

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-533123

(P2024-533123A)

(43)公表日 令和6年9月12日(2024.9.12)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z 4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-513756(P2024-513756)	(71)出願人 521469128
(86)(22)出願日 令和4年8月31日(2022.8.31)	エリクサージェン セラピューティクス
(85)翻訳文提出日 令和6年4月24日(2024.4.24)	, インコーポレイティド
(86)国際出願番号 PCT/US2022/075789	アメリカ合衆国, メリーランド 2 1 2
(87)国際公開番号 WO2023/034881	0 5 , ポルチモア, ノース ウルフ スト
(87)国際公開日 令和5年3月9日(2023.3.9)	リート 8 5 5 , スイート 6 2 4
(31)優先権主張番号 63/240,280	(74)代理人 100099759
(32)優先日 令和3年9月2日(2021.9.2)	弁理士 青木 篤
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100123582
(31)優先権主張番号 63/341,318	弁理士 三橋 真二
(32)優先日 令和4年5月12日(2022.5.12)	(74)代理人 100108903
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	弁理士 中村 和広
(31)優先権主張番号 63/390,216	(74)代理人 100123593
	弁理士 関根 宣夫
	(74)代理人 100208225

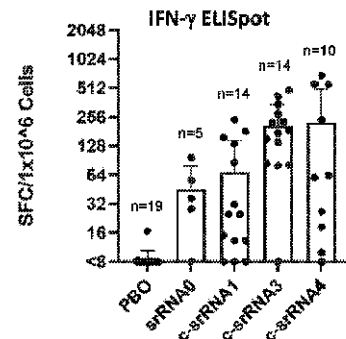
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんのための温度制御可能なRNA免疫療法

(57)【要約】

本開示は、がん抗原をコードする、mRNA、自己複製RNA、及び温度感受性自己複製RNAに関する。このRNA構築物は、ヒト被験体などの哺乳動物被験体におけるがん免疫療法に適している。

FIG. 9B



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物被験体においてがん抗原に対する免疫応答を刺激するための組成物であって、賦形剤、及び融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）と、ウイルス構造タンパク質コード領域を欠くアルファウイルスレプリコンと、を含む温度感受性自己複製RNAを含み、前記ORFが、5'から3'に、

（i）哺乳動物シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列と、

（ii）がん抗原をコードするヌクレオチド配列と、

を含み、

前記温度感受性自己複製RNAが、許容温度で前記融合タンパク質を発現することができるが、非許容温度では発現することができない、組成物。 10

## 【請求項 2】

前記がん抗原が腫瘍関連抗原（TAA）を含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記TAAが、WT1抗原、NY-ESO-1抗原、MAGEA3抗原、BIRC5（サイピン）抗原、PRAME抗原、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記TAAがWT1抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。 20

## 【請求項 5】

前記WT1抗原のアミノ酸配列が、配列番号 2、又は配列番号 2 と少なくとも 95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記TAAが、WT1抗原、NY-ESO-1抗原、MAGEA3抗原、BIRC5抗原、及びPRAME抗原を含む、TAA融合タンパク質である、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記TAA融合タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号 7、又は配列番号 7 と少なくとも 95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の組成物。 30

## 【請求項 8】

前記TAAがBIRC5抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記BIRC5抗原のアミノ酸配列が、配列番号 3、又は配列番号 3 と少なくとも 95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記TAAがNY-ESO-1抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。 40

## 【請求項 11】

前記NY-ESO-1抗原のアミノ酸配列が、配列番号 4、又は配列番号 4 と少なくとも 95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記TAAがMAGEA3抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記MAGEA3抗原のアミノ酸配列が、配列番号 5、又は配列番号 5 と少なくとも 95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の組成物。 50

## 【請求項 14】

前記 T A A が P R A M E 抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

前記 P R A M E 抗原のアミノ酸配列が、配列番号 6、又は配列番号 6 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

前記がん抗原がネオ抗原を含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

前記哺乳動物シグナルペプチドが、哺乳動物抗原提示細胞において発現される表面タンパク質のシグナルペプチドである、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。 10

## 【請求項 18】

前記哺乳動物シグナルペプチドが、C D 5 シグナルペプチドであり、前記 C D 5 シグナルペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1、又は配列番号 1 と少なくとも 9 0 % もしくは 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 に記載の組成物。

## 【請求項 19】

前記アルファウイルスが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、及びセムリキ森林ウイルスからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルスである、請求項 1 9 に記載の組成物。 20

## 【請求項 21】

前記アルファウイルスレプリコンが、非構造タンパク質 2 ( n s P 2 ) の シート 5 と シート 6 との間に 4 ~ 6 個の追加のアミノ酸を含む、前記 n s P 2 の発現を生じる 1 2 ~ 1 8 ヌクレオチドの挿入を有する非構造タンパク質コード領域を含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記追加のアミノ酸が、配列番号 1 4 ( T G A A A ) の配列を含む、請求項 2 1 に記載の組成物。 30

## 【請求項 23】

前記 n s P 2 のアミノ酸配列が配列番号 1 2 を含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

## 【請求項 24】

前記 n s P 2 のアミノ酸配列が、配列番号 9、配列番号 1 0、及び配列番号 1 1 からなる群から選択される 1 つの配列を含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

## 【請求項 25】

前記 n s P 2 のアミノ酸配列が配列番号 1 1 を含む、請求項 2 4 に記載の組成物。

## 【請求項 26】

前記許容温度が  $3 0 \sim 3 6$ 、又は  $3 1 \sim 3 5$ 、又は  $3 2 \sim 3 4$ 、又は  $3 3 \pm 0.5$  であり、前記非許容温度が  $3 7 \pm 0.5$  であり、任意選択で、前記許容温度が  $3 1 \sim 3 5$  であり、前記非許容温度が少なくとも  $3 7 \pm 0.5$  である、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の組成物。 40

## 【請求項 27】

前記組成物が脂質ナノ粒子を含まない、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 28】

前記組成物がキトサンをさらに含む、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 29】

哺乳動物被験体においてがん抗原に対する免疫応答を刺激するための方法であって、請 50

求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の組成物を哺乳動物被験体に投与して、前記哺乳動物被験体において前記がん抗原に対する免疫応答を刺激するステップを含む、方法。

【請求項 30】

前記組成物が皮内投与される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記免疫応答が、前記がん抗原を発現する哺乳動物細胞と反応性の細胞性免疫応答を含む、請求項 29 又は請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞性免疫応答が、がん抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球応答及びがん抗原特異的ヘルパー T リンパ球応答の一方又は両方を含む、請求項 31 に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記免疫応答が、前記がん抗原と反応性の体液性免疫応答をさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記哺乳動物被験体がヒト被験体である、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

( i ) 実施形態 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の組成物と、

( i i ) 哺乳動物被験体への前記組成物の皮内送達のためのデバイスと、

を含む、キット。

20

【請求項 36】

前記デバイスがシリンジ及び針を含む、請求項 35 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年7月18日に提出された米国仮特許出願第63/390,216号、2022年5月12日に提出された米国仮特許出願第63/341,318号、及び2021年9月2日に提出された米国仮特許出願第63/240,280号の利益を主張するものであり、それら各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

電子配列表の提出

電子配列表 ( 699442001540 SEQLIST . xml 、 サイズ : 25374 バイト、作成日 : 2022年8月30日 ) の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、がん抗原をコードする、mRNA、自己複製RNA、及び温度感受性自己複製RNAに関する。このRNA構築物は、ヒト被験体などの哺乳動物被験体におけるがん免疫療法に適している。

【背景技術】

40

【0004】

免疫療法は、がんの治療に有効であり得、より広く使用されるようになっている。1つの療法戦略は、腫瘍細胞において発現される抗原を含む免疫原性組成物を、がん患者に注射することである。腫瘍関連抗原 ( TAA ) は、腫瘍細胞において発現されるが、胚細胞においても発現され、又は正常細胞において低レベルで発現される。腫瘍特異的抗原 ( TSA ) は、ネオ抗原とも呼ばれ、腫瘍細胞においてのみ発現され、多くの場合、腫瘍細胞において変異している遺伝子から発現される。がん免疫療法は、がん細胞に対する細胞傷害性 T リンパ球 ( CTL ) 応答の誘導に依存する。

【0005】

強力な TAA 又は TSA 特異的細胞性免疫応答を誘導して、TAA 又は TSA を発現す

50

る腫瘍細胞を破壊するがん免疫療法が当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、がん細胞に対する細胞性免疫応答を誘導するための、がん抗原（TAA及び/又はTSA）の使用に関する。いくつかの実施形態では、温度制御可能な自己複製RNAワクチンプラットフォームが利用される。例示的な実施形態では、WT1タンパク質は、温度制御可能な自己複製RNA（c-srRNA）から宿主細胞において発現されて、WT1発現腫瘍細胞に対する強力な細胞性免疫応答を誘導する。c-srRNAは、本明細書では温度感受性自己複製RNA（srRNAs）とも呼ばれる。重要なことに、c-srRNA-WT1免疫療法剤（EXG-5101）は、前臨床モデルにおいて、腫瘍増殖を阻害し、更に、確立された腫瘍のサイズを減少させることが見出された。したがって、本明細書に記載されるc-srRNAプラットフォームは、腫瘍関連抗原（TAA）、例えば、WT1、NY-ESO-1、MAGEA3、BIRC5（SURVIVINとしても知られる）、PRAME又は腫瘍特異的抗原（TSA）（ネオ抗原としても知られる）の発現に適したベクターである。いくつかの実施形態では、c-srRNAは、2つ以上のTAA、TSA、又はTAA及びTSAの組み合わせの融合タンパク質を発現するために使用される。

10

【0007】

他の実施形態の中でも、本開示は、賦形剤及び温度制御可能な自己複製RNA（c-srRNA）を含む、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物はキトサンを含む。いくつかの実施形態では、キトサンは、低分子量（約3~5kDa）キトサンオリゴ糖、例えばキトサンオリゴ糖ラクテートである。いくつかの実施形態では、組成物は、リポソームも脂質ナノ粒子も含まない。

20

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】温度制御可能な自己複製RNA（本明細書において「c-srRNA」又は「srRNAs」と称される）の皮内注射後の細胞性（CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞）免疫応答の誘導のための機構の模式図を示す。

【0009】

【図2】温度制御可能な自己複製RNA（c-srRNA）から発現されるがん抗原の模式図を示す。例示的な実施形態では、ヒトウィルムス腫瘍（WT1）タンパク質のコード領域は、c-srRNA内に挿入された目的遺伝子（GOI）である。EXG-5101抗原は、配列番号1として示されるヒトCD5抗原（CD5-SP）由来のシグナルペプチド配列と、配列番号1として示されるヒトWT1タンパク質のアミノ酸配列（アイソフォームD、GenBank番号NM\_024426.6、NCBI番号NP\_077744.4）と、を含む融合タンパク質である。WT1アイソフォームDのコード配列は、非AUG（CUG）翻訳開始コドンを有する。

30

【0010】

【図3】ヒト被験体においてがん抗原に対する免疫応答を刺激するための例示的な方法の模式図を示す。c-srRNAは、許容温度（例えば、30~35）では機能性であるが、非許容温度（例えば、37以上）では機能性でない。人体の表面又はその直下の温度（表面体温）は約31~34であり、約37である人体の深部体温よりも低い。c-srRNAは、許容表面体温である被験体の細胞への皮内及び皮下投与によって直接送達される。

40

【0011】

【図4】同系マウス腫瘍モデルにおけるEXG-5101 mRNAワクチンの試験を例示する。

【0012】

【図5】プラセボ（PBO）、5µg又は25µgのEXG-5101 mRNAワクチンを注射したBALB/cマウスにおける腫瘍の増殖のグラフを示す。5匹のマウス（n

50

= 5) の平均及び標準偏差 (エラーバー) を各群について示す。腫瘍接種後 7 日目までに、3 群すべてのマウスで腫瘍が発生した。しかし、腫瘍接種後 25 日目 (注射後 18 日目) までに、腫瘍増殖は、EXG-5101 mRNA ワクチンを注射したマウスにおいて用量依存的に遅延した。対照的に、プラセボを注射したマウスでは、腫瘍は増殖し続けた。

#### 【0013】

【図 6 A】図 6 A 及び図 6 B は、EXG-5101 mRNA (ヒト WT1 遺伝子をコードする温度制御可能な自己複製 RNA) の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図 6 A は、実験手順を例示する。

【図 6 B】図 6 A 及び図 6 B は、EXG-5101 mRNA (ヒト WT1 遺伝子をコードする温度制御可能な自己複製 RNA) の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図 6 B は、25  $\mu$ g の EXG-5101 又はプラセボ (緩衝液のみ) の皮内注射によって各々免疫化されている 5 匹 (n = 5) のマウスから得られた脾細胞の ELISpot アッセイの結果を示す。左パネルは、ヒト WT1 タンパク質をカバーする 110 のペプチドのプール (11 アミノ酸オーバーラップを有する 15 量体: JPT Peptide Technologies、カタログ番号 PM-WT1) によって刺激された  $1 \times 10^6$  脾細胞当たりのインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) スポット形成細胞 (SFC) の頻度を示す。右パネルは、ヒト WT1 タンパク質をカバーする 110 のペプチドのプール (11 アミノ酸オーバーラップを有する 15 量体: JPT Peptide Technologies、カタログ番号 PM-WT1) によって刺激された  $1 \times 10^6$  個の脾細胞当たりのインターロイキン-4 (IL-4) SFC の頻度を示す。平均及び標準偏差 (エラーバー) を各群について示す。

10

20

#### 【0014】

【図 7】温度制御可能な自己複製 RNA (c-srRNA) から発現される複数の腫瘍関連抗原を含む融合タンパク質の模式図を示す。例示的な実施形態では、EXG-5105 抗原は、配列番号 1 として示されるヒト CD5 抗原 (CD5-SP) 由来のシグナルペプチド配列と、配列番号 2 として示されるヒト WT1 タンパク質のアミノ酸配列 [アイソフォーム D、GenBank 番号 NM\_024426.6、NCBI 番号 NP\_077744.4: WT1 アイソフォーム D のコード配列は、非 AUG (CUG) 翻訳開始コドンを含む] と、配列番号 3 として示されるヒト BIRC5 (SURVIVIN としても知られる) タンパク質のアミノ酸配列 (GenBank 番号 NM\_001168) と、配列番号 4 として示されるヒト NY-ESO-1 タンパク質のアミノ酸配列 (GenBank 番号 NM\_001327) と、配列番号 5 として示されるヒト MAGEA3 タンパク質のアミノ酸配列 (GenBank 番号 NM\_005362) と、配列番号 6 として示されるヒト PRAME タンパク質のアミノ酸配列 (GenBank 番号 NM\_001291715) と、を含む融合タンパク質である。TAA 融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 7 として示され、CD5-SP+TAA 融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 8 として示される。

30

#### 【0015】

【図 8 A】図 8 A ~ 図 8 F は、EXG-5105 mRNA (ヒト WT1 遺伝子、ヒト BIRC5 (SURVIVIN)、ヒト NY-ESO-1、ヒト MAGEA3、及びヒト PRAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製 RNA) の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図 8 A は、実験手順を例示する。0 日目に、合計 10 匹の BALB/c 雌マウスを実験に使用した。5 匹のマウスに各々 25  $\mu$ g の EXG-5105 を皮内注射で投与し、5 匹のマウスにプラセボ (緩衝液のみ) を皮内注射で投与した。14 日目に、脾細胞を各マウスから収集し、EXG-5105 mRNA ワクチン上にコードされる例示的な抗原としての WT1 及び NY-ESO-1 に対する免疫応答について ELISpot アッセイによって試験した。

40

【図 8 B】図 8 A ~ 図 8 F は、EXG-5105 mRNA (ヒト WT1 遺伝子、ヒト BIRC5 (SURVIVIN)、ヒト NY-ESO-1、ヒト MAGEA3、及びヒト P

50

RAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNA)の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図8Bは、ヒトWT1タンパク質をカバーする110のペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体: JPT Peptide Technologies、カタログ番号PM-WT1)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。

【図8C】図8A~図8Fは、EXG-5105 mRNA(ヒトWT1遺伝子、ヒトBIRC5(SURVIVIN)、ヒトNY-ESO-1、ヒトMAGEA3、及びヒトPRAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNA)の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図8Cは、ヒトNY-ESO-1タンパク質をカバーするペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体: Miltenyi Biotec、カタログ番号130-095-380)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。

【図8D】図8A~図8Fは、EXG-5105 mRNA(ヒトWT1遺伝子、ヒトBIRC5(SURVIVIN)、ヒトNY-ESO-1、ヒトMAGEA3、及びヒトPRAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNA)の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図8Dは、ヒトMAGEA3タンパク質をカバーするペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体: JPT PepMix MAGEA3、UniProt ID: P43357、カタログ番号PM-MAGEA3)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。

【図8E】図8A~図8Fは、EXG-5105 mRNA(ヒトWT1遺伝子、ヒトBIRC5(SURVIVIN)、ヒトNY-ESO-1、ヒトMAGEA3、及びヒトPRAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNA)の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図8Eは、ヒトBIRC5(SURVIVIN)タンパク質をカバーするペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体: JPT PepMix Survivin-1、UniProt ID: O15392、カタログ番号PM-Survivin)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。

【図8F】図8A~図8Fは、EXG-5105 mRNA(ヒトWT1遺伝子、ヒトBIRC5(SURVIVIN)、ヒトNY-ESO-1、ヒトMAGEA3、及びヒトPRAME、の融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNA)の皮内注射による、腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図8Fは、ヒトPRAMEタンパク質をカバーするペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体: JPT PepMix PRAME(OIP4)、UniProt ID: P43357、カタログ番号PM-OIP4)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。

【0016】

【図9A】図9A及び図9Bは、T細胞誘導性についてのsrRNA構築物の比較を示す。図9Aは、実験手順を例示する。0日目に、マウスにプラセボ(PBO、緩衝液のみ)、srRNA0、c-srRNA1、c-srRNA3、又はc-srRNA4のいずれかを皮内注射した。srRNA0、c-srRNA1、c-srRNA3、及びc-srRNA4は、SARS-CoV-2の同じRBDをコードする。14日目に、マウスを殺し、RBDタンパク質に対するELISpotアッセイのために脾細胞を単離した。

【図9B】図9A及び図9Bは、T細胞誘導性についてのsrRNA構築物の比較を示す。図9Bは、SARS-CoV-2 RBD（元の株）をカバーする53のペプチドのプール（11アミノ酸オーバーラップを有する15量体）の存在下又は非存在下で、脾細胞中で培養することによって再刺激した免疫マウス由来の $1 \times 10^6$ 個の脾細胞中のIFN-スポット形成細胞（SFC）の数を示す。平均及び標準偏差（エラーバー）を各群について示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

がん免疫療法は、主に細胞性免疫の誘導に依存する免疫原性組成物（すなわち、CD8<sup>+</sup>キラーT細胞及びCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞を伴うT細胞誘導ワクチン）によって最良に達成されると考えられる。本開示は、腫瘍関連抗原（TAA）及び腫瘍特異的抗原（TSA、ネオ抗原とも呼ばれる）などの1つ以上のがん抗原をコードする、mRNA、自己複製RNA（srRNA）、及び温度制御可能な自己複製RNA（c-srRNA）を提供する。したがって、本開示は、がん免疫療法のための細胞性免疫に基づくプラットフォームを提供する。ウィルムス腫瘍1（WT1）は、腫瘍関連抗原（TAA）であり、広範囲の腫瘍において発現されるが、胚組織及び成体の非常に限定された細胞種においてのみ発現される。したがって、いくつかの実施形態では、c-srRNAはWT1をコードする。いくつかの実施形態では、c-srRNAはBIRC5（別名SURVIVIN）をコードする。いくつかの実施形態では、c-srRNAはNY-ESO-1をコードする。いくつかの実施形態では、c-srRNAはMAGEA3をコードする。いくつかの実施形態では、c-srRNAはPRAMEをコードする。さらなる実施形態では、c-srRNAは、WT1、BIRC5、NY-ESO-1、MAGEA3、及びPRAMEからなる群の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つすべてのがん抗原をコードする。

【0018】

細胞性免疫に基づくmRNA免疫療法プラットフォーム

ワクチンプラットフォームは、Elixigenの先行特許出願[国際出願第PCT/US20/67506号、現在国際公開第2021/138447(A1)号として公開]に部分的に記載されている。このワクチンプラットフォームは、細胞性免疫を誘導するように最適化され、これは、ワクチン生物学の既存の知識を、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）などのアルファウイルスに基づく温度制御可能な自己複製mRNA（c-srRNA）と組み合わせることによって可能になる。用語c-srRNA及びsrRNAは、本開示全体を通して互換的に使用され、srRNA 1 ts 2（国際公開第2021/138447(A1)号に記載）が例示的な実施形態である。c-srRNAは、温度感受性を提供するアルファウイルスレプリカーゼに小さなアミノ酸変化を組み込むことによる、自己増幅mRNA（saRNA又はSAM）としても知られるsrRNAに基づく。Elixigenのc-srRNAは、約30~35の許容温度範囲で機能性であるが、約37以上の非許容温度では機能性でない。このプラットフォームは、ゲノム組込みがなく、迅速な開発と展開、及び単純なGMP（優良製造プロセス）プロセスが可能であるというmRNAプラットフォームのすべての利益と同時に、mRNAプラットフォームと比較したsrRNAプラットフォーム（すなわち、本発明者らのc-srRNAプラットフォームに先行したもの）のさらなる利点、特に、より長い発現[Johanning et al., 1995]及びより低い投薬量でのより高い免疫原性[Brito et al., 2014]を有する。しかし、この単純な温度制御可能な特徴は、以下に簡潔に記載されるように、T細胞誘導ワクチンの多くの望ましい特徴をともに引き出すことを可能にする。

【0019】

簡潔に述べると、srRNA 1 ts 2は、異種タンパク質の一過性発現のために開発された温度感受性自己複製VEEVに基づくRNAレプリコンである。温度感受性は、VEEVの非構造タンパク質2（nsP2）内での5つのアミノ酸残基の挿入によって付与される。nsP2タンパク質はヘリカーゼ/プロテイナーゼであり、これはnsP1、ns

10

20

30

40

50

P 3 及び n s P 4 と共に V E E V レプリカーゼを構成する。s r R N A 1 t s 2 は、V E E V 構造タンパク質（カプシド、E 1、E 2 及び E 3）を含有しない。E l i x i r g e n T h e r a p e u t i c s I n c . の国際公開第 2 0 2 1 / 1 3 8 4 4 7 ( A 1 ) 号の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。特に、国際公開第 2 0 2 1 / 1 3 8 4 4 7 ( A 1 ) 号の実施例 3、図 1 2、及び配列番号 2 9 ~ 4 9 は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0020】

全般的な技術及び定義

本開示の実施は、他に示されない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を使用し、これらは当技術分野の技術の範囲内である。

10

#### 【0021】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別段の指示をしない限り、複数の言及を含む。例えば、「1つの(an)」賦形剤は、1つ以上の賦形剤を含む。

#### 【0022】

本明細書で使用される句「含む(comprising)」は、オープンエンドであり、このような実施形態が追加の要素を含み得ることを示す。対照的に、句「からなる(consisting of)」は閉じられており、このような実施形態が追加の要素（微量不純物を除く）を含まないことを示す。句「から本質的になる」は、部分的に閉じられており、このような実施形態が、このような実施形態の基本的特徴を実質的に変化させない要素をさらに含み得ることを示す。

20

#### 【0023】

値に関して本明細書で使用される用語「約」は、その値の90%~110%を包含する（例えば、キトサンオリゴ糖に関して使用される場合、約5,000ダルトンの分子量は、4,500ダルトン~5,500ダルトンを指す）。

#### 【0024】

用語「抗原」は、抗体又はT細胞抗原受容体によって特異的に認識され結合される物質を指す。抗原には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、複合炭水化物、糖、ガングリオシド、脂質及びリン脂質、それらの部分及びそれらの組み合わせが含まれ得る。本開示の文脈において、用語「抗原」は、典型的には、1つ以上の翻訳後修飾を含み得る、少なくとも8アミノ酸残基長のポリペプチド又はタンパク質抗原を指す。

30

#### 【0025】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用され、別段の指定がない限り、特定の長さ限定されない。ポリペプチドには、天然アミノ酸残基又は天然及び非天然アミノ酸残基の組み合わせが含まれ得る。この用語にはまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含まれる。いくつかの態様では、ポリペプチドは、タンパク質が所望の活性（例えば、抗原性）を維持する限り、自然又は天然の配列に対して修飾を含み得る。

40

#### 【0026】

本明細書で使用される用語「単離された」及び「精製された」は、天然に付随している少なくとも1つの成分から取り出された（例えば、その元の環境から取り出された）材料を指す。用語「単離された」は、組換えタンパク質に関して使用される場合、タンパク質を産生した宿主細胞の培養培地から取り出されたタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、単離されたタンパク質（例えば、WT1タンパク質）は、HPLCによって決定される時、少なくとも75%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度である。

#### 【0027】

50

物質の「有効量」又は「十分な量」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果をもたらすのに十分な量であり、このようなものとして、「有効量」は、それが適用される文脈に応じて異なる。抗原をコードする mRNA を含む本開示の組成物を投与する文脈において、有効量は、免疫応答（好ましくは抗原に対する細胞性免疫応答）を刺激するのに十分な mRNA を含有する。

**【0028】**

本開示において、用語「個体」及び「被験体」は、哺乳動物を指す。「哺乳動物」には、限定されるわけではないが、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、サル）、家畜、競技用動物、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）及びペット（例えば、イヌ及びネコ）が含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、被験体はヒト被験体である。

10

**【0029】**

抗原をコードする mRNA を含む組成物に関して本明細書で使用される用語「用量」は、任意の時点で被験体によって摂取される（被験体に投与されるか、又は被験体に受け入れられる）量の測定された部分を指す。本開示の組成物を、それを必要とする被験体に投与することは、被験体において抗原に対する免疫応答を刺激するために、有効量の、抗原をコードする mRNA を含む組成物を投与することを含む。

**【0030】**

応答又はパラメータの「刺激」には、目的のパラメータを除いて他の点では同じ条件と比較した場合、あるいは別の条件と比較した場合に、その応答又はパラメータを誘発及び/又は増強することが含まれる（例えば、抗原を含まないか又はコードしない対照組成物の投与と比較した場合の、抗原を含むか又はコードする組成物の投与後の抗原特異的サイトカイン分泌の増加）。例えば、免疫応答（例えば、Th1 応答）の「刺激」は、応答の増加を意味する。測定されるパラメータに応じて、増加は、2 倍～200 倍以上、5 倍～500 倍以上、10 倍～1000 倍以上、又は 2、5、10、50、もしくは 100 倍～200、500、1,000、5,000、もしくは 10,000 倍であり得る。

20

**【0031】**

逆に、応答又はパラメータの「阻害」には、目的のパラメータを除いて他の点では同じ条件と比較した場合、あるいは別の条件と比較した場合に、その応答又はパラメータを低減及び/又は抑制することが含まれる。例えば、免疫応答（例えば、Th2 応答）の「阻害」は、応答の減少を意味する。測定されるパラメータに応じて、減少は、2 倍～200 倍、5 倍～500 倍以上、10 倍～1000 倍以上、又は 2、5、10、50、もしくは 100 倍～200、500、1,000、2,000、5,000、もしくは 10,000 倍であり得る。

30

**【0032】**

相対的な用語「より高い」及び「より低い」は、目的のパラメータを除いて他の点では同じ条件と比較した場合、あるいは別の条件と比較した場合の、応答又はパラメータにおけるそれぞれ測定可能な増加又は減少を指す。例えば、「より高い抗体力価」は、対照条件（例えば、mRNA を含まないか、又は抗原をコードしない対照 mRNA を含む比較組成物の投与）の結果としての抗原反応性抗体力価よりも、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 倍高い、抗原をコードする mRNA を含む本開示の組成物の投与の結果としての抗原反応性抗体力価を指す。同様に、「より低い抗体力価」は、抗原をコードする mRNA を含む本開示の組成物の投与の結果としての抗原反応性抗体力価よりも、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 倍低い、対照条件（例えば、mRNA を含まないか、又は抗原をコードしない対照 mRNA を含む比較組成物の投与）の結果としての抗原反応性抗体力価を指す。

40

**【0033】**

本明細書で使用される場合、用語「免疫化」は、抗原に対する哺乳動物被験体の反応を増加させ、したがって、感染に抵抗するか、もしくはそれを克服する、及び/又は疾患に抵抗するその能力を改善するプロセスを指す。

**【0034】**

50

本明細書で使用される用語「ワクチン接種」は、哺乳動物被験体の体内へのワクチンの導入を指す。

【0035】

本明細書で使用される場合、「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」及び「パーセント同一性」及び「配列同一性」は、アミノ酸配列(参照ポリペプチド配列)に関して用いた場合、配列を整列させ、最大パーセント配列同一性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列(例えば対象抗原)中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のための整列は、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの一般に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野の技術の範囲内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列するための適切なパラメータを決定することができる。

10

【0036】

アミノ酸置換には、ポリペプチド中の1つのアミノ酸の別のアミノ酸での置換が含まれる。アミノ酸置換を目的の抗原に導入してもよく、産物を、所望の活性、例えば、増大した安定性及び/又は免疫原性についてスクリーニングしてもよい。

【0037】

アミノ酸は概して、以下の共通の側鎖特性にしたがって分類することができる。

20

- (1) 疎水性：Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 中性親水性：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) 酸性：Asp, Glu;
- (4) 塩基性：His, Lys, Arg;
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly, Pro;
- (6) 芳香族：Trp, Tyr, Phe.

【0038】

保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの1つのメンバーを同じクラスの別のメンバーと交換することを含む。非保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを含む。

30

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「賦形剤」は、活性成分(例えば、抗原をコードするmRNA)を含む組成物中に存在する化合物を指す。医薬的に許容され得る賦形剤は、不活性な医薬化合物であり、例えば、溶媒、増量剤、緩衝剤、等張化剤、及び保存剤を含み得る(Pramanick et al., Pharma Times, 45:65-77, 2013)。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、溶媒、増量剤、緩衝剤、及び等張化剤のうち1つ以上として機能する賦形剤を含む(例えば、食塩水中の塩化ナトリウムは、水性ビヒクル及び等張化剤の両方として役立ち得る)。

【0040】

細胞性免疫のための皮内送達の最適化

40

皮内ワクチン接種は、長期持続細胞性免疫及び免疫原の増大をもたらす[Hickling and Jones, 2009]。ヒト皮膚(表皮及び真皮)には、ランゲルハンス細胞及び真皮樹状細胞(DC)を含む抗原提示細胞(APC)が豊富である。皮内ワクチン接種は、APCを標的とするので、皮下又は筋肉内ワクチン接種よりも5~10倍有効であることが知られており[Hickling and Jones, 2009]、このような標的化はまた、長期持続性免疫のためにT細胞免疫経路を活性化する。皮内注射によって、c-srRNAは主に皮膚APCによって取り込まれ、そこで複製し、抗原を産生し、抗原をペプチドに消化し、これらのペプチドをT細胞に提示する(図1)。この経路を介して提示されるペプチドは、MHC-I拘束性CD8<sup>+</sup>キラーT細胞を刺激する。別の経路では、APCはまた、近くの皮膚細胞によって産生される抗原を取り込む。この

50

経路を介して提示されるペプチドは、MHC - II 拘束性 CD4<sup>+</sup> ヘルパー T 細胞を刺激する。

#### 【0041】

皮内注射の問題及び本発明者らの解決策

ここで、本発明者らが特定した潜在的な問題及び本発明者らの c - s r R N A プラットフォームが提供する解決策がある。

#### 【0042】

(1) 皮内ワクチンプラットフォームにおけるような s r R N A の適用について認識されていない重大なハードルは、m R N A 及び s r R N A の両方が皮膚温度で抗原を十分に発現しないことである [ 国際出願第 P C T / U S 2 0 / 6 7 5 0 6 号 ]。分かりにくいことに、ヒトの皮膚の温度 ( 約 3 0 ~ 3 5 ) は、ヒトの深部体温 ( 約 3 7 ) よりも低い。これは、37 で開発されたベクター及びプラットフォームが皮内注射に最適ではないことを意味する。本発明者らの c - s r R N A プラットフォームの1つの新基軸は、それが皮膚温度で抗原を強く発現することである [ 国際出願第 P C T / U S 2 0 / 6 7 5 0 6 号 ]。さらに、この温度制御はまた、c - s r R N A の意図されない全身分布によって引き起こされる安全性リスクを最小化する。なぜなら、c - s r R N A は、その温度がその許容閾値を超えて上昇すると ( c - s r R N A が身体深部に近づく ) 不活性化されるからである。言い換えれば、c - s r R N A プラットフォームは、m R N A 及び s r R N A と比較して皮内注射に最良の抗原を発現し、それはさらに、ベクターが被験体の身体の他の領域に広がり、産生されるようになる能力が制限されるか、又は不活性化されるという安全性の特徴を有する。

10

20

#### 【0043】

(2) 皮内ワクチン接種の別の課題は、適した添加剤の欠如である。アジュバント ( 例えば、アルミニウム塩及び水中油 ) は、皮内経路によって送達される場合、局所的に反応原性が高すぎるため、アジュバントは、臨床的に承認された皮内ワクチンに組み込まれておらず、その結果、免疫原性がより低くなる [ H i c k l i n g a n d J o n e s , 2 0 0 9 ]。筋内投与される m R N A 及び s r R N A ワクチンに使用される脂質ナノ粒子 ( L N P ) も水中油型であり、これは皮膚反応原性を引き起こし、P E G などの L N P 成分に対するアレルギー反応のリスクを増加させ得る。本発明者らの c - s r R N A プラットフォームは、裸の c - s r R N A ( L N P なし、アジュバントなし ) として注射されるため、この問題に対する解決策となる。第1に、細胞、特に A P C 内での R N A の自己複製は、強力な自然免疫を誘導し、これがアジュバントの主要な機能の代替となる。第2に、文献及び本発明者ら自身のデータは、特に皮内注射について、裸の m R N A / s r R N A が、m R N A / s r R N A のエレクトロポレーション [ J o h a n s s o n e t a l . , 2 0 1 2 ] 及び L N P と組み合わせた m R N A / s r R N A [ G o l o m b e k e t a l . , 2 0 1 8 ] と比較して、同等に効率的に抗原を産生することを実証する。

30

#### 【0044】

(3) 第3の課題は、皮内ワクチンの先例の数が限られていることである。日常的に皮内投与されてきたのは B C G ワクチンのみである。皮内注射を採用するためのハードルを下げる1つの方法は、容易で一貫した皮内注射を可能にするために現在利用可能である、M i c r o n J e t 6 0 0 ( N a n o P a s s ) 及び I m m u c i s e ( T e r u m o ) などの特化デバイスを使用することによるものである。これらのデバイスはまた、大規模生産及び展開のための良好な候補でもある。しかし、これらの特殊なデバイスは比較的高価であるため、標準的な針及びシリンジを使用する M a n t o u x 技術による皮内注射も選択肢である。

40

#### 【0045】

適した抗原の設計

腫瘍関連抗原 ( T A A ) は、腫瘍細胞において発現されるが、胚細胞においても発現され、又は正常細胞において低レベルで発現される。米国がん研究所 ( N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e ) は、がん療法の標的に適した75個のがん抗原を選

50

択した (Cheever et al., 2009)。例えば、ウィルムス腫瘍 1 (WT 1) は、米国がん研究所によって特定された 75 個のがん抗原の中で最も有望なものとしてランク付けされた (Cheever et al., 2009)。WT 1 は、広範な腫瘍において発現されるが、胚組織において発現され、及び成体における非常に限定された細胞型においてのみ発現される。例えば、WT 1 は、大部分の白血病 (AML、ALL)、膵臓がん、肺がん、及び神経膠芽腫において発現される。WT 1 ペプチドは、多くの前臨床及び臨床試験においてがんワクチンに対する抗原として使用されている。WT 1 の使用を実施例 1 に示す。このリストはまた、NY-ESO-1 (実施例 2) 及び MAGEA 3 (実施例 3) を含む。本発明者らの c-srRNA プラットフォームに基づくがんワクチンに対する抗原として、任意の TAA を使用してもよい。融合タンパク質又は別々に発現されるタンパク質として、これらの TAA の任意の組み合わせを使用することも可能である (実施例 4)。

10

#### 【0046】

近年、患者由来の腫瘍細胞のゲノム配列決定を行うことが一般的になってきている。このような試みは、多くの場合、それらのゲノムにおける変異による、腫瘍に特異的なタンパク質産物又はペプチドを特定する。ネオ抗原とも呼ばれるこれらの腫瘍特異的抗原 (TSA) は、がんワクチンの理想的な標的である。本発明者らの c-srRNA プラットフォームに基づくがんワクチンに対する抗原として、単一の TSA 又は複数の TSA の融合体を使用してもよい (実施例 5)。

20

#### 【0047】

In vivo での遺伝子発現のキトサン増強

RNアーゼ阻害剤 (ヒト胎盤から精製されたタンパク質) は、c-srRNA 上にコードされる抗原に対する免疫原性をわずかに増強し、これはおそらく、マウスに皮内注射された場合に、in vivo で c-srRNA からの抗原の発現を増強することによる (例えば、国際公開第 2021/138447 (A1) 号の図 25C を参照のこと)。RNアーゼ阻害剤は、c-srRNA を in vivo での RNアーゼ媒介性分解から保護し得る。しかし、注射可能な製品において賦形剤としてタンパク質に基づく RNアーゼ阻害剤を使用することは困難であるため、療法目的のために in vivo で目的の遺伝子 (GOI) の発現を増強することができる代替的な薬剤を見出すことが望ましい。

30

#### 【0048】

低分子量キトサン (分子量約 6 kDa) は、30 ~ 220 nM の範囲の阻害定数で RNアーゼの活性を阻害することが示された (Yakovlev et al., Biochem Biophys Res Commun, 357 (3): J. 584-8, 2007)。2つの異なるキトサンオリゴマー、すなわちキトサンオリゴマー (CAS 番号 9012-76-4、分子量 5 kDa、75% 脱アセチル化: Hepp Medical Chitosan GmbH: 製品番号 44009)、及びキトサンオリゴ糖ラクテート (CAS 番号 148411-57-8、分子量約 5 kDa、>90% 脱アセチル化: Sigma-Aldrich: 製品番号 523682) が最近試験された。驚くべきことに、0.001 µg/mL (約 0.2 nM: Yakovlev et al., 上記、2007) によって発見された阻害定数の約 1/100 という非常に低いレベルのキトサンオリゴマーであっても、c-srRNA 上にコードされるルシフェラーゼの発現を約 10 倍増強可能であることが見出された (データ未提示)。GOI 発現の同様の増強は、最大で 0.5 µg/mL にわたってのキトサンオリゴマーによって、及び 0.1 µg/mL のキトサンオリゴ糖ラクテートによって達成された。

40

#### 【0049】

キトサンは、複合体又はナノ粒子を形成することができるため、ヌクレオチド (DNA 及び RNA) 送達ベクターとして使用されている (Buschmann et al., Adv Drug Deliv Rev, 65 (9): 1234-70, 2013、及び Cao et al., Drugs, 17: 381, 2019 に概説されている)。しかし、キトサンオリゴマーによる GOI 発現の増強が、ナノ粒子又は c-srRNA とキト

50

サンオリゴマーとの複合体形成によって媒介されそうにないことは注目に値する。第1に、このような低濃度のキトサンオリゴマーは、RNAとの複合体形成を可能にしない。第2に、皮内注射の直前にキトサンオリゴマーをc-srRNAに添加することにより、複合体を形成するために十分な時間がない。

#### 【0050】

キトサンオリゴマーは、*in vitro*でのRNAアーゼ阻害剤としての有効濃度と比較してはるかに低い濃度で*in vivo*でのGOIの発現を増強するため(Yakovlev et al., 前出、2007)、キトサンオリゴマーによるこの増強されたGOI発現は、そのRNAアーゼ阻害機構によって媒介されない可能性があると考えられる。例えば、キトサンオリゴマーは、細胞へのc-srRNAの取り込みを促進可能であり、それによって、c-srRNAからのGOIの発現を増強可能である。それにもかかわらず、この驚くべき発見は、c-srRNA上にコードされるGOIの*in vivo*療法発現を増強するための有効な手段を提供するものとなる。

10

#### 列挙された実施形態

1. 哺乳動物被験体においてがん抗原に対する免疫応答を刺激するための組成物であって、賦形剤、及び融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)と、ウイルス構造タンパク質コード領域を欠くアルファウイルスレプリコンと、を含む温度感受性自己複製RNAを含み、このORFが、5'から3'に、

(i) 哺乳動物シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列と、

(ii) がん抗原をコードするヌクレオチド配列と、

20

を含み、

温度感受性自己複製RNAが、許容温度で融合タンパク質を発現することができるが、非許容温度では発現することができない、組成物。

2. がん抗原が腫瘍関連抗原(TAA)を含む、実施形態1に記載の組成物。

3. TAAが、WT1抗原、NY-ESO-1抗原、MAGEA3抗原、BIRC5(SURVIVIN)抗原、PRAME抗原、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態2に記載の組成物。

4. TAAがWT1抗原を含む、実施形態2に記載の組成物。

5. WT1抗原のアミノ酸配列が、配列番号2、又は配列番号2と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態4に記載の組成物。

30

6. TAAが、WT1抗原、NY-ESO-1抗原、MAGEA3抗原、BIRC5抗原、及びPRAME抗原を含む、TAA融合タンパク質である、実施形態2に記載の組成物。

7. TAA融合タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号7、又は配列番号7と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態6に記載の組成物。

8. TAAがBIRC5抗原を含む、実施形態2に記載の組成物。

9. BIRC5抗原のアミノ酸配列が、配列番号3、又は配列番号3と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態8に記載の組成物。

40

10. TAAがNY-ESO-1抗原を含む、実施形態2に記載の組成物。

11. NY-ESO-1抗原のアミノ酸配列が、配列番号4、又は配列番号4と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態10に記載の組成物。

12. TAAがMAGEA3抗原を含む、実施形態2に記載の組成物。

13. MAGEA3抗原のアミノ酸配列が、配列番号5、又は配列番号5と少なくとも95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態12に記載の組成物。

50

14. T A A が P R A M E 抗原を含む、実施形態 2 に記載の組成物。
15. P R A M E 抗原のアミノ酸配列が、配列番号 6、又は配列番号 6 と少なくとも 95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態 14 に記載の組成物。
16. がん抗原がネオ抗原を含む、実施形態 1 に記載の組成物。
17. 哺乳動物シグナルペプチドが、哺乳動物抗原提示細胞において発現される表面タンパク質のシグナルペプチドである、実施形態 1 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の組成物。
18. 哺乳動物シグナルペプチドが C D 5 シグナルペプチドであり、C D 5 シグナルペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1、又は配列番号 1 と少なくとも 90% もしくは 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態 17 に記載の組成物。 10
19. アルファウイルスが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、及びセムリキ森林ウイルスからなる群から選択される、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の組成物。
20. アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルスである、実施形態 19 に記載の組成物。
21. アルファウイルスレプリコンが、非構造タンパク質 2 ( n s P 2 ) の シート 5 と シート 6 との間に 4 ~ 6 個の追加のアミノ酸を含む、n s P 2 の発現を生じる 12 ~ 18 ヌクレオチドの挿入を有する非構造タンパク質コード領域を含む、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の組成物。
22. 追加のアミノ酸が配列番号 14 ( T G A A A ) の配列を含む、実施形態 21 に記載の組成物。 20
23. n s P 2 のアミノ酸配列が配列番号 12 を含む、実施形態 22 に記載の組成物。
24. n s P 2 のアミノ酸配列が、配列番号 9、配列番号 10、及び配列番号 11 からなる群から選択される 1 つの配列を含む、実施形態 23 に記載の組成物。
25. n s P 2 のアミノ酸配列が配列番号 11 を含む、実施形態 24 に記載の組成物。
26. 許容温度が 30 ~ 36、又は 31 ~ 35、又は 32 ~ 34、又は  $33 \pm 0.5$  であり、非許容温度が  $37 \pm 0.5$  であり、任意選択で許容温度が 31 ~ 35 であり、非許容温度が少なくとも  $37 \pm 0.5$  である、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の組成物。
27. 組成物が脂質ナノ粒子を含まない、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の組成物。 30
28. 組成物がキトサンをさらに含む、実施形態 1 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の組成物。
29. 哺乳動物被験体においてがん抗原に対する免疫応答を刺激するための方法であって、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物を哺乳動物被験体に投与して、この哺乳動物被験体においてこのがん抗原に対する免疫応答を刺激するステップを含む、方法。
30. 組成物が皮内投与される、実施形態 29 に記載の方法。
31. 免疫応答が、がん抗原を発現する哺乳動物細胞と反応性の細胞性免疫応答を含む、実施形態 29 又は実施形態 30 に記載の方法。 40
32. 細胞性免疫応答が、がん抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球応答及びがん抗原特異的ヘルパー T リンパ球応答の一方又は両方を含む、実施形態 31 に記載の方法。
33. 免疫応答が、がん抗原と反応性の体液性免疫応答をさらに含む、実施形態 32 に記載の方法。
34. 哺乳動物被験体がヒト被験体である、実施形態 29 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。
35. ( i ) 実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物と、  
( i i ) 哺乳動物被験体へのこの組成物の皮内送達のためのデバイスと、  
を含む、キット。
36. デバイスがシリンジ及び針を含む、実施形態 35 に記載のキット。 50

## 【実施例】

## 【0051】

略語：APC（抗原提示細胞）；BIRC5（5又はSURVIVINを含むバキュロウイルスIAプリペート）；IL-4（インターロイキン-4）；IFN-（インターフェロンガンマ）；MAGEA3（黒色腫関連抗原3）；ORF（オープンリーディングフレーム）；PBO（プラセボ）；NY-ESO-1（ニューヨーク食道扁平上皮がん1又はCTAG1B）；PRAME（黒色腫において優先的に発現される抗原）；SFC（スポット形成細胞）；srRNAs（温度感受性自己複製RNA又はc-srRNA温度制御可能自己複製RNA）；TAA（腫瘍関連抗原）；TSA（腫瘍特異的抗原）；及びWT1（ウィルムス腫瘍1）。

10

## 【0052】

実施例1．WT1を発現する腫瘍に対する免疫療法

本実施例は、ヒトウィルムス腫瘍1（WT1）タンパク質が、皮内注射された温度制御可能な自己複製RNAから発現された場合に、BALB/cマウスにおいて強力な細胞性免疫応答を誘導するという知見を記載する。驚くべきことに、EXG-5101 RNA構築物は、同系マウスがんモデルにおいてヒトWT1を発現するマウス乳腺腫瘍細胞の排除を誘導する。

## 【0053】

材料及び方法

BALB/c近交系雌マウス。

20

## 【0054】

EXG-5101 mRNAは、ヒトWT1タンパク質に融合されたヒトCD5シグナルペプチドを含む融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNAベクター（srRNA1ts2 [国際出願第PCT/US2020/067506号]）のin vitro転写によって産生された（図2）。EXG-5101のWT1タンパク質は、非AUG（CUG）翻訳開始コドンから始まるアイソフォームDによってコードされる。

## 【0055】

4T1乳腺腫瘍細胞（ATCC番号CRL-2539）は、BALB/cマウスに由来し、ヒト乳がん（ステージIV）を再現することが知られている。

## 【0056】

図4は、実験手順を例示する。CMVプロモーターによって駆動されるヒトウィルムス腫瘍1（WT1）タンパク質アイソフォームD（NM\_024426.6）をコードするプラスミドDNAと、選択可能マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子とで、4T1腫瘍細胞をトランスフェクションした。ヒトWT1を発現する4T1細胞の安定な形質転換体を、G418選択によって単離した。細胞をBALB/cマウスの乳腺脂肪体に注射した（腫瘍接種後0日目）。7日目に、プラセボ（PBO）、5µg又は25µgのEXG-5101 mRNAのいずれかを皮内投与した（ワクチン接種後0日目）。腫瘍サイズを、5日目、8日目（ワクチン接種後0日目）、25日目（ワクチン接種後18日目）、及び32日目（ワクチン接種後25日目）に測定した。

30

## 【0057】

結果及び結論

図5は、プラセボ（PBO）、5µg又は25µgのEXG-5101 mRNAワクチンを注射したBALB/cマウスにおける腫瘍の増殖を示す。5匹のマウス（n=5）の平均及び標準偏差（エラーバー）を各群について示す。腫瘍接種後7日目までに、3群すべてのマウスで腫瘍が発生した。しかし、25日目（ワクチン接種後18日目）までに、EXG-5101 mRNAを注射したマウスにおいて腫瘍増殖が用量依存的に抑制された一方、プラセボを注射したマウスにおいて腫瘍は増殖し続けた。

40

## 【0058】

図6A、6Bは、EXG-5101 mRNAの皮内注射による腫瘍関連抗原反応性細胞性免疫応答の誘導を示す。図6Aに示すように、BALB/cマウスに、25µgのE

50

XG-5101又はプラセボ(PBO)のいずれかを0日目に皮内注射した。14日目にこれらのマウスから脾細胞を収集し、ELISpotアッセイに使用した。図6Bは、ヒトWT1タンパク質をカバーする110のペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのIFN- $\gamma$ 又はIL-4スポット形成細胞(SFC)の頻度としてのELISpotアッセイの結果を示す。IFN- $\gamma$ 分泌細胞は、CD8 $^+$ T細胞及びCD4 $^+$ Th1細胞に相当し、細胞媒介性(細胞性)免疫応答があるとみられ、一方、IL-4分泌細胞は、CD4 $^+$ Th2細胞に相当する。したがって、この結果は、EXG-5101がヒトWT1タンパク質に対する細胞性免疫を誘導したことを示す。

#### 【0059】

結論として、皮内注射されたEXG-5101 mRNA免疫療法剤は、乳がんの同系マウスモデルにおいて用量依存的にWT1発現腫瘍の腫瘍増殖を抑制するか、又は腫瘍サイズを減少させる。さらに、皮内注射されたEXG-5101 mRNA免疫療法剤は、マウスモデルにおいてヒトWT1タンパク質に対する細胞性免疫を誘導する。

#### 【0060】

実施例2. NY-ESO-1を発現する腫瘍に対する免疫療法

本実施例は、皮内注射されたヒトNY-ESO-1をコードするc-srRNAが、同系マウスがんモデルにおいてヒトNY-ESO-1を発現するマウス乳腺腫瘍細胞に対する細胞性免疫応答を誘導することができるかどうかの評価を記載する。

#### 【0061】

材料及び方法

BALB/c近交系雌マウス。

#### 【0062】

c-srRNA-NY-ESO1 mRNAは、ヒトNY-ESO-1タンパク質に融合されたヒトCD5シグナルペプチドを含む融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNAベクター(srRNA1ts2[国際出願第PCT/US20/67506号])の*in vitro*転写によって産生される。NY-ESO-1は、がん/精巢抗原1B(CTAG1B)(NM\_001327)としても知られている。

#### 【0063】

4T1乳腺腫瘍細胞(ATCC番号CRL-2539)は、BALB/cマウスに由来し、ヒト乳がん(ステージIV)を再現することが知られている。

#### 【0064】

CMVプロモーターによって駆動される、がん/精巢抗原1B(CTAG1B)(NM\_001327)としても知られるヒトNY-ESO-1をコードするプラスミドDNAと、選択可能マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子とで、4T1腫瘍細胞をトランスフェクションする。ヒトNY-ESO-1遺伝子を発現する4T1細胞の安定な形質転換体を、G418選択によって単離する。細胞をBALB/cマウスの乳腺脂肪体に注射する(腫瘍接種後0日目)。7日目に、プラセボ(PBO)、5 $\mu$ g又は25 $\mu$ gのc-srRNA-NY-ESO-1 mRNAのいずれかを皮内投与する(ワクチン接種後0日目)。腫瘍サイズを、ワクチン接種後のいくつかの時点で測定する。

#### 【0065】

結果および結論

皮内注射されたc-srRNA-NY-ESO-1 mRNA免疫療法剤は、乳がんの同系マウスモデルにおいて用量依存的にNY-ESO-1発現腫瘍の腫瘍増殖を抑制するか又は腫瘍サイズを減少させると考えられる。

#### 【0066】

実施例3. MAGEA3を発現する腫瘍に対する免疫療法

本実施例は、皮内注射されたヒトMAGEファミリーメンバーA3(MAGEA3)をコードするc-srRNAが、同系マウスがんモデルにおいてヒトMAGEA3を発現するマウス乳腺腫瘍細胞に対する細胞性免疫応答を誘導可能であるかどうかの評価を記載す

10

20

30

40

50

る。

【0067】

材料及び方法

BALB/c近交系雌マウス。

【0068】

c-srRNA mRNA-MAGEA3は、ヒトMAGEファミリーメンバーA3(MAGEA3)タンパク質(NM\_005362)に融合されたヒトCD5シグナルペプチドを含む融合タンパク質をコードする温度制御可能な自己複製RNAベクター(srRNA1ts2[国際出願第PCT/US20/67506号])のin vitro転写によって産生される。

10

【0069】

4T1乳腺腫瘍細胞(ATCC番号CRL-2539)は、BALB/cマウスに由来し、ヒト乳がん(ステージIV)を再現することが知られている。

【0070】

CMVプロモーターによって駆動されるヒトMAGEA3(NM\_005362)をコードするプラスミドDNAと、選択可能マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子とで、4T1腫瘍細胞をトランスフェクションする。ヒトMAGEA3を発現する4T1細胞の安定な形質転換体を、G418選択によって単離する。細胞をBALB/cマウスの乳腺脂肪体に注射する(腫瘍接種後0日目)。7日目に、プラセボ(PBO)、5µg又は25µgのc-srRNA-MAGEA3 mRNAのいずれかを皮内投与する(ワクチン接種後0日目)。腫瘍サイズを、ワクチン接種後のいくつかの時点で測定する。

20

【0071】

結果及び結論

皮内注射されたc-srRNA-MAGEA3 mRNA免疫療法剤は、乳がんの同系マウスモデルにおいて用量依存的にMAGEA3発現腫瘍の腫瘍増殖を抑制するか、又は腫瘍サイズを減少させると考えられる。

【0072】

実施例4. 2つ以上の腫瘍関連抗原(TAA)を発現する腫瘍に対する免疫療法

本実施例は、WT1、NY-ESO-1、BIRC5、MAGEA3、及びPRAMEを含む、融合タンパク質をコードする皮内注射されたc-srRNAが、BALB/cマウスにおいて、融合タンパク質のTAAに対する強力な細胞性免疫応答を誘導するという知見を記載する。

30

【0073】

材料及び方法

BALB/c近交系雌マウス。

【0074】

図7は、ヒトWT1、NY-ESO-1、BIRC5、MAGEA3及びPRAMEの、ヒトCD5遺伝子由来のシグナルペプチド配列を有する融合タンパク質をコードするc-srRNA mRNA(srRNA1ts2[国際出願第PCT/US20/67506号])である、EXG-5105ワクチンの模式図を示す。

40

【0075】

4T1乳腺腫瘍細胞は、BALB/c(ATCC:CRL-2539)に由来し、ヒト乳がん(ステージIV)を再現することが知られている。

【0076】

CMVプロモーターによって駆動される、それぞれ、ヒトWT1、BIRC5、NY-ESO-1、MAGEA3及びPRAMEをコードする3つのプラスミドDNAと、G418(ネオマイシン)に対する選択可能マーカーとで、4T1腫瘍細胞株をトランスフェクションした。ヒトWT1、BIRC5、NY-ESO-1、MAGEA3、及びPRAMEを発現する4T1細胞の安定な形質転換体を、G418選択後に単離した。細胞をBALB/cマウスの乳腺脂肪体に注射した。プラセボ(PBO)、5µg又は25µgの

50

EXG - 5105 mRNAワクチンのいずれかを皮内投与した。続いて、腫瘍サイズを測定した。

【0077】

結果及び結論

図8Aは、EXG - 5105 mRNAワクチンの免疫原性を調べるための実験手順を示す。BALB/cマウスに、0日目に25 µgのEXG - 5105又はプラセボ(PBO)のいずれかを皮内注射した。14日目にこれらのマウスから脾細胞を収集し、ELISpotアッセイに使用した。EXG - 5105は、ヒトWT1、NY - ESO - 1、BIRC5、MAGEA3、及びPRAMEを含む、融合タンパク質をコードする。このようなものとして、EXG - 5105の皮内注射は、これらのTAAの5つすべてに対する細胞性免疫を同時に誘導すると予想される。実際、図8B~8Fに示される結果は、これが事実であったことを示す。図8Bは、ヒトWT1タンパク質をカバーする110のペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体)によって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのIFN- $\gamma$ 又はIL-4スポット形成細胞(SFC)の頻度としてのELISpotアッセイの結果を示す。IFN- $\gamma$ 分泌細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞及びCD4<sup>+</sup>Th1細胞に相当し、細胞媒介性(細胞性)免疫応答を示し、一方、IL-4分泌細胞は、CD4<sup>+</sup>Th2細胞に相当する。したがって、この結果は、EXG - 5105がヒトWT1タンパク質に対する細胞性免疫を誘導したことを示す。同様に、図8Cは、ヒトNY - ESO - 1タンパク質をカバーするペプチドのプール(11アミノ酸オーバーラップを有する15量体)によって刺激された $1 \times 10^6$ 個の脾細胞当たりのIFN- $\gamma$ 又はIL-4スポット形成細胞(SFC)の頻度としてのELISpotアッセイの結果を示す。結果は、EXG - 5105が、ヒトNY - ESO - 1タンパク質ならびにヒトWT1タンパク質に対する細胞性免疫を誘導したことを示す。同様に、図8D、図8E、及び図8Fは、それぞれ、ヒトMAGEA3タンパク質、ヒトBIRC5(SURVIVIN)タンパク質、及びヒトPRAMEタンパク質をカバーするペプチドのプールによって刺激された $1 \times 10^6$ 脾細胞当たりのサイトカイン(左、インターフェロンガンマ[IFN- $\gamma$ ]、右、インターロイキン-4[IL-4])スポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。興味深いことに、WT1、NY - ESO - 1、及びBIRC5(これらはすべて、腫瘍ならびにいくつかの他の組織において発現される)に対してよりも、いずれもむしろもっぱら腫瘍及び精巣において発現されるMAGEA3及びPRAMEに対して、より強力な細胞性免疫応答が誘発された。

10

20

30

【0078】

結論として、皮内注射されたEXG - 5105 mRNA免疫療法剤は、同系マウスがんモデルにおいて融合タンパク質の個別の成分に対する細胞性免疫を誘導する。さらに、皮内注射されたEXG - 5105 mRNAワクチンは、*in vivo*でヒトWT1、NY - ESO - 1、BIRC5、MAGEA3、及びPRAMEを発現する腫瘍細胞の増殖を抑制することが予想される。

【0079】

実施例5．腫瘍特異的抗原(TSA)を発現する腫瘍に対する免疫療法

本実施例は、ネオ抗原をコードする皮内注射されたsrRNA tsが、同系マウスがんモデルにおいて、BALB/cマウス中、ネオ抗原に対する細胞性免疫応答を誘導するという知見を記載する。

40

【0080】

材料及び方法

BALB/c近交系雌マウス。

【0081】

srRNA ts mRNA(srRNA ts 2 [国際出願第PCT/US20/67506号])は、ヒトCD5遺伝子に由来するシグナルペプチド配列を有するネオ抗原をコードする。

【0082】

50

4 T 1 乳腺腫瘍細胞は、BALB/c (ATCC: CRL - 2539) に由来し、ヒト乳がん (ステージIV) を再現することが知られている。

【0083】

CMVプロモーターによって駆動されるヒトネオ抗原をコードする3つのプラスミドDNAと、G418 (ネオマイシン) に対する選択可能マーカーとで、4 T 1 腫瘍細胞株をトランスフェクションした。ヒトネオ抗原を発現する4 T 1 細胞の安定な形質転換体を、G418 選択後に単離した。細胞をBALB/cマウスの乳腺脂肪体に注射した。プラセボ (PBO)、5 μg 又は25 μg のsrRNA tsネオ抗原mRNAワクチンのいずれかを皮内投与した。続いて、腫瘍サイズを測定した。

【0084】

結果及び結論

皮内注射されたsrRNA tsネオ抗原mRNAワクチンは、ヒトネオ抗原を発現する腫瘍細胞の増殖を抑制し、同系マウスがんモデルにおいて用量依存的に腫瘍を排除する。

【0085】

実施例6 . T細胞誘導性に関しての自己複製RNAの比較

本実施例は、抗原をコードする皮内注射されたsrRNA ts構築物が、マウスにおいてその抗原に対する細胞性免疫応答を誘導するという知見を記載する。

【0086】

材料及び方法

C57BL/6マウス。

【0087】

3つの異なる温度制御可能な自己複製RNAベクター (c-srRNA) 及び対照自己複製RNAベクター (c-srRNA) を試験した。srRNAの特徴を表6-1に要約する。親VEEV株のIFN- / 感受性は以前に報告された (Spotts et al., J Virol, 72: 10286-10291, 1998)。c-srRNA1は、VEEVのTRD株に基づくが、A16D置換 (TC83変異) 及びP778S置換を有するように修飾された。c-srRNA3もまた、VEEVのTRD株に基づくが、A16D及びP778S置換を含まなかった。srRNA4は、ヒトから単離されたVEEVのV198株に基づいた。3つすべてのc-srRNAベクターには、以前に記載されたように (Koによる米国特許第11, 421, 248号、実施例3、21及び22 (参照により本明細書に組み込まれる) を参照のこと)、温度制御性のためにVEEVのnsP2タンパク質内に同じ5アミノ酸挿入が含まれる。4つすべてのsrRNAは、シグナルペプチド配列を欠く抗原 (SARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメイン) をコードする。

【表1】

表6-1. srRNA特性

RNA	ts変異体	VEEV
srRNA0	x	TRD
c-srRNA1	○	TRD/TC-83
c-srRNA3	○	TRD
c-srRNA4	○	V198

【0088】

VEEVゲノムのヌクレオチド配列は、TRD株がGenBank番号L01442.2として、TC-83株がGenBank番号L01443.1として、GenBankに開示されている。srRNAのnsP2タンパク質のアミノ酸配列は、本明細書に開示される: srRNA0 (配列番号13); c-srRNA1 (配列番号9); c-srRNA3 (配列番号10); c-srRNA4 (配列番号11); c-srRNAコンセンサス (配列番号12)。

【0089】

10

20

30

40

50

s r R N A の調製。すべての s r R N A を *in vitro* 転写によって産生した。N E B 10 - beta Competent E . coli ( C 3 0 1 9 H / C 3 0 1 9 I ) をプラスミド DNA で形質転換し、100 μ g / m L アンピシリンを含む Luria プロスで培養した。精製したプラスミド DNA を M l u I によって線状化した。C a p 1 及びポリ A を用いた c - s r R N A の *in vitro* 転写 ( I V T ) は、C l e a n c a p A U ( T r i l i n k ) と共に T 7 R N A ポリメラーゼを製造業者のプロトコルにしたがって用いた、プラスミド DNA の *in vitro* 転写を用いて行った。

#### 【0090】

マウス皮膚への s r R N A の注射。マウスを無作為に群に分け、注射の1日前に後肢を剃毛し、皮膚を露出させた。乳酸リンゲル ( L R ) 溶液中で再構成した 5 μ g 又は 25 μ g の s r R N A を、剃毛した皮膚に皮内注射した。 10

#### 【0091】

##### 結果及び結論

C 5 7 B L / 6 マウスに、裸の R N A ( 脂質ナノ粒子もトランスフェクション試薬もなし ) としての s r R N A 又はプラセボのうちの1つを皮内注射によって投与した ( 図 9 A ) 。予想された通り、抗原特異的 I F N - 分泌 T 細胞の存在によって評価された細胞性免疫は、ワクチン接種後 14 日目までに既に誘導されていた ( 図 9 B ) 。 c - s r R N A 1 によって誘導された T 細胞応答は、標準的な非温度制御性 s r R N A 0 によって誘導された応答よりも強かった。さらに、 c - s r R N A 3 及び c - s r R N A 4 によって誘導される T 細胞応答はいずれも、 s r R N A 0 及び c - s r R N A 1 によって誘導される応答よりも強かった。驚くべきことに、 c - s r R N A 3 及び c - s r R N A 4 によって誘導される T 細胞応答はいずれも、 c - s r R N A 1 によって誘導される応答よりも約 3 倍高かった。この差異は、 c - s r R N A 3 及び c - s r R N A 4 の親 V E E V 配列が、 c - s r R N A 1 の親 V E E V 配列よりも I 型インターフェロンによる抑制に対してより耐性であることによると考えられる。 20

#### 【0092】

##### 参考文献

本開示に関する参考文献には、E l i x i r g e n T h e r a p e u t i c s の国際出願第 P C T / U S 2 0 2 0 / 0 6 7 5 0 6 号 ; B r i t o e t a l . , M o l T h e r . 2 2 ( 1 2 ) : 2 1 1 8 - 2 1 2 9 , 2 0 1 4 ; C h e e v e r e t a l . , C l i n C a n c e r R e s . 1 5 : 5 3 2 3 - 5 3 3 7 , 2 0 0 9 ; G o l o m b e k e t a l . , M o l T h e r N u c l e i c A c i d s . 1 1 : 3 8 2 - 3 9 2 , 2 0 1 8 ; H i c k l i n g e t a l . , 「 I n t r a d e r m a l D e l i v e r y o f V a c c i n e s : A r e v i e w o f t h e l i t e r a t u r e a n d t h e p o t e n t i a l f o r d e v e l o p m e n t f o r u s e i n l o w - a n d m i d d l e - i n c o m e c o u n t r i e s . 」 P A T H / W H O A u g u s t 2 7 , 2 0 0 9 ; J o h a n n i n g e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 3 ( 9 ) : 1 4 9 5 - 5 0 1 , 1 9 9 5 ; 及び J o h a n s s o n e t a l . , P L o S O n e . 7 ( 1 ) : e 2 9 7 3 2 , 2 0 1 2 が含まれる。 30 40

#### 〔配列表〕

#### 【0093】

##### 配列番号 1

> ヒト CD5 シグナルペプチド

#### 【化 1】

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG

#### 【0094】

##### 配列番号 2

> ヒトウィルムス腫瘍タンパク質 ( N M \_ 0 2 4 4 2 6 . 6 ) 50

【化2】

MDFLLLQDPASTCVPEPASQHTLRSGPGCLQQPEQQGVRDPGGIWAKLGAAEASAERLQGRRSRGASGSE
PQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGCALFVSGAAQWAPVLDFAFPFGASAYGSLGGPAPPPAPPPPPPPF
PHSFIKQEPSWGGAEPEHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSC
LESQPAIRNQGYSTVTFDGTSPSYGHTPSHHAQAQFNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVGCHTPTD
SCTGSQALLLRTPYSSDNLYQMTSQLECMTNQMNLGATLKGVAAGSSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHT
TPILCGAQYRIHTHGVFRGIQDVRVPGVAPTIVRSASETSEKRFPMCAYPGCNKRYFKLSHLQMSRKH
TGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCR
WPSCQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQAL

【0095】

10

配列番号3

> ヒトBIRC5 (別名サイピン) タンパク質 (NM\_001168)

【化3】

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFKCFKELEGWEPD
DDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKFEETAEKVRRRAIEQLAA
MD

【0096】

20

配列番号4

> ヒトNY-ESO-1 タンパク質 (NM\_001327)

【化4】

MQAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGGAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRPHGGAAS
GLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPLVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAA
DHRQLQLS ISSCLQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQR

【0097】

配列番号5

> ヒトMAGEA3 タンパク質 (NM\_005362)

【化5】

30

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASS
LPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVV
GNWQYFFPVIFSKASSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVLAIIA
REGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQH FVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVE
TSYVKVLHMMVKISGGPHISYPLHEWVLRGEE

【0098】

配列番号6

> ヒトPRAME タンパク質 (NM\_001291715)

【化6】

40

MERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVELAGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLK
AMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFAVLDGLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNHQDFWTVWVSGNR
ASLYSFPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVKRKKNVLRCC
KKLKFAMPQDIKMILKMQVLDLSDIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSYISPEK
EEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRDLQLLRHVMNPLETSLITNCRLESGDVMHLSQSPSVSQ
LSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLERASATLQDLVEDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSSISI
SALQSLLOHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHC
GDRTFYDPEPILCPCFMPN

【0099】

配列番号7

> 人工タンパク質: WT1、BIRC5、NY-ESO-1、MAGEA3、PRAME
タンパク質の融合

50

【化7】

LDLFLLLQDPASTCVPEPASQHTLRSGPGCLQQPEQQGVDRDPGGIWAKLGAAEASAERLQGRRSRGASGSE  
PQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAFPGASAYGSLGGPAPPPAPPPPPPP  
PHSFIKQEPSWGGAEPEHEEQCLSFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSC  
LESQPAIRNQYSTVTFDGTSPSYGHTPSHHAQAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEEQQYSVPPPVYGCHTPTD  
SCTGSQALLLRTPYSSDNLYQMTSQLECMTWNQMNLGATLKGVAAGSSSSVVKWTEGQSNHSTGYESDNHT  
TPILCGAQYRIHHTGVFRGIQDVRVPGVAPTLLVRSASETSEKRFPMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKH  
TGEKPYQCDFKDCERRFERSDQLKRHRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRHTGKTSEKPFSCR  
WPCQKQKFFARSDDELVRHNMHQRNMTKLQALMGAPTLPPAWQPFKLDHRISTFKNWPFLGCACTPERM  
AEAGFIHCPTENEPDLAQCFFCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDRE  
AKNKIAKETNNKKKEFEETAEKVRAIEQLAAMDMAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGE  
AGATGGRGPRGAGAAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEELAR  
RSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSSCLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPS  
GQRRMPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPQPSPQ  
GASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEML  
GSVVGWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVL  
AIIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGR  
ALVETSIVKVLHMHVKISGGPHISYPLHEWVLRGEEMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVELAGQ  
SLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLKMGQHLHLETFAVLD  
GLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAEQPF  
IPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVKRKNVLRCLCKKLIKIFAMPMDIKMILKMQVQLDSIEDLEVTC  
TWKLP TLAKFSPYLGQMINLRRLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGR  
LDQLLRHVMNPLETSLITNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLSGVMLTDVVSPEPLQALLERASATLQD  
LVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLFSYGNSSISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIH  
GTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRFTFYDPEPILCPCFMPN

10

20

30

40

50

【0100】

配列番号8

>人工タンパク質：ヒトCD5（シグナルペプチドのみ）、WT1、BIRC5、NYSE-1、MAGEA3、PRAMEタンパク質の融合

【化8】

MPMGSIQPLATLYLLGMLVASCLGLDFLLQDPASTCVPEPASQHTLRSGPGCLQQPEQQGVDRDPGGIWA  
 KLGAEEASAERLQGRRSRGASGSEPQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAFP  
 GASAYGSLGGPAPPPAPPPPPPPPHSFIKQEPSWGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPF  
 PPPPSQASSGQARMPFNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTPSYGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPMG  
 QQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDCTGSQALLLRTPYSSDNLYQMTSQLECMTNQMNLGATLKGVAAG  
 SSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVRFGIQDVRRVPGVAPTLVRSASETSEKRPF  
 MCAYPGCNKRYFKLSHLQMHRSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHRHRHTGVKPFQCKTCQRKFS  
 RSDHLKTHTRHTGKTSEKPFSCRWPSQKFKARSDELVRHHNMHQRNMTKLQALMGAPTLPAPWQPF  
 KDHRISTFKNWPFLEGCCTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCCFKELEGWEPDDDPIDEEHKKHSSGC  
 AFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREKAKNKIAKETNNKKKEFEETAEKVRRRAIEQLAAMDMAEGRGTGGST  
 GDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARG  
 PESRLLEFYLAMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPLVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSIS  
 LQQSLLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRRMPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASS  
 STLVEVTLGEVPAAESPDPQPSPQASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEIEGEPSTFPDLESEFQAALS  
 RKAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCL  
 GLSYDGLLDGNQIMPAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQHFVQ  
 ENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPALVETSYVKVLHMHVKISGGPHISYPLHEWVLRGEEMERRRLWG  
 SIQSRYSISVWTSRRLVELAGQSLKDEALIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPF  
 TCLPLGVLKMGQHLHLETFAVLDGLDVLQAQEVRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFE  
 PEAAQPMTKKRKVDGLSTEAEQFPFIVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVKRKNVLRCLCKKLIKIFAM  
 PMQDIKMIKMQVQLDSIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQF  
 TSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRLDQLLRHVMNPLETLSITNCRLESGDVMHLSQSPSVSOLSVLSL  
 VMLTDVSPPEPLQALLERASATLQDLVDFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLISFYGNSSISALQSL  
 LQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRFTYDP  
 EPILCPCFMPN

10

20

【0101】

配列番号9

> タンパク質 : c - s r R N A 1 n s P 2

【化9】

GSVETPRGLIKVTSYDGEDKIGSYAVLSPQAVLKSEKLSCIHPLAEQVIVITHSGRKG  
 AVEPYHGKVVVPEGHAI PVQDFQALSESATIVNEREFVNRYLHHIATHGGALNTDEEY  
 KTVKPESEHDGEYLYDIDRQKQCVKKELVTLGLTGLVDPPFHEFAYESLRTRPAAPYQVP  
 TIGVYGVPGSGKSGI IKSAVTKKDLVVSACKENCAE I IRDVKKMKGLDVNARTVDSVLLN  
 GCKHPVETLYIDEAFACHAGTLRALIA I IRPKKAVLCGDPKQCGFFNMMCLKVHFNHEIC  
 TQVFHKSISRRTKSVTSVSTLFDYDKMRTTNPKETKIVIDTTGSTKPKQDDLILTCFR  
 GWVKQLQIDYKNEIMTAAASQGLTRKGVYAVRYKVNENPLYAPTSEHVNVLLTRTEDRI  
 VWKTLAGDPWIKTLTAKYPGNFTATIEEWQAEHDAIMRHI LERPDPTDVFQNKANVCWAK  
 ALVPVLKTAGIDMTTEQWNTVDYFETDKAHS AEIVLNQLCVRFFGLDLDSGLFSAPTVP  
 SIRNNHWDNSPSPNMYGLNKEVVRQLSRRYPQLPRAVATGRVYDMNTGAAATGTLRNYDP  
 RINLVVNRRLPHALVLHNEHPQSD FSSFVSKLKGRTVLVVGKLSVPGKMDWLSDRP  
 EATFRARLDLGI PGDVPKYDI I FVNVRTPYKYHHYQQCEDHAIKLSMLTKKACLHLNPGG  
 TCVSIGYGYADRASESIIGAIARQFKFSRVCKPKSSLEETEVLVFFIGYDRKARTHNSYK  
 LSSTLTNIYTGSRLHEAGC

30

40

【0102】

配列番号10

> タンパク質 : c - s r R N A 3 n s P 2

50

## 【化 1 0】

GSVETPRGLIKVTSYAGEDKIGSYAVLSPQAVLKSEKLS CIHPLAEQVIVITHSGRKG  
 AVEPYHGKVVVPEGHAI PVQDFQALSESATIVNEREFVNRYLHHIATHGGALNTDEEYY  
 KTVKPSSEHDGEYLYDIDRKQCVKKELV TGLGLTGELVDP PFHEFAYESLRTRPAAPYQVP  
 TIGVYGVPGSGKSGI IKS AVTKKDLVVS AKKENCAE I IRDVKKMKGLDVNARTVDSVLLN  
 GCKHPVETLY IDEAFACHAGTLRALIAI IRPKKAVLCGDPKQCGFFNMMCLKVHFNHEIC  
 TQVFHKSISRRTKSVTSVSTLFYDKMRTTNPKETKIV IDTTGSTKPKQDDLILTCFR  
 GWVKQLQIDYKNEIMTAAASQGLTRKGVYAVRYKVNENPLYAPTSEHVNVL LTRTEDRI  
 VWKTLAGDPWIKTLTAKYPGNFTATIEEWQAEHDAIMRHILERPDPTDVFQNKANVCWAK  
 ALVPVLKTAGIDMTTEQWNTVDYFETDKAHS AEIVLNQLCVRFFGLDLD SGLFSAPT VPL  
 SIRNNHWDNSPSPNMYGLNKEVVRQLSRRYPQLPRAVATGRVYDMNTGAAATGTLRNYDP  
 RINLVPVNRRLPHALV LHHNEHPQSD FSSFVSKLKGRTVLV VGEKLSVPGKMVDWLS DRP  
 EATFRARLDLGI PGDVPKYDI I FVNVRTPYKYHHYQ CEDHAIKLSMLTKKACLHLNPGG  
 TCVSIGYGYADRASESIIGAIARQFKFSRVCKPKSSLEETEVL FVFIGYDRKARTHNPYK  
 LSSTLTNIYTGSR LHEAGC

10

## 【0 1 0 3】

配列番号 1 1

&gt; タンパク質 : c - s r R N A 4 n s P 2

## 【化 1 1】

GSVETPRGLIKVTSYAGEDKIGSYAVLSPQAVLKSEKLS CIHPLAEQVIVITHSGRKG  
 AVEPYHGKVVVPEGHAI PVQDFQALSESATIVNEREFVNRYLHHIATHGGALNTDEEYY  
 KTVKPSSEHDGEYLYDIDRKQCVKKELV TGLGLTGELVDP PFHEFAYESLRTRPAAPYQVP  
 TIGVYGVPGSGKSGI IKS AVTKKDLVVS AKKENCAE I IRDVKKMKGLDVNARTVDSVLLN  
 GCKHPVETLY IDEAFACHAGTLRALIAI IRPKKAVLCGDPKQCGFFNMMCLKVHFNHEIC  
 TQVFHKSISRRTKSVTSVSTLFYDKMRTTNPKETKIE IDTTGSTKPKQDDLILTCFR  
 GWVKQLQIDYKNEIMTAAASQGLTRKGVYAVRYKVNENPLYAPTSEHVNVL LTRTEDRI  
 VWKTLAGDPWIKTLTAKYPGNFTATIEEWQAEHDAIMRHILERPDPTDVFQNKANVCWAK  
 ALVPVLKTAGIDMTTEQWNTVDYFETDKAHS AEIVLNQLCVRFFGLDLD SGLFSAPT VPL  
 SIRNNHWDNSPSPNMYGLNKEVVRQLSRRYPQLPRAVATGRVYDMNTGAAATGTLRNYDP  
 RINLVPVNRRLPHALV LHHNEHPQSD FSSFVSKLKGRTVLV VGEKLSVPGKKVDWLS DQP  
 EATFRARLDLGI PGDVPKYDI V F INVRTPYKYHHYQ CEDHAIKLSMLTKKACLHLNPGG  
 TCVSIGYGYADRASESIIGAIARQFKFSRVCKPKSSHEETEVL FVFIGYDRKARTHNPYK  
 LSSTLTNIYTGSR LHEAGC

20

30

## 【0 1 0 4】

配列番号 1 2

&gt; 人工タンパク質 : c - s r R N A n s P 2 コンセンサス

## 【化 1 2】

GSVETPRGLIKVTSY[A/D]GEDKIGSYAVLSPQAVLKSEKLS CIHPLAEQVIVITHSGRKG  
 AVEPYHGKVVVPEGHAI PVQDFQALSESATIVNEREFVNRYLHHIATHGGALNTDEEYY  
 KTVKPSSEHDGEYLYDIDRKQCVKKELV TGLGLTGELVDP PFHEFAYESLRTRPAAPYQVP  
 TIGVYGVPGSGKSGI IKS AVTKKDLVVS AKKENCAE I IRDVKKMKGLDVNARTVDSVLLN  
 GCKHPVETLY IDEAFACHAGTLRALIAI IRPKKAVLCGDPKQCGFFNMMCLKVHFNHEIC  
 TQVFHKSISRRTKSVTSVSTLFYDK[K/R]MRTTNPKETKI[V/E] IDTTGSTKPKQDDLILTCFR  
 GWVKQLQIDYKNEIMTAAASQGLTRKGVYAVRYKVNENPLYAPTSEHVNVL LTRTEDRI  
 VWKTLAGDPWIKTLTAKYPGNFTATIEEWQAEHDAIMRHILERPDPTDVFQNKANVCWAK  
 ALVPVLKTAGIDMTTEQWNTVDYFETDKAHS AEIVLNQLCVRFFGLDLD SGLFSAPT VPL  
 SIRNNHWDNSPSPNMYGLNKEVVRQLSRRYPQLPRAVATGRVYDMNTGAAATGTLRNYDP  
 RINLVPVNRRLPHALV LHHNEHPQSD FSSFVSKLKGRTVLV VGEKLSVPGK[M/K]VDWLS D[R/Q]P  
 EATFRARLDLGI PGDVPKYDI[I/V]F[V/I]NVRTPYKYHHYQ CEDHAIKLSMLTKKACLHLNPGG  
 TCVSIGYGYADRASESIIGAIARQFKFSRVCKPKSS[L/H]EETEVL FVFIGYDRKARTH N[P/S]YK  
 LSSTLTNIYTGSR LHEAGC

40

## 【0 1 0 5】

配列番号 1 3

50

> VEEV : srRNA 0

【化 1 3】

```

GSVETPRGLIKVTSYAGEDKIGSYAVLSPQAVLKSEKLSICHLPLAEQVIVITHSGRKGRYAVEPYHGKVV
VPEGHAIPVQDFQALSESATIVYNEREFVNRYLHHIATHGGALNTDEEYKYTKPSEHDGEYLYDIDRKQ
CVKKELVTGLGLTGELVDPFFHEFAYESLRTRPAAPYQVPTIGVYGVPGSGKSGI IKS AVTKKDLVVS AK
KENCAE I IRDVKKMKGLDVNARTVDSVLLNGCKHPVETLYIDEAFACHAGTLRALIA I IRPKAVLCGDP
KQCGFFNMCLKVHFNHEICTQVFHKS I SRRCTKSVTSVSTLFYDKMRTTNPKETKIVIDTTGSTKPK
QDDLILTCFRGWVKQLQIDYKNEIMTAAASQGLTRKGVYAVRYKVNENPLYAPTSEHVNVLLTRTEDRI
VWKTLAGDPWIKTLTAKYPGNFTATIEEWQAEHDAIMRHILERPDPTDVFQNKANVCWAKALVPVLKTAG
IDMTTEQWNTVDYFETDKAHS AEIVLNQLCVRFFGLDLDSGLFSAPTVP L S IRNNHWDNSPSPNMYGLNK
EVVRQLSRRYPQLPRAVATGRVYDMNTGTLRNYDPRINLVPVNRRLPHALVLHHNEHPQSD FSS FVSKLK
GRTVLVVGEKLSVPGKMDWLSDRPEATFRARLDLGI PGDVPKYD I IFVNVRTPYKYHHYQQCEDHAIKL
SMLTKKACLHLNPGGTCVSI GYGYADRASES I IGAIARQFKFSRVCKPKSSLEETEVL FVFIGYDRKART
HNPYKLSSTLTNIYTGSRLHEAGC

```

10

【 0 1 0 6】

配列番号 1 4

> 人工タンパク質 : t s 挿入

T G A A A

【 図 面】

【 図 1】

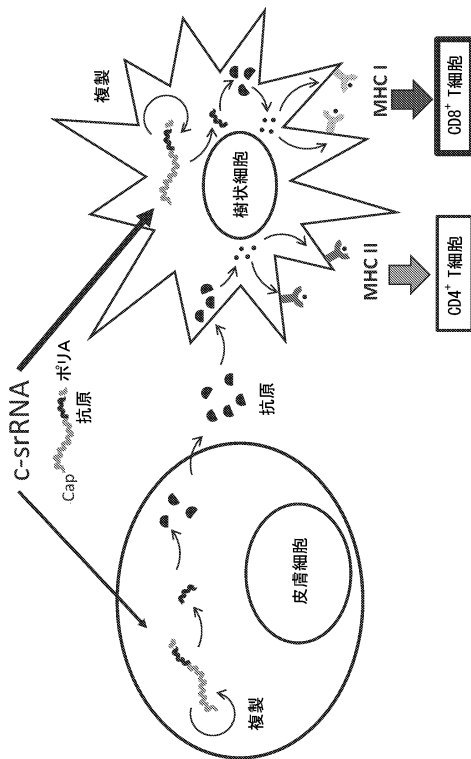


FIG. 1

【 図 2】

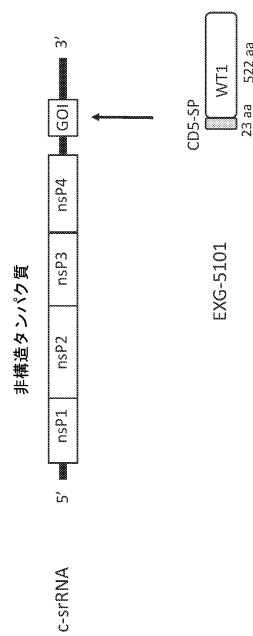


FIG. 2

20

30

40

50

【 図 3 】

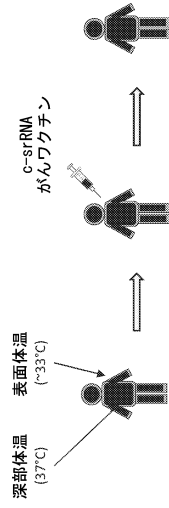


FIG. 3

【 図 4 】

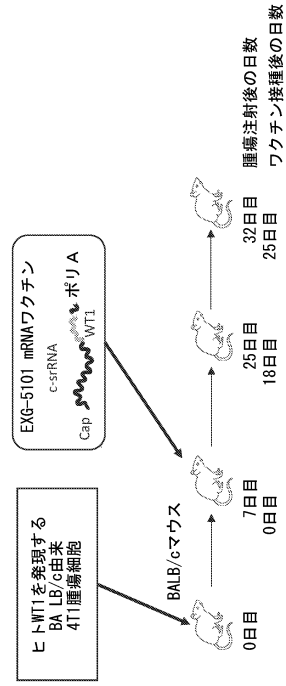


FIG. 4

10

20

【 図 5 】

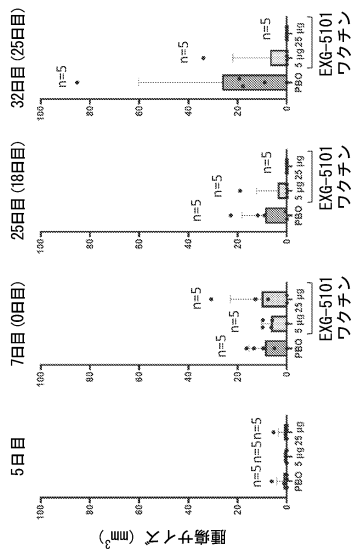
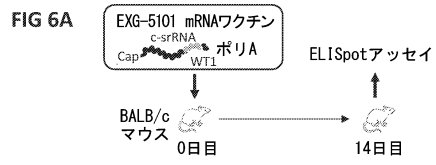


FIG. 5

【 図 6 A 】

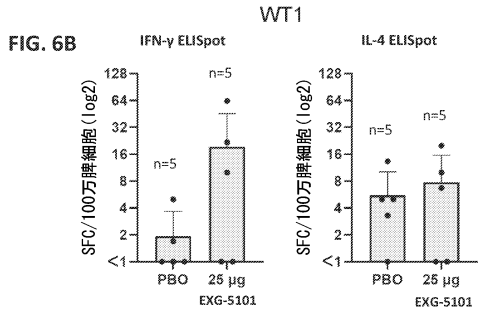


30

40

50

【 図 6 B 】



【 図 7 】

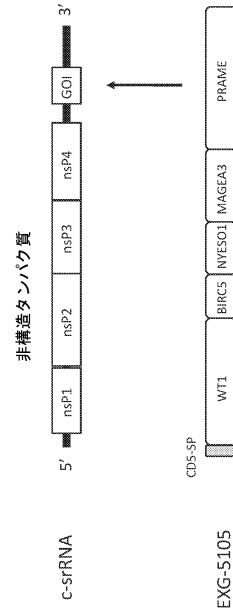
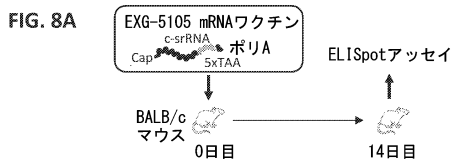


FIG. 7

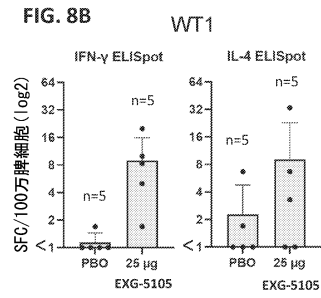
10

20

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

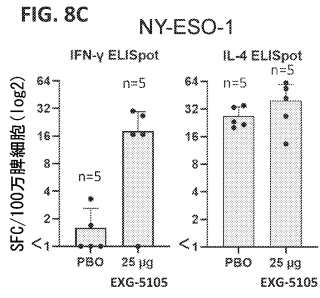


30

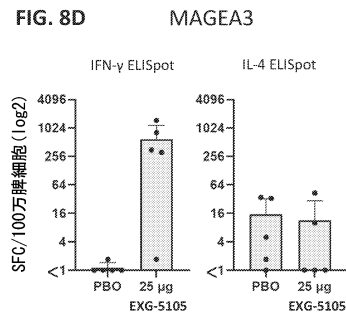
40

50

【 図 8 C 】

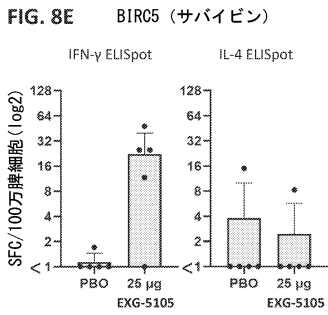


【 図 8 D 】

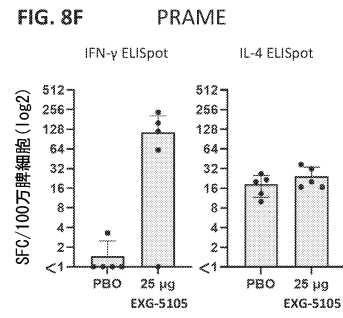


10

【 図 8 E 】

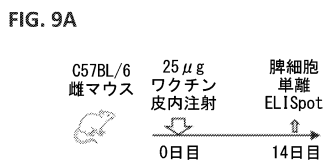


【 図 8 F 】

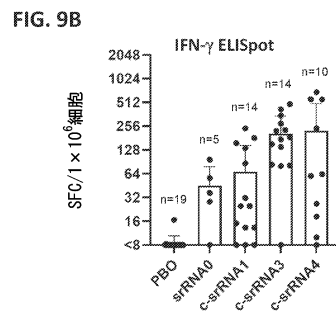


20

【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



30

40

50

【配列表】

2024533123000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2022/075789

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p><b>A61K 39/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)</b>  <b>C07K 14/005 (2006.01) C07K 14/18 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)</b>  <b>A61K 9/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</b></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																																
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p><b>STN</b> (searched MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS and EMBASE): alphavirus, Venezuelan equine encephalitis virus, Sindbis virus, Semliki Forrest virus, self-replicating, temperature-sensitive, tumour, tumour antigen, mammalian signal peptide, CD5 signal peptide, WT1, NY-ESO-1, BIRC5, MAGEA3, PRAME and like terms; <b>EPOQUE</b> (searched PATENW English language databases): alphavirus, Venezuelan equine encephalitis virus, Sindbis virus, Semliki Forrest virus, self-replicating, temperature-sensitive, tumour, antigen, immunize, vaccinate, WT1, NY-ESO-1, BIRC5, MAGEA3, PRAME, C12N2770/36111, A61K39/0011, mutation, nsP2 and like terms; <b>Google</b>: RNA, self-replicating, temperature-regulated, cancer, antigen, nsP2, WT1, NY-ESO-1, BIRC5, MAGEA3, PRAME, alphavirus and like terms; <b>Google Patents</b>: self-replicating, RNA, temperature, sensitive, applicant's name; <b>Google Scholar</b>: self-replicating, RNA, cancer, temperature, sensitive, VEEV, signal, peptide, inventor's name; <b>Automated Preliminary Search Tool</b> (searched DOCDB, DWPI and IP Australia internal databases) applicant's and inventor's names.</p>																																
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Documents are listed in the continuation of Box C</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C      <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex</p> <p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"D"</td> <td>document cited by the applicant in the international application</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		Documents are listed in the continuation of Box C		"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"D"	document cited by the applicant in the international application	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																														
	Documents are listed in the continuation of Box C																															
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																													
"D"	document cited by the applicant in the international application	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																													
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																													
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family																													
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																															
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																															
<p>Date of the actual completion of the international search 21 October 2022</p>		<p>Date of mailing of the international search report 21 October 2022</p>																														
<p>Name and mailing address of the ISA/AU</p> <p>AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustrialia.gov.au</p>		<p>Authorised officer</p> <p>Joan Holgate AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2671</p>																														

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2022/075789
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021138447 A1 (Elixirgen Therapeutics, Inc) 08 July 2021 Title; Abstract; Figures 1A-1D, 8, 12, 21; Example 3, 10, 13, 15, 19; SEQ ID NO: 39; Claims 22, 24, 27; [0146]; Table 3-1	1-5, 8-36
Y	US 20110207223 A1 (Tang et al) 25 August 2011 Abstract; Claim 11: Figures 2 and 5-8; [0038, 0045]	1-5, 8-36
Y	WO 2017152042 A2 (New York University) 08 September 2017 Abstract; Figures 1A-2B; Tables 1-28; pages 12-13; page 15, lines 14-24; page 107, lines 5-13 and 25-30	1-5, 8-36
Y	WO 2018161092 A1 (New York University) 07 September 2018 Abstract; Figures 1A-2B; Tables 1-28 and 30; Example 2; Pharmaceutical compositions, page 118	1-5, 8-36
Y	WO 2021138448 A1 (Elixirgen Therapeutics, Inc) 08 July 2021 Abstract; Examples 3 and 10; SEQ ID NO: 44; Table 3-1; Figures 1C, 8 and 12; Claims 22, 24 and 27; [0067, 0095, 0101-0102, 0118, 0122, 0195]	1-5, 8-36
Y	US 20060024788 A1 (Renner et al) 02 February 2006 Title; Figures 1-2, 4A-4B and 7A and associated text; SEQ ID NOs: 2-9; [0114, 0165]; Examples 1, 6, 8	1-5, 8-21, 26-36

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/US2022/075789**

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a.  forming part of the international application as filed.
- b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).
  - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2022/075789	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2021138447 A1	08 July 2021	WO 2021138447 A1	08 Jul 2021
		AU 2020417800 A1	14 Jul 2022
		CA 3162690 A1	08 Jul 2021
		IL 294290 A	01 Aug 2022
		KR 20220129567 A	23 Sep 2022
		US 2021381005 A1	09 Dec 2021
		US 11421248 B2	23 Aug 2022
		US 20110207223 A1	25 August 2011
US 20110207223 A1	25 August 2011	US 9234181 B2	12 Jan 2016
		AU 2008338803 A1	25 Jun 2009
		AU 2008338803 B2	05 Feb 2015
		CA 2705787 A1	25 Jun 2009
		EP 2225374 A2	08 Sep 2010
		EP 2225374 B1	14 Aug 2013
		JP 2011504724 A	17 Feb 2011
		JP 5627464 B2	19 Nov 2014
		JP 2014209917 A	13 Nov 2014
		WO 2009079185 A2	25 Jun 2009
		WO 2017152042 A2	08 September 2017
AU 2017226199 A1	13 Sep 2018		
BR 112018067565 A2	05 Feb 2019		
CA 3015530 A1	08 Sep 2017		
CN 109415416 A	01 Mar 2019		
EP 3423473 A2	09 Jan 2019		
IL 261273 A	31 Oct 2018		
JP 2019510488 A	18 Apr 2019		
KR 20180119659 A	02 Nov 2018		
US 2018000912 A1	04 Jan 2018		
WO 2018161092 A1	07 September 2018		
		EP 3589312 A1	08 Jan 2020
		US 2020377598 A1	03 Dec 2020
WO 2021138448 A1	08 July 2021	WO 2021138448 A1	08 Jul 2021
		AU 2020419183 A1	14 Jul 2022
		CA 3162825 A1	08 Jul 2021

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.  
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

10

20

30

40

50

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2022/075789	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
US 20060024788 A1	02 February 2006	CN 115175689 A	11 Oct 2022
		IL 294289 A	01 Aug 2022
		KR 20220128367 A	20 Sep 2022
		US 2006024788 A1	02 Feb 2006
		AU 2848199 A	18 Oct 1999
		AU 757549 B2	27 Feb 2003
		CA 2325564 A1	07 Oct 1999
		EP 1066395 A1	10 Jan 2001
		EP 1066395 B1	14 Sep 2005
		JP 2002509729 A	02 Apr 2002
		JP 2005323620 A	24 Nov 2005
		NZ 507195 A	25 Jul 2003
		US 2003053988 A1	20 Mar 2003
		US 7005275 B2	28 Feb 2006
WO 9950432 A1	07 Oct 1999		
<b>End of Annex</b>			

10

20

30

40

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.  
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z Z N A

(32)優先日 令和4年7月18日(2022.7.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

弁理士 青木 修二郎

(74)代理人 100217179

弁理士 村上 智史

(72)発明者 ミノル エス . エイチ . コ

アメリカ合衆国, メリーランド 21205, ボルチモア, ノース ウルフ ストリート 855, スイート 624, シーノオー エリクサージェン セラピューティクス, インコーポレイティド

F ターム (参考) 4C076 CC07 CC27 EE20  
 4C084 AA13 NA05 NA06 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262  
 4C085 AA03 BB01 BB23  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 NA05 NA06 ZB09 ZB26