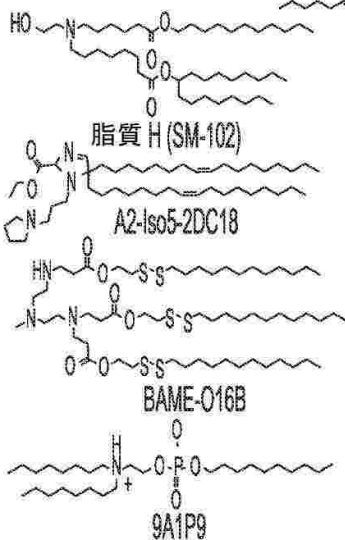
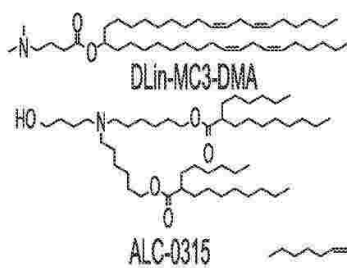
本開示の脂質ベースのmRNA送達ビヒクルにおける使用に好適な脂質の構造は、以下に示される(Hou et al., Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021の図2から再現)。

【化4】

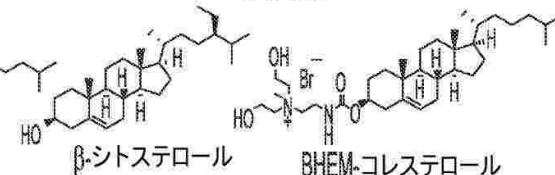
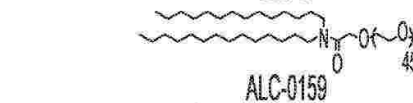
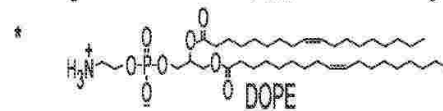
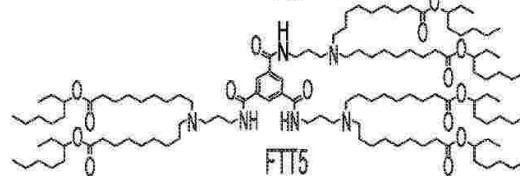
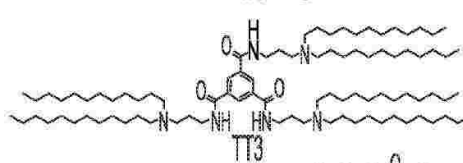
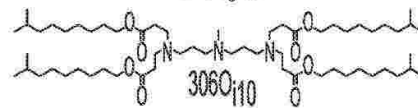
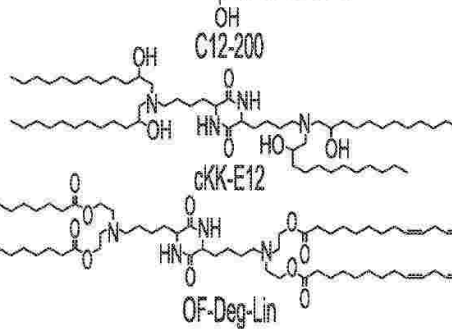
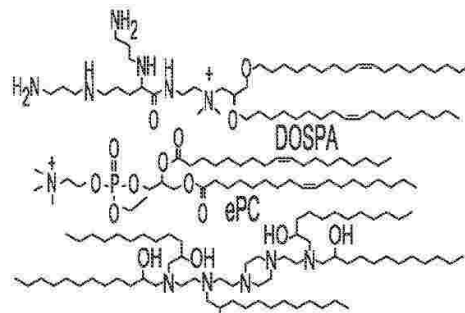
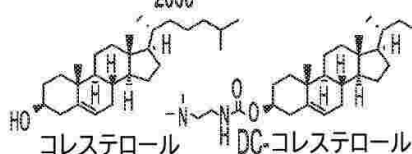
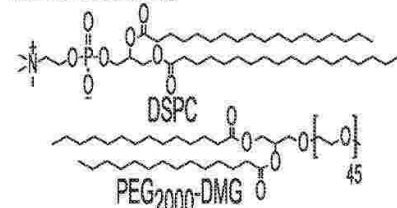
カチオン性脂質



イオン化可能な脂質



他の種類の脂質



10

20

30

40

【0055】

本開示の一部の組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤である。本開示の医薬製剤は、溶液または懸濁液の形態であり得る。代替的に、医薬製剤は、無水固体（例えば、凍結乾燥またはスプレー乾燥させた固体）であり得る。本開示の医薬製剤は、好ましくは無菌であり、好ましくは本質的にエンドトキシンを含まない。「医薬製剤」という用語は、本明細書では「医薬生成物」および「医薬」という用語と互換的に使用される。一部の実施形態では、医薬製剤は、製剤の意図された目的に基づいて、特定の比率の種々の構成成分を含む。

【0056】

本開示の薬学的に許容される賦形剤には、例えば、溶媒、緩衝剤、浸透圧調整剤、増量剤、および防腐剤が含まれる（例えば、Pramanick et al., Pharma Times, 45:65-77, 2013を参照されたい）。一部の実施形態では、医薬製剤は、溶媒、緩衝剤、浸透圧調整剤、および増量剤の1つまたは複数として機能する賦形剤を含み得る（例えば、生理食塩水中の塩化ナトリウムは、水性ビヒクルおよび浸透圧調整剤の両方として働くことができる）。

10

【0057】

一部の実施形態では、医薬製剤は、溶媒として水性ビヒクルを含む。好適なビヒクルには、例えば滅菌水、生理食塩水溶液、リン酸緩衝食塩水、およびリンゲル溶液が含まれる。一部の実施形態では、組成物は等張である。

【0058】

医薬製剤は、緩衝剤を含み得る。緩衝剤は、pHを制御して、処理、保存および必要に応じて再構成中の活性薬剤の分解を阻害する。好適な緩衝剤には、例えば酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩または硫酸塩を含む塩が含まれる。他の好適な緩衝剤には、例えばアミノ酸、例えば、アルギニン、グリシン、ヒスチジン、およびリシンが含まれる。緩衝剤は、塩酸または水酸化ナトリウムをさらに含み得る。一部の実施形態では、緩衝剤は、組成物のpHを6～9の範囲内に維持する。一部の実施形態では、pHは、6、7または8（下限）よりも大きい。一部の実施形態では、pHは、9、8、または7（上限）よりも小さい。すなわち、pHは、約6～9の範囲であり、ここで下限は上限よりも小さい。

20

【0059】

医薬組成物は、浸透圧調整剤を含み得る。好適な浸透圧調整剤には、例えばブドウ糖、グリセロール、塩化ナトリウム、グリセリンおよびマンニトールが含まれる。

30

【0060】

医薬製剤は、増量剤を含み得る。増量剤は、医薬組成物が投与前に凍結乾燥させられるべき場合に、特に有用である。一部の実施形態では、増量剤は、凍結もしくはスプレー乾燥中および／または保存中に、活性薬剤の安定化および分解防止の一助になる保護剤である。好適な増量剤は、糖（単糖、二糖および多糖）、例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール（sorbital）、グルコースおよびラフィノースである。

【0061】

医薬製剤は、防腐剤を含み得る。好適な防腐剤には、例えば抗酸化剤および抗微生物剤が含まれる。しかし、好ましい実施形態では、医薬製剤は、無菌条件下で調製され、単一の使用容器に入れられ、したがって防腐剤を含む必要はない。

40

【0062】

本開示の医薬製剤は、非経口投与に好適である。すなわち、本開示の医薬製剤は、経腸投与を意図されない（例えば、経口、胃内、または直腸内によるものではない）。

V E. 使用方法

【0063】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される組成物または製剤のいずれか1つの使用方法に関する。使用法は、免疫応答を刺激することを含む複数の使用に好適である。一部の実施形態では、使用法は、がんを処置する方法を含む。一部の実施形態では、

50

使用方法は、異常細胞増殖を阻害する方法を含む。一部の実施形態では、使用方法は、感染性疾患を処置または防止する方法を含む。方法は、有効量の本明細書に記載される製剤または組成物を、それを必要とする個体に投与して、特定の転帰を達成することを含む。個体は、哺乳動物対象、例えばヒト患者である。他の実施形態では、個体は、非ヒト患者である。一部の実施形態では、個体は、イヌ患者である。すなわち、一部の実施形態では、使用方法是臨床的使用を含み、一方、他の実施形態では、使用方法是前臨床的および／または獣医学的使用を含む。前臨床的使用について、哺乳動物対象は、非ヒト霊長類（例えば、サルまたは類人猿）またはげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）であり得る。獣医学的使用について、哺乳動物対象は、家畜（例えば、ウシ）、スポーツ用動物（例えば、ウマ）、またはペット（例えば、コンパニオン・アニマル、例えば、イヌまたはネコ）であり得る。

10

A. 免疫応答の刺激

【0064】

手短には、本開示は、個体において免疫応答を刺激する方法であって、個体において免疫応答を刺激するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することを含む方法を提供する。免疫応答を「刺激すること」（「誘発すること」および免疫応答と互換的に使用される）は、新たな免疫応答を誘発するか（例えば、初回ワクチン接種レジメンの結果として）、または既存の免疫応答を増強する（例えば、ブースターワクチン接種レジメンの結果として）ことから生じ得る、免疫応答の増大を意味する。一部の実施形態では、免疫応答を刺激することは、サイトカイン生成を刺激する、Bリンパ球増殖を刺激する、インターフェロン経路関連遺伝子発現を刺激する、化学誘引物質関連遺伝子発現を刺激する、および樹状細胞DC成熟を刺激することからなる群の1つまたは複数を含む。免疫応答の刺激を測定するための方法は、当技術分野で公知である。

20

【0065】

例えば、本開示は、個体において抗原特異的免疫応答を誘導するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することによって、個体において抗原特異的免疫応答を誘導する方法を提供する。好ましい実施形態では、組成物または製剤は、抗原を含む。一部の実施形態では、組成物または製剤は、抗原を含む個体の組織に投与される。免疫応答は、抗原特異的抗体応答および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答の一方または両方を含み得る。抗原特異的抗体応答を「誘導すること」は、抗原特異的抗体の力価を、閾値レベル、例えば、投与前のベースライン力価または防御抗体（seroprotective）レベルよりも上昇させることを意味する。抗原特異的CTL応答を「誘導すること」は、抗原特異的CTLが末梢血に見出される頻度を、投与前のベースラインの頻度よりも上昇させることを意味する。

30

【0066】

免疫応答の解析（質的および量的の両方）は、抗原特異的抗体生成（特異的抗体サブクラスを測定することを含む）、リンパ球、例えばB細胞およびヘルパーT細胞の特定集団の活性化、サイトカイン、例えばIFN- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-12の生成、ならびに／またはヒスタミンの放出を測定することを含むが、これらに限定されない当技術分野で公知のいずれかの方法によって行われ得る。抗原特異的抗体応答を測定するための方法には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）が含まれる。リンパ球の特定集団の活性化は、増殖アッセイによって、蛍光活性化細胞選別（FACS）を用いて測定され得る。サイトカインの生成は、ELISAによって測定することもできる。一部の実施形態では、免疫応答を刺激する方法は、単球由来樹状細胞または末梢血単核細胞による、インターロイキン-1ベータ（IL-1 β ）分泌、インターフェロン- γ （IFN- γ ）分泌、および／または腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）分泌の刺激を含む。一部の好ましい実施形態では、本開示の組成物と接触させられた細胞の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%または75%は、接触後40～56時間（または約48時間）目もまだ生存している。一部の好ましい実施形態では、本開示の組成物と接触させられた細胞の少なくとも75%が、接触後40～56時間（または約48時間）

40

50

目もまだ生存している。

【0067】

一部の実施形態では、方法は、抗腫瘍免疫応答を刺激するのに好適である。他の実施形態では、方法は、抗微生物免疫応答を刺激するのに好適である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗菌免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗真菌免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗ウイルス免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗原虫免疫応答である。

B. 疾患の処置または防止

【0068】

本開示はさらに、個体における疾患を処置または防止する方法であって、個体における疾患を処置または防止するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、異常細胞増殖である。他の実施形態では、疾患は、感染性疾患である。一態様では、方法は、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む得る。

【0069】

一部の実施形態では、方法は、個体におけるがんを処置するか、またはそうでなければがんを有する哺乳動物対象を処置することを含む。一部の実施形態では、がんは、血液がん、例えばリンパ腫、白血病、または骨髄腫である。他の実施形態では、がんは、非血液がん、例えば肉腫、癌腫、または黒色腫である。一部の実施形態では、がんは悪性である。

【0070】

一部の実施形態では、方法は、個体における異常細胞増殖を阻害することを含む。「異常細胞増殖」は、良性腫瘍または悪性腫瘍の増殖を指す。悪性腫瘍は、転移性腫瘍であり得る。

【0071】

一部の実施形態では、方法は、個体における感染性疾患を処置または防止することを含む。一部の実施形態では、感染性疾患は、ウイルス感染によって引き起こされる。他の実施形態では、感染性疾患は、細菌感染によって引き起こされる。さらなる実施形態では、感染性疾患は、真菌感染によって引き起こされる。またさらなる実施形態では、感染性疾患は、原生動物感染によって引き起こされる。ヒトおよび他の動物、例えば哺乳動物または鳥に感染する人獣共通病原体によって引き起こされる感染性疾患が、特に重要である。一部の実施形態では、人獣共通病原体は、中間種（ベクター）を介してヒトに伝染する。実施形態の列挙

1 脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNAを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

2 脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNAおよびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

3 脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたmRNA、およびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記mRNAが、抗原のコード領域を含み、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1の

リン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

4 脂質ナノ粒子（LNP）に封入されたTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

5 脂質ナノ粒子（LNP）およびTLR7／8アゴニストを含む組成物であって、前記LNPが、第1のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含み、前記第1のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）を含み、前記アシル鎖が、C13～C24アシル鎖である、組成物。

6 前記少なくとも1つの脂質が、イオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、および構造的脂質を含む、実施形態1～5のいずれか一つに記載の組成物。

7 前記イオン化可能な脂質が、

i) SM-102またはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは

ii) ALCO-0315またはそのアナログもしくは誘導体

を含む、実施形態1～6のいずれか一つに記載の組成物。

8 前記ペグ化脂質が、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン（phosphatidylethanolamine）、PEG修飾ホスファチド酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール（dialkylglycerol）、およびそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態1～7のいずれか一つに記載の組成物。

9 前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール〔PEG〕2000ジミリスチルグリセロール〔DMG〕を含む、実施形態1～7のいずれか一つに記載の組成物。

10 前記構造的脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンブエステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、アルファートコフェロール、およびそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態1～9のいずれか一つに記載の組成物。

11 前記構造的脂質が、コレステロールを含む、実施形態1～9のいずれか一つに記載の組成物。

12 前記第2のリン脂質が、

i) ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンからなる群から選択される親水性頭部部分、ならびに

ii) ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン（phytanoic）酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される1つまたは複数の脂肪酸尾部部分

を含む、実施形態1～11のいずれか一つに記載の組成物。

13 前記第2のリン脂質が、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DLPC）、

1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-ホスホコリン（DMPC）、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、

1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、

1, 2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン（DUPC）、

1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）、

1, 2-ジ-0-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

10

20

30

40

50

1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D O P E)、

1, 2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-r a c-(1-グリセロール) ナトリウム塩 (D O P G)、

スフィンゴミエリン、および

それらの組合せ

からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 11 のいずれか一つに記載の組成物。

14 前記第 2 のリン脂質が、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (D S P C) を含む、実施形態 1 ~ 13 のいずれか一つに記載の組成物。

15 少なくとも 1 種の賦形剤をさらに含む、実施形態 1 ~ 14 のいずれか一つに記載の組成物。

16 前記賦形剤が、スクロースを含む、実施形態 15 に記載の組成物。

17 i) 1 つまたは複数の脂質と複合体化した mRNA (RNA-L i p o p l e x)、および

ii) 単一 C 13 ~ C 24 アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (L P C)

を含む組成物であって、

前記 mRNA が、抗原のコード領域を含み、前記 1 つまたは複数の脂質が、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

18 i) 1 つまたは複数の脂質と複合体化した mRNA (RNA-L i p o p l e x)、

ii) 単一 C 13 ~ C 24 アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (L P C)、および

iii) T L R 7 / 8 アゴニスト

を含む組成物であって、

前記 mRNA が、抗原のコード領域を含み、前記 1 つまたは複数の脂質が、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

19 前記第 1 の脂質が、カチオン性脂質であり、前記第 2 の脂質が、中性またはアニオン性脂質である、実施形態 17 または実施形態 18 に記載の組成物。

20 前記カチオン性脂質が、

i) 1, 2-ジ-0-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (D O T M A) またはそのアナログもしくは誘導体、および

ii) 1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (D O T A P) またはそのアナログもしくは誘導体

の一方または両方を含む、実施形態 19 に記載の組成物。

21 前記中性またはアニオン性脂質が、

i) 1, 2-ジ-(9 Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D O P E) またはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは

ii) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体、および／あるいは

iii) 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (D O P C) またはそのアナログもしくは誘導体

10

20

30

40

50

を含む、実施形態 19 または実施形態 20 に記載の組成物。

22 前記 L P C の前記アシル鎖が、C 21 ~ C 24 アシル鎖である、実施形態 1 ~ 21 のいずれか一つに記載の組成物。

23 前記 L P C の前記アシル鎖が、C 22 アシル鎖である、実施形態 1 ~ 21 のいずれか一つに記載の組成物。

24 前記 L P C の前記アシル鎖が、完全に飽和している、実施形態 1 ~ 23 のいずれか一つに記載の組成物。

25 前記 L P C が、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン [L P C (22:0)] を含む、実施形態 24 に記載の組成物。

26 前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、900 ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、実施形態 1 ~ 25 のいずれか一つに記載の組成物。

27 前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態 1 ~ 25 のいずれか一つに記載の組成物。

28 前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 848) を含む、実施形態 27 に記載の組成物。

29 前記 L P C が、L P C (22:0) を含み、前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 848) を含む、実施形態 1 ~ 28 のいずれか一つに記載の組成物。

30 前記抗原が、腫瘍抗原である、実施形態 1 ~ 28 のいずれか一つに記載の組成物。

31 前記腫瘍抗原が、ネオアンチゲンである、実施形態 1 ~ 28 のいずれか一つに記載の組成物。

32 前記抗原が、微生物抗原を含む、実施形態 1 ~ 28 のいずれか一つに記載の組成物。

33 前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、または真菌抗原を含む、実施形態 32 に記載の組成物。

34 前記微生物抗原が、表面抗原を含む、実施形態 32 に記載の組成物。

35 前記 m R N A が、前記コード領域の 5' 末端に 5' 非翻訳領域 (5' U T R) を含み、前記コード領域の 3' 末端に 3' 非翻訳領域 (3' U T R) を含む、実施形態 1 ~ 34 のいずれか一つに記載の組成物。

36 前記 m R N A が、5' キャップ構造を含む、実施形態 1 ~ 35 のいずれか一つに記載の組成物。

37 前記 m R N A が、ポリ A テールを含む、実施形態 1 ~ 36 のいずれか一つに記載の組成物。

38 リポ多糖 (L P S) もモノホスホリル脂質 A (M P L A) も含まない、実施形態 1 ~ 37 のいずれか一つに記載の組成物。

39 酸化 1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (o x P A P C) も o x P A P C 種も含まない、実施形態 1 ~ 38 のいずれか一つに記載の組成物。

40 2- [[(2 R) - 2 - [(E) - 7-カルボキシ-5-ヒドロキシヘプター-6-エノイル] オキシ-3-ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] -ヒドロキシホスホリル] オキシエチル-トリメチルアザニウム (H O d i A - P C)、 [(2 R) - 2 - [(E) - 7-カルボキシ-5-オキソヘプター-6-エノイル] オキシ-3-ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (K O d i A - P C)、 L-パルミトイル-2- (5-ヒドロキシ-8-オキソ-オクテノイル) -sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (H O O A - P C)、 2- [[(2 R) - 2 - [(E) - 5, 8-ジオキソオクタ-6-エノイル] オキシ-3-ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] -ヒドロキシホスホリル] オキシエチル-トリメチルアザニウム (K O O A - P C)、 [(2 R) - 3-ヘキサデカノイルオキシ-2- (5-オキソペンタノイルオキシ) プロピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (P O V P C)、 [(2 R) - 2 - (4-カルボキシブタノイルオキシ) -3-ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2- (トリメチルアザニウムイル) エチルホスフェート (P G P C)、 [(2 R)

10

20

30

40

50

－３－ヘキサデカノイルオキシ－２－〔４－〔３－〔（Ｅ）－〔２－〔（Ｚ）－オクタ－２－エニル〕－５－オキソシクロペンタ－３－エン－１－イリデン〕メチル〕オキシラン－２－イル〕ブタノイルオキシ〕プロピル〕２－（トリメチルアザニウムイル）エチルホスフェート（ＰＥＣＰＣ）、〔（２Ｒ）－３－ヘキサデカノイルオキシ－２－〔４－〔３－〔（Ｅ）－〔３－ヒドロキシ－２－〔（Ｚ）－オクタ－２－エニル〕－５－オキソシクロペンタイルリデン〕メチル〕オキシラン－２－イル〕ブタノイルオキシ〕プロピル〕２－（トリメチルアザニウムイル）エチルホスフェート（ＰＥＩＰＣ）および／または１－パルミトイル－２－アゼラオイル－sn－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＡzeＰＣ）を含まない、実施形態３９に記載の組成物。

４１ 抗原を含まない、実施形態１～４０のいずれか一つに記載の組成物。

４２ 実施形態１～４１のいずれか一つに記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

４３ 過剰活性化された樹状細胞を生成するための方法であって、前記樹状細胞を、有効量の前記実施形態のいずれかに記載の組成物と接触させて、過剰活性化された樹状細胞を生成することを含み、前記過剰活性化された樹状細胞が、曝露後約４８時間以内に細胞死を受けずにＩＬ－１ベータを分泌する、方法。

４４ 前記樹状細胞が、前記組成物と*in vivo*で接触させられる、実施形態４３に記載の方法。

４５ 前記樹状細胞が、前記組成物と*ex vivo*で接触させられる、実施形態４３に記載の方法。

４６ 実施形態４５に記載の方法によって生成された少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または 10^6 の前記過剰活性化された樹状細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

４７ 抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、有効量の実施形態４２または実施形態４６に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答を刺激することを含む、方法。

４８ がんを処置する方法であって、有効量の実施形態４２または実施形態４６に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを含む、方法。

４９ 異常細胞増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態４２または実施形態４６に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、異常細胞増殖を阻害することを含む、方法。

５０ 感染性疾患を処置または防止する方法であって、有効量の実施形態４２に記載の医薬製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置または防止することを含む、方法。

５１ 前記感染性疾患が、ウイルス性疾患である、実施形態５０に記載の方法。

５２ 前記感染性疾患が、細菌性疾患である、実施形態５１に記載の方法。

５３ 前記樹状細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態４３～４９のいずれか一つに記載の方法または医薬製剤。

５４ 前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態５３に記載の方法または医薬製剤。

５５ 前記個体が、哺乳動物である、実施形態４７～５３のいずれか一つに記載の方法。

５６ 前記哺乳動物が、ヒトである、実施形態５５に記載の方法。

５７ 前記哺乳動物が、イヌまたはネコである、実施形態５５に記載の方法。

５８ 前記組成物が、タンパク質を含まない、実施形態１～５７のいずれか一つに記載の組成物、製剤、または方法、または使用。

５９ 前記ＬＮＰが、約５００ナノメートル未満、必要に応じて約５～約５００ナノメートル、必要に応じて約１０～約４００ナノメートル、必要に応じて約２０～約３００ナノメートル、または必要に応じて約２５～約２５０ナノメートルの有効径を有する、実施形態１～１５８のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。

10

20

30

40

50

60 前記 LNP が、約 250 ナノメートル未満の有効径を有する、実施形態 59 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

61 前記 LNP が、約 125 ナノメートル未満の有効径を有する、実施形態 60 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

62 前記 LNP が、約 20 ～ 約 120 ナノメートルの有効径を有する、実施形態 61 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【実施例】

【0072】

略語：BMD C（骨髄由来樹状細胞）、CDS（細胞質 DNA センサー）、CLR（C 型レクチン受容体）、DAMP（ダメージ関連分子パターン）、DC（樹状細胞）、DMG-PEG2000（1, 2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000）、DSPC（1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、GFP（緑色蛍光タンパク質）、Hod i A-PC（1-パルミトイル-2-（5-ヒドロキシ-8-オキソ-6-オクテンジオイル）-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン）、HO OA-PC（1-パルミトイル-2-（5-ヒドロキシ-8-オキソオクタ-6-エノイル）-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、IFN γ （インターフェロン-ガンマ）、IL-1b / IL1-ベータ / IL-1 β （インターロイキン-1ベータ）、Kod i A-PC（1-（パルミトイル）-2-（5-ケト-6-オクテンジオイル）ホスファチジルコリン）、KOOA-PC（1-パルミトイル-（5-ケト-8-オキソ-6-オクテノイル）-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、LNP（脂質ナノ粒子）、LPC / Lyso PC（リゾホスファチジルコリン）、Lyso PC（22:0）（1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、LPS（リポ多糖）、moDC（単球由来樹状細胞）、MPLA（モノホスホリル脂質 A）、NLR（NOD 様受容体）、OVA（卵白アルブミン）、oxPAPC（酸化 1-パルミトイル-2-アラキドニル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン）、PAMP（病原体関連分子パターン）、PBMC（末梢血単核細胞）、PDI（多分散指数）、PGPC（1-パルミトイル-2-グルタリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、POVPC（1-パルミトイル-2-（5'-オキソ-バレロイル）-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、PRR（病原体認識受容体）、RLR（RIG-I 様受容体）、R848（レシキモド）、SM102（（8-〔（2-ヒドロキシエチル）〔6-オキソ-6-（ウンデシルオキシ）ヘキシル〕アミノ〕-オクタン酸）、1-オクチルノニルエステル）、STING（IFN 遺伝子の刺激因子）、TNF α （腫瘍壊死因子- α アルファ）、および TLR（tol l 様受容体）。

【0073】

本開示を、明確にし、理解を進めるために、例証または例示によって一部を詳細に記載してきたが、ある程度の変更および修正が実施され得ることが、当業者には明らかである。それゆえに、実施例は、本開示の範囲を制限するものとして解釈されるべきではなく、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によって説明される。

（実施例 1）

単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）および TLR7 / 8 アゴニストの組合せは、哺乳動物の末梢血単核細胞を過剰活性化する

【0074】

この実施例は、脂質 DAMP を小分子 PAMP と組み合わせて用いるイヌおよびヒト末梢血単核細胞（PBMC）の過剰活性化を記載する。

材料および方法

【0075】

ヒトおよびイヌ全血からの PBMC の単離。PBMC を、Ficoll-Paque PLUS（Cytivia）を用いて、密度勾配遠心分離を使用して全血から単離した。全血を、PBS で 1:1 希釈し、Ficoll-Paque PLUS の最上部に積層し、1000 $\times$ g で、室温で 30 分間遠心分離した。PBMC を収集し、PBS で 2 回洗浄

し、Ack溶解緩衝剤 (Lonza) と共にインキュベートして、残りのあらゆる赤血球を除去した。

【0076】

細胞培養および刺激。単離直後に、PBMCを、10% FBS、50単位/mLのペニシリン、50mg/mLのストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、1mMビルビン酸ナトリウム、および50mMベーターメルカプトエタノールを含有するRPMI培地 (R10培地) に蒔いた。細胞を、1ウェル当たり 1×10^5 (イヌ細胞) または 1×10^6 (ヒト細胞) で96ウェル平底組織培養プレートに蒔いた。凍結乾燥させたVaccigrade R848 (Invivogen) を再構成し、製造業者の推奨に従って希釈し、最終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ で細胞に添加した。直後に、22:0 LYSO PC (1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) を、最終濃度 $82.5 \mu\text{M}$ で細胞に添加した。さらなる自然アゴニストを、製造業者の推奨に従ってR10培地で希釈し、以下の通り細胞に添加した。ヒトGM-CSF (Peprotech) を最終濃度 10 ng/mL で添加し、2',3',cGAMP (Invivogen) を最終濃度 $15 \mu\text{g/mL}$ で添加し、LPS、血清型O55:B5 (Enzo Life Sciences) を最終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ で添加し、水酸化Alum (Invivogen) を最終濃度 $30 \mu\text{g/mL}$ で添加した。細胞を、 37°C 、5% CO_2 で2日間インキュベートした。次に、細胞培養物を、エンドポイント解析のために使用した。

10

【0077】

エンドポイント解析。PBMCをPAMPおよびDAMPと共に2日間培養した後、解析のために上清および細胞試料を収集した。培養物中の細胞を、 $400 \times g$ で5分間遠心分離することによってペレット状にした。ウェル中の培地体積の半分を、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) またはLumit (商標) 生物発光アッセイによってサイトカインを定量化するために収集し、一方、残りの培地および細胞を使用して、代謝活性を評価することによって細胞生存率を定量化した。

20

【0078】

サイトカイン分泌の定量化。ヒトPBMCからのIL-1 β 分泌を、以下のキットのうちの1つを使用して評価した。ELISA MAX Deluxe SetヒトIL-1 β キット (Biolegend)、InvitrogenヒトIL-1 β キット、またはLumit (商標) ヒトIL-1 β イムノアッセイ (Promega)。ヒトPBMCからのIFN γ 分泌を、ELISA MAX Deluxe SetヒトIFN γ (Biolegend) を使用して評価し、ヒトPBMCからのTNF α 分泌を、ヒトTNF α 未コーティングELISAキット (Invitrogen) を使用して評価した。ELISAを、以下の修正を加えて、製造業者の指示に従って実施した。i) インキュベーションのための全試料+緩衝剤体積を、 $100 \mu\text{L}$ から $50 \mu\text{L}$ に低減し、ii) 最高標準物質を 500 pg/mL で調製し、 7.8 pg/mL に2倍希釈し、iii) 試料のインキュベーションを、 4°C で一晩、オービタルシェイカーで完了させた。Lumit (商標) アッセイを、製造業者の指示に従って実施した。イヌPBMCからのIL-1 β 分泌を、イヌIL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D) を製造業者の指示に従って使用し、以下の修正を加えて評価した。i) インキュベーションのための全試料+緩衝剤体積を、 $100 \mu\text{L}$ から $50 \mu\text{L}$ に低減し、ii) 試料のインキュベーションを、 4°C で一晩、オービタルシェイカーで完了させた。すべてのELISAについて、吸光度を、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用して 450 nm で測定し、補正に 570 nm を用いた。Lumit (商標) アッセイについては、発光を、すべての波長に対して、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用し、500ミリ秒の積分時間で測定した。上清中のサイトカイン濃度を決定するために、試料濃度を、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) で4PL解析により標準曲線を使用して補間した。次に、試料の補間結果を、上清に対して行われたあらゆる希釈度に合わせて調整した。

30

40

50

【0079】

細胞生存率の定量化。細胞生存率を、Cell Titer-Glo 発光細胞生存アッセイ (Promega) を使用して、代謝的に活性な細胞の指標として ATP の存在を定量化することによって評価した。代謝活性を、製造業者の指示に従って評価した。Cell Titer-Glo 試薬を、細胞ペレットおよび新鮮培地と混合し、次に白色不透明の 96 ウェルプレートに移した。発光を、すべての波長に対して、Spectramax M5e プレートリーダー (Molecular Devices) で 500 ミリ秒の積分時間を使用して測定した。生存率パーセントを、R848 で処置した PBMC の対照条件と比べて計算した。

【0080】

統計解析。条件ごとに、各ドナーからの細胞を三連で試験するために蒔いた。サイトカインの定量化のために、三連の値を補間のために使用し、データを、全濃度 (pg/mL) またはドナー当たりの倍数変化として、R848 単独の対照条件と比べてプロットした。生存率の定量化については、各ドナーからの三連の値を平均し、その平均を 1 つのドナー測定値として使用した。複数のドナーを試験し、棒グラフ上の各データ点は、1 つのドナーについての値を表す。試験条件の差異について試験するために、試験結果を、R848 単独の対照条件と比較した。p 値を、混合効果一元配置 ANOVA を使用して計算し、多重比較のためにダネット検定を使用して補正した。

結果-22:0 LYSO PC および R848 を用いる処置は、イヌ PBMC を過剰活性化する

【0081】

22:0 LYSO PC (DAMP) および TLR7/8 アゴニスト R848 (PAMP) の組合せは、ヒト mDC において強力な過剰刺激活性を有することが既に見出されている。この過剰刺激活性が他の臨床的に関連する種につながるかどうかを評価するために、イヌ全血から単離した PBMC を過剰活性化する 22:0 LYSO PC + R848 の能力を評価した。本物のイヌ mDC を誘導するのに入手可能なイヌに特異的な試薬がなかったので、データセットごとに、mDC の代わりに複数のドナーからの PBMC を使用した。手短には、PBMC を、密度勾配遠心分離を使用して全血から単離し、次に、目的の過剰活性化刺激を用いて 2 日間培養した。

【0082】

2 日間培養した後、過剰活性化を、細胞培養上清中の IL-1 β の定量化および細胞生存率の測定によって評価した。22:0 LYSO PC および R848 を一緒に用いて処置した場合、イヌ PBMC は、1 mL 当たりの濃度およびドナー当たりの R848 単独に対する倍数変化の両方として、試験した他のあらゆる刺激と比較して同等のまたはより高いレベルの IL-1 β を分泌した。PBMC の 5~10% を構成する単球が、R848 を用いる活性化に応答して IL-1 β を放出し得ることを示す過去の研究と一致して、イヌ PBMC は、未処置細胞と比較して R848 単独で上昇したレベルの IL-1 β を分泌していた。パイロトシスの LPS + Alum の組合せは、予想通り高レベルの IL-1 β を誘発した。とりわけ、PGPC + R848 は、R848 単独と比較して同様のレベルの IL-1 β を誘発したのに対して、GM-CSF も 2'3'cGAMP も、未処置細胞と比較してイヌ PBMC からの著しい IL-1 β 分泌を誘導しなかった。

【0083】

IL-1 β は、細胞培養上清中でイヌ PBMC が過剰活性化された翌日に検出することができたが、細胞生存率を過剰活性化後 2 日目に評価すると、IL-1 β 分泌後の永続的な生存が保証された。22:0 LYSO + R848 では、細胞の相対的生存率は著しく低下しなかった。興味深いことに、PGPC を R848 と組み合わせると、イヌ PBMC に対していくらか毒性になることが証明されたが、ヒト mDC またはヒト PBMC に対する毒性は観察されなかった。しかし、目的の特定の細胞集団 (この場合、本発明者らが疑っている単球は、IL-1 β に応答している) の生存率は、混合物から決定することができないので、混合細胞集団の試験から行った観察を解釈することは、生存率に関する懸

10

20

30

40

50

念の難易度が高くなることに留意することが重要である。これらのデータをまとめると、
22:0 LYSO+R848は、イヌPBMCから高レベルのIL-1 β 分泌を誘発し、
これが過剰活性化の指標になることが実証される。

結果-22:0 LYSO PCおよびR848を用いる処置はヒトPBMCを過剰活性化する

【0084】

ヒトドナーから得た全血から単離したPBMCでも、過剰活性化実験を実施した。手短
には、PBMCを、複数のヒトドナーの全血から密度勾配遠心分離によって単離し、目的
の過剰活性化刺激を用いて2日間培養した。

【0085】

ヒトPBMCは、ヒトmoDCおよびイヌPBMCと同様に、試験した他のすべての刺
激よりも高いか、またはそれらと同等のレベルでIL-1 β を分泌した。ヒトPBMCは、
イヌPBMCと同様に、単球活性化に起因してR848単独に反応してIL-1 β を分
泌し、これは22:0 LYSO PCの添加によって上昇した。LPS+Alumのパ
イロトキシ的組合せは、予想通り高レベルのIL-1 β を誘発した。イヌPBMCにお
ける観察と一致して、PGPC+R848は、R848単独ほど実質的に高レベルのIL-
1 β を誘導しなかった。GM-CSFは、未処置細胞によって生じたバックグラウンド
レベルを著しく上回るレベルのヒトPBMCからのIL-1 β 分泌は誘導しなかった。

【0086】

また、ヒトPBMCの生存率を過剰活性化後2日目に評価すると、IL-1 β 分泌後の
ヒトPBMCの持続的な生存が保証された。いずれの刺激を用いる処置の後も、ヒトPB
MCの生存率の著しい低下は観察されなかった。しかし、目的の特定の細胞集団（この場
合、単球）の生存率は、混合物で得られた結果からは決定することができないので、混合
細胞集団の試験から行った観察を解釈することは難易度が高い。これらのデータをまとめ
ると、ヒトおよびイヌPBMCは共に、22:0 LYSO PC+R848によって過
剰活性化されることが実証される。興味深いことに、イヌPBMCは、PGPC+R84
8よりも22:0 LYSO PC+R848によって過剰活性化される程度が大きい。

【0087】

活性化されたヒトPBMCは、IL-1 β に加えて他のサイトカインを分泌することが
できるので、細胞培養上清における炎症促進性サイトカインIFN γ およびTNF α の分
泌を、過剰活性化後2日目に測定した。22:0 LYSO PC+R848の組合せは、
IFN γ 分泌およびTNF α 分泌の両方において、試験した他のすべての刺激と比較し
て、R848単独と比べたドナー当たり最高の倍数変化を誘導した。とりわけ、LPS+
Alumは、ヒトPBMCから高レベルのIL-1 β 分泌を誘導したが、この刺激の組合
せは、IFN γ またはTNF α 分泌の倍率上昇を誘導しなかった。さらに、GM-CSF
も2'3'cGAMPも、R848単独を上回るIFN γ 分泌の実質的な倍数変化を誘発し
なかった。これらのデータは、22:0 LYSO PC+R848の組合せが、ヒトP
BMCからの炎症性サイトカインIFN γ およびTNF α の分泌を誘導するのに優れてい
ることを示している。

（実施例2）

哺乳動物樹状細胞の過剰活性化のための、mRNAの存在下での単一アシル鎖を有するL
PCの脂質ナノ粒子への組み込み

【0088】

この実施例は、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）化合物（例
えば、22:0 Lysol PC）および抗原をコードするmRNAを含有する脂質ナノ
粒子（LNP）の調製および試験を記載する。LPC/mRNAを負荷したLNPは、小
分子PAMP（例えば、R848）との組合せで、哺乳動物樹状細胞の過剰活性化に好適
である。

材料および方法

【0089】

10

20

30

40

50

LNP合成。LNPを、以下の構成成分：

(8-[(2-ヒドロキシエチル) [6-オキソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル]アミノ]-オクタン酸)、1-オクチルノニルエステル(CAS登録番号2089251-47-6、本明細書では「SM102」と呼ばれる)(Cayman Chemical)、

1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(CAS登録番号816-94-4、本明細書では「DSPC」と呼ばれる)(Avanti)、

コレステロール(Sigma)、および

1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(CAS登録番号160743-62-4、本明細書では「DMG-PEG2000」と呼ばれる)(Avanti)

を、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(CAS登録番号125146-65-8、本明細書では「22:0 Lyso PC」と呼ばれる)

(Avanti)と組み合わせて、または組み合わせることなく調製した。表2-1は、試験したLNP製剤ごとの各構成成分のモルパーセンテージの詳細である。LNPを、22:0 Lyso PCなしに、またはLNP中20%、30%もしくは40%モル比の22:0 Lyso PCを負荷して調製して、22:0 Lyso PCの負荷が意図的に変えられ得るかどうかを決定した。LNPを、mRNAを用いずに、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするmRNAを用いて、または卵白アルブミン(OVA)をコードするmRNAを様々な負荷レベルで用いて作製して、22:0 Lyso PCを包含することが、LNPへのmRNA負荷に影響を与え得るかどうかを決定した。

【0090】

LNPを、NanoAssembler Ignite機器(Precision Nanosystems)を使用して合成した。まず、脂質をエタノールに溶解させ、次に表2-1に示されているモル濃度の組成に従って合わせた。エタノール中の脂質を、mRNAを含有するクエン酸ナトリウム緩衝剤(pH4)と1:3の体積比で、流速12mL/分で合わせた。増強されたGFP mRNA(Trilink)を、LNPに負荷するために、クエン酸ナトリウム緩衝剤中0.053mg/mLの濃度まで添加した。OVA mRNA(Trilink)を、LNPに負荷するために、クエン酸ナトリウム緩衝剤中0.035mg/mLまたは0.004mg/mLの濃度まで添加した。LNPを、10体積のPBS、pH7.4で洗浄して、残留エタノールを除去し、次にAmicon 10K MWCO遠心フィルターを使用して濃縮した。

表2-1. LNP製剤における脂質のモル濃度パーセント

【表2-1】

脂質	LNPビヒクル LNP 0	22:0 Lyso PC LNP 20	22:0 Lyso PC LNP 30	22:0 Lyso PC LNP 40
SM102	35%	35%	35%	30%
DSPC	33%	13%	3%	0%
コレステロール	30.5%	30.5%	30.5%	28.5%
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
22:0 Lyso PC	0%	20%	30%	40%

【0091】

LNPの特徴付け。LNPへの22:0 Lyso PCの負荷を、HPLCを使用して評価した。PBS中LNPを、定量化まで-20℃で凍結させた。LNPを、1部のエタノールをPBS中LNPに添加することによって溶解させた。22:0 Lyso PCの7点標準曲線を、試料の調製に合致するように添加される1:1のエタノール:PBS中で調製した。標準物質および試料を、0.45μmフィルターを介して濾過した後、HPLCに流した。HPLC定量化を、1260 Infinity II蒸発光散乱検

出器を備えた Agilent 1260 Infinity II HPLC を使用して実施した。Luna 5 μ m NH2 100 Å、150×4.6 mm の LC カラム (Phenomenex) をカラム温度 30℃ で使用して、試料を検出した。A、100% 水、および B、100% アセトニトリルの 2 種の溶離液を使用した。5% / 95% A / B から構成された初期移動相を使用して、2.5 分後に 24% / 76% A / B に達する勾配でカラムにロードした。2.5～6 分ではより狭い勾配を使用し、その時間枠中に A / B は 25% / 75% にゆっくり達した。その後、3 分間かけて勾配を出発条件に戻した後、次の試料を流した。流速は 1 mL / 分に設定し、注入体積は、試料および標準物質について 2.5 μ L であった。蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、エバポレーター温度 50℃、ネブライザー温度 30℃、およびガス流速 0.9 標準 L / 分を使用した。HPLC 機器制御、データ取得、および処理のために、Agilent CDS 2.6 ソフトウェアを使用した。

10

【0092】

LNP への mRNA の負荷を、RiboGreen アッセイ (ThermoFisher) を製造業者のプロトコールに従って使用して定量化した。試料を、標準曲線の範囲内に入るように希釈した。Triton (登録商標) X-100 を使用して LNP を溶解させて、LNP への mRNA の封入を評価した。全 mRNA および封入された mRNA の両方を定量化した。LNP のサイズを、NanoBrook Omni (Brookhaven) で動的光散乱 (DLS) を使用して評価した。LNP を PBS で 1:10 希釈した後、DLS で行った。試料ごとに 90 秒間の 3 回の測定値を記録した。

20

【0093】

ヒト単球由来樹状細胞 (moDC) の産生。ヒト単球を、Straight From (登録商標) Leukopak (登録商標) CD14 マイクロビーズキットを製造業者の指示に従って使用して、Miltenyi Inc. (San Jose, CA) から購入した Leukopak から単離した。次に、単球を一定分量に分け、10% ジメチルスルホキシドを含有する FBS 中で凍結させた。試験の前に単球を解凍し、10% FBS、50 単位 / mL のペニシリン、50 mg / mL のストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウム、50 mM ベータ-メルカプトエタノール、10 mM HEPES、および Gibco MEM 非必須アミノ酸を含有する RPMI 培地 (R10 培地) 中で培養した。単球を moDC に分化させるために、組換えヒト GM-CSF (50 ng / mL) および IL-4 (25 ng / mL) を R10 培地に添加した。細胞を、GM-CSF および IL-4 と共に 6 日間培養し、3 日目に GM-CSF および IL-4 を含有する R10 培地でさらに供給した。

30

【0094】

ヒト単球由来樹状細胞 (moDC) の過剰活性化。分化後 6 日目に moDC を収集し、計数した。細胞を、96 ウェル平底プレートに 1×10^5 細胞 / ウェルで蒔いた。細胞を、eGFP mRNA の存在下または非存在下で、1 μ g / mL の R848 (最終) を用いてまたは用いずに、過剰活性化脂質 (またはビヒクル対照) を負荷した LNP を用いてまたは用いずに処置した。LNP によって誘導された過剰活性化を、LNP と共に培養した状態で 48 時間後に測定した。細胞生存率を、LDH CyQuant キット (Invitrogen) を製造業者の指示に従って使用して評価した。IL-1 β および IL-6 の Lumit アッセイ (Promega) を使用して、moDC 細胞培養上清中に存在している IL-1 β および IL-6 を測定した。実験条件を三連で試験し、2 人のヒトドナーからの結果の平均をプロットした。データは、2 回の実験からの結果を表す。

40

【0095】

過剰活性化に加えて、moDC における GFP 発現を、BD FACS Symphony A3 デバイスでフローサイトメトリーを使用して定量化した。LNP と共に培養した状態で 48 時間後に、moDC を収集し、生 / 死細胞用色素で染色して生細胞を特定し、続いて CD11c、CD40、CD86、HLA-DR、および HLA-ABC に特異的な抗体で染色した。生細胞を解析のために選択し、次に、CD11c⁺ 細胞を GFP 発

50

現について評価して、LNPに22:0 Lysol PCを負荷した場合にLNPのmRNAがGFPタンパク質に翻訳され得るかどうかを決定した。抗原提示を、HLA-DRおよびHLA-A*02:01に特異的な抗体を使用して評価して、過剰活性化が抗原提示を妨害し得るかどうかを決定した。活性化を、CD40およびCD86について染色することによって評価して、過剰活性化が活性化マーカーの発現を増加し得るかどうかを決定した。

【0096】

マウス骨髄由来FLT3L-DC (BMDC) の産生。マウスから大腿骨および脛骨を除去し、ハサミで切断し、滅菌管に流し入れた。骨髄懸濁液を、ACK溶解緩衝剤で1分間処置し、次に40 μ mの細胞濾過器を通過させた。細胞を計数し、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシン、ならびにL-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムのサプリメントを含む完全IMDMからなる培地 (I10) に再懸濁させた。次に、細胞をP12プレート中8 $\times$ 10⁶細胞/ウェルで蒔いた。組換えマウスFLT3L (Miltentyi) を、200 ng/mLで培養物に添加した。分化した細胞を、8日目のその後のアッセイのために使用した。分化効率を、BD Symphony A3デバイスを使用してフローサイトメトリーによってモニタリングし、CD11c⁺MHC-II⁺細胞は、日常的に生細胞の80%を上回っていた。実験ごとに、5~15匹のマウスを使用して、BMDCを産生した。

【0097】

マウス骨髄由来FLT3L-DCの過剰活性化およびT細胞共培養。BMDCを、分化後8日目および9日目に回収し、PBSで洗浄し、完全IMDM培地 (I10) に2 $\times$ 10⁵細胞/ウェルの濃度で再び蒔いた。細胞を、50 μ Mの22:0 Lysol PC LNPを負荷したLNPの存在下または非存在下で、高用量または低用量のmRNAのいずれかのOVA mRNAがある状態またはない状態で培養した (表2-2)。刺激後24時間および48時間目に、上清およびBMDCを収集した。BMDCによるIL-1 β サイトカイン分泌を、サンドイッチELISA (Invitrogen) を製造業者の指示に従って使用して測定した。約2 $\times$ 10⁴の過剰活性化されたBMDCを、T細胞との共培養のために丸底96ウェルプレートのウェルに播種した。

【0098】

CD8⁺T細胞を、H2-K^bによって提示された卵白アルブミンペプチド (残基257~264) に特異的なT細胞受容体 (TCR) を発現する、トランスジェニックOT-Iマウスの脾臓およびリンパ節から収集した。OT-IマウスのすべてのCD8⁺T細胞は、卵白アルブミンペプチドに特異的なナイーブ細胞である。T細胞の共培養を、BMDCを含む各ウェルに6 $\times$ 10⁴のCD8⁺T細胞を添加することによって設定した。過剰活性化されたBMDCを、T細胞と共に72時間共培養し、その後、共培養上清を収集した。

【0099】

加えて、CD8⁺T細胞を、不完全フロイントアジュバント (IFA) 中卵白アルブミン (OVA) で予め免疫付与されたマウスの脾臓およびリンパ節から、マウスCD8⁺T細胞単離キット (Miltentyi) を製造業者の指示に従って使用して収集した。免疫化により、抗原に予め曝露されたOVA特異的T細胞を含むCD8⁺T細胞集団を、生理的に関連するレベルで誘発した。T細胞の共培養を、BMDCを含む各ウェルに1.6 $\times$ 10⁵のCD8⁺T細胞を添加することによって設定した。過剰活性化されたBMDCおよびCD8⁺T細胞を、96時間共培養した後、共培養上清を収集した。

【0100】

BMDCによって提示されたOVAに応答するCD8⁺T細胞によるIFN γ 分泌を、マウスLumit IFN γ キット (Promega) を製造業者の指示に従って使用して評価した。発光を、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用してすべての波長にわたって500ミリ秒間測定した。上清中のIFN γ 濃度を決定するために、試料濃度を、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) で4PL解析を介して標準曲線を使用して補間

10

20

30

40

50

した。次に、試料の補完結果を、上清に対して行われたあらゆる希釈度に合わせて調整した。

結果

【0101】

脂質ナノ粒子（LNP）は、特にmRNAワクチンの状況において重要なワクチン送達ツールになっており、COVID-19に対する戦いにおいて世界的に大きな役割を果たしてきた。LNPは、mRNAカーゴを細胞に送達するのに特に有用である。しかし、LNPベースのmRNAワクチンは、それらがコードする抗原に対する抗体応答を誘導するには有効であるが、mRNAワクチンは、多くの場合、限られた抗原特異的T細胞応答を誘発し、それによって、それらの有効性および長寿がマイナスの影響を受ける。この問題に対処するために、本開示は、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン（LPC）化合物、例えば、22:0 Lyso PCを、抗原をコードするmRNAを含有するLNP製剤に添加して、その免疫原性を増強することを記載する。

10

【0102】

例示的な脂質の構造に基づいて、22:0 Lyso PCをLNPに組み込むことを考え、その種々のLNP構成成分のモジュレーションにより、22:0 Lyso PCを負荷したLNPの物理的特徴および生物活性に影響を及ぼすことができた。負荷されたLNPの負荷レベルおよび数の両方が、細胞に送達される22:0 Lyso PCのペイロードに影響を及ぼす非常に重要な変数であると考えられた。

20

【0103】

22:0 Lyso PCを、LNPに負荷することができる。LNPを、22:0 Lyso PCを用いてまたは用いずに、以下のSM102、DPSC、コレステロール、およびDMG-PEG2000を合わせることによって調製した。これらのLNP製剤についての投入モル比は、表2-1に列挙されている。22:0 Lyso PCは、DSPCと最も構造的に類似しているため、LNPに添加される22:0 Lyso PCの量が増加した場合、製剤におけるDSPCを22:0 Lyso PCで置き換えた。22:0 Lyso PCの負荷レベルが意図的に変えられ得るかどうかを決定し、負荷レベルがLNPの生物活性にどのように影響を与え得るかを理解するために、様々なレベルの22:0 Lyso PCを含有するいくつかの異なるLNP組成物を調製した。LNPを、22:0 Lyso PCなしに（LNP0）、または20%（LNP20）、30%（LNP30）もしくは40%（LNP40）モル比の22:0 Lyso PCを負荷して調製した。またLNPを、mRNAを用いずに、またはGFPをコードするmRNA（GFP mRNA）を用いて、またはOVAをコードするmRNA（OVA mRNA）を様々な負荷レベルで用いて作製して、22:0 Lyso PCを包含することが、LNPへのmRNAの負荷に影響を与え得るかどうかを決定した。

30

【0104】

表2-2は、試験した製剤についてのmRNAに対する22:0 Lyso PCの負荷比の詳細である。種々の負荷レベルのmRNA/22:0 Lyso PCを試験して、mRNAおよび22:0 Lyso PCの両方が生物学的に活性となり得る条件を特定した。すべての場合において、それぞれRibogreenおよびHPLCによって評価される通り、mRNAおよび22:0 Lyso PCの両方をLNPに負荷した。22:0 Lyso PC LNP20を除いて、すべてのLNP製剤についてのmRNA負荷は>75%であり、22:0 Lyso PCの負荷は>80%であった。

40

表2-2. LNP製剤の相対的負荷レベル[^]

50

【表 2 - 2】

LNP 製剤	カーゴ投入比: mRNA/22:0 Lyso PC	mRNA 負荷効率	22:0 Lyso PC 負荷効率
22:0 Lyso PC LNP 0: GFP mRNA	--	75.5%	--
22:0 Lyso PC LNP 20: GFP mRNA	0.110	69.4%	76.7%
22:0 Lyso PC LNP 30: GFP mRNA	0.074	76.6%	82.1%
22:0 Lyso PC LNP 40: GFP mRNA	0.055	77.7%	92.4%
22:0 Lyso PC LNP 40: OVA mRNA 高用量	0.044	103.0%	86.5%
22:0 Lyso PC LNP 40: OVA mRNA 低用量	0.005	115.7%	86.3%

10

^ mRNAを含有していないLNP(LNP 0、LNP 30、LNP 40)を調製した。これらのLNPに、mRNAを含有するLNPと類似の効率で22:0 Lyso PCを負荷した。

【0105】

重要なことには、22:0 Lyso PCおよびmRNAの両方が、LNPのサイズまたは多分散指数(PDI)を劇的に上昇させることなくLNPに負荷された(図1A~B)。すべての場合において、mRNAを用いて調製されたLNPは、より大きく、22:0 Lyso PCがLNPに添加された場合の有効径がわずかに大きくなった(図1A)。すべてのLNPが、まだナノ粒子のサイズであり、すべての直径が<125nmであった。22:0 Lyso PCの添加は、LNPのPDIに影響を与えず(図1B)、すべてのLNP製剤が、比較的均一な粒子集団を生じた(PDI<0.3)。ほとんどの場合、動的光散乱(DLS)によるLNPについてのすべてのサイズ読取り値が、mRNAを含まないLNP20製剤を除いて、比較的近かった。それゆえに、一部の実施形態では、22:0 Lyso PCは、20%を上回る、好ましくは25%を上回る、より好ましくは少なくとも30%のモルパーセント濃度でLNP製剤に包含される。

20

【0106】

22:0 Lyso PC LNPは、ヒトmoDCの過剰活性化を可能にする。Leukopakから単離したヒト単球を、GM-CSFおよびIL-4と共に培養した状態で6日間にわたって単球由来DC(moDC)に分化させた。分化後6日目にmoDCを収集し、96ウェル平底プレートに1×10⁵細胞/ウェルで蒔いた。moDCを、eGFP mRNAの存在下または非存在下で、1μg/mLのR848を用いてまたは用いずに、過剰活性化脂質を負荷したLNP(またはLNPビヒクル対照)を用いてまたは用いずに処置した。LNPを、全量の50μMまたは100μM 22:0 Lyso PCになるように、LNPの負荷含量に基づいて投与した。LNPによって誘導された過剰活性化を、生moDCからのサイトカイン分泌を評価することによって、LNPと共に培養した状態で48時間後に測定した。

30

40

【0107】

細胞生存率を、上清中に存在しているLDHによって評価し、R848単独で処置したウェル(LNPなし)に対して正規化した。50μMの処置条件では、すべてのウェルが、LNPまたはLNP中22:0 Lyso PCの存在にかかわらず、R848単独処置条件と同様の生存率を有していた(図2A)。100μM用量では、R848を含有するほとんどの処置が、>75%の細胞生存率と関連していた(図2B)。LNP40条件の生存率は、R848がない状態で培養した場合、75%未満に低下したが、R848をウェルに添加した場合、細胞生存率は75%を上回った。LNPで送達された22:0 Lyso PCがmoDCを過剰活性化する能力を測定するために、IL-1βサイトカイン分泌を、細胞培養上清中で測定した。重要なことには、R848および22:0 L

50

y s o P Cを含有するL N P処置した生細胞だけが、I L - 1 β を生成することができた（図2 C ~ 2 D）。I L - 1 β 分泌は用量依存的であり、1 0 0 μ M 2 2 : 0 L y s o P Cで処置した細胞は、5 0 μ M 2 2 : 0 L y s o P Cで処置した細胞よりも多いI L - 1 β を生成することができた。重要なことには、I L - 1 β 分泌は、L N P中のm R N Aの存在によって影響を受けなかったが、このことは、2 2 : 0 L y s o P Cおよびm R N Aを負荷したL N Pが、2 2 : 0 L y s o P Cを欠いたL N Pと比較して免疫原性が増大したことを示している。加えて、L N P中の2 2 : 0 L y s o P Cのモル比を増加すると、I L - 1 β 分泌が増加したが、このことは、同じ全用量の2 2 : 0 L y s o P Cを送達しても、L N P中の2 2 : 0 L y s o P Cの量を変えることにより、L N Pの免疫原性が変わり得ることを示している。

10

【0108】

I L - 1 β に加えて、I L - 6分泌を、細胞培養上清中で4 8時間後に測定した。興味深いことに、2 2 : 0 L y s o P CをL N Pに添加することにより、R 8 4 8に応答して分泌されるI L - 6の量が増加した（図2 E ~ 2 F）。2 2 : 0 L y s o P Cを含まないL N Pを用いて処置したm o D Cは、R 8 4 8単独で処置した細胞と同様のレベルでI L - 6を生成したが、このことは、L N P自体が必ずしも強力に免疫原性であるとは限らないことを示している。しかし、L N Pに2 2 : 0 L y s o P Cも負荷した場合、分泌されるI L - 6の量は著しく増加した。加えて、この応答は用量依存的であり、1 0 0 μ M 2 2 : 0 L y s o P Cで処置した細胞は、5 0 μ M 2 2 : 0 L y s o P Cで処置した細胞よりも多いI L - 6を生成することができた。

20

【0109】

2 2 : 0 L y s o P C L N Pは、m R N Aの翻訳を可能にし、ヒトm o D Cにおける活性化マーカーの表面発現を増加する。m o D Cの過剰活性化がm R N A発現に影響を与え得るかどうかを決定するために、G F Pのレベルを測定した。G F P m R N Aを含有するL N Pを用いて処置した細胞だけが、G F P発現を生じた（図3 A ~ 3 B）。2 2 : 0 L y s o P Cを含有するL N P（L N P m R N A 3 0およびL N P m R N A 4 0）を用いる処置では、実際、G F Pについて陽性の細胞のパーセンテージが低下したが、m R N A L N Pを用いて処置した細胞のほとんどは、G F P m R N Aをタンパク質に翻訳することができた。重要なことには、G F Pの蛍光強度中央値（M F I）は、2 2 : 0 L y s o P Cを含有するL N Pについてはより低かったが（図3 C ~ 3 D）、m R N Aを発現する細胞のパーセンテージは高いままであり、このことは、より低い速度ではあるが細胞がG F Pを発現し続けることを示している。これらのm o D Cが、過剰活性化されると同時にG F Pを生成することを考慮すると、より低いレベルのG F P発現が、細胞表面における著しくより低いレベルの抗原（G F P）提示につながるとは考えられない。興味深いことに、このことは、2 2 : 0 L y s o P Cの量を増加すると、より低レベルのG F P発現が生じると同時に、I L - 6およびI L - 1 β 分泌のレベルが増加するので、用量依存的であることが見出された。重要なことには、G F P m R N Aを負荷したL N Pを用いて処置したm o D Cは、L N Pへの2 2 : 0 L y s o P Cの負荷にかかわらず、G F Pを発現することができる。

30

【0110】

前述の研究と並行して、m o D Cを、L N Pと共に培養した状態で4 8時間後に収集し、生C D 1 1 c ⁺細胞を、C D 4 0、C D 8 6、H L A - D R、およびH L A - A B Cの表面発現について評価した。m o D C上のC D 8 6およびC D 4 0のレベルを測定して、過剰活性化が活性化マーカーの発現に影響を与え得るかどうかを決定した。2人のヒトドナーの試料から調製したm o D Cでは、2 2 : 0 L y s o P Cが負荷されたL N Pを用いる処置により、C D 8 6（図4 A ~ 4 B）およびC D 4 0（図4 C ~ 4 D）の両方の蛍光強度中央値（M F I）が上昇したが、このことは、過剰活性化後に共刺激性および活性化マーカーの発現が増加したことを示している。加えて、1 0 0 μ M 2 2 : 0 L y s o P Cを用いる処置により、C D 8 6およびC D 4 0の表面発現がさらに増加したので、C D 8 6およびC D 4 0の増加は用量依存的であった。m o D C上のH L A - D Rお

40

50

よびHLA-ABCのレベルを測定して、過剰活性化が、主要組織適合性複合体(MHC)の発現、およびそれゆえに抗原提示を妨害し得るかどうかを決定した。活性化マーカーの発現と同様に、22:0 Lyso PCが負荷されたLNPを用いるmoDCの処置により、HLA-DR(MHC-II)(図4E~4F)およびHLA-ABC(MHC-I)(図4G~4H)の両方のMFIが上昇したが、このことは、過剰活性化後に抗原提示分子の発現が増加することを示している。この増加も、100μM 22:0 Lyso PCを用いる処置によりHLA-DRおよびHLA-ABCの発現がさらに増加したので、用量依存的であることが観察された。

【0111】

マウスDC:T細胞の共培養により、22:0 LPCが負荷されたLNPを用いる抗原特異的T細胞の活性化が可能になる。ヒトmoDC系で行った観察を発展させるために、マウス系でも研究を実施した。LNPに、22:0 Lyso PCおよび2つの異なる濃度のOVA mRNAを負荷した(表2-2)。次に、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)を、R848および低用量または高用量のOVA mRNAを含有するLNPを介して送達される50μMまたは100μMの22:0 Lyso PCを用いて過剰活性化した(表2-2)。刺激後約48時間目に、IL-1β分泌を測定するために上清を収集した。重要なことには、R848および22:0 Lyso PCを含有するLNPを用いて処置したBMDCだけが、IL-1βを高レベルで生成することができた(図5A)。22:0 Lyso PCを含有していないLNP(LNP0製剤)で処置した細胞は、実際、R848単独で処置した細胞よりも多いIL-1βを生成した。LNPへの22:0 Lyso PCの添加は、著しく多いIL-1β生成を生じた。ヒトmoDCでも見られた通り、IL-1β分泌は用量依存的であり、100μM 22:0 Lyso PCで処置した細胞は、50μMで処置した細胞よりも多いIL-1βを生成した。加えて、IL-1β分泌は、LNP中のmRNAの存在または用量によって影響を受けなかった。このことは、22:0 Lyso PCおよびmRNAを負荷したLNPが、22:0 Lyso PCを欠いたLNPよりも免疫原性が高いことを示している。

【0112】

加えて、22:0 Lyso PCおよび異なる用量のOVA mRNAを含有するLNPを用いて48時間過剰活性化したBMDCを、OT-Iマウスの脾臓およびリンパ節から収集したOT-I CD8+T細胞と共培養した。OT-IマウスのすべてのCD8+T細胞が、ナイーブ(抗原未経験)であり、OVAペプチドに対して特異的である。過剰活性化されたDCおよびCD8+T細胞を、72時間共培養した後、共培養上清を収集した。BMDCによって提示されたOVAへの応答における、CD8+T細胞によるIFNγ分泌を評価した。予想通り、CD8+T細胞によるIFNγ分泌は、LNP中のOVA mRNAの存在によって推進された(図5B)。重要なことには、活性化されたCD8+T細胞によるIFNγ分泌は、LNP中の22:0 Lyso PCの存在によって影響を受けなかった。興味深いことに、低用量OVA mRNAと高用量OVA mRNAの間でmRNAの用量差が10倍あったが、IFNγ分泌には影響を与えなかった。これらの結果を合わせると、LNPに22:0 Lyso PCを負荷しても、抗原発現は、DC細胞表面における抗原提示にマイナスの影響を与え得るレベルには低下せず、したがって抗原特異的ナイーブCD8+T細胞の活性化を可能にすることが示される。

【0113】

また、22:0 Lyso PCおよび異なる用量のOVA mRNAを含有するLNPを用いて48時間過剰活性化されたBMDCを、IFA中卵白アルブミンで予め免疫付与されたマウスの脾臓およびリンパ節から収集したCD8+T細胞と共培養した。OVA-IFA免疫化スキームにより、抗原を経験したOVAに特異的なCD8+T細胞の集団を、生理的に関連するレベルで産生する。過剰活性化されたBMDCおよびCD8+T細胞を、96時間共培養した後、共培養上清を収集した。BMDCによって提示されたOVAに応答して再活性化されたCD8+T細胞によるIFNγ分泌を評価した。重要なことには、再活性化されたCD8+T細胞によるIFNγ分泌は、送達されるOVA mRN

Aの用量によって大きく推進され、LNP中22:0 Lyso PCの存在によって影響を受けなかった(図6A~6B)。やはりこのデータも、LNPに22:0 Lyso PCを負荷しても、抗原をコードするmRNAからの抗原発現および提示が妨害されないことを示している。

【0114】

まとめると、これらの結果は、抗原をコードするmRNAに加えて単一アシル鎖を有するLPC(例えば、22:0 Lyso PC)が負荷された、より免疫原性が高いLNPの使用が、過剰活性化脂質を含有していないLNPを上回る利点を有することを示している。過剰活性化LNPの影響は、*in vivo*でより明らかになると予想される。特に、過剰活性化LNPを取り込んだDCによるリンパ節への遊走およびIL-1 β 分泌の増大は、新たな抗原特異的メモリーT細胞の産生および抗原特異的T細胞の再活性化を、より強力に導くと予想される。

【図面】

【図1】

FIG. 1B

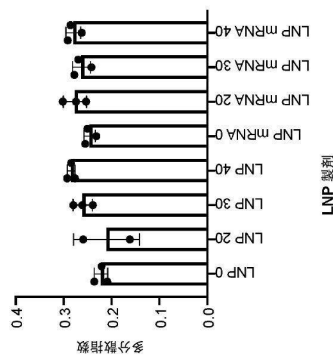
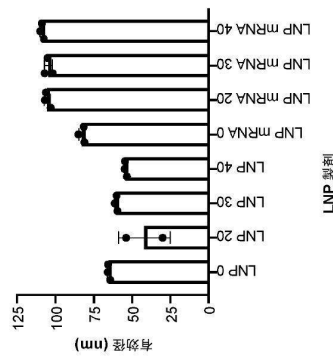


FIG. 1A



【図2-1】

FIG. 2B

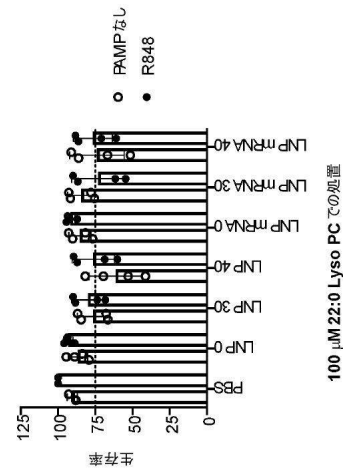
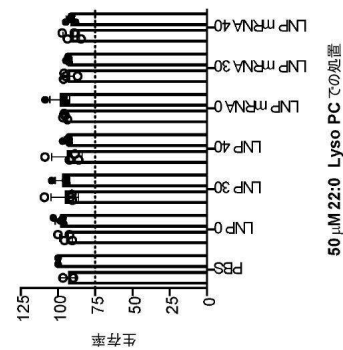


FIG. 2A



10

20

30

40

50

【図 2 - 2】

FIG. 2D

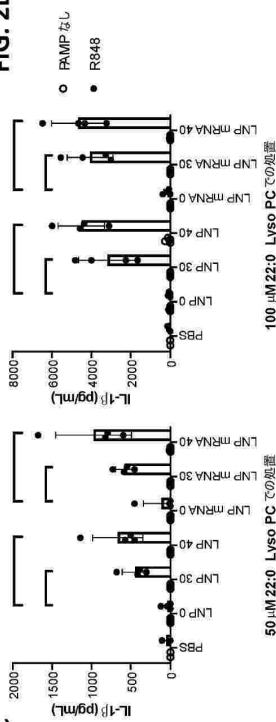
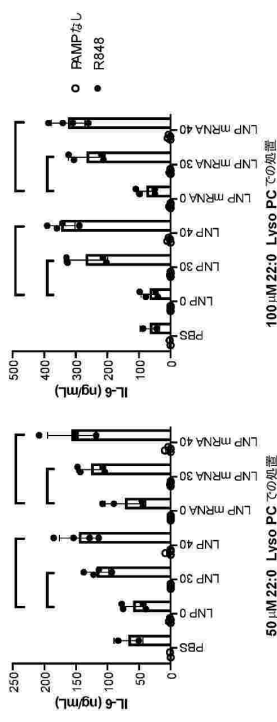


FIG. 2F



【図 3】

FIG. 3B

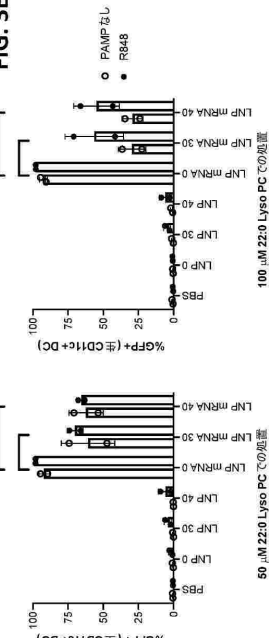


FIG. 3D

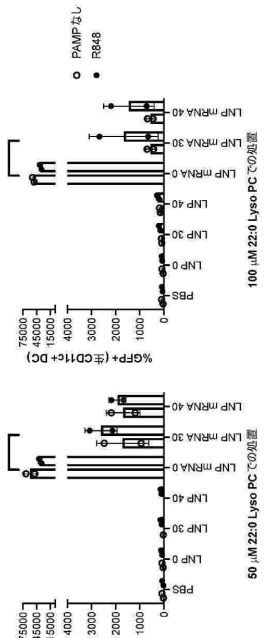


FIG. 2C

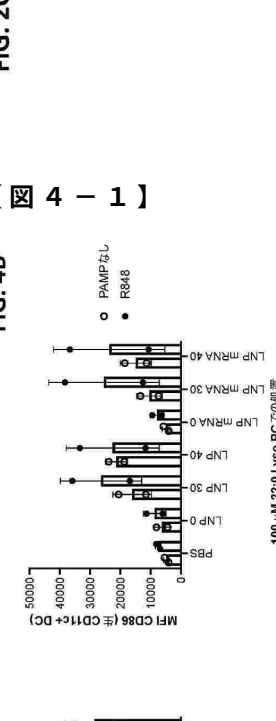


FIG. 2E

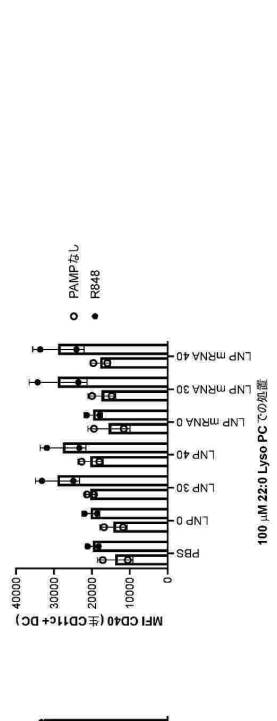


FIG. 3A

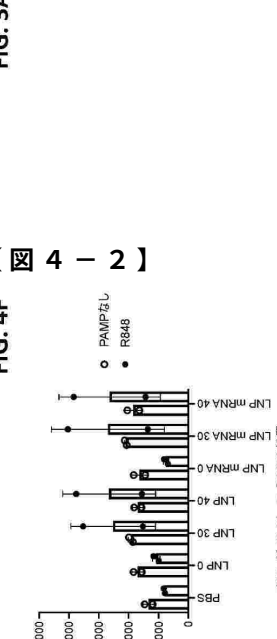
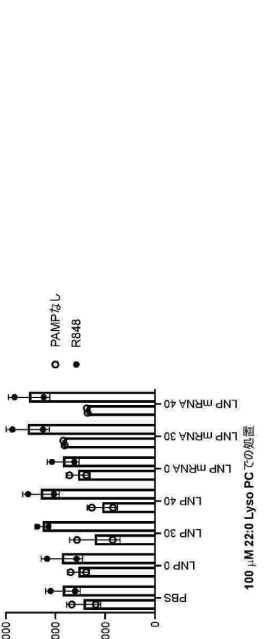


FIG. 3C



【図 4 - 1】

FIG. 4B

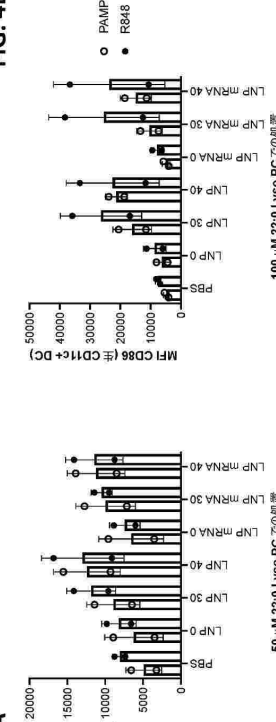
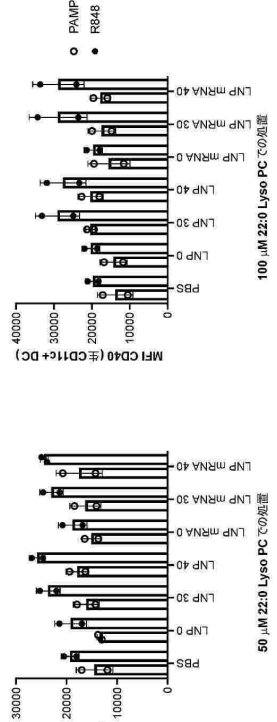


FIG. 4D



【図 4 - 2】

FIG. 4F

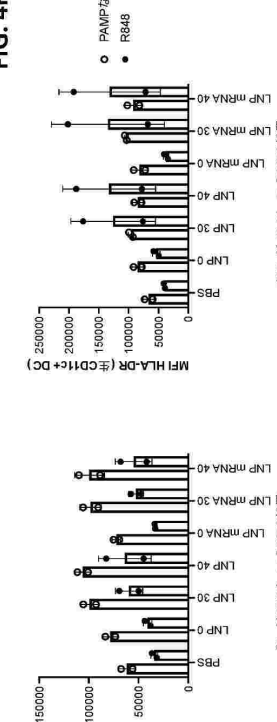


FIG. 4H



FIG. 4A

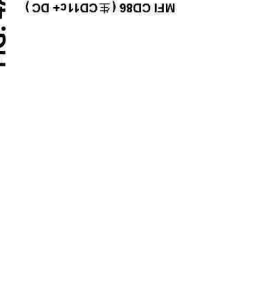


FIG. 4C



FIG. 4E

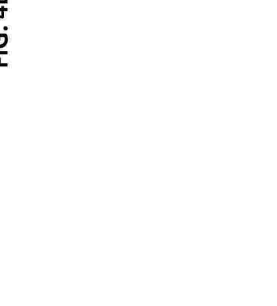


FIG. 4G



【図 5】

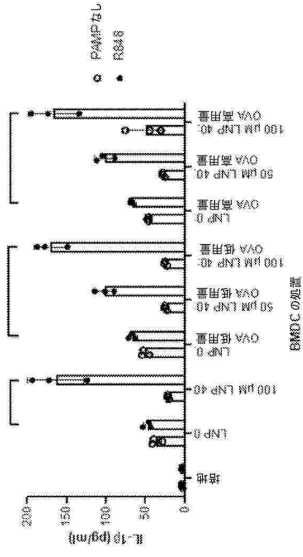


FIG. 5A

【図 6】

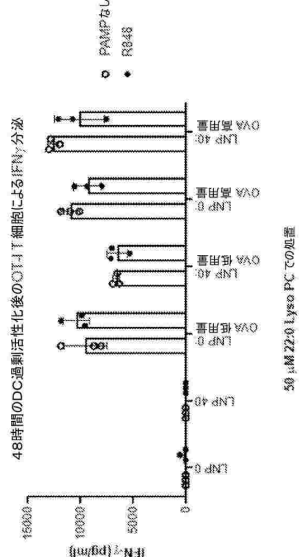


FIG. 5B

【図 6】

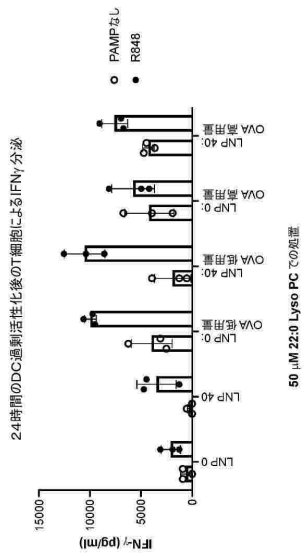


FIG. 6A

【図 6】

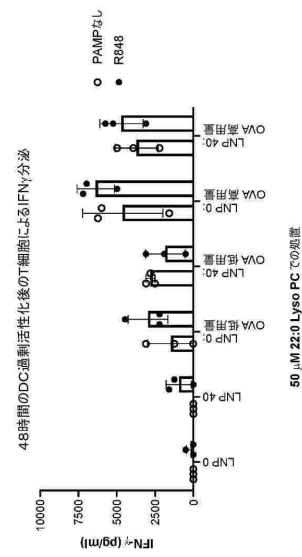


FIG. 6B

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K9/51	A61K31/685
	A61P31/00	A61P35/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORY D. SAGO ET AL: "High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 115, no. 42, October 2018 (2018-10), pages E9944-E9952, XP055538045, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1811276115 page E9947, right-hand column, paragraph 2 - page E9948, left-hand column, paragraph 1	1, 6, 8, 10, 11, 17, 35-42, 58-62
A	EP 2 974 715 A1 (ARIBIO INC [KR]) 20 January 2016 (2016-01-20) page 7; examples 1,2 claims 1-12	1-62
----- -/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 May 2023		09/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nyeki, Agnes

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062063

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERRIN-COCON L ET AL: "Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 24, no. 9, 27 February 2006 (2006-02-27), pages 1254-1263, XP028011249, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.09.036 [retrieved on 2006-02-27] the whole document -----	1-62
A	MALIK VAISHALI ET AL: "TLR7/8 Agonist and SHP2 Inhibitor Loaded Nanoparticle Enhances Macrophage Immunotherapy Efficacy", ADVANCED THERAPEUTICS, vol. 4, no. 8, 22 July 2021 (2021-07-22), page 2100086, XP093049837, ISSN: 2366-3987, DOI: 10.1002/adtp.202100086 the whole document figure 4 -----	1-62
A	CN 109 692 326 A (UNIV HUAZHONG SCIENCE TECH ET AL.) 30 April 2019 (2019-04-30) the whole document claims 1-9 -----	1-62
A	MIAO LEI ET AL: "mRNA vaccine for cancer immunotherapy", MOLECULAR CANCER, vol. 20, no. 1, 25 February 2021 (2021-02-25), XP055960280, DOI: 10.1186/s12943-021-01335-5 the whole document -----	1-62
X,P	WO 2022/221827 A2 (CORNER THERAPEUTICS INC [US]) 20 October 2022 (2022-10-20) the whole document -----	4-16, 22-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/US2023/062063	
Information on patent family members					
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 2974715	A1	20-01-2016	CN	105246487 A	13-01-2016
			EP	2974715 A1	20-01-2016
			ES	2690393 T3	20-11-2018
			JP	6259474 B2	10-01-2018
			JP	2016518313 A	23-06-2016
			KR	20140112622 A	24-09-2014
			US	2016022711 A1	28-01-2016
			WO	2014142517 A1	18-09-2014

CN 109692326	A	30-04-2019	NONE		

WO 2022221827	A2	20-10-2022	NONE		

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 31/4745(2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/002(2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 K 35/15 (2025.01)	A 6 1 K 39/00	K
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 35/15	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
	A 6 1 P 31/04	
	A 6 1 P 43/00	1 2 1

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コーンフォース, アンドリュウ エヌ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ゴセリン, エミリー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA65 AA95 CC06 CC07 CC26 CC27 CC31 CC32 CC35
CC47 DD41 DD49H DD50H DD59H DD63H DD67 DD70H EE23H FF21 FF63
4C084 AA17 AA19 NA03 NA05 NA13 ZB09 ZB21 ZB26 ZB31 ZB33
ZB35 ZC75
4C085 AA03 BA02 BA07 BA51 BA99 CC07 CC08 CC21 DD62 EE01
EE03
4C086 AA01 AA02 CB05 EA16 MA03 MA05 NA03 NA05 NA13 ZB09
ZB21 ZB26 ZB31 ZB33 ZB35 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 DA31 NA03 NA05 NA13 ZB09 ZB21
ZB26 ZB31 ZB33 ZB35 ZC75