

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7181880号  
(P7181880)

(45)発行日 令和4年12月1日(2022.12.1)

(24)登録日 令和4年11月22日(2022.11.22)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127

請求項の数 38 (全61頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-540384(P2019-540384)  
 (86)(22)出願日 平成30年1月26日(2018.1.26)  
 (65)公表番号 特表2020-505403(P2020-505403  
 A)  
 (43)公表日 令和2年2月20日(2020.2.20)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/015601  
 (87)国際公開番号 WO2018/140826  
 (87)国際公開日 平成30年8月2日(2018.8.2)  
 審査請求日 令和3年1月26日(2021.1.26)  
 (31)優先権主張番号 62/451,575  
 (32)優先日 平成29年1月27日(2017.1.27)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 515104741  
 ザ・メソジスト・ホスピタル  
 アメリカ合衆国テキサス州 77030 ,  
 ヒューストン , ファニン・ストリート  
 6565 , エムエス - ディー 200  
 (74)代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74)代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74)代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74)代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74)代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫療法のためのコア / シェル構造プラットホーム

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗原をコードするmRNA分子の集団を含む組成物であって、mRNA分子の該集団が少なくともポリマーまたはタンパク質を含む複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子の中に含まれ、該複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子がそれ自体、生体適合性脂質二重層シェルにカプセル化されており、

該生体適合性脂質二重層シェルが、

(a) 約45%～約55%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EDOPC)、

(b) 約55%～約45%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、および

(c) 約1%～約2%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG)を含む、組成物。

## 【請求項 2】

前記生体適合性脂質二重層シェルが、1または複数の哺乳動物の抗原提示細胞による前記複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子のマクロピノサイトーシスを促進する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記生体適合性脂質二重層シェルの中にカプセル化された、CpG、ポリ(I:C)、

10

20

アラム、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアジュバントをさらに含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

I L - 1 2 p 7 0 タンパク質、F L T 3 リガンド、およびインドールアミン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ ( I D O - 1 ) 阻害剤からなる群より選択される免疫調節化合物をさらに含み、該免疫調節化合物は、前記生体適合性脂質二重層シェルの間の空間の中にカプセル化されており、該インドールアミン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ ( I D O - 1 ) 阻害剤が、G D C - 0 9 1 9、I N C B 2 4 3 6 0、またはそれらの組合せである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記ポリマーまたはタンパク質が、プロタミン、ポリエチレンイミン、ポリ - ( B - アミノエステル )、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗原が哺乳動物の細胞に特異的である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

m R N A 分子の前記集団が、少なくとも 1 つのがんもしくは腫瘍特異的タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド、またはその抗原性断片をコードする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

m R N A 分子の前記集団が、H E R 2 p 6 6、H E R 2 E 7 5、H E R 2 Y V M A、T R P 2、p 6 6、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのヒト腫瘍特異的ポリペプチドまたはペプチドをコードする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

好適な哺乳動物の細胞に導入されたときに I 型インターフェロン ( I F N - I ) の発現を増加させるように、好ましくは I F N - 4、I F N - 5、またはそれらの組合せの発現を増加させるように、適合され構成された、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

ヒト樹状細胞、マクロファージ細胞、B 細胞、がん細胞、またはそれらの組合せを含む哺乳動物の抗原提示細胞の集団に導入されたときに、I F N - I の発現を増加させる、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

免疫調節剤、抗新生物剤、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、神経活性薬剤、抗炎症剤、抗脂血症剤、ホルモン、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、抗感染症剤、タンパク質、ペプチド、抗体、抗原結合性断片、酵素、R N A、D N A、s i R N A、m R N A、リボザイム、ホルモン、コファクター、ステロイド、アンチセンス分子、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される治療剤をさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

前記治療剤が、シクロホスファミド、ドキソルビシン、5 - フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセル、トラスツズマブ、メトトレキセート、エピルビシン、シスプラチニン、カルボプラチニン、ビノレルビン、カペシタビン、ゲムシタビン、ミトキサントロン、イサベピロン、エリブリソマブ、ラパチニブ、カルムスチニン、窒素マスターード、硫黄マスターード、四硝酸プラチニン、ビンプラスチニン、エトポシド、カンプトテシン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

抗原ポリペプチド、抗原性融合ポリペプチド、抗原性ペプチド、またはその断片をさらに含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

メソ多孔質ケイ素粒子、ナノ粒子、ミクロ粒子、またはそれらの任意の組合せの集団の中に含まれた、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 15】

1 または複数の界面活性剤、リポソーム、ニオソーム、エトソーム、トランスフェロソーム、リン脂質、スフィンゴソーム、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

1 または複数の薬学的に許容される担体、緩衝剤、希釈剤、ビヒクル、または賦形剤をさらに含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 17】

哺乳動物への全身投与のため、好ましくはヒトへの皮内または静脈内投与のために製剤化された、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 18】

がん細胞、腫瘍細胞、マクロファージ細胞、B 細胞、樹状細胞、またはそれらの任意の組合せを含む哺乳動物の抗原提示細胞の単離された集団の中に含まれた、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物および該組成物の投与を必要とするヒトへの該組成物の投与のための少なくともセットの指示を含む治療用キットの一部として適合され構成された、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 20】

哺乳動物のがんの 1 または複数の症状の予防、治療、または改善における使用のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 21】

ヒトのがんの 1 または複数の症状の治療または改善における使用のための、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 22】

ヒトの転移がんの 1 または複数の症状の治療または改善における使用のための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 23】

前記ポリマーまたはタンパク質は正に荷電している、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 24】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の組成物を含む、哺乳動物細胞の単離された集団。

【請求項 25】

前記哺乳動物細胞は、抗原提示細胞、好ましくは、ヒト樹状細胞、マクロファージ、B 細胞、またはそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の哺乳動物細胞の単離された集団。

【請求項 26】

哺乳動物対象における疾患、障害、または機能不全の少なくとも 1 つの症状を処置または改善するための医薬の製造における、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

40

【請求項 27】

前記哺乳動物対象がヒト、非ヒト靈長類、伴侶動物、外来種、家畜、または原料動物である、請求項 2 6 に記載の使用。

【請求項 28】

1 ) 請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物、および 2 ) 哺乳動物における疾患、障害、異常な状態、または機能不全の 1 または複数の症状の防止、処置、または改善のためのレジメンの一部としての、該組成物の投与を必要とする該哺乳動物への該組成物の投与のための指示、を含むキット。

50

**【請求項 2 9】**

疾患、障害、異常な状態、または機能不全の 1 または複数の症状の処置または改善を必要とする哺乳動物における疾患、障害、異常な状態、または機能不全の 1 または複数の症状を処置または改善するための、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物であつて、前記組成物が、該哺乳動物における疾患、障害、異常な状態、または機能不全の 1 または複数の症状を処置または改善するのに十分な時間投与されることを特徴とする、組成物。

**【請求項 3 0】**

前記疾患が、難治性、転移、再発、または治療抵抗性がんとして診断されまたは同定されている、請求項 2 9 に記載の組成物。

10

**【請求項 3 1】**

前記がんが、転移乳がん、転移肺がん、または転移黒色腫である、請求項 3 0 に記載の組成物。

**【請求項 3 2】**

前記哺乳動物がヒトである、請求項 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 3 3】**

前記組成物が、前記哺乳動物に放射線または追加の化学療法剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 2 9 から 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 3 4】**

前記組成物が、単回投与で、あるいは 1 日もしくはそれより長い日数からの期間にわたる、1 週もしくはそれより長い週数の期間にわたる、または 1 か月もしくはそれより長い月数の期間にわたる、またはそれより長い期間にわたる一連の複数回投与で、前記哺乳動物に全身投与される、請求項 2 9 から 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

20

**【請求項 3 5】**

前記組成物が、化学療法剤、または治療用がんワクチンをさらに含む、請求項 2 9 から 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 3 6】**

抗原をコードする m R N A の投与を必要とする哺乳動物対象の体内的細胞の集団に、抗原をコードする m R N A を投与するための、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

30

**【請求項 3 7】**

哺乳動物対象における疾患、障害、または機能不全の少なくとも 1 つの症状を処置または改善するための、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 3 8】**

前記哺乳動物対象がヒト、非ヒト靈長類、伴侶動物、外来種、家畜、または原料動物である、請求項 3 7 に記載の組成物。

**【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

40

本出願は、P C T 国際特許出願 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 5 6 0 1 (係属中; 同時に出願; A t t y . D k t 3 7 1 8 2 . 2 1 5 W O 0 1 ) および、2 0 1 7 年 1 月 2 7 に出願された米国仮特許出願 6 2 / 4 5 1 , 5 7 5 (係属中; A t t y . D k t 3 7 1 8 2 . 2 1 5 P V 0 1 ) に対する優先権を主張し、その内容は、その全体が本明細書に、明白な参照により具体的に援用される。

**【0 0 0 2】**

連邦支援の研究または開発に関する声明

本発明は、アメリカ国防総省により与えられた W 8 1 X W H - 1 2 - 1 - 0 4 1 4 の助成金ならびに、アメリカ国立衛生研究所により与えられた 1 R 0 1 - C A 1 9 3 8 8 0 - 0 1 A 1 および U 4 3 - C A 2 1 0 1 8 1 の助成金の下、政府支援によりなされた。米国

50

政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

本開示は、分子生物学、腫瘍学、および特にmRNAワクチンのために最適化された多成分組成物に関する。これらの組成物を含む製剤および医薬、ならびにmRNAに基づくワクチンの哺乳動物細胞への効率的な送達のための方法、および罹患した哺乳動物における1または複数のがんまたは腫瘍の症状を処置し、および/または改善するための方法も開示される。

【背景技術】

【0004】

治療用ワクチン

10

ワクチンは通常、身体の免疫系によって認識され得る抗原および身体の免疫反応を増強し得る1または複数のアジュバントから構成されている。しかし治療用がんワクチンは感染性疾患を防止するために使用される予防用ワクチンとは全く異なっている。それは、ワクチンは病原体と戦う抗体を産生する代わりに、がん細胞を殺滅する免疫細胞を生成するのに十分に強力でなければならないからである。治療用ワクチンは、がんおよび感染性疾患を含む複数の種類の生命を脅かす疾患の処置において大きな潜在性を有している。がんワクチン接種の成功を決定する重要な課題は、選択した抗原に対する抗腫瘍応答の強力な誘導である。タンパク質ペプチドおよびDNAプラスミドの両方は、従来よりワクチン開発のための抗原として役立ってきた(Meleröら、2014年; Schwartzen trüberら、2011年; Kantomffら、2010年)。タンパク質およびペプチドは調製が比較的容易で、大スケールで産生することができるが、抗原ペプチドの選択は患者の独特の主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質の型に依存し、したがって個別の患者に適合するようにカスタム化する必要がある。一方、DNAワクチンは効力が低いという欠点があり、制御できないゲノム組込みのリスクがある(McNamaraら、2015年)。

20

【0005】

mRNAに基づくがんワクチン

【0006】

mRNAは最近、治療用がんワクチンの理想的な抗原源として現れた(SuillengerおよびNair、2016年)。mRNA分子は複数の抗原をコードするように調整でき、抗原提示細胞におけるToll様受容体(TLR)シグナル伝達をトリガーすることによってアジュバントとして作用する(Heilら、2004年; Dieboldら、2004年)。さらに、mRNA媒介遺伝子移入は、核移行および転写が要求されないので非分裂細胞において起こり得る一方、プラスミドDNA媒介遺伝子移入は、分裂細胞において最も効果的である(McNamaraら、2015年; KallenおよびThess、2014年)。

30

【0007】

負電荷のmRNA分子は抗原提示細胞に直接進入できないので、mRNAに基づくワクチンは通常、mRNA分子をエレクトロポレーションによって患者由来の樹状細胞(DC)にトランスフェクトすることによって調製される(Van Tendelooら、2001年)。次いでDCワクチンは腫瘍抗原の合成、プロセシングおよび提示のために患者に再導入して戻される。いくつかのDCワクチンが臨床試験の異なった段階に達している(Wilgenhöfら、2013年)。しかし、この手順では既製の治療用ワクチンの大量生産は可能でない。

40

【0008】

mRNAワクチンを調製する代替の手法は、mRNA分子をナノ粒子内にパッケージ化し、これを体内に直接接種して、そこでワクチンを抗原提示細胞に取り込ませることである。この手法は、抗原提示細胞の高いファゴサイトーシス能力を利用している。プロタミン濃縮mRNAワクチンはこのグループにおける重要な部分を占め、そのいくつかは前臨床研究および臨床試験の異なった段階にある(Weideら、2009年)。mRNAを

50

、プロタミンを用いてパッケージ化することは、細胞によるワクチン粒子の取り込みを可能にするだけでなく、宿主細胞におけるM y D 8 8 依存性 T L R - 7 / 8 シグナル伝達の刺激を促進する (S c h e e l ら、2 0 0 5 年)。しかし、裸のm R N A の一部が体液に曝され、血漿および組織の R N a s e による攻撃を受けやすいので、m R N A の分解は潜在的な懸念である。さらに、m R N A 分子の非抗原提示細胞への曝露は、体内における有害反応のトリガーとなる恐れがある。

【 0 0 0 9 】

従来技術の欠点

【 0 0 1 0 】

産業界および学界では長期にわたって効果的な治療用がんワクチンの開発に注力してきたが、今のところ成功にはほとんど至っていない。前臨床および臨床研究で試験されている治療用がんワクチンの1つの型がm R N A ワクチンであり、これはコア構造 (約 2 0 ナノメートル ~ 数百ナノメートルの範囲) に濃縮されたm R N A 分子で構成されている。m R N A ワクチンがいったん抗原提示細胞に取り込まれると、これらの細胞の中でm R N A が放出され、次いでコードされた抗原 (複数可) を產生するための鋳型として使用される。そのようなワクチンの例が、C u r a V a c m R N A ワクチンである。

10

【 0 0 1 1 】

そのようなワクチンにおける主な問題は、1) m R N A 分子が体液に曝され、したがって組織、細胞、および / または血漿の酵素によって分解されやすいこと、2) 「裸の」m R N A 分子が全ての種類の免疫細胞と相互作用し、これが望ましくない副作用 (例えば、高レベルのサイトカインの分泌) に繋がる可能性があること、および 3) そのようなm R N A は抗原提示細胞によってあまり効果的には内在化されないことである。

20

【 0 0 1 2 】

大規模のがんゲノムシーケンシングの努力および免疫原性腫瘍変異の予測における技術の進歩の結果として、腫瘍関連ネオ抗原が常に同定されている (例えば、S c h u m a c h e r および S c h r e i b e r 、2 0 1 5 年; S h u k l a ら、2 0 1 5 年; Y a d a v ら、2 0 1 4 年を参照)。このリソースは新規で改善されたがんワクチンの開発のために前例のない機会を提供してきた。残念ながら、がんワクチンを可能にする技術の開発は遅れている。

30

【 0 0 1 3 】

しかし、本明細書に開示したような免疫療法は、がん治療法の新たな手段となる。これらの治療法は特定のがん細胞の独特的な遺伝的特徴に基づいており、したがって従来の標準的治療の化学療法薬による不必要的攻撃から身体を救うことができる。本明細書に開示したm R N A に基づくワクチンは、同じ構築物の中に複数のネオ抗原を含む柔軟性を有しており、抗原ペプチド (複数可) の選択 (複数可) は個別の患者の独特的な変異スペクトルに基づいて調整でき、精密なまたは「個別化された」医療を可能にする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

本明細書に記載した生体適合性のシェル / コア多成分ワクチン送達プラットフォームは、一般的な意味で、抗がん免疫を刺激するための方法において抗原提示細胞 (例えば樹状細胞) へのm R N A の効果的な送達およびそれによる効率的な取り込みのための組成物を提供することによって、当技術分野におけるこれらのおよびその他の固有の限界を克服することにおいて重要な進歩となる。

40

【 0 0 1 5 】

全体的かつ一般的な意味で、開示したコア / シェル組成物は、「コア」構造内にパッケージされ、外側の親水性脂質二重層を含む「シェル」とともにカプセル化された (例えば、1 または複数のがんまたは腫瘍特異性抗原をコードするm R N A を含む) 核酸分子を、(例えば、限定するものではないが樹状細胞、マクロファージ、および B 細胞等の 1 または複数の抗原提示細胞を含む) 1 または複数の選択された哺乳動物細胞に効率的に送達す

50

ることができる。内側の疎水性コアをカプセル化する親油性シェルの存在により、核酸は組織酵素による分解または他の免疫細胞との相互作用から保護される。さらに、親油性シェルによって抗原提示細胞による組成物の内在化も増大し、従来のmRNAに基づく治療用ワクチンと比べて、より強力な抗腫瘍免疫が刺激される。

【0016】

既存の技術に対する重要な進歩として、開示したコア / シェル多成分ワクチン送達システムは、既存のmRNAに基づくワクチンを構成する従来の単一成分の「コア + 核酸のみ」の構造より優れた、強固な抗腫瘍免疫を刺激することによるmRNAに基づくがんワクチン開発における現在の「ボトルネック」に対する代替選択肢をもつことを可能にする。これらの多成分の親水性 / 疎水性シェル / コアにより、樹状細胞の成熟の刺激において、したがって抗原プロセシングおよび提示において、従来のmRNAワクチンよりも有意に強力なmRNAワクチンの調製が促進される。

【0017】

特定の実施形態では、本開示は、インターフェロン - 、インターフェロン - 、およびインターロイキン - 12 の刺激において従来のmRNAコアワクチンよりも有意に強力なコア - シェル構造化mRNAワクチンを提供する。そのような多成分の、mRNAに基づく、腫瘍抗原をコードする治療用ワクチンは、哺乳動物における1または複数の疾患の処置のため、ならびに特に哺乳動物のがんの1または複数の症状の処置および / または改善のための医薬の調製において特定の用途を見出す。

【0018】

少なくとも第1の腫瘍抗原をコードするmRNA分子の集団を含む治療用がんワクチンを含む組成物であって、集団が少なくとも第1の正電荷ポリマーを含む複数のポリプレックスコア粒子内に含まれ、さらに複数のポリプレックスコア粒子がそれ自体、第1の生体適合性脂質二重層シェルにカプセル化されている、組成物。

【0019】

好ましくは、第1の生体適合性脂質二重層シェルは、限定するものではないがヒト樹状細胞、ヒトマクロファージ、およびヒトB細胞を含む1または複数の哺乳動物の抗原提示細胞による複数のポリプレックスコア粒子のマクロビノサイトーシスを促進する。

【0020】

そのような組成物は、生体適合性脂質二重層の中にカプセル化された、mRNAコアの中に含まれた、またはコア粒子とそれらを取り囲む / 包含するエンベロープ親水性リン脂質二重層との間の空間の中に含まれた、CpG、ポリ(I : C)、アラム(alum)、環状GMP - AMP(cGAMP)、リポ多糖(LPS)、モノホスホリル脂質A(MPLA)、またはそれらの任意の組合せ等の1または複数のアジュバントを必要に応じてさらに含んでもよい。

【0021】

ある特定の実施形態では、コア粒子を調製するために使用される正電荷作用物質(positively-charged agent)は、プロタミン、ポリエチレンイミン、ポリ-(B-アミノエステル)、ポリ-アルギニン、ポリ-リシン、およびそれらの組合せの1または複数を含む。

【0022】

同様に、親水性シェル成分を調製するために使用される生体適合性リン脂質は、好ましくは、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EDOPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG)、1,2-ジパルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジパルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)、O-エチルホスファチジルコリン(EDPPC)、コレステロール、およびそれらの組合せの1または複数を含む。

10

20

30

40

50

## 【0023】

ある特定の実施形態では、生体適合性リン脂質二重層は、好ましくは、  
 (a) 約30%～約70%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(「EDOPC」)、  
 (b) 約70%～約30%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(「DOP-E」)、または  
 (c) 約0.5～約5%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](「DSPE-PEG」)

を含む。

10

## 【0024】

あるいは、生体適合性脂質二重層は、好ましくは、  
 (a) 約45%～約55%のEDOPC、  
 (b) 約55%～約45%のDOP-E、および  
 (c) 約1%～約2%のDSPE-PEG

を、含んでよい。

20

本発明の実施において、本明細書に開示した組成物は、好ましくは、1または複数の哺乳動物のがんまたは腫瘍細胞に特異的な少なくとも1つの抗原をコードする、mRNA等の核酸分子の集団を含む。例示的ながん細胞特異的抗原には、これらに限定されないが、乳がん特異的HER2抗原E75およびp66、黒色腫特異的抗原TRP2、ならびに乳がんおよび肺がんにおけるエクソン20にYVMA挿入を有するHER2[HER2YVMA]等の腫瘍変異抗原[ネオ抗原]、ならびにがんゲノムにおける変異の結果として発生したもの等の腫瘍関連抗原が含まれる。例示的ながんおよび腫瘍特異的抗原には、これらに限定されないが、HER2E75、HER2p66、HER2YVMA、およびTRP2が含まれる。

## 【0025】

本明細書に開示した組成物は、好ましくは、好適な哺乳動物細胞に導入された場合に、I型インターフェロン(IFN-I)の発現のレベルを増加させるのに適しており、好ましくは、IFN-4、IFN-、およびそれらの下流サイトカイン、例えばCCL-5等の1または複数の発現を増加させるのに適している。

30

## 【0026】

ある特定の実施形態では、開示した組成物は1または複数の種類の哺乳動物細胞の集団への導入に適している。そのような細胞には、これらに限定されないが、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、がん細胞、またはそれらの組合せが含まれる。

## 【0027】

本明細書に開示した組成物は、例えば、限定するものではないが、免疫調節剤、抗新生物剤、神経活性薬剤、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、抗炎症剤、抗脂血症剤、ホルモン、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、抗感染症剤(anti infective agent)、タンパク質、ペプチド、抗体、抗原結合性断片、酵素、RNA、DNA、siRNA、mRNA、リボザイム、ホルモン、コファクター、ステロイド、アンチセンス分子、またはそれらの任意の組合せ等の薬剤を含む、1または複数の追加の治療剤を必要に応じてさらに含んでよい。好ましい実施形態では、免疫調節剤はIL-12p70、タンパク質、FLT3リガンド[FLT3L]、およびGDC-0919またはINC24360等のインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ[IDO-1]の小分子阻害剤からなる群から選択される化合物である。

40

## 【0028】

本明細書に開示した組成物は、例えば、限定するものではないが、シクロホスファミド、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセル、トラスツズマブ、メトトレキセート、エピルビシン、カルボプラチニン、ビノレルビン、カペシタビン

## 【0029】

ある特定の実施形態では、治療剤は(これらに限定されないが)、シクロホスファミド、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセル、トラスツズマブ、メトトレキセート、エピルビシン、カルボプラチニン、ビノレルビン、カペシタビン

50

、ゲムシタビン、ミトキサントロン、イサベピロン、エリブリン、ラバチニブ、カルムスチン、窒素マスター、硫黄マスター、四硝酸プラチン (platin tetratin  
nitrate) (例えばシスプラチン)、ビンプラスチン、エトポシド、カンプトテシン、またはそれらの任意の組合せ等の 1 または複数の化合物を含んでよい。

【0030】

他の実施形態では、組成物は、例えば、細胞によって別々に (即ち、異なる m R N A 分子から)、またはともに (即ち、1 つの m R N A 分子から) 產生される複数抗原ペプチドを含む、1 または複数の抗原、抗原性ポリペプチド、またはその抗原性ペプチド断片を必要に応じてさらに含んでよい。そのような抗原は可溶性であってよく、ここで、抗原はコアの外部および外部脂質二重層の内側表面で画定される内腔もしくは容積の中に組み込まれ得るか、または、不溶性抗原の場合には、抗原はコア構造の中におよび / もしくは脂質二重層それ自体の中に組み込まれ得る。

10

【0031】

可溶性抗原の例には、これらに限定されないが、p 6 6 H E R 2 抗原ペプチド (H E R 2 p 6 6)、およびそのホモログまたは抗原性断片が含まれる。

【0032】

わずかに可溶性の抗原の例には、これらに限定されないが、E 7 5 H E R 2 抗原ペプチド (H E R 2 E 7 5)、およびそのホモログまたは抗原性断片が含まれる。

【0033】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示したがんワクチン送達組成物は、1 もしくは複数の薬学的に許容される担体、緩衝剤、希釈剤、ビヒクリ、もしくは賦形剤と混合してよく、または 1 もしくは複数の界面活性剤、リポソーム、ニオソーム、エトソーム、トランスフェロソーム、リン脂質、スフィンゴソーム、エキソソーム、もしくは細胞それ自体によって產生される他の種類のベシクルと混合してもよい。

20

【0034】

そのような組成物は、好ましくは哺乳動物への全身投与のため、好ましくは皮内もしくは静脈内投与、筋肉内、腹腔内、結節内、もしくは眼内投与のため、または、あるいはヒトへの皮膚パッチの形態で、製剤化され、限定するものではないがヒト樹状細胞、マクロファージ、および B 細胞を含む 1 または複数の抗原提示細胞との接触およびこれらによる取り込みのために特に製剤化される。

30

【0035】

ある特定の実施形態では、開示した m R N A に基づくワクチン組成物は、組成物および組成物の投与を必要とするヒトがん患者等の哺乳動物への組成物の投与のための指示の少なくとも第 1 のセットを含む治療用キットの一部として適合され構成されてよい。そのようなキットは、限定するものではないが、感染性疾患 [ 例えば、ウエストナイルウイルスおよびシャーガスのためのワクチン ]、心血管疾患 [ 例えば、心不全を防止するための H S P 6 0 ワクチン ] 等を含む、哺乳動物におけるがん、過剰増殖性障害、もしくは他の疾患、機能不全、外傷、または異常な状態の 1 または複数の症状の防止、診断、処置または改善のためのレジメンの一部として利用することができる。

30

【0036】

本開示のさらなる態様は、がんの 1 または複数の症状の処置または改善を必要とする動物におけるがんの 1 または複数の症状を処置または改善するための方法である。全体的かつ一般的な意味で、そのような方法は一般に、動物におけるがんの 1 または複数の症状を処置または改善するのに十分な時間、有効量の本明細書に開示した m R N A に基づく治療用がんワクチン組成物の 1 または複数を動物に投与するステップを少なくとも含む。一部の実施形態では、がんは難治性、転移、再発、または治療抵抗性がんとして診断されまたは同定され得る。

40

【0037】

そのようながんの例には、これらに限定されないが、乳がん、肺がん、結腸直腸がん、胃がん、膵がん、膠芽細胞腫、頭頸部がん、白血病、リンパ腫、多発性骨髓腫、肝がん、

50

腎がん、膀胱がん、黒色腫、および罹患した哺乳動物における関連状態が含まれる。

【0038】

ある特定の実施形態では、がんは転移がん、例えば、転移乳がん、転移肺がん、転移黒色腫、または転移結腸直腸がん、胃がん、膵がん、膠芽細胞腫、頭頸部がん、肝がん、腎がん、膀胱がん、または罹患した哺乳動物における1もしくは複数の関連状態であり得る。

【0039】

そのような方法は、治療有効量の放射線または追加の化学療法剤を、単回投与で、あるいは1日もしくはそれより長い日数からの期間にわたる、1週もしくはそれより長い週数の期間にわたる、または1か月もしくはそれより長い月数の期間にわたる、またはそれより長い期間にわたる一連の複数回投与で、動物に投与するステップを必要に応じてさらに含んでよい。

10

【0040】

そのような方法は、第2の異なる化学療法剤または第2の異なる治療用がんワクチンを、処置中の罹患した哺乳動物に投与するステップを必要に応じてさらに含んでもよい。

【0041】

別の実施形態では、本開示は、活性剤、および特に1もしくは複数の抗がん抗原、またはそのような抗がん抗原をコードする1もしくは複数のmRNAを、それを必要とする哺乳動物対象の1または複数の細胞、組織、器官、または系に投与するための方法も提供する。本方法は一般に、対象の体内または体に関する1または複数の選択された組織、器官、系、または細胞に存在する細胞（例えば、樹状細胞等の抗原提示細胞）の集団にmRNAワクチンを投与するのに有効な量および時間で、本明細書に開示した組成物の1または複数を、それを必要とする哺乳動物対象に提供するステップを含む。特に好ましい実施形態では、対象はヒトであり、組成物は、それ自体、外側の脂質二重層の中に含まれるポリプレックスコア粒子の集団の中に含まれた、mRNA抗原をコードする成分を含む。

20

【0042】

開示した組成物は、種々のin vitro、ex vivo、およびin vivo処置レジメンにおいて特定の有用性を見出し、これらは、限定するものではないが、1または複数のヒトのがん、過剰増殖性障害、感染性疾患、心疾患等の症状の処置または改善のためを含む種々の治療適応における使用のために、単独で、または代わりに、限定するものではないが、1もしくは複数の抗がん抗原、1もしくは複数の抗原ペプチド、1もしくは複数の診断試薬、1もしくは複数の治療試薬、1もしくは複数の細胞傷害性試薬、1もしくは複数の化学療法剤、1もしくは複数のアジュバント、1もしくは複数の免疫刺激剤、1もしくは複数の免疫調節剤、またはそれらの任意の組合せを含む1または複数の追加の薬剤と組み合わせて、製剤化することができる。

30

【0043】

本明細書に記載したように、開示したワクチンシステムは、1または複数の活性剤、例えば、例えば、1もしくは複数の予防剤、1もしくは複数の治療剤、1もしくは複数の診断剤、1もしくは複数のワクチン、1もしくは複数のイメージング剤、1もしくは複数の放射標識、1もしくは複数のアジュバント剤、1もしくは複数の化学療法剤、1もしくは複数の細胞傷害性薬剤、1もしくは複数のチェックポイント阻害薬〔例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体等〕、またはそれらの任意の組合せを、必要に応じてさらに含んでよい。

40

【0044】

関連する実施形態では、本発明は、典型的には1または複数の薬学的に許容される担体、目的の対象への組成物の投与のための1または複数のデバイス、ならびに、がん等の哺乳動物の疾患の診断または処置において組成物を使用するための1または複数の指示のセットと組み合わせて、本明細書に開示したコア／シェルに基づくmRNAワクチン送達システムの1または複数を含む治療(therapeutic)および／または治療用キットも提供する。

【0045】

50

本発明は、全体的かつ一般的な意味で、mRNA分子の集団を、哺乳動物の体内の（例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、または腫瘍細胞を含む）哺乳動物細胞の集団に効果的に送達するための組成物および方法も提供する。そのような組成物は、好ましくは、対象における1または複数の疾患または異常な状態を処置または改善するのに有効な量および時間で、哺乳動物対象に投与される。ある特定の実施形態では、対象は、例えば、1または複数のがんまたは他の過剰増殖性障害を含む1または複数の異常な細胞増殖状態を有するリスクがあり、そのように診断され、またはその疑いがある。

#### 【0046】

本明細書で注目するように、本開示の組成物は、限定するものではないが、静脈内、皮膚に（cutaneous 1 y）、皮下、あるいは対象の体内もしくは体に関する1もしくは複数の細胞または1もしくは複数の組織、器官、もしくは腫瘍への直接注射を含む、投与のための任意の1または複数の従来の方法によって、対象に投与してもよい。

10

#### 【0047】

本明細書においてさらに述べるように、ある特定の応用では、対象からex vivoで得られた細胞の集団を、本明細書に開示したワクチン組成物と接触させ、その後、続いて得られた接触させた細胞を対象の体内に再導入することが望ましいことがある。そのようなex vivo治療は、開示したmRNAワクチンをヒト樹状細胞の集団に導入し、活性成分を細胞と接触させ、次いで得られた形質転換細胞を動物の体内に再導入して戻すことにおいて有用であると特に考えられる。好ましくは、そのようなex vivo操作における使用のために抽出される樹状細胞は、処置を受けている実際の患者の樹状細胞である。

20

#### 【0048】

特定の実施形態では、本発明のmRNAワクチン組成物は、薬学的投与のため、好ましくはヒトへの投与のために製剤化されてよい。そのような組成物は、1または複数の追加の治療剤、化学療法剤、アジュバント、または第2の異なるmRNAワクチンをさらに含んでよい。

#### 【0049】

本明細書に開示したmRNAワクチンをin vitroで使用して、腫瘍抗原特異的T細胞の集団を拡大することもできる。この応用の例は、腫瘍抗原特異的T細胞の集団を患者に注入して戻す前に拡大するために、ヒト患者由来T細胞と共に培養することである。

30

#### 【0050】

さらに、開示したmRNAワクチンを使用して、T細胞操作のために腫瘍抗原特異的T細胞受容体を単離することもできる。例は、mRNAワクチンを含む樹状細胞をヒトT細胞と共に培養し、それから高い結合能力を有するT細胞を単離することである。いったんT細胞が単離されれば、そのT細胞受容体をシーケンシングによって決定し、TCR-T細胞（がん免疫療法の別のプランチ）を生成するために使用することができる。

#### 【0051】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を示すために含まれる。本発明の原理の理解を促すために、図面に示された実施形態または実施例を参照し、特定の言語を使用してそれを説明する。それにもかかわらず、それによって本発明の範囲の限定が意図されないことが理解される。記載される実施形態における任意の変更およびさらなる修正、ならびに本発明の原理の任意のさらなる応用は、本発明が関係する当業者に通常想到するはずである。本発明は、同様の参照番号が同様の要素を識別する添付の図面と併せて以下の説明を参照することにより、よりよく理解され得る。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0052】

【図1】図1A、図1B、図1C、図1D、図1E、図1F、図1G、図1H、図1I、図1J、図1K、および図1Lは、リポポリブレックスmRNAワクチンの構造および特徴付けを示す。図1Aは、本開示の一態様に従って調製されたリポポリブレックス-mRNAに基づくワクチンの概略図である。例示的なワクチンは、正電荷PbAEPolimerと

50

負電荷mRNA分子との間の静電的相互作用によって組み立てられたポリプレックス疎油性 (lipophilic) 「コア」から構成される。得られたポリプレックス-mRNAコアは、次いで、親水性の脂質二重層「シェル」にカプセル化される。図1Bは、例示的なポリプレックス-mRNA結合に関するゲル遅延アッセイを示す。試料は、遊離mRNA、10、20、30、および40 (wt. / wt.) のポリプレックス/mRNA、の順にロードされた。図1C、図1D、および図1Eは、空のリポソームシェル (図1C)、ポリプレックス/mRNAコア (wt. / wt. = 20) (図1D)、およびリポポリプレックス/mRNAコア・シェル構造 (図1E) の透過型電子顕微鏡法 (TEM) 画像を示す。図1F、図1G、図1H、図1I、図1J、図1Kは、mRNAパッケージ化粒子で処置したDC2.4細胞でのeGFP発現を示す。DC2.4細胞をPBS対照 (図1F)、PbAe/eGFP mRNAコア (図1G)、EDOPC/DOPCパッケージ化PbAe/eGFP mRNA (図1H)、DOTAP/Cholパッケージ化PbAe/eGFP mRNA (図1I)、CHEMS/DOPE/R8パッケージ化PbAe/eGFP mRNA (図1J)、またはプロタミン/eGFP mRNAコア (図1K) で処置し、24時間後に蛍光顕微鏡法でeGFP発現を検出した。図1Lは、様々な粒子タイプで処置した場合のDC2.4の生存率を示す。

#### 【0053】

【図2】図2は、哺乳動物樹状細胞の集団による例示的なリポポリプレックス/mRNAコアシェルワクチンの優先的な取り込みを示す。細胞選別の前に24時間、リポポリプレックス/eGFP mRNAとともにインキュベートされた後のDC2.4、MDA-MB-231およびmDMEC細胞のGFP陽性細胞について、フローサイトメトリー分析が実施され；生物発光画像を使用して、LPP/Lucのs.c.注射48時間後の、マウスにおいてルシフェラーゼ発現を検出した。左側には対照マウスがあり；右側にはLPP/Luc処置マウスがある。

#### 【0054】

【図3】図3A、図3B、図3C、図3D、図3E、図3F、図3G、および図3Hは細胞進入のメカニズムを示す。図3A～図3Fは、モック対照 (図3A)、アミロリド (図3B)、クロルプロマジン (図3C)、クロロキン (図3D)、ゲニステイン (図3E)、およびビモジド (図3F) の存在下でLPP/0.5 μg FAM標識eGFP mRNAで処置したDC2.4細胞の画像を表す。図3Gは、FAM陽性細胞のImageJ分析を示し、一方で図3Hは、DC2.4細胞によるLPP/FAM標識eGFP mRNAの時間依存的な取り込みを示す。エラーバーは、三重の実験の平均±標準偏差を表す。

#### 【0055】

【図4】図4A、図4B、および図4Cは、LPP/mRNAワクチンによるDC刺激を示す。図4Aは、LPP/OVA (OVA mRNAを用いてパッケージ化されたEDOPC/DOPC/DSPE-PEG) および対照で処置したBMDCにおけるサイトカイン分泌を示し；図4Bは、TLR7/8阻害剤ODN2087によるIL-12およびIFN-発現の阻害を示し；図4CはDC刺激でのLPP/OVA mRNAとLPP/OVAタンパク質との間の比較であり；示されるものはDC成熟マーカーのフローサイトメトリー分析である。エラーバーは、三重の実験の平均±標準偏差を表す。

#### 【0056】

【図5】図5A、図5B、および図5Cは、LPP/mRNAワクチンによるDC抗原交差提示の刺激を示す。図5Aは、H-2kb-OVA257-264提示のフローサイトメトリー分析である。図5Bは、処置後のBMDCとの共インキュベーション後のOVA特異的CD4+およびCD8+T細胞による時間依存的なIL-2分泌を示す。B3Z:OVA特異的CD8+T細胞；DOBW:OVA特異的CD4+T細胞。図5Cは、処置後のDC2.4細胞との共インキュベーション後のOVA特異的CD4+およびCD8+T細胞による時間依存的なIL-2分泌を示し；示されるものは、LPP/OVA mRNAまたはLPP/OVAタンパク質で前処置したDC2.4細胞との共インキュベーション後のOVA特異的CD8T細胞によるIL-2分泌の比較である。

10

20

30

40

50

## 【0057】

【図6】図6Aおよび図6Bは、*in vitro*および*in vivo*でのLPP/OVAからの抗腫瘍活性を示す。図6Aは、s.c.によるLPP/OVA mRNAワクチン接種の3、6、および24時間後の血清IFN- $\gamma$ レベルを示し；図6Bは、LPP/OVA mRNAによるB16-OVA黒色腫肺転移の阻害を示す。処置スケジュール（上のパネル）と処置後のマウスの肺の代表的な画像（中央のパネル）が示され、肺の腫瘍結節の平均数がまとめられている（下のパネル）。データは平均±SEMで表される。各群に5匹のマウスがいる。

## 【0058】

【図7】図7は、mRNA分子が増加する量のポリマー（PbAE）と混合され、試料がアガロースゲルでの電気泳動により分離されたことを示す。非結合のmRNA分子は底部に移動し、結合したmRNA分子はポリマーとともに上部に残った。レーン#1：遊離mRNA、レーン2～5：増加する量のポリマーを含むmRNA分子。

10

## 【0059】

【図8】図8Aおよび図8Bは、それぞれ、非標的化および標的化のmRNAワクチンナノ粒子のサイズ分析を示す。

## 【0060】

【図9】図9A、図9B、および図9Cは、それぞれ、本開示の一態様による、例示的な空の脂質シェル（左）、mRNAコア（中央）、およびmRNAワクチンナノ粒子全体の透過型電子顕微鏡（TEM）画像を示す。

20

## 【0061】

【図10】図10A、図10B、図10C、図10D、図10E、および図10Fは、DC2.4樹状細胞を、mRNAコア形態（PbAE/mRNAコアまたはプロタミン/mRNAコア）の、または脂質シェル中にパッケージ化した（本発明者らのmRNAワクチン、DOTAP/コレステロールカプセル化mRNA、またはCHEMS/DOPE/R8カプセル化mRNA）、同量のEGFP（緑色蛍光タンパク質）mRNAと共にインキュベートした。EGFP発現は24時間後に蛍光顕微鏡でモニターされた。

## 【0062】

【図11】図11は、DC2.4細胞を裸のmRNAコアまたはパッケージ化mRNAとインキュベートし、細胞生存率を24時間後に決定したことを示す。

30

## 【0063】

【図12】図12Aおよび図12Bは、Cy5標識mRNAが非標的化ワクチンまたは標的化ワクチン中にパッケージ化されたことを示す。次いで、蛍光ワクチン粒子をDC2.4細胞とともに4時間インキュベートした。蛍光mRNAワクチン粒子を内在化した細胞のパーセンテージ（図12A）および全蛍光を有する細胞（図12B）を測定した。

## 【0064】

【図13】図13は、mRNAワクチンによる樹状細胞成熟の刺激を示す。骨髄由来樹状細胞（BMDC）をmRNAワクチンまたはワクチンの個々の成分で処置し、I型インターフェロンサイトカインインターフェロン- $\alpha$ （IFN- $\alpha$ ）および樹状細胞成熟マーカーIL-12p70の分泌を酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）で測定した。

40

## 【0065】

【図14】図14は、TLR7/8阻害剤ODN2095によるmRNAワクチン媒介樹状細胞刺激の阻害を示す。BMDCは、オボアルブミンタンパク質（OVA）、TLR7/8阻害剤ODN2095、OVAを発現するmRNAワクチン、またはmRNAワクチンとODN2095の組合せで処置し、I型インターフェロンサイトカインインターフェロン- $\alpha$ （IFN- $\alpha$ ）および樹状細胞成熟マーカーIL-12p70の分泌がELISAによって測定された。

## 【0066】

【図15】図15は、PBS陰性対照、プロタミン/mRNAコア、またはOVA特異的mRNAワクチン（OVAタンパク質を発現するmRNAワクチン）で処置したBMDC

50

を示し；次いで、フローサイトメトリーを適用して、MHCⅠ-OVAエピトープも提示したCD11c陽性樹状細胞を検出した。

【0067】

【図16】図16Aは、OVA特異的CD4 T細胞(DOBW)およびCD8 T細胞(B3Z)とともに24時間または48時間共インキュベートしたOVA mRNAワクチンで処置したBMDC細胞を示し、図16Bは、それで処置したDC2.4細胞を示す。次いで、T細胞によるIL-2発現を、ELISAで検出および定量した。

【0068】

【図17】図17は、OVA mRNAワクチンがIDO1阻害剤INCBO24360とともに共パッケージ化され、BMDCの処置に適用されたことを示す。次いで、BMDCをOVA特異的T細胞と共にインキュベートし、IL-2分泌をELISAで測定した。

10

【0069】

【図18】図18Aおよび図18Bは、C57BL6マウスをPBS、OVAタンパク質、またはOVA mRNAワクチンで3回処置し、脾臓およびリンパ節からの細胞（活性化T細胞を含む）を単離し、T細胞刺激状態および腫瘍細胞殺滅活性の試験に適用したことを示す。図18Aでは、単離された細胞がOTIおよびOTIIのOVA特異的抗原ペプチドでチャレンジされた（即ち、共インキュベートされた）後のインターフェロン-分泌。図18Bでは、単離されたT細胞とB16-OVA腫瘍細胞の共インキュベーション、および細胞生存率を測定した。

【0070】

【図19】図19は、B16-OVA腫瘍肺転移を有するC57BL6マウスをOVA mRNAワクチンで3回処置した（3、7、および10日目）ことを示す。18日目にマウスを安樂死させ、肺の腫瘍結節を数えた。上のタイムラインは処置スケジュールを示す。PBS対照群とOVA mRNAワクチン処置群の代表的な肺が画像の中央に示され；比較のために、肺の腫瘍結節の数に基づく定量が示されている。

20

【0071】

【図20】本開示の特定の一態様によるワクチン構造の例示的な概略図を示す。その中で、（1）中央のmRNAコア、（2）外側の脂質シェル（標的化部分を含むかまたは含まない）、ならびに（3）間にある小分子および/またはタンパク質で構成されるmRNAワクチンナノ粒子の概要が視覚化され得る。

30

【0072】

【図21】図21は、IL12p70をコードするmRNAの共パッケージ化が、单一抗原ワクチン単独と比較してmRNAワクチン活性をさらに促進することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0073】

配列の簡単な説明

配列番号1は、野生型TP53ペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

【0074】

配列番号2は、変異したTP53ペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

40

【0075】

配列番号3は、野生型TP53ペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

【0076】

配列番号4は、変異したTP53ペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

【0077】

配列番号5は、野生型PIK3CAペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

50

## 【0078】

配列番号6は、変異したP I K 3 C Aペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

## 【0079】

配列番号7は、野生型P I K 3 C Aペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

## 【0080】

配列番号8は、変異したP I K 3 C Aペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

## 【0081】

配列番号9は、野生型P T E Nペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

## 【0082】

配列番号10は、変異したP T E Nペプチド由来の例示的な細胞傷害性T細胞エピトープであり、本開示の1または複数の態様に従って有用である。

## 説明的実施形態の記述

## 【0083】

本発明の説明的実施形態を以下に記述する。明瞭にするため、本明細書には実際の実施の全ての特徴を記載しているわけではない。もちろん、任意のそのような実際の実施形態の開発において、実施ごとに様々であるシステム関連および事業関連の制約の準拠等の開発者の固有の目的を達成するために、実施に固有な多くの決定を下さなければならないということが理解されよう。さらに、そのような開発努力は複雑で時間がかかるものであるが、本開示の恩恵を受ける当業者には日常の業務であることが理解されよう。

がん

## 【0084】

がんは、間違いなく公衆の健康に対する最大の世界的脅威の1つである。がんの転移は悪性疾患の重要な特徴であり、固体腫瘍に関連する死亡の90%超の原因となっている。がんの転移の機構についてよく分かっていないので、腫瘍の転移を効率的に制御するために利用可能な診断／予後の徴候および特定の処置は存在しない。実際、転移は、いくつかの腫瘍細胞が原発病巣を離れて遠い部位に定着する、良好に調整された一連の事象を含む複雑なプロセスである。原発腫瘍の中の全ての細胞が転移する能力を有しているわけではないので、転移がん細胞が特別の特徴を有し、これが価値ある治療目標を提供できるということが推論される。

## m R N Aに基づく治療用がんワクチン

## 【0085】

m R N Aに基づく治療用がんワクチンは、D N Aワクチンからのゲノム組込みの潜在的危険もペプチドワクチンからの抗原選択の制限もなしに、強固な抗がん免疫をトリガーするという利点を有している。しかし、正電荷タンパク質コア構造の中の凝縮したm R N A分子で構成された従来のm R N Aワクチンは、抗原提示細胞によって効果的には内在化されず、したがって、血漿および組織の酵素による分解からm R N A分子を十分に保護することができない。

## m R N Aをパッケージするためのリポポリプレックス組成物

## 【0086】

一態様では、本開示は、核酸分子（例えばm R N Aを含む）をポリマー性ポリプレックス「コア」の中にパッケージし、このコアが次にリン脂質二重層で構成された「シェル」構造中にロードされるように設計されている、リポポリプレックス（L P P）およびタンパク質に基づくシェル／コア送達システムを提供する。説明的なシステムを図1Aに示し、そのようなワクチン送達システムの一般化された概略図を図20に示す。これらの組成物は疎水性のポリプレックスコア構造の内部のm R N A分子をR N A s eによる攻撃および引き続く分解から保護することができるだけでなく、コアを取り囲むエンベロープリン

10

20

30

40

50

脂質二重層シェル構造の存在が（限定するものではないがマクロファージ、B細胞、樹状細胞等を含む）抗原提示細胞によってベクターをより効率的に内在化するように作用し、小胞システムによる粒子の輸送およびmRNA分子のコア構造からサイトゾルへの最終的な放出を促進し、コードされた抗原の産生を促進する。

【0087】

実施例1において、特定のLPPの組成および形態を系統的に特徴付け、DCによるLPP/mRNAの細胞取込みおよびコードされたペプチド抗原のDC内での得られるタンパク質合成も研究した。抗原モデルとしてオボアルブミン(OVA)を適用することによって、LPP/OVA mRNAワクチンに対する免疫応答を細胞培養で調べ、抗腫瘍免疫も、OVAを発現するB16黒色腫細胞で確立した黒色腫肺転移のマウスモデルで評価した。

10

医薬製剤

【0088】

ある特定の実施形態では、本開示は、単独で、または1もしくは複数の他の診断、予防、および／もしくは治療の様式と組み合わせて、動物の1または複数の細胞または組織への投与のための薬学的に許容される製剤において調製されたワクチン送達組成物に関する。薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は当業者には周知であり、種々の診断およびがん予測レジメンにおいて本明細書に記載した特定のLPP-mRNAに基づくワクチン組成物を使用するための好適な投薬および処置レジメンの開発も周知である。

【0089】

ある特定の状況では、適切に製剤化した薬学的ビヒクル中の開示したポリマー性ポリプレックスコア／リン脂質二重層シェルに基づくワクチン送達システムを、限定するものではないが、皮下、非経口、静脈内、筋肉内、髄腔内、腫瘍内、腹腔内、経皮、局所、経口もしくは経鼻吸入、または直接注射で、動物、好ましくはヒトの体内または体に関する1または複数の細胞、組織、または器官への1または複数の標準的な送達デバイスによって送達することが望ましい。

20

【0090】

投与の方法は、そのそれぞれが明示的な参照により全体として本明細書に具体的に組み込まれる米国特許第5,543,158号、第5,641,515号、および第5,399,363号に記載された様式を含んでもよい。遊離の塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は無菌水中で調製してよく、ヒドロキシプロピルセルロース等の1または複数の界面活性剤と適切に混合してよい。分散液もグリセロール、液体ポリエチレングリコール、油、またはそれらの混合物中で調製してよい。通常の保存および使用の条件下で、これらの調製物は微生物の成長を防止するための保存剤を含む。

30

【0091】

注射可能な水溶液の投与のため、限定するものではないが、溶液は必要な場合適切に緩衝され、液体希釈剤は最初に十分な食塩水またはグルコースで等張化され得る。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、真皮下(subdermal)、および／または腹腔内投与に特に好適である。これに関し、本発明の組成物は、例えば、無菌の水性媒体、緩衝剤、希釈剤等を含む1または複数の薬学的に許容されるビヒクル中で製剤化してよい。例えば、所与の投与量の活性成分（複数可）を特定体積の等張溶液（例えば等張のNaClに基づく溶液）に溶解し、次いで提案した投与部位に注射するか、または静脈内注入に適したビヒクルでさらに希釈してよい（例えば「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES」、15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照）。処置される対象の状態、処置の程度、および投与部位によって投与量のいくらかの変動が必然的に起こるが、それにも関わらず、投与に責任のある者は、医学および薬学の技術分野における通常の知識を使用して、個別の対象に適した正しい投与レジメンを決定することができる。

40

【0092】

無菌の注射可能な組成物は、開示したワクチン組成物を必要な量で、必要に応じて上に

50

列挙した他の成分のいくつかとともに適当な溶媒に組み込み、次いで濾過滅菌を行うことによって調製してよい。一般に、分散液は、選択され滅菌された活性成分（複数可）を、基礎分散媒および上に列挙した成分からの必要な他の成分を含む無菌のビヒクルに組み込むことによって調製できる。本明細書に開示したワクチン組成物は、中性または塩の形態で製剤化してもよい。

【0093】

薬学的に許容される塩は、（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される）酸付加塩を含み、これは、限定するものではないが塩酸もしくはリン酸等の無機酸、または限定するものではないが酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸とともに形成される。遊離のカルボキシル基とともに形成される塩も、限定するものではないが水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化第二鉄等の無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導することができる。製剤化されれば、液剤は投与製剤に適合した方法で、また意図した用途に効果的なかかる量で投与される。本発明の化合物の製剤は、持続放出カプセル、ヒドロゲル、コロイド、粘稠ゲル、経皮試薬、鼻内および吸入製剤等を含む注射可能な液剤、局所調製物、口腔製剤等の種々の剤形で容易に投与し得る。

10

【0094】

本明細書に開示したワクチン組成物の量、投薬レジメン、製剤、および投与は、本教示の恩恵を有する当業者の技能範囲内にある。しかし、開示したmRNAに基づくワクチン組成物の1または複数の診断有効（即ち薬学的に有効な）量の投与は、限定するものではないが、それを必要とする患者に望ましい恩恵を提供するために十分な量の送達された薬剤の単回注射等の単回投与によって達成できる可能性がある。あるいは、一部の状況では、そのような手順（複数可）を受ける選択された個体へのそのような組成物の投与を監督する医師によって決定され得るように、比較的短い期間に、または比較的長い期間にわたりてさえ、開示した組成物の複数回または継続的投与を提供することが望ましいことがある。

20

【0095】

典型的には、本明細書に記載したポリマー性ポリブレックスコア／リン脂質二重層シェルに基づくワクチン送達システムの1または複数の製剤は、少なくとも有効量の第1の活性剤を含む。好ましくは、製剤は少なくとも約0.001%のそれぞれの活性成分、好ましくは少なくとも約0.01%の活性成分を含んでよいが、活性成分（複数可）の百分率はもちろん変動してよく、便利には全製剤に基づいて約0.01～約90重量%もしくは体積%、または約0.1～約80重量%もしくは体積%、またはより好ましくは約0.2～約60重量%もしくは体積%の量で存在してよい。当然ながら、それぞれの組成物中の活性化合物の量は、化合物の任意の所与の単位用量で好適な投与量が得られるように調製してよい。溶解性、生物利用性、生物学的t<sub>1/2</sub>、投与経路、製品寿命、ならびに他の薬理学的考慮等の因子が、そのような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、したがって、種々の投与量および処置レジメンが望ましいことがある。好ましい実施形態では、活性剤は内側のポリブレックスの中に含まれるmRNAワクチン成分である。

30

【0096】

本発明の多くの実施形態において全身投与が効果的であると想定されるが、本明細書に開示した製剤が身体の1または複数の器官、組織、または細胞型への直接注射に適していることも想定される。例えば、開示した組成物の体内的特定の目立たない場所への直接投与、または腫瘍もしくはがんの組織への直接投与を、関連する医療腫瘍学技術分野における当業者に公知の好適な手段を使用して行ってよい。

40

【0097】

本発明の医薬製剤は1または複数の賦形剤、緩衝剤、または希釈剤をさらに含んでよく、哺乳動物細胞、特にヒト細胞との接触のため、および／または哺乳動物対象、例えばヒト患者への投与のために特に製剤化される。組成物は1もしくは複数の診断剤もしくは予後剤（prognostic agent）を必要に応じてさらに含んでよく、および／

50

またはマイクロスフェア、ミクロ粒子、ナノスフェア、もしくはナノ粒子の集団の中に製剤化されてもよく、特にヒトの 1 または複数の細胞、組織、器官、または身体への投与のために製剤化されてよい。

【 0 0 9 8 】

薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は当業者には周知であり、限定するものではないが、例えば、経口、非経口、静脈内、鼻内、腫瘍内、および筋肉内投与経路を含む種々の様式で本明細書に記載した特定の組成物を使用するための好適な投薬、診断および / または処置レジメンの開発も周知である。

【 0 0 9 9 】

採用した組成物の特定の量、および投与の特定の時間、または開示したワクチン製剤を採用した組成物の投薬レジメンは、本教示の恩恵を有する当業者の技能範囲内にある。しかし、開示した製剤の投与は、そのような処置を受ける患者に所望の恩恵を提供するのに効果的な時間、製剤の 1 または複数の用量を投与することによって達成できる可能性がある。そのような投与レジメンは、特定の状態または患者、投与される治療の程度または期間等に応じて、化合物の投与を監督する医師によって決定されてよい。

10

【 0 1 0 0 】

本明細書に開示した 1 または複数の活性成分を含む医薬製剤は、決してヒトにおける使用のみに限定されるものでも、靈長類、または哺乳動物における使用に限定されるものでもない。ある特定の実施形態では、本明細書に開示した方法および組成物は鳥類、両生類、爬虫類、または他の動物種を使用して用いることができる。しかし好ましい実施形態では、本発明の組成物は、がん細胞の転移潜在能を調節するための種々のレジメンにおいて、好ましくは哺乳動物、特にヒトへの投与のために製剤化される。上記のように、そのような組成物はヒトにおける使用にのみ限定されず、限定するものではないが選択された家畜、外来のまたは飼い慣らされた動物、( ペット等を含む ) 伴侶動物、非ヒト靈長類、ならびに動物学的標本、または他の種類の捕獲標本 ( *captive specimen* ) 等への投与を含め、獣医学的投与のために製剤化されてもよい。

20

医薬の調製のための組成物

【 0 1 0 1 】

本発明の別の重要な態様は、例えば脊椎哺乳動物を含む動物における 1 または複数の疾患、機能不全、異常な状態、または障害の 1 または複数の症状を防止し、診断し、処置し、および / または改善するための医薬の調製において、開示した組成物 ( ならびにそれらを含む製剤 ) を使用するための方法に関する。開示した組成物の使用は、がんの診断および / もしくは予後において、がんの転移の検出もしくは予測において、またはその程度のモニタリングにおいて、および / または 1 もしくは複数のがん細胞型の転移潜在能の抑制のために、特に意図される。

30

【 0 1 0 2 】

そのような使用は一般に、罹患した哺乳動物におけるがんの 1 または複数の症状を診断し、処置し、軽減し、または改善するのに十分な量および時間で、開示したワクチン組成物の 1 または複数を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む。

【 0 1 0 3 】

開示した mRNA に基づくワクチン組成物の 1 または複数、ならびに特に罹患した哺乳動物におけるがんの 1 または複数の症状の治療および / または改善における使用のための少なくとも第 1 の薬学的に許容される賦形剤をさらに含む組成物を含む医薬製剤も、本発明の一部を形成する。

40

例示的定義

【 0 1 0 4 】

本発明によれば、ポリヌクレオチド、核酸セグメント、核酸配列等は、これらに限定されないが、DNA ( これらに限定されないが、ゲノム DNA またはエクストラゲノム DNA を含む ) 、遺伝子、ペプチド核酸 ( RNA ) 、RNA ( これらに限定されないが、rRNA 、 mRNA 、および tRNA を含む ) 、ヌクレオシド、および天然源から得た、化学

50

的に合成された、改質された、または他の方法により人の手で全体としてもしくは部分的に調製されもしくは合成された好適な核酸セグメントを含む。

【0105】

他に定義しない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術における当業者によって共通に理解されているのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明において用いる多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する。Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (第2版)、J. Stenesh(編)、Wiley-Interscience (1989年) ; Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第3版)、P. SingletonおよびD. Sainsbury(編)、Wiley-Interscience (2007年) ; Chambers Dictionary of Science and Technology (第2版)、P. Walker(編)、Chambers (2007年) ; Glossary of Genetics (第5版)、R. Riegerら(編)、Springer-Verlag (1991年) ; ならびにThe HarperCollins Dictionary of Biology、W.G. HaleおよびJ. P. Margham(編)、HarperCollins (1991年)。

10

【0106】

本明細書に記載した方法および組成物と同様または等価の任意の方法および組成物が本発明の実施または試験において使用できるが、好ましい方法および組成物を本明細書に記載する。本発明の目的のため、明確にして参照を容易にするために、以下の用語を下に定義する。

20

【0107】

長年にわたる特許法の慣例に従い、単語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、特許請求の範囲を含む本出願において用いる場合、「1または複数の(one or more)」を意味する。

【0108】

用語「約」および「ほぼ」は、本明細書で用いる場合、相互交換可能であり、所与の数の付近のある範囲の数、ならびに列挙した数の範囲内の全ての数を指すと一般に理解されるべきである(例えば、「約5～15」は、他に述べない限り、「約5～約15」を意味する)。さらに、本明細書中の全ての数値範囲は、その範囲内の全ての整数のそれぞれを含むと理解すべきである。

30

【0109】

本明細書で用いる場合、「抗原性ポリペプチド」または「免疫原性ポリペプチド」は、脊椎動物に導入された場合に、脊椎動物の免疫系分子と反応し、即ち抗原性があり、および/または脊椎動物において免疫応答を誘導する、即ち免疫原性があるポリペプチドである。

【0110】

「生体適合性」は、生きた細胞に曝された場合に、細胞において望ましくない効果、例えば、細胞の生活サイクルの変化、細胞の増殖速度の変化、または細胞傷害性効果を引き起こさずに細胞の適切な細胞活性を支持する材料を指す。

40

【0111】

用語「生物学的機能等価」は当技術分野でよく理解されており、本明細書で詳細にさらに定義する。したがって、本明細書に提供したヌクレオチド配列の1または複数と同一または機能的に等価であるヌクレオチドの約85%～約90%、またはより好ましくは約91%～約95%、またはさらにより好ましくは約96%～約99%を有する配列は、本出願で説明した方法および組成物の実施において有用であると特に想定される。

【0112】

本明細書で用いる場合、用語「緩衝剤」は、緩衝剤を含む溶液または組成物に酸またはアルカリを添加した場合にpHの変動に抵抗する1または複数の組成物、またはその水溶

50

液を含む。pH変化へのこの抵抗はそのような溶液の緩衝特性によるものであり、組成物に含まれる1または複数の特定の化合物の機能であり得る。したがって、緩衝活性を示す溶液または他の組成物は、緩衝剤または緩衝溶液と称される。緩衝剤は一般に溶液または組成物のpHを維持する無制限の能力を有さず、むしろこれらは典型的にはpHをある特定の範囲内、例えば約5～7のpHに維持することができる。

【0113】

本明細書で用いる場合、用語「担体」は、該当する場合には、関係する動物への投与に薬学的に許容される、または治療もしくは診断目的に許容される、任意の溶媒（複数可）、分散媒、コーティング（複数可）、希釈剤（複数可）、緩衝剤（複数可）、等張化剤（複数可）、溶剤（複数可）、懸濁剤（複数可）、コロイド（複数可）、不活性物（inert）（複数可）等、またはそれらの組合せを含むことが意図されている。10

【0114】

本明細書で用いる場合、用語「DNAセグメント」は、特定の種の全ゲノムDNAを含まずに単離されたDNA分子を指す。したがって、本明細書に開示した組成物の1つを使用して生物学的試料から得られたDNAセグメントは、そのDNAセグメントが得られた特定の種の全ゲノムDNAから単離された、またはそれを含まずに精製された、1または複数のDNAセグメントを指す。用語「DNAセグメント」には、DNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片、ならびに例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス等を含む組み換えベクターが含まれる。

【0115】

用語「有効量」は、本明細書で用いる場合、疾患もしくは状態を処置しもしくは改善することができる、または他の方法で意図した治療効果をもたらすことができる量を指す。20

【0116】

本明細書で用いる場合、用語「エピトープ」は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定される、所与の免疫原性物質に対する免疫応答を組み込んだ宿主免疫系の抗体または細胞表面受容体の標的であり、即ちこれに結合される、所与の免疫原性物質の部分を指す。さらに、エピトープは、当技術分野で利用可能な任意の方法によって決定されるよう、動物において抗体応答を誘起し、またはT細胞の応答を誘導する免疫原性物質の一部として定義され得る（例えば、Geysenら、1984年を参照）。エピトープは任意の免疫原性物質、例えば、タンパク質、ポリヌクレオチド、多糖、有機もしくは無機の化学物質、またはそれらの任意の組合せの一部であつてよい。用語「エピトープ」は、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と相互交換可能にも用いられ得る。30

【0117】

用語「例えば（for example）」または「例えば（e.g.）」は、本明細書で用いる場合、限定を意図せずに例としてのみ用いられ、本明細書中で明示的に列挙されたこれらの項目のみが言及されていると解釈すべきではない。

【0118】

本明細書で用いる場合、「異種」は、所定の参照した核酸配列に関連して定義される。例えば、構造遺伝子配列に関して、異種プロモーターは、参照した構造遺伝子の近傍に天然には存在しないが、実験室での操作によって位置決めされたプロモーターとして定義される。同様に、異種遺伝子または核酸セグメントは、参照したプロモーターおよび/またはエンハンサー要素の近傍に天然には存在しない遺伝子またはセグメントとして定義される。40

【0119】

本明細書で用いる場合、「相同」は、ポリヌクレオチドについて言及する場合には、異なる起源から発生したにも関わらず同じ本質的なヌクレオチド配列を有する配列を意味する。典型的には、相同的な核酸配列は、1または複数の実質的に同様のゲノム配列を有する密接に関連した遺伝子または生物体（organism）に由来する。対照的に、「類似」ポリヌクレオチドは、異なる種または生物体からのポリヌクレオチドと同じ機能を共有しているが、同様の機能を遂行したまたは同様の生物学的活性を有する1または複数の50

タンパク質またはポリペプチドをコードする顕著に異なった一次ヌクレオチド配列を有してもよいポリヌクレオチドである。類似ポリヌクレオチドは、（例えば、遺伝学的にまたは系統発生学的に）密接に関連していない<sup>2</sup>またはそれより多い生物体に由来し得ることが多い。

【0120】

本明細書で用いる場合、用語「相同性」は、2またはそれより多いポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間の相補性の程度を指す。第1の核酸またはアミノ酸配列が第2の核酸またはアミノ酸配列と正確に同じ一次配列を有する場合には、「同一性」という単語で「相同性」という単語を置き換えてよい。配列相同性および配列同一性は、当技術分野で公知のアルゴリズムおよびコンピュータプログラムを使用して2またはそれより多い配列を解析することによって決定することができる。そのような方法は、所与の配列が別の選択された配列と同一または相同であるかを評価するために使用され得る。

【0121】

用語「同一」または「同一性」パーセントは、2またはそれより多い核酸またはポリペプチド配列の文脈では、以下に記載する配列比較アルゴリズム（または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）の1つを使用して測定して、または目視によって、比較し最大の一致のために整列させたときに同じであるか、または同じである指定した百分率のアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2またはそれより多い配列または部分配列を指す。

【0122】

本明細書で用いる場合、語句「処置を必要とする」は、患者が処置を必要とする（または1もしくは複数の点で恩恵を受ける）という、医師または獣医師等の医療従事者によってなされる判断を指す。そのような判断は、医療従事者の専門知識の領域内にある種々の要素に基づいてなされることがあり、本明細書で説明したもの等の1または複数の化合物または医薬組成物によって処置できる疾患状態の結果として、患者が病気であるという知識を含み得る。

【0123】

語句「単離された」または「生物学的に純粋」は、自然の状態で見出されたときにその材料に通常付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない材料を指す。したがって、本開示による単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、好ましくはそれらの天然のまたはin situの環境においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドに通常付随する材料を含まない。

【0124】

本明細書で用いる場合、用語「キット」は、本発明の試薬、成分、または薬学的に製剤化された組成物の少なくとも1つのセットを含む多種の携行可能な自己充足型の封入物を記載するために用い得る。そのようなキットは、必要に応じて、例えば、実験室または臨床の用途における封入された組成物の使用のための指示の1または複数のセットを含んでよい。

【0125】

「連結」または「接合」は、限定するものではないが組み換え融合、共有結合、ジスルフィド結合、イオン結合、水素結合、静電結合等を含む、1または複数のタンパク質、ペプチド、核酸、またはポリヌクレオチドを機能的に接続するための当技術分野で公知の任意の方法を指す。

【0126】

用語「天然に存在する」は、本明細書で用いる場合、目的物に適用する際には、目的物が自然界で見出され得るという事実を指す。例えば、天然の源から単離できる（ウイルスを含む）生物体に存在し、人の手によって実験室内で意図的に改質されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然に存在している。本明細書で用いる場合、古典的遺伝学に従って選択的に繁殖させることができたげっ歯類の実験室系統は、天然に存在する動物であると考えられる。

【0127】

10

20

30

40

50

本明細書で用いる場合、用語「核酸」は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含む）、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含む）、およびプリンもしくはピリミジン塩基または改質されたプリンもしくはピリミジン塩基のN-グリコシドである任意の他の型のポリヌクレオチド（非塩基部位を含む）の1または複数の型を含む。用語「核酸」は、本明細書で用いる場合、典型的にはサブユニット間のホスホジエステル連結によって、いくつかの場合にはホスホロチオエート、メチルホスホネート等によって共有結合したリボヌクレオシドまたはデオキシリボヌクレオシドのポリマーも含む。「核酸」は一本鎖および二本鎖DNA、ならびに一本鎖および二本鎖RNAを含む。例示的な核酸は、限定するものではないがgDNA、hnRNA、mRNA、rRNA、tRNA、ミクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核小体低分子RNA（snRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、および一過性低分子RNA（stRNA）等、ならびにそれらの任意の組合せを含む。

#### 【0128】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書で用いる場合、連結される核酸配列が典型的には連續的または実質的に連續的であり、2つのタンパク質コード領域を接合させることが必要な場合には、連續的で読み取りフレーム内にあることを指す。しかし、エンハンサーは一般にプロモーターから数キロ塩基離れた場合に機能し、イントロン配列の長さは変動し得るので、いくつかのポリヌクレオチドエレメントは作動可能に連結され得るが連續的でなくてよい。

#### 【0129】

本明細書で用いる場合、用語「患者」（「レシピエント」、「宿主」、または「対象」とも相互交換可能に称される）は、本明細書で論じるように血管アクセスデバイスの1または複数のためのレシピエントとして働くことができる任意の宿主を指す。ある特定の様では、レシピエントは脊椎動物であり、これは任意の動物種（および好ましくは人類等の哺乳動物種）を意味することを意図している。ある特定の実施形態では、「患者」は、限定するものではないが飼い慣らされた家畜、群れをなすまたは移動性の動物または鳥類、外来のまたは動物学的標本を含む、これらに限定されないが、ヒトおよび非ヒト霊長類、鳥類、爬虫類、両生類、ウシ、イヌ、ヤギ（caprine）、cavine、カラス、epine、ウマ、ネコ、ヤギ（hircine）、ウサギ（lapin）、ウサギ（leporine）、オオカミ、ネズミ、ヒツジ、ブタ、racine、キツネ等、ならびに伴侶動物、ペット、および獣医師のケアを受ける任意の動物を含む任意の動物宿主を指す。

#### 【0130】

語句「薬学的に許容される」は、ヒトに投与した場合、特にヒトの眼に投与した場合に、アレルギー性または同様の有害な反応を生じない分子実体および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は、当技術分野でよく理解されている。典型的には、そのような組成物は液体液剤としてまたは懸濁剤のいずれかとして、注射剤として調製される。あるいは、これらは注射に先立って液体中の液剤または懸濁剤とするのに適した固体形態で調製してよい。

#### 【0131】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される塩」は、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、望ましくない毒性効果を及ぼさない塩を指す。そのような塩の例は、これらに限定されないが、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等と形成された酸付加塩、および有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パモ酸（エンボン酸）、アルギン酸、ナフトエ酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸と形成された塩、例えば、亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム等の多価金属カチオンとの塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成された有機カチオンと形成された塩、ならびにそれらの組合

10

20

30

40

50

せを含む。

【 0 1 3 2 】

本明細書で用いる場合、用語「プラスミド」または「ベクター」は、遺伝子材料（即ち核酸）からなる遺伝子構築物を指す。典型的には、プラスミドまたはベクターは、細菌宿主細胞、例えば *E. coli* の中に機能的である複製起点、およびプラスミドを含む細菌宿主細胞を検出するための選択可能なマーカーを含む。本発明のプラスミドおよびベクターは、挿入されたコーディング配列が好適な発現細胞の中で転写され翻訳され得るように配置された、本明細書に記載した 1 または複数の遺伝子要素を含み得る。さらに、プラスミドまたはベクターは、1 または複数の天然および / または人工の源から得られたまたはこれに由来するセグメントを含む、1 もしくは複数の核酸セグメント、遺伝子、プロモーター、エンハンサー、アクチベーター、マルチプルクローニング領域、またはそれらの任意の組合せを含み得る。

【 0 1 3 3 】

本明細書で用いる場合、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド類」を包含することを意図しており、2 またはそれより多いアミノ酸の任意の鎖（単数または複数）を含む。したがって、本明細書で用いる場合、これらに限定されないが、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「タンパク質」、「酵素」、「アミノ酸鎖」、および「連続したアミノ酸配列」を含む用語は、全て「ポリペプチド」の定義に包含され、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれの代わりにも、またはそれらと交換可能に用いることができる。用語は、例えば、これらに限定されないが、グリコシリ化、アセチル化、ホスホリル化、アミド化、誘導体化、タンパク分解的開裂、翻訳後プロセシング、または 1 もしくは複数の天然に存在しないアミノ酸の含有による改質を含む 1 または複数の翻訳後改質を受けたポリペプチドをさらに含む。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造については従来の命名法が当技術分野に存在する。

【 0 1 3 4 】

例えば、アミノ酸を記述するために 1 文字および 3 文字の略号が広く採用されている。アラニン (A、A l a)、アルギニン (R、A r g)、アスパラギン (N、A s n)、アスパラギン酸 (D、A s p)、システイン (C、C y s)、グルタミン (Q、G l n)、グルタミン酸 (E、G l u)、グリシン (G、g l y)、ヒスチジン (H、H i s)、イソロイシン (I、I l e)、ロイシン (L、L e u)、メチオニン (M、M e t)、フェニルアラニン (F、P h e)、プロリン (P、P r o)、セリン (S、S e r)、スレオニン (T、T h r)、トリプトファン (W、T r p)、チロシン (Y、T y r)、バリン (V、V a l)、およびリシン (K、L y s)。本明細書に記載したアミノ酸残基は「1」アイソマー形であることが好ましい。しかし、ポリペプチドの望ましい特性が保たれるならば、「d」アイソマー形の残基で 1 - アミノ酸残基を置換してもよい。

【 0 1 3 5 】

本明細書で用いる場合、本明細書で用いる用語「防止する」、「防止すること」、「防止」、「抑制する」、「抑制すること」、および「抑制」は、疾患状態の任意の症状、態様または特徴を防止するために、疾患状態の臨床症状の発症に先立って、単独のまたは医薬組成物に含まれた化合物を投与することを指す。そのような防止および抑制は、医学的に有用であるとみなされるために絶対的である必要はない。

【 0 1 3 6 】

「タンパク質」は本明細書において「ペプチド」および「ポリペプチド」と相互交換可能に用いられ、合成により、組み換えにより、または *in vitro* で産生されたペプチドおよびポリペプチドと、核酸配列が宿主動物またはヒト対象に投与された後に *in vivo* で発現したペプチドおよびポリペプチドの両方を含む。用語「ポリペプチド」は、好ましくは、約 2 ~ 約 20 アミノ酸残基の長さの短いペプチド、約 10 ~ 約 100 アミノ酸残基の長さのオリゴペプチド、および約 100 アミノ酸残基またはそれを超える長さを含むより長いポリペプチドの鎖を含む任意のアミノ酸鎖長を指すことを意図している。さらに、用語は酵素、即ち少なくとも 1 つのアミノ酸ポリマーを含む機能的生体分子を含

10

20

30

40

50

むことも意図している。本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、翻訳後に改質されるまたは改質されたポリペプチドおよびタンパク質も含み、骨格のアミノ酸鎖に付加された任意の糖または他の誘導体もしくはコンジュゲートを含む。

【0137】

「精製された」は、本明細書で用いる場合、多くの他の化合物または実体から分離されたことを意味する。化合物または実体は、部分的に精製され、実質的に精製され、または純粋であつてよい。化合物または実体は、実質的に全ての他の化合物または実体から除去され、即ち好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99%より大きく純粋である場合に、純粋と考えられる。部分的にまたは実質的に精製された化合物または実体は、それとともに天然に見出される材料、例えば、細胞のタンパク質および/または核酸等の細胞材料の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%が除去されてよい。

10

【0138】

用語「組み換え」は、材料（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）がヒトの介入によって人工的にまたは合成的に（非天然に）変化されたことを示す。変化は、その天然の環境または天然の状態の中の、またはそれから除去された材料について実施することができる。具体的には、例えば、プロモーター配列は、人の手によって操作された核酸セグメントの発現によって産生される場合には、「組み換え」である。例えば、「組み換え核酸」は、例えば、クローニング、DNAシャフリング、もしくは他の手順の間に核酸を組み換えることによって、または化学的もしくは他の変異誘発によって作られる核酸であり、「組み換えポリペプチド」または「組み換えタンパク質」は、組み換え核酸の発現によって産生されるポリペプチドまたはタンパク質であり、「組み換えウイルス」、例えば組み換えAAVウイルスは、組み換え核酸の発現によって産生される。

20

【0139】

用語「調節エレメント」は、本明細書で用いる場合、転写を調節する核酸配列の領域（単数または複数）を指す。例示的な調節エレメントには、これらに限定されないが、エンハンサー、転写後エレメント、転写制御配列等が含まれる。

【0140】

用語「RNAセグメント」は、特定の種の全細胞RNAを含まずに単離されたRNA分子を指す。したがって、RNAセグメントは、他のRNAから単離された、またはそれらを含まずに精製された、1または複数のRNAセグメント（天然または合成の起源）を指し得る。RNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片は、用語「RNAセグメント」の中に含まれる。

30

【0141】

用語「配列」は、アミノ酸に言及する場合には、所与のアミノ酸鎖、例えば、ポリペプチドまたはタンパク質の中のアミノ酸のN末端からC末端への直線的な順序の全てまたは一部に関する。「部分配列」は、配列の中のアミノ酸の任意の連続した一続きの配列、例えば、所与のタンパク質またはポリペプチド配列の中の少なくとも3つの連続したアミノ酸を意味する。ヌクレオチド鎖に関しては、「配列」および「部分配列」は、ヌクレオチドの5'から3'への順序に関して同様の意味を有する。

40

【0142】

用語「本質的に配列番号Xで示される配列」は、その配列が、配列番号Xの一部に実質的に対応し、配列番号Xのヌクレオチド（またはアミノ酸）と同一でないまたは生物学的に機能が等価でないヌクレオチド（または、ポリペプチド配列の場合にはアミノ酸）を比較的少なく有することを意味する。用語「生物学的に機能が等価」は当技術分野でよく理解されており、本明細書で詳細にさらに定義する。したがって、本明細書に提供されるヌクレオチド配列の1または複数と同一または機能的に等価なヌクレオチドの約85%～約90%、またはより好ましくは約91%～約95%、またはさらにより好ましくは約96%～約99%を有する配列は特に、本発明の実施において有用であることが意図される。

50

## 【0143】

本発明における使用のための核酸についての好適な標準的ハイブリダイゼーション条件には、例えば、50%のホルムアミド、5倍のデンハルト溶液、5倍のSSC、25mMのリン酸ナトリウム、0.1%のSDS、および100μg/mLの変性サケ精子DNA中における42、16時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く所望の量のバックグラウンドシグナルを除去するための0.1倍のSSC、0.1%のSDS溶液による60、1時間の逐次洗浄が含まれる。本発明のための低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件には、例えば、35%のホルムアミド、5倍のデンハルト溶液、5倍のSSC、25mMのリン酸ナトリウム、0.1%のSDS、および100μg/mLの変性サケ精子DNAまたはE.coli DNA中における42、16時間のハイブリダイゼーションおよびそれに続く0.8倍のSSC、0.1%のSDSによる55での逐次洗浄が含まれる。当業者は、そのようなハイブリダイゼーション条件は特定の用途のための所望のレベルのストリンジエンシーを得るために容易に調整できることを認識する。

## 【0144】

本明細書で用いる場合、用語「構造遺伝子」は、コードされたペプチド、ポリペプチド、タンパク質、リボザイム、触媒的RNA分子、またはアンチセンス分子を產生するために発現される遺伝子等のポリヌクレオチドを一般に記述することを意図している。

## 【0145】

用語「対象」は、本明細書で用いる場合、本発明による組成物を用いた処置を提供できる靈長類等の哺乳動物を含む生物体を記述している。開示した処置の方法から恩恵を受けることができる哺乳動物種には、これらに限定されないが、類人猿、チンパンジー、オランウータン、ヒト、サル、イヌおよびネコ等の飼い慣らされた動物、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、およびニワトリ等の家畜、ならびにマウス、ラット、モルモット、およびハムスター等の他の動物が含まれる。

## 【0146】

用語「実質的に相補的」は、アミノ酸または核酸配列を定義するために用いる場合には、特定の対象配列、例えばオリゴヌクレオチド配列が、選択した配列の全てまたは一部に実質的に相補的であり、したがって選択した配列をコードするmRNAの一部に特異的に結合することを意味する。したがって、典型的には配列はmRNA「標的」配列に高度に相補的であり、配列の相補部分を通して約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10程度以下の塩基のミスマッチを有する。多くの場合に、配列は正確にマッチすること、即ちオリゴヌクレオチドが特異的に結合する配列に完全に相補的であり、したがって相補的な一続きの配列に沿ってミスマッチはゼロであることが望ましいことがある。したがって、高度に相補的な配列は、典型的にはmRNAの標的配列領域に全く特異的に結合し、したがって標的mRNA配列のポリペプチド生成物への翻訳の低減および/または阻害においてさえも、高度に効率的である。

## 【0147】

実質的に相補的な核酸配列は、その核酸が特異的に結合する対応する核酸標的配列に約80パーセント（即ち「正確なマッチの%」）を超えて相補的であり、より好ましくは、その核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約85パーセントを超えて相補的である。ある特定の態様では、上記のように、本発明の実施における使用のために、さらにより実質的に相補的な核酸配列を有することが望ましく、そのような場合には、核酸配列は、その核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約90パーセントを超えて相補的であり、ある特定の実施形態では、その核酸が特異的に結合する対応する標的配列に約95パーセントを超えて相補的であってよく、そしてさらには、設計した核酸が特異的に結合する標的配列の全てまたは一部に相補的な、最大約96%、約97%、約98%、約99%、さらには約100%のおよびそれらを含む正確な一致であり得る。

## 【0148】

開示した核酸配列のいずれかの類似性パーセントまたは相補性パーセントは、例えば、ウィスコンシン大学のGenetics Computer Group (UWGCG) か

ら利用可能な G A P コンピュータプログラムバージョン 6 . 0 を使用して配列情報を比較することによって決定することができる。G A P プログラムは N e e d l e m a n および W u n s c h ( 1 9 7 0 年 ) の整列法を利用している。簡単には、G A P プログラムは、整列させた類似の記号（即ちヌクレオチドまたはアミノ酸）の数を 2 つの配列のうち短い方の記号の総数で割った値として類似性を定義している。G A P プログラムのための好ましいデフォルトパラメーターは、（ 1 ）ヌクレオチドについての単項比較マトリックス（同一性について 1 、および非同一性について 0 の値を含む）ならびに G r i b s k o v および B u r g e s s ( 1 9 8 6 年 ) の重み付け比較マトリックス、（ 2 ）各ギャップについて 3 . 0 のペナルティおよび各ギャップ内の各記号について追加の 0 . 1 0 のペナルティ、ならびに（ 3 ）末端ギャップについてペナルティなし、を含む。

10

#### 【 0 1 4 9 】

当然ながら、本発明は、本明細書で具体的に示した特定のヌクレオチド配列の少なくとも 1 または複数に相補的な、本質的に相補的な、および / または実質的に相補的な核酸セグメントも包含する。「相補的な」核酸配列は、標準的なワトソン - クリック相補性規則に従って塩基対を形成できる核酸配列である。本明細書で用いる場合、用語「相補的配列」は、上で示した同じヌクレオチド比較によって評価し得る、またはすぐ上に記載したような比較的ストリンジエントな条件下で本明細書に開示した特定の核酸セグメントの 1 または複数にハイブリダイズすることができると定義され得る、実質的に相補的である核酸配列を意味する。

#### 【 0 1 5 0 】

本明細書で用いる場合、成分の量に関する用語「実質的に含まない」または「本質的に含まない」は、好ましくは、約 1 0 重量パーセント未満、好ましくは約 5 重量パーセント未満、より好ましくは約 1 重量パーセント未満の化合物を含む組成物を指す。好ましい実施形態では、これらの用語は、約 0 . 5 重量パーセント未満、約 0 . 1 重量パーセント未満、または約 0 . 0 1 重量パーセント未満を指す。

20

#### 【 0 1 5 1 】

本発明における使用のためのプローブおよびプライマーは、任意の好適な長さであつてよい。配列に数値を割り付けることによって、例えば、第 1 の残基を 1 、第 2 の残基を 2 などとして、所与の配列の中に含まれる全てのプローブまたはプライマーを定義する以下のアルゴリズムを提案することができる：

30

#### 【 0 1 5 2 】

n から n + y ( ここで n は 1 から配列の最後の番号までの整数であり、 y はプローブまたはプライマーの長さマイナス 1 であり、 n + y は配列の最後の番号を超えない ) 。したがって、 2 5 塩基対のプローブまたはプライマー（即ち「 2 5 マー」）については、プローブまたはプライマーのコレクションは、配列の全長にわたって塩基 1 ~ 2 5 、塩基 2 ~ 2 6 、塩基 3 ~ 2 7 、塩基 4 ~ 2 8 などに対応する。同様に、 3 5 塩基対のプローブまたはプライマー（即ち「 3 5 マー」）については、例示的なプライマーまたはプローブ配列は、限定するものではないが、配列の全長にわたって塩基 1 ~ 3 5 、塩基 2 ~ 3 6 、塩基 3 ~ 3 7 、塩基 4 ~ 3 8 などに対応する配列を含む。同様に 4 0 マーについては、そのようなプローブまたはプライマーは、第 1 の塩基対から b p 4 0 まで、配列の第 2 の b p から b p 4 1 まで、第 3 の b p から b p 4 2 までなどのヌクレオチドに対応し得、一方 5 0 マーについては、そのようなプローブまたはプライマーは、 b p 1 から b p 5 0 、 b p 2 から b p 5 1 、 b p 3 から b p 5 2 、 b p 4 から b p 5 3 などに延びるヌクレオチド配列に対応し得る。

40

#### 【 0 1 5 3 】

用語「実質的に対応する」、「実質的に相同」、または「実質的同一性」は、本明細書で用いる場合、選択した核酸またはアミノ酸配列が、選択した参照核酸またはアミノ酸配列と比較して少なくとも約 7 0 または約 7 5 パーセントの配列同一性を有している、核酸またはアミノ酸配列の特徴を意味する。より典型的には、選択した配列および参照配列は、少なくとも約 7 6 、 7 7 、 7 8 、 7 9 、 8 0 、 8 1 、 8 2 、 8 3 、 8 4 、またはさらに

50

は 85 パーセントの配列同一性を有し、より好ましくは、少なくとも約 86、87、88、89、90、91、92、93、94、または 95 パーセントの配列同一性を有する。さらにより好ましくは、高度に相同な配列は、選択した配列と、それと比較した参照配列との間で、少なくとも約 96、97、98、または 99 パーセントより大きい配列同一性を共有することが多い。

【 0154 】

本明細書で用いる場合、「合成の」は、材料がヒトおよび動物の起源でないことを意味する。

【 0155 】

用語「治療上実際的な期間」は、1 または複数の活性剤が治療上有効なために必要な期間を意味する。用語「治療上有効な」は、1 または複数の症状の重症度および / または頻度の低減、1 または複数の症状および / または根本原因の排除、症状および / またはその根本原因の発生の防止、ならびに損傷の改善または治療を指す。

10

【 0156 】

「治療剤」は、対象における標的部位において所望の生物学的効果を生成し得る任意の生理学的または薬理学的に活性な物質であってよい。治療剤は、化学療法剤、免疫抑制剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、核酸分解性化合物、放射性同位元素、受容体、およびプロドラッグ活性化酵素であってよく、これらは天然に存在するものあっても、または合成もしくは組み換え法で產生されても、またはそれらの任意の組合せでもよい。古典的な多剤耐性によって影響される薬物、例えば、ビンカアルカロイド類（例えば、ビンプラスチンおよびビンクリスチン）、アンスラサイクリン類（例えばドキソルビシンおよびダウノルビシン）、RNA 転写阻害剤（例えばアクチノマイシン D）、および微小管安定化薬（例えばパクリタクセル）は、治療剤として特定の有用性を有し得る。サイトカイン類も治療剤として使用し得る。そのようなサイトカイン類の例は、リンホカイン類、モノカイン類、および従来のポリペプチドホルモン類である。がん化学療法剤は好ましい治療剤であり得る。抗がん剤および他の治療剤のより詳細な記載については、当業者は、これらに限定されないが Physician's Desk Reference ならびに Good man および Gilman の「Pharmacological Basis of Therapeutics」、10 版、Hardman ら（編）（2001 年）を含むいくつかの解説書を参照されたい。

20

【 0157 】

本明細書で用いる場合、「転写因子認識部位」および「転写因子結合部位」は、直接のタンパク質 - DNA 結合の形態を取ることが多い 1 または複数の転写因子の配列特異的相互作用のための部位として同定されるポリヌクレオチド配列または配列モチーフを指す。典型的には、転写因子結合部位は、DNA フットプリントイング、ゲル易動度シフトアッセイ等によって同定することができ、および / または既知のコンセンサス配列モチーフに基づいて、または当業者には公知の他の方法によって、予測することができる。

30

【 0158 】

「転写調節エレメント」は、単独でまたは 1 もしくは複数の他の核酸配列と組み合わせて転写を活性化するポリヌクレオチド配列を指す。転写調節エレメントは、例えば、1 もしくは複数のプロモーター、1 もしくは複数の応答エレメント、1 もしくは複数の負の調節エレメント、および / または 1 もしくは複数のエンハンサーを含んでよい。

40

【 0159 】

「転写ユニット」は、少なくとも第 1 のシス作用性プロモーター配列に作動可能に連結され、必要に応じて構造遺伝子配列の効率的な転写のために必要な 1 もしくは複数の他のシス作用性核酸配列に作動可能に連結された少なくとも第 1 の構造遺伝子、ならびにプロモーターおよび / またはエンハンサーエレメントの制御の下に作動可能に位置させた構造遺伝子配列の適切な組織特異的な、発生における転写に必要とされ得る少なくとも第 1 の末梢調節エレメント、ならびに効率的な転写および翻訳のために必要な任意の追加のシス配列（例えば、ポリアデニル化部位（複数可）、mRNA 安定性制御配列（複数可）等）

50

を含むポリヌクレオチド配列を指す。

【0160】

本明細書で用いる場合、用語「形質転換」は、外来のポリヌクレオチド配列（例えば、ウイルスベクター、プラスミド、または組み換えDNAもしくはRNA分子）を、外来のポリヌクレオチドが少なくとも第1の染色体に組み込まれ、または形質転換された宿主細胞の中で自律的に複製することができる宿主細胞またはプロトプラストの中に導入するプロセスを一般に記載することを意図している。トランスフェクション、エレクトロポレーション、および「裸の」核酸の取込みは全て、1または複数のポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換するために使用する手法の例を表している。

【0161】

本明細書で用いる場合、用語「形質転換された細胞」は、その核酸成分が1または複数の外来のポリヌクレオチドのその細胞への導入によって変化した宿主細胞を意味することを意図している。

【0162】

「処置すること」または「～の処置」は、本明細書で用いる場合、任意の種類の医学的または外科的な管理を対象に提供することを指す。処置することは、これに限定されないが、治療剤を含む組成物を対象に投与することを含み得る。「処置すること」は、疾患、障害、もしくは状態、または疾患、障害、もしくは状態の1もしくは複数の症状もしくは徴候の治癒、回復、緩和、その重症度の低減、その進行の阻止、またはその可能性（likelihood）の低減等を目的とする、対象への本発明の化合物または組成物の任意の投与または適用を含む。ある特定の態様では、本発明の組成物は、予防的に、即ちそのような予防が正当化される場合には、状態の任意の症状または徴候の発生の前に、投与してもよい。典型的には、そのような場合には、対象は、家族歴、診療記録、またはそのような疾患もしくは障害が後に発生する傾向を示す1もしくは複数の診断もしくは予後試験の完了の結果として、そのような疾患または障害が発生する「危険にある」と診断された対象である。

【0163】

用語「ベクター」は、本明細書で用いる場合、核酸分子であって、宿主細胞内での複製が可能な、および／または別の核酸セグメントがそれに作動的に連結されて結合したセグメントの複製をもたらす、（典型的にはDNAで構成された）核酸分子を指す。プラスミド、コスミド、またはウイルスは、例示的なベクターである。

【0164】

「ゼロ次」または「ほぼゼロ次」という表現は、開示したワクチン送達組成物からの活性剤の放出動力学に適用する場合には、活性剤の治療効果のある血漿中濃度を達成するための、組成物の投与の後の治療として実際的な期間にわたって制御された様式での活性剤の放出の速度を含むことを意図している。

【0165】

ある特定の実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイにおける所与の標的配列の存在の決定において標識されたポリヌクレオチドプローブを採用する場合のように、本発明の1または複数の核酸セグメントを適切な検出可能なマーカー（即ち、「標識」）と組み合わせて採用することが有利である。限定するものではないが、蛍光、放射活性、酵素または他のリガンド、例えばアビジン／ビオチン等を含む、好適なアッセイで検出可能な、オリゴヌクレオチドプローブを標識するための多種多様な適切なインジケーター化合物および組成物が当技術分野で公知である。特定の実施形態では、放射活性または他の環境にとってあまり望ましくない試薬の代わりに、1もしくは複数の蛍光標識またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、もしくはペルオキシダーゼ等の酵素タグを採用してもよい。酵素タグの場合には、1または複数の相補的なまたは実質的に相補的な核酸配列を含む試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定するために、ヒトの目に見える、または例えばシンチグラフィー、蛍光光度法、分光光度法等の分析法による、試料を検出するための方法を提供するために採用できる比色インジケーター基質、色素形成インジケーター基

10

20

30

40

50

質、または蛍光原インジケーター基質が公知である。2またはそれより多い標識プローブが同時にまたは逐次に検出される、いわゆる「マルチプレキシング」アッセイの場合には、第1のオリゴヌクレオチドプローブを第1の検出特性またはパラメーター（例えば、発光および／または励起のスペクトル最大値）を有する第1の標識で標識し、第2のオリゴヌクレオチドプローブを第1の標識とは異なる（即ち目立たないまたは識別できる）第2の検出特性またはパラメーターを有する第2の標識で標識することが望ましい場合がある。特に遺伝子増幅／検出プロトコールに関してマルチプレキシングアッセイの使用は、分子遺伝学の技術分野における当業者には周知である。

#### 生物学的機能等価

##### 【0166】

10

核酸の構造において、またはそれらを含むベクターに対して、ならびにそれらにコードされるmRNA、ポリペプチド、または治療剤に対して改変および変更を行い、それでもなお所望の特徴を有する1または複数の治療剤を含む機能的ワクチン送達システムを得ることができる。上記のように、特定のポリヌクレオチド配列に1または複数の変異を導入することができる。しばしば望ましい。ある特定の状況では、得られるコードされたポリペプチド配列はこの変異によって変化し、他の場合には、ポリペプチドの配列はコードするポリヌクレオチドの1または複数の変異によって変化しない。

##### 【0167】

等価の、またはさらに改善された第2世代の分子を創製するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることができると望ましい場合には、アミノ酸の変化は、コードするDNA配列のコドンの1または複数を表1に従って変化させることによって達成できる。

20

##### 【0168】

例えば、ある特定のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子の結合部位等の構造と相互作用する結合能力の感知できるほどの損失なしに、タンパク質構造中の他のアミノ酸で置換することができる。タンパク質の生物学的機能活性を定義するものはタンパク質の相互作用能力および性質であるので、タンパク質配列、およびもちろんその下にあるDNAコード配列において、ある特定のアミノ酸配列置換を行い、それにも関わらず同様の特性を有するタンパク質を得ることができる。したがって、生物学的な有用性または活性の感知できるほどの損失なしに、開示した組成物のペプチド配列または前記ペプチドをコードする対応するDNA配列に種々の変更を加えることができるが、本発明者らによって意図されている。

30

40

50

## 【表1】

表1

アミノ酸		コドン				
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	Cys	C	UGC	UGU		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG		
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU		
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU		
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
リシン	Lys	K	AAA	AAG		
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	Val	V	GUU	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

## 【0169】

そのような変更を行う場合、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮してよい。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する場合のハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野で一般に理解されている（参照により本明細書に組み込まれる Kyte および Doolittle、1982年）。アミノ酸の相対的ハイドロパシー特性が得られるタンパク質の二次構造に寄与し、それが次にタンパク質と他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等との相互作用を規定することが受け入れられている。それぞれのアミノ酸には、その疎水性および電荷の特徴に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている（Kyte および Doolittle、1982年）。これらの値は、イソロイシン（+4.5）、バリン（+4.2）、ロイシン（+3.8）、フェニルアラニン（+2.8）、システイン/シスチン（+2.5）、メチオニン（+1.9）、アラニン（+1.8）、グリシン（-0.4）、スレオニン（-0.7）、セリン（-0.8）、トリプトファン（-0.9）、チロシン（-1.3）、プロリン（-1.6）、ヒスチジン（-3.2）、グルタメート（-3.5）、グルタミン（-3.5）、アスパルテート（-3.5）、アスパラギン（-3.5）、リシン（-3.9）、およびアルギニン（-4.5）である。

## 【0170】

ある特定のアミノ酸を同様のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸で置換して、それでも同様の生物学的活性を有するタンパク質がもたらされ得る、即ちそれでも生物学的機能が等価なタンパク質が得られ得ることが、当技術分野で公知である。そ

10

20

30

40

50

のような変更を行う場合、ハイドロパシー指数が $\pm 2$ 以内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内のものが特に好ましく、 $\pm 0.5$ 以内のものがさらにより特に好ましい。同様のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的に行われ得ることも、当技術分野で理解されている。米国特許第4,554,101号（それへの明示的な参照により全体として本明細書に特に組み込まれる）は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大の局所平均親水性がタンパク質の生物学的特性と相関していることを述べている。

#### 【0171】

米国特許第4,554,101号に詳細に述べられているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている。アルギニン(+3.0)、リシン(+3.0)、アスパルテート(+3.0±1)、グルタメート(+3.0±1)、セリン(+0.3)、アスパラギン(+0.2)、グルタミン(+0.2)、グリシン(0)、スレオニン(-0.4)、プロリン(-0.5±1)、アラニン(-0.5)、ヒスチジン(-0.5)、システイン(-1.0)、メチオニン(-1.3)、バリン(-1.5)、ロイシン(-1.8)、イソロイシン(-1.8)、チロシン(-2.3)、フェニルアラニン(-2.5)、トリプトファン(-3.4)。アミノ酸を同様の親水性値を有する別のアミノ酸で置換し、それでも生物学的に等価な、特に免疫学的に等価なタンパク質を得ることができることが理解される。そのような変更において、その親水性値が $\pm 2$ 以内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内のものが特に好ましく、 $\pm 0.5$ 以内のものがさらにより特に好ましい。

10

#### 【0172】

したがって、上に概要を示したように、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸の側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさ等に基づいている。上記の特徴の1または複数を考慮に入れた例示的な置換は当業者には周知であり、アルギニンとリシン、グルタメートとアスパルテート、セリンとスレオニン、グルタミンとアスパラギン、およびバリン、ロイシンとイソロイシンを含む。

20

#### 【0173】

全体で使用したセクションの見出しあは構成上の目的のみのためのものであって、記述した主題を限定すると解釈すべきではない。本出願に引用した全ての文書、または文書の一部（これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含む）は、それに対する明示的な参照により全体として本明細書に明示的に組み込まれる。組み込まれた文献および同様の資料の1または複数が本出願における用語の定義と矛盾する様式での用語を定義した場合には、本出願が優先する。

30

#### 【実施例】

#### 【0174】

以下の実施例は、本発明の例示的な実施形態を実証するために含まれる。これらの実施例に開示される技術は、本発明の実施において良好に機能することが発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましいモードを構成するとみなすことができるこことを当業者は理解するべきである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、開示された特定の実施形態に多くの変更を加えることができ、それでも本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果を得ることを理解すべきである。

40

#### （実施例1）

リポポリプレックスはmRNAに基づくワクチンの抗腫瘍免疫を増強する

#### 【0175】

この実施例では、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン/1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-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-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000(EDOPC/DOPE/DSPE-PEG)脂質シェルにカプセル化されたポリ-(アミノエステル)ポリマーmRNAコアからなるリポポリプレックスmRNAワクチンが記載されている。このコアシェル構造化mRNAワ

50

クチンは、マクロピノサイトーシスにより樹状細胞に入る。それは、Toll様受容体7/8シグナル伝達を介して樹状細胞におけるインターフェロン- $\alpha$ およびインターロイキン-12の発現を強力に刺激することにより、固有のアジュバント活性を示した。mRNAワクチンで処置した樹状細胞は、抗原提示能力の強化を示した。オボアルブミン抗原を発現する肺転移性B16-OVA腫瘍を担持するマウスをリポポリプレックスmRNAで処置し、腫瘍結節の90%を超える減少が観察された。まとめると、このコアシェル構造は、mRNAワクチンを哺乳動物細胞に送達するための優れたシステムを提供する。

#### 【0176】

図1Aは、本発明の一態様による例示的なシェル/コア-mRNAリポポリプレックスワクチン組成物の合成を概略的に示す。シェル/コア-mRNAワクチンでは、負電荷mRNAが正電荷ポリマーの内部に凝縮し、それらはともに直径数ナノメートルから数百ナノメートルのタイトなポリプレックス「コア」構造を形成した。次いで、このポリプレックスコアは、両方が樹状細胞による取り込みを強化し、細胞内ヌクレアーゼによる分解から内部コア内のmRNA分子を保護する親水性のリン脂質二重層「シェル」によってカプセル化された。得られた3成分シェル/コア/mRNA組成物は、1または複数の可溶性アジュバントをポリプレックス-mRNA内部コアと外部脂質シェルの間の空間に入ることによりさらに修飾し、抗腫瘍免疫をさらに増強することができた。

#### 【0177】

本明細書に記載される結果は、従来の圧縮コア-mRNAワクチンと比較して、開示されたシェル/コア-mRNA-ポリプレックス構造化ワクチンシステムの複数の利点を明らかにする。ポリプレックスコア-mRNA粒子をリン脂質外側シェルにカプセル化すると、コアmRNA分子が分解から保護されるだけでなく、抗原提示樹状細胞によるワクチン粒子の取り込みが有意に改善された(図1A)。さらに、コアをカプセル化する脂質シェル構造の存在により、コア-mRNA分子が非DC免疫細胞と相互作用することが妨げられ、潜在的な望ましくない副作用が制限された。さらに、本明細書に開示されるLPP-mRNAワクチン組成物は、IFN- $\alpha$ およびIL-12(DC成熟の促進を通じて抗腫瘍免疫を媒介するのに重要な役割を果たすサイトカイン)の発現を刺激することにおいて、従来の「裸の」mRNAコアワクチンよりも強力であった(図4A)。さらに、LPP-mRNAワクチンは、腫瘍細胞の殺滅を媒介するのに非常に強力であった。最後に、本明細書に記載されるシェル/コア/mRNA多成分ワクチン組成物はまた、抗原提示細胞の活性をさらに増強する必要がある場合は常に、脂質シェルに可溶性アジュバントまたは他の刺激分子をカプセル化するための効果的な選択肢をも提供した。これらの特性は全て、急速に進化する精密医学の時代における新しい免疫療法薬の創出におけるこの治療ワクチンプラットフォームの有用性を強調している。

#### 材料および方法

#### 【0178】

ポリ-( $\epsilon$ -アミノエステル)ポリマー(PbAE)の合成。PbAE(MW約4kDa)は、これまでに記載された(Kamatara, 2013年)ような、2段階の反応手順で合成された。第1のステップでは、1,4-ブタンジオールジアクリレート(Sigma-Aldrich)と5-アミノ-1-ペンタノール(Sigma-Aldrich)を1.2:1のモル比で混合することにより、ベースポリマーを合成した。この反応は、テフロン(登録商標)攪拌棒を備えたガラスシンチレーションバイアル内で、90度24時間維持した。ベースポリマーを乾燥させ、次いで、無水ジメチルスルホキシド(DMSO)に167mg/mLの最終濃度で溶解した。第2のステップでは、1.5mLのエッペンドルフチューブで480 $\mu$ Lのベースポリマー溶液を320 $\mu$ Lの0.5mol/Lの(PEO)4-ビス-アミン(Molecular Biosciences, Boulders, CO, USA)と混合し、室温で24時間反応させた。ポリマー混合物を最初に透析チューブ(MWCO 3,500Da)に入れミリQ水に対して透析して、大量の遊離試薬を除去し、次いで4倍容量のエチルエーテル(Sigma-Aldrich)と混合し、激しくボルテックスした後、4,000rpmで5分間遠心分離し、上清中の

10

20

30

40

50

未反応モノマーをさらに除去した。精製したポリマーを真空乾燥した後、25 mM酢酸ナトリウム、pH 5.2に溶解した。

【0179】

PbAЕ / mRNAポリプレックスの調製。PbAЕ / mRNAポリプレックスは、1容量のPbAЕポリマーと2容量のmRNA分子 (TriLink Biotechnologies、San Diego、CA、USA)を混合することにより調製した。20で20分間インキュベートした後、Malvern Zetasizer Nano ZS動的光散乱装置 (Malvern Instruments, Inc.、Worcestershire、UNITED KINGDOM)を使用して、サイズ分布とゼータ電位についてポリプレックスを分析した。PbAЕ / mRNAポリプレックスもまた、ゲル遅延アッセイで分析した。簡潔に述べると、250 ngのmRNAを含むポリプレックス試料を各ウェルにロードし、1×TBE緩衝液 (BiORad、Hercules、CA、USA)を含む0.7%アガロースゲルでの電気泳動により分離した。RNAバンドをGel red核酸ゲル染色 (Biotium、Hayward、CA、USA)で染色し、GelDocシステム (BiORad、Hercules、CA、USA)で可視化した。

10

【0180】

LPP / mRNAワクチンの調製と特徴付け。脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (EDOPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン (DOPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000 (DSPE-PEG-2000)、コレステリルヘミスクシネート (CHEMS)、および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)はAvanti Polar Lipids (Birmingham、AL、USA)から購入した。コレステロールは、Sigma-Aldrich (St. Louis、MO、USA)から入手した。試薬を20 mg / mLの最終濃度でクロロホルムに溶解し、部分真空中でBuchi Rotavapor (Oldham、UNITED KINGDOM)に適用して回転蒸発により薄い脂質フィルムを調製した。薄い脂質フィルムは、49%EDOPC、49%DOPE、および2%DSPE-PEGで構成されていた。脂質フィルムをPbAЕ / mRNAポリプレックスを含む溶液で再水和して、リポポリプレックスmRNAワクチンを調製した。LPP / mRNAワクチンのサイズ分布とゼータ電位を、DLSと透過型電子顕微鏡法 (TEM)で測定した。同じ手順を適用して、CHEMS / DOPE / オクタアルギニン (CHEMS / DOPE / R8)およびDOTAP / コlesteroール / DSPE-PEG-2000 (DOTAP / Chol / DSPE-PEG-2000)リポポリプレックスを調製した。プロタミン / mRNAポリプレックスを調製するために、硫酸プロタミン (グレードX、Sigma-Aldrich)をmRNAと2:1の重量比で10 mMのTris-HCl緩衝液中で混合し、続いて室温で30分間インキュベートした。

20

【0181】

in vitroでのLPP / mRNAワクチンの細胞取り込み。不死化DC2.4(マウス骨髄由来樹状細胞株)細胞を、LPP / mRNAワクチンからのタンパク質発現の試験に適用した。簡潔に述べると、細胞を $1.5 \times 10^5$ 細胞 / ウェルの播種密度で24ウェルプレートに播種し、1 mLのRPMI-1640完全培地 (10%ウシ胎仔血清 [FBS、Atlas Biological、Fort Collins、CO、USA]、1%ペニシリン / ストレプトマイシン [10,000単位のペニシリンと10 mgのストレプトマイシン、Sigma-Aldrich]、および0.1%の-メルカプトエタノール [Sigma-Aldrich])中で維持した。細胞を0.5  $\mu$ gのeGFP mRNA (LPP / eGFP mRNA)をパッケージ化したLPPとともに24時間インキュベートし、Eclipse TE2000-S蛍光顕微鏡 (株式会社ニコン、東京、日本)を使用してeGFP発現を視覚化した。GFP陽性細胞のパーセンテージを測定

30

40

50

するために、Accuri C6 フローサイトメーター (Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) を使用してフローサイトメトリーを実施した。同じ手順を適用して、ヒトMDA-MB-231 乳がん細胞 (アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関; Manassas、VA、USA) およびマウスMDMEC 皮膚内皮細胞をそれぞれ LPP / eGFP mRNA とインキュベートした後に、それらの細胞において eGFP 発現を決定した。

【0182】

LPP / mRNA ワクチンの細胞内在化の経路を決定するため、DC2.4 細胞を  $1.5 \times 10^5$  細胞 / ウェルの密度で 24 ウェルプレートに播種し、37 度で 24 時間インキュベートした。次いで、それらを、LPP (LPP / FAM-mRNA) 中にパッケージ化された FAM 標識 mRNA および次の小分子阻害剤: アミロリド (0.2 mM)、クロロキン (100 mM)、ゲニステイン (50 μM)、クロルプロマジン (15 μM)、またはピモジド (10 μM) のうちの 1 つで処置した。細胞を 4 時間成長させた後、それらを氷冷 PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡法によって粒子取り込みを決定するのに適用した。

10

【0183】

in vitro での LPP / mRNA からの細胞毒性。LPP / mRNA ワクチンの潜在的な細胞毒性を試験するために、DC2.4、MDA-MB-231、および内皮細胞を  $3 \times 10^4$  細胞 / ウェルの播種密度で 96 ウェルプレートに播種し、LPP / 0.1 μg の mRNA で処置した。24 時間後、テトラゾリウムに基づく CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution 細胞増殖 (MTS) アッセイ (Promega, Inc., Madison, WI, USA) で、製造者の指示に従って細胞生存率を測定した。

20

【0184】

骨髓由来樹状細胞 (BMDC) の調製。BMDC は、これまでに記載された (Xiala、2015 年) ように C57BL/6 マウスから調製した。簡潔に述べると、大腿骨および脛骨からの骨髓細胞を、シリングを使用して 2% FBS 含有リン酸緩衝食塩水 (PBS) で流し出した。細胞を  $500 \times g$  で 4 分間遠心分離し、ACK 溶解緩衝液 (Lonza, Inc.) で処置して赤血球を除去し、10% FBS、0.5% の - メルカプトエタノール、1% のペニシリン / ストレプトマイシン、20ng / mL の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、20ng / mL のインターロイキン-4 (IL-4) を補充した RPMI-1640 培養培地に再懸濁した。それらを、 $1 \times 10^6$  細胞 / mL の播種密度で 6 ウェルプレートに播種し、1 日おきに成長培地を交換した。非接着樹状細胞を 5 日目に採取した。

30

【0185】

炎症促進性サイトカインの測定。BMDC を  $3 \times 10^5$  細胞 / ウェルの密度で 24 ウェルプレートに播種し、LPP / 0.5 μg の OVA mRNA で処置した。LPP / mRNA ワクチンの分解された成分 (リポソームシェルとポリブレックスコア) は、陰性対照として機能した。24 時間のインキュベーション後、上清を収集し、サイトカイン測定用の ELISA キット (eBioscience, San Diego, CA, USA) で IL-6、TNF-、IFN-、および IL-12 濃度を測定した。

40

【0186】

TLR7/8 阻害。DC2.4 細胞を  $1.5 \times 10^5$  細胞 / 1 mL RPMI-1640 完全培地の密度で 24 ウェルプレートに播種し、37 度で 24 時間インキュベートした。次いで、細胞を、37 度で 1 時間、終濃度 2.5 μM の TLR7/8 阻害剤 ODN2087 (Millipore Biotech, San Diego, CA, USA) で処置した。その後、LPP / 0.5 μg OVA mRNA を培養物に添加し、細胞成長をさらに 24 時間維持した後、サイトカイン分析のために細胞培地を収集した。TLR 阻害剤処置のない樹状細胞は陽性対照として機能し、LPP / OVA mRNA 処置のない細胞を陰性対照として使用した。

【0187】

50

樹状細胞成熟の評価。DC2.4細胞を、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、1mLのRPMI完全培地を供給した。それらをLPP/0.5 $\mu$ g mRNAで処置し、37℃で24時間インキュベートした。次いで、細胞をPBSで洗浄し、CD11c、CD40、CD86、およびMHC IIに特異的な抗体(BD Bioscience)で染色し、BD Accuri C6フローサイトメーター(Becton Dickinson, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA)によるフローサイトメトリー分析に適用した。

#### 【0188】

MHC IおよびII拘束性抗原提示アッセイ。抗原提示を測定するために、LPP/OVA mRNAで処置したBMDCをOVA257-264-H-2Kb複合体(H-2Kb/SIINFEKL, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を認識する五量体によって室温で10分間染色した。次いで、細胞を抗CD11c抗体(BD Bioscience)で30分間染色し、Accuri C6フローサイトメーターを使用して分析した。

#### 【0189】

T細胞の活性化を決定するために、BMDCおよびDC2.4細胞をLPP/0.5 $\mu$ g OVA mRNAで24時間処置した。細胞をPBSで洗浄し、DC/T細胞比1:1でB3Z OVA特異的CD8T細胞またはDOBW OVA特異的CD4T細胞のいずれかと共に培養した。ELISAを実施して、活性化T細胞によるIL-2分泌を測定した。全ての試料を三重で測定した。

#### 【0190】

細胞傷害性T細胞によるB16-OVA黒色腫細胞のin vitroでの殺滅。DC2.4を、 $1.5 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種した。一晩インキュベートした後、細胞を37℃で24時間、LPP/0.5 $\mu$ g OVA mRNAで処置した。続いて、これらのDC2.4細胞をDC2.4/T細胞比1:2でB3Z T細胞と共に培養した。24時間のインキュベーション後、活性化されたT細胞を、37℃で4、8、または24時間、T細胞/腫瘍細胞比5:1でのB16黒色腫細胞との共培養に適用した。次いで、上記のように、MTSホルマザン生存率アッセイ(Promega, Inc., Madison, WI, USA)を使用して、腫瘍細胞の生存率を決定した。非活性化T細胞またはHER2乳がん抗原ペプチドで活性化されたT細胞で処置した腫瘍細胞は、陰性対照として機能した。全ての試料を三重で測定した。

#### 【0191】

肺転移黒色腫のマウスモデルにおける有効性試験。8週齢のオスおよびメスのC57BL/6マウスに、尾静脈注射により $2.5 \times 10^5$ 個のB16-OVA黒色腫腫瘍細胞を接種し、これまでに記載されたプロトコール(OverwijkおよびRestifo, 2001年)に従って肺転移腫瘍を確立した。腫瘍接種の3日後に、LPP/OVA mRNA(1 $\mu$ g)をマウスの皮下にワクチン接種した。7日目と10日目にさらに2回接種してワクチン接種をブーストした。マウスを18日目に安樂死させ、肺を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。肺転移腫瘍結節の数を解剖顕微鏡下で数えた。

#### 【0192】

生きているマウスの生物発光イメージング。BALB/cマウスに、LPPへとロードした10 $\mu$ gのルシフェラーゼmRNA(LPP/Luc mRNA)を皮下投与した。24時間または48時間後に、30 $\mu$ gのRediject D-luciferin Ultra(Perkin-Elmer)をマウスに腹腔内注射し、Xenogen IVIS-200イメージングシステムで生物発光を測定した。

#### 【0193】

肺転移黒色腫のマウスモデルにおける有効性試験。8週齢のオスおよびメスのC57BL/6マウスに、尾静脈注射により $2.5 \times 10^5$ 個のB16-OVA黒色腫腫瘍細胞を接種し、肺転移腫瘍を確立した。腫瘍接種の3日後に、LPP/OVA mRNA(1mg)をマウスの皮下にワクチン接種した。7日目と10日目にさらに2回接種してワクチ

10

20

30

40

50

ン接種をブーストした。マウスを18日目に安樂死させ、肺を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。肺転移腫瘍結節の数を解剖顕微鏡下で数えた。

#### 【0194】

in vivoのT細胞活性化分析。T細胞活性化状態を決定するために、C57BL/6マウスを、2.5mgのLPP/OVA mRNAによりs.c.で免疫した。表面マーカーによりT細胞活性化を決定するために、マウスを24時間後に安樂死させ、脾臓およびリンパ節を収集し、処理し、抗マウスCD3、CD4、CD8、またはCD69抗体(Ebioscience)により4で30分間染色し、次いで、BD Accuri C6フローサイトメーター(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を使用したフローサイトメトリーで分析した。IFN- 分泌によるT細胞の活性化を測定するために、1、4、7日目に、C57BL/6マウスを、LPP/OVA mRNAまたはLPP/TRP2 mRNAによりs.c.で免疫した。最後の免疫の1週間後、脾臓、リンパ節、およびPBMCを収集し、単一細胞分析のために処理した。37で48時間、OT-I(OVA257-264)、OT-II(OVA323-339)、またはPMA-イオノマイシンで細胞を再刺激した。IFN- 分泌はELISA(eBioscience)によって分析した。

#### 【0195】

統計解析。実験群間の比較には、両側スチュードントのt検定が適用された。P < 0.05を統計学的に有意とみなした。

#### 結果

#### 【0196】

リボポリプレックスに基づくmRNAワクチンは、樹状細胞の取り込みとタンパク質の発現に最適である。脂質二重層エンベロープ中にパッケージ化されたPbAE/mRNAポリプレックスコア構造を含むmRNAに基づくワクチンのプラットフォームが記載されている(図1A)。カチオン性PbAEポリマーに対するmRNAの結合能を調べるためにアガロースゲル電気泳動を実施し、PbAE/mRNA比(wt./wt.)が20またはそれより大きいときにmRNAがPbAEに完全にカプセル化されていることが確認された(図1B)。その結果、研究の残りの部分でLPP mRNAワクチンを調製するために、20のPbAE/mRNA比が選択された。TEM分析は、EDOPC/DOP-E/DSPE-PEG-2000脂質シェルに囲まれた50nmのPbAE/mRNAポリプレックスコア(図1C)を検出した(図1D、図1E、および図1F)。

#### 【0197】

LPP/mRNAワクチンの脂質シェルは、EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000、DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000、およびCHEMS/DOPE/R8の間で比較された。DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000はカチオン性脂質シェルを形成し、CHEMS/DOPE/R8は活性な標的化部分を持つ脂質シェルであり；どちらもこれまでにRNA送達に適用されていた(Wangら、2013年; Hayashiら、2015年)。DC2.4は抗原提示細胞として機能し、eGFPタンパク質をコードするmRNA分子は、ポリプレックスコアを調製するために適用された。PbAE/mRNAコアとともにインキュベートした細胞は、検出可能なレベルのeGFPを発現しなかった(図1G)。EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000およびDOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000でパッケージ化した粒子で処置した細胞は明るいeGFPタンパク質を発現したが、CHEMS/DOPE/R8でパッケージ化したポリプレックスとインキュベートしたものは検出可能なレベルのeGFPを有さなかった(図1H、図1I、および図J)。興味深いことに、プロタミンに基づくmRNAワクチンは臨床試験の種々の段階にある(KallenおよびTheiss、2014年)が、プロタミン/eGFPで処置した細胞はeGFP発現レベルも高くなかった(図1K)。さらに、DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000製剤から高レベルの細胞毒性が検出された(図1L)。結果として、EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000は、全ての追跡調査でLPP/mRNAワクチンの調製に

10

20

30

40

50

選択された。

【0198】

L P P / m R N A ワクチンは、マクロピノサイトーシスにより樹状細胞に入る。種々の細胞型によるL P P / m R N A ワクチン粒子の取り込みが調査された。P b A E / e G F P m R N A でパッケージ化された等量のE D O P C / D O P E / D S P E - P E G - 2 0 0 0 粒子をD C 2 . 4 細胞、M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳がん細胞、またはm D M E C マウス内皮細胞の培養物に添加し、2 4 時間後に、e G F P を発現する細胞を検出した。D C は高い食作用の潜在能を有する最も効果的な抗原提示細胞であるという概念 (B a n c h e r e a u およびS t e i n m a n 、1 9 9 8 年) と合致して、全てのD C 2 . 4 細胞はワクチン粒子を内在化し、緑色蛍光タンパク質を発現したが、比較して、M D A - M B - 2 3 1 細胞の約半数がG F P 陽性であり、内皮細胞のごく一部のみがG F P を合成した (図2)。

【0199】

細胞取り込みのメカニズムは、D C 2 . 4 細胞をエンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、および食作用の阻害剤で処置することによって調べた。マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロリド (K o i v u s a l o r a 、2 0 1 0 年) による処置は、E D O P C / D O P E / D S P E - P E G - 2 0 0 0 でパッケージ化されたF A M 蛍光色素標識m R N A (L P P / F A M - m R N A ) の細胞取り込みを7 0 % 減少させた。比較して、粒子の細胞取り込みは、カベオリン媒介性エンドサイトーシスの阻害剤であるゲニステイン；クラスリン媒介性エンドサイトーシスの阻害剤であるクロルプロマジン；または食作用の阻害剤であるピモジドによって有意には影響されなかった (図3 A、図3 B、図3 C、図3 D、図3 E、図3 F、および図3 G を参照されたい)。

【0200】

これらの結果は、開示されたL P P m R N A に基づくワクチンの細胞進入の主要経路がマクロピノサイトーシスであることを示唆した。重要なことに、エンドソームの酸性化と成熟を防止する試薬であるクロロキンは、m R N A の蓄積に影響しなかった (図3 A、図3 B、図3 C、図3 D、図3 E、図3 F、および図3 G)。クロロキン処置した細胞の時間依存的なモニタリングは、蛍光強度の遅延した増加を示し、ピーク強度はインキュベーション後1 2 0 分に達した (図3 H)。この結果は、m R N A 分子が首尾よくエンドソームを出てサイトゾルに入ったことを示した。

【0201】

L P P m R N A ワクチンはD C 成熟を促進する。過剰発現したオボアルブミン (O V A ) を有するマウス腫瘍モデルは、がんワクチンの有効性を試験するために広く適用されている (K i m ら、2 0 1 5 年；A v c i ら、2 0 1 1 年；U h l i g ら、2 0 1 5 年)。O V A m R N A を、治療用m R N A ワクチン (L P P / O V A ) を組み立てるのに適用し、i n v i t r o およびi n v i v o で抗腫瘍免疫を調べた。i n v i t r o の環境では、骨髄由来D C (B M D C ) をL P P / O V A または対照のいずれかとともに共インキュベートし、細胞成長培地中のサイトカインレベルを測定した。興味深いことに、ポリプレックス/O V A コアとL P P / O V A の両方が、プロタミン/O V A とともに、有意なT N F - 発現を誘発し得た (図4 A)。T N F - 依存性D C 成熟は、ウイルス感染に対する適応免疫応答の活性化 (T r e v e j o ら、2 0 0 1 年) および抗腫瘍免疫 (B r u n n e r ら、2 0 0 0 年) に重要であることがこれまでに報告されている。しかしながら、ポリプレックス/O V A とプロタミン/O V A のいずれも、I F N - およびI L - 1 2 発現を刺激することについてL P P / O V A 程に強力ではなかった (図4 A)。I 型インターフェロンI F N - は、D C の成熟、抗原プロセシングと提示、およびT 細胞のクローニング増殖の刺激を促進することがこれまでに示されている (X i a ら、2 0 1 5 年)。同様に、I L - 1 2 はT h 1 サイトカインの1つであり (M i l l s およびL e y 、2 0 1 4 年)、I L - 1 2 を産生するD C はI 型C D 8 + T 細胞の免疫を促進する (C a r r e n o ら、2 0 1 3 年；C a r r e n o ら、2 0 1 5 年)。結果は、ワクチンからのアジュバント効果を最大化するために、ポリプレックス/m R N A コアと脂質シェル

10

20

30

40

50

の両方が必要であることを示す。LPP/mRNAを介したアジュバント効果は、プロタミン凝縮mRNA粒子 (Scheelら、2005年; Fotin-Mleczekら、1997年) と合致して、TLR-7/8シグナル伝達の活性化により媒介された。なぜなら、短い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドTLR7/8阻害剤であるODN2087による処置が、LPP/OVA刺激のIL-12およびIFN- $\gamma$ の発現を完全に抑制した(図4B)からである。

#### 【0202】

DC成熟マーカーもまた、LPP/OVA処置したDC2.4細胞で調べられた。処置後の細胞は、劇的に増加したMHC II発現のレベルを示した(図4C)。DCは、活性化すると原形質膜の抗原に由来するペプチドをロードした高レベルのMHC IIを発現することが報告されている(TrombettaおよびMellman、2005年)。さらに、他のDC成熟マーカーであるCD40およびCD86のレベルもまた、処置された細胞で高かった(図4C)。

10

#### 【0203】

LPP mRNAワクチンは抗原提示を刺激する。抗原プロセシングおよび提示は、LPP/OVAで処置されたBMDCSで分析された。フローサイトメトリーは、細胞表面にMHC I-OVAエピトープをも提示するCD11c<sup>+</sup>DCを検出した(図5A)。処置後の細胞をOVA特異的CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞と共にインキュベートするとき、抗原特異的T細胞によるIL-2分泌の有意な増加が検出され(図5B)、DCが、T細胞によって認識され得るOVAエピトープを首尾よくプロセシングおよび提示したことが示された。これらの結果は、BMDCがmRNA抗原を適切に翻訳し、ならびに、抗原エピトープをプロセシングして提示することができることを実証した。別の研究では、同様の効果が処置後のDC2.4細胞で観察された(図5C)。

20

#### 【0204】

LPP mRNAワクチンは強力な抗腫瘍活性を有する。in vitroでの腫瘍細胞殺滅を試験するために、活性化OVA特異的T細胞をエフェクターT細胞/腫瘍細胞比5:1でB16-OVA黒色腫細胞と共に培養し、時間依存的な腫瘍細胞殺滅を調べた。B16-OVA腫瘍細胞の生存率の有意な低下が、共インキュベーション後4時間で観察され、ほとんどの腫瘍細胞は24時間の時点までに死滅した(図6A)。

30

#### 【0205】

比較して、ナイーブT細胞で処置した腫瘍細胞は、有意な細胞死を示さなかった。抗原特異的な腫瘍細胞の殺滅を確認するために、B16-OVA細胞をHER2乳がん抗原に特異的であるがOVAに特異的ではないT細胞と共にインキュベートしたが、細胞死は観察されなかった。

#### 【0206】

抗腫瘍活性は、B16-OVA黒色腫肺転移モデルでさらに評価された。マウスをLPP/OVAの皮下注射で3回処置し、最後の処置の8日後に安樂死させて肺の腫瘍成長を調べた。PBS対照群のマウスは、広範な肺転移を発症し；比較して、LPP/OVA mRNAで処置したマウスは、肺の腫瘍結節の数が96%減少し(図6B)、転移性腫瘍の処置におけるLPP mRNAワクチンの力を実証した。

40

#### 【0207】

別の研究では、B16黒色腫を担持するC57BL6マウスを、TRP2を標的とする別のmRNAワクチン(LPP/TRP2 mRNA)で処置した。PBMCによる有意なレベルのIFN- $\gamma$ 発現がワクチン接種されたマウスで検出された。全PBMCの約4%がTRP2特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞であった。これらの結果は、LPP/mRNAプラットフォームが1つの特定のmRNAだけに限定されないことを示しており、がんに対する戦いでの幅広い応用の潜在性を示している。

#### (実施例2)

リポポリブレックスはmRNAに基づくワクチンの抗腫瘍免疫を増強する

#### 【0208】

50

図 8 A および図 8 B は、非標的化および標的化の m RNA ワクチン粒子のサイズ分布を示す。標的化 m RNA ワクチンは、脂質シェルの表面にマンノースを有する。樹状細胞はマンノース受容体を発現するため、表面にマンノース部分を有する粒子に高い結合親和性で結合する傾向がある。それは、非標的化 m RNA ワクチンと同じ手順に従って調製された。シェルの脂質組成は、49% E D O P C、49% D O P E、1% D S P E - P E G、および 1% D S P E - P E G - マンノースである。非標的化および標的化の m RNA ワクチン粒子の両方は 40 ~ 200 nm の範囲内にあり、標的化された粒子の中間のサイズは非標的化のものよりも大きい。

#### 【 0 2 0 9 】

図 12 A および図 12 B は、樹状細胞が非標的化 m RNA ワクチンよりも効果的に標的化 m RNA ワクチンを取り込むことを示している。標的化 m RNA ワクチンは、脂質シェルの表面にマンノースを有する。それは、非標的化 m RNA ワクチンと同じ手順に従って調製された。シェルの脂質組成は、49% E D O P C、49% D O P E、1% D S P E - P E G、および 1% D S P E - P E G - マンノースである。Cy 5 蛍光色素標識 m RNA 分子は、非標的化ワクチンまたは標的化ワクチン中にパッケージ化された。ワクチンを D C 2 . 4 細胞（不死化樹状細胞株）とともに 4 時間インキュベートし、フローサイトメトリーを実施して、蛍光ワクチン粒子を取り込んだ細胞を検出した。蛍光 m RNA ワクチンを内在化した D C 2 . 4 細胞のパーセンテージを図 12 A に示し、一方で、図 12 B は、D C 2 . 4 細胞の総蛍光強度を示している。これらの結果は、親和性部分（即ち、マンノース）の表面コンジュゲーションが、ワクチン粒子の樹状細胞の取り込みを増強する効果的なアプローチであることを示した。

#### 【 0 2 1 0 】

図 17 は、I D O 1 阻害剤が、樹状細胞による抗原提示を増強したことを示す。m RNA ワクチンは、O V A m RNA コアと I D O 1 阻害剤 I N C B 0 2 4 3 6 0 の両方を脂質シェル内部にカプセル化することにより調製された。I N C B 0 2 4 3 6 0 を含むまたは含まない m RNA ワクチンを使用して B M D C を処置し、次に、B M D C を B 3 Z O V A 特異的 T 細胞との共インキュベートに適用した。刺激された T 細胞は I L - 2 を成長培地に分泌し、E L I S A を、I L - 2 レベルの測定に適用した。結果に基づくと、I D O 1 阻害剤を含めることで、T 細胞の活性化をさらに刺激することができる。

#### 【 0 2 1 1 】

図 18 A および図 18 B は、O V A m RNA ワクチンからの抗腫瘍免疫応答を示す。C 5 7 B L 6 マウスは、1、4、および 7 日目に O V A タンパク質または O V A m RNA ワクチンのいずれかで処置した。最後の処置の 1 週間後、マウスを安樂死させ、脾臓、リンパ節、および末梢血試料を収集した。（図 18 A）脾臓およびリンパ節から調製した単一細胞を O T I (O V A 2 5 7 - 2 6 4 0 ) または O T I I (O V A 3 2 3 - 3 3 9 ) ペプチドで 48 時間再刺激し、E L I S A を、培地中の分泌されたインターフェロン - レベルを測定するのに適用した。（図 18 B）末梢血からの T 細胞を B 1 6 - O V A 腫瘍細胞と共にインキュベートし、24 時間後に細胞生存率を測定した。この結果は、O V A タンパク質ではなく O V A m RNA ワクチンによる処置が、抗原を発現する腫瘍細胞の殺滅に有効な O V A 抗原特異的 T 細胞の生成を促進することを示している。

#### （実施例 3 ）

m RNA ワクチンプラットフォームの一般化した説明

#### 【 0 2 1 2 】

図 20 は、本明細書に開示される m RNA ワクチンプラットフォームの全体的な説明を示す。ワクチンは、好ましくは、親水性「シェル」構造（リポソーム二重層で構成され、その中にコア構造を効率的にカプセル化するよう組み立てる）内に含まれる複数の疎水性「コア」構造（各々が目的の抗原をコードする少なくとも 1 つの m RNA を含む）で構成される。疎水性「コア」は、好ましくは負電荷 m RNA 分子と正電荷ポリプレックス（例えば、P b A E ）またはタンパク質（例えば、プロタミン）分子の集団を含み、親水性「シェル」は、好ましくは事前に選択され最適化された比の、脂質および / またはリン脂質

10

20

30

40

50

の組合せで構成される。特定の実施形態では、1または複数の親和性部分（例えば、マンノースなどの糖部分、結合タンパク質、または1つもしくは複数のDC発現エピトープに特異的な抗体）を脂質シェルの表面にコンジュゲートして、ワクチン粒子と、ワクチンのコア／シェル複合体が標的とする抗原提示細胞（樹状細胞、マクロファージ、およびB細胞など）との間の相互作用を強化する、および／またはその間の結合を増加させることによって、脂質シェルの表面を「機能化」することが望ましい場合がある。mRNAを含む内部コアと外側のリポソーム二重層シェルとの間に形成される「サイトゾル」空間はまた、1または複数のサイトカイン（例えば、CpG）、タンパク質（例えば、FLT3L）、または小分子（例えば、IDO-1阻害剤などの免疫調節剤）を含むように最適化し、それにより、選択された細胞および患者におけるワクチンの活性をさらに増強／拡張することができる。

10

#### 【0213】

好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療組成物用のシェル／コア送達構築物を調製する際に最も望ましい結果を提供するために、20:1のポリマー対mRNA分子（または、あるいは1:1のプロタミン対mRNA分子）の比が決定された。同様に、約1μgのmRNA対2μgのプロタミン対20μgの脂質の比が、ヒト投与用のワクチンの製剤化に特に有利であることが示された。

##### （実施例4）

2つのmRNAを、デュアル免疫療法のために単一シェル中に共パッケージ化することができる

20

#### 【0214】

図21に示す研究では、500ngのOVA mRNAを、増加する量のIL12p70をコードするmRNAと混合して、プロタミン／mRNAコアを調製し、その後、コアを脂質シェル中にパッケージ化した。そのため、得られたmRNAワクチンには、OVA抗原をコードするmRNAと樹状細胞刺激サイトカインIL12p70をコードするmRNAの2つの異なるmRNA分子が含まれていた。DC2.4細胞を最初にmRNAワクチンで処置し、次いでB3Z OVA特異的T細胞とともに共インキュベートした。細胞成長培地中のIL-2レベルは24時間後に測定された。結果は、500ngのIL12p70 mRNAの共パッケージ化がワクチン活性をブーストすることを示した。これにより、1) 1つのワクチン粒子に2つの異なる種類のmRNA分子をパッケージ化できること；および2) 2種類のmRNA分子が異なる目的 - 一方が抗原産生、他方が樹状細胞刺激に役立ち得ること、が実証された。

30

#### 【0215】

この結果は、特に特定の患者向けに作成された「個別化」がん免疫療法の設計に関する、本発明の重要な態様を実証した。この用途は、次の実施例で説明する研究でさらに拡張される。

##### （実施例5）

個別化がん免疫療法のためのmRNAに基づくワクチン

#### 【0216】

がんゲノムからの体細胞変異の同定と免疫原性腫瘍変異の予測の進歩により、個別化がん免疫療法用の治療用ワクチンを開発する前例のない機会が提供された。しかしながら、所定の腫瘍で不均質な変異スペクトルを持つがん細胞を標的とするために、従来のタンパク質ベースまたはペプチドに基づくワクチンを準備することは困難な作業である。開示されるmRNAワクチンプラットフォームは、この目的のために特別に設計されている。ここでは、この非常に効果的なプラットフォームを使用して、患者固有のがんゲノムの特徴に基づいてカスタマイズされたワクチン接種により、個別化された乳がん処置を達成できるという仮説を検証した。

40

#### 【0217】

この実施例では、乳がんの研究における3つの主要な課題に対処している。

a) より効果的で毒性が低く、生存期間に影響を与える処置レジメンに置き換えること

50

により、処置レジメンに革命をもたらすこと；

b ) 転移性乳がんに関する死亡率を排除すること；および

c ) 乳がん細胞が何年も休眠状態であり、その後再出現する理由と方法を解明し、この情報を使用してそのような再発を防止すること。

【0218】

がん免疫療法は、近年、複数の種類のがんで前例のない臨床的有効性を達成している。しかし、免疫療法の恩恵を受けるのは少数のがん患者のみであり、多くの患者は効果的な抗腫瘍免疫応答に応答しないか、それを高めることができない。腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の存在が予後マーカーとして機能し、免疫療法および化学療法を含む種々の治療法への応答を予測することを一連の複数の証拠が示している。TILを欠く腫瘍は「非炎症性」と特徴付けられており、一般的に処置の失敗や予後不良と相関している。例えば、TILが比較的少ない乳がん患者におけるチェックポイント遮断抗体の有効性は、「炎症性」として特徴付けられるTILが豊富な腫瘍タイプである、黒色腫または非小細胞肺癌の患者におけるそれと比較してはるかに効果的ではない。したがって、T細胞浸潤を促進し、腫瘍微小環境におけるT細胞の機能を維持する手段は、特に乳がんを含む「非炎症性」の腫瘍タイプに対する効果的な免疫療法の開発に焦点を当てている。

10

【0219】

治療用がんワクチンは、強力な抗腫瘍免疫を刺激する潜在能を有する。最近の研究では、p66 HER2抗原ペプチドを含むナノテクノロジーに基づく樹状細胞ワクチン（ナノDCワクチン）を使用して、HER2陽性乳がんを標的とし、乳がんのマウスモデルでHER2陽性腫瘍成長を強力に阻害する、抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の大量腫瘍浸潤とTh1に偏ったサイトカインの刺激を検出した。

20

【0220】

追跡研究では、腫瘍関連CD45<sup>+</sup>細胞集団内のCD3<sup>+</sup>T細胞の増加により示されるように、T細胞の腫瘍浸潤をさらに促進することにおける、がんワクチンによる処置と抗PD-1抗体による処置との相乗作用も実証された。

【0221】

個別化された免疫療法の新時代における治療用mRNAワクチン。乳がんの全体的な変異荷重は黒色腫または非小細胞肺癌がんほど重くはないが、560個の乳がんの全ゲノム配列の最近の研究では、93個のがん遺伝子で1,628の可能性のあるドライバー変異が同定され、エストロゲン受容体（ER）陰性の乳がんにおいて、TP53が最も一般的に変異しているドライバーがん遺伝子であった。この結果は、TP53変異がHER2陽性乳がん（72%）および基底様乳がん（80%）でより頻繁に発生するのに対し、PIK3CA変異は、他のサブタイプ（29~45%）と比べて基底様乳がん（9%）でまれであるというこれまでの報告とよく一致する。プロテアソーム切断モチーフに基づいたオンラインツールを使用して、TP53、PIK3CA、およびPTEN中のものを含むヒトとマウスのタンパク質間で100%保存された複数の細胞傷害性T細胞エピトープが同定された（表2）。これらのエピトープは、「次世代」免疫療法の開発に最良の試薬として機能し、マウス腫瘍モデルを使用した有効性研究から得られた結果は、患者の応答を予測するために直接適用できる。

30

【0222】

40

50

## 【表2】

表2  
BCにおける細胞傷害性T細胞エピトープ

ペプチドの名称	ペプチドの配列*	配列番号X
TP53-170	TEVVRRCPH	配列番号 1
TP53-170*	TEVV <u>H</u> RCPH	配列番号 2
TP53-258	TLEDSSGN	配列番号 3
TP53-258*	<u>T</u> LEDSSGN	配列番号 4
PIK3CA-106	GNREEKNRE	配列番号 5
PIK3CA-106*	GNRE <u>N</u> KNRE	配列番号 6
PIK3CA-721	QEKLKDETQK	配列番号 7
PIK3CA-721*	QEKLKD <u>K</u> TQK	配列番号 8
PTEN-63	NHYKIYNLC	配列番号 9
PTEN-63*	NHY <u>N</u> IYNLC	配列番号 10

\*野生型タンパク質のアミノ酸配列は参考として提供されており、変異アミノ酸には下線が付されている。

## 【0223】

本明細書に開示されるmRNAに基づくワクチンプラットフォームは、この目的のために理想的に開発された。ポリプレックス/mRNAコアがポリ-(-アミノエステル)ポリマー/mRNA (P-AE/mRNA) またはプロタミン/mRNAで構成されるリポソームシェル構造内のmRNAコアで構成され、リポソームシェルが中性リン脂質と正電荷リン脂質の混合物でできている、LPP mRNAワクチンを使用すると、このプラットフォームはmRNA分子からのロバストなタンパク質発現を可能にする。従来のペプチドに基づくワクチンとは対照的に、mRNAに基づくワクチンは、1つのミニ遺伝子構築物に複数の抗原エピトープを組み込むという利点があるため、個々のがんゲノムの変異スペクトルに基づいて個々の患者のニーズに合致するよう迅速にカスタマイズできる。また、それらは、従来のプラスミド由来のワクチンとは、(他の利点もある中でとりわけ)分裂細胞と非分裂細胞の両方で機能する一方でゲノム組み込みのリスクもないという点で異なっている。興味深いことに、プロタミンに基づくmRNAワクチン製品は長年にわたって試験されてきたが、裸のプロタミン/mRNAからのタンパク質抗原発現はLPP/mRNAに比べほんのわずかであった。考えられる理由は、裸の構築物のmRNA分子が血漿RNAseによる攻撃を受けやすいということである。

## 【0224】

代替的に、LPP/mRNAは、DCが抗原提示細胞の最大の抗原プロセシングおよび提示活性に不可欠なサイトカインであるIL-12をはるかに高いレベルで発現するよう誘導する。mRNAコアはまた、Toll様受容体7および8 (TLR7/8) 阻害剤ODN2095によるサイトカイン発現の阻害によって実証されるように、TLR7/8シ

10

20

20

30

40

50

グナル伝達を活性化することにより、ワクチンの強力なアジュvantとしても機能する。mRNAワクチンの活性を試験するために、オボアルブミン(OVA)をモデル抗原として適用し、骨髄由来樹状細胞(BMDC)をLPP/OVAとインキュベートして抗原提示とT細胞活性化を決定した。プロタミン/OVAではなく、LPP/OVAとインキュベートしたBMDCは、表面に高レベルの主要組織適合遺伝子複合体I(MHCⅠ)-OVAエピトープを提示した。LPP/OVA mRNAワクチンによる処置は、脾臓およびリンパ節のCD4+およびCD8+T細胞の刺激を引き起こした。このワクチンは、OVA発現腫瘍の成長を阻害するのにも有効であった。別の研究では、開示されたLPP/mRNAワクチンは、がんおよび感染症に対する類似した構造と組成を持つリポソームmRNAワクチンに関する最近の著名な刊行物にもかかわらず、抗原発現の促進およびDC活性化の刺激において、単純なリポソームmRNAワクチン(即ち、mRNA保護コア構造を欠くワクチン)よりもはるかに効果的であることが示された。まとめると、これらのデータは、LPP/mRNAワクチンプラットフォームが強力な抗原プロセシングと提示を通じて強固な抗腫瘍免疫を提供することを示した。ポリプレックス/mRNAコア-リポソームシェル構造は、抗腫瘍免疫の刺激において、他のmRNAに基づくプラットフォーム(裸のプロタミン/mRNAおよびリポソームでカプセル化されたmRNA)よりもはるかに優れている。

#### 【0225】

ヒトのがんは分子的特徴と構造的特徴の両方で不均質であり、腫瘍成長、クローンの増殖、および薬物処置中に遺伝子変異/増幅/欠失が頻繁に発生することは周知である。この複雑さの度合いを強めているのは、各がんのタイプにそれ自身の独自の特徴があることである。例えば、トリプルネガティブ乳がん(TNBC、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体またはHER2/neuの発現を欠く)には、多種多様な遺伝子の低頻度変異と組み合わされた高率のTP53変異がある。これらの変異事象は、単一の腫瘍で特定の遺伝子増幅/変異の特徴を持つ異なるクローン(いくつかは優勢で、いくつかはよく表されていない)の形成を引き起こす可能性が最も高い。その結果、同じ患者からの異なる腫瘍結節で、または原発性腫瘍と転移性腫瘍の間で異なる変異スペクトルを同定することはまれなことではない。がん免疫療法の目標は、腫瘍内の全てのクローンを高効率で除去することであり、mRNAがんワクチンは、ある単一のワクチン構築物が各々の患者のがんゲノムの複雑さに合わせて複数の抗原を標的とするように操作できるため、この目的に非常に適している。

#### 【0226】

免疫応答性のあるマウスにおける原発性および転移性腫瘍の生成: 4T1マウス乳腺腫瘍細胞(p53ヌル(null))は、CRISPR/Cas9技術によってPIK3CAまたはPTEN遺伝子に点変異を生成するように操作され、これは、実験室で日常的に実施されている。次いで、野生型またはPIK3CAおよびPTEN変異を持つ4T1細胞に、変異TP53遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を持つレトロウイルスを感染させる。得られた同系4T1細胞は、TP53遺伝子に単一変異(4T1/TP53\*)、TP53遺伝子およびPIK3CAもしくはPTENの二重変異(4T1/TP53\*PIK3CA\*もしくは4T1/TP53\*PTEN\*)、または3つの遺伝子全て(4T1/TP53\*PIK3CA\*PTEN\*)の変異のいずれかを持つ。4つの同質遺伝子系統全てを1:1:1:1の比で一緒にプールし、6~8週齢のメスBALB/cマウスの乳腺脂肪パッドに接種して、原発性腫瘍を生成する。前の実施例で示したように、4T1原発性腫瘍は肝臓と肺に高い効率で転移を起こす。原発性腫瘍と転移性腫瘍結節を特徴付けるために組織学的分析を実施し、親4T1腫瘍と比較する。腫瘍から単一細胞を単離し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して定量して、所定の腫瘍で単一のTP53\*変異または二重もしくは三重変異を持つ腫瘍細胞の割合を測定することができる。

#### 【0227】

in vitroでの免疫応答のテスト: 細胞に基づく研究を実施して、mRNAワクチンが腫瘍担持マウスモデルの処置に適用される前に意図した機能を発揮できることを確

認することができる。個々のmRNAワクチンを骨髓由来樹状細胞（BMDC）と6時間インキュベートし、次いでBMDCをマウスT細胞と共にインキュベートする。DC成熟は、CD40およびCD86の発現に関するフローサイトメトリー分析と、インターロイキン-12（IL-12）の発現に関するELISAによって決定できる。T細胞の活性化は、インターフェロン（IFN-I）およびインターロイキン-2（IL-2）の発現によって測定される。

【0228】

in vivoでのmRNAワクチンからの免疫応答の調査：BALB/cマウスに、乳腺脂肪パッドに4つの同質遺伝子クローニングの混合物を含む4T1細胞を接種する。原発性腫瘍が200～300mm<sup>3</sup>に達するとき、マウスを4群に分け（n=10マウス/群）、4つのmRNAワクチンで皮内処置し、1週間後にもう1回ワクチン接種をブーストする。血液試料は、2回目のワクチン接種の前に1回、実験の完了のときにもう1回収集する。2回目のワクチン接種の3日後にマウスを安樂死させ、脾臓、リンパ節、および腫瘍試料を収集する。EasySep TMマウスT細胞分離キット（StemCell Technologies）を使用して全ての試料をCD3<sup>+</sup>T細胞の分離に適用し、本発明者らが記載したのと同一のプロトコールに従って、IL-2およびIFN-Iの発現レベルまたは表面成熟マーカーに基づいて、またはELISPOTアッセイを使用して、活性化細胞を検出する。チェックポイント阻害剤タンパク質の発現レベルも調べる。

10

【0229】

mRNAワクチンからの抗腫瘍活性の評価：BALB/cマウスに親4T1腫瘍を接種するか、4つの同質遺伝子クローニングの混合物に由来する腫瘍を4つの群に分けて（n=10マウス/群）、4週間にわたって毎週、4つのmRNAワクチンで皮内（i.d.）処置する。マウスは、腫瘍成長（腫瘍サイズに基づく）および遠隔臓器への腫瘍転移のモニタリング（Xenogen IVIS-200イメージングシステムを使用）のために維持される。マウスは、原発性腫瘍の重量（密度を1g/cm<sup>3</sup>と仮定して腫瘍体積に基づいて計算）が体重の10%を超えるか、または腫瘍潰瘍形成、または不活発、猫背、立毛（ruffled fur）などの病気の徴候がある場合、安樂死させる。

20

【0230】

HLA-A2トランスジェニックマウスにおけるmRNAワクチンに対する免疫応答：Jackson LaboratoriesのHLA-A2トランスジェニックマウス（C57BL/6-Tg[HAL-A2.1]1Eng/J）は、脾臓、骨髄、胸腺の細胞でヒトHLA-A2.1 MHC I白血球抗原を発現する。mRNAワクチンに対する患者の免疫応答を予測するために、HLA-A2マウス（n=10マウス/群）を4つの列挙されたmRNAワクチンで処置し、血液および組織試料を収集して、抗原特異的T細胞活性を調べる。

30

【0231】

マウス腫瘍モデル：混合同質遺伝子クローニングを接種されたマウスは、混合分子の特徴（mixed molecular feature）を持つ腫瘍を発症する。腫瘍試料のPCR分析に基づいて検出される、1つの同質遺伝子クローニングからの腫瘍細胞が残りのクローニングよりもはるかに速く成長する場合、これらのクローニングの比は腫瘍細胞接種前に調整され得る。原発性腫瘍からのシグナルが転移性結節の検出に干渉する場合、原発性腫瘍は500cm<sup>3</sup>に達したら外科的に切除し、発光アッセイで腫瘍の転移をモニターし得る。

40

【0232】

抗腫瘍免疫：免疫応答の分析により、mRNAワクチンが強力な抗腫瘍免疫を発揮できることを明らかにする。複数の新抗原エピトープ（例えば、LPP/p53-PI3K-PTEN）をコードするワクチンは、単一のエピトープ（即ち、LPP/p53）を有するワクチンと比較して、より強力な抗腫瘍免疫を促進する利点があると予想され、その効果は、T細胞活性測定および腫瘍成長と転移の阻害によって反映される。LPP/p53またはLPP/p53-PI3Kなどの特定のワクチンによる処置が腫瘍成長の部分的な阻害のみを引き起こす場合、4つの個々の同質遺伝子クローニングからの腫瘍細胞の割合に焦

50

点を合わせて、ワクチン接種後のマウスから腫瘍組織を収集して、腫瘍組成を分析できる。腫瘍組成の変化は、特定のワクチン（複数可）からの有効性（または有効性の欠如）を示す。mRNAワクチンの潜在的なリスクの1つは、MHC I新抗原エピトープが一連のアルゴリズムに基づいて選択されたが、生物学的研究では確認されていないことである。特定の *in vitro* 研究からの結果に基づいて選択されたエピトープから応答が観察されないか、非常に弱い場合、いくつかの成功した候補が得られるまで繰り返し研究において代替的なエピトープを利用できる。代替的に、抗原エピトープを単一アミノ酸置換で修飾して、MHC結合を増強することができるが、この戦略は、WT1 MHC I抗原の開発に成功裏に適用されている。

## 【0233】

10

HLA-A2マウスを用いる研究：MHC I新抗原エピトープ領域を包含するペプチド配列はヒトタンパク質とマウスホモログ間で保存されているため、本発明者らは、BALB/cマウスとHLA-A2トランスジェニックマウスから同様の免疫応答が観察されると予想している。

## 【0234】

治療用がんワクチンは、抗腫瘍活性を発揮するために、抗原提示細胞、主にDCを活性化する必要がある。mRNAに基づく治療用がんワクチンの作用機序を完全に理解し、この新規治療薬の活性をさらに改善するアプローチを特定するために、まず抗腫瘍免疫を駆動するのに不可欠なDCの亜集団（複数可）を同定する必要がある。この研究では、mRNAワクチン活性におけるDCの3つの主要なサブセット：従来のCD8<sup>+</sup>およびCD8<sup>-</sup>DC（cDC）および形質細胞様DC（pDC）の役割を解明するための、実験が選択された。この研究のために、The Jackson Laboratoriesから3つの遺伝子組み換えマウス系統：B at f 3<sup>-/-</sup>ノックアウト、zDC-DTR (Zbt6.4<sup>6</sup>遺伝子の3'非翻訳領域のジフテリア毒素受容体 [DTR] )、およびCd11c-DTR (CD11cプロモーターの制御下のDTR) が入手された。B at f 3<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスは、CD8<sup>+</sup>DCを生成しない。zDC-DTRマウスをジフテリア毒素 (DT) で処置すると、両方のタイプのcDCが骨髄から枯渇するが、pDCには影響せず、一方で、Cd11c-DTRマウスのDT処置は、身体から全てのDCを枯渇させる。

20

## 【0235】

野生型および遺伝子操作マウスの抗腫瘍免疫：抗腫瘍免疫におけるCD8<sup>+</sup>DCの役割を評価するため、4T1腫瘍細胞をBALB/cバックグラウンドのB at f 3<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスまたは対照野生型マウス (n = 10マウス/群) に接種し、動物を4週間にわたって毎週、LPP/p53-Pi3K-PTEN mRNAワクチンで処置する。mRNAワクチン活性に対するcDCおよびpDCの影響を評価するために、腫瘍担持zDC-DTRおよびCd11c-DTRマウスを1系統あたり2つの処置群に分ける (n = 10マウス/群)。対照群のマウスはDTによる処置を受けないが、処置群のマウスにはワクチン接種の24時間前にDTが投与される (20 μg/kg, i.p.)。DCサブセットの枯渇は、本格的な有効性研究の前にフローサイトメトリー分析によって確認される。腫瘍成長と転移をモニターし、病気の徴候が現れた場合マウスを安楽死させる。

30

## 【0236】

40

mRNAワクチンの作用機序に基づいて、Cd11c-DTRマウスの全てのDCの枯渇は、mRNAワクチンからの抗腫瘍免疫を完全に排除するはずである。B at f 3<sup>-/-</sup>ノックアウトおよびzDC-DTRマウスからの結果は、mRNAワクチン活性を促進するためにどのDCサブセットが重要な役割を果たすかを示すはずである。以前の例では、mRNAワクチン処置に対する強い応答がBMDCから観察され、CD8<sup>+</sup>DCの関与を示していた。DCの標的のサブセットが20 μg/kg DT処置（複数の研究所で使用されるプロトコール）の後にzDC-DTRまたはCd11c-DTRマウスで完全に除去されない場合、DTの投与量および/または投与スケジュールは必要に応じて調整できる。

## 参考文献

## 【0237】

50

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載されるものを補足する例示的な手順の詳細または他の詳細を提供する範囲で、明示的に参照することによりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる。

【0238】

ALT SCHUL, SF et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucl. Acids Res.*, 25(17):3389-3402 (1997).

【0239】

ANGUILLE, S. et al., "Clinical use of dendritic cells for cancer therapy," *Lancet Oncol.*, 15(7):e257e67 (2014).

10

【0240】

AVCI, FY et al., "A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design," *Nat. Med.*, 17(12):1602-1609 (2011).

【0241】

BANCHEREAU, J and STEINMAN, RM, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, 392(6673):245-252 (1998).

20

【0242】

BENTEYN, D. et al., "mRNA-based dendritic cell vaccines," *Expert Rev. Vaccines*, 14(2):161e176 (2015).

【0243】

BROOS, K. et al., "Particle-mediated intravenous delivery of antigen mRNA results in strong antigen-specific T-cell responses despite the induction of type I interferon," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 5:e326 (2016).

30

【0244】

BRUNNER, C et al., "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo," *J. Immunol.*, 165(11):6278-6286 (2000).

【0245】

CARRENO, BM et al., "IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity," *J. Clin. Invest.*, 123(8):3383-3394 (2013).

40

【0246】

CARRENO, BM, et al., "Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells," *Science*, 348(6236):803-808 (2015).

50

【0247】

DE BEUCKELAER, A. et al., "Type I interferons interfere with the capacity of mRNA lipoplex vaccines to elicit cytolytic T cell responses," *Mol. Ther.*, 24(11):2012e2020. (2016).

【0248】

DEVOLDERE, J. et al., "Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger," *Drug Discov. Today*, 21(10):11e25 (2016).

【0249】

DIEBOLD, S. et al., "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA," *Science*, 303(5663):1529-1531 (2004).

【0250】

FOTIN-MLECZEK, M. et al., "Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity," *J. Immunother.* (Hagerstown, MD), 34(1):1-15 (1997).

【0251】

GRIBSKOV, M. and BURGESS, RR, "Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins," *Nucleic Acids Res.*, 14(16):6745-6763 (1986).

【0252】

HALE, WG, and MARGHAM, JP, "HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY," Harper Perennial, New York (1991).

【0253】

HARDMAN, JG, and LIMBIRD, LE, (Eds.), "GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS" 10<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York (2001).

【0254】

HAYASHI, Y. et al., "Multifunctional envelope-type nano device: evolution from nonselective to active targeting system," *Biocjug. Chem.*, 26(7):1266-1276 (2015).

【0255】

HEIL, F. et al., "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8," *Science*, 303(5663):1526-1529 (2004).

【0256】

KALLEN, KJ and THESS, A, "A development that may evolve into a revolution in medicin

e: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs," *Ther. Adv. Vaccines*, 2(1):10-31 (2014).

【0257】

KAMAT, CD et al., "Poly(beta-amino ester) nanoparticle delivery of TP53 has activity against small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*," *Mol. Cancer Therapeut.*, 12(4):405-415 (2013).

【0258】

KANTOFF, PW et al., "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer," *N. Engl. J. Med.*, 363(5):411-422 (2010).

【0259】

KIM, J et al., "Injectable, spontaneously assembling, inorganic scaffolds modulate immune cells *in vivo* and increase vaccine efficacy," *Nat. Biotechnol.*, 33(1):64-72 (2015).

【0260】

KOIVUSALO, M et al., "Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signalling," *J. Cell Biol.*, 188(4):547-563 (2010).

【0261】

KRANZ, LM et al., "Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy," *Nature*, 534(7607):396e401 (2016).

【0262】

KREITER, A et al., "Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent pro-phylactic and therapeutic antitumoral immunity," *Cancer Res.*, 70(22):9031e9040 (2010).

【0263】

KYTE, J, and DOOLITTLE, RF, "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132 (1982).

【0264】

MCNAMARA, M et al., "RNA-based vaccines in cancer immunotherapy," *J. Immunol. Res.*, 2015:794528 (2015).

【0265】

MELERO, I et al., "Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 11(9):509-524 (2014).

10

20

30

40

50

【0266】

MILLS, CD and LEY, K, "M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity," *J. Innate Immun.*, 6(6):716-726 (2014).

【0267】

NEEDLEMAN, SB and WUNSCH, CD, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins," *J. Mol. Biol.*, 48(3):443-453 (1970).

10

【0268】

OVERWIJK, WW and RESTIFO, NP, "B16 as a mouse model for human melanoma," *Curr. Protocols Immunol.*, 20(20):1 (2001).

【0269】

PROBST, J. et al., "Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface," *Genet. Vaccines Ther.*, 4:1524753 (2006).

20

【0270】

RYCHLIK, W and RHOADS, RE, "A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA," *Nucl. Acid Res.*, 17:8543-8551 (1989).

【0271】

SCHEEL, B et al., "Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA," *Eur. J. Immunol.*, 35(5):1557-1566 (2005).

30

【0272】

SCHRODINGER 2013. Schrodinger, LLC: New York, NY (2013).

【0273】

SCHUMACHER, TN and SCHREIBER, RD, "Neoantigens in cancer immunotherapy," *Science*, 348(6230):69-74 (2015).

【0274】

SCHWARTZENTRUBER, DJ et al., "gp100 peptid e vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma," *N. Engl. J. Med.*, 364(22):2119-2127 (2011).

40

【0275】

SHUKLA, SA et al., "Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes," *Nat. Biotechnol.*, 33(11):1152-1158 (2015).

【0276】

SINGLETON, P and SAINSBURY, D, "DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY," 2<sup>n</sup>

50

d Ed., John Wiley and Sons, New York (1987).  
【0277】

SULLENGER, BA and NAIR, S "From the RNA world to the clinic," *Science*, 352(6292):1417-1420 (2016).

【0278】

TREVEJO, JM et al., "TNF--dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(21):12162-12167 (2001).

10

【0279】

TROMBETTA, ES and MELLMAN, I, "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo," *Annu. Rev. Immunol.*, 23:975-1028 (2005).

【0280】

UHLIG, KM et al., "Lentiviral protein transfer vectors are an efficient vaccine platform and induce a strong antigen-specific cytotoxic T cell response," *J. Virol.*, 89(17):9044-9060 (2015).

20

【0281】

VAN LINT, C. et al., "Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy," *Cancer Res.*, 72(7):1661e1671 (2012).

【0282】

VAN TENDELOO, VF et al., "Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells," *Blood*, 98(1):49-56 (2001).

30

【0283】

WANG, Y et al., "Systemic delivery of modified mRNA encoding herpes simplex virus 1 thymidine kinase for targeted cancer gene therapy," *Molec. Ther.*, 21(2):358-367 (2013).

40

【0284】

WEIDE, B et al., "Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients," *J. Immunother.*, 32(5):498-507 (2009).

【0285】

WILGENHOF, S et al., "A phase I B study on intravenous synthetic mRNA electroporated

50

dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients," Ann. Oncol., 24(10):2686-2693 (2013).

【0286】

XIA, X et al., "porous silicon microparticle potentiates anti-tumor immunity by enhancing cross-presentation and inducing Type I interferon response," Cell Rep., 11:957-966 (2015).

【0287】

YADAV, M et al., "Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing," Nature, 515(7528):572-576 (2014).

【0288】

本明細書に記載される実施例および実施形態は例示のみを目的とするものであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に示唆され、それらは本出願の趣旨および範囲内ならびに添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることを理解されたい。

【0289】

本明細書に引用される刊行物、特許出願および特許を含む全ての参考文献は、それぞれの参考文献が個別にかつ具体的に参照により組み入れられることが示され、その全体が本明細書に記載されているのと同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

【0290】

本明細書における値の範囲の言及は、本明細書中に別の指示がない限り、範囲に含まれるそれぞれの個別の値を個々に参照する簡略方法として機能することを意図しており、それぞれの個別の値は本明細書に個別に言及されているかのように、本明細書に組み入れられる。

【0291】

1または複数の要素に関して、「含む (comprising)」、「有する」、「含む (including)」または「含む (containing)」などの用語を使用した本発明の任意の態様または実施形態の本明細書の説明は、特に明記しない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、特定の1または複数の要素「からなる」、「本質的に～からなる」、または「実質的に含む」本発明の同様の態様または実施形態のサポートを提供することを意図している（例えば、特定の要素を含む (comprising) として本明細書に記載される組成物はまた、特に明記しない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、その特定の要素を含む (containing) および / または含む (including) 組成物についても記載していると理解されるべきである）。

【0292】

本明細書に開示され請求される全ての組成物および方法は、本開示に照らして過度の実験をすることなく作製および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して説明してきたが、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される、組成物および方法、ならびに方法のステップまたはステップの順序に変更を加えてもよいことが当業者には明らかである。より具体的には、化学的および / または生理学的に関連する特定の薬剤を本明細書に記載される薬剤の代わりに使用しても、同一または同様の結果が達成されることは明らかである。当業者に明らかなるような類似の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲および概念内にあるとみなされる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

少なくとも第1の腫瘍抗原をコードするmRNA分子の集団を含む治療用がんワクチン

10

20

30

40

50

を含む組成物であって、該集団が少なくとも第1の正電荷ポリマーまたはタンパク質を含む複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子の中に含まれ、さらに該複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子がそれ自体、第1の生体適合性脂質二重層シェルにカプセル化されている、組成物。

(項目2)

前記第1の生体適合性脂質二重層シェルが、1または複数の哺乳動物の抗原提示細胞による前記複数のポリプレックスまたはタンパク質コア粒子のマクロピノサイトーシスを促進する、項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記生体適合性脂質二重層の中にカプセル化された、CpG、ポリ(I:C)、アラム、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるアジュバントをさらに含む、項目1または項目2に記載の組成物。

10

(項目4)

前記生体適合性脂質二重層の間の空間の中にカプセル化された、IL-12p70タンパク質、FLT3リガンド、またはインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO-1)阻害剤等の免疫調節化合物をさらに含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目5)

前記インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO-1)阻害剤が、GDC-0919、INC B 24360、またはそれらの組合せである、項目4に記載の組成物。

(項目6)

前記正電荷ポリマーまたはタンパク質が、プロタミン、ポリエチレンイミン、ポリ-(B-アミノエスチル)、またはそれらの任意の組合せを含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

20

(項目7)

前記生体適合性脂質二重層が、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EDOPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG)、およびそれらの組合せの1または複数を含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

30

(項目8)

前記生体適合性脂質二重層が、  
(a) 約30%～約70%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EDOPC)、  
(b) 約70%～約30%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、または  
(c) 約0.5～約5%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG)を含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目9)

前記生体適合性脂質二重層が、  
(a) 約45%～約55%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(EDOPC)、  
(b) 約55%～約45%の1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、および(c) 約1～約2%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ(ポリエチレングリコール)-2000](DSPE-PEG)を含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

40

(項目10)

mRNA分子の前記集団が、哺乳動物のがん細胞に特異的な少なくとも1つの抗原をコ

50

ードする、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 1)

m R N A 分子の前記集団が、少なくとも 1 つのがんもしくは腫瘍特異的タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド、またはその抗原性断片をコードする、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 2)

m R N A 分子の前記集団が、H E R 2 p 6 6、H E R 2 E 7 5、H E R 2 Y V M A、T R P 2、p 6 6、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのヒト腫瘍特異的ポリペプチドまたはペプチドをコードする、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

10

(項目 1 3)

好適な哺乳動物の細胞に導入されたときに I 型インターフェロン (I F N - I ) の発現を増加させるように、好ましくは I F N - 4、I F N - 、またはそれらの組合せの発現を増加させるように、適合され構成された、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 4)

哺乳動物の抗原提示細胞、例えば、ヒト樹状細胞、マクロファージ細胞、B 細胞、がん細胞、またはそれらの組合せの集団に導入されたときに、I F N - I の発現を増加させる、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 5)

治療剤、例えば、免疫調節剤、抗新生物剤、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、神経活性薬剤、抗炎症剤、抗脂血症剤、ホルモン、受容体アゴニスト、受容体アンタゴニスト、抗感染症剤、タンパク質、ペプチド、抗体、抗原結合性断片、酵素、R N A、D N A、s i R N A、m R N A、リボザイム、ホルモン、コファクター、ステロイド、アンチセンス分子、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される薬剤をさらに含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

20

(項目 1 6)

化学療法剤が、シクロホスファミド、ドキソルビシン、5 - フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセル、トラスツズマブ、メトトレキセート、エピルビシン、シスプラチン、カルボプラチン、ビノレルビン、カペシタビン、ゲムシタビン、ミトキサントロン、イサペビロン、エリブリント、ラパチニブ、カルムスチン、窒素マスター、硫黄マスター、四硝酸プラチン、ピンプラスチニブ、エトポシド、カンプトテシン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される化合物を含む、項目 1 3 に記載の組成物。

30

(項目 1 7)

抗原ポリペプチド、抗原性融合ポリペプチド、抗原性ペプチド、またはその断片をさらに含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 8)

メソ多孔質ケイ素粒子、ナノ粒子、ミクロ粒子、またはそれらの任意の組合せの集団の中に含まれた、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 9)

1 または複数の界面活性剤、リボソーム、ニオソーム、エトソーム、トランスフェロソーム、リン脂質、スフィンゴソーム、またはそれらの任意の組合せと混合された、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

40

(項目 2 0)

1 または複数の薬学的に許容される担体、緩衝剤、希釈剤、ビヒクリ、または賦形剤をさらに含む、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 1)

哺乳動物への全身投与のため、好ましくはヒトへの皮内または静脈内投与のために製剤化された、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 2)

哺乳動物の抗原提示細胞、例えば、がん細胞、腫瘍細胞、マクロファージ細胞、B 細胞

50

樹状細胞、またはそれらの任意の組合せの単離された集団の中に含まれた、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 3)

前記組成物および該組成物の投与を必要とするヒトへの該組成物の投与のための少なくとも第1のセットの指示を含む治療用キットの一部として適合され構成された、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 4)

哺乳動物のがんの1または複数の症状の予防、治療、または改善における使用のための、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 5)

ヒトのがんの1または複数の症状の治療または改善における使用のための、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

10

(項目 2 6)

ヒトの転移がんの1または複数の症状の治療または改善における使用のための、先行する項目のいずれかに記載の組成物。

(項目 2 7)

先行する項目のいずれかに記載の組成物を含む、哺乳動物細胞の単離された集団。

(項目 2 8)

抗原提示細胞、好ましくは、ヒト樹状細胞、マクロファージ、B細胞、またはそれらの組合せとして特徴付けられる、項目27に記載の哺乳動物細胞の単離された集団。

20

(項目 2 9)

哺乳動物対象における疾患、障害、または機能不全、例えばがんの少なくとも1つの症状を処置または改善するための医薬の製造における、項目1から26のいずれか一項に記載の組成物の使用。

(項目 3 0)

前記哺乳動物対象がヒト、非ヒト靈長類、伴侶動物、外来種、家畜、または原料動物である、項目29に記載の使用。

(項目 3 1)

1) 項目1から26のいずれか一項に記載の組成物、および2) 哺乳動物における疾患、障害、異常な状態、または機能不全、例えば、がんまたは過剰増殖性障害の1または複数の症状の防止、処置、または改善のためのレジメンの一部としての、該組成物の投与を必要とする該哺乳動物への該組成物の投与のための指示、を含むキット。

30

(項目 3 2)

がんの1または複数の症状の処置または改善を必要とする哺乳動物におけるがんの1または複数の症状を処置または改善する方法であって、該哺乳動物における疾患、障害、異常な状態、または機能不全の1または複数の症状を処置または改善するのに十分な時間、有効量の項目1から26のいずれか一項に記載の組成物を該動物に投与するステップを含む、方法。

(項目 3 3)

前記疾患が、難治性、転移、再発、または治療抵抗性がんとして診断されまたは同定されている、項目32に記載の方法。

40

(項目 3 4)

前記がんが、転移乳がん、転移肺がん、または転移黒色腫である、項目33に記載の方法。

(項目 3 5)

前記哺乳動物がヒトである、項目32から34のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記哺乳動物に治療有効量の放射線または追加の化学療法剤を投与するステップをさらに含む、項目32から35のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

50

前記組成物が、単回投与で、あるいは1日もしくはそれより長い日数からの期間にわたる、1週もしくはそれより長い週数の期間にわたる、または1か月もしくはそれより長い月数の期間にわたる、またはそれより長い期間にわたる一連の複数回投与で、前記哺乳動物に全身投与される、項目32から36のいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

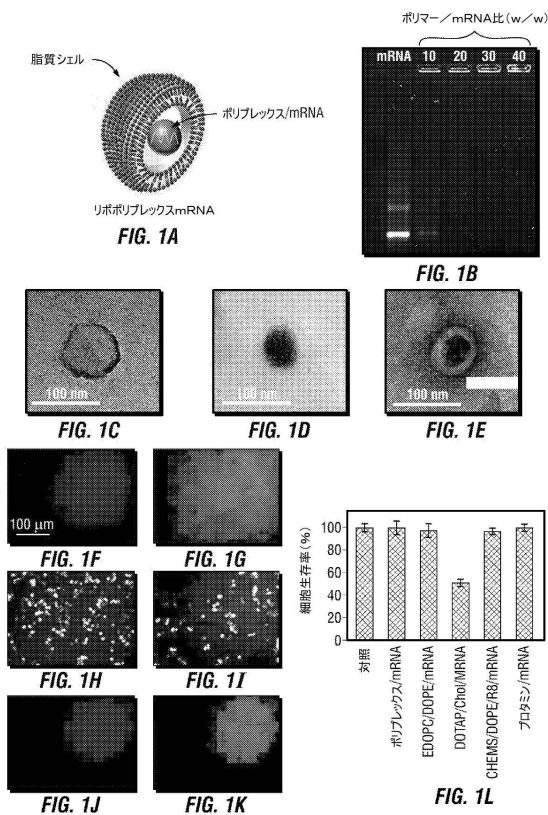
前記組成物が、化学療法剤、または第2の異なる治療用がんワクチンをさらに含む、項目32から37のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

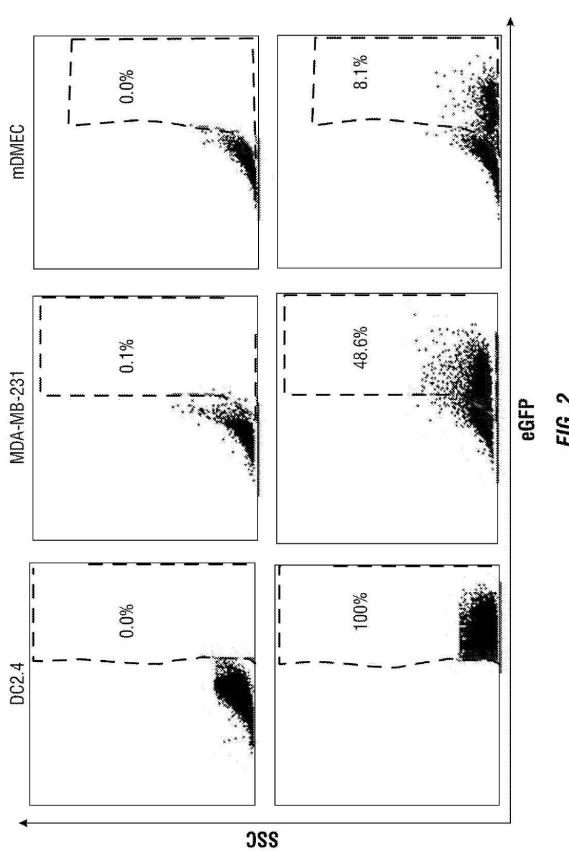
治療用抗がん抗原をコードするmRNAの投与を必要とする哺乳動物対象の体内のがん細胞の集団に、治療用抗がん抗原をコードするmRNAを投与する方法であって、有効量の項目1から26のいずれか一項に記載の組成物を該対象に投与するステップを含む、方法。

【図面】

【図1】



【図2】



10

20

30

40

50

【図3】

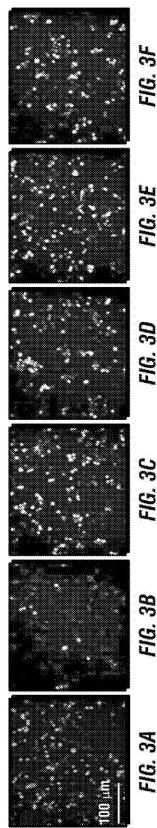


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

FIG. 3E

FIG. 3F

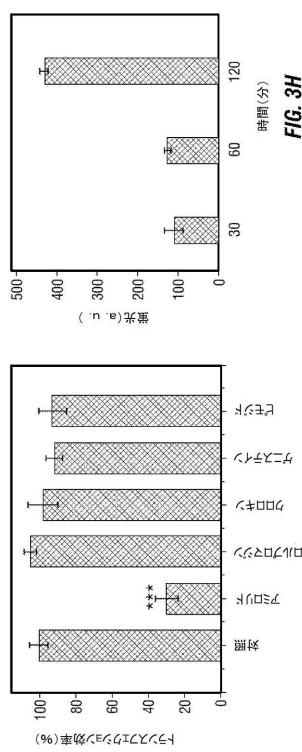


FIG. 3G

【図4】

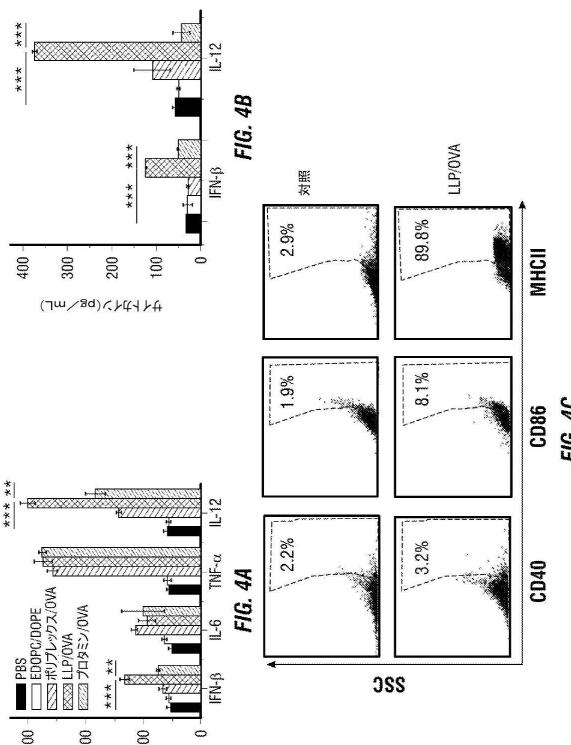


FIG. 4B

FIG. 4A

FIG. 4C

FIG. 4D

【図5】

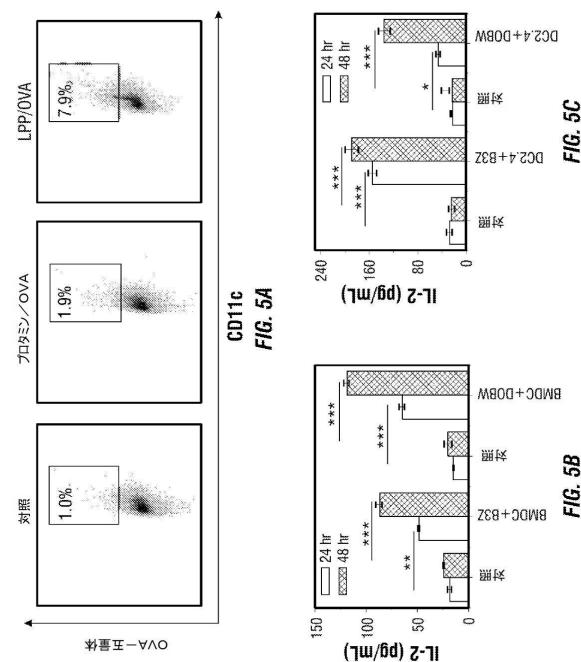


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

【図6】

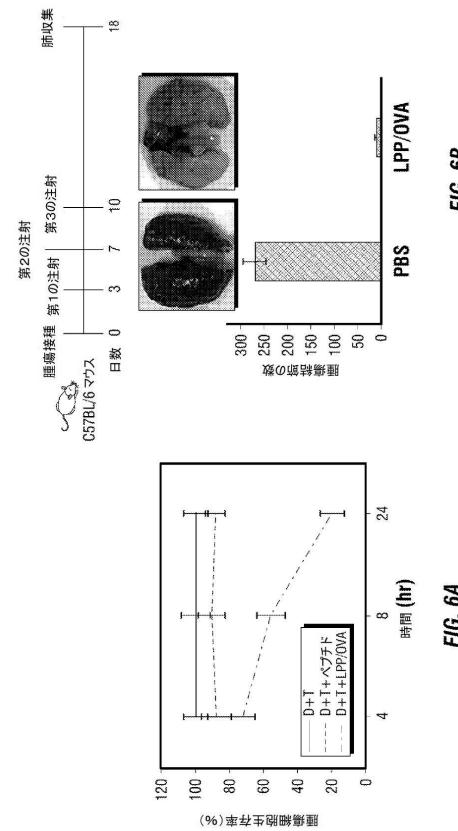


FIG. 6B

FIG. 6A

【図 7】

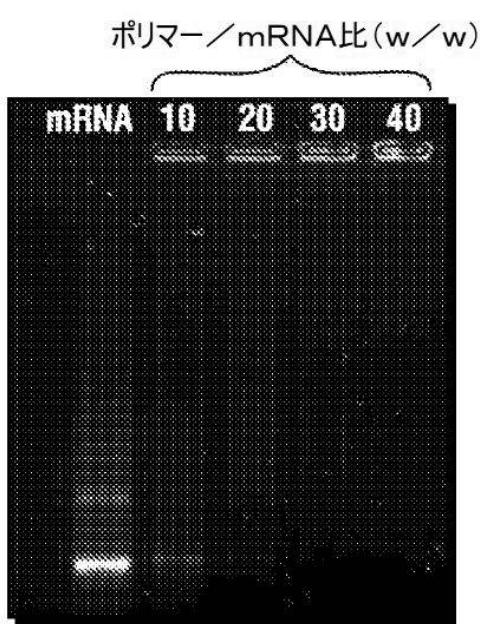


FIG. 7

20

【図 8】

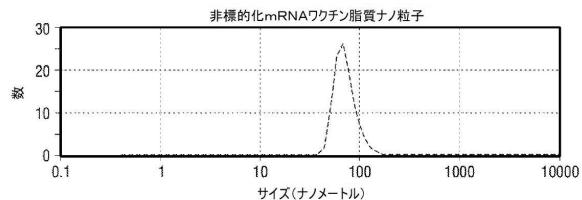


FIG. 8A

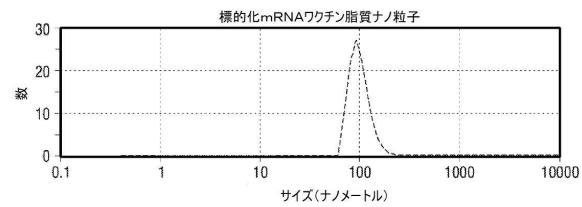


FIG. 8B

10

【図 9】

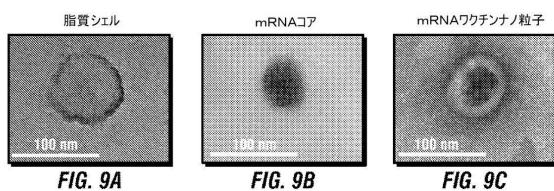


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

【図 10】

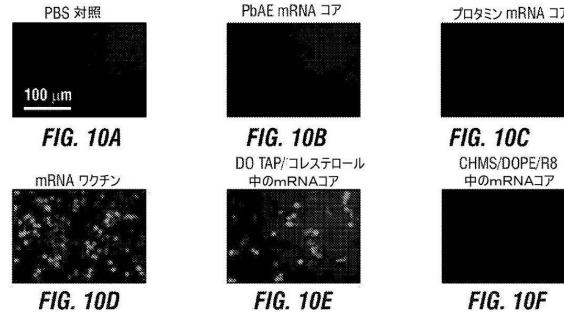


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

FIG. 10D

FIG. 10E

FIG. 10F

30

40

50

【図 1 1】

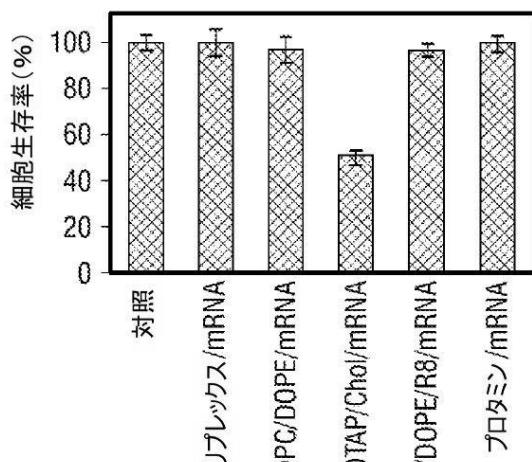
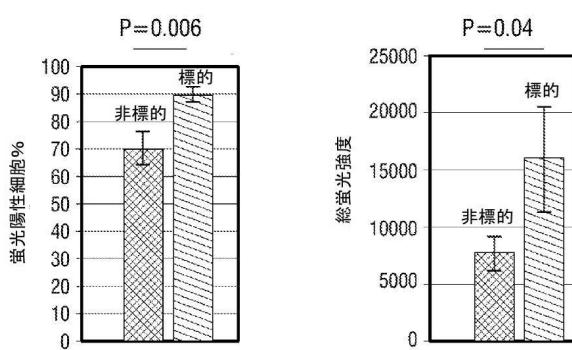


FIG. 11

【図 1 2】



【図 1 3】

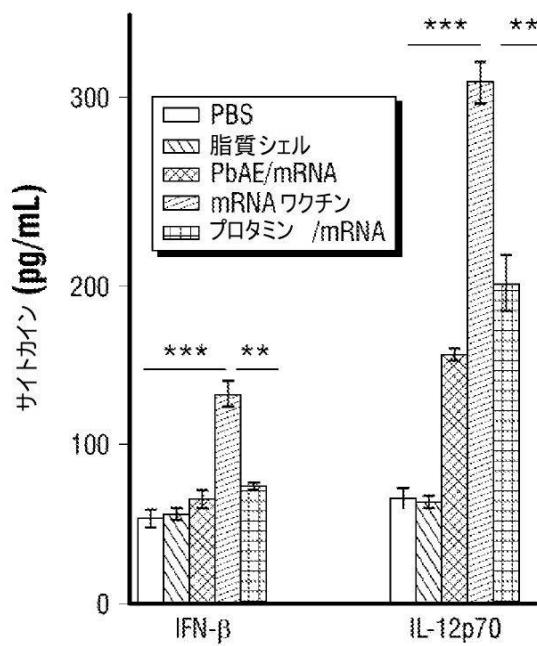


FIG. 13

【図 1 4】

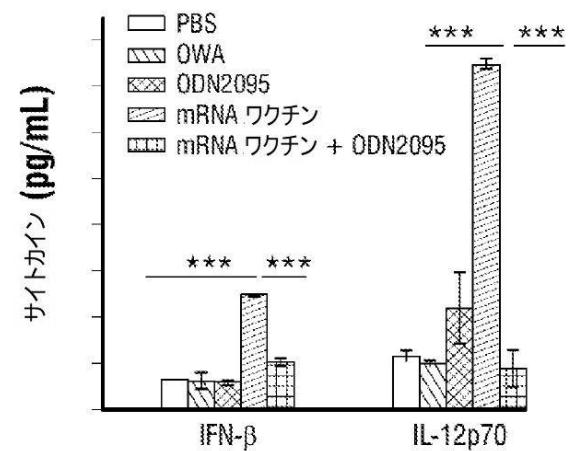
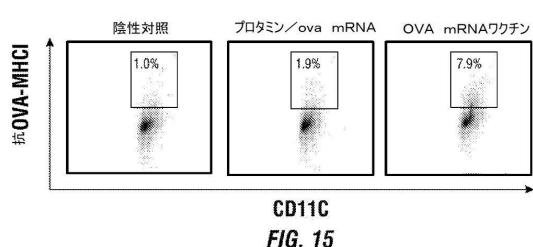
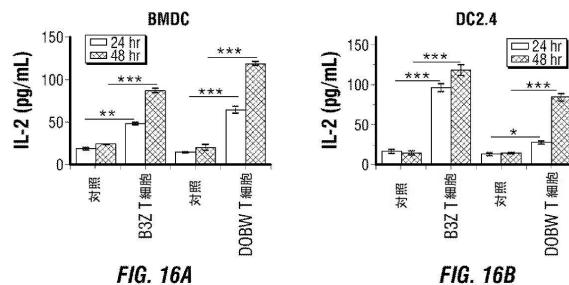


FIG. 14

【図 15】

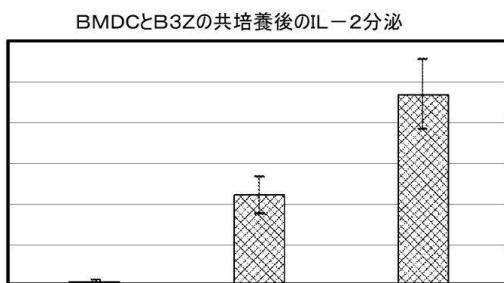


【図 16】

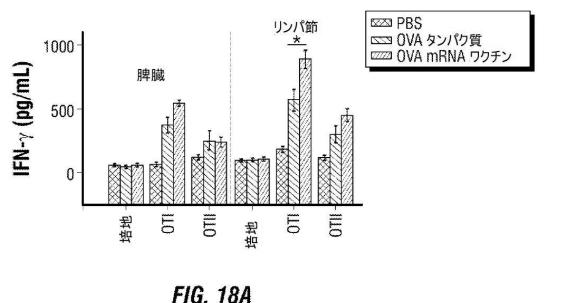


10

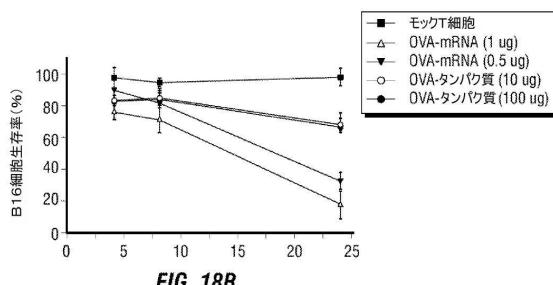
【図 17】



【図 18】



20



30

40

50

【図 19】

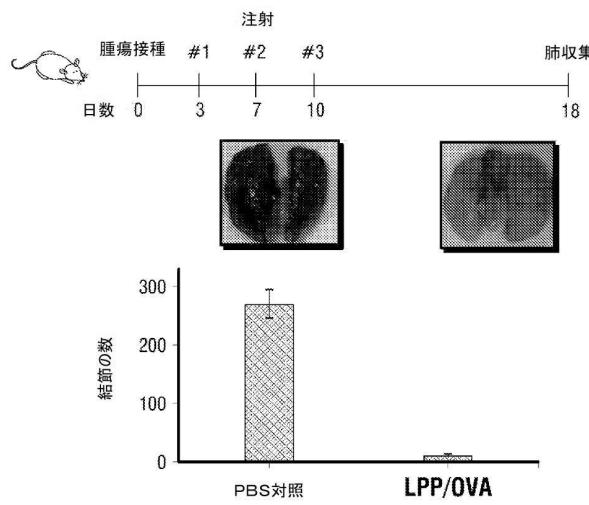


FIG. 19

【図 20】

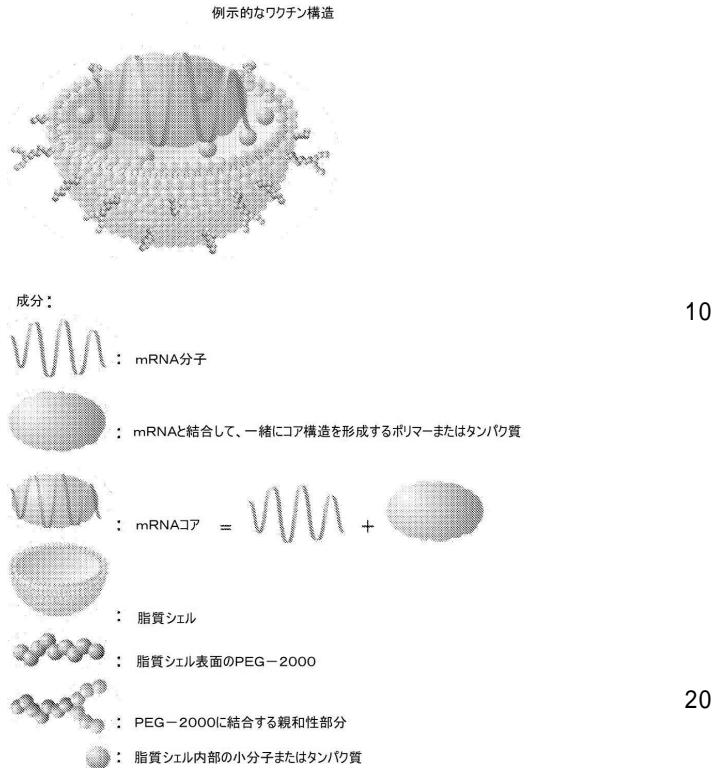


FIG. 20

【図 21】

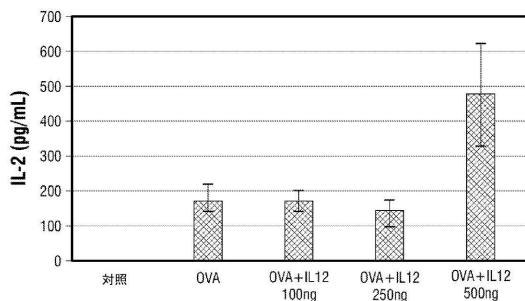


FIG. 21

【配列表】

0007181880000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 31/4245(2006.01)	A 6 1 K 31/4245	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 31/4188(2006.01)	A 6 1 K 31/4188	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	C 0 7 K 2/00	
C 1 2 N 15/117(2010.01)	C 1 2 N 15/117	Z
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K 14/46	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	

## (72)発明者 シエン , ハイファ

アメリカ合衆国 テキサス 77401 , ベルエアー , シンシア ストリート 4313

審査官 井上 能宏

(56)参考文献 Biomaterials , 2022年02月 , Vol. 125 , pp. 81-89

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A 6 1 K、C 1 2 N、C 0 7 K  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )