

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-507571
(P2025-507571A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	4 C 0 8 5	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	9/127(2025.01)	A 6 1 K	9/127		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全206頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-548426(P2024-548426)	(71)出願人	513084469		
(86)(22)出願日	令和5年2月17日(2023.2.17)		モデルナティエックス インコーポレイ		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月15日(2024.8.15)		テッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062844		ModernaTX, Inc.		
(87)国際公開番号	WO2023/159197		アメリカ合衆国02142マサチューセ		
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)		ッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリー		
(31)優先権主張番号	63/311,716		ト325		
(32)優先日	令和4年2月18日(2022.2.18)	(74)代理人	100078282		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山本 秀策		
(31)優先権主張番号	63/381,460	(74)代理人	100113413		
(32)優先日	令和4年10月28日(2022.10.28)		弁理士 森下 夏樹		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		弁理士 飯田 貴敏		
	最終頁に続く	(74)代理人	100181641		
			弁理士 石川 大輔		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 チェックポイントがんワクチンをコードするmRNA及びその使用

(57)【要約】

本開示は、チェックポイントがんワクチンを含む脂質ナノ粒子（LNP）組成物及びその使用を特色付けるものである。本開示のLNP組成物は、IDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAの治療物質を含む。本開示のLNP組成物は、インビボで免疫応答を誘導しTエフェクター細胞を刺激することができ、したがってがんの治療において有用である。チェックポイントがんワクチンをコードするmRNA及びその使用が提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1 (PD-L1) 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含むポリヌクレオチドを含む、脂質ナノ粒子 (LNP) 組成物。

【請求項 2】

免疫調整のための、例えば免疫応答を誘導する及び／または免疫寛容を破壊する（例えば T 効果細胞を刺激する）ための脂質ナノ粒子 (LNP) 組成物であって、(i) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含むポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 3】

T 効果細胞を刺激するための脂質ナノ粒子組成物であって、(i) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含むポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 4】

(i) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む、mRNA コンストラクト。

【請求項 5】

前記 IDO 抗原性ペプチドが、天然に存在する IDO 分子の断片またはそのバリエーションを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 6】

前記 IDO 抗原性ペプチドが、IDO1 または IDO2 に由来する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 7】

前記 IDO 抗原性ペプチドが、IDO1 に由来する、請求項 6 に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 8】

前記 IDO 抗原性ペプチドが、配列番号 1 の配列へ、少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 9】

前記 IDO 抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 2 またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 10】

前記 PD-L1 抗原性ペプチドが、天然に存在する PD-L1 分子の断片またはそのバリエーションを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の LNP 組成物または mRNA コンストラクト。

【請求項 11】

前記 P D - L 1 抗原性ペプチドが、配列番号 3 の配列へ、少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 12】

前記 P D - L 1 抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 4 またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも 60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

10

【請求項 13】

前記チェックポイントがんワクチンが、2 つの I D O 抗原性ペプチド及び 2 つの P D - L 1 抗原性ペプチドを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 14】

前記チェックポイントがんワクチンが、3 つの I D O 抗原性ペプチド及び 3 つの P D - L 1 抗原性ペプチドを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 15】

前記チェックポイントがんワクチンが、4 つの I D O 抗原性ペプチド及び 4 つの P D - L 1 抗原性ペプチドを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

20

【請求項 16】

前記チェックポイントがんワクチンが、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 17】

前記チェックポイントがんワクチンが、(i) I D O 抗原性ペプチド、(i i) P D - L 1 抗原性ペプチド、(i i i) I D O 抗原性ペプチド、(i v) P D - L 1 抗原性ペプチド、(v) I D O 抗原性ペプチド、(v i) P D - L 1 抗原性ペプチド、(v i i) I D O 抗原性ペプチド、及び (v i i i) P D - L 1 抗原性ペプチドを含む、請求項 15 または 16 に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

30

【請求項 18】

前記交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドが、表 1 A 中で提供される I D O アミノ酸配列（例えば配列番号 5）またはその抗原性断片へ、少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 19】

前記交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 6、300、301、もしくは 302、またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも 50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

40

【請求項 20】

(i) T エフェクター細胞を刺激すること；

(i i) P D - L 1 または I D O を過剰発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞を、細胞傷害性 T 細胞を媒介して殺傷すること；及び／または

(i i i) 抗腫瘍性免疫応答を誘導すること

50

をもたらす、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 2 1】

例えば本明細書において記載されるように、対象におけるがんの進行の軽快または遅延をもたらす、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 2 2】

1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D-L 1）抗原性ペプチドを含む前記チェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含む前記ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの化学的修飾を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

10

【請求項 2 3】

前記化学的修飾が、N1-メチルシュードウリジンである、請求項 2 2 に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【請求項 2 4】

前記 L N P 組成物が、（i）イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；（i i）ステロールまたは他の構造脂質；（i i i）非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び（i v）P E G-脂質を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物。

20

【請求項 2 5】

前記イオン化可能脂質が、化合物 2 5 を含む、請求項 2 4 に記載の L N P 組成物。

【請求項 2 6】

前記 P E G 脂質が、P E G D M G である、請求項 2 4 に記載の L N P 組成物。

【請求項 2 7】

前記 L N P 組成物が、（i）化合物 2 5、（i i）コレステロール、（i i i）D S P C、及び（i v）P E G D M G を含む、請求項 2 4 に記載の L N P 組成物。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクトを含む、医薬組成物。

30

【請求項 2 9】

対象において免疫応答を調整する（例えば刺激する）方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D-L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の L N P 組成物を、それを必要とする前記対象へ投与することを含む、方法。

【請求項 3 0】

対象において T エフェクター細胞を刺激する方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D-L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の L N P 組成物を、前記対象へ投与することを含む、方法。

40

【請求項 3 1】

がんまたはその症状を治療または予防する方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D-L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の

50

L N P 組成物を、それを必要とする前記対象へ投与することを含む、方法。

【請求項 3 2】

前記がんが、局所進行性または転移性の固形腫瘍である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記がんが、メラノーマである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記メラノーマが、皮膚メラノーマである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記皮膚メラノーマが、1 L 皮膚メラノーマステージ I I I B + である、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記がんが、N S C L C である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 N S C L C が、1 L N S C L C である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記がんが、膀胱癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記膀胱癌が、筋層非浸潤性膀胱癌である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記がんが、頭頸部癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

前記頭頸部癌が、頭頸部扁平上皮癌である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記がんが、結腸直腸癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記結腸直腸癌が、マイクロサテライト安定結腸直腸癌である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記がんが、基底細胞癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記がんが、乳癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 4 6】

前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記チェックポイントがんワクチンをコードする前記 m R N A が、配列番号 3 0 0、3 0 1、または 3 0 2 の核酸配列を含む、請求項 2 9 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 L N P 組成物が、(i) イオン化可能脂質 (例えばアミノ脂質) ; (i i) ステロールまたは他の構造脂質 ; (i i i) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質 ; 及び (i v) P E G - 脂質を含む、請求項 2 9 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 4 9】

前記イオン化可能脂質が、化合物 2 5 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 L N P 組成物が、(i) 化合物 2 5、(i i) コレステロール、(i i i) D S P C、及び (i v) P E G D M G を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記方法が、抗 P D - 1 及び抗 C T L A 4 からなる群から選択されるチェックポイント阻害物質を対象へ投与することをさらに含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記チェックポイント阻害物質が、ペムブロリズマブを含む、請求項 5 1 に記載の方法

50

。

【請求項 53】

前記 LNP 組成物が、約 100 μ g ～ 約 1 mg の用量で投与される、請求項 29 ～ 52 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 54】

前記 LNP 組成物が、50 μ g ～ 150 μ g、150 μ g ～ 250 μ g、250 μ g ～ 350 μ g、350 μ g ～ 450 μ g、450 μ g ～ 550 μ g、550 μ g ～ 650 μ g、650 μ g ～ 750 μ g、750 μ g ～ 850 μ g、850 μ g ～ 950 μ g、または 950 μ g ～ 1 mg の用量で投与される、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記 LNP 組成物が、50 μ g、100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g、800 μ g、900 μ g、または 1 mg の用量で投与される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記 LNP 組成物が、筋肉内投与される、請求項 29 ～ 55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

前記 LNP 組成物が、3 週間毎に 1 回投与される、請求項 29 ～ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 2 月 18 日に出願された米国仮出願第 63 / 311, 716 号及び 2022 年 10 月 28 日に出願された米国仮出願第 63 / 381, 460 号の利益を主張する。前述の出願の内容は、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

メラノーマは、米国において 5 番目多いがんの診断である。メラノーマは、すべての新たながんの診断のうちの 5.3%、及びがん関連のすべて死亡のうちの 1.5% を占める。皮膚メラノーマは、皮膚のメラノサイト（色素産生細胞）から出発するがんである。局所ステージで診断されるならば、5 年生存率はおおよそ 95% である。しかしながら、領域性疾患または転移性疾患（ステージ III B+）については、5 年生存率はおおよそ 30 ～ 60% へ下落する。米国において、おおよそ 18,000 名の新たな患者が、ステージ III B+ 皮膚メラノーマと診断される。進行性メラノーマ（稀で重篤なタイプの皮膚癌）は、皮膚癌症例のうちのたった 1% に相当するにもかかわらず、大部分の皮膚癌関連死を占める。現在の標準的な医療は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはニボルマブ + イピリムマブの併用である。

【0003】

NSCLC は後期ステージに進行するまで無症候性のままであり、多くの場合検出されない。米国において、毎年おおよそ 115,000 名の人々が転移性 NSCLC と診断されるか、または転移性疾患へ進行する。転移性 NSCLC の治療への現在のアプローチは、PD-L1 発現の存在に依存する。腫瘍の PD-L1 発現が 50% を超えるならば、ペムブロリズマブまたはアテゾリズマブの単剤療法が好ましいが、PD-L1 発現が 50% 未満の患者には、化学療法及びペムブロリズマブの併用が好ましい。

【0004】

がん（メラノーマ及び NSCLC 等）のための複数の治療があるが、治療転帰を改善し且つがん患者の生存を延長し得る新たな様式及び治療法を開発する必要性は、満たされていない。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0005】

本開示は、チェックポイントがんワクチン（例えば1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含む）をコードするポリヌクレオチドコンストラクト、及びかかるポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）組成物、ならびにその使用をとりわけ提供する。本開示のLNP組成物は、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド；及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択でアジュバントアミノ酸配列をコードする1つまたは複数のmRNA分子を含む。一態様において、本開示のLNP組成物は、免疫応答を刺激し（例えばエフェクターT細胞を刺激して、IDOまたはPD-L1を発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞を標的化及び殺傷する）、T細胞をプライミングして、腫瘍関連抗原の認識を誘導し、ヘルパーT細胞を誘導し、腫瘍部位の中へのT細胞の流入を増進し、細胞傷害性T細胞媒介性の腫瘍細胞の殺傷を誘導し得る。がんの治療のためにまたは対象における免疫応答の刺激のために、チェックポイントがんワクチンを含むLNP組成物を使用する方法も本明細書において開示される。

10

【0006】

本開示の追加の態様は、以下にさらに詳細に記載される。

【0007】

一態様において、（i）1つまたは複数のインドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のプログラム死リガンド1（PD-L1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）が本明細書において提供される。任意選択で、ポリヌクレオチドは、アジュバントのためのアミノ酸配列をコードする配列も含み得る。本発明は、かかるポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）組成物にも関する。

20

【0008】

別の態様において、本開示は、免疫調整のための、例えばIDO/PDL1特異的T細胞によって免疫応答を刺激することまたは免疫寛容を破壊すること（例えばTEフェクター細胞をそれらの活性化の増加によって刺激すること及び／またはIDO及びPDL1を発現し得る腫瘍細胞へそれらを引きつけること）のための脂質ナノ粒子（LNP）組成物であって、（i）1つまたは複数のインドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のプログラム死リガンド1（PD-L1）抗原性ペプチドのmRNAを含む、組成物を提供する。任意選択で、mRNAは、アジュバントのためのアミノ酸配列もコードし得る。一実施形態において、LNP組成物は、CD4+及び／またはCD8+のT細胞による腫瘍細胞の浸潤を増進し、IDO及び／またはPDL1を発現する腫瘍細胞の殺傷を増進する。

30

【0009】

一態様において、メラノーマまたはNSCLCを有する対象においてTEフェクター細胞を刺激するための脂質ナノ粒子（LNP）組成物であって、（i）1つまたは複数のインドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のプログラム死リガンド1（PD-L1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含む、組成物が本明細書において提供される。任意選択で、mRNAは、アジュバントのためのアミノ酸配列もコードし得る。

40

【0010】

一実施形態において、本明細書において開示されるLNP組成物の投与は、例えば本明細書において記載されるアッセイによって測定されるように、例えば本明細書において記載されるように、対象におけるがんの進行の軽快または遅延をもたらす。一実施形態において、チェックポイント阻害物質（例えば抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、またはそれらの併用）も、対象へ投与され得る。

【0011】

本明細書において開示されるLNP組成物のうちの任意のものの一実施形態において、

50

チェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含み、それを含む mRNA は、少なくとも 1 つの化学的修飾を含む。

【0012】

本明細書において開示される LNP 組成物のうちの任意のものの一実施形態において、LNP 組成物は、(i) イオン化可能脂質（例えばイオン化可能アミノ脂質）；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv) PEG-脂質を含む。

【0013】

一態様において、本明細書において開示される LNP 組成物を含む医薬組成物が本明細書において提供される。

10

【0014】

一態様において、対象において免疫応答を調整する（例えば誘導または増進する）方法であって、(i) 1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び(ii) 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含む有効量の LNP 組成物を、それを必要とする対象へ投与することを含む、方法が本明細書において提供される。任意選択で、mRNA は、アジュバントのためのアミノ酸配列もコードし得る。

【0015】

別の態様において、本開示は、対象において T 効果細胞を刺激する方法であって、(i) 1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び(ii) 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含む有効量の LNP 組成物を、対象へ投与することを含む、方法を提供する。任意選択で、mRNA は、アジュバントのためのアミノ酸配列もコードし得る。

20

【0016】

さらに別の態様において、がんもしくはその転移病巣（例えば皮膚メラノーマ（例えば 1L 皮膚メラノーマステージ IIIIB+）または NSCLC（例えば 1L NSCLC））またはそれらの症状を、治療するかまたはそれらの蔓延を予防する方法であって、(i) 1 つまたは複数の IDO ペプチド及び(ii) 1 つまたは複数の PD-L1 ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含む有効量の LNP 組成物を、それを必要とする対象へ投与することを含む、方法が本明細書において提供される。任意選択で、mRNA は、アジュバントのためのアミノ酸配列もコードし得る。

30

【0017】

本明細書において開示される方法のうちの任意のものの実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、IDO 及び PD-L1 の交互の抗原性ペプチド（例えば多量体である）を含む。

【0018】

本明細書において開示される方法のうちの任意のものの実施形態において、(i) 1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び(ii) 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含む LNP 組成物は、追加の薬剤、例えば免疫応答をさらに刺激する薬剤、例えばチェックポイント阻害物質（抗 PD1 抗体または抗 CTLA4 抗体等）と併用して投与される。

40

【0019】

一実施形態において、追加の薬剤は、治療タンパク質の形態で投与される。別の実施形態において、追加の薬剤は、LNP 中でカプセル化されたポリヌクレオチドの形態で投与される。一実施形態において、LNP 組成物及び追加の薬剤は、同じ組成物または分離した組成物中にある。

【0020】

一実施形態において、LNP 組成物及び追加の薬剤は、実質的に同時にまたは逐次投与される。一実施形態において、逐次投与に関して、LNP 組成物は、追加の薬剤が投与される前に投与される。一実施形態において、投与の順序は逆である。本明細書において開

50

示される方法のうちの任意のものの実施形態において、がんは、固形腫瘍（例えば局所進行性または転移性の固形腫瘍）である。いくつかの実施形態において、がんは、皮膚メラノーマ（例えば1L皮膚メラノーマステージIIIB+）、NSCLC（例えば1L NSCLC）、膀胱癌（例えば筋層非浸潤性膀胱癌）、頭頸部癌（例えば頭頸部扁平上皮癌）、結腸直腸癌（例えばマイクロサテライト安定結腸直腸癌）、基底細胞癌、または乳癌（例えばトリプルネガティブ乳癌）から選ばれる。

【0021】

一実施形態において、がんは、皮膚メラノーマである。一実施形態において、皮膚メラノーマは、1L皮膚メラノーマステージIIIB+である。一実施形態において、メラノーマは、不応性メラノーマである。一実施形態において、がんは、NSCLCである。一実施形態において、NSCLCは、1L NSCLCである。一実施形態において、NSCLCは、局所進行性もしくは転移性のNSCLC及び／またはチェックポイント阻害物質不応性NSCLCである。

10

【0022】

本明細書において開示される方法のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、LNP組成物は、(i)イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(ii)ステロールまたは他の構造脂質；(iii)非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv)PEG-脂質を含む。いくつかの実施形態において、イオン化可能脂質は、化合物25を含む。本明細書において開示される方法のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、LNP組成物は、化合物25を含むイオン化可能脂質及びPEG DMGを含むPEG-脂質を含む。

20

【0023】

さらに別の態様において、本明細書において開示されるLNP組成物または本明細書において開示される薬学的LNP組成物を含む容器を含むキットが本明細書において開示される。

【0024】

いくつかの実施形態において、キットは、がんの治療のためのLNP組成物または薬学的LNP組成物の投与のための指示書を含むパッケージ挿入物を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、薬学的に許容される担体を含む。

30

【0026】

本明細書において開示される、LNP組成物、前記LNPを含む医薬組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの追加の特色としては、以下の態様または実施形態が挙げられる。

【0027】

一態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される例えば1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含む、例えばチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成物を提供する。任意選択で、ポリヌクレオチドは、アジュバントのためのアミノ酸配列をコードする配列も含み得る。

40

【0028】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成物は、1つまたは複数のIDO抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDO抗原性ペプチドアミノ酸配列（例えば配列番号1）またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列（例えば配列番号1）またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、配列番号1またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。

50

【0029】

一実施形態において、IDO抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、配列番号2またはその抗原性断片のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ヌクレオチド配列を含む。

【0030】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成物は、1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるPD-L1抗原性ペプチドアミノ酸配列（例えば配列番号3）またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1分子は、表1A中で提供されるPD-L1アミノ酸配列（例えば配列番号3）またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1分子は、配列番号3またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。

10

【0031】

一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号4またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、配列番号4またはその抗原性断片のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ヌクレオチド配列を含む。

20

【0032】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成物は、例えば1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、1つのIDO抗原性ペプチド及び1つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、2つのIDO抗原性ペプチド及び2つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、3つのIDO抗原性ペプチド及び3つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドは、交互様式でアレンジされる。したがって一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、(i) IDO抗原性ペプチド、(ii) PD-L1抗原性ペプチド、(iii) IDO抗原性ペプチド、(iv) PD-L1抗原性ペプチド、(v) IDO抗原性ペプチド、(vi) PD-L1抗原性ペプチド、(vii) IDO抗原性ペプチド、及び(viii) PD-L1抗原性ペプチドを含む。

30

40

【0033】

一実施形態において、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列（例えば配列番号5）またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるアミノ酸配列（例えば配列

50

番号 5) またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドは、配列番号 5 またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 6、3 0 0、3 0 1、もしくは 3 0 2、またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例えば m R N A) は、配列番号 6、3 0 0、3 0 1、もしくは 3 0 2、またはその抗原性断片のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 3 5 】

本明細書において開示される、L N P 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの化学的修飾を含む。一実施形態において、化学的修飾は、シュードウリジン、N 1 - メチルシュードウリジン、2 - チオウリジン、4' - チオウリジン、5 - メチルシトシン、2 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - シュードウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - シュードウリジン、2 - チオ - 5 - アザ - ウリジン、2 - チオ - ジヒドロシュードウリジン、2 - チオ - ジヒドロウリジン、2 - チオ - シュードウリジン、4 - メトキシ - 2 - チオ - シュードウリジン、4 - メトキシ - シュードウリジン、4 - チオ - 1 - メチル - シュードウリジン、4 - チオ - シュードウリジン、5 - アザ - ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5 - メチルウリジン、5 - メチルウリジン、5 - メトキシウリジン、及び 2' - O - メチルウリジンからなる群から選択される。一実施形態において、化学的修飾は、シュードウリジン、N 1 - メチルシュードウリジン、5 - メチルシトシン、5 - メトキシウリジン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態において、化学的修飾は、N 1 - メチルシュードウリジンである。一実施形態において、脂質ナノ粒子中の各々の m R N A は、完全に修飾された N 1 - メチルシュードウリジンを含む。

20

【 0 0 3 6 】

本明細書において開示される、L N P 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、L N P 組成物は、(i) イオン化可能脂質 (例えばアミノ脂質) ; (i i) ステロールまたは他の構造脂質 ; (i i i) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質 ; 及び (i v) P E G - 脂質を含む。

30

【 0 0 3 7 】

本明細書において開示される、L N P 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、L N P 組成物は、アミノ脂質を含むイオン化可能脂質を含む。一実施形態において、イオン化可能脂質は、式 (I)、(I - a)、(I - b)、(I - c)、(I I)、(I I - a)、(I I - b)、(I I - c)、(I I - d)、(I I - e)、(I I - f)、(I I - g)、(I I - h)、または (I I I) のうちの任意の化合物を含む。一実施形態において、イオン化可能脂質は、式 (I) の化合物を含む。一実施形態において、イオン化可能脂質は、化合物 1 8 を含む。一実施形態において、イオン化可能脂質は、化合物 2 5 を含む。

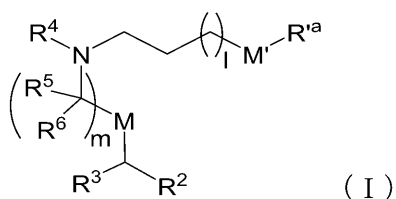
40

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、式 (I) のイオン化可能アミノ脂質の化合物 :

50

【化 1】



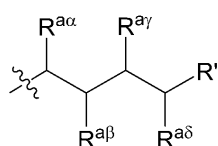
もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくはは異性体

10

【式中、R^{1a} は、R 分岐鎖であり；

R 分岐鎖は、

【化 2】



であり；

20

【化 3】



は、結合点を表わし；

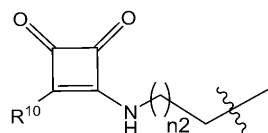
R^{aα}、R^{aβ}、R^{aγ}、及び R^{aδ} は各々、H、C₂-12 アルキル、及び C₂-12 アルケニルからなる群から独立して選択され；

R² 及び R³ は各々、C₁-14 アルキル及び C₂-14 アルケニルからなる群から独立して選択され；

30

R⁴ は、-(CH₂)_nOH（式中、n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される）及び

【化 4】



からなる群から選択され、

40

【化 5】



は、結合点を表わし；

R¹⁰ は、N(R)₂ であり；各々の R は、C₁-6 アルキル、C₂-3 アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され；n₂ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R⁵ は、C₁-3 アルキル、C₂-3 アルケニル及び H からなる群から独立して

50

選択され；

各々の R^6 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ からなる群から独立して選択され；

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

l は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択され；

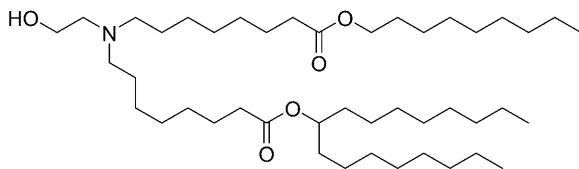
m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 からなる群から選択される]を含む。

【0039】

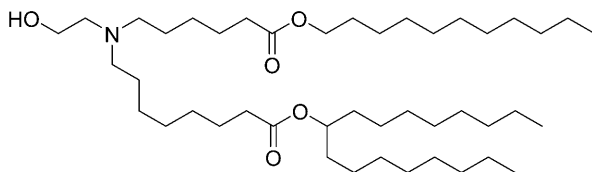
10

いくつかの実施形態において、イオン化可能アミノ脂質の式 (I) の化合物は、

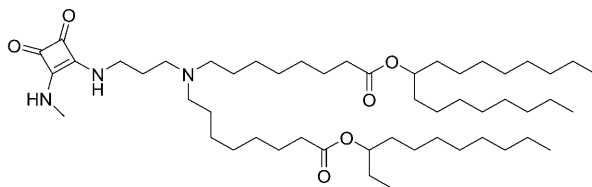
【化 6】



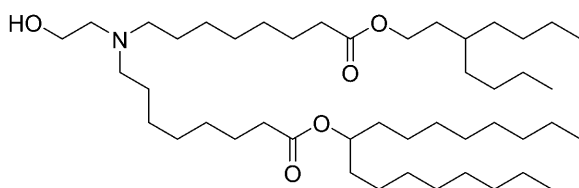
(18)、



(25)、



(301)、及び



(357)

から選択される。

【0040】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、リン脂質、構造脂質、及び PEG-脂質をさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態において、PEG-脂質は、PEG DMG である。

【0042】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、

(i) 40~50 mol% の式 (I) の化合物、30~45 mol% の構造脂質、5~15 mol% のリン脂質、及び 1~5 mol% の PEG-脂質；または

(ii) 45~50 mol% の式 (I) の化合物、35~45 mol% の構造脂質、8~12 mol% のリン脂質、及び 1.5~3.5 mol% の PEG-脂質

を含む。

【0043】

50

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、化合物 25、DSPC、コレステロール、及び PEG DMG を含む。

【0044】

本明細書において開示される、LNP 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNP は、約 20 mol % ~ 約 60 mol % のイオン化可能脂質、約 5 mol % ~ 約 25 mol % の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約 25 mol % ~ 約 55 mol % のステロールまたは他の構造脂質、及び約 0.5 mol % ~ 約 15 mol % の PEG 脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 35 mol % ~ 約 55 mol % のイオン化可能脂質、約 5 mol % ~ 約 25 mol % の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約 30 mol % ~ 約 40 mol % のステロールまたは他の構造脂質、及び約 0 mol % ~ 約 10 mol % の PEG 脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 50 mol % のイオン化可能脂質、約 10 mol % の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約 38.5 mol % のステロールまたは他の構造脂質、及び約 1.5 mol % の PEG 脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 49.83 mol % のイオン化可能脂質、約 9.83 mol % の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約 30.33 mol % のステロールまたは他の構造脂質、及び約 2.0 mol % の PEG 脂質を含む。本明細書において開示される、LNP 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45.5 mol % ~ 約 49.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 46 mol % ~ 約 49 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 46.5 mol % ~ 約 48.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 47 mol % ~ 約 48 mol % のイオン化可能脂質を含む。

10

20

【0045】

本明細書において開示される、LNP 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 49.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 49 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 48.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 48 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 47.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 47 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 46.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 46 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 45 mol % ~ 約 45.5 mol % のイオン化可能脂質を含む。

30

40

【0046】

本明細書において開示される、LNP 組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNP は、約 45.5 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 46 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 46.5 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 47 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本開示の LNP または方法の一実施形態において、LNP は、約 47.5 mol % ~ 約 50 mol % のイオン化可能脂質を含む。本

50

10

20

30

40

50

本明細書において開示される、LNP組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNPは、約1mol%～約4.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約4mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、

LNPは、約1mol%～約3.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約3mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約2.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約2mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約1.5mol%のPEG脂質を含む。

【0051】

本明細書において開示される、LNP組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNPは、約1.5mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約2mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約2.5mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約3mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約3.5mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約4mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約4.5mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。

10

【0052】

本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1mol%～約2mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1.5mol%～約2.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約2mol%～約3mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約3.5mol%～約4.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約4mol%～約5mol%のPEG脂質を含む。

20

【0053】

本明細書において開示される、LNP組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNPは、約1mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約1.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約2mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約2.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約3mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約3.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約4mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約4.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約5mol%のPEG脂質を含む。

30

【0054】

本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約50mol%の化合物25及び約10mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、50mol%の化合物25及び約10mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約50mol%の化合物25及び10mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、50mol%の化合物25及び10mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約49.83mol%の化合物25、約9.83mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約30.33mol%のステロールまたは他の構造脂質、及び約2.0mol%のPEG脂質を含む。

40

【0055】

50

本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約48mol%の化合物25、約11mol%の非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質、約38.5mol%のステロールまたは他の構造脂質、及び約2.5mol%のPEG脂質を含む。本開示のLNPまたは方法の一実施形態において、LNPは、約48mol%の化合物25、約11mol%のDSPC、約38.5mol%のコレステロール、及び約2.5mol%のPEG-DMGを含む。

【0056】

本明細書において開示される、LNP組成物、方法、または使用のための組成物のうちの任意のものの実施形態において、LNPは、静脈内送達、皮下送達、または筋肉内送達のために製剤化される。一実施形態において、LNPは、筋肉内送達のために製剤化される。

10

【0057】

一実施形態において、本明細書において開示されるLNP組成物は、がんを有する対象へ投与される。いくつかの実施形態において、がんは、固形腫瘍であり、例えば局所進行性または転移性の固形腫瘍である。

【0058】

本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、メラノーマである。いくつかの実施形態において、メラノーマは、皮膚メラノーマである。一実施形態において、皮膚メラノーマは、1L皮膚メラノーマステージIIIB+である。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、NSCLCである。一実施形態において、NSCLCは、1L NSCLCである。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、膀胱癌である。いくつかの実施形態において、膀胱癌は、筋層非浸潤性膀胱癌である。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、頭頸部癌である。いくつかの実施形態において、頭頸部癌は、頭頸部扁平上皮癌である。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、結腸直腸癌は、マイクロサテライト安定結腸直腸癌である。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、基底細胞癌である。本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、がんは、乳癌である。いくつかの実施形態において、乳癌は、トリプルネガティブ乳癌である。

20

30

【0059】

本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、LNP組成物は、投薬間隔に従って対象へ投与される。いくつかの実施形態において、投薬間隔は、3週間のサイクルを含む。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、1つまたは複数のサイクルで3週間毎に1回、対象へ投与される。いくつかの実施形態において、投薬レジメンは、2つのサイクル、3つのサイクル、4つのサイクル、5つのサイクル、6つのサイクル、7つのサイクル、8つのサイクル、または9つのサイクルを含む。

40

【0060】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約50μg～約1mg、例えば約100μg～約1mg、約200μg～約900μg、約300μg～約800μg、約400μg～約700μg、約500μg～約600μg、約200μg～約1mg、約300μg～約1mg、約400μg～約1mg、約500μg～約1mg、約600μg～約1mg、約700μg～約1mg、約800μg～約1mg、約900μg～約1mg、約100μg～約900μg、約100μg～約800μg、約100μg～約700μg、約100μg～約600μg、約100μg～約500μg、約100μg～約400μg、約100μg～約300μg、または約100μg～約200μgの用量で投

50

与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約100 μ g～約200 μ g、約200 μ g～約300 μ g、約300 μ g～約400 μ g、約400 μ g～約500 μ g、約500 μ g～約600 μ g、約600 μ g～約700 μ g、約700 μ g～約800 μ g、約800 μ g～約900 μ g、または約900 μ g～約1mgの用量で投与される。

【0061】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約50 μ g～約75 μ g（例えば約50 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約50 μ g～約150 μ g（例えば約100 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約150 μ g～約250 μ g（例えば約200 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約250 μ g～約350 μ g（例えば約300 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約350 μ g～約450 μ g（例えば約400 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約450 μ g～約550 μ g（例えば約500 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約550 μ g～約650 μ g（例えば約600 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約650 μ g～約750 μ g（例えば約700 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約750 μ g～約850 μ g（例えば約800 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約850 μ g～約950 μ g（例えば約900 μ g）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約950 μ g～約1mg（例えば約1mg）の用量で投与される。

【0062】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、筋肉内（IM）投与される。

【0063】

本明細書において開示される方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、対象は、哺乳動物（例えばヒト）である。

【0064】

前述のLNP組成物または前記LNP組成物を使用する方法のうちの任意のものの特徴としては、以下で列挙される実施形態のうちの1つまたは複数が挙げられる。当業者であれば、単なるルーチンの実験作業を使用するだけで、本明細書において記載される本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を、認識するか、または確認できるだろう。かかる均等物は、以下で列挙される実施形態によって包含されることが意図される。

【0065】

本開示の他の実施形態

E1. (i) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド1（PD-L1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む、脂質ナノ粒子（LNP）組成物。

【0066】

E2. Tエフェクター細胞を刺激するための脂質ナノ粒子組成物であって、(i) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む、組成物。

【0067】

E3. Tエフェクター細胞を刺激するための脂質ナノ粒子組成物であって、(i) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗

原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む、組成物。

【0068】

E4. (i) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む、mRNAコンストラクト。

【0069】

E5. 前記IDO抗原性ペプチドが、天然に存在するIDO分子の断片またはそのバリエーションを含む、実施形態E1～E4のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

10

【0070】

E6. 前記IDO抗原性ペプチドが、IDO1またはIDO2に由来する、実施形態E1～E5のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0071】

E7. 前記IDO抗原性ペプチドが、IDO1に由来する、実施形態E6に記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0072】

E8. 前記IDO抗原性ペプチドが、配列番号1の配列へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態E1～E7のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

20

【0073】

E9. 前記IDO抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号2またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E1～E8のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0074】

E10. 前記PD-L1抗原性ペプチドが、天然に存在するPD-L1分子の断片またはそのバリエーションを含む、実施形態E1～E9のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

30

【0075】

E11. 前記PD-L1抗原性ペプチドが、配列番号3の配列へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態E1～E10のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0076】

E12. 前記PD-L1抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号4またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E1～E11のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

40

【0077】

E13. 前記チェックポイントがんワクチンが、2つのIDO抗原性ペプチド及び2つのPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E1～E12のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0078】

E14. 前記チェックポイントがんワクチンが、3つのIDO抗原性ペプチド及び3つのPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E1～E12のいずれか1つに記載のLNP

50

P 組成物または mRNA コンストラクト。

【0079】

E 15 . 前記チェックポイントがんワクチンが、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E1～E12のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0080】

E 16 . 前記チェックポイントがんワクチンが、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E1～E15のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0081】

E 17 . 前記チェックポイントがんワクチンが、(i) IDO抗原性ペプチド、(ii) PD-L1抗原性ペプチド、(iii) IDO抗原性ペプチド、(iv) PD-L1抗原性ペプチド、(v) IDO抗原性ペプチド、(vi) PD-L1抗原性ペプチド、(vii) IDO抗原性ペプチド、及び(viii) PD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E15またはE16に記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0082】

E 18 . 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドが、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列(例えば配列番号5)またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態E15～E17のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0083】

E 19 . 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号6またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E16～E18のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0084】

E 20 . 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号300またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E16～E19のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0085】

E 21 . 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号301またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E16～E19のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0086】

E 22 . 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号302またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E16～E19のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0087】

10

20

30

40

50

E 2 3 . 前記交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、5' 端から 3' 端へ、配列番号 5 6 の 5' U T R、配列番号 6 の O R F 配列、及び配列番号 1 0 8 の 3' U T R を含む配列番号 3 0 0 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 E 1 6 ~ E 1 9 のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【0088】

E 2 4 . 前記交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、5' 端から 3' 端へ、配列番号 2 7 2 の 5' U T R、配列番号 6 の O R F 配列、及び配列番号 1 0 8 の 3' U T R を含む配列番号 3 0 1 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 E 1 6 ~ E 1 9 のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A

10

【0089】

E 2 5 . 前記交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、5' 端から 3' 端へ、配列番号 2 7 3 の 5' U T R、配列番号 6 の O R F 配列、及び配列番号 1 0 8 の 3' U T R を含む配列番号 3 0 2 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 E 1 6 ~ E 1 9 のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【0090】

E 2 6 . 1 つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

20

【0091】

E 2 7 .

(i) T エフェクター細胞を刺激すること；

(i i) P D - L 1 または I D O を過剰発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞を、細胞傷害性 T 細胞を媒介して殺傷すること；

(i i i) 抗腫瘍性免疫応答を誘導すること；及び／または

(i v) C D 4 + 及び／または C D 8 + の T 細胞によって腫瘍細胞を浸潤すること、ならびに I D O 及び／または P D L 1 を発現する腫瘍細胞を殺傷すること
をもたらす、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

30

【0092】

E 2 8 . 例えば本明細書において記載されるように、対象におけるがんの進行の軽快または遅延をもたらす、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【0093】

E 2 9 . 1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2, 3-ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D - L 1）抗原性ペプチドを含む前記チェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含む前記ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの化学的修飾を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

40

【0094】

E 3 0 . 前記化学的修飾が、シュードウリジン、N 1-メチルシュードウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メチルウリジン、5-

50

メチルウリジン、5-メトキシウリジン、及び2'-O-メチルウリジンからなる群から選択される、実施形態E29に記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0095】

E31. 前記化学的修飾が、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5-メチルシトシン、5-メトキシウリジン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態E30に記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0096】

E32. 前記化学的修飾が、N1-メチルシュードウリジンである、実施形態E31に記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0097】

E33. 前記脂質ナノ粒子中の前記mRNAが、完全に修飾されたN1-メチルシュードウリジンを含む、先行実施形態のいずれか1つに記載のLNP組成物またはmRNAコンストラクト。

【0098】

E34. 前記LNP組成物が、(i) イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv) PEG-脂質を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0099】

E35. 前記イオン化可能脂質が、アミノ脂質を含む、実施形態E34に記載のLNP組成物。

【0100】

E36. 前記イオン化可能脂質が、式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意の化合物を含む、実施形態E34またはE35に記載のLNP組成物。

【0101】

E37. 前記イオン化可能脂質が、化合物18、化合物25、化合物301、または化合物357を含む、実施形態E34～E36のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0102】

E38. 前記イオン化可能脂質が、化合物25を含む、実施形態E37に記載のLNP組成物。

【0103】

E39. 前記ステロールまたは他の構造脂質が、コレステロールを含む、実施形態E34～E38のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0104】

E40. 前記非カチオン性ヘルパー脂質またはリン脂質が、DSPCを含む、実施形態E34～E39のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0105】

E41. 前記PEG脂質が、PEG DMGを含む、実施形態E34～E40のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0106】

E42. 前記LNPが、モル比で、約20～60%のイオン化可能脂質：5～25%のリン脂質：25～55%のコレステロール；及び0.5～15%のPEG脂質を含む、実施形態E34～E41のいずれか1つに記載のLNP組成物。

【0107】

E43. 前記LNPが、モル比で、約48mol%のイオン化可能脂質：約11mol%のリン脂質：約38.5mol%のコレステロール；及び約2.5mol%のPEG脂質を含む、実施形態E42に記載のLNP組成物。

【0108】

10

20

30

40

50

E 4 4 . 前記 L N P が、モル比で、約 4 8 m o l % の化合物 2 5 : 約 1 1 m o l % の D S P C : 約 3 8 . 5 m o l % のコレステロール ; 及び約 2 . 5 m o l % の P E G D M G を含む、実施形態 E 4 3 に記載の L N P 組成物。

【 0 1 0 9 】

E 4 5 . 筋肉内送達、皮下送達、静脈内送達、鼻腔内送達、眼内送達、直腸送達、または経口送達のために製剤化される、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【 0 1 1 0 】

E 4 6 . 薬学的に許容される担体または賦形剤をさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクト。

【 0 1 1 1 】

E 4 7 . 先行実施形態のいずれか 1 つに記載の L N P 組成物または m R N A コンストラクトを含む、医薬組成物。

【 0 1 1 2 】

E 4 8 . 対象において免疫応答を調整する（例えば刺激する）方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2 , 3 -ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D - L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の L N P 組成物を、それを必要とする前記対象へ投与することを含む、方法。

【 0 1 1 3 】

E 4 9 . 対象において T エフェクター細胞を刺激する方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2 , 3 -ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D - L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の L N P 組成物を、前記対象へ投与することを含む、方法。

【 0 1 1 4 】

E 5 0 . がんまたはその症状を治療または予防する方法であって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール 2 , 3 -ジオキシゲナーゼ（I D O）抗原性ペプチド及び（i i）1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド 1（P D - L 1）抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A を含むポリヌクレオチドを含む有効量の L N P 組成物を、それを必要とする前記対象へ投与することを含む、方法。

【 0 1 1 5 】

E 5 1 . 前記がんが、局所進行性または転移性の固形腫瘍である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。

【 0 1 1 6 】

E 5 2 . 前記がんが、メラノーマである、実施形態 E 5 0 に記載の方法。

【 0 1 1 7 】

E 5 3 . 前記メラノーマが、皮膚メラノーマである、実施形態 E 5 2 に記載の方法。

【 0 1 1 8 】

E 5 4 . 前記皮膚メラノーマが、1 L 皮膚メラノーマステージ I I I B + である、実施形態 3 4 に記載の方法。

【 0 1 1 9 】

E 5 5 . 前記がんが、N S C L C である、実施形態 E 5 4 に記載の方法。

【 0 1 2 0 】

E 5 6 . 前記 N S C L C が、1 L N S C L C である、実施形態 E 5 5 に記載の方法。

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

50

- E 5 7 . 前記がんが、膀胱癌である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。
【 0 1 2 2 】
- E 5 8 . 前記膀胱癌が、筋層非浸潤性膀胱癌である、実施形態 E 5 7 に記載の方法。
【 0 1 2 3 】
- E 5 9 . 前記がんが、頭頸部癌である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。
【 0 1 2 4 】
- E 6 0 . 前記頭頸部癌が、頭頸部扁平上皮癌である、実施形態 E 5 9 に記載の方法。
【 0 1 2 5 】
- E 6 1 . 前記がんが、結腸直腸癌である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。
【 0 1 2 6 】 10
- E 6 2 . 前記結腸直腸癌が、マイクロサテライト安定結腸直腸癌である、実施形態 E 6 1 に記載の方法。
【 0 1 2 7 】
- E 6 3 . 前記がんが、基底細胞癌である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。
【 0 1 2 8 】
- E 6 4 . 前記がんが、乳癌である、実施形態 E 5 0 に記載の方法。
【 0 1 2 9 】
- E 6 5 . 前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌である、実施形態 E 6 4 に記載の方法。
【 0 1 3 0 】
- E 6 6 . 前記 I D O 抗原性ペプチドが、天然に存在する I D O 分子の断片またはそのバ
リアントを含む、実施形態 E 4 8 ~ E 6 5 のいずれか 1 つに記載の方法。 20
【 0 1 3 1 】
- E 6 7 . 前記 I D O 抗原性ペプチドが、I D O 1 または I D O 2 に由来する、実施形態
E 4 8 ~ E 6 6 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 2 】
- E 6 8 . 前記 I D O 抗原性ペプチドが、I D O 1 に由来する、実施形態 E 6 7 に記載の
方法。
【 0 1 3 3 】
- E 6 9 . 前記 I D O 抗原性ペプチドが、配列番号 1 の配列へ、少なくとも 8 5 %、9 0
%、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ 30
酸配列を含む、実施形態 E 4 8 ~ E 6 8 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 4 】
- E 7 0 . 前記 I D O 抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 2 またはそ
の抗原性断片の配列へ、少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、
9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するヌ
クレオチド配列を含む、実施形態 E 4 8 ~ E 6 9 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 5 】
- E 7 1 . 前記 P D - L 1 抗原性ペプチドが、天然に存在する P D - L 1 分子の断片また
はそのバリアントを含む、実施形態 E 4 8 ~ E 7 0 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 6 】 40
- E 7 2 . 前記 P D - L 1 抗原性ペプチドが、配列番号 3 の配列へ、少なくとも 8 5 %、
9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、実施形態 E 4 8 ~ E 7 1 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 7 】
- E 7 3 . 前記 P D - L 1 抗原性断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 4 また
はその抗原性断片の配列へ、少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5
%、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の同一性を有す
るヌクレオチド配列を含む、実施形態 E 4 8 ~ E 7 2 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 1 3 8 】
- E 7 4 . 前記チェックポイントがんワクチンが、2 つの I D O 抗原性ペプチド及び 2 つ 50

のPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E48～E73のいずれか1つに記載の方法。

【0139】

E75. 前記チェックポイントがんワクチンが、3つのIDO抗原性ペプチド及び3つのPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E48～E73のいずれか1つに記載の方法。

【0140】

E76. 前記チェックポイントがんワクチンが、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E48～E73のいずれか1つに記載の方法。

【0141】

E77. 前記チェックポイントがんワクチンが、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E48～E76のいずれか1つに記載の方法。

【0142】

E78. 前記チェックポイントがんワクチンが、(i) IDO抗原性ペプチド、(ii) PD-L1抗原性ペプチド、(iii) IDO抗原性ペプチド、(iv) PD-L1抗原性ペプチド、(v) IDO抗原性ペプチド、(vi) PD-L1抗原性ペプチド、(vii) IDO抗原性ペプチド、及び(viii) PD-L1抗原性ペプチドを含む、実施形態E76またはE77に記載の方法。

【0143】

E79. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドが、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列(例えば配列番号5)またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態E76～E78のいずれか1つに記載の方法。

【0144】

E80. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号6またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E79のいずれか1つに記載の方法。

【0145】

E81. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号300またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0146】

E82. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号301またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0147】

E83. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号302またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0148】

E84. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする

10

20

30

40

50

前記ポリヌクレオチドが、5'端から3'端へ、配列番号56の5'UTR、配列番号6のORF配列、及び配列番号108の3'UTRを含む配列番号300のヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0149】

E85. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、5'端から3'端へ、配列番号272の5'UTR、配列番号6のORF配列、及び配列番号108の3'UTRを含む配列番号301のヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0150】

E86. 前記交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、5'端から3'端へ、配列番号273の5'UTR、配列番号6のORF配列、及び配列番号108の3'UTRを含む配列番号302のヌクレオチド配列を含む、実施形態E77～E80のいずれか1つに記載の方法。

【0151】

E87. 前記組成物が、1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0152】

E88.

(i) Tエフェクター細胞を刺激すること；

(ii) PD-L1またはIDOを過剰発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞を、細胞傷害性T細胞を媒介して殺傷すること；

(iii) 抗腫瘍性免疫応答を誘導すること；及び／または

(iv) CD4+及び／またはCD8+のT細胞によって腫瘍細胞を浸潤すること、ならびにIDO及び／またはPD-L1を発現する腫瘍細胞を殺傷すること
をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0153】

E89. 例えば本明細書において記載されるように、対象におけるがんの進行の軽快または遅延をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0154】

E90. 1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）プログラム死リガンド1（PD-L1）抗原性ペプチドを含む前記チェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含む前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの化学的修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0155】

E91. 前記化学的修飾が、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン、及び2'-O-メチルウリジンからなる群から選択される、実施形態E90に記載の方法。

【0156】

E92. 前記化学的修飾が、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5-メチルシトシン、5-メトキシウリジン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態E91に記載の方法。

【0157】

10

20

30

40

50

E 9 3 . 前記化学的修飾が、N 1 -メチルシュードウリジンである、実施形態 E 9 2 に記載の方法。

【0158】

E 9 4 . 前記脂質ナノ粒子中の前記 mRNA が、完全に修飾された N 1 -メチルシュードウリジンを含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0159】

E 9 5 . 前記 LNP 組成物が、(i) イオン化可能脂質 (例えばアミノ脂質) ; (i i) ステロールまたは他の構造脂質 ; (i i i) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質 ; 及び (i v) PEG -脂質を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0160】

E 9 6 . 前記イオン化可能脂質が、アミノ脂質を含む、実施形態 E 9 5 に記載の方法。

【0161】

E 9 7 . 前記イオン化可能脂質が、式 (I) 、 (I - a) 、 (I - b) 、 (I - c) 、 (I I) 、 (I I - a) 、 (I I - b) 、 (I I - c) 、 (I I - d) 、 (I I - e) 、 (I I - f) 、 (I I - g) 、 (I I - h) 、または (I I I) のうちの任意の化合物を含む、実施形態 E 9 5 または E 9 6 に記載の方法。

【0162】

E 9 8 . 前記イオン化可能脂質が、式 (I) の化合物を含む、実施形態 E 9 5 ~ E 9 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0163】

E 9 9 . 前記イオン化可能脂質が、化合物 1 8 、化合物 2 5 、化合物 3 0 1 、または化合物 3 5 7 を含む、実施形態 E 9 5 ~ E 9 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0164】

E 1 0 0 . 前記イオン化可能脂質が、化合物 2 5 を含む、実施形態 E 9 9 に記載の方法。

【0165】

E 1 0 1 . 前記ステロールまたは他の構造脂質が、コレステロールを含む、実施形態 E 9 5 ~ E 1 0 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0166】

E 1 0 2 . 前記非カチオン性ヘルパー脂質またはリン脂質が、DSPC を含む、実施形態 E 9 5 ~ E 1 0 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0167】

E 1 0 3 . 前記 PEG 脂質が、PEG DMG を含む、実施形態 E 9 5 ~ E 1 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0168】

E 1 0 4 . 前記 LNP が、モル比で、約 2 0 ~ 6 0 % のイオン化可能脂質 : 5 ~ 2 5 % のリン脂質 : 2 5 ~ 5 5 % のコレステロール ; 及び 0 . 5 ~ 1 5 % の PEG 脂質を含む、実施形態 E 9 5 ~ E 1 0 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0169】

E 1 0 5 . 前記 LNP が、モル比で、約 4 8 m o l % のイオン化可能脂質 : 約 1 1 m o l % のリン脂質 : 約 3 8 . 5 m o l % のコレステロール ; 及び約 2 . 5 m o l % の PEG 脂質を含む、実施形態 E 1 0 4 に記載の方法。

【0170】

E 1 0 6 . 前記 LNP が、モル比で、約 4 8 m o l % の化合物 2 5 : 約 1 1 m o l % の DSPC : 約 3 8 . 5 m o l % のコレステロール ; 及び約 2 . 5 m o l % の PEG DMG を含む、実施形態 E 1 0 5 に記載の方法。

【0171】

E 1 0 7 . 前記 LNP 組成物が、約 1 0 0 μ g ~ 約 1 m g の用量で投与される、実施形態 E 4 8 ~ E 1 0 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0172】

10

20

30

40

50

E 1 0 8 . 前記 L N P 組成物が、5 0 μ g ~ 1 5 0 μ g、1 5 0 μ g ~ 2 5 0 μ g、2 5 0 μ g ~ 3 5 0 μ g、3 5 0 μ g ~ 4 5 0 μ g、4 5 0 μ g ~ 5 5 0 μ g、5 5 0 μ g ~ 6 5 0 μ g、6 5 0 μ g ~ 7 5 0 μ g、7 5 0 μ g ~ 8 5 0 μ g、8 5 0 μ g ~ 9 5 0 μ g、または 9 5 0 μ g ~ 1 m g の用量で投与される、実施形態 E 1 0 7 に記載の方法。
【0 1 7 3】

E 1 0 9 . 前記 L N P 組成物が、5 0 μ g、1 0 0 μ g、2 0 0 μ g、3 0 0 μ g、4 0 0 μ g、5 0 0 μ g、6 0 0 μ g、7 0 0 μ g、8 0 0 μ g、9 0 0 μ g、または 1 m g の用量で投与される、実施形態 E 1 0 8 に記載の方法。
【0 1 7 4】

E 1 1 0 . 前記 L N P 組成物が、筋肉内投与される、実施形態 E 4 8 ~ E 1 0 9 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

【0 1 7 5】
E 1 1 1 . 前記 L N P 組成物が、例えば本明細書において記載される投薬間隔に従って対象へ投与される、実施形態 E 4 8 ~ E 1 1 0 のいずれか 1 つに記載の方法。
【0 1 7 6】

E 1 1 2 . 前記投薬間隔が、少なくとも 1 週間、2 週間、3 週間、または 4 週間にわたって遂行される、実施形態 E 1 1 1 に記載の方法。
【0 1 7 7】

E 1 1 3 . 前記投薬間隔が、サイクル（例えば 2 1 日間または 3 週間のサイクル）を含む、実施形態 E 1 1 2 に記載の方法。 20

【0 1 7 8】
E 1 1 4 . 前記 L N P 組成物が、3 週間のサイクルの 1 日目に、対象へ投与される、実施形態 E 1 1 2 に記載の方法。
【0 1 7 9】

E 1 1 5 . 前記 L N P 組成物が、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、または 9 のサイクルで投与される、実施形態 E 1 1 4 に記載の方法。
【0 1 8 0】

E 1 1 6 . 前記方法が、追加の治療剤を対象へ投与することをさらに含む、実施形態 E 4 8 ~ E 1 1 5 のいずれか 1 つに記載の方法。
【0 1 8 1】 30

E 1 1 7 . 前記追加の治療剤が、チェックポイント阻害物質である、実施形態 E 1 1 6 に記載の方法。
【0 1 8 2】

E 1 1 8 . 前記チェックポイント阻害物質が、抗 P D - 1 薬剤及び抗 C T L A 4 薬剤からなる群から選択される、実施形態 E 1 1 7 に記載の方法。
【0 1 8 3】

E 1 1 9 . 前記チェックポイント阻害物質が、ペムブロリズマブを含む、実施形態 E 1 1 8 に記載の方法。
【0 1 8 4】

E 1 2 0 . 前記ペムブロリズマブが、例えば本明細書において記載される投薬間隔に従って対象へ投与される、E 1 1 9 に記載の方法。 40

【0 1 8 5】
E 1 2 1 . 前記投薬間隔が、少なくとも 1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、または 6 週間にわたって遂行される、実施形態 E 1 2 1 に記載の方法。
【0 1 8 6】

E 1 2 2 . 前記投薬間隔が、サイクル（例えば 6 週間のサイクル）を含む、実施形態 E 1 2 1 に記載の方法。
【0 1 8 7】

E 1 2 3 . 前記 L N P 組成物が、6 週間のサイクルの 1 日目に、対象へ投与される、実施形態 E 1 2 2 に記載の方法。 50

【0188】

E124. 前記LNP組成物が、少なくとも2、3、4、または5のサイクルで投与される、実施形態E123に記載の方法。

【0189】

E125. 前記ベムプロリズマブが、約400mgの用量で投与される、実施形態E119～E124のいずれか1つに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】HLA-A*02:01トランスジェニックマウス及び野生型マウスにおける、PD-L1再刺激による、mRNA-4359に対する抗原特異的IFN γ ELISpot 10
t応答の比較を図示するグラフである。

【図2】HLA-A*02:01トランスジェニックマウス及び野生型マウスにおける、IDO1再刺激による、mRNA-4359に対する抗原特異的IFN γ ELISpot
t応答の比較を図示するグラフである。

【図3】HLA-A*02:01トランスジェニックマウス及び野生型マウスにおける、mRNA-4359に対する抗原特異的CD8+IFN γ + T細胞応答のフローサイト
メトリー分析を図示するグラフである。

【図4A】100万のPBMCへ経時的に正規化された、INF γ スポット形成単位(SFU)の数によって測定されたワクチン接種後のT細胞応答を示すグラフである。

【図4B】ワクチン接種の前後の末梢血における、IDO1応答を示すヒートマップである。 20

【図4C】ワクチン接種の前後の末梢血における、PD-L1応答を示すヒートマップである。

【図4D】IDO特異的細胞における、IFN γ SFU/100万PBMCの変化を示すグラフである。

【図4E】PD-L1特異的細胞における、IFN γ SFU/100万PBMCの変化を示すグラフである。

【図5】IS/IDモデルの図解表示である。

【図6A】IDO1完全奏効者における、IFN γ SFU/100万PBMCを示すグラフである。 30

【図6B】IDO1部分奏効者における、IFN γ SFU/100万PBMCを示すグラフである。

【図6C】PD-L1完全奏効者における、IFN γ SFU/100万PBMCを示すグラフである。

【図6D】PD-L1部分奏効者における、IFN γ SFU/100万PBMCを示すグラフである。

【図7A】IDO1完全奏効者についての一次及び全次(total order)のsobol指標を示すグラフである。

【図7B】IDO1部分奏効者についての一次及び全次のsobol指標を示すグラフである。 40

【図7C】PD-L1完全奏効者についての一次及び全次のsobol指標を示すグラフである。

【図7D】PD-L1部分奏効者についての一次及び全次のsobol指標を示すグラフである。

【図8】ペプチドワクチン(A)及びmRNAワクチン(B)についての予測的用量-パラメーター効果曲線を示す1ペアのグラフである。

【図9A】IDO1完全奏効者について、異なる用量で予想される定常状態ピーク及び定常状態トラフを示すグラフである。

【図9B】IDO1部分奏効者について、異なる用量で予想される定常状態ピーク及び定常状態トラフを示すグラフである。 50

【図 9 C】PD-L1 完全奏効者について、異なる用量で予想される定常状態ピーク及び定常状態トラフを示すグラフである。

【図 9 D】PD-L1 部分奏効者について、異なる用量で予想される定常状態ピーク及び定常状態トラフを示すグラフである。

【図 10 A】投薬レジメンシミュレーションを示すグラフである。

【図 10 B】投薬レジメンシミュレーションを示すグラフである。

【図 10 C】投薬レジメンシミュレーションを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0191】

本明細書において記載される組成物及び方法を使用して、免疫細胞（例えば T 細胞）は、プライミングされて、腫瘍関連抗原を認識し得る、及び／または活性化されるようになって、例えば細胞傷害特性を有し得る。例えば、T エフェクター細胞は、プライミングされて、対象において抗がん応答を媒介し、IDO または PD-L1 を発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞の殺傷をもたらし得る。一実施形態において、主題の方法及び組成物が使用されて、がんを有する対象において抗腫瘍性免疫応答を誘導または増進し得る。

【0192】

がんを治療する例示的な方法は、例えば本明細書において記載される 1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1 抗原性ペプチドをコードする mRNA 配列を含むポリヌクレオチドを含むチェックポイントがんワクチンを、対象へ投与することを包含する。任意選択で、ワクチンは、アジュバントのためのアミノ酸配列をコードする mRNA 配列も含み得る。理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態において、全身性の PD-1 / PD-L1 遮断は、効果をさらに増幅し、さらなる免疫活性化及び優れた疾患制御を導き得ると考えられている。したがって一実施形態において、チェックポイント阻害物質、例えば及び抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体、またはそれらの併用も対象へ投与することができる。

【0193】

したがって、1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1 抗原性ペプチド、ならびに任意選択で 1 つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含む脂質ナノ粒子（LNP）組成物、ならびにその使用が本明細書において開示される。本開示の LNP 組成物は、(i) 1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチド、ならびに任意選択で 1 つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA 治療物質を含む。一態様において、本開示の LNP 組成物は、インビボで、T エフェクター細胞をプライミングし得る、及び／または抗腫瘍性免疫応答を刺激し得る。IDO / PD-L1 特異的 T 細胞によって免疫応答を刺激して、免疫刺激環境を増進する、及び／または IDO / PD-L1 発現がん細胞の殺傷を増進し、それによってがん（例えばメラノーマまたは NSCLC）を治療するために、(i) 1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンを含む LNP 組成物を使用する方法も本明細書において開示される。

【0194】

定義

投与する：本明細書において使用される時、「投与する」は、組成物を対象または患者へ送達する方法を指す。投与の方法は、身体の特定の領域または体系への送達を標的化する（例えば特異的に送達する）ように選択される。例えば、投与は、非経口（例えば筋肉内）であり得る。

【0195】

およそ（approximately）、約（about）：本明細書において使用さ

10

20

30

40

50

れる時、「およそ」または「約」という用語は、1つまたは複数の関心のある値へ適用される場合、述べられた参照値に類似する値を指す。ある特定の実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別段述べられないかまたは別段文脈から明白でない限り、述べられた参照値のいずれかの方向で（それより大きいかまたはそれ未満で）、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満以内に収まる範囲の値を指す（かかる数値が可能な値の100%を越える場合を除く）。例えば、LNPの脂質構成要素中の所与の化合物の量の文脈において使用される場合に、「約」は、列挙された値の±5%を意味し得る。例えば、約40%の所与の化合物を有する脂質構成要素を含むLNPは、30～50%の当該化合物を含み得る。別の例として、約50%の所与の化合物を有する脂質構成要素を含むLNPは、45～55%の当該化合物を含み得る。

10

【0196】

キメラ分子：本明細書において使用される時、「キメラ分子」という用語は、異なる供給源または起源からの少なくとも2つの部分（例えばIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチド）を有する分子を指す。例えば、2つの部分は、2つの異なるポリペプチドに由来し得る。各々の部分は、全長ポリペプチドまたはその断片（例えば抗原性断片）であり得る。ある特定の実施形態において、2つのポリペプチドは、2つの異なる生物体由来である。他の実施形態において、2つのポリペプチドは、同じ生物体由来である。2つの異なるポリペプチドは、両方とも天然に存在するかもしれないが合成であり得るか、または1つが天然に存在し、他のものが合成であり得る。いくつかの実施形態において、キメラ分子の2つの部分は、異なる特性を有する。特性は、生物学的特性（インビトロ、エクスピボ、またはインビボでの機能または活性等）であり得る。特性は、物理的特性または化学的特性（結合親和性または結合特異性等）でもあり得る。いくつかの実施形態において、2つの部分は、共有結合で一緒に連結される。例えば、2つの部分は、直接的に（例えば単一の共有結合（例えばペプチド結合）によって）、または間接的に（例えばリンカー（例えばペプチドリリンカー）を介して）連結され得る。いくつかの実施形態において、キメラ分子は、別個のポリペプチドを元々コードする2つ以上のポリヌクレオチドの連結を介して産生される。いくつかの実施形態において、2つ以上のポリヌクレオチドは、単一のオープンリーディングフレームを形成する。

20

30

【0197】

コンジュゲートされた：本明細書において使用される時、「コンジュゲートされた」という用語は、2つ以上の部分に関して使用される場合に、当該部分が、直接的に、または連結剤として供される1つもしくは複数の追加の部分を通じてのいずれかで、互いに物理的に会合または接続されて、当該部分が、構造が使用される条件（例えば生理的条件）下で物理的に会合したままであるように、十分に安定的な構造を形成することを意味する。いくつかの実施形態において、2つ以上の部分は、直接的な共有結合性化学結合によってコンジュゲートされ得る。他の実施形態において、2つ以上の部分は、イオン結合または水素結合によってコンジュゲートされ得る。

【0198】

接触させる：本明細書において使用される時、「接触させる」という用語は、2つ以上の実体の間に物理的接続を確立することを意味する。例えば、細胞をmRNAまたは脂質ナノ粒子組成物と接触させることは、細胞及びmRNAまたは脂質ナノ粒子に物理的接続を共有させることを意味する。細胞を、外部の実体と、インビボ、インビトロ、及びエクスピボで、両者を接触させる方法は、生物学の分野において周知である。本開示の例示的な実施形態において、哺乳動物細胞を、組成物（例えばナノ粒子または本開示の医薬組成物）と接触させるステップは、インビボで遂行される。例えば、脂質ナノ粒子組成物と、生物体（例えば哺乳動物）内に配置され得る細胞（例えば哺乳動物細胞）を接触させることは、任意の好適な投与経路（例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、及び皮下投与を包含する、生物体への非経口投与）によって遂行され得る。インビトロで存在する細胞

40

50

について、組成物（例えば脂質ナノ粒子）及び細胞は、例えば組成物を細胞の培養培地へ加えることによって接触させられ、トランスフェクションを伴うか、またはトランスフェクションをもたらし得る。さらに、2つ以上の細胞は、ナノ粒子組成物に接触させられ得る。

【0199】

送達する：本明細書において使用される時、「送達する」という用語は、実体を目的地へ提供することを意味する。例えば、治療物質及び／または予防物質を対象へ送達することは、治療物質及び／または予防物質を含むLNPを対象へ投与することを包含し得る（例えば静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、または皮下経路によって）。哺乳動物または哺乳動物細胞へのLNPの投与は、1つまたは複数の細胞を脂質ナノ粒子と接触させることを包含し得る。

10

【0200】

カプセル化する：本明細書において使用される時、「カプセル化する」という用語は、封入する、包囲する、または包み込むことを意味する。いくつかの実施形態において、化合物、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）、または他の組成物は、完全にカプセル化されるか、部分的にカプセル化されるか、または実質的にカプセル化され得る。例えばいくつかの実施形態において、本開示のmRNAは、脂質ナノ粒子（例えばリポソーム）中でカプセル化され得る。

【0201】

カプセル化効率：本明細書において使用される時、「カプセル化効率」は、LNPの調製において使用される治療物質及び／または予防物質の最初の全量に比した、LNPの一部になる治療物質及び／または予防物質の量を指す。例えば、組成物へ最初に提供された100mgの全治療物質及び／または予防物質のうちの97mgの治療物質及び／または予防物質が、LNP中でカプセル化されるならば、カプセル化効率は97%として与えられ得る。本明細書において使用される時、「カプセル化」は、完全、実質的、または部分的な封入、閉じ込め、包囲、または包み込みを指し得る。

20

【0202】

有効量：本明細書において使用される時、薬剤の「有効量」という用語は、有益な効果または所望される結果（例えば臨床結果）に十分な量であり、それゆえ「有効量」は、それが適用されている文脈に依存する。例えば、本開示の脂質組成物（例えばLNP）中の標的細胞送達強化脂質の量の文脈において、標的細胞送達強化脂質の有効量は、標的細胞送達強化脂質を欠如する脂質組成物（例えばLNP）に比較して、有益なまたは所望される結果を果たすのに十分な量である。脂質組成物（例えばLNP）によって果たされる有益なまたは所望される結果の非限定例としては、トランスフェクションされた細胞のパーセンテージを増加させること、及び／または脂質組成物（例えばLNP）と会合した／脂質組成物によってカプセル化された核酸によってコードされるタンパク質の発現のレベルを増加させることが挙げられる。有効量の脂質ナノ粒子が対象における標的細胞によって取り込まれるように、標的細胞送達強化脂質含有脂質ナノ粒子を投与するという文脈において、標的細胞送達強化脂質含有LNPの有効量は、標的細胞送達強化脂質を欠如するLNPに比較して、有益なまたは所望される結果を果たすのに十分な量である。対象における有益なまたは所望される結果の非限定例としては、標的細胞送達強化脂質を欠如するLNPに比較して、トランスフェクションされた細胞のパーセンテージを増加させること、標的細胞送達強化脂質含有LNPと会合した／標的細胞送達強化脂質含有LNPによってカプセル化された核酸によってコードされるタンパク質の発現のレベルを増加させること、及び／または標的細胞送達強化脂質含有LNPと会合した／標的細胞送達強化脂質含有LNPによってカプセル化された核酸もしくはそのコードされるタンパク質のインビボでの予防的もしくは治療的な効果を増加させることが挙げられる。いくつかの実施形態において、標的細胞送達強化脂質含有LNPの治療有効量は、感染、疾患、障害、及び／または病態に罹患するかまたはそれらにかかりやすい対象へ投与された場合に、感染、疾患、障害、及び／または病態を治療する、それらの症状を改善する、それらを診断する、それ

30

40

50

らを予防する、及び／またはそれらの発症を遅延させるのに十分である。別の実施形態において、脂質ナノ粒子の有効量は、標的細胞の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、またはそれを超えるものにおいて所望されるタンパク質の発現をもたらすのに十分である。例えば、標的細胞送達強化脂質含有LNPの有効量は、単回静脈注射後に標的細胞の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、または35%のトランスフェクションをもたらす量であり得る。

【0203】

発現：本明細書において使用される時、核酸配列の「発現」は、以下の事象：(1) DNA配列からのRNA鋳型の産生（例えば転写によって）；(2) RNA転写物のプロセシング（例えばスプライシング、編集、5'キャップ形成、及び／または3'端プロセシングによって）；(3) RNAのポリペプチドまたはタンパク質への翻訳；ならびに(4) ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾、のうちの1つまたは複数を指す。

【0204】

エキスピボ：本明細書において使用される時、「エキスピボ」という用語は、生物体（例えば動物、植物、もしくは微生物、またはその細胞もしくは組織）の外部で起こる事象を指す。エキスピボの事象は、天然の（例えばインビボの）環境から最小で変更された環境において起こり得る。

【0205】

断片：「断片」は、本明細書において使用される時、一部分を指す。例えば、タンパク質の断片は、培養された細胞から単離された全長タンパク質の細分化によって得られたポリペプチド、または組み換えDNA技法を介して得られたポリペプチドを包含し得る。

【0206】

GCリッチ：本明細書において使用される時、「GCリッチ」という用語は、GC含有量が約50%を超える、グアニン（G）及び／またはシトシン（C）核酸塩基を含むポリヌクレオチド（例えばmRNA）もしくは任意のその一部分（例えばRNAエレメント）、またはそれらの誘導体もしくは類似体の核酸塩基組成を指す。「GCリッチ」という用語は、約50%のGC含有量を含む、遺伝子、非コーディング領域、5'UTR、3'UTR、オープンリーディングフレーム、RNAエレメント、配列モチーフ、またはその任意の不連続の配列、断片、もしくはセグメントが挙げられるがこれらに限定されない、ポリヌクレオチドのすべてまたは一部分を指す。本開示のいくつかの実施形態において、GCリッチポリヌクレオチドまたはその任意の一部分は、グアニン（G）核酸塩基及び／またはシトシン（C）核酸塩基で独占的に構成される。

【0207】

GC含有量：本明細書において使用される時、「GC含有量」という用語は、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）またはその一部分（例えばRNAエレメント）中の、グアニン（G）及びシトシン（C）核酸塩基、または誘導体もしくはその類似体のいずれかである核酸塩基のパーセンテージ（DNA及びRNA中のアデニン（A）及びチミン（T）またはウラシル（U）、及び誘導体またはその類似体を含むことが可能な核酸塩基の総数からの）を指す。「GC含有量」という用語は、遺伝子、ノンコーディング領域、5'UTRもしくは3'UTR、オープンリーディングフレーム、RNAエレメント、配列モチーフ、またはその任意の不連続の配列、断片、もしくはセグメントが挙げられるがこれらに限定されない、ポリヌクレオチドのすべてまたは一部分を指す。

【0208】

IDO抗原性ペプチド：本明細書において使用される時、「IDO抗原性ペプチド」という用語は、全長の天然に存在するIDO（例えば哺乳動物IDO、例えばヒトIDO、例えばUniProt: P14902及び／またはNCBI Gene ID: 3620と関連する；あるいはUniProt: Q6ZQW0及び／またはNCBI Gene ID: 169355と関連する）、IDOの断片（例えば抗原性断片）、または天然に存在する野生型IDOもしくはその断片（例えば抗原性断片）へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するI

D Oのバリエーションを指す。いくつかの実施形態において、I D O分子は、I D O遺伝子産物（例えばI D Oポリペプチド）である。

【0209】

P D-L 1抗原性ペプチド：本明細書において使用される時、「P D-L 1抗原性ペプチド」という用語は、全長の天然に存在するP D-L 1（例えば哺乳動物P D-L 1、例えばヒトP D-L 1、例えばUniProt: Q9NZQ7; NCBI Gene ID: 29126と関連する）、P D-L 1の断片（例えば抗原性断片）、または天然に存在する野生型P D-L 1もしくはその断片（例えば抗原性断片）へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するP D-L 1のバリエーションを指す。いくつかの実施形態において、P D-L 1分子は、P D-L 1遺伝子産物（例えばP D-L 1ポリペプチド）である。

10

【0210】

異種：本明細書において使用される時、「異種」は、配列（例えばアミノ酸配列、またはアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド）が、所与のポリペプチドまたはポリヌクレオチド中に普通はないことを示す。例えば、1つのタンパク質のドメインまたはモチーフに対応するアミノ酸配列は、第2のタンパク質に対して異種であり得る。

【0211】

単離された：本明細書において使用される時、「単離された」という用語は、少なくともそれが会合した構成要素のうちのいくつかから分離された物質または実体を指す（天然でまたは実験的な設定であるかどうかにかかわらず）。単離された物質は、それらが会合した物質に関して、変動レベルの純度を有し得る。単離された物質及び／または実体は、それらが最初に会合した他の構成要素の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれを超えるものから分離され得る。いくつかの実施形態において、単離された薬剤は、約80%超、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超で純粋である。本明細書において使用される時、他の構成要素が実質的にないならば、物質は「純粋」である。

20

【0212】

リポソーム：本明細書において使用される時、「リポソーム」は、水性の内部を封入する脂質含有膜を含む構造を意味する。リポソームは、1つまたは複数の脂質膜を有し得る。リポソームとしては、一層リポソーム（また単層リポソームとして当技術分野において公知）及び多層リポソーム（また多重膜リポソームとして当技術分野において公知）が挙げられる。

30

【0213】

修飾された：本明細書において使用される時、「修飾された」または「修飾」は、ポリヌクレオチド（例えばmRNA）の変化状態または組成もしくは構造における変化を指す。ポリヌクレオチドは、様々な手法で修飾され得、化学的、構造的、及び／または機能的なものが挙げられる。例えば、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のRNAエレメントの取り込みによって構造的に修飾され得、RNAエレメントは、1つまたは複数の機能（例えば翻訳調節活性）を提供する配列及び／またはRNA二次構造（複数可）を含む。したがって、本開示のポリヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾（例えば1つまたは複数の化学的修飾、構造的修飾、または機能的修飾が挙げられ、任意のそれらの組み合わせを包含し得る）で構成され得る。

40

【0214】

修飾された：本明細書において使用される時、「修飾された」は、本開示の分子の変化させた状態または構造を指す。分子は、多数の手法で修飾され得、化学的、構造的、及び機能的なものが挙げられる。一実施形態において、本開示のmRNA分子は、例えば天然のリボヌクレオチドであるA、U、G、及びCに関連する場合、非天然のヌクレオチド及び／またはヌクレオチドの導入によって修飾される。非カノニカルなヌクレオチド（キャップ構造等）は、A、C、G、Uリボヌクレオチドの化学構造とは異なるが、「修飾され

50

た」とは判断されない。

【0215】

mRNA：本明細書において使用される時、「mRNA」は、メッセンジャーリボ核酸を指す。mRNAは、天然に存在するものまたは天然に存在しないものであり得る。例えば、mRNAは、1つまたは複数の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはリンカー等の修飾された構成要素及び／または天然に存在しない構成要素を含み得る。mRNAは、キャップ構造、鎖終結ヌクレオシド、ステムループ、ポリA配列、及び／またはポリアデニル化シグナルを含み得る。mRNAは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有し得る。mRNAの翻訳（例えば哺乳動物細胞の内部でのmRNAのインビボの翻訳）は、ポリペプチドを産生し得る。伝統的には、mRNA分子の基本的構成要素としては、少なくともコーディング領域、5'-非翻訳領域（5'-UTR）、3'UTR、5'キャップ、及びポリA配列が挙げられる。

【0216】

ナノ粒子：本明細書において使用される時、「ナノ粒子」は、同一素材のバルクサンプルと比較して、新規の特性を呈する約1000nm未満のスケールでの任意の1つの構造上の特色を有する粒子を指す。慣例的に、ナノ粒子は、約500nm未満、約200nm未満、または約100nmのスケールでの任意の1つの構造上の特色を有する。さらに慣例的に、ナノ粒子は、約50nm～約500nm、約50nm～約200nm、または約70～約120nmのスケールでの任意の1つ構造上の特色を有する。例示的な実施形態において、ナノ粒子は、約1～1000nmのオーダーの1つまたは複数の寸法を有する粒子である。他の例示的な実施形態において、ナノ粒子は、約10～500nmのオーダーの1つまたは複数の寸法を有する粒子である。他の例示的な実施形態において、ナノ粒子は、約50～200nmのオーダーの1つまたは複数の寸法を有する粒子である。球状ナノ粒子は、例えば約50～100または70～120ナノメートルの直径を有するだろう。ナノ粒子は、その輸送及び特性に関して、最も多くの場合、単位として挙動する。対応するバルク材料からナノ粒子を区別する新規の特性は、典型的には、1000nm未満のサイズスケールで、または約100nmのサイズで発達するが、ナノ粒子は、例えば楕円形、管状、及び同種のものである粒子については、より大きなサイズであり得ることに留意されたい。大部分の分子のサイズは、上記の概要の中へ収まるが、個別の分子は、通常ナノ粒子と称されない。

【0217】

核酸：本明細書において使用される時、「核酸」という用語は、その最も広範な意味において使用され、ヌクレオチドのポリマーを包含する任意の化合物及び／または物質を網羅する。これらのポリマーは、多くの場合、ポリヌクレオチドと称される。本開示の例示的な核酸またはポリヌクレオチドとしては、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）、DNA-RNAハイブリッド、RNAi誘導剤、RNAi剤、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、触媒DNA、三重らせん形成を誘導するRNA、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ペプチド核酸（PNA）、ロック核酸（ β -D-リボ立体配置を有するLNA、 α -L-リボ立体配置を有する α -LNA（LNAのジアステレオ異性体）、2'-アミノ官能基を有する2'-アミノ-LNA、及び2'-アミノ官能基を有する2'-アミノ- α -LNAを包含する、LNA）、またはそのハイブリッドが挙げられるがこれらに限定されない。

【0218】

核酸構造：本明細書において使用される時、「核酸構造」という用語（「ポリヌクレオチド構造」と互換的に使用される）は、核酸（例えばmRNA）を含む、連結されたヌクレオチドまたはその誘導体もしくは類似体の原子、化学的構成物、エレメント、モチーフ、及び／または配列のアレンジまたは構成を指す。当該用語は、核酸の二次元または三次元の状態も指す。したがって、「RNA構造」という用語は、RNA分子（例えばmRNA）を含む、連結されたヌクレオチドまたはその誘導体もしくは類似体の原子、化学的構成物、エレメント、モチーフ、及び／または配列のアレンジまたは構成を指す、及び／ま

たはRNA分子の二次元及び／または三次元の状態を指す。核酸構造は、構成の複雑性の増加に基づいて、「分子構造」、「一次構造」、「二次構造」、及び「三次構造」と本明細書において称される、4つの構成カテゴリーへとさらに区分され得る。

【0219】

核酸塩基：本明細書において使用される時、「核酸塩基」という用語（代替的に「ヌクレオチド塩基」または「窒素含有塩基」）は、核酸中に見出されるプリンまたはピリミジンのヘテロ環式化合物を指し、改善された特性（例えば結合親和性、ヌクレアーゼ耐性、化学的安定性）を核酸またはその一部分もしくはセグメントへ付与する、天然に存在するプリン及びピリミジンの任意の誘導体または類似体を包含する。アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシルは、天然の核酸中で主に見出される核酸塩基である。当技術分野において公知の及び／または本明細書において記載される、他の天然、非天然、及び／または合成の核酸塩基は、核酸の中へ取り込まれ得る。

10

【0220】

ヌクレオシド／ヌクレオチド：本明細書において使用される時、「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基（例えばプリンまたはピリミジン）またはその誘導体もしくは類似体（これも本明細書において「核酸塩基」と称される）へ共有結合で連結されるが、ヌクレオシド間連結基（例えばリン酸基）を欠如する、糖分子（例えばRNA中のリボースまたはDNA中のデオキシリボース）を含有する化合物またはその誘導体もしくは類似体を指す。本明細書において使用される時、「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシド間連結基（例えばリン酸基）へ共有結合された、ヌクレオシド、あるいは改善された化学的及び／または機能的な特性（例えば結合親和性、ヌクレアーゼ耐性、化学的安定性）を、核酸またはその一部分もしくはセグメントへ付与する、任意のその誘導体、類似体、または修飾物を指す。

20

【0221】

オープンリーディングフレーム：本明細書において使用される時、「ORF」と略称される「オープンリーディングフレーム」という用語は、ポリペプチドをコードするmRNA分子のセグメントまたは領域を指す。ORFは、オーバーラップしないインフレームのコードンの連続的なストレッチを含み、開始コドンから始まり停止コドンで終了し、リボソームによって翻訳される。

【0222】

患者：本明細書において使用される時、「患者」は、治療を求め得るかもしくは必要とし得る対象、治療を要求する対象、治療を受けている対象、治療を受ける予定がある対象、または特定の疾患もしくは病態について熟練の専門家によるケア下にある対象を指す。特定の実施形態において、患者は、ヒト患者である。いくつかの実施形態において、患者は、例えば本明細書において記載されるような自己免疫疾患に罹患する患者である。

30

【0223】

薬学的に許容される：「薬学的に許容される」という語句は、妥当な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症無しに、合理的なベネフィット／リスク比に見合うような、ヒト及び動物の組織と接触させる使用に好適な化合物、材料、組成、及び／または投薬形態を指すように本明細書において用いられる。

40

【0224】

薬学的に許容される賦形剤：「薬学的に許容される賦形剤」という語句は、本明細書において使用される時、本明細書において記載される化合物以外のもの（例えば活性化合物を懸濁または溶解し得るビヒクル）であり、患者において実質的に非毒性且つ非炎症性の特性を有する任意の成分を指す。賦形剤としては、例えば：抗接着物質、抗酸化物質、結合物質、コーティング、圧縮補助物質、崩壊物質、色素（顔料）、皮膚軟化物質、乳化物質、充填物質（希釈物質）、フィルム形成物質またはフィルムコーティング、香味物質、香料、流動化物質（流動促進物質）、潤滑物質、防腐物質、印刷インク、吸着物質、懸濁剤または分散剤、甘味物質、及び水和水が挙げられ得る。例示的な賦形剤としては、ブチ

50

ルヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋されたポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスボビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、レチニルパルミテート、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、及びキシリトールが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0225】

薬学的に許容される塩：本明細書において使用される時、「薬学的に許容される塩」は、既存の酸部分または塩基部分をその塩形態へ変換することによって（例えば遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによって）親化合物が修飾される、開示される化合物の誘導体を指す。薬学的に許容される塩の例としては、塩基性残基（アミン等）の無機塩または有機酸塩；酸性残基（カルボン酸等）のアルカリ塩または有機塩；及び同種のもものが挙げられるがこれらに限定されない。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩（heptonate）、ヘキサノ酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシーエタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオネート、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩、及び同種のもものが挙げられる。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、及び同種のもの、そして非毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、及びアミンカチオン（アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン、及び同種のもものが挙げられるがこれらに限定されない）を含む。本開示の薬学的に許容される塩としては、例えば非毒性の無機酸または有機酸から形成された親化合物の従来の非毒性塩が挙げられる。本開示の薬学的に許容される塩は、塩基性部分または酸性部分を含有する親化合物から従来の化学的方法によって合成され得る。概して、かかる塩は、これらの化合物の遊離酸形態または遊離塩基形態を、化学量論的な量の適切な塩基または酸と、水、有機溶媒、またはこの2つの混合物（概して、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、またはアセトニトリルのような非水性媒質が好ましい）中で反応させることによって調製され得る。好適な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008、及びBerge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977)（それらの各々は、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される）中で見出される。

20

30

40

【0226】

50

ポリペプチド：本明細書において使用される時、「ポリペプチド」または「関心のあるポリペプチド」という用語は、天然に（例えば単離または精製される）または合成的に産生され得る、典型的にはペプチド結合によって繋がれたアミノ酸残基のポリマーを指す。

【0227】

RNA：本明細書において使用される時、「RNA」は、天然に存在し得るかまたは天然に存在し得ないリボ核酸を指す。例えば、RNAは、修飾された及び／または天然に存在しない構成要素（1つまたは複数の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはリンカー等）を含み得る。RNAは、キャップ構造、鎖終結ヌクレオシド、ステムループ、ポリA配列、及び／またはポリアデニル化シグナルを含み得る。RNAは、関心のあるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有し得る。例えば、RNAは、メッセンジャーRNA（mRNA）であり得る。特定のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳（例えばインビボでの哺乳動物細胞の内部のmRNAの翻訳）は、コードされるポリペプチドを産生し得る。RNAは、小分子干渉RNA（siRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、ダイサー基質RNA（dsRNA）、小ヘアピンRNA（shRNA）、mRNA、長鎖非コーディングRNA（lncRNA）、及びそれらの混合物からなる非限定的な群から選択され得る。

【0228】

RNAエレメント：本明細書において使用される時、「RNAエレメント」という用語は、生物学的機能を提供する、及び／または生物学的活性（例えば翻訳調節活性）を有する、RNA分子の一部分、断片、またはセグメントを指す。本明細書において記載されるもの等の1つまたは複数のRNAエレメントの取り込みによるポリヌクレオチドの修飾は、1つまたは複数の所望される機能的特性を修飾されるポリヌクレオチドへ提供する。本明細書において記載されるRNAエレメントは、天然に存在するか、天然に存在しないか、合成されるか、操作されるか、または任意のそれらの組み合わせであり得る。例えば、調節活性を提供する天然に存在するRNAエレメントとしては、ウイルス、原核生物、及び真核生物（例えばヒト）のトランスクリプトームの全体にわたって見出されるエレメントが挙げられる。RNAエレメント、特に真核生物mRNA及び翻訳されるウイルスRNAは、細胞中での多数の機能の媒介に関与することが示されている。例示的な天然のRNAエレメントとしては、翻訳開始エレメント（例えば内部リボソーム進入部位（IRES））、Kieft et al., (2001) RNA 7 (2) : 194-206を参照）、翻訳エンハンサーエレメント（例えばAPP mRNA翻訳エンハンサーエレメント、Rogers et al., (1999) J Biol Chem 274 (10) : 6421-6431を参照）、mRNA安定性エレメント（例えばAUリッチエレメント（ARE）、Garneau et al., (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8 (2) : 113-126を参照）、翻訳抑制エレメント（例えばBlumer et al., (2002) Mech Dev 110 (1-2) : 97-112を参照）、タンパク質結合RNAエレメント（例えば鉄応答性エレメント、Seleznova et al., (2013) J Mol Biol 425 (18) : 3301-3310を参照）、細胞質ポリアデニル化エレメント（Villalba et al., (2011) Curr Opin Genet Dev 21 (4) : 452-457）、及び触媒RNAエレメント（例えばリボザイム、Scott et al., (2009) Biochim Biophys Acta 1789 (9-10) : 634-641を参照）が挙げられる（がこれらに限定されない）。

【0229】

実質的に：本明細書において使用される時、「実質的に」という用語は、関心のある特徴または特性のすべてまたはほぼすべての範囲または程度を呈する定性的条件を指す。生物学の当業者であれば、生物学現象及び化学的現象は、完了まで行く、及び／または完全に進行するか、あるいは絶対的な結果を達成もしくは回避することは、あるとしても稀であることを理解するだろう。「実質的に」という用語は、したがって、多数の生物学現象及び化学的現象における固有の完全性の欠如の可能性を捕捉するために、本明細書におい

て使用される。

【0230】

～に罹患する：疾患、障害、及び／または病態「に罹患する」個体は、疾患、障害、及び／または病態と診断されるか、あるいはそれらの1つまたは複数の症状を提示する。

【0231】

治療剤：「治療剤」という用語は、対象へ投与された場合に、治療効果、診断効果、及び／または予防効果を有する、及び／または所望される生物学的効果及び／または薬理学的効果を惹起する、任意の薬剤を指す。

【0232】

トランスフェクション：本明細書において使用される時、「トランスフェクション」という用語は、細胞の中へ種（species）（例えばmRNA等のポリヌクレオチド）を導入する方法を指す。

【0233】

対象：本明細書において使用される時、「対象」という用語は、例えば実験的、診断的、予防的、及び／または、治療的な目的のために、本開示に従う組成が投与され得る任意の生物体を指す。典型的な対象としては、動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長動物、及びヒト等の哺乳動物）及び／または植物が挙げられる。いくつかの実施形態において、対象は、患者であり得る。

【0234】

治療する：本明細書において使用される時、「治療する」という用語は、特定の感染、疾患、障害、及び／または病態の1つまたは複数の症状または特色を、部分的にまたは完全に、緩和する、軽快させる、改善する、軽減する、それらの発症を遅延させる、それらの進行を阻害する、それらの重症度を低減する、及び／またはそれらの発生率を低減することを指す。例えば、がんを「治療する」ことは、腫瘍の生存、増殖、及び／または蔓延を阻害することを指し得る。治療は、疾患、障害、及び／または病態と関連する病理を発達させるリスクを減少させる目的のために、疾患、障害、及び／または病態の徴候を呈していない対象へ、及び／または疾患、障害、及び／または病態の初期徴候のみを呈する対象へ施され得る。

【0235】

予防する：本明細書において使用される時、「予防する」という用語は、特定の感染、疾患、障害、及び／または病態の1つまたは複数の症状または特色の開始を、部分的にまたは完全に阻害することを指す。

【0236】

非修飾：本明細書において使用される時、「非修飾」は、任意の手法で変化される前の任意の物質、化合物、または分子を指す。非修飾は、生体分子の野生型またはネイティブ形態を指し得るが、常にではない。分子は、1シリーズの修飾を受け得、それによって、各々の修飾された分子は、後続する修飾については「非修飾」出発分子として供され得る。

【0237】

バリエーション：本明細書において使用される時、「バリエーション」という用語は、例えば当技術分野で認識されているアッセイによって測定されるように、野生型分子の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の活性を有する分子を指す。

【0238】

IDO抗原性ペプチド

インドールアミン-ピロール2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）は、キヌレニン経路においてトリプトファンの分解を制御する細胞内のモノマー性のヘム含有酵素である（Cemil Band Sarisozen C (2017) Journal of Oncological Sciences 3:2 pp. 52-56）。IDOの2つのアイソフォーム（IDO1及びIDO2）があり、その両方は、トリプトファンをキヌ

10

20

30

40

50

レニンへ異なる酵素の率で変換する。例えば内皮細胞、抗原提示細胞、線維芽細胞、マクロファージ、及び樹状細胞において、IDO2は狭い範囲で発現され、IDO1はより幅広く発現される。

【0239】

一態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される例えばIDO1またはIDO2に由来する、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンを例えばコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成を提供する。

【0240】

一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、IDO1に由来する。一実施形態において、1つまたは複数のIDO抗原性ペプチドは、天然に存在するIDO1分子、天然に存在するIDO1分子の断片（例えば抗原性断片）、またはそのバリエーションを含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、天然に存在するIDO1のバリエーション分子（例えばIDO1バリエーション）またはその断片を含む。一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO1抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成は、単独または追加の薬剤と併用して投与され得る。

【0241】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成は、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列（例えば配列番号1）またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列（例えば配列番号1）またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、配列番号1またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、配列番号1またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、配列番号1またはその抗原性断片を含む。

【0242】

一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列（例えばコドン最適化ヌクレオチド配列）を含む。一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2またはその抗原性断片のヌクレオチド配列（例えばコドン最適化ヌクレオチド配列）を含む。

【0243】

一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、1つまたは複数のエレメント（例えば5'UTR及び／または3'UTR）をさらに含む。一実施形態において、5'UTR及び／または3'UTRは、例えば本明細書において開示されるような1つまたは複数のマイクロRNA（miRNA）結合部位を含む。例示的な5'UTR及び3'UTRは、本明細書において「5'UTR及び3'UTR」と題するセクションにおいて開示される。

10

20

30

40

50

【0244】

PD-L1 分子

PD-L1（プログラム死リガンド1、CD274、B7-H1としても公知である）は、樹状細胞及びマクロファージ等の抗原提示細胞を包含する造血細胞上で発現される、膜にアンカーされたタンパク質である。PD-L1は、活性化されたT細胞、B細胞、及び単球、そして末梢の非造血組織（肝臓、心臓、骨格筋、胎盤、肺、及び腎臓が挙げられる）上にも発現される（Dai S et al. (2014) Cell Immunol 290, 72-79）。PD-L1は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、及び胸腺細胞上で発現される共阻害膜貫通受容体である、その同族受容体PD-1へ結合する。PD-1のPD-L1への係合は、調節性ホスファターゼの動員を介してT細胞受容体（TCR）シグナル伝達を阻害し、IL2産生及びグルコース代謝の減少をもたらす得る。PD-1とPD-L1との継続的な相互作用は、T細胞アネルギーの誘導またはナイーブ細胞の誘導性制御性T細胞（iTreg）への変換を導き得る。PD-L1/PD-1経路は、免疫調節（例えばT細胞分裂増殖、細胞傷害性活性、及びサイトカイン産生の阻害）において重要な機能を有し、Tregの発生及び機能を増進する。

10

【0245】

一態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンを例えばコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成を提供する。

【0246】

一実施形態において、1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドは、天然に存在するPD-L1分子、天然に存在するPD-L1分子の断片（例えば抗原性断片）、またはそのバリエーションを含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、天然に存在するPD-L1分子のバリエーション（例えばPD-L1バリエーション）、またはその断片を含む。一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成は、単独でまたは追加の薬剤と併用して投与され得る。

20

【0247】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成は、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態において、IDO抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるPD-L1アミノ酸配列（例えば配列番号3）またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるPD-L1アミノ酸配列（例えば配列番号3）またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、配列番号3またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、配列番号3またはその抗原性断片へ、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、配列番号3またはその抗原性断片を含む。

30

40

【0248】

一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、リーダー配列及び／または親和性タグ（例えば本明細書において記載されるリーダー配列及び／または本明細書において記載される親和性タグ）についてのアミノ酸配列を含む。一実施形態において、PD-L1抗原性ペプチドは、リーダー配列及び／または親和性タグ（例えば本明細書において記載されるリーダー配列及び／または本明細書において記載される親和性タグ）についてのアミノ酸配列を含まない。

【0249】

50

一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、配列番号4またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列（例えばコドン最適化ヌクレオチド配列）を含む。一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、配列番号4またはその抗原性断片のヌクレオチド配列（例えばコドン最適化ヌクレオチド配列）を含む。

【0250】

10

一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、リーダー配列及び／または親和性タグ（例えば本明細書において記載されるリーダー配列及び／または本明細書において記載される親和性タグ）をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、リーダー配列及び／または親和性タグ（例えば本明細書において記載されるリーダー配列及び／または本明細書において記載される親和性タグ）をコードするヌクレオチド配列を含まない。

【0251】

20

一実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、1つまたは複数のエレメント（例えば5' UTR及び／または3' UTR）をさらに含む。一実施形態において、5' UTR及び／または3' UTRは、例えば本明細書において開示されるような1つまたは複数のマイクロRNA（miRNA）結合部位を含む。例示的な5' UTR及び3' UTRは、本明細書において「5' UTR及び3' UTR」と題するセクションにおいて開示される。

【0252】

例示的なチェックポイントがんワクチン

例示的なチェックポイントがんワクチンとしては、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含有するものが挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドを含む。

【0253】

一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、1つのIDO抗原性ペプチド及び1つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、2つのIDO抗原性ペプチド及び2つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、3つのIDO抗原性ペプチド及び3つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4つのIDO抗原性ペプチド及び4つのPD-L1抗原性ペプチドは、交互様式でアレンジされる。したがって一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、(i) IDO抗原性ペプチド、(ii) PD-L1抗原性ペプチド、(iii) IDO抗原性ペプチド、(iv) PD-L1抗原性ペプチド、(v) IDO抗原性ペプチド、(vi) PD-L1抗原性ペプチド、(vii) IDO抗原性ペプチド、及び(viii) PD-L1抗原性ペプチドを含む。

【0254】

一実施形態において、交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドは、表1A中で提供されるIDOアミノ酸配列（例えば配列番号5）またはその抗原性断片へ

50

、少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドは、表 1 A 中で提供されるアミノ酸配列（例えば配列番号 5）またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドは、配列番号 5 またはその抗原性断片のアミノ酸配列を含む。

【0255】

一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドは、リーダー配列及び／または親和性タグについてのアミノ酸配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドは、リーダー配列及び／または親和性タグについてのアミノ酸配列を含まない。

10

【0256】

一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 6、300、301、もしくは 302、またはその抗原性断片の配列へ、少なくとも 50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 %の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えば m R N A）は、配列番号 6、300、301、もしくは 302、またはその抗原性断片のヌクレオチド配列を含む。一実施形態において、交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ヌクレオチド配列を含む。

20

【0257】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）I D O 抗原性ペプチド及び 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号 300 のヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5' 端から 3' 端へ、配列番号 56 の 5' U T R、配列番号 6 の O R F 配列、及び配列番号 108 の 3' U T R からなる。

30

【0258】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）I D O 抗原性ペプチド及び 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、5' 端から 3' 端へ、

(i) 5' キャップ（例えば本明細書において提供されるキャップ C 1 等）；

(i i) 5' U T R（本明細書において提供される配列、例えば配列番号 56 等）；

(i i i) 交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（例えば配列番号 6 として示される交互の I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドをコードする、配列最適化核酸配列）；

40

(i v) 少なくとも 1 つの停止コドン（3' U T R の 5' 末端に存在しないならば）；

(v) 3' U T R（本明細書において提供される配列、例えば配列番号 108 等）；

及び

(v i) 本明細書において提供されるポリ A 尾部（例えば配列番号 502）

を含む。

【0259】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）I D O 抗原性ペプチド及び 1つまたは複数の（例えば 1、2、3、4、またはそれを超える）P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする m R N A ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号 301 のヌクレオチ

50

ド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5'端から3'端へ、配列番号272の5'UTR、配列番号6のORF配列、及び配列番号108の3'UTRからなる。

【0260】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、5'端から3'端へ、

(i) 5'キャップ（例えば本明細書において提供されるキャップC1等）；

(ii) 5'UTR（本明細書において提供される配列、例えば配列番号272等）；

(iii) 交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（例えば配列番号6として示される交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする、配列最適化核酸配列）；

(iv) 少なくとも1つの停止コドン（3'UTRの5'末端に存在しないならば）；

(v) 3'UTR（本明細書において提供される配列、例えば配列番号108等）；

及び

(vi) 本明細書において提供されるポリA尾部（例えば配列番号502）

を含む。

【0261】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号302のヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5'端から3'端へ、配列番号273の5'UTR、配列番号6のORF配列、及び配列番号108の3'UTRからなる。

【0262】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数の（例えば1、2、3、4、またはそれを超える）PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、5'端から3'端へ、

(i) 5'キャップ（例えば本明細書において提供されるキャップC1等）；

(ii) 5'UTR（本明細書において提供される配列、例えば配列番号273等）；

(iii) 交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（例えば配列番号6として示される交互のIDO抗原性ペプチド及びPD-L1抗原性ペプチドをコードする、配列最適化核酸配列）；

(iv) 少なくとも1つの停止コドン（3'UTRの5'末端に存在しないならば）；

(v) 3'UTR（本明細書において提供される配列、例えば配列番号108等）；

及び

(vi) 本明細書において提供されるポリA尾部（例えば配列番号502）

を含む。

【0263】

一実施形態において、表2A中で記載されるように、チェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、バリエーション1、バリエーション2、またはバリエーション3のヌクレオチド配列を含む。

【0264】

一態様において、本明細書において開示されるLNP組成は、例えば本明細書において記載される1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む。

一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、半減期延長物質（例えば血清タンパク質（アルブミン、IgG、FcRn、またはトランスフェリン等）へ結合するタンパク質（またはその断片））を含む。一実施形態において、半減期延長物質は、免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン F c 領域またはそのバリエーション（例えば I g G 1 F c）である。

【0265】

一実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、標的化部分をさらに含む。一実施形態において、標的化部分は、抗体分子（例えば F a b または s c F v）、受容体分子（例えば受容体、受容体断片、またはそれらの機能的バリエーション）、リガンド分子（例えばリガンド、リガンド断片、またはそれらの機能的バリエーション）、またはそれらの組み合わせを含む。

【表 1 A】

表 1 A：例示的な I D O 抗原性ペプチド及び P D - L 1 抗原性ペプチドの配列

配列番号	配列情報	配列
1	IDO 抗原性ペプチド アミノ酸、モノマー	ERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQ
2	IDO 抗原性ペプチド ヌクレオチド、モノマー	GAGCGGGAUACCCUCCUGAAGGCUCUGCUGGAGAUCG CAAGCUGCCUGGAGAAAGCCCUCAGGUGUCCACCA A
3	PD-L1 抗原性ペプチド アミノ酸、モノマー	VFIFMTYWHLNNAFTVTPKDLYVV
4	PD-L1 抗原性ペプチド 核酸、モノマー	GUGUUCAUCUUAUGACAUACUGGCAUCUGCUGAACG CCUUUACCGUGACCGUACCCAAGGACCUGUACGUGGU G
5	交互の IDO PD-L1 の抗原性ペプチド アミノ酸、マルチ マー	ERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQVFIFMTYWHLNNAFTV TVPKDLYVVERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQVFIFMTY WHLNNAFTVTPKDLYVVERDTLLKALLEIASCLEKALQV FHQVFIFMTYWHLNNAFTVTPKDLYVVERDTLLKALLEI ASCLEKALQVFHQVFIFMTYWHLNNAFTVTPKDLYVV
6	交互の IDO PD-L1 の抗原性ペプチド 核酸、マルチマー	AUGGAGCGGGAUACCCUCCUGAAGGCUCUGCUGGAGA UCGCAAGCUGCCUGGAGAAAGCCCUCAGGUGUCCA CCAAGUGUUAUCUUAUGACAUACUGGCAUCUGCUG AACGCCUUUACCGUGACCGUACCCAAGGACCUGUACG UGGUGGAGAGAGAUACCCUGCUGAAAGCCCUGCUGGA AAUCGCCUCUGGCCUGGAGAAGGCCUGCAGGUGUUU CACCAGGUGUUAUUUUAUGACCUAUUGGCACCUGU UGAACGCUUUUACUGUGACCGUGCCAAAGGAUUUAUA CGUGGUGGAGCGGGACACACUGCUGAAGGCCUGCUU GAGAUCGCCAGCUGUCUGGAGAAAGCCCUGCAAGUGU UCCACCAGGUAUUAUCUUAUGACUUAUGGCACCU GCUCAACGCCUUCACCGUGACAGUGCCCAAGGACUUG UACGUGGUCGAGCGGGACACCCUGUAAAGGCCUGC UGGAGAUUGCCAGCUGUCUGGAGAAGGCACUGCAGGU GUUCCAUCAGGUGUUUAUCUUAUGACCUACUGGCAC CUCCUGAACGCCUUCACAGUGACCGUGCCCAAGGAUCU CUACGUGGUG

【0266】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば 1 つまたは複数の I

10

20

30

40

50

IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド) は、
(1) 5' キャップ (例えば本明細書において開示されるような、例えば表 2 A 中で提供されるかまたは本明細書において記載されるような)、(2) 5' UTR (例えば表 2 A 中で提供されるような、(3) 表 2 A 中で提供されるヌクレオチド配列 ORF (例えば配列番号 2 または 5)、(4) 停止コドン、(5) 3' UTR (例えば表 2 A 中で提供されるような)、及び (6) 尾部 (例えばポリ A 尾部) (例えば本明細書において開示されるような、例えば約 100 残基のポリ A 尾部 (例えば配列番号 502)) を含む。

【0267】

いくつかの実施形態において、1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号 300 のヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5' 端から 3' 端へ、配列番号 56 の 5' UTR、配列番号 6 の ORF 配列、及び配列番号 108 の 3' UTR を含む。

10

【0268】

いくつかの実施形態において、1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号 301 のヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5' 端から 3' 端へ、配列番号 272 の 5' UTR、配列番号 6 の ORF 配列、及び配列番号 108 の 3' UTR を含む。

20

【0269】

いくつかの実施形態において、1 つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び 1 つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号 302 のヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、5' 端から 3' 端へ、配列番号 273 の 5' UTR、配列番号 6 の ORF 配列、及び配列番号 108 の 3' UTR を含む。

【0270】

いくつかの実施形態において、5' UTR 配列、ORF 配列、及び／または 3' UTR 配列のすべては、表 2 A 中で記載される修飾 (複数可) を含む。いくつかの実施形態において、5' UTR 配列、ORF 配列、及び／または 3' UTR 配列のうちの 1 つ、2 つ、またはすべては、表 2 A 中で記載される修飾 (複数可) を含まない。いくつかの実施形態において、表 2 A 中で記載される 5' UTR は、「A」または「G」である第 1 のヌクレオチドを追加で含む。

30

40

50

【表 2 A - 1】

表 2 A : 例示的なチェックポイントがんワクチンコンストラクト配列

注: 「G 5」は、mRNA中のすべてのウラシル (U) が、N1-メチルシュードウラシルによって置き換えられることを示す。

mRNA 名称	追加情報	ORF 配列 (アミノ酸)	ORF 配列 (ヌクレオチド)	5'UTR 配列	3'UTR 配列	コンストラクト配列
配列番号		5	6	56	108	300
IDO/PD-L1 チェックポイントがんワクチンバリアント 1	G5 キャップ C1 ポリ A 尾部:100 ヌクレオチド (配列番号 502)	MERDTLL KALLEIA SCLEKAL QVFHQVF IFMTYWH LLNAFTV TVPKDL VVERDTL LKALLEI ASCLEKA LQVFHQV FIFMTYW HLLNAFT VTVPKDL YVVERDT LLKALLE IASCLEK ALQVFHQ VFIFMTY WHLLNA FTVTVPK DLYVVER DTLLKAL LEIASCLE KALQVFH QVFIFMT YWHLLN AFTVTV KDLYVV	AUGGAGCGGGAUACCCUCCU GAAGGCUCUGCUGGAGAU CAAGCUGCCUGGAGAAAGCC CUCCAGGUGUCCACCAAGU GUUCAUCUUAUGACAUACU GGCAUCUGCUGAACGCCUUU ACCGUGACCGUACCCAAGGA CCUGUACGUGGUGGAGAGAG AUACCCUGCUGAAAGCCCUG CUGGAAAUCGCCUCGUGCCU GGAGAAGGCCUGCAGGUGU UUCACCAGGUGUUCAUUUU AUGACCUAUUGGCACCGUU GAACGCUUUUACUGUGACCG UGCCAAAGGAUUUAUACGUG GUGGAGCGGGACACACUGCU GAAGGCCUGCUUGAGAU CCAGCUGUCUGAGAAAGCC CUGCAAGUGUCCACCAGGU AUUCAUCUUUAUGACUUACU GGCACCUGCUCAACGCCUUC ACCGUGACAGUGCCCAAGGA CUUGUACGUGGUCGAGCGGG ACACCCUGUUAAAGGCCUG CUGGAGAUUGCCAGCUGUCU GGAGAAGGCACUGCAGGUGU UCCAUCAGGUGUUUAUCUUU AUGACCUACUGGCACCUCCU GAACGCCUUCACAGUGACCG UGCCCAAGGAUCUCUACGUG GUG	GGA AAU AAG AGA GAA AAG AGU AAG AAA UAU AAG ACCC CGGC GCCG CCAC C	UGAU AAUA GGCU GGAG CCUCG GUGG CCUAG CUUCU UGCCC CUUG GGCCU CCCC CAGCC CCUCC UCCCC UCCU GCACC CGUAC CCCCG UGGU CUUU GAAU AAAG UCUG AGUG GGCG GC	配列番号 300 は、5' 端から 3' 端へ、配列番号 56 の 5'UTR、配列番号 6 の ORF 配列、及び配列番号 108 の 3'UTR 配列を含む。

10

20

30

40

50

【表 2 A - 2】

mRN A 名 称	追加 情報	ORF 配列 (アミノ酸)	ORF 配列 (ヌクレオチド)	5'UTR 配列	3'UTR 配列	コンス トラク ト配列
配列 番号		5	6	272	108	301
IDO/P D-L1 チェ ック ポイ ント がん ワク チン バリ アン ト 2	G5 キャ ップ C1 ポリ A 尾 部:100 ヌク レオ チド (配列 番号 502)	MERDTLL KALLEIA SCLEKAL QVFHQVF IFMTYWH LLNAFTV TVPKDLY VVERDTL LKALLEI ASCLEKA LQVFHQV FIFMTYW HLLNAFT VTVPKDL YVVERDT LLKALLE IASCLEK ALQVFHQ VFIFMTY WHLLNA FTVTVPK DLYVVER DTLLKAL LEIASCLE KALQVFH QVFIFMT YWHLLN AFTVTVP KDLYVV	AUGGAGCGGGAUACCCUC CUGAAGGCUCUGCUGGAG AUCGCAAGCUGCCUGGAG AAAGCCCUCCAGGUGUUC CACCAAGUGUUCAUCUUC AUGACAUACUGGCAUCUG CUGAACGCCUUUACCGUG ACCGUACCCAAGGACCUG UACGUGGUGGAGAGAGAU ACCCUGCUGAAAGCCUG CUGGAAAUCGCCUCGUGC CUGGAGAAGGCCUGCAG GUGUUUCACCAGGUGUUC AUUUUCAUGACCUAUUGG CACCUGUUGAACGCUUUU ACUGUGACCGUGCCAAAG GAUUUAUACGUGGUGGAG CGGGACACACUGCUGAAG GCCCUGCUUGAGAUCCG AGCUGUCUCGAGAAAGCC CUGCAAGUGUCCACCAG GUAUUCAUCUUUAUGACU UACUGGCACCUGCUAAC GCCUUCACCGUGACAGUG CCCAAGGACUUGUACGUG GUCGAGCGGGACACCCUG UAAAAGGCCUGCUGGAG AUUGCCAGCUGUCUGGAG AAGGCACUGCAGGUGUUC CAUCAGGUGUUUAUCUUU AUGACCUACUGGCACCUC CUGAACGCCUUCACAGUG ACCGUGCCCAAGGAUCUC UACGUGGUG	GGGAA AUAAG AGAGA AAAGA AGAGU AAGAA GAAAU AUAAG ACCCCG GCGCCG CCACC	UGAU AAUA GGCU GGAG CCUCG GUGG CCUAG CUUCU UGCCC CUUG GGCCU CCCCC CAGCC CCUCC UCCCC UUCCU GCACC CGUAC CCCCG UGGU CUUU GAAU AAAG UCUG AGUG GGCG GC	配列番 号 301 は、5' 端から 3'端 へ、配 列番号 272 の 5'UTR 、配列 番号 6 の ORF 配列、 及び配 列番号 108 の 3'UTR 配列を 含む。

10

20

30

40

50

【表 2 A - 3】

mRN A 名 称	追加 情報	ORF 配列 (アミノ酸)	ORF 配列 (ヌクレオチド)	5'UT R 配 列	3'UTR 配列	コンス トラク ト配列
配列 番号		5	6	273	108	302
IDO/P D-L1 チェ ック ポイ ント がん ワク チン バリ アン ト 3	G5 キャ ップ C1 ポリ A 尾 部:100 ヌク レオ チド (配列 番号 502)	MERDTLL KALLEIA SCLEKAL QVFHQVF IFMTYWH LLNAFTV TVPKDL VVERDTL LKALLEI ASCLEKA LQVFHQV FIFMTYW HLLNAFT VTVPKDL YVVERDT LLKALLE IASCLEK ALQVFHQ VFIFMTY WHLLNA FTVTVPK DLYVVER DTLLKAL LEIASCLE KALQVFH QVFIFMT YWHLLN AFTVTVP KDLYVV	AUGGAGCGGGAUACCCUCCU GAAGGCUCUGCUGGAGAUCG CAAGCUGCCUGGAGAAAGCC CUCCAGGUGUUCCACCAAGU GUUCAUCUUGACAUACU GGCAUCUGCUGAACGCCUUU ACCGUGACCGUACCCAAGGA CCUGUACGUGGUGGAGAGAG AUACCCUGCUGAAAGCCCUG CUGGAAAUCGCCUCGUGCCU GGAGAAGGCCUGCAGGUGU UUCACCAGGUGUUCUUUUC AUGACCUAUUGGCACCUGUU GAACGCUUUUACUGUGACCG UGCCAAAGGAUUUAUACGUG GUGGAGCGGGACACUGCU GAAGGCCUGCUUGAGAUCG CCAGCUGUCUGAGAAAGCC CUGCAAGUGUCCACCAGGU AUUCAUCUUUAUGACUUACU GGCACCUGCUAACGCCUUC ACCGUGACAGUGCCCAAGGA CUUGUACGUGGUCGAGCGGG ACACCCUGUUAAAGGCCUG CUGGAGAUUGCCAGCUGUCU GGAGAAGGCACUGCAGGUGU UCCAUCAGGUGUUUAUCUUU AUGACCUACUGGCACCUCCU GAACGCCUUCACAGUGACCG UGCCCAAGGAUCUCUACGUG GUG	AGG AAA UAA GAG AGA AAA GAA GAG UAA GAA GAA AUA UAA GACC CCGG CGCC GCCA CC	UGAU AAUA GGCU GGAG CCUCG GUGG CCUAG CUUCU UGCCC CUUG GGCCU CCCC CAGCC CCUCC UCCCC UCCCU GCACC CGUAC CCCCG UGGU CUUU GAUU AAAG UCUG AGUG GGCG GC	配列番 号 302 は、5' 端から 3'端 へ、配 列番号 273 の 5'UTR 、配列 番号 6 の ORF 配列、 及び配 列番号 108 の 3'UTR 配列を 含む か、ま たはそ れらか らな る。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 1 】

治療用の L N P

単独でまたは追加の薬剤（例えば標準的な医療治療法）と併用して投与され得る、1つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び 1つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む L N P 組成物が、とりわけ本明細書において開示される。一実施形態において、追加の薬剤は、ポリペプチド、例えばタンパク質、融合タンパク質、可溶性タンパク質、抗体（例えば抗体断片、F a b、s c F v、単ドメイン抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、及び／または多重特異性抗体）である。一実施形態において、L N P 組成物及び追加の薬剤は、同じ組成物ま

たは別個の組成物中にある。一実施形態において、L N P 組成物及び追加の薬剤は、実質的に同時にまたは逐次投与される。

【0272】

L N P の脂質含有量

脂質に関して上で説明されるように、本明細書において開示される L N P は、(i) イオン化可能脂質；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；(iv) P E G 脂質を含む。これらのカテゴリーの脂質は、以下でより詳細に説明される。

【0273】

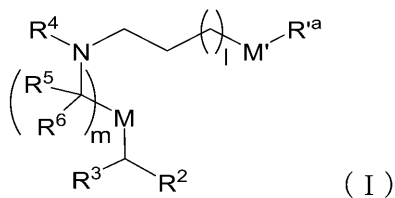
イオン化可能脂質

本開示の脂質ナノ粒子は、1つまたは複数のイオン化可能脂質を含む。ある特定の実施形態において、本開示のイオン化可能脂質は、中心のアミン部分及び少なくとも1つの生体分解基を含む。本明細書において記載されるイオン化可能脂質は、核酸分子を哺乳動物細胞または器官へ送達するために、本開示の脂質ナノ粒子において有利に使用され得る。以下で説明されるイオン化可能脂質の構造は、それらと本発明の他の脂質を区別するために接頭語 I を含む。

【0274】

いくつかの態様において、本開示は、イオン化可能アミノ脂質式 (I) の化合物：

【化7】

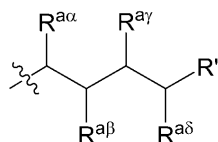


もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくは異性体

【式中、R'a は、R 分岐鎖であり；

R 分岐鎖は、

【化8】



であり；

【化9】



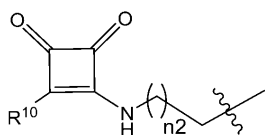
は、結合点を表わし；

R'aα、R'aβ、R'aγ、及び R'aδ は各々、H、C₂₋₁₂アルキル、及び C₂₋₁₂アルケニルからなる群から独立して選択され；

R² 及び R³ は各々、C₁₋₁₄アルキル及び C₂₋₁₄アルケニルからなる群から独立して選択され；

R⁴ は、-(CH₂)_nOH (式中、n は、1、2、3、4、及び5からなる群から選択される) 及び

【化 1 0】



からなる群から選択され、

【化 1 1】

10



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R^5 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

各々の R^6 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

20

M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ からなる群から独立して選択され；

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

l は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択され；

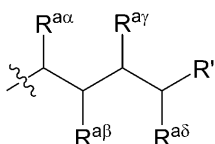
m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 からなる群から選択される] に関する。

【0 2 7 5】

式 (I) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

30

【化 1 2】



であり；

【化 1 3】

40



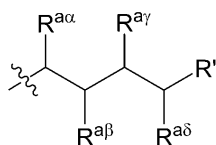
は、結合点を表わし； $R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、 H であり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2 であり； R^5 は各々、 H であり； R^6 は各々、 H であり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、5 であり； m は、7 である。

【0 2 7 6】

式 (I) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

50

【化 1 4】



であり；

【化 1 5】

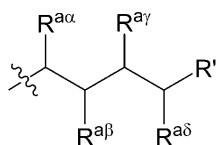


は、結合点を表わし； $R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、Hであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2であり； R^5 は各々、Hであり； R^6 は各々、Hであり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、3であり； m は、7である。

【0 2 7 7】

式 (I) の化合物のいくつかの実施形態において、 $R^{a\alpha}$ は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

【化 1 6】



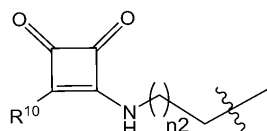
であり；

【化 1 7】



は、結合点を表わし； $R^{a\alpha}$ は、 C_{2-12} アルキルであり； $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、Hであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、

【化 1 8】



であり； R^{10} は、 $NH(C_{1-6}$ アルキル)であり； n_2 は、2であり； R^5 は、Hであり； R^6 は各々、Hであり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、5であり； m は、7である。

【0 2 7 8】

式 (I) の化合物のいくつかの実施形態において、 $R^{a\alpha}$ は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

10

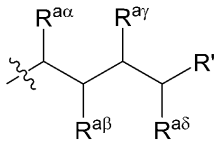
20

30

40

50

【化 1 9】



であり；

【化 2 0】

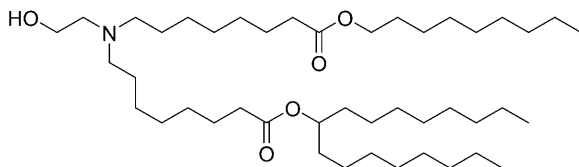


は、結合点を表わし； $R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、Hであり； $R^{a\gamma}$ は、 C_{2-12} アルキルであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2であり； R^5 は各々、Hであり； R^6 は各々、Hであり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、5であり； m は、7である。

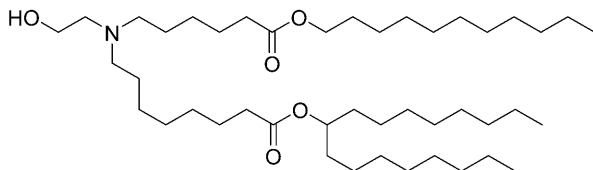
【0 2 7 9】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、

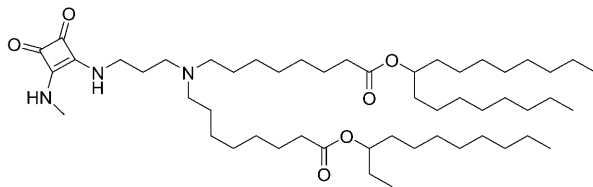
【化 2 1】



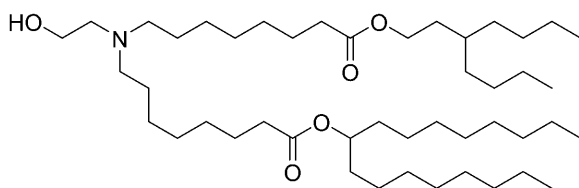
(18)、



(25)、



(301)、及び



(357)

から選択される。

【0 2 8 0】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、

10

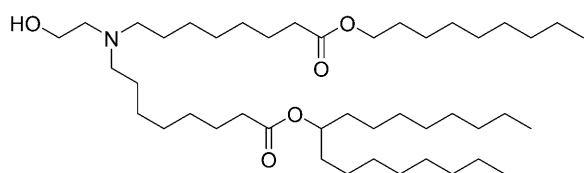
20

30

40

50

【化 2 2】



(18)

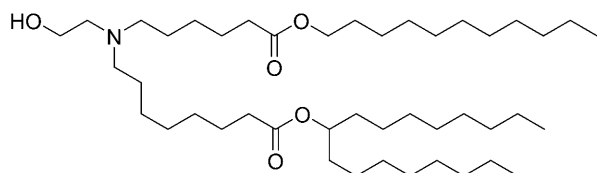
である。

【0281】

10

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、

【化 2 3】



(25)

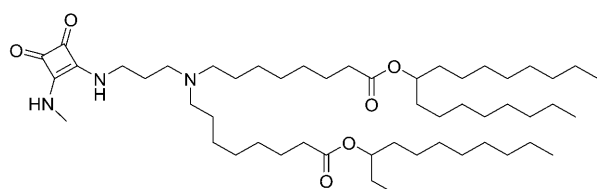
である。

20

【0282】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、

【化 2 4】



(301)

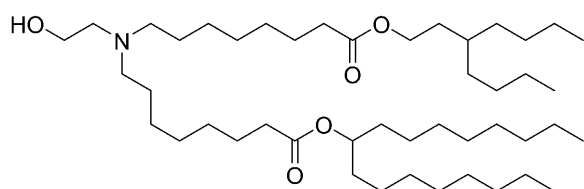
30

である。

【0283】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、

【化 2 5】



(357)

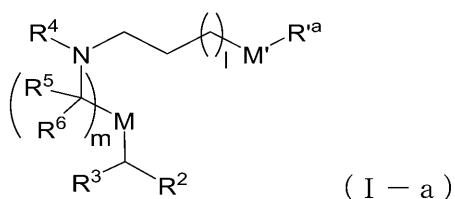
40

である。

【0284】

いくつかの態様において、本開示は、式 (I-a) の化合物：

【化 2 6】



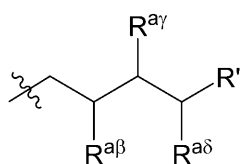
もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくはは異性体

10

〔式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり；

R 分岐鎖は、

【化 2 7】



20

であり；

【化 2 8】



は、結合点を表わし；

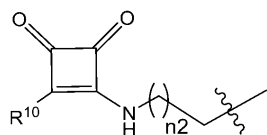
$R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、 H 、 C_{2-12} アルキル、及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキル及び C_{2-14} アルケニルからなる群から独立して選択され；

30

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される) 及び

【化 2 9】



40

からなる群から選択され、

【化 3 0】



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

50

各々の R^5 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

各々の R^6 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ からなる群から独立して選択され；

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

l は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択され；

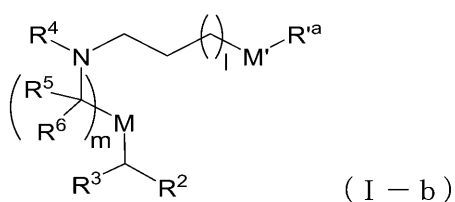
m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 からなる群から選択される] に関する。

10

【0285】

いくつかの態様において、本開示は、式 (I-b) の化合物：

【化31】



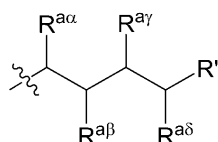
20

もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくはは異性体

[式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり；

R 分岐鎖は、

【化32】



30

であり；

【化33】



は、結合点を表わし；

$R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、H、 C_{2-12} アルキル、及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され；

40

R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキル及び C_{2-14} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される) であり；

各々の R^5 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

各々の R^6 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ からなる群から独立して選択され；

50

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

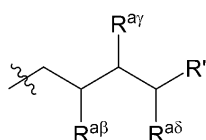
l は、1、2、3、4、及び5からなる群から選択され；

m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び13からなる群から選択される] に関する。

【0286】

式 (I) または (I-b) のいくつかの実施形態において、 $R^{a\gamma}$ は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

【化34】



10

であり；

【化35】



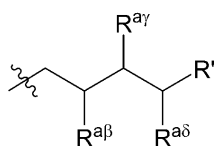
20

は、結合点を表わし； $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、Hであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2であり； R^5 は各々、Hであり； R^6 は各々、Hであり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、5であり； m は、7である。

【0287】

式 (I) または (I-b) のいくつかの実施形態において、 $R^{a\gamma}$ は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

【化36】



30

であり；

【化37】



40

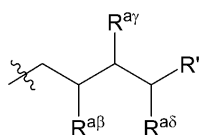
は、結合点を表わし； $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、Hであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2であり； R^5 は各々、Hであり； R^6 は各々、Hであり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、3であり； m は、7である。

【0288】

式 (I) または (I-b) のいくつかの実施形態において、 $R^{a\gamma}$ は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、

50

【化 3 8】



であり；

【化 3 9】

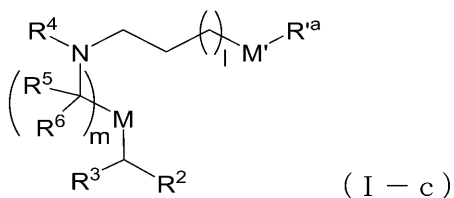


は、結合点を表わし； $R^{a\beta}$ 及び $R^{a\delta}$ は各々、H であり； $R^{a\gamma}$ は、 C_{2-12} アルキルであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり； n は、2 であり； R^5 は各々、H であり； R^6 は各々、H であり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 C_{1-12} アルキルであり； l は、5 であり； m は、7 である。

【0 2 8 9】

いくつかの態様において、本開示は、式 (I-c) の化合物：

【化 4 0】

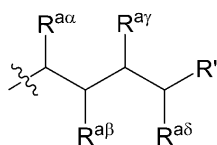


もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくは異性体

【式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり；

R 分岐鎖は、

【化 4 1】



であり；

【化 4 2】

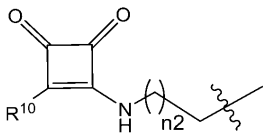


は、結合点を表わし；

$R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、H、 C_{2-12} アルキル、及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキル及び C_{2-14} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^4 は、
【化 4 3】



であり、
【化 4 4】

10



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R^5 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

20

各々の R^6 は、 C_{1-3} アルキル、 C_{2-3} アルケニル及び H からなる群から独立して選択され；

M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ 及び $-OC(O)-$ からなる群から独立して選択され；

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

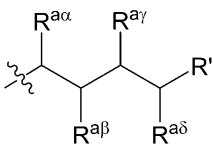
l は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択され；

m は、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 からなる群から選択される] に関する。

【0290】

いくつかの実施形態において、 R^{1a} は、 R 分岐鎖であり； R 分岐鎖は、
【化 4 5】

30



であり；
【化 4 6】

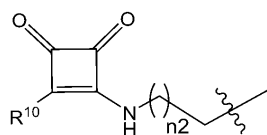
40



は、結合点を表わし； $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 、及び $R^{a\delta}$ は各々、 H であり； $R^{a\alpha}$ は、 C_{2-12} アルキルであり； R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキルであり； R^4 は、

50

【化 4 7】



であり；

【化 4 8】

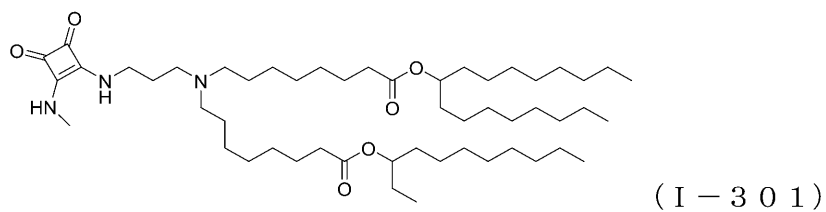


は、結合点を表わし； R^{10} は、 $NH(C_{1-6}アルキル)$ であり； n_2 は、2であり； R^5 は各々、 H であり； R^6 は各々、 H であり； M 及び M' は各々、 $-C(O)O-$ であり； R' は、 $C_{1-12}アルキル$ であり； l は、5であり； m は、7である。

【0291】

いくつかの実施形態において、式（I-c）の化合物は、

【化 4 9】

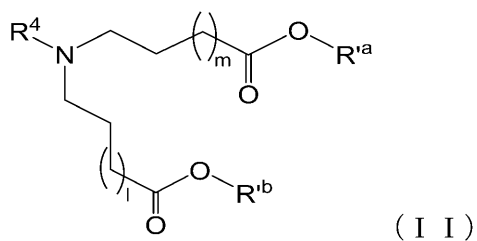


である。

【0292】

いくつかの態様において、本開示は、式（II）の化合物：

【化 5 0】



もしくはそのN-オキシド、またはその塩もしくは異性体

〔式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖または R 環式であり；

R 分岐鎖は、

10

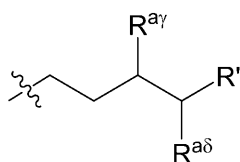
20

30

40

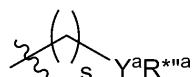
50

【化 5 1】



であり、R 環式は、

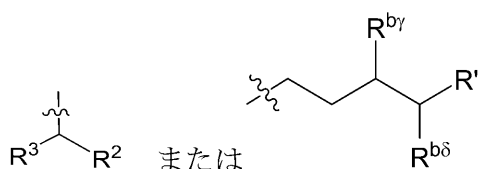
【化 5 2】



であり；

R ^bは、

【化 5 3】



であり；

【化 5 4】



は、結合点を表わし；

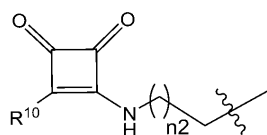
R ^a\gamma 及び R ^a\delta は各々、H、C₁₋₁₂アルキル、及び C₂₋₁₂アルケニルからなる群から独立して選択され、R ^a\gamma 及び R ^a\delta のうちの少なくとも1つは、C₁₋₁₂アルキル及び C₂₋₁₂アルケニルからなる群から選択され；

R ^b\gamma 及び R ^b\delta は各々、H、C₁₋₁₂アルキル、及び C₂₋₁₂アルケニルからなる群から独立して選択され、R ^b\gamma 及び R ^b\delta のうちの少なくとも1つは、C₁₋₁₂アルキル及び C₂₋₁₂アルケニルからなる群から選択され；

R ^2 及び R ^3 は各々、C₁₋₁₄アルキル及び C₂₋₁₄アルケニルからなる群から独立して選択され；

R ^4 は、- (CH₂)_nOH (式中、n は、1、2、3、4、及び5からなる群から選択される) 及び

【化 5 5】



からなる群から選択され、

【化 5 6】



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

Y^a は、 C_{3-6} 炭素環であり；

R^{*a} は、 C_{1-15} アルキル及び C_{2-15} アルケニルからなる群から選択され；

s は、2 または 3 であり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

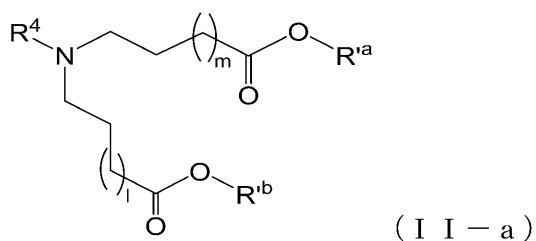
l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

に関する。

【0 2 9 3】

いくつかの態様において、本開示は、式 (II-a) の化合物：

【化 5 7】

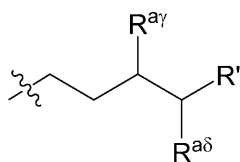


もしくはその N -オキシド、またはその塩もしくは異性体

[式中、 R^a は、 R 分岐鎖または R 環式であり；

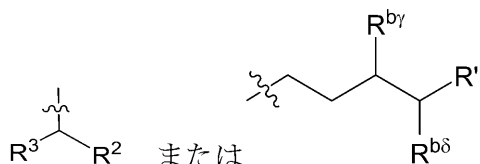
R 分岐鎖は、

【化 5 8】



であり、 R^b は、

【化 5 9】



であり；

【化 6 0】



は、結合点を表わし；

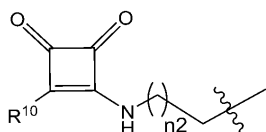
$R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ は各々、 H 、 C_{1-12} アルキル、及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され、 $R^{a\gamma}$ 及び $R^{a\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 C_{1-12} アルキル及び C_{2-12} アルケニルからなる群から選択され；

$R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ は各々、 H 、 C_{1-12} アルキル、及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され、 $R^{b\gamma}$ 及び $R^{b\delta}$ のうちの少なくとも 1 つは、 C_{1-12} アルキル及び C_{2-12} アルケニルからなる群から選択され；

R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキル及び C_{2-14} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される) 及び

【化 6 1】



からなる群から選択され、

【化 6 2】



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

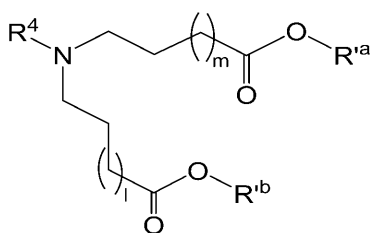
l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

に関する。

【0294】

いくつかの態様において、本開示は、式 (I I - b) の化合物：

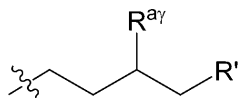
【化 6 3】



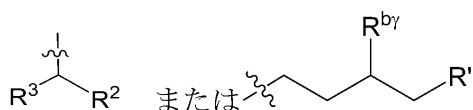
(I I - b)

もしくはその N -オキシド、またはその塩もしくは異性体

[式中、 $R^{a\gamma}$ は、 R 分岐鎖または R 環式であり；
 R 分岐鎖は、
 【化 6 4】



であり、 $R^{b\gamma}$ は、
 【化 6 5】



であり；
 【化 6 6】



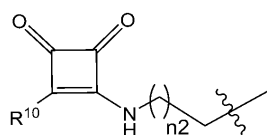
は、結合点を表わし；

$R^{a\gamma}$ 及び $R^{b\gamma}$ は各々、 C_{1-12} アルキル及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^2 及び R^3 は各々、 C_{1-14} アルキル及び C_{2-14} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される) 及び

【化 6 7】



からなる群から選択され、
 【化 6 8】



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

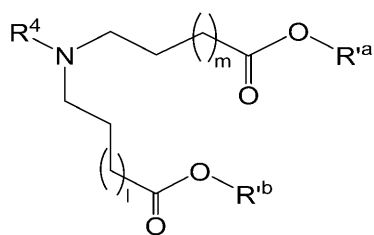
l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

に関する。

【0295】

いくつかの態様において、本開示は、式（II-c）の化合物：

【化69】



(II-c)

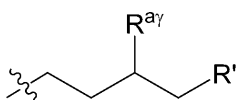
10

もしくはそのN-オキシド、またはその塩もしくは異性体

【式中、R^aは、R分岐鎖またはR環式であり；

R分岐鎖は、

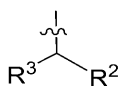
【化70】



20

であり、R^bは、

【化71】



であり；

【化72】

30

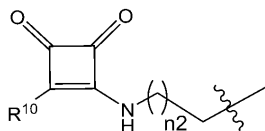


は、結合点を表わし；

R^{aγ}は、C₁₋₁₂アルキル及びC₂₋₁₂アルケニルからなる群から選択され；R²及びR³は各々、C₁₋₁₄アルキル及びC₂₋₁₄アルケニルからなる群から独立して選択され；R⁴は、-(CH₂)_nOH（式中、nは、1、2、3、4、及び5からなる群から選択される）及び

40

【化73】



からなる群から選択され、

50

【化 7 4】



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

R' は、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

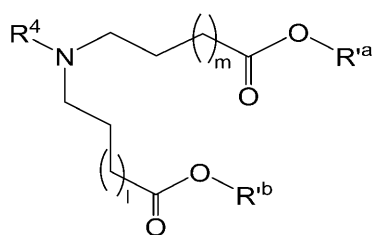
l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

に関する。

【0296】

いくつかの態様において、本開示は、式 (II-d) の化合物：

【化 7 5】



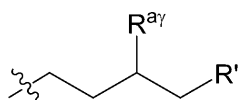
(II-d)

もしくはその N -オキシド、またはその塩もしくは異性体

[式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖または R 環式であり；

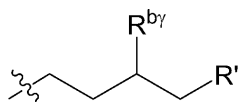
R 分岐鎖は、

【化 7 6】



であり、 R^{1b} は、

【化 7 7】



であり；

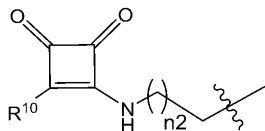
【化 7 8】



は、結合点を表わし；

R^{2a} 及び R^{2b} は各々、 C_{1-12} アルキル及び C_{2-12} アルケニルからなる群から独立して選択され；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される) 及び
【化 79】



からなる群から選択され、
【化 80】

10



は、結合点を表わし；

R^{10} は、 $N(R)_2$ であり；各々の R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-3} アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され； n_2 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 からなる群から選択され；

各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルまたは C_{2-12} アルケニルであり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

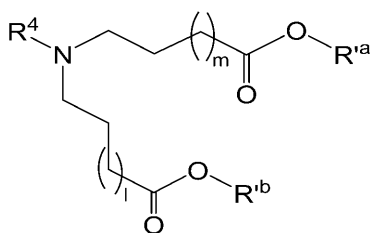
20

に関する。

【0297】

いくつかの態様において、本開示は、式 (II-e) の化合物：

【化 81】



(II-e)

30

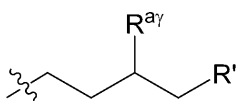
もしくはその N -オキシド、またはその塩もしくは異性体

【式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖または R 環式であり；

R 分岐鎖は、

【化 82】

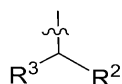
40



であり、 R^{1b} は、

50

【化 8 3】



であり；

【化 8 4】



10

は、結合点を表わし；

R^a は、C₁₋₁₂ アルキル及び C₂₋₁₂ アルケニルからなる群から選択され；R² 及び R³ は各々、C₁₋₁₄ アルキル及び C₂₋₁₄ アルケニルからなる群から独立して選択され；R⁴ は、-(CH₂)_nOH（式中、n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される）であり；R' は、C₁₋₁₂ アルキルまたは C₂₋₁₂ アルケニルであり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択され；

20

l は、1、2、3、4、5、6、7、8、及び 9 から選択される]

に関する。

【0298】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、m 及び l は各々、4、5、及び 6 から独立して選択される。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、m 及び l は各々、5 である。

【0299】

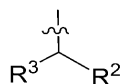
式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、各々の R' は独立して、C₁₋₁₂ アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、各々の R' は独立して、C₂₋₅ アルキルである。

30

【0300】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R^{1b} は、

【化 8 5】

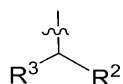


40

であり、R² 及び R³ は各々独立して、C₁₋₁₄ アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R^{1b} は、

50

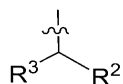
【化 8 6】



であり、 R^2 及び R^3 は各々独立して、 C_{6-10} アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^b は、

【化 8 7】

10



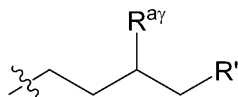
であり、 R^2 及び R^3 は各々、 C_8 アルキルである。

【0301】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、

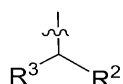
【化 8 8】

20



であり、 R^b は、

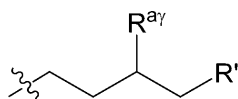
【化 8 9】



30

であり、 R^{ay} は、 C_{1-12} アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々独立して、 C_{6-10} アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、

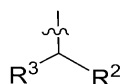
【化 9 0】



40

であり、 R^b は、

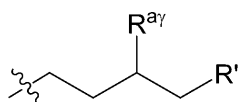
【化 9 1】



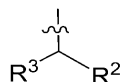
であり、 R^{ay} は、 C_{2-6} アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々独立して、 C_{6-10} アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)

50

、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R 分岐鎖は、
【化 9 2】

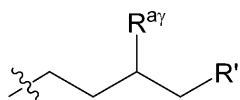


であり、R^{ay} は、
【化 9 3】

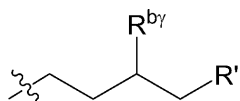


であり、R^{ay} は、C₂ - 6 アルキルであり、R² 及び R³ は各々、C₈ アルキルである。
【0302】

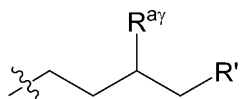
式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R 分岐鎖は、
【化 9 4】



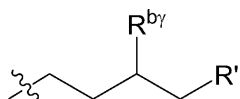
であり、R^{ay} は、
【化 9 5】



であり、R^{ay} 及び R^{by} は各々、C₁ - 12 アルキルである。式 (II)、(II-a)、
(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつか
の実施形態において、R 分岐鎖は、
【化 9 6】



であり、R^{ay} は、
【化 9 7】



であり、R^{ay} 及び R^{by} は各々、C₂ - 6 アルキルである。
【0303】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R 分岐鎖は、

10

20

30

40

50

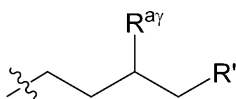
I-e) の化合物のいくつかの実施形態において、m 及び l は各々、4、5、及び 6 から独立して選択され、各々の R' は独立して、C₁₋₁₂ アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、m 及び l は各々、5 であり、各々の R' は独立して、C₂₋₅ アルキルである。

【0304】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R^{ab} は、

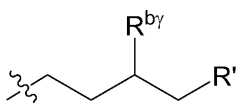
【化98】

10



であり、R^{ab} は、

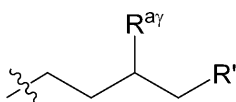
【化99】



20

であり、m 及び l は各々、4、5、及び 6 から独立して選択され、各々の R' は独立して、C₁₋₁₂ アルキルであり、R^{ay} 及び R^{by} は各々、C₁₋₁₂ アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R^{ab} は、

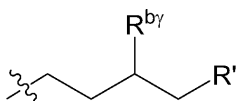
【化100】



30

であり、R^{ab} は、

【化101】



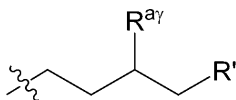
であり、m 及び l は各々、5 であり、各々の R' は独立して、C₂₋₅ アルキルであり、R^{ay} 及び R^{by} は各々、C₂₋₆ アルキルである。

40

【0305】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R^{ab} は、

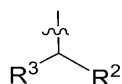
【化102】



であり、R^{ab} は、

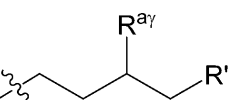
50

【化 1 0 3】



であり、 m 及び l は各々、4、5、及び6から独立して選択され、 R' は、 C_{1-12} アルキルであり、 R^{ay} は、 C_{1-12} アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々独立して、 C_{6-10} アルキルである。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、

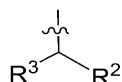
10



であり、 R^{yb} は、

【化 1 0 5】

20



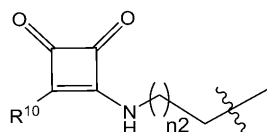
であり、 m 及び l は各々、5であり、 R' は、 C_{2-5} アルキルであり、 R^{ay} は、 C_{2-6} アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々、 C_8 アルキルである。

【0 3 0 6】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、

【化 1 0 6】

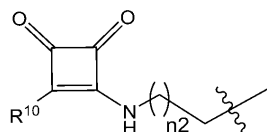
30



であり、 R^{10} は、 NH (C_{1-6} アルキル) であり、 n_2 は、2である。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、

【化 1 0 7】

40



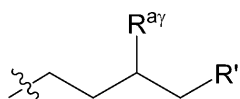
であり、 R^{10} は、 NH (CH_3) であり、 n_2 は、2である。

【0 3 0 7】

式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、

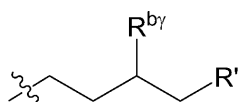
50

【化 1 0 8】



であり、 R^{yb} は、

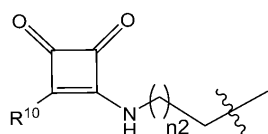
【化 1 0 9】



10

であり、 m 及び l は各々、4、5、及び 6 から独立して選択され、各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は各々、 C_{1-12} アルキルであり、 R^4 は、

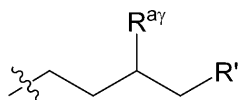
【化 1 1 0】



20

であり、 R^{10} は、 $NH(C_{1-6}$ アルキル) であり、 n_2 は、2 である。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、

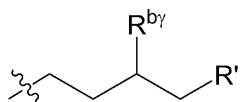
【化 1 1 1】



30

であり、 R^{yb} は、

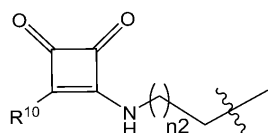
【化 1 1 2】



であり、 m 及び l は各々、5 であり、各々の R' は独立して、 C_2-5 アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は各々、 C_{2-6} アルキルであり、 R^4 は、

40

【化 1 1 3】

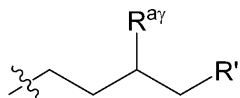


であり、 R^{10} は、 $NH(CH_3)$ であり、 n_2 は、2 である。

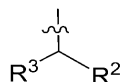
【0 3 0 8】

50

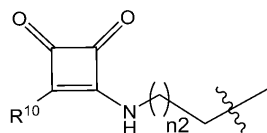
式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R 分岐鎖は、
【化 114】



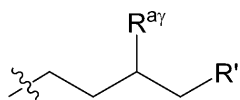
であり、R^{4b}は、
【化 115】



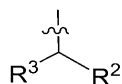
であり、m及びlは各々、4、5、及び6から独立して選択され、R'は、C₁-12アルキルであり、R²及びR³は各々独立して、C₆-10アルキルであり、R^{aγ}は、C₁-12アルキルであり、R⁴は、
【化 116】



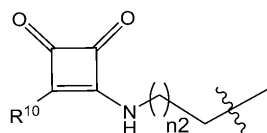
であり、R¹⁰は、NH (C₁-6アルキル) であり、n₂は、2である。式 (II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または (II-e) の化合物のいくつかの実施形態において、R 分岐鎖は、
【化 117】



であり、R^{4b}は、
【化 118】



であり、m及びlは各々、5であり、R'は、C₂-5アルキルであり、R^{aγ}は、C₂-6アルキルであり、R²及びR³は各々、C₈アルキルであり、R⁴は、
【化 119】



であり、 R^{10} は、 $NH(CH_3)$ であり、 n_2 は、2である。

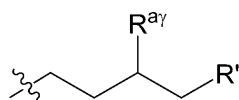
【0309】

式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または(II-e)の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2、3、または4である。式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または(II-e)の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2である。

【0310】

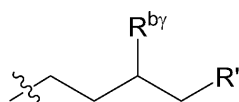
式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または(II-e)の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、
【化120】

10



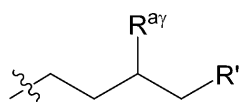
であり、 R^{1b} は、
【化121】

20



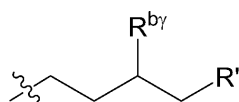
であり、 m 及び l は各々、4、5、及び6から独立して選択され、各々の R' は独立して、 C_{1-12} アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は各々、 C_{1-12} アルキルであり、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2、3、または4である。式(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、または(II-e)の化合物のいくつかの実施形態において、 R 分岐鎖は、
【化122】

30



であり、 R^{1b} は、
【化123】

40



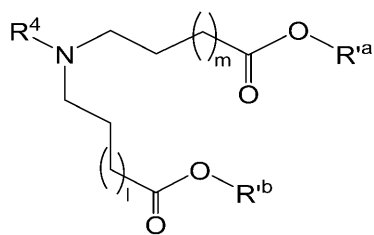
であり、 m 及び l は各々、5であり、各々の R' は独立して、 C_{2-5} アルキルであり、 R^{ay} 及び R^{by} は各々、 C_{2-6} アルキルであり、 R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ であり、 n は、2である。

【0311】

いくつかの態様において、本開示は、式(II-f)の化合物：

50

【化 1 2 4】



(II-f)

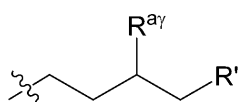
10

もしくはその N-オキシド、またはその塩もしくは異性体

【式中、 R^{1a} は、 R 分岐鎖または R 環式であり；

R 分岐鎖は、

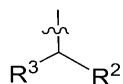
【化 1 2 5】



であり、 R^{1b} は、

20

【化 1 2 6】



であり；

【化 1 2 7】



30

は、結合点を表わし；

R^{1a} は、 C_{1-12} アルキルであり；

R^2 及び R^3 は各々独立して、 C_{1-14} アルキルであり；

R^4 は、 $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ （式中、 n は、1、2、3、4、及び 5 からなる群から選択される）であり；

R^1 は、 C_{1-12} アルキルであり；

m は、4、5、及び 6 から選択され；

l は、4、5、及び 6 から選択される]

40

に関する。

【0 3 1 2】

式 (II-f) の化合物のいくつかの実施形態において、 m 及び l は各々、5 であり、 n は、2、3、または 4 である。

【0 3 1 3】

式 (II-f) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^1 は、 C_{2-5} アルキルであり、 R^{1a} は、 C_{2-6} アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々、 C_{6-10} アルキルである。

【0 3 1 4】

式 (II-f) の化合物のいくつかの実施形態において、 m 及び l は各々、5 であり、

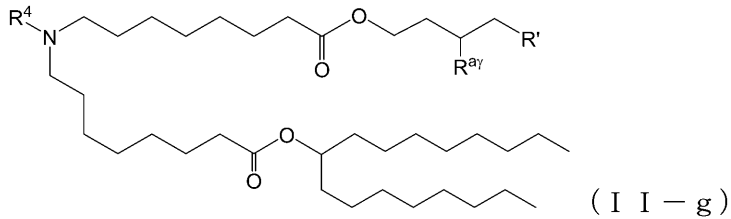
50

n は、2、3、または4であり、 R' は、 $C_2 - 5$ アルキルであり、 R^{ay} は、 $C_2 - 6$ アルキルであり、 R^2 及び R^3 は各々、 $C_6 - 10$ アルキルである。

【0315】

いくつかの態様において、本開示は、式 (II-g) の化合物：

【化128】



10

[式中、

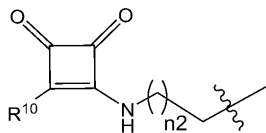
R^{ay} は、 $C_2 - 6$ アルキルであり；

R' は、 $C_2 - 5$ アルキルであり；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、3、4、及び5からなる群から選択される) 及び

【化129】

20



からなる群から選択され、

【化130】



30

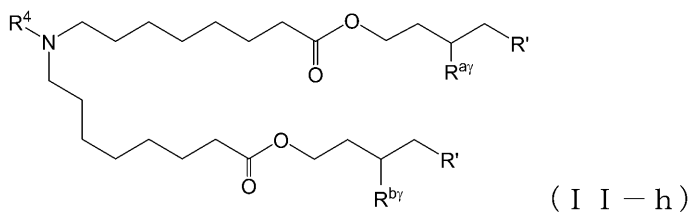
は、結合点を表わし、 R^{10} は、 $NH(C_1 - 6$ アルキル) であり、 n_2 は、1、2、及び3からなる群から選択される]

に関する。

【0316】

いくつかの態様において、本開示は、式 (II-h) の化合物：

【化131】



40

[式中、

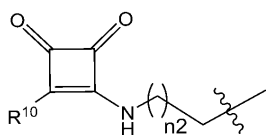
R^{ay} 及び R^{by} は各々独立して、 $C_2 - 6$ アルキルであり；

各々の R' は独立して、 $C_2 - 5$ アルキルであり；

R^4 は、 $-(CH_2)_nOH$ (式中、 n は、3、4、及び5からなる群から選択される) 及び

50

【化 1 3 2】



からなる群から選択され、

【化 1 3 3】

10

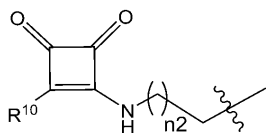


は、結合点を表わし、 R^{10} は、 $NH(C_{1-6} \text{アルキル})$ であり、 n_2 は、1、2、及び 3 からなる群から選択される] に関する。

【0 3 1 7】

式 (I I - g) または (I I - h) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、

20



であり、

R^{10} は、 $NH(CH_3)$ であり、 n_2 は、2 である。

【0 3 1 8】

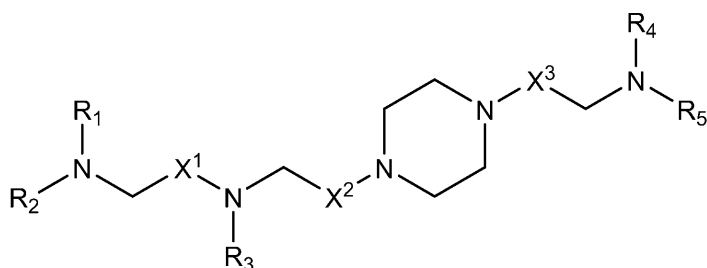
式 (I I - g) または (I I - h) の化合物のいくつかの実施形態において、 R^4 は、 $-(CH_2)_2OH$ である。

30

【0 3 1 9】

いくつかの態様において、本開示は、式 (I I I) を有する化合物：

【化 1 3 5】



(I I I)

40

またはその塩もしくは異性体 [式中、

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 は、 C_{5-20} アルキル、 C_{5-20} アルケニル、 $-R''MR'$ 、 $-YR''$ 、 $-YR'$ 、及び $-OR''$ からなる群から独立して選択され；
各々の M は、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、アリール基、及びヘテロアリール基からなる群から独立して選択され；

50

X^1 、 X^2 、及び X^3 は、結合、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 、及び $-CH(SH)-$ からなる群から独立して選択され；

各々の Y は独立して、 C_3-6 炭素環であり；

各々の R^* は、 C_1-12 アルキル及び C_2-12 アルケニルからなる群から独立して選択され；

各々の R は、 C_1-3 アルキル及び C_3-6 炭素環からなる群から独立して選択され；

各々の R' は、 C_1-12 アルキル、 C_2-12 アルケニル、及び H からなる群から独立して選択され；

各々の R'' は、 C_3-12 アルキル及び C_3-12 アルケニルからなる群から独立して選択され、

i) X^1 、 X^2 、及び X^3 のうちの少なくとも1つは、 $-CH_2-$ ではない；及び／または

ii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 のうちの少なくとも1つは、 $-R''MR'$ である]

に関する。

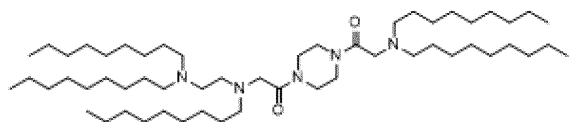
【0320】

いくつかの実施形態において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 は各々、 C_5-20 アルキルであり； X^1 は、 $-CH_2-$ であり； X^2 及び X^3 は各々、 $-C(O)-$ である。

【0321】

いくつかの実施形態において、式(III)の化合物は、

【化136】



(I-356)

である。

【0322】

本明細書における式のうちの任意のものに従う脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の中心のアミン部分は、生理的なpHでプロトン化され得る。したがって、脂質は、生理的pHで、正電荷または部分正電荷を有し得る。かかる脂質は、カチオン性脂質またはイオン化可能(アミノ)脂質と称され得る。脂質は、双性イオン性、すなわち正電荷及び負電荷の両方を有する中性分子でもあり得る。

【0323】

いくつかの実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、約1mol%~99mol%の範囲である。

【0324】

一実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)

I)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99mol%である。

【0325】

一実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、約30mol%~約70mol%、約35mol%~約65mol%、約40mol%~約60mol%、及び約45mol%~約55mol%の範囲である。

【0326】

特定の一実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、約45mol%である。

【0327】

特定の一実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、約40mol%である。

【0328】

特定の一実施形態において、本発明のイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)の量は、脂質組成物中で、約50mol%である。

【0329】

本明細書において開示されるイオン化可能アミノ脂質、例えば式(I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または(III)のうちの任意のものを有する化合物(これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する)に加えて、本明細書において開示される脂質ベースの組成物(例えば脂質ナノ粒子)は追加の構成要素(コレステロール及び/またはコレステロール類似体、非カチオン性ヘルパー脂質、構造脂質、PEG-脂質、ならびに任意のそれらの組み合わせ等)を含み得る。

【0330】

本発明の追加のイオン化可能脂質は、3-(ジドデシルアミノ)-N1, N1, 4-トリドデシル-1-ピペラジンエタンアミン(KL10)、N1-[2-(ジドデシルアミノ)エチル]-N1, N4, N4-トリドデシル-1, 4-ピペラジンジエタンアミン(KL22)、14, 25-ジトリドデシル15, 18, 21, 24-テトラアザ-オクタトリアコンタン(KL25)、1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロ

10

20

30

40

50

パン (DLin-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、ヘプタトリアコンター-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-MC3-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン (DLin-KC2-DMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、(13Z,165Z)-N,N-ジメチル-3-ノニドコサ (nonydocossa)-13-16-ジエン-1-アミン (L608)、2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA (2R))、及び (2S)-2-({8-[(3β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA (2S)) からなる非限定的な群から選択され得る。これらに加えて、イオン化可能アミノ脂質は、環式アミン基を含む脂質でもあり得る。

10

【0331】

本発明のイオン化可能脂質は、国際公開第WO2017/075531A1号（参照することによってその全体が本明細書に援用される）中で開示される化合物でもあり得る。

20

【0332】

本発明のイオン化可能脂質は、国際公開第WO2015/199952A1号（参照することによってその全体が本明細書に援用される）において開示される化合物でもあり得る。

【0333】

上記の態様または関連する態様のうちの任意のものにおいて、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、例えば式 (I)、(I-a)、(I-b)、(I-c)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(II-e)、(II-f)、(II-g)、(II-h)、または (III)（これらの各々は、明瞭性のために文字Iが先行する）のうちの任意のものを有する任意の化合物中に含まれる化合物を含む。

30

【0334】

上記の態様または関連する態様のうちの任意のものにおいて、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、化合物番号18、25、301、及び357のうちの任意のものを含む化合物を含む。

【0335】

上記の態様または関連する態様のうちの任意のものにおいて、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、化合物番号18、25、301、及び357からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含む。別の実施形態において、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、化合物番号18、25、301、及び357からなる群から選択される化合物を含む。別の実施形態において、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、化合物18を含む。別の実施形態において、本開示のLNPのイオン化可能脂質は、化合物25を含む。

40

【0336】

上記の態様または関連する態様のうちの任意のものにおいて、本発明の化合物（例えば化合物番号18、25、301、及び357のうちの任意のものを含む化合物）の合成は、2018年9月19日に出願された米国仮特許出願第62/733,315号における合成の記載に従う。

【0337】

代表的な合成経路：

化合物I-182：ヘプタデカン-9-イル8-((3-((2-(メチルアミノ)-

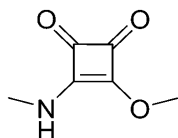
50

3,4-ジオキソシクロブタ-1-エン-1-イル)アミノ)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート

【0338】

3-メトキシ-4-(メチルアミノ)シクロブタ-3-エン-1,2-ジオン

【化137】



化学式: $C_6H_7NO_3$

分子量: 141.13

10

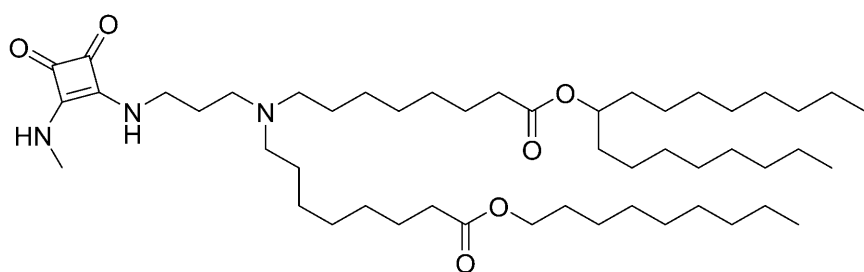
100 mL のジエチルエーテル中の3,4-ジメトキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン(1 g、7 mmol)の溶液へ、THF中の2 Mメチルアミン溶液(3.8 mL、7.6 mmol)を添加し、沈殿物が形成された。混合物を室温で24時間攪拌し、次いで濾過して固体を収集した。固体をジエチルエーテルにより洗浄し、風乾させ、次いで熱EtOAc中で溶解し、濾過した。濾液を室温へ冷冷させ、次いで0℃へ冷却して沈殿物を得て、それを濾過を介して単離し、冷EtOAcにより洗浄し、風乾させ、次いで真空下で乾燥させて、3-メトキシ-4-(メチルアミノ)シクロブタ-3-エン-1,2-ジオン(0.70 g、5 mmol、73%)を固体として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : ppm 8.50 (br. d, 1H, J = 6.9 Hz); 4.27 (s, 3H); 3.02 (sdd, 3H, J = 4.2 Hz, 4.5 Hz).

20

【0339】

ヘプタデカン-9-イル8-((3-((2-(メチルアミノ)-3,4-ジオキソシクロブタ-1-エン-1-イル)アミノ)プロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート

【化138】



化学式: $C_{50}H_{93}N_3O_6$

分子量: 832.31

30

40

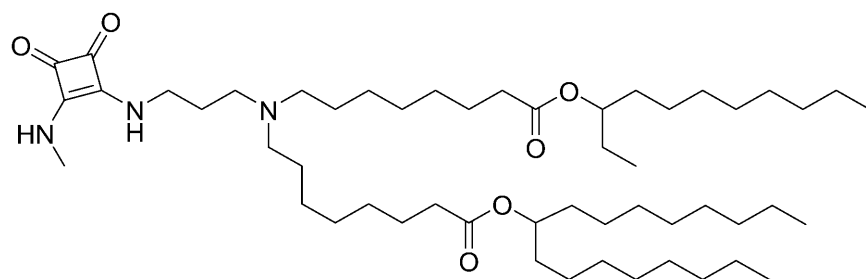
10 mL エタノール中のヘプタデカン-9-イル8-((3-アミノプロピル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート(200 mg、0.28 mmol)の溶液へ、3-メトキシ-4-(メチルアミノ)シクロブタ-3-エン-1,2-ジオン(39 mg、0.28 mmol)を添加した。反応混合物を室温で20時間攪拌し、次いで真空下で濃縮して、残留物を得た。残留物を、シリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン中で0~100%(ジクロロメタン中の1%の NH_4OH 、20%のMeOHの混合物))によって精製して、ヘプタデカン-9-イル8-((3-((2-(メチルアミノ)-3,4-ジオキソシクロブタ-1-エン-1-イル)アミノ)プロ

50

ピル) (8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル) アミノ) オクタノエート (138 mg、0.17 mmol、60%) を固体として得た。UPLC/ELSD: RT = 3. min. MS (ES): m/z (MH⁺) C₅₁H₉₅N₃O₆ については 833.4. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 7.86 (br. s., 1H); 4.86 (五重線, 1H, J = 6 Hz); 4.05 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.92 (d, 2H, J = 3 Hz); 3.20 (s, 6H); 2.63 (br. s., 2H); 2.42 (br. s., 3H); 2.28 (m, 4H); 1.74 (br. s., 2H); 1.61 (m, 8H); 1.50 (m, 5H); 1.41 (m, 3H); 1.25 (br. m, 47H); 0.88 (t, 9H, J = 7.5 Hz). [0340]

10

化合物 I-301: ヘプタデカン-9-イル 8-((3-((2-(メチルアミノ)-3,4-ジオキソシクロブター-1-エン-1-イル) アミノ) プロピル) (8-オキソ-8-(ウンデカン-3-イルオキシ) オクチル) アミノ) オクタノエート
[化139]



20

化学式: C₅₂H₉₇N₃O₆

分子量: 860.36

ヘプタデカン-9-イル 8-((3-アミノプロピル) (8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル) アミノ) オクタノエートの代わりに、ヘプタデカン-9-イル 8-((3-アミノプロピル) (8-オキソ-8-(ウンデカン-3-イルオキシ) オクチル) アミノ) オクタノエート (500 mg、0.66 mmol) を使用したことを除いて、化合物 I-301 を化合物 182 に類似して調製した。水性後処理の後に、残留物を、シリカゲルクロマトグラフィー (ジクロロメタン中で 0~50% (ジクロロメタン中の 1% の NH₄OH、20% の MeOH の混合物)) によって精製して、ヘプタデカン-9-イル 8-((3-((2-(メチルアミノ)-3,4-ジオキソシクロブター-1-エン-1-イル) アミノ) プロピル) (8-オキソ-8-(ウンデカン-3-イルオキシ) オクチル) アミノ) オクタノエート (180 mg、32%) を固体として得た。HPLC/UV (254 nm): RT = 6.77 min. MS (CI): m/z (MH⁺) 860.7 for C₅₂H₉₇N₃O₆. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.86-4.79 (m, 2H); 3.66 (bs, 2H); 3.25 (d, 3H, J = 4.9 Hz); 2.56-2.52 (m, 2H); 2.42-2.37 (m, 4H); 2.28 (dd, 4H, J = 2.7 Hz, 7.4 Hz); 1.78-1.68 (m, 3H); 1.64-1.50 (m, 16H); 1.48-1.38 (m, 6H); 1.32-1.18 (m, 43H); 0.88-0.84 (m, 12H).

30

40

[0341]

コレステロール／構造脂質

本明細書において記載される LNP は、1 つまたは複数の構造脂質を含む。

[0342]

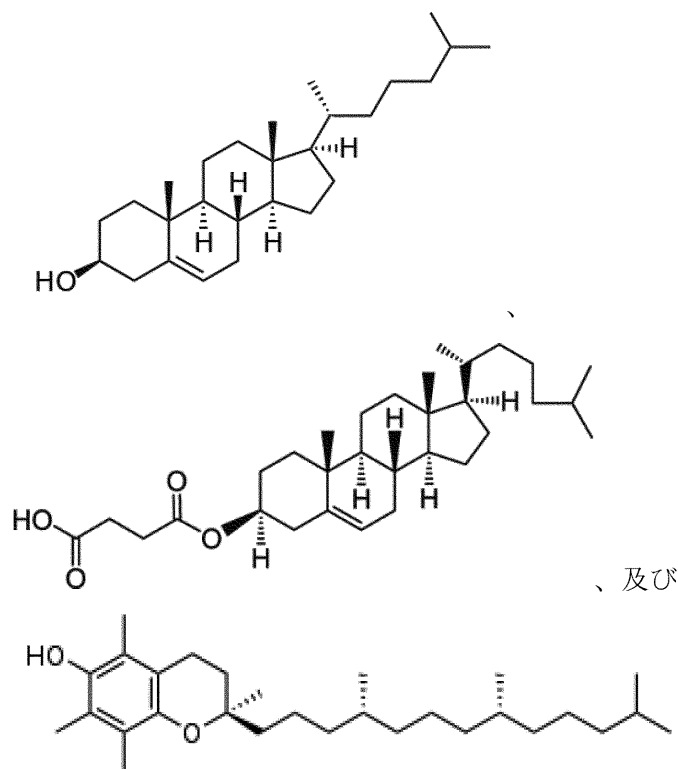
50

本明細書において使用される時、「構造脂質」という用語は、ステロールを指し、ステロール部分を含有する脂質も指す。脂質ナノ粒子中への構造脂質の取り込みは、粒子中での他の脂質の凝集の緩和を支援し得る。構造脂質としては、コレステロール、フェコステロール、エルゴステロール、バシカステロール (b a s s i c a s t e r o l)、トマチジン、トマチン、ウルソル酸 (u r s o l i c)、 α -トコフェロール、及びそれらの混合物が挙げられ得るがこれらに限定されない。ある特定の実施形態において、構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態において、構造脂質としては、コレステロール及びコルチコステロイド (例えばプレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾン等)、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0343】

いくつかの実施形態において、構造脂質は、ステロールである。本明細書において定義される時、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドの下位の群である。ある特定の実施形態において、構造脂質は、ステロイドである。ある特定の実施形態において、構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態において、構造脂質は、コレステロールの類似体である。ある特定の実施形態において、構造脂質は、 α -トコフェロールである。構造脂質の例としては、以下の：

【化140】



が挙げられるがこれらに限定されない。

【0344】

本明細書において記載される標的細胞送達 L N P は、1つまたは複数の構造脂質を含む。

【0345】

本明細書において使用される時、「構造脂質」という用語は、ステロールを指し、ステロール部分を含有する脂質も指す。脂質ナノ粒子中への構造脂質の取り込みは、粒子中での他の脂質の凝集の緩和を支援し得る。ある特定の実施形態において、構造脂質としては、コレステロール及びコルチコステロイド (例えばプレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾン等)、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0346】

いくつかの実施形態において、構造脂質は、ステロールである。本明細書において定義される時、「ステロール」は、ステロイドアルコールからなるステロイドの下位の群である。構造脂質としては、ステロール（例えば植物ステロールまたは動物性ステロール）が挙げられることができるがこれらに限定されない。

【0347】

ある特定の実施形態において、構造脂質は、ステロイドである。例えば、ステロールとしては、コレステロール、 β -シトステロール、フェコステロール、エルゴステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、トマチジン、トマチン、ウルソル酸、 α -トコフェロール、または同種のも

10

【0348】

ある特定の実施形態において、構造脂質は、コレステロールである。ある特定の実施形態において、構造脂質は、コレステロールの類似体である。

【0349】

化合物の比率

本発明の脂質ナノ粒子は、本明細書において記載されるような構造構成要素を含み得る。脂質ナノ粒子の構造構成要素は、個別の化合物、または本発明の1つまたは複数の構造化合物の混合物であり得る。

【0350】

非カチオン性ヘルパーの脂質／リン脂質

いくつかの実施形態において、本明細書において記載される脂質ベースの組成物（例えばLNP）は、1つまたは複数の非カチオン性ヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態において、非カチオン性ヘルパー脂質は、リン脂質である。いくつかの実施形態において、非カチオン性ヘルパー脂質は、リン脂質置換体またはリン脂質代替物である。

20

【0351】

本明細書において使用される時、「非カチオン性ヘルパー脂質」という用語は、少なくとも8つの長さの炭素の少なくとも1つの脂肪酸鎖、及び少なくとも1つの極性頭部基部分を含む脂質を指す。一実施形態において、ヘルパー脂質は、ホスファチジルコリン（PC）ではない。一実施形態において、非カチオン性ヘルパー脂質は、リン脂質またはリン脂質置換体である。いくつかの実施形態において、リン脂質またはリン脂質置換体は、例えば1つもしくは複数の飽和リン脂質もしくは（多価）不飽和リン脂質、またはリン脂質置換体、あるいはそれらの組み合わせであり得る。概して、リン脂質は、リン脂質部分及び1つまたは複数の脂肪酸部分を含む。

30

【0352】

リン脂質部分は、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リソホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。

【0353】

脂肪酸部分は、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、エルカ酸、フィタノン酸（phytanoic acid）、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。

40

【0354】

リン脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンシトール、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジン酸等のグリセロリン脂質が挙げられるがこれらに限定されない。リン脂質としては、スフィンゴミエリン等のリンスフィンゴ脂質も挙げられる。

【0355】

50

いくつかの実施形態において、非カチオン性ヘルパー脂質は、DSPC類似体、DSPC置換体、オレイン酸、またはオレイン酸類似体である。

【0356】

いくつかの実施形態において、非カチオン性ヘルパー脂質は、非ホスファチジルコリン(PC)双性イオン性脂質、DSPC類似体、オレイン酸またはオレイン酸類似体、または1,2-ジステアロイル-1,3-ビス(2-ホスホエタノール)-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC)置換体である。

【0357】

リン脂質

リン脂質

本明細書において開示される脂質ナノ粒子組成物の脂質組成物は、1つまたは複数のリン脂質(例えば1つもしくは複数の飽和リン脂質もしくは(多価)不飽和リン脂質、またはそれらの組み合わせ)を含み得る。概して、リン脂質は、リン脂質部分及び1つまたは複数の脂肪酸部分を含む。

【0358】

リン脂質部分は、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リソホスファチジルコリン、及びスフィンゴミエリンからなる非限定的な群から選択され得る。

【0359】

脂肪酸部分は、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、エルカ酸、フィタノン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、及びドコサヘキサエン酸からなる非限定的な群から選択され得る。

【0360】

特定のリン脂質は、膜への融合を促進し得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜(例えば細胞膜または細胞内膜)の1つまたは複数の負に荷電したリン脂質と相互作用し得る。リン脂質の膜への融合は、脂質含有組成物(例えばLNP)の1つまたは複数の要素(例えば治療剤)が膜を介して通過することを可能に、例えば1つまたは複数の要素の標的組織への送達を可能にし得る。

【0361】

修飾及び置換(分岐、酸化、環化、及びアルキンが挙げられる)を備えた天然種を包含する非天然リン脂質種も企図される。例えば、リン脂質は、1つもしくは複数のアルキン(例えば1つまたは複数の二重結合が三重結合により置き換えられたアルケニル基)により官能化され得るか、または1つもしくは複数のアルキンへ架橋され得る。適切な反応条件下で、アルキン基は、アジドへの曝露に際して、銅触媒で環化付加を受け得る。かかる反応は、ナノ粒子組成物の脂質二重層を官能化して、膜透過もしくは細胞認識を促進することにおいて、またはナノ粒子組成物を、標的化部分もしくは画像化部分(例えば色素)等の有用成分へコンジュゲートすることにおいて有用であり得る。

【0362】

リン脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチディ(phosphatidyl)グリセロール、及びホスファチジン酸等のグリセロリン脂質が挙げられるがこれらに限定されない。リン脂質としては、スフィンゴミエリン等のリンスフィンゴ脂質も挙げられる。

【0363】

いくつかの実施形態において、本発明のリン脂質は、1,2-ジステアロイル-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジリノレオイル-グリセロール-3-ホスホコリン(DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-glyシアロ-ホスホコリン(DMP C)、1,2-ジオレオイル-グリセロール-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジパ

10

20

30

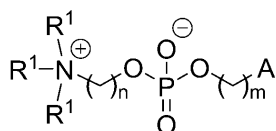
40

50

10

20

【化 1 4 1】



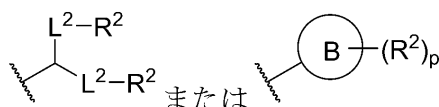
(I V)

30

mは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり；

A は、式：

【化 1 4 2】



であり；

50

R^2 の各々の実例は独立して、任意選択で置換された C_{1-30} アルキル、任意選択で置換された C_{1-30} アルケニル、または任意選択で置換された C_{1-30} アルキニルであり；任意選択で、 R^2 の 1 つまたは複数のメチレン単位は、任意選択で置換されたカルボシクリレン (carbocyclylene)、任意選択で置換されたヘテロシクリレン (heterocyclylene)、任意選択で置換されたアリーレン、任意選択で置換されたヘテロアリーレン、 $N(R^N)$ 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $C(O)N(R^N)$ 、 $-NR^N C(O)$ 、 $NR^N C(O)N(R^N)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)O$ 、 $C(O)S$ 、 $SC(O)$ 、 $-C(=NR^N)$ 、 $C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $C(S)$ 、 $C(S)N(R^N)$ 、 $NR^N C(S)$ 、 $-NR^N C(S)N(R^N)$ 、 $S(O)$ 、 $OS(O)$ 、 $S(O)O$ 、 $OS(O)O$ 、 $OS(O)_2$ 、 $S(O)_2O$ 、 $OS(O)_2O$ 、 $N(R^N)S(O)$ 、 $S(O)N(R^N)$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)$ 、 $OS(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)O$ 、 $S(O)_2$ 、 $N(R^N)S(O)_2$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)$ 、または $N(R^N)S(O)_2O$ により独立して置き換えられ；

10

R^N の各々の実例は独立して、水素、任意選択で置換されたアルキル、または窒素保護基であり；

環 B は、任意選択で置換されたカルボシクリル、任意選択で置換されたヘテロシクリル、任意選択で置換されたアリール、または任意選択で置換されたヘテロアリールであり；

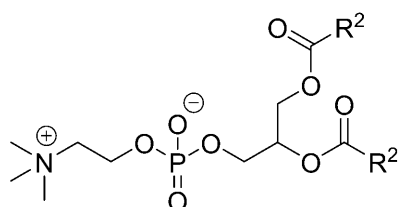
20

p は、1 または 2 である]

であり；

但し、当該化合物は、式：

【化 1 4 3】



30

【式中、 R^2 の各々の実例は独立して、非置換アルキル、非置換アルケニル、または非置換アルキニルである】

ではない。

【0 3 6 5】

いくつかの実施形態において、リン脂質は、米国出願第 6 2 / 5 2 0 , 5 3 0 号において記載されるリン脂質のうちの 1 つまたは複数であり得る。

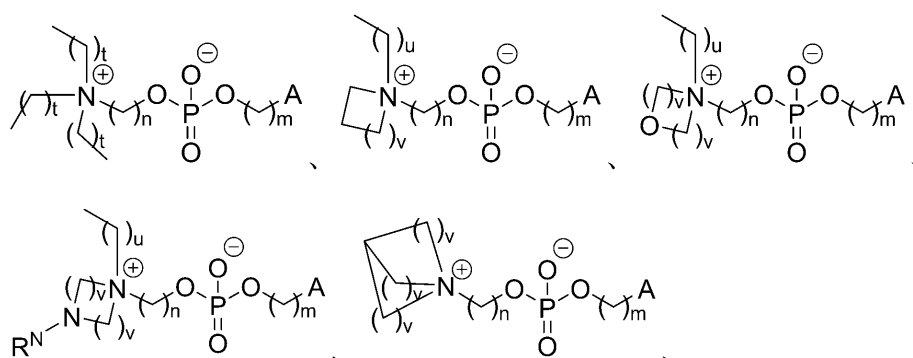
【0 3 6 6】

リン脂質頭部の修飾

ある特定の実施形態において、本発明において有用であるかまたは潜在的に有用であるリン脂質は、修飾されたリン脂質頭部（例えば修飾されたコリン基）を含む。ある特定の実施形態において、修飾された頭部を備えたリン脂質は、修飾された第四級アミンを備えた DSPC、またはその類似体である。例えば、式 (I V) の複数の実施形態において、 R^1 のうちの少なくとも 1 つは、メチルではない。ある特定の実施形態において、 R^1 のうちの少なくとも 1 つは、水素またはメチルではない。ある特定の実施形態において、式 (I V) の化合物は、以下の式：

40

【化 1 4 4】



10

またはその塩〔式中、

各々の t は独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり；

各々の u は独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり；

各々の v は独立して、1、2、または3である〕

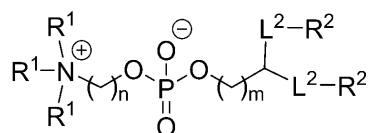
のうちの1つである。

【0 3 6 7】

ある特定の実施形態において、式 (I V) の化合物は、式 (I V - a)：

20

【化 1 4 5】



(I V - a)

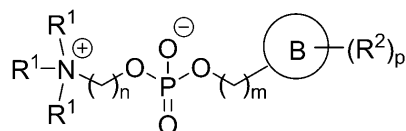
またはその塩である。

【0 3 6 8】

30

ある特定の実施形態において、本発明において有用であるかまたは潜在的に有用であるリン脂質は、グリセリド部分の代わりに環状部分を含む。ある特定の実施形態において、本発明において有用なリン脂質は、グリセリド部分の代わりに環状部分を備えた D S P C、またはその類似体である。ある特定の実施形態において、式 (I V) の化合物は、式 (I V - b)：

【化 1 4 6】



(I V - b)

40

またはその塩である。

【0 3 6 9】

リン脂質尾部の修飾

ある特定の実施形態において、本発明において有用であるかまたは潜在的に有用であるリン脂質は、修飾された尾部を含む。ある特定の実施形態において、本発明において有用であるかまたは潜在的に有用であるリン脂質は、修飾された尾部を備えた D S P C、またはその類似体である。本明細書において記載される時、「修飾された尾部」は、より短い

50

10

20

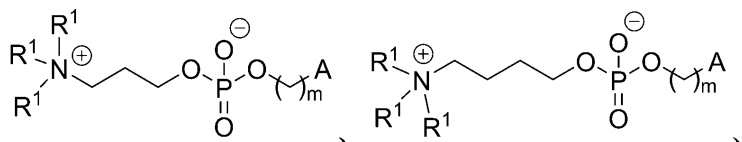
$$\begin{array}{c} \text{R}^1 \\ | \\ \text{R}^1-\text{N}^{\oplus} \\ | \\ \text{R}^1 \end{array} \text{---} (\text{---})_n \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}^{\ominus} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{---})_m \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{L}^2 \text{---} (\text{---})_x \\ \text{L}^2 \text{---} (\text{---})_x \end{array} \text{---} \text{G} \text{---} (\text{---})_x \text{---} \text{G} \text{---} (\text{---})_x$$

30

40

50

0である。例えば、ある特定の実施形態において、式（I V）の化合物は、以下の式：
【化 1 4 8】



またはそれらの塩のうちの1つである。

【0 3 7 2】

10

代替の脂質

ある特定の実施形態において、本発明において有用であるかまたは潜在的に有用であるリン脂質は、修飾されたホスホコリン部分を含み、第四級アミンをホスフォリル基へ連結するアルキル鎖は、エチレンではない（例えばnは、2ではない）。したがってある特定の実施形態において、リン脂質が有用である。

【0 3 7 3】

ある特定の実施形態において、代替の脂質は、本開示のリン脂質の代わりに使用される。

【0 3 7 4】

ある特定の実施形態において、本発明の代替の脂質は、オレイン酸である。

20

【0 3 7 5】

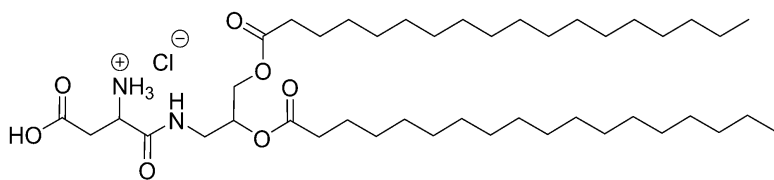
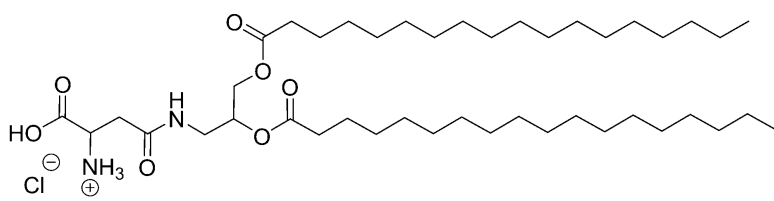
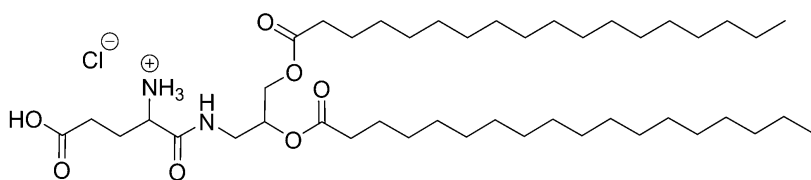
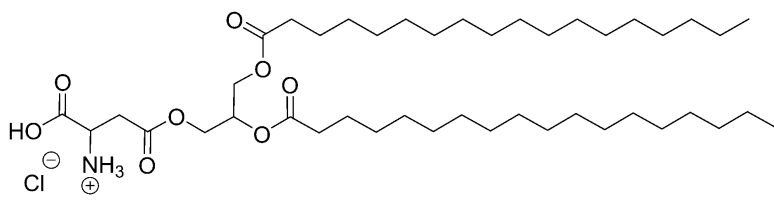
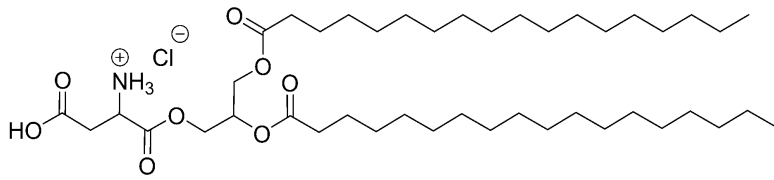
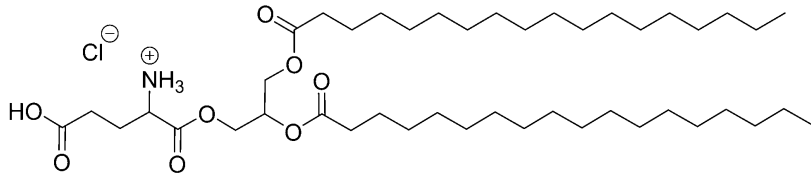
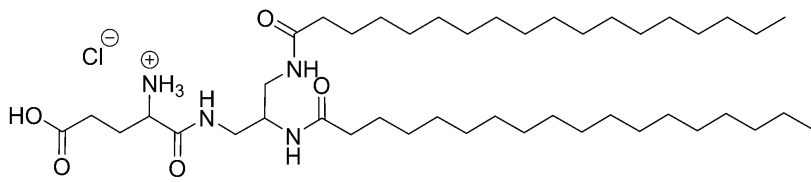
ある特定の実施形態において、代替の脂質は、以下の：

30

40

50

【化 1 4 9】



10

20

30

、及び

40

のうちの1つである。

【0376】

PEG 脂質

本明細書において開示される医薬組成物の脂質組成物は、1つまたは複数のポリエチレングリコール（PEG）脂質を含み得る。

【0377】

本明細書において使用される時、「PEG-脂質」という用語は、ポリエチレングリコール（PEG）修飾脂質を指す。PEG-脂質の非限定例としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン及びPEG修飾ホスファチジン酸、PEG-セラミドコンジュゲ

50

ート（例えばPEG-CerC14またはPEG-CerC20）、PEG修飾アルキルアミン、ならびにPEG修飾1,2-ジアシルオキシプロパン-3-アミンが挙げられる。かかる脂質は、PEG化脂質とも称される。例えば、PEG脂質は、PEG-c-DOMG脂質、PEG-DMG脂質、PEG-DLPE脂質、PEG DMPE脂質、PEG-DPPC脂質、またはPEG-DSPE脂質であり得る。

【0378】

いくつかの実施形態において、PEG-脂質としては、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロールメトキシポリエチレングリコール（PEG-DMG）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[アミノ（ポリエチレングリコール）]（PEG-DSPE）、PEG-disterylグリセロール（PEG-DSG）、PEG-ジパルメトレイル（dipalmetoleyl）、PEG-ジオレイル、PEG-ジステアリル、PEG-ジアシルグリカミド（diacylglycamide）（PEG-DAG）、PEG-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DPPE）、またはPEG-1,2-ジミリスチルオクスルプロピル（dimyristyloxlpropyl）-3-アミン（PEG-c-DMA）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0379】

一実施形態において、PEG-脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される。

【0380】

いくつかの実施形態において、PEG-脂質の脂質部分は、約C14～約C22、好ましくは約C14～約C16の長さを有するものを含む。いくつかの実施形態において、PEG部分（例えばmPEG-NH₂）は、約1000、2000、5000、10,000、15,000、または20,000ダルトンのサイズを有する。一実施形態において、PEG-脂質は、PEG_{2k}-DMGである。

【0381】

一実施形態において、本明細書において記載される脂質ナノ粒子は、非拡散性PEGであるPEG脂質を含み得る。非拡散性PEGの非限定例としては、PEG-DSG及びPEG-DSPEが挙げられる。

【0382】

PEG-脂質は、米国特許第8158601号及び国際公開第WO2015/130584A2号（これらは、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される）において記載されるもの等であり、当技術分野において公知である。

【0383】

概して、本明細書において記載される様々な式の他の脂質構成要素（例えばPEG脂質）のうちのいくつかは、「Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents」と題する、2016年12月10日に出願された国際特許出願第PCT/US2016/000129号（これは、参照することによってその全体が援用される）で記載されるように合成され得る。

【0384】

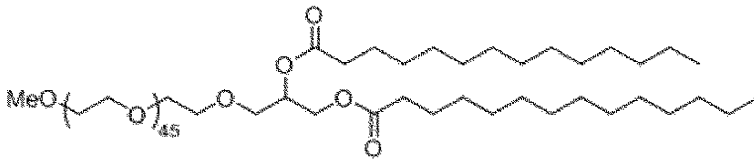
脂質ナノ粒子組成物の脂質構成要素は、ポリエチレングリコールを含む1つまたは複数の分子（PEGまたはPEG修飾脂質等）を含み得る。かかる種は、代替的にPEG化脂質と称され得る。PEG脂質は、ポリエチレングリコールにより修飾される脂質である。PEG脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物を包含する非限定的な群から選択され得る。例えば、PEG脂質は、PEG-c-DOMG脂質、PEG-DMG脂質、PEG-DLPE脂質、PEG DMPE脂質、PEG-DPPC脂質、またはPE

G-D S P E 脂質であり得る。

【0385】

いくつかの実施形態において、P E G 修飾脂質は、P E G D M G の修飾形態である。P E G - D M G は以下の構造：

【化150】



10

を有する。

【0386】

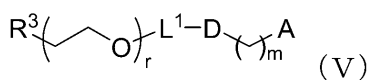
一実施形態において、本発明において有用な P E G 脂質は、国際公開第 W O 2 0 1 2 0 9 9 7 5 5 号（その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）において記載される P E G 化された脂質であり得る。本明細書において記載されるこれらの例示的な P E G 脂質のうちの任意のものは、P E G 鎖上でヒドロキシル基を含むように修飾され得る。ある特定の実施形態において、P E G 脂質は、P E G - O H 脂質である。概して本明細書において定義される時、「P E G - O H 脂質」（本明細書において「ヒドロキシ P E G 化脂質」とも称される）は、脂質上で1つまたは複数のヒドロキシル（-O H）基を有する P E G 化脂質である。ある特定の実施形態において、P E G - O H 脂質は、P E G 鎖上で1つまたは複数のヒドロキシル基を含む。ある特定の実施形態において、P E G - O H 脂質またはヒドロキシ P E G 化脂質は、P E G 鎖の末端で - O H 基を含む。各々の可能性は、本発明の別個の実施形態を表わす。

20

【0387】

ある特定の実施形態において、本発明において有用な P E G 脂質は、式（V）の化合物である。式（V）の化合物：

【化151】



30

またはその塩〔式中、

R³ は、- O R⁰ であり；

R⁰ は、水素、任意選択で置換されたアルキル、または酸素保護基であり；

r は、1 ~ 100 の整数（両端の値を含む）であり；

L¹ は、任意選択で置換された C₁ - 10 アルキレンであり、任意選択で置換された C₁ - 10 アルキレンの少なくとも1つのメチレンは、任意選択で置換されたカルボシクリレン、任意選択で置換されたヘテロシクリレン、任意選択で置換されたアリーレン、任意選択で置換されたヘテロアリーレン、O、N (R^N)、S、C (O)、C (O) N (R^N)、N R^N C (O)、C (O) O、O C (O)、O C (O) O、O C (O) N (R^N)、N R^N C (O) O、または N R^N C (O) N (R^N) により独立して置き換えられ；

40

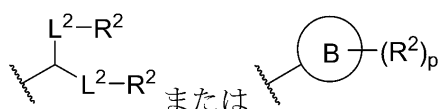
D は、クリックケミストリーによって得られた部分または生理的条件下で切断可能な部分であり；

m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり；

A は、式：

50

【化 1 5 2】



であり；

L^2 の各々の実例は独立して、結合または任意選択で置換された C_{1-6} アルキレンであり、任意選択で置換された C_{1-6} アルキレンの 1 つのメチレン単位は、 O 、 $N(R^N)$ 、 S 、 $C(O)$ 、 $C(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)O$ 、または $NR^N C(O)N(R^N)$ により任意選択で置き換えられ；

R^2 の各々の実例は独立して、任意選択で置換された C_{1-30} アルキル、任意選択で置換された C_{1-30} アルケニル、または任意選択で置換された C_{1-30} アルキニルであり；任意選択で、 R^2 の 1 つまたは複数のメチレン単位は、任意選択で置換されたカルボシクリレン、任意選択で置換されたヘテロシクリレン、任意選択で置換されたアリーレン、任意選択で置換されたヘテロアリーレン、 $N(R^N)$ 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $C(O)N(R^N)$ 、 $-NR^N C(O)$ 、 $NR^N C(O)N(R^N)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)O$ 、 $C(O)S$ 、 $SC(O)$ 、 $-C(=NR^N)$ 、 $C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $C(S)$ 、 $C(S)N(R^N)$ 、 $NR^N C(S)$ 、 $-NR^N C(S)N(R^N)$ 、 $S(O)$ 、 $OS(O)$ 、 $S(O)O$ 、 $OS(O)O$ 、 $OS(O)_2$ 、 $S(O)_2O$ 、 $OS(O)_2O$ 、 $N(R^N)S(O)$ 、 $S(O)N(R^N)$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)$ 、 $OS(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)O$ 、 $S(O)_2$ 、 $N(R^N)S(O)_2$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)$ 、または $N(R^N)S(O)_2O$ により独立して置き換えられ；

R^N の各々の実例は独立して、水素、任意選択で置換されたアルキル、または窒素保護基であり；

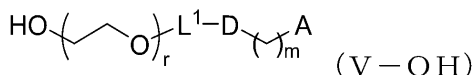
環 B は、任意選択で置換されたカルボシクリル、任意選択で置換されたヘテロシクリル、任意選択で置換されたアリール、または任意選択で置換されたヘテロアリールであり；
 p は、1 または 2 である]

が本明細書において提供される。

【0388】

ある特定の実施形態において、式 (V) の化合物は、PEG-OH 脂質である（すなわち、 R^3 は $-OR^O$ であり、 R^O は水素である）。ある特定の実施形態において、式 (V) の化合物は、式 (V-OH)：

【化 1 5 3】



またはその塩である。

【0389】

ある特定の実施形態において、本発明において有用な PEG 脂質は、PEG 化脂肪酸である。ある特定の実施形態において、本発明において有用な PEG 脂質は、式 (VI) の化合物である。式 (VI) の化合物：

10

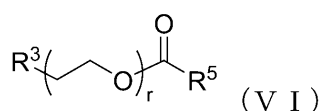
20

30

40

50

【化 1 5 4】



またはその塩〔式中、

R^3 は、 ---OR^0 であり；

R^0 は、水素、任意選択で置換されたアルキル、または酸素保護基であり；

r は、1～100の整数（両端の値を含む）であり；

R^5 は、任意選択で置換された C_{10-40} アルキル、任意選択で置換された C_{10-40} アルケニル、または任意選択で置換された C_{10-40} アルキニルであり； R^5 の任意選択で1つまたは複数のメチレン基は、任意選択で置換されたカルボシクリレン、任意選択で置換されたヘテロシクリレン、任意選択で置換されたアリーレン、任意選択で置換されたヘテロアリーレン、 $N(R^N)$ 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $C(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)$ 、 $NR^N C(O)N(R^N)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)O$ 、 $C(O)S$ 、 $SC(O)$ 、 $C(=NR^N)$ 、 $C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $C(S)$ 、 $C(S)N(R^N)$ 、 $NR^N C(S)$ 、 $NR^N C(S)N(R^N)$ 、 $S(O)$ 、 $OS(O)$ 、 $S(O)O$ 、 $OS(O)O$ 、 $\text{---OS}(O)_2$ 、 $S(O)_2O$ 、 $OS(O)_2O$ 、 $N(R^N)S(O)$ 、 $S(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)N(R^N)$ 、 $OS(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)O$ 、 $S(O)_2$ 、 $N(R^N)S(O)_2$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ 、 $OS(O)_2N(R^N)$ 、または $N(R^N)S(O)_2O$ により置き換えられ；

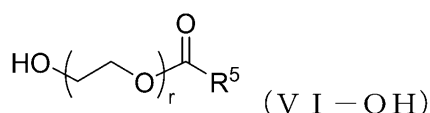
R^N の各々の実例は独立して、水素、任意選択で置換されたアルキル、または窒素保護基である〕

が本明細書において提供される。

【0390】

ある特定の実施形態において、式 (VI) の化合物は、式 (VI-OH)：

【化 1 5 5】

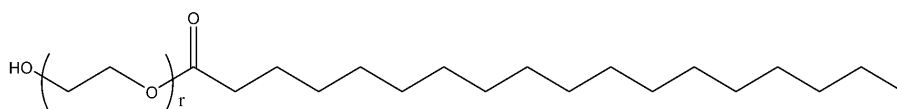


またはその塩である。いくつかの実施形態において、 r は、45である。上記の態様または関連する態様の別のものにおいて、 r が40～50である本発明のPEG脂質が、特色付けられる。

【0391】

さらに他の実施形態において、式 (VI) の化合物は、

【化 1 5 6】

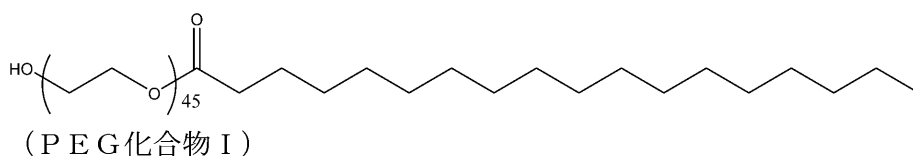


またはその塩である。

【0392】

一実施形態において、式 (VI) の化合物は、

【化 1 5 7】



である。

【0393】

いくつかの態様において、本明細書において開示される医薬組成物の脂質組成物は、PEG-脂質を含まない。

10

【0394】

いくつかの実施形態において、PEG-脂質は、米国出願第62／520，530号において記載されるPEG脂質のうちの1つまたは複数であり得る。

【0395】

いくつかの実施形態において、本発明のPEG脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びその混合物を含む。いくつかの実施形態において、PEG修飾脂質は、PEG-DMG、PEG-c-DOMG (PEG-DOMGとも称される)、PEG-DSG及び／またはPEG-DPGである。

20

【0396】

本明細書において提供されるLNPは、ある特定の実施形態において、PEG脂質を含む既存のLNP製剤と比較して、PEG脱落の増加を呈する。「PEG脱落」は、本明細書において使用される時、PEG基のPEG脂質からの切断を指す。多くの実例において、PEG基のPEG脂質からの切断は、血清駆動性エステラーゼ切断または加水分解を介して起こる。本明細書において提供されるPEG脂質は、ある特定の実施形態において、PEG脱落の速度を制御するようにデザインされている。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%を超えるPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、50%を超えるPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、60%を超えるPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、70%を超えるPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、LNPは、ヒト血清中で約6時間後に、80%を超える脱落を呈する。ある特定の実施形態において、LNPは、ヒト血清中で約6時間後に、90%を超える脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、90%を超えるPEG脱落を呈する。

30

40

【0397】

他の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%未満のPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、60%未満のPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、70%未満のPEG脱落を呈する。ある特定の実施形態において、本明細書において提供されるLNPは、ヒト血清中で約6時間後に、80%未満のPEG脱落を呈する。

【0398】

50

本明細書において提供されるPEG脂質に加えて、LNPは、1つまたは複数の追加の脂質構成要素を含み得る。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、0.15～15%のモル比でLNP中に存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、0.15～5%のモル比で存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、1～5%のモル比で存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、0.15～2%のモル比で存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、1～2%のモル比で存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、およそ1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、または2%のモル比で存在する。ある特定の実施形態において、PEG脂質は、他の脂質に対して、およそ1.5%のモル比で存在する。

10

【0399】

一実施形態において、本明細書において開示される医薬組成物の脂質組成物中のPEG-脂質の量は、約0.1mol%～約5mol%、約0.5mol%～約5mol%、約1mol%～約5mol%、約1.5mol%～約5mol%、約2mol%～約5mol%、約0.1mol%～約4mol%、約0.5mol%～約4mol%、約1mol%～約4mol%、約1.5mol%～約4mol%、約2mol%～約4mol%、約0.1mol%～約3mol%、約0.5mol%～約3mol%、約1mol%～約3mol%、約1.5mol%～約3mol%、約2mol%～約3mol%、約0.1mol%～約2mol%、約0.5mol%～約2mol%、約1mol%～約2mol%、約1.5mol%～約2mol%、約0.1mol%～約1.5mol%、約0.5mol%～約1.5mol%の範囲である。

20

【0400】

一実施形態において、本明細書において開示される脂質組成物中のPEG-脂質の量は、約2mol%である。一実施形態において、本明細書において開示される脂質組成物中のPEG-脂質の量は、約1.5mol%である。

【0401】

一実施形態において、本明細書において開示される脂質組成物中のPEG-脂質の量は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、または5mol%である。

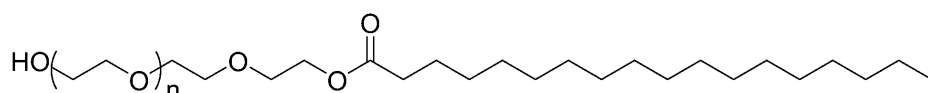
30

【0402】

例示的な合成：

化合物：HO-PEG₂₀₀₀-エステル-C₁₈

【化158】



40

【0403】

炭素担持パラジウム（10重量%、74mg、0.070mmol）を含有する窒素充填されたフラスコへ、ベンジル-PEG₂₀₀₀-エステル-C₁₈（822mg、0.35mmol）及びMeOH（20mL）を添加した。フラスコを、H₂により3回排気及び再充填し、室温及び1気圧のH₂下で12時間攪拌した。混合物をセライトを介して濾過し、DCMによりリンスし、濾液を真空下で濃縮して、所望される生産物（692mg、88%）を得た。この方法論を使用して、n=40～50であった。一実施形態にお

50

いて、もたらされた多分散混合物の n は、平均である 4.5 によって表される。

【0404】

例えば、 r の値は、PEG 脂質内の PEG 部分の分子量に基づいて決定され得る。例えば、2,000 の分子量（例えば PEG 2000）は、およそ 4.5 の n の値に対応する。所与の組成物については、ポリマーは、多くの場合異なるポリマー鎖長の分布として見出されるので、 n の値は、当技術分野で許容される範囲内の値の分布を内包し得る。例えば、かかる高分子化合物の多分散性を理解する当業者であれば、4.5 の n 値（例えば構造式において）が、実際の PEG 含有組成物（例えば DMG-PEG 200-peg 脂質組成物）において 4.0～5.0 の値の分布を表わし得ることを認識するだろう。

【0405】

いくつかの態様において、本明細書において開示される医薬組成物の標的細胞送達脂質は、PEG-脂質を含まない。

【0406】

一実施形態において、本開示の標的細胞送達 LNP は、PEG-脂質を含む。一実施形態において、PEG 脂質は、PEG-DMG ではない。いくつかの態様において、PEG-脂質は、PEG 修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG 修飾ホスファチジン酸、PEG 修飾セラミド、PEG 修飾ジアルキルアミン、PEG 修飾ジアシルグリセロール、PEG 修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの態様において、PEG 脂質は、PEG-c-DMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、及び PEG-DSPC 脂質からなる群から選択される。他の態様において、PEG-脂質は、PEG-DMG である。

【0407】

一実施形態において、本開示の標的細胞送達 LNP は、約 14 よりも、または分岐鎖ならば、約 10 よりも長い鎖長を有する PEG-脂質を含む。

【0408】

本明細書において使用される時、「アルキル」、「アルキル基」、または「アルキレン」という用語は、1つまたは複数の炭素原子（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれを超える炭素原子）を含む直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素であり、任意選択で置換されたものを意味する。「C₁₋₁₄アルキル」という表記は、1～14 の炭素原子を含む任意選択で置換された直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素を意味する。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるアルキル基は、非置換のアルキル基及び置換されたアルキル基の両方を指す。

【0409】

本明細書において使用される時、「アルケニル」、「アルケニル基」、または「アルケニレン」という用語は、2つ以上の炭素原子（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれを超える炭素原子）、及び少なくとも1つの二重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素であり、任意選択で置換されたものを意味する。「C₂₋₁₄アルケニル」という表記は、2～14 の炭素原子及び少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む任意選択で置換された直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルケニル基は、1、2、3、4、またはそれを超える炭素-炭素二重結合を含み得る。例えば、C₁₈アルケニルは、1つまたは複数の二重結合を含み得る。2つの二重結合を含む C₁₈アルケニル基は、リノレイル基であり得る。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるアルケニル基は、非置換のアルケニル基及び置換されたアルケニル基の両方を指す。

【0410】

本明細書において使用される時、「アルキニル」、「アルキニル基」、または「アルキニレン」という用語は、2つ以上の炭素原子（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれを超える炭素原子）、及び少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭

10

20

30

40

50

化水素であり、任意選択で置換されたものを意味する。「C₂₋₁₄アルキニル」という表記は、2～14の炭素原子及び少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む任意選択で置換された直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルキニル基は、1、2、3、4、またはそれを超える炭素-炭素三重結合を含み得る。例えば、C₁₈アルキニルは、1つまたは複数の炭素-炭素三重結合を含み得る。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるアルキニル基は、非置換のアルキニル基及び置換されたアルキニル基の両方を指す。

【0411】

本明細書において使用される時、「炭素環」または「炭素環基」という用語は、1つまたは複数の炭素原子の環を含む任意選択で置換された単環系または多環系を意味する。環は、3員環、4員環、5員環、6員環、7員環、8員環、9員環、10員環、11員環、12員環、13員環、14員環、15員環、16員環、17員環、18員環、19員環、または20員環であり得る。「C₃₋₆炭素環」という表記は、3～6の炭素原子を有する単環を含む炭素環を意味する。炭素環は、1つまたは複数の炭素-炭素二重結合または炭素-炭素三重結合を含んでもよく、非芳香族または芳香族（例えばシクロアルキル基またはアリール基）であり得る。炭素環の例としては、シクロプロピル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、フェニル基、ナフチル基、及び1,2ジヒドロナフチル基が挙げられる。「シクロアルキル」という用語は、本明細書において使用される時、非芳香族炭素環を意味し、任意の二重結合または三重結合を含んでも含まなくてもよい。別段の定めのない限り、本明細書において記載される炭素環は、非置換の炭素環基及び置換された炭素環基（すなわち任意選択で置換された炭素環）を指す。

10

20

【0412】

本明細書において使用される時、「ヘテロ環」または「ヘテロ環基」という用語は、1つまたは複数の環を含み、少なくとも1つの環が少なくとも1つのヘテロ原子を含む、任意選択で置換された単環系または多環系を意味する。ヘテロ原子は、例えば窒素原子、酸素原子、または硫黄原子であり得る。環は、3員環、4員環、5員環、6員環、7員環、8員環、9員環、10員環、11員環、12員環、13員環、または14員環であり得る。ヘテロ環は、1つまたは複数の二重結合または三重結合を含んでもよく、非芳香族または芳香族（例えばヘテロシクロアルキル基またはヘテロアリール基）であり得る。ヘテロ環の例としては、イミダゾリル基、イミダゾリジニル基、オキサゾリル基、オキサゾリジニル基、チアゾリル基、チアゾリジニル基、ピラゾリジニル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリジニル基、イソキサゾリル基、イソチアゾリジニル基、イソチアゾリル基、モルホリニル基、ピロリル基、ピロリジニル基、フリル基、テトラヒドロフラニル基、チオフェニル基、ピリジニル基、ピベリジニル基、キノリル基、及びイソキノリル基が挙げられる。「ヘテロシクロアルキル」という用語は、本明細書において使用される時、非芳香族ヘテロ環を意味し、任意の二重結合または三重結合を含んでも含まなくてもよい。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるヘテロ環は、非置換のヘテロ環基及び置換されたヘテロ環基（すなわち任意選択で置換されたヘテロ環）を指す。

30

【0413】

本明細書において使用される時、「ヘテロアルキル」、「ヘテロアルケニル」、または「ヘテロアルキニル」という用語は、それぞれ、本明細書において定義されるようなアルキル基、アルケニル基、アルキニル基を指し、これらのものは、さらに1つもしくは複数の（例えば1、2、3、または4の）ヘテロ原子（例えば酸素、硫黄、窒素、ホウ素、ケイ素、リン）を含み、当該1つもしくは複数のヘテロ原子は、親炭素鎖内の隣接する炭素原子間に挿入される、及び／または当該1つもしくは複数のヘテロ原子は、炭素原子と親分子との間に（すなわち結合点の間に）挿入される。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、またはヘテロアルキニルは、非置換の及び置換されたヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、またはヘテロアルキニル（すなわち任意選択で置換されたヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、またはヘテロアルキニル）を指す。

40

50

【0414】

本明細書において使用される時、「生体分解基」は、哺乳動物実体中での脂質のより迅速な代謝を促進し得る基である。生体分解基は、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、アリール基、及びヘテロアリール基からなるがこれらに限定されない群から選択され得る。本明細書において使用される時、「アリール基」は、1つまたは複数の芳香族環を含む任意選択で置換された炭素環基である。アリール基の例としては、フェニル基及びナフチル基が挙げられる。本明細書において使用される時、「ヘテロアリール基」は、1つまたは複数の芳香族環を含む任意選択で置換されたヘテロ環基である。ヘテロアリール基の例としては、ピロリル、フリル、チオフェニル、イミダゾリル、オキサゾリル、及びチアゾリルが挙げられる。アリール基及びヘテロアリール基の両方は、任意選択で置換され得る。例えば、M及びM'は、任意選択で置換されたフェニル、オキサゾール、及びチアゾールからなる非限定的な群から選択され得る。本明細書における式において、M及びM'は、上記の生体分解基のリストから独立して選択され得る。別段の定めのない限り、本明細書において記載されるアリール基またはヘテロアリール基は、非置換基及び置換基の両方（すなわち任意選択で置換されたアリール基またはヘテロアリール基）を指す。

10

【0415】

アルキル基、アルケニル基、及びシクリル基（例えばカルボシクリル基及びヘテロシクリル基）は、別段の定めのない限り、任意選択で置換され得る。任意選択の置換基は、ハロゲン原子（例えば塩化物基、臭化物基、フッ化物基、またはヨウ化物基）、カルボン酸（例えば $C(O)OH$ ）、アルコール（例えばヒドロキシル、 OH ）、エステル（例えば $C(O)OR$ 、 $OC(O)R$ ）、アルデヒド（例えば $C(O)H$ ）、カルボニル（ $C(O)R$ 、例えば $C=O$ によって代替的に表わされる）、ハロゲン化アシル（例えば $C(O)X$ 、式中、Xは、臭化物、フッ化物、塩化物、及びヨウ化物から選択されるハロゲン化物である）、炭酸塩（例えば $OC(O)OR$ ）、アルコキシ（例えば OR ）、アセタール（例えば $C(OR)_2R''$ 、式中、各々のORは、同じかまたは異なり得るアルコキシ基であり、 R'' は、アルキル基またはアルケニル基である）、リン酸塩（例えば $P(O)_4^{3-}$ ）、チオール（例えば SH ）、スルホキシド（例えば $S(O)R$ ）、スルフィン酸（例えば $S(O)OH$ ）、スルホン酸（例えば $S(O)_2OH$ ）、チアール（例えば $C(S)H$ ）、硫酸塩（例えば $S(O)_4^{2-}$ ）、スルホニル（例えば $S(O)_2$ ）、アミド（例えば $C(O)NR_2$ または $N(R)C(O)R$ ）、アジド（例えば N_3 ）、ニトロ（例えば NO_2 ）、シアノ（例えば CN ）、イソシアノ（例えば NC ）、アシルオキシ（例えば $OC(O)R$ ）、アミノ（例えば NR_2 、 NRH 、または NH_2 ）、カルバモイル（例えば $OC(O)NR_2$ 、 $OC(O)NRH$ 、または $OC(O)NH_2$ ）、スルホンアミド（例えば $S(O)_2NR_2$ 、 $S(O)_2NRH$ 、 $S(O)_2NH_2$ 、 $N(R)S(O)_2R$ 、 $N(H)S(O)_2R$ 、 $N(R)S(O)_2H$ 、または $N(H)S(O)_2H$ ）、アルキル基、アルケニル基、シクリル（例えばカルボシクリルまたはヘテロシクリル）基からなるがこれらに限定されない群から選択され得る。先行するもののうちの任意のものにおいて、Rは、本明細書において定義されるようなアルキル基またはアルケニル基である。いくつかの実施形態において、置換基それ自体は、例えば1、2、3、4、5、または6つの本明細書において定義される置換基によりさらに置換され得る。例えば、 C_{1-6} アルキル基は、1、2、3、4、5、または6つの本明細書において記載される置換基によりさらに置換され得る。

20

30

40

【0416】

窒素を含有する本開示の化合物は、酸化剤（例えば3-クロロペルオキシ安息香酸（mCPBA）及び／または過酸化水素）による処理によってN-オキシドに変換されて、本開示の他の化合物を与え得る。したがって、示され且つ請求されるすべての窒素含有化合物は、原子価及び構造によって可能にされる場合に、示されるような化合物及びそのN-オキシド誘導体（それは $N \rightarrow O$ または $N+-O-$ として表記され得る）の両方を含むと判

50

断される。さらに、他の実例において、本開示の化合物中の窒素は、N-ヒドロキシ化合物またはN-アルコキシ化合物に変換され得る。例えば、N-ヒドロキシ化合物は、酸化剤（mCPBA等）による親アミンの酸化によって調製され得る。示され且つ請求されるすべての窒素含有化合物は、原子価及び構造によって可能にされる場合に、示されるような化合物ならびにそのN-ヒドロキシ誘導体（すなわちN-OH）及びそのN-アルコキシ誘導体（すなわちN-OR、式中、Rは、置換または非置換のC₁-C₆アルキル、C₁-C₆アルケニル、C₁-C₆アルキニル、3～14員の炭素環、または3～14員のヘテロ環である）の両方もカバーすると判断される。

【0417】

例示的な追加のLNP構成要素

本明細書において開示される医薬組成物の脂質組成物は、上で記載されるものに加えて1つまたは複数の構成要素を含み得る。例えば、脂質組成物は、1つまたは複数の透過性促進物質分子、炭水化物、ポリマー、表面変更剤（例えば界面活性物質）、または他の構成要素を含み得る。例えば、透過性促進物質分子は、米国特許出願公開第2005/0222064号によって記載される分子であり得る。炭水化物は、単糖（例えばグルコース）及び多糖（例えばグリコーゲンならびにその誘導体及び類似体）を含み得る。ポリマーは、本明細書において開示される医薬組成物（例えば脂質ナノ粒子形態での医薬組成物）中に含まれ得る、及び／またはカプセル化もしくは部分的にカプセル化するために使用され得る。

【0418】

ポリマーは、生物分解性及び／または生体適合性であり得る。ポリマーは、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカーバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリウレタン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートから選択され得るがこれらに限定されない。

【0419】

チェックポイントがんワクチンを含むLNP

対象におけるがんの治療のために、T細胞（例えばTエフェクター細胞）の刺激における使用のための、1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成物が、とりわけ本明細書において開示される。別の実施形態において、本発明は、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含むLNPに関する。本開示のLNP組成物を使用して、T細胞をプライミングし、Tエフェクター細胞を刺激及び活性化すること、及び／またはIDO及びPD-L1を過剰発現する免疫抑制性（調節性）免疫細胞及びがん細胞の殺傷をインビボもしくはエキスビボで誘導することができる。

【0420】

一態様において、チェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成物は、(i) イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv) PEG-脂質を含む。

【0421】

一態様において、IDO（例えばIDO1またはIDO2）をコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成物は、(i) イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv) PEG-脂質を含む。

【0422】

一態様において、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまた

10

20

30

40

50

は複数の P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンのポリヌクレオチドを含む L N P 組成物は、(i) イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(i i) ステロールまたは他の構造脂質；(i i i) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(i v) P E G - 脂質を含む。

【 0 4 2 3 】

別の態様において、本開示の L N P 組成物は、対象におけるがんを治療する方法または対象における免疫応答を刺激する方法において使用される。

【 0 4 2 4 】

一態様において、(i) 1 つまたは複数の I D O 抗原性ペプチド及び(i i) 1 つまたは複数の P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含む L N P 組成物は、例えば本明細書において記載される追加の薬剤と共に投与され得る。

【 0 4 2 5 】

併用療法における使用のための L N P 組成物の追加の特色は「治療用の L N P」というタイトルのセクションにおいて提供される。

【 0 4 2 6 】

一実施形態において、脂質組成物とポリヌクレオチド範囲との間の比は、約 1 0 : 1 ~ 約 6 0 : 1 (w t / w t) であり得る。

【 0 4 2 7 】

ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態において、本明細書において開示される医薬組成物は、脂質ナノ粒子 (L N P) として製剤化される。したがって、本開示は、(i) 送達剤 (本明細書において記載される化合物等) を含む脂質組成物、及び(i i) 本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むナノ粒子組成物も提供する。かかるナノ粒子組成物において、本明細書において開示される脂質組成物は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをカプセル化し得る。

【 0 4 2 8 】

ナノ粒子組成物は、典型的にはマイクロメートルのオーダーのサイズ以下であり、脂質二重層を含み得る。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子 (L N P) 、リポソーム (例えば脂質小胞) 、及びリポプレックスを網羅する。例えば、ナノ粒子組成物は、5 0 0 n m 以下の直径を備えた脂質二重層を有するリポソームであり得る。

【 0 4 2 9 】

ナノ粒子組成物としては、例えば脂質ナノ粒子 (L N P) 、リポソーム、及びリポプレックスが挙げられる。いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物は、1 つまたは複数の脂質二重層を含む小胞である。ある特定の実施形態において、ナノ粒子組成物は、水性コンパートメントによって分離された 2 つ以上の同心性の二重層を含む。脂質二重層は、官能化され得る、及び／または互いに架橋され得る。脂質二重層は、1 つまたは複数のリガンド、タンパク質、またはチャンネルを含み得る。

【 0 4 3 0 】

一実施形態において、脂質ナノ粒子は、イオン化可能アミノ脂質、構造脂質、リン脂質、及び m R N A を含む。いくつかの実施形態において、L N P は、イオン化可能アミノ脂質、P E G 修飾脂質、ステロール、及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態において、L N P は、約 4 0 ~ 5 0 % のイオン化可能アミノ脂質；約 5 ~ 1 5 % の構造脂質；約 3 0 ~ 4 5 % のステロール；及び約 1 ~ 5 % の P E G 修飾脂質のモル比を有する。

【 0 4 3 1 】

いくつかの実施形態において、L N P は、0 . 4 未満の多分散値を有する。いくつかの実施形態において、L N P は、中性 p H で正味の中性電荷を有する。いくつかの実施形態において、L N P は、5 0 ~ 1 5 0 n m の平均直径を有する。いくつかの実施形態において、L N P は、8 0 ~ 1 0 0 n m の平均直径を有する。

【 0 4 3 2 】

概して本明細書において定義される時、「脂質」という用語は、疎水性または両親媒性を有する小分子を指す。脂質は、天然に存在し得るかまたは合成であり得る。脂質のクラス例としては、脂肪、ワックス、ステロール含有代謝物質、ビタミン、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質、及びポリケチド、ならびにプレノール脂質が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実例において、いくつかの脂質の両親媒性の特性により、水性溶媒中で、リポソーム、小胞、または膜が形成される。

【0433】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子(LNP)は、イオン化可能アミノ脂質を含み得る。本明細書において使用される時、「イオン化可能アミノ脂質」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、1つまたは複数の荷電部分を含む脂質を指し得る。いくつかの実施形態において、イオン化可能アミノ脂質は、正に荷電または負に荷電し得る。イオン化可能アミノ脂質は正に荷電してもよく、この事例において、「カチオン性脂質」と称され得る。ある特定の実施形態において、イオン化可能アミノ脂質分子はアミン基を含み、イオン化可能アミノ脂質と称され得る。本明細書において使用される時、「荷電部分」は、形式的な電子電荷(例えば一価(+1または-1)、二価(+2または-2)、三価(+3または-3)など)を保有する化学的部分である。荷電部分は、アニオン性(すなわち負に荷電)またはカチオン性(すなわち正に荷電)であり得る。正に荷電した部分の例としては、アミン基(例えば第一級アミン、第二級アミン、及び／または第三級アミン)、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基、及びイミジゾリウム(imidizolum)基が挙げられる。特定の実施形態において、荷電部分は、アミン基を含む。負に荷電した基またはその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、スルフェート基、ホスホネート基、ホスフェート基、ヒドロキシル基、及び同種のもものが挙げられる。荷電部分の電荷は、いくつかの事例において、環境条件により変動し得る(例えばpHの変化は、当該部分の電荷を変更し得る、及び／または当該部分を荷電もしくは非荷電にし得る)。概して、分子の電荷密度は、所望に応じて選択され得る。

【0434】

「荷電した」または「荷電部分」という用語は、分子上の「部分負電荷」または「部分正電荷」を指さないことを理解されたい。「部分負電荷」及び「部分正電荷」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を与えられる。官能基が、極性を持つ結合を含み、電子密度が結合の1つの原子に向かって引き寄せられ、原子上で部分負電荷を生成する場合に、「部分負電荷」がもたらされ得る。当業者であれば、概して、このように極性を持ち得る結合を認識するだろう。

【0435】

イオン化可能アミノ脂質は、時には「イオン化可能カチオン性脂質」と当技術分野において称される。一実施形態において、イオン化可能アミノ脂質は、リンカー構造を介して接続される正に荷電した親水性頭部及び疎水性尾部を有し得る。

【0436】

これらに加えて、イオン化可能アミノ脂質は、環式アミン基を含む脂質でもあり得る。

【0437】

一実施形態において、イオン化可能アミノ脂質は、国際公開第WO2013086354号及び同第WO2013116126号(それらの各々の内容は、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される)において記載されるイオン化可能アミノ脂質から選択され得るがこれらに限定されない。

【0438】

さらに別の実施形態において、イオン化可能アミノ脂質は、米国特許第7,404,969号(その各々は、参照することによってその全体が本明細書に援用される)の式CL I~CL XXXXIIから選択され得るがこれらに限定されない。

【0439】

10

20

30

40

50

一実施形態において、脂質は、国際公開第WO2012170889号（参照することによってその全体が本明細書に援用される）において記載されるもの等の切断可能脂質であり得る。一実施形態において、脂質は、当技術分野において公知の方法、及び／または国際公開第WO2013086354号（その各々の内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）において記載されるような方法によって合成され得る。

【0440】

ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けられ得る。例えば、顕微鏡法（例えば透過電子顕微鏡法または走査電子顕微鏡法）を使用して、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調査することができる。動的光散乱または電位差測定（例えば電位差滴定）を使用して、ゼータ電位を測定することができる。動的光散乱を使用して、粒子サイズも決定することができる。Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) 等の装置も使用して、ナノ粒子組成物の複数の特徴（粒子サイズ、多分散性指数、及びゼータ電位等）を測定することができる。

10

【0441】

ナノ粒子のサイズは、生物学的な反応（炎症等であるがこれらに限定されない）を無効にすることを支援し得るか、またはポリヌクレオチドの生物学的な効果を増加し得る。

【0442】

本明細書において使用される時、「サイズ」または「平均サイズ」は、ナノ粒子組成物の文脈において、ナノ粒子組成物の平均直径を指す。

20

【0443】

一実施形態において、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、約10～約100 nm（約10～約20 nm、約10～約30 nm、約10～約40 nm、約10～約50 nm、約10～約60 nm、約10～約70 nm、約10～約80 nm、約10～約90 nm、約20～約30 nm、約20～約40 nm、約20～約50 nm、約20～約60 nm、約20～約70 nm、約20～約80 nm、約20～約90 nm、約20～約100 nm、約30～約40 nm、約30～約50 nm、約30～約60 nm、約30～約70 nm、約30～約80 nm、約30～約90 nm、約30～約100 nm、約40～約50 nm、約40～約60 nm、約40～約70 nm、約40～約80 nm、約40～約90 nm、約40～約100 nm、約50～約60 nm、約50～約70 nm、約50～約80 nm、約50～約90 nm、約50～約100 nm、約60～約70 nm、約60～約80 nm、約60～約90 nm、約60～約100 nm、約70～約80 nm、約70～約90 nm、約70～約100 nm、約80～約90 nm、約80～約100 nm、及び／または約90～約100 nm等であるがこれらに限定されない）の直径を有する脂質ナノ粒子で製剤化される。

30

【0444】

一実施形態において、ナノ粒子は、約10～500 nmの直径を有する。一実施形態において、ナノ粒子は、100 nm超、150 nm超、200 nm超、250 nm超、300 nm超、350 nm超、400 nm超、450 nm超、500 nm超、550 nm超、600 nm超、650 nm超、700 nm超、750 nm超、800 nm超、850 nm超、900 nm超、950 nm超、または1000 nm超の直径を有する。

40

【0445】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子組成物の最大の寸法は、1 μ mまたはそれ未満（例えば1 μ m、900 nm、800 nm、700 nm、600 nm、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、175 nm、150 nm、125 nm、100 nm、75 nm、50 nm、またはそれ未満）である。

【0446】

ナノ粒子組成物は、比較的均一であり得る。多分散性指数を使用して、ナノ粒子組成物の均一性（例えばナノ粒子組成物の粒子サイズ分布）を示すことができる。小さい（例えば0.3未満）多分散性指数は、概して狭い粒子サイズ分布を示す。ナノ粒子組成物は、

50

約 0 ～ 約 0.25 (0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、または 0.25 等) の多分散性指数を有し得る。いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるナノ粒子組成物の多分散性指数は、約 0.10 ～ 約 0.20 であり得る。

【0447】

ナノ粒子組成物のゼータ電位を使用して、組成物の界面動電位を示すことができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を記載し得る。より高く荷電した種は、細胞、組織、及び身体中の他の要素と所望されずに相互作用し得るので、比較的低い電荷 (正または負の) を備えたナノ粒子組成物が、概して所望される。いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるナノ粒子組成物のゼータ電位は、約 -10 mV ～ 約 +20 mV、約 -10 mV ～ 約 +15 mV、約 10 mV ～ 約 +10 mV、約 -10 mV ～ 約 +5 mV、約 -10 mV ～ 約 0 mV、約 -10 mV ～ 約 -5 mV、約 -5 mV ～ 約 +20 mV、約 -5 mV ～ 約 +15 mV、約 -5 mV ～ 約 +10 mV、約 -5 mV ～ 約 +5 mV、約 -5 mV ～ 約 0 mV、約 0 mV ～ 約 +20 mV、約 0 mV ～ 約 +15 mV、約 0 mV ～ 約 +10 mV、約 0 mV ～ 約 +5 mV、約 +5 mV ～ 約 +20 mV、約 +5 mV ～ 約 +15 mV、または約 +5 mV ～ 約 +10 mV であり得る。

【0448】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約 0 mV ～ 約 100 mV、約 0 mV ～ 約 90 mV、約 0 mV ～ 約 80 mV、約 0 mV ～ 約 70 mV、約 0 mV ～ 約 60 mV、約 0 mV ～ 約 50 mV、約 0 mV ～ 約 40 mV、約 0 mV ～ 約 30 mV、約 0 mV ～ 約 20 mV、約 0 mV ～ 約 10 mV、約 10 mV ～ 約 100 mV、約 10 mV ～ 約 90 mV、約 10 mV ～ 約 80 mV、約 10 mV ～ 約 70 mV、約 10 mV ～ 約 60 mV、約 10 mV ～ 約 50 mV、約 10 mV ～ 約 40 mV、約 10 mV ～ 約 30 mV、約 10 mV ～ 約 20 mV、約 20 mV ～ 約 100 mV、約 20 mV ～ 約 90 mV、約 20 mV ～ 約 80 mV、約 20 mV ～ 約 70 mV、約 20 mV ～ 約 60 mV、約 20 mV ～ 約 50 mV、約 20 mV ～ 約 40 mV、約 20 mV ～ 約 30 mV、約 30 mV ～ 約 100 mV、約 30 mV ～ 約 90 mV、約 30 mV ～ 約 80 mV、約 30 mV ～ 約 70 mV、約 30 mV ～ 約 60 mV、約 30 mV ～ 約 50 mV、約 30 mV ～ 約 40 mV、約 40 mV ～ 約 100 mV、約 40 mV ～ 約 90 mV、約 40 mV ～ 約 80 mV、約 40 mV ～ 約 70 mV、約 40 mV ～ 約 60 mV、及び約 40 mV ～ 約 50 mV であり得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約 10 mV ～ 約 50 mV、約 15 mV ～ 約 45 mV、約 20 mV ～ 約 40 mV、及び約 25 mV ～ 約 35 mV であり得る。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約 10 mV、約 20 mV、約 30 mV、約 40 mV、約 50 mV、約 60 mV、約 70 mV、約 80 mV、約 90 mV、及び約 100 mV であり得る。

【0449】

ポリヌクレオチドの「カプセル化効率」という用語は、提供された最初の量に比べた、調製後にナノ粒子組成物によってカプセル化された、またはそうでなければ当該組成物と会合したポリヌクレオチドの量を記載する。本明細書において使用される時、「カプセル化」は、完全、実質的、または部分的な封入、閉じ込め、包囲、または包み込みを指し得る。

【0450】

カプセル化効率は、望ましくは高い (例えば 100 % 近く)。カプセル化効率は、例えば 1 つまたは複数の有機溶媒またはデタージェントによるナノ粒子組成物の破壊の前後のナノ粒子組成物を含有する溶液中のポリヌクレオチドの量の比較によって測定され得る。

【0451】

蛍光を使用して、溶液中の遊離ポリヌクレオチドの量を測定することができる。本明細書において記載されるナノ粒子組成物について、ポリヌクレオチドのカプセル化効率は、

少なくとも50%（例えば50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%または96%、97%、98%、99%、または100%）である。いくつかの実施形態において、カプセル化効率は、少なくとも80%である。ある特定の実施形態において、カプセル化効率は、少なくとも90%である。

【0452】

本明細書において開示される医薬組成物中に存在するポリヌクレオチドの量は、複数の因子（ポリヌクレオチドのサイズ、所望される標的及び／または適用、あるいはナノ粒子組成物の他の特性等）、そしてポリヌクレオチドの特性に依存し得る。

【0453】

例えば、ナノ粒子組成物中で有用なmRNAの量は、サイズ（長さまたは分子量として表現される）、配列、及びmRNAの他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物中のポリヌクレオチドの相対量も、変動し得る。

【0454】

本開示の脂質ナノ粒子組成物中に存在する脂質組成物及びポリヌクレオチドの相対量は、有効性及び忍容性を考慮して最適化され得る。ポリヌクレオチドとしてmRNAを含む組成物について、N:P比は、有用な測定基準として供され得る。

【0455】

ナノ粒子組成物のN:P比は、発現及び忍容性の両方を制御するので、低いN:P比及び高い発現を備えたナノ粒子組成物が所望される。N:P比は、ナノ粒子組成物中の脂質対RNAの比に従って変動する。

【0456】

概して、より低いN:P比が好ましい。1つまたは複数のRNA、脂質、及びその量は、約2:1～約30:1のN:P比（2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1、20:1、22:1、24:1、26:1、28:1、または30:1等）を提供するように選択され得る。ある特定の実施形態において、N:P比は、約2:1の約8:1であり得る。他の実施形態において、N:P比は、約5:1～約8:1である。ある特定の実施形態において、N:P比は、5:1～6:1である。具体的な一態様において、N:P比は、約5.67:1である。

【0457】

ナノ粒子組成物の提供に加えて、本開示は、ポリヌクレオチドをカプセル化することを含む脂質ナノ粒子を産生する方法も提供する。かかる方法は、本明細書において開示される医薬組成物のうちの任意のものを使用すること、及び当技術分野において公知の脂質ナノ粒子の産生の方法に従って脂質ナノ粒子を産生することを含む。例えばWang et al. (2015) "Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles" Adv. Drug Deliv. Rev. 87:68-80; Silva et al. (2015) "Delivery Systems for Biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticles" Curr. Pharm. Technol. 16:940-954; Naseri et al. (2015) "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application" Adv. Pharm. Bull. 5:305-13; Silva et al. (2015) "Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals" Curr. Pharm. Biotechnol. 16:291-302、及びその中で引用される参考文献を参照されたい。

【0458】

いくつかの実施形態において、脂質組成物とポリヌクレオチドとの間での比は、約10

10

20

30

40

50

： 1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18
 ： 1、19：1、20：1、21：1、22：1、23：1、24：1、25：1、26
 ： 1、27：1、28：1、29：1、30：1、31：1、32：1、33：1、34
 ： 1、35：1、36：1、37：1、38：1、39：1、40：1、41：1、42
 ： 1、43：1、44：1、45：1、46：1、47：1、48：1、49：1、50
 ： 1、51：1、52：1、53：1、54：1、55：1、56：1、57：1、58
 ： 1、59：1、または60：1（wt／wt）であり得る。いくつかの実施形態におい
 て、脂質組成物対治療剤をコードするポリヌクレオチドのwt／wt比は、約20：1ま
 たは約15：1である。

【0459】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示される医薬組成物は、2つ以上の
 ポリペプチドを含有し得る。例えば、本明細書において開示される医薬組成物は、2つ以
 上のポリヌクレオチド（例えばRNA、例えばmRNA）を含有し得る。

【0460】

一実施形態において、本明細書において記載される脂質ナノ粒子は、ポリヌクレオチド
 （例えばmRNA）を、脂質：ポリヌクレオチドが、5：1、10：1、15：1、20
 ：1、25：1、30：1、35：1、40：1、45：1、50：1、55：1、60
 ：1、もしくは70：1の重量比、またはこれらの比の範囲もしくは任意のもの（5：1
 ～約10：1、約5：1～約15：1、約5：1～約20：1、約5：1～約25：1、
 約5：1～約30：1、約5：1～約35：1、約5：1～約40：1、約5：1～約4
 5：1、約5：1～約50：1、約5：1～約55：1、約5：1～約60：1、約5：1
 ～約70：1、約10：1～約15：1、約10：1～約20：1、約10：1～約2
 5：1、約10：1～約30：1、約10：1～約35：1、約10：1～約40：1、
 約10：1～約45：1、約10：1～約50：1、約10：1～約55：1、約10：1
 ～約60：1、約10：1～約70：1、約15：1～約20：1、約15：1～約2
 5：1、約15：1～約30：1、約15：1～約35：1、約15：1～約40：1、約
 15：1～約45：1、約15：1～約50：1、約15：1～約55：1、約15：1
 ～約60：1、または約15：1～約70：1等であるがこれらに限定されない）で含み
 得る。

【0461】

一実施形態において、本明細書において記載される脂質ナノ粒子は、およそ0.1mg
 ／ml～2mg／ml（0.1mg／ml 0.2mg／ml 0.3mg／ml 0.4
 mg／ml（0.5mg／ml）、0.6mg／ml、0.7mg／ml、0.8mg／
 ml、0.9mg／ml、1.0mg／ml、1.1mg／ml、1.2mg／ml、1
 .3mg／ml、1.4mg／ml、1.5mg／ml、1.6mg／ml、1.7mg
 ／ml、1.8mg／ml、1.9mg／ml、2.0mg／ml、または2.0mg／
 ml超等であるがこれらに限定されない）の濃度でポリヌクレオチドを含み得る。

【0462】

チェックポイントがんワクチンを含むLNP組成物を使用する方法

一態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される方法に従って、対象に
 おけるがんの治療において、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）
 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジ
 ュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含む
 ポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えば本明細書において
 記載されるLNP組成物）を提供する。

【0463】

別の態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される方法に従って、対象
 において免疫応答を刺激するために、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び
 （ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複
 数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNA

10

20

30

40

50

Aを含むポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えば本明細書において記載されるLNP組成物）を提供する。

【0464】

別の態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される方法に従って、例えば対象においてエフェクターT細胞を刺激して、IDOまたはPD-L1を発現する腫瘍細胞を標的化及び殺傷するために、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えばLNP本明細書において記載される組成物）を提供する。

【0465】

別の態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される方法に従って、T細胞（例えばTEフェクター細胞）を刺激するために、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列、またはそれらの組み合わせを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えば本明細書において記載されるLNP組成物）を提供する。

【0466】

別の態様において、本開示は、例えば本明細書において記載される方法に従って、ワクチン活性化T細胞によるT細胞媒介性の腫瘍細胞の殺傷を誘導するために、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えば本明細書において記載されるLNP組成物）を提供する。

【0467】

別の態様において、本開示は、対象におけるがんの治療において使用するために、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む組成物（例えば本明細書において記載されるLNP組成物）を提供する。

【0468】

関連する態様において、対象においてがんを治療する方法であって、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドを含む有効量の脂質ナノ粒子（LNP）（例えばLNP本明細書において記載される組成物）を、対象へ投与することを含む、该方法が本明細書において提供される。

【0469】

本明細書において開示される方法のうちの任意の複数の実施形態において、LNPの投与は、例えば本明細書において記載されるアッセイによって測定されるように、例えば本明細書において記載されるように、対象におけるがんの進行の軽快または遅延をもたらす。複数の実施形態において、疾患進行の軽快または遅延は、他の点では類似の対象（例えば（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド、ならびに任意選択で1つまたは複数のアジュバントアミノ酸配列を含むチェックポイントがんワクチンを含むLNP組成物と接触させられてない対象）における疾患進行に比較される。

【0470】

複数の実施形態において、がんの進行における遅延は、少なくとも1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、1

10

20

30

40

50

0 か月、11 か月、12 か月、1.5 年、2 年、3 年、4 年、または 5 年以上の遅延である。

【0471】

いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンは、標的抗原を発現する抑制性免疫細胞及び腫瘍細胞を標的化及び殺傷するエフェクター T 細胞を刺激する。したがっていくつかの実施形態において、IDO 及び PD-L1 特異的な T 細胞は、IDO 及び PD-L1 を過剰発現する免疫抑制性（調節性）免疫細胞及びがん細胞を殺傷する。いくつかの実施形態において、治療は、ワクチン活性化 T 細胞による追加の腫瘍殺傷をもたらす。更に、いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンの投与は、T 細胞プライミングをもたらす、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞による追加の腫瘍関連抗原の認識及び腫瘍殺傷増加を導く。理論に拘束されることを望むものではないが、全身性の PD-1 / PD-L1 遮断は、効果をさらに増幅し、さらなる免疫活性化及び優れた疾患制御を導き得る。

10

【0472】

一実施形態において、がんは、固形腫瘍であり、例えば局所進行性または転移性の固形腫瘍である。一実施形態において、がんは、メラノーマである。一実施形態において、メラノーマは、皮膚メラノーマである。一実施形態において、皮膚メラノーマは、1L 皮膚メラノーマステージ IIIIB+ である。一実施形態において、がんは、NSCLC である。一実施形態において、NSCLC は、1L NSCLC である。一実施形態において、がんは、膀胱癌である。いくつかの実施形態において、膀胱癌は、筋層非浸潤性膀胱癌である。一実施形態において、がんは、頭頸部癌である。いくつかの実施形態において、頭頸部癌は、頭頸部扁平上皮癌である。一実施形態において、がんは、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、結腸直腸癌は、マイクロサテライト安定結腸直腸癌である。一実施形態において、がんは、基底細胞癌である。一実施形態において、がんは、乳癌である。いくつかの実施形態において、乳癌は、トリプルネガティブ乳癌である。

20

【0473】

LNP 投薬及び投薬レジメン

いくつかの実施形態において、本明細書において開示される LNP のうちの任意のものは、例えば本明細書において記載される投薬間隔に従って投与され得る。いくつかの実施形態において、投薬間隔は、LNP 組成物の初回用量、及び同じ LNP 組成物の 1 つまたは複数の後続する用量（例えば 1～50 用量、5～50 用量、10～50 用量、15～50 用量、20～50 用量、25～50 用量、30～50 用量、35～50 用量、40～50 用量、45～50 用量、1～45 用量、1～40 用量、1～35 用量、1～30 用量、1～25 用量、1～20 用量、1～15 用量、1～10 用量、1～5 用量）を含む。

30

【0474】

いくつかの実施形態において、投薬間隔は、LNP 組成物の 1 つまたは複数の用量及び追加の薬剤の 1 つまたは複数の用量を含む。

【0475】

いくつかの実施形態において、投薬間隔は、少なくとも 1 週間、2 週間、3 週間、または 4 週間にわたって遂行される。

40

【0476】

いくつかの実施形態において、投薬間隔は、サイクル（例えば 7 日間のサイクル）を含む。いくつかの実施形態において、サイクルは、3 週間（例えば 21 日間）を含む。

【0477】

いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、1 つまたは複数のサイクルで 3 週間毎に 1 回投与される。いくつかの実施形態において、投薬レジメンは、2 つのサイクル、3 つのサイクル、4 つのサイクル、5 つのサイクル、6 つのサイクル、7 つのサイクル、8 つのサイクル、または 9 つのサイクルを含む。

【0478】

いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、約 50 µg ～ 約 1 mg、例えば約 10

50

0 μg～約1mg、約200 μg～約900 μg、約300 μg～約800 μg、約400 μg～約700 μg、約500 μg～約600 μg、約200 μg～約1mg、約300 μg～約1mg、約400 μg～約1mg、約500 μg～約1mg、約600 μg～約1mg、約700 μg～約1mg、約800 μg～約1mg、約900 μg～約1mg、約100 μg～約900 μg、約100 μg～約800 μg、約100 μg～約700 μg、約100 μg～約600 μg、約100 μg～約500 μg、約100 μg～約400 μg、約100 μg～約300 μg、約100 μg～約200 μg、約200 μg～約400 μg、約300 μg～約500 μg、約400 μg～約600 μg、約500 μg～約700 μg、約600 μg～約800 μg、または約700 μg～約900 μgの用量で対象へ投与される。

10

【0479】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約100 μg～約200 μg、約200 μg～約300 μg、約300 μg～約400 μg、約400 μg～約500 μg、約500 μg～約600 μg、約600 μg～約700 μg、約700 μg～約800 μg、約800 μg～約900 μg、または約900 μg～約1mgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、約50 μg～約150 μg、約150 μg～約250 μg、約250 μg～約350 μg、約350 μg～約450 μg、約450 μg～約550 μg、約550 μg～約650 μg、約650 μg～約750 μg、約750 μg～約850 μg、約850 μg～約950 μg、または約950 μg～約1mgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、用量約100 μg、約200 μg、約300 μg、約400 μg、約500 μg、約600 μg、約700 μg、約800 μg、約900 μg、または約1mgで投与される。

20

【0480】

本明細書において開示されるLNP組成物のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、LNP組成物は、1kgあたり約0.1～10mg、1kgあたり約0.1～9.5mg、1kgあたり約0.1～9mg、1kgあたり約0.1～8.5mg、1kgあたり約0.1～8mg、1kgあたり約0.1～7.5mg、1kgあたり約0.1～7mg、1kgあたり約0.1～6.5mg、1kgあたり約0.1～6mg、1kgあたり約0.1～5.5mg、1kgあたり約0.1～5mg、1kgあたり約0.1～4.5mg、1kgあたり約0.1～4mg、1kgあたり約0.1～3.5mg、1kgあたり約0.1～3mg、1kgあたり約0.1～2.5mg、1kgあたり約0.1～2mg、1kgあたり約0.1～1.5mg、1kgあたり約0.1～1mg、1kgあたり約0.1～0.9mg、1kgあたり約0.1～0.8mg、1kgあたり約0.1～0.7mg、1kgあたり約0.1～0.6mg、または1kgあたり約0.1～0.5mgの用量（例えば全用量）で投与される。

30

【0481】

本明細書において開示されるLNP組成物のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、LNP組成物は、1kgあたり約0.2～10mg、1kgあたり約0.3～10mg、1kgあたり約0.4～10mg、1kgあたり約0.5～10mg、1kgあたり約0.6～10mg、1kgあたり約0.7～10mg、1kgあたり約0.8～10mg、1kgあたり約0.9～10mg、1kgあたり約1～10mg、1kgあたり約1.5～10mg、1kgあたり約2～10mg、1kgあたり約2.5～10mg、1kgあたり約3～10mg、1kgあたり約3.5～10mg、1kgあたり約4～10mg、1kgあたり約4.5～10mg、1kgあたり約5～10mg、1kgあたり約5.5～10mg、1kgあたり約6～10mg、1kgあたり約6.5～10mg、1kgあたり約7～10mg、1kgあたり約7.5～10mg、1kgあたり約8～10mg、1kgあたり約8.5～10mg、1kgあたり約9～10mg、または1kgあたり約9.5～10mgの用量（例えば全用量）で投与される。

40

【0482】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるLNPのうちの任意のもの

50

は、筋肉内（IM）投与される。

【0483】

疾患及び障害

本明細書において開示される治療の方法または使用のための組成物のうちの任意のものの一実施形態において、対象は、がんを有するか、または有すると同定される。一実施形態において、本明細書において開示されるLNPは、がんの症状を治療または軽快させるために対象へ投与される。一実施形態において、本明細書において開示されるLNPは、対象における免疫応答を刺激するために対象へ投与される。

【0484】

一実施形態において、がんは、固形腫瘍（例えば局所進行性または転移性の固形腫瘍）である。一実施形態において、がんは、メラノーマである。いくつかの実施形態において、メラノーマは、皮膚メラノーマである。いくつかの実施形態において、皮膚メラノーマは、1L皮膚メラノーマステージIIIB+である。一実施形態において、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態において、NSCLCは、1L NSCLCである。一実施形態において、がんは、膀胱癌である。いくつかの実施形態において、膀胱癌は、筋層非浸潤性膀胱癌である。一実施形態において、がんは、頭頸部癌である。いくつかの実施形態において、頭頸部癌は、頭頸部扁平上皮癌である。一実施形態において、がんは、結腸直腸癌である。いくつかの実施形態において、結腸直腸癌は、マイクロサテライト安定結腸直腸癌である。一実施形態において、がんは、基底細胞癌である。一実施形態において、がんは、乳癌である。いくつかの実施形態において、乳癌は、トリプルネガティブ乳癌である。

【0485】

一実施形態において、対象は、哺乳動物（例えばヒト）である。

【0486】

さらなる併用療法

いくつかの実施形態において、本明細書において開示される治療の方法または使用のための組成物は、追加の薬剤と併用して、本明細書において開示されるLNPを投与することを含む。一実施形態において、追加の薬剤は、疾患または障害（例えば自己免疫疾患）のための標準的な医療である。一実施形態において、追加の薬剤は、mRNAである。

【0487】

いくつかの態様において、本方法または組成物のための対象は、1つまたは複数の標準的な医療の治療法により治療されている。他の態様において、本方法または組成物のための対象は、1つまたは複数の標準的な医療の治療法に応答性ではなかった。

【0488】

例えば、チェックポイント阻害物質（抗PD1抗体または抗CTLA4抗体等）は、対象へ追加で投与される。いくつかの実施形態において、抗PD-1抗体は、ペムブロリズマブである。

【0489】

併用療法の投薬量は、当業者によって決定され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-1抗体（例えばペムブロリズマブ）は、例えば合計で24週間にわたって、用量200mgで3週間毎に1回（または400mgで6週間毎に1回）、対象へ投与される（例えば静脈内投与によって）。いくつかの実施形態において、抗PD-1抗体（例えばペムブロリズマブ）は、用量400mgで6週間毎に1回（例えば3週間おきのサイクルの1日目、例えばサイクル1、サイクル3、サイクル5、サイクル7、及びサイクル9の1日目）、対象へ投与される（例えば静脈内投与によって）。

【0490】

いくつかの実施形態において、追加療法は、LNP組成物と同時に（例えば同じ日に）患者へ投与される。いくつかの実施形態において、追加療法は、LNP組成物とは分離して投与される（例えば分離した日に投与される）。

【0491】

配列最適化及びその方法

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、(i) 1つまたは複数の I D O 抗原性ペプチド及び (i i) 1つまたは複数の P D - L 1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする配列最適化ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、1つまたは複数の I D O 抗原性ペプチド及び 1つまたは複数の P D - L 1 抗原性ペプチドをコードするオープンリーディングフレーム (O R F) を含み、O R F は配列最適化されている。

【0492】

本明細書において開示される配列最適化ヌクレオチド配列は、対応する野生型ヌクレオチド酸配列及び他の公知の配列最適化ヌクレオチド配列とは異なり、例えばこれらの配列最適化核酸は、ユニークな組成の特徴を有する。

10

【0493】

いくつかの実施形態において、配列最適化ヌクレオチド配列（例えばチェックポイントがんワクチンをコードする）中のウラシルまたはチミンの核酸塩基パーセンテージは、参照の野生型ヌクレオチド配列中のウラシルまたはチミンの核酸塩基パーセンテージに関して修飾される（例えば低減される）。かかる配列は、ウラシル修飾配列またはチミン修飾配列と称される。ヌクレオチド配列中のウラシルまたはチミンの含有量のパーセンテージは、配列中のウラシルまたはチミンの数をヌクレオチドの総数によって割り、100を掛けることによって決定され得る。いくつかの実施形態において、配列最適化ヌクレオチド配列は、参照野生型配列中のウラシルまたはチミンの含有量よりも低いウラシルまたはチミンの含有量を有する。いくつかの実施形態において、本開示の配列最適化ヌクレオチド配列中のウラシルまたはチミンの含有量は、参照野生型配列中のウラシルまたはチミンの含有量を超えても、参照野生型配列に比較した場合に、有益な効果（例えば発現及び／またはシグナリング応答の増加）を依然として維持する。

20

【0494】

いくつかの実施形態において、本開示の最適化配列は、配列中でウラシルまたはチミン（DNAであるならば）のユニークな範囲を含有する。最適化配列のウラシルまたはチミンの含有量は、様々な手法において表現され得、例えば理論上の最小値に比した（% U T Mまたは% T T M）、野生型に比した（% U W Tまたは% T W T）、及び合計のヌクレオチド含有量に比した（% U T Lまたは% T T L）、最適化配列のウラシルまたはチミンの含有量である。DNAについては、チミンはウラシルの代わりに存在し、Uが現われるところでは、Tを置換するだろうことが認識される。したがって、例えばRNAに関する% U T M、% U W T、または% U T Lに関連するすべての開示は、DNAに関する% T T M、% T W T、または% T T Lへ等しく適用可能である。

30

【0495】

ウラシルまたはチミンの理論上の最小値に比したウラシルまたはチミンの含有量は、配列最適化ヌクレオチド配列中のウラシルまたはチミンの数を、仮想ヌクレオチド配列（仮想配列中のすべてのコドンは、可能な限り低いウラシルまたはチミンの含有量を有する同義コドンにより置き換えられる）中のウラシルまたはチミンの総数によって割り、100を掛けることによって決定されるパラメーターを指す。このパラメーターは、% U T Mまたは% T T Mとして本明細書において略称される。

40

【0496】

いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、対応する野生型核酸配列に対して低減した数の連続ウラシルを有する。例えば、2つの連続ロイシンは、配列 C U U U U Gによってコードされ得、それは4つのウラシルクラスターを含む。かかるサブ配列は、例えば C U G C U Cにより置換され得、それはウラシルクラスターを除去する。フェニルアラニンは、U U CまたはU U Uによってコードされ得る。したがって、たとえU U UによってコードされるフェニルアラニンがU U Cによって置き換えられても、同義コドンは依然としてウラシルペア (U U) を含有する。したがって、配列中のフェニルアラニンの数は、コードされるポリペプチド中の

50

フェニルアラニンの数の変更無しに除去され得ないウラシルペア（UU）の最小数を確立する。

【0497】

いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、野生型核酸配列に対して低減した数のウラシルトリプレット（UUU）を有する。いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、野生型核酸配列中のウラシルペア（UU）の数に対して低減した数のウラシルペア（UU）を有する。いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、野生型核酸配列中のウラシルペア（UU）の可能な最小数に対応する数のウラシルペア（UU）を有する。

10

【0498】

「野生型核酸配列中のウラシルペア（UU）に比したウラシルペア（UU）」という語句は、配列最適化ヌクレオチド配列中のウラシルペア（UU）の数を、対応する野生型ヌクレオチド配列中のウラシルペア（UU）の総数によって割り、100を掛けることによって決定されるパラメーターを指す。このパラメーターは、%UUwtとして本明細書において略称される。いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、100%未満の%UUwtを有する。

【0499】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、本明細書において開示されるチェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列を含む。いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列は、少なくとも1つの化学的に修飾された核酸塩基（例えば5-メトキシウラシル）を含む。いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列中の核酸塩基（例えばウラシル）のうちの少なくとも95%は、修飾された核酸塩基である。いくつかの実施形態において、チェックポイントがんワクチンをコードするウラシル修飾配列中のウラシルのうちの少なくとも95%は、5-メトキシウラシルである。いくつかの実施形態において、ウラシル修飾配列を含むポリヌクレオチドは、miRNA結合部位（例えばmiR-122へ結合するmiRNA結合部位）をさらに含む。いくつかの実施形態において、ウラシル修飾配列を含むポリヌクレオチドは、送達剤（例えば式（I）を有する化合物、例えば化合物番号18、25、301、または357のうちの任意のもの）と共に製剤化される。

20

30

【0500】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えばチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列（例えば野生型配列、その機能的断片、またはバリエーション）を含むポリヌクレオチド）は、配列最適化される。

【0501】

配列最適化ヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列は、本明細書において「核酸」とも称される）は、参照配列（例えばチェックポイントがんワクチンをコードする野生型配列）に対して少なくとも1つのコドン修飾を含む。したがって、配列最適化核酸中で、少なくとも1つのコドンが、参照配列（例えば野生型配列）中の対応するコドンとは異なる。

40

【0502】

概して、配列最適化核酸は、少なくとも参照配列中のコドンを同義コドン（すなわち同じアミノ酸をコードするコドン）により置換することを含むステップによって生成される。かかる置換は、例えばコドン置換マップ（すなわちコドン最適化配列中の各々のアミノ酸をコードするコドンを提供する表）を適用することによって、または1セットのルール（例えばグリシンが中性アミノ酸の隣にあるならば、グリシンはある特定のコドンによってコードされるが、それが極性アミノ酸の隣にあるならば、それが別のコドンによってコードされる）の適用によって、達成され得る。コドン置換（すなわち「コドン最適化」）に加えて、本明細書において開示される配列最適化手法は、有害なモチーフの除去（不安定化モチーフの置換）等のコドン最適化を厳密に指向するものではない、追加の最適化ス

50

テップを含む。

【0503】

配列最適化の追加及び例示的な方法は、2017年5月18日上に出願された国際PCT出願WO2017/201325（その内容全体は参照することによって本明細書に援用される）において開示される。

【0504】

マイクロRNA（miRNA）結合部位

本発明のポリヌクレオチドは調節エレメント（例えばマイクロRNA（miRNA）結合部位、転写因子結合部位、構造化mRNA配列及び／またはモチーフ、内因性核酸結合分子のための擬似受容体として作用するように操作された人工結合部位、ならびにそれらの組み合わせ）を含み得る。いくつかの実施形態において、かかる調節エレメントを含むポリヌクレオチドは、「センサー配列」を含むと称される。

【0505】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド（例えばリボ核酸（RNA）、例えばメッセンジャーRNA（mRNA））は、関心のあるポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含み、1つまたは複数のmiRNA結合部位（複数可）をさらに含む。miRNA結合部位（複数可）の組み入れまたは取り込みは、天然に存在するmiRNAの組織特異的及び／または細胞型特異的発現に基づいた、本発明のポリヌクレオチドの調節、及び次にはそれからコードされるポリペプチドの調節を提供する。

【0506】

本発明は、上で記載されるポリヌクレオチドのうちの任意のものを含む医薬組成物及び製剤も提供する。いくつかの実施形態において、組成物または製剤は、さらに送薬剤を含む。

【0507】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドをコードする組成物または製剤は、本明細書において開示される配列最適化核酸配列を含むポリヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態において、組成物または製剤は、ポリペプチドをコードする本明細書において開示される配列最適化核酸配列へ有意な配列同一性を有するポリヌクレオチド（例えばORF）を含むポリヌクレオチド（例えばRNA、例えばmRNA）を含有し得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、miRNA結合部位（例えば結合するmiRNA結合部位）をさらに含む。

【0508】

miRNA（例えば天然に存在するmiRNA）は、ポリヌクレオチドへ結合し、安定性の低減によって、またはポリヌクレオチドの翻訳の阻害によって、遺伝子発現を下方制御する19～25ヌクレオチド長の非コーディングRNAである。miRNA配列は、「シード」領域（すなわち成熟miRNAの位置2～8の領域中の配列）を含む。miRNAシードは、成熟miRNAの位置2～8または2～7を含み得る。

【0509】

マイクロRNAは、RNA転写物の領域から酵素的に得られ、当該領域は、それ自体の上に折り畳まれて、多くの場合プレmiRNA（前駆体miRNA）と称される短ヘアピン構造を形成する。プレmiRNAは、典型的には、その3'端で2つのヌクレオチドオーバーハングを有し、3'ヒドロキシル基及び5'リン酸基を有する。この前駆体mRNAは、核中でプロセッシングされ、後続して細胞質へ輸送され、そこで、DICER（RNAse III酵素）によってさらにプロセッシングされて、およそ22ヌクレオチドの成熟マイクロRNAを形成する。次いで成熟マイクロRNAは、リボ核粒子の中へ取り込まれて、遺伝子サイレンシングを媒介するRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を形成する。成熟miRNAについて当技術分野で認識されている命名法は、典型的には、成熟miRNAが由来するプレmiRNAのアームを指定し、「5p」は、マイクロRNAがプレmiRNAヘアピンの5'アームからであることを意味し、「3p」は、マイクロ

RNAがプレmiRNAヘアピンの3'端からであることを意味する。本明細書において数字によって参照されるmiRは、同じプレmiRNAの反対のアームを起源とする2つの成熟マイクロRNAのいずれか（例えば3pマイクロRNAまたは5pマイクロRNAのいずれか）を指し得る。本明細書において参照されるすべてのmiRは、3pまたは5pの指定によって特に規定されないならば、3p及び5pの両方のアーム／配列を含むことが意図される。

【0510】

本明細書において使用される時、「マイクロRNA（miRNAまたはmiR）結合部位」という用語は、ポリヌクレオチド内の（例えばDNA内のまたはRNA転写物内の、5'UTR及び／または3'UTR中を包含する）配列を指し、当該配列は、miRNAと相互作用するか、それと会合するか、またはそれへ結合するために、miRNAのすべてまたは領域へ十分な相補性を有する。いくつかの実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするORFを含む本発明のポリヌクレオチドは、1つまたは複数のmiRNA結合部位（複数可）をさらに含む。例示的な実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばリボ核酸（RNA）、例えばメッセンジャーRNA（mRNA））の5'UTR及び／または3'UTRは、1つまたは複数のmiRNA結合部位（複数可）を含む。

【0511】

miRNAへの十分な相補性を有するmiRNA結合部位は、ポリヌクレオチドのmiRNA媒介性調節（例えばポリヌクレオチドのmiRNA媒介性翻訳抑制または分解）を助長するのに十分な相補性の程度を表す。本発明の例示的な態様において、miRNAへの十分な相補性を有するmiRNA結合部位は、ポリヌクレオチドのmiRNA媒介性分解（例えばmiRNAガイドRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）媒介性のmRNAの切断）を助長するのに十分な相補性の程度を表す。miRNA結合部位は、例えば19～25ヌクレオチド長のmiRNA配列へ、19～23ヌクレオチド長のmiRNA配列、または22ヌクレオチド長のmiRNA配列へ相補性を有し得る。miRNA結合部位は、miRNAの一部のみへ（例えば天然に存在するmiRNA配列の全長のうちの1、2、3、もしくは4ヌクレオチド未満の一部へ、または天然に存在するmiRNA配列よりも1、2、3、もしくは4ヌクレオチド未満短い一部分へ）相補的であり得る。所望される調節がmRNA分解である場合に、十分な（full）または完全な（complete）相補性（例えば天然に存在するmiRNAの長さのすべてまたは有意な一部分にわたって、十分な相補性または完全な相補性）が、好ましい。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miRNAシード配列と相補性（例えば部分的または完全な相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miRNAシード配列と完全な相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miRNA配列と相補性（例えば部分的または完全な相補性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miRNA配列と完全な相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、1、2、もしくは3つのヌクレオチド置換、末端付加、及び／または短縮を除いて、miRNA配列と完全な相補性を有する。

【0512】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、対応するmiRNAと同じ長さである。他の実施形態において、miRNA結合部位は、5'末端、3'末端、または両方での対応するmiRNAよりも、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヌクレオチド（複数可）短い。さらに他の実施形態において、マイクロRNAの結合部位は、5'末端、3'末端、または両方での対応するマイクロRNAよりも、2ヌクレオチド短い。対応するmiRNAよりも短いmiRNA結合部位は、依然として、1つまたは複数のmiRNA結合部位を取り込むmRNAを分解することまたはmRNAの翻訳を防止することが可能である。

【0513】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、ダイサーを含有する活性のある

RISCの一部である対応する成熟miRNAに結合する。別の実施形態において、miRNA結合部位のRISC中の対応するmiRNAへの結合は、miRNA結合部位を含有するmRNAを分解するか、またはmRNAが翻訳されることを防止する。いくつかの実施形態において、miRNAを含むRISC複合体が、miRNA結合部位を含むポリヌクレオチドを切断するように、miRNA結合部位は、miRNAへの十分な相補性を有する。他の実施形態において、miRNAを含むRISC複合体が、miRNA結合部位を含むポリヌクレオチドにおいて不安定性を誘導するように、miRNA結合部位は、miRNAへの不完全な相補性を有する。別の実施形態において、miRNAを含むRISC複合体が、miRNA結合部位を含むポリヌクレオチドにおいて転写を抑制するように、miRNA結合部位は、miRNAへの不完全な相補性を有する。

10

【0514】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、対応するmiRNAからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のミスマッチ（複数可）を有する。

【0515】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、または少なくとも約21の連続したヌクレオチドを有し、当該ヌクレオチドは、対応するmiRNAの少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、または少なくとも約21の連続したヌクレオチドへそれぞれ相補的である。

20

【0516】

本発明のポリヌクレオチドの中へ1つまたは複数のmiRNA結合部位を操作することによって、問題になっているmiRNAが利用可能であることを条件として、ポリヌクレオチドは、分解または低減された翻訳のために標的化され得る。これは、ポリヌクレオチドの送達に際しての標的外効果を低減させ得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドが組織または細胞へ送達されることが意図されないが、最終的に前記組織または細胞で到達するならば、miRNAの1つまたは複数の結合部位がポリヌクレオチドの5'UTR及び／または3'UTRの中へ操作されていると、そのとき組織または細胞中で豊富なmiRNAは、関心のある遺伝子の発現を阻害し得る。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のmRNAの中への1つまたは複数のmiRNA結合部位の取り込みは、核酸分子送達に際しての標的外効果の危険性を低減し得る、及び／またはmRNAによってコードされるポリペプチドの発現の組織特異的調節を可能にし得る。さらに他の実施形態において、本開示のmRNAの中への1つまたは複数のmiRNA結合部位の取り込みは、核酸送達に際しての免疫応答をインビボで調整し得る。さらなる実施形態において、本開示のmRNAの中への1つまたは複数のmiRNA結合部位の取り込みは、本明細書において記載される脂質が含む化合物及び組成物の加速血液クリアランス（ABC）を調整し得る。

30

40

【0517】

逆に、miRNA結合部位を、それらが天然に存在するポリヌクレオチド配列から除去して、特定の組織におけるタンパク質発現を増加させることができる。例えば、特異的なmiRNAについての結合部位を、ポリヌクレオチドから除去して、miRNAを含有する組織または細胞におけるタンパク質発現を改善することができる。

【0518】

複数の組織における発現の調節は、1つまたは複数のmiRNA結合部位（例えば1つまたは複数の別個のmiRNA結合部位）の導入または除去を介して達成され得る。miRNA結合部位を除去するかまたは挿入するかという決定は、発生及び／または疾患における組織及び／または細胞中のmiRNA発現パターン及び／または、それらのプロファ

50

イリングに基づいて行われる。miRNA、miRNA結合部位、ならびに生物学におけるそれらの発現パターン及び役割の同定が報告されている（例えばBonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresch Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec 20. doi:10.1038/leu.2011.356); Bartel Cell 2009 136:215-233; Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414; Gentner and Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403、及びそれらの中のすべての参考文献；それらの各々は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）。

10

【0519】

miRNAがmRNAを調節し、それによってタンパク質発現を調節することが公知の組織の例としては、肝臓（miR-122）、筋肉（miR-133、miR-206、miR-208）、内皮細胞（miR-17-92、miR-126）、骨髄性細胞（miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27）、脂肪組織（let-7、miR-30c）、心臓（miR-1d、miR-149）、腎臓（miR-192、miR-194、miR-204）、及び肺上皮細胞（let-7、miR-133、miR-126）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0520】

具体的には、miRNAは、抗原提示細胞（APC）（例えば樹状細胞及びマクロファージ）、マクロファージ、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞など等の免疫細胞（造血細胞とも呼ばれる）において差次的に発現されることが公知である。免疫細胞特異的miRNAは、免疫原性、自己免疫、感染、炎症への免疫応答、そして遺伝子治療法及び組織／臓器移植後の望まれない免疫応答に関与する。免疫細胞特異的miRNAは、造血細胞（免疫細胞）の発生、分裂増殖、分化、及びアポトーシスの多数の態様も調節する。例えば、miR-142及びmiR-146は、免疫細胞においてのみで発現され、骨髄樹状細胞において特に豊富である。ポリヌクレオチドへの免疫応答は、ポリヌクレオチドの3'-UTRへのmiR-142結合部位の付加によって遮断され、組織及び細胞におけるより安定的な遺伝子移行を可能し得ることが実証されている。miR-142は、抗原提示細胞における外因性ポリヌクレオチドを効率的に分解し、形質導入された細胞の細胞傷害性排除を抑制する（例えばAnnoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161; Brown BD, et al., Nat med. 2006, 12 (5), 585-591; Brown BD, et al., blood, 2007, 110 (13): 4144-4152、それらの各々は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）。

30

【0521】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、miRNA結合部位を含み、miRNA結合部位は、表3Cまたは表4Aから選択される1つまたは複数のヌクレオチド配列を含み、miRNA結合部位配列のうちの任意の1つまたは複数ものの1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える、表3Cまたは表4Aから選択される同じかまたは異なるmiRNA結合部位（任意のそれらの組み合わせも包含する）をさらに含む。

40

【0522】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miR-142へ結合するか、またはmiR-142へ相補的である。いくつかの実施形態において、miR-142は、配列番号200を含む。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、miR-142-3pまたはmiR-142-5pへ結合する。いくつかの実施形態において、

50

miR-142-3p 結合部位は、配列番号 202 を含む。いくつかの実施形態において、miR-142-5p 結合部位は、配列番号 204 を含む。いくつかの実施形態において、miRNA 結合部位は、配列番号 202 または配列番号 204 に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または 100 % 同一のヌクレオチド配列を含む。

【0523】

いくつかの実施形態において、miRNA 結合部位は、miR-126 へ結合するか、または miR-126 へ相補的である。いくつかの実施形態において、miR-126 は、配列番号 205 を含む。いくつかの実施形態において、miRNA 結合部位は、miR-126-3p または miR-126-5p へ結合する。いくつかの実施形態において、miR-126-3p 結合部位は、配列番号 207 を含む。いくつかの実施形態において、miR-126-5p 結合部位は、配列番号 710 を含む。いくつかの実施形態において、miRNA 結合部位は、配列番号 121 または配列番号 123 に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または 100 % 同一のヌクレオチド配列を含む。

【0524】

一実施形態において、3' UTR は、2つの miRNA 結合部位を含み、第1の miRNA 結合部位は、miR-142 へ結合し、第2の miRNA 結合部位は、miR-126 へ結合する。特定の実施形態において、miR-142 及び miR-126 へ結合する 3' UTR は、配列番号 249 の配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる。

【表 3 C】

表 3 C。miR-142、miR-126、ならびに miR-142 結合部位及び miR-126 結合部位

配列番号	記載	配列
200	miR-142	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAA AGCACUACUAAACAGCACUGGAGGGUGU AGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGU ACUGUG
201	miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
202	miR-142-3p 結合部位	UCCAUAAGUAGGAAACACUACA
203	miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
204	miR-142-5p 結合部位	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG
205	miR-126	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUU GGUACGCGCUGUGACACUCAAACUCG UACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCAC GGCA
206	miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
207	miR-126-3p 結合部位	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA
208	miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG
710	miR-126-5p 結合部位	CGCGUACCAAAAGUAAUAAUG

【0525】

いくつかの実施形態において、miRNA 結合部位は、本発明のポリヌクレオチドにお

いて、ポリヌクレオチドの任意の位置（例えば5'UTR及び／または3'UTR）で挿入される。いくつかの実施形態において、5'UTRは、miRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、3'UTRは、miRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態において、5'UTR及び3'UTRは、miRNA結合部位を含む。ポリヌクレオチド中のmiRNA結合部位の挿入が、対応するmiRNAの非存在下における機能的ポリペプチドの翻訳を妨害せず、且つmiRNAの存在下において、ポリヌクレオチド中のmiRNA結合部位の挿入及び対応するmiRNAへのmiRNA結合部位の結合が、ポリヌクレオチドを分解することまたはポリヌクレオチドの翻訳を防止することが可能である限り、ポリヌクレオチド中の挿入部位は、ポリヌクレオチド中のどこでもあり得る。

【0526】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、ORFを含む本発明のポリヌクレオチド中のORFの終止コドンから少なくとも約30ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチド中のORFの終止コドンから少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約15ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチド、少なくとも約30ヌクレオチド、少なくとも約35ヌクレオチド、少なくとも約40ヌクレオチド、少なくとも約45ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約55ヌクレオチド、少なくとも約60ヌクレオチド、少なくとも約65ヌクレオチド、少なくとも約70ヌクレオチド、少なくとも約75ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、または少なくとも約100ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチド中のORFの終止コドンから約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約20ヌクレオチド～約90ヌクレオチド、約30ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約40ヌクレオチド～約70ヌクレオチド、約50ヌクレオチド～約60ヌクレオチド、約45ヌクレオチド～約65ヌクレオチド下流に挿入される。

【0527】

いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチド（例えばmRNA）内のコーディング領域の終止コドン直後の3'UTR内に挿入される。いくつかの実施形態において、コンストラクト中に終止コドンの複数のコピーがあるならば、miRNA結合部位は、最後の終止コドン直後に挿入される。いくつかの実施形態において、miRNA結合部位は、終止コドンのさらに下流に挿入され、この事例において、終止コドンとmiRNA結合部位（複数可）との間に3'UTR塩基がある。いくつかの実施形態において、3'UTR中のmiRNAについての可能な挿入部位の3つの非限定例が、配列番号248、249、及び250において示され、これらは、3'UTR内の3つの異なる可能な挿入部位のうちの1つ中にそれぞれ挿入されたmiR-142-3p部位を備えた3'UTR配列を示す。

【0528】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のmiRNA結合部位は、1つまたは複数の可能な挿入部位で5'UTR内に位置し得る。例えば、5'UTR中のmiRNAについての可能な挿入部位の3つの非限定例が、配列番号251、252、及び253において示され、これらは、5'UTR内の3つの異なる可能な挿入部位のうちの1つ中にそれぞれ挿入されたmiR-142-3p部位を備えた5'UTR配列を示す。

【0529】

一実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、終止コドンの1～100ヌクレオチド後の3'UTR内に所在する。一実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRNAについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、終止コドンの30～50ヌクレオチド後の3'UTR内に所在す

10

20

30

40

50

る。別の実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、終止コドンの少なくとも50ヌクレオチド後の3' UTR内に所在する。他の実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、終止コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、終止コドンの直後の3' UTR内に、または終止コドンの15~20ヌクレオチド後の3' UTR内にもしくは終止コドンの70~80ヌクレオチド後の3' UTR内に所在する。他の実施形態において、3' UTRは、2つ以上のmiRNA結合部位（例えば2~4のmiRNA結合部位）を含み、各々のmiRNA結合部位の間にスペーサー領域（例えば10~100ヌクレオチド、20~70ヌクレオチド、または30~50ヌクレオチドの長さのもの）があり得る。別の実施形態において、3' UTRは、miRNA結合部位（複数可）の端部とポリA尾部ヌクレオチドとの間にスペーサー領域を含む。例えば、10~100ヌクレオチド、20~70ヌクレオチド、または30~0ヌクレオチドの長さのスペーサー領域は、miRNA結合部位（複数可）の端部とポリA尾部の始まりとの間に置かれ得る。

10

20

30

40

50

【0530】

一実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、開始コドンの1~100ヌクレオチド前の（上流の）5' UTR内に所在する。一実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、開始コドンの10~50ヌクレオチド前の（上流の）5' UTR内に所在する。別の実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、開始コドンの少なくとも25ヌクレオチド前の（上流の）5' UTR内に所在する。他の実施形態において、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレームは、開始コドンを含み、免疫細胞において発現されるmiRについての少なくとも1つのマイクロRNA結合部位は、開始コドンの直前の5' UTR内に、または終止コドンの15~20ヌクレオチド前の5' UTR内にもしくは開始コドンの70~80ヌクレオチド前の5' UTR内に所在する。他の実施形態において、5' UTRは、2つ以上のmiRNA結合部位（例えば2~4のmiRNA結合部位）を含み、各々のmiRNA結合部位の間にスペーサー領域（例えば10~100ヌクレオチド、20~70ヌクレオチド、または30~50ヌクレオチドの長さのもの）があり得る。

【0531】

一実施形態において、3' UTRは、2つ以上の終止コドンを含み、少なくとも1つのmiRNA結合部位は、終止コドンの下流に位置する。例えば、3' UTRは、1、2、または3つの終止コドンを含み得る。使用され得る三重の終止コドンの非限定例としては、UGA UAA UAG、UGA UAG UAA、UAA UGA UAG、UGA UAA UAA、UGA UAG UAG、UAA UGA UGA、UAA UAG UAG、UGA UGA UGA、UAA UAA UAA、及びUAG UAG UAGが挙げられる。例えば3' UTR内に、1、2、3、または4つのmiRNA結合部位（例えばmiR-142-3p結合部位）は、終止コドン（複数可）へすぐ隣接して、または最後の終止コドンの任意の数のヌクレオチド下流で位置し得る。3' UTRが、複数のmiRNA結合部位を含む場合に、これらの結合部位は、コンストラクトにおいて互いの隣に（すなわち交互に）直接位置し得るか、または代替的に、スペーサーヌクレオチドが各々の結合部位の間に位置し得る。

【0532】

一実施形態において、3' UTRは、3つの終止コドンを含み、単一のmiR-142-3p結合部位は、第3の終止コドンの下流に所在する。3つの終止コドン、及び最後の

終止コドンの下流の異なる位置で所在する単一のmiR-142-3p結合部位を有する3'UTRの配列の非限定例は、配列番号237、248、249、及び250において示される。

【表4A-1】

表4A。5'UTR、3'UTR、miR配列、及びmiR結合部位

配列番号	配列
220	GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCC CCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUA CAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位を備えた3'UTR)
202	UCCAUAAGUAGGAAACACUACA (miR 142-3p 結合部位)
201	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA (miR 142-3p 配列)
203	CAUAAGUAGAAAGCACUACU (miR 142-5p 配列)
221	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG (miR 146-3p 配列)
222	UGAGAACUGAAUCCAUUGGGUU (miR 146-5p 配列)
223	CUCCUACAUAUAGCAUUAACA (miR 155-3p 配列)
224	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU (miR 155-5p 配列)
206	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (miR 126-3p 配列)
208	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG (miR 126-5p 配列)
225	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA (miR 16-3p 配列)
226	UAGCAGCACGUAAUAAUUGGCG (miR 16-5p 配列)
227	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (miR 21-3p 配列)
228	UAGCUUAUCAGACUGAUUGA (miR 21-5p 配列)
143	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA (miR 223-3p 配列)
230	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU (miR 223-5p 配列)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 2】

231	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG (miR 24-3p 配列)
232	UGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGU (miR 24-5p 配列)
233	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC (miR 27-3p 配列)
234	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA (miR 27-5p 配列)
207	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA (miR 126-3p 結合部位)
235	UGAUAUUAGG CUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>CGCAUUAUUAC</u> <u>UCACGGUACGA</u> GUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 126-3p 結合部位を備えた 3' UTR)
236	UGAUAUUAGG CUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGA AUAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 結合部位の無い 3' UTR)
237	UGAUAUUAGG CUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>UCCAUA</u> AAAGUA <u>GGAAACACUACAG</u> UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR)
199	UGAUAUUAG UCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGC CAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC ACCCGUACCCCC <u>CGCAUUAUUACUCACGGUACGA</u> GUGGUCUUUGAAUAA AGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位及び miR 126-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 1)
239	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU (miR 155-5p 配列)
240	ACCCCUAUCACAAUAGCAUUA (miR 155-5p 結合部位)
241	UGAUAUUAG UCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGC CAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUCCC CCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>UCCAUA</u> AGUAGGA <u>AACACUACAG</u> UGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3 つの miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 3】

242	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>AGUAGUGCUUUC</u> <u>UACUUUAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (miR 142-5p 結合部位を備えた 3' UTR)
243	UGAUAAUAG <u>AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG</u> GCUGGAGCCUCGGUGGCCA UGCUUCUUGCCCCUUGGGCC <u>AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG</u> UCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>AGUAGUGCUUUCUACUUUAU</u> <u>GGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (3 つの miR 142-5p 結合部位を備えた 3' UTR)
244	UGAUAAUAG <u>AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG</u> GCUGGAGCCUCGGUGGCCA UGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUCCCCC AGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>AGUAGUGCUUUCUACUU</u> <u>UAUGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (2 つの miR 142-5p 結合部位及び 1 つの miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR)
245	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>ACCCCUAUCACA</u> <u>AUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (miR 155-5p 結合部位を備えた 3' UTR)
246	UGAUAAUAG <u>ACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUAAG</u> CUGGAGCCUCGGUGGCC AUGCUUCUUGCCCCUUGGGCC <u>ACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUA</u> AUCCCCC AGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>ACCCCUAUCACAAUUAAG</u> <u>CAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (3 つの miR 155-5p 結合部位を備えた 3' UTR)
247	UGAUAAUAG <u>ACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUAAG</u> CUGGAGCCUCGGUGGCC AUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUCCCC CCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>ACCCCUAUCACAAUUA</u> <u>GCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (2 つの miR 155-5p 結合部位及び 1 つの miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR)
248	UGAUAAUAGUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGC CAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC ACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位、P1 挿入を備えた 3' UTR)
249	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGC <u>UCCAUAAGUAGGAAACACUACA</u> CAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC ACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位、P2 挿入を備えた 3' UTR)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 4】

250	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCAUAAGUAGGAAACACUACA <u>UCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC</u> ACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位、P3 挿入を備えた 3' UTR)
204	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG (miR-142-5p 結合部位)
200	GACAGUGCAGUCACCCAUAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUGGAG GGUGUAGUGUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG (miR-142)
708	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAAAGAGCCACC (5' UTR)
251	GGGAAAUAAAGAGUCCAUAAGUAGGAAACACUACAAGAAAGAAGAGU AAGAAGAAAUAAAGAGCCACC (位置 p1 で miR142-3p 結合部位を備えた 5' UTR)
252	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAUCCAUAAGUAGGAAACACUA CAGAAGAAAUAAAGAGCCACC (位置 p2 で miR142-3p 結合部位を備えた 5' UTR)
253	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAAGAAGAAAUAAAUCCAUAAG UAGGAAACACUACAGAGCCACC (位置 p3 で miR142-3p 結合部位を備えた 5' UTR)
254	ACCCCUAUCACAAUUGCAUUA (miR 155-5p 結合部位)
255	UGAUAAUAGAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGGCUGGAGCCUCGGUGGCCA UGCUUCUUGCCCCUUGGGCCAGUAGUGCUUUCUACUUUAUGUCCCCCAG CCCCUCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCAAGUAGUGCUUUCUACUUUAU GGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3 つの miR 142-5p 結合部位を備えた 3' UTR)
256	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUCCAUA AGUAGGAAACACUACAUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGC ACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR142-3p 結合部位を含む 3' UTR)
257	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGUCCAUAAGUAGGAAACACUACA <u>CCCCUCCUCCCCUCCUGC</u> ACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR142-3p 結合部位を含む 3' UTR)
258	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCUCCAUAAGUAGGAAACACUACA <u>CUGC</u> ACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR142-3p 結合部位を含む 3' UTR)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 5】

259	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUC CCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAU AAAGU <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUAC <u>AC</u> UGAGUGGGCGGC (miR142-3p 結合部位を含む 3' UTR)
260	UGAUAAUAG <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCAC CCGUACCCCG <u>CGCAUUAUUACUCACGGUACGA</u> GUGGUCUUUGAAUAAAGU CUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位及び miR 126-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 2)
261	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUC CCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAU AAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 結合部位の無い 3' UTR、バリエント 2)
111	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUC CCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCG <u>UCCA</u> AAAGUAGG <u>AAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 3)
262	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUC CCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCG <u>CGCAUUAUUACUCA</u> <u>CGGUACGA</u> GUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 126-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 3)
263	UGAUAAUAG <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUACA <u>UCCCCC</u> <u>AGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCGUCCA</u> AAAGUAGGAAACA <u>CUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (3 つの miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 2)
264	UGAUAAUAG <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCAC CCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR、P1 挿入、バリエント 2)
265	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCC <u>UCCA</u> AAAGUAGGAAACACUACAC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCAC CCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位、P2 挿入を備えた 3' UTR、バリエント 2)
266	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCC <u>UC</u> <u>CAU</u> AAAGUAGGAAACACUACA <u>UCCCCC</u> AGCCCCUCCUCCCCUCCUGCAC CCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 142-3p 結合部位、P3 挿入を備えた 3' UTR、バリエント 2)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 6】

267	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCU CCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCACCCCUAUCACA AUUAGCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (miR 155-5p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 2)
268	UGAUAAUAGACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGGCCACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUAUCCCCC AGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCACCCCUAUCACAAUUAAGC AUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3 つの miR 155-5p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 2)
269	UGAUAAUAGACCCCUAUCACAAUUAAGCAUUAAGCUGGAGCCUCGGUGGCC UAGCUUCUUGCCCCUUGGGGCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUCCCC CCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCACCCCUAUCACAAUUA GCAUUAAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (2 つの miR 155-5p 結合部位及び 1 つの miR 142-3p 結合部位を備えた 3' UTR、バリエント 2)
271	AGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5'-UTR (v1+A 開始)
272	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGACCCCGGC GCCGCCACC (5' UTR、v1.1+G 開始)
273	AGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGACCCCGGC GCCGCCACC (5' UTR、v1.1+A 開始)
274	GGGAGAUCAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR 002 (上流 UTR+G 開始)
80	GGGAGACAAGCUUGGCAUCCGGUACUGUUGGUAAAGCCACC 5' UTR-004 (上流 UTR+G 開始)
81	GGGAAUUAACAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR-008 (上流 UTR+G 開始)
82	GGGAAUUAAGACAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR-009 (上流 UTR+G 開始)
83	GGGAAUUAAGAGAGUAAAGAACAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR-010 (上流 UTR+G 開始)
84	GGGAAAAAAGAGAGAAAAGAAGACUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR-011 (上流 UTR+G 開始)
85	GGGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAUUAUUAAGAGCCACC 5' UTR-012 (上流 UTR+G 開始)
86	GGGAAUUAAGAGACAAAACAAGAGUAAGAAGAAAUUAUAGAGCCACC 5' UTR-013 (上流 UTR+G 開始)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 7】

87	GGGAAAUUAGAGAGUAAAGAACAGUAAGUAGAAUUAAAAGAGCCACC 5' UTR-014 (上流 UTR+G 開始)
88	GGGAAAUAAAGAGAGAAUAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAAGAGCCACC 5' UTR-015 (上流 UTR+G 開始)
89	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAAUUAAGAGCCACC 5' UTR-016 (上流 UTR+G 開始)
90	GGGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUUAAGAGCCACC 5' UTR-017 (上流 UTR+G 開始)
91	UCAAGCUUUUGGACCCUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGA AAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAAGAGCCACC 5' UTR-018 (上流 UTR)

10

終止コドン=太字

m i R 1 4 2 - 3 p 結合部位=下線

m i R 1 2 6 - 3 p 結合部位=太い下線

m i R 1 5 5 - 5 p 結合部位=イタリック体

m i R 1 4 2 - 5 p の結合部位=イタリック体で太い下線

20

【0533】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、5' UTR、関心のあるポリペプチドをコードするコドン最適化オープンリーディングフレーム、免疫細胞において発現される m i R についての少なくとも 1 つの m i R N A 結合部位を含む 3' UTR、及び連結されたヌクレオシドの 3' 尾部領域を含む。様々な実施形態において、3' UTR は、免疫細胞において発現される（好ましくは免疫細胞において多量にまたは優先的に発現される）m i R についての 1 ~ 4、少なくとも 2、1、2、3、または 4 つの m i R N A 結合部位を含む。

30

【0534】

一実施形態において、免疫細胞において発現される少なくとも 1 つの m i R N A は、m i R - 1 4 2 - 3 p マイクロRNA 結合部位である。一実施形態において、m i R - 1 4 2 - 3 p マイクロRNA 結合部位は、配列番号 202 において示される配列を含む。一実施形態において、m i R - 1 4 2 - 3 p マイクロRNA 結合部位を含む m R N A の 3' UTR は、配列番号 220 において示される配列を含む。

【0535】

一実施形態において、免疫細胞において発現される少なくとも 1 つの m i R N A は、m i R - 1 2 6 マイクロRNA 結合部位である。一実施形態において、m i R - 1 2 6 結合部位は、m i R - 1 2 6 - 3 p 結合部位である。一実施形態において、m i R - 1 2 6 - 3 p マイクロRNA 結合部位は、配列番号 207 において示される配列を含む。一実施形態において、m i R - 1 2 6 - 3 p マイクロRNA 結合部位を含む本発明の m R N A の 3' UTR は、配列番号 235 において示される配列を含む。

40

【0536】

本開示のマイクロRNA 結合部位（複数可）に結合し得る m i R についての非限定的な例示的な配列としては、以下のもの：m i R - 1 4 2 - 3 p（配列番号 201）、m i R - 1 4 2 - 5 p（配列番号 203）、m i R - 1 4 6 - 3 p（配列番号 221）、m i R - 1 4 6 - 5 p（配列番号 222）、m i R - 1 5 5 - 3 p（配列番号 223）、m i R - 1 5 5 - 5 p（配列番号 224）、m i R - 1 2 6 - 3 p（配列番号 206）、m i R - 1 2 6 - 5 p（配列番号 208）、m i R - 1 6 - 3 p（配列番号 225）、m i R -

50

16-5p（配列番号226）、miR-21-3p（配列番号227）、miR-21-5p（配列番号228）、miR-223-3p（配列番号143）、miR-223-5p（配列番号230）、miR-24-3p（配列番号231）、miR-24-5p（配列番号232）、miR-27-3p（配列番号233）、及びmiR-27-5p（配列番号234）が挙げられる。免疫細胞において発現される（例えば多量にまたは優先的に免疫細胞において発現される）他の好適なmiR配列は、当技術分野において公知且つ利用可能であり、例えばUniversity of ManchesterのマイクロRNAデータベース（miRBase）である。前述のmiRのうちの任意のものに結合する部位は、miRへのワトソン・クリック型相補性（典型的にはmiRへの100%の相補性）に基づいてデザインされ、本開示のmRNAコンストラクトの中へ本明細書において記載されるように挿入され得る。

10

【0537】

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド（例えば及びmRNA、例えばその3'UTR）は、B細胞による例えばPEGに対するIgMの産生を例えば低減もしくはは阻害すること、及び／またはpDCの分裂増殖及び／または活性化を低減もしくはは阻害することによって、加速血液クリアランスを低減または阻害するための少なくとも1つのmiRNA結合部位を含み得、コードされる関心のあるタンパク質の組織発現を調整するための少なくとも1つのmiRNA結合部位を含み得る。

【0538】

miRNA遺伝子調節は、miRNAの周囲の配列（周囲の配列の種、配列のタイプ（例えば異種、同種、外来性、内在性、または人工的）、周囲の配列中の調節エレメント、及び／または周囲の配列中の構造要素等であるがこれらに限定されない）によって影響を受け得る。miRNAは、5'UTR及び／または3'UTRによって影響を受け得る。非限定例として、非ヒト3'UTRは、同じ配列タイプのヒト3'UTRに比較して、関心のあるポリペプチドの発現に対するmiRNA配列の調節作用を増加させ得る。

20

【0539】

一実施形態において、5'UTRの他の調節エレメント及び／または構造要素は、miRNA媒介性遺伝子調節に影響を及ぼし得る。調節エレメント及び／または構造要素の1つの例は、タンパク質翻訳を開始する翻訳伸長因子の結合のために必要な、5'UTR中の構造化IRES（内部リボソーム進入部位）である。5'-UTR中のこの二次構造化要素へのEIF4A2結合は、miRNA媒介性遺伝子発現のために必要である（Meijer HA et al., Science, 2013, 340, 82-85、参照することによってその全体が本明細書に援用される）。本発明のポリヌクレオチドは、マイクロRNA媒介性遺伝子調節を促進するために、この構造化5'UTRをさらに含み得る。

30

【0540】

少なくとも1つのmiRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチドの3'UTRの中へ操作され得る。この文脈において、少なくとも2つ、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、またはそれを超えるmiRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチドの3'UTRの中へ操作され得る。例えば、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、2、または1つのmiRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチドの3'UTRの中へ操作され得る。一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれるmiRNA結合部位は、同じであり得るか、または異なるmiRNA部位であり得る。本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれる異なるmiRNA結合部位の組み合わせは、異なるmiRNA部位のうちの任意の2つ以上のコピーが取り込まれる組み合わせを包含し得る。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれるmiRNA結合部位は、身体中の同じかまたは異なる組織を標的化し得る。非限定例として、本発明のポリヌクレオチドの3'-UTR中への組織、細胞型、または疾患に特異的なmiRNA結合部位の導入を介して、特定の細胞型（例えば骨髄性細胞及び内皮細胞など）における発現の程度は低減され得る。

40

50

【0541】

一実施形態において、miRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチド中の、3' UTRの5'末端の近傍に、3' UTRの5'末端と3'末端との間の中間辺りに、及び／または3' UTRの3'末端の近傍に操作され得る。非限定例として、miRNA結合部位は、3' UTRの5'末端の近傍に及び3' UTRの5'末端と3'末端との間の中間辺りに操作され得る。別の非限定例として、miRNA結合部位は、3' UTRの3'末端の近傍に及び3' UTRの5'末端と3'末端との間の中間辺りに操作され得る。別の非限定例において、miRNA結合部位は、3' UTRの5'末端の近傍に及び3' UTRの3'末端の近傍に操作され得る。

【0542】

10

別の実施形態において、3' UTRは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のmiRNA結合部位を含み得る。miRNA結合部位は、miRNA、miRNAシード配列、及び／またはシード配列に隣接するmiRNA配列へ相補的であり得る。

【0543】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチド中に少なくとも1つのセンサー配列を取り込むこと及び投与のためにポリヌクレオチドを製剤化することによって制御され得る。非限定例として、本発明のポリヌクレオチドは、miRNA結合部位を取り込むこと及びイオン化可能脂質（本明細書において記載される脂質のうちの任意のものを包含する）を含む脂質ナノ粒子中でポリヌクレオチドを製剤化することによって組織または細胞へ標的化され得る。

20

【0544】

本発明のポリヌクレオチドは、異なる組織、細胞型、または生物学的条件におけるmiRNAの発現パターンに基づいて、特定の組織、細胞型、または生物学的条件において、より標的化された発現のために操作され得る。本発明のポリヌクレオチドは、組織特異的miRNA結合部位の導入を介して、組織もしくは細胞における、または生物学的条件の文脈における、最適なタンパク質発現のためにデザインされ得る。

【0545】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、既知のmiRNAシード配列へ100%の同一性を有するかまたはmiRNAシード配列へ100%未満の同一性を有するかのいずれかであるmiRNA結合部位を取り込むようにデザインされ得る。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、既知のmiRNAシード配列へ、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するmiRNA結合部位を取り込むようにデザインされ得る。miRNAシード配列は、miRNA結合親和性を減少させて、それゆえポリヌクレオチドの下方調節の低減をもたらすように部分的に変異され得る。要するに、miRNA結合部位とmiRNAシードとの間の一致または不一致の程度は、miRNAがタンパク質発現を調整する能力をより細かく調整するためのレオスタットとして作用し得る。加えて、miRNA結合部位の非シード領域中の変異も、miRNAがタンパク質発現を調整する能力に影響を与え得る。

30

【0546】

40

一実施形態において、miRNA配列は、ステムループのループの中へ取り込まれ得る。

【0547】

別の実施形態において、miRNAシード配列は、ステムループのループ中に取り込まれ得、miRNA結合部位は、ステムループの5'ステムまたは3'ステムの中へ取り込まれ得る。

【0548】

一実施形態において、5' UTR中のmiRNA配列は、本明細書において記載される本発明のポリヌクレオチドを安定化するために使用され得る。

【0549】

50

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの5'UTR中のmiRNA配列は、翻訳開始の部位（開始コドン等であるがこれらに限定されない）のアクセス容易性を減少させるために使用され得る。例えばMatsuda et al., PLoS One. 2010 11 (5): e15057（参照することによってその全体が本明細書に援用される）を参照されたく、これは、開始コドン付近で（AUGコドンのAが+1である場合、-4～+37）、アンチセンスロック核酸（LNA）オリゴヌクレオチド及びエクソーン-ジャンクション複合体（EJC）を使用して、第1の開始コドン（AUG）へのアクセス容易性を減少させたものである。Matsudaは、LNAまたはEJCによる開始コドン付近の配列の変更が、ポリヌクレオチドの効率、長さ、及び構造安定性に影響したことを示した。本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始の部位へのアクセス容易性を減少させるために、Matsuda et al.によって記載されたLNAまたはEJC配列の代わりに、翻訳開始の部位の近傍にmiRNA配列を含み得る。翻訳開始の部位は、miRNA配列の前、その後、またはその内部にあり得る。非限定例として、翻訳開始の部位は、miRNA配列（シード配列または結合部位等）内に所在し得る。

10

【0550】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、抗原提示細胞による抗原提示を弱めるために少なくとも1つのmiRNAを含み得る。miRNAは、完全なmiRNA配列、miRNAシード配列、シード無しのmiRNA配列、またはそれらの組み合わせであり得る。非限定例として、本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれるmiRNAは、造血系に特異的であり得る。別の非限定例として、抗原提示を弱めるために本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれるmiRNAは、miR-142-3pである。

20

【0551】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、関心のある組織または細胞におけるコードされるポリペプチドの発現を弱めるために、少なくとも1つのmiRNAを含み得る。非限定例として、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つのmiR-142-3p結合部位、miR-142-3pシード配列、シード無しのmiR-142-3p結合部位、miR-142-5p結合部位、miR-142-5pシード配列、シード無しのmiR-142-5p結合部位、miR-146結合部位、miR-146シード配列、及び／またはシード配列無しのmiR-146結合部位を含み得る。

30

【0552】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、治療物質送達によって引き起こされる望まれない免疫原性反応を抑えるために、免疫細胞におけるmRNA治療物質を選択的に分解するように、3'UTR中で少なくとも1つのmiRNA結合部位を含み得る。非限定例として、miRNA結合部位は、本発明のポリヌクレオチドを抗原提示細胞中でより不安定にし得る。これらのmiRNAの非限定例としては、miR-142-5p、miR-142-3p、miR-146a-5p、及びmiR-146-3pが挙げられる。

【0553】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、RNA結合タンパク質と相互作用し得るポリヌクレオチドの領域中で少なくとも1つのmiRNA配列を含む。

40

【0554】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド（例えばRNA、例えばmRNA）は、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする配列最適化ヌクレオチド配列（例えばORF）ならびに(ii) miRNA結合部位（例えばmiR-142へ結合するmiRNA結合部位）及び／またはmiR-126へ結合するmiRNA結合部位を含む。

【0555】

IVTポリヌクレオチドアーキテクチャ

50

いくつかの実施形態において、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含む本開示のポリヌクレオチドは、IVTポリヌクレオチドである。従来、mRNA分子の基本的構成要素としては、少なくともコーディング領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ、及びポリA尾部が挙げられる。本開示のIVTポリヌクレオチドはmRNAとして機能し得るが、例えば核酸ベースの治療物質を使用する有効なポリペプチド産生についての既存の問題を克服するのに役立つという機能的及び／または構造的なデザインの特色において、野生型mRNAとは区別される。

【0556】

IVTポリヌクレオチドの一次コンストラクトは、第1の隣接領域及び第2の隣接領域が隣接する連結されたヌクレオチドの第1の領域を含む。この第1の領域は、コードされたチェックポイントがんワクチンを含み得るがこれらに限定されない。第1の隣接領域は、5' 非翻訳領域(UTR) (ポリペプチドのネイティブな5' UTRまたは非ネイティブな5' UTR (異種5' UTRまたは合成5' UTR等であるがこれらに限定されない) をコードする核酸のうちの任意の5' UTR等) として機能する連結されたヌクレオチドの配列を含み得る。(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするIVTは、その5' 末端で1つまたは複数のシグナル配列をコードするシグナル配列領域を含み得る。隣接領域は、1つまたは複数の完全または不完全な5' UTR配列を含む連結されたヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域は、5' 末端のキャップも含み得る。第2の隣接領域は、チェックポイントがんワクチンのネイティブな3' UTRまたは非ネイティブな3' UTR (異種3' UTRまたは合成3' UTR等であるがこれらに限定されない) をコードし得る1つまたは複数の完全または不完全な3' UTRを含む連結されたヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域は、3' 尾部配列も含み得る。3' 尾部配列は、ポリA尾部配列、ポリA-Gカルテット配列、及び／またはステムループ配列であり得るがこれらに限定されない。

【0557】

IVTポリヌクレオチドアーキテクチャの追加の及び例示的な特色は、2017年5月18日に出願された国際PCT出願WO2017/201325 (その内容全体は参照することによって本明細書に援用される) において開示される。

【0558】

5' UTR及び3' UTR

UTRは、ポリヌクレオチド中のコーディング領域に対して同種または異種であり得る。いくつかの実施形態において、UTRは、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするORFに対して同種である。

【0559】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、2つ以上の5' UTRまたはその機能的断片を含み、その各々は、同じかまたは異なるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、2つ以上の3' UTRまたはその機能的断片を含み、その各々は、同じかまたは異なるヌクレオチド配列を有する。

【0560】

いくつかの実施形態において、5' UTRもしくはその機能的断片、3' UTRもしくはその機能的断片、または任意のそれらの組み合わせは、配列最適化されている。

【0561】

いくつかの実施形態において、5' UTRもしくはその機能的断片、3' UTRもしくはその機能的断片、または任意のそれらの組み合わせは、少なくとも1つの化学的に修飾された核酸塩基 (例えばN1メチルシュードウラシルまたは5-メトキシウラシル) を含む。

【0562】

10

20

30

40

50

UTRは、調節性の役割（例えば安定性、局在化、及び／または翻訳効率の増加または減少）を提供する特色を有し得る。UTRを含むポリヌクレオチドは、細胞、組織、または生物体へ投与され得、1つまたは複数の調節性の特色は、ルーチンの方法を使用して測定され得る。いくつかの実施形態において、5'UTRまたは3'UTRの機能的断片は、それぞれ、全長の5'UTRまたは3'UTRの1つまたは複数の調節性の特色を含む。

【0563】

天然の5'UTRは、翻訳開始における役割を果たすという特色を持つ。当該UTRは、リボソームによる多数の遺伝子の翻訳開始のプロセスに関与することが一般的に公知であるコザック配列のようなシグネチャーを保有する。コザック配列は、コンセンサスCCR(A/G)CCAUGG（配列中、Rは、開始コドン(AUG)の3塩基上流のプリン（アデニンまたはグアニン）であり、当該開始コドンには、別の「G」が続く）を有する。5'UTRは、伸長因子結合に関与する二次構造を形成することも公知である。

【0564】

特定の標的器官の多量に発現される遺伝子において典型的に見出される特色の操作によって、ポリヌクレオチドの安定性及びタンパク質生産を促進し得る。例えば、肝臓発現mRNA（アルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トランスフェリン、 α フェトプロテイン、エリスロポエチン、または第VII因子等）の5'UTRの導入は、肝細胞株または肝臓におけるポリヌクレオチドの発現を促進し得る。同様に、他の組織特異的mRNAからの5'UTRを使用して、組織における発現を改善することは、筋肉（例えばMyoD、ミオシン、ミオグロビン、マイोजェニン、ヘルキュリン（herculin））で、内皮細胞（例えばTie-1、CD36）で、骨髄性細胞（例えばC/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS）で、白血球（例えばCD45、CD18）で、脂肪組織（例えばCD36、GLUT4、ACRP30、アディポネクチン）で、及び肺上皮細胞（例えばSP-A/B/C/D）で可能である。

【0565】

いくつかの実施形態において、UTRは、タンパク質が一般的な機能、構造、特色、または特性を共有する転写物のファミリーから選択される。例えば、コードされるポリペプチドは、特定の細胞、組織において、または発生の間のある時間で発現されるタンパク質のファミリー（すなわち、それは少なくとも1つの機能、構造、特色、局在化、起源、または発現パターンを共有する）に属し得る。遺伝子またはmRNAのうちの任意のものからのUTRは、同じかまたは異なるタンパク質のファミリーの他のUTRと交換されて、新規ポリヌクレオチドを生成することができる。

【0566】

いくつかの実施形態において、5'UTR及び3'UTRは、異種であり得る。いくつかの実施形態において、5'UTRは、3'UTRとは異なる種に由来し得る。いくつかの実施形態において、3'UTRは、5'UTRとは異なる種に由来し得る。

【0567】

共同所有の国際特許出願第PCT/US2014/021522号（公開第WO/2014/164253号、参照することによってその全体が本明細書に援用される）は、本発明のポリヌクレオチド中でORFへ隣接する領域として利用され得る例示的なUTRのリストを提供する。

【0568】

本出願の追加の例示的なUTRとしては、グロビン（ α -グロビンまたは β -グロビン等（例えばXenopus、マウス、ウサギ、またはヒトのグロビン））；強力なコザック翻訳開始シグナル；CYBA（例えばヒトチトクロームb-245 α ポリペプチド）；アルブミン（例えばヒトアルブミン7）；HSD17B4（ヒドロキシステロイド（17- β ）脱水素酵素）；ウイルス（例えばタバコエッチウイルス（TEV）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）、デング熱ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）（例えばCMV最初期1（IE1））、肝炎ウイルス（例えばB型肝炎ウイルス）、シンド

10

20

30

40

50

ビスウイルス、またはPAVオオムギ黄萎ウイルス)；熱ショックタンパク質(例えばhsp70)；翻訳開始因子(例えばeIF4G)；グルコーストランスポーター(例えばhGLUT1(ヒトグルコーストランスポーター1))；アクチン(例えばヒトの α アクチンまたは β アクチン)；GAPDH；チューブリン；ヒストン；クエン酸回路酵素；トポイソメラーゼ(例えば5' TOPモチーフ(オリゴピリミジントラクト)を欠如するTOP遺伝子の5' UTR)；リボソームタンパク質ラージ32(L32)；リボソームタンパク質(例えば例えばrps9等のヒトまたはマウスのリボソームタンパク質)；ATP合成酵素(例えばATP5A1またはミトコンドリアの H^+ ATP合成酵素の β サブユニット)；成長ホルモンe(例えばウシ(bGH)またはヒト(hGH))；伸長因子(例えば延長因子1 α 1(EEF1A1))；マンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)；筋細胞エンハンサー因子2A(MEF2A)； β -F1-ATPase、クレアチンキナーゼ、ミオグロビン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)；コラーゲン(例えばI型コラーゲン α 2鎖(Col1A2)、I型コラーゲン α 1鎖(Col1A1)、VI型コラーゲン α 2鎖(Col6A2)、VI型コラーゲン α 1鎖(Col6A1))；リボフォリン(例えばリボフォリンI(RPNI))；低密度リポタンパク質受容体関連タンパク(例えばLRP1)；カルジオトロフィン様サイトカイン因子(例えばNnt1)；カルレティキュリン(Calr)；プロコラーゲン-リジン、2-オキシグルタラート5-ジオキシゲナーゼ1(Plod1)；及びヌクレオバインディン(例えばNucb1)の核酸配列に由来する1つまたは複数の5' UTR及び／または3' UTRが挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0569】

いくつかの実施形態において、5' UTRは、 β -グロビン5' UTR；強力なコザック翻訳開始シグナルを含有する5' UTR；シトクロムb-245 α ポリペプチド(CYBA)5' UTR；ヒドロキシステロイド(17- β)脱水素酵素(HSD17B4)5' UTR；タバコエッチウイルス(TEV)5' UTR；ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)5' UTR；非構造タンパク質をコードする風疹ウイルス(RV)RNAの5' 近位オープンリーディングフレーム；デング熱ウイルス(DEN)5' UTR；熱ショックタンパク質70(Hsp70)5' UTR；eIF4G 5' UTR；GLUT1 5' UTR；それらの機能的断片、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

30

【0570】

いくつかの実施形態において、3' UTRは、 β -グロビン3' UTR；CYBA 3' UTR；アルブミン3' UTR；成長ホルモン(GH)3' UTR；VEEV 3' UTR；B型肝炎ウイルス(HBV)3' UTR； α -グロビン3' UTR；DEN 3' UTR；PAVオオムギ黄萎ウイルス(BYDV-PAV)3' UTR；延長因子1 α 1(EEF1A1)3' UTR；マンガンスーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)3' UTR；ミトコンドリアの $H(+)$ -ATP合成酵素の β サブユニット(β -mRNA)3' UTR；GLUT1 3' UTR；MEF2A 3' UTR； β -F1-ATPase 3' UTR；それらの機能的断片、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

【0571】

任意の遺伝子またはmRNAに由来する野生型UTRは、本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれ得る。いくつかの実施形態において、UTRは、例えばORFに対するUTRの向きもしくはは所在位置の変化によって、または追加のヌクレオチドの組み込み、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換もしくはは転位によって、野生型またはネイティブなUTRに比べて変更されて、バリエントUTRを産生することができる。いくつかの実施形態において、5' UTRまたは3' UTRのバリエントは利用され得、例えば野生型UTRの突然変異、または1つもしくはは複数のヌクレオチドがUTRの末端へ付加されるかもしくははUTRの末端から除去されるバリエントである。

【0572】

更に、1つまたは複数の合成UTRは、1つまたは複数の非合成UTRと組み合わせて使用され得る。例えばMandal and Rossi, Nat. Protoc. 20

50

1 3 8 (3) : 5 6 8 - 8 2 (この内容は、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される)を参照されたい。

【0573】

UTRまたはその一部分は、それらが選択された転写物と同じ向きで置かれ得るか、または向きもしくは所在位置が変更され得る。したがって、5'UTR及び／または3'UTRは、逆向きであるか、短縮されるか、延長されるか、または1つもしくは複数の他の5'UTRもしくは3'UTRと組み合わせられ得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、複数のUTR、例えば2重、3重、または4重の5'UTRまたは、3'UTRを含む。例えば、2重のUTRは、同じUTRの2つのコピーを連続でまたは実質的に連続で含む。例えば、2重のβ-グロビン3'UTRが使用され得る(US2010/0129877を参照、その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される)。

10

【0574】

ある特定の実施形態において、本発明の5'UTR及び／または3'UTR配列は、本明細書において開示される(例えば表3Aまたは表3B中の)5'UTRまたは3'UTR配列のうちの任意のもの、及びそれらの任意の組み合わせを含む5'UTR配列からなる群から選択される配列に、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%同一のヌクレオチド配列を含む。

20

【0575】

本発明のポリヌクレオチドは、特色の組み合わせを含み得る。例えば、ORFは、強力なコザック翻訳開始シグナルを含む5'UTR及び／またはポリA尾部の鑄型依存性付加(template addition)のためのオリゴ(dT)配列を含む3'UTRが隣接し得る。5'UTRは、同じ及び／または異なるUTRからの第1のポリヌクレオチド断片及び第2のポリヌクレオチド断片を含み得る(例えばUS2010/0293625を参照、参照することによってその全体が本明細書に援用される)。

【0576】

他の非UTR配列は、本発明のポリヌクレオチド内の領域またはサブ領域として使用され得る。例えば、イントロンまたはイントロン配列の一部分は、本発明のポリヌクレオチドの中へ取り込まれ得る。イントロン配列の取り込みは、タンパク質生産そしてポリヌクレオチド発現レベルを増加させ得る。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、UTRの代わりにまたはUTRに加えて内部リボソーム進入部位(IRES)を含む(例えばYakubov et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 394 (1): 189-193を参照、これらの内容は、参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される)。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'UTR配列の代わりにIRESを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ORF及びウイルスカプシド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、非合成3'UTRと組み合わせ、合成5'UTRを含む。

30

40

【0577】

いくつかの実施形態において、UTRは、少なくとも1つの翻訳促進ポリヌクレオチド、翻訳エンハンサーエレメント(translation enhancer element)、または翻訳エンハンサーエレメント(translational enhancer element)(まとめると「TEE」であり、それは、ポリヌクレオチドから産生されたポリペプチドまたはタンパク質の量を増加する核酸配列を指す)も含み得る。非限定例として、TEEは、転写プロモーターと開始コドンとの間に所在し得る。いくつかの実施形態において、5'UTRは、TEEを含む。

【0578】

一態様において、TEEは、核酸の翻訳活性(キャップ依存的翻訳またはキャップ非依

50

存的翻訳等であるがこれらに限定されない)を増進し得るUTR中の保存された要素である。

【0579】

a. 5'UTR配列

5'UTR配列は、mRNAへのリボソーム動員のために重要であり、翻訳における役割を果たすことが報告されている(Hinnebusch A, et al., (2016) Science, 352:6292:1413-6)。

【0580】

(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド(例えば本明細書において記載されるような)を含むチェックポイントがんワクチンをコードするオープンリーディングフレームを含む、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えばmRNA)であって、前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはポリヌクレオチドそれ自体の半減期の増加、発現の増加、及び/または活性の増加を付与する5'UTRを有する、ポリヌクレオチドが、とりわけ本明細書において開示される。一実施形態において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、(a) 5'-UTR(例えば表3A中で提供されるようなものまたはそれらのバリエーションもしくは断片); (b) 終止エレメントを含むコーディング領域(例えば本明細書において記載されるようなもの); 及び(c) 3'-UTR(例えば本明細書において記載されるようなもの)を含み、LNP組成物は、これらを含む。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、表3A中で提供される配列またはそれらのバリエーションもしくは断片(例えばそれらの機能的バリエーションまたは断片)を含む5'UTRを含む。

【0581】

一実施形態において、表3A中で提供される5'UTR配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエーションもしくは断片は、ポリヌクレオチドの半減期の増加(例えばポリヌクレオチドの半減期の約1.5~20倍の増加)を有する。一実施形態において、半減期の増加は、約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20倍、またはそれを超える。一実施形態において、半減期の増加は、約1.5倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約2倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約3倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約4倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約5倍以上である。

【0582】

一実施形態において、表3A中で提供される5'UTR配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエーションもしくは断片は、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び/または活性(例えばアウトプット)の増加をもたらす。一実施形態において、5'UTRは、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び/または活性(例えばアウトプット)の約1.5~20倍の増加をもたらす。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20倍、またはそれを超える。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約1.5倍以上である。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約2倍以上である。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約3倍以上である。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約4倍以上である。一実施形態において、レベル及び/または活性の増加は、約5倍以上である。

【0583】

一実施形態において、増加は、5'UTRを有しないか、異なる5'UTRを有するか、あるいは表3A中で記載される5'UTRまたはそれらのバリエーションもしくは断片を有しない、他の点では類似のポリヌクレオチドと比較される。

【0584】

一実施形態において、ポリヌクレオチドの半減期の増加は、ポリヌクレオチドの半減期

を測定するアッセイ（例えば本明細書において記載されるアッセイ）に従って測定される。

【0585】

一実施形態において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性（例えばアウトプット）の増加は、ポリペプチドのレベル及び／または活性を測定するアッセイ（例えば本明細書において記載されるアッセイ）に従って測定される。

【0586】

一実施形態において、5' UTRは、表3A中で提供される配列、あるいは表3A中で提供される5' UTR配列またはそれらのバリエーションもしくは断片へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、または配列番号79へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。

【0587】

一実施形態において、5' UTRは、配列番号50へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号51へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号52へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号53へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号54へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号55へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号56へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号57へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号58へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号59へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号60へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号61へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号62へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号63へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、5' UTRは、配列番号64へ、少なくとも80%、85%

、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 65 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 66 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 67 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 68 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 69 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 70 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 71 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 72 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 73 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 74 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 75 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 76 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 77 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 78 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、 5' UTR は、配列番号 79 へ、少なくとも 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 100 % の同一性を備えた配列を含む。

10

20

30

【0588】

一実施形態において、表 3 A 中で提供される 5' UTR 配列は、A である追加の第 1 のヌクレオチドを有する。一実施形態において、表 3 A 中で提供される 5' UTR 配列は、G である追加の第 1 のヌクレオチドを有する。

40

50

【表 3 A - 1】

表 3 A : 5' U T R 配列

配列番号	配列名称	配列
50	A1	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUUCUUUUAG UUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC
51	A5	GGAAAUCCCCACAACCGCCUCAUAUCCAGGCUCAAGAAUAG AGCUCAGUGUUUUUGUUGUUUAAUCAUUCGACGUGUUUUUGC GAUAUUCGCGCAAAGCAGCCAGUCGCGCGCUUGCUUUUAAG UAGAGUUGUUUUUCCACCCGUUUGCCAGGCAUCUUUAAUUU AACAUUUUUUAAUUUUUCAGGCUAACCUACGCCGCCACC
52	A6	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA UCUCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCGGCGCCGCCACC
53	A7	GGAAACCCCCACCCCCGUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGA AGAAAUAUAAGAUCUCCUGAGCUUCAGGGAGCCCCGGCGC CGCCACC
54	A8	GGAGAACUUCGCUUCCGUUGGCGCAAGCGCUUUCAUUUUU UCUGCUACCGUGACUAAG
55	A9	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA GCCACC
56	A11 (参考)	GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGA CCCCGGCGCCGCCACC
57	A2	GGAAAUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUUCUUUUAG UUUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
58	A3	GGAAAUCGCAAAAUUUUCUUUUCGCGUUAGAUUUUCUUUUAG UUUUCUUUCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCCGCCGCC
59	A4	$G G A A A U C G C A A A A (N_2)_x (N_3)_x C U (N_4)_x (N_5)_x C G C G U U$ $A G A U U U C U U U A G U U U C U N_6 N_7 C A A C U A G C A$ $A G C U U U U G U U C U C G C C (N_8 C C)_x$ $(N_2)_x$ は、ウラシルであり、x は、0～5 の整数であり、例えば配列 中、$x=3$ または 4 であり； $(N_3)_x$ は、グアニンであり、x は、0～1 の整数であり； $(N_4)_x$ は、シトシンであり、x は、0～1 の整数であり； $(N_5)_x$ は、ウラシルであり、x は、0～5 の整数であり、例えば式 中、$x=2$ または 3 であり； N_6 は、ウラシルまたはシトシンであり； N_7 は、ウラシルまたはグアニンであり； N_8 は、アデニンまたはグアニンであり、x は、0～1 の整数であ る。
60	A27	GGAAAUAUUUAGCCUGGAACGUUAGAUAAACUGUCCUGUUGU CUUUUAUAUACUUGGUCCCCAAGUAGUUUGUCUCCAAA

10

20

30

40

50

【表 3 A - 2】

61	A12	GGAAACUUUUAUUUAGUGUUACUUUUAUUUUCUGUUUUAUUUGU GUUUUCUUCAGUGGGUUUGUUCUAAUUUCCUUGGCCGCC
62	A13	GGAAAAUCUGUAUUAGGUUGGCGUGUUCUUUGGUCGGUUGU UAGUAUUGUUGUUGAUUCGUUUGUGGUCGGUUGGCCGCC
63	A14	GGAAAAUUAUUAACAUCUUGGUUAUUCUCGAUAACCAUUCGUU GGAUUUUAUUGUAUUCGUAGUUUGGGUUCUGGCCGCC
64	A15	GGAAAUUAUUUAUUUAUUUCUAGCUACAAUUUAUCAUUGUAUU AUUUUAGCUAUUCAUCAUUUAUUUACUUGGUGAUCAACA
65	A16	GGAAAUAGGUUGUUAACCAAGUUCAAGCCUAAUAAGCUUGG AUUCUGGUGACUUGCUUCACCGUUGGCGGGCACC GAUC
66	A17	GGAAAUUCGUAGAGAGUCGUACUUAGUACAUAUCGACUAUCGG UGGACACCAUCAAGAUAUAAAACCGGCCAGA
67	A18	GGAAACCCGCCCAAGCGACCCCAACAUAUCAGCAGUUGCCCA AUCCCAACUCCCAACACAAUCCCAAGCAACGCCGCC
68	A19	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUAACUACUCGAUUAAGGU UGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUUGUUGUUUCC
69	A20	GGAAACUAAUCGAAAUAAAAGAGCCCCGUACUCUUUUUAUUUC UAUUAGGUUAGGAGCCUUAGCAUUUGUAUCUUAGGUA
70	A21	GGAAAUUGUGAUUUCCAGCAACUUCUUUUGAAUAUAUUGAAU UCCUAAUUCAAAGCGAACAACAAUCUACAAGCCAUAUACC
71	A22	GGAAAUUCGUAGAGAGUCGUACUUACGUGGUCGCCAUUGCAUA GCGCGCGAAAGCAACAGGAACAAGAACGCGCC
72	A23	GGAAAUUCGUAGAGAGUCGUACUUAGAAUAAACAGAGUCGGG UCGACUUGUCUCUGAUACUACGACGUCACAAUC
73	A24	GGAAAAUUUGCCUUCGGAGUUGCGUAUCCUGAACUGCCCAGC CUCCUGAUUAACAACUGUUCCGCUUAUUCGGGCCGCC
74	A25	GGAAAUUCUGAGCAGGAUCCUUGUGCAUUGAAGACUUUAG AUUCCUCUCUGCGGUAGACGUGCACUUAUAAGUAUUUG
75	A26	GGAAAGCGAUUGAAGGCGUCUUUUAACUACUCGAUUAAGGU UGGGUAUCGUCGUGGGACUUGGAAAUUUUGUUGCCACC
76	A28	GGAAAUUUUUUUUGAUUAUUAUAAGAGUUUUUUUUUGAUUAU UAAGAAAAUUUUUUUUUGAUUAUAGAAGAGUAAGAAGAAAU AUAAGACCCCGCGCCGCCACC
77	A29	GGAAAUAAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAG CCAAAAAAAAAAAAACC
78	A30	GGAAAUUCUCCUGAGCUUCAGGGAGUAAGAGAGAAAAGAAG AGUAAGAAGAAUAUAAGACCCCGCGCCGCCACC
	A31	GCCRCC、配列中、R=A または G である
79	A32	GGAAAUUCGCAAAAUUUGCUCUUCGCGUUAGAUUUCUUUUAGU UUUCUCGCAACUAGCAAGCUUUUUGUUCUCGCC

10

20

30

40

【0589】

一実施形態において、5'UTRは、配列番号50のバリエーションを含む。一実施形態において、配列番号50のバリエーションは、式Aの核酸配列：

G G A A A U C G C A A A A (N2) X (N3) X C U
(N4) X (N5) X C G C G U U A G A U U U C U U
U U A G U U U U C U N6 N7 C A A C U A G C A
A G C U U U U U G U U C U C G C C (N8 C C) x (配列番号59)

[配列中、

(N2) x は、ウラシルであり、x は、0～5の整数であり、例えば配列中、x = 3 ま

50

たは 4 であり；

(N 3) x は、グアニンであり、x は、0 ～ 1 の整数であり；

(N 4) x は、シトシンであり、x は、0 ～ 1 の整数であり；

(N 5) x は、ウラシルであり、x は、0 ～ 5 の整数であり、例えば式中、x = 2 または 3 であり；

N 6 は、ウラシルまたはシトシンであり；

N 7 は、ウラシルまたはグアニンであり；

N 8 は、アデニンまたはグアニンであり、x は、0 ～ 1 の整数である]

を含む。

【0590】

一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、0 である。一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、1 である。一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、2 である。一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、3 である。一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、4 である。一実施形態において、(N 2) x は、ウラシルであり、x は、5 である。

【0591】

一実施形態において、(N 3) x は、グアニンであり、x は、0 である。一実施形態において、(N 3) x は、グアニンであり、x は、1 である。

【0592】

一実施形態において、(N 4) x は、シトシンであり、x は、0 である。一実施形態において、(N 4) x は、シトシンであり、x は、1 である。

【0593】

一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、0 である。一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、1 である。一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、2 である。一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、3 である。一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、4 である。一実施形態において、(N 5) x は、ウラシルであり、x は、5 である。

【0594】

一実施形態において、N 6 は、ウラシルである。一実施形態において、N 6 は、シトシンである。

【0595】

一実施形態において、N 7 は、ウラシルである。一実施形態において、N 7 は、グアニンである。

【0596】

一実施形態において、N 8 は、アデニンであり、x は、0 である。一実施形態において、N 8 は、アデニンであり、x は、1 である。

【0597】

一実施形態において、N 8 は、グアニンであり、x は、0 である。一実施形態において、N 8 は、グアニンであり、x は、1 である。

【0598】

一実施形態において、5' UTR は、配列番号 50 のバリエーションを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 50 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 60 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 70 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 80 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 90 % の同一性を備えた配列を含む

10

20

30

40

50

。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 95 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 96 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 97 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 98 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、配列番号 50 A のバリエーションは、配列番号 50 へ、少なくとも 99 % の同一性を備えた配列を含む。

【0599】

一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、または 80 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 5 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 10 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 20 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 30 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 40 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 50 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 60 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 70 % のウリジン含有量を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 80 % のウリジン含有量を含む。

【0600】

一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、少なくとも 2、3、4、5、6、または 7 の連続したウリジン（例えばポリウリジントラクト）を含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーション中のポリウリジントラクトは、少なくとも 1～7、2～7、3～7、4～7、5～7、6～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～6、または 3～5 の連続ウリジンを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーション中のポリウリジントラクトは、4 つの連続ウリジンを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーション中のポリウリジントラクトは、5 つの連続ウリジンを含む。

【0601】

一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 のポリウリジントラクトを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、3 つのポリウリジントラクトを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、4 つのポリウリジントラクトを含む。一実施形態において、配列番号 50 のバリエーションは、5 つのポリウリジントラクトを含む。

【0602】

一実施形態において、ポリウリジントラクトのうちの 1 つまたは複数は、異なるポリウリジントラクトに近接する。一実施形態において、ポリウリジントラクトの各々（例えばすべて）は、互いに近接し、例えば、ポリウリジントラクトのすべては、連続する。

【0603】

一実施形態において、ポリウリジントラクトのうちの 1 つまたは複数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、または 60 のヌクレオチドによって分離される。一実施形態において、ポリウリジントラクトの各々（例えばすべて）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、または 60 のヌクレオチドによって分離される。

【0604】

一実施形態において、第 1 のポリウリジントラクト及び第 2 のポリウリジントラクトは、互いに近接する。

【0605】

一実施形態において、後続する（例えば第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、または第10の）ポリウリジントラクトは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、または60のヌクレオチドによって、第1のポリウリジントラクト、第2のポリウリジントラクト、または後続するポリウリジントラクトのうちの任意の1つから分離される。

【0606】

一実施形態において、第1のポリウリジントラクトは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、2、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、または60のヌクレオチドによって、後続するポリウリジントラクト（例えば第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、または第10のポリウリジントラクト）から分離される。一実施形態において、後続するポリウリジントラクトのうちの1つまたは複数は、異なるポリウリジントラクトに近接する。

【0607】

一実施形態において、5' UTRは、コザック配列（例えばGCCRC Cヌクレオチド配列、配列中、Rは、アデニンまたはグアニンである）を含む。一実施形態において、コザック配列は、5' UTR配列の3'端に配置される。

【0608】

一態様において、1つまたは複数IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするオープンリーディングフレーム（例えば配列番号300、301、または302）を含み、本明細書において開示される5' UTR配列を含むポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、LNPとして製剤化される。一実施形態において、LNP組成物は、(i) イオン化可能脂質（例えばアミノ脂質）；(ii) ステロールまたは他の構造脂質；(iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質；及び(iv) PEG-脂質を含む。

【0609】

b. 3' UTR配列

3' UTR配列は、mRNAの翻訳、半減期、及び細胞内局在に影響を及ぼすことが示されている（Mayr C., Cold Spring Harb Persp Biol 2019 Oct 1; 11(10): a034728）。

【0610】

1つまたは複数IDO抗原性ペプチド及び1つまたは複数PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするオープンリーディングフレーム（例えば配列番号300、301、または302）を含むポリヌクレオチド（例えばmRNA）であって、前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはポリヌクレオチドそれ自体の半減期の増加、発現の増加、及び／または活性の増加を付与する3' UTRを有する、ポリヌクレオチドが、とりわけ本明細書において開示される。一実施形態において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、(a) 5'-UTR（例えば本明細書において記載されるようなもの）；(b) 終止エレメントを含むコーディング領域（例えば本明細書において記載されるようなもの）；及び(c) 3'-UTR（例えば表3B中で提供されるようなものまたはそれらのバリエーションもしくは断片）を含み、LNP組成物は、これらを含む。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、表3B中で提供される配列またはそれらのバリエーションもしくは断片を含む3'-UTRを含む。

【0611】

一実施形態において、表3B中で提供される3' UTR配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエーションもしくは断片は、ポリヌクレオチドの半減期の増加（例えばポリヌクレオチドの半減期の約1.5～10倍の増加）をもたらす。一実施形態において、半減期の増加は、約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10倍、またはそれを超える。一実施形態において、半減期の増加は、約1.5倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約2倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約3倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約4倍以上である。一実施

10

20

30

40

50

形態において、半減期の増加は、約 5 倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約 6 倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約 7 倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約 8 倍である。一実施形態において、半減期の増加は、約 9 倍以上である。一実施形態において、半減期の増加は、約 10 倍以上である。

【0612】

一実施形態において、表 3 B 中で提供される 3' UTR 配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエーションもしくは断片は、10 を超える半減期スコアを備えたポリヌクレオチドをもたらす。

【0613】

一実施形態において、表 3 B 中で提供される 3' UTR 配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエーションもしくは断片は、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのレベル及び／または活性（例えばアウトプット）の増加をもたらす。

10

【0614】

一実施形態において、増加は、3' UTR を有しないか、異なる 3' UTR を有するか、あるいは表 3 B 中で記載される 3' UTR またはそれらのバリエーションもしくは断片を有しない、他の点では類似のポリヌクレオチドへ比較される。

【0615】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、表 3 B 中で提供される 3' UTR 配列、あるいは表 3 B 中で提供される 3' UTR 配列またはそれらのバリエーションもしくは断片へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 107、配列番号 108、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 111、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 114、配列番号 115、配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138、配列番号 139、配列番号 140、または配列番号 141 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を備えた配列を含む。

20

【0616】

一実施形態において、3' UTR は、配列番号 100 の配列、または配列番号 100 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 101 の配列、または配列番号 101 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 102 の配列、または配列番号 102 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 103 の配列、または配列番号 103 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 104 の配列、または配列番号 104 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 105 の配列、または配列番号 105 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 106 の配列、または配列番号 106 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 107 の配列、または配列番号 107 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTR は、配列番号 108 の配列、または配列番号 108 へ、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の同

30

40

50

一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号109の配列、または配列番号109へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号110の配列、または配列番号110へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号111の配列、または配列番号111へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号112の配列、または配列番号112へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号113の配列、または配列番号113へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号114の配列、または配列番号114へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号115の配列、または配列番号115へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号136の配列、または配列番号136へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号137の配列、または配列番号137へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号138の配列、または配列番号138へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号139の配列、または配列番号139へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号140の配列、または配列番号140へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。一実施形態において、3' UTRは、配列番号141の配列、または配列番号141へ、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を備えた配列を含む。

10

20

30

40

50

【表 3 B - 1】

表 3 B : 3' UTR 配列

配列番号	配列名称	配列
100	B1	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUUAU UGAGAAGAUCGGAACAGCUCCUUACUCUGAGGAAGUUGGUAC CCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
101	B3	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCACUCUCCUCUCCAUCCCGUAUC CAGGCUGUGAAUUUUUCAAGGAAUUAUAAAGAUCCGGAUGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
102	B4	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCUAGUGACGGCAACAGGGCUUGG UUUUUCCUUGUUGUGAAAUCGACAUCUCUGAAGACAGGGUAC CCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
103	B5	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCCUCCAUCUAGUCACAAAGACU CCUUCGUCCCCAGUUGCCGUCUAGGAUUGGGCCUCCAGUAC CCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
104	B6	UGAUAGUAAGCUGGAGCCUCCCAUAACAUGACAUAUCUGGAU UUUGUGCUUAGAACC UUAAA UUGGAAGCAUUCUAAUUGUA CCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
105	B7	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCCGAAAACUAAAAUAGAGAU UUUCAAGAUUUUAUAAU UUUC AAAGACCUUGAAAUAUUGU ACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
106	B8	UAAUAGUAAGCUGGAGCCUCUACACAUUGC UUCUAGUUGGCA GAAAUAAUUGAUUAAAAGACCAGAAACUGUGAUAAACUGGUA CCCCCGUGGUCUUUAAA UAAAGUCUAAGUGGGCGGC
107	B9	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
108	B10	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
109	B11	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAG UCUGAGUGGGCGGC
110	B12	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCUUUGAAUAAAG UCUGAGUGGGCGGC

10

20

30

40

50

【表 3 B - 2】

111	B13	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAA GUCUGAGUGGGCGGC
112	B14	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCCGCAUUAUUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAG UCUGAGUGGGCGGC
113	B15	UGAUAAUAGUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCU CGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCU CCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCCGCAUUAUUACUCACGG UACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
114	B16	UGAUAAUAGUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCU CGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAGUAGG AAACACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCG UACCCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAA UAAAGUCUGAGUGGGCGGC
115	B2	CUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGAACAGCUC CUUACUCUGAGGAAGUUG
116	B17	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCUCACACACCUCUGCCCCUUGGG CCUCCACUCCCAUGGCUCUGGGCGGUCCAGAAGGAGCGUAC CCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
117	B18	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCCACCGCGUUAUCCGUUCCUCGU AGGCUGGUCCUGGGGAACGGGUCGGCGGGUACCCCCGUGGUC UUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
118	B19	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCUGCCCCGCAACGGCCAGGUCUG UGCCAAGUGUUUGCUGACGCAACCCCCACUGGCUGGGGCUUG GUCAUGGGCCAUCAGCGCGUGCGUGGAACCUUUUCGGCUCCU CUGCCGAUCCAUAUCUGCGGAACUCCUAGCCGCUUGUUUUGCU CGCAGCAGGUCUGGAGCAAACAUUAUCGGGACUGAAACUCU GUUGUCCUGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG GCGGC
119	B20	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU GAGUGGGCGGC

10

20

30

40

50

【表 3 B - 3】

120	B21	UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCU GAGUGGGCGGC
133	B22	UAAGUCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGG UGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAGUAGGAAA CACUACAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUAC CCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAA AGUCUGAGUGGGCGGC
134	B23	UAAAGCGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGG GCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC UCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUAAAGUC UGAGUGGGCGGC
135	B24	UAAAGCUCCCCGGGGUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGCUG GAGCCUCCUGAGAGACCUGUGUGAACUAUUGAGAAGAUCGGA ACAGCUCCUACUCUGAGGAAGUUGUCCAUAAGUAGGAAAC ACUACAGUACCCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
136	B25	UAAUAGUAAACCUCACUCACGGCCACAUUGAGUGCCAGGCUC CGGGCUGGUUUUAGUAGUGUAGAGCAUUGCAGCACUUAGAC UGGGGUGCUGUAGUCUUUAUUGUAGUCUUUCCACAUACCUGA UAAUUCUUAGAUAAUUCUUAUUUUAAUCCAUAAGUAGG AAACACUACAUAUUCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUAU UCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAUAAGGCU
137	B26	GCCUCCACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGG AACGGGUCGGCGGGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC
138	B27	CACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGGAACGG GUCGGCGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCC ACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGGAACGGG UCGGCGGUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUAC CCCCACCGCGUUAUCCGUUCCUCGUAGGCUGGUCCUGGGGA ACGGGUCGGCGGGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCG GC
139	B28	UAAAGCUCCCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC

10

20

30

40

50

【表 3 B - 4】

140	B29	UAAGUCUCCGCGUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC
141	B30	UAAGCCCCUCCGGGGGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCU UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC

10

【0617】

一態様において、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、(a) 5' - UTR (例えば本明細書において記載されるようなもの) ; (b) 終止エレメントを含むコーディング領域 (例えば本明細書において記載されるようなもの) ; 及び (c) 3' - UTR (例えば本明細書において記載されるようなもの) を含む、該ポリヌクレオチドが本明細書において開示される。

【0618】

一態様において、(i) 1つまたは複数 IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数 PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするオープンリーディングフレーム (例えば配列番号 6、300、301、または 302) を含み、本明細書において開示される 3' UTR を含むポリヌクレオチドを含む LNP 組成物は、(i) イオン化可能脂質 (例えばアミノ脂質) ; (ii) ステロールまたは他の構造脂質 ; (iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質 ; 及び (iv) PEG-脂質を含む。

20

【0619】

5' キャップを有する領域

本開示は、5' キャップ及び本発明のポリヌクレオチド (例えばチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド) の両方を含むポリヌクレオチドも包含する。

30

【0620】

天然の mRNA の 5' キャップ構造は、核外輸送に関与し、mRNA 安定性を増加させ、mRNA キャップ結合タンパク質 (CBP) に結合し、このことは、CBP がポリ (A) 結合タンパク質と会合して、成熟した環状の mRNA 種を形成することを介して、細胞中の mRNA 安定性及び翻訳能力を担う。キャップは、mRNA スプライシングの間の 5' 近位のイントロンの除去をさらに支援する。

【0621】

内在性 mRNA 分子は、キャッピングされた 5' 端であり得、末端グアノシンキャップ残基と mRNA 分子の 5' 末端の転写されたセンスヌクレオチドとの間で 5' - ppp - 5' - 三リン酸結合を生成する。次いでこの 5' グアニル酸キャップはメチル化されて、N7 - メチル - グアニル酸残基を生成し得る。mRNA の 5' 端の末端及び / または末端前 (ante-terminal) の転写されたヌクレオチドのリボース糖も、任意選択で 2' - O - メチル化され得る。グアニル酸キャップ構造の加水分解及び切断を介する 5' 脱キャッピングは、核酸分子 (mRNA 分子等) を分解のために標的化し得る。

40

【0622】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド (例えばチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド) は、キャップ部分を取り込む。

【0623】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド (例えばチェックポイントが

50

んワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド)は、脱キャッピングを防止し、したがってmRNA半減期を増加させる、非加水分解可能キャップ構造を含む。キャップ構造の加水分解が、5'-ppp-5'ホスホロジエステル結合の切断を要求するので、修飾ヌクレオチドは、キャッピング反応の間に使用され得る。例えば、New England Biolabs (Ipswich, MA)からのワクシニアキャッピング酵素を、製造者の指示に従って α -チオ-グアノシンヌクレオチドと共に使用して、5'-ppp-5'キャップ中のホスホロチオエート結合を生成することができる。追加の修飾グアノシンヌクレオチドは使用され得、 α -メチル-ホスホネートヌクレオチド及びセレノ-ホスフェートヌクレオチド等である。

【0624】

10

追加の修飾としては、糖環の2'-ヒドロキシル基上のポリヌクレオチドの5'末端及び／または5'末端前(anteterminal)のヌクレオチドのリボース糖の2'-O-メチル化(上で言及されるような)が挙げられるがこれらに限定されない。複数の別個の5'キャップ構造が使用されて、核酸分子(mRNA分子として機能するポリヌクレオチド等)の5'キャップを生成し得る。キャップ類似体(合成キャップ類似体、化学的キャップ、化学的キャップ類似体、または構造的キャップ類似体もしくは機能的キャップ類似体とも本明細書において称される)は、化学構造において天然の(すなわち内在性、野生型、または生理的な)5'キャップとは異なるが、キャップ機能を保持している。キャップ類似体は、化学的に(すなわち非酵素的に)または酵素的に合成され得る、及び／または本発明のポリヌクレオチドへ連結され得る。

20

【0625】

例えば、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)キャップは、5'-5'-三リン酸基によって連結された2つのグアニンを含有し、1つのグアニンは、N7メチル基そして3'-O-メチル基を含有する(すなわちN7, 3'-O-ジメチル-グアノシン-5'-三リン酸-5'-グアノシン(m7G-3'mppp-G;これは同等に3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')Gと表記され得る))。他方の非修飾グアニンの3'-O原子は、キャッピングされたポリヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドへ連結される。N7-メチル化及び3'-O-メチル化されたグアニンは、キャッピングされたポリヌクレオチドの末端部分を提供する。

【0626】

30

別の例示的なキャップはmCAPであり、これはARCAに類似するが、グアノシン上に2'-O-メチル基を有する(すなわちN7, 2'-O-ジメチル-グアノシン-5'-三リン酸-5'-グアノシン、m7Gm-ppp-G)。

【0627】

別の例示的なキャップは、m7G-ppp-Gm-A(すなわちN7, グアノシン-5'-三リン酸-2'-O-ジメチル-グアノシン-アデノシン)である。

【0628】

いくつかの実施形態において、キャップは、ジヌクレオチドキャップ類似体である。非限定例として、ジヌクレオチドキャップ類似体は、ボラノホスフェート基またはホスホロセレノエート基により異なるリン酸塩位置で修飾され得、米国特許第8,519,110号(その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される)において記載されるジヌクレオチドキャップ類似体等である。

40

【0629】

別の実施形態において、キャップは、キャップ類似体であり、当技術分野において公知の及び／または本明細書において記載されるキャップ類似体のN7-(4-クロロフェノキシエチル)置換ジヌクレオチド形態である。キャップ類似体のN7-(4-クロロフェノキシエチル)置換ジヌクレオチド形態の非限定例としては、N7-(4-クロロフェノキシエチル)-G(5')ppp(5')Gキャップ類似体及びN7-(4-クロロフェノキシエチル)-m3'-OG(5')ppp(5')Gキャップ類似体が挙げられる(例えばKore et al. Bioorganic & Medicinal Chemi

50

stry 2013 21: 4570-4574において記載される様々なキャップ類似体及びキャップ類似体を合成する方法を参照；その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）。別の実施形態において、本発明のキャップ類似体は、4-クロロ／プロモフェノキシエチル類似体である。

【0630】

キャップ類似体が、ポリヌクレオチドまたはその領域の同時のキャッピングを可能にするが、インビトロ転写反応において、転写物の最大20%は非キャップのままであり得る。このこと、そして内在性の細胞性転写機構によって産生される核酸の内在性5'キャップ構造とのキャップ類似体の構造的な差異は、翻訳能力の低減及び細胞での安定性の低減を導き得る。

【0631】

本発明のポリヌクレオチド（例えば（i）1つまたは複数IDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数PD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、酵素を使用して、製造後（IVTまたは化学的合成かどうかにかかわらず）にもキャッピングされて、より真正の5'キャップ構造を生成し得る。本明細書において使用される時、「より真正の」という語句は、内在性の特色または野生型の特色を、構造的にまたは機能的にのいずれかで、厳密に反映または模倣する特色を指す。すなわち、「より真正な」特色は、先行技術の合成的特色または類似体などに比較して、内在性、野生型、天然、または生理学的な細胞の機能及び／または構造をよりよく表すか、あるいは1つまたは複数の点で対応する内在性、野生型、天然、生理学的な特色より優れている。本発明のより真正の5'キャップ構造の非限定例は、とりわけ、当技術分野において公知の合成の5'キャップ構造に（または野生型、天然、もしくは生理学的な5'キャップ構造に）比較して、キャップ結合タンパク質の結合の促進、半減期の増加、5'エンドヌクレアーゼへの感受性の低減、及び／または5'脱キャッピングの低減を有するものである。例えば、組み換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組み換え2'-O-メチル基転移酵素は、ポリヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドとグアニンキャップヌクレオチドとの間でカノニカルな5'-5'-三リン酸結合を生成し得、キャップグアニンは、N7メチル化を含有し、mRNAの5'末端ヌクレオチドは、2'-O-メチルを含有する。かかる構造は、キャップ1構造と称される。このキャップは、例えば当技術分野において公知の他の5'キャップ類似体構造に比較して、より高い翻訳能力及び細胞安定性ならびに細胞炎症促進性サイトカインの活性化の低減をもたらす。キャップ構造としては、7mG(5')ppp(5')N1pN2p(キャップ0)、7mG(5')ppp(5')N1mpN2p(キャップ1)、及び7mG(5')-ppp(5')N1mpN2mp(キャップ2)が挙げられるがこれらに限定されない。キャップ1は、時には本明細書においてキャップC1と称される。いくつかの実施形態において、キャップC1は、任意選択でキャップの3'端で追加のGを含み得る。いくつかの実施形態において、キャップC1中で、N2は、5'UTRの第1のヌクレオチドを含み得る。

【0632】

非限定例として、キメラポリヌクレオチドを製造後にキャッピングすることは、キメラポリヌクレオチドのほぼ100%がキャッピングされ得るので、より効率的であり得る。このことは、キャップ類似体がインビトロ転写反応の間にキメラポリヌクレオチドへ連結される場合の約80%効率と対照的である。

【0633】

本発明によれば、5'末端キャップは、内在性のキャップまたはキャップ類似体を包含し得る。本発明によれば、5'末端キャップは、グアニン類似体を含み得る。有用なグアニン類似体としては、イノシン、N1-メチル-グアノシン、2'-フルオロ-グアノシン、7-デアザ-グアノシン、8-オキソ-グアノシン、2'-アミノ-グアノシン、LNA-グアノシン、及び2'-アジド-グアノシンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0634】

RNAポリメラーゼ（例えば野生型RNAポリメラーゼまたはそのバリエーション、例えば本明細書において記載されるそれらのバリエーション等）を使用する、リボ核酸（RNA）合成のための共転写キャッピング方法において使用され得るものを包含する例示的なキャップも本明細書において提供される。一実施形態において、RNAが「ワンポット」反応において産生される場合に、キャップは添加され得、別個のキャッピング反応を必要としない。したがって、方法は、いくつかの実施形態において、RNAポリメラーゼバリエーション、ヌクレオシド三リン酸、及びキャップ類似体とポリヌクレオチド鋳型を、インビトロ転写反応条件下で反応させて、RNA転写物を産生することを含む。

【0635】

キャップ類似体は、例えばジヌクレオチドキャップ、トリヌクレオチドキャップ、またはテトラヌクレオチドキャップであり得る。いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、ジヌクレオチドキャップである。いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、トリヌクレオチドキャップである。いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、テトラヌクレオチドキャップである。本明細書において使用される時、「キャップ」という用語は、逆向きGヌクレオチドを含み、逆向きGヌクレオチドの3'で1つまたは複数の追加のヌクレオチド（例えば逆向きGヌクレオチドの3'及び5'UTR（例えば本明細書において記載される5'UTR））に対して5'で1つ、2、またはそれを超えるヌクレオチドを含み得る。

【0636】

例示的なキャップは、

【化159】

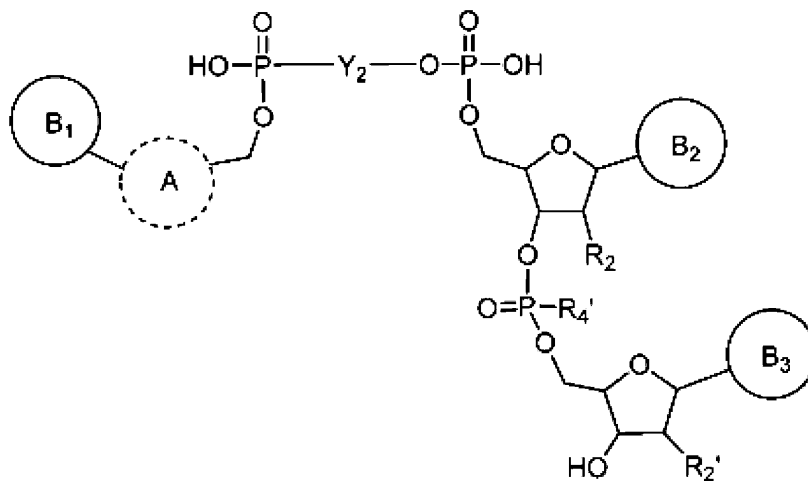
GG、GA、またはGGA

の配列を含み、配列中、下線でイタリック体のGは逆向きGヌクレオチドであり、5' - 5'三リン酸基が続く。

【0637】

トリヌクレオチドキャップは、いくつかの実施形態において、式(I)の化合物

【化160】



(I)、

またはその立体異性体、互変異性体、もしくは塩〔式中、

10

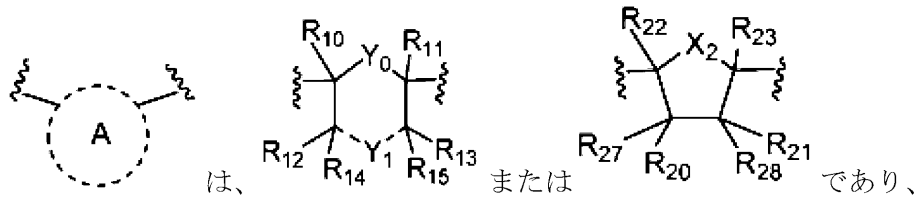
20

30

40

50

【化 1 6 1】



環 B 1 は、修飾または非修飾のグアニンであり；

10

環 B 2 及び環の B 3 は各々独立して、核酸塩基または修飾核酸塩基であり；

X 2 は、O、S (O) p または NR 2 4 または CR 2 5 R 2 6 (式中、p は、0、1、または 2 である) であり；

Y 0 は、O または CR 6 R 7 であり；

Y 1 は、O、S (O) n、CR 6 R 7、または NR 8、(式中、n は、0、1、または 2 である) であり；

各々の --- は、単結合であるかまたは非存在であり、各々の --- が単結合である場合に、Y i は、O、S (O) n、CR 6 R 7、または NR 8 であり；各々の --- が非存在である場合に、Y 1 は、欠けており；

Y 2 は、(OP (O) R 4) m (式中、m は 0、1、または 2 である) であるか、または -O- (CR 4 0 R 4 1) u - Q 0 - (CR 4 2 R 4 3) v - (式中、Q 0 は、結合、O、S (O) r、NR 4 4、または CR 4 5 R 4 6 であり、r は、0、1、または 2 であり、u 及び v の各々は、独立して 1、2、3、または 4 である) であり；

20

各々の R 2 及び R 2 ' は、独立してハ口、LNA、または OR 3 であり；

各々の R 3 は独立して、H、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、または C 2 - C 6 アルキニルであり、R 3 は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、または C 2 - C 6 アルキニルである場合に、ハ口、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシル (1 つまたは複数の OH または OC (O) - C 1 - C 6 アルキルにより任意選択で置換された) のうちの 1 つまたは複数により任意選択で置換され；

各々の R 4 及び R 4 ' は独立して、H、ハ口、C 1 - C 6 アルキル、OH、SH、Se H、または BH 3 - であり；

30

R 6、R 7、及び R 8 の各々は独立して、-Q 1 - T 1 であり、Q 1 は、結合、またはハ口、シアノ、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシのうちの 1 つまたは複数により任意選択で置換された C 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 1 は、H、ハ口、OH、COOH、シアノ、または Rs 1 であり、Rs 1 は、C 1 - C 3 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、C 2 - C 6 アルキニル、C 1 - C 6 アルコキシル、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、NR 3 1 R 3 2、(NR 3 1 R 3 2 R 3 3) +、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、または 5 員もしくは 6 員のヘテロアリールであり、Rs 1 は、ハ口、OH、オキソ、C 1 - C 6 アルキル、COOH、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、シアノ、C 1 - C 6 アルコキシル、NR 3 1 R 3 2、(NR 3 1 R 3 2 R 3 3) +、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、及び 5 員または 6 員のヘテロアリールからなる群から選択される 1 つまたは複数の置換基により任意選択で置換され；

40

R 1 0、R 1 1、R 1 2、R 1 3、R 1 4、及び R 1 5 の各々は独立して、-Q 2 - T 2 であり、Q 2 は、結合、またはハ口、シアノ、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシのうちの 1 つもしくは複数により任意選択で置換された C 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 2 は、H、ハ口、OH、NH 2、シアノ、NO 2、N 3、Rs 2、または OR s 2 であり、Rs 2 は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、C 2 - C 6 アルキニル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、NHC (O) - C 1 - C 6 アルキル、NR 3 1 R 3 2、(NR 3 1 R 3 2 R 3 3) +、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、また

50

は5員もしくは6員のヘテロアリールであり、R s 2は、ハロ、OH、オキソ、C 1 - C 6 アルキル、COOH、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、シアノ、C 1 - C 6 アルコキシル、NR 3 1 R 3 2、(NR 3 1 R 3 2 R 3 3) +、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 1 0 アリール、4 ~ 1 2 員のヘテロシクロアルキル、及び5員または6員のヘテロアリールからなる群から選択される1つまたは複数の置換基により任意選択で置換されるか；あるいは代替的に、R 1 2は、R 1 4と一緒にオキソであるか、またはR 1 3は、R 1 5と一緒にオキソであり、

R 2 0、R 2 1、R 2 2、及びR 2 3の各々は独立して、-Q 3 -T 3であり、Q 3は、結合、またはハロ、シアノ、OH、及びC 1 - C 6 アルコキシのうちの1つもしくは複数により任意選択で置換されたC 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 3は、H、ハロ、OH、NH 2、シアノ、NO 2、N 3、RS 3、またはORS 3であり、RS 3は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、C 2 - C 6 アルキニル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 1 0 アリール、NHC (O) - C 1 - C 6 アルキル、モノC 1 - C 6 アルキルアミノ、ジC 1 - C 6 アルキルアミノ、4 ~ 1 2 員のヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員のヘテロアリールであり、R s 3は、ハロ、OH、オキソ、C 1 - C 6 アルキル、COOH、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、シアノ、C 1 - C 6 アルコキシル、アミノ、モノ-C 1 - C 6 アルキルアミノ、ジC 1 - C 6 アルキルアミノ、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 1 0 アリール、4 ~ 1 2 員のヘテロシクロアルキル、及び5員または6員のヘテロアリールからなる群から選択される1つまたは複数の置換基により任意選択で置換され；

R 2 4、R 2 5、及びR 2 6の各々は独立して、HまたはC 1 - C 6 アルキルであり；

R 2 7及びR 2 8の各々は独立して、HもしくはOR 2 9であるか；またはR 2 7及びR 2 8は、一緒にO - R 3 0 - Oを形成し；各々のR 2 9は、独立してH、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、またはC 2 - C 6 アルキニルであり、R 2 9は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、またはC 2 - C 6 アルキニルである場合に、ハロ、OH、及びC 1 - C 6 アルコキシル（1つまたは複数のOHまたはOC (O) - C 1 - C 6 アルキルにより任意選択で置換された）のうちの1つまたは複数により任意選択で置換され；

R 3 0は、ハロ、OH、及びC 1 - C 6 アルコキシルのうちの1つまたは複数により任意選択で置換されたC 1 - C 6 アルキレンであり；

R 3 1、R 3 2、及びR 3 3の各々は独立して、H、C 1 - C 6 アルキル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 1 0 アリール、4 ~ 1 2 員のヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員のヘテロアリールであり；

R 4 0、R 4 1、及びR 4 2及びR 4 3の各々は独立して、H、ハロ、OH、シアノ、N 3、OP (O) R 4 7 R 4 8、または1つもしくは複数のOP (O) R 4 7 R 4 8により任意選択で置換されたC 1 - C 6 アルキルであるか、あるいは1つのR 4 1及び1つのR 4 3は、それらが結合されている炭素原子及びQ 0と一緒に、C 4 - C 1 0 シクロアルキル、4 ~ 1 4 員のヘテロシクロアルキル、C 6 - C 1 0 アリール、または5 ~ 1 4 員のヘテロアリールを形成し、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、フェニル、または5 ~ 6 員のヘテロアリールの各々は、OH、ハロ、シアノ、N 3、オキソ、OP (O) R 4 7 R 4 8、C 1 - C 6 アルキル、C 1 - C 6 ハロアルキル、COOH、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、C 1 - C 6 アルコキシル、C 1 - C 6 ハロアルコキシル、アミノ、モノ-C 1 - C 6 アルキルアミノ、及びジC 1 - C 6 アルキルアミノのうちの1つまたは複数により任意選択で置換され；

R 4 4は、H、C 1 - C 6 アルキル、またはアミン保護基であり；

R 4 5及びR 4 6の各々は独立して、H、OP (O) R 4 7 R 4 8、または1つもしくは複数のOP (O) R 4 7 R 4 8により任意選択で置換されたC 1 - C 6 アルキルであり、

各々のR 4 7及びR 4 8は独立して、H、ハロ、C 1 - C 6 アルキル、OH、SH、SeH、またはBH 3である]

を含む。

【0638】

本明細書において提供されるキャップ類似体は、2017年4月20日に公開された国際公開WO2017/066797（参照することによってその全体が本明細書に援用される）において記載されるキャップ類似体のうちの任意のものを包含し得ることを理解されたい。

【0639】

いくつかの実施形態において、B2中央位置は、非リボース分子（アラビノース等）であり得る。

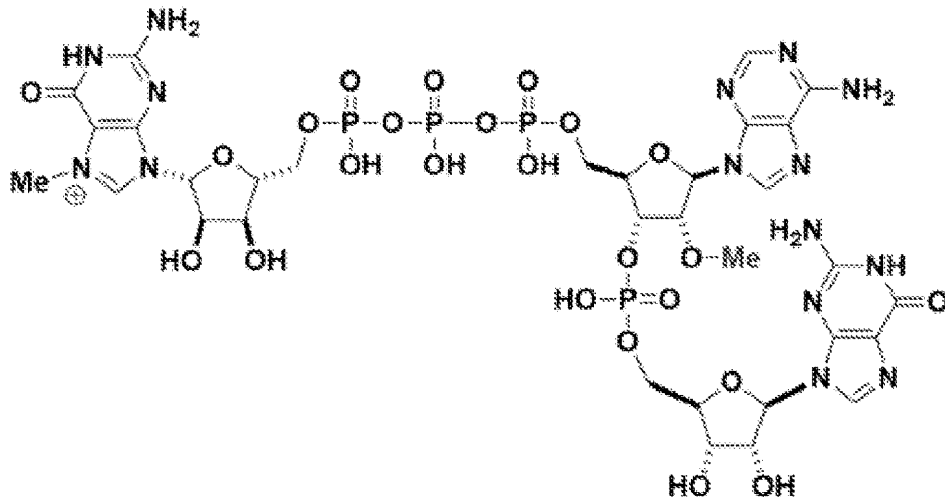
【0640】

いくつかの実施形態において、R2は、エチルベースである。

【0641】

したがって、いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の構造：

【化162】



(II)

を含む。

【0642】

他の実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の構造：

10

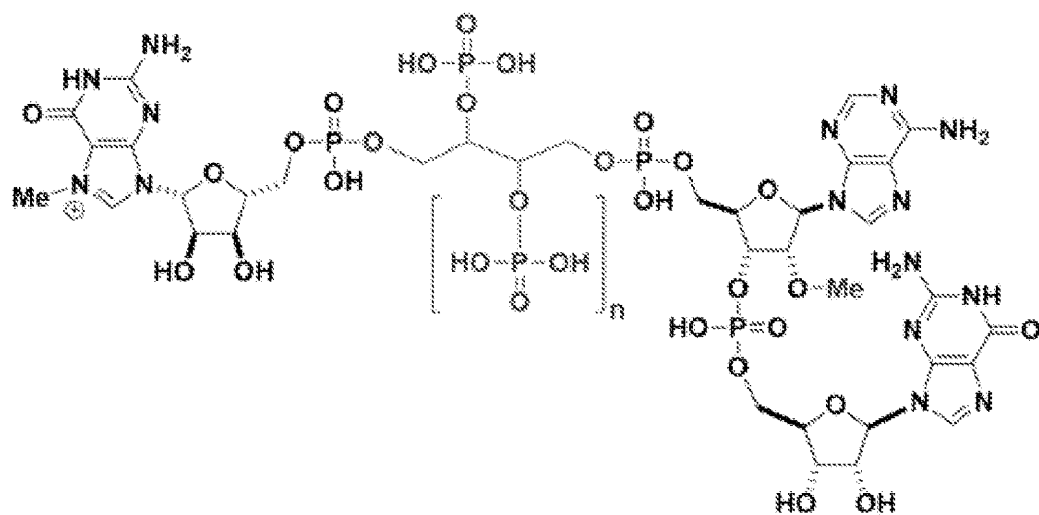
20

30

40

50

【化 1 6 3】



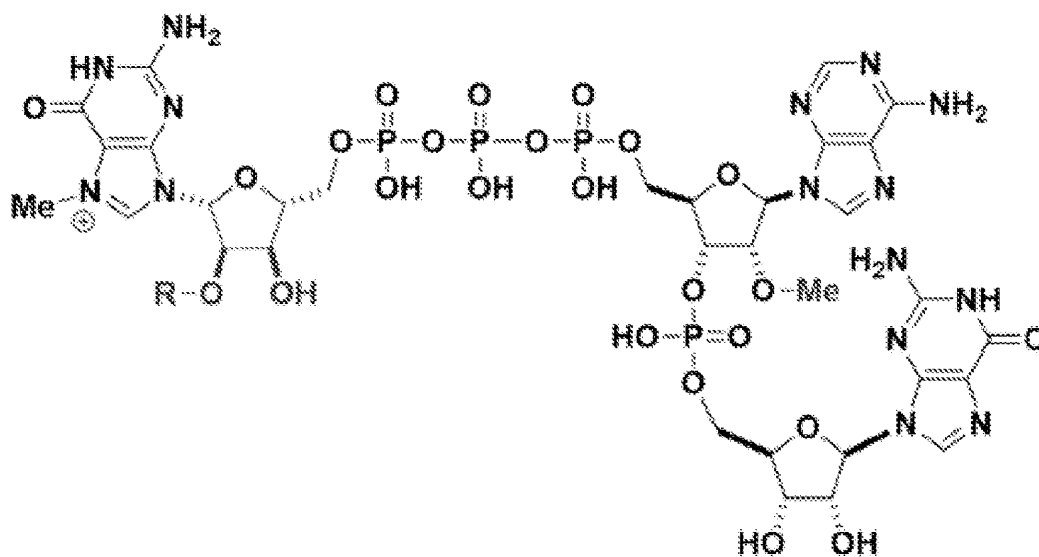
(III)

を含む。

【 0 6 4 3】

さらに他の実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の構造：

【化 1 6 4】



(IV)

を含む。

【 0 6 4 4】

さらに他の実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の構造：

10

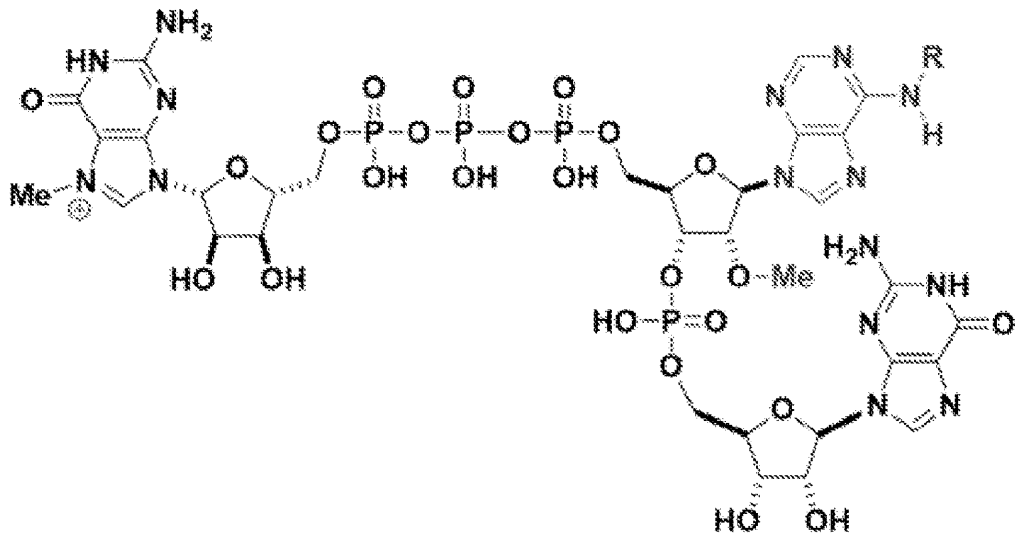
20

30

40

50

【化 1 6 5】



(V)

を含む。

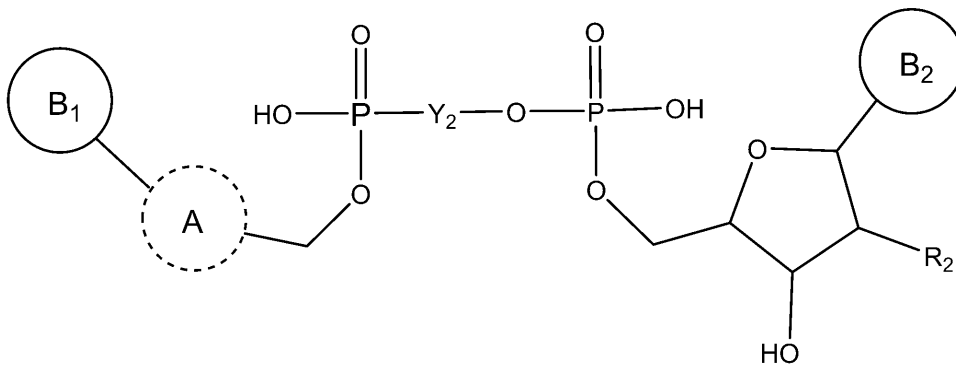
【 0 6 4 5】

いくつかの実施形態において、Rは、アルキル（例えばC₁－C₆アルキル）である。
 いくつかの実施形態において、Rは、メチル基（例えばC₁アルキル）である。いくつかの実施形態において、Rは、エチル基（例えばC₂アルキル）である。

【 0 6 4 6】

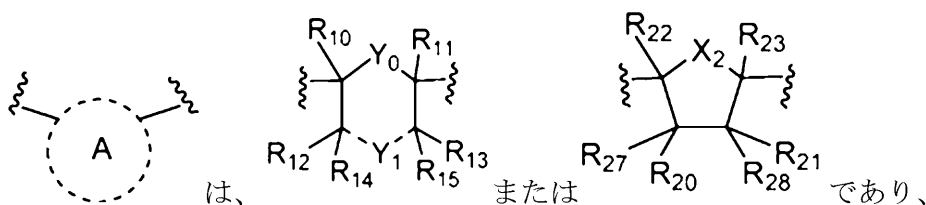
ジヌクレオチドキャップは、いくつかの実施形態において、式（I－b）の化合物

【化 1 6 6】



(I－b)、

またはその立体異性体、互変異性体、もしくは塩〔式中、
 【化 1 6 7】



環 B 1 は、修飾または非修飾のグアニンであり；

環 B 2 は、核酸塩基または修飾核酸塩基であり；

X 2 は、O、S (O) p または N R 2 4 または C R 2 5 R 2 6 (式中、p は、0、1、または 2 である) であり；

Y 0 は、O または C R 6 R 7 であり；

Y 1 は、O、S (O) n、C R 6 R 7、または N R 8、(式中、n は、0、1、または 2 である) であり；

各々の --- は、単結合であるかまたは非存在であり、各々の --- が単結合である場合に、Y 1 は、O、S (O) n、C R 6 R 7、または N R 8 であり；各々の --- が非存在である場合に、Y 1 は、欠けており；

Y 2 は、(O P (O) R 4) m (式中、m は 0、1、または 2 である) であるか、または -O- (C R 4 0 R 4 1) u - Q 0 - (C R 4 2 R 4 3) v - (式中、Q 0 は、結合、O、S (O) r、N R 4 4、または C R 4 5 R 4 6 であり、r は、0、1、または 2 であり、u 及び v の各々は、独立して 1、2、3、または 4 である) であり；

R 2 は、ハ口、L N A、または O R 3 であり；

各々の R 3 は独立して、H、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、または C 2 - C 6 アルキニルであり、R 3 は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、または C 2 - C 6 アルキニルである場合に、ハ口、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシル (1 つまたは複数の OH または O C (O) - C 1 - C 6 アルキルにより任意選択で置換された) のうちの 1 つまたは複数により任意選択で置換され；

R 4 は、H、ハ口、C 1 - C 6 アルキル、OH、S H、S e H、または B H 3 - であり；

R 6、R 7、及び R 8 の各々は独立して、- Q 1 - T 1 であり、Q 1 は、結合、またはハ口、シアノ、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシのうちの 1 つまたは複数により任意選択で置換された C 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 1 は、H、ハ口、OH、C O O H、シアノ、または R s 1 であり、R s 1 は、C 1 - C 3 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、C 2 - C 6 アルキニル、C 1 - C 6 アルコキシル、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、N R 3 1 R 3 2、(N R 3 1 R 3 2 R 3 3) +、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、または 5 員もしくは 6 員のヘテロアリールであり、R s 1 は、ハ口、OH、オキソ、C 1 - C 6 アルキル、C O O H、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、シアノ、C 1 - C 6 アルコキシル、N R 3 1 R 3 2、(N R 3 1 R 3 2 R 3 3) +、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、及び 5 員または 6 員のヘテロアリールからなる群から選択される 1 つまたは複数の置換基により任意選択で置換され；

R 1 0、R 1 1、R 1 2、R 1 3、R 1 4、及び R 1 5 の各々は独立して、- Q 2 - T 2 であり、Q 2 は、結合、またはハ口、シアノ、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシのうちの 1 つもしくは複数により任意選択で置換された C 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 2 は、H、ハ口、OH、N H 2、シアノ、N O 2、N 3、R s 2、または O R s 2 であり、R s 2 は、C 1 - C 6 アルキル、C 2 - C 6 アルケニル、C 2 - C 6 アルキニル、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、N H C (O) - C 1 - C 6 アルキル、N R 3 1 R 3 2、(N R 3 1 R 3 2 R 3 3) +、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、または 5 員もしくは 6 員のヘテロアリールであり、R s 2 は、ハ口、OH、オキソ、C 1 - C 6 アルキル、C O O H、C (O) O - C 1 - C 6 アルキル、シアノ、C 1 - C 6 アルコキシル、N R 3 1 R 3 2、(N R 3 1 R 3 2 R 3 3) +、C 3 - C 8 シクロアルキル、C 6 - C 10 アリール、4 ~ 12 員のヘテロシクロアルキル、及び 5 員または 6 員のヘテロアリールからなる群から選択される 1 つまたは複数の置換基により任意選択で置換されるか；あるいは代替的に、R 1 2 は、R 1 4 と一緒にオキソであるか、または R 1 3 は、R 1 5 と一緒にオキソであり、

R 2 0、R 2 1、R 2 2、及び R 2 3 の各々は独立して、- Q 3 - T 3 であり、Q 3 は、結合、またはハ口、シアノ、OH、及び C 1 - C 6 アルコキシのうちの 1 つもしくは複数により任意選択で置換された C 1 - C 3 アルキルリンカーであり、T 3 は、H、ハ口、

10

20

30

40

50

OH、NH₂、シアノ、NO₂、N₃、RS₃、またはORS₃であり、RS₃は、C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニル、C₃－C₈シクロアルキル、C₆－C₁₀アリール、NHC(O)－C₁－C₆アルキル、モノC₁－C₆アルキルアミノ、ジC₁－C₆アルキルアミノ、4～12員のヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員のヘテロアリールであり、Rs₃は、ハロ、OH、オキソ、C₁－C₆アルキル、COOH、C(O)O－C₁－C₆アルキル、シアノ、C₁－C₆アルコキシル、アミノ、モノ－C₁－C₆アルキルアミノ、ジC₁－C₆アルキルアミノ、C₃－C₈シクロアルキル、C₆－C₁₀アリール、4～12員のヘテロシクロアルキル、及び5員または6員のヘテロアリールからなる群から選択される1つまたは複数の置換基により任意選択で置換され；

10

R₂₄、R₂₅、及びR₂₆の各々は独立して、HまたはC₁－C₆アルキルであり；

R₂₇及びR₂₈の各々は独立して、HもしくはORS₂₉であるか；またはR₂₇及びR₂₈は、一緒にO－R₃₀－Oを形成し；各々のR₂₉は、独立してH、C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、またはC₂－C₆アルキニルであり、R₂₉は、C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、またはC₂－C₆アルキニルである場合に、ハロ、OH、及びC₁－C₆アルコキシル（1つまたは複数のOHまたはOC(O)－C₁－C₆アルキルにより任意選択で置換された）のうちの1つまたは複数により任意選択で置換され；

R₃₀は、ハロ、OH、及びC₁－C₆アルコキシルのうちの1つまたは複数により任意選択で置換されたC₁－C₆アルキレンであり；

20

R₃₁、R₃₂、及びR₃₃の各々は独立して、H、C₁－C₆アルキル、C₃－C₈シクロアルキル、C₆－C₁₀アリール、4～12員のヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員のヘテロアリールであり；

R₄₀、R₄₁、及びR₄₂及びR₄₃の各々は独立して、H、ハロ、OH、シアノ、N₃、OP(O)R₄₇R₄₈、または1つもしくは複数のOP(O)R₄₇R₄₈により任意選択で置換されたC₁－C₆アルキルであるか、あるいは1つのR₄₁及び1つのR₄₃は、それらが結合されている炭素原子及びQ₀と一緒に、C₄－C₁₀シクロアルキル、4～14員のヘテロシクロアルキル、C₆－C₁₀アリール、または5～14員のヘテロアリールを形成し、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、フェニル、または5～6員のヘテロアリールの各々は、OH、ハロ、シアノ、N₃、オキソ、OP(O)R₄₇R₄₈、C₁－C₆アルキル、C₁－C₆ハロアルキル、COOH、C(O)O－C₁－C₆アルキル、C₁－C₆アルコキシル、C₁－C₆ハロアルコキシル、アミノ、モノ－C₁－C₆アルキルアミノ、及びジC₁－C₆アルキルアミノのうちの1つまたは複数により任意選択で置換され；

30

R₄₄は、H、C₁－C₆アルキル、またはアミン保護基であり；

R₄₅及びR₄₆の各々は独立して、H、OP(O)R₄₇R₄₈、または1つもしくは複数のOP(O)R₄₇R₄₈により任意選択で置換されたC₁－C₆アルキルであり、

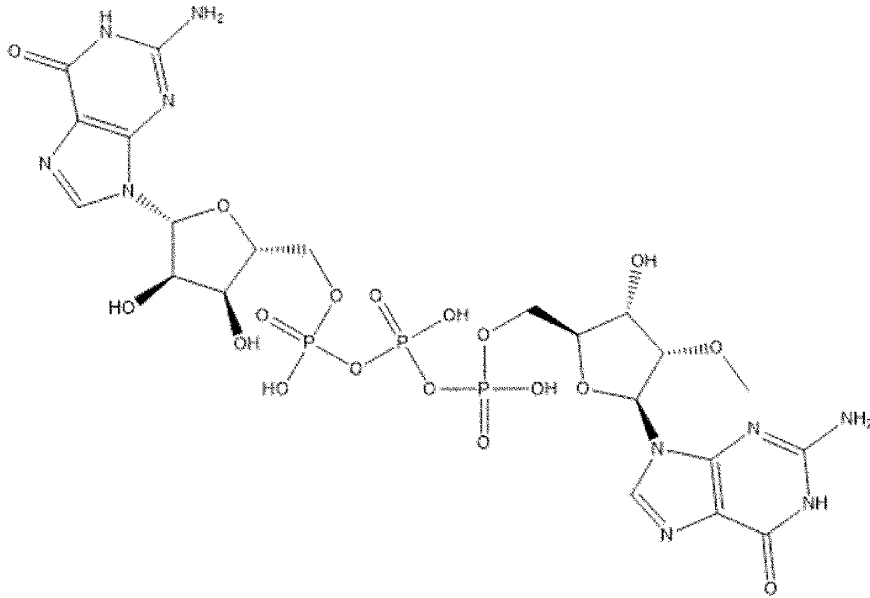
各々のR₄₇及びR₄₈は独立して、H、ハロ、C₁－C₆アルキル、OH、SH、SeH、またはBH₃である]

40

【0647】

したがって、いくつかの実施形態において、ジヌクレオチドキャップは、以下の構造：

【化 1 6 8】



を含む。

【0 6 4 8】

トリヌクレオチドキャップは、いくつかの実施形態において、以下の配列：G A A、G A C、G A G、G A U、G C A、G C C、G C G、G C U、G G A、G G C、G G G、G G U、G U A、G U C、G U G、及びG U Uから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G A Aを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G A Cを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G A Gを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G A Uを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G C Aを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G C Cを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G C Gを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G C Uを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G G Aを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G G Cを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G G Gを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G G Uを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G U Aを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G U Cを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G U Gを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、G U Uを含む。

【0 6 4 9】

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の配列： $m^7GpppApA$ 、 $m^7GpppApC$ 、 $m^7GpppApG$ 、 $m^7GpppApU$ 、 $m^7GpppCpA$ 、 $m^7GpppCpC$ 、 $m^7GpppCpG$ 、 $m^7GpppCpU$ 、 $m^7GpppGpA$ 、 $m^7GpppGpC$ 、 $m^7GpppGpG$ 、 $m^7GpppGpU$ 、 $m^7GpppUpA$ 、 $m^7GpppUpC$ 、 $m^7GpppUpG$ 、及び $m^7GpppUpU$ から選択される配列を含む。

【0 6 5 0】

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7GpppApA$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7GpppApC$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7GpppApG$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7GpppApU$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 m^7GpppC

p Aを含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p C p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p C p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p C p U$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p G p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p G p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p G p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p G p U$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p U p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p U p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p U p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G p p p U p U$ を含む。

10

【0651】

トリヌクレオチドキャップは、いくつかの実施形態において、以下の配列： $m^7 G_3, O m e p p p A p A, m^7 G_3, O m e p p p A p C, m^7 G_3, O m e p p p A p G, m^7 G_3, O m e p p p A p U, m^7 G_3, O m e p p p C p A, m^7 G_3, O m e p p p C p C, m^7 G_3, O m e p p p C p G, m^7 G_3, O m e p p p C p U, m^7 G_3, O m e p p p G p A, m^7 G_3, O m e p p p G p C, m^7 G_3, O m e p p p G p G, m^7 G_3, O m e p p p G p U, m^7 G_3, O m e p p p U p A, m^7 G_3, O m e p p p U p C, m^7 G_3, O m e p p p U p G$ 、及び $m^7 G_3, O m e p p p U p U$ から選択される配列を含む。

20

【0652】

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p A p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p A p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p A p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p A p U$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p C p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p C p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p C p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p C p U$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p G p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p G p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p G p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p G p U$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p U p A$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p U p C$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p U p G$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7 G_3, O m e p p p U p U$ を含む。

30

40

【0653】

トリヌクレオチドキャップは、他の実施形態において、以下の配列： $m^7 G_3, O m e p p p A_2, O m e p A, m^7 G_3, O m e p p p A_2, O m e p C, m^7 G_3, O m e p p p A_2, O m e p G, m^7 G_3, O m e p p p A_2, O m e p U, m^7 G_3, O m e p p p C_2, O m e p A, m^7 G_3, O m e p p p C_2, O m e p C, m^7 G_3, O m e p p p C_2, O m e p G, m^7 G_3, O m e p p p C_2, O m e p U, m^7 G_3, O m e p p p G_2, O m e p A, m^7 G_3, O m e p p p G_2, O m e p C, m^7 G_3, O m e p p p G_2, O m e p G, m^7 G_3, O m e p p p G_2, O m e p U, m^7 G_3, O m e p p p U_2, O m e p A, m^7 G_3, O m e p p p U_2, O m e p C, m^7 G_3, O m e p p p U_2, O m e p G$ 、及び $m^7 G_3, O m e p p p U_2, O m e p U$ から選択される配列を含む。

50

10

20

30

40

50

0

【 0 6 5 7 】

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7Gpppm^6A_2'$ 、 $omepG$ を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 $m^7Gpppe^6A_2'$ 、 $omepG$ を含む。

【0658】

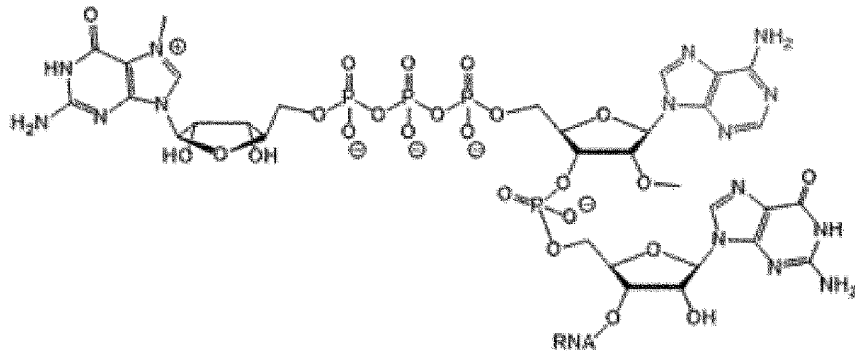
いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 GAG を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 GCG を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 GUG を含む。いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、 GGG を含む。

【0659】

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドキャップは、以下の構造：

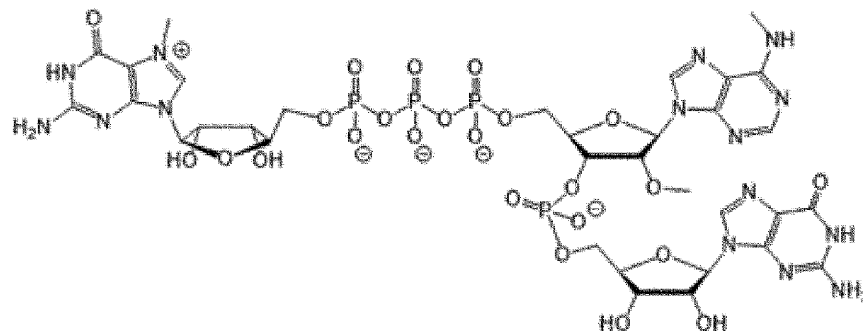
10

【化169】



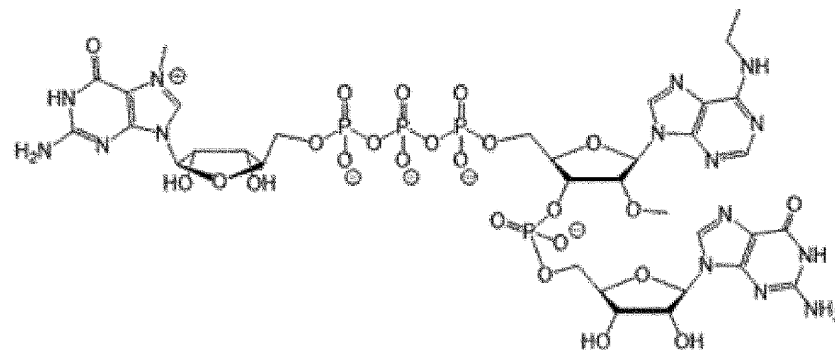
(V I) ;

20



(V I I) ; または

30



(V I I I)

40

のうちの任意の1つを含む。

【0660】

いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、テトラヌクレオチドキャップを含む。いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、上で説明されるようにトリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、 $m^7GpppN_1N_2N_3$ を含み、 N_1 、 N_2 、及び N_3 は、任意選択で（すなわち、非存在であり得るか、または1つもしくは複数が存在し得る）であり、独立して、天然ヌク

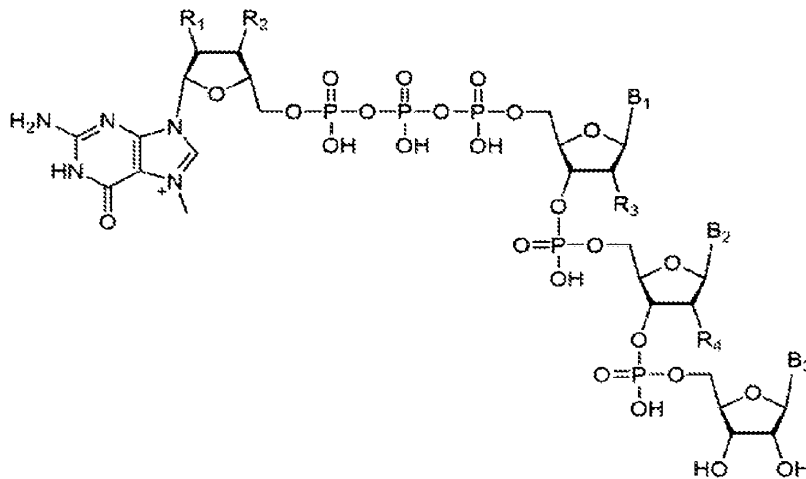
50

レオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基、または非天然ヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態において、 m^7G は、例えば3'位でさらにメチル化される。いくつかの実施形態において、 m^7G は、3'位でO-メチルを含む。いくつかの実施形態において、 N_1 、 N_2 、及び N_3 は、存在するならば、任意選択で独立してアデニン、ウラシル、グアニジン、チミン、またはシトシンである。いくつかの実施形態において、 N_1 、 N_2 、及び N_3 のうちの1つまたは複数（またはすべて）は、存在するならば、例えば2'位でメチル化される。いくつかの実施形態において、 N_1 、 N_2 、及び N_3 のうちの1つまたは複数（またはすべて）は、存在するならば、2'位でO-メチルを有する。

【0661】

いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、以下の構造：

【化170】



(IX)

【式中、 B_1 、 B_2 、及び B_3 は、独立して天然ヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基、または非天然ヌクレオシド塩基であり； R_1 、 R_2 、 R_3 、及び R_4 は、独立してOHまたはO-メチルである】を含む。いくつかの実施形態において、 R_3 は、O-メチルであり、 R_4 は、OHである。いくつかの実施形態において、 R_3 及び R_4 は、O-メチルである。いくつかの実施形態において、 R_4 は、O-メチルである。いくつかの実施形態において、 R_1 は、OHであり、 R_2 は、OHであり、 R_3 は、O-メチルであり、 R_4 は、OHである。いくつかの実施形態において、 R_1 は、OHであり、 R_2 は、OHであり、 R_3 は、O-メチルであり、 R_4 は、O-メチルである。いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 のうちの少なくとも1つは、O-メチルであり、 R_3 は、O-メチルであり、 R_4 は、OHである。いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 のうちの少なくとも1つは、O-メチルであり、 R_3 は、O-メチルであり、 R_4 は、O-メチルである。

【0662】

いくつかの実施形態において、 B_1 、 B_2 、及び B_3 は、天然のヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態において、 B_1 、 B_2 、及び B_3 のうちの少なくとも1つは、修飾塩基または非天然塩基である。いくつかの実施形態において、 B_1 、 B_2 、及び B_3 のうちの少なくとも1つは、N6-メチルアデニンである。いくつかの実施形態において、 B_1 は、アデニン、シトシン、チミン、またはウラシルである。いくつかの実施形態において、 B_1 は、アデニンであり、 B_2 は、ウラシルであり、 B_3 は、アデニンである。いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 は、OHであり、 R_3 及び R_4 は、O-メチルであり、 B_1 は、アデニンであり、 B_2 は、ウラシルであり、 B_3 は、アデニンである。

【0663】

いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、以下の配列：G A A A、G A C A、G A G A、G A U A、G C A A、G C C A、G C G A、G C U A、G G A A、G G C A、G G G A、G G U A、G U C A、及びG U U Aから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、以下の配列：G A A G、G A C G、G A G G、G A U G、G C A G、G C C G、G C G G、G C U G、G G A G、G G C G、G G G G、G G U G、G U C G、G U G G、及びG U U Gから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、以下の配列：G A A U、G A C U、G A G U、G A U U、G C A U、G C C U、G C G U、G C U U、G G A U、G G C U、G G G U、G G U U、G U A U、G U C U、G U G U、及びG U U Uから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、テトラヌクレオチドキャップは、以下の配列：G A A C、G A C C、G A G C、G A U C、G C A C、G C C C、G C G C、G C U C、G G A C、G G C C、G G G C、G G U C、G U A C、G U C C、G U G C、及びG U U Cから選択される配列を含む。

10

【0664】

テトラヌクレオチドキャップは、いくつかの実施形態において、以下の配列： m^7G_3 、 $OMepppApApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppApCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppApGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppApUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppCpApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppCpCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppCpGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppCpUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppGpApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppGpCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppGpGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppGpUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppUpApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppUpCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppUpGpN$ 、及び m^7G_3 、 $OMepppUpUpN$ （配列中、Nは、天然ヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基、または非天然ヌクレオシド塩基である）から選択される配列を含む。

20

【0665】

テトラヌクレオチドキャップは、他の実施形態において、以下の配列： m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppG_2$ 、 $OMepppApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppG_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppG_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppG_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppU_2$ 、 $OMepppApN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppU_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppU_2$ 、 $OMepppGpN$ 、及び m^7G_3 、 $OMepppU_2$ 、 $OMepppUpN$ （配列中、Nは、天然ヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基、または非天然ヌクレオシド塩基である）から選択される配列を含む。

30

【0666】

テトラヌクレオチドキャップは、さらに他の実施形態において、以下の配列： m^7Gp 、 $pppA_2$ 、 $OMepppApN$ 、 $m^7GppppA_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 $m^7GppppA_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 $m^7GppppA_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 $m^7GppppC_2$ 、 $OMepppApN$ 、 $m^7GppppC_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 $m^7GppppC_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 $m^7GppppC_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 $m^7GppppG_2$ 、 $OMepppApN$ 、 $m^7GppppG_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 $m^7GppppG_2$ 、 $OMepppGpN$ 、 $m^7GppppG_2$ 、 $OMepppUpN$ 、 $m^7GppppU_2$ 、 $OMepppApN$ 、 $m^7GppppU_2$ 、 $OMepppCpN$ 、 $m^7GppppU_2$ 、 $OMepppGpN$ 、及び $m^7GppppU_2$ 、 $OMepppUpN$ （配列中、Nは、天然ヌクレオシド塩基、修飾ヌクレオシド塩基、または非天然ヌクレオシド塩基である）から選択される配列を含む。

40

【0667】

テトラヌクレオチドキャップは、他の実施形態において、以下の配列： m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppG_2$ 、 $OMepppN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppU_2$ 、 $OMepppN$ 、 m^7G_3 、 $OMepppC_2$ 、 $OMepppA_2$ 、 $OMepppN$ 、 m^7G_3 、 OMe

50

10

20

30

40

50

【 0 6 7 7 】

【 0 6 7 8 】

【 0 6 7 9 】

【 0 6 8 0 】

【 0 6 8 1 】

いくつかの実施形態において、ポリA尾部は、代替のヌクレオシド（例えば逆向きチミジン）を含む。代替のヌクレオシド（例えば逆向きチミジン）を含むポリA尾部は、本明細書において記載されるように生成され得る。例えば、mRNAコンストラクトは、ポリ（A）尾部を安定化するためにライゲーションによって修飾され得る。ライゲーションは、0.5～1.5 mg/mLのmRNA（5' Cap 1, 3' A100）、50 mMのトリスHCl（pH 7.5）、10 mMのMgCl₂、1 mMのTCEP、1000単位/mLのT4 RNAリガーゼ1、1 mMのATP、20% w/vのポリエチレングリコール8000、及び5：1のモル比の修飾オリゴ対mRNAを使用して遂行され得る。修飾オリゴは、5' -リン酸-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-（逆向きデオキシチミジン（idT）（配列番号209））の配列を有する（以下参照）。ライゲーション

は構造)に影響することが公知である(例えばMatsuda and Mauro PLoS ONE, 2010 5:11を参照;その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される)。翻訳を開始させるコドンに隣接するヌクレオチドのうちの任意のものをマスクすることは、ポリヌクレオチドの翻訳開始の位置、翻訳効率、長さ、及び／または構造を変更するために使用され得る。

【0687】

いくつかの実施形態において、マスクング剤を、開始コドンまたは代替の開始コドンの近傍で使用して、コドンをマスクするかまたは隠して、マスクされた開始コドンまたは代替の開始コドンで翻訳開始の確率を低減することができる。マスクング剤の非限定例としては、アンチセンスロック核酸(LNA)ポリヌクレオチド及びエクソーン-ジャンクション複合体(EJC)が挙げられる(例えばMatsuda and Mauroはマスクング剤LNAポリヌクレオチド及びEJCを記載することを参照(PLoS ONE, 2010 5:11);その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される)。

【0688】

別の実施形態において、マスクング剤を使用して、ポリヌクレオチドの開始コドンをマスクして、翻訳が代替の開始コドンで開始する可能性を増加させることができる。いくつかの実施形態において、マスクング剤を使用して、第1の開始コドンまたは代替の開始コドンをマスクして、マスクされた開始コドンまたは代替の開始コドンに対して下流の開始コドンまたは代替の開始コドンで翻訳が開始する機会を増加させることができる。

【0689】

いくつかの実施形態において、開始コドンまたは代替の開始コドンは、miRNA結合部位の完全な相補物内に所在し得る。miRNA結合部位の完全な相補物は、マスクング剤に類似するポリヌクレオチドの翻訳、長さ、及び／または構造を制御することを支援し得る。非限定例として、開始コドンまたは代替の開始コドンは、miRNA結合部位のために最適な相補物の中央に所在し得る。開始コドンまたは代替の開始コドンは、第1のヌクレオチド、第2のヌクレオチド、3番目のヌクレオチド、4番目ヌクレオチド、第5のヌクレオチド、第6のヌクレオチド、第7のヌクレオチド、第8のヌクレオチド、第9のヌクレオチド、第10のヌクレオチド、第11のヌクレオチド、第12のヌクレオチド、第13のヌクレオチド、第14のヌクレオチド、第15のヌクレオチド、第16のヌクレオチド、第17のヌクレオチド、第18のヌクレオチド、第19のヌクレオチド、第20のヌクレオチド、または21番目のヌクレオチドの後に所在し得る。

【0690】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドの開始コドンはポリヌクレオチド配列から除去されて、ポリヌクレオチドの翻訳が、開始コドンでないコドンで始まるようにすることができる。ポリヌクレオチドの翻訳は、除去された開始コドンに続くコドンまたは下流開始コドンもしくは代替の開始コドンで始まり得る。非限定例において、開始コドンATGまたはAUGは、ポリヌクレオチド配列の最初の3つのヌクレオチドとして除去されて、翻訳が、下流の開始コドンまたは代替の開始コドンで開始するようにする。開始コドンが除去されたポリヌクレオチド配列は、下流の開始コドン及び／または代替物開始コドンのための少なくとも1つのマスクング剤をさらに含んで、ポリヌクレオチドの翻訳の開始、長さ、及び／またはポリヌクレオチドの構造を制御することができるか、または制御を試みることができる。

【0691】

終止コドン領域

本発明は、終止コドン領域及び本明細書において記載されるポリヌクレオチド(例えば(i)1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii)1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド)の両方を含むポリヌクレオチドも包含する。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、3'非翻訳領域(UTR)の前に少なくとも2つ

10

20

30

40

50

終止コドンを含み得る。終止コドンは、DNAの事例において、TGA、TAA、及びTAG、またはRNAの事例において、UGA、UAA、及びUAGから選択され得る。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、DNAの事例において終止コドンTGA、またはRNAの事例において終止コドンUGA、及び1つの追加の終止コドンを含む。さらなる実施形態において、追加の終止コドンは、TAAまたはUAAであり得る。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、連続する3つの終止コドン、4つの終止コドン、またはそれを超えるものを含む。

【0692】

3'安定化領域

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチド（例えば（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）は、3'安定化領域をさらに含む。一実施形態において、ポリヌクレオチドは、（a）5'-UTR（例えば本明細書において記載されるようなもの）；（b）オープンリーディングフレーム（ORF）を含むコーディング領域（例えば本明細書において記載されるようなもの）；（c）3'-UTR（例えば本明細書において記載されるようなもの）、及び（d）3'安定化領域を含む。それを含むLNP組成物も本明細書において開示される。

10

【0693】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、3'安定化領域、例えば安定化尾部（例えば本明細書において記載されるようなもの）を含む。3'安定化領域（例えば代替の核酸塩基、糖、及び／または骨格を含む3'安定化領域）を含有するポリヌクレオチドは、増加した安定性、高発現レベルから利益を受け得るので、治療組成物における使用に特に有効であり得る。

20

【0694】

一実施形態において、3'安定化領域は、ポリA尾部（例えば80～150、例えば120のアデニンを含むポリA尾部（配列番号370））を含む。一実施形態において、ポリA尾部は、UCUAG配列を含む。一実施形態において、ポリA尾部は、UCUAGの上流に約80～120（例えば100）のアデニンを含む。一実施形態において、ポリA尾部は、UCUAGの下流に約1～40（例えば20）のアデニンを含む。

30

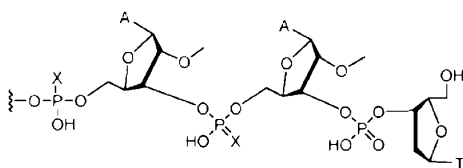
【0695】

一実施形態において、3'安定化領域は、少なくとも1つの代替のヌクレオシドを含む。一実施形態において、代替のヌクレオシドは、逆向きチミジン（idT）である。一実施形態において、代替のヌクレオシドは、3'安定化領域の3'端に配置される。

【0696】

一実施形態において、3'安定化領域は、式VIIの構造：

【化173】



40

またはその塩を含み、式中、各々のXは独立して、OまたはSであり、Aは、アデニンを表わし、Tは、チミンを表わす。

【0697】

一態様において、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチド（例えば本明細書において記載される）を含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）であって、（

50

a) 5' - UTR (例えば本明細書において記載されるようなもの) ; (b) 終止エレメントを含むコーディング領域 (例えば本明細書において記載されるようなもの) ; (c) 3' - UTR (例えば本明細書において記載されるようなもの) 及び ; (d) 3' 安定化領域 (例えば本明細書において記載されるようなもの) を含む、ポリヌクレオチドを含む LNP 組成物が本明細書において開示される。

【0698】

一実施形態において、LNP 組成物は、(i) イオン化可能脂質 (例えばアミノ脂質) ; (ii) ステロールまたは他の構造脂質 ; (iii) 非カチオン性ヘルパーの脂質またはリン脂質 ; 及び (iv) PEG-脂質を含む。

【0699】

ポリヌクレオチドを作製する方法

本開示は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドまたはその相補物を作製する方法も提供する。いくつかの態様において、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示されるポリヌクレオチド (例えばmRNA) は、インビトロ転写を使用して構築され得る。

【0700】

他の態様において、チェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示されるポリヌクレオチド (例えばmRNA) は、オリゴヌクレオチド合成装置を使用して、化学的合成によって構築され得る。他の態様において、チェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示されるポリヌクレオチド (例えばmRNA) は、宿主細胞の使用によって作製される。ある特定の態様において、チェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示されるポリヌクレオチド (例えばmRNA) は、IVT、化学的合成、宿主細胞発現、または当技術分野において公知の他の方法のうちの1つまたは複数の組み合わせによって作製される。

【0701】

天然に存在するヌクレオシド、天然に存在しないヌクレオシド、またはそれらの組み合わせは、候補ヌクレオチド配列中に存在する天然に存在するヌクレオシドを、完全にまたは部分的に置き換えることができ、(i) 1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び(ii) 1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする配列最適化ヌクレオチド配列 (例えばmRNA) の中へ取り込まれ得る。次いで、もたらされたmRNAは、タンパク質を産生する及び/または治療転帰を産生する能力について検討され得る。

【0702】

当技術分野において周知の方法を合成的に使用してRNAを作製することができるが、一実施形態において、RNA転写物 (例えばmRNA転写物) は、RNA転写物の産生をもたらす条件下で、DNA鋳型を、RNAポリメラーゼ (例えばT7 RNAポリメラーゼまたはT7 RNAポリメラーゼバリエーション) と接触させることによって合成される。

【0703】

いくつかの態様において、本開示は、RNA転写物の産生をもたらす条件下で、ヌクレオシド三リン酸及びバッファーの存在下において、DNA鋳型を、RNAポリメラーゼ (例えばT7 RNAポリメラーゼバリエーション等のT7 RNAポリメラーゼ) と接触させることを含むIVT (インビトロ転写) 反応を遂行する方法を提供する。

【0704】

本開示の他の態様は、キャッピング方法 (例えば共転写キャッピング方法または当技術分野において公知の他の方法) を提供する。一実施形態において、キャッピング方法は、RNA転写物を産生するインビトロ転写反応条件下で、ポリヌクレオチド鋳型を、T7 RNAポリメラーゼバリエーション、ヌクレオシド三リン酸、及びキャップ類似体と反応させることを含む。

【0705】

10

20

30

40

50

I V T 条件は、典型的には、プロモーターを含有する精製された直鎖 D N A 鋳型、ヌクレオシド三リン酸、ジチオスレイトール (D T T) 及びマグネシウムイオンを含むバッファ系、ならびに R N A ポリメラーゼを必要とする。転写反応において使用される正確な条件は、特定の適用のために必要とされる R N A の量に依存する。典型的な I V T 反応は、D N A 鋳型を、転写バッファ中の R N A ポリメラーゼ及びヌクレオシド三リン酸 (G T P、A T P、C T P、及び U T P (またはヌクレオチド類似体) が挙げられる) とインキュベーションすることによって遂行される。5' 末端のグアノシン三リン酸を有する R N A 転写物は、この反応から産生される。

【0706】

デオキシリボ核酸 (D N A) は、単純に R N A ポリメラーゼのための核酸鋳型である。D N A 鋳型は、(i) 1つまたは複数の I D O 抗原性ペプチド及び (i i) 1つまたは複数の P D - L 1 抗原性ペプチド (例えば本明細書において開示されるもの) を含むチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドを含み得る。D N A 鋳型は、いくつかの実施形態において、5' から所在する R N A ポリメラーゼプロモーター (例えば T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター) を含み、チェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドへ作動可能に連結される。D N A 鋳型は、ポリヌクレオチドの 3' 端に所在するポリアデニル化 (ポリ A) 尾部をコードするヌクレオチド配列も含み得る。

【0707】

関心のあるポリペプチドとしては、生物製剤、抗体、抗原 (ワクチン)、及び治療タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。「タンパク質」という用語は、ペプチドを網羅する。

【0708】

R N A 転写物は、いくつかの実施形態において、I V T 反応の産物であり、当業者によって理解されるであろうように、R N A 分子を作製するための D N A 鋳型は、塩基相補性に基づいて既知である。R N A 転写物は、いくつかの実施形態において、ポリ A 尾部へ連結された関心のあるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むメッセンジャー R N A (m R N A) である。いくつかの実施形態において、m R N A は、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む修飾された m R N A (m m R N A) である。

【0709】

ヌクレオチドは、窒素含有塩基、五炭糖 (リボースまたはデオキシリボース)、及び少なくとも 1 つのリン酸基を含む。ヌクレオチドとしては、ヌクレオシド一リン酸、ヌクレオシド二リン酸、及びヌクレオシド三リン酸が挙げられる。ヌクレオシド一リン酸 (N M P) は、リボース及び単一のリン酸塩へ連結された核酸塩基を含み、ヌクレオシド二リン酸 (N D P) は、リボース及び 2 つのリン酸塩へ連結された核酸塩基を含み、ヌクレオシド三リン酸 (N T P) は、リボース及び 3 つのリン酸塩へ連結された核酸塩基を含む。ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドの一般的な構造を有するか、またはヌクレオチドに構造的に類似する化合物である。ヌクレオチド類似体は、例えばヌクレオチドの核酸塩基の類似体、糖の類似体、及び／またはリン酸基の類似体を含む。

【0710】

ヌクレオシドは、窒素含有塩基及び五炭糖を含む。したがって、リン酸基を加えたヌクレオシドは、ヌクレオチドをもたらす。ヌクレオシド類似体は、ヌクレオシドの一般的な構造を有するか、またはヌクレオシドに構造的に類似する化合物である。ヌクレオシド類似体は、例えばヌクレオシドの核酸塩基の類似体及び／または糖の類似体を含む。

【0711】

「ヌクレオチド」という用語は、別段指摘されない限り、天然に存在するヌクレオチド、合成ヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドを包含することを理解されたい。本明細書において提供される、例えば I V T 反応において R N A の産生のために使用される天然に存在するヌクレオチドの例としては、アデノシン三リン酸 (A T P)、グアノシン三リン酸 (G T P)、シチジン三リン酸 (C T P)、ウリジン三リン酸 (U T P)、及び 5-メチルウリジン三リン酸 (m 5 U T P) が挙げられる。いくつかの実施形態において、アデノ

10

20

30

40

50

シンニリン酸（A D P）、グアノシンニリン酸（G D P）、シチジンニリン酸（C D P）、及び／またはウリジンニリン酸（U D P）が使用される。

【0712】

ヌクレオチド類似体の例としては、抗ウイルスヌクレオチド類似体、リン酸塩類似体（加水分解可能で、（または非加水分解可能な）可溶性（または固定化された））、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド（例えばキャップ類似体）、または酵素的なキャッピングのための前駆体／基質（ワクシニアまたはリガーゼ）、キャップもしくは5'部分（IRES）のライゲーション／コンジュゲーションを容易にするために官能基により標識されたヌクレオチド、キャップもしくは5'部分のライゲーションを容易にするために5' P O 4により標識されたヌクレオチド、または化学的もしくは酵素的に切断し得る官能基／保護基により標識されたヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない。抗ウイルスヌクレオチド／ヌクレオシド類似体の例としては、ガンシクロビル、エンテカビル、テルビブジン、ビダラビン、及びシドフォビルが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0713】

修飾ヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含み得る。例えば、本開示のRNA転写物（例えばmRNA転写物）は、シュードウリジン（ψ）、1-メチルシュードウリジン（m1ψ）、1-エチルシュードウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン（mo5U）、及び2'-O-メチルウリジンから選択される修飾核酸塩基を含み得る。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、上記の修飾核酸塩基のうちの少なくとも2つ（例えば2、3、4、またはそれを超える）の組み合わせを含む。

20

【0714】

本明細書において提供されるヌクレオシド三リン酸（NTP）は、非修飾ATPもしくは修飾ATP、修飾UTPもしくは非修飾UTP、修飾GTPもしくは非修飾GTP、及び／または修飾CTPもしくは非修飾CTPを含み得る。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、非修飾ATPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、修飾ATPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、非修飾UTPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、修飾UTPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、非修飾GTPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、修飾GTPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、非修飾CTPを含む。いくつかの実施形態において、IVT反応のNTPは、修飾CTPを含む。

30

【0715】

IVT反応中に存在するヌクレオシド三リン酸及びキャップ類似体の濃度は、変動し得る。いくつかの実施形態において、NTP及びキャップ類似体は、等モルの濃度で反応中に存在する。いくつかの実施形態において、反応中のキャップ類似体（例えばトリヌクレオチドキャップ）対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：1を超える。例えば、反応中のキャップ類似体対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、15：1、20：1、25：1、50：1、または100：1であり得る。いくつかの実施形態において、反応中のキャップ類似体（例えばトリヌクレオチドキャップ対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：1未満である。例えば、反応中のキャップ類似体（例えばトリヌクレオチドキャップ）対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：15、1：20、1：25、1：50、または1：100であり

40

50

得る。

【0716】

IVT反応中のNTPの組成も、変動し得る。例えば、ATPは、GTP、CTP、及びUTPについて過剰で使用され得る。非限定例として、IVT反応は、7.5ミリモルのGTP、7.5ミリモルのCTP、7.5ミリモルのUTP、及び3.75ミリモルのATPを含み得る。同じIVT反応は、3.75ミリモルのキャップ類似体（例えばトリヌクレオチドキャップ）を含み得る。いくつかの実施形態において、G:C:U:A:キャップのモル比は、1:1:1:0.5:0.5である。いくつかの実施形態において、G:C:U:A:キャップのモル比は、1:1:0.5:1:0.5である。いくつかの実施形態において、G:C:U:A:キャップのモル比は、1:0.5:1:1:0.5である。いくつかの実施形態において、G:C:U:A:キャップのモル比は、0.5:1:1:1:0.5である。

10

【0717】

いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、シュードウリジン（ ψ ）、1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）、5-メトキシウリジン（ m^5U ）、5-メチルシチジン（ m^5C ）、 α -チオーグアノシン、及び α -チオーアデノシンから選択される修飾核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、上記の修飾核酸塩基のうちの少なくとも2つ（例えば2、3、4、またはそれを超える）の組み合わせを含む。

20

【0718】

いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、シュードウリジン（ ψ ）を含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）を含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、5-メトキシウリジン（ m^5U ）を含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、5-メチルシチジン（ m^5C ）を含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、 α -チオーグアノシンを含む。いくつかの実施形態において、RNA転写物（例えばmRNA転写物）は、 α -チオーアデノシンを含む。

【0719】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えばmRNAポリヌクレオチド等のRNAポリヌクレオチド）は、特定の修飾について均一に修飾される（例えば完全に修飾され、全体の配列を通して修飾される）。例えば、ポリヌクレオチドは、均一に1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）により修飾され得、mRNA配列中のすべてウリジン残基が1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）により置き換えられることを意味する。同様に、ポリヌクレオチドは、修飾残基（上で説明されたもののうちの任意の等）による置き換えによって配列中に存在する任意のタイプのヌクレオチド残基について均一に修飾され得る。代替的に、ポリヌクレオチド（例えばmRNAポリヌクレオチド等のRNAポリヌクレオチド）は、均一に修飾されなくてもよい（例えば部分的に修飾され、配列の一部は修飾される）。各々の可能性は、本発明の別個の実施形態を表わす。

30

【0720】

いくつかの実施形態において、バッファー系は、トリスを含有する。IVT反応において使用されるトリスの濃度は、例えば少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも30mM、少なくとも40mM、少なくとも50mM、少なくとも60mM、少なくとも70mM、少なくとも80mM、少なくとも90mM、少なくとも100mM、または少なくとも110mMのリン酸塩であり得る。いくつかの実施形態において、リン酸塩の濃度は、20~60mMまたは10~100mMである。

40

【0721】

いくつかの実施形態において、バッファー系は、ジチオスレイトール（DTT）を含有する。IVT反応において使用されるDTTの濃度は、例えば少なくとも1mM、少なくとも5mM、または少なくとも50mMであり得る。いくつかの実施形態において、IV

50

T反応において使用されるDTTの濃度は、1～50 mMまたは5～50 mMである。いくつかの実施形態において、IVT反応において使用されるDTTの濃度は、5 mMである。

【0722】

いくつかの実施形態において、バッファー系は、マグネシウムを含有する。いくつかの実施形態において、IVT反応中に存在するNTP対マグネシウムイオン (Mg^{2+} ; 例えば $MgCl_2$) のモル比は、1:1～1:5である。例えば、NTP対マグネシウムイオンのモル比は、1:1、1:2、1:3、1:4、または1:5であり得る。

【0723】

いくつかの実施形態において、IVT反応中に存在するキャップ類似体+NTP (例えばトリヌクレオチドキャップ、GAG等) 対マグネシウムイオン (Mg^{2+} ; 例えば $MgCl_2$) のモル比は、1:1～1:5である。例えば、NTP+トリヌクレオチドキャップ (例えばGAG) 対マグネシウムイオンのモル比は、1:1、1:2、1:3、1:4、または1:5であり得る。

【0724】

いくつかの実施形態において、バッファー系は、トリス-HCl、スぺルミジン (例えば1～30 mMの濃度で)、TRITON (登録商標) X-100 (ポリエチレングリコールp-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル)、及び/またはポリエチレングリコール (PEG) を含有する。

【0725】

成長するRNA鎖の3'端へのヌクレオシド三リン酸 (NTP) の追加は、ポリメラーゼ (T7 RNAポリメラーゼ等、例えば本開示のT7 RNAポリメラーゼバリエーションのうちの任意の1つまたは複数 (例えばG47A)) によって触媒される。いくつかの実施形態において、RNAポリメラーゼ (例えばT7 RNAポリメラーゼバリエーション) は、0.01 mg/mL～1 mg/mLの濃度で反応 (例えばIVT反応) 中に存在する。例えば、RNAポリメラーゼは、0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、または1.0 mg/mLの濃度で反応中に存在し得る。

【0726】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、IVTポリヌクレオチドである。従来、mRNA分子の基本的構成要素としては、少なくともコーディング領域、5' UTR、3' UTR、5' キャップ、及びポリA尾部が挙げられる。本開示のIVTポリヌクレオチドはmRNAとして機能し得るが、例えば核酸ベースの治療物質を使用する有効なポリペプチド産生についての既存の問題を克服するのに役立つという機能的及び/または構造的なデザインの特色において、野生型mRNAとは区別される。

【0727】

IVTポリヌクレオチドの一次コンストラクトは、第1の隣接領域及び第2の隣接領域が隣接する連結されたヌクレオチドの第1の領域を含む。この第1の領域は、コードされたチェックポイントがんワクチンを含み得るがこれらに限定されない。第1の隣接領域は、5' 非翻訳領域 (UTR) (ポリペプチドのネイティブな5' UTRまたは非ネイティブな5' UTR (異種5' UTRまたは合成5' UTR等であるがこれらに限定されない) をコードする核酸のうちの任意の5' UTR等) として機能する連結されたヌクレオシドの配列を含み得る。チェックポイントがんワクチン治療ペイロードまたは予防ペイロードをコードするIVTは、その5' 末端で1つまたは複数のシグナル配列をコードするシグナル配列領域を含み得る。隣接領域は、1つまたは複数の完全または不完全な5' UTR配列を含む連結されたヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域は、5' 末端のキャップも含み得る。第2の隣接領域は、チェックポイントがんワクチンの治療ペイロードもしくは予防ペイロードのネイティブな3' UTRまたは非ネイティブな3' UTR (異種3' UTRまたは合成3' UTR等であるがこれらに限定されない) をコードし得る1つまたは複数の完全または不完全な3' UTRを含む連結されたヌクレオチドの領域を含み得る。隣接領域は、3' 尾部配列も含み得る。3' 尾部配列は、ポリA尾部配列、ポリA-Gカルテッ

10

20

30

40

50

ト配列、及び／またはステムループ配列であり得るがこれらに限定されない。

【0728】

本明細書において開示されるポリヌクレオチドを作製する例示的な方法は、2017年5月18日に出願された国際PCT出願WO 2017/201325（その内容全体は参照することによって本明細書に援用される）において開示されるインビトロ転写による酵素的合成及び化学的合成を含む。

【0729】

化学的合成

標準的な方法は、本発明のポリヌクレオチド等の関心のある単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列（例えば（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を合成するために適用され得る。例えば、特定の単離されたポリペプチドについてのコドン最適化ヌクレオチド配列コーディングを含有する単一のDNAオリゴマーまたはRNAオリゴマーは、合成され得る。他の態様において、所望されるポリペプチドの一部分をコードする複数の小さいオリゴヌクレオチドは合成され、次いでライゲーションされ得る。いくつかの態様において、個別のオリゴヌクレオチドは、典型的には相補的なアセンブリのための5'オーバーハングまたは3'オーバーハングを含有する。

【0730】

本明細書において開示されるポリヌクレオチド（例えばRNA、例えばmRNA）は、当技術分野において公知の化学的合成方法及び可能性のある核酸塩基置換を使用して化学的に合成され得る。例えば国際公開第WO2014093924号、同第WO2013052523号；同第WO2013039857号、同第WO2012135805号、同第WO2013151671号；米国公開第US20130115272号；または米国特許第US8999380号、または同第US8710200号、（それらのすべては、全体が参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【0731】

精製

他の態様において、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示されるポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、精製され得る。本明細書において記載されるチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）の精製は、ポリヌクレオチドクリーンアップ、品質保証、及び品質管理を包含し得るがこれらに限定されない。クリーンアップは、当技術分野において公知の方法（AGENCOURT（登録商標）ビーズ（Beckman Coulter Genomics、Danvers、MA）、ポリ-Tビーズ、LNATMオリゴ-T捕捉プローブ（EXIQON（登録商標）Inc、Vedbaek、デンマーク）等であるがこれらに限定されない）またはHPLCベースの精製方法（強陰イオン交換HPLC、弱陰イオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、及び疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）等であるがこれらに限定されない）によって遂行され得る。「精製された」という用語は、ポリヌクレオチドに関連して使用される場合に（「精製されたポリヌクレオチド」等）、少なくとも1つの汚染物質から分離されたものを指す。本明細書において使用される時、「汚染物質」は、別のものを、不適當、不純、または粗悪にする任意の物質である。したがって、精製されたポリヌクレオチド（例えばDNA及びRNA）は、それが天然で見出されるものとは異なる形態もしくはは設定で存在するか、または処理もしくはは精製方法をそれに対して行う前にあったものとは異なる形態もしくはは設定で存在する。

【0732】

いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）の精製は、不純物を除去し、これにより、望まれない

免疫応答を低減または除去し得る（例えばサイトカイン活性を低減する）。

【0733】

いくつかの実施形態において、本開示のチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチド（例えばmRNA）は、カラムクロマトグラフィー（例えば強陰イオン交換HPLC、弱陰イオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）、または（LCMS））を使用して、投与の前に精製される。いくつかの実施形態において、カラムクロマトグラフィー（例えば強陰イオン交換HPLC、弱陰イオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）、または（LCMS））により精製された、本明細書において開示されるチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドは、異なる精製方法によって精製されたチェックポイントがんワクチンをコードするポリヌクレオチドに比較して、チェックポイントがんワクチンの発現を増加させる。

10

【0734】

いくつかの実施形態において、カラムクロマトグラフィー（例えば強陰イオン交換HPLC、弱陰イオン交換HPLC、逆相HPLC（RP-HPLC）、及び疎水性相互作用HPLC（HIC-HPLC）、または（LCMS））により精製されたポリヌクレオチドは、（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする。

【0735】

いくつかの実施形態において、精製されたポリヌクレオチドは、少なくとも約80%純粋、少なくとも約85%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、少なくとも約96%純粋、少なくとも約97%純粋、少なくとも約98%純粋、少なくとも約99%純粋、または約100%純粋である。

20

【0736】

品質保証及び／または品質管理のチェックは、ゲル電気泳動法、UV吸光度、または分析用HPLC等であるがこれらに限定されない方法を使用して遂行され得る。

【0737】

別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、逆転写酵素-PCRが挙げられるがこれらに限定されない方法によってシーケンスされ得る。

【0738】

ポリヌクレオチドの化学的修飾
本開示は、核酸（例えばmRNA核酸等のRNA核酸）の修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドを提供する。「ヌクレオシド」は、有機塩基（例えばプリンまたはピリミジン）またはそれらの誘導体（本明細書において「核酸塩基」とも称される）と組み合わせて、糖分子（例えばペントースまたはリボース）またはそれらの誘導体を含有する化合物を指す。「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドを指す。修飾されたヌクレオチドは、任意の有用な方法によって（例えば化学的に、酵素的に、または組み換えにより等）合成されて、1つまたは複数の修飾されたヌクレオシドまたは非天然ヌクレオシドを含み得る。核酸は、連結されたヌクレオシドの領域（複数可）を含み得る。かかる領域は、可変的な骨格結合を有し得る。結合は、標準的なホスホジエステル結合であり得、この事例において、核酸は、ヌクレオチドの領域を含むであろう。

30

【0739】

修飾されたヌクレオチド塩基対合は、標準的なアデノシン-チミン、アデノシン-ウラシル、またはグアノシン-シトシンの塩基対だけではなく、ヌクレオチド及び／または標準的でない塩基もしくは修飾された塩基を含む修飾されたヌクレオチド間で形成される塩基対も網羅し、そこで、水素結合ドナー及び水素結合アクセプターのアレンジは、標準的でない塩基と標準的な塩基との間、または2つの相補的な標準的でない塩基構造（例えば少なくとも1つの化学的修飾を有する核酸中のもの等）の間で、水素結合することを許容する。かかる標準的でない塩基対合の1つの例は、修飾されたヌクレオチドイノシンと、アデニン、シトシン、またはウラシルとの間の塩基対合である。塩基／糖またはリンカー

40

50

の任意の組み合わせは、本開示の核酸の中へ取り込まれ得る。

【0740】

いくつかの実施形態において、核酸（例えばmRNA核酸等のRNA核酸）中の修飾された核酸塩基は、N1-メチル-シュードウリジン（m1ψ）、1-エチル-シュードウリジン（e1ψ）、5-メトキシ-ウリジン（mo5U）、5-メチル-シチジン（m5C）、及び／またはシュードウリジン（ψ）を含む。いくつかの実施形態において、核酸（例えばmRNA核酸等のRNA核酸）中の修飾された核酸塩基は、5-メトキシメチルウリジン、5-メチルチオウリジン、1-メトキシメチルシュードウリジン、5-メチルシチジン、及び／または5-メトキシシチジンを含む。いくつかの実施形態において、ポリリボヌクレオチドは、前記修飾された核酸塩基（化学的修飾が挙げられるがこれに限定されない）の任意のもののうちの少なくとも2つ（例えば2、3、4、またはそれを超える）の組み合わせを含む。

10

【0741】

いくつかの実施形態において、本開示のRNA核酸は、核酸の1つもしくは複数またはすべてのウリジン位置でのN1-メチル-シュードウリジン（m1ψ）置換を含む。

【0742】

いくつかの実施形態において、本開示のRNA核酸は、核酸の1つもしくは複数またはすべてのウリジン位置でのN1-メチル-シュードウリジン（m1ψ）置換、及び核酸の1つもしくは複数またはすべてのシチジン位置での5-メチルシチジン置換を含む。

【0743】

いくつかの実施形態において、本開示のRNA核酸は、核酸の1つもしくは複数またはすべてのウリジン位置でのシュードウリジン（ψ）置換を含む。

20

【0744】

いくつかの実施形態において、本開示のRNA核酸は、核酸の1つもしくは複数またはすべてのウリジン位置でのシュードウリジン（ψ）置換、及び核酸の1つもしくは複数またはすべてのシチジン位置での5-メチルシチジン置換を含む。

【0745】

いくつかの実施形態において、本開示のRNA核酸は、核酸の1つもしくは複数またはすべてのウリジン位置でウリジンを含む。

【0746】

いくつかの実施形態において、核酸（例えばmRNA核酸等のRNA核酸）は、特定の修飾のために一様に修飾される（例えば完全に修飾される、全体の配列にわたって修飾される）。例えば、核酸は、N1-メチル-シュードウリジンにより一様に修飾され得、mRNA配列中のすべてのウリジン残基がN1-メチル-シュードウリジンにより置換されることを意味する。同様に、核酸は、修飾された残基（上で記載されるもの等）による置き換えによって、配列中に存在する任意のタイプのヌクレオチド残基について一様に修飾され得る。

30

【0747】

本開示の核酸は、分子の全体の長さに沿って部分的にまたは完全に修飾され得る。例えば、1つもしくは複数またはすべてまたは所与のタイプのヌクレオチド（例えばプリンもしくはピリミジン、あるいはA、G、U、Cのうちの任意の1つもしくは複数またはすべて）は、本開示の核酸中で、またはその既定の配列領域中で（例えばポリA尾部を含むかまたは除外したmRNA中で）、一様に修飾され得る。いくつかの実施形態において、すべてのヌクレオチドXは、本開示の核酸中で（またはその配列領域中で）、修飾されたヌクレオチドであり、Xは、ヌクレオチドA、G、U、Cのうちの任意の1つ、またはA+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C、もしくはA+G+Cの組み合わせのうちの任意の1つであり得る。

40

【0748】

核酸は、約1%～約100%（全体的なヌクレオチド含有量に関連して、または1つもしくは複数のタイプのヌクレオチド、すなわち、A、G、U、もしくはCのうちの任意の

50

1つもしくは複数に関連して、のいずれか) または任意の間に入るパーセンテージ (例えば 1%~20%、1%~25%、1%~50%、1%~60%、1%~70%、1%~80%、1%~90%、1%~95%、10%~20%、10%~25%、10%~50%、10%~60%、10%~70%、10%~80%、10%~90%、10%~95%、10%~100%、20%~25%、20%~50%、20%~60%、20%~70%、20%~80%、20%~90%、20%~95%、20%~100%、50%~60%、50%~70%、50%~80%、50%~90%、50%~95%、50%~100%、70%~80%、70%~90%、70%~95%、70%~100%、80%~90%、80%~95%、80%~100%、90%~95%、90%~100%、及び 95%~100%) の修飾ヌクレオチドを含有し得る。非修飾の A、G、U、または C の存在によって任意の残りのパーセンテージが占められることが理解されるだろう。

10

【0749】

核酸は、最小 1% 及び最大 100%、または任意の間に入るパーセンテージで修飾されたヌクレオチドを含有し得る (少なくとも 5% の修飾されたヌクレオチド、少なくとも 10% の修飾されたヌクレオチド、少なくとも 25% の修飾されたヌクレオチド、少なくとも 50% の修飾されたヌクレオチド、少なくとも 80% の修飾されたヌクレオチド、または少なくとも 90% の修飾されたヌクレオチド等)。例えば、核酸は、修飾されたピリミジン (修飾されたウラシルまたは修飾されたシトシン) を含有し得る。いくつかの実施形態において、核酸中のウラシルのうちの少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または 100% は、修飾されたウラシル (例えば 5-置換ウラシル) により置き換えられる。修飾されたウラシルは、単一のユニークな構造を有する化合物によって置き換えられ得るか、または異なる構造 (例えば 2、3、4、またはそれを超えるユニークな構造) を有する複数の化合物によって置き換えられ得る。いくつかの実施形態において、核酸中のシトシンのうちの少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 25%、少なくとも 50%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または 100% は、修飾されたシトシン (例えば 5-置換シトシン) により置き換えられる。修飾されたシトシンは、単一のユニークな構造を有する化合物によって置き換えられ得るか、または異なる構造 (例えば 2、3、4、またはそれを超えるユニークな構造) を有する複数の化合物によって置き換えられ得る。

20

【0750】

医薬組成物

本開示は、本明細書において開示される LNP 組成物 (例えば (i) 1つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする mRNA を含むポリヌクレオチドを含む LNP 組成物) のうちの任意のものを含む医薬製剤を提供する。

30

【0751】

いくつかの実施形態において、組成物または製剤は、(i) 1つまたは複数の IDO 抗原性ペプチド及び (ii) 1つまたは複数の PD-L1 抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示される配列最適化核酸配列を含むポリヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態において、組成物または製剤は、チェックポイントがんワクチンをコードする本明細書において開示される配列最適化核酸配列へ有意な配列同一性を有するポリヌクレオチド (例えば ORF) を含むポリヌクレオチド (例えば RNA、例えば mRNA) を含有し得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、miRNA 結合部位 (例えば miR-126、miR-142、miR-144、miR-146、miR-150、miR-155、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27、及び miR-26a に結合する miRNA 結合部位) をさらに含む。

40

【0752】

本開示のいくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて組成物及び複合体で製剤化される。医薬組成物は、任

50

意選択で1つまたは複数の追加の活性物質（例えば治療的活性物質及び／または予防的活性物質）を含み得る。本開示の医薬組成物は、滅菌済み及び／またはパイロジェンフリーであり得る。医薬用薬剤の製剤化及び／または製造における一般的な考慮は、例えば Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005において見出され得る。

【0753】

いくつかの実施形態において、組成物は、ヒト、ヒト患者、または対象へ投与される。本開示の目的のために、「活性成分」という語句は、概して、本明細書において記載されるように送達されるポリヌクレオチドを指す。

10

【0754】

本明細書において提供される医薬組成物の記載は、主にヒトへの投与に好適な医薬組成物に関するが、かかる組成物が、概して、他の動物への（例えば非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳動物への）投与に好適であることは当業者によって理解されるだろう。ヒトへの投与に好適な医薬組成物を、様々な動物への投与に好適な組成物にするために修飾することはよく理解されており、獣医薬理学の当業者は、たとえあるにしても通常の実験だけにより、かかる修飾をデザインし得る及び／または遂行し得る。医薬組成物の投与が企図される対象としては、ヒト及び／または他の霊長動物、哺乳動物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0755】

いくつかの実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、筋肉内送達のために製剤化される。

20

【0756】

本明細書において記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野において公知であるかまたは今後開発される任意の方法によって調製され得る。概して、かかる調製方法は、活性成分を賦形剤及び／または1つもしくは複数の他の補助成分と一緒にし、次いで必要である及び／または所望されるならば、産物を所望される単回用量単位または複数回用量単位へと、分割、成形、及び／またはパッケージングするステップを含む。

【0757】

本開示に従う医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び／または任意の追加の成分の相対量は、治療される対象の同一性、サイズ、及び／または条件に依存して、ならびに組成物が投与される経路にさらに依存して、変動するだろう。一例として、組成物は、0.1%～100%、例えば0.5～50%、1～30%、5～80%、または少なくとも80%（w/w）で、活性成分を含み得る。

30

【0758】

製剤化

本開示の、チェックポイントがんワクチンをコードするmRNAを含むポリヌクレオチドは、1つまたは複数の賦形剤を使用して製剤化され得る。

【0759】

本発明は、本明細書において記載されるポリヌクレオチド（例えば（i）1つまたは複数のIDO抗原性ペプチド及び（ii）1つまたは複数のPD-L1抗原性ペプチドを含むチェックポイントがんワクチンをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド）を含む医薬製剤を提供する。本明細書において記載されるポリヌクレオチドは、1つまたは複数の賦形剤を使用して、（1）安定性を増加させるために；（2）細胞トランスフェクションを増加させるために；（3）持続放出または遅延放出を可能にするために（例えばポリヌクレオチドのデポー製剤からの）；（4）生体内分布を変更する（例えばポリヌクレオチドを特異的な組織または細胞のタイプへ標的化する）ために；（5）コードされたタンパク質の翻訳をインビボで増加させるために；及び／または（6）コードされたタンパク質の放出プロフィールをインビボで変更するために、製剤化され得る。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、例えば式（I）を有する化合物；または式（III）

40

50

、(IV)、(V)、もしくは(VI)を有する化合物、あるいは任意のそれらの組み合わせを含む送達薬剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、送達剤は、例えば約(i)約40~50mol%のイオン化可能アミノ脂質、任意選択で45~50mol%、例えば、45~46mol%、46~47mol%、47~48mol%、48~49mol%、または49~50mol%、例えば約45mol%、45.5mol%、46mol%、46.5mol%、47mol%、47.5mol%、48mol%、48.5mol%、49mol%、または49.5mol%のイオン化可能アミノ脂質；(ii)30~45mol%のステロール(例えばコレステロール)、任意選択で35~42mol%のステロール、例えば30~31mol%、31~32mol%、32~33mol%、33~34mol%、35~35mol%、35~36mol%、36~37mol%、37~38mol%、38~39mol%、または39~40mol%、または40~42mol%のステロール；(iii)5~15mol%のヘルパー脂質(例えばDSPC)、任意選択で10~15mol%のヘルパー脂質、例えば5~6mol%、6~7mol%、7~8mol%、8~9mol%、9~10mol%、10~11mol%、11~12mol%、12~13mol%、13~14mol%、または14~15mol%のヘルパー脂質；及び(iv)1~5%のPEG脂質、任意選択で1~5mol%のPEG脂質、例えば1.5~2.5mol%、1~2mol%、2~3mol%、3~4mol%、または4~5mol%のPEG脂質の範囲におけるモル比により、イオン化可能アミノ脂質、ヘルパー脂質(例えばDSPC)、ステロール(例えばコレステロール)、及びPEG脂質(例えばPEG-DMG)を含む。

10

20

【0760】

薬学的に許容される賦形剤としては、本明細書において使用される時、所望される特定の投薬形態に適するような、任意の及びすべての溶媒、分散物媒質もしくは他の液体ビヒクル、分散補助物質もしくは懸濁補助物質、希釈物質、粒状化剤及び／または分散剤、界面活性剤、等張剤、粘度増加剤もしくは乳化剤、防腐物質、結合物質、潤滑物質もしくは油、着色剤、甘味剤、もしくは香味剤、安定化物質、抗酸化物質、抗微生物剤もしくは抗真菌剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、バッファー、キレート物質、凍結保護物質、及び／または充填剤が挙げられるがこれらに限定されない。医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤及び組成物を調製するための技法は、当技術分野において公知である(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)を参照；参照することによってその全体が本明細書に援用される)。

30

【0761】

例示的な希釈物質としては、炭酸カルシウムもしくは炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトールなど、及び／またはそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0762】

例示的な界面活性剤及び／または乳化物質としては、天然の乳化物質(例えばアカシア、アガー、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス(chondrux)、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、及びレシチン)、ソルビタン脂肪酸エステル(例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン[TWEEN(登録商標)80]、モノパルミチン酸ソルビタン[SPAN(登録商標)40])、モノオレイン酸グリセリル、ポリオキシエチレンエステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル(例えばCREMOPHOR(登録商標))、ポリオキシエチレンエーテル(例えばポリオキシエチレンラウリルエーテル[BRIJ(登録商標)30])、PLUORINC(登録商標)F68、POLOXAMER(登録商標)188など、及び／またはそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

40

50

【0763】

例示的な結合剤としては、デンプン、ゼラチン、糖（例えばスクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール）、アミノ酸（例えばグリシン）、天然及び合成ゴム（例えばアカシア、アルギン酸ナトリウム）、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0764】

酸化は、mRNAについて（特に液体mRNA製剤について）可能性のある分解経路である。酸化を防止するために、抗酸化物質は、製剤へ添加され得る。例示的な抗酸化物質としては、 α トコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ベンジルアルコール、ブチルヒドロキシアニソール、 m -クレゾール、メチオニン、ブチルヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸ナトリウムまたはメタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウムなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0765】

例示的なキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸、エデト酸三ナトリウムなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0766】

例示的な抗微生物剤または抗真菌剤としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウムまたは安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウムまたはソルビン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸など、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0767】

例示的な防腐物質としては、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、 β -カロテン、クエン酸、アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール（hydroxyanisol）、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）、ラウリルエーテル硫酸ナトリウムなど、及びそれらの組み合わせ（SLES）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0768】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド溶液のpHは、安定性を改善するためにpH5～pH8で維持される。

【0769】

例示的なpHを制御するバッファーとしては、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、ヒスチジン（またはヒスチジン-HCl）、リンゴ酸ナトリウム、炭酸ナトリウムなど、及び／またはそれらの組み合わせが挙げられ得るがこれらに限定されない。

【0770】

例示的な滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、麦芽、水素化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムもしくはラウリル硫酸マグネシウムなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0771】

本明細書において記載される医薬組成物または製剤は、凍結の間に本明細書において記載されるポリヌクレオチドを安定化するために凍結保護物質を含有し得る。例示的な凍結保護物質としては、マンニトール、スクロース、トレハロース、ラクトース、グリセロール、デキストロースなど、及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。本明細書において記載される医薬組成物または製剤は、凍結乾燥されたポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド製剤中で充填剤を含有して、「薬学的に洗練された」ケーキをもたらし、長期的な（例えば36か月）貯蔵の間に凍結乾燥されたポリヌクレオチドを安定化させ得る。本発明の例示的な充填剤としては、スクロース、トレハロース、マンニトール、グリシン、ラクトース、ラフィノース、及びそれらの組み合わせが挙げられ得るがこれらに限定されない。

【0772】

いくつかの実施形態において、医薬組成物または製剤は、送達剤をさらに含む。本開示の送達剤としては、リポソーム、脂質ナノ粒子、リポイド、ポリマー、リポプレックス、微小胞、エクソソーム、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドによりトランスフェクションされた細胞、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣体、ナノチューブ、コンジュゲート、及びそれらの組み合わせが限定されずに挙げられ得る。

【0773】

本開示の製剤は、各々が一緒になって、ポリヌクレオチドの安定性を増加させる、ポリヌクレオチドによる細胞トランスフェクションを増加させる、ポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の発現を増加させる、及び／またはポリヌクレオチドにコードされたタンパク質の放出プロファイルを変更する量で1つまたは複数の賦形剤を含み得る。さらに、本開示のポリヌクレオチドは、自己組織化した核酸ナノ粒子を使用して製剤化され得る。

【0774】

本明細書において記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野において公知であるかまたは今後開発される任意の方法によって調製され得る。概して、かかる調製方法は、活性成分を、賦形剤及び／または1つまたは複数の他の補助成分と合わせるステップを包含する。

【0775】

本開示に従う医薬組成物は、バルクで、単回単位用量として、及び／または複数の単回単位用量として、調製、パッケージング、及び／または販売され得る。本明細書において使用される時、「単位用量」は、活性成分の既定量を含む個別の量の医薬組成物を指す。活性成分の量は、概して、対象へ投与される活性成分の投薬量、及び／またはかかる投薬量の好都合な分率（例えばかかる投薬量の2分の1または3分の1等）に等しい。

【0776】

本開示に従う医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び／または任意の追加の成分の相対量は、治療されている対象の同一性、サイズ、及び／または条件に依存して、ならびに組成物が投与される経路にさらに依存して、変動し得る。例えば、組成物は、0.1%~99% (w/w) の活性成分を含み得る。一例として、組成物は、0.1%~100%、例えば0.5~50%、1~30%、5~80%、少なくとも80% (w/w) の活性成分を含み得る。

【0777】

いくつかの実施形態において、本明細書において記載される製剤は、少なくとも1つのポリヌクレオチドを含有する。非限定例として、製剤は、1、2、3、4、または5つのポリヌクレオチドを含有する。

【0778】

任意の従来の賦形剤媒質が、任意の所望されない生物学的な効果を産生するか、またはさもなければ医薬組成物の任意の他の構成要素（複数可）と有害な様式で相互作用すること等によって、物質またはその誘導体と不適合でない限りは、従来の賦形剤媒質の使用は本開示の範囲内で企図され得る。

【0779】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子の粒子サイズは、増加される及び／または減少される。粒子サイズの変化は、生物学的な反応（炎症等であるがこれらに限定されない）を無効にすることを支援し得るか、または哺乳動物へ送達された修飾されたmRNAの生物学的な効果を増加させ得る。

【0780】

医薬組成物の製造において使用される薬学的に許容される賦形剤としては、不活性希釈物質、界面活性剤及び／または乳化物質、防腐物質、バッファー剤、滑沢剤、及び／または油が挙げられるがこれらに限定されない。かかる賦形剤は、任意選択で本開示の医薬製剤中に含まれ得る。

【0781】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、分子（コレステロール等）を隔離し得るナノ構造中で、または当該ナノ構造と共に投与され、当該ナノ構造中で製剤化されるか、または当該ナノ構造と共に送達される。これらのナノ構造及びこれらのナノ構造を作製する方法の非限定例は、米国特許公開第US20130195759号において記載される。これらのナノ構造の例示的な構造は、米国特許公開第US20130195759号において示され、コア、及びコアを周囲のシェルを含み得る。

10

【0782】

均等物及び範囲

当業者は、単なるルーチンの実験作業を使用するだけで、本明細書において記載される本開示に従う特定の実施形態に対する多くの均等物を、認識または確認することが可能であろう。本開示の範囲は、以下の記載に限定されることは意図されず、むしろ添付の特許請求の範囲において示される通りである。

【0783】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、及び「the」等の冠詞は、相反することが指摘されない限り、またはさもなければ文脈から明白ではない限り、1または1を超えることを意味し得る。群の1つまたは複数のメンバーの間に「または」を含む特許請求の範囲または記載は、相反することが指摘されない限り、またはさもなければ文脈から明白ではない限り、群のメンバーのうちの1つ、1つを超える、またはすべてが、所与の産物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、またはさもなければ関連しているならば、満たされていると判断される。本開示は、群の正確に1つのメンバーが、所与の産物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、またはさもなければ関連している実施形態を包含する。本開示は、群の1を超えるメンバーまたはすべてのメンバーが、所与の産物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、またはさもなければ関連している実施形態を包含する。

20

【0784】

「含む」という用語は、開放的であることが意図され、追加の要素またはステップの包含を許容するが、要求しないことにも留意されたい。「含む」という用語が、本明細書において使用される場合に、したがって「からなる」という用語も、網羅及び開示される。

30

【0785】

範囲が与えられる場合は、終点が含まれている。さらに、別段の指示のない限り、またはさもなければ文脈及び当業者の理解から明白ではない限り、範囲として表現される値は、別段文脈が明確に定めない限り、本開示の異なる実施形態において述べられた範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、範囲の下限の単位の10分の1までとり得ることを理解されたい。

【0786】

すべての引用された出典（例えば本明細書において引用された、参考文献、出版物、データベース、データベースエントリー、及び技術）は、たとえ引用で明示的に述べられてなくとも、参照することによって本出願の中へ援用される。引用された出典と本出願の記述が矛盾する事例において、本出願における記述を優先するものとする。

40

【実施例】

【0787】

本開示は、以下の実施例を参照することによって、より完全に理解されるだろう。しかしながら、それらは、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきでない。本明細書において記載される実施例及び実施形態は、例示のみを目的とするものであり、それらに照らした様々な修飾または変化は、当業者に示唆され、本出願の精神及び範囲ならびに

50

添付の特許請求の範囲内に包含されるものであることが理解される。

【0788】

実施例1：チェックポイントがんワクチンの免疫原性

ヒト白血球抗原（HLA）血清型A 02：01（HLA-A*02：01）トランスジェニックマウスにおいてIDO1及びPD-L1エピトープに対する抗原特異的T細胞応答を生成するようにデザインされたメッセンジャーRNA（mRNA）ワクチンを、免疫原性について試験した。ワクチンは、4回反復の（PD-L1₆₋₃₀+IDO1₁₉₂₋₂₁₆）から構成される八量体をコードする。ワクチンを、化合物25ベースの脂質ナノ粒子（LNP）で製剤化した。

【0789】

研究1日目及び8日目に6 µgのワクチンによりマウスにワクチン接種した。脾臓を研究15日目に収集し、ワクチン中でコードされる個別のエピトープに対応する重複ペプチドにより脾細胞を再度エキスピボで刺激した。

【0790】

陽性応答を、IFNγ酵素連結免疫吸収性スポット（ELISpot）及び細胞内サイトカイン染色（ICS）及びフローサイトメトリーによって検出した。免疫応答は、評価されたすべてのHLA-A*02：01動物において、IFNγELISpotによってPD-L1及びIDO1の両方に検出された。PD-L1特異的CD8+IFNγ+ T細胞応答は、すべてのHLA-A*02：01動物において観察され、1匹のHLA-A*02：01動物は、IDO1特異的CD8+IFNγ+ T細胞応答を示した。

【0791】

データの全体は、IDO1／PD-L1抗原コンカテマーmRNAワクチンが、HLA-A*02：01トランスジェニックマウスT細胞免疫原性モデルにおいて、IDO1／PD-L1特異的T細胞応答を生成することを示す。

【0792】

実施例1A。ワクチンデザイン

mRNAワクチン中の2つのエピトープの配列及び再刺激を遂行するために使用されたペプチド（各々について全長25mer、予測される最小配列、及び4つの重複する15merペプチドを含む）を、表1中でリストする。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1：IDO1／PD-L1 抗原コンカテマーメッセンジャーRNAワクチンエピトープ及び再刺激ペプチド

エピトープ	エピトープ配列	再刺激ペプチド配列
IDO1 ₁₉₂₋₂₁₆	ERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQ	ERDTLLKALLEIASCLEKALQ VFHQALLEIASCLERDTLLK ALLEIASCLKALLEIASCLEK ALEIASCLEKALQVFHQ RDTLLKALLEIASCL
PD-L1 ₆₋₃₀	VFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYV V	VFIFMTYWHLNNAFTVTVPK DLYVVLLNNAFTVTVVFIFMT YWHLNNAFTTYWHLNNAFT VTVPKLNNAFTVTVPKDLYVV FMTYWHLNNAFTVTVAF TV

10

20

【0793】

Richner et al (Richner et al 2017) において記載されるように、mRNA 薬物物質を製造した。mRNA を LNP 中で製剤化した。陰性対照は、翻訳されない第 IX 因子配列 (NT-FIX) を含有する脂質ナノ粒子 (LNP) である。すべての試験物品を、同じ組成で、同じ最終バッファー (100 mM のトリス、7 % w / v の PG、1 mM の DTPA、pH 7.5) 中で製剤化する。製剤化の詳細を表 2 中でリストする。

【表 2】

30

表 2：2 つの試験物品についての製剤化の詳細

試験材料	mRNA 濃度 (mg/ml)	サイズ (nm)	DPI	EE%
NT-FIX (FID 18295.2)	0.28	82	0.15	93
IDO1- PDL1_alt25merX4 (FID 18297.1)	0.36	88	0.12	89

40

略語：DS、薬物物質；EE、カプセル化効率；IDO1、インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 1；mRNA、メッセンジャーRNA；NT-FIX、翻訳可能でない第 XI 因子；DPI、多分散性指数；PDL1、プログラム死リガンド 1 (PD-L1)。

【0794】

mRNA ワクチン用量は、100 μ L の合計の用量体積において、化合物 25 ベースの LNP 中で製剤化された 6 μ g の mRNA を含んでいた。すべて試験物品を、注射前に PBS 中で希釈した。

【0795】

マウス

50

メスH L A - A * 0 2 : 0 1マウス (O R 1 1 5 9、T a c o n i c系統# 9 6 5 9 - F ; 週齢 : 出荷時に6 ~ 8週 ; 平均体重 : 研究開始時に2 1 . 3 g)、メスB A L B / cマウス (O R 1 1 6 0、T a c o n i c系統# B A L B / c A n N T a c ; 週齢 : 出荷時に6 ~ 8週 ; 研究開始時に平均体重1 9 . 8 g)、及びメスC 5 7 B L / 6マウス (T a c o n i c系統# B 6 n T A C ; 出荷時に週齢6 ~ 8週 ; 研究開始時に平均重量1 8 . 7 g)を、T a c o n i c L a b o r a t o r i e s (H u d s o n、N Y)から購入した。

【0796】

用量開始の直前に、メスH L A - A * 0 2 : 0 1マウスを、1 8 . 3 3 ~ 2 5 . 7 3 グラム (平均2 1 . 2 9 g、中央値2 1 . 0 4 g)の範囲の体重に従って、群 (群1においてn = 4及び群2 ~ 9においてn = 6)へと無作為に割り当てた。

10

【0797】

実施例1B。研究デザイン

用量開始の直前に、動物を、B A L B / cマウス (1群あたりマウス# 1 ~ 3)について、1 6 . 6 7 ~ 2 2 . 2 8 g (平均1 9 . 7 7 g及び中央値1 9 . 7 3 g)の範囲、及びC 5 7 B L / 6マウス (1群あたりマウス# 4 ~ 6)について、1 6 . 4 5 ~ 2 0 . 2 7 g (平均1 8 . 6 7 g、中央値1 8 . 7 2 g)の範囲の体重に従って、群 (1群あたりn = 6、各々の群内で試験したマウス系統ごとにn = 3)へと無作為に割り当てた。群2 ~ 4及び群6 ~ 9に関連するデータは、このレポート中で提示されない。

20

【0798】

マウスを、表3中で呈された研究デザインに従って処理した。

【表3】

表3 : 研究O R 1 1 5 9及びO R 1 1 6 0についての処理レジメン

群 ^a	mRNA/処理 ^b	mRNA 比	個別の mRNA 用量 (μg) ^c	ROA、体積、処理日	組織採取の時期 (用量後)
1	NT FIX	N/A	6	IM、100μL (1肢あたり50μL)、研究1日目及び8日目	第2の用量の7日後 (研究15日目)
5	IDO1-PDL1_25mer_altX4	N/A	6		

30

略語 : I D O 1、インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ1 ; I M、筋肉内 ; m R N A、メッセンジャーRNA ; N / A、該当無し ; N T F I X、翻訳可能でない第I X因子 ; P D L 1、プログラム死リガンド1 (P D - L 1) ; R O A、投与経路。

^a研究O R 1 1 5 9 (メスH L A - A * 0 2 : 0 1マウス)において、群サイズは、群1中でn = 4及び群2 ~ 9中でn = 6であった。研究O R 1 1 6 0 (野生型メスC 5 7 B L / 6及びB A L B / cマウス)において、群サイズは、n = 6であり、試験したマウス系統ごとにn = 3匹のマウスであった。

40

^bmRNAを、1 0 0 m Mのトリス、7 % w / vのP G、1 m MのD T P A、p H 7 . 5のバッファーで化合物2 5含有脂質ナノ粒子中で製剤化した。

^c全mRNA用量は、6 μ gであった。

【0799】

実施例1C。免疫、組織収集、及びプロセッシング

L N P中で個別に製剤化されたm R N Aを、P B S中で標的用量レベルへ希釈し、化合物ベースのL N P中で製剤化されたI D O 1 / P D - L 1コンカテマーm R N Aワクチン

50

である mRNA-4359 を、研究 1 日目及び 8 日目に筋肉内に投与した（1 用量あたり各々の後肢へ 50 μ L を投与した）（ハイスループット操作ロット FID18297、6 μ g 用量、群 1 において $n=4$ 及び群 2～9 において $n=6$ 、試験した系統ごとに $n=3$ 匹のマウス及び 1 群あたり $n=6$ ）。脾臓を研究 15 日目に収集し、単一細胞懸濁物を標準的な手順によって調製した。簡潔には、50 mL のコニカルチューブの内部に置いた 70 μ L のセルストレーナーを介して、5 mL のシリンジのプランジャーを使用して、脾臓を手動で破壊した。セルストレーナーを機械的破碎の間に培地により複数回洗浄し、50 mL のコニカルチューブの中へ洗浄培地のすべてを収集した。細胞懸濁物を 4℃で 10 分間 300 $\times$ g で遠心沈殿させ、上清をペレットから流し出し、赤色血液細胞溶解のために、3 mL のアンモニウムクロライドカリウム溶解バッファー中で細胞を再懸濁した。溶解を、室温で 3 分間遂行した。3 分間の溶解後に、10% の FBS を含有する 12 mL の RPMI-1640 を各々のチューブへ添加し、懸濁物を 4℃で 10 分間 300 $\times$ g で遠心沈殿させた。上清を流し出し、細胞を 10% の FBS を含有する 3 mL の RPMI-1640 中で再懸濁した。次いで細胞懸濁物を、新たな 50 mL のコニカルチューブの中へ 70 μ L のセルストレーナーを介して濾過した。洗浄ステップを、10% の FBS を含有する 10 mL の RPMI-1640 により元の 50 mL のコニカルチューブをセルストレーナーを介してリンスすること及び新たな 50 mL のコニカルチューブの中へ収集することによって遂行した。次いで細胞懸濁物をカウントし、染色するまで 37℃、5% の CO₂ で保存した。

10

20

30

40

50

【0800】

マウス IFN γ ELISpot-plus キット（Mabtech、3321-4APT-2）を使用して、抗原特異的免疫応答を分析した。ELISpot キットは、IFN γ プレコートプレート、ビオチン化検出モノクローナル抗体（R4-6A2）、ストレプトアビジン-ALP、及び BCIP/NBT-plus 基質を含む。脾細胞を細胞懸濁物へプロセッシングし、赤血球を除去し、生存細胞をカウントした。ELISpot プレートを、37℃及び 5% の CO₂ で 2 時間完全培地によりブロッキングし、その後、細胞をプレーティングした。細胞を、ペアの刺激物質ペプチド（2 μ g/mL；表 1）、陰性（ビヒクル／培地）対照、または陽性（50 ng/mL のホルボールミリスチン酸アセテート、[Sigma Aldrich、P8139] 及び 1 μ g/mL イオノマイシン [Sigma Aldrich、I0634]）対照（各々 1 ウェルへ添加した）と共にプレーティングし（4 $\times$ 10⁵ 細胞／ウェル）、プレートを、37℃及び 5% の CO₂ で 36 時間インキュベーションした。インキュベーション後に、5 回の PBS の洗浄を使用して、細胞を膜から洗浄した。抗マウス IFN γ 検出抗体 R4-6A2（100 μ L／ウェル；1 μ g/mL）を、膜へ添加し、プレートを、37℃及び 5% の CO₂ で 2 時間インキュベーションした。次いで膜を PBS により 5 回洗浄し、その後、室温で 1 時間ストレプトアビジン-ALP を添加した。1 時間のインキュベーションに続いて、膜を PBS により 5 回洗浄し、続いて PBS により 3 回洗浄し、その後、BCIP/NBT-plus 基質を添加した。膜を BCIP/NBT-plus 基質中で 4 分間インキュベーションして、プレートを顕色させ、その後、冷水道水中でのプレートのリンスによって反応を停止した。

【0801】

脾臓細胞を、カウントし、正規化し、生存率（固定可能生存率色素、4）のために染色し、TruStain[™] fcX（商標）（抗マウス CD16／32）抗体（BioLegend、#101319）によりブロッキングし、表 4 中で詳述されるように染色バッファー中で希釈した蛍光抗体により染色した。細胞内染色を、FoxP3／転写因子染色バッファーセット（Thermo Fisher Scientific、#005523）により遂行した。さもなければ、サンプルを、細胞内固定バッファー（Thermo Fisher Scientific、#88-8824-00）により固定した。染色したサンプルを、Attune NxT フローサイトメーター（Invitrogen）で分析した。

【表 4】

表 4：使用したフローサイトメトリー染色抗体及び希釈

抗体	フルオロフォア	クローン	アイソタイプ	希釈
CD44	FITC	IM7	ラット IgG2b	200
CD8b	Percp Cy5.5	YTS156.7.7	ラット IgG2b	300
CD4	APC	GK1.5	ラット IgG2b	300
Foxp3	AF700	MF-14	ラット IgG2b	200
固定可能な生存率色素	eFluor 780			800
CD107a	BV421	1D4B	ラット IgG2a	200
CD62L	BV510	MEL-14	ラット IgG2a	200
TNF α	BV650	MP6-XT22	ラット IgG1	200
IL-2	PE	JES6-5H4	ラット IgG2b	200
IFN γ	PE/Cy7	XMG1.2	ラット IgG2b	400

10

20

【0802】

IFN γ ELISpot 分析

スポット形成単位を、CTL ImmunoSpot R 分析器を使用して数えた。バックグラウンド除去を、各々のウェルからビヒクルのみのスポットを差し引くことによって遂行した。ELISpot 結果についての統計的有意差を Mann-Whitney 試験によって、及びフローサイトメトリー結果についての統計的有意差を Graphpad Prism ソフトウェアを使用する二元配置 ANOVA によって計算した。適用されるパラメーターは、両側分布であった。0.05 以下の P 値を、有意であると判断した。0.05 $\geq$ P > 0.01、* 有意；0.01 $\geq$ P > 0.001、** 非常に有意；0.001 > P、*** 高度に有意。

30

【0803】

フローサイトメトリー分析

すべてフローサイトメトリー分析を、FlowJo (バージョン 10、FlowJo ; Ashland、OR) を使用して遂行した。このソフトウェアにおける補正を補正対照を使用して手動で調整し、染色内のすべてサンプルへ均等に適用した。補正マトリックスは各々の染色間で類似していたが、単一色対照に従って各々の染色について調整した。

【0804】

実施例 1D。結果

mRNA ワクチンによってコードされる IDO1 配列及び PD-L1 配列に対応する重複ペプチドまたはビヒクルのみにより細胞をエクスピボで再刺激することによって、IFN γ ELISpot 応答を、IDO1 / PD-L1 mRNA (化合物 25 ベースの LNP 中で製剤化された) によりワクチン接種した HLA-A*02:01 マウスの脾細胞と野生型マウスの脾細胞との間で比較した。バックグラウンド除去を、各々のウェルからビヒクルのみのスポットを差し引くことによって遂行した。ワクチン中の IDO1 エピトープ及び PD-L1 エピトープに対して、応答が検出された。更に、HLA-A*02:01 動物において検出されたエピトープ特異的応答は、Mann-Whitney t 検定によって決定されるように、野生型動物において検出されたものよりも有意に大きい (図 1 及び図 2)。最小の応答は、ビヒクルのみで検出された。

40

【0805】

CD8 + IFN γ + T 細胞応答も、ビヒクルのみ、IDO1 ペプチド、及び PD-L

50

1 ペプチドによるエキスピボの再刺激への応答として、ICS及びフローサイトメトリーによって測定した（図3）。バックグラウンド除去を、対応するサンプルからビヒクルのみの応答を差し引くことによって遂行した。PD-L1特異的CD8⁺T細胞応答は、IDO1/PD-L1コンカテマー処理動物において検出された。更に、HLA-A*02:01動物において検出されたPD-L1特異的応答は、Mann-Whitney t検定によって決定されるように、野生型動物において検出されたものよりも有意に大きい。有意なIDO1特異的CD8⁺IFN γ ⁺T細胞応答は、このアッセイにより検出されなかった。

【0806】

後続する薬理学研究において、着実なIDO1特異的T細胞応答は、チェックポイントがんワクチンによって誘導された。顕著なことには、これらの応答は、HLA-A*02:01導入遺伝子に関係なく検出可能であった（データ不掲載）。

【0807】

実施例1E。結論

IDO1/PD-L1抗原コンカテマーmRNAワクチンを、T細胞応答を生成するようにデザインした。HLA-A*02:01拘束性免疫応答は、IDO1/PD-L1コンカテマーmRNAワクチンによるワクチン接種後のHLA-A*02:01トランスジェニックマウス及び野生型マウスにおけるIDO1/PD-L1特異的応答を比較することによって評価された。野生型動物に比較して、HLA-A*02:01において有意により高い量のIDO1及びPD-L1特異的応答が、IFN γ ELISpotによって観察され、抗原特異的応答がヒトHLAによっても媒介されることを示した。フローサイトメトリーベースの分析から、PD-L1特異的応答はCD8⁺IFN γ ⁺T細胞によって駆動されることが示された。総合すると、これらのデータは、IDO1/PD-L1抗原コンカテマーmRNAワクチンが、HLA-A*02:01トランスジェニックマウス免疫原性モデルにおいて、IDO1/PD-L1特異的T細胞応答を惹起することを実証する。

【0808】

実施例2。チェックポイントがんワクチンをコードするmRNAのヒト初回投与用量選択を支援する免疫刺激/免疫力学モデル化。

この実施例は、PD-L1及びIDO（がんにおいて頻繁に上方制御される2つの標的）に対するチェックポイントがんワクチンをコードするmRNAについての投薬量範囲を同定するための、半機構的数学的モデル化を記載する。このモデル化フレームワーク（IS/IDモデル化とも呼ばれる）は、ワクチン接種によって刺激された免疫応答（IS）及びもたらされる免疫応答力学（ID）を記載する。

【0809】

ワクチン薬物の開発は、標準的なpK/PDモデル化アプローチにおけるフレームワークとして一般的に使用される従来の濃度vs時間プロファイルを欠如する。したがって、ヒト初回投与（FIH）試験のためのワクチン用量選択は、多くの場合、モデルを活かした医薬品開発（MIDD）及び毒性データ査定を介して、安全性、毒物学、及び用量応答の適切な査定を可能にする妥当な動物モデルの選択を包含する。加えて、研究が健康な対象ではなく腫瘍患者において遂行されるので、選択される用量も治療的に妥当でなくてはならない。

【0810】

しかしながら、IDO1及びPD-L1へ向けられるチェックポイントがんワクチンの文脈において、PD-L1またはIDO1のいずれかに対して活性化されたT細胞の標的毒性を評価する妥当な動物モデルは無い。臨床的に妥当なモデルの不在は、主として以下の：（a）ペプチド-MHC複合体へのT細胞受容体（TCR）の高い結合特異性が、免疫応答のために要求される；（b）すべての種内及び種にわたって、MHC結合対立遺伝子の高多型性及び低有病率が存在する；（c）非ヒト霊長動物におけるMHCを結合ペプチドの低確率が予測される；ならびに（d）ヒトにおいて観察される薬理活性を模倣する

10

20

30

40

50

ことが動物モデルでは不可能である、ためであった。さらに、従来の毒性試験は、LNPのみの毒性に限定され、抗原特異的な標的T細胞毒性ではないだろう。

【0811】

したがって、毒性を査定するために、LNP毒性の定義を支援するために同じLNP製剤を使用した他のプログラムを活用し、PD-L1及びIDO1に向けられるペプチドベースのワクチンに関して以前に公開された臨床安全性データから、臨床安全性データを得た。PD-L1及びIDO1に対するペプチドベースのワクチンの公開された文献データの活用から、治療的に妥当なFIH用量を予測することが可能なモデル化フレームワークを確立した。

【0812】

従来のpK/PDモデル化と同様に、モデル開発における第1のステップは、免疫刺激の根底にある機構及び応答の力学を数学的に記載することであった。単一のPD-L1ペプチド及び単一のIDO1ペプチドから構成されたペプチドワクチンを使用する参照研究において、腫瘍患者に2週間毎に15回のワクチン用量を与え、免疫応答を測定した。図4A中で示されるように、患者の免疫応答を、ワクチン接種後75週間までの患者のT細胞応答を調査することによって測定し、100万の末梢の血液単核細胞(PBMC)へ経時的に正規化されたIFN γ スポット形成単位(SFU)の数によって図示した。

【0813】

患者ごとに層別化した抗原特異的T細胞応答をデジタル化し、100万PBMCにスケールを合わせた(図4B及び4C)。データを応答カテゴリーごとに調査し(図4D及び4E)、モデル化フレームワークをデジタル化データに基づいて構築した。

【0814】

当該モデルにおいて、以前に公開されたIS/IDモデル(図5)に基づいて、トランジショナルエフェクターメモリー(TEM)細胞は、活性化関数 δ によって表わされるように、ワクチン接種に際して系の中へ導入され、活性化関数は、活性化の大きさ(a)、遅延(b)、及び時間(c)の関数である(図5)。図5中で示されるように、TEM細胞は、ワクチン再接種に際してセントラルメモリー細胞がTEM細胞へ変換されること(BCM)によって形成された。TEM細胞は、自然死(μ_{TEM})に起因して、またはより長命のセントラルメモリー細胞への変換(β_{TEM})によって減少した。セントラルメモリー細胞は、より長命であり、TEM分化(β_{TEM})または複製(RCM)によって生じる。セントラルメモリー細胞も、ワクチン再接種に際してのTEM細胞への変換(BCM)または死(μ_{CM})によってそれらのプールから除去された。モデルは、以下の式によって図示される。

【化174】

$$d(TEM)/dt = \delta(\text{活性化関数}) - \beta_{TEM} * TEM - \mu_{TEM} * TEM + CM * \beta_{CM}$$

$$d(CM)/dt = \beta_{TEM} * TEM - \text{ワクチン再接種に際しての} (CM * \beta_{CM} - CM * RCM + \mu_{CM} * CM)$$

【0815】

一旦、IS/IDモデルが生成されたならば、それは、公開されたペプチドベースのワクチンのデジタル化データに対して適格化された(図6A~6D)。簡潔には、奏効群、完全奏効者(図6A及び6C)、及び部分奏効者(図6B及び6D)に分けられた、平均IDO1(図6A及び6B)またはPD-L1(図6C及び6D)のT細胞応答データに対して、モデルを適合させた。図6A~6D中で示されるように、モデルは、治療後の72週間までの平均の公開データに十分に適合した。

【0816】

次に、図7A~7D中で示されるように、パラメータ感度分析はモデルをさらに適格化するために遂行された。単一モデルパラメーター化をベースラインとして採用し、0.5~2倍の範囲で変動させて、変動に起因する有効な転帰を測定した。一次sobel指数及び全次sobel指数の両方を、感度の尺度として使用した。一次sobelは、パラメ

10

20

30

40

50

ーターが単独で変動された場合の感度を測定し、全次 *s o b o l* は、パラメーターがすべての他のパラメーターともに変動される場合の感度を測定した。図 7 A ~ 7 D 中で示されるように、異なる色強度を使用して、十分な時間経過にわたって対応する *s o b o l* 指数を観察する頻度を表わす。より濃い色は、対応する *s o b o l* 指数を観察する頻度が高いことを意味し、より薄い色は、*s o b o l* 指数の頻度が低いことを意味する。

【 0 8 1 7 】

全体的な感度分析は、推定されたすべてのパラメーターへの適切なレベルの感度が示され、感度パラメータの大きさが、PD-L1 CR 患者適合について「b」（活性化の時間）及びCM細胞からTEMへの変換（BCM）が高感度あることを除いて、2つの表現型（CP/PR）の間で類似していたことを示した（図 7 A ~ 7 D）。PD-L1 CR 患者適合についての高感度は、このサブセットの患者において、4週目と10週目との間で観察された応答における大きな差があり、TEM細胞の流入がピークに達するのにより長い時間を要求することにおそらく起因する。

【 0 8 1 8 】

別の感度のよいパラメーターはワクチン再接種（TR）の時間であり、異なるレジメンが異なるT細胞応答を導くことが示唆される（図 7 A ~ 7 D）。理論に束縛されることを望むものではないが、ワクチン再接種パラメーターへの時間において感度が高いことは、投薬スケジュールを最適化することが可能かもしれないことを示唆する（図 7 A ~ 7 D）。

【 0 8 1 9 】

一旦、モデルを適格化し、感度分析を遂行したならば、様々なシミュレーションを遂行した。ペプチドベースのワクチンについての予測される用量-効果曲線を図 8 A 中で示し、mRNAワクチンについての同等な曲線を図 8 B 中で示す。図 8 A 及び 8 B 中で示される結果から、チェックポイントがんワクチンをコードするmRNAの同等な180 µgの用量が、ペプチドベースのワクチンと比較して、類似のT細胞応答を惹起し得ることが示唆された。このことは、（a）mRNAワクチンは、ペプチドベースのワクチン試験において見られるのと同じ応答を惹起するように標的化されるべきである；（b）APCによる分子内在化において完全な効率性がある；（c）各々のmRNA分子はデザインされたように4つのPD-L1配列及び4つのIDO1配列を有する；ならびに（d）各々のmRNA分子はおよそ17モルのペプチドを産生する、を含む特定のモデル化仮定に基づく。

【 0 8 2 0 】

一旦、用量-効果関係が確立されたならば、用量-効果シミュレーションを遂行して、応答及びペプチドのタイプにおける潜在的な差を決定した（図 9 A ~ 9 D）。図 8 A 及び 8 B 中で示されるように、モデルから、前臨床的データの非存在下において、おそらく180 µgの用量が着実なT細胞応答を惹起し得ることが予測されたが、複数の妥当な臨床的検討の評価に続いて、100 µg用量が、理論的には治療応答を提供することができるが、治療効果及び有害事象の両方についての用量-応答曲線の探索及び調査を可能にし得る用量であることが同定された。

【 0 8 2 1 】

最終的に、反復投薬の効果をモデル化するために、複数の実行可能な投薬レジメンシミュレーションを遂行して、様々な可能性のあるワクチン接種スケジュール後のT細胞応答を推定した（図 10 A ~ 10 C）。これらの予備的シミュレーションに基づいて、15用量のQW3レジメンは、他の疑似シナリオに比較して、より長い応答を有することが予測された（図 10 A ~ 10 C）。

【 0 8 2 2 】

実施例 3。チェックポイントがんワクチンをコードするmRNAのヒト初回投与・第1/2相オープンラベル試験。

この研究は、局所進行性または転移性の固形腫瘍の患者において、チェックポイントがんワクチン単独またはペムブロリズマブとの併用の安全性及び忍容性を評価するだろう。

10

20

30

40

50

この研究は、以下の治療群を含むだろう。

【0823】

群1aは、局所進行性または転移性のがん（例えば皮膚メラノーマ、非小細胞肺癌〔NSCLC〕、非筋肉侵襲的膀胱癌、頭頸部扁平上皮癌、マイクロサテライト安定結腸直腸癌、基底細胞癌、またはトリプルネガティブ乳癌）の成人を含む。用量レベルは、修飾された継続的再査定方法モデル化によって決定され、予備的用量レベルは、50 µg、100 µg、200 µg、400 µg、及び1000 µgである。チェックポイントがんワクチンは、9サイクルで3週間毎に1回（各々のサイクルの1日目）、筋肉内投与されるだろう。群1a参加者へ、100 µgでの開始用量が投与されるだろう。

【0824】

群1bならびに薬力学的（PD）群1及び2は、局所進行性もしくは転移性のチェックポイント阻害物質不応性メラノーマまたは局所進行性もしくは転移性のチェックポイント阻害物質不応性NSCLCの成人を含む。群1bは、データの全体に基づいて群1aにおいて安全と表明されたチェックポイントがんワクチン用量レベル、及び群1aにおいて調査された現在のレベルよりも少なくとも1用量少ないレベルで、順次開始されるだろう。ペムブロリズマブ投薬は、チェックポイントがんワクチンのみと併用して計画され、9サイクル治療期間の間に、6週間毎に1回（例えば一つおきのサイクルの1日目で；サイクル1、サイクル3、サイクル5、サイクル7、及びサイクル9）、30分間の静脈内注入として400 mgで投与される。PD群における参加者は、ペムブロリズマブと併用してチェックポイントがんワクチンを投与されるだろう。

【0825】

群2は、局所進行性もしくは転移性黒色腫（コホート1）またはPD-L1腫瘍割合スコアが≥1%の局所進行性もしくは転移性のNSCLC（コホート2）で、この設定におけるこのがんについての任意の前治療（例えば第一選択治療）を受けていない成人を含む。一旦、拡張のためのMTD／推奨用量が、用量確認群（群1b）における併用療法のために表明されたならば、用量拡張群は、開始されるだろう。群2コホートにおける参加者を、9つのサイクルで21日間のサイクルの1日目（全9用量のチェックポイントがんワクチン；全5用量のペムブロリズマブ）に治療した。

【0826】

チェックポイントがんワクチン単独またはペムブロリズマブと併用した安全性及び忍容性は、様々な測定結果によって評価されるだろう。主要転帰尺度は、用量制限毒性のある患者の数ならびに有害事象の数及びタイプを含むだろう。副次評価項目は、例えばResponse Evaluation Criteria in Solid Tumorsバージョン1.1（RECIST）に基づいた、客観的奏効率（ORR）、疾患制御率（DCR）、奏効の継続期間（DOR）、及び無増悪生存期間（PFS）を含むだろう。追加の転帰尺度は、末梢及び腫瘍におけるT細胞プロファイルにおけるベースラインからのパーセント変化（例えばCD3+CD8+、CD3+CD4+、及びCD3+CD4+Foxp3+の変化によって測定される）（例えば末梢血におけるフローサイトメトリー及び腫瘍における免疫組織化学によって測定される）を含むだろう。

【0827】

他の実施形態

本開示は、その発明を実施するための形態と共に記載されるが、前述の記載は、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を例証することが意図され、限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、及び変更は、以下の特許請求の範囲内である。本明細書において記載されるすべて参照文献は、参照することによってそれらの全体が援用される。

10

20

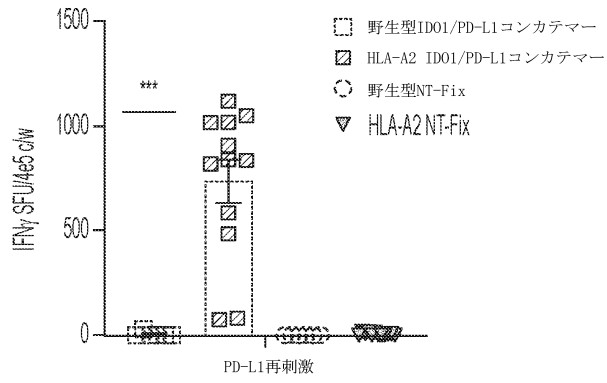
30

40

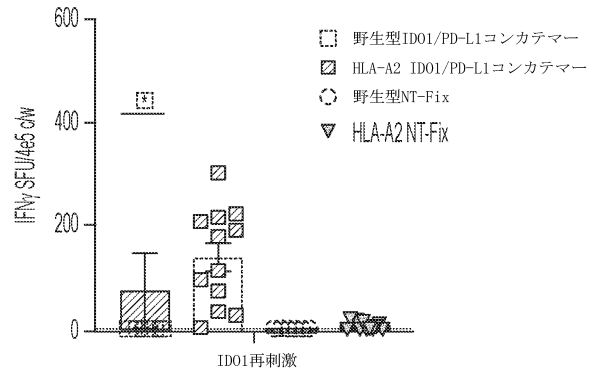
50

【図面】

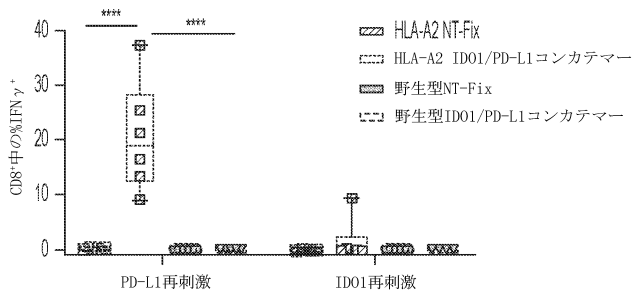
【図 1】



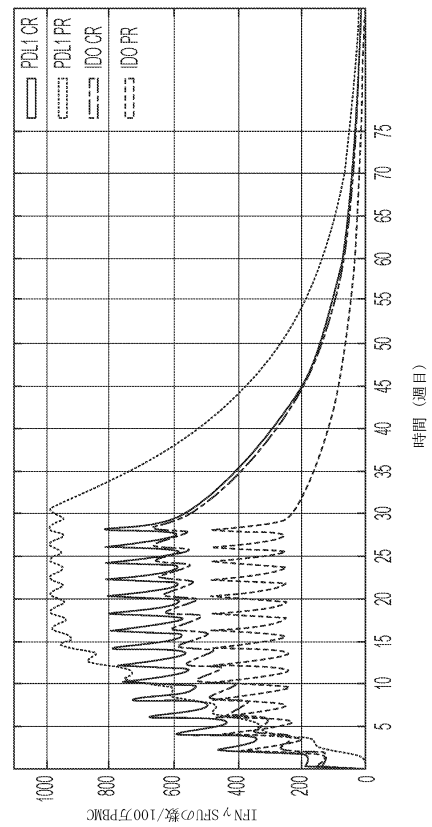
【図 2】



【図 3】



【図 4 A】



10

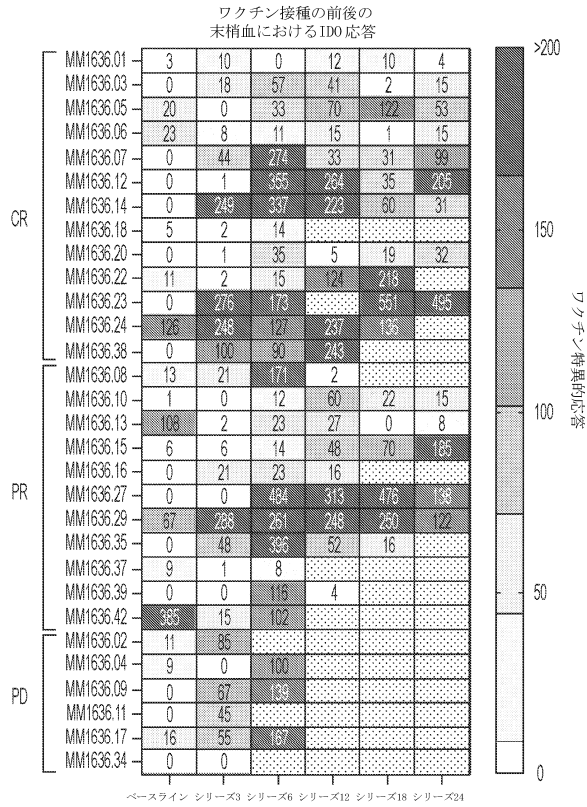
20

30

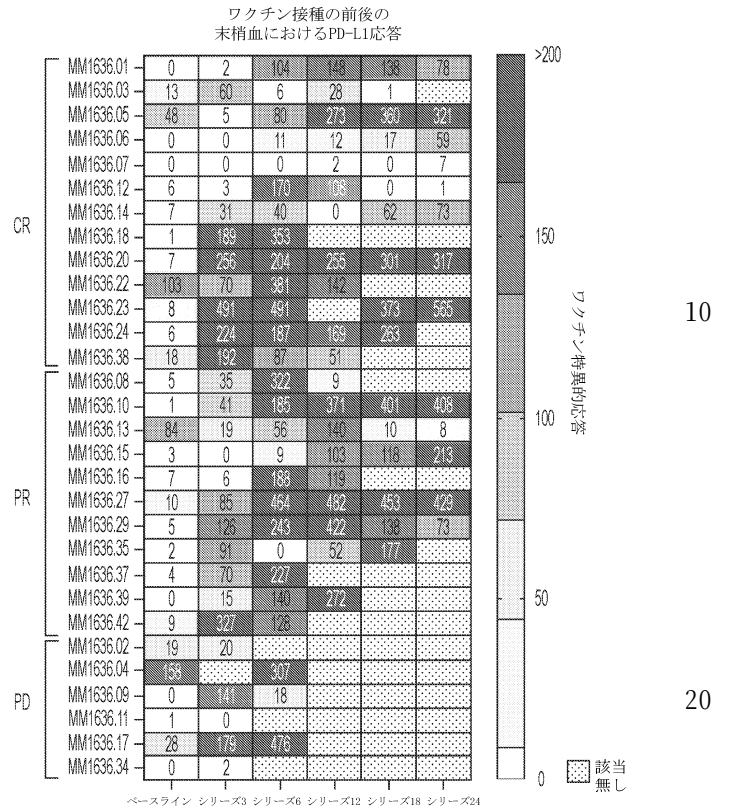
40

50

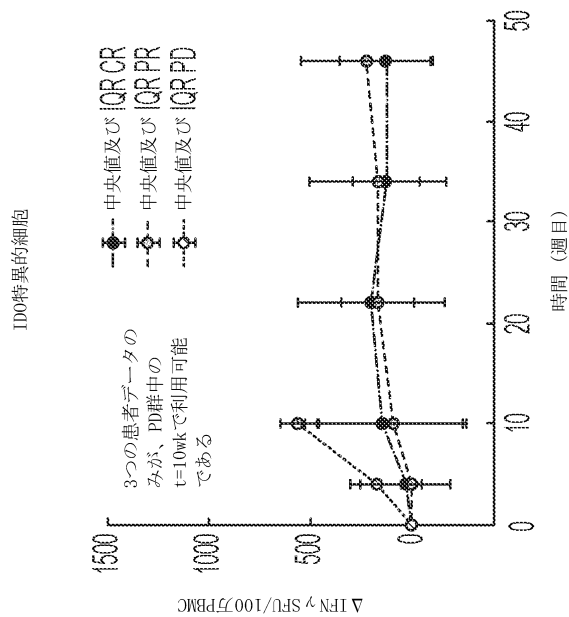
【図 4 B】



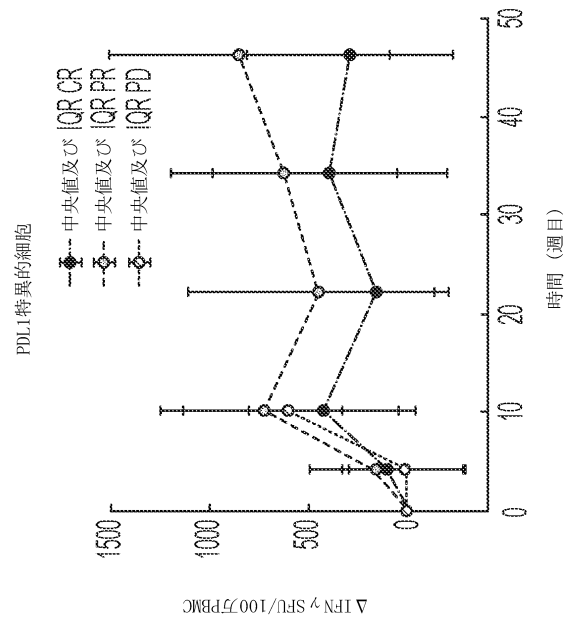
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 4 E】

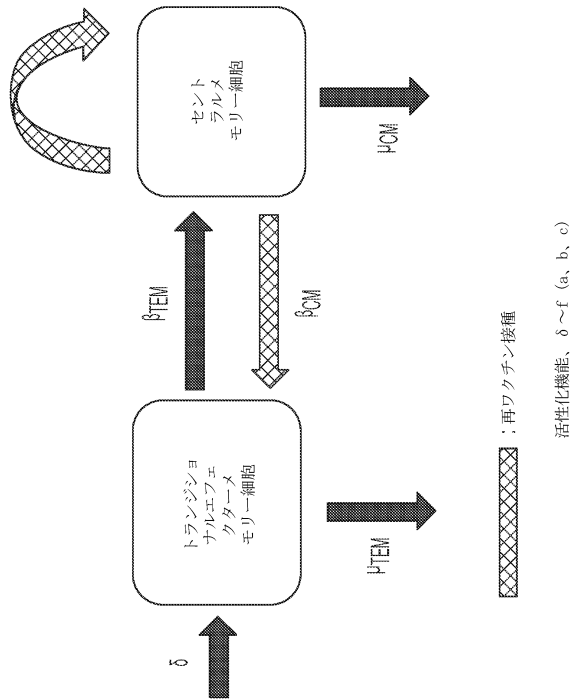


30

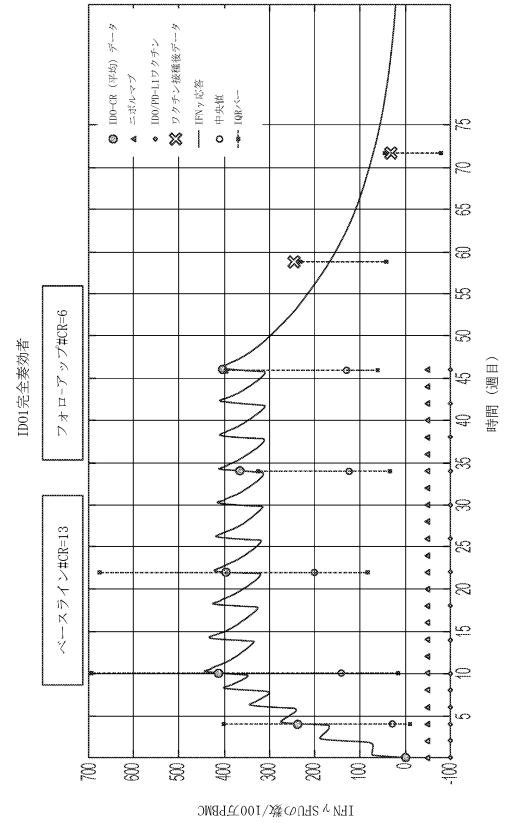
40

50

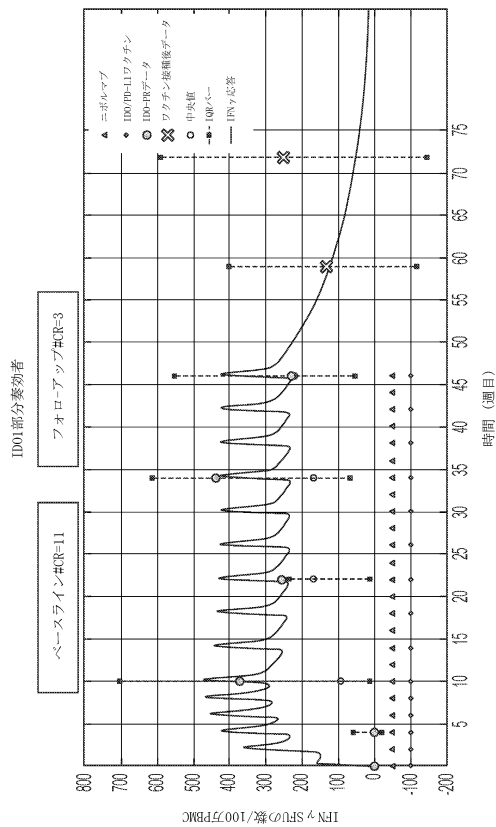
【図 5】



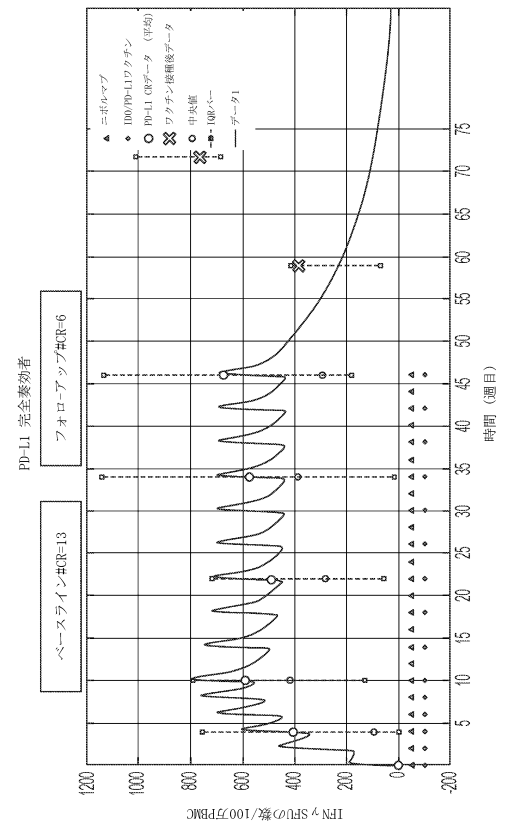
【図 6 A】



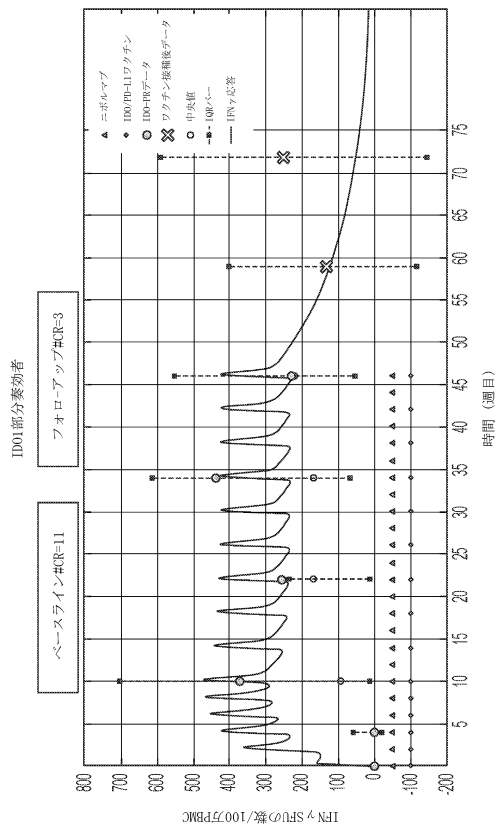
【図 6 B】



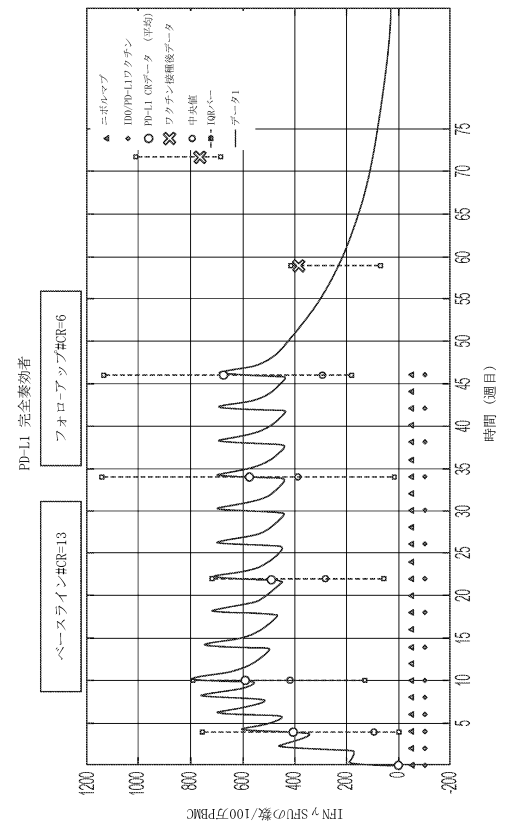
【図 6 C】



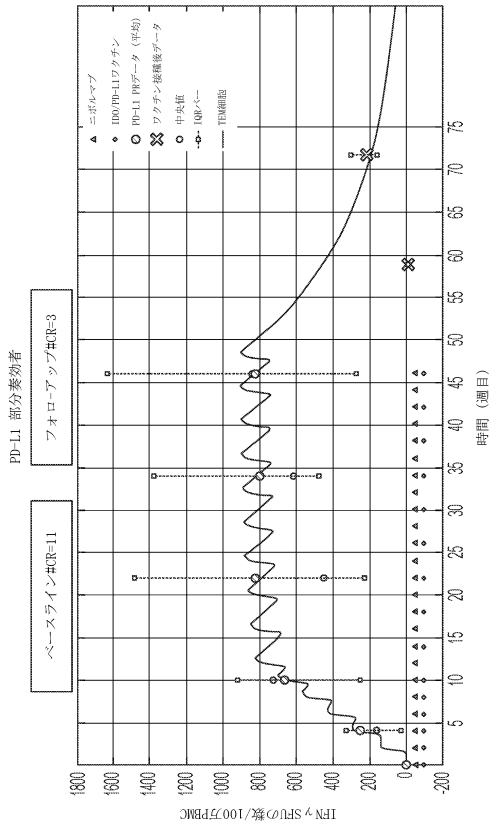
【図 6 B】



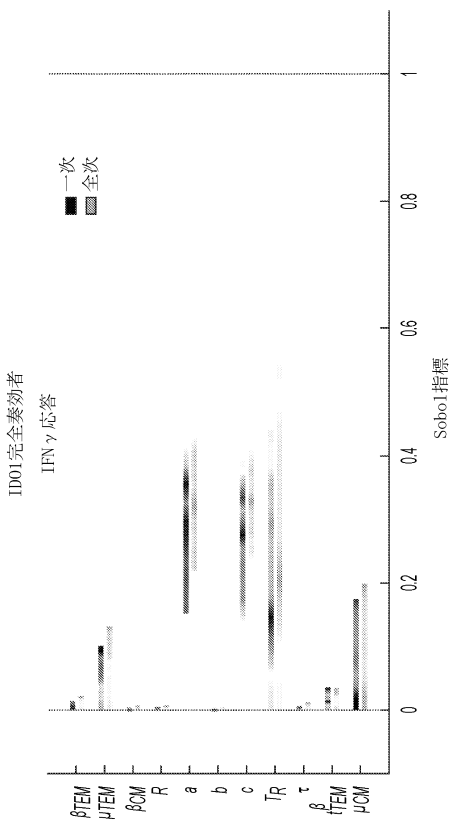
【図 6 C】



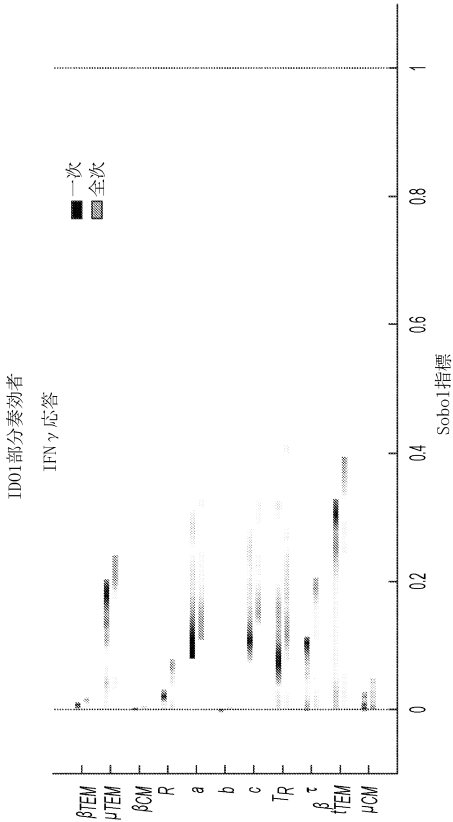
【図 6 D】



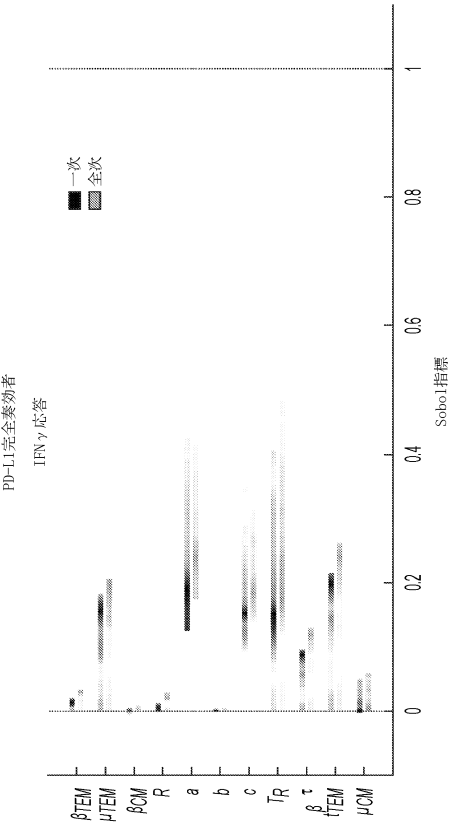
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】



10

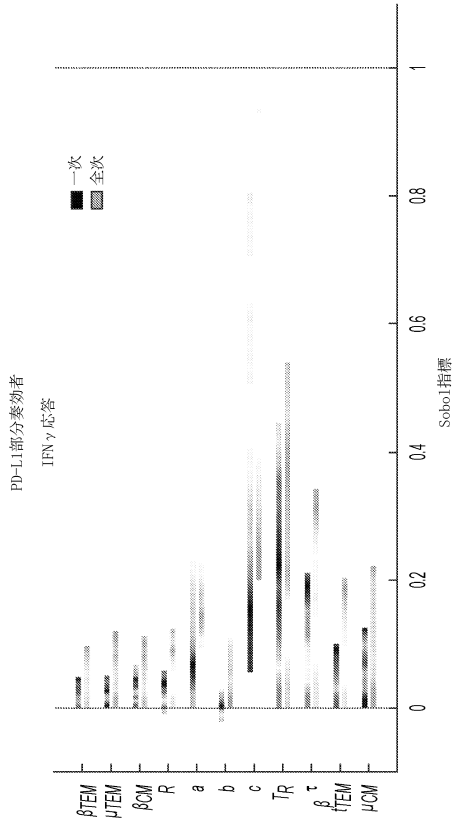
20

30

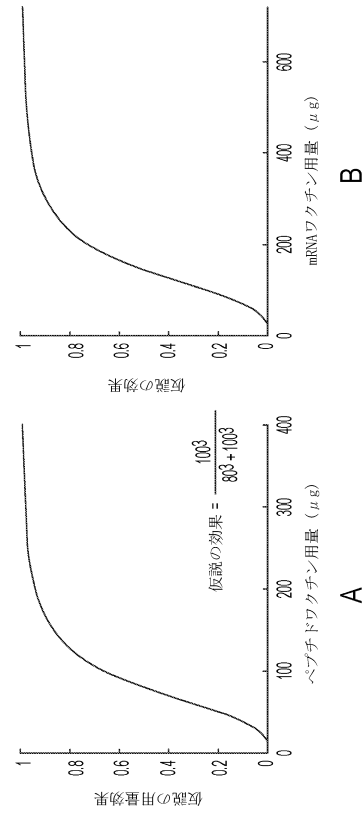
40

50

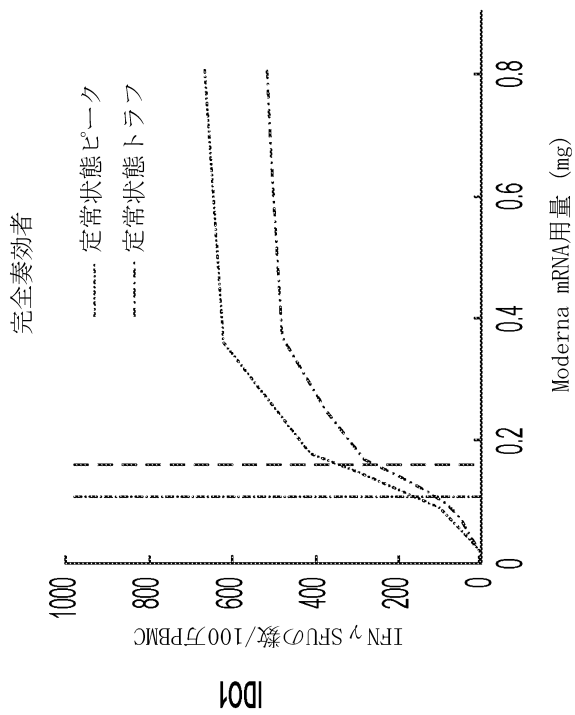
【図 7 D】



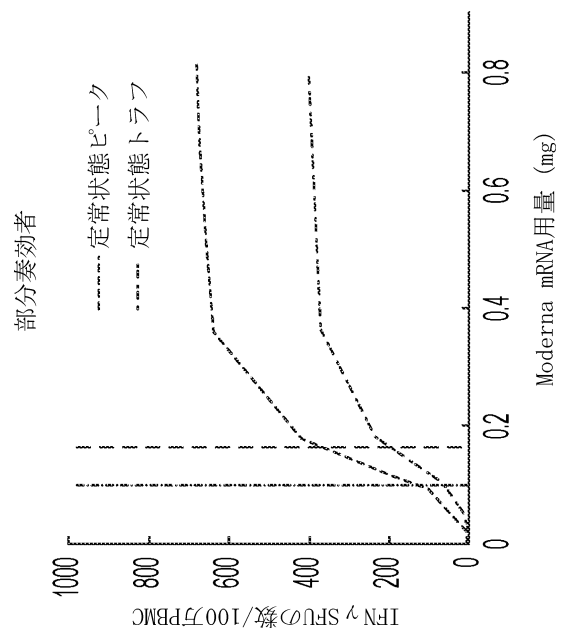
【図 8】



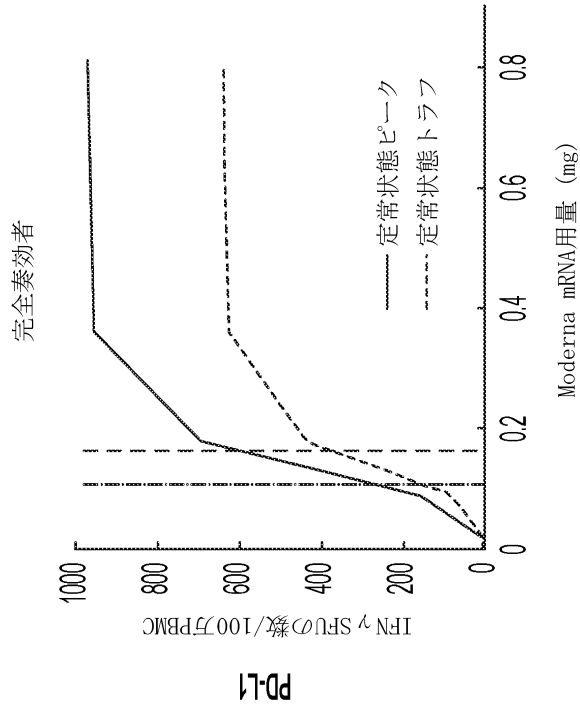
【図 9 A】



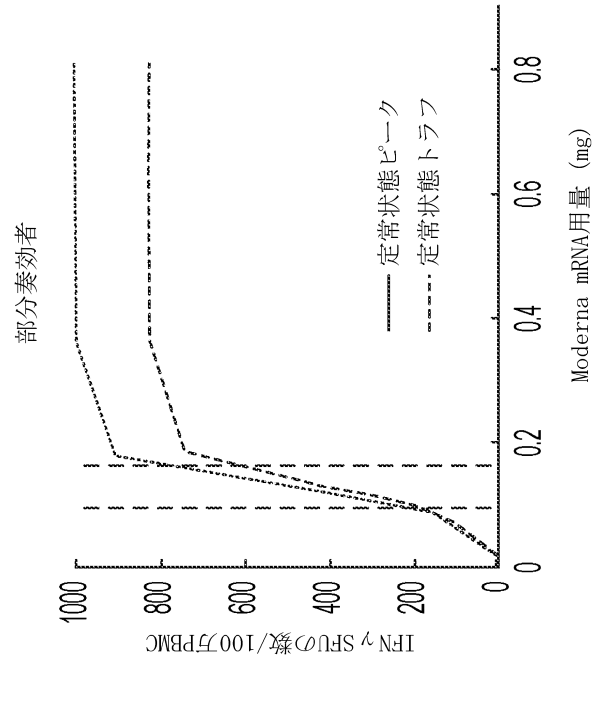
【図 9 B】



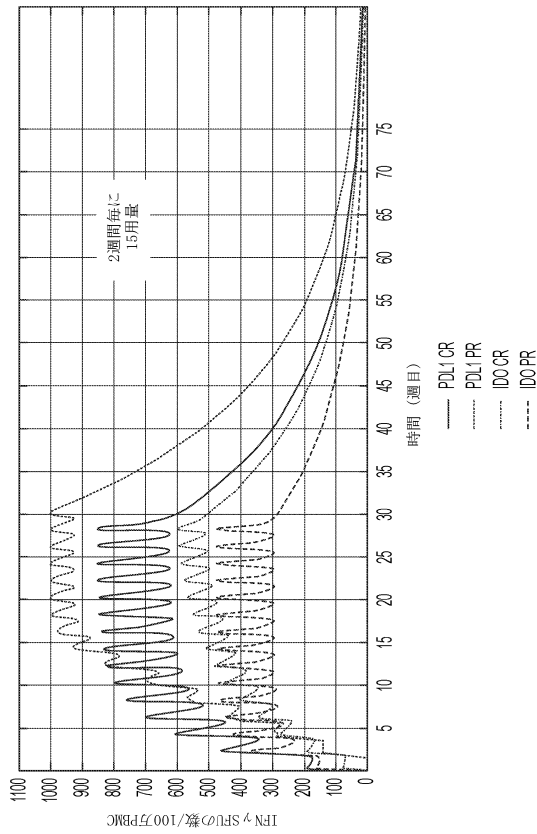
【図 9 C】



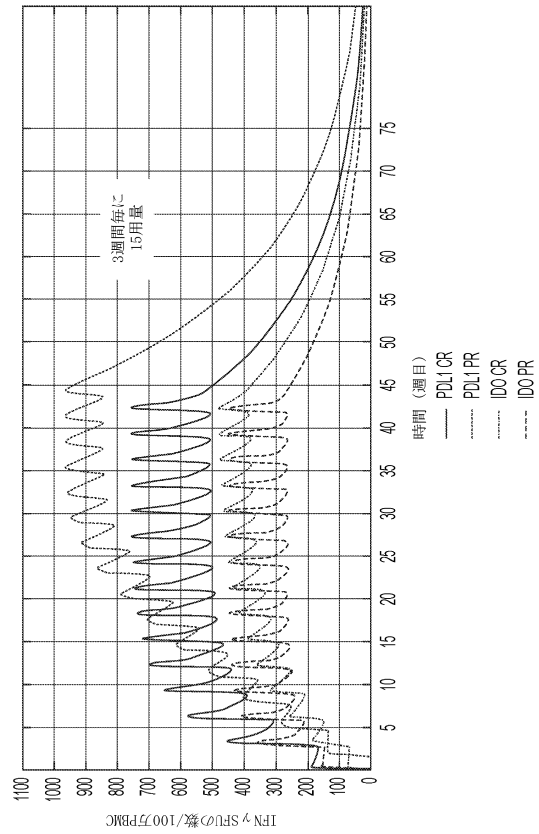
【図 9 D】



【図 10 A】



【図 10 B】



10

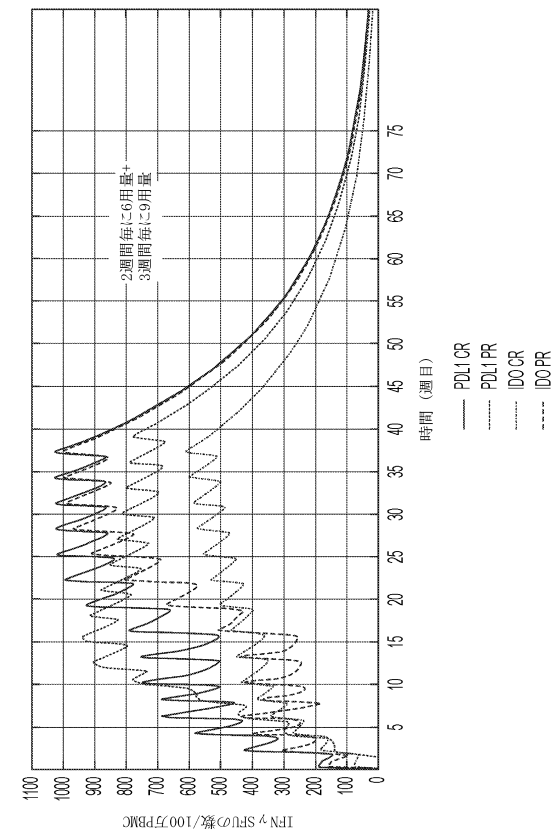
20

30

40

50

【図 10 C】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 C07K16/00 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KJELDEN JULIE WESTERLIN ET AL: "A phase 1/2 trial of an immune-modulatory vaccine against IDO/PD-L1 in combination with nivolumab in metastatic melanoma", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 27, no. 12, 1 December 2021 (2021-12-01), pages 2212-2223, XP037643407, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/s41591-021-01544-X [retrieved on 2021-12-09] the whole document -----	1-57
Y	WO 2017/049245 A2 (MODERNATX INC [US]) 23 March 2017 (2017-03-23) paragraphs [0002], [0435] ----- -/--	1-57
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 June 2023		16/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, Veerle

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062844

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/081459 A1 (MODERNATX INC [US]) 3 May 2018 (2018-05-03) claims 101-103; examples 12,15 -----	1-57
Y	SVANE I-M. ET AL: "LBA48 Clinical efficacy and immunity of combination therapy with nivolumab and IDO/PD-L1 peptide vaccine in patients with metastatic melanoma: A phase I/II trial", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 31, 1 September 2020 (2020-09-01), page S1176, XP055895421, NL ISSN: 0923-7534, DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2278 the whole document -----	1-57
Y	WO 2017/149150 A1 (IO BIOTECH APS [DK]) 8 September 2017 (2017-09-08) example 11 -----	1-57

1

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

page 2 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/062844

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/062844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017049245 A2	23-03-2017	AU 2016324310 A1	12-04-2018
		AU 2021204763 A1	05-08-2021
		CA 2998810 A1	23-03-2017
		DK 3350157 T3	14-02-2022
		EP 3350157 A2	25-07-2018
		EP 3736261 A1	11-11-2020
		ES 2910425 T3	12-05-2022
		HR P20220156 T1	15-04-2022
		HU E057613 T2	28-05-2022
		JP 6948313 B2	13-10-2021
		JP 6948313 B6	10-11-2021
		JP 6948313 B6	14-01-2022
		JP 6948313 B6	08-02-2022
		JP 2018532721 A	08-11-2018
		JP 2022008431 A	13-01-2022
		LT 3350157 T	25-02-2022
		PL 3350157 T3	16-05-2022
		PT 3350157 T	18-03-2022
		RS 63030 B1	29-04-2022
		SI 3350157 T1	29-04-2022
		TW 201718017 A	01-06-2017
		TW 202241844 A	01-11-2022
		US 2017210697 A1	27-07-2017
		US 2017210698 A1	27-07-2017
		US 2017224844 A1	10-08-2017
		US 2017233332 A1	17-08-2017
		US 2018201572 A1	19-07-2018
		US 2018273467 A1	27-09-2018
		US 2019016669 A1	17-01-2019
		US 2020123100 A1	23-04-2020
		US 2022380299 A1	01-12-2022
		WO 2017049245 A2	23-03-2017
WO 2018081459 A1	03-05-2018	AU 2017347837 A1	06-06-2019
		BR 112019008369 A2	01-10-2019
		CA 3042015 A1	03-05-2018
		CN 110402145 A	01-11-2019
		EP 3532070 A1	04-09-2019
		IL 266222 A	30-06-2019
		JP 2019532657 A	14-11-2019
		JP 2022184924 A	13-12-2022
		KR 20190086681 A	23-07-2019
		RU 2019116006 A	27-11-2020
		SG 11201903674Y A	30-05-2019
		US 2018311343 A1	01-11-2018
		US 2020261572 A1	20-08-2020
		WO 2018081459 A1	03-05-2018
WO 2017149150 A1	08-09-2017	EP 3423087 A1	09-01-2019
		JP 2019507180 A	14-03-2019
		JP 2022068348 A	09-05-2022
		US 2019343940 A1	14-11-2019
		US 2022257741 A1	18-08-2022
		WO 2017149150 A1	08-09-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/14 (2017.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フレデリック, ジョシュア ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 アーヌアー, プラヴィーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 コーダー, ブランドン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 ロバートーティソ, セリーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 ミーハン, ロバート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 グリーン, スティーブン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

(72)発明者 ガルナース, マイヤ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ビニー ストリート 3 2 5

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA65 BB15 CC07 CC15 CC16 CC17 CC18 CC27 DD51
DD63 DD70 EE23

4C084 AA13 AA19 MA02 MA05 MA24 MA38 MA66 NA14 ZA59 ZA66
ZA81 ZA89 ZB09 ZB26 ZC75

4C085 AA03 AA14 BA01 BB31 CC23 EE01 EE03 EE05 GG03

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA86 EA20 EA31 FA74