

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7201725号

(P7201725)

(45)発行日 令和5年1月10日(2023.1.10)

(24)登録日 令和4年12月26日(2022.12.26)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K

48/00

Z N A

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K

31/7105

A 6 1 K 31/7115(2006.01)

A 6 1 K

31/7115

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P

35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 2 1

請求項の数 20 外国語出願 (全167頁)

(21)出願番号 特願2021-37923(P2021-37923)

(22)出願日 令和3年3月10日(2021.3.10)

(62)分割の表示 特願2019-546924(P2019-546924

)の分割

原出願日 平成30年2月27日(2018.2.27)

(65)公開番号 特開2021-98735(P2021-98735A)

(43)公開日 令和3年7月1日(2021.7.1)

審査請求日 令和3年3月10日(2021.3.10)

(31)優先権主張番号 62/464,981

(32)優先日 平成29年2月28日(2017.2.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 17306089.8

(32)優先日 平成29年8月23日(2017.8.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 504456798

サノファイ

S A N O F I

フランス国75017パリ、アヴェニ

ユ・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ46

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 フリーデリーケ・ギーゼケ

ドイツ連邦共和国55131マインツ、

アン・デア・ゴルトグルーベ12、バイ

オエヌテック・アーゲー

(72)発明者 ウグル・サヒン

ドイツ連邦共和国55131マインツ、

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療用RNA

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における腫瘍のサイズを縮小させること、寛解期のがんの再発を予防すること、またはがん転移を予防することにおいて使用するための、IL-12scタンパク質をコードするRNAと、IL-15sushiタンパク質をコードするRNAと、IFN α タンパク質をコードするRNAと、GM-CSFタンパク質をコードするRNAとを含む、医薬組成物。

【請求項2】

RNAは、IL-12scタンパク質をコードするRNAと、IL-15sushiタンパク質をコードするRNAと、IFN α タンパク質をコードするRNAと、GM-CSFタンパク質をコードするRNAとからなる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

IFN α タンパク質は、IFN α 2bタンパク質である、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

(i) IL-12scタンパク質をコードするRNAは、配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列、もしくは配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(ii) IL-12scタンパク質は、配列番号14のアミノ酸配列、もしくは配列番号14のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む；または(i)および(ii)の組

合せである、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

(i) IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA は、配列番号 26 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 26 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(ii) IL-15 sush i タンパク質は、配列番号 24 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む；または (i) および (ii) の組合せである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

(i) IFN α タンパク質をコードする RNA は、配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(ii) IFN α タンパク質は、配列番号 19 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む；または (i) および (ii) の組合せである、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

(i) GM-CSF タンパク質をコードする RNA は、配列番号 29 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 29 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(ii) GM-CSF タンパク質は、配列番号 27 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む；または (i) および (ii) の組合せである、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに、場合により各ウリジンの代わりに、修飾ヌクレオシドを含み、そして場合により各 RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに、場合により各ウリジンの代わりに、修飾ヌクレオシドを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m1\psi$)、および 5-メチルウリジン ($m5U$) から独立して選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの RNA は、1 つより多くのタイプの修飾ヌクレオシドを含み、該修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m1\psi$)、および 5-メチルウリジン ($m5U$) から独立して選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップ $m^7,3'-O-Gppp(m_1^{2'-O})ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ を含み、場合により各 RNA は、5' キャップ $m^7,3'-O-Gppp(m_1^{2'-O})ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')$ $ppp(5')G$ を含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの RNA、場合により各 RNA は、配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 5' UTR を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの RNA、場合により各 RNA は、配列番号 8 のヌクレオチド配列、または配列番号 8 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む 3' UTR を含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

少なくとも1つのRNA、場合により各RNAは、ポリAテールを含み、場合により該ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含むか、または場合により該ポリAテールは、配列番号78で示されるポリAテールを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

1つまたはそれ以上のRNAは：

a. $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ または $3'-O-Me-\overline{m}G(5')ppp(5')G$ を含む5'キャップ；

b. (i) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または(ii) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む5'UTR；

c. (i) 配列番号8のヌクレオチド配列、または(ii) 配列番号8のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む3'UTR；ならびに

d. 少なくとも100ヌクレオチドを含むポリAテール、場合により該ポリAテールは、配列番号78で示されるポリAテールを含む、を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

さらなる治療剤を用い、場合により該さらなる治療剤は、抗がん治療剤、場合によりチェックポイントモジュレーターであり、場合により該チェックポイントモジュレーターは、抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、または抗PD1抗体と抗CTLA-4抗体の組合せである、請求項1～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

腫瘍は、肉腫、癌腫またはリンパ腫である、請求項1～16のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚におけるものである、請求項1～17のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、小細胞肺腫瘍、神経芽腫腫瘍、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫腫瘍、精上皮腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である、請求項1～18のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

RNAは、腫瘍内または腫瘍周囲投与される；

RNAは、液体、固体、またはこれらの組合せとして製剤化される；

RNAは、注射用に製剤化される；

対象はヒトである；

複数のRNAは、同時に投与される；

複数のRNAは、注射によって投与され、該RNAは、注射の前に液体溶液中で混合される；

複数のRNAは、該RNAの組合せを含む組成物を投与することにより投与される；または

上記の1つまたはそれ以上の組合せである、

請求項1～19のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年2月28日に出願した米国仮出願第62/464,981号、2017年12月12日に出願した米国仮出願第62/597,527号、および2017年8月23日に出願した欧州特許出願第17306089.8号の優先権の利益を主張するものであり、これらの出願のすべてを、それら全体として、参照によって組み入れる。

【0002】

本開示は、固形腫瘍がんを処置するための治療用RNAの分野に関する。米国国立がん研究所は、固形腫瘍を、嚢胞も液状領域も通常は含有しない組織の異常な塊と定義している。固形腫瘍は、良性および悪性（がん性）肉腫、癌腫およびリンパ腫を含み、身体的には、脳、卵巣、乳房、結腸および他の組織を含むあらゆる組織または器官に位置することがある。がんは、主に2種類に分けられることが多い：固形腫瘍がんおよび血液学的（血液）がん。150万件を超えるがん症例が毎年米国で診断され、500,000人を超える米国人が毎年がんで死亡することになると、推定される。

【背景技術】

【0003】

固形腫瘍がんは、特に処置が難しい。現行の処置は、外科手術、放射線療法、免疫療法および化学療法を含む。単独での外科手術は、小さい限局性腫瘍には適切な処置であることもあるが、大きい浸潤腫瘍およびほとんどの転移性悪性腫瘍は、通常は、外科手術では切除不能である。放射線療法および化学療法のような他の一般的な処置は、望ましくない副作用を伴い、健常細胞に損傷を与える。

【0004】

外科手術および現行の治療は、固形腫瘍の大部分を死滅させることができる場合もあるが、さらなる細胞（がん幹細胞を含む可能性がある）が、治療しても生き残ることもある。これらの細胞は、やがて新たな腫瘍を形成することができ、その結果、がんが再発することになる。集学的な従来の治療にもかかわらず、無病生存率は、多くの種類の固形腫瘍について25%未満である。集学的治療に抵抗性である固形腫瘍または治療後に再発した固形腫瘍は、処置がさらにいっそう難しく、長期生存率は、10%未満である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本明細書で開示されるのは、固形腫瘍の処置の現在の欠点を克服することができる組成物、使用および方法である。本明細書で開示される治療用RNAの投与は、腫瘍サイズを縮小することができ、生存期間を延長することができ、ならびに／または腫瘍の転移および／もしくは再発を防ぐことができる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

実施形態1．配列番号14のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるIL-12scタンパク質をコードするRNAと、配列番号27のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるGM-CSFタンパク質をコードするRNAとを含む、組成物。

実施形態2．配列番号24のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIL-15sushiタンパク質をコードするRNAをさらに含む、実施形態1に記載の組成物。

実施形態3．配列番号9のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIL-2タンパク質をコードするRNAをさらに含む、実施形態1に記載の組成物。

実施形態4．配列番号19のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIFNα2bタンパク質をコードするR

10

20

30

40

50

NAをさらに含む、実施形態1に記載の組成物。

実施形態5. 以下を含む組成物：

a. 配列番号14のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIL-12s cタンパク質をコードするRNA；

b. 配列番号27のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるGM-CSFタンパク質をコードするRNA；および

c. 配列番号19のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIFN α 2bタンパク質をコードするRNA。

実施形態6. 配列番号24のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIL-15 sush iタンパク質をコードするRNAをさらに含む、実施形態5に記載の組成物。

実施形態7. 配列番号9のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%同一であるIL-2タンパク質をコードするRNAをさらに含む、実施形態5に記載の組成物。

実施形態8. 少なくとも1つのRNAは、少なくとも1つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態9. 各RNAは、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態10. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態8～9のいずれか1つに記載の組成物。

【0007】

実施形態11. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である、実施形態10に記載の組成物。

実施形態12. 少なくとも1つのRNAは、5'キャップをさらに含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態13. 各RNAは、5'キャップをさらに含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態14. 5'キャップは、 $m^7Gppp(m^{12'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態12～13のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態15. 少なくとも1つのRNAは、5'UTRをさらに含む、実施形態1～14のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態16. 各RNAは、5'UTRをさらに含む、実施形態1～14のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態17. 5'UTRは、配列番号2、4もしくは6のヌクレオチド、もしくは配列番号2、4もしくは6に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態15～16のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態18. 少なくとも1つのRNAは、3'UTRをさらに含む、実施形態1～17のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態19. 各RNAは、3'UTRをさらに含む、実施形態1～17のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態20. 3'UTRは、配列番号8のヌクレオチド、もしくは配列番号8に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態18～19のいずれか1つに記載の組成物。

【0008】

実施形態21. 少なくとも1つのRNAは、ポリAテールをさらに含む、実施形態1～

20のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態22. 各RNAは、ポリAテールをさらに含む、実施形態1～20のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態23. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、実施形態21～22のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態24. 少なくとも1つのRNAは、5'キャップ、5'UTR、3'UTR、およびポリAテールを含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態25. 各RNAは、5'キャップ、5'UTR、3'UTR、およびポリAテールを含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態26.

a. 5'キャップは、 $m_2^7, 3' - Gppp (m_1^{2'} - GApG$ または $3' - O - Me - m^7G (5') ppp (5') G$ であり；

b. 5'UTRは、配列番号2、4もしくは6のヌクレオチド、もしくは配列番号2、4もしくは6に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；

c. 3'UTRは、配列番号8のヌクレオチド、もしくは配列番号8に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；および

d. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、

実施形態24～25のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態27. 対象におけるがんを処置もしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小する、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する方法であって、実施形態1～26のいずれか1つに記載の組成物を対象に投与することを含む方法。

実施形態28. 対象におけるがんを処置もしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小する、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する方法であって、対象に：

a. 配列番号14のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるIL-12s cタンパク質をコードする、および／または配列番号17もしくは18のヌクレオチドに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNAと；

b. 配列番号27のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるGM-CSFタンパク質をコードする、および／または配列番号29のヌクレオチドに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNAと

を投与することを含み、

それによって、対象におけるがんを処置もしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小する、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する、方法。

実施形態29. 配列番号19のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるIFN α 2bタンパク質をコードする、および／または配列番号22もしくは23のヌクレオチドに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNAを投与することをさらに含む、実施形態28に記載の方法。

実施形態30. 配列番号24のアミノ酸と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一であるIL-15 s u s h i タンパク質をコードする、および／または配列番号26のヌクレオチドに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNAを投与することをさらに含む、実施形態28に記載の方法。

[0009]

10

20

30

40

50

実施形態 31. 配列番号 9 のアミノ酸と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一である IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA を投与することをさらに含む、実施形態 28 に記載の方法。

実施形態 32.

a. 配列番号 24 のアミノ酸と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一である IL-15 s u s h i タンパク質、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む IL-15 s u s h i タンパク質；ならびに

b. 配列番号 19 のアミノ酸と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一である IFN α 2b タンパク質、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む IFN α 2b タンパク質

をコードする RNA を投与することをさらに含む、実施形態 28 に記載の方法。

実施形態 33.

a. 配列番号 9 のアミノ酸と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一である IL-2 タンパク質、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む IL-2 タンパク質；ならびに

b. 配列番号 19 のアミノ酸と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%同一である IFN α 2b タンパク質、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含む IFN α 2b タンパク質

をコードする RNA を投与することをさらに含む、実施形態 28 に記載の方法。

実施形態 34. がんは、肉腫、癌腫、またはリンパ腫である、実施形態 27～33 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 35. がんは、固形腫瘍である、実施形態 27～33 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 36. 固形腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚におけるものである、実施形態 35 に記載の方法。

実施形態 37. 固形腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、小細胞肺腫瘍、神経芽腫、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫腫瘍、精上皮腫瘍腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である、実施形態 35 に記載の方法。

実施形態 38. 組成物は、腫瘍内または腫瘍周囲投与される、実施形態 27～37 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 39. 被注射腫瘍および未注射腫瘍は、両方とも、第 1 の腫瘍へのまたはその付近への腫瘍内または腫瘍周囲注射後にサイズが縮小される、実施形態 38 に記載の方法。

実施形態 40. 対象はヒトである、実施形態 27～39 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0010】

実施形態 41. 別の治療も投与される、実施形態 27～40 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 42. 他の治療は、腫瘍を摘出、切除または減量するための外科手術である、

10

20

30

40

50

実施形態 41 に記載の方法。

実施形態 43. 他の治療は、免疫療法、放射線療法または化学療法である、実施形態 41 に記載の方法。

実施形態 44. 少なくとも 1 つの RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 27 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 45. 各 RNA は、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 27 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 46. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または 5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態 44 ~ 45 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 47. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である、実施形態 46 に記載の方法。

実施形態 48. 少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップをさらに含む、実施形態 27 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 49. 各 RNA は、5' キャップをさらに含む、実施形態 27 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 50. 5' キャップは、 $m_2^7, 3' - Gppp (m_1^{2'} - 9 ApG$ または $3' - O - Me - m^7G (5') ppp (5') G$ である、実施形態 48 ~ 49 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0011】

実施形態 51. 少なくとも 1 つの RNA は、5' UTR をさらに含む、実施形態 27 ~ 50 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 52. 各 RNA は、5' UTR をさらに含む、実施形態 27 ~ 50 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 53. 5' UTR は、配列番号 2、4 もしくは 6 のヌクレオチド、もしくは配列番号 2、4 もしくは 6 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態 51 ~ 52 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 54. 少なくとも 1 つの RNA は、3' UTR をさらに含む、実施形態 27 ~ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 55. 各 RNA は、3' UTR をさらに含む、実施形態 27 ~ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 56. 3' UTR は、配列番号 8 のヌクレオチド、もしくは配列番号 8 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態 54 ~ 55 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 57. 少なくとも 1 つの RNA は、ポリ A テールをさらに含む、実施形態 27 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 58. 各 RNA は、ポリ A テールをさらに含む、実施形態 27 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 59. ポリ A テールは、少なくとも 100 ヌクレオチドを含む、実施形態 57 ~ 58 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 60. 少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップ、5' UTR、3' UTR、およびポリ A テールを含む、実施形態 27 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0012】

実施形態 61. 各 RNA は、5' キャップ、5' UTR、3' UTR、およびポリ A テールを含む、実施形態 27 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 62.

a. 5' キャップは、 $m_2^7, 3' - Gppp (m_1^{2'} - 9 ApG$ または $3' - O - Me - m^7G (5') ppp (5') G$ であり；

10

20

30

40

50

b. 5' UTRは、配列番号2、4もしくは6のヌクレオチド、もしくは配列番号2、4もしくは6に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；

c. 3' UTRは、配列番号8のヌクレオチド、もしくは配列番号8に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；および

d. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、
実施形態60～61のいずれか1つに記載の方法。

実施形態63. コドン最適化DNAであって、配列番号11に対して少なくとも83%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、コドン最適化RNA。

実施形態64. 配列番号11に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態63に記載のDNA。

実施形態65. コドン最適化RNAであって、配列番号13に対して少なくとも83%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、コドン最適化RNA。

実施形態66. 配列番号13に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態65に記載のRNA。

実施形態67. 実施形態63または64のいずれか1つに記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態68. 以下を含むか、またはそれらからなる、コドン最適化DNA：

a. 配列番号16のヌクレオチド1～984に対して少なくとも78%の同一性を有する連続したヌクレオチド；

b. 配列番号16のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも81%の同一性を有する連続したヌクレオチド；および

c. a)のヌクレオチドとb)のヌクレオチド間のリンカーをコードするヌクレオチド。

実施形態69. リンカーは、配列番号16のヌクレオチド985～1026を含む、実施形態68に記載のDNA。

実施形態70. 部分a)は、配列番号16のヌクレオチド1～984に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%または75%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含み；および部分b)は、配列番号16のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%または85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含む、実施形態68および69のいずれか1つに記載のDNA。

【0013】

実施形態71. 以下を含むか、またはそれらからなる、コドン最適化RNA：

a. 配列番号18のヌクレオチド1～984に対して少なくとも78%の同一性を有する連続したヌクレオチド；

b. 配列番号18のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも81%の同一性を有する連続したヌクレオチド；および

c. a)のヌクレオチドとb)のヌクレオチド間のリンカーをコードするヌクレオチド。

実施形態72. リンカーは、配列番号18のヌクレオチド985～1026を含む、実施形態71に記載のRNA。

実施形態73. 部分a)は、配列番号18のヌクレオチド1～984に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%または75%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含み；および部分b)は、配列番号18のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、

10

20

30

40

50

90%または85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含む、実施形態71および72のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態74. 実施形態68~70のいずれか1つに記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態75. コドン最適化DNAであって、配列番号21に対して少なくとも80%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、コドン最適化DNA。

実施形態76. 配列番号21に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態75に記載のDNA。

実施形態77. コドン最適化RNAであって、配列番号23に対して少なくとも80%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、コドン最適化RNA。

実施形態78. 配列番号23に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態77に記載のRNA。

実施形態79. 実施形態75~76のいずれか1つに記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態80. 以下を含むか、またはそれらからなる、DNA：

a. 配列番号25のヌクレオチド1~321に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号25のヌクレオチド382~729に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. a)のヌクレオチドとb)のヌクレオチド間のリンカーをコードするヌクレオチド。
【0014】

実施形態81. 実施形態80に記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態82. 以下を含むか、またはそれらからなる、RNA：

a. 配列番号26のヌクレオチド1~321に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号26のヌクレオチド382~729に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. a)のヌクレオチドとb)のヌクレオチド間のリンカーをコードするヌクレオチド。

実施形態83. DNAであって、配列番号28に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、DNA。

実施形態84. 実施形態83に記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態85. RNAであって、配列番号29に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%もしくは85%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、RNA。

実施形態86. DNAから *in vitro* で転写される、実施形態67、74、79、81および84のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態87. 少なくとも1つのウリジンは、修飾核酸塩基で置換されている、実施形態65~67、71~74、78~79、81~82、および84~85のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態88. 各ウリジンは、修飾核酸塩基で置換されている、実施形態65~67、71~74、78~79、81~82、および84~85のいずれか1つに記載のRNA。

10

20

30

40

50

実施形態 89. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または 5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態 87 または 88 に記載の RNA。

実施形態 90. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である、実施形態 89 に記載の RNA。

【0015】

実施形態 91. 5' キャップをさらに含む、実施形態 65~67、71~74、78~79、81~82、および 84~90 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 92. 5' キャップは、 $m^7, 3'-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態 91 に記載の RNA。

実施形態 93. 5' UTR をさらに含む、実施形態 65~67、71~74、78~79、81~82、および 84~92 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 94. 5' UTR は、配列番号 2、4 もしくは 6 のヌクレオチド、もしくは配列番号 2、4 もしくは 6 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態 93 に記載の RNA。

実施形態 95. 3' UTR をさらに含む、実施形態 65~67、71~74、78~79、81~82、および 84~94 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 96. 3' UTR は、配列番号 8 のヌクレオチド、もしくは配列番号 8 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる、実施形態 95 に記載の RNA。

実施形態 97. ポリ A テールをさらに含む、実施形態 65~67、71~74、78~79、81~82、および 84~96 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 98. ポリ A テールは、少なくとも 100 ヌクレオチドを含む、実施形態 97 に記載の RNA。

実施形態 99. 5' キャップ、5' UTR、3' UTR、およびポリ A テールをさらに含む、実施形態 65~67、71~74、78~79、81~82、および 84~97 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 100.

a. 5' キャップは、 $m^7, 3'-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ であり；

b. 5' UTR は、配列番号 2、4 もしくは 6 のヌクレオチド、もしくは配列番号 2、4 もしくは 6 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；

c. 3' UTR は、配列番号 8 のヌクレオチド、もしくは配列番号 8 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90% もしくは 85% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり；および

d. ポリ A テールは、少なくとも 100 ヌクレオチドを含む、実施形態 99 に記載の組成物。

【0016】

実施形態 101. DNA であって：

a. 配列番号 11 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 83% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b. 配列番号 1、3 もしくは 5 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a) および b) のヌクレオチド

が単一の転写物を形成する、前記DNA。

実施形態102．DNAであって：

a．配列番号16のヌクレオチド1～984に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%もしくは78%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b．配列番号16のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%もしくは81%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c．配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b) およびc) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

10

実施形態103．DNAであって：

a．配列番号21に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b．配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a) およびb) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

20

実施形態104．DNAであって：

a．配列番号28と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b．配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a) およびb) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

30

実施形態105．DNAであって：

a．配列番号25のヌクレオチド1～321に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b．配列番号25のヌクレオチド382～729に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c．配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも80%の同一性を有する連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b) およびc) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

40

実施形態106．DNAであって：

a．配列番号11に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは83%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b．配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

50

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a) および b) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記 DNA。

実施形態 107. DNA であって：

a. 配列番号 16 のヌクレオチド 1～984 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80% もしくは 78% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号 16 のヌクレオチド 1027～1623 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80% もしくは 81% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. 配列番号 7 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a)、b) および c) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記 DNA。

実施形態 108. DNA であって：

a. 配列番号 21 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b. 配列番号 7 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a) および b) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

実施形態 109. DNA であって：

a. 配列番号 28 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

b. 配列番号 7 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a) および b) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記 DNA。

実施形態 110. DNA であって：

a. 配列番号 25 のヌクレオチド 1～321 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号 25 のヌクレオチド 382～729 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. 配列番号 7 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド

を含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分 a)、b) および c) のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記 DNA。

【0017】

実施形態 111. DNA であって：

a. 配列番号 11 に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 83% の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

10

20

30

40

50

b. 配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. 配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b)およびc)のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

実施形態112. DNAであって：

a. 配列番号16のヌクレオチド1～984に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%もしくは78%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号16のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%もしくは81%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

c. 配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

d. 配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b)、c)およびd)のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

実施形態113. DNAであって：

a. 配列番号21に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド（ここで、この部分b)のヌクレオチドは、部分a)のヌクレオチドの発現を調節するものである）；

c. 配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b)およびc)のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、DNA。

実施形態114. DNAであって：

a. 配列番号28に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

c. 配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b)およびc)のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記DNA。

実施形態115. DNAであって：

a. 配列番号25のヌクレオチド1～321に対して少なくとも99%、98%、97

10

20

30

40

50

%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

b. 配列番号25のヌクレオチド382～729に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；

c. 配列番号1、3もしくは5に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチド；および

d. 配列番号7に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチドを含むか、もしくはそのようなヌクレオチドからなる連続したヌクレオチドを含むか、またはこれらからなり、転写されたとき、部分a)、b)、c)およびd)のヌクレオチドが単一の転写物を形成する、前記DNA。

実施形態116. 実施形態101～115のいずれか1つに記載のDNAから産生されるRNA。

実施形態117. 少なくとも1つのウリジンは、修飾核酸塩基で置換されている、実施形態116に記載のRNA。

実施形態118. 各ウリジンは、修飾核酸塩基で置換されている、実施形態116に記載のRNA。

実施形態119. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態117～118のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態120. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である、実施形態119に記載のRNA。

【0018】

実施形態121. 5'キャップをさらに含む、実施形態116～120のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態122. 5'キャップは、 $m^7Gppp(m^{12'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態121に記載のRNA。

実施形態123. 二本鎖RNAが実質的にない、実施形態116～122のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態124. 二本鎖RNAは除去された、実施形態116～122のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態125. HPLCによってまたはセルロースに基づくクロマトグラフィーによって精製された、実施形態123～124のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態126. 実施形態63～125に記載のDNAまたはRNAのいずれか1つと薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬製剤。

実施形態127. 対象におけるがんを処置もしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小する、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する方法であって、実施形態63～125に記載のRNAもしくはDNAのいずれか1つもしくはそれ以上、または実施形態126に記載の医薬製剤を、投与することを含む方法。

実施形態128. IL-2、IL-12sc、IL-15 sush i、GM-CSF およびIFN α 2bをコードするポリペプチドをin vivoで産生させる方法であって、実施形態63～125のいずれか1つに記載のDNAもしくはRNAの1つもしくはそれ以上、実施形態1～26のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態126に記載の医薬製剤を、対象に投与することを含む方法。

実施形態129. 少なくとも2つのRNAを含む組成物であって、該RNAは、異なるタンパク質をコードし、ならびに該RNAは、実施形態65～67、71～74、78～79、81～82、84～100、および116～125のいずれか1つに記載のRNAから選択される、組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 130. GM-CSF および IL-12sc をコードする 2 つの RNA を含む、実施形態 129 に記載の組成物。

【0019】

実施形態 131. GM-CSF、IL-12sc および IFN α 2b をコードする 3 つの RNA を含む、実施形態 129 に記載の組成物。

実施形態 132. GM-CSF、IL-2 および IFN α 2b をコードする 3 つの RNA を含む、実施形態 129 に記載の組成物。

実施形態 133. GM-CSF、IL-12sc、IL-2 および IFN α 2b をコードする 4 つの RNA を含む、実施形態 129 に記載の組成物。

実施形態 134. GM-CSF、IL-12sc、IL-15 sushi および IFN α 2b をコードする 4 つの RNA を含む、実施形態 129 に記載の組成物。

実施形態 135. GM-CSF をコードする RNA は、実施形態 84～85 のいずれか 1 つに記載の RNA から選択される、実施形態 130～134 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 136. IL-12sc をコードする RNA は、実施形態 71～74 のいずれか 1 つに記載の RNA から選択される、実施形態 130～134 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 137. IFN α 2b をコードする RNA は、実施形態 77～79 のいずれか 1 つに記載の RNA から選択される、実施形態 131～134 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 138. IL-15 sushi をコードする RNA は、実施形態 81～82 のいずれか 1 つに記載の RNA から選択される、実施形態 134 に記載の組成物。

実施形態 139. IL-2 をコードする RNA は、実施形態 65～67 のいずれか 1 つに記載の RNA から選択される、実施形態 132～133 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 140. 固形腫瘍がんを処置または予防する方法であって、以下の RNA の各々：

- a. IL-12sc をコードする RNA (配列番号 17 または 18) を含む RNA；
- b. GM-CSF をコードする RNA (配列番号 29) を含む RNA；および
- c. IFN α 2b をコードする RNA (配列番号 22 または 23) を含む RNA

についての治療有効量を腫瘍に直接投与することを含み、

各 RNA は、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含み、ならびに

各 RNA は、5' UTR (配列番号 2、4 または 6)、3' UTR (配列番号 8)、5' キヤップ、およびポリ A テールを含む、前記方法。

【0020】

実施形態 141. 固形腫瘍がんを処置または予防する方法であって、以下の RNA の各々：

- a. IL-12sc をコードする RNA (配列番号 17 または 18) を含む RNA；
- b. GM-CSF をコードする RNA (配列番号 29) を含む RNA；
- c. IFN α 2b をコードする RNA (配列番号 22 または 23) を含む RNA；および
- d. IL-2 をコードする RNA (配列番号 12 または 13) を含む RNA

についての治療有効量を腫瘍に直接投与することを含み、

各 RNA は、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含み、ならびに

各 RNA は、5' UTR (配列番号 2、4 または 6)、3' UTR (配列番号 8)、5' キヤップ、およびポリ A テールを含む、前記方法。

実施形態 142. 固形腫瘍がんを処置または予防する方法であって、以下の RNA の各々：

- a. IL-12sc をコードする RNA (配列番号 17 または 18) を含む RNA；
- b. GM-CSF をコードする RNA (配列番号 29) を含む RNA；
- c. IFN α 2b をコードする RNA (配列番号 22 または 23) を含む RNA；および
- d. IL-15 sushi をコードする RNA (配列番号 26) を含む RNA

についての治療有効量を腫瘍に直接投与することを含み、

各RNAは、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含み、ならびに

各RNAは、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、方法。

実施形態143. RNAを含む組成物であって、該RNAは、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号9のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-2タンパク質をコードし、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記組成物。

実施形態144. RNAを含む組成物であって、該RNAは、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号14のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-12scタンパク質をコードし、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記組成物。

実施形態145. RNAを含む組成物であって、該RNAは、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号27のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有するGM-CSFタンパク質をコードし、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記組成物。

実施形態146. RNAを含む組成物であって、該RNAは、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号19のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有するIFN α 2bタンパク質をコードし、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記組成物。

実施形態147. RNAを含む組成物であって、該RNAは、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている、配列番号24のアミノ酸に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-15 sushiタンパク質をコードし、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、組成物。

実施形態148. IL-12sc RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている、配列番号17または18に対して少なくとも95%の同一性を有する、ヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、IL-12sc RNA組成物。

実施形態149. GM-CSF RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている、配列番号29に対して少なくとも95%の同一性を有する、ヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、GM-CSF RNA組成物。

実施形態150. IFN α 2b RNA組成物であって、各ウリジンがウリジンアナログで置換されている、配列番号22または23に対して少なくとも95%の同一性を有する、ヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、IFN α 2b RNA組成物。

【0021】

実施形態151. IL-15 sushi RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている、配列番号26に対して少なくとも95%の同一性を有する、ヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、IL-15 sushi RNA組成物。

実施形態152. IL-2 RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている、配列番号12または13に対して少なくとも95%の同一性を有する、ヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR（配列番号2、4または6）、3' UTR（配列番号8）、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記IL-2 RNA組成物。

実施形態153. IL-12sc RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号17または18のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR (配列番号2、4または6)、3' UTR (配列番号8)、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記IL-12sc RNA組成物。

実施形態154. GM-CSF RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号29のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR (配列番号2、4または6)、3' UTR (配列番号8)、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記GM-CSF RNA組成物。

実施形態155. IFN α 2b RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号22または23のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR (配列番号2、4または6)、3' UTR (配列番号8)、5' キャップ、およびポリAテールを含む、前記IFN α 2b RNA組成物。

10

実施形態156. IL-15 sushi RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号26のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR (配列番号2、4または6)、3' UTR (配列番号8)、5' キャップ、およびポリAテールを含む、IL-15 sushi RNA組成物。

実施形態157. IL-2 RNA組成物であって、各ウリジンが修飾核酸塩基で置換されている配列番号12または13のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなり、さらに、5' UTR (配列番号2、4または6)、3' UTR (配列番号8)、5' キャップ、およびポリAテールを含む、IL-2 RNA組成物。

20

実施形態158. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態143~157のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態159. IFN α 2bをコードするRNAを含む組成物であって、該RNAは、非改変RNAと比較して免疫原性が低下するように改変されている、組成物。

実施形態160. 改変は、少なくとも1つのウリジンの修飾核酸塩基での置換を含む、実施形態159に記載の組成物。

【0022】

実施形態161. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、または5-メチルウリジン (m^5U) である、実施形態159に記載の組成物。

30

実施形態162. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である、実施形態161に記載の組成物。

実施形態163. 改変は、二本鎖RNAの量の低減を含む、実施形態159~162のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態164. 二本鎖RNAの低減は、HPLCによる精製またはセルロースに基づくクロマトグラフィーによる精製の結果である、実施形態163に記載の組成物。

実施形態165. 改変は、自然免疫系によるRNA認識を非改変RNAと比較して低下させる、実施形態159~164のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態166. 改変は、RNAへの5' キャップの付加を含む、実施形態159~165のいずれか1つに記載の組成物。

40

実施形態167. 5' キャップは、 $m^7Gppp(m^{12'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態166に記載の組成物。

実施形態168. 目的のペプチドまたはタンパク質をコードする第2のRNAをさらに含む、実施形態159~167のいずれか1つに記載の組成物。

実施形態169. 目的のペプチドまたはタンパク質は、サイトカイン、ケモカイン、自殺遺伝子産物、免疫原性タンパク質またはペプチド、アポトーシス誘導因子、血管新生阻害剤、熱ショックタンパク質、腫瘍抗原、 β -カテニン阻害剤、STING経路の活性化因子、レチノイン酸誘導性遺伝子 (RIG) -I経路の活性化因子、 toll様受容体 (TLR) 経路のアゴニスト、チェックポイントモジュレーター、自然免疫活性化因子、抗

50

体、ドミナントネガティブ受容体およびデコイ受容体、骨髄系由来サプレッサー細胞（M D S C）の阻害剤、I D O経路阻害剤、ならびにアポトーシスの阻害剤に結合するタンパク質またはペプチドから選択される、またはこれらに由来するペプチドまたはタンパク質である、実施形態 1 6 8 に記載の組成物。

実施形態 1 7 0 . 第 2 の R N A は、非改変 R N A と比較して免疫原性が低下するように改変されている、実施形態 1 6 8 または 1 6 9 に記載の組成物。

【 0 0 2 3 】

実施形態 1 7 1 . 改変は、少なくとも 1 つのウリジンの修飾核酸塩基での置換を含む、実施形態 1 7 0 に記載の組成物。

実施形態 1 7 2 . 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン（ ψ ）、N 1 -メチルプソイドウリジン（ $m^1\psi$ ）、または 5 -メチルウリジン（ m^5U ）である、実施形態 1 7 1 に記載の組成物。

実施形態 1 7 3 . 修飾核酸塩基は、N 1 -メチルプソイドウリジン（ $m^1\psi$ ）である、実施形態 1 7 2 に記載の組成物。

実施形態 1 7 4 . 改変は、二本鎖 R N A の量の低減を含む、実施形態 1 6 8 ~ 1 7 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 1 7 5 . 二本鎖 R N A の低減は、H P L C による精製またはセルロースに基づくクロマトグラフィーによる精製の結果である、実施形態 1 7 4 に記載の組成物。

実施形態 1 7 6 . 改変は、R N A への 5 ' キャップの付加を含む、実施形態 1 6 8 ~ 1 7 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 1 7 7 . 5 ' キャップは、 $m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態 1 7 6 に記載の組成物。

実施形態 1 7 8 . 第二の R N A は：

a . 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 2 s c タンパク質をコードする、および／もしくは配列番号 1 7 もしくは 1 8 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；

b . 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する G M - C S F タンパク質をコードする、および／もしくは配列番号 2 9 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；

c . 配列番号 2 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 5 s u s h i タンパク質をコードする、および／もしくは配列番号 2 6 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；または

d . 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 2 タンパク質をコードする、および／もしくは配列番号 1 2 もしくは 1 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A

を含む、実施形態 1 6 8 ~ 1 7 7 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 1 7 9 . 対象におけるがんを処置もしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小する、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する方法であって、実施形態 1 5 9 ~ 1 7 8 に記載の組成物のいずれか 1 つを投与することを含む方法。

実施形態 1 8 0 . がんを処置するもしくは予防する、腫瘍のサイズを縮小させる、寛解期のがんの再発を予防する、またはがん転移を予防する方法における使用のための、実施形態 1 5 9 ~ 1 7 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【 0 0 2 4 】

実施形態 1 8 1 . 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 2 s c タンパク質をコードする R N A を含む組成物。

実施形態 1 8 2 . 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する G M - C S F タンパク質をコードする R N A を含む組成物。

実施形態 1 8 3 . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I F N α 2 b タンパク質をコードする R N A を含む組成物。

実施形態 1 8 4 . 配列番号 2 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有

10

20

30

40

50

する I L - 1 5 s u h i タンパク質をコードする R N A を含む組成物。

実施形態 1 8 5 . 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 2 タンパク質をコードする R N A を含む組成物。

実施形態 1 8 6 . I L - 1 2 s c タンパク質をコードする R N A を含む組成物であって、該 R N A は、配列番号 1 7 または 1 8 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 1 8 7 . G M - C S F タンパク質をコードする R N A を含む組成物であって、該 R N A は、配列番号 2 9 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 1 8 8 . I F N α 2 b タンパク質をコードする R N A を含む組成物であって、該 R N A は、配列番号 2 2 または 2 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 1 8 9 . I L - 1 5 s u s h i タンパク質をコードする R N A を含む組成物であって、該 R N A は、配列番号 2 6 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、組成物。

実施形態 1 9 0 . I L - 2 タンパク質をコードする R N A を含む組成物であって、該 R N A は、配列番号 1 2 または 1 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、組成物。

【 0 0 2 5 】

実施形態 1 9 1 . 以下の R N A のうちのいずれか 2 つを含む組成物：

a . 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 2 s c タンパク質をコードする、および／または配列番号 1 7 もしくは 1 8 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；

b . 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する G M - C S F タンパク質をコードする、および／または配列番号 2 9 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；

c . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I F N α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 2 2 もしくは 2 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；

d . 配列番号 2 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 5 s u s h i タンパク質をコードする、および／または配列番号 2 6 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；ならびに

e . 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 1 2 もしくは 1 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A 。

実施形態 1 9 2 . 以下を含む組成物：

a . 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 2 s c タンパク質をコードする、および／または配列番号 1 7 もしくは 1 8 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；ならびに

b . 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する G M - C S F タンパク質をコードする、および／または配列番号 2 9 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A 。

実施形態 1 9 3 . 以下を含む組成物：

a . 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I L - 1 2 s c タンパク質をコードする、および／または配列番号 1 7 もしくは 1 8 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A ；ならびに

b . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する I F N α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 2 2 または 2 3 のヌクレオチドに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、R N A 。

実施形態 1 9 4 . 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-12 s c タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 s u s h i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 195. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-12 s c タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 または 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 196. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C S F タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 197. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C S F タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 s u s h i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 198. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C S F タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 199. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 s u s h i タンパク質および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドをコードする、RNA。

実施形態 200. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

b. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

【0026】

実施形態 201. 以下を含む組成物：

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タ

50

実施形態 206. 以下を含む組成物：

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

10

実施形態 207. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-12sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

20

実施形態 208. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-12sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 sushitanパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

30

実施形態 209. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 sushitanパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

40

実施形態 210. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タ

50

ンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

【0027】

実施形態 211. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-15 sush i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 212. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IFN α 2b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-15 sush i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

c. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 213. 以下のうちのいずれか 4 つを含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-12 sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IFN α 2b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

d. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-15 sush i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

e. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 214. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-12 sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IFN α 2b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

d. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-1

10

20

30

40

50

5 *sushi*タンパク質をコードする、および／または配列番号26のヌクレオチドに
対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 2 1 5 . 以下を含む組成物 :

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-12sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

d. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 2 1 6 . 以下を含む組成物 :

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する IL-12sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95% の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 s u s h i タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA ; ならびに

d. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 217. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-12sc タンパク質をコードする、および／または配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IFN α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 sushitanパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

d. 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-2 タンパク質をコードする、および／または配列番号 12 もしくは 13 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態 218. 以下を含む組成物：

a. 配列番号 27 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する GM-C SF タンパク質をコードする、および／または配列番号 29 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号 19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する I F N α 2 b タンパク質をコードする、および／または配列番号 22 もしくは 23 のヌクレオチドに対して少なくとも 95 % の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する IL-15 sushi タンパク質をコードする、および／または配列番号 26 のヌクレオチドに

対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

d. 配列番号9のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-2タンパク質をコードする、および／または配列番号12もしくは13のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態219. 以下を含む組成物：

a. 配列番号14のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-12scタンパク質をコードする、および／または配列番号17もしくは18のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

b. 配列番号27のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するGM-CSFタンパク質をコードする、および／または配列番号29のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

c. 配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するIFN α 2bタンパク質をコードする、および／または配列番号22もしくは23のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；

d. 配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-15sushitanパク質をコードする、および／または配列番号26のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA；ならびに

e. 配列番号9のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するIL-2タンパク質をコードする、および／または配列番号12もしくは13のヌクレオチドに対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチドを含む、RNA。

実施形態220. 実施形態181～219に記載の組成物のいずれか1つを含む、医薬製剤。

【0028】

実施形態221. 実施形態181～219に記載の組成物のいずれか1つと薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬製剤。

実施形態222. がんを処置または予防する方法における使用のための、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤。

実施形態223. 腫瘍のサイズを縮小する方法における使用のための、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤。

実施形態224. 寛解期のがんの再発を予防する方法における使用のための、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤。

実施形態225. がん転移を予防する方法における使用のための、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤。

実施形態226. がんを処置または予防する方法であって、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤を投与することを含む方法。

実施形態227. 腫瘍のサイズを縮小する方法であって、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤を投与することを含む方法。

実施形態228. 寛解期のがんの再発を予防する方法であって、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤を投与することを含む方法。

実施形態229. がん転移を予防する方法であって、実施形態181～219のいずれか1つに記載の組成物、または実施形態220もしくは221に記載の医薬製剤を投与することを含む方法。

【0029】

本発明のさらなる実施形態は、以下の通りである：

実施形態 A 1. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA とを含む、医療用製剤。

実施形態 A 2. IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA をさらに含む、実施形態 A 1 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 3. IL-2 タンパク質をコードする RNA をさらに含む、実施形態 A 1 または 2 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 4. IFN α タンパク質をコードする RNA をさらに含む、実施形態 A 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5. IFN α タンパク質は、IFN α 2b タンパク質である、実施形態 A 4 に記載の医療用製剤。

10

実施形態 A 6. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA と、IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA とを含む、実施形態 A 2 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 7. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA と、IL-2 タンパク質をコードする RNA とを含む、実施形態 A 3 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 8. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA と、IFN α タンパク質をコードする RNA とを含む、実施形態 A 4 または 5 に記載の医療用製剤。

20

実施形態 A 9. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA と、IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA と、IFN α タンパク質をコードする RNA とを含む、実施形態 A 4 または 5 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 10. IL-12sc タンパク質をコードする RNA と、GM-CSF タンパク質をコードする RNA と、IL-2 タンパク質をコードする RNA と、IFN α タンパク質をコードする RNA とを含む、実施形態 A 4 または 5 に記載の医療用製剤。

【0030】

実施形態 A 11. (i) IL-12sc タンパク質をコードする RNA は、配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 17 もしくは 18 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または (ii) IL-12sc タンパク質は、配列番号 14 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 A 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

30

実施形態 A 12. (i) GM-CSF タンパク質をコードする RNA は、配列番号 29 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 29 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または (ii) GM-CSF タンパク質は、配列番号 27 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 27 のアミノ酸配列と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 A 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

40

実施形態 A 13. (i) IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA は、配列番号 26 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 26 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または (ii) IL-15 sush i タンパク質は、配列番号 24 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 A 2 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の医療

50

用製剤。

実施形態 A 1 4. (i) IL-2 タンパク質をコードする RNA は、配列番号 1 2 もしくは 1 3 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 1 2 もしくは 1 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % もしくは 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または (ii) IL-2 タンパク質は、配列番号 9 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % もしくは 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 A 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 1 5. (i) IFN α タンパク質をコードする RNA は、配列番号 2 2 もしくは 2 3 のヌクレオチド配列、もしくは配列番号 2 2 もしくは 2 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % もしくは 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または (ii) IFN α タンパク質は、配列番号 1 9 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % もしくは 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 A 4 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 1 6. 少なくとも 1 つの RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 A 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 1 7. 各 RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 A 1 ~ 1 6 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 1 8. 各 RNA は、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 A 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 1 9. 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m_1\psi$)、または 5-メチルウリジン (m_5U) である、実施形態 A 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 0. 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m_1\psi$) である、実施形態 A 1 9 に記載の医療用製剤。

【0031】

実施形態 A 2 1. 少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップを含む、実施形態 A 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 2. 各 RNA は、5' キャップを含む、実施形態 A 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 3. 5' キャップは、 $m_2^7, 3'-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m_1^7G(5')ppp(5')G$ である、実施形態 A 2 1 または 2 2 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 4. 少なくとも 1 つの RNA は、5' UTR を含む、実施形態 A 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 5. 各 RNA は、5' UTR を含む、実施形態 A 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 6. 5' UTR は、配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % もしくは 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態 A 2 4 または 2 5 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 7. 少なくとも 1 つの RNA は、3' UTR を含む、実施形態 A 1 ~ 2 6 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 8. 各 RNA は、3' UTR を含む、実施形態 A 1 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 2 9. 3' UTR は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 8 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、

90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態A27または28に記載の医療用製剤。

実施形態A30. 少なくとも1つのRNAは、ポリAテールを含む、実施形態A1~29のいずれか1つに記載の医療用製剤。

【0032】

実施形態A31. 各RNAは、ポリAテールを含む、実施形態A1~30のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A32. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、実施形態A30または31に記載の医療用製剤。

実施形態A33. 少なくとも1つのRNAは、5'キャップ、5'UTR、3'UTR、およびポリAテールを含む、実施形態A1~32のいずれか1つに記載の医療用製剤。 10

実施形態A34. 各RNAは、5'キャップ、5'UTR、3'UTR、およびポリAテールを含む、実施形態A1~33のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A35.

a. 5'キャップは、 $m_2^7, 3'-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ であり；

b. 5'UTRは、配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み； 20

c. 3'UTRは、配列番号8のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号8のヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み；

d. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、

実施形態A33または34に記載の医療用製剤。

実施形態A36. RNAは、mRNAである、実施形態A1~35のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A37. さらなる治療剤を含む、実施形態A1~36のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A38. さらなる治療剤は、抗がん治療剤である、実施形態A37に記載の医療用製剤。 30

実施形態A39. さらなる治療剤は、チェックポイントモジュレーターである、実施形態A37または38に記載の医療用製剤。

実施形態A40. チェックポイントモジュレーターは、抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、または抗PD1抗体と抗CTLA-4抗体の組合せである、実施形態A39に記載の医療用製剤。

【0033】

実施形態A41. 前記RNAの少なくとも1つを各々の容器を含む、少なくとも2つの容器を含むキットである、実施形態A1~40のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A42. 別々の容器に各RNAを含む、実施形態A41に記載の医療用製剤。 40

実施形態A43. さらなる治療剤は、RNAを含まない容器内にある、実施形態A41または42に記載の医療用製剤。

実施形態A44. がんを処置または予防するための医療用製剤の使用説明書をさらに含む、実施形態A41~43のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A45. RNAを含む医薬組成物である、実施形態A1~40のいずれか1つに記載の医療用製剤。

実施形態A46. 医薬組成物は、1つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤および／または賦形剤をさらに含む、実施形態A45に記載の医療用製剤。

実施形態A47. RNAは、液体形態、固体形態、またはこれらの組合せから選択される形態で存在する、実施形態A1~46のいずれか1つに記載の医療用製剤。 50

実施形態 A 4 8 . 固体形態は、凍結形態または脱水形態である、実施形態 A 4 7 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 4 9 . 脱水形態は、凍結乾燥または噴霧乾燥形態である、実施形態 A 4 8 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 0 . 薬学的使用のための、実施形態 A 1 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

【0034】

実施形態 A 5 1 . 薬学的使用は、疾患または障害の治療的または予防的処置を含む、実施形態 A 5 0 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 2 . がんを処置または予防する方法における使用のための、実施形態 A 1 ~ 5 1 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 3 . がんは、肉腫、癌腫、またはリンパ腫である、実施形態 A 3 8 ~ 5 2 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 4 . がんは、固形腫瘍である、実施形態 A 3 8 ~ 5 3 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 5 . 固形腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚におけるものである、実施形態 A 5 4 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 6 . 固形腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫 (HL)、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、小細胞肺腫瘍、神経芽腫腫瘍、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫瘍、精上皮腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である、実施形態 A 5 4 または 5 5 に記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 7 . RNA は、腫瘍内または腫瘍周囲投与のためのものである、実施形態 A 1 ~ 5 6 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 8 . さらに治療剤は、全身投与のためのものである、実施形態 A 3 7 ~ 5 7 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 5 9 . ヒトへの投与のためのものである、実施形態 A 1 ~ 5 8 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

実施形態 A 6 0 . 対象におけるがんを処置または予防することは、腫瘍のサイズを小さくすること、寛解期のがんの再発を予防すること、またはがん転移を予防することを含む、実施形態 A 4 4 および 4 7 ~ 5 9 のいずれか 1 つに記載の医療用製剤。

【0035】

本発明のさらなる実施形態は、以下の通りである：

実施形態 B 1 . 対象におけるがんを処置または予防する方法において使用するための RNA であって、方法は、IL-12 s c タンパク質をコードする RNA、および GM-CSF タンパク質をコードする RNA を投与することを含む、RNA。

実施形態 B 2 . 方法は、IL-15 s u s h i タンパク質をコードする RNA を投与することをさらに含む、実施形態 B 1 に記載の RNA。

実施形態 B 3 . 方法は、IL-2 タンパク質をコードする RNA を投与することをさらに含む、実施形態 B 1 または 2 に記載の RNA。

実施形態 B 4 . 方法は、IFN α タンパク質をコードする RNA を投与することをさらに含む、実施形態 B 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 5 . IFN α タンパク質は、IFN α 2 b タンパク質である、実施形態 B 4 に記載の RNA。

実施形態 B 6 . 方法は、IL-12 s c タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、および IL-15 s u s h i タンパク質をコードする RNA を投与することを含む、実施形態 B 2 に記載の RNA。

実施形態 B 7 . 方法は、IL-12 s c タンパク質をコードする RNA、GM-CSF

10

20

30

40

50

タンパク質をコードするRNA、およびIL-2タンパク質をコードするRNAを投与することを含む、実施形態B3に記載のRNA。

実施形態B8．方法は、IL-12scタンパク質をコードするRNA、GM-CSFタンパク質をコードするRNA、およびIFN α タンパク質をコードするRNAを投与することを含む、実施形態B4または5に記載のRNA。

実施形態B9．方法は、IL-12scタンパク質をコードするRNA、GM-CSFタンパク質をコードするRNA、IL-15 sushitanパク質をコードするRNA、およびIFN α タンパク質をコードするRNAを投与することを含む、実施形態B4または5に記載のRNA。

実施形態B10．方法は、IL-12scタンパク質をコードするRNA、GM-CSFタンパク質をコードするRNA、IL-2タンパク質をコードするRNA、およびIFN α タンパク質をコードするRNAを投与することを含む、実施形態B4または5に記載のRNA。

【0036】

実施形態B11．(i) IL-12scタンパク質をコードするRNAは、配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列、もしくは配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IL-12scタンパク質は、配列番号14のアミノ酸配列、もしくは配列番号14のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態B1～10のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B12．(i) GM-CSFタンパク質をコードするRNAは、配列番号29のヌクレオチド配列、もしくは配列番号29のヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) GM-CSFタンパク質は、配列番号27のアミノ酸配列、もしくは配列番号27のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態B1～11のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B13．(i) IL-15 sushitanパク質をコードするRNAは、配列番号26のヌクレオチド配列、もしくは配列番号26のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IL-15 sushitanパク質は、配列番号24のアミノ酸配列、もしくは配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態B2～12のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B14．(i) IL-2タンパク質をコードするRNAは、配列番号12もしくは13のヌクレオチド配列、もしくは配列番号12もしくは13のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IL-2タンパク質は、配列番号9のアミノ酸配列、もしくは配列番号9のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態B3～13のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B15．(i) IFN α タンパク質をコードするRNAは、配列番号22もしくは23のヌクレオチド配列、もしくは配列番号22もしくは23のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IFN α タンパク質は、配列番号19のアミノ酸配列、もしくは配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同

一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 B 4 ～ 1 4 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 1 6 . 少なくとも 1 つの RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 B 1 ～ 1 5 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 1 7 . 各 RNA は、少なくとも 1 つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 B 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 1 8 . 各 RNA は、各ウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含む、実施形態 B 1 ～ 1 7 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 1 9 . 修飾核酸塩基は、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m_1\psi$)、または 5-メチルウリジン (m_5U) である、実施形態 B 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 0 . 修飾核酸塩基は、N1-メチルプソイドウリジン ($m_1\psi$) である、実施形態 B 1 9 に記載の RNA。

【0037】

実施形態 B 2 1 . 少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップを含む、実施形態 B 1 ～ 2 0 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 2 . 各 RNA は、5' キャップを含む、実施形態 B 1 ～ 2 1 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 3 . 5' キャップは、 $m_2^7, 3' - Gppp (m_1^{2'} - 9 ApG$ または $3' - O - Me - m^7G (5') ppp (5') G$ である、実施形態 B 2 1 または 2 2 に記載の RNA。

実施形態 B 2 4 . 少なくとも 1 つの RNA は、5' UTR を含む、実施形態 B 1 ～ 2 3 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 5 . 各 RNA は、5' UTR を含む、実施形態 B 1 ～ 2 4 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 6 . 5' UTR は、配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 2、4 および 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 2 4 または 2 5 に記載の RNA。

実施形態 B 2 7 . 少なくとも 1 つの RNA は、3' UTR を含む、実施形態 B 1 ～ 2 6 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 8 . 各 RNA は、3' UTR を含む、実施形態 B 1 ～ 2 7 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 2 9 . 3' UTR は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 8 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85% もしくは 80% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態 B 2 7 または 2 8 に記載の RNA。

実施形態 B 3 0 . 少なくとも 1 つの RNA は、ポリ A テールを含む、実施形態 B 1 ～ 2 9 のいずれか 1 つに記載の RNA。

【0038】

実施形態 B 3 1 . 各 RNA は、ポリ A テールを含む、実施形態 B 1 ～ 3 0 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 3 2 . ポリ A テールは、少なくとも 100 ヌクレオチドを含む、実施形態 B 3 0 または 3 1 に記載の RNA。

実施形態 B 3 3 . 少なくとも 1 つの RNA は、5' キャップ、5' UTR、3' UTR、およびポリ A テールを含む、実施形態 B 1 ～ 3 2 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 3 4 . 各 RNA は、5' キャップ、5' UTR、3' UTR、およびポリ A テールを含む、実施形態 B 1 ～ 3 3 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 3 5 .

a. 5' キャップは、 $m_2^7, 3' - Gppp (m_1^{2'} - 9 ApG$ または $3' - O - Me$

10

20

30

40

50

−m⁷G (5′) p p p (5′) Gであり；

b. 5′ UTRは、配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み；

c. 3′ UTRは、配列番号8のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号8のヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み；

d. ポリAテールは、少なくとも100ヌクレオチドを含む、

実施形態B33または34に記載のRNA。

実施形態B36. mRNAである、実施形態B1〜35のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B37. 方法は、さらなる治療を投与することをさらに含む、実施形態B1〜36のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B38. さらなる治療は、次の(i)、(ii)、(iii)および(iv)からなる群から選択される1つまたはそれ以上を含む、実施形態B37に記載のRNA：
(i) 腫瘍を摘出、切除または減量するための外科手術、(ii) 免疫療法、(iii) 放射線療法、および(iv) 化学療法。

実施形態B39. さらなる治療は、さらなる治療剤を投与することを含む、実施形態B37または38に記載のRNA

実施形態B40. さらなる治療剤は、抗がん治療剤である、実施形態B39に記載のRNA。

【0039】

実施形態B41. さらなる治療剤は、チェックポイントモジュレーターである、実施形態B39または40に記載のRNA。

実施形態B42. チェックポイントモジュレーターは、抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、または抗PD1抗体と抗CTLA-4抗体の組合せである、実施形態B41に記載のRNA。

実施形態B43. がんは、肉腫、癌腫、またはリンパ腫である、実施形態B1〜42のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B44. がんは、固形腫瘍である、実施形態B1〜43のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B45. 固形腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚におけるものである、実施形態B44に記載のRNA。

実施形態B46. 固形腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、小細胞肺腫瘍、神経芽腫腫瘍、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫瘍、精上皮腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である、実施形態B44または45に記載のRNA。

実施形態B47. 腫瘍内または腫瘍周囲投与される、実施形態B1〜46のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B48. さらなる治療剤は、全身投与される、実施形態B39〜47のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B49. 対象はヒトである、実施形態B1〜48のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B50. 複数のRNAは、同時に投与される、実施形態B1〜49のいずれか1つに記載のRNA。

実施形態B51. 複数のRNAは、該RNAの組合せを含む組成物を投与することにより投与される、実施形態B1〜50のいずれか1つに記載のRNA。

10

20

30

40

50

実施形態 B 5 2 . 複数の RNA のうちの少なくとも 2 つは、異なる時点で投与される、実施形態 B 1 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 5 3 . 複数の RNA は、前記 RNA の少なくとも 1 つを各々の組成物が含む、少なくとも 2 つの組成物を投与することにより投与される、実施形態 B 1 ~ 4 9 および 5 2 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 5 4 . がんを処置または予防することは、対象における腫瘍のサイズを縮小させること、寛解期のがんの再発を予防すること、またはがん転移を予防することを含む、実施形態 B 1 ~ 5 3 のいずれか 1 つに記載の RNA。

実施形態 B 5 5 . 前記方法で投与される複数の RNA の 1 つもしくはそれ以上であるか、1 つもしくはそれ以上を含む、実施形態 B 1 ~ 5 4 のいずれか 1 つに記載の RNA。

10

実施形態 B 5 6 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA、IL-2 タンパク質をコードする RNA、および IFN α タンパク質をコードする RNA からなる群から選択される 1 つもしくはそれ以上である、または 1 つもしくはそれ以上を含む、実施形態 B 5 5 に記載の RNA。

実施形態 B 5 7 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 5 8 . GM-CSF タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 5 9 . IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

20

実施形態 B 6 0 . IL-2 タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

【0040】

実施形態 B 6 1 . IFN α タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 6 2 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、および GM-CSF タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 6 3 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、および IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

30

実施形態 B 6 4 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、および IL-2 タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 6 5 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、および IFN α タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

実施形態 B 6 6 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、IL-15 sush i タンパク質をコードする RNA、および IFN α タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

40

実施形態 B 6 7 . IL-12 sc タンパク質をコードする RNA、GM-CSF タンパク質をコードする RNA、IL-2 タンパク質をコードする RNA、および IFN α タンパク質をコードする RNA であるか、またはそのような RNA を含む、実施形態 B 5 5 または 5 6 に記載の RNA。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1-1】図 1 A ~ 1 G は、B 1 6 F 1 0 腫瘍担持マウスに mRNA を 8、10、12、14 日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長を 41 日目までモニターした実験の結果を示

50

す図である。図1 Aおよび図1 Dは、IL-2、IL-12scおよびGM-CSF (Mod A) mRNA使用時の結果を示す。図1 Bおよび図1 Eは、IL-2、IL-12scおよびGM-CSF (Mod B) mRNAを示す。図1 Cおよび図1 Fは、ルシフェラーゼmRNA (Mod A) 使用時の結果を示す。図1 Gは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B) 使用時の結果を示す。(A～Cについてはマウス N=10/群、およびD～Gについてはマウス N=9/群)。

【図1-2】図1-1の続き。

【図1-3】図1-2の続き。

【図1-4】図1-3の続き。

【図2-1】図2 A～2 Dは、CT26腫瘍担持マウスにmRNAを19、21、24、26、28および31日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長を48日目までモニターした実験の結果を示す図である。図2 Aは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc (Mod A) を示す。図2 Bは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc (Mod B) を示す。図2 Cは、対照としてのルシフェラーゼmRNA (Mod A) を示す。図2 Dは、対照としてのリンゲル液を示す。

【図2-2】図2-1の続き。

【図2-3】図2-2の続き。

【図3-1】図3 A～3 Cは、CT26腫瘍担持マウスにmRNAを13、15、18、20および22日目に腫瘍内注射し、腫瘍成長を42日目までモニターした実験の結果を示す図である。図3 Aは、IL-2、GM-CSF、IL-12sc (Mod B) を示す。図3 Bは、IL-15 sushi、GM-CSF、IL-12sc (Mod B) を示す。図3 Cは、対照としてのルシフェラーゼmRNA (Mod B) を示す。

【図3-2】図3-1の続き。

【図4-1】図4 A～4 Fは、B16F10腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を11、13、15、17日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長を45日目までモニターした実験の結果を示す図である。図4 Aは、IL-2、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod A) を示す。図4 Bは、IL-2、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod B) を示す、図5 Aに記載のものと同じ実験での反復実験である。図4 Cは、IL-15 sushi、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod A) を示す。図4 Dは、IL-15 sushi、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod B) を示す、図5 Bに記載のものと同じ実験での反復実験である。図4 Eは、対照ルシフェラーゼmRNA (Mod A) を示す。図4 Fは、対照ルシフェラーゼmRNA (Mod B) を示す、図5 Dおよび6 Dに記載のものと同じ実験での反復実験である。(マウス N=8/群)。

【図4-2】図4-1の続き。

【図4-3】図4-2の続き。

【図5-1】図5 A～5 Dは、B16F10腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を11、13、15、17日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長を45日目までモニターした実験の結果を示す図である。図5 Aは、IL-2、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod B) を示す、図4 Bに記載のものと同じ実験での反復実験である。図5 Bは、IL-15 sushi、IL-12sc、およびGM-CSF (Mod B) を示す、図4 Dに記載のものと同じ実験での反復実験である。図5 Cは、IL-2、IL-12sc、GM-CSF、およびIFN α (Mod B) を示す、図6 Cに記載のものと同じ実験での反復実験である。図5 Dは、対照としてのルシフェラーゼmRNA (Mod B) を示す、図4 Fおよび6 Dに記載のものと同じ実験での反復実験である。(マウス N=8/群)。

【図5-2】図5-1の続き。

【図6-1】図6 Aおよび6 Bは、CT26腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を13、15、17、19、21、23日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長をプロットした実験の結果を示す図である。図6 Aは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc

、およびIFN α (Mod B)を示す、図7Aに記載のものと同じ実験での反復実験である。図6Bは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)を示す、図7Cに記載のものと同じ実験での反復実験である。マウス N=8/群。

【図6-2】図6Cおよび6Dは、B16F10腫瘍担持マウスにmRNAを、11、13、15、17日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長をプロットした実験の結果を示す図である。図6Cは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す、図5Cに記載のものと同じ実験での反復実験である。図6Dは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)を示す、図4Fおよび5Dに記載のものと同じ実験での反復実験である。マウス N=8/群。

【図6-3】図6Eおよび6Fは、MC38腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を、11、15、19、23日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長をプロットした実験の結果を示す図である。図6Eは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す。図6Fは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)を示す。マウス N=5/群。

【図7-1】図7Aおよび7Fは、CT26腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を13、15、17、19、21、23日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長をプロットした実験の結果を示す図である。図7Aは、IL-2、IL-12sc、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す、図6Aに記載のものと同じ実験での反復実験である。図7Bは、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す。図7Cは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)対照を示す、図6Bに記載のものと同じ実験での反復実験である。同様のデザインの反復研究では、CT26腫瘍担持マウスにサイトカインmRNA混合物を19、21、23、26、28および30日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長をプロットした。図7Dは、IL-2、IL-12sc、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す、図9Aに記載のものと同じ実験での反復実験である。図7Eは、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す。図7Fは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)対照を示す、図9Fに記載のものと同じ実験での反復実験である。図A~Cについてはマウス N=8/群、および図D~Fについてはマウス N=10~11/群。

【図7-2】図7-1の続き。

【図7-3】図7-2の続き。

【図8-1】図8A~8Hは、CT26腫瘍担持マウスにmRNAを12、15、19および22日目に腫瘍内注射し、個々の腫瘍成長を35日目までモニターし、プロットした実験の結果を示す図である。図8Aは、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す。図8Bは、IL-15 sushi、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す。図8Cは、IL-15 sushi、GM-CSF、IFN α (Mod B)を示す。図8Dは、GM-CSF、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す。図8Eは、IL-15 sushi、GM-CSF、IL-12sc (Mod B)を示す。図8Fは、ルシフェラーゼmRNA (Mod B)対照を示す。(N=10/群)。図8Gおよび8Hは、図8A~8Fに示されている研究の腫瘍成長動態を示す。図8Gは、すべての処置群についての33日目までの平均腫瘍体積を示す。図8Hは、腫瘍成長抑制を示す。19日目までのT/C (平均腫瘍体積に基づく、腫瘍/対照)を計算した。

【図8-2】図8-1の続き。

【図8-3】図8-2の続き。

【図8-4】図8-3の続き。

【図9-1】図9A~9Fは、CT26腫瘍担持マウスにmRNAを19、21、23、26、28および30日目に腫瘍内注射し、腫瘍成長を50日目までモニターした実験を示す図である。図9Aは、GM-CSF、IL-2、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す、図7Dに記載のものと同じ実験での反復実験である。図9Bは、IL-2、IL-12sc、IFN α (Mod B)を示す。図9Cは、GM-CSF、IL-2、I

FN α (Mod B) を示す。図 9 D は、GM-CSF、IL-12sc、IFN α (Mod B) を示す。図 9 E は、GM-CSF、IL-2、IL-12sc (Mod B) を示す。図 9 F は、対照としてのルシフェラーゼ mRNA (Mod A) を示す、図 7 F に記載のものと同じ実験での反復実験である。(図 9 A ~ 9 E については N = 11 / 群; 図 9 F についてはルシフェラーゼ mRNA 群 N = 10)。

【図 9 - 2】図 9 - 1 の続き。

【図 9 - 3】図 9 - 2 の続き。

【図 10】図 10 A ~ 10 B は、図 9 に示されている研究の腫瘍成長動態を示す図である。図 10 A は、すべての処置群についての 36 日目までの平均腫瘍体積を示す。図 10 B は、腫瘍成長抑制を示す。30 日目までの T / C (平均腫瘍体積に基づく、腫瘍 / 対照) を計算した。

10

【図 11】腫瘍体積の有意な低減があった mRNA 混合物を示す、図 9 に示されている実験からのデータの棒グラフであって、有意な腫瘍低減があった処置群の各々におけるマウスの数を、腫瘍体積の Z スコア、および腫瘍体積変化と対照群の平均との間の比に基づいて、ルシフェラーゼ対照群と比較した棒グラフを示す図である。

【図 12 - 1】図 12 A ~ 12 D は、マウスが、1) 腫瘍無処置であったか、または 2) 以前に B16F10 細胞 5×10^5 個の皮下注射を受け、腫瘍内サイトカイン mRNA 処置後に最初の腫瘍を拒絶した、実験の結果を示す図である。両方の群に B16F10 腫瘍を再負荷した。図 12 A は、腫瘍無処置宿主マウスを示す。図 12 B は、以前に、GM-CSF、IL-15 sushi、IL-12sc、IFN α (Mod B) での腫瘍内サイトカイン mRNA 処置後に B16F10 腫瘍を拒絶したマウスを示す。マウスを B16F10 注射後 55 日間にわたってモニターし、各マウスの腫瘍成長をプロットした。B16F10 細胞を生着させた無処置マウス 9 匹すべては腫瘍を発生した (図 12 A) が、無腫瘍マウス 8 匹はすべてが B16F10 細胞を拒絶し、B16F10 腫瘍の成長を示さなかった (図 12 B)。図 12 B のグラフは、すべての実測値がゼロであった、すなわち、横軸と重なっていたため、目に見えるデータトレースがなかった。図 12 C は、腫瘍部位における限局性白斑の例を示す。図 12 D は、マウスが、腫瘍無処置であった (三角記号) か、または以前に CT26 腫瘍細胞の皮下注射を受け、腫瘍内サイトカイン mRNA 処置後に最初の腫瘍を拒絶した (丸記号)、実験の結果を示す。両方の群に、CT26 腫瘍細胞 (CT26-WT)、または gp70-エピトープがノックアウトされていた CT26 Δ gp70 腫瘍細胞、どちらかを再負荷した。腫瘍細胞注射後 21 日間にわたってマウスをモニターした。CT26-WT 細胞を生着させた 1 匹を除く 9 匹すべての無処置マウス、および CT26- Δ gp70 細胞を生着させたすべての無処置マウスは、腫瘍を発生したが、3 匹すべての無腫瘍マウスは、CT26 細胞を拒絶し、CT26 および CT26- Δ gp70 腫瘍それぞれの成長を示さなかった。

20

30

【図 12 - 2】図 12 - 1 の続き。

【図 12 - 3】図 12 - 2 の続き。

【図 13 - 1】図 13 A ~ 13 D は、0 日目にマウスの右側腹部 (被注射) および左側腹部 (未注射) (図 13 A) に B16F10 腫瘍細胞を移植した実験の結果を示す図である。マウスに、右側の腫瘍内への Mod B サイトカイン mRNA (IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSF および IFN α) または Mod B 対照 mRNA (ルシフェラーゼ) の一連の 4 回の腫瘍内注射を 11、15、19 および 23 日目に施した。平均腫瘍体積 + / - SEM (n = 12) が、注射を施した腫瘍 (図 13 B) および反対側の未注射の腫瘍 (図 13 C) について示されている。生存率中央値は、図 13 D に示されている。

40

【図 13 - 2】図 13 - 1 の続き。

【図 14 - 1】図 14 A ~ 14 F は、ヒト HEK293 (図 14 B) およびメラノーマ細胞株 (A101D (図 14 C)、A2058 (図 14 D)、A375 (図 14 E)、および Hs294T (図 14 F)) にヒトサイトカイン mRNA 混合物 (IL-12sc、GM-CSF、IL-15 sushi および IFN α 2b) を様々な mRNA 用量でトラ

50

ンスフェクトした実験の結果を示す図である。トランスフェクションの24時間後に上清を回収し、タンパク質濃度をサイトカイン特異的ELISAで決定した。図14Aは、実験の模式図を示す。

【図14-2】図14-1の続き。

【図14-3】図14-2の続き。

【図15-1】図15A~15Bは、IL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α 2bをコードするヒトサイトカインmRNA混合物、または個々のサイトカインmRNAを、HEK293細胞にトランスフェクトし、条件培地を24時間の時点で回収し、希釈し、ヒトPBMCに添加した研究からの、模式図（図15A）および結果（図15B）を示す図である。PBMC培養物上清中のIFN γ を24時間の時点で測定した（ドナー N=6、平均）。

10

【図15-2】図15-1の続き。

【図16-1】図16A~16Eは、ヒトA375腫瘍異種移植片を担持している免疫不全マウスに、ヒトサイトカインをコードするModB mRNA混合物（IL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α 2b；「IL15 *sushi*混合物」）または（IL-2、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α 2b；「IL2混合物」）の単回注射を施した実験結果を示す図である。腫瘍細胞溶解物を、注射後2時間、4時間、8時間、24時間、48時間および72時間の時点で調製し、腫瘍溶解物中の全タンパク質に対する各サイトカインの濃度を測定した（マウス n=3/時点、+/-SEM）。図16Aは、IFN α 2bを示し、図16Bは、IL-2を示し、図16Cは、IL-12 *sc*を示し、図16Dは、IL-15 *sushi*を示し、図16Eは、GM-CSFを示す。

20

【図16-2】図16-1の続き。

【図16-3】図16-2の続き。

【図17-1】図17A~17Cは、ModBサイトカインmRNA混合物（IL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSF、IFN α 2b）または（IL-2、IL-12 *sc*、GM-CSF、IFN α 2b）の注射後2時間、4時間、8時間、24時間、48時間および72時間の時点でA375腫瘍からmRNAを単離した実験の結果を示す図である。インターフェロナルファ応答遺伝子の発現を、qPCRによりモニターした。図17Aは、ヒトISG15を示し、図17Bは、ヒトISG54を示し、ヒト17Cは、ヒトMX1を示す。

30

【図17-2】図17-1の続き。

【図18-1】図18A~18Eは、マウスにB16F10細胞を移植し、IFN α を伴うまたは伴わないmRNA混合物（FLT3L、IL-2、41BBL、およびCD27L-CD40L）で処置した実験の結果を示す図である。IFN α を伴わない、標準形態（ModA、図18B）および修飾形態（ModB、図18C）のmRNA混合物を、IFN α を含む、標準形態（ModA、図18D）および修飾形態（ModB、図18E）のものと比較した。図18Aは、mRNAを伴わないリンゲル培地を供給した負の対照である。

【図18-2】図18-1の続き。

40

【図18-3】図18-2の続き。

【図19-1】図19A~19Eは、マウスの一方の側腹部に腫瘍を移植し、肺にホーミングするルシフェラーゼ発現腫瘍細胞のIV注射を施した（図19A）実験の結果を示す図である。処置群のマウスの側腹部腫瘍のみにmRNA混合物 IL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α の腫瘍内注射を施したが、肺における腫瘍は処置しなかった。図19Bは、肺における生物発光測定、および同じ日（20日目）に摘出した、相応する肺の写真为例として示し；腫瘍結節が黒い印として見え；図19Cは、ノギス測定により判定された側腹部腫瘍の平均腫瘍体積を示し；図19Dは、20日目の生物発光測定の全光束の分析を示し；図19Eは、肺重量を示す。

【図19-2】図19-1の続き。

50

【図19-3】図19-2の続き。

【図19-4】図19-3の続き。

【図20-1】図20A~20Gは、二重側腹部腫瘍モデルにおいて抗体の全身投与と組み合わせたmRNA混合物の腫瘍内注射の効果を評価するために計画した実験の結果を示す図である。左右側腹部へのB16F10腫瘍の移植または左右側腹部へのMC38腫瘍の移植のどちらかを施したマウスの一方の側腹部の腫瘍のみにIL-15 s u s h i、IL-12 s c、GM-CSFおよびIFN α (Mod B)のmRNA混合物の腫瘍内注射を施し、その一方で、他方の側腹部は、処置しなかった。マウスに抗PD1抗体の腹腔内(全身)注射も施した。図20は、B16F10(図20A)およびMC38(図20B)腫瘍モデルにおける全生存率を示す。図20C~Gは、抗PD-1抗体を評価する実験の結果を示し、この実験では、マウスの一方の側腹部にB16F10腫瘍を移植し、肺にホーミングするルシフェラーゼ発現B16F10腫瘍細胞のIV注射を施した。マウスに、IL-15 s u s h i、IL-12 s c、GM-CSFおよびIFN α のmRNA混合物の3回の腫瘍内注射を施し、抗PD-1抗体の3回の腹腔内(全身)注射も施した。SC腫瘍の腫瘍成長が図20C~Fに描示されている。図20Cは、対照mRNAおよび対照抗体を示し；図20Dは、対照mRNA、加えて、抗PD1抗体を示し；図20Eは、サイトカインmRNA混合物、加えて、アイソタイプ対照抗体を示す。図20Fは、サイトカインmRNA、加えて、抗PD-1抗体を示す。図20Gは、IV腫瘍接種後70日目までの4つすべての処置群についての生存パーセントを示し；mRNA、加えて、抗PD-1抗体を施した処置群は、最も強い抗腫瘍活性を示し、マウス15匹のうちの6匹が腫瘍接種後40日目に無腫瘍であった。

【図20-2】図20-1の続き。

【図20-3】図20-2の続き。

【図20-4】図20-3の続き。

【図21-1】図21A~21Iは、抗体の全身投与と組み合わせたmRNA混合物の腫瘍内注射の効果を評価するために計画した追加実験の結果を示す図である。CT26腫瘍担持マウスに、IL-15 s u s h i、IL-12 s c、GM-CSFおよびIFN α のmRNA混合物の腫瘍内注射を施した。マウスに抗CTLA-4抗体の腹腔内(全身)注射も施した。図21Aは、腫瘍内サイトカインmRNAとIP注射抗CTLA-4の併用療法の、最も強い抗腫瘍活性を生じさせる結果となり、マウス16匹のうちの12匹が、腫瘍接種後55日目に無腫瘍であったことを示す。図21Bは、サイトカインmRNA混合物、加えて、アイソタイプ対照抗体を示し；図21Cは、対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体を示し；図21Dは、対照mRNAおよび対照抗体を示す。図21E~21Iは、B16F10腫瘍モデルにおいて抗CTLA-4抗体と組み合わせたmRNA混合物の腫瘍内注射の効果を評価するために計画した追加実験の結果を示す。B16F10腫瘍担持マウスに、IL-15 s u s h i、IL-12 s c、GM-CSFおよびIFN α のmRNA混合物の腫瘍内注射を施した。マウスに抗CTLA-4抗体の腹腔内(全身)注射も施した。図21Eは、腫瘍内サイトカインmRNAとIP注射抗CTLA-4の併用療法の、最も強い抗腫瘍活性を生じさせる結果となり、マウス9匹のうちの6匹が、腫瘍接種後70日目に無腫瘍であったことを示す。図21Fは、サイトカインmRNA混合物、加えて、アイソタイプ対照抗体を示し；図21Gは、対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体を示し；図21Hは、対照mRNAおよび対照抗体を示す。図21Iは、腫瘍接種後70日目までの4つすべてについての処置群についての生存パーセントを示す。

【図21-2】図21-1の続き。

【図21-3】図21-2の続き。

【図21-4】図21-3の続き。

【図21-5】図21-4の続き。

【図22-1】図22A~22Dは、異なるヒトがんのヒト腫瘍異種移植片におけるサイトカインmRNA (Mod B)の腫瘍内注射の効果を評価するために計画した実験の結果を示す。

果を示す図である。4つのmRNAにコードされたサイトカイン：IL-12sc（図22A）、IFN α 2b（図22B）、GM-CSF（図22C）およびIL-15sushi（図22D）の各々についての腫瘍内発現が示されている。

【図22-2】図22-1の続き。

【図23-1】図23A~23Dは、コードされたサイトカイン：IL-15sushi（図23A）、IL-12sc（図23B）、GM-CSF（図23C）およびIFN α 2b（図23D）の発現に対する異なる腫瘍内mRNA用量の効果を評価するために計画した実験の結果を示す図である。

【図23-2】図23-1の続き。

【図24-1】図24A~24Gは、マウスにB16F10腫瘍を移植し、IL-15sushi、IL-12sc、GM-CSF、IFN α （ModB）のサイトカインmRNA混合物、または単一のサイトカインをコードするmRNAの、4回の腫瘍内注射で処置した実験の結果を示す図である。明らかになる腫瘍体積をおおよそ70日目まで測定した。図24Aは、ルシフェラーゼ対照を示し；図24Bは、4つのサイトカインの混合物を示し；図24Cは、IL-12sc mRNAのみを示し；図24Dは、GM-CSF mRNAのみを示し；図24Eは、IFN α mRNAのみを示し；図24Fは、IL-15sushiのみを示す。図24Gは、サイトカインmRNA混合物でまたはmRNAにコードされた個々のサイトカインで処置したB16F10腫瘍の全生存率を示す。生存率データは、図24A~Fに提示されている実験からのものである。

【図24-2】図24-1の続き。

【図24-3】図24-2の続き。

【図24-4】図24-3の続き。

【図25】対照mRNA（「プラセボ」）およびサイトカインmRNA処置後の皮下腫瘍におけるCD8+免疫細胞浸潤物を示す図である。

【図26】図26A~26Cは、サイトカインmRNA処置および対照mRNAの腫瘍内投与をそれぞれ施したCT26腫瘍担持マウスの血液中のgp70のgp70腫瘍抗原に特異的なCD8+T細胞の測定結果を示す図である。図26Cは、抗マウスCD8抗体でおよび対照mRNAを施した動物から得たgp70特異的四量体で染色した、CD8+T細胞のFACSヒストグラムを例として示し、図26Bは、サイトカインmRNAで処置した1匹の動物からの例を示す。図26Cは、4回の対照mRNA注射を施したマウス9匹および4回のサイトカインmRNA注射を施したマウス10匹からの処置開始後13日目の血液中のgp70特異的なCD8+T細胞のパーセンテージの分析を示す。

【図27-1】図27A~27Cは、左右の側腹部にB16F10腫瘍を担持しているマウスの一方の腫瘍のみにサイトカインmRNAまたは対照mRNAの単回腫瘍内mRNA注射を施した実験を示す図である。mRNA注射後7日目に、左右の腫瘍を採取し、RNA配列決定に供した。図27Bは、対照mRNAで処置した腫瘍に対するサイトカインmRNA処置の、これらの間の遺伝子発現変化を比較する、インジェヌイティー・パスウェイ・アナリシスの結果を示す。処置した腫瘍側部（カラム1）および未処置の腫瘍側部（カラム2）の因果関係ネットワーク分析を行い、Activation Zスコア（上半分）およびInhibition Zスコア（下半分）を分析して、発現が上方および下方調節される経路をそれぞれ定義した。図27は、注射を施した腫瘍および未注射の腫瘍のクラスター分析を、327個のインターフェロンガンマ調節遺伝子に基づいて行ったことを示す。サイトカインmRNAで処置したマウスの被注射腫瘍と未注射腫瘍の両方が、対照mRNAで処置したマウスと比較して、複数のIFNガンマ遺伝子の上方調節を示した。

【図27-2】図27-1の続き。

【図27-3】図27-2の続き。

【図28-1】図28A~28Dは、B16F10二重腫瘍モデルからの細胞の蛍光顕微鏡写真を示す図である。パネルAは、サイトカインmRNAで処置した被注射腫瘍を示し、パネルBは、対応する未注射腫瘍を示す。パネルCは、対照mRNAで処置した被注射

10

20

30

40

50

腫瘍を示し、パネル D は、対応する未注射腫瘍を示す。スライドを C D 4 +、C D 8 + および F O X P 3 + 細胞について染色した。図 2 8 E ~ G は、免疫蛍光画像で定量された C D 4 +、C D 8 + および F o x P 3 + 細胞の出現頻度を示す図である。1 mm² 当たりの C D 4 + および C D 8 + 細胞の出現頻度が、図 2 8 E および 2 8 F に提示されている。F O X P 3 + 出現頻度で割った C D 8 + 出現頻度の比が、図 2 8 G に提示されている。

【図 2 8 - 2】図 2 8 - 1 の続き。

【図 2 8 - 3】図 2 8 - 2 の続き。

【図 2 9 - 1】図 2 9 A ~ 2 9 G は、T h y 1 . 1 細胞表面タンパク質をコードする m R N A またはビヒクル（リンゲル液）のどちらか単独での単回注射を施した単一 B 1 6 F 1 0 腫瘍を有するマウスを示す図である。腫瘍内注射後およそ 1 6 ~ 1 8 時間の時点で、腫瘍を摘出し、消化し、抗体のパネルで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。T h y 1 . 1 を発現する細胞の細胞型および出現頻度を特徴づけた。

【図 2 9 - 2】図 2 9 - 1 の続き。

【図 2 9 - 3】図 2 9 - 2 の続き。

【図 3 0 - 1】図 3 0 A ~ 3 0 F は、実施例 1 5 に記載の、様々な用量のサイトカイン m R N A またはルシフェラーゼ対照 m R N A 後に腫瘍溶解物中で検出された、示されているタンパク質の発現を示す図である。図 3 0 E 中の「I F N γ」は、I F N γ を示す。

【図 3 0 - 2】図 3 0 - 1 の続き。

【図 3 0 - 3】図 3 0 - 2 の続き。

【図 3 1 - 1】図 3 1 A ~ 3 1 B は、実施例 1 5 に記載の、対照またはサイトカイン m R N A 処置後の C D 8 + および F O X P 3 + (T r e g) 細胞についてのフローサイトメトリー結果を示す図である。C D 8 + T r e g 細胞に対する実測比が、各パネルに示されている。図 3 1 C ~ 3 1 D は、実施例 1 5 に記載の、対照またはサイトカイン m R N A 処置後の多機能性 C D 8 + T 細胞についてのフローサイトメトリー結果を示す図である。多機能性 C D 8 + T 細胞の割合が、各パネルに示されている。図 3 1 E は、実施例 1 5 に記載の、対照またはサイトカイン m R N A 処置後の浸潤性骨髄系細胞上の P D - L 1 のレベルを示す図である。図 3 1 F は、実施例 1 5 に記載の、対照またはサイトカイン m R N A 処置後の浸潤性 C D 8 + 細胞上の P D - 1 のレベルを示す図である。図 3 1 G ~ H は、実施例 1 5 に記載の、対照またはサイトカイン m R N A 処置後の腫瘍内グランザイム B C D 8 + T 細胞の出現頻度を示す図である。

【図 3 1 - 2】図 3 1 - 1 の続き。

【図 3 1 - 3】図 3 1 - 2 の続き。

【図 3 1 - 4】図 3 1 - 3 の続き。

【図 3 2 - 1】図 3 2 A ~ 3 2 B は、実施例 1 6 に記載の、ホタルルシフェラーゼをコードする m R N A 5 0 μ g の腫瘍内注射後の様々な組織におけるルシフェラーゼ発現を示す図である。

【図 3 2 - 2】図 3 2 - 1 の続き。

【図 3 3】本質的には図 1 2 に示されている通りの実験に関するデータを示す図である。

【図 3 4】実施例 1 7 に記載の、B 1 6 F 1 0 腫瘍を担持しているマウスにおけるサイトカイン m R n A での処置前の C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞または N K 細胞の枯渇の生存率に対する効果を示す図である。

【図 3 5】実施例 1 に記載の通り B 1 6 F 1 0 腫瘍細胞を移植した、および実施例 1 8 に記載の通り対照またはサイトカイン m R N A で処置した、W T および I F N γ K O マウスの生存率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 2】

配列の説明

表 1 および 2 は、本明細書で言及される、ある特定の配列の一覧表を提供するものである。

【0 0 4 3】

【表 2】

[illegible]

【 0 0 4 5 】

【表 3】

ヒト非最適化 IL-12sc (CDS DNA) 配列注釈 CAPS: p40 ドメ イン; CAPS: リンカー; CAPS: p35. 15	ヒト最適化IL- 12sc (CDS DNA) 配列注釈 CAPS: p40 ドメ イン; CAPS: リンカー; CAPS: p35. 16
ATGTGTCACACGAGTTGGTCACTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCTCGTGCCATATGGGAACCTGAAGAAAGATGT TTATGTCGTAGATTGGATTGGTATCGGATGCCCTGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAGATGGTATCACT GGACCTTGGACACGAGCTAGGCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCTGACCTCAAGAGTTTGGAGTTTGGCCAGTACACCT TGTCACAAAGGAGCGAGTTCTAAGCCATTTCGCTCTGCTGCTTCAAAAGGAAGATGGATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGA CCAGAAAGAACCCAAATAAGACCTTCTAAGATCGAGCCAAAGATTTATCTGGAGCTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACATCA GTAATTTAGATTTCAGTGTCAAAAGCAGAGGGTCTTTCAGCCCAAGGGTACGCTGGAGCTGTCTACACTCTCTCTGCAAG AGAGTCAGAGGGGACCAAGAGATATGATGACTCAGTGAGTGCAGAGGACACTGCTGCCCCAGCTGCTGAGGAGAGTGTCCCCAT TGAGGTGATGGTGGATGCGTTTCAAGCTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT CCAAAGACTTGCAGCTGAGCCATTAAAGATTTCTCGGAGGTGAGGTGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT TACTTCTCCCTGACATTCTCGTTGAGTCCAGGCAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG GCAGTGGCTTAGCGGAGGGAGGCTCTCCTGGCGGGGATCTAGCAGAAACCTCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAAATGTTCCCA TGCTTACCACTCCCAAACTGCTGAGGCGCTCAGCAACATCTCCAGAGGCGCAGCAAACTCTAGAAATTTTACCTTGCACCTTC TGAGGAAATTTGATCATGAGATATCAAAAGATAAAACAGCAGTGGAGGCTGTTTACCAATGGAATTAACCAAGAAATGAGAGTT GCCTAAATTCAGAGAGACTCTTTCATAAATAAGAGTGGAGTGGCTGGCTCCAGAAAGCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCTTACT AGTATTTATGAGACTTGAAGATCTACAGGTGAGTCAAGACCATGAATCAAGAGCTTCTGATGATCCTTAAGAGGCGAGACTTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATGATGAGCTGATGAGGCGCTGAAATTCACAGTGAAGTGTGCCCCAAGAAATCTCTCCCTTGAAG AACCGGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATCTCTTTCATGCTTTCAGAAATTCGGGCACTGACTATTTGATAGAGTATGAGC TATCTGAATGCTTCTCTGATGA	ATGTGTCACACGAGTTGGTCACTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCTCGTGCCATATGGGAACCTGAAGAAAGATGT TTATGTCGTAGATTGGATTGGTATCGGATGCCCTGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAGATGGTATCACT GGACCTTGGACACGAGCTAGGCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCTGACCTCAAGAGTTTGGAGTTTGGCCAGTACACCT TGTCACAAAGGAGCGAGTTCTAAGCCATTTCGCTCTGCTGCTTCAAAAGGAAGATGGATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGA CCAGAAAGAACCCAAATAAGACCTTCTAAGATCGAGCCAAAGATTTATCTGGAGCTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACATCA GTAATTTAGATTTCAGTGTCAAAAGCAGAGGGTCTTTCAGCCCAAGGGTACGCTGGAGCTGTCTACACTCTCTCTGCAAG AGAGTCAGAGGGGACCAAGAGATATGATGACTCAGTGAGTGCAGAGGACACTGCTGCCCCAGCTGCTGAGGAGAGTGTCCCCAT TGAGGTGATGGTGGATGCGTTTCAAGCTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT CCAAAGACTTGCAGCTGAGCCATTAAAGATTTCTCGGAGGTGAGGTGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT TACTTCTCCCTGACATTCTCGTTGAGTCCAGGCAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG GCAGTGGCTTAGCGGAGGGAGGCTCTCCTGGCGGGGATCTAGCAGAAACCTCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAAATGTTCCCA TGCTTACCACTCCCAAACTGCTGAGGCGCTCAGCAACATCTCCAGAGGCGCAGCAAACTCTAGAAATTTTACCTTGCACCTTC TGAGGAAATTTGATCATGAGATATCAAAAGATAAAACAGCAGTGGAGGCTGTTTACCAATGGAATTAACCAAGAAATGAGAGTT GCCTAAATTCAGAGAGACTCTTTCATAAATAAGAGTGGAGTGGCTGGCTCCAGAAAGCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCTTACT AGTATTTATGAGACTTGAAGATCTACAGGTGAGTCAAGACCATGAATCAAGAGCTTCTGATGATCCTTAAGAGGCGAGACTTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATGATGAGCTGATGAGGCGCTGAAATTCACAGTGAAGTGTGCCCCAAGAAATCTCTCCCTTGAAG AACCGGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATCTCTTTCATGCTTTCAGAAATTCGGGCACTGACTATTTGATAGAGTATGAGC TATCTGAATGCTTCTCTGATGA

【0046】

【表 4】

[illegible]

10

20

30

40

【表 7】

[illegible]

【 0 0 5 0 】

【表 9】

Moda ヲ イル
12 (DNA: 5',
UTR-CDS-3',
UTR)

GGGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCACAGACTACAGAGAAACCGCCACCATTGAGAGTGACCGCCCCAGAAACCCCTGATCTGCTG
CTGTCTGSGCGCCCTGACAGACATGCGCCGGAAGCGGATCCATGTGGGAGCTGGAGAAAGACAGTTTATGTTTAGAGGTGG
ATGGACTCCCGATCCCGTGGAAAGAACAGTGAACCTCACCTGTACAGCCCTGACGAAGATGACATCACCTGGACCTACAGACAG
ACATGGAGTCTAGAGCTTGGAAGAACCCCTGACCATCACTCTCAAAGAGTTTCTAGATGCTTGGCCAGTACACCTGCCACAAAGGAGGC
GAGACTGTAGCCATCACTCTGCTGCTCCACAGAAGAAATGGAATTTGGTCCACTGAAATTTTAAAAATTTCAAAAACAAGA
CTTTCTCAAGTCTGAAGCACCAAAATTACTCCGGACGTTTCAGTGTCTCATGGTGGTGCAAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCAACAT
CAAGAGAGTAGCAGTTCCTGACTCTCGGCGAGTGTCACTGTCGCCACGAGGATGATCACTGCCCACTGATGCCAGGAGACCCCTGCCACTTGAAG
GACTATGAGAACTATTTCAGTGTCTTCCACAGGAGTGTCACTGCCCACTGATGCCAGGAGACCCCTGCCACTTGAAGTGGCCTTGGAAAG
CACGGACAGATAAATATGAGACTACAGCACCACTCTTCTACAGGAGATGATCACTAAACAGACCGGCCCAAGAACTTGCAGAT
GAAAGCTTTGAAGAACTCACAGTTCGAGTTCAGCTGGAGTACCTGACTCTCTGGAGCACTCCCACTTCTTCTCCCTCAAGTTC
TTTGTTCGAATCCACGCGCAAGAAAGATGAAGCAGAGGGGTGAACAGAGAAAGTGGTCTCTCGTAGAGAGACAT
CTACCGAAGTCCAAATGCAAAAGGCGGAAATGTTCTCGTGCAAGCTCAGGATCGTATTACAAATCTCTGACAGCAAGTGGGCACTGTGT
TCCCTCGAGAGTCGAGTTCCTGGAGTAGGGTACTCGAGTGGGAGGGTGTATACCGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGC
CAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAGCTGAAACATTTATTCCTGCACCTCTGAAGACA
TGTACTATGAGACATCAACCGGACCAACCCAGACATCGAATGACACTCTTTACCACTTACACAAAGACGAGAGTGGCTGGC
TATGAGACTTGAAGATGTAACAGACAGAGTTCAGGCCATCAACGCGCATCTGAAATCAACCAACCATCAGCAGATCATCTAGACA
AGGGCATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTGAAATCAATAATGGCGAGACTCTGGCCAGAAAACCTCTCTGGGGAAGAAC
AGACCTTACAGAGTGAATGAAGCTCTGCATCTCTGCTTCAGCTTCAGTCCAGCCGCTGACACCGGCTGTGACCATCAGAGGGTGTAGGGCTAT
CTGTCCAGCGCCTAAATAGCTCGAGAGCTCGCTTTCTTGTCTCCCAATTTCTATTTAAAGTTTCTTTTGTTCCTTAAGTCCAACTACTAA
ACTGGGGGATATATGAGGGCCCTTGAGCATCTGGATTTCTGCTTAATAAAAAACATTTATTTCTTCTGCTGGCTCGAGAGCTCGCTTT
CTTGTCTCCAAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTTCCCTAAGTCCAACTACTAACTTGGGGGATATTTATGAAGGGCCCTTTGAGCATCTG
GATCTGCCCTAATAAAAAACATTTATTTCTATGCTCGTGCAGAGCTGGTGCAGAGTCCGTAGCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
AAAAAAGCAATATCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
AAAAAAGCAATATCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

37

【 0 0 5 2 】

【表 1 1】

ModE ヲ入 IL- 12 (DNA: 5' UTR-CDS-3' UTR)	GGAAATAAAGTAGTCTCAACACACATATACAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTTCTACTTCTATTTGAGCAATTTAAATCA TTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTCTGAAATTTTACCAATTTAGCAACGATAGCATGGGCGCCATGGCCCTAGAACATTTGGCTCC TGCTGCTGGCCGCTGCCCTGGCCCTACACAGACAGAGCTGGACCTGGATCCATGTGGGAGTGGAGAAAGAGCGTTTATGTTGTAGA GGTGGACTGGACTCCCGATCCCGATCCCGATGGAGAAACAGTGAACCTCAGCTGACACCGCTGAAGAGATGACATCACTGGACCTCAGAC CAGAGACATGGACTATAGGCTCTGGAAAGACCCCTGACCAATCACTGCAAGATTTCTAGATGCTGGCCAGTACACCTGCCCAAAAG GAGCGGAGACTCTGAGCCACTCACAATCTGCTGCTCCACAAAGGAAATTTGGTCCATTTGAAATTTTAAAAAATTTTCAAAAA CAAGACTTCTCTGAAGTGGAAGCACCACAAATTAATCCCGGAGGTTCAAGTGCTCAATGGCTGGTGCACAAAGAAATGGACTTGAAGTTC AAATCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCTCTGACTCTCGGGCAGTGACATGTGGAATGGCGTCTCTGTCTGCAGAGAAGGTCACTGGAACC AAAGGACTATGAGAGATATTAGTTGCTCTCCAGGAGGATGTCACTGCCCAACTGCCGAGGAGACCTGCCCATTTGAACTGGCGTT GGAAGCAGGCGACAGATAAATATGAACTACAGCACAGCTTCTTCACTCAGGGACATCATCAACAGACCGGCCCAAGAACTTG CAGATGAAGCCTTTGAAGAACTCAGAGTGGAGTCACTGGGAGTACCTGACTCCTGGAGCACTCCCATTTCTACTTCTCTCCCTCA AGTTCTTTGTCGAATCCAGCGCAAGAAAGAAAGATGAAGAGACAGAGGGGGTGAACAGAAAGGTGCGTTCCTCGTAGAGAA GACATCTACCGAAGTCCAAATGCAAGGGCGGAAATGCTGCTGCTGCAAGCTCAGATCGCTATTACAAATTCCTCATGACAGCAAGTGGCA TGTTTCCCTTCGAGAGTCCGATCGGTTCCTGGAGTAGGGTAACCTGGAGTGGGCGAGGTCAATACCGGTCTCTGCACTGCCAGGTGTC TTAGCCAGTCCCGAAACCTGCTGAAGACACACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAGCTGAAACATTTATCTGCACTGCTGA AGACATCGATCATGAAGACATCAACGGGACCAACACAGCACTTGAAGACCTGTTTACCTGGAATACACAAAGAACAGAGAGTTGC CTGGCTACTAGAGACTTCTTCCACAAAGAGGGAGTGCCTGCCCCCAGAGACGTCTTTGATGATGACCTGTGCTGCTGGTA GCATCTATGAGGACTTGAAGATGTACAGACAGAGTTCCAGGCCATCAACGCGACACTTCAGAAATCAACCAATCAGCAGATCATCT AGACAAGGGCATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCACTCTGCAATCATATGGGGAGACTCTGGCCAGAAACCTCTCTGTGGGA GAAAGCAGACCCCTTACAGAGTGAATGAAGCTCTGATCCCTGCTTCAACCGCTTCAGACCCGCTGTCACCAATCAACAGGGTGTATGG GCTATCTGTCCAGGCCCTAATAGCTCGAGCTCTGGTATGTGATGACAGCAATGCTAGCTGCCCCCTTCCCGCTTCCCGGTACCCGAG TCTCCCCGACCTCGGGTCCAGGTATGCTCCCACTCCCACTGCCCACTCACCACTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCAGC CAGCAATGCAAGCTCAAAAGCTTAGCCTAGCCACACCCCGGGAACAGCAGTGAATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACT AAGCTATACTACCCCGGGTTGGTCAATTTGCTGCCACACACCTCGAGCTAGCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA CATATGACTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
40	

【0 0 5 4】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

[illegible]

【 0 0 5 5 】

10

20

30

40

【表 13】

43	ModAマウスIFN α4 (DNA:5' UTR-CDS-3' UTR)	GGCGGAAC TAGTATTCTTCTGGTCC CACAGACTCAGAGAGAACCCGCGCACCA TGAGAGTGCACGCGCCCGCAGAACCCCTGATCCTGCTG CTGCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGCGCGGAAGCGATCCTGTGACCTGCCCTCACACTATTAOCTTCGGGAACAAGAGGG CCTTGACAGTCTCTGGAAGAAATGAGAGACTCCCGCCCTCTTCTGCTGAAGCAGCAGGAAGATTTTGGATTCCCTTGGGAGAGGGT GGATAACCAACAGATCCAGAAAGGCTCAAGCCATCCTTGTCTAGAGATCTTACCCAGCAGATTTTGAACATCTTACATCAAAAGAC TTTGTCTGTACTTTGGAAATGCAACTCTCTTAGACTCATTTCTGCAATGACCTCCATCAGCAGCTCAATGATCTCAAAAGCCTGTGTCTATGC AGAAACCTCTCTGACCCAGGAAGACTCCCTGCTGGCTGTGAGCAATACCTTCCACAGGATCACCTGTCTACCTCAGAAAGAGAAACA AGCCTCTGTGCTGGAGGCTGATCAGAGAGAAAGTGTGGAGCCCTCTTCTCCTCAACCAACTTGTCTGGCAAGCTAGTAGGAGGAG AAGAGTGTATAACTCAGAGGCTCGCTTTCTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGTTCTCTTTGTTCCCTTAAAGTCCAACTACTAAACTGGG GGATATTATGAAGGCTTGAAGCTGTGATTTCTGCTTAATAAAACATTTATTCTATGCTGTGCTCGAGAGCTCGCTTTCTTGTCT GTCCAAATTTCTATTAAAGTTCTCTTTCTGCTTAAGTCCAACTACTAACTGGGGATATTATGAAGGCTTGTGAGCATCTGGATTTCT GCCTAATAAATAACATTTATTCTATGCTGTGCTGAGACCTGTGCTCCAGTCCGTAAGCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAA AGCATATGACTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAA GGCGAACUAGUAUUCUGGUCGCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCGCACCAUGAGAGUGACCGCCCGCAGAACCCUGAUCUCUGCUG CUGUCUGGCGCCCGCCCGCAGACAGACAUUGGCGCGGAAGCGGAUCCUGAGACCCUUCACACUUAUAACCCUGGGGAACAAGAGGG CCUUGACAGUCCUGGAAGAAUGAGAGACUCGCCCUUCUUCUGCCUGAAGGACAGGAAGAUUUGAUUCCCUUGGAGAGAGGU GGAUAACCAACAGAUCCAGAAAGGCUCAAGCCAUCCUUGUGCUAAGAGAUUUUACCCAGCAGAUUUUUAACCUUUCACAUCAAAAGAC UUGUCUGCUACUUGGAUUGCAACUCUCCUAGACUCAUUCUGCAUUGACCCUCCAUAGCAGCAGCUCAUAGAUCAAAAGCCUGUGAUGC AGGAACCCUCCUCUGACCCAGGAAGACUCCUGUGGUGUGAGCAUAUCCACAGGAUCACUGUGUACCUAGAGAGAAAGAGAAACA CAGCCUCUGUGCCUGGAGGUGAUCAGAGCAGAAAGUCUGGAGAGCCCUUCUUCUCCUACCAACUUCUGGCAAGACUGAGUGAGGAG AAGAGUGAUAACUCGAGAGCUCGCUUCUUGUGUCCAAUUCUUAUAAAGGUUCUUAUCCUUAAGCUCUACUACUAAACUAAACUGGG GGAUAUUAUGAGGCGCUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAUAUAAACAUUUUUAUUUUAUUGUGUGUGUGAGCUGCGUUUCUGUCU GUCCAAUUCUAUUAAGGUUCCUUGUCCUUAAGUCCACUACUAACUUGGGGAUAUUAUAGAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCU GCCUUAUAAACAUUUUAUUCUUGUGUGUGGAGCCUGGUGCCAGAGCUGGUGCCAGCAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAA AGCAUAGACUAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAA MGAMAPRTLLLLAALAPTQTRAGPGSCDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRLPLSLDKRDFGFPLEKVDNQIQKAQAILVLRDL TQQILNLTFSKDLSATWNA TLIDSFNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLLAVRTYFHRITVYLRKKKHS LC AWEVIRAEVWRALS SSTNLLARLSEEKE
44	ModAマウスIFN α4 (RNA)	
45	ModBマウスIFN α4 (アミノ酸)	

【表 14】

[illegible]

【 0 0 5 7 】

【表 16】

[illegible]

【 0 0 5 9 】

【表 17】

[illegible]

【 0 0 6 0 】

【表 19】

[illegible]

【 0 0 6 2 】

【表 20】

65	ModB マウス FLI3L (RNA)	GGAAUAAACUAGUCUCAACAACAUAUACAACAAACAAAGCAUUCUUAUUGCAGCAAAUUAUAAUACA UUUCUUUAAAGCAAAAGCAAAUUCUGAAAUUUUCACCAUUAUACGAAGCAUUGCGGCCCAUGGCCCUAGAACAUUGCUUC UGCUGUGCGCGCGCCUACACAGACAGACUGCAGUCGACGACUACCCAGCAGUCGACUCCUACGACUCCUCCUUAUCUC CUCGACUUCGCCGUGAUAUGCGGAGUCUGCGAUUAUCUGUCUGAGGACUACCCUGUGACCGUGGCCGCAACUCUGAGGAA GAACUGUGUGCGCGCGUGUGUGCGCGGCGGCGGUGGAGGAGGCGGGAACCGUGGCCGCGUCCACAAGUAGCGGCG UGCUGAGCGGUGAACACCGAGAUCCACUUGUGAGCAAGUGCGCCUUCACGCUCCUUCUGCGUGCGGUUCUGUGACGACAA CAUUCGCCGCGUGUCGAGGAAACUUCGCGAGCAGUGGUGCGCCUGAAGCCUUGGAUACCCGGGCAACUUCUCCCGGUGUCUGGAA CUCAGUGCAGCGCCACUCCUCCUGCCUCCUGCGGCCCGCAGGCGCUGGAGCCUACGCCCCUACCGCCACACGACUCUC CUUGAUGUGCAGGUCUGGUAUGCAUGCAGCAGCAUGCUAGCUGCCUCCUUCUGUGGUAACCCCGAGUCUCCCGGACCGUCC GGUCCAGUAUGCUCACUCCUCCACUCCACUCCACUCCUGUGUAGUCCAGACACUCCCAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC AAACGUUAGCUGUAGCCACCCCGCAGGGAACACGAGUGAUUACCUUAGCAUAAAGAAAGUUUAACUAGCUAUACUAAACCC CAGGUGUGUCAUUCUGCGCGCACCCUCCAGCUAGCAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
41BL マウス		
66	ModA マウス 41BL (アミノ酸)	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLLADAALLSDTVRPINAALPTDAAYPAVNVDRDAAWPPALNFCRHPKLYGLVA IVLLLLIAACVPILFTRTEPRPALITTSNPLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQGSPPFAKLAKNQASLNTTLNHSQDAGSSY LSQGLRYEEDKELVDSPLGYLYFLELKLSPFTFTNTGHKVQGWVSLVLAQKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQILLIK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGLEFLVLPDPWE
ModA マウス 41BL (DNA: 5' UTR-CD5-3' UTR)		GGCGCACTAGTATCTCTTGCTGGTCCCGCATGCTCAGAGAAACCCGGCACCATGAGACAGCACACACTTGATGTGGAGGATACCGCG GATGCCAGATCCAGCAGGTACTTCGTGCGCCCTCGGATCGCGCTCTCTCAGAGATACCGGGCTCCTCGCGGACGCTGGCTCTCT CAGATAGTGTGCGCCCGCAAAATGCGCGGTCTCCGAGATGCTGCTACCTCGGGTTAATGTTGGGATCGCGAGCGCGCGGTGGCC GCCTGCAGTGAATCTGTCTCCGCAACCCAAAGCTATGGCTAGTCTGCTTTGGTTTGTCTGCTGATCGCGCGCTGTGTCTCT ATCTTCACTCCGCGCAGGCTCGCGCAGGCTCACAATCCACCTCCGCAACCTGGTACCCGAGAAATATGACAGACCAAGTCA CCCTGTTTCCACATTTGGCTGCCCAACACTACAACACAGGCTCTCTGTGTTGCCAAGTACTTGGCTAAAAACAAGCATCTGTT GTGCAATACAACTCTGAATGGCAGCAAGATGGAGCTGGAGCTCATATCTCAAGGCTTGAGGTCTGAGTCAAGAACAGCAAAAAAG GAGTTGGTGGTAGACAGTCCCGGCTCTACTACGTAATTTTGGAACTGGAAGCTCAGTCCAACTTCAACAACACAGGCCACAAAGTGC AGGGCTGGGTCTCTCTGTTTGGCAAGCAAGCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACTTGGCCCTGACAGTGGAACTGTCTCCCTTGCTC CATGGAACAACAGTTAGTGGACCGTTCTTGAGTCAACTTGTCTCTCTGAAAGTGGCCACCGCTCAGTGTGGGTGTGAGGGCTTAT CTGCAATGGAGCCCGAGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTCTTATCCCAACACACACAGCTTTGGACTCTTTCTTGTGAACACCGGACA ACCCATGGGAAATGATAGGATCCGATCTGGTACTGCATGACGCAATGCTAGCTGCGCCCTTCCCGTCTGGTACCCCGAGTCTCC CCGACCTGGGGTCCCGAGTATGCTCCCACTTCACCTGCCCGCACTCACCACTCTGCTATGTTCCAGACACCTCCCAAGCAGCGACGAA TGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCGAGGAAACAGACGATGATTAACTTTAGCAATTAACCGAAAGTTTAACTAAGCTA TACTAACCCCGAGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACCCCTCGAGCTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATG ACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
67		

【 0 0 6 3 】

【 0 0 6 5 】

50

【表 2 5】

ModBマウス CD27L-CD40L (アミノ酸)	MGAMAPRTL L L L L A A A L A P T Q T R A G P G S H P E P H T A E L Q L N I T V P R K D P T L R W G A G P A L G R S F T H G P E L E E G H L R I H Q D G L Y R L H I Q V T L A N C S S P G S T L Q H R A T L A V G I C S P A A H G I S L L R G R F G Q D C T V A L Q R L T Y L V H G D V L C T N I L T L P L P S R N A D E T F F G V Q W I C P G G S G G G H P E P H T A E L Q L N I T V P R K D P T L R W G A G P A L G R S F T H G P E L E E G H L R I H Q D G L Y R L H I Q V T L A N C S S P G S T L Q H R A T L A V G I C S P A A H G I S L L R G R F G Q D C T V A L Q R L T Y L V H G D V L C T N I L T L P L P S R N A D E T F F G V Q W I C P G G S G G G H P E P H T A E L Q L N I T V P R K D P T L R W G A G P A L G R S F T H G P E L E E G H L R I H Q D G L Y R L H I Q V T L A N C S S P G S T L Q H R A T L A V G I C S P A A H G I S L L R G R F G Q D C T V A L Q R L T Y L V H G D V L C T N I L T L P L P S R N A D E T F F G V Q W I C P G G S G G G G G G G G G G D E D P Q I A A H V V S E A N S N A A S V L Q W A K K G Y Y T M K S N I L V M L E N G K Q L T V K R E G L Y Y V Y T Q V T F C S N R E P S S Q R P F I V G L W L K P S S G S E R I L L K A A N T H S S Q L C E Q Q S V H L G G V F E L Q A G A S V F V N V T E A S Q V I H R V G S S F G L L K L G G G S G G G D E D P Q I A A H V V S E A N S N A A S V L Q W A K K G Y Y T M K S N I L V M L E N G K Q L T V K R E G L Y Y V T Q V T F C S N R E P S S Q R P F I V G L W L K P S S G S E R I L L K A A N T H S S Q L C E Q Q S V H L G G V F E L Q A G A S V F V N V T E A S Q V I H R V G S S F G L L K L G G G S G G G D E D P Q I A A H V V S E A N S N A A S V L Q W A K K G Y Y T M K S N I L V M L E N G K Q L T V K R E G L Y Y V T Q V T F C S N R E P S S Q R P F I V G L W L K P S S G S E R I L L K A A N T H S S Q L C E Q Q S V H L G G V F E L Q A G A S V F V N V T E A S Q V I H R V G S S F G L L K L
75	

【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

[illegible]

50

もある。

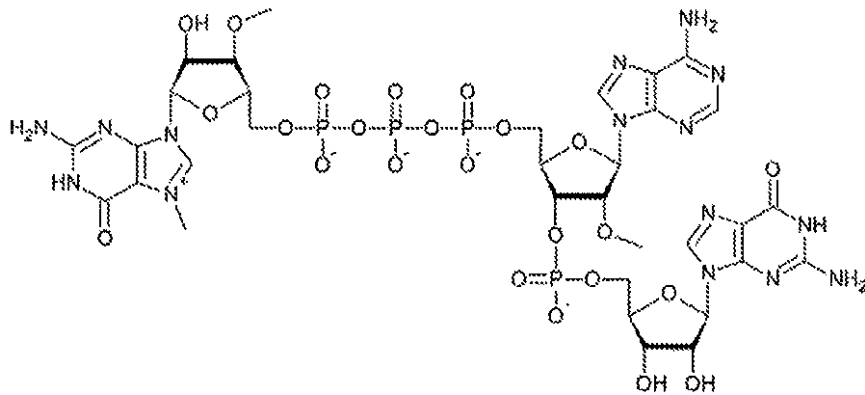
【0072】

一部の実施形態では、Mod B修飾RNAの構成要素キャップは、同時翻訳キャッピングの際に使用され、次の通り：

$m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$

($m_2^{7,3'}-G(5')ppp(5')m'-9ApG$ と呼ばれることもある)であり、これは、次の構造を有する：

【化1】



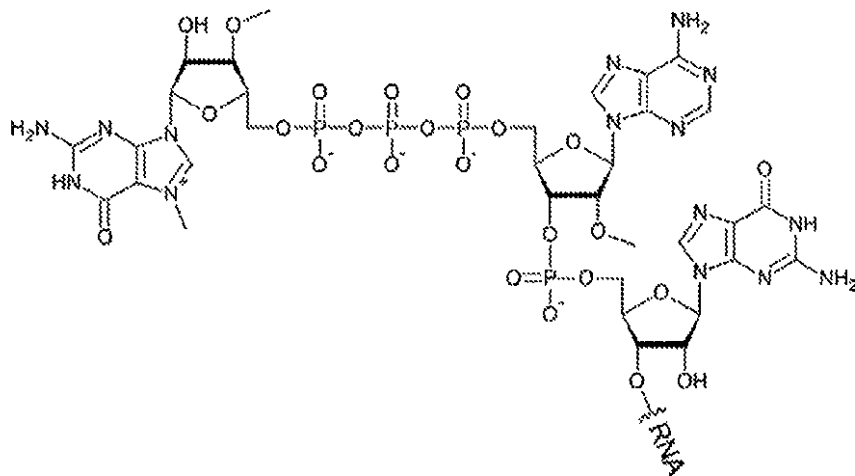
10

20

【0073】

下記は、RNAと $m_2^{7,3'}-G(5')ppp(5')m'-9ApG$ とを含む、同時翻訳キャッピング後の例示的Cap1 RNAである：

【化2】



30

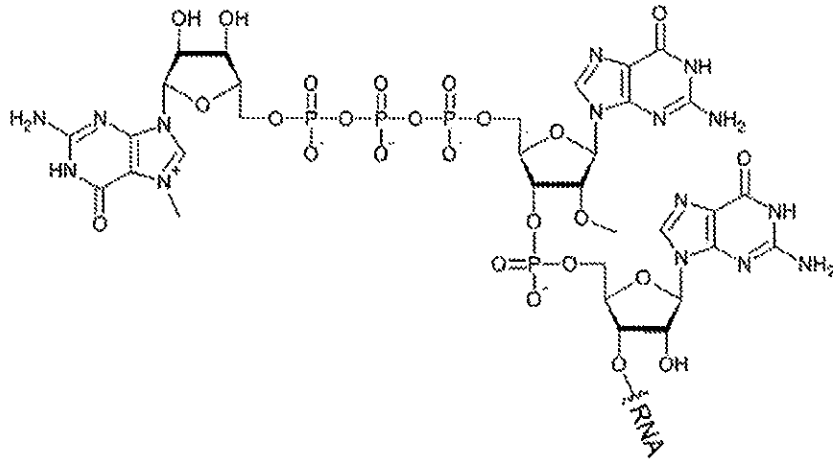
【0074】

下記は、酵素的キャッピング後の別の例示的Cap1 RNA (キャップアナログなし) である：

40

50

【化3】



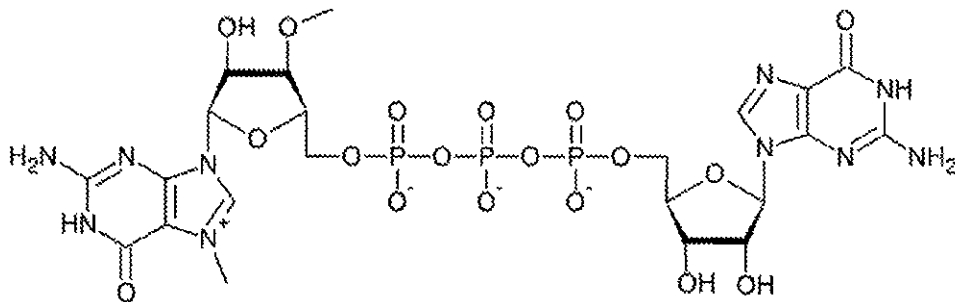
10

【0075】

用語「ModA」は、少なくとも1つのウリジンの代わりに修飾核酸塩基を含まない、dsRNA低減のないRNAを表す。ModA RNAは、該RNAの5'末端にCap0構造を含む。ModA RNAの5' UTRは、配列番号2を含むこともある。「Cap0」構造は、一実施形態では、次の構造を有するキャップアナログアンチリバースキャップ (ARCA Cap (m₂⁷, 3' G (5') ppp (5') G)) :

20

【化4】



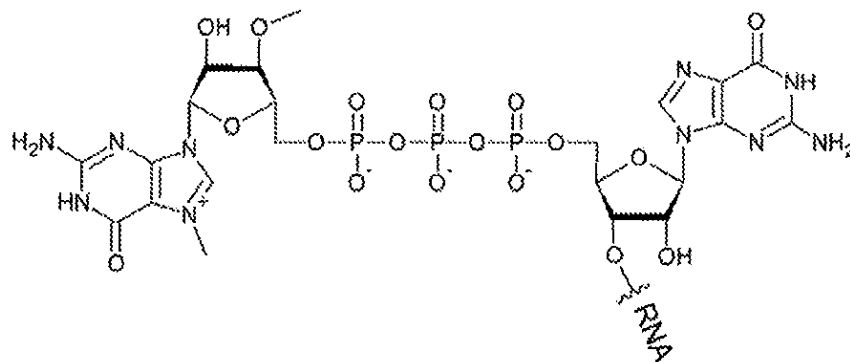
30

を使用して、*in vitro* 翻訳中に生成 (同時翻訳キャッピング) される。

【0076】

下記は、RNAとm₂⁷, 3' G (5') ppp (5') G' とを含む、例示的Cap0 RNAである：

【化5】

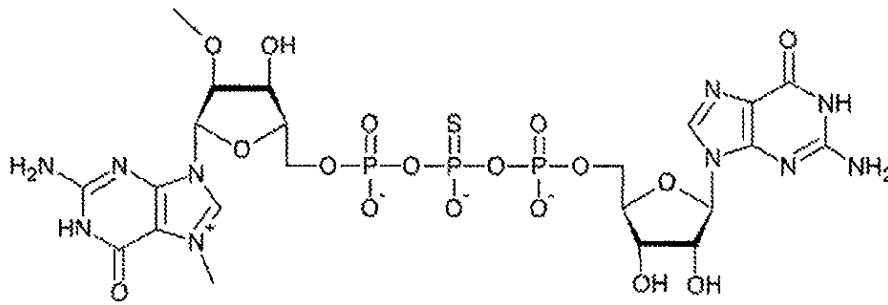


40

【0077】

50

一部の実施形態では、「Cap 0」構造は、構造：
【化 6】



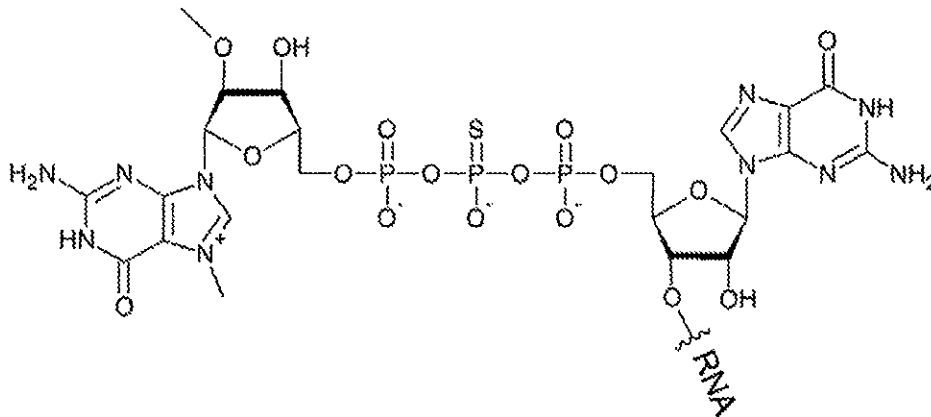
10

を有するキャップアナログベーターS-ARCA (m₂⁷, 2' QG (5') ppSp (5') G) を使用して、*in vitro* 翻訳中に生成 (当時翻訳キャッピング) される。

【0078】

下記は、ベーターS-ARCA (m₂⁷, 2' QG (5') ppSp (5') G) とRNAとを含む、例示的Cap 0 RNAである：

【化 7】

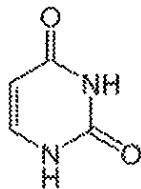


20

【0079】

用語「ウラシル」は、本明細書で使用される場合、RNAの核酸中に存在することができる核酸塩基の1つを表す。ウラシルの構造は、下記である：

【化 8】



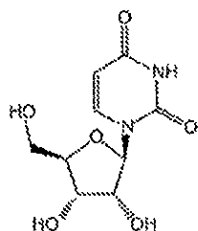
40

【0080】

用語「ウリジン」は、本明細書で使用される場合、RNA中に存在することができるヌクレオシドの1つを表す。ウリジンの構造は、下記である：

50

【化 9】

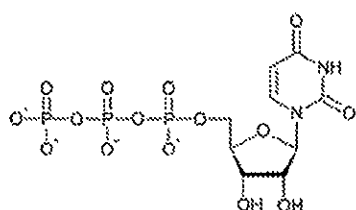


【 0 0 8 1】

10

U T P（ウリジン 5' -三リン酸）は、次の構造を有する：

【化 1 0】



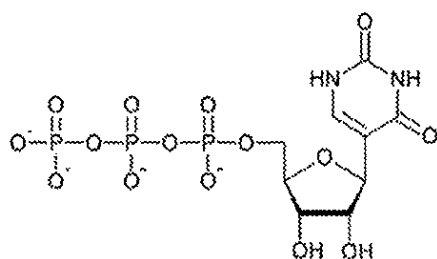
20

【 0 0 8 2】

プソイド-U T P（プソイドウリジン 5' -三リン酸）は、次の構造を有する：

【 0 0 8 3】

【化 1 1】



30

【 0 0 8 4】

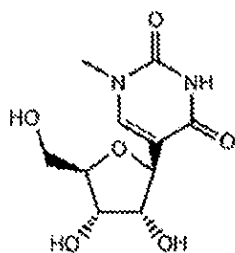
「プソイドウリジン」は、ウラシルが、窒素-炭素グリコシド結合ではなく炭素-炭素結合によってペントース環に結合されている、ウリジンの異性体である、修飾ヌクレオシドの一例である。プソイドウリジンは、例えば、CharetteおよびGray、Life ; 49 : 341 ~ 351 頁 (2000) に記載されている。

【 0 0 8 5】

別の例示的修飾ヌクレオシドは、構造：

40

【化 1 2】



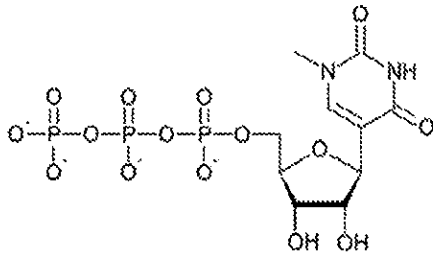
50

を有する N1-メチルプソイドウリジン (m1Ψ) である。

【0086】

N1-メチルプソイド-UTP は、次の構造を有する：

【化13】



10

【0087】

本明細書で使用される場合、用語「ポリAテール」または「ポリA配列」は、RNA分子の3'末端に通常は位置する、アデニル酸残基の分断されていないまたは分断された配列を指す。ポリAテールまたはポリA配列は、当業者に公知であり、本明細書に記載されるRNA中の3' UTRの後に続くことがある。分断されていないポリAテールは、連続したアデニル酸残基を特徴とする。本来、分断されていないポリAテールが定型である。本明細書で開示されるRNAは、転写後に鋳型非依存性RNAポリメラーゼによりRNAの遊離3'末端に結合されたポリAテールを有することもあり、またはDNAにコードされており、鋳型依存性RNAポリメラーゼにより転写されたポリAテールを有することもある。

20

【0088】

約120 AヌクレオチドのポリAテールは、トランスフェクトされた真核細胞内のRNAレベルにはもちろん、ポリAテールの上流(5')に存在するオープンリーディングフレームから翻訳されるタンパク質のレベルにも、有益な影響を及ぼすことが、実証されている(Holtkampら、2006、Blood、108巻、4009~4017頁)。

【0089】

ポリAテールは、いずれの長さのものであってもよい。一実施形態では、ポリAテールは、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも80または少なくとも100、かつ500以下、400以下、300以下、200以下または150以下のAヌクレオチド、特に、約120のAヌクレオチドを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなる。この文脈での「から本質的になる」は、ポリAテール中の大部分のヌクレオチド、通常は、ポリAテール中のヌクレオチドの数で少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%が、Aヌクレオチドであることを意味するが、残りのヌクレオチドがAヌクレオチド以外のヌクレオチド、例えば、Uヌクレオチド(ウリジル酸)、Gヌクレオチド(グアニル酸)またはCヌクレオチド(シチジル酸)であることを許容する。この文脈での「からなる」は、ポリAテール中のすべてのヌクレオチド、すなわち、ポリAテール中のヌクレオチドの数で100%が、Aヌクレオチドであることを意味する。用語「Aヌクレオチド」または「A」は、アデニル酸を指す。

30

【0090】

一部の実施形態では、ポリAテールは、RNA転写中に、例えば、*in vitro*転写RNAの調製中に、コード鎖と相補的な鎖内に反復dTヌクレオチド(デオキシチミジル酸)を含むDNA鋳型に基づいて結合される。ポリAテールをコードするDNA配列(コード鎖)は、ポリ(A)カセットと呼ばれる。

【0091】

本発明の一実施形態では、DNAのコード鎖内に存在するポリ(A)カセットは、dAヌクレオチドから本質的になるが、4ヌクレオチド(dA、dC、dGおよびdT)のラ

40

50

ンダム配列により分断されている。このようなランダム配列は、5～50ヌクレオチド長であることもあり、10～30ヌクレオチド長であることもあり、または10～20ヌクレオチド長であることもある。このようなカセットは、参照によって本明細書に組み入れられるWO2016/005324 A1に開示されている。WO2016/005324 A1に開示されている任意のポリ(A)カセットを、本発明で使用するができる。dAヌクレオチドから本質的になるが、4ヌクレオチド(dA、dC、dGおよびdT)の同じ分布および例えば5～50ヌクレオチドの長さを有するランダム配列によって分断されている、ポリ(A)カセットは、DNAレベルでは大腸菌においてプラスミドDNAの一定の伝播を示し、RNAレベルではRNA安定性および翻訳効率の支援に関する有益な特性に、なお関連する。それ故、本発明の一実施形態では、本明細書に記載されるRNA分子に含有されるポリAテールは、Aヌクレオチドから本質的になるが、4ヌクレオチド(A、C、GおよびU)のランダム配列により分断されている。このようなランダム配列は、5～50ヌクレオチド長であることもあり、10～30ヌクレオチド長であることもあり、または10～20ヌクレオチド長であることもある。

【0092】

本発明の一実施形態では、Aヌクレオチド以外のヌクレオチドは、ポリAテールの3'末端に隣接しない、すなわち、ポリAテールの3'末端はマスクされず、またはその3'末端の後にA以外のヌクレオチドが続かない。

【0093】

一部の実施形態では、ポリAテールは、配列：

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACU
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号78)

を含み、これは、表2中にも3'UTR配列に続いて示されている。

【0094】

「RNA」および「mRNA」は、本明細書では同義で使用される。

【0095】

「IFN α 」は、本明細書では、IFN α 2bおよびIFN α 4を含む任意のインターフェロナルファI型サイトカインを記述するために同義で使用される。実施例セクションに記載の実験では、ヒトIFN α 2bおよびマウスIFN α 4を利用した。任意のIFN α を組成物に組み込むことができ、本明細書に記載の方法において使用することができる。

【0096】

用語「処置」は、本明細書で使用される場合、対象における疾患のための治療薬の投与または適用を包含し、疾患を抑制すること、その発症を阻止すること、疾患の1つもしくはそれ以上の症状を軽減すること、疾患を治癒させること、または疾患の再発を予防することを含む。例えば、固形腫瘍の処置は、固形腫瘍の症状を緩和すること、固形腫瘍のサイズを減少させること、固形腫瘍を消失させること、腫瘍のさらなる成長を低減させること、または処置後の固形腫瘍の再発を低減させるもしくは無くすことを含むこともある。処置は、有効性のバイオマーカーの変化として測定されることもあり、またはイメージングもしくはX線撮影測定量の変化として測定されることもある。

【0097】

用語「予防」は、本明細書で使用される場合、がんがないと考えられる対象における、固形腫瘍を含むがんの発症を抑制または阻止することを意味する。

【0098】

「転移」は、がんが、原発性腫瘍として最初に生じた場所から体内の他の位置に拡散する過程を意味する。

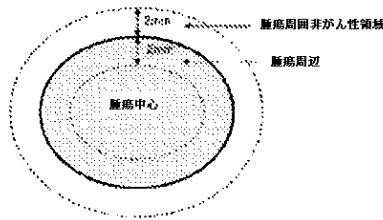
【0099】

用語「腫瘍内に」は、本明細書で使用される場合、腫瘍の中へを意味する。例えば、腫瘍内注射は、腫瘍に接触している任意の位置に治療薬を注射することを意味する。

【0100】

用語「腫瘍周囲に」または「腫瘍周囲の」は、本明細書で使用される場合、約2mm幅である領域であって、腫瘍周辺の浸潤先進部に隣接する領域である。腫瘍周囲領域は、宿主組織を含む。例えば、下記を参照されたい：

【化14】



10

【0101】

「投与すること」は、対象に医薬品または医薬組成物を提供することを意味し、これらに限定されないが、医療専門家が投与すること、および自己投与することを含む。

【0102】

本開示は、所与の核酸配列またはアミノ酸配列それぞれ（参照配列）に対してある特定の同一度を有する、核酸配列およびアミノ酸配列を記載する。

【0103】

2核酸配列間の「配列同一性」は、それらの配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。2アミノ酸配列間の「配列同一性」は、それらの配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。

20

【0104】

用語「%同一」、「%の同一性」または同様の用語は、特に、比較すべき配列間の最適アラインメントにおいて同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージを指すように意図されている。前記パーセンテージは、純粋に統計に基づくものであり、2配列間の差は、比較すべき配列の全長にわたってランダムに分布していることもあるが、必ずしもそうとは限らない。2配列の比較は、対応する配列の局所領域を同定するために、前記配列を最適アラインメント後にセグメントまたは「比較ウィンドウ」に関して比較することによって通常は行われる。比較のための最適アラインメントは、手動で行ってもよく、またはSmithおよびWaterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482頁による局所相同性アルゴリズムを用いて、NeddlemanおよびWunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443頁による局所相同性アルゴリズムを用いて、PearsonおよびLipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2444頁による類似性検索アルゴリズムを用いて、もしくは前記アルゴリズムのコンピュータプログラム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. における、GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA) を用いて、行ってもよい。

30

40

【0105】

同一性パーセンテージは、比較すべき配列が対応する同一の位置の数を判定すること、この数を比較した位置の数（例えば、参照配列中の位置の数）で割ること、およびこの結果に100を掛けることにより得られる。

【0106】

一部の実施形態では、参照配列の全長の少なくとも約50%、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%、または約100%である領域についての、同一度が得られる。例えば、参照核酸配列が200ヌクレオチドからなる場合、一部の実施形態では連続したヌクレオチドでの、少なくとも約100、少なくとも

50

も約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180、または約200ヌクレオチドについての、同一度が得られる。一部の実施形態では、参照配列の全長についての同一度が得られる。

【0107】

所与の核酸配列またはアミノ酸配列それぞれに対して特定の同一度を有する核酸配列またはアミノ酸配列は、前記所与の配列の少なくとも1つの機能的特性を有することができ、例えば、および場合によっては、前記所与の配列と機能的に等価である。1つの重要な特性としては、特に、対象に投与されたとき、サイトカインとして作用することができることが挙げられる。一部の実施形態では、所与の核酸配列またはアミノ酸配列に対して特定の同一度を有する核酸配列およびアミノ酸配列は、前記所与の配列と機能的に等価である。

10

【0108】

II. 組成物および医療用製剤

A. インターロイキン-2 (IL-2)

一部の実施形態では、組成物は、インターロイキン-2 (IL-2) (配列番号9) をコードするDNA配列を含む。一部の実施形態では、IL-2をコードするDNA配列は、配列番号10で提供される。

【0109】

一部の実施形態では、組成物は、IL-2をコードするコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、コドン最適化DNA配列は、配列番号11のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、DNA配列は、配列番号11に対して83%、84%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するコドン最適化DNA配列を含む。

20

【0110】

ネイティブIL-2に対するコドン最適化IL-2のアラインメントが下に示され、このアラインメント中の「Q」は、ネイティブIL-2 (NM_000586.3; 配列番号10) であり、「S」は、コドン最適化IL-2 (配列番号11) である。同一性パーセントは、82.79%である。

【0111】

30

40

50

【化 1 5】

Q: 1 ATGTGAGGATGCACTGCTGCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTTGTGCAAAACAGT 68
 S: 1 ATGTACAGAAATGCACTGCTGCTTGCCTTGTGCTTCTTCTTGTGCTTGTGCAAAATCT 68

Q: 61 GCACCTACTTCAAGTCTACAAAGAAACACAGCTTCAACTGGAGCATTACTGCTGGAT 120
 S: 61 GCTCCAGCATCTTCTTCAACAAAGAAACACAGCTTCAAGCTTGAACACCTTCTCTTGGAT 120

Q: 121 TTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATTAATTAAGAAATCCAACTCACCAGGATGCTC 180
 S: 121 CTTCAGATGATTTCTGAATGGAATCAACAATTACAAAATCCAAACTGACAAGGATGCTG 180

Q: 181 ACATTTAAGTTTACATGCTCAAGGAGGACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAA 240
 S: 181 ACATTTAAGTTTACATGCTCAAGGAGGACAGAACTGAAACACCTTCAAGTGTCTAGAA 240

Q: 241 GAAGAAGCTCAAGCTCTGAGGAGGAGTGTAAATTTAGCTCAAGGAGAAACCTTTCCTTA 300
 S: 241 GAAGAAGCTCAAGCTCTGAGGAGGAGTGTAAATTTAGCTCAAGGAGAAACCTTTCCTTG 300

Q: 301 AGAGCCAGGAGCTTAATCAGCAATATCAAGTAAATAGTTCTGGAAGTAAAGGATCTGAA 360
 S: 301 AGAGCCAGGAGCTTAATCAGCAATATCAAGTAAATAGTTCTGGAAGTAAAGGATCTGAA 360

Q: 361 ACAACATTCATGTTGTAATATCTGATGAGACAGCAACCTTGTAGATTTCTGAACAGA 420
 S: 361 ACAACATTCATGTTGTAATATCTGATGAGACAGCAACCTTGTAGATTTCTGAACAGA 420

Q: 421 TGGATTACCTTTTGTCAAGGATCATCTCAACACTGACT 459
 S: 421 TGGATCACATTTTGCAGTCAATCATTTCAACACTGACA 459

10

20

【0 1 1 2】

一部の実施形態では、組成物は、IL-2をコードするDNA配列から転写されたRNA配列を含む。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号10または11を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号12もしくは13を含むか、または配列番号12もしくは13からなる。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号12もしくは13に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するRNA配列を含むか、またはそのようなRNA配列からなる。

30

【0 1 1 3】

一部の実施形態では、IL-2 RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン(m¹ψ)または5-メチルウリジン(m⁵U)である。

【0 1 1 4】

一部の実施形態では、IL-2 RNAは、5'末端に改変ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IL-2 RNAは、5'キャップを含む。当技術分野において公知のいずれの5'キャップを使用してもよい。一部の実施形態では、5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、チオリン酸修飾を含む5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、2'-Oまたは3'-O-リボースメチル化ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、7-メチルグアニル酸を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、Cap0またはCap1である。例示的キャップ構造としては、m7G(5')ppp(5')G、m7,2'-O-mG(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')2'-O-mG、およびm7,3'-O-mG(5')ppp(5')2'-O-mAが挙げられる。

40

【0 1 1 5】

一部の実施形態では、IL-2 RNAは、5'非翻訳領域(UTR)を含む。一部の実施形態では、5'UTRは、開始コドンの上流にある。一部の実施形態では、5'UTRは

50

、RNAの翻訳を調節する。一部の実施形態では、5' UTRは、安定化配列である。一部の実施形態では、5' UTRは、RNAの半減期を延長する。当技術分野において公知のいずれの5' UTRを使用してもよい。一部の実施形態では、5' UTR RNA配列は、配列番号1、3または5を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、5' UTR RNA配列は、配列番号2、4もしくは6を含むか、または配列番号2、4もしくは6からなる。一部の実施形態では、5' UTR RNA配列は、配列番号2、4または6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0116】

一部の実施形態では、IL-2 RNAは、3' UTRを含む。一部の実施形態では、3' UTRは、翻訳終結コドンの後に続く。一部の実施形態では、3' UTRは、RNAのポリアデニル化、翻訳効率、局在または安定性を調節する。一部の実施形態では、3' UTR RNA配列は、配列番号7を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、3' UTR RNA配列は、配列番号8を含むか、または配列番号8からなる。一部の実施形態では、3' UTR RNA配列は、配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0117】

一部の実施形態では、IL-2組成物は、5' UTRと3' UTRの両方を含む。一部の実施形態では、組成物は、5' UTRのみを含む。一部の実施形態では、組成物は、3' UTRのみを含む。

【0118】

一部の実施形態では、IL-2 RNAは、ポリAテールを含む。一部の実施形態では、RNAは、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約50、少なくとも約70または少なくとも約100ヌクレオチドのポリAテールを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、200またはそれ以上のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、配列番号78を含むか、または配列番号78からなる。

【0119】

一部の実施形態では、RNAは、5' キャップ、5' UTR、IL-2をコードする核酸、3' UTR、およびポリAテールを、この順序で含む。

【0120】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むか、またはそのような核酸配列からなるDNA配列を含む。

【0121】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IL-2 RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0122】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75

%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0123】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。一部の実施形態では、IL-2 RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

10

【0124】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

20

【0125】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号10もしくは11と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。

30

【0126】

一部の実施形態では、IL-2 RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

40

【0127】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号12もしくは13と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号2、4もしくは6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、RNA配列を含む。一部の実施形態では、IL-2 RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン

50

(ψ)、N1-メチル-プソイドウリジン ($m^1\psi$) または 5-メチル-ウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNA は、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチル-プソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0128】

B. インターロイキン-12 単鎖 (IL-12 sc)

一部の実施形態では、組成物は、IL-12 p40 (IL-12 B と呼ばれることもある) と、GS リンカーのようなリンカーと、IL-12 p35 (IL-12 A と呼ばれることもある) とを含む、インターロイキン-12 単鎖 (IL-12 sc) (例えば、配列番号 14) をコードする DNA 配列を含む。一部の実施形態では、IL-12 p40、リンカー、および IL-12 p35 は連続しており、介在ヌクレオチドを有さない。IL-12 sc をコードする例示的 DNA 配列は、配列番号 15 で提供される。

10

【0129】

ネイティブ IL-12 p40 に対するコドン最適化 IL-12 p40 のアラインメントが下に示され、このアラインメント中の「S」は、ネイティブ IL-12 p40 (NM_002187.2; 配列番号 15 のヌクレオチド 1~984) であり、「Q」は、コドン最適化 IL-12 p40 (配列番号 16 のヌクレオチド 1~984) である。同一性パーセントは、77% である。

【0130】

20

30

40

50

10

20

30

40

【0131】

ネイティブIL-12 p35に対するコドン最適化IL-12 p35のアラインメントが下に示され、このアラインメント中の「S」は、ネイティブIL-12 p35 (NM_00882.3; 配列番号15のヌクレオチド1027~1623) であり、「Q」は、コドン最適化IL-12 p35 (配列番号16のヌクレオチド1027~1623) である。同一性パーセントは、80%である。

【0132】

【化18】

```

Q:      1 AGAAATCTCCCTGTGGCTACACCTGATCCAGGCATGTTTCCCTGTTTGCACCATAGCCAA 60
      ||||| ||||| ||||| || || || ||||| ||||| || || || ||||| |||||
S:      1 AGAAACCTCCCTGTGGCTACCTCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCTTCACTACTCCCAA 60

Q:      61 AACCTCCTGAGAGCAGTCAGCAACATGCTCCAGAAAGCTAGACAAACACTGGAATTTCTAC 120
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      61 AACCTGCTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTCCAGAAAGCCAGACAAACTCTAGAAATTTTAC 120

Q:      121 CCATGCACCTCCGAGGAAATAGATCAGGAGATATCACTAAGGACAAAACAGGACTGTC 180
      || ||||| || || || ||||| || ||||| || || ||||| ||||| |||||
S:      121 CCTTGCACTTCTGAGAGATTGATCATGAGATATCACAAAGATAAAACAGCAGAGTG 180

Q:      181 GAAGCATGCCCTTCCCTTGGAACTGACAAAGAACGAGAGTTGCCCTTAATTCAGAGAAACA 240
      || || || || || || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      181 GAGGCCCTGTTTACCATTTGAATTAACCAAGAAATGAGAGTTGCCCTAATTCAGAGAGACC 240

Q:      241 TCTTTCATTACAAACGGTAGCTGCTTGGCAAGCAGAAACATCTTTTATGATGCCCTT 300
      ||||| ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      241 TCTTTCATACTAATGGAGTTGCCCTGCCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGCCCTG 300

Q:      301 TGTCTGAGCAGTATTTATGAGGATCTCAAAATGTACCAGGTGAGTTTAAGACCATGAAT 360
      || || || ||||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      301 TGCCCTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGAGTTCAGACCATGAAT 360

Q:      361 GCCAAGCTGCTGATGGACCCAAAGAGACAGATTTTCTCGATCAGAAATATGCTGGCTGTG 420
      || ||||| ||||| || ||||| ||||| || || ||||| ||||| |||||
S:      361 GCAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCAGATCAAAACATGCTGGCAGTT 420

Q:      421 ATTGATGAAGTGTGACAGCCCTTGAATTTCAACAGCGAAACCGTTCCCCAGAAAGCAGT 480
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      421 ATTGATGAGTGTGACAGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCC 480

Q:      481 CTGAGAGAACCTGACTTTTATAAGAACAGATCAAACTGTGTATTCTCCTGATGCTTT 540
      ||||| ||||| || ||||| || || ||||| || || ||||| || || ||||| ||
S:      481 CTGAGAGAACCGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTT 540

Q:      541 AGAATCAGAGCAGTCACTATAGATAGAGTGATGTCTACCTGAATGCTTCC 591
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      541 AGAATCGGSCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCC 591

```

【0133】

一部の実施形態では、組成物は、IL-12 sc をコードするコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、組成物は、IL-12 p40 をコードするコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、組成物は、IL-12 p35 をコードするコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、コドン最適化DNA配列は、配列番号16を含むか、または配列番号16からなる。一部の実施形態では、DNA配列は、配列番号16に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、IL-12 p40 をコードするコドン最適化DNA配列は、IL-12 sc-p40 (配列番号16のヌクレオチド1~984) をコードするヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IL-12 p35 をコードするコドン最適化DNA配列は、IL-12 sc-p35 (配列番号16のヌクレオチド1027~1623) をコードするヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IL-12 sc をコードするコドン最適化DNA配

列は、配列番号 16 の IL-12sc-p40 部分（配列番号 16 のヌクレオチド 1～984）および IL-12sc-p35 部分（配列番号 16 のヌクレオチド 1027～1623）をコードするヌクレオチドを含み、さらに、p40 部分と p35 部分を接続するリンカーポリペプチドをコードするヌクレオチド（例えば、配列番号 16 のヌクレオチド 985～1026）を p40 部分と p35 部分の間に含む。当業者に公知のいずれのリンカーを使用してもよい。p40 部分は、p35 部分の 5' 側にあってもよく、または 3' 側にあってもよい。

【0134】

一部の実施形態では、組成物は、RNA 配列を含み、該 RNA 配列は、例えば、IL-12sc をコードする DNA 配列から転写される。RNA は、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、RNA 配列は、配列番号 15 または 16 を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、RNA 配列は、配列番号 17 もしくは 18 を含むか、または配列番号 17 もしくは 18 からなる。一部の実施形態では、RNA 配列は、配列番号 17 もしくは 18 に対して 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する RNA 配列を含むか、またはそのような RNA 配列からなる。一部の実施形態では、RNA 配列は、配列番号 17 または 18 の IL-12sc-p40 部分（配列番号 17 または 18 のヌクレオチド 1～984）および IL-12sc-p35 部分（配列番号 17 または 18 のヌクレオチド 1027～1623）をコードするヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IL-12sc をコードするコドン最適化 RNA 配列は、配列番号 18 の IL-12sc-p40 部分（配列番号 18 のヌクレオチド 1～984）および IL-12sc-p35 部分（配列番号 18 のヌクレオチド 1027～1623）をコードするヌクレオチドを含み、さらに、p40 部分と p35 部分を接続するリンカーポリペプチドをコードするヌクレオチドを p40 部分と p35 部分の間に含む。当業者に公知のいずれのリンカーを使用してもよい。

【0135】

一部の実施形態では、IL-12sc RNA 中の 1 つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または 5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNA は、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0136】

一部の実施形態では、IL-12sc RNA は、5' 末端に改変ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、RNA は、5' キャップを含む。当技術分野において公知のいずれの 5' キャップを使用してもよい。一部の実施形態では、5' キャップは、5'-5' トリリン酸結合を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、チオリン酸修飾を含む 5'-5' トリリン酸結合を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、2'-O または 3'-O-リボースメチル化ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5' キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5' キャップは、7-メチルグアニル酸を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、Cap0 または Cap1 である。例示的キャップ構造としては、m7G (5') ppp (5') G、m7, 2'-O-mG (5') ppp (5') G、m7G (5') ppp (5') 2'-O-mG、および m7, 3'-O-mG (5') ppp (5') 2'-O-mA が挙げられる。

【0137】

一部の実施形態では、IL-12sc RNA は、5' 非翻訳領域 (UTR) を含む。一部の実施形態では、5' UTR は、開始コドンの上流にある。一部の実施形態では、5' UTR は、RNA の翻訳を調節する。一部の実施形態では、5' UTR は、安定化配列である。一部の実施形態では、5' UTR は、RNA の半減期を延長する。当技術分野において公知のいずれの 5' UTR を使用してもよい。一部の実施形態では、5' UTR RNA 配列は

、配列番号 1、3 または 5 から転写される。一部の実施形態では、5' UTR RNA 配列は、配列番号 2、4 もしくは 6 を含むか、または配列番号 2、4 もしくは 6 からなる。一部の実施形態では、5' UTR RNA 配列は、配列番号 2、4 または 6 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 同一である。

【0138】

一部の実施形態では、IL-12sc RNA は、3' UTR を含む。一部の実施形態では、3' UTR は、翻訳終結コドンの後に続く。一部の実施形態では、3' UTR は、RNA のポリアダニル化、翻訳効率、局在または安定性を調節する。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 7 から転写される。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 8 を含むか、または配列番号 8 からなる。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 8 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 同一である。

【0139】

一部の実施形態では、IL-12sc 組成物は、5' UTR と 3' UTR の両方を含む。一部の実施形態では、IL-12sc 組成物は、5' UTR のみを含む。一部の実施形態では、IL-12sc 組成物は、3' UTR のみを含む。

【0140】

一部の実施形態では、IL-12sc RNA は、ポリ A テールを含む。一部の実施形態では、RNA は、少なくとも約 25、少なくとも約 30、少なくとも約 50 ヌクレオチド、少なくとも約 70 ヌクレオチド、または少なくとも約 100 ヌクレオチドのポリ A テールを含む。一部の実施形態では、ポリ A テールは、200 またはそれ以上のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリ A テールは、配列番号 78 を含むか、または配列番号 78 からなる。

【0141】

一部の実施形態では、RNA は、5' キャップ、5' UTR、IL-12sc をコードする核酸、3' UTR、およびポリ A テールを、この順序で含む。

【0142】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号 15 もしくは 16 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % 同一であり、かつ配列番号 1、3 もしくは 5 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % 同一である核酸配列を含むか、またはそのような核酸配列からなる DNA 配列を含む。

【0143】

一部の実施形態では、組成物は、RNA 配列を含み、該 RNA 配列は、例えば、配列番号 15 もしくは 16 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % 同一であり、かつ配列番号 1、3 もしくは 5 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % 同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる DNA 配列から転写される。RNA は、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IL-12sc RNA 中の 1 つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または 5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNA は、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0144】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号 15 もしくは 16 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % 同一であり、かつ配列番号 7 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %

、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0145】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号15もしくは16と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IL-12sc RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

10

【0146】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号15もしくは16と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

20

【0147】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号15もしくは16と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IL-12sc RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

30

【0148】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号17もしくは18と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；配列番号2、4もしくは6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；かつ配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、RNA配列を含む。一部の実施形態では、IL-12sc RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。

40

50

【0149】

C. インターフェロンアルファ (IFN α)

一部の実施形態では、組成物は、インターフェロンアルファ (IFN α) (例えば配列番号19) をコードするDNA配列を含む。IFN α をコードする例示的DNA配列は、配列番号20で提供される。

【0150】

ネイティブIFN α に対するコドン最適化IFN α のアラインメントが下に示され、このアラインメント中の「S」は、ネイティブIFN α (NM_000605.3; 配列番号20) であり、「Q」は、コドン最適化IFN α (配列番号21) である。同一性パーセントは、79%である。

【0151】

【化19】

```

Q:      1 ATGGCCCTGACCTTTTGCCTTCCTGCTGCTTTGTTGGTGTGAGTTGCAAACTCTTCCTGT 60
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      1 ATGGCCCTGACCTTTTGTCTTACTGGTGGCCCTCTGCTGTCTGAGCTGCAAGTCAAGCTGC 60

Q:      61 AGTGTGGGATGTGATCTGCTGCAAAACCCACAGTCTGGG-ATCTAGGAGAACACTGATGCT 119
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      61 TCTGTGGGCTGTGATCTGCTGCAAAACCCACAGCTGGGTAGC-AGGAGGACCTTGATGCT 119

Q:      120 GTTGGCACAGATGAGGAGAAT-TAGC-CTCTTTTCTGCTGCTGAGGATAGACATGACTTC 177
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      120 CCTGGCACAGATGAGGAGAATCT---CTCTTTTCTGCTGCTGAGGACAGACATGACTTC 177

Q:      178 GGTCTTCCCAAGAGGAGTGTGGCAATCAGTTCCAGAAAGCGGAAACGATTCCTGTCG 237
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      178 GGATTTCCCAAGAGGAGTGTGGCAATCAGTTCCAGAAAGGCTGAAACCATCTCTGTCCTC 237

Q:      238 CACGAGATGATCAGCAGATCTTCAACCTCTTTTCAAC-CAAG-ACAGCTCAGCAGCT 295
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      238 CATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTT--CAGCAGAAAGGACTCATCTGCTGCTT 295

Q:      296 GGGATGAGACACTGCTGGGACAAATCTACACAGAACTGTATCAGCAGCTTAACGATCTGG 355
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      296 GGGATGAGACCTCTCTAGACAAATCTACACTGAACCTTACCAAGCAGCTGAATGACTGG 355

Q:      356 AAGCATGCTGATCCAAGGGGTTGGTGTGACTGAAACTCCGCTTATGAAAGGAGGACTCCA 415
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      356 AAGCTGTGTGATACAGGGGTTGGGTGTGACTGAAAGCTCCCTGATGAAAGGAGGACTCCA 415

Q:      416 TTCTGGCTGTACGGAAGTACTTCCAGAGAATAACCTCTATCTGAAGGAGAGAAAGTACT 475
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      416 TTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACA 475

Q:      476 CACCATGTGCTTGGGAGTCTGTGAGAGCCGAAATCATGAGATCCTTCAGCCTTAG-CACC 534
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      476 GCCCTGTGCTTGGGAGTCTGTGAGAGCAGAAATCATGAGATC-TTTTTC-TTGTCAAC 534

Q:      535 AATC-TCCAGGAATCTCTGAGAAAGCAAGAG 564
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
S:      534 AAACITGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAA 564

```

【0152】

一部の実施形態では、組成物は、IFN α をコードするコドン最適化DNA配列を含む。一部の実施形態では、コドン最適化DNA配列は、配列番号21のヌクレオチドを含むか、またはそのようなヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、DNA配列は、配列番号21に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するコドン最適化DNA配列を含むか、またはそのようなコドン最適化DNA配列からなる。

【0153】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、IFN α をコードするDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもあ

る。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号20または21を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号22もしくは23を含むか、または配列番号22もしくは23からなる。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号22もしくは23に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するRNA配列を含むか、またはそのようなRNA配列からなる。

【0154】

一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。一部の実施形態では、RNA中の各ウリジンは、修飾されている。一部の実施形態では、RNA中の各ウリジンは、N1-メチルプソイドウリジン($M^1\psi$)で修飾されている。

【0155】

一部の実施形態では、IFN α RNAは、5'末端に改変ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IFN α RNAは、5'キャップを含む。当技術分野において公知のいずれの5'キャップを使用してもよい。一部の実施形態では、5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、チオリン酸修飾を含む5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、2'-Oまたは3'-O-リボースメチル化ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、7-メチルグアニル酸を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、Cap0またはCap1である。例示的キャップ構造としては、m7G(5')ppp(5')G、m7,2'-O-mG(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')2'-O-mG、およびm7,3'-O-mG(5')ppp(5')2'-O-mAが挙げられる。

【0156】

一部の実施形態では、IFN α RNAは、5'非翻訳領域(UTR)を含む。一部の実施形態では、5'UTRは、開始コドンの上流にある。一部の実施形態では、5'UTRは、RNAの翻訳を調節する。一部の実施形態では、5'UTRは、安定化配列である。一部の実施形態では、5'UTRは、RNAの半減期を延長する。当技術分野において公知のいずれの5'UTRを使用してもよい。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号1、3または5を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号2、4もしくは6を含むか、または配列番号2、4もしくは6からなる。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号2、4または6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0157】

一部の実施形態では、IFN α RNAは、3'UTRを含む。一部の実施形態では、3'UTRは、翻訳終結コドンの後に続く。一部の実施形態では、3'UTRは、RNAのポリアデニル化、翻訳効率、局在または安定性を調節する。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号7を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号8を含むか、または配列番号8からなる。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0158】

一部の実施形態では、IFN α 組成物は、5'UTRと3'UTRの両方を含む。一部の実施形態では、組成物は、5'UTRのみを含む。一部の実施形態では、組成物は、3'UTRのみを含む。

【0159】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、IFN α RNAは、ポリAテールを含む。一部の実施形態では、IFN α RNAは、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約70ヌクレオチド、または少なくとも約100ヌクレオチドのポリAテールを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、200またはそれ以上のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、配列番号78を含むか、または配列番号78からなる。

【0160】

一部の実施形態では、RNAは、5'キャップ、5'UTR、IFN α をコードする核酸、3'UTR、およびポリAテールを、この順序で含む。

【0161】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号20もしくは21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むか、またはそのような核酸配列からなるDNA配列を含む。

【0162】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号20もしくは21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)である。

【0163】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号20もしくは21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0164】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号20もしくは21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)である。

【0165】

一部の実施形態では、組成物は、配列番号20もしくは21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、8

10

20

30

40

50

5 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0166】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号20もしくは21と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一であり、配列番号1、3もしくは5と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。一部の実施形態では、組成物は、配列番号22もしくは23と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一であり、配列番号2、4もしくは6と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一であり、かつ配列番号8と少なくとも70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %もしくは100 %同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、RNA配列を含む。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。

【0167】

D. IL-15 sushi

本明細書で使用される場合、用語「IL-15 sushi」は、可溶性インターロイキン15 (IL-15) 受容体アルファsushiドメインと成熟インターロイキンアルファ (IL-15) とを融合タンパク質として含む構築物を表す。一部の実施形態では、組成物は、可溶性IL-15受容体アルファ鎖 (sushi)、続いてグリシン-セリン (GS) リンカー、続いてIL-15の成熟配列を含む、IL-15 sushi (配列番号24) をコードするDNA配列を含む。IL-15 sushiをコードするDNA配列は、配列番号25で提供される。

【0168】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、IL-15 sushiをコードするDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号25を含むヌクレオチド配列から転写される。一部の実施形態では、リンカーをコードするヌクレオチドは、完全に非存在であることもあり、または適切なリンカーをコードする任意のヌクレオチドで一部がもしくは全体が置換されていることもある。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号26を含むか、または配列番号26からなる。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号26に対して70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %の同一性を有するRNA配列を含む。一部の実施形態では、IL-15 sushiをコードするDNAまたはRNA配列は、IL-15受容体アルファのsushiドメインをコードするヌクレオチド (例えば、配列番号25または26

のヌクレオチド1～321)、および成熟IL-15をコードするヌクレオチド(例えば、配列番号25または26のヌクレオチド382～729)を含む。一部の実施形態では、IL-15 sushiをコードするDNAまたはRNA配列は、IL-15受容体アルファのsushiドメインをコードするヌクレオチド(例えば、配列番号25または26のヌクレオチド1～321)、および成熟IL-15をコードするヌクレオチド(例えば、配列番号25または26のヌクレオチド382～729)を含み、さらに、これらの部分の間に、これらの部分を接続するリンカーポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号25または26のヌクレオチド322～381を含む。当業者に公知の任意のリンカーを使用することができる。

【0169】

一部の実施形態では、IL-15 sushi RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)である。

【0170】

一部の実施形態では、IL-15 sushi RNAは、5'末端に改変ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、IL-15 sushi RNAは、5'キャップを含む。当技術分野において公知のいずれの5'キャップを使用してもよい。一部の実施形態では、5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、チオリン酸修飾を含む5'-5'三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、2'-Oまたは3'-O-リボースメチル化ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5'キャップは、7-メチルグアニル酸を含む。一部の実施形態では、5'キャップは、Cap0またはCap1である。例示的キャップ構造としては、 $m^7G(5')ppp(5')G$ 、 $m^7, 2'O-mG(5')sp(5')G$ 、 $m^7G(5')ppp(5')2'O-mG$ 、および $m^7, 3'O-mG(5')ppp(5')2'O-mA$ が挙げられる。

【0171】

一部の実施形態では、IL-15 sushi RNAは、5'非翻訳領域(UTR)を含む。一部の実施形態では、5'UTRは、開始コドンの上流にある。一部の実施形態では、5'UTRは、RNAの翻訳を調節する。一部の実施形態では、5'UTRは、安定化配列である。一部の実施形態では、5'UTRは、RNAの半減期を延長する。当技術分野において公知のいずれの5'UTRを使用してもよい。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号1、3または5から転写される。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号2、4もしくは6を含むか、または配列番号2、4もしくは6からなる。一部の実施形態では、5'UTR RNA配列は、配列番号2、4または6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0172】

一部の実施形態では、IL-15 sushi RNAは、3'UTRを含む。一部の実施形態では、3'UTRは、翻訳終結コドンの後に続く。一部の実施形態では、3'UTRは、RNAのポリアデニル化、翻訳効率、局在または安定性を調節する。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号7から転写される。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号8を含むか、または配列番号8からなる。一部の実施形態では、3'UTR RNA配列は、配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0173】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、5'UTRと3'UTRの両方を

含む。一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、5' UTRのみを含む。一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、3' UTRのみを含む。

【0174】

一部の実施形態では、IL-15 sushi RNAは、ポリAテールを含む。一部の実施形態では、RNAは、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約70ヌクレオチド、または少なくとも約100ヌクレオチドのポリAテールを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、200またはそれ以上のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリAテールは、配列番号78を含むか、または配列番号78からなる。

【0175】

一部の実施形態では、RNAは、5' キャップ、5' UTR、IL-15 sushi をコードする核酸、3' UTR、およびポリAテールを、この順序で含む。

【0176】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むか、またはそのような核酸配列からなるDNA配列を含む。

【0177】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNAから転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0178】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0179】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

10

20

30

40

50

【0180】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0181】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号25と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNAから転写される。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

【0182】

一部の実施形態では、IL-15 sushi 組成物は、配列番号26と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号2、4もしくは6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；かつ配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、RNA配列を含む。一部の実施形態では、IFN α RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。

【0183】

E. 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)

一部の実施形態では、組成物は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (例えば配列番号27) をコードするDNA配列を含む。一部の実施形態では、GM-CSFをコードするDNA配列は、配列番号28で提供される。

【0184】

一部の実施形態では、GM-CSF 組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、GM-CSFをコードするDNA配列から転写される。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号28から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号29を含むか、または配列番号29からなる。一部の実施形態では、RNA配列は、配列番号29に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するRNA配列を含む。

【0185】

一部の実施形態では、GM-CSF RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジン

10

20

30

40

50

を置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または 5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNA は、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。一部の実施形態では、GM-CSF RNA は、5' 末端に改変ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、RNA は、5' キャップを含む。当技術分野において公知のいずれの 5' キャップを使用してもよい。一部の実施形態では、5' キャップは、5' - 5' 三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、チオリン酸修飾を含む 5' - 5' 三リン酸結合を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、2' - O または 3' - O-リボースメチル化ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5' キャップは、修飾グアノシンヌクレオチドまたは修飾アデノシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5' キャップは、7-メチルグアニル酸を含む。一部の実施形態では、5' キャップは、Cap 0 または Cap 1 である。例示的キャップ構造としては、 $m^7G(5')ppp(5')G$ 、 $m^7, 2'O-mG(5')sp(5')G$ 、 $m^7G(5')ppp(5')2'O-mG$ 、および $m^7, 3'O-mG(5')ppp(5')2'O-mA$ が挙げられる。

【0186】

一部の実施形態では、GM-CSF RNA は、5' 非翻訳領域 (UTR) を含む。一部の実施形態では、5' UTR は、開始コドンの上流にある。一部の実施形態では、5' UTR は、RNA の翻訳を調節する。一部の実施形態では、5' UTR は、安定化配列である。一部の実施形態では、5' UTR は、RNA の半減期を延長する。当技術分野において公知のいずれの 5' UTR を使用してもよい。一部の実施形態では、5' UTR RNA 配列は、配列番号 1、3 または 5 から転写される。一部の実施形態では、5' UTR

RNA 配列は、配列番号 2、4 もしくは 6 を含むか、または配列番号 2、4 もしくは 6 からなる。一部の実施形態では、5' UTR RNA 配列は、配列番号 2、4 または 6 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。

【0187】

一部の実施形態では、GM-CSF RNA は、3' UTR を含む。一部の実施形態では、3' UTR は、翻訳終結コドンの後に続く。一部の実施形態では、3' UTR は、RNA のポリアデニル化、翻訳効率、局在または安定性を調節する。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 7 から転写される。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 8 を含むか、または配列番号 8 からなる。一部の実施形態では、3' UTR RNA 配列は、配列番号 8 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。

【0188】

一部の実施形態では、GM-CSF 組成物は、5' UTR と 3' UTR の両方を含む。一部の実施形態では、組成物は、5' UTR のみを含む。一部の実施形態では、組成物は、3' UTR のみを含む。

【0189】

一部の実施形態では、GM-CSF RNA は、ポリ A テールを含む。一部の実施形態では、RNA は、少なくとも約 25、少なくとも約 30、少なくとも約 50 ヌクレオチド、少なくとも約 70 ヌクレオチド、または少なくとも約 100 ヌクレオチドのポリ A テールを含む。一部の実施形態では、ポリ A テールは、200 またはそれ以上のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリ A テールは、配列番号 78 を含むか、または配列番号 78 からなる。

【0190】

一部の実施形態では、GM-CSF RNA は、5' キャップ、5' UTR、GM-CSF をコードするヌクレオチド、3' UTR、およびポリ A テールを、この順序で含む。

【0191】

一部の実施形態では、GM-CSF 組成物は、配列番号 28 と少なくとも 70%、75

%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むか、またはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

【0192】

一部の実施形態では、GM-CSF組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、GM-CSF RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

10

【0193】

一部の実施形態では、GM-CSF組成物は、配列番号28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

20

【0194】

一部の実施形態では、GM-CSF組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり、かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、GM-CSF RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) または5-メチルウリジン (m^5U) である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) である。

30

【0195】

一部の実施形態では、GM-CSF組成物は、配列番号28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、DNA配列を含む。

40

【0196】

一部の実施形態では、組成物は、RNA配列を含み、該RNA配列は、例えば、配列番号28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号1、3もしくは5と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；かつ配列番号7と少なくとも70%、75%、80%、8

50

5%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなるDNA配列から転写される。RNAは、組換えにより産生されることもある。一部の実施形態では、GM-CSF RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。一部の実施形態では、RNAは、各ウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)である。

【0197】

一部の実施形態では、GM-CSF組成物は、配列番号29と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であり；配列番号2、4もしくは6と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一であり；かつ配列番号8と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である核酸配列を含むかまたはそのような核酸配列からなる、RNA配列を含む。一部の実施形態では、GM-CSF RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。

【0198】

F. 修飾形態

本明細書に記載されるRNAおよび組成物の各々を、当業者に公知のいずれの方法で修飾してもよい。一部の実施形態では、修飾形態は、本明細書に記載の通り修飾された「Mod A」または「Mod B」である。

【0199】

一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、修飾ウリジンである。

【0200】

一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ウリジンは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン($m^1\psi$)または5-メチルウリジン(m^5U)である。

【0201】

一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のシトシン、アデニンまたはグアニンは、修飾核酸塩基により置換されている。一実施形態では、シトシンを置換する修飾核酸塩基は、5-メチルシトシン(m^5C)である。別の実施形態では、アデニンを置換する修飾核酸塩基は、N⁶-メチルアデニン(m^6A)である。別の実施形態では、分子の免疫原性を低下させるための、当該技術分野において公知の、いずれの他の修飾核酸塩基を使用してもよい。

【0202】

RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、3-メチルウリジン(m^3U)、5-メトキシウリジン(mo^5U)、5-アザウリジン、6-アザウリジン、2-チオ-5-アザウリジン、2-チオウリジン(s^2U)、4-チオウリジン(s^4U)、4-チオプソイドウリジン、2-チオプソイドウリジン、5-ヒドロキシウリジン(ho^5U)、5-アミノアリルウリジン、5-ハローウリジン(例えば、5-ヨードウリジンもしくは5-ブロモウリジン)、ウリジン5-オキシ酢酸(cmo^5U)、ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル($mcmo^5U$)、5-カルボキシメチルウリジン(cm^5U)、1-カルボキシメチルプソイドウリジン、5-カルボキシヒドロキシメチルウリジン(chm^5U)、5-カルボキシヒド

ロキシメチル-ウリジンメチルエステル ($mchm^5U$)、5-メトキシカルボニルメチル-ウリジン (mcm^5U)、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオ-ウリジン (mcm^5s^2U)、5-アミノメチル-2-チオ-ウリジン (nm^5s^2U)、5-メチルアミノメチル-ウリジン (mnm^5U)、1-エチル-プソイドウリジン、5-メチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン (mnm^5s^2U)、5-メチルアミノメチル-2-セレノ-ウリジン (mnm^5se^2U)、5-カルバモイルメチル-ウリジン (ncm^5U)、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウリジン ($cmnm^5U$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン ($cmnm^5s^2U$)、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-プソイドウリジン、5-タウリノメチル-ウリジン (τm^5U)、1-タウリノメチル-プソイドウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン (τm^5s^2U)、1-タウリノメチル-4-チオ-プソイドウリジン)、5-メチル-2-チオ-ウリジン (m^5s^2U)、1-メチル-4-チオ-プソイドウリジン ($m^1s^4\psi$)、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、3-メチル-プソイドウリジン ($m^3\psi$)、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、ジヒドロウリジン (D)、ジヒドロプソイドウリジン、5, 6-ジヒドロウリジン、5-メチル-ジヒドロウリジン (m^5D)、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-メトキシ-ウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、N1-メチル-プソイドウリジン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン (acp^3U)、1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)プソイドウリジン ($acp^3\psi$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)ウリジン (inm^5U)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオ-ウリジン (inm^5s^2U)、 α -チオ-ウリジン、2'-O-メチル-ウリジン (Um)、5, 2'-O-ジメチル-ウリジン (n^5Um)、2'-O-メチル-プソイドウリジン (ψm)、2-チオ-2'-O-メチル-ウリジン (s^2Um)、5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチル-ウリジン (mcn^5Um)、5-カルバモイルメチル-2'-O-メチル-ウリジン (ncn^5Um)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチル-ウリジン (cmn^5Um)、3, 2'-O-ジメチル-ウリジン (n^3Um)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチル-ウリジン (in^5Um)、1-チオ-ウリジン、デオキシチミジン、2'-F-アラ-ウリジン、2'-F-ウリジン、2'-OH-アラ-ウリジン、5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン、5-[3-(1-E-プロペニルアミノ)ウリジンまたは当技術分野において公知の任意の他の修飾ウリジンのいずれか1つまたはそれ以上であってもよい。

【0203】

G. 組合せ組成物

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の1つより多くのRNAを含む組成物を含む。一部の実施形態では、組成物は、2つのRNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、3つのRNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、4つのRNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、5つのRNAを含む。一部の実施形態では、IL-2、IL12sc、IL-15 sush i、GM-CSFまたはIFN α をコードするRNAのいずれかまたはすべては、例えば、本明細書に記載のこれらのRNAを含む組成物および製剤のいずれにおいても、IL-2、IL12sc、IL-15 sush i、GM-CSFおよび／またはIFN α ポリペプチドによって置換されていてもよい。

【0204】

一部の実施形態では、IL-2、IL12sc、IL-15 sush i、GM-CSFおよび／またはIFN α をコードする修飾または非修飾RNAは、例えば、本明細書に記載されるこれらのRNAを含む組成物および製剤のいずれにおいても、IL-2、IL12sc、IL15 sush i、GM-CSFおよびIFN α ポリペプチドから選択される2つまたはそれ以上のポリペプチドをコードする修飾または非修飾多シストロン性RNAによって置換されていてもよい。

【0205】

いずれの組合せ組成物も、賦形剤または希釈剤をさらに含むことがある。賦形剤または希釈剤は、対象への投与のために薬学的に許容されるものである。

【0206】

一部の実施形態では、組合せ組成物は、同じ修飾を有するRNAを含む。一部の実施形態では、組合せ組成物は、異なる修飾を有するRNAを含む。一部の実施形態では、組合せ組成物は、ModA修飾を有するRNAを含む。一部の実施形態では、組合せ組成物は、ModB修飾を有するRNAを含む。一部の実施形態では、組合せ組成物は、ModAおよびModB修飾を有するRNAを含む。

【0207】

一部の実施形態では、IL-2をコードするDNAまたはRNAと、IL-12sc、IFN α 、IL-15 sush iおよびGM-CSFをコードするDNAまたはRNAの1つまたはそれ以上とを含む組成物が、包含される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の、IL-2をコードするDNAもしくはRNAまたはコドン最適化IL-2をコードするDNAもしくはRNA（配列番号10～13）と、IL-12scをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-12scをコードするDNAもしくはRNA（配列番号15～18）、IFN α をコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IFN α をコードするDNAもしくはRNA（配列番号20～23）、IL-15 sush iをコードするDNAまたはRNA（配列番号25～26）およびGM-CSFをコードするDNAまたはRNA（配列番号28～29）の1つまたはそれ以上とを含む。一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ ψ ）、N1-メチルプソイドウリジン（ $m^1\psi$ ）または5-メチルウリジン（ m^5U ）である。一部の実施形態では、組成物中のRNAの1つまたはそれ以上は、本明細書中の組成物セクションに記載の5'キャップ、5'UTR、3'UTRおよびポリAテールをさらに含む。

【0208】

一部の実施形態では、IL-12scをコードするDNAまたはRNAと、IL-2、IFN α 、IL-15 sush iおよびGM-CSFをコードするDNAまたはRNAの1つまたはそれ以上とを含む組成物が、包含される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の、IL-12scをコードするDNAもしくはRNAまたはコドン最適化IL-12scをコードするDNAもしくはRNA（配列番号15～18）と、IL-2をコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-2をコードするDNAもしくはRNA（配列番号10～13）、IFN α をコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IFN α をコードするDNAもしくはRNA（配列番号20～23）、IL-15 sush iをコードするDNAまたはRNA（配列番号25～26）およびGM-CSFをコードするDNAまたはRNA（配列番号28～29）の1つまたはそれ以上とを含む。一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ ψ ）、N1-メチルプソイドウリジン（ $m^1\psi$ ）または5-メチルウリジン（ m^5U ）である。

【0209】

一部の実施形態では、組成物中のRNAの1つまたはそれ以上は、本明細書中の組成物セクションに記載の5'キャップ、5'UTR、3'UTRおよびポリAテールをさらに含む。

【0210】

一部の実施形態では、IFN α をコードするDNAまたはRNAと、IL-2、IL-12sc、IL-15 sush iおよびGM-CSFをコードするDNAまたはRNAの1つまたはそれ以上とを含む組成物が、包含される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の、IFN α をコードするDNAもしくはRNAまたはコドン最適化IFN α をコードするDNAもしくはRNA（配列番号20～23）と、IL-12scをコ

ードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-12scをコードするDNAもしくはRNA（配列番号15～18）、IL-2αをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-2をコードするDNAもしくはRNA（配列番号10～13）、IL-15 sush iをコードするDNAまたはRNA（配列番号25～26）およびGM-CSFをコードするDNAまたはRNA（配列番号28～29）の1つまたはそれ以上を含む。一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ψ）、N1-メチルプソイドウリジン（m¹ψ）または5-メチルウリジン（m⁵U）である。一部の実施形態では、組成物中のRNAの1つまたはそれ以上は、本明細書中の組成物セクションに記載の5'キャップ、5'UTR、3'UTRおよびポリAテールをさらに含む。

10

【0211】

一部の実施形態では、IL-15 sush iをコードするDNAまたはRNAと、IL-2、IL-12sc、IFNαおよびGM-CSFをコードするDNAまたはRNAの1つまたはそれ以上を含む組成物が、包含される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の、IL-15 sush iをコードするDNAまたはRNA（配列番号25～26）と、IL-12scをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-12scをコードするDNAもしくはRNA（配列番号15～18）、IFNαをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IFNαをコードするDNAもしくはRNA（配列番号20～23）、IL-2をコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-2をコードするDNAもしくはRNA（配列番号10～13）およびGM-CSFをコードするDNAまたはRNA（配列番号28～29）の1つまたはそれ以上を含む。一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ψ）、N1-メチルプソイドウリジン（m¹ψ）または5-メチルウリジン（m⁵U）である。一部の実施形態では、組成物中のRNAの1つまたはそれ以上は、本明細書中の組成物セクションに記載の5'キャップ、5'UTR、3'UTRおよびポリAテールをさらに含む。

20

【0212】

一部の実施形態では、GM-CSFをコードするDNAまたはRNAと、IL-2、IL-12sc、IFNαおよびIL-15 sush iをコードするDNAまたはRNAの1つまたはそれ以上を含む組成物が、包含される。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の、GM-CSFをコードするDNAまたはRNA（配列番号28～29）と、IL-12scをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-12scをコードするDNAもしくはRNA（配列番号15～18）、IFNαをコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IFNαをコードするDNAもしくはRNA（配列番号20～23）、IL-2をコードするDNAもしくはRNAまたは最適化IL-2をコードするDNAもしくはRNA（配列番号10～13）およびIL-15 sush iをコードするDNAまたはRNA（配列番号25～26）の1つまたはそれ以上を含む。一部の実施形態では、RNA中の1つまたはそれ以上のウリジンは、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドにより置換されている。一部の実施形態では、ウリジンを置換する修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン（ψ）、N1-メチルプソイドウリジン（m¹ψ）または5-メチルウリジン（m⁵U）である。一部の実施形態では、組成物中のRNAの1つまたはそれ以上は、本明細書中の組成物セクションに記載の5'キャップ、5'UTR、3'UTRおよびポリAテールをさらに含む。

30

40

【0213】

一部の実施形態では、組成物は、GM-CSF、IL-2、およびIL-12sc RNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、修飾されており、例えば、ModAまたはModBとして修飾されている。一部の実施形態では、IL-12sc RNAは、配列番号18で示されるように最適化されている。

50

【0214】

一部の実施形態では、組成物は、GM-CSF、IL-15 sushi、およびIL-12sc RNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、修飾されており、例えば、ModAまたはModBとして修飾されている。一部の実施形態では、IL-12sc RNAは、配列番号18で示されるように最適化されている。

【0215】

一部の実施形態では、組成物は、GM-CSF、IL-2、IL-12sc、およびIFN α RNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、修飾されており、例えば、ModAまたはModBとして修飾されている。一部の実施形態では、IL-12sc RNAおよびIFN α RNAは、それぞれ、配列番号18および23で示されるように最適化されている。

10

【0216】

一部の実施形態では、組成物は、GM-CSF、IL-15 sushi、IL-12sc、およびIFN α RNAを含む。一部の実施形態では、組成物は、修飾されており、例えば、ModAまたはModBとして修飾されている。一部の実施形態では、IL-12sc RNAおよびIFN α RNAは、それぞれ、配列番号18および23で示されるように最適化されている。

【0217】

一部の実施形態では、組成物は、GM-CSF、IL-15 sushi、IL-12sc、およびIFN α RNAを含み、該RNAは、配列番号18 (IL-12sc)、23 (IFN α)、26 (IL-15 sushi) もしくは29 (GM-CSF) で示されるヌクレオチドを含むか、そのようなヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、組成物は、修飾されており、例えば、ModAまたはModBとして修飾されている。

20

【0218】

一部の実施形態では、RNAの組合せは、等しいRNA質量に基づいて、1:1、1:1:1、または1:1:1:1比として投与される。例えば、IL15 sushi 20 μ g、IL-12sc 20 μ g、IFN α 2b 20 μ g、およびGM-CSF 20 μ g。一部の実施形態では、比は、異なる質量比、例えば、1:10:1:10比 (20 μ g、200 μ g、20 μ g、200 μ g) が投与されるように調整される。同様に、一部の実施形態では、例えば、1:2:3:4 (20 μ g、40 μ g、60 μ g、80 μ g) の比が使用される。あるいは、RNAの質量に基づく比を基準として用いるのではなく、比は、RNAのモル濃度に基づくこともある。

30

【0219】

一部の実施形態では、混合物中の各RNAが等比である、RNAの混合物が、投与される。

【0220】

一部の実施形態では、混合物中の各RNAが不等比である、RNAの混合物が、投与される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のRNAは、混合物中の別のRNAより1、2、3、4、5、6、7、8、9または10倍大きい比で、投与される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のRNAは、混合物中の別のRNAの1/1、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9または1/10である比で、投与される。

40

【0221】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、医療用製剤であってもよい。一部の実施形態では、医療用製剤は、含まれているRNAが、同じバイアルの内にあってもよく、または別々のバイアルの中にあってもよい、キットを含む。一部の実施形態では、医療用製剤は、固形腫瘍を処置または予防するための組成物の使用説明書をさらに含む。

【0222】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物を含むキットであって、含まれているRNAが、同じバイアルの内にあってもよく、または別々のバイアルの中にあってもよい、

50

キットが提供される。一部の実施形態では、キットは、固形腫瘍を処置または予防するための組成物の使用説明書をさらに含む。

【0223】

H. 修飾mRNA処置へのIFN α 追加の効果

RNAは、様々なパターン認識受容体（PRR）を刺激することによって免疫系を活性化することができ、その結果、I型インターフェロン（IFN α のような）の産生に至る。様々な修飾ヌクレオチド、または投与されるdsRNAの量を低減させることのような他の改変を組み込むことで、RNAの免疫刺激効果を低下させることができる。意外にも、実施例で説明されるように、インターフェロナルファをコードする、ヌクレオチド修飾型およびdsRNA低減型mRNAの包含は、ヌクレオチド修飾がなく、dsRNAを低減させないmRNAの包含と比較して、抗腫瘍活性を向上させた。インターフェロナルファをコードするmRNAの追加は、修飾ヌクレオチドおよびdsRNA精製の包含により除去された免疫刺激効果の一部を回復させた。

【0224】

一部の実施形態では、IFN（任意の形態またはサブタイプのもの）をコードするRNAであって、IFN RNAが、非改変RNAと比較して免疫原性が低下するように改変されている、RNAが提供される。ある特定の実施形態では、このIFNの投与は、IFNをコードしていないRNAの抗腫瘍応答を向上させる。一部の実施形態では、IFN α をコードするRNAは、他のRNAが、免疫原性を低下させるように改変されていない限り、他のRNAの抗腫瘍応答を向上させる。一実施形態では、免疫原性を低下させる改変は、dsRNAの量の低減である。一部の態様では、免疫原性を低下させる改変は、1つまたはそれ以上のウリジンの修飾ヌクレオシドでの置換である。一部の態様では、免疫原性を低下させる改変は、dsRNAの量の低下と、1つまたはそれ以上のウリジンの修飾ヌクレオシドでの置換の両方である。一部の実施形態では、IFNは、IFN α である。

【0225】

一部の実施形態では、IFN RNAは、修飾RNAの抗腫瘍応答を向上させる。一部の実施形態では、IFN RNAは修飾ヌクレオチドを含むRNAの抗腫瘍応答を向上させる。一部の実施形態では、IFN RNAは、プソイドウリジンを含むmRNAの抗腫瘍応答を向上させる。一部の実施形態では、IFN RNAは、ModB修飾を有するRNAの抗腫瘍応答を向上させる。

【0226】

一部の実施形態では、IFN RNAは、IL-2（配列番号12もしくは13）、IL-12sc（配列番号17もしくは18）、IL-15 sush（配列番号26）またはGM-CSF（配列番号29）のRNAの抗腫瘍応答を向上させる。一部の実施形態では、RNAは、ModB修飾を含む。

【0227】

一部の実施形態では、IFNは、IFN α である。

【0228】

一部の実施形態では、IFN RNA構築物は、配列番号22または23である。

【0229】

III. 方法および使用

本明細書に記載されるいずれのRNA、組成物、医療用製剤および組合せ組成物も、がんまたは固形腫瘍を処置するために対象に投与することができる。一部の実施形態では、がんは、固形腫瘍である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、嚢胞も液状領域も含有しない組織の異常な塊である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、良性であってもよく、または悪性であってもよい。一部の実施形態では、固形腫瘍は、前がん性病変である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚に存在する。

【0230】

一部の実施形態では、固形腫瘍は、肉腫、癌腫またはリンパ腫である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、基底細胞癌、扁平上皮癌、小細胞肺腫瘍、神経芽腫、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫腫瘍、精上皮腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である。一部の実施形態では、固形腫瘍は、光線角化症などの前がん性病変である。

【0231】

一部の実施形態では、RNA組成物を注射によって腫瘍の中に（例えば、腫瘍内に）または腫瘍の付近に（腫瘍周囲に）送達することができる。一部の実施形態では、RNA組成物を腫瘍除去部位にまたはその付近に送達することができる。

10

【0232】

一部の実施形態では、RNA組成物を局所用溶液、軟膏またはクリームによって送達することができる。

【0233】

一部の実施形態では、RNA組成物をウイルスによって送達することができる。一部の実施形態では、RNA組成物を、該RNA組成物をコードするウイルス、例えば腫瘍溶解性ウイルス、による感染によって送達することができる。一部の実施形態では、RNA組成物を腫瘍溶解性ウイルスによって送達することができる。

【0234】

20

一部の実施形態では、1回より多くの投与が送達される。一部の実施形態では、複数回投与のためにカテーテルが腫瘍部位内にまたはその付近に留置される。一部の実施形態では、複数回投与のためにカテーテルが腫瘍除去部位に留置される。

【0235】

一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタである。

【0236】

一部の実施形態では、RNA組成物は、別の治療と組み合わせられる。一部の実施形態では、RNA組成物は、1つより多くの他の治療と組み合わせられる。一部の実施形態では、RNA組成物は、集学的治療に組み合わせられる。

30

【0237】

一部の実施形態では、他の治療は、腫瘍を摘出、切除または減量するための外科手術である。一部の実施形態では、治療的RNA組成物は、腫瘍を摘出、切除または減量するための外科手術中に投与される。

【0238】

一部の実施形態では、他の治療は、放射線療法である。一部の実施形態では、放射線療法は、外照射療法または粒子線照射である。一部の実施形態では、放射線療法は、カテーテルまたは大口径針による直接腫瘍への放射性同位元素の一時的または永久移植を含む、密封小線源療法である。一部の実施形態では、放射性同位元素は、 $^{137}\text{セシウム}$ 、 $^{192}\text{イリジウム}$ 、または放射性ヨウ素である。一部の実施形態では、放射線療法は、静脈内投与される放射性同位元素製剤である。一部の実施形態では、放射性同位元素製剤は、放射性ヨウ素（ ^{131}I ）、ストロンチウム（ ^{89}Sr ）またはサマリウム（ ^{153}Sm ）である。

40

【0239】

一部の実施形態では、他の治療は、化学療法である。一部の実施形態では、化学療法は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、微小管阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、または細胞傷害性抗体である。

【0240】

一部の実施形態では、化学療法は、抗浸潤剤（例えば、マリマスタットのようなメタロ

50

プロテイナーゼ阻害剤、およびウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体機能の阻害剤)を含む。一部の実施形態では、化学療法は、増殖因子機能(例えば、血小板由来増殖因子および肝細胞増殖因子)、増殖因子抗体または増殖因子受容体抗体(例えば、抗 *erbB2* 抗体トラスツズマブ [ハーセプチン (商標)] および抗 *erbB1* 抗体セツキシマブ (商標))の阻害剤を含む。一部の実施形態では、化学療法は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤である。一部の実施形態では、化学療法は、チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、上皮増殖因子ファミリーの阻害剤(例えば、EGFRファミリーチロシンキナーゼ阻害剤、例えばゲフィチニブ (イレッサ (商標))、エルロチニブ (タルセバ (商標))、およびカネルチニブ (CE 1033)、またはセリン/トレオニンキナーゼ阻害剤)である。

10

【0241】

一部の実施形態では、化学療法は、抗増殖/抗悪性腫瘍薬、例えば、代謝拮抗薬(例えば、葉酸代謝拮抗薬、例えばメトトレキサート;フルオロピリミジン、例えば5-フルオロウラシル、テガフル;プリンおよびアデノシン類似体、シトシンアラビノシド);抗腫瘍性抗生物質(例えば、アントラサイクリン系薬剤、例えばアドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノマイシン、エピルビシンおよびイダルビシン;マイトマイシン-C、ダクチノマイシン、ミトラマイシン);白金誘導体(例えば、シスプラチン、カルボプラチン);アルキル化剤(例えば、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソウレア、チオテパ);有糸分裂阻害剤(例えば、ビンカルカロイド類、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン;およびタキソイド類、例えばタキソール、タキソテル);トポイソメラーゼ阻害剤(例えば、エピポドフィロトキシン類、例えばエトポシドおよびテニポシド;アムサクリン、トポテカン、カンプトテシンおよびまたイリノテカン);またはチミジル酸シンターゼ阻害剤(例えば、ラルチトレキセド)を含む。

20

【0242】

一部の実施形態では、化学療法は、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。一部の実施形態では、ADCは、細胞傷害(抗がん)薬に連結された抗体である。一部の実施形態では、ADCは、腫瘍細胞への細胞傷害薬の標的化送達を可能にする。一部の実施形態では、ADCは、正常組織に対して腫瘍細胞への優先的な細胞傷害薬送達を可能にする。

30

【0243】

一部の実施形態では、化学療法は、異なる薬剤の組合せでの併用化学療法である。一部の実施形態では、その組合せは、異なる作用機序および/または異なる、重複しない毒性を有する、異なる薬剤を含む。

【0244】

一部の実施形態では、他の治療は、例えば、チェックポイントモジュレーター/阻害剤などの、免疫刺激因子または免疫療法である。チェックポイントモジュレーター/阻害剤は、宿主免疫系がそれ自体を攻撃するのを防ぐことは当技術分野において周知であり、例えば、CTLA-4、PD1、PDL1、GITR、OX40、LAG-3およびTIM-3を含む。一部の実施形態では、免疫刺激因子、免疫療法、またはチェックポイントモジュレーター/阻害剤は、モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、PD1、PDL1、CTLA-4、LAG3、OX40、CD40、CD40L、41BB、41BBL、GITR、CD3、CD28、CD38またはTGFBetaに対する抗体である。一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、二重特異性抗体である。一部の実施形態では、免疫刺激因子は、細胞に基づく免疫療法である。一部の実施形態では、免疫刺激因子は、サイトカインまたはケモカインである。一部の実施形態において、免疫刺激因子は、がんワクチンである。広範な免疫刺激因子が、当技術分野における技能を有する科学者および臨床医に公知であるので、本発明は、特定の免疫刺激因子との特異的な組合せに限定されない。

40

【0245】

50

一部の事例では、本明細書に記載のいずれのRNA、RNA組成物、医療用製剤およびRNA組合せ組成物も、免疫刺激因子、免疫療法、またはチェックポイントモジュレーターと組み合わせて投与することができる。一部の事例では、本明細書に記載のRNA、RNA組成物およびRNA組合せ組成物は、固形腫瘍を含むがんを処置するために抗体と組み合わせて対象に投与される。一部の実施形態では、抗体は、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、または抗PD1抗体と抗CTLA4抗体の組合せである。一部の実施形態では、抗体は、例えば三重特異性または二重特異性抗体などの、多重特異性抗体である。

【0246】

一部の実施形態では、抗PD1抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、単離されている、および／または組換え体である。抗PD-1抗体の例は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、センプリマブ、MED10608（旧名AMP-514；例えば、WO2012/145493および米国特許第9,205,148号を参照されたい）、PDR001（例えば、WO2015/112900を参照されたい）、PF-06801591（例えば、WO2016/092419を参照されたい）、BGB-A317（例えばWO2015/035606を参照されたい）である。

【0247】

一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、WO2015/112800において開示されているもの（例えば、このPCT公報の表1においてH1M7789N、H1M7799N、H1M7800N、H2M7780N、H2M7788N、H2M7790N、H2M7791N、H2M7794N、H2M7795N、H2M7796N、H2M7798N、H4H9019P、H4xH9034P2、H4xH9035P2、H4xH9037P2、H4xH9045P2、H4xH9048P2、H4H9057P2、H4H9068P2、H4xH9119P2、H4xH9120P2、H4xH9128P2、H4xH9135P2、H4xH9145P2、H4xH8992P、H4xH8999PおよびH4xH9008Pとして言及されているもの、ならびにこのPCT公報の表3においてH4H7798N、H4H7795N2、H4H9008PおよびH4H9048P2として言及されているもの）の1つである。WO2015/112800の開示は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。例えば、WO2015/112800において開示されている抗体、および関連抗体（このPCT公報において開示されているCDR、VHおよびVL配列または重鎖および軽鎖配列を有する抗体および抗原結合断片、ならびにこのPCT公報において開示されている抗体と同じPD-1エピトープと結合する抗体および抗原結合断片を含む）を、がんを処置および／または予防するために本発明のRNA組成物とともに使用することができる。

【0248】

関連する実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号79および80としてそれぞれ下に示される重鎖および軽鎖アミノ酸配列；配列番号87および88におけるVHおよびVL配列（イタリック体で示される）、または配列番号79および80における1つもしくはそれ以上（例えば、6つすべて）のCDR（太字枠内に示される）を含むこともある。一部の実施形態では、次のCDRを含む抗体が包含される：

HCDR1=GFTFSNFG（配列番号81）

HCDR2=ISGGGRDT（配列番号82）

HCDR3=VKWGNIFYFDY（配列番号83）

LCDR1=LSINTF（配列番号84）

LCDR2=AAS（配列番号85）

LCDR3=QQSSNTPTFT（配列番号86）。

【0249】

配列番号87および88におけるVHおよびVL配列（イタリック体で示される）を含む重鎖を含む例示的抗体は、REGN2810（センプリマブ）として公知の完全ヒト抗PD-1抗体である。

【0250】

抗PD-1 Mab重鎖

【化20】

EVQLLESQGV LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS NFG**MTWVRQA PGKGLEWVSG **ISGGGRDT**YF
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYC**VKWG NIYFDY**WGQG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVTVPS SSLGTRKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNATKPRE EQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGOP REPOVYTLPP SOEEMTKNOV
 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF
 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (配列番号79)

10

HCDR1=GFTFSNFG (配列番号81)

HCDR2=ISGGGRDT (配列番号82)

HCDR3=VKWGNIIYFDY (配列番号83)

【0251】

抗PD-1 Mab軽鎖

【化21】

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRAS**LSIN TFL**NWYQQKPK GKAPNLLI**YA AS**SLHGGVPS
 RFGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYC**QQ SSNTPT**FTFGP GTVVDERRTV AAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (配列番号80)

20

LCDR1=LSINTF (配列番号84)

LCDR2=AAS (配列番号85)

LCDR3=QQ SSNTPTFT (配列番号86)。

【0252】

一部の実施形態では、RNA、RNA組成物、およびRNA組合せ組成物を、注射によって腫瘍の中に（例えば、腫瘍内に）、腫瘍の付近に（腫瘍周囲に）、または腫瘍除去部位の付近に送達してもよく、抗体を同じ方法で送達してもよく、または全身送達、例えば、注射、注入および移植によるものを含む、経腸または非経口方法などで送達してもよい。「組み合わせて投与」は、同時投与または逐次投与を含む。逐次的な場合、投与は、いずれの順序であってもよく、当業者に公知のいずれの適切な時間間隔であってもよい。

30

【0253】

一部の実施形態では、他の治療は、ホルモン療法である。一部の実施形態では、ホルモン療法は、乳がんの処置のための抗エストロゲン薬、または前立腺がんを処置するための抗アンドロゲン薬である。薬剤の例としては、抗エストロゲン剤（例えば、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロキシフェン、イドキシフェン）、エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（例えば、フルベストラント）、プロゲステロゲン（例えば、メゲストロール酢酸エステル）、アロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール、レトラゾール、ボロゾール、エキセメスタン）、抗プロゲステロゲン、抗アンドロゲン剤（例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、シプロテロン酢酸エステル）、LHRHアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、ゴセレリン酢酸塩、リュープロリド、ブセレリン）、ならびに5-アルファ-レダクターゼ阻害剤（例えば、フィナステリド）が挙げられる。

40

【0254】

一部の実施形態では、他の治療は、標的療法である。一部の実施形態では、標的療法は、キナーゼ阻害剤である。一部の実施形態では、標的療法は、がん原遺伝子の遺伝子産物の活性を阻害するものである。一部の実施形態では、標的療法は、抗血管新生剤である。

50

一部の実施形態では、標的療法は、VEGF、BCR-ABL、BRAF、EGFR、c-Met、MEK、ERK、mTORまたはALKの活性を調節することに関するものである。

【0255】

一部の実施形態では、他の治療は、幹細胞移植である。

【0256】

一部の実施形態では、治療用RNA組成物は、別の治療と同時に送達される。

【0257】

一部の実施形態では、治療用RNA組成物は、別の治療の前に送達される。

【0258】

一部の実施形態では、治療用RNA組成物は、別の治療の後に送達される。

【0259】

一部の実施形態では、治療用RNA組成物は、別の治療と一緒に、直接腫瘍に、または腫瘍のもしくは腫瘍除去部位の付近に、送達される。一部の実施形態では、治療用RNA組成物は、直接腫瘍に、または腫瘍のもしくは腫瘍除去部位の付近に、送達されるが、別の薬剤は、全身送達される。

【0260】

IV. 医薬製剤

一部の実施形態では、本明細書に記載のいずれのDNA、RNAおよび組成物も医薬製剤である。一部の実施形態では、医薬製剤は、希釈剤、賦形剤、または他の薬学的に許容される担体を含む。したがって、本明細書で提供されるDNA、RNA、組成物またはその組合せと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物が、本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、水溶液である。ある特定の実施形態では、水溶液は、食塩溶液である。本明細書で使用される場合、薬学的に許容される賦形剤は、無菌であると理解される。一部の実施形態では、医薬組成物は、投薬単位の形態で投与される。例えば、ある特定の実施形態では、投薬単位は、錠剤、カプセル、植込み型デバイス、またはボラス注入の形態でのものある。

【0261】

一部の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、医薬組成物中で従来見いだされる他の補助成分をさらに含有することがある。例えば、組成物は、例えば鎮痛薬、収斂薬、局所麻酔剤または抗炎症剤などの、追加の、適合性の、薬学的に活性の材料を含有することもある。組成物はまた、例えば賦形剤、希釈剤および担体などの、追加の、適合性の、薬学的に不活性の材料を含有することもある。

【0262】

注射用のある特定の医薬組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンであり、懸濁化剤、安定剤および／または分散剤などの、製剤用薬剤を含有することもある。注射のための医薬組成物における使用に適しているある特定の溶媒は、これらに限定されないが、親油性溶媒および脂肪油、例えばゴマ油、合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリド、およびリポソームが含まれる。水性懸濁注射剤は、懸濁液の粘度を上昇させる物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有することもある。場合により、そのような懸濁液はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために、適切な安定剤と、医薬品の溶解度を上昇させる薬剤とを含有することもある。

【0263】

脂質部分を使用して、本明細書で提供されるRNAを送達してもよい。1つの方法では、RNAは、カチオン性脂質と中性脂質の混合物で製造された既成のリポソームまたはリポプレックスに導入される。別の方法では、中性脂質が存在しない、モノまたはポリカチオン性脂質とRNA複合体が形成される。ある特定の実施形態では、脂質部分は、特定の細胞または組織への医薬品の分配を増加させるように選択される。

【0264】

一部の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、本明細書で提供されるDNAまたはRNAと複合体を形成している、ポリアミン化合物または脂質部分を含む。

【0265】

一部の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、送達系を含む。送達系の例としては、リポソームおよびエマルジョンが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の送達系は、疎水性化合物を含むものを含む、ある特定の医薬組成物の調製に有用である。ある特定の実施形態では、ジメチルスルホキシドなどの、ある特定の有機溶媒が、使用される。

【0266】

注射のためのある特定の医薬組成物は、単位剤形で、例えば、アンプルで、または複数回投与用容器で、提供される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、RNAまたはRNAの組合せを治療有効量で含む。ある特定の実施形態では、治療有効量は、処置される対象におけるがんを処置または予防するのに十分な量ある。

【0267】

以下の条項は、非常に多くの実施形態を提供するものであり、非限定的である：

条項1. IL-12タンパク質をコードするRNAと、IL-15タンパク質をコードするRNAと、IFN α タンパク質をコードするRNAと、GM-CSFタンパク質をコードするRNAとを含む、組成物。

条項2. IFN α タンパク質は、IFN α 2bタンパク質である、条項1に記載の組成物。

条項3. (i) IL-12タンパク質をコードするRNAは、配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列、もしくは配列番号17もしくは18のヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IL-12タンパク質は、配列番号14のアミノ酸配列、もしくは配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項1に記載の組成物。

条項4. (i) IL-15タンパク質をコードするRNAは、配列番号26のヌクレオチド配列、もしくは配列番号26のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IL-15タンパク質は、配列番号24のアミノ酸配列、もしくは配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項1に記載の組成物。

条項5. (i) IFN α タンパク質をコードするRNAは、配列番号22もしくは23のヌクレオチド配列、もしくは配列番号22もしくは23のヌクレオチド配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) IFN α タンパク質は、配列番号19のアミノ酸配列、もしくは配列番号19のアミノ酸配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項1に記載の組成物。

条項6. (i) GM-CSFタンパク質をコードするRNAは、配列番号29のヌクレオチド配列、もしくは配列番号29のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、および／または(ii) GM-CSFタンパク質は、配列番号27のアミノ酸配列、もしくは配列番号27のアミノ酸配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項1に記載の組成物。

条項7. 少なくとも1つのRNAは、少なくとも1つのウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、該修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイ

10

20

30

40

50

ドウリジン (m1ψ)、5-メチル-ウリジン (m5U)、またはこれらの組合せである、条項1に記載の組成物。

条項8. 各RNAは、少なくとも1つのウリジンの代わりに修飾ヌクレオシドを含み、該修飾ヌクレオシドは、プソイドウリジン (ψ)、N1-メチル-プソイドウリジン (m1ψ)、5-メチル-ウリジン (m5U)、またはこれらの組合せである、条項1に記載の組成物。

条項9. 少なくとも1つのRNAは、5'キャップ $m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ 、または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ 、または $m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ 、または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ を含む、条項1に記載の組成物。

10

条項10. 少なくとも1つのRNAは、(i) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列、もしくは(ii) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む5'UTR、および／または(i) 配列番号8のヌクレオチド配列、もしくは(ii) 配列番号8のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む3'UTRを含む、条項1に記載の組成物。

条項11. 少なくとも1つのRNAは、少なくとも100ヌクレオチドのポリAテールを含む、条項1に記載の組成物。

20

条項12. ポリAテールは、配列番号78で示されるポリAテールを含む、条項11に記載の組成物。

条項13. 1つまたはそれ以上のRNAは：

— $m_2^{7,3'}-Gppp(m_1^{2'}-9ApG$ または $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ を含む5'キャップ；

— (i) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列、または(ii) 配列番号2、4および6からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む5'UTR；

— (i) 配列番号8のヌクレオチド配列、または(ii) 配列番号8のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む3'UTR；ならびに

30

— 少なくとも100ヌクレオチドを含むポリAテールを含む、条1に記載の組成物。

条項14. ポリAテールは、配列番号78を含む、条項13に記載の組成物。

条項15. 条項1に記載の組成物と薬学的に許容される担体、希釈剤および／または賦形剤とを含む、医薬組成物。

条項16. 固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させる方法であって、それを必要とする対象に条項1に記載の組成物を投与することを含む方法。

条項17. 固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させる方法であって、それを必要とする対象に第1のRNAを投与することを含み、第1のRNAは、IL-12 scタンパク質、IL-15 sushitanパク質、IFNαタンパク質、またはGM-CSFタンパク質、およびさらなるRNAをコードし、ここで：

40

— 第1のRNAがIL-12 scタンパク質をコードする場合には、さらなるRNAは、IL-15 sushitanパク質、IFNαタンパク質、およびGM-CSFタンパク質をコードし；

— 第1のRNAがIL-15 sushitanパク質をコードする場合には、さらなるRNAは、IL-12 scタンパク質、IFNαタンパク質、およびGM-CSFタンパク質をコードし；

— 第1のRNAがIFNαタンパク質をコードする場合には、さらなるRNAは、I

50

L-15 s u s h i タンパク質、I L-12 s c タンパク質、および G M-C S F タンパク質をコードし；

－ 第1のRNAが G M-C S F タンパク質をコードする場合には、さらなるRNAは、I L-15 s u s h i タンパク質、I F N α タンパク質、および I L-12 s c タンパク質をコードする、前記方法。

条項18．第1のRNAは、さらなるRNAと同時に対象に投与される、条項17に記載の方法。

条項19．RNAは、腫瘍内または腫瘍周囲投与される、条項17に記載の方法。

条項20．対象は、(i) 腫瘍を摘出、切除もしくは減量するための外科手術、(i i) 免疫療法、(i i i) 放射線療法、または(i v) 化学療法を含む、追加の治療でさらに処置される、条項17に記載の方法。

条項21．対象は、チェックポイントモジュレーターでさらに処置される、条項17に記載の方法。

条項22．チェックポイントモジュレーターは、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A-4 抗体、または抗 P D 1 抗体と抗 C T L A-4 抗体の組合せである、条項21に記載の方法。

条項23．RNAは、注射によって腫瘍内または腫瘍周囲投与され、チェックポイントモジュレーターは、全身投与される、条項21に記載の方法。

条項24．固形腫瘍は、肉腫、癌腫またはリンパ腫である、条項17に記載の方法。

条項25．固形腫瘍は、肺、結腸、卵巣、子宮頸部、子宮、腹膜、精巣、陰茎、舌、リンパ節、脾臓、骨、乳房、前立腺、軟部組織、結合組織、腎臓、肝臓、脳、甲状腺または皮膚におけるものである、条項17に記載の方法。

条項26．固形腫瘍は、上皮腫瘍、ホジキンリンパ腫(H L)、非ホジキンリンパ腫、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、腎細胞腫瘍、消化管腫瘍、肝腫瘍、結腸直腸腫瘍、脈管構造を伴う腫瘍、中皮腫瘍、脾腫瘍、乳房腫瘍、肉腫腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、メラノーマ腫瘍、小細胞肺腫瘍、神経芽腫腫瘍、精巣腫瘍、癌腫腫瘍、腺癌腫瘍、神経膠腫腫瘍、精上皮腫瘍、網膜芽細胞腫、または骨肉腫腫瘍である、条項17に記載の方法。

条項27．固形腫瘍を処置することまたは固形腫瘍の可能性を低下させることは、対象における、腫瘍のサイズを縮小すること、寛解期のがんの再発の可能性を低下させること、またはがん転移の可能性を低下させることを含む、条項17に記載の方法。

条項28．固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させる併用治療方法であって、それを必要とする対象にRNAおよびさらなる治療を投与することを含み、RNAは、I L-12 s c タンパク質、I L-15 s u s h i タンパク質、I F N α タンパク質、および G M-C S F タンパク質をコードし、さらなる治療は、免疫療法、化学療法またはチェックポイントモジュレーターを含む、併用治療方法。

条項29．さらなる治療は、抗 P D 1 抗体、抗 C T L A-4 抗体、または抗 P D 1 抗体と抗 C T L A-4 抗体の組合せを含む、条項28に記載の併用治療方法。

条項30．I L-12 s c タンパク質をコードする配列を含む単離された核酸であって、I L-12 s c タンパク質をコードする配列は、a) 配列番号16または18のヌクレオチド1～984に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%または78%の同一性を有する連続したヌクレオチドと、b) 配列番号16または18のヌクレオチド1027～1623に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または81%の同一性を有する連続したヌクレオチドと、c) a) のヌクレオチドとb) のヌクレオチドの間のリンカーをコードするヌクレオチドとを含む、単離された核酸。

条項31．DNAである、条項30に記載の核酸。

条項32．RNAである、条項30に記載の核酸。

条項33．I F N α タンパク質をコードする配列を含む、単離された核酸であって、I F N α タンパク質をコードする配列は、配列番号21または23のヌクレオチド配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%の同一性を有する、前記単離された核酸。

10

20

30

40

50

条項 34. DNAである、条項 33に記載の核酸。

条項 35. RNAである、条項 33に記載の核酸。

条項 36. 固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させる方法であって、それを必要とする対象に条項 34に記載のRNAを投与することを含み、対象は、IL-15 sushiタンパク質、IFN α タンパク質およびGM-CSFタンパク質をコードするさらなるRNAでさらに処置される、前記方法。

条項 37. 固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させる方法であって、それを必要とする対象に条項 35に記載のRNAを投与することを含み、対象は、IL-15 sushiタンパク質、IL-12scタンパク質およびGM-CSFタンパク質をコードするさらなるRNAでさらに処置される、前記方法。

条項 38. IL-12scをコードするRNAを産生する方法であって、プロモーターに作動可能に連結された条項 32に記載の核酸を含む発現構築物を、転写可能な条件下で、RNAポリメラーゼと接触させることを含む、前記方法。

条項 39. IFN α をコードするRNAを産生する方法であって、プロモーターに作動可能に連結された条項 35に記載の核酸を含む発現構築物を、転写可能な条件下で、RNAポリメラーゼと接触させることを含む、前記方法。

条項 40. 条項 1に記載の組成物を含む、キット。

条項 41. IL-12scタンパク質をコードするRNAと、IL-15 sushiタンパク質をコードするRNAと、IFN α タンパク質をコードするRNAと、GM-CSFタンパク質をコードするRNAとを含むキットであって、これらのRNAは、同じ容器内にない、前記キット。

条項 42. 各RNAは、別々の容器内にある、条項 41に記載のキット。

条項 43. 固形腫瘍を処置するまたは固形腫瘍の可能性を低下させるための組成物またはRNAの使用説明書をさらに含む、条項 40～42のいずれか1項に記載のキット。

【0268】

この説明および例示的实施形態は、限定と考えるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲に関して、別段の指示がない限り、本明細書および特許請求の範囲で 사용되는、量、パーセンテージまたは割合を表すすべての数、および他の数値は、すべての場合、用語「約」により修飾されていると、それらがまだそのように修飾されていなくても、解されたい。したがって、相反する指示がない限り、以下の明細書および付属の特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、得ようとする所望の特性に依存して変ることがある近似値である。最低でも、また本特許請求の範囲に記載の範囲への均等論の適用を制限しないようにして、各数値パラメータは、少なくとも、報告有効桁数に照らして、また通常の丸め技法を適用することにより、解釈されたい。

【0269】

本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」、ならびに任意の語の任意の単数形の使用は、1つの指示対象に明確にかつ明白に限定されていない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本明細書で 사용되는場合、用語「含む(include)」およびその文法上の異表記は、非限定的であるように意図されており、したがって、リスト内の品目の言及は、挙げられている品目の代わりに使用することができるまたは挙げられている品目に加えることができる他の同様の品目の除外への言及ではない。

【実施例】

【0270】

以下の実施例は、ある特定の開示する実施形態を例証するために提供するものであり、いかなる点においても本開示の範囲を制限するものと見なしてはならない。

【実施例 1】

【0271】

材料および方法

B16F10腫瘍モデル：6～8週齢で17.0～20.9gの間の体重を有する雌C

10

20

30

40

50

57BL/6Jマウス (Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME) を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌 (Harlan 2916 齧歯動物用飼料、Massachusetts, USA) および滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\% \pm 15\%$ でマウスを飼育した。B16F10細胞を米国培養細胞系統保存機関 (ATCC) (Manassas, Virginia USA) (カタログ番号 CRL-6475) から入手し、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清 (HI FBS) (Life technologies、カタログ番号 10082-147) を補充したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Life technologies、カタログ番号 11995) において $5\% \text{CO}_2$ で、 37°C で培養した。0.25% トリプシン-EDTA (Life technologies、カタログ番号 25200-056) を使用して細胞を回収し、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (DPBS) (Life technologies、カタログ番号 14190-144) に再浮遊させ、マウス1匹当たり細胞 0.5×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ を、雌 C57BL/6Jマウスの右側腹部に皮下 (SC) 移植した。二重側腹部腫瘍モデルには、0日目に、マウス1匹当たり B16F10細胞 0.5×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ を右側腹部に皮下 (SC) 移植し、マウス1匹当たり B16F10細胞 0.25×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ を左側腹部に SC 移植した。サイトカイン mRNA の局所投与が、遠位効果を及ぼすことができるかどうかを試験するために (図 19 を参照されたい)、17~24g の間の体重を有する 6~8 週齢の雌 C57BL/6J OlaHsd マウス (Envigo, Rossdorf, Germany) を、研究登録前に少なくとも6日間、順化させた。マウスは、餌 (加熱滅菌処理可能な ssniff M-Z, Soest, Germany) および滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\% \pm 10\%$ でマウスを飼育した。B16F10細胞を米国培養細胞系統保存機関 (ATCC (登録商標) CRL-6475 (商標)) から入手し、10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Biochrom、カタログ番号 S 0115) を補充した DMEM、高グルコース、GlutaMAX (商標) (Life technologies、カタログ番号 31966047) において、 $7.5\% \text{CO}_2$ で、 37°C で培養した。StemPro (登録商標) Accutase (登録商標) 細胞解離試薬 (Life technologies、カタログ番号 A1110501) を使用して細胞を回収し、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (DPBS) (Life technologies、カタログ番号 14190-169) に再浮遊させ、マウス1匹当たり細胞 0.3×10^6 個/ $100 \mu\text{l}$ を、雌 C57BL/6Jマウスの右側の剪毛した側腹部に皮下 (SC) 移植した。遠位肺腫瘍の播種には、B16F10_luc-gfp細胞を使用した。これらの細胞は、ルシフェラーゼおよび GFP をコードするプラスミドでの安定したトランスフェクションによって B16F10 から得た。B16F10_luc-gfp細胞を、B16F10 と同じ条件で培養し；だがしかし $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシンを培養培地に添加した。SC 移植の翌日、マウス1匹当たり B16F10_luc-gfp細胞 0.3×10^6 個/ $200 \mu\text{l}$ を尾静脈に静脈内 (IV) 注射した。腫瘍の SC 接種の 10~14 日後に、腫瘍内 mRNA 注射を開始した。腫瘍成長を 2~3 日ごとにノギス測定によって評価し、次の式を使用して垂直直径の積として表した： $a \times b / 2$ (式中、 $a < b$)。肺におけるルシフェラーゼ陽性腫瘍細胞の生着を、Xenogen IVIS Spectrum イメージングシステム (Caliper Life Sciences) を用いる *in vivo* 生物発光イメージングにより分析した。L-ルシフェリンの水溶液 ($250 \mu\text{l}$ 、 1.6mg ；BD Biosciences) を腹腔内注射した。生存動物から放出される光子を1分の露光時間で10分後に定量した。関心領域 (ROI) を、平均放射輝度 (Caliper Life Sciences) からの Living Image ソフトウェアを使用してマウスのグレースケール写真に重ね合わせたカラースケールの画像として表される、光子 $\cdot \text{s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$) として定量した。絶対定量のために、生物発光シグナルを全光束 (光子 $\cdot \text{s}^{-1}$) としてプロットした。図 20 C~G および 21 E~I に関して行った研究には、肺転移の播種を伴わない、C57BL/6J OlaHsd マウス (Envigo

10

20

30

40

50

o、Rossdorf、Germany)の上記モデルも、使用した。

【0272】

CT26腫瘍モデル：図2、3、7D～F、8、9、12Dおよび21に関して行った実験については、17～24gの間の体重を有する6～8週齢の雌Balb/c Rjマウス(Janvier、Genest-St.-Isle、France)を研究登録の前に少なくとも6日間、順化させた。マウスは、餌(加熱滅菌処理可能なssniff M-Z、Soest、Germany)および滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、22℃±2℃、相対湿度55%±10%でマウスを飼育した。CT26細胞を(ATCC(登録商標)CRL-2638(商標))から入手し、10%ウシ胎仔血清(FBS)(Biochrom、カタログ番号S 0115)を補充したロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)1640培地、GlutaMAX(商標)(Life technologies、カタログ番号61870-044)において、5%CO₂で、37℃で培養した。StemPro(登録商標)Accutase(登録商標)細胞解離試薬(Life technologies、カタログ番号A1110501)を使用して細胞を回収し、DPBS(Life technologies、カタログ番号14190-169)に再浮遊させ、マウス1匹当たり細胞0.5×10⁶個/100μlを、雌Balb/c Rjマウスの右側の剪毛した側腹部にSC移植した。腫瘍接種の13～19日後に、腫瘍内RNA注射を開始した。腫瘍成長を2～3日ごとにノギス測定によって評定し、次の式を使用して垂直直径の積として表した： $a \times b / 2$ (式中、bは、2つの直径の長い方である($a < b$))。

【0273】

図6および7A～Cに関して行った研究については、6～8週齢で17.0～20.9gの間の体重を有する雌BALB/cマウス(Jackson Laboratory; Bar Harbor、ME)を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌(Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts、USA)および滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、温度(22℃±2℃)、相対湿度(55%±15%)でマウスを飼育した。CT26細胞をATCC(Manassas、Virginia USA)(カタログ番号CRL-2638)から入手し、10%HI FBS(Life technologies、カタログ番号10082-147)を補充したRPMI-1640(Life technologies、カタログ番号11875-093)において5%CO₂で、37℃で培養した。0.25%トリプシン-EDTA(Life technologies、カタログ番号25200-056)を使用して細胞を回収し、DPBS(Life technologies、カタログ番号14190-144)に再浮遊させ、マウス1匹当たり細胞0.5×10⁶個/200μlを、BALB/c雌マウスの右側腹部にSC移植した。

【0274】

CT26腫瘍モデルに関しては、腫瘍成長に加えて、示した箇所の血液中のgp70反応性CD8+T細胞を測定した。血液試料は、EDTA被覆チューブを使用して採取した。血液100μlをFACSチューブに移し、T-Select H-2Ld MuLV gp70四量体-SPSYVYHQF-APC(MBL(TS-M-521-2)、血液100μlに対して4μl)と、抗CD8a FITC(life technologies(MCD801)、血液100μlに対して1μl)と、抗CD45 V500(BD(561487)、血液100μlに対して1μl)とを含有する抗体混合物を添加した。室温で20分インキュベーション後、Blood Lysis Buffer(BD(349202)、チューブ1本当たり300μl)を添加し、さらに6分間インキュベートした。次いで、試料をPBS-EDTA緩衝液で2回洗浄した。FACS試料をFACS Canto IIフローサイトメーターで分析した。

【0275】

MC38腫瘍モデル：6～8週齢で17.0～20.9gの間の体重を有する雌C57BL/6Jマウス(Jackson Laboratory; Bar Harbor、ME

）を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌（Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts、USA）および滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\%\pm 15\%$ でマウスを飼育した。MC38細胞は、S. A. Rosenberg博士（米国国立衛生研究所、Bethesda、MD、USA）からの寛大な寄贈品であった。細胞株を、 $10\%\text{HI FBS}$ （Gibco、カタログ番号100082）を補充した、 L-グルタミン を含有するRPMI-1640（Gibco、カタログ番号11875）において $5\%\text{CO}_2$ で、 37°C で培養した。細胞を回収し、DPBS（Gibco、カタログ番号14190）に再浮遊させ、マウス1匹当たり細胞 1×10^6 個/ $200\mu\text{L}$ を雌C57BL/6Jマウスの右側腹部にSC移植した。

10

【0276】

A375腫瘍モデル：6～8週齢で $17.0\sim 20.9\text{g}$ の間の体重を有する雌重症複合免疫不全（SCID）マウス（Jackson Laboratory；Bar Harbor、ME）を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌（Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts、USA）、滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\%\pm 15\%$ でマウスを飼育した。A375細胞は、ATCC（Manassas、Virginia USA）（カタログ番号CRL-1619）から入手した。 $10\%\text{HI FBS}$ （Life technologies、カタログ番号10082-147）を補充したDMEM（Life technologies、カタログ番号11995）において $5\%\text{CO}_2$ で、 37°C で細胞株を培養した。 $0.25\%\text{トリプシン-EDTA}$ （Life technologies、カタログ番号25200-056）を使用して細胞を回収し、DPBS（Life technologies、カタログ番号14190-144）に再浮遊させ、PBS $100\mu\text{L}$ 当たり 3.0×10^6 個をBDマトリゲルマトリックス（BD、カタログ番号354234） $100\mu\text{L}$ と混合し、雌SCIDマウスの右側腹部にSC移植した。

20

【0277】

KM12（CRC）異種移植モデル：10週齢で $17.3\text{g}\sim 21.9\text{g}$ の間の体重を有する雌NOD.CB17-Prkdcscid/SCIDマウス（Jackson Laboratory；Bar Harbor、ME）を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌（Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts、USA）、滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、（ $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）で、相対湿度（ $55\pm 15\%$ ）でマウスを飼育した。KM-12細胞は、米国国立がん研究所（NCI）（カタログ番号507345）から入手した。 $10\%\text{HI FBS}$ （Life technologies、カタログ番号10082）を補充した、 L-グルタミン を含有するRPMI培地1640（Gibco、カタログ番号11875）において細胞を増殖させ、 37°C で、 $5\%\text{CO}_2$ でインキュベートした。 $0.25\%\text{トリプシン-EDTA}$ （Gibco、カタログ番号25200）を使用して細胞を回収し、DPBS（Gibco、カタログ番号14190）に再浮遊させ、マウスごとに、 $50\%\text{マトリゲル}$ （BD、カタログ番号356234）を含有するDPBS $200\mu\text{L}$ 中の細胞 5.0×10^6 個を、雌SCIDマウスの右側腹部にSC移植した。

30

40

【0278】

RPMI8226（骨髄腫）異種移植モデル：12週齢で $19.8\text{g}\sim 26.6\text{g}$ の間の体重を有する雌NSGマウス（Jackson Laboratory；Bar Harbor、ME）を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌（Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts、USA）、滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、（ $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）で、相対湿度（ $55\pm 15\%$ ）でマウスを飼育した。RPMI8226細胞は、ATCC（カタログ番号CCL-155）から入手した。 $10\%\text{HI FBS}$ （Gibco、カタログ番号10082）を補充した、 L-グルタミン を含有するRPMI培地1640（Gibco、カタログ番号11

50

875)において細胞を増殖させ、37℃で、5%CO₂でインキュベートした。0.25%トリプシン-EDTA (Gibco、カタログ番号25200)を使用して細胞を回収し、DPBS (Gibco、カタログ番号14190)に再浮遊させ、マウスごとに、50%マトリゲル (BD、カタログ番号356234)を含有するDPBS 200 µl中の細胞 5.0×10^6 個を、雌NSGマウスの右側腹部にSC移植した。

【0279】

NCI-N87 (胃がん) 異種移植モデル：11週齢で18.3~22.7gの間の体重を有する雌NOD.CB17-Prkdcscid/SCID (Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME)を、研究登録前に少なくとも3日間、順化させた。マウスは、餌 (Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts, USA)、滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、(22±2℃)で、相対湿度(55±15%)でマウスを飼育した。NCI-N87細胞は、ATCC (カタログ番号CRL-5822)から入手した。10%HI FBS (Gibco、カタログ番号10082)を補充した、レーグルタミンを含有するRPMI培地1640 (Gibco、カタログ番号11875)において細胞を増殖させ、37℃で、5%CO₂でインキュベートした。0.25%トリプシン-EDTA (Gibco、カタログ番号25200)を使用して細胞を回収し、DPBS (Gibco、カタログ番号14190)に再浮遊させ、マウスごとに、50%マトリゲル (BD、カタログ番号356234)を含有するDPBS 200 µl中の細胞 3.0×10^6 個を、雌SCIDマウスの右側腹部にSC移植した。

【0280】

NCI-H1975 (NSCLC) 異種移植モデル：10週齢で18.8g~26.0gの間の体重を有する雌NSGマウス (Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME)を、研究登録前に少なくとも3日間、放置して順化させた。マウスは、餌 (Harlan 2916齧歯動物用飼料、Massachusetts, USA)、滅菌水を自由に入手でき、12時間の昼夜サイクルで、(22±2℃)で、相対湿度(55%±15%)でマウスを飼育した。NCI-H1975細胞をATCC (カタログ番号CRL-5908)から入手し、10%HI FBS (Gibco、カタログ番号10082)を補充した、レーグルタミンを含有するRPMI培地1640 (Gibco、カタログ番号11875)において培養し、37℃で、5%CO₂でインキュベートした。0.25%トリプシン-EDTA (Gibco、カタログ番号25200)を使用して細胞を回収し、DPBS (Gibco、カタログ番号14190)に再浮遊させ、マウスごとに、50%マトリゲル (BD、カタログ番号356234)を含有するDPBS 200 µl中の細胞 5.0×10^6 個を、雌NSGマウスの右側腹部にSC移植した。

【0281】

腫瘍再負荷：雌C57BL/6Jマウスに、上で説明したようにB16F10細胞を移植した。ModBサイトカインmRNA混合物 (IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSF、IFNα)を用いる11、13、15および17日目における4回の腫瘍内注射 (mRNA 80 µg/標的ごとに20 µg)で、マウスを処置した。サイトカインmRNA処置後、マウス8匹に腫瘍がなかった。最後のサイトカインmRNA処置の4週間後、無腫瘍マウスに、マウス1匹当たりB16F10細胞 0.5×10^6 個/200 µlをSC注射により再負荷し、腫瘍成長をモニターした。

【0282】

腫瘍モニタリング：最終的な 殺まで週に2回、ノギスで腫瘍を測定した。腫瘍サイズがおおよそ2000 mm³に達した場合、または動物に健康問題 (20%の腫瘍領域の潰瘍化)があった場合、動物を安楽死させた。腫瘍退縮は、i) 研究終了時の腫瘍体積<20 mm³、またはii) $T^F/T^0 < 1$ (式中、 T^F は、最終腫瘍体積に等しく、 T^0 は、初回腫瘍内mRNA注射当日の腫瘍体積に等しい)と定義した。

【0283】

mRNA修飾A (ModA)：5'-UTR (一部のケースでは配列番号1に対応する)

と、FおよびIと呼ばれる2つのエレメントからなる3' UTR（一部のケースでは配列番号7に対応する）と、合計で110ヌクレオチドのポリ（A）テール（A30-リンカー-A70構造；一部のケースでは配列番号78に対応する）とを含む一般的な開始ベクターに、目的の遺伝子をコードする合成DNA断片をクローニングした。クラスIIS制限酵素を用いてプラスミドDNAの線形化をポリ（dA:dT）の下流で行って、ポリ（dA:dT）の先に追加のヌクレオチドがない鑄型を生成した（Holtkampら、Blood 108（13）：4009～172006頁（2006）を参照されたい）。線形化されたプラスミドDNAを、7.5mM ATP、CTP、UTP、GTPおよび6mM D1、ベータ-S-アンチリバースキャップ類似体（ベータ-S-ARCA、Cap0）（Kuhn ANら、Gene Ther. 17（8）：961～71頁（2010）を参照されたい）の存在下で、以前に記載されたような（Grudzien-Nogalska Eら、Methods Mol Biol. 969：55～72頁（2013）を参照されたい）、T7 RNAポリメラーゼ（Thermo Fisher）を用いるin vitro転写に供した。磁性粒子を使用してRNAを精製し（Berensmeier S. Appl Microbiol Biotechnol. 73（3）：495～504頁（2006）を参照されたい）、RNAの濃度および質を、それぞれ、分光光度法により評定し、キャピラリーゲル電気泳動システムにより分析した。

【0284】

mRNA修飾B（ModB）：5'-UTR（一部のケースではタバコエッチウイルスリーダー配列TEV、配列番号3に対応する）と、FおよびIと呼ばれる2つのエレメントからなる3' UTR（一部のケースでは配列番号7に対応する）と、合計で110ヌクレオチドのポリ（A）テール（A30-リンカー-A70構造）とを含む一般的な開始ベクターに、目的の遺伝子をコードする合成DNA断片をクローニングした。上で説明したようにプラスミドDNAを線形化し次第、T7 RNAポリメラーゼ（Thermo Fisher）を用いるin vitro転写を行った。この転写は、ModAについて説明したように行ったが、キャップ構造を反応に加えず、UTPをN1-メチルプソイドウリジン三リン酸の代わりに使用した。次いで、磁性粒子を使用してRNAを精製し（Berensmeier 2006）、その後、ワクシニアウイルスキャッピング酵素に基づく市販の系（NEB）およびmRNA Cap 2'-O-メチルトランスフェラーゼ（NEB）の付加を使用して、Cap1構造を酵素的に導入した。その後、RNAをセルソースに基づくクロマトグラフィーによるさらなる精製手順に供して、二本鎖RNA夾雑物を除去した（Day PRら、Phytopathology 67：1393頁（1977）；Morris TJら、Phytopathology 69：854～858頁（1979）；およびCastillo Aら、Virol J. 8：38（2011）を参照されたい）。RNAの濃度および質を、それぞれ、分光光度法により評定し、キャピラリーゲル電気泳動により分析した。Karikoら、Nucleic Acids Res. 39（21）：e142（2011）に記載されているように、dsRNA特異的J2 mAb（English & Scientific Consulting）を使用するノースウェスタンドットプロットアッセイで、dsRNAの存在を評定した。

【0285】

mRNAコドン最適化：タンパク質のコード配列は、タンパク質翻訳の効率はもちろん、精度にも影響を及ぼすことがある（Bossi Lら、Nature. 286（5769）：123～7頁（1980）およびIrwinら、J Biol Chem. 270（39）：22801～6頁（1995）を参照されたい）。

【0286】

それ故、各標的の異なるコドンバリエントを設計し、試験した。各標的についての異なるコドンバリエントの設計には、Life Technologies GmbHからの公開ソフトウェアGeneArt（登録商標）（Regensburg, Germany）（Raab Dら、Syst Synth Biol. 4（3）：215～25頁（2010）を参照されたい）およびEurofins MWG Operon（Ebersber

10

20

30

40

50

g、Germany)からの公開ソフトウェアを利用した。加えて、コドン最適化を手動で行って、各コドンをもとに編集した。野生型配列に匹敵するGC含有量を最適化工程中に維持した。

【0287】

構築物の評価および選択は、(i) HEK293T/17細胞のmRNAリポフェクションおよび(ii) K562細胞のmRNAエレクトロポレーションを使用して行った*in vitro*発現によって決定した。

【0288】

4万(40,000)個のHEK293T/17細胞(ATCC(登録商標)CRL-11268(商標))を、平底96ウェルプレート(VWR International、カタログ番号734-1794)における、0.5%FBS(Biochrom、カタログ番号S0115)を含有する、DMEM、高グルコース、GlutaMAX(商標)(Life technologies、カタログ番号31966047)に、播種した。96ウェルプレート内の播種細胞を37℃、7.5%CO₂で16~18時間インキュベートした。RNAse不含1.5mlセーフロックチューブバイオピュア(Eppendorf、Germany、カタログ番号0030121589)においてトランスフェクション試薬1.2μlをOptiMEM(Thermo Fisher、カタログ番号31985070)20μlに添加することにより、Lipofectamine Messenger MAX試薬(Invitrogen、カタログ番号LMRNA)を製造業者の手順書に従って使用して、接着HEK293T/17細胞にRNAをトランスフェクトした；第2のチューブにおいて、示したRNAをOptiMEM 20μlに添加した。10分のインキュベーション後、RNAが入っているチューブをLipofectamine Messenger MAXが入っているチューブに移して希釈し、さらに5分インキュベートした後、培地100μl中のHEK293T/17細胞層が入っている、96ウェルプレートの1つのウェルに、RNA-脂質複合体10μlを滴下した。このRNA-脂質複合体10μlは、標的RNA 5ng、25ngおよび100ngをそれぞれ含有した。プレートをインキュベーター内に3時間置いた後、追加の新鮮培地(DMEM+0.5%FBS)140μlを添加した。トランスフェクトされた細胞を15~18時間インキュベートし、上清を回収し、本明細書の中で説明するようにELISAによってタンパク質含有量を分析した。

【0289】

慢性骨髄性白血病由来のヒト細胞株であるK562(ATCC(登録商標)CCL-243(商標))を、5%FBSを補充した、RPMI 1640培地、GlutaMAX(商標)(Life technologies、カタログ番号61870-044)において培養した。K562を96ウェルプレートシステムで次のようにエレクトロポレーションした。細胞をX-VIVO15培地(Lonza、カタログ番号BE02-060Q)で1回洗浄し、細胞25万(250,000)個/150μlの最終濃度になるようにX-VIVO15に浮遊させた。細胞浮遊液150μlを、RNA 5ng、25ngおよび100ngが入っている96ウェルプレートのウェルごとに添加した。細胞とRNAを混合し、Bioradからの96ウェルGene Pulser MX細胞エレクトロポレーションシステム(250V、パルス1×30ms)でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの直後に、細胞を、抗生物質不含の新鮮培地が入っている新たな培養プレートに移し、1時間、37℃のインキュベーター内に静置した。0.5%FCSを補充した新鮮RPMI 1640 GlutaMAXに培地を交換し、15~18時間インキュベートした。上清を回収し、本明細書の中で説明するようにELISAによってタンパク質含有量について分析した。

【0290】

タンパク質濃度を、RNAにコードされたサイトカインに特異的なELISAにより製造業者の手順書に従って判定した。(i) ヒトIL-15 sushi/IL-15 sushi R alpha Complex DuoSet ELISA(ii) マウスIL

10

20

30

40

50

－12sc Duo Set Development System (DY419-05) (iii) マウスGM-CSF DuoSet ELISA Development Systems (DY415) (すべて、RnD systemsから入手した)、およびマウスIFN α ELISA Kit (TCM) (PBL assay science、42120-2)。

【0291】

mRNA 標的ごとに、タンパク質発現を、wt 配列および種々のコドン最適化バリエーションについて評価した。3つの異なる量の修飾RNAを用いて各々試験したHEK293T／17のリポフェクションおよびK562のエレクトロポレーションからの両方のデータセットを、タンパク質コード配列の選択のために考慮した。コドン最適化配列は、WT配列と比較して少なくとも1.5倍のタンパク質発現増加が測定された場合に選択した。そうでなかった場合には、WT配列を選択した。すべての構築物について、WTアミノ酸を保存しつつDNA認識配列(5'-CTCTTC-3')を変異させることによりEarI制限配列を除去した。

【0292】

細胞株：HEK293(ATCC CRL-1573)細胞株、ならびにヒトメラノーマ細胞株A101D(ATCC CRL-7798)、A375(ATCC CRL-1619)、A2058(ATCC CRL-11147)およびHs294T(ATCC HTB-140)をATCCから入手し、10%FBS HI FBS(Life Technologies、カタログ10082)を補充したDMEM(ThermoFisher Scientific、カタログ11885-084)において5%CO₂の加湿雰囲気、37℃で培養した。

【0293】

mRNAトランスフェクション：Lipofectamine Messenger MAX試薬(Invitrogen、カタログ番号LMRNA001)を製造業者の手順書に従って使用して細胞にトランスフェクトした。簡単に言うと、ウェルごとに、トランスフェクション試薬0.3 μ lをOpti-MEM培地(Life Technologies、カタログ31985062)5 μ lで希釈し、10分間、室温でインキュベートし；mRNA混合物をOpti-MEM培地(1ウェル当たり5 μ l)で希釈し、希釈したMessengerMax試薬と混合し、5分間、室温でインキュベートし、96ウェルプレートに分取した。細胞を完全増殖培地で希釈し、1ウェル当たり細胞40,000個をトランスフェクション混合物に添加した。細胞を24時間、37℃でCO₂インキュベーターにおいてインキュベートし、次いで培地を回収し、サイトカイン濃度をMeso Scale Discovery(MDS)アッセイにより判定した。

【0294】

Meso Scale Discoveryアッセイ：サイトカイン濃度は、MSDアッセイ：IL12p70についてはProinflammatory Panel 1(ヒト)MSDキット(カタログN05049A-1)、GM-CSFとIL-15 sush iについてはCytokine Panel 1(ヒト)MSDキット(カタログN05050A-1)、およびIFN α についてはHuman IFN- α 2a Ultra-sensitiveキット(カタログN05050A-1)を使用して、判定した。データは、MSD Discovery Workbench V.4.0.12ソフトウェアおよびGraphPad Prism V.6.00ソフトウェアを使用して解析した。

【0295】

PBMC単離および処置：末梢血単核細胞(PBMCs)を、ロイコパック(Research Blood Components)から密度勾配媒体(Ficoll-Paque)により単離した。96ウェルプレートの1ウェルにつき600,000個のPBMCを添加した。細胞をサイトカイン混合物で24時間処理し、ヒトIFN γ 384-Tissue Culture MSDアッセイを使用して細胞培養培地におけるIFN γ 産生

10

20

30

40

50

を測定した。

【0296】

CD8応答の測定：B16F10腫瘍担持マウスに、Immuno mRNA (IFN α 、IL-15 sush i、GM-CSFおよびIL-12sc、Mod B) または対照ルシフェラーゼmRNA (プラセボ) の単回腫瘍内注射を施した。腫瘍内mRNA注射の7日後、腫瘍を摘出し、免疫蛍光検査のために処理し、CD8について抗体で染色した (灰色)。図25に示すように、CD8細胞は、サイトカインmRNA腫瘍内注射後に存在した。

【0297】

in vivo研究のためのmRNAの調製：水の中で等量 (マイクログラム) のmRNAを所期の2倍の用量で混合することによりin vivo研究のためのそれぞれのmRNA混合物を調製した。そのmRNA混合物を、-80℃で、腫瘍内注射日まで凍結しておいた。注射当日に、mRNAを解凍し、等体積の2X無菌リンゲル液と混合した。得られた1X mRNA/リンゲル液を腫瘍内注射に使用した。

【0298】

遺伝子発現分析：Precellys 24ホモジナイザー (Bertin Instruments) を使用して、A375腫瘍をRLT緩衝液 (Qiagen) 中で均質化した。DNase処理に関する回転手順書に従ってRNeasy-96 Kit (Qiagen) を用いて、全RNAを単離した。RNAをヌクレアーゼ不含有水で溶離し、NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) を使用して紫外吸光度により定量した。High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems) を製造業者の推奨手順に従って用いて、cDNA合成を行った。標準手順書に従ってViia (商標) 7 (Applied Biosystems) でリアルタイムPCRを行った。増幅は、TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) および予め指定されたTaqman Assays (Applied Biosystems) を使用して行った。遺伝子発現を内在性対照GAPDHに正規化した。比較ddCT法を使用して、遺伝子発現を評価した。

【0299】

【表29】

表3

遺伝子	アッセイID	ロット番号	蛍光色素
ISG15	Hs01921425_s1	1548867	FAM
ISG54	Hs01922738_s1	1532771	FAM
Mx1	Hs00895608_m1	1539223	FAM
hGAPDH	4326317E	1311049	VIC

【実施例2】

【0300】

3つのmRNAの組合せはin vivoで腫瘍体積を低減させる

GM-CSF、IL-2およびIL-12scをコードする修飾mRNAの混合物をB16F10腫瘍担持マウスに注射し、腫瘍成長を41日目までモニターした。図1に示すように、Mod Aを有する、GM-CSF、IL-2およびIL-12scをコードする3つのmRNA (配列番号32、38および56; 図1) の組合せ、またはMod Bを有する、GM-CSF、IL-2およびIL-12scをコードする3つのmRNA (配列番号35、41および59; 図1B) の組合せの腫瘍内注射は、マウス10匹のうちの6

匹において退縮を誘導したが、ルシフェラーゼをコードする対照mRNA (Mod A) で処置したマウスは、動物10匹のうちの1匹において腫瘍退縮を示した (図1C)。これらのデータを同様のデザインの反復研究 (図1D~1G) で確認した。反復実験では、Mod AまたはMod Bを有するサイトカインmRNA (GM-CSF、IL-2、IL-12sc) の混合物は、マウス9匹のうち5匹において腫瘍退縮をもたらしたが、Mod AおよびMod Bでの対照mRNAを用いる処置は、それぞれ、9匹のうち2匹、および9匹のうち0匹において腫瘍退縮を示した。

【0301】

サイトカインmRNA処置の効果をCT26腫瘍において評価した。CT26腫瘍が樹立されたマウスに、Mod AおよびMod B形式でのGM-CSF、IL-2およびIL-12scをコードするサイトカインmRNA混合物をそれぞれ注射した。次の2つの対照群を含めた：i) mRNAリングル希釈液およびii) ホタルルシフェラーゼをコードするMod A mRNA。合計6回の腫瘍内注射を第19、21、24、26、28および31日目に投与した。図2に示すように、GM-CSF、IL-2およびIL-12sc mRNA Mod A (配列番号56、32および38；図2A) とMod B (配列番号59、35および41；図2B) の両方は、マウス8匹のうちのそれぞれ5匹および6匹において腫瘍退縮を生じさせる結果となったが、Mod Aでの対照mRNAで処置した腫瘍 (図2C) も、リングル液で処置した腫瘍 (図2D) も、腫瘍退縮を示さなかった。

【0302】

IL-15 sushi、GM-CSFおよびIL-12sc (Mod B；配列番号53、59および41) ならびにIL-2、GM-CSFおよびIL-12sc (Mod B；配列番号35、59および41) をコードするサイトカインmRNA混合物を、CT26腫瘍モデルにおいて抗腫瘍活性について評価した。腫瘍接種後13、15、18、20および22日目に、腫瘍に腫瘍内mRNA注射を施した。図3に示すように、IL-2混合物 (図3A) またはIL-15 sushi混合物 (図3B) のどちらかの腫瘍内注射は、それぞれ、担腫瘍動物10または11匹のうちの5匹において腫瘍退縮を生じさせる結果となった (図3Aおよび3B) が、ルシフェラーゼmRNA (Mod B) を注射した対照群では、腫瘍退縮は観察されなかった (図3C)。

【0303】

IL-2、IL-12scおよびGM-CSFのmRNA混合物 (図4A-Mod A [配列番号32、38および56]、4B-Mod B [配列番号35、41および59])、またはIL-15 sushi、IL-12scおよびGM-CSFのmRNA混合物 (図4C-Mod A [配列番号50、38および56]、4D-Mod B [配列番号53、41および59]) の抗腫瘍活性を、B16F10腫瘍モデルにおいてさらに評価した。B16F10腫瘍を有するマウスに、11、13、15および17日目にmRNAを腫瘍内注射した。IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFをコードするサイトカインmRNA混合物でのB16F10腫瘍の処置は、Mod AおよびMod Bで、マウス8匹のうちそれぞれ3匹および4匹において腫瘍退縮を生じさせる結果となった。IL-2、IL-12scおよびGM-CSFのmRNA混合物 (Mod AまたはMod B) で処置した腫瘍は、マウス8匹のうちの4匹において腫瘍退縮を有したが、ルシフェラーゼをコードするMod AまたはMod B mRNAで処置したマウスについて腫瘍退縮は認められなかった (図4E-Mod A、図4F-Mod B)。

【実施例3】

【0304】

4つのmRNAの組合せはin vivoで腫瘍体積を低減させる

本発明者らは、次に、サイトカインmRNA混合物に第4のmRNAを加えることの効果を試験した。B16F10腫瘍担持マウスに、i) GM-CSF、IL-2、IL-12sc (配列番号59、35および41；図5A)、ii) GM-CSF、IL-15 sushi、IL-12sc (配列番号59、53および41；図5B) およびiii) GM-CSF、IL-15 sushi、IL-12sc、IFN α (配列番号59、5

10

20

30

40

50

3、41および47；図5C）をコードするModBサイトカインmRNA混合物の4回の腫瘍内注射を施し、腫瘍成長を45日目までモニターした。サイトカインmRNA混合物の各々には抗腫瘍効果があり、GM-CSFとIL-2とIL-12scのまたはGM-CSFとIL-15 sush iとIL-12scとのサイトカインmRNA混合物の腫瘍内注射後に腫瘍8個のうちの4個が退縮し、GM-CSF、IL-15 sush i、IL-12scおよびIFN α での処置時には腫瘍8個のうちの7個が退縮した。対照mRNA（ModB）で処置したマウスは、腫瘍退縮を示さなかった（図5D）。

【0305】

GM-CSF、IL-2、IL-12scおよびIFN α の抗腫瘍活性を、3つの異なるマウスin vivo腫瘍モデル、CT26、B16F10およびMC38において検査した。担腫瘍マウスに、IL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （配列番号35、41、59および47）をコードするModBサイトカインmRNA、またはホタルルシフェラーゼをコードする対照ModB mRNAの、4～6回の腫瘍内注射を施した。抗腫瘍活性を各腫瘍モデルにおいて評価した。サイトカインmRNAのこの組合せで処置したマウスは、CT26（図6A）、B16F10（図6C）およびMC38（図6E）モデルにおいて、それぞれ、4/8、7/8および5/5の退行性腫瘍を有した。ルシフェラーゼmRNAで処置した比較対照担腫瘍マウスでは腫瘍退縮は観察されなかった（図6B [CT26]、6D [B16F10]、および6F [MC38]）。

【0306】

IL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB、配列番号35、41、59および47）またはIL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB、配列番号53、41、59および47）の各々をコードする4成分サイトカインmRNA混合物の抗腫瘍活性を、CT26腫瘍モデルにおいて評価した。担腫瘍マウスを6回の腫瘍内注射で処置し、腫瘍成長をモニターした。IL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （図7A）と、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （図7B）の両方での処置は、それぞれ、マウス4/8匹および8/8匹において腫瘍退縮を有効に誘導したが、対照mRNAで処置したマウスについては腫瘍退縮は観察されなかった（図7C）。これらのデータを同様のデザインの反復研究（図7D～F）で確認した。

【0307】

CT26腫瘍モデルにおいて、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB、配列番号53、41、59および47）のmRNA混合物から個々の成分を系統的に除去する研究を行った。CT26腫瘍に、接種後12、15、19および22日目にサイトカインmRNAを注射した。IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α をコードするmRNAの4回の注射で処置した腫瘍は、処置した腫瘍10個すべてにおいて退縮を誘導した（図8A）。i) IL-15 sush i、IL-12scおよびIFN α の、ii) IL-15 sush i、GM-CSFおよびIFN α の、iii) IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α の、iv) IL-15 sush i、IL-12scおよびGM-CSFの、ModB mRNA混合物で処置した腫瘍は、腫瘍10個のうちのそれぞれ8、6、8、7個の退縮を生じさせる結果となった（図8B～E）。対照mRNA（ModB）で処置した腫瘍は、腫瘍退縮を示さなかった（図8F）。腫瘍成長動態を分析するために、平均腫瘍体積を処置群ごとに33日目まで計算した（図8G）。最小平均腫瘍体積は、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α の混合物で処置したマウスについて観察され、その一方で、最大平均腫瘍体積は、ルシフェラーゼ処置動物において観察された。腫瘍成長抑制T/C（平均腫瘍体積の基づく、腫瘍/対照）を、処置群の各々について19日目までプロットした（図8H）。IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α の4成分混合物は、最大T/Cを示した。

【0308】

図8に示す研究に類似した研究を行い、この研究では、IL-2、IL-12sc、G

10

20

30

40

50

M-C S FおよびI F N α (M o d B ; 配列番号35、41、59および47)のm R N A混合物から個々の成分を系統的に除去した。C T 2 6腫瘍に合計6回の腫瘍内m R N A注射を第19、21、23、26、28および30日目に施した。I L - 2、I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α のサイトカインm R N A混合物での処置は、動物10匹のうち4匹において腫瘍退縮を生じさせる結果となり、動物4匹において完全腫瘍退縮を、個体2匹において40日目を超えて病状安定をもたらした(図9A)。i) I L - 2、I L - 1 2 s cおよびI F N α の、ii) I L - 2、G M - C S FおよびI F N α の、iii) I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α の、ならびにiv) I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI L - 2の、M o d B 3成分m R N A混合物で処置した腫瘍は、それぞれ、腫瘍2、3、3および4個の退縮を生じさせる結果となり(図9B~E)、対照ルシフェラーゼm R N Aで処置したC T 2 6腫瘍は、腫瘍退縮を示さなかった(図9F)。

10

【0309】

腫瘍成長動態を分析するために、平均腫瘍体積を処置群ごとに36日目まで計算した。最小平均腫瘍体積は、I L - 2、I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α の混合物で処置したマウスについて観察され、その一方で、最大平均腫瘍体積は、ルシフェラーゼ処置動物において観察された(図10A)。腫瘍成長抑制T/C(平均腫瘍体積の基づく、腫瘍/対照)を、処置群の各々について30日目までプロットした(図10B)。I L - 2、I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α の4成分混合物は、最大T/Cを示した。

20

【0310】

図9における異なるサイトカインm R N A混合物からの抗腫瘍応答を、次のようにさらに分析した：実験の終了のまたは停止時の測定値(V_t)と実験の開始時の測定値(V_b)との腫瘍体積の差によって定義される腫瘍体積変化(ΔV)($\Delta V = V_t - V_b$)を、4成分サイトカインm R N A混合物(I L - 2、I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α)で処置したマウス、4つのサイトカインのうちの1つが欠けている3成分混合物で処置したマウス、および対照ルシフェラーゼm R N Aで処置したマウスを含む、6つの処置群の各々におけるすべてのマウスについて計算した。腫瘍体積変化に関するトリミングしたデータ(元データの上10%と下10%を除去)の平均(μ)および標準偏差(σ)を対照ルシフェラーゼ群について計算し、このトリミングしたデータのシャピロウィルク正規性検定は、そのデータが、正規分布にほぼ従うことを示した。次いで、Zスコア($Z = (\Delta V - \mu) / \sigma$)を、すべての処置群からの個々のマウス各々に関する腫瘍体積変化データについて計算した。各腫瘍体積変化値と対照群のトリミングした平均との間の比(R)を計算した($R = \Delta V / \mu$)。定義を考慮して、本発明者らは、Zスコアを「腫瘍体積低減の有意性」と考え、Rを「腫瘍体積低減の程度」と考えた。対照ルシフェラーゼ群におけるものより有意に小さい腫瘍体積増加(言い換えると、対照群と比較して「有意な腫瘍低減」)を示すマウスを同定するために、 $Z \leq -1.645$ ($p(Z \leq -1.645) = 0.05$)および $R \leq 0.15$ のカットオフを適用した。結果は、対照群より有意に小さい腫瘍体積増加を有する各処置群におけるマウスの数を、次のように示した：i) I L - 2、I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α (M o d B)のサイトカインm R N A混合物についてはマウス8匹のうちの6匹、ii) I L - 2、G M - C S FおよびI F N α (M o d B)についてはマウス8匹のうちの2匹、iii) I L - 1 2 s c、G M - C S FおよびI F N α 、ならびにI L - 2、I L - 1 2 s cおよびI F N α については、8匹のうちの3匹、およびiv) I L - 2、I L - 1 2 s cおよびG M - C S F(M o d B)のサイトカインm R N A混合物で処置したマウス8匹のうちの4匹(図11)。

30

40

【0311】

雌C 5 7 B L / 6 Jマウスに、上で説明したようにB 1 6 F 1 0細胞を移植した。11、15、19および23日目におけるM o d Bサイトカインm R N A混合物(I L - 1 5 s u s h i、I L - 1 2 s c、G M - C S F、I F N α)または対照ルシフェラーゼm R N Aの4回の腫瘍内注射(m R N A 8 μ g/標的ごとに2 μ g)で、マウスを処置した

50

。サイトカインmRNAの4成分混合物での処置は、処置したマウス6／10匹において腫瘍拒絶が生じる結果となった。図24Bを参照されたい。比較して、単一のmRNAで処置したいずれの群においても無腫瘍マウスは観察されなかった（図24C～F）。IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSF、IFN α の組合せは、全生存率上昇をもたらし、70日目に腫瘍のないマウスについて60%であったが、単一のサイトカインmRNAで処置したマウスのすべての腫瘍は、動物に安楽死を施す必要がある病期まで進行した（図24G）。ルシフェラーゼ対照を図24Aに示す。

【実施例4】

【0312】

サイトカインmRNAは腫瘍再負荷から保護する

免疫学的記憶の発生に対するサイトカインmRNA混合物の効果を評価するために、再負荷実験を行った。簡単に言うと、B16F10腫瘍担持マウスを、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物で処置した。サイトカインmRNA処置B16F10腫瘍の一部分は完全に退縮し、無腫瘍動物をもたらした。次いで、これらの無腫瘍動物に、適応免疫記憶を評定する手段としてB16F10細胞を再負荷し、腫瘍生着の正の対照として、無処置マウス9匹にB16F10腫瘍細胞を移植した（図12A）。B16F10細胞を生着させたマウス9匹すべてが腫瘍を発生したが、無腫瘍マウス8匹すべては、B16F10細胞を拒絶し、B16F10腫瘍の成長を示さなかった（図12B）。サイトカインmRNAで以前に処置したマウスの一部分は、最初の腫瘍部位に局限性白斑を発症した（図12C）。この実験を本質的に反復した。結果を図33に示す。

【0313】

免疫学的記憶の発生に対するサイトカインmRNA混合物の効果を評価するために、CT26腫瘍モデルを使用して再負荷実験を行った。したがって、CT26腫瘍担持マウスを、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物で処置した。サイトカインmRNA処置CT26腫瘍の一部分は完全に退縮し、無腫瘍動物をもたらした。次いで、無腫瘍動物3匹にCT26腫瘍細胞を再負荷し、次いで、無腫瘍動物3匹に、gp70エピトープをノックアウトしたCT26腫瘍細胞（CT26- Δ gp70）を再負荷した。腫瘍生着の正の対照として、無処置マウスそれぞれ9および10匹にCT26腫瘍細胞およびCT26- Δ gp70を移植した。腫瘍接種後21日目に、CT26腫瘍細胞を生着させた無処置マウス9匹のうちの8匹が腫瘍を発現し、CT26- Δ gp70腫瘍細胞を生着させた無処置マウス10匹すべてが腫瘍を発現したが、各群内の無腫瘍マウス3匹すべてが、CT26およびCT26- Δ gp70細胞をそれぞれ拒絶し、CT26腫瘍およびCT26- Δ gp70の成長をそれぞれ示さなかった（図12D）。この実験は、CT26腫瘍モデルにおけるサイトカインmRNA注射時の免疫学的記憶が、免疫優性エピトープgp70に特異的なT細胞に限定されないことを示す。

【実施例5】

【0314】

サイトカインmRNAの全身性抗腫瘍活性

全身性抗腫瘍応答を発揮する局所腫瘍内サイトカインmRNAの能力を評価するために、マウスの左右両方の側腹部にB16F10腫瘍細胞を生着させた（図13A）。両側B16F10腫瘍を担持しているマウスに、ルシフェラーゼをコードする対照mRNA、またはIL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）をコードするサイトカインmRNA混合物の、4回の腫瘍内注射を施した。右側の腫瘍にmRNAを3つの異なる用量レベル（20 μ g、2 μ gおよび0.2 μ g mRNA／標的に対応する、80 μ g、8 μ gおよび0.8 μ g mRNA）で注射したが、左側腹部の腫瘍を処置しなかった。用量依存的な抗腫瘍活性が、注射を施した腫瘍（図13B）と未注射の腫瘍（図13C）の両方で観察され、腫瘍成長阻害は、未注射の腫瘍における88%から注射を施した腫瘍における96%に及

んだ。サイトカインmRNA処置で処置した群には、ルシフェラーゼ対照mRNAで処置した群と比較して生存率中央値上昇があった（図13D）。

【0315】

全身性抗腫瘍応答を発揮する局所腫瘍内サイトカインmRNAの能力をさらに評価するために、マウスの右側腹部にB16F10腫瘍細胞を生着させ、肺における腫瘍の誘導のためにルシフェラーゼ発現B16F10細胞のIV注射を施した（図19A）。SC腫瘍移植後11、14および18日目に、B16F10腫瘍を担持しているマウスの側腹部の腫瘍のみに、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の合計3回の腫瘍内注射を施したが、肺における腫瘍は処置しなかった。対照群には、いずれのコード配列も有さない等量の対照mRNAの腫瘍内注射を施した。マウスを20日目にエンドポイント分析のために殺し、このときに肺を摘出し、計量した。図19Bは、動物4匹の生物発光測定、および暗色の腫瘍結節を可視化するための摘出した相応する肺の写真を、例として示す。SC腫瘍の腫瘍成長は、サイトカインmRNA混合物の注射によって強く抑制されたが、対照mRNAを注射した腫瘍は、各群内のマウス15匹の平均腫瘍体積を示す図19Cに描示されている通り、漸進的に成長した。肺腫瘍成長は、SC腫瘍の場合、腫瘍内サイトカインmRNA注射を施した動物では、対照mRNAで処置した動物と比較して抑制された；図19Dは、20日目の1群当たり15匹の動物すべてについての生物発光測定の全光束分析を示し、この全光束は、ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞に起因する腫瘍量と相関するものであり；線は、中央値を示し、アスタリスクは、T検定により分析した $p < 0.05$ を示す。加えて、サイトカインmRNAで処置した動物の肺のほうが、有意に軽い重量を有した（図19E、線は中央値を示す）。対照RNAで処置した動物の肺のより重い重量は、より多い腫瘍量に起因した。

【実施例6】

【0316】

ヒトサイトカインmRNA

ヒトサイトカインmRNAの*in vitro*発現を評価するために、ヒトサイトカインIL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（配列番号26、18、29および23）（ModB）をコードするmRNA混合物を、4つのメラノーマ腫瘍細胞株（A375、A101D、A2058およびHs294T）に加えてHEK293細胞株にトランスフェクトした（図14A）。サイトカインmRNA混合物は、5つのヒト細胞株のパネルにわたって用量依存的発現および分泌を示した（図14B～F）。

【0317】

IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2bのヒトmRNA混合物の薬力学的効果を、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いて*in vitro*で評価した。手短に言えば、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（ModB）のヒトサイトカインmRNA混合物、またはIL-12sc、IFN α 2b、IL-15 sushiもしくはGM-CSF（ModB）をコードする個々のサイトカインmRNAを、HEK293細胞内にトランスフェクトし、条件培地を24時間の時点で回収し、希釈し、ヒトPBMCに添加した（図15A）。IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2bのサイトカインmRNA混合物で処置したドナー6名からのIFN γ レベル中央値は、5623 pg/mLであったが、IL-12sc、IFN α 2b、IL-15 sushiまたはGM-CSFの個々のサイトカインmRNAでの処置は、それぞれ、534、67、17および4 pg/mLのIFN γ レベル中央値を誘導した（図15B）。

【0318】

IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（ModB）ならびにIL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（ModB）のヒトサイトカインmRNA混合物の*in vivo*発現を、A375ヒトメラノーマ異

10

20

30

40

50

種移植片においてモニターした。担腫瘍マウスにサイトカインmRNAの単回注射を施し、mRNA注射後2時間、4時間、8時間、24時間、48時間および72時間の時点で腫瘍試料を採取した。腫瘍溶解物を調製し、個々のヒトサイトカインIFN α 2b（図16A）、IL-2（図16B）、IL-12sc（図16C）、IL-15 sushi（図16D）、GM-CSF（図16E）の発現を評価した。

【0319】

時間依存的発現が、個々のサイトカイン各々について観察され、最大濃度（Cmax）は、IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2bの混合物（表4）ならびにIL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2bの混合物（表5）について2～8時間の間に発生した。

【0320】

【表30】

表4：IL-15 sushi 混合物についての薬物動態結果

腫瘍	GM-CSF	IFN α 2b	IL-12sc	IL-15sushi
t _{1/2} (時間)	12.4	9.59	15.2	10.2
Tmax(時間)	4	4	8	4
Cmax (pg/mg)	1591	4862	3767	2639

【0321】

【表31】

表5：IL-2混合物についての薬物動態結果

腫瘍	GM-CSF	IFN α 2b	IL-12sc	IL-2
t _{1/2} (時間)	14.8	10.2	15.5	12.8
Tmax(時間)	2	2	8	2
Cmax (pg/mg)	2487	10685	4961	4274

【0322】

IL-15 sushi、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（Mod B）ならびにIL-2、IL-12sc、GM-CSFおよびIFN α 2b（Mod B）のサイトカインmRNA混合物のmRNA注射後2時間、4時間、8時間、24時間、48時間および72時間の時点で、薬力学的マーカーとしてのヒトインターフェロンアルファ遺伝子ISG15、ISG54およびMX1の導入を、A375腫瘍においてモニターした。対照処置腫瘍と比較して、サイトカインmRNAで処置したA375腫瘍は、ISG15（図17A）、ISG54（図17B）およびMX1（図17C）の100倍を超える誘導を示し、腫瘍内mRNA注射後8時間までにピーク誘導が発生した。

【実施例7】

【0323】

インターフェロン効果

B16F10腫瘍担持マウスに、IL-2、Flt3リガンド（FLT3L）、41BBL（CD137Lまたは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー9としても公知）およびCD27L-CD40L（これは、CD70としても公知のCD27Lの可溶性ドメインとCD40Lの可溶性ドメインの融合タンパク質を含み；CD27LとCD40Lの

10

20

30

40

50

両方が、CD27LまたはCD40Lのどちらかの3つの可溶性ドメインを含み、これらの可溶性ドメインのすべてが、GS-リンカー配列によって隔てられている（図18A、配列番号32、62、68、および74）をコードするModA（「標準」）サイトカインmRNA、またはIL-2、FLT3L、41BBLおよびCD27L-CD40L（図18B、配列番号35、65、71、および77）をコードするModB（「修飾」）サイトカインmRNAの腫瘍内注射を施した。加えて、IFN α をコードするModA mRNA（配列番号44）、またはIFN α をコードするModB mRNA（配列番号47）のどちらかを、それぞれ、ModAまたはModB mRNA混合物に加えた（図18Dおよび18E）。抗腫瘍活性を評定した。

【0324】

ModA mRNAのこの組合せで処置したマウスは、IFN α がないとマウス4/9匹が無腫瘍であり（図18B）、IFN α があるとマウス3/9匹が無腫瘍であった（図18D）。それ故、IFN α mRNAでの処置は、mRNAをModA形態で投与したとき、サイトカインに対する応答を増大させないように見えた。

【0325】

対照的に、ModB mRNAの組合せで処置したマウスは、IFN α がないとマウス1/9匹が無腫瘍であり（図18C）、IFN α があるとマウス7/9匹が無腫瘍であった（図18E）。したがって、IFN α mRNAでの処置は、mRNAをModB形態で投与したとき、サイトカインの混合物に対する応答を増大させた。

【実施例8】

【0326】

抗体と組み合わせたサイトカインmRNA

抗体の全身投与と組み合わせたサイトカインmRNAの腫瘍内注射の効果を評価するために、マウスの左右両方の側腹部にB16F10またはMC38腫瘍細胞を生着させた。マウスの側腹部の腫瘍の一方のみに、11、15、19、23日目に、IL-15 su sh i、IL-12 sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の4回の腫瘍内注射を施したが、他方の側腹部の腫瘍は、未処置のまま放置した。マウスには、10、13、16、19、22、25日目に、抗PD1抗体（5mg/kgでの、ラットIgG2a抗マウスPD-1クローンRMP1-14のSanofiマウス化バージョン）の腹腔内注射も施した。群は、次の通りであった：1）対照mRNA（全mRNA 80 μ g；1.6mg/mLでの50 μ L腫瘍内注射）、加えて、アイソタイプ抗体（クローンMOPC-21（BioLegend）；5mg/kg）；2）対照mRNA、加えて、抗PD1抗体；3）サイトカインmRNA、加えて、対照アイソタイプ抗体；および4）サイトカインmRNA、加えて、抗PD1。B16F10（図20A）およびMC38（図20B）腫瘍モデル両方において全生存率をモニターした。両方の腫瘍モデルにおいて、最高全生存率は、サイトカインmRNAと抗PD-1の組合せでの処置で観察され、この研究の終了時にB16F10担持マウスの60%およびMC38担持マウスの80%が無腫瘍であった。B16F10腫瘍モデルでは、抗PD-1またはサイトカインmRNA単独で処置したマウスの10%が無腫瘍であったが、MC38モデルでは、抗PD-1で処置したマウスの40%、およびサイトカイン単独で処置したマウスの30%が無腫瘍であった。これらの結果は、サイトカインmRNAと抗PD-1抗体の組合せに関連する強い抗腫瘍活性を示す。

【0327】

全身性抗腫瘍応答を発揮する、抗PD-1抗体と組み合わせた局所腫瘍内サイトカインmRNAの能力をさらに評価するために、マウスの右側腹部にB16F10腫瘍細胞を生着させ、翌日、肺転移誘導のためにルシフェラーゼ発現B16F10細胞のIV注射を施した。IV腫瘍移植後11、14および17日目に、B16F10腫瘍を担持しているマウスの側腹部の腫瘍のみに、IL-15 su sh i、IL-12 sc、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の合計3回の腫瘍内注射を施したが、肺における腫瘍は処置しなかった。同じ日

10

20

30

40

50

に、マウスには、抗PD-1抗体（10mg/kgでの、ラットIgG2a抗マウスPD-1クローンRMP1-14のSanofiマウス化バージョン）の腹腔内（IP）注射も施した。群は、次の通りであった：1）対照mRNA（全mRNA 40μg；対照アイソタイプ抗体（クローンMOPC-21（BioLegend）；10mg/kg）の50μL腫瘍内注射（図20C）；2）対照mRNA、加えて抗PD1抗体（図20D）；3）サイトカインmRNA、加えて、対照アイソタイプ抗体（図20E）；および4）サイトカインmRNA、加えて、抗PD1（図20F）。SC腫瘍の腫瘍成長をモニターし（図20C～F）、生存率もモニターした（図20G）。このモデルにおける全生存率は、SC腫瘍に起因する腫瘍量はもちろん、肺仮性転移腫瘍（lung pseudometastasis tumor）（この図には示されていない）に起因する腫瘍量にも左右され；一部のマウスでは、SC腫瘍は拒絶されたが、肺転移は徐々に増した。最高全生存率は、サイトカインmRNAと抗PD-1の組合せ処置で観察された。サイトカインmRNA単独で処置したマウスの6～7%は無腫瘍であったが、単独での抗PD-1、または対照mRNA+アイソタイプ抗体を施したマウスはすべて、高い腫瘍量のため、22日目に殺した。これらの結果は、肺疑似転移を有するこのB16F10腫瘍モデルにおけるサイトカインmRNAと抗PD-1抗体の組合せに関連する強い抗腫瘍活性を示すが、単独での抗PD-1抗体は、抗腫瘍活性を一切示さなかった。

【0328】

抗体の全身投与と組み合わせたサイトカインmRNAの腫瘍内注射の効果をさらに評価するために、マウスの右側腹部にCT26腫瘍細胞を生着させた。マウスに、腫瘍接種後11、14、18および21日目に、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFNα（ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の4回の腫瘍内注射を施した。同じ日に、マウスに、抗CTLA-4抗体（マウス1匹当たり100μg/200μL；InvivoMAbからのクローン9H10）またはアイソタイプ対照抗体（マウス1匹当たり100μg/200μL；BioXCellからのアルメニアハムスターIgG）の腹腔内（IP）注射も施した。群は、次の通りであった：1）サイトカインmRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21A）；2）サイトカインmRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体（図21B）；3）対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21C）および4）対照mRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体（図21D）。腫瘍内サイトカインmRNAとIP注射抗CTLA-4の併用療法は、最も強い抗腫瘍活性を生じさせる結果となり、腫瘍接種後55日目にマウス16匹のうちの12匹は無腫瘍マウスであった（図21A）。サイトカインmRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体（図21B）、または対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21C）のどちらかでの処置は、抗腫瘍活性を然程誘導せず、研究終了時に、無腫瘍マウスはそれぞれ5匹および7匹であった。比較して、対照mRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体を施した群（図21D）では、研究の終わりに無腫瘍マウスは1匹しか残存しなかった。

【0329】

抗CTLA-4抗体と組み合わせたサイトカインmRNAの腫瘍内注射の効果をさらに評価するために、マウスの右側腹部にB16F10腫瘍細胞を生着させた。マウスに、腫瘍接種後13、17および20日目に、IL-15 sush i、IL-12sc、GM-CSFおよびIFNα（ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の3回の腫瘍内注射を施した。腫瘍接種後13、17、20および24日目に、マウスに、抗CTLA-4抗体（マウス1匹当たり100μg/200μL；InvivoMAbからのクローン9H10）またはアイソタイプ対照抗体（マウス1匹当たり100μg/200μL；BioXCellからのアルメニアハムスターIgG）の腹腔内（IP）注射も施した。SC腫瘍の腫瘍成長はもちろん生存率もモニターした。群は、次の通りであった：1）サイトカインmRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21E）；2）サイトカインmRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体（図21F）；3）対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21G）および4）対照mRNA、加

えて、アイソタイプ対照抗体（図21H）。腫瘍内サイトカインmRNAとIP注射抗CTLA-4の併用療法は、最も強い抗腫瘍活性を生じさせる結果となり、腫瘍接種後60日目にマウス9匹のうちの6匹が無腫瘍マウスであった（図21E）。サイトカインmRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体での処置（図21F）は、抗腫瘍活性を然程誘導せず、マウス9匹のうち2匹が無腫瘍マウスであった。比較して、対照mRNA、加えて、抗CTLA-4抗体（図21G）または対照mRNA、加えて、アイソタイプ対照抗体（図21H）のどちらかを施した2群では、研究の終わりに無腫瘍マウスは残存しなかった。生存パーセントは、図21Iに描示されており、この図は、サイトカインmRNA単独で処置したマウスの33%が無腫瘍であった一方で、サイトカインmRNAと抗CTLA-4の組合せ処置では研究終了時（70日目）に腫瘍担持マウスについて67%である最高全生存率を示す。これらの結果は、単独での抗CTLA-4抗体が抗腫瘍活性を一切示さなかったこのB16F10腫瘍モデルにおいて、単独でのサイトカインmRNA、およびサイトカインmRNAと抗CTLA-4抗体の組合せに関連する、強い抗腫瘍活性を示す。

【実施例9】

【0330】

複数のがんの種類におけるmRNAサイトカイン注射

様々な種類のがんにおけるサイトカインmRNAの腫瘍内注射の効果を評価するために、5つの異種移植マウスモデル-KM12（CRC）、RPMI8226（骨髄腫）、NCI-N87（胃がん）、A375（メラノーマ）およびNCI-H1975（NSCLC）-を、実施例1で説明したように試験した。KM12（CRC）、RPMI8226（骨髄腫）、NCI-N87（胃がん）、A375（メラノーマ）、およびNCI-H1975（NSCLC）腫瘍を担持しているマウスに、IL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号26、18、29および23）のヒトサイトカインmRNA混合物 8 μ g（2 μ g／標的）の単回腫瘍内注射を施し、24時間の時点で腫瘍内のコードされたサイトカインを評価した。IL-15 *sushi*（図22D）、IL-12 *sc*（図22A）、GM-CSF（図22C）およびIFN α （図22B）の4つのサイトカインの各々についての発現が、異種移植モデル5つすべてにおいて検出され、NCI-H1975に関して観察されたサイトカインレベルが最も高く、これにA375、NCI-N87、RPMI8226、そしてKM12が続いた。

【実施例10】

【0331】

腫瘍内mRNAサイトカイン注射後のサイトカインの用量依存的血清中発現

コードされたサイトカインの発現に対する種々の腫瘍内mRNA用量の効果を、右側腹部に単一A375腫瘍を生着させたマウスの血清において検査した。マウスに、ヒトIL-15 *sushi*、IL-12 *sc*、GM-CSFおよびIFN α （ModB；配列番号26、18、29および23）のサイトカインmRNA混合物の単回腫瘍内注射を施した。腫瘍内mRNA注射後6時間の時点で血清を採取し、サイトカイン発現をMesoscale Discoveryアッセイによって分析した。mRNAにコードされたサイトカインの各々についての用量依存的発現が、80 μ g（20 μ g）の最高用量から0.0256 μ g（0.0064 μ g）の最低用量まで、血清中で観察された。結果を図23A～Dに示す。

【実施例11】

【0332】

サイトカインmRNAはgp70+CD8T細胞の発現をもたらす

一方の側腹部に単一のCT26腫瘍を担持しているマウスに、IL-15 *sushi*、GM-CSF、IFN α およびIL-12 *sc*（ModB；配列番号53、41、59および47）のサイトカインmRNA混合物の4回の腫瘍内注射を施した。初回腫瘍内mRNA投与の13日後に血液を採取し、gp70腫瘍抗原に対して特異的なT細胞をフローサイトメトリーにより定量した。血液中のgp70腫瘍抗原に対して特異的なT細胞の

10

20

30

40

50

出現頻度は、mRNA サイトカインの腫瘍内注射時のマウスにおいて、対照RNAを施したマウスと比較して強く増加された。

【実施例12】

【0333】

サイトカインmRNAは、複数の炎症誘発性経路を誘導し、処置した腫瘍においても、未処置の腫瘍においても、免疫浸潤を増加させる

左右側腹部にB16F10腫瘍を担持しているマウスの、細胞 0.5×10^6 個で発症させた右側の腫瘍に、mRNA $80 \mu\text{g}$ ($20 \mu\text{g}$ / 標的) の単回腫瘍内注射を施した (腫瘍を処置した) が、細胞 0.25×10^6 個で発症させた腫瘍は、未処置のままとした。mRNAの腫瘍内注射後7日の時点で、両方の腫瘍を採取し、RNAを単離し、RNA配列決定分析に供した。図27A~Cに示すように、IL-15 *sushi*、GM-CSF、IFN α およびIL-12 *sc* (配列番号59、53、41および47) のサイトカインmRNA混合物での処置は、様々なIFNガンマ応答遺伝子を含む複数の炎症誘発性経路を上方調節した。炎症誘発性 / IFNガンマ関連経路の上方調節は、処置した腫瘍においても、未処置の腫瘍においても発生し、これは、局所腫瘍内処置に全身性免疫調節効果があることを支持した。

【0334】

因果関係ネットワーク分析 (インジェヌイティー・パスウェイ・アナリシスツールの一部) を、被注射側腹部におけるサイトカインmRNA処置と対照との間で差次的に発現された遺伝子3298個 (1699個が上方調節、1599個が下方調節)、および未注射側腹部における遺伝子4973個 (2546個が上方調節、2427個が下方調節) に関して行って、観察された遺伝子発現変化を説明することができるシグナル伝達経路の変化を同定した。経路の変化を示すために、値の符号が変化の方向を示す (正の符号は活性化を示唆するが、負の符号は阻害を示唆する) Zスコアを計算した。

【0335】

IFNGにより調節される遺伝子328個の発現 (295個が上方調節、33個が下方調節) に関する階層的クラスタリングを、被注射腫瘍と未注射腫瘍の両方における対照mRNAで処置した試料およびサイトカインmRNAで処置した試料の両方に関して行った。試料全体にわたって各遺伝子の発現のZスコアを正規化した。類似度の尺度は、ピアソン相関係数に基づき、完全連結を使用してデンドログラムを生成した。表6を参照されたい。

【0336】

浸潤免疫細胞の相対的存在量は、免疫細胞型特異的遺伝子シグネチャーの平均発現を計算することによって決定した。

【0337】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 6

遺伝子	IFNG 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
ABI1	活性化する	1.6776	0.0073	0.0995	1.5218	0.0354	0.1551
ACOD1	活性化する	31.6293	3.9652E-06	0.0024	6.1017	0.0096	0.0911
ADGRG2	活性化する	1.8174	0.0248	0.2076	1.3902	0.2293	0.4662
ADORA2B	活性化する	2.9657	0.0044	0.0752	1.4261	0.352	0.6138
AIF1	活性化する	6.0406	0.0005	0.0201	4.7598	0.0032	0.057
AIM2	活性化する	9.9707	0.000085324	0.0086	3.4835	0.0276	0.1361
ANGPTL4	活性化する	2.0707	0.0293	0.2265	2.0904	0.0368	0.1586
APOL6	活性化する	10.3994	0.0017	0.0418	10.1341	0.0031	0.0564
APP	活性化する	2.0312	0.0006	0.0238	2.2382	0.0003	0.0276
ARFGAP3	活性化する	1.6535	0.0146	0.1517	1.0201	0.9237	1
ASS1	活性化する	3.5414	0.0084	0.1093	-1.0202	0.9668	1
ATF3	活性化する	5.5284	0.0006	0.0231	-1.1007	0.8409	1
B2M	活性化する	4.7005	0.000092097	0.0089	2.7946	0.0085	0.0859
BACH1	活性化する	2.2944	0.0098	0.1179	1.3281	0.3821	0.6482
BATF2	活性化する	4.0479	0.0211	0.1885	1.6468	0.4201	0.6889
BCL2L11	活性化する	4.2973	0.0057	0.0868	1.1465	0.7946	1
BCL3	活性化する	4.4411	0.0167	0.1639	2.5676	0.1413	0.3455
BLNK	活性化する	4.2753	0.0003	0.0158	3.2008	0.0044	0.0643
BST1	活性化する	16.9081	1.3371E-06	0.0016	6.6164	0.0007	0.0334
BTG1	活性化する	3.5307	0.0001	0.0102	-1.1775	0.5968	0.8607
C1QA	活性化する	5.3999	0.0029	0.0588	1.3506	0.5911	0.8558
C1QB	活性化する	5.955	0.0104	0.1219	3.531	0.0786	0.2408
C1QC	活性化する	6.2282	0.0009	0.0307	2.7013	0.0707	0.2284

【0 3 3 8】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
遺伝子						
C2	活性化する	2.2866	0.0367	0.2598	0.0242	0.1281
C3	活性化する	10.2057	0.0043	0.0734	0.0044	0.0648
C4B	活性化する	3.3143	0.0154	0.1562	0.5045	0.7768
C5AR1	活性化する	6.4343	0.000061281	0.0074	0.1729	0.3925
CAMK4	活性化する	2.5261	0.0011	0.0335	0.012	0.1009
CASP1	活性化する	8.2891	0.0079	0.1049	0.0214	0.1263
CASP4	活性化する	3.9281	0.0015	0.0389	0.5969	0.8608
CCL11	活性化する	6.225	0.0028	0.0579	0.0007	0.0334
CCL17	活性化する	3.9738	0.0268	0.2146	0.0868	0.2549
CCL2	活性化する	5.0444	0.0331	0.2446	0.4045	0.6716
CCL22	活性化する	5.4223	0.000050981	0.0069	0.002	0.0467
CCL3	活性化する	8.2215	0.0007	0.0259	0.0129	0.1045
CCL4	活性化する	8.7234	0.0008	0.0287	0.1042	0.2846
CCL5	活性化する	19.1375	0.000004935	0.0027	0.0004	0.0299
CCL7	活性化する	4.7053	0.0068	0.0952	0.6964	0.9457
CCL8	活性化する	9.3589	0.0113	0.1283	0.1286	0.3243
CCR1	活性化する	5.333	0.0012	0.0349	0.2823	0.5325
CCR2	活性化する	5.8007	0.0025	0.0546	0.1766	0.3975
CCR5	活性化する	10.8409	0.000010504	0.004	0.0025	0.0512
CCR2L2	活性化する	3.9822	0.002	0.0465	0.0056	0.071
CD14	活性化する	5.6413	0.0025	0.0546	0.5406	0.8104
CD2	活性化する	13.539	0.0001	0.0095	0.0138	0.1086
CD274	活性化する	11.0684	0.000096803	0.0091	0.038	0.1616
CD38	活性化する	5.5697	0.0005	0.0212	0.4221	0.6908
CD40	活性化する	11.0285	0.0003	0.0158	0.7201	0.9637
CD40LG	活性化する	3.1168	0.0068	0.0952	0.6673	0.9224
CD68	活性化する	6.1325	0.000040468	0.0063	0.0029	0.0544

【0 3 3 9】

10

20

30

40

50

【表 3 4】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH
CD74	活性化する	30.4684	0.00057089	0.0072	5.9291	0.0291	0.1392
CD80	活性化する	4.1003	0.0005	0.0217	3.5579	0.0026	0.0517
CD86	活性化する	6.3927	0.0008	0.027	8.2257	0.0004	0.0289
CDKN2A	活性化する	1.9017	0.0117	0.1312	-1.2679	0.3579	0.6202
CEBPB	活性化する	4.4389	0.0007	0.0253	2.1429	0.0784	0.2404
CELSR1	活性化する	1.6953	0.0001	0.0107	1.1455	0.3001	0.5534
CERS6	活性化する	2.2538	0.0064	0.0927	1.717	0.0763	0.2363
CFB	活性化する	9.003	0.0001	0.0109	6.2886	0.0018	0.0444
CH25H	活性化する	4.3757	0.007	0.097	1.9042	0.2435	0.4858
CHRNE	活性化する	1.6587	0.0293	0.2263	1.0536	0.8254	1
CIITA	活性化する	6.2751	0.0008	0.0287	2.736	0.0651	0.2172
CLEC2D	活性化する	4.9639	0.0002	0.0135	2.6567	0.0223	0.1263
CLEC4E	活性化する	25.396	2.9823E-07	0.001	7.0201	0.0009	0.0355
CLIC4	活性化する	2.2909	0.000025847	0.0053	1.4654	0.0399	0.1658
CMPPK2	活性化する	2.6988	0.0048	0.0785	1.9213	0.0687	0.2249
CORO1A	活性化する	5.8653	0.0076	0.1019	2.1612	0.2494	0.4929
CP	活性化する	2.7012	0.0222	0.1945	1.2703	0.5885	0.8544
CSF1	活性化する	5.3648	0.0071	0.0977	2.9314	0.0916	0.2624
CSF2	活性化する	2.4249	0.0053	0.0828	1.8261	0.0635	0.2145
CSF2RB	活性化する	7.8798	0.000014063	0.0041	3.3417	0.008	0.0833
CTSB	活性化する	2.9396	0.0192	0.1786	-1.5854	0.3271	0.5867
CTSD	活性化する	1.7662	0.0058	0.0873	1.5654	0.0351	0.1546
CTSH	活性化する	6.6723	0.0004	0.0189	3.0998	0.0341	0.1523
CTSS	活性化する	14.2913	0.000052305	0.0069	2.0554	0.2402	0.4813
CXCL1	活性化する	2.4631	0.0443	0.2909	2.3701	0.0679	0.223
CXCL10	活性化する	4.0615	0.0183	0.174	3.84	0.0314	0.1453
CXCL11	活性化する	6.3825	0.0032	0.0623	2.1745	0.2167	0.4494

【 0 3 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
遺伝子							
CXCL12	活性化する	4.1992	0.0099	0.1191	3.9497	0.0188	0.1263
CXCL16	活性化する	11.7476	0.000012898	0.0041	2.7724	0.052	0.1919
CXCL2	活性化する	17.8737	0.000065478	0.0076	2.0435	0.2897	0.5414
CXCL3	活性化する	2.5623	0.0157	0.1584	-1.1159	0.7808	1
CXCL9	活性化する	10.5652	0.002	0.0475	6.7433	0.0152	0.1139
CYBB	活性化する	10.2429	0.0001	0.0102	2.4115	0.1288	0.3246
CYLD	活性化する	2.1952	0.0005	0.0217	1.0366	0.8685	1
CYSLTR2	活性化する	4.6876	0.0015	0.0389	-1.3886	0.4896	0.7624
DAPK1	活性化する	2.9566	0.0202	0.1837	2.3734	0.0752	0.2341
DAXX	活性化する	2.5923	0.0255	0.2101	2.7152	0.0271	0.1349
DDIT3	活性化する	2.2027	0.0286	0.2233	2.4229	0.0212	0.1263
DDX58	活性化する	2.2084	0.0054	0.084	1.2566	0.422	0.6908
DPP4	活性化する	4.4101	0.047	0.3002	2.2805	0.2869	0.5383
DTX3L	活性化する	3.4716	0.000027857	0.0053	1.6387	0.0759	0.2356
EBI3	活性化する	5.2118	0.0003	0.0153	2.8451	0.0203	0.1263
ECE1	活性化する	3.9089	0.0033	0.0624	1.8673	0.1782	0.3996
EGLN3	活性化する	2.9572	0.0465	0.2989	1.0391	0.9453	1
EGR2	活性化する	2.4479	0.0155	0.157	2.5764	0.0158	0.1159
ERAP1	活性化する	2.5669	0.0033	0.0634	2.2811	0.0134	0.1068
FAM26F	活性化する	14.7052	0.0008	0.0279	26.6887	0.0002	0.0227
FAS	活性化する	7.0896	0.0003	0.0169	4.7216	0.0052	0.0695
FCER1G	活性化する	6.7045	0.0007	0.0254	4.8631	0.0059	0.0728
FGF2	活性化する	2.9272	0.0257	0.2106	1.8257	0.2249	0.4606
FGL2	活性化する	12.456	9.3027E-06	0.0038	4.9116	0.0036	0.0599
FPR2	活性化する	26.1833	0.000096227	0.0091	4.1758	0.0744	0.2328
FTH1	活性化する	1.6855	0.0413	0.2791	2.2166	0.0045	0.0657
GBP2	活性化する	7.2783	0.0007	0.0248	6.7229	0.0017	0.0437

【0 3 4 1】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
遺伝子							
GBP3	活性化する	6.2795	0.0006	0.0222	3.0356	0.0358	0.156
GBP4	活性化する	18.7632	0.0002	0.0139	6.7981	0.0154	0.1146
GBP5	活性化する	18.254	0.0003	0.0157	7.5534	0.0118	0.1
GBP6	活性化する	6.4537	0.0004	0.0187	8.0969	0.0002	0.0266
GBP7	活性化する	4.3285	0.0017	0.0427	2.3295	0.0713	0.2296
GCH1	活性化する	3.9933	0.0057	0.0867	-2.2318	0.1144	0.3009
GNA13	活性化する	1.843	0.0129	0.1403	1.2404	0.3874	0.6539
GSDMD	活性化する	5.5069	0.000067203	0.0076	4.0075	0.0013	0.0403
GZMB	活性化する	10.9342	0.001	0.0323	11.0118	0.0018	0.0442
H2-M3	活性化する	6.3613	0.0003	0.0169	-1.2831	0.6129	0.8754
H2-Q7	活性化する	13.035	0.00007123	0.0078	13.2107	0.0001	0.0209
H2-T23	活性化する	9.9835	0.0035	0.0651	1.093	0.9091	1
HCAR2	活性化する	5.1405	0.0007	0.0254	3.0731	0.0206	0.1263
HCK	活性化する	7.0952	0.000025322	0.0053	4.1767	0.0019	0.0455
HIF1A	活性化する	1.661	0.0261	0.2122	1.117	0.6345	0.8942
HMOX1	活性化する	2.9191	0.0049	0.0797	2.2892	0.0345	0.1532
ICAM1	活性化する	5.8185	0.0005	0.0217	4.9939	0.0023	0.0487
ICOSL	活性化する	1.9545	0.0086	0.1107	1.8592	0.0203	0.1263
IDO1	活性化する	2.1676	0.007	0.097	1.5151	0.1535	0.3644
IFI27	活性化する	2.1198	0.0058	0.088	1.1685	0.5669	0.8345
IFI44	活性化する	10.2739	0.0001	0.0093	5.8893	0.0032	0.057
IFIH1	活性化する	3.3922	0.0001	0.0093	1.8886	0.0369	0.1588
IFIT1	活性化する	4.7651	0.000038724	0.0062	2.3488	0.0191	0.1263
IFIT2	活性化する	2.6547	0.0381	0.266	1.6098	0.3269	0.5865
IFIT3	活性化する	6.6433	0.0003	0.0153	2.3076	0.0981	0.2746
IFITM1	活性化する	13.8818	0.0017	0.0427	4.0409	0.096	0.2703
IFITM3	活性化する	5.3416	0.000049885	0.0069	4.6318	0.0003	0.0278

【0 3 4 2】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
IFNG	活性化する	15.8295	0.000030559	0.0055	5.3984	0.0086	0.0862
IFNGR1	活性化する	4.6529	0.0003	0.0169	1.1624	0.713	0.9579
IKBKE	活性化する	3.6191	0.000070796	0.0078	2.1509	0.0151	0.1135
IL10RA	活性化する	6.6362	0.0006	0.0225	2.2744	0.1259	0.3198
IL12B	活性化する	1.5869	0.0237	0.2019	1.3356	0.1698	0.3882
IL12RB1	活性化する	3.6563	0.0032	0.0623	2.7374	0.0261	0.1323
IL12RB2	活性化する	10.8737	0.0001	0.0105	2.7693	0.0898	0.2596
IL15RA	活性化する	5.6222	0.0002	0.0124	3.263	0.01	0.0929
IL18BP	活性化する	13.3799	0.000016505	0.0045	2.6518	0.0808	0.2445
IL18R1	活性化する	10.5794	0.0004	0.0172	4.1773	0.0288	0.1387
IL18RAP	活性化する	12.8979	1.6368E-06	0.0016	3.9032	0.0058	0.0721
IL1A	活性化する	5.0611	0.0002	0.014	2.016	0.1006	0.2792
IL1B	活性化する	7.1785	0.0017	0.0427	2.9628	0.0846	0.2505
IL1RL1	活性化する	3.2501	0.0421	0.2825	2.7191	0.0999	0.2778
IL1RN	活性化する	11.4696	0.000016637	0.0045	3.5493	0.0183	0.1256
IL27	活性化する	5.0377	0.0003	0.0145	2.9655	0.0136	0.1077
IL2RA	活性化する	12.629	0.000036735	0.0059	9.0232	0.0004	0.03
IL3RA	活性化する	2.0071	0.0463	0.2977	-2.3554	0.0222	0.1263
INHBA	活性化する	7.0079	0.0006	0.0238	8.1176	0.0005	0.0316
IRF1	活性化する	4.8896	0.0002	0.0136	4.2429	0.0011	0.0383
IRF2	活性化する	3.0856	0.0001	0.0102	2.3475	0.0038	0.0609
IRF4	活性化する	3.6001	0.0009	0.0303	2.7396	0.0107	0.0955
IRF5	活性化する	6.3959	0.0039	0.0697	6.2724	0.0066	0.0767
IRF7	活性化する	4.6951	0.0016	0.0408	2.6708	0.0468	0.1806
IRGM1	活性化する	3.5604	0.0205	0.1855	3.8887	0.0196	0.1263
ISG15	活性化する	6.1635	0.0003	0.0158	2.64	0.0488	0.1845
ISG20	活性化する	3.3567	0.0012	0.0349	3.9719	0.0006	0.0322

【0 3 4 3】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
ITGA4	活性化する	2.0304	0.0397	0.272	2.0083	0.055	0.1984
ITGAL	活性化する	16.3545	0.00032377	0.0056	6.1759	0.0055	0.0707
ITGAM	活性化する	8.5704	0.0093	0.1151	3.5033	0.1371	0.3385
ITGAX	活性化する	3.9189	0.0101	0.1202	2.0482	0.185	0.4084
ITGB2	活性化する	7.7479	0.0002	0.0124	6.9547	0.0006	0.0332
JAK2	活性化する	1.6647	0.0461	0.2976	1.3678	0.2378	0.4779
JUN	活性化する	1.7589	0.0035	0.0649	-1.1739	0.4037	0.6708
KLF4	活性化する	1.907	0.0409	0.2778	1.156	0.6546	0.9116
KLF6	活性化する	2.4625	0.0037	0.0672	2.1351	0.0182	0.125
KYNU	活性化する	3.8871	0.008	0.1057	4.8859	0.0039	0.061
LAG3	活性化する	7.4221	0.0002	0.0114	2.156	0.1298	0.3262
LAT2	活性化する	2.6441	0.028	0.2208	1.5322	0.3475	0.6094
LCN2	活性化する	4.3524	0.0296	0.2275	16.3586	0.0003	0.0276
LCP2	活性化する	8.4235	0.0004	0.0193	4.07	0.0205	0.1263
LGALS9	活性化する	1.6825	0.0051	0.0817	1.6728	0.0085	0.086
LST1	活性化する	7.6841	0.02	0.1832	1.6707	0.5648	0.8328
LTA	活性化する	2.7386	0.0055	0.0851	2.4968	0.0157	0.1157
LTB	活性化する	8.1723	0.0014	0.0379	2.3655	0.1846	0.4079
LY6E	活性化する	5.1119	0.0028	0.0572	2.8148	0.061	0.2104
LY96	活性化する	2.4218	0.0302	0.2305	1.5311	0.3103	0.5661
LYN	活性化する	5.1219	0.001	0.0325	1.6841	0.2851	0.536
MAP3K8	活性化する	7.131	0.0009	0.0302	1.0205	0.9717	1
MEFV	活性化する	10.8378	0.000019758	0.0047	2.3756	0.0951	0.2688
MMP12	活性化する	6.4662	0.0035	0.0647	5.0068	0.015	0.1131
MX1	活性化する	6.1489	0.0128	0.1395	2.6469	0.1916	0.4171
MX2	活性化する	3.9804	0.0005	0.0205	1.8666	0.1068	0.2889
NAMPT	活性化する	2.341	0.0066	0.0943	-1.4194	0.2673	0.514

【0 3 4 4】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH
NAPSA	活性化する	4.3452	0.0003	0.0149	4.7434	0.0003	0.0272
NEURL3	活性化する	5.943	0.0009	0.0291	1.9354	0.2066	0.4363
NFKB1	活性化する	1.8089	0.0051	0.0815	1.0738	0.7351	0.9751
NFKBIA	活性化する	4.9409	0.000013016	0.0041	2.4688	0.0097	0.0912
NFKBIZ	活性化する	2.328	0.0073	0.0995	2.0257	0.0308	0.1436
NGF	活性化する	3.1687	0.0065	0.0933	3.4968	0.0055	0.0706
NLR5	活性化する	3.4173	0.0109	0.1261	2.2706	0.0985	0.2752
NLRP3	活性化する	5.11	0.0007	0.0254	3.4525	0.0111	0.0975
NMI	活性化する	2.0435	0.0228	0.1979	1.6117	0.1416	0.3459
NOD2	活性化する	3.5157	0.000018135	0.0045	2.5449	0.0013	0.0396
NOS2	活性化する	26.5216	2.2445E-06	0.0017	24.8128	7.9556E-06	0.0117
NOTCH1	活性化する	2.2952	0.0301	0.2303	1.4949	0.3078	0.5625
NR1D1	活性化する	1.7995	0.0049	0.0799	1.8784	0.0045	0.065
NUPR1	活性化する	2.8421	0.001	0.0318	1.7353	0.0807	0.2444
OAS2	活性化する	3.8997	0.0003	0.0154	2.3682	0.0204	0.1263
OAS3	活性化する	14.5317	7.7153E-06	0.0034	4.0924	0.0123	0.1019
P2RY14	活性化する	16.6314	0.0005	0.0204	4.8513	0.0471	0.1812
P2RY6	活性化する	5.352	0.0001	0.0103	2.2094	0.0606	0.2093
PARP9	活性化する	3.1267	0.0179	0.1716	-1.1573	0.7644	0.9977
PARVG	活性化する	6.3047	0.0025	0.0539	1.2154	0.7444	0.9822
PDCD1LG2	活性化する	11.6201	2.1928E-06	0.0017	3.9612	0.0045	0.065
PF4	活性化する	6.7372	0.0284	0.2226	-2.2437	0.3655	0.6285
PIM1	活性化する	4.0708	0.0003	0.0169	2.0732	0.0575	0.2034
PLA2G16	活性化する	4.8619	0.001	0.0309	1.3802	0.4886	0.7613
PLAU	活性化する	3.8214	0.00003401	0.0058	2.1662	0.0131	0.1056
PLEK	活性化する	5.9274	0.0049	0.0805	2.9561	0.0921	0.2632
PMAIP1	活性化する	3.4224	0.0002	0.0134	2.6199	0.0041	0.0627

【 0 3 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 40】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH
PRDM1	活性化する	3.5702	0.0297	0.2283	4.0335	0.0251	0.13
PRKCD	活性化する	4.5574	2.2524E-07	0.001	2.0325	0.0066	0.0768
PRKCQ	活性化する	2.1379	0.0065	0.0932	2.1615	0.0089	0.087
PSMB10	活性化する	3.6197	0.005	0.0807	1.4724	0.3976	0.6643
PSMB8	活性化する	3.9093	0.0032	0.0615	2.652	0.0388	0.1637
PSMB9	活性化する	7.4132	0.0005	0.0197	4.5308	0.009	0.0877
PSME1	活性化する	6.1609	0.0001	0.0096	3.9584	0.0037	0.06
PTAFR	活性化する	8.5218	0.000052584	0.0069	2.2614	0.1024	0.2821
PTGES	活性化する	3.3225	0.0241	0.2039	1.61	0.3819	0.6479
PTGS2	活性化する	10.9036	0.0075	0.1017	3.9538	0.1309	0.3282
PTX3	活性化する	5.271	0.0253	0.2091	1.8833	0.4052	0.672
RAB20	活性化する	2.29	0.0257	0.2106	1.1261	0.7537	0.9893
RAC2	活性化する	7.9519	0.000098427	0.0091	3.7008	0.0123	0.1021
RIPK1	活性化する	1.6822	0.0456	0.2959	-1.1344	0.6373	0.8964
RSAD2	活性化する	3.916	0.0003	0.0152	1.6141	0.184	0.407
RTP4	活性化する	4.8033	0.0025	0.0537	2.5839	0.0696	0.2269
RUNX2	活性化する	5.3191	0.0001	0.0095	2.2697	0.0491	0.185
RUNX3	活性化する	5.5652	0.0012	0.0354	5.5875	0.002	0.0467
S100A10	活性化する	2.1419	0.001	0.0318	-1.0647	0.7799	1
S100A8	活性化する	10.9785	0.0065	0.0931	11.8118	0.0079	0.0832
S100A9	活性化する	5.1245	0.0058	0.0879	4.0622	0.0228	0.1263
S1PR3	活性化する	2.8084	0.0426	0.2844	4.3054	0.0083	0.0851
SAMHD1	活性化する	6.8165	0.000028539	0.0053	5.2676	0.0004	0.0289
SELL	活性化する	9.0266	0.000036704	0.0059	2.6848	0.0503	0.1879
SEMA4A	活性化する	4.5461	0.0002	0.0134	7.1376	0.000014188	0.0118
SEPT3	活性化する	1.9813	0.0021	0.0484	1.2827	0.2581	0.5036
SERPINB9	活性化する	3.6968	0.0068	0.0955	1.3544	0.5306	0.8014

【0346】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
SERPINE1	活性化する	2.7348	0.0131	0.142	1.0382	0.9268	1
SERPING1	活性化する	8.5956	0.0003	0.0154	5.6206	0.0042	0.063
SHARPIN	活性化する	1.8222	0.0003	0.0169	-1.1856	0.2897	0.5414
SLAMF1	活性化する	4.2282	0.000066073	0.0076	1.8422	0.0753	0.2344
SLC11A1	活性化する	8.1631	0.0002	0.0114	6.6594	0.0009	0.0364
SLC15A3	活性化する	13.0122	0.0001	0.0093	4.2688	0.0238	0.1278
SLC16A9	活性化する	2.2466	0.0273	0.2172	1.6072	0.21	0.4406
SLC28A2	活性化する	6.903	0.0001	0.0096	1.4304	0.4466	0.7176
SLFN5	活性化する	3.7058	0.0022	0.0493	2.1361	0.0772	0.2383
SMAD7	活性化する	3.1247	0.0209	0.187	-1.1526	0.7767	1
SOCS1	活性化する	3.9437	0.011	0.1267	3.3365	0.0325	0.1481
SOD2	活性化する	2.6759	0.0047	0.0774	3.1489	0.0021	0.0475
SOD3	活性化する	2.1257	0.0158	0.1591	1.4255	0.2663	0.5128
SP100	活性化する	4.8282	7.0055E-06	0.0032	2.8699	0.0019	0.0452
SP110	活性化する	3.7976	0.0057	0.0867	1.1957	0.71	0.9556
SPI1	活性化する	10.5793	0.000055966	0.0071	6.5856	0.0014	0.0409
SPP1	活性化する	2.5268	0.0212	0.1893	2.4021	0.0384	0.1624
STAT1	活性化する	4.2736	0.0089	0.1122	3.9844	0.0176	0.1229
STAT2	活性化する	5.4847	0.000013182	0.0041	3.019	0.0035	0.0589
STAT4	活性化する	6.3819	0.0038	0.069	1.1576	0.8175	1
STAT6	活性化する	1.7399	0.0097	0.1171	1.7712	0.0116	0.0993
STX11	活性化する	3.6303	0.0058	0.088	1.7593	0.2306	0.4679
TAP1	活性化する	4.588	0.001	0.0323	2.7092	0.0329	0.1493
TAP2	活性化する	2.8268	0.0148	0.1526	1.5315	0.3257	0.585
TAPBP	活性化する	2.5416	0.0274	0.2176	1.7971	0.1801	0.4019
TAPBPPL	活性化する	3.0796	0.0031	0.0609	2.4014	0.0251	0.13
TBX21	活性化する	3.8788	0.0008	0.0273	4.1566	0.0008	0.0354

【0 3 4 7】

10

20

30

40

50

【表 4 2】

遺伝子	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH
TCIRG1	活性化する	2.7899	0.0005	0.0217	1.2508	0.4321	0.7008
TGFB2	活性化する	1.9044	0.031	0.2346	1.2596	0.451	0.7222
THBS1	活性化する	2.8135	0.005	0.0807	2.9522	0.0055	0.0707
THEMIS2	活性化する	9.3368	0.0011	0.0339	6.5099	0.0079	0.0832
THY1	活性化する	5.5745	0.0036	0.0666	3.0999	0.0597	0.2073
TLR1	活性化する	3.9534	0.0044	0.0751	4.9709	0.002	0.0463
TLR2	活性化する	4.2854	0.0004	0.0173	1.0613	0.8785	1
TLR7	活性化する	3.6076	0.0317	0.2384	1.1789	0.7874	1
TLR8	活性化する	7.9426	0.0012	0.0349	1.5453	0.4846	0.7574
TLR9	活性化する	7.0125	0.0004	0.0182	5.5003	0.0026	0.052
TMEM50B	活性化する	2.2646	0.0029	0.0584	1.6005	0.089	0.2584
TNF	活性化する	15.5761	0.000001549	0.0016	3.6025	0.014	0.1094
TNFAIP2	活性化する	4.2629	0.0043	0.0737	1.3184	0.5837	0.8504
TNFRSF11A	活性化する	3.7342	0.0089	0.1124	3.2927	0.0236	0.1273
TNFRSF14	活性化する	3.3507	0.0151	0.1547	2.0443	0.1615	0.3761
TNFRSF1B	活性化する	6.9767	0.0004	0.0187	3.0014	0.0433	0.1723
TNFSF10	活性化する	5.9466	0.0008	0.0286	2.8254	0.0505	0.1883
TNFSF12	活性化する	4.0396	0.0003	0.0145	3.0636	0.0039	0.061
TNFSF13	活性化する	3.7405	0.0229	0.1979	-1.7547	0.3434	0.6048
TNFSF13B	活性化する	4.2939	0.00009167	0.0089	1.0175	0.96	1
TRAFD1	活性化する	7.5123	0.000066493	0.0076	1.4364	0.4415	0.7113
TRIM21	活性化する	3.1067	0.0069	0.096	-1.1129	0.7984	1
TXK	活性化する	3.1599	0.0017	0.0418	1.8261	0.0992	0.2766
UBD	活性化する	39.4489	3.1101E-06	0.0021	20.5238	0.0001	0.0203
UBE2L6	活性化する	3.418	0.002	0.0464	4.4962	0.0005	0.031
USP18	活性化する	5.4886	0.0004	0.0192	1.697	0.258	0.5036
VCAM1	活性化する	7.3103	0.0003	0.0163	1.2409	0.6812	0.9337

【0 3 4 8】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

	IFNG_ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対Luc mRNA/IgG1. FDR BH
遺伝子							
WARS	活性化する	1.5033	0.0098	0.1179	1.8802	0.0003	0.0284
ZFP36	活性化する	3.0067	0.0051	0.0815	-1.1887	0.6585	0.9153
AHCY	阻害する	-2.0639	0.0374	0.2628	-1.8643	0.0878	0.2566
AQP1	阻害する	-2.6893	0.0012	0.0354	-2.9843	0.0008	0.0346
AZGP1	阻害する	-3.6306	0.0039	0.0701	-3.72	0.0054	0.0705
CSE1L	阻害する	-1.9528	0.0448	0.2931	-4.9001	0.000053442	0.0177
DHX9	阻害する	-1.9049	0.0192	0.1787	-1.3891	0.2439	0.4863
EMID1	阻害する	-2.5566	0.047	0.3003	-1.9661	0.1701	0.3887
FKBP6	阻害する	-4.1867	0.0043	0.0733	-2.2618	0.1075	0.2898
FLT4	阻害する	-1.7478	0.0248	0.2076	-1.6367	0.0588	0.2058
GMPR	阻害する	-2.9853	0.027	0.2154	-5.5877	0.0017	0.0432
GNAO1	阻害する	-2.2497	0.0179	0.1721	-1.0647	0.8565	1
HSP90AB1	阻害する	-1.9951	0.007	0.0974	-1.1404	0.6083	0.8715
IDI1	阻害する	-2.9218	0.004	0.0713	-2.402	0.023	0.1263
IGFBP4	阻害する	-3.3872	0.0211	0.1885	-3.0044	0.0473	0.1815
MIF	阻害する	-3.5707	0.0052	0.0828	-1.3189	0.5425	0.8124
MSH2	阻害する	-1.909	0.0328	0.2435	-1.7932	0.0664	0.2198
MYC	阻害する	-1.8764	0.0225	0.1962	-1.5059	0.1507	0.36
PBK	阻害する	-4.8198	0.0008	0.0287	-10.4275	0.000012076	0.0117
PCDH17	阻害する	-2.2868	0.0029	0.0588	-1.1447	0.6223	0.8835
PLCG1	阻害する	-1.6389	0.0439	0.2895	1.263	0.3564	0.6189
POLR2F	阻害する	-1.7137	0.0139	0.1473	-2.1058	0.0019	0.0456
POMP	阻害する	-1.5182	0.047	0.3002	-1.3884	0.1354	0.336
PRPF8	阻害する	-2.0788	0.0159	0.1593	-2.1397	0.0179	0.1239
PTGES2	阻害する	-1.9137	0.0278	0.2201	-1.0746	0.811	1
RAD18	阻害する	-2.1129	0.0032	0.0615	-1.7251	0.0354	0.1551
SF3A1	阻害する	-1.598	0.0042	0.0729	-1.2281	0.2111	0.4418

【0 3 4 9】

10

20

30

40

50

【表 4 4】

	IFN γ 調節	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 変化倍数	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 生P値	処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. FDR_BH	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. 生P値	未処置_ サイトカイン mRNA混合物/ IgG1対 Luc mRNA/IgG1. FDR_BH
遺伝子						
SLC12A2	阻害する	-2.8366	0.0039	0.0697	0.0011	0.0373
SMTN	阻害する	-1.8432	0.0398	0.2725	0.3927	0.6593
SQLE	阻害する	-4.0941	0.0396	0.2717	0.0296	0.1404
SREBF2	阻害する	-2.3929	0.0032	0.0615	0.0001	0.0209
SSBP1	阻害する	-1.5752	0.0094	0.1156	0.9665	1
TMEM158	阻害する	-1.6002	0.044	0.2897	0.1352	0.3357
TYMP	阻害する	-2.6432	0.0448	0.2928	0.4412	0.7111
UNC5B	阻害する	-2.3093	0.0267	0.2143	0.2666	0.5132

【実施例 13】

【0350】

サイトカインmRNAは、処置した腫瘍においても未処置の腫瘍においてもCD4+およびCD8+T細胞を増加させる

左右側腹部にB16F10腫瘍を担持しているマウスの、細胞 0.5×10^6 個で発症させた右側の腫瘍、腫瘍の一方のみ、にmRNA 80 μ g (20 μ g/標的)の単回腫瘍内注射を施した(腫瘍を処置した)が、細胞 0.25×10^6 個で発症させた他方の腫瘍は、未処置のままとした。腫瘍内mRNA注射後7日の時点で、両方の腫瘍を採取し、CD4+、CD8+およびFoxP3+細胞について抗体で染色するIHC(免疫蛍光顕

10

20

30

40

50

微鏡法)のために処理した。図28Aおよび28Bにおける腫瘍からのマウスは、サイトカインmRNAで処置し、その一方で、図28CおよびDにおける腫瘍からのマウスは、対照mRNAで処置した。パネルAおよびCは、mRNAの注射を施した腫瘍からのものであり、その一方で、パネルBおよびDは、注射を施していない対応する反対側の腫瘍からのものである。(図28A~D)。サイトカインmRNA処置群と対照mRNA処置群の両方について、RNAの注射を施した腫瘍5つ、および未注射の対応する反対側の腫瘍5つを、CD4+、CD8+、FOXP3+細胞について免疫蛍光染色した。細胞の相対出現頻度および比を図28E、F、Gにプロットした。これらの結果は、IL-15 sush i、GM-CSF、IFN α およびIL-12sc(配列番号59、53、41および47)のサイトカインmRNA混合物が、CD8+およびCD4+T細胞浸潤を増加させて、CD8+/Treg比の変化をもたらすことを示す。免疫浸潤の増加は、処置した腫瘍においても未処置の腫瘍においても発生し、これは、局所腫瘍内処置に全身性免疫調節効果があるという考えを支持した。

【実施例14】

【0351】

mRNAは、腫瘍細胞と浸潤性免疫細胞の両方において発現される

単一B16F10腫瘍を担持しているマウスに、Thy1.1タンパク質をコードするmRNAの単回腫瘍内注射を施した(図29A~G)。腫瘍内注射のおおよそ18時間後、腫瘍を解離させ、抗体のパネルで染色し、フローサイトメトリーを行って、Thy1.1タンパク質を発現する細胞を定義した。これらの結果は、腫瘍細胞と免疫細胞の両方がmRNAを取込み、発現することを示す。

【実施例15】

【0352】

腫瘍内サイトカインmRNA注射後の用量依存的腫瘍発現およびPD応答

B16F10腫瘍を担持しているマウスに、IL-15 sush i、GM-CSF、IFN α およびIL-12sc(配列番号59、53、41および47)のサイトカインmRNA混合物80、8または0.8 μ gの単回mRNA注射を施した。腫瘍内注射のおおよそ6時間後、腫瘍を除去し、溶解し、腫瘍溶解物中のIL-15 sush i、GM-CSF、IFN α およびIL-12sc、IFNガンマおよびIP-10のレベルを定量した。図30A~Fは、サイトカインmRNAが用量依存的に腫瘍内に発現されたことを示す。

【0353】

別個の実験で、B16F10腫瘍を担持しているマウスに、IL-15 sush i、GM-CSF、IFN α およびIL-12sc(配列番号59、53、41および47)のサイトカインmRNA混合物80、8または0.8 μ gの単回mRNA注射を施した。腫瘍内サイトカインmRNA注射後7日の時点で、腫瘍を解離させ、抗体のパネルで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。使用した抗体は、マウス:CD45、CD4、CD3、CD8、CD279、IFNガンマ、TNFアルファ、FOXP3、グランザイムBに対するものであった。これらの結果は、サイトカインmRNA混合物による処置が、CD8+/Treg比を変化させたこと(図31A~B)、腫瘍微小環境における多機能性CD8+T細胞の出現頻度増加をもたらしたこと(図31C~D)、浸潤性骨髓系細胞上のPD-L1を増加させたこと(図31E)、および浸潤性CD8+T細胞上のPD-1レベルを上昇させたこと(図31F)を示す。

【0354】

さらなる実験では、B16F10腫瘍を担持しているマウスの左右側腹部の腫瘍の一方のみに、IL-15 sush i、GM-CSF、IFN α およびIL-12sc(配列番号59、53、41および47)のサイトカインmRNA混合物、または対照mRNAの単回腫瘍内注射を施した(腫瘍を処置した)が、他方の腫瘍は、未処置のままであった。腫瘍内mRNA注射後7日の時点で、注射を施した腫瘍を採取し、CD45+、CD8+、CD3+およびグランザイムBについて抗体で染色するフローサイトメトリーのため

に処理した。これらの結果は、サイトカインmRNA混合物が、腫瘍における腫瘍内グランザイムB CD8+T細胞の出現頻度を上昇させたことを示す（図31G～H）。

【実施例16】

【0355】

腫瘍内注射されたmRNAは主として腫瘍内に発現される

B16F10腫瘍を担持しているマウスに、ホタルルシフェラーゼをコードするmRNA 50μgの単回腫瘍内注射を施した。6および24時間の時点で、マウス3匹を殺し、腫瘍、肝臓、脾臓、腫瘍流入領域リンパ節（TDLN）および非腫瘍流入領域リンパ節（NDLN）をex vivoでルシフェラーゼ発現について分析した。図32A～Bは、ルシフェラーゼ発現が腫瘍内で最も高度であり、腫瘍内での発現が、いずれの他の組織より100倍を超えて高度であったことを示す。

10

【実施例17】

【0356】

CD4+、CD8+およびNK細胞は、B16F10モデルにおいてサイトカインmRNAの抗腫瘍活性の一因となる

B16F10腫瘍を担持しているマウスの群を、合計4週間にわたって枯渇用抗体（抗CD4、抗CD8、抗NK1.1）100μgでの週1回の腹腔内注射により処置した。IL-15 sushi、GM-CSF、IFNαおよびIL-12sc（配列番号59、53、41および47）のサイトカインmRNA混合物 80μgでの処置の前日に、抗体媒介細胞枯渇を開始した。全生存率に対する抗体の枯渇効果をモニターした。図34に示すこれらの結果は、CD8+、CD4+またはNK細胞の個々の枯渇が、サイトカインmRNAの抗腫瘍活性および全生存率を、様々な程度に、低下させたことを示す。

20

【実施例18】

【0357】

サイトカインmRNAの抗腫瘍活性は、IFN-ガンマ欠損マウスでは観察されないWT C57BL/6Jマウス、およびマウスIFNγが欠損している（IFNγKO）C57BL/6Jマウスに、実施例1で説明したようにB16F10腫瘍細胞を移植した。IL-15 sushi、GM-CSF、IFNαおよびIL-12sc（配列番号59、53、41および47）のサイトカインmRNA混合物80μg（20μg／標的）または対照mRNA 80μgの腫瘍内注射によってマウスを処置し、全生存率をモニターした。図35に描示されているこれらの結果は、IFNγを欠いているマウスが、サイトカインmRNAで処置されたときに検出可能な抗腫瘍応答を示さなかったことを示す。

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

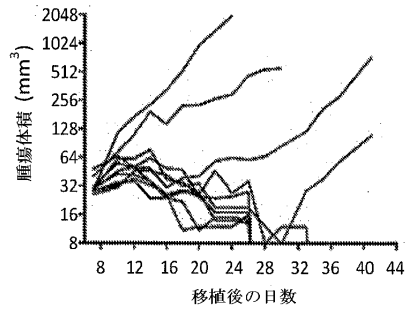


Fig. 1A

【図 1 - 2】

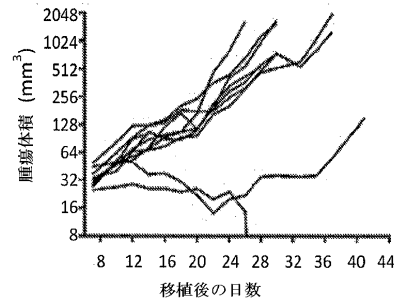


Fig. 1C

10

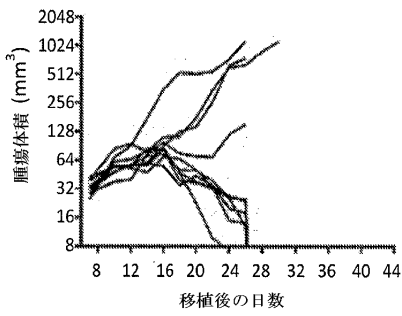


Fig. 1B

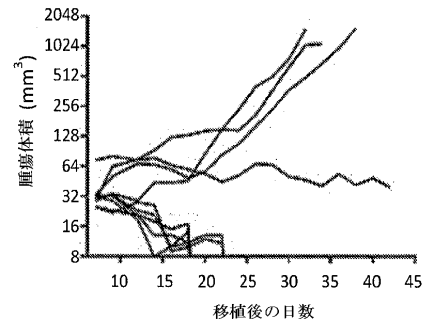


Fig. 1D

20

【図 1 - 3】

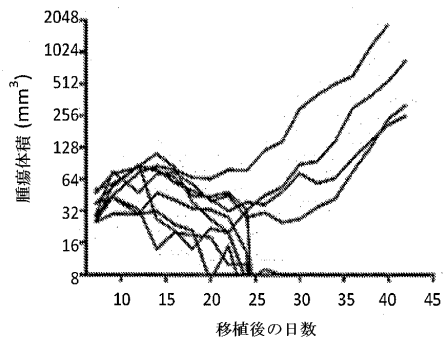


Fig. 1E

【図 1 - 4】

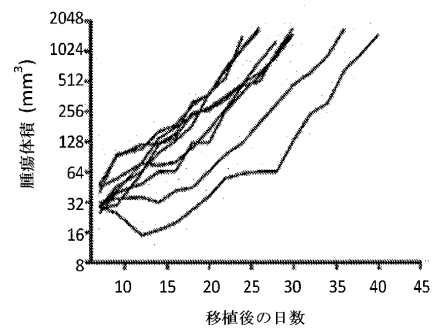


Fig. 1G

30

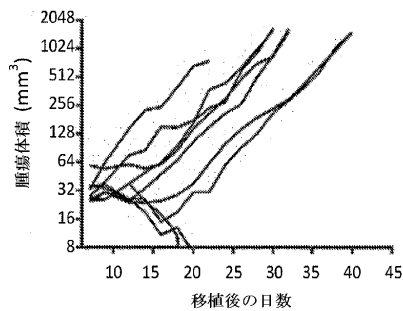


Fig. 1F

40

50

【図 2 - 1】

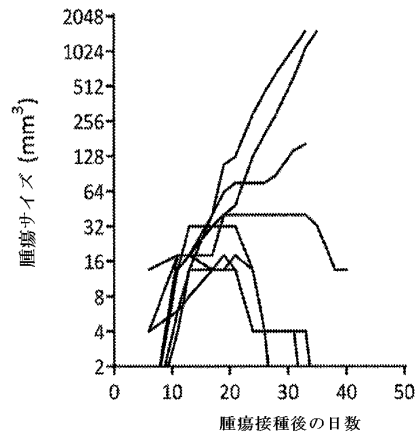


Fig. 2A

【図 2 - 2】

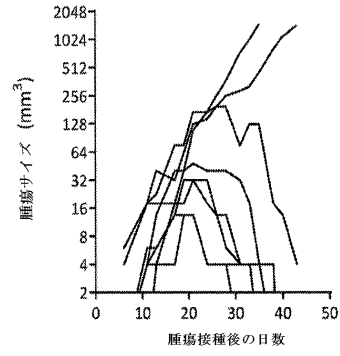


Fig. 2B

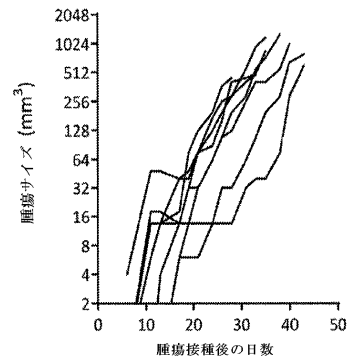


Fig. 2C

【図 2 - 3】

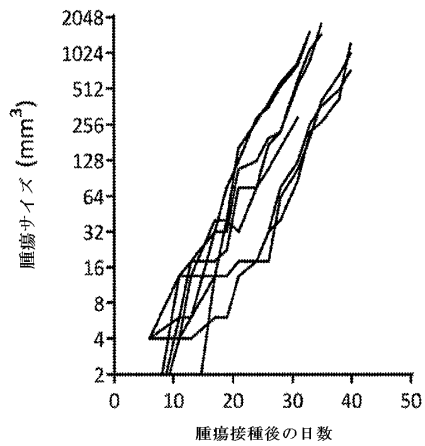


Fig. 2D

【図 3 - 1】

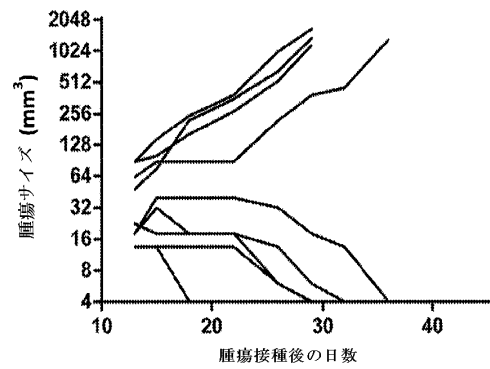


Fig. 3A

10

20

30

40

50

【図 3 - 2】

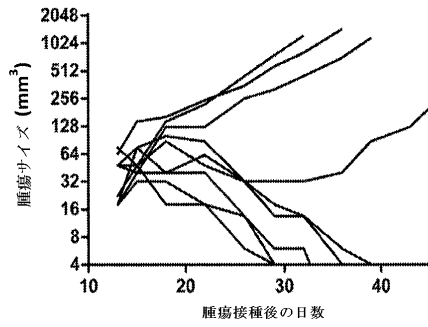


Fig. 3B

【図 4 - 1】

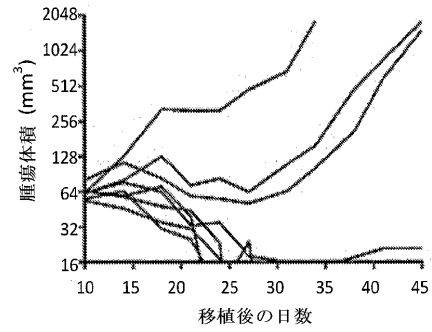


Fig. 4A

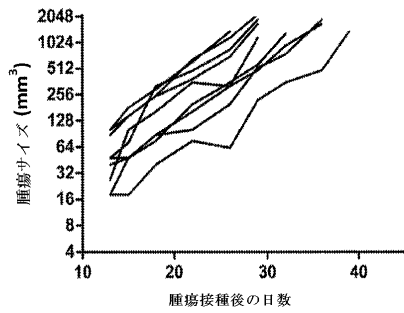


Fig. 3C

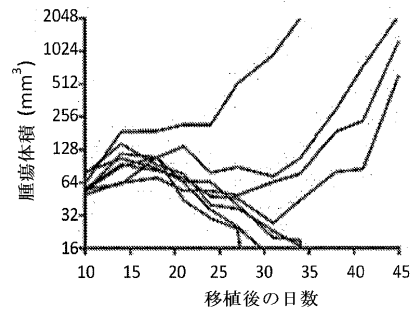


Fig. 4B

【図 4 - 2】

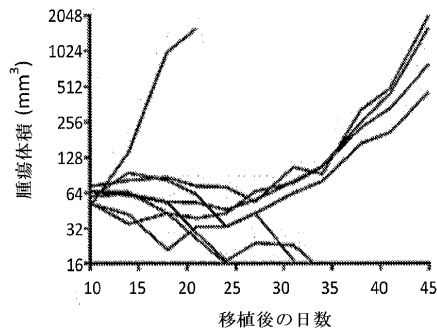


Fig. 4C

【図 4 - 3】

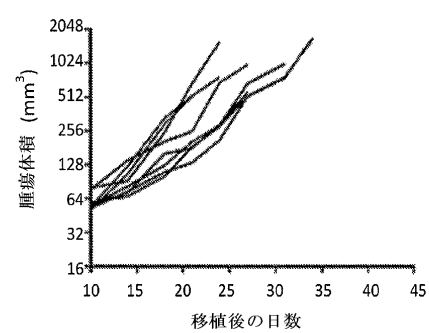


Fig. 4E

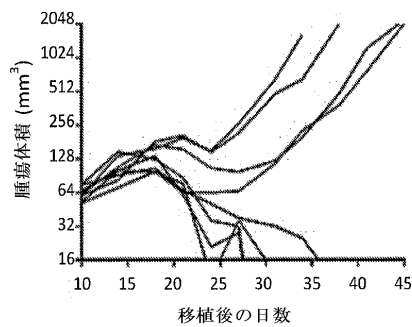


Fig. 4D

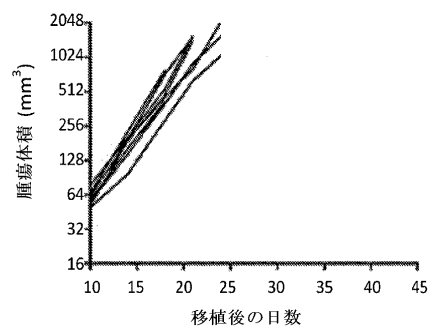


Fig. 4F

10

20

30

40

50

【図 5 - 1】

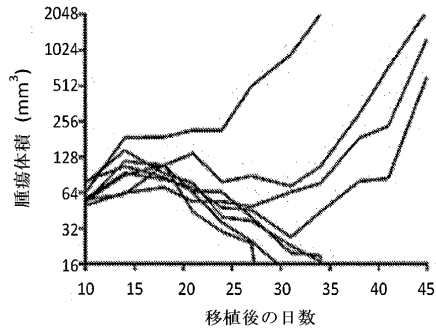


Fig. 5A

【図 5 - 2】

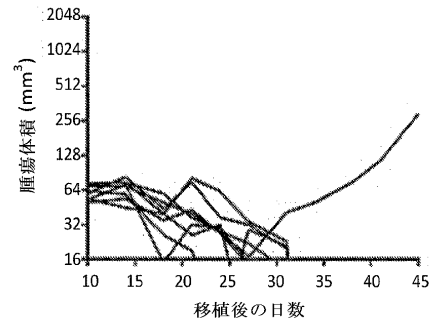


Fig. 5C

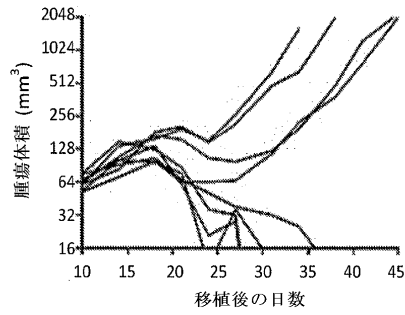


Fig. 5B

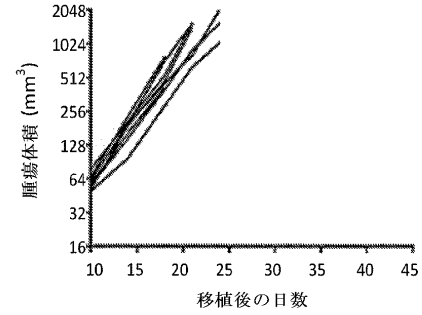


Fig. 5D

【図 6 - 1】

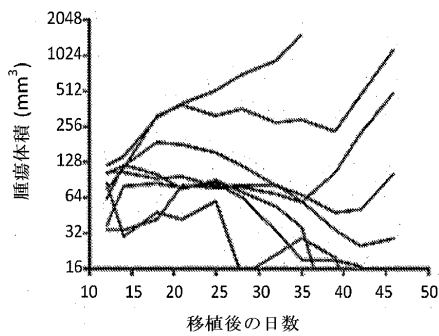


Fig. 6A

【図 6 - 2】

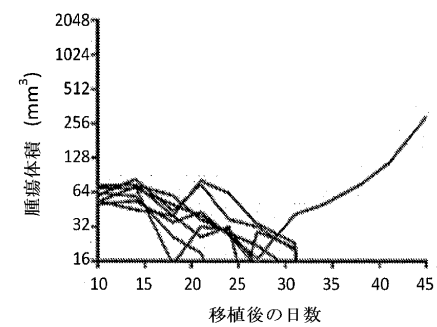


Fig. 6C

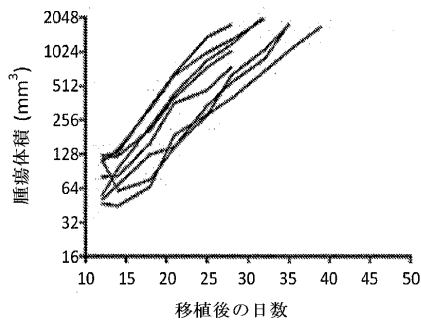


Fig. 6B

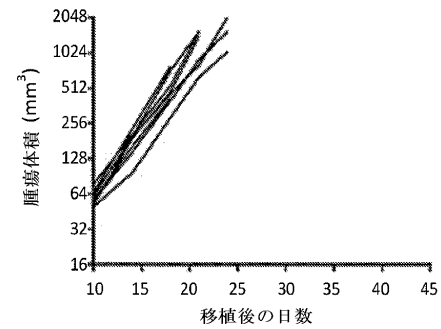


Fig. 6D

10

20

30

40

50

【図 6 - 3】

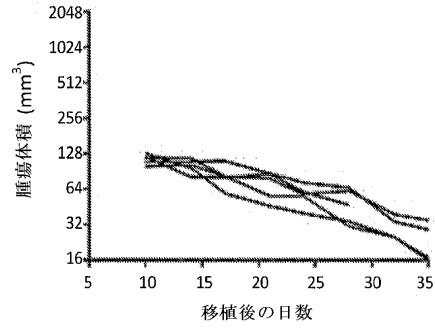


Fig. 6E

【図 7 - 1】

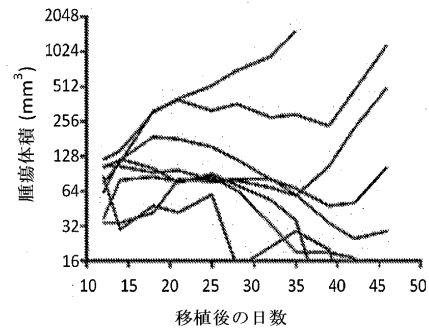


Fig. 7A

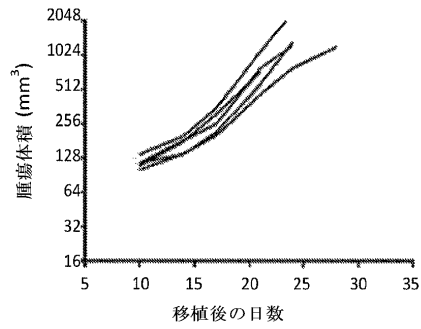


Fig. 6F

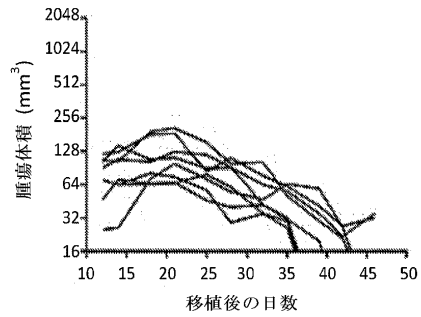


Fig. 7B

【図 7 - 2】

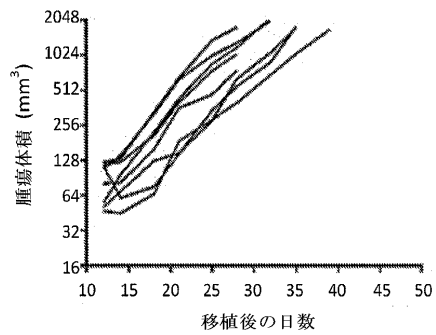


Fig. 7C

【図 7 - 3】

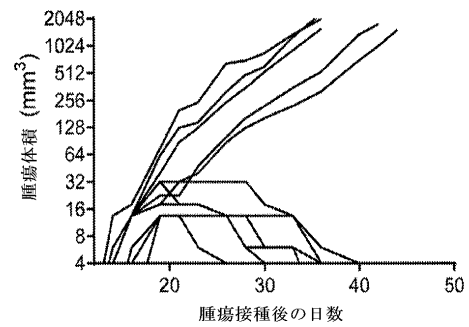


Fig. 7E

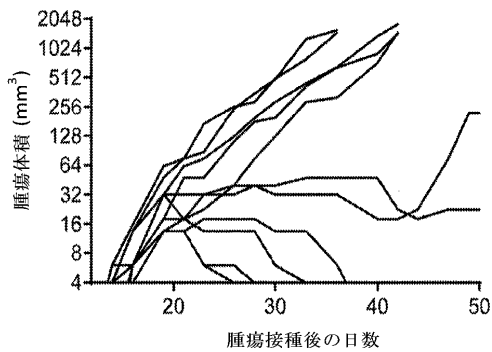


Fig. 7D

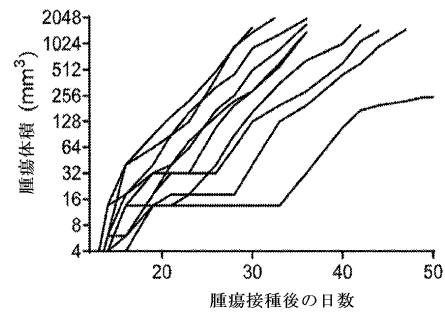


Fig. 7F

10

20

30

40

50

【図 8 - 1】

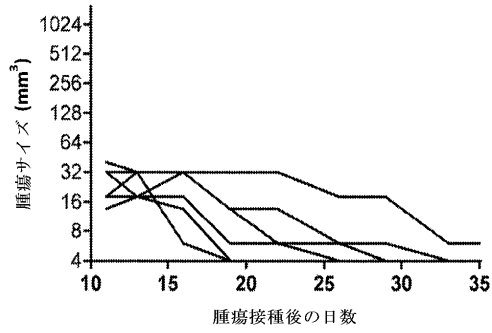


Fig. 8A

【図 8 - 2】

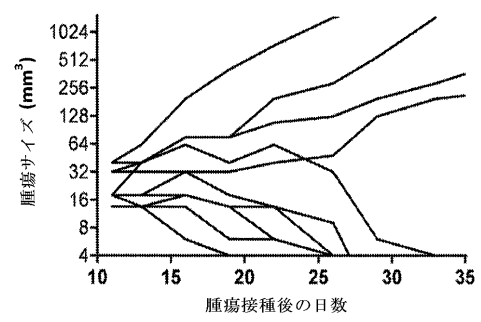


Fig. 8C

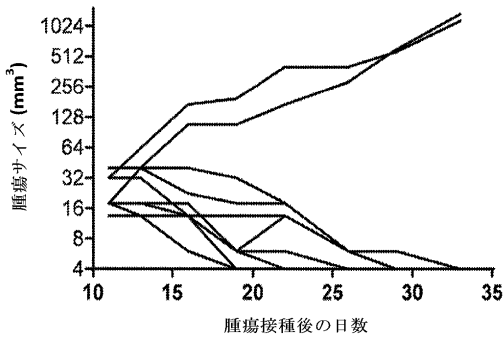


Fig. 8B

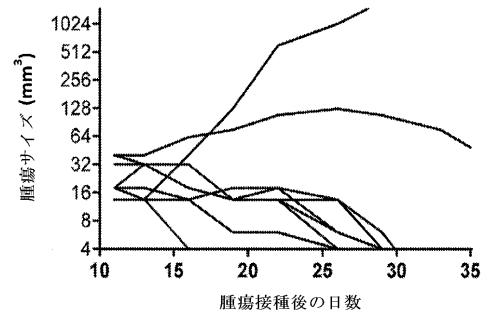


Fig. 8D

【図 8 - 3】

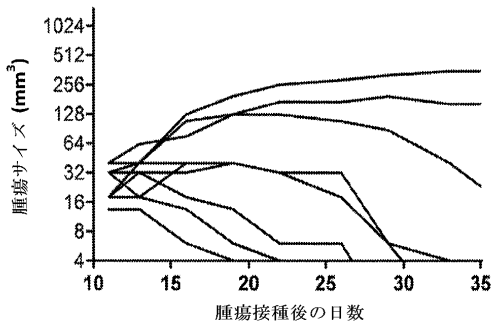


Fig. 8E

【図 8 - 4】

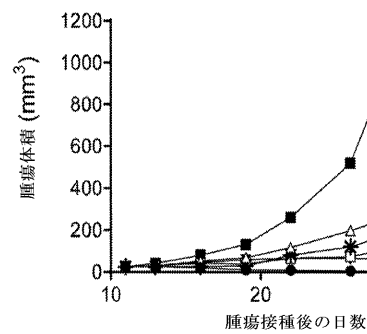


Fig. 8G

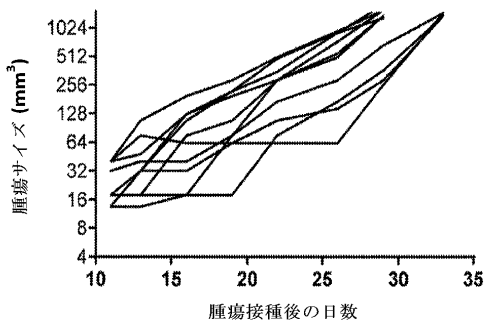


Fig. 8F

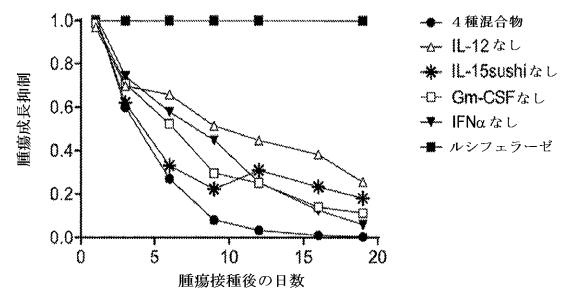


Fig. 8H

10

20

30

40

50

【図 9 - 1】

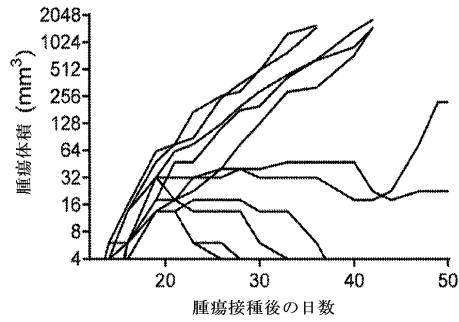


Fig. 9A

【図 9 - 2】

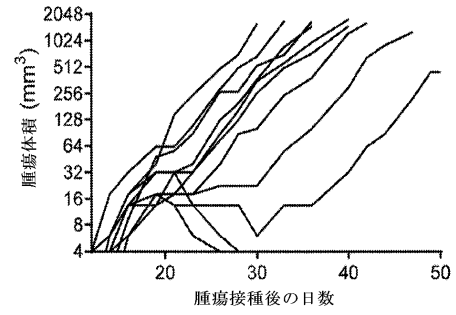


Fig. 9C

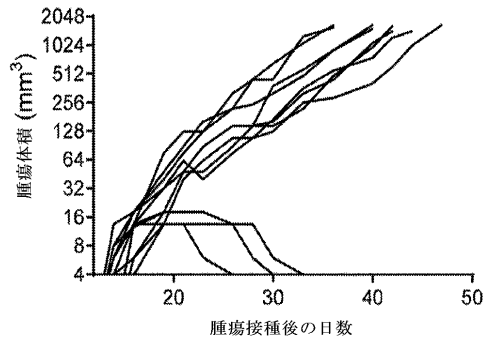


Fig. 9B

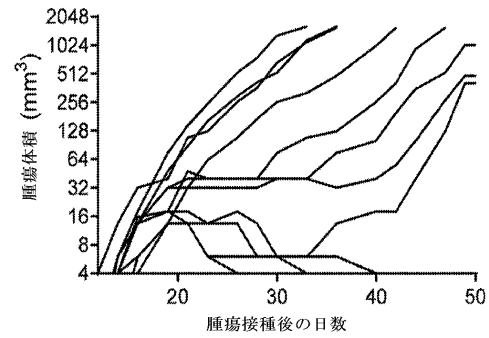


Fig. 9D

【図 9 - 3】

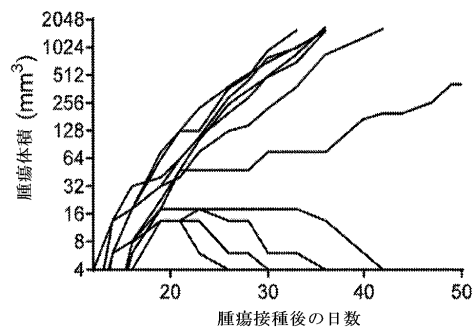


Fig. 9E

【図 10】

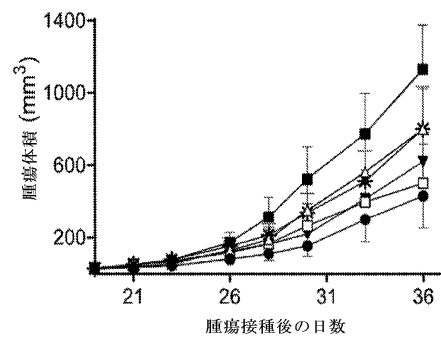


Fig. 10A

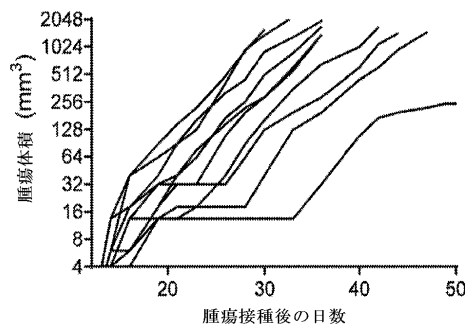


Fig. 9F

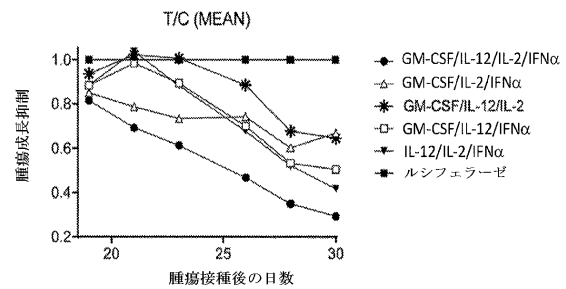


Fig. 10B

10

20

30

40

50

【図 1 1】

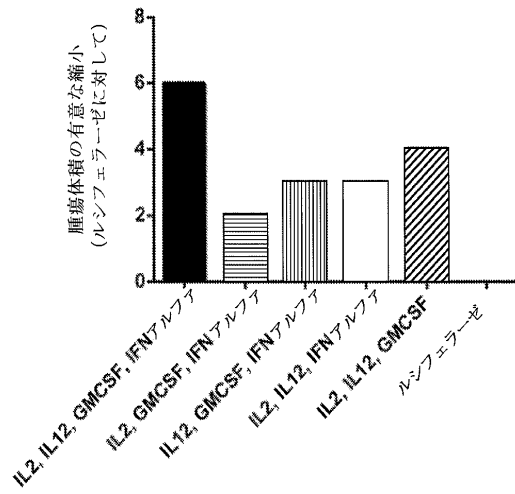


Fig. 11

【図 1 2 - 1】

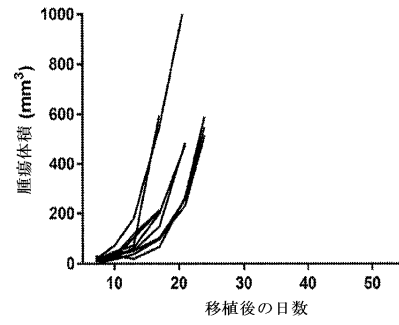


Fig. 12A

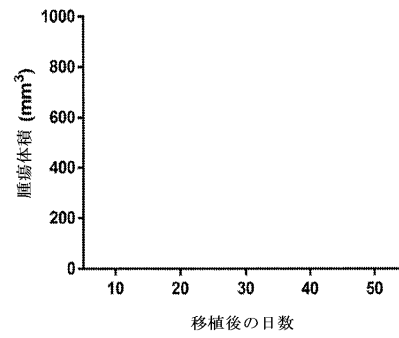


Fig. 12B

【図 1 2 - 2】

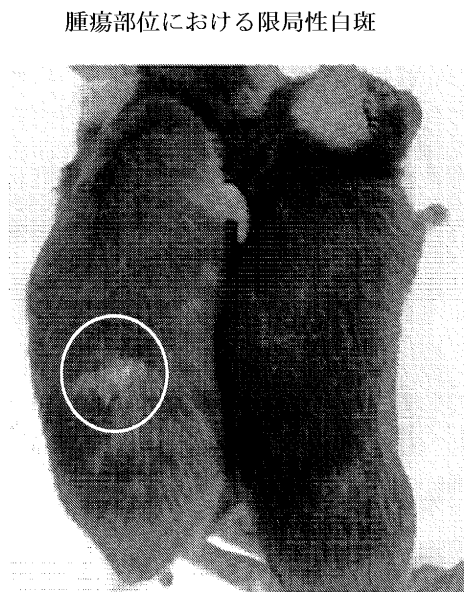


Fig. 12C

【図 1 2 - 3】



Fig. 12D

10

20

30

40

50

【図 13-1】

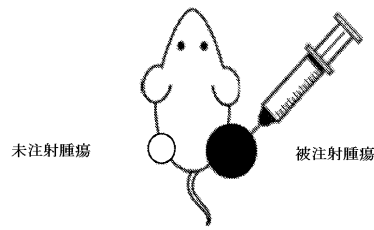


Fig. 13A

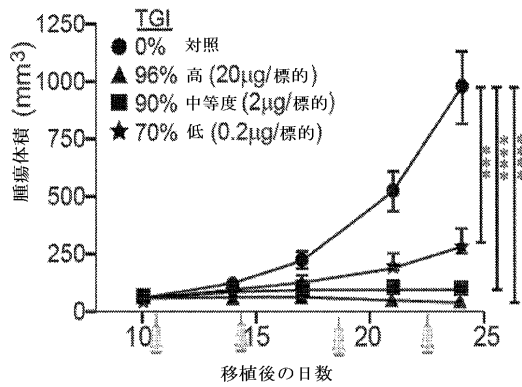


Fig. 13B

【図 13-2】

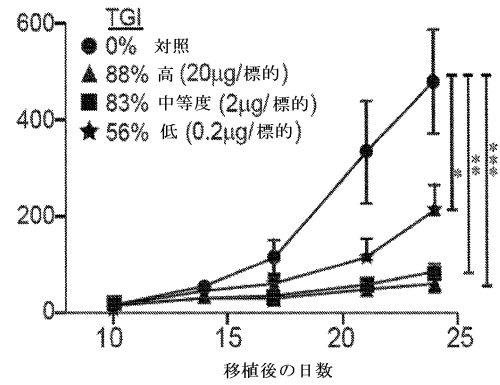


Fig. 13C

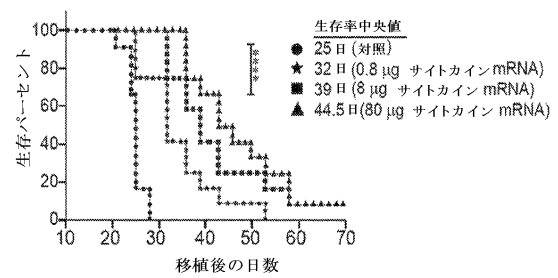


Fig. 13D

【図 14-1】

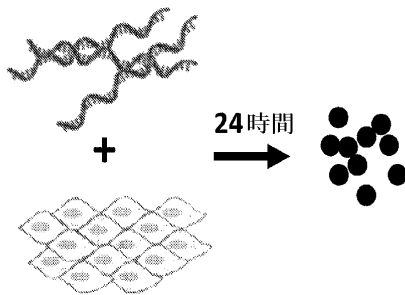


Fig. 14A

【図 14-2】

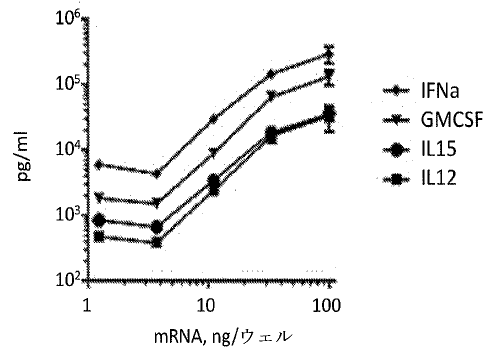


Fig. 14C

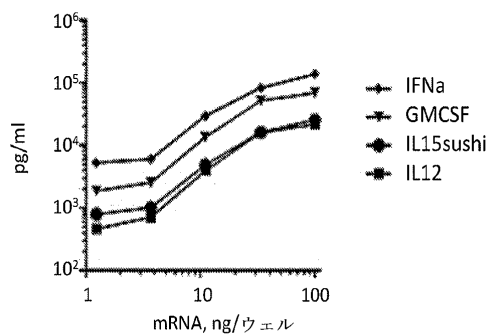


Fig. 14B

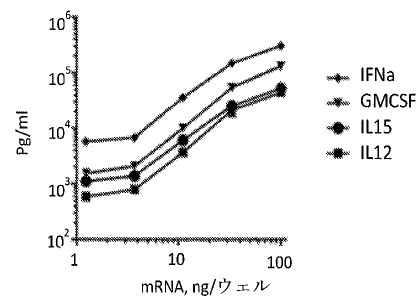


Fig. 14D

10

20

30

40

50

【図 14-3】

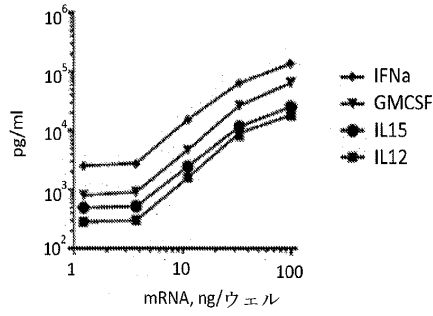


Fig. 14E

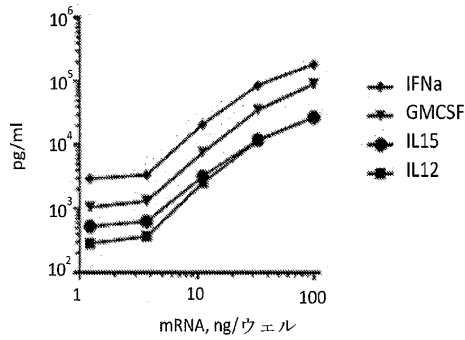
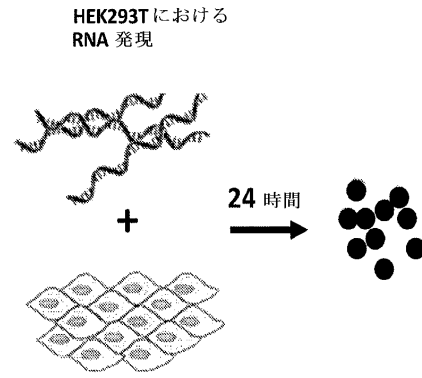
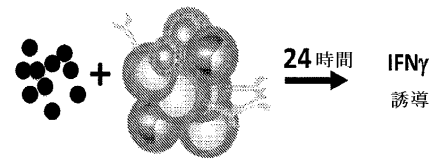


Fig. 14F

【図 15-1】



10

PBMC のサイトカイン
処置

20

Fig. 15A

【図 15-2】

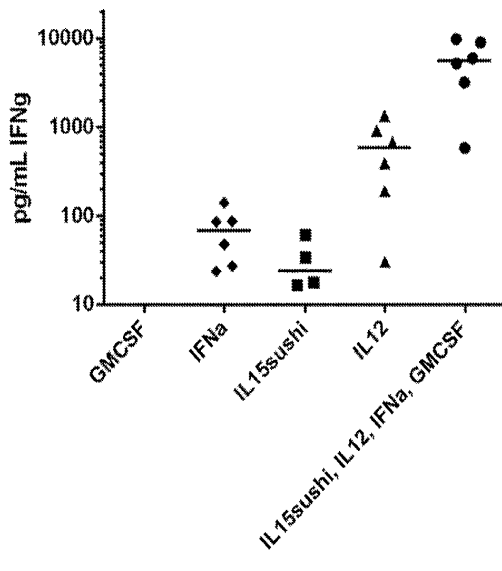


Fig. 15B

【図 16-1】

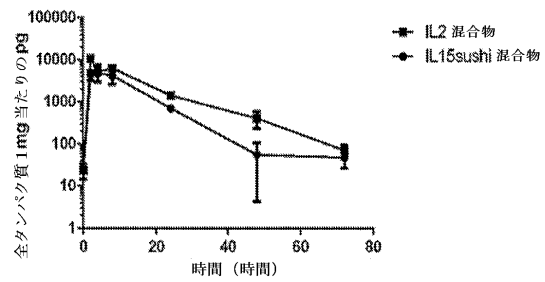


Fig. 16A

30

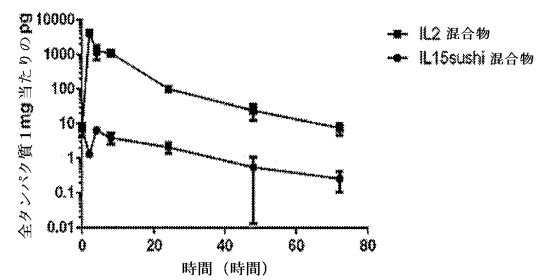


Fig. 16B

40

50

【図 16-2】

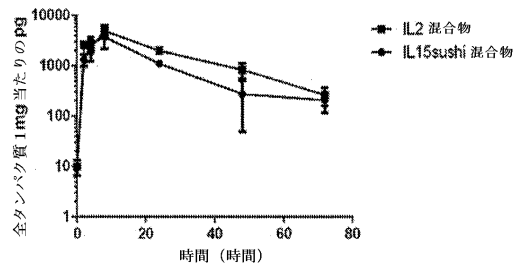


Fig. 16C

【図 16-3】

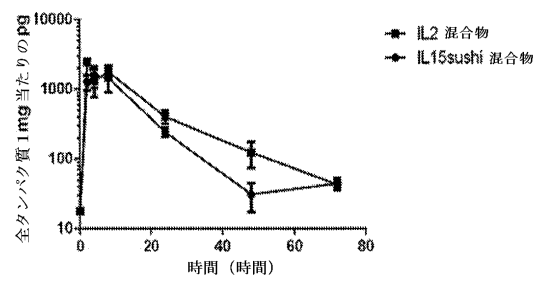


Fig. 16E

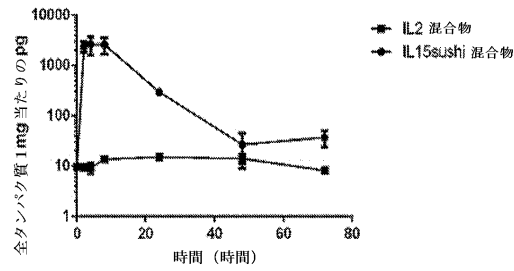


Fig. 16D

【図 17-1】

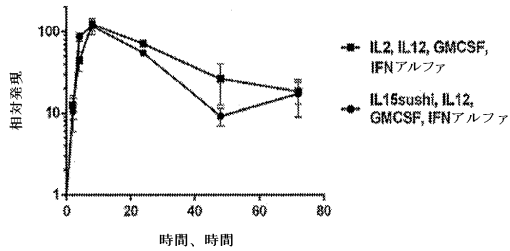


Fig. 17A

【図 17-2】

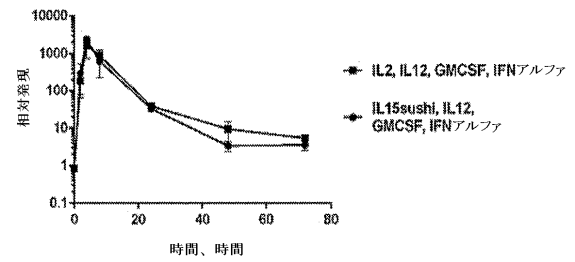


Fig. 17B

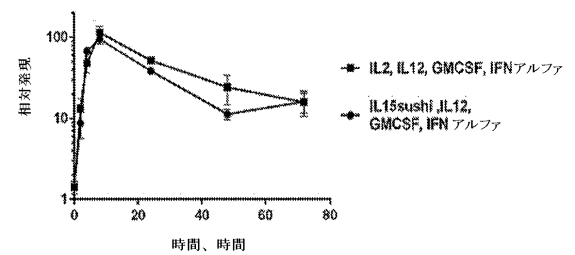


Fig. 17C

10

20

30

40

50

【図 18-1】

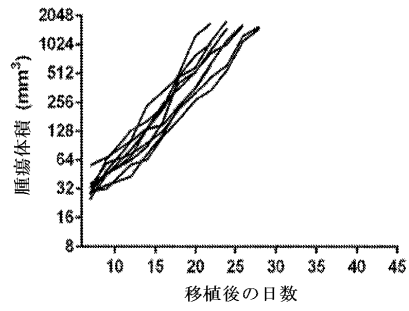


Fig. 18A

【図 18-2】

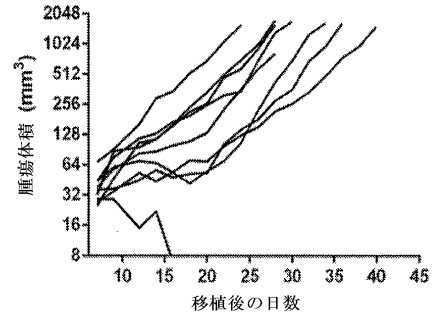


Fig. 18C

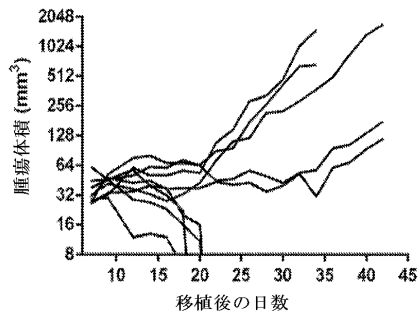


Fig. 18B

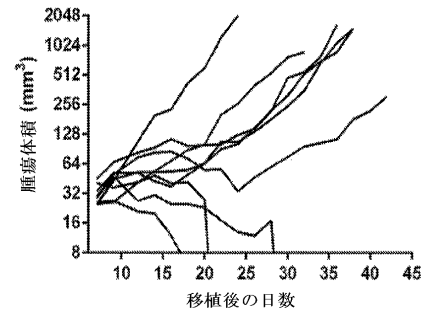


Fig. 18D

【図 18-3】

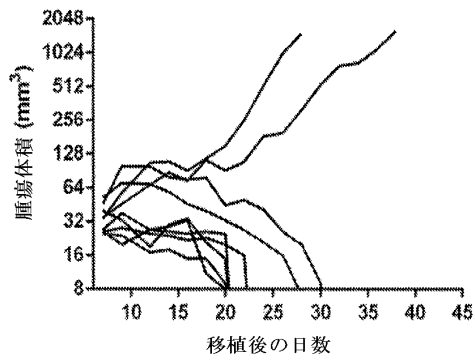


Fig. 18E

【図 19-1】

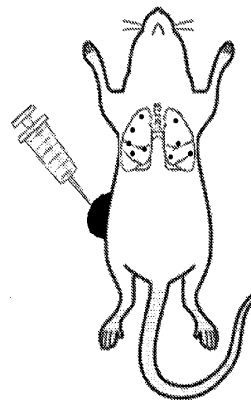


Fig. 19A

10

20

30

40

50

【図 19 - 2】

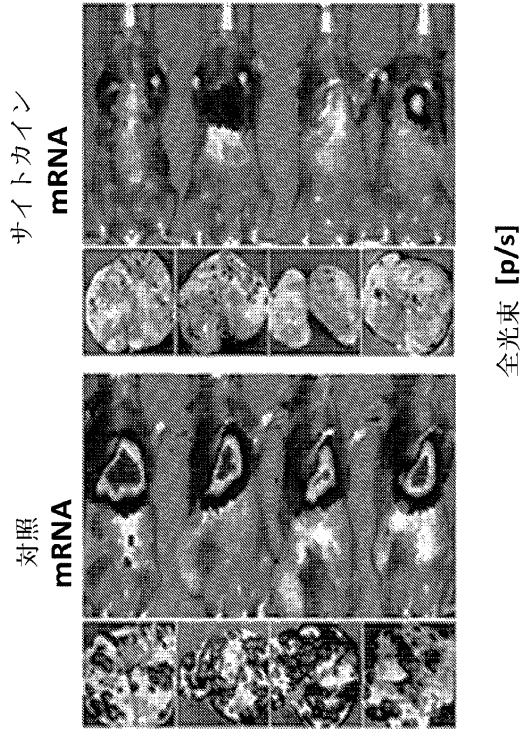


Fig. 19B

【図 19 - 3】

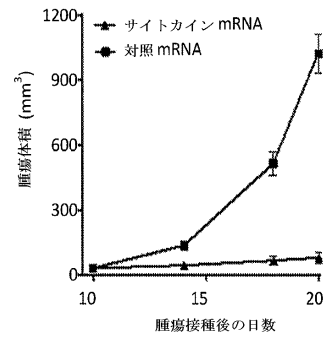


Fig. 19C

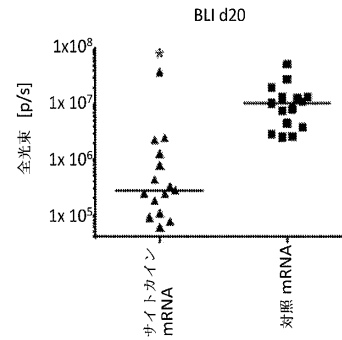


Fig. 19D

【図 19 - 4】

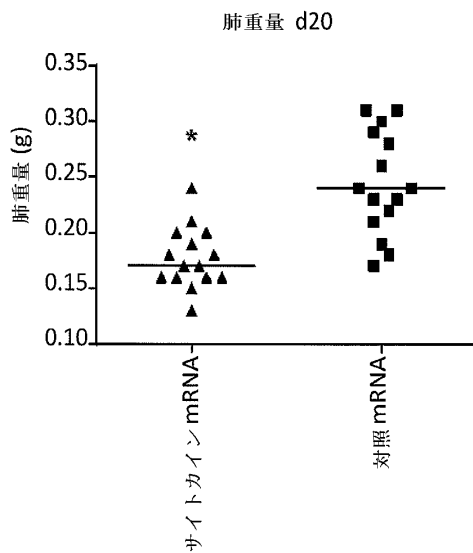


Fig. 19E

【図 20 - 1】

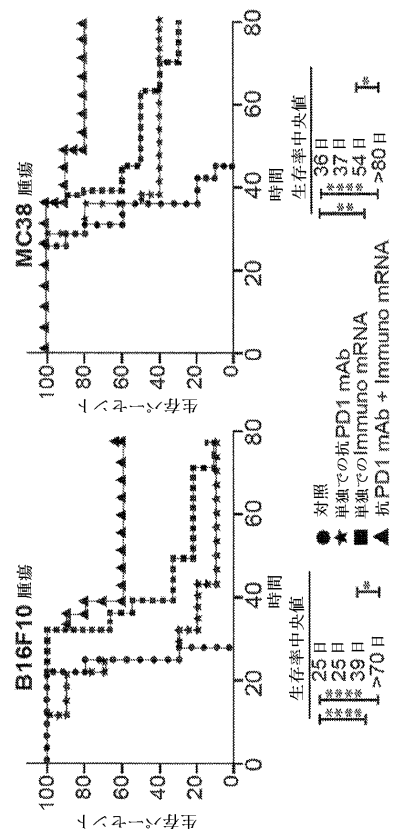


Fig. 20B

Fig. 20A

10

20

30

40

50

【図 20-2】

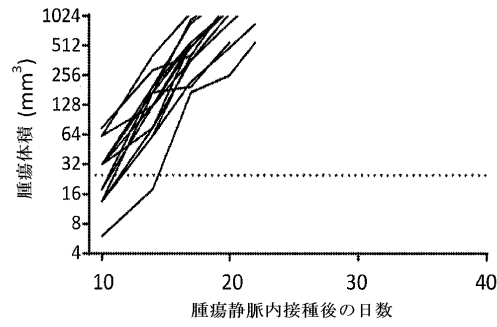


Fig. 20C

【図 20-3】

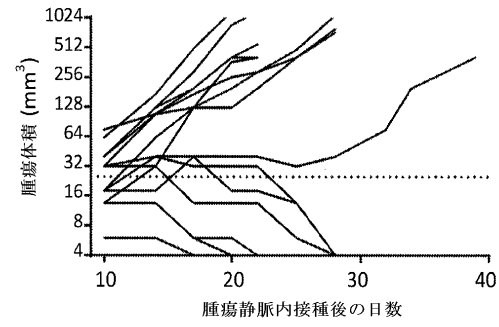


Fig. 20E

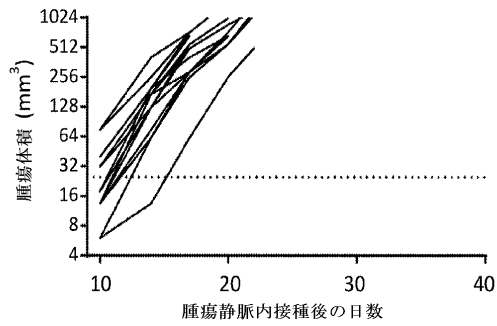


Fig. 20D

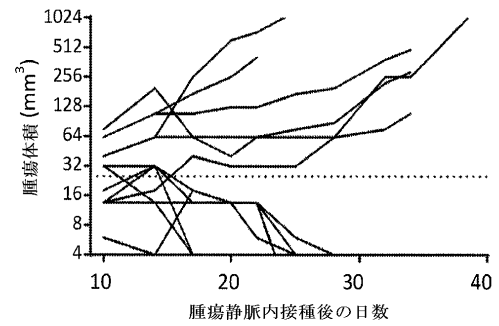


Fig. 20F

【図 20-4】

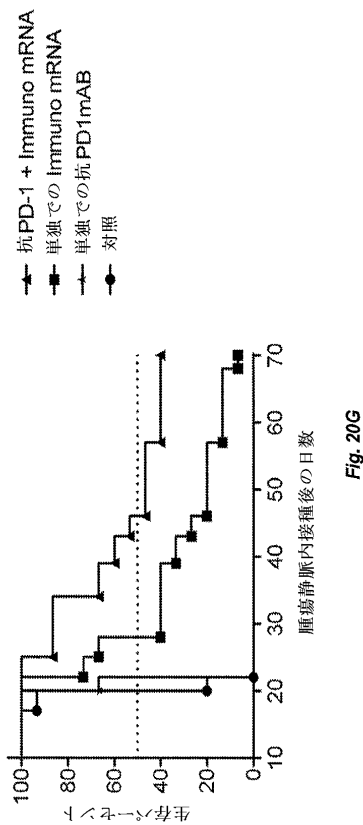


Fig. 20G

【図 21-1】

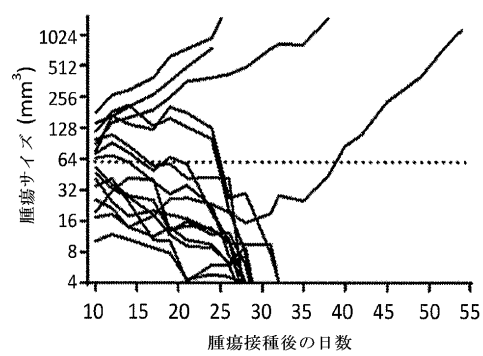


Fig. 21A

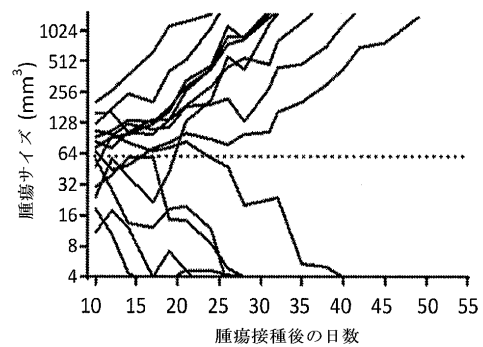


Fig. 21B

10

20

30

40

50

【図 21-2】

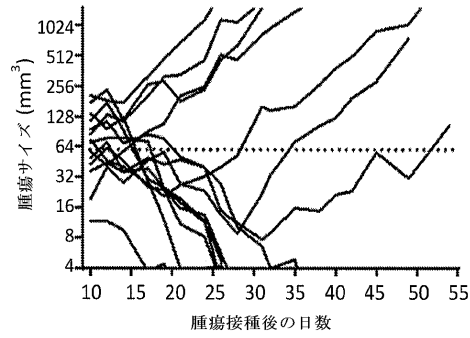


Fig. 21C

【図 21-3】

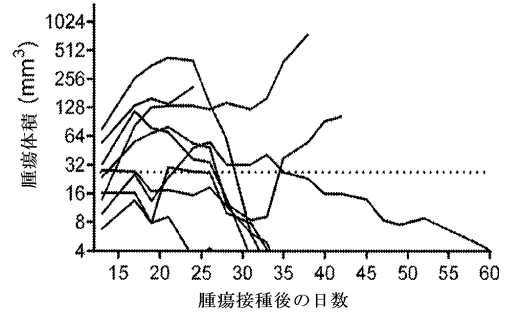


Fig. 21E

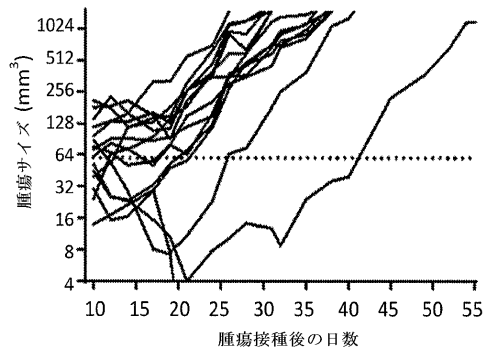


Fig. 21D

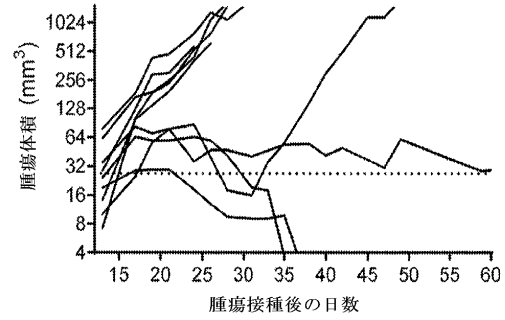


Fig. 21F

【図 21-4】

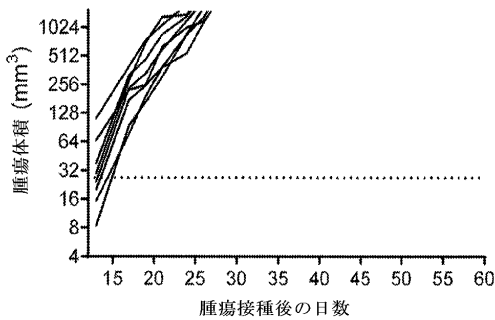


Fig. 21G

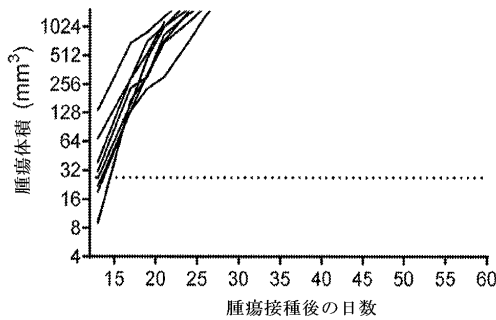


Fig. 21H

【図 21-5】

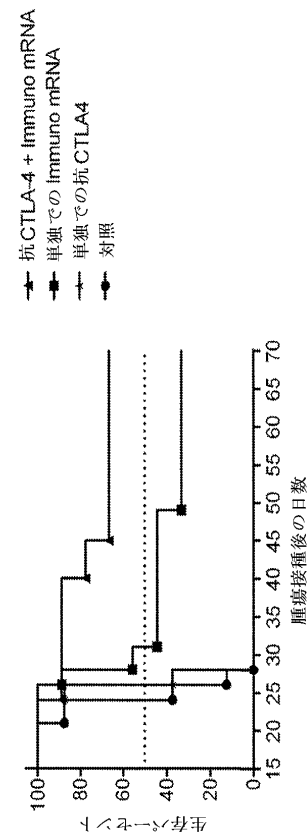


Fig. 21I

10

20

30

40

50

【図 2 2 - 1】

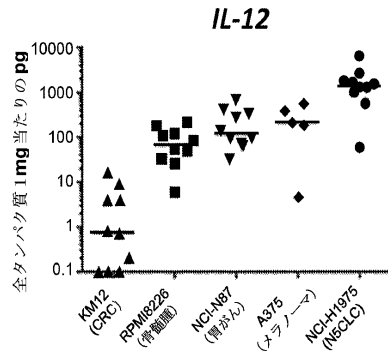


Fig. 22A

【図 2 2 - 2】

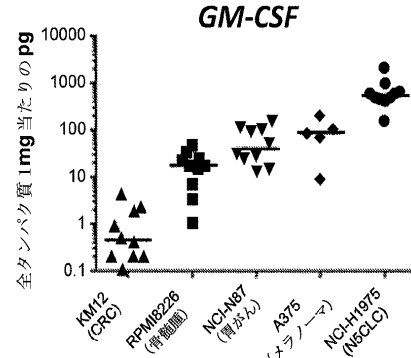


Fig. 22C

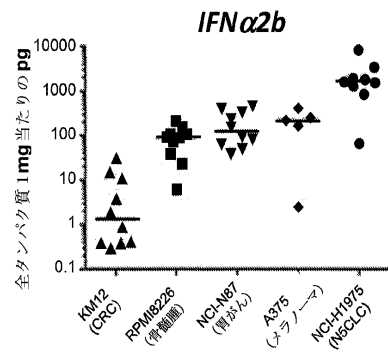


Fig. 22B

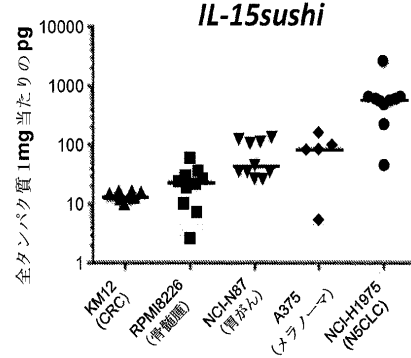


Fig. 22D

【図 2 3 - 1】

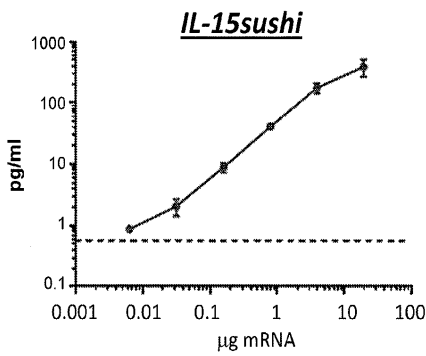


Fig. 23A

【図 2 3 - 2】

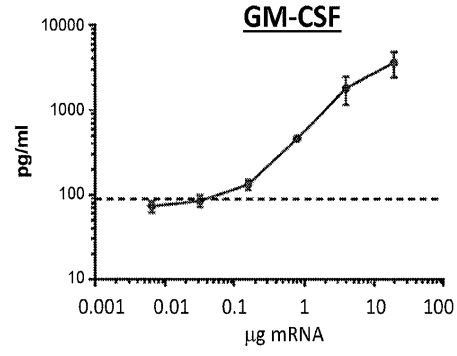


Fig. 23C

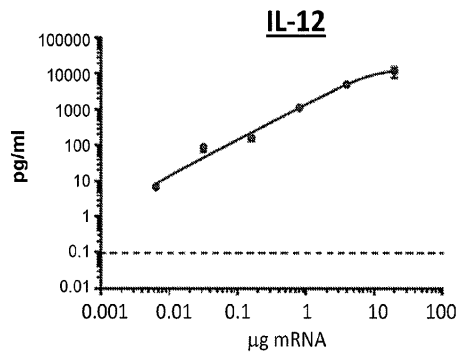


Fig. 23B

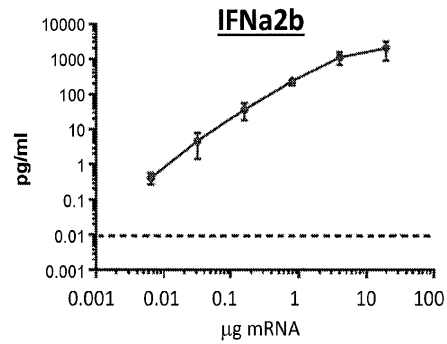


Fig. 23D

10

20

30

40

50

【図 24-1】

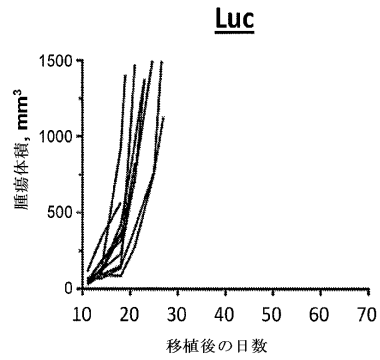


Fig. 24A

【図 24-2】

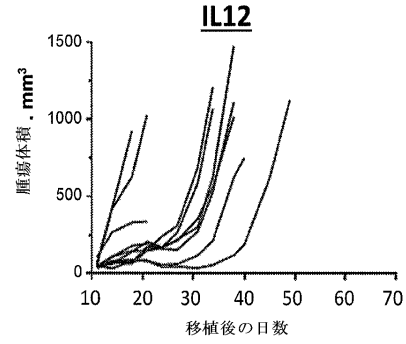


Fig. 24C

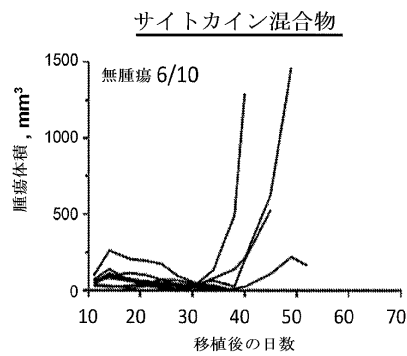


Fig. 24B

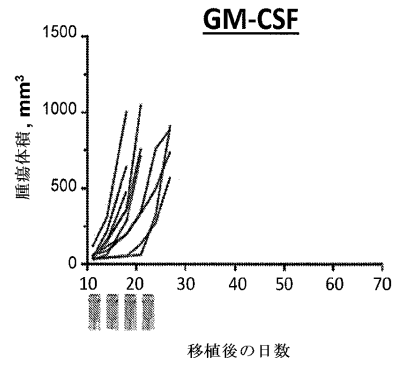


Fig. 24D

【図 24-3】

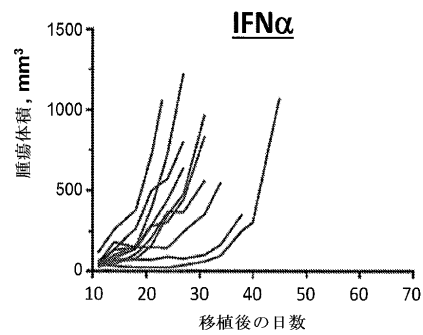


Fig. 24E

【図 24-4】

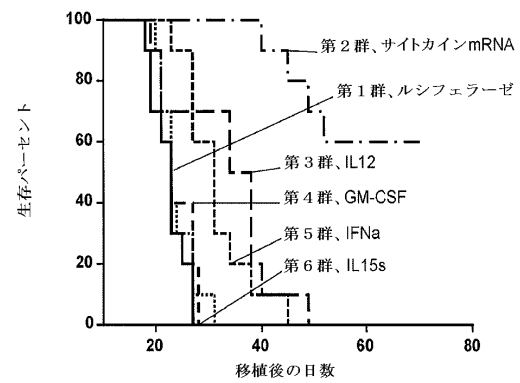


Fig. 24G

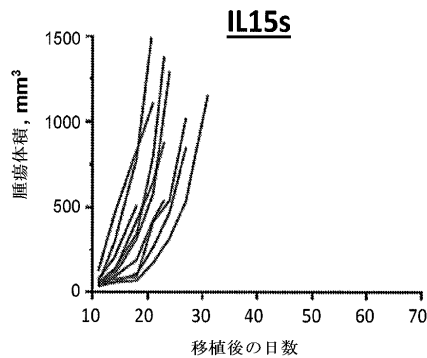


Fig. 24F

10

20

30

40

50

【図 25】

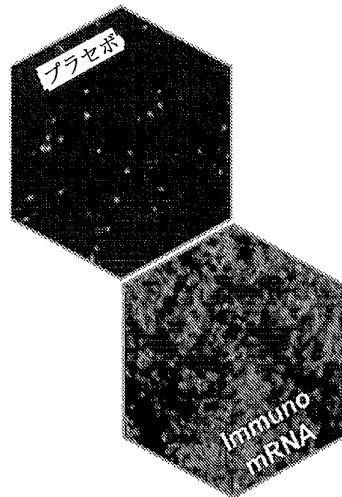


Fig. 25

【図 26】

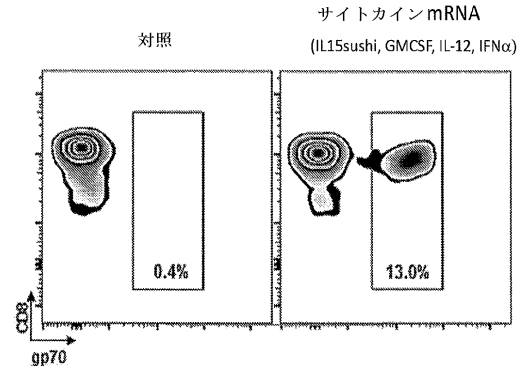


Fig. 26A

Fig. 26B

血液中の抗原特異的T細胞増加

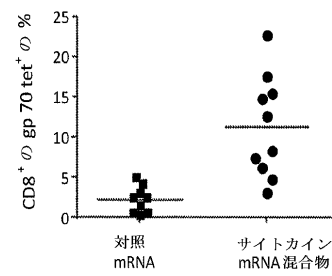


Fig. 26C

【図 27-1】

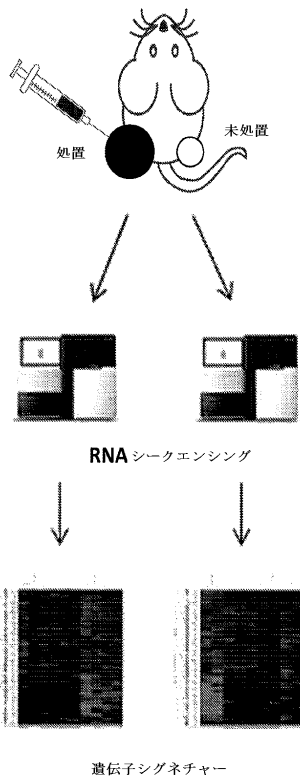


Fig. 27A

【図 27-2】

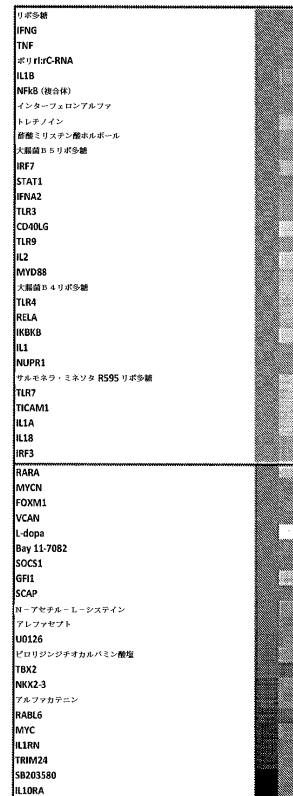


Fig. 27B

10

20

30

40

50

【図 27-3】

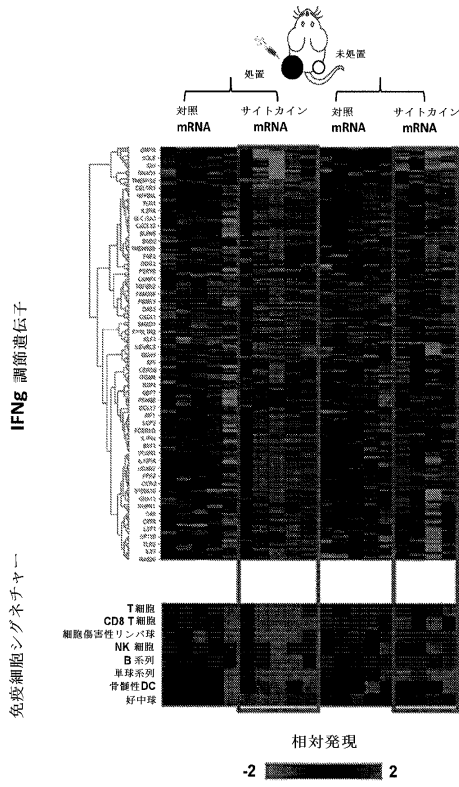
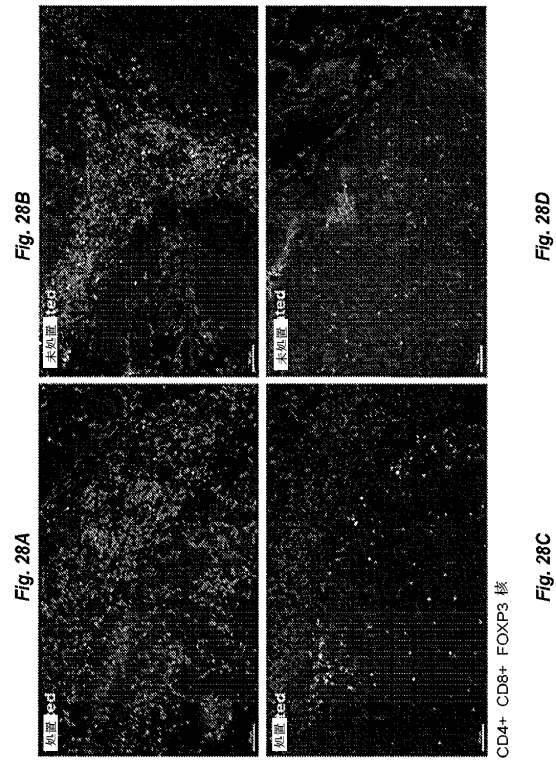
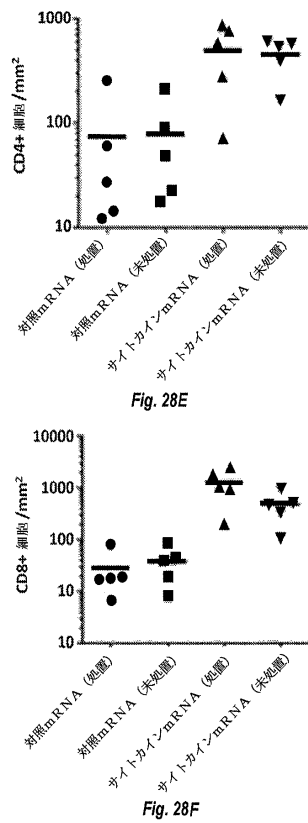


Fig. 27C

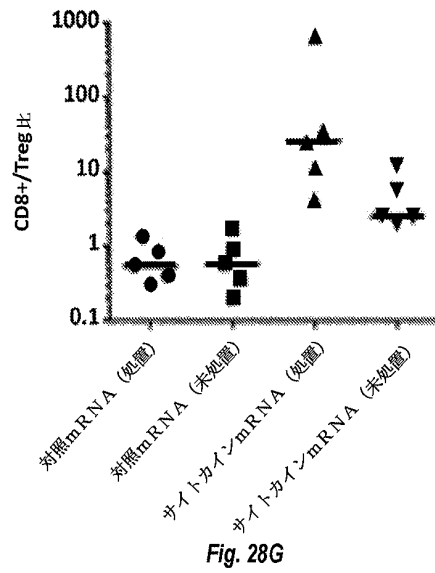
【図 28-1】



【図 28-2】



【図 28-3】



10

20

30

40

50

【図 29-1】

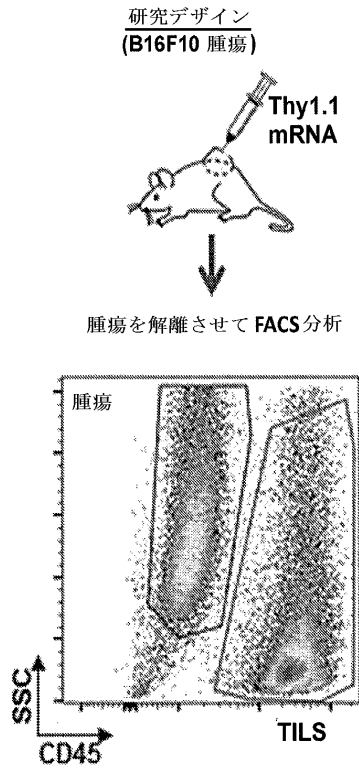


Fig. 29A

【図 29-2】

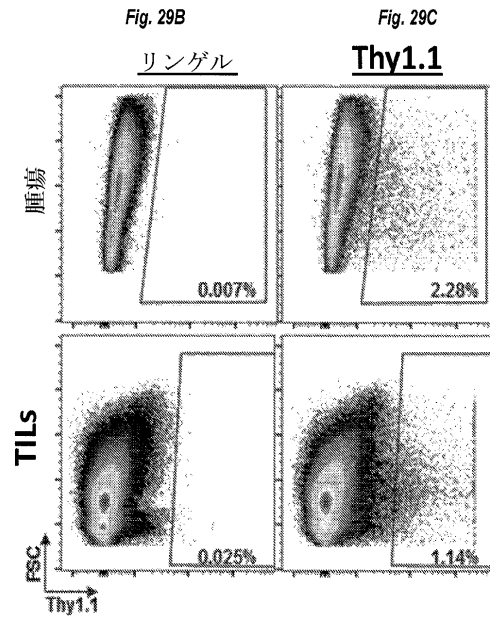


Fig. 29D

Fig. 29E

【図 29-3】

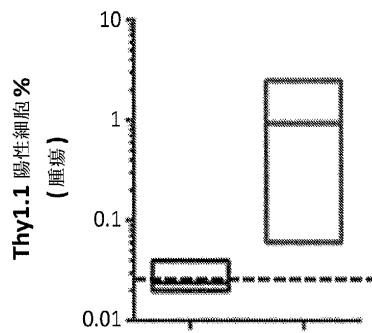


Fig. 29F

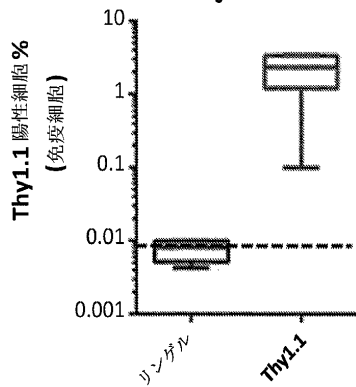


Fig. 29G

【図 30-1】

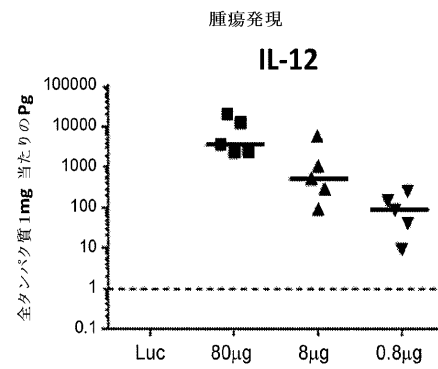


Fig. 30A

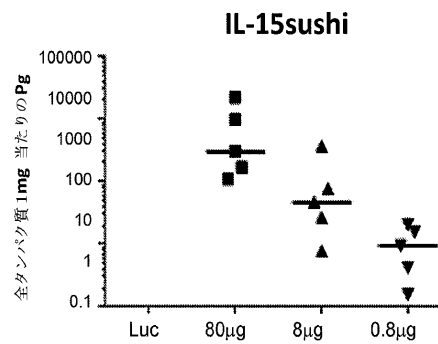


Fig. 30B

10

20

30

40

50

【図 30-2】

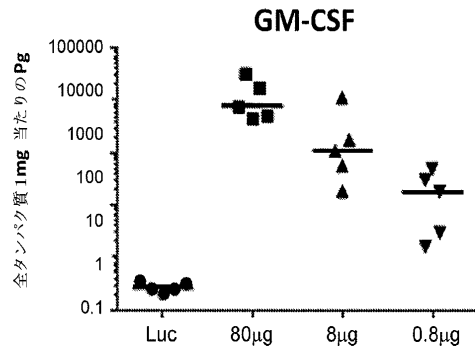


Fig. 30C

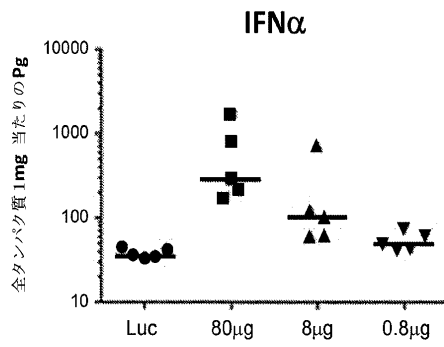


Fig. 30D

【図 30-3】

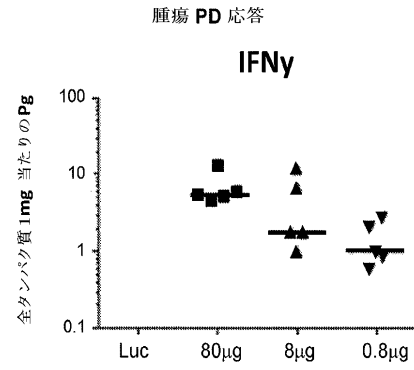


Fig. 30E

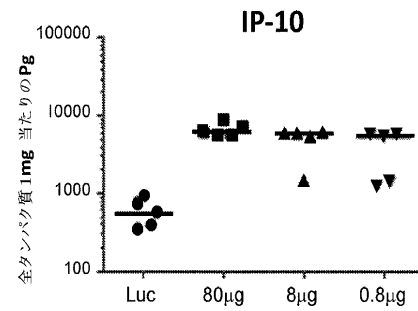


Fig. 30F

【図 31-1】

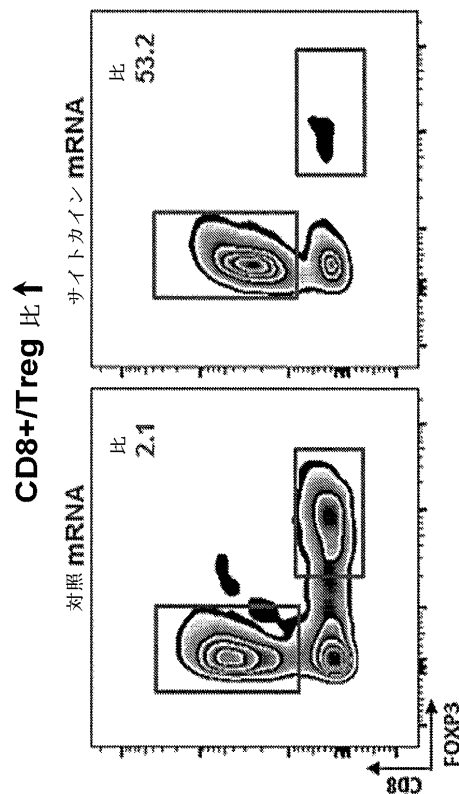


Fig. 31A

Fig. 31B

【図 31-2】

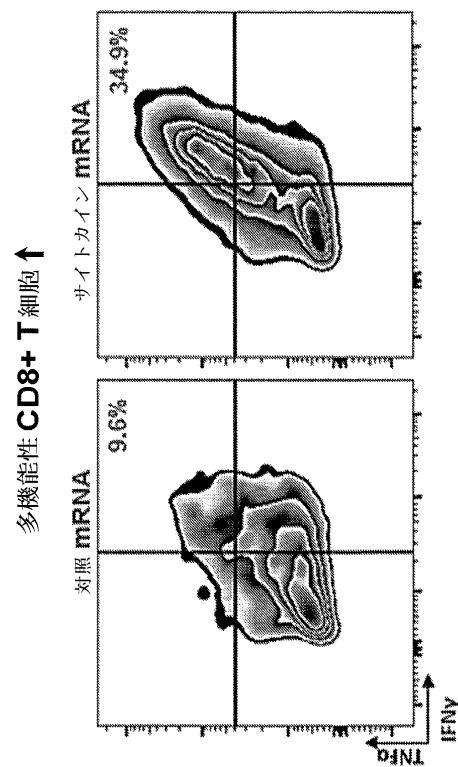


Fig. 31C

Fig. 31D

10

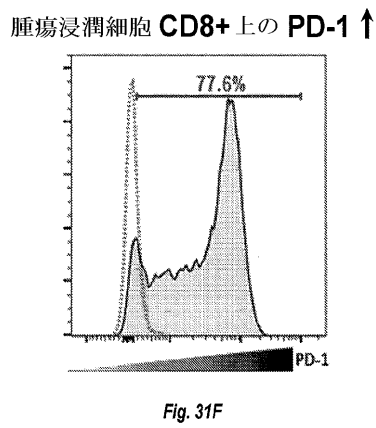
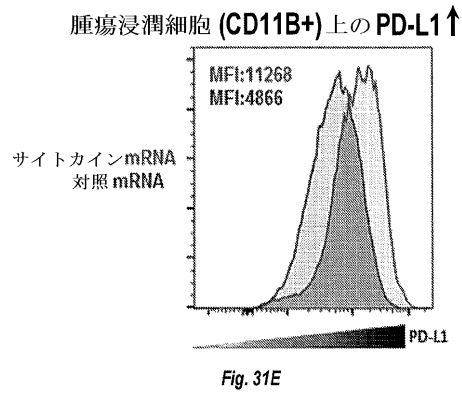
20

30

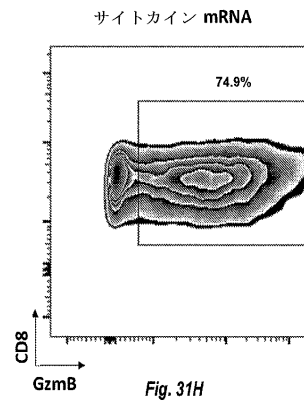
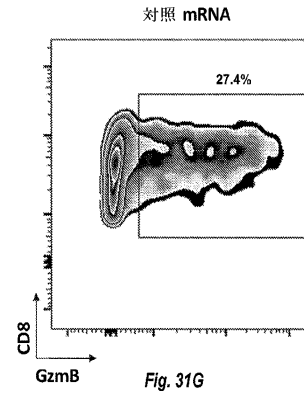
40

50

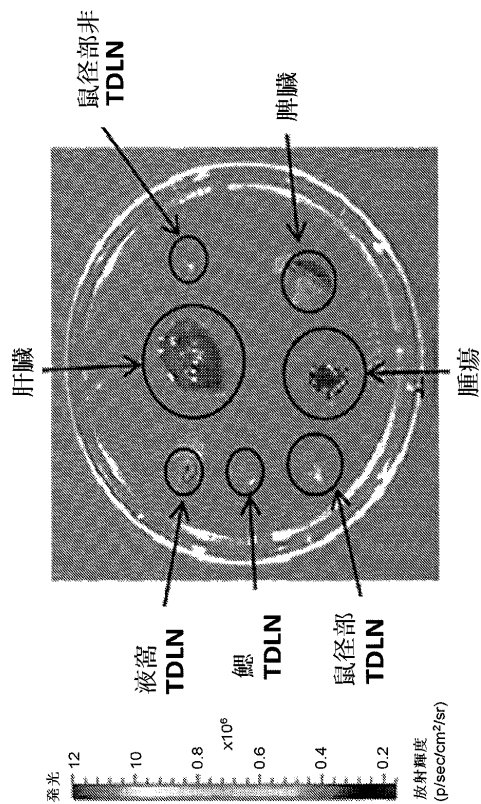
【図 3 1 - 3】



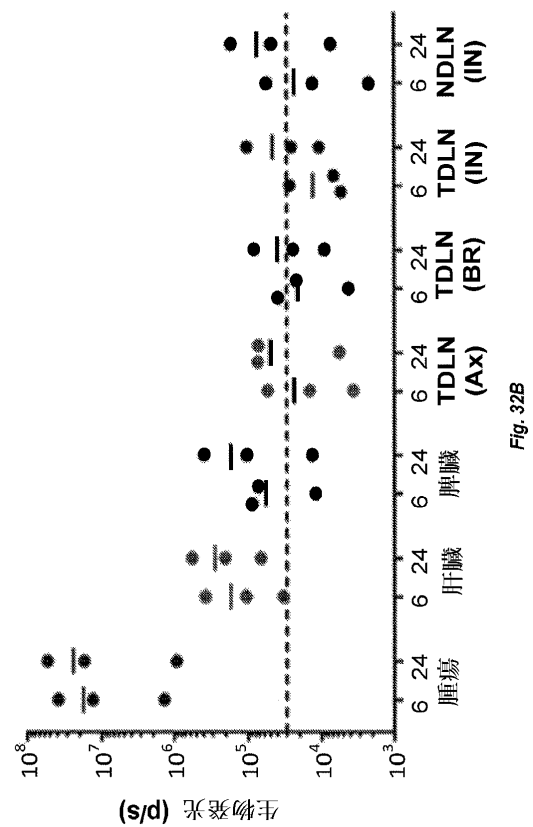
【図 3 1 - 4】



【図 3 2 - 1】



【図 3 2 - 2】



10

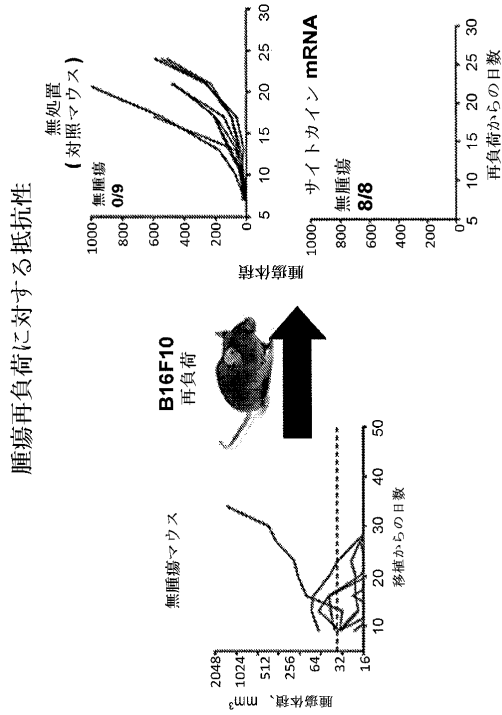
20

30

40

50

【図 3 3】



【図 3 4】

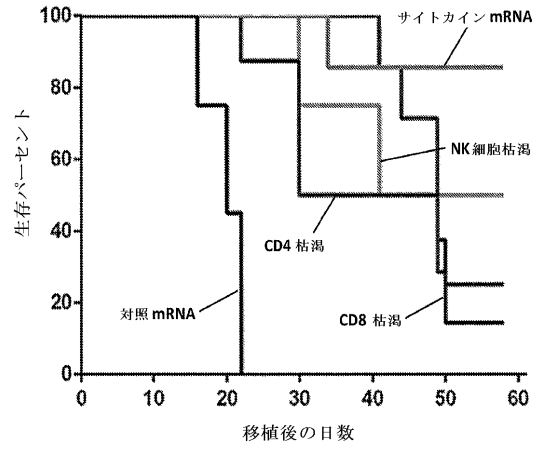


Fig. 33

Fig. 34

【図 3 5】

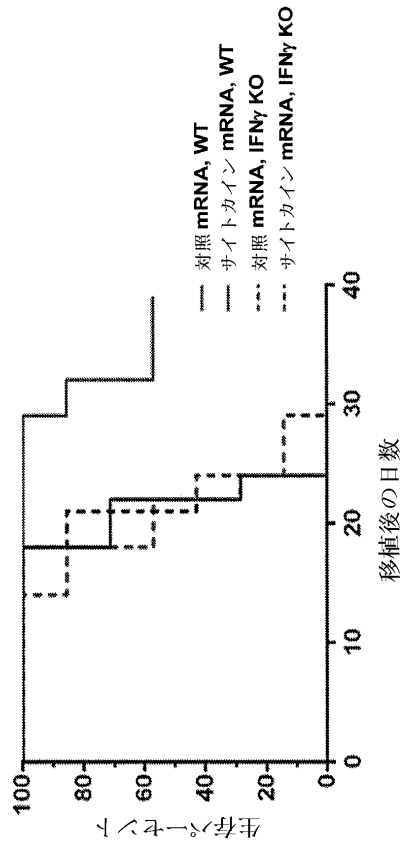


Fig. 35

【配列表】

0007201725000001.app

フロントページの続き

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 62/597,527

(32)優先日 平成29年12月12日(2017.12.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アン・デア・ゴルトグルーベ12. バイオエヌテック・アーゲー

(72)発明者 ドミトリ・ジー・ウィーダーシャイン

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター.メイル・コード:55エー
ー505エー.コーポレートドライブ55.サノフィ

(72)発明者 ティモシー・アール・ワーゲナー

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.ブリッジウォーター.メイル・コード:55エー
ー505エー.コーポレートドライブ55.サノフィ

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特許第6949131(JP, B2)

国際公開第2014/066527(WO, A2)

国際公開第2015/095249(WO, A1)

国際公開第2016/170176(WO, A1)

国際公開第2017/027843(WO, A1)

Seminars in Oncology, 2015年, Vol.42, No.4, p.539-548

Hepatology, 2007年, Vol.45, No.3, p.746-754

OncoImmunology, 2016年, Vol.5, No.2, e1115942

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 48/00

A61K 31/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)