

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516637
(P2025-516637A)

(43)公表日 令和7年5月30日(2025.5.30)

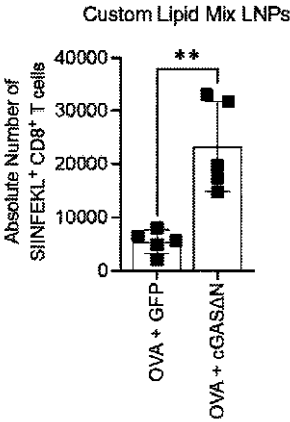
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	4 C 0 7 6	1 0 5
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	4 C 0 8 6	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全53頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-566529(P2024-566529)	(71)出願人	523385846	コーナ セラピューティクス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02472, ウォータータウン, ノースビーコン ストリート 300, ビルディング 39, スイート 202 100078282 弁理士 山本 秀策 100113413 弁理士 森下 夏樹 100181674 弁理士 飯田 貴敏 100181641 弁理士 石川 大輔 最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年5月12日(2023.5.12)	(74)代理人			
(85)翻訳文提出日	令和7年1月9日(2025.1.9)	(74)代理人			
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066974	(74)代理人			
(87)国際公開番号	WO2023/220746	(74)代理人			
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)	(74)代理人			
(31)優先権主張番号	63/341,987	(74)代理人			
(32)優先日	令和4年5月13日(2022.5.13)	(74)代理人			
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人			
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼをコードする mRNA およびそのための脂質送達ビヒクル

(57)【要約】

本開示は、哺乳動物被験体の細胞における構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼの発現のための組成物、および mRNA ワクチンの免疫原性を増強するためのその使用に関する。上記 mRNA は、脂質ナノ粒子 (LNP) に被包され得るか、または脂質と複合体化 (RNA-Lipoplex) され得る。本開示はまた、病原体認識レセプターアゴニストをさらに含む組成物に関する。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、単一の C13 - C24 アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (LPC) を含まない。

FIG. 11D



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質ナノ粒子（LNP）に被包された mRNA を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ（cGAS）のコード領域を含み、前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

【請求項 2】

脂質ナノ粒子（LNP）に被包された第 1 の mRNA および第 2 の mRNA を含む組成物であって、ここで前記第 1 の mRNA は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ（cGAS）のコード領域を含み、前記第 2 の mRNA は、抗原のコード領域を含み；前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

10

【請求項 3】

脂質ナノ粒子（LNP）に被包された mRNA を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、2A 様配列によって分離された第 1 のコード領域および第 2 のコード領域を含み、ここで前記第 1 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ（cGAS）のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、抗原のコード領域であるか、または前記第 1 のコード領域は、抗原のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ（cGAS）のコード領域であり、前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

20

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの脂質は、イオン化可能な脂質、peg 化脂質、および構造脂質を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記イオン化可能な脂質は、

i) 8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸、1 - オクチルノニルエステル (SM - 102) またはそのアナログもしくは誘導体；および / あるいは

ii) 6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) - N - (6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) ヘキシル) - N - (4 - ヒドロキシブチル) ヘキサン - 1 - アミニウム (AL C - 0315) またはそのアナログもしくは誘導体；ならびに / あるいは

30

iii) (6 Z , 9 Z , 28 Z , 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 28 , 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (DL in - MC 3 - DMA) またはそのアナログもしくは誘導体、

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 peg 化脂質は、PEG 改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG 改変ホスファチジン酸、PEG 改変セラミド、PEG 改変ジアルキルアミン、PEG 改変ジアシルグリセロール、PEG 改変ジアルキルグリセロール、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 7】

前記 peg 化脂質は、ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリストイルグリセロール [DMG] を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、α - トコフェロール、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

50

前記構造脂質は、コレステロールを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物

。【請求項 10】

前記リン脂質は、

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

ii) ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α - リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群より選択される 1 またはこれより多くの脂肪酸

10

尾部、を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記リン脂質は、

1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DLPC)、

1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (DMPC)、

1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、

1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、

1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、

20

1, 2 - ジウンデカノイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (DUPC)、

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

、

1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

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

1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

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

30

1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

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

1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - (1 - グリセロール)

ナトリウム塩 (DOPG)、

スフィンゴミエリン、および

これらの組み合わせ、

40

からなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記リン脂質は、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物は、少なくとも 1 つの添加剤をさらに含み、必要に応じてここで前記添加剤は、スクロースを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物は、リゾホスファチジルコリン (LPC) を含まず、必要に応じてここで前記 LPC は、単一の C13 - C24 アシル鎖を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に

50

記載の組成物。

【請求項 15】

1 またはこれより多くの脂質と複合体化された mRNA (RNA-Lipoplex) を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、構成的に活性な環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域を含み、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

【請求項 16】

1 またはこれより多くの脂質と複合体化された第 1 の mRNA および第 2 の mRNA (RNA-Lipoplex) を含む組成物であって、ここで前記第 1 の mRNA は、構成的に活性な環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域を含み、前記第 2 の mRNA は、抗原のコード領域を含み、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

10

【請求項 17】

1 またはこれより多くの脂質と複合体化された mRNA (RNA-Lipoplex) を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、2A 様配列によって分離された第 1 のコード領域および第 2 のコード領域を含み、前記第 1 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、抗原のコード領域であるか、または前記第 1 のコード領域は、抗原のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域であり、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

20

【請求項 18】

前記第 1 の脂質は、カチオン性脂質であり、前記第 2 の脂質は、中性またはアニオン性脂質である、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記カチオン性脂質は、

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

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

30

のうちの一方または両方を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記中性またはアニオン性脂質は、

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

ii) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体；および / あるいは

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

を含む、請求項 18 または請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

TLR7 / 8 アゴニストをさらに含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 22】

前記 TLR7 / 8 アゴニストは、分子量 900 ダルトンまたはこれ未満を有する低分子である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記 TLR7 / 8 アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記 TLR7 / 8 アゴニストは、レシキモド (R848) を含む、請求項 23 に記載の

50

組成物。

【請求項 25】

前記 mRNA または前記第 1 の mRNA および前記第 2 の mRNA は、5' 非翻訳領域 (5' UTR) および 3' 非翻訳領域 (3' UTR) を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記 mRNA は、5' キャップ構造を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記 mRNA は、ポリ A テールを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の組成物 10

【請求項 28】

前記 mRNA は、ヌクレオシド改変された mRNA である、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 29】

前記構成的に活性な cGAS は、その野生型対応物よりも自己 DNA 反応性が高い傾向がある、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記 cGAS は、アミノ末端ホスホイノシチド結合ドメインを欠く短縮型 cGAS (cGAS ΔN) である、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 31】

前記 cGAS ΔN は、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 1 と少なくとも 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記 cGAS ΔN は、
(i) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一のアミノ酸配列；あるいは 30
(i i) 配列番号 9 のコンセンサスアミノ酸配列、
を含む、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記 cGAS ΔN は、配列番号 17 のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記 cGAS ΔN のコード領域は、開始コドン (ATG) と作動可能な組み合わせの状態にある、請求項 30 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 35】

前記抗原は、腫瘍抗原である、請求項 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の組成物。 40

【請求項 36】

前記腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原である、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記腫瘍抗原は、ネオアンチゲンである、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記抗原は、微生物抗原を含む、請求項 1 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、または真菌抗原を含む、請求項 38 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記抗原は、病原体の表面タンパク質またはそのフラグメントを含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記病原体は、ヒト被験体において疾患を引き起こし得る、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記病原体は、ウイルスである、請求項 4 0 または請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記ウイルスは、SARS-CoV-2 である、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記抗原は、前記 SARS-CoV-2 のスパイク (S) 糖タンパク質であり、必要に応じてここで前記スパイク糖タンパク質は、融合前安定化バリエーションである、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記組成物は、リボポリサッカリド (LPS) またはモノホスホリルリピド A (MPLA) を含まない、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記組成物は、酸化型 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (oxPAPC) または oxPAPC の種を含まない、請求項 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記組成物は、2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (HodA-PC)、[(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - オキソヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (KodA-PC)、1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソ - オクテノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (HOOA-PC)、2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 5, 8 - ジオキソオクタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (KOOA-PC)、[(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - (5 - オキソペンタノイルオキシ) プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (POVPC)、[(2R) - 2 - (4 - カルボキシブタノイルオキシ) - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (PGPC)、[(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (PEPC)、[(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [3 - ヒドロキシ - 2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンチリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (PEIPC) および / または 1 - パルミトイル - 2 - アゼラオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PAzePC) を含まない、請求項 4 6 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の組成物、および薬学的に受容可能な添加剤を含む、医薬製剤。

【請求項 4 9】

過剰活性化した樹状細胞の生成のための方法であって、前記方法は、前記樹状細胞と、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の組成物、請求項 2 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項、または請求項 4 8 に記載の製剤の有効量とを接触させて、過剰活性化した樹状細胞を生成する

10

20

30

40

50

ことであって、ここで前記過剰活性化した樹状細胞は、約 48 時間以内の曝露で細胞死を受けることなく IL-1 β を分泌することを包含する方法。

【請求項 50】

前記樹状細胞は、

(i) インピボで前記組成物と接触される；または

(ii) エキソピボで前記組成物と接触される、

請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記過剰活性化した樹状細胞は、

(i) 刺激されていない樹状細胞もしくは空の LNP と接触させた樹状細胞より高レベルの、RANTES、IP-10 および IFN α のうちの 1 もしくはこれより多くのものを分泌する；ならびに / または

(ii) より高レベルの、CD40、CD86、CD69、MHC クラス II、MHC クラス I、CCR7、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも 1 つの細胞表面マーカーを発現する、

請求項 49 または請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

請求項 49 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の方法によって生成される少なくとも 10³、10⁴、10⁵ または 10⁶ の前記過剰活性化した樹状細胞、および薬学的に受容可能な添加剤を含む、医薬製剤。

【請求項 53】

抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、前記方法は、有効量の、請求項 48 または請求項 52 に記載の医薬製剤を、抗原に対する免疫応答を刺激することを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答を刺激することを包含する方法。

【請求項 54】

がんを処置する方法であって、前記方法は、有効量の、請求項 48 または請求項 52 に記載の医薬製剤を、がんを処置することを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを包含する方法。

【請求項 55】

異常な細胞増殖を阻害する方法であって、前記方法は、有効量の、請求項 48 または請求項 52 に記載の医薬製剤を、異常な細胞増殖を阻害することを必要とする個体に投与して、異常な細胞増殖を阻害することを包含する方法。

【請求項 56】

感染性疾患を処置または防止する方法であって、前記方法は、有効量の、請求項 48 に記載の医薬製剤を、感染性疾患を処置または防止することを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置または防止することを包含する方法。

【請求項 57】

前記感染性疾患は、ウイルス性疾患である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記感染性疾患は、細菌性疾患である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

前記樹状細胞は、哺乳動物細胞である、請求項 49 ~ 55 のいずれか 1 項に記載の方法または医薬製剤。

【請求項 60】

前記哺乳動物細胞は、ヒト細胞である、請求項 59 に記載の方法または医薬製剤。

【請求項 61】

前記個体は、哺乳動物である。請求項 53 ~ 59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記哺乳動物は、ヒトである、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

10

20

30

40

50

前記哺乳動物は、イヌまたはネコである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記リン脂質は、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) を含み、前記少なくとも 1 つの脂質は、8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸, 1 - オクチルノニルエステル (S M - 1 0 2) またはそのアナログもしくは誘導体、およびコレステロールを含む、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の組成物、製剤、または方法。

【請求項 6 5】

前記少なくとも 1 つの脂質は、peg 化脂質をさらに含み、必要に応じてここで前記 peg 化脂質は、ポリエチレングリコール [P E G] 2 0 0 0 ジミリスチルグリセロール [D M G] を含む、請求項 6 4 に記載の組成物、製剤、または方法。

【請求項 6 6】

前記 L N P は、約 2 5 0 ナノメートル未満、必要に応じて約 2 5 ~ 約 2 5 0 ナノメートル、必要に応じて約 5 0 ~ 約 2 0 0 ナノメートル、または必要に応じて約 7 5 ~ 約 1 7 5 ナノメートルの有効直径を有する、請求項 1 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物、製剤、または方法。

【請求項 6 7】

前記 L N P は、約 2 0 0 ナノメートル未満の有効直径を有する、請求項 6 6 に記載の組成物、製剤、または方法。

【請求項 6 8】

前記 L N P は、約 1 5 0 ナノメートル未満の有効直径を有する、請求項 6 7 に記載の組成物、製剤、または方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 2 年 5 月 1 3 日出願の米国仮特許出願第 6 3 / 3 4 1 , 9 8 7 号 (これは、その全体において本明細書に参考として援用される) の優先権および利益を主張する。

【0 0 0 2】

電子配列表の参照

電子配列表 (1 6 5 5 3 2 0 0 0 5 4 0 S E Q L I S T . x m l ; サイズ : 2 2 , 3 2 6 バイト ; および作成日 : 2 0 2 3 年 5 月 1 0 日) の内容は、その全体において本明細書に参考として援用される。

【0 0 0 3】

分野

本開示は、哺乳動物被験体の細胞における構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼの発現のための組成物、および m R N A ワクチンの免疫原性を増強するためのその使用に関する。上記 m R N A は、脂質ナノ粒子 (L N P) に被包され得るか、または脂質と複合体化 (R N A - L i p o p l e x) され得る。本開示はまた、病原体認識レセプターアゴニストをさらに含む組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景

m R N A 化学および送達システムの進歩は、いくつかの有効な m R N A C O V I D - 1 9 ワクチンの迅速な生成を可能にしている (H o u r a , N a t u r e R e v i e w M a t e r i a l s , 6 : 1 0 7 8 - 1 0 9 4 , 2 0 2 1) 。しかし、近年の報告では、S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質に対する T 細胞反応性が、ワクチン接種した非感染個体では、以前に S A R S - C o V - 2 に感染した個体よりかなり低いことが見出された (N a r a n b h a i r a , C e l l , 1 8 5 : 1 - 1 1 , 2 0 2 2) 。 S

10

20

30

40

50

A R S - C o V - 2 反応性 C D 4 + および C D 8 + T 細胞免疫応答のより高いレベルが、より軽度の C O V I D - 1 9 疾患と関連していることを見出されたことを考慮すれば、これは問題である (R y d y z n s k i M o d e r b a c h e r ら , C e l l , 1 8 3 (4) : 9 9 6 - 1 0 1 2 , 2 0 2 0)。

よって、mRNA ワクチンによって惹起される細胞性免疫応答を増強するための製剤は、当該分野で必要である。特に、核酸でコードされる抗原に対する適応免疫応答を増加させるために適切なアジュバントが所望される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hou ら , N a t u r e R e v i e w M a t e r i a l s , 6 : 1 0 7 8 - 1 0 9 4 , 2 0 2 1

【非特許文献2】N a r a n b h a i ら , C e l l , 1 8 5 : 1 - 1 1 , 2 0 2 2

【非特許文献3】R y d y z n s k i M o d e r b a c h e r ら , C e l l , 1 8 3 (4) : 9 9 6 - 1 0 1 2 , 2 0 2 0

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

簡単な要旨

本開示は、哺乳動物被験体の細胞における構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼの発現のための組成物、および mRNA ワクチンの免疫原性を増強するためのその使用に関する。上記 mRNA は、脂質ナノ粒子 (L N P) に被包され得るか、または脂質と複合体化 (R N A - L i p o p l e x) され得る。本開示はまた、病原体認識レセプターアゴニストをさらに含む組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1-1】図1は、ヒト (H o m o s a p i e n s , 配列番号1) ; アカゲザル (M a c a c a m u l a t t a , 配列番号2) ; アヌビスヒヒ (P a p i o a n u b i s , 配列番号3) ; キタホオジロオナガザル (N o m a s c u s l e u c o g e n y s , 配列番号4) ; シロテテナガザル (H y l o b a t e s l a r , 配列番号5) ; スマトラオランウータン (P o n g o a b e l i i , 配列番号6) ; チンパンジー (P a n t r o g l o d y t e s , 配列番号7) ; ニシゴリラ (G o r i l l a g o r i l l a , 配列番号8) ; および c G A S Δ N コンセンサス配列 (配列番号9) を含む霊長類 c G A S Δ N タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントである。

【図1-2】図1は、ヒト (H o m o s a p i e n s , 配列番号1) ; アカゲザル (M a c a c a m u l a t t a , 配列番号2) ; アヌビスヒヒ (P a p i o a n u b i s , 配列番号3) ; キタホオジロオナガザル (N o m a s c u s l e u c o g e n y s , 配列番号4) ; シロテテナガザル (H y l o b a t e s l a r , 配列番号5) ; スマトラオランウータン (P o n g o a b e l i i , 配列番号6) ; チンパンジー (P a n t r o g l o d y t e s , 配列番号7) ; ニシゴリラ (G o r i l l a g o r i l l a , 配列番号8) ; および c G A S Δ N コンセンサス配列 (配列番号9) を含む霊長類 c G A S Δ N タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントである。

【0008】

【図2】図2は、そのアミノ末端ホスホイノシチド結合ドメインの除去によって構成的に活性であるように操作されている環状 G A M P - A M P シンターゼ (c G A S) によるインターフェロン遺伝子刺激因子 (S T I N G) 自然免疫シグナル伝達経路の活性化を示すイラストである。c G A S Δ N は、これが DNA を結合し、c G A M P の生成をもたらす場所であるミトコンドリアに局在する。

【0009】

【図3A-C】図3A~3Cは、G e n V o y I L M ^{T M} イオン化可能な脂質ミック

10

20

30

40

50

ス (Precision Nano Systems) を使用して生成される脂質ナノ粒子 (LNP) の特徴を示す。図 3 A は、OVA、GFP、または cGASΔN mRNA のいずれかを充填した LNP が、全て、200 nm 未満の直径であることを示す。図 3 B は、OVA、GFP、または cGASΔN mRNA のいずれかを充填した LNP が全て、比較的均一なサイズであり、全て 0.3 未満の多分散指数を示す。図 3 C は、LNP は、OVA、GFP、または cGASΔN mRNA を類似のレベルの効率で充填し得ることを示す。

【0010】

【図 4 A - C】図 4 A ~ 4 C は、マウス樹状細胞 (DC) が、cGASΔN をコードする mRNA を充填した LNP (cGASΔN LNP) での処置に応答して cGAS - ST 10
ING 経路によって刺激される炎症性サイトカインを分泌することを示す。図 4 A は、cGASΔN LNP で刺激した骨髓由来樹状細胞 (BMDC) が、空の LNP、またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみで処理した細胞より有意に高いレベルで RANTES を生成することを示す。図 4 B は、cGASΔN LNP での BMDC の処理は、空の LNP、またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみでの処理より有意に高いレベルの IP-10 分泌を生じることを示す。図 4 C は、cGASΔN LNP で処理した BMDC が、空の LNP、またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみで処理した細胞より有意に高いレベルで IFNα を生成することを示す。3 つ全てのプロットに関する X 軸の表示は、図 4 C に関して示されるとおりである。P < 0.05 *, p < 0.01 **, p < 0.001 ***, p < 0.0001 **** 20
*。複数の比較のために Tukey 事後検定 (Tukey post test) とともに一元配置 ANOVA を使用して、統計を完了した。データは、2 回の実験の代表である。

【0011】

【図 5 A - F】図 5 A ~ 5 F は、cGASΔN をコードする mRNA を充填した LNP (cGASΔN LNP) での処理が、マウス DC を活性化し、複数の細胞表面マーカーの増加した発現を生じることを示す。DC は、空の LNP またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみでの処理と比較して、cGASΔN LNP での処理後の平均蛍光強度 (MFI) の増加によって示されるように、有意により高レベルの共刺激分子、CD40 (図 5 A)、CD86 (図 5 B)、および CD69 (図 5 C) を発現すること 30
が見出された。DC はまた、空の LNP またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみでの処理と比較して、cGASΔN LNP で処理した場合に、有意により高レベルの抗原提示分子 MHC - II (図 5 D) および H2k B (MHC - I) (図 5 E) を発現することが見出された。さらに、DC は、空の LNP またはモデル抗原をコードする mRNA を充填した LNP のみでの処理と比較して、cGASΔN LNP で処理した場合に、CCR7 移動分子 (図 5 F) のより高いレベルの発現を有することが見出された。6 つ全てのプロットに関する X 軸表示は、図 5 E および図 5 F に関して示されるとおりである。P < 0.05 *, p < 0.01 **, p < 0.001 ***, p < 0.0001 **** 40
*。複数の比較のために Tukey 事後検定とともに一元配置 ANOVA を使用して、統計を完了した。データは、2 回の実験の代表である。

【0012】

【図 6 A - C】図 6 A ~ 6 C は、異なる脂質製剤から作製され、異なる mRNA を充填した LNP が、類似の特徴を示すことを示す。図 6 A は、GenVoy ILMTM イオン化可能な脂質ミックス (Precision Nano Systems) でまたは特注の脂質ミックスで作製した LNP が、OVA、GFP、または cGASΔN mRNA を充填した場合に、全て 150 nm 未満の直径であることを示す。図 6 B は、GenVoy ILMTM または特注の脂質ミックスで作製した LNP が、全て比較的均一なサイズであり、0.3 未満の多分散指数を有することを示す。図 6 C は、GenVoy ILMTM または特注の脂質ミックスで作製した LNP が、OVA、GFP、および cGASΔN mRNA の効率的な被包を可能にすることを示す。データは、3 回の実験の代表である。 50

【0013】

【図7A - F】図7A ~ 7Fは、cGASΔN mRNA含有LNPが、ヒト単球由来樹状細胞(moDC)においてcGAS-STING炎症経路を活性化することを示す。ヒトmoDCを、OVA、GFP、cGASΔN mRNAを充填したLNPまたはLNPの組み合わせとともに、24時間培養し、その後、上清を集め、サイトカイン分泌を評価した。cGASΔN mRNAを充填したLNPで処理したヒトmoDCは、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPで処理したmoDCより、有意により多くのIL-6(図7A)、より多くのTNFα(図7B)、および有意により多くのIP-10(図7C)を生成した。さらに、moDCは、cGASΔN mRNAを充填したLNPで処理した場合に、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPで処理したmoDCより有意により多くのIFNλ1(図7D)、有意により多くのIFNβ(図7E)、およびより多くのIFNα2(図7F)を分泌した。6つ全てのプロットに関するX軸表示は、図7Eおよび図7Fに関して示されるとおりである。P<0.05^{*}、p<0.01^{**}、p<0.0001^{***}。複数の比較のためにTukey事後検定とともに二元配置ANOVAを使用して、統計を完了した。データは、2回の実験の代表である。丸は、LNPを欠くコントロール条件を示す。四角は、GenVoy ILMTMを使用して形成したLNPを含む条件を示す。菱形は、特注の脂質ミックスを使用して形成したLNPを含む条件を示す。白抜き四角および白抜き菱形は、それぞれ、GenVoy ILMTMおよび特注の脂質ミックスを使用して形成したcGASΔN mRNA含有LNPを含む条件を示す。

10

20

【0014】

【図8A - D】図8A ~ 8Dは、cGASΔN mRNA含有LNPでの処理が、ヒトmoDCを活性化することを示す。ヒトmoDCを、OVA、GFP、cGASΔN mRNAを充填したLNP、またはLNPの組み合わせとともに、24時間培養し、その後、細胞表面マーカー発現を測定した。CD83(図8A)発現は、moDCをcGASΔN mRNAを充填したLNPで処理した場合に、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPでの処理と比較して、有意に増加した。同様に、T細胞共刺激分子CD40(図8B)およびCD80(図8C)の発現は、moDCを(集団全体および単一細胞レベルでの両方)をcGASΔN mRNAを充填したLNPで処理した場合、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPでの処理と比較して、有意に増加した。さらに、MHCクラスII(HLA-DR)(図8D)発現は、moDCをcGASΔN mRNA含有LNPで処理した場合、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPでの処理と比較して、増加した。P<0.05^{*}、p<0.01^{**}。複数の比較のためにTukey事後検定とともに二元配置ANOVAを使用して、統計を完了した。データは、2回の実験の代表である。丸は、LNPを欠くコントロール条件を示す。四角は、GenVoy ILMTMを使用して形成したLNPを含む条件を示す。菱形は、特注の脂質ミックスを使用して形成したLNPを含む条件を示す。白抜き四角および白抜き菱形は、それぞれ、GenVoy ILMTMおよび特注の脂質ミックスを使用して形成したcGASΔN mRNA含有LNPを含む条件を示す。

30

40

【0015】

【図9A - B】図9A ~ 9Bは、cGASΔN mRNA含有LNPが、ヒト白血病単球細胞株(THP-1細胞)における炎症経路を活性化することを示す。簡潔には、THP-1細胞を、OVA、GFP、cGASΔN mRNAを充填したLNP、またはLNPの組み合わせとともに、24時間培養し、その後、上清を、サイトカイン分泌の測定のために集め、細胞を、細胞表面分子発現の評価のために集めた。cGASΔN mRNA含有LNPで処理したTHP-1細胞は、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPで処理したTHP-1細胞より有意により多くのIP-10を分泌した(図9A)。THP-1細胞上のCD40発現(図9B)は、モデル抗原をコードするmRNAのみを充填したLNPと比較して、cGASΔN mRNA含有LNPでの処理後に増加した。P<0.01^{**}、p<0.0001^{***}。複数の比較のためにTukey事後検

50

定とともに二元配置 A N O V A を使用して、統計を完了した。データは、2 回の実験の代表である。丸は、L N P を欠くコントロール条件を示す。四角は、G e n V o y I L M^{T M} を使用して形成した L N P を含む条件を示す。菱形は、特注の脂質ミックスを使用して形成した L N P を含む条件を示す。白抜き四角および白抜きの菱形は、それぞれ、G e n V o y I L M^{T M} および特注の脂質ミックスを使用して形成した c G A S Δ N m R N A 含有 L N P を含む条件を示す。

【0016】

【図10A - B】図10A ~ 10B は、C G A S Δ N をコードする m R N A を充填した L N P と組み合わせた R 8 4 8 での m o D C の処理が、過剰活性化（これは、D C が生存可能なままであると同時に I L - 1 β を分泌する能力によって定義される）をもたらすことを示す。m o D C は、培地、R 8 4 8、もしくは R 8 4 8 および M C C 9 5 0 の存在下で、刺激しないままにした（P B S 処理）か、または c G A S Δ N もしくは O V A をコードする m R N A を充填した L N P で処理したかのいずれかであった。図10A は、全ての処理条件が生存率に資したことを示す。これは、細胞が処理条件のいずれかに応答して、ピロトーシスしていなかったことを示す。図10B は、C G A S Δ N をコードする m R N A を充填した L N P での処理のみが、R 8 4 8 と組み合わせて送達した場合に、m o D C を刺激して、I L - 1 β を分泌することを示す。選択的 N L R P 3 インフラマソームインヒビター M C C 9 5 0 での m o D C の処理は、別の方法では、R 8 4 8 と組み合わせた c G A S Δ N m R N A を充填した L N P での処理によって誘導されたであろう I L - 1 β 生成を排除した。P < 0 . 0 0 0 1 * * * * 。複数の比較のために T u k e y 事後検定とともに二元配置 A N O V A を使用して、統計を完了した。

10

20

【0017】

【図11A - D】図11A ~ 11D は、c G A S Δ N m R N A を充填した L N P の投与が、L N P を介して送達される m R N A でコードされるモデル抗原に対する T 細胞応答を増加させることを示す。マウスを、1 m c g もしくは 5 m c g c G A S Δ N m R N A を充填した L N P または 1 m c g もしくは 5 m c g 緑色蛍光タンパク質（G F P）m R N A を充填した L N P と組み合わせて送達した、オボアルブミン（O V A）をコードする 5 m c g m R N A を充填した L N P で 2 回（初回およびブーストレジメン）免疫した。血液を、ブーストの 7 日後に集め、T 細胞への「S I I N F E K L - テトラマー」の結合を、引き続いて評価した。S I I N F E K L は、O V A 内の T 細胞エピトープのアミノ酸配列（配列番号 1 7）である。m R N A がコードする O V A を充填した L N P と組み合わせた、c G A S Δ N m R N A を充填した L N P でのマウスの処置は、血液中の S I I N F E K L 特異的 C D 8 + T 細胞の頻度（図11A）および絶対数（図11C）の両方を、m R N A がコードする O V A および G F P を充填した L N P での、または G e n V o y I L M^{T M} 製剤を使用して調製した L N P 中の、m R N A がコードする G F P および c G A S Δ N での処置と比較して、有意に増加させた。同様に、m R N A がコードする O V A を充填した L N P と組み合わせた、c G A S Δ N m R N A を充填した L N P でのマウスの処置は、特注の脂質ミックスを使用して調製した L N P 中において m R N A がコードする O V A および G F P を充填した L N P での処置と比較して、血液中の S I I N F E K L 特異的 C D 8 + T 細胞の頻度（図11B）および絶対数（図11D）の両方を有意に増加させた。P < 0 . 0 1 * * 、p < 0 . 0 0 1 * * * 。複数の比較のために T u k e y 事後検定とともに二元配置 A N O V A を使用して、G e n V o y I L M^{T M} プロットに関する統計を完了した。特注の脂質ミックスに関する統計を、対応のない t 検定を使用して完了した。

30

40

【0018】

【図12A - F】図12A ~ 12F は、C G A S Δ N m R N A を充填した L N P での処置が、全 I g G 応答に影響することなく、T h 2 特異的抗体を低減することを示す。1 m c g もしくは 5 m c g c G A S Δ N m R N A を充填した L N P、または 1 m c g もしくは 5 m c g の G F P m R N A を充填した L N P とともに送達される 5 m c g O V A m R N A を充填した L N P でマウスを 2 回免疫した。ブーストの 7 日後に血

50

液を集め、血清を単離して、抗体応答を定量した。O V Aおよびc G A S Δ N m R N Aを充填したL N Pで処置したマウスは、G e n V o y I L M^{T M}製剤を使用して調製したL N P (図1 2 A)において、および特注の脂質ミックスを使用して調製したL N P (図1 2 B)において、O V A m R N AおよびG F P m R N Aを充填したL N Pで処置したマウスと比較して、O V A特異的全I g Gにおいて有意な変化を示さなかった。図1 2 Cに示されるように、O V A特異的I g G 1は、G e n V o y I L M^{T M}製剤を使用して調製したL N P中のc G A S Δ N m R N Aの存在によって有意に低減した(1 : 5 0 0および1 : 2 5 0 0希釈に関して $p < 0 . 0 5$ 、G F P m R N A含有L N Pに対して1 m c gおよび5 m c g c G A S Δ N m R N A含有L N P)。図1 2 Dに示されるように、O V A特異的I g G 1応答は、特注の脂質ミックスを使用して調製したc G A S Δ N m R N A含有L N Pで処置したマウスにおいて低減した(G F P m R N A含有L N Pに対して5 m c g c G A S Δ N m R N A含有L N Pで、1 : 5 0 0、1 : 2 5 0 0、および1 : 1 2 5 0 0希釈に関して $p < 0 . 0 5$)。対照的に、O V A m R N A含有L N Pおよびc G A S Δ N L N Pで処置したマウスは、L N PをG e n V o y (E)および特注の脂質ミックス(F)製剤で調製した場合に、O V A + G F P L N P処置と比較して、測定されたO V A特異的I g G 2 aにおいて有意な変化を示さなかった。一番上にある凡例は、全てのパネルにあてはまる。複数の比較のためにT u k e y事後検定とともに二元配置A N O V Aを使用して、統計を完了した。

10

【0 0 1 9】

【図1 3 A】図1 3 Aは、本開示の脂質ベースのm R N A送達ビヒクルにおける使用に適したカチオン性およびイオン化可能な脂質の構造を示す。

20

【図1 3 B】図1 3 Bは、本開示の脂質ベースのm R N A送達ビヒクルにおける使用に適した脂質の他のタイプの構造を示す。H o u r a , N a t u r e R e v i e w M a t e r i a l s , 6 : 1 0 7 8 - 1 0 9 4 , 2 0 2 1 (これは、本明細書に参考として援用される)も参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 0】

詳細な説明

本開示は、哺乳動物被験体の細胞における構成的に活性な環状G M P - A M Pシンターゼの発現のための組成物、およびm R N Aワクチンの免疫原性を増強するためのその使用に関する。上記m R N Aは、脂質ナノ粒子(L N P)に被包され得るか、または脂質と複合体化(R N A - L i p o p l e x)され得る。本開示はまた、病原体認識レセプターアゴニストをさらに含む組成物に関する。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、単一のC 1 3 - C 2 4アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン(L P C)を含まない。

30

【0 0 2 1】

炎症応答の誘導は、例えば、免疫治療またはワクチン接種のために、望ましい可能性がある。C O V I D - 1 9 m R N Aワクチン(S A R S - C o V - 2抗原をコードするm R N Aを充填したL N Pを含む)は、感染の頻度および重篤度を低減するにあたって有効であると判明している。本明細書で記載されるように、c G A S - S T I N G自然免疫経路を誘導することは、タンパク質抗原(これは、例示的实施形態では、オボアルブミン(O V A)である)をコードするm R N Aを充填したL N Pを含む組成物を補助する。S T I N Gシグナル伝達は、全ての可能な自然免疫シグナル伝達経路の中で特に重要である。なぜなら、いくつかの他のシグナル伝達経路とは異なり、c G A S - S T I N G活性化は、翻訳阻害を誘導しないからである。

40

【0 0 2 2】

c G A S - S T I N Gシグナル伝達を誘導するために、そのN末端の一部を欠いているc G A S変異体を、これが構成的に活性であるように設計した(c G A S Δ N)。上記c G A S変異体をコードするm R N Aを、細胞取り込みおよびタンパク質発現のためにL N Pの中にパッケージングした。c G A S Δ Nをコードする、L N Pパッケージングされた

50

mRNAは、cGAS-STING経路を介して免疫応答を補助する(adjunct)能力を有する。重要なことに、構成的に活性なcGAS(例えば、cGASΔN)をコードするmRNAを含めることは、炎症シグナルを増加させることによって、抗原をコードするmRNAを充填したLNPの効力を増加させる。

【0023】

一般的技術および定義

本開示の実施は、別段示されなければ、分子生物学(組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を使用し、これは、当該分野の技術範囲内である。

【0024】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a(1つの、ある)」、「an(1つの、ある)」および「the(上記、この、その)」は、別段示されなければ、複数形の指示物を含む。例えば、「1つの(an)添加剤」は、1またはこれより多くの添加剤を含む。

【0025】

語句「含む、包含する(comprising)」とは、本明細書で使用される場合、制限がなく、このような実施形態がさらなる要素を含み得ることを示す。対照的に、語句「からなる(consisting of)」は排他的であり、このような実施形態がさらなる要素を含まない(微量の不純物を除く)ことを示す。語句「から本質的になる(consisting essentially of)」とは、部分的に排他的であり、このような実施形態が、このような実施形態の基本的特性を実質的に変化させない要素をさらに含んでもよいことを示す。

【0026】

用語「約」とは、値に関連して本明細書で使用される場合、その値の90%~110%を包含する(例えば、分子量 約900ダルトンは、810ダルトン~990ダルトンの分子量に言及する)。

【0027】

物質の「有効量」または「十分量(sufficient amount)」とは、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果をもたらすために十分なその量であり、よって、「有効量」は、これが適用されている文脈に依存する。例えば、抗原および構成的に活性なcGASをコードする1またはこれより多くのmRNAを含む免疫原性組成物を投与するという文脈では、有効量は、抗原に対する免疫応答(例えば、抗原反応性抗体および/または細胞性免疫応答)を刺激するために、十分なmRNAを含む。

【0028】

用語「個体」および「被験体」とは、哺乳動物をいう。「哺乳動物」としては、ヒト、非ヒト霊長類(例えば、サル)、農場動物、競技用動物、齧歯類(例えば、マウスおよびラット)、およびペット(例えば、イヌおよびネコ)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記被験体は、ヒト患者(例えば、がんおよび/または感染性疾患に罹患しているヒト患者)である。

【0029】

用語「用量」とは、免疫学的組成物に関連して本明細書で使用される場合、どの時点においても被験体によって摂取される(被験体に投与される、または被験体によって受容される)上記免疫原性組成物の測定された部分に言及する。

【0030】

用語「単離された」および「精製された」とは、本明細書で使用される場合、天然に会合している少なくとも1つの構成成分から除去されている(例えば、その本来の環境から除去されている)物質に言及する。一例として、リン脂質に関連して使用される場合、単離されたリン脂質は、薄層クロマトグラフィー、またはガスクロマトグラフィーによって決定される場合、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%純粋である。さらなる例として、組換えタンパク質に関連して使用される場合、単離されたタ

10

20

30

40

50

ンパク質とは、上記タンパク質を生成した宿主細胞の培養培地から除去されているタンパク質に言及する。

【 0 0 3 1 】

用語「医薬製剤」および「医薬組成物」とは、活性成分の生物学的活性が有効であるようにするような形態にあり、上記製剤または組成物が投与される個体に対して許容できない程度に毒性であるさらなる構成成分を含まない調製物に言及する。このような製剤または組成物は、無菌であることが意図される。

【 0 0 3 2 】

「添加剤 (e x c i p i e n t) 」とは、本明細書で使用される場合、使用される投与量および濃度においてそれに曝されている細胞または哺乳動物に対して非毒性である薬学的に受容可能な賦形剤 (e x c i p i e n t) 、キャリア、ビヒクルまたは安定化剤を含む。しばしば、生理学的に受容可能な添加剤は、水性 pH 緩衝溶液である。

10

【 0 0 3 3 】

用語「抗原」とは、抗体によって、または T 細胞抗原レセプターによって認識され、特異的に結合される物質に言及する。抗原としては、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、ポリサッカリド、複合糖質、糖、ガングリオシド、脂質およびリン脂質；これらの一部およびこれらの組み合わせが挙げられ得る。本開示の文脈において、用語「抗原」は、代表的には、mRNA または DNA の核酸配列によってコードされるポリペプチドに言及する。ポリペプチド抗原は、好ましくは、少なくとも 8 個のアミノ酸残基の長さであり、1 またはこれより多くの翻訳後修飾を含み得る。

20

【 0 0 3 4 】

用語「アゴニスト」とは、最も広い意味において使用され、レセプターを介するシグナル伝達を活性化する任意の分子を含む。いくつかの実施形態において、上記アゴニストは、上記レセプターに結合する。例えば、TLR8 アゴニストは、TLR8 に結合し、TLR8 シグナル伝達経路を活性化する。

【 0 0 3 5 】

「アルキル」とは、一価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基に言及する。C_xアルキルとは、x 個の炭素原子数を有するアルキル基に言及する。C_x-C_yアルキルまたは C_x-y アルキルとは、x 個 ~ y 個の間の炭素数 (両端を含む) を有するアルキル基に言及する。

【 0 0 3 6 】

30

「アルキレン」とは、二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基に言及する。

【 0 0 3 7 】

「アルケニル」とは、少なくとも 1 個の二重結合 (> C = C <) を有する一価のヒドロカルビル基に言及する。C_xアルケニルとは、x 個の炭素原子数を有するアルケニル基に言及する。C_x-C_yアルケニルまたは C_x-y アルケニルとは、x 個 ~ y 個の間の炭素数 (両端を含む) を有するアルケニル基に言及する。

【 0 0 3 8 】

応答またはパラメーターの「刺激」は、目的のパラメーターを除いて他の点では同じ条件と比較した場合に、または代わりに、別の条件と比較した場合に (例えば、TLR アゴニストの非存在下と比較した場合、TLR アゴニストの存在下での TLR シグナル伝達における増加) 、その応答またはパラメーターを誘発および / または増強することを含む。例えば、免疫応答の「刺激」は、その応答における増加を意味する。測定されるパラメーターに依存して、その増加は、2 倍 ~ 2 , 0 0 0 倍、または 5 倍 ~ 5 0 0 倍、またはそれを超える、あるいは 2 倍、5 倍、1 0 倍、5 0 倍、または 1 0 0 倍から 5 0 0 倍、1 , 0 0 0 倍、2 , 0 0 0 倍、5 , 0 0 0 倍、または 1 0 , 0 0 0 倍までであり得る。

40

【 0 0 3 9 】

逆に、応答またはパラメーターの「阻害」は、目的のパラメーターを除いて他の点では同じ条件と比較した場合に、または代わりに、別の条件と比較した場合に (例えば、プラシーボ組成物の投与または処理なしと比較した場合に、本開示の組成物の投与後の異常な細胞増殖の減少) 、その応答またはパラメーターを低減および / または抑制することを含

50

む。例えば、免疫応答の「阻害」は、応答の減少を意味する。測定されるパラメーターに依存して、その減少は、2 倍～2,000 倍、または5 倍～500 倍、またはそれを超える、あるいは2 倍、5 倍、10 倍、50 倍、または100 倍から500 倍、1,000 倍、2,000 倍、5,000 倍、または10,000 倍までであり得る。

【0040】

相対的な用語「より高い」および「より低い」とは、目的のパラメーターを除いて他の点では同じ条件と比較した場合に、または代わりに、別の条件と比較した場合に、それぞれ、応答またはパラメーターにおける測定可能な増加または減少に言及する。例えば、「より高いレベルのDC 過剰活性化」とは、コントロール条件の結果としてのDC 過剰活性化のレベルを少なくとも2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または10 10 倍上回っている、処理状態の結果としてのDC 過剰活性化のレベルに言及する。同様に、「より低いレベルのDC 過剰活性化」とは、コントロール条件の結果としてのDC 過剰活性化のレベルを少なくとも2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または10 倍下回っている、処理状態の結果としてのDC 過剰活性化のレベルに言及する。

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「免疫付与 (immunization)」とは、抗原に対する哺乳動物被験体の免疫応答を増加させ、従って、感染に抵抗するもしくは感染を克服するおよび/または疾患に抵抗するその能力を改善するプロセスに言及する。

【0042】

用語「ワクチン接種」とは、本明細書で使用される場合、哺乳動物被験体の身体へのワクチンの導入に言及する。 20

【0043】

「アジュバント」とは、抗原または抗原をコードする核酸を含む組成物に添加される場合、曝露されると、その哺乳動物レシピエントにおいて抗原に対する免疫応答を増強または強化する物質に言及する。

【0044】

用語疾患の「処置すること」または「処置とは、個体において有益なまたは所望の結果（臨床結果を含む）を得ようと努力して、1 またはこれより多くの治療剤を個体（ヒトまたは別のもの）に投与することを含み得る、プロトコールを実行することに言及する。有益なまたは所望の臨床結果としては、疾患の1 もしくはこれより多くの徴候または症状の緩和または改善、疾患の程度の減弱、疾患の安定化した（すなわち、増悪していない）状態、疾患の拡がりの防止、疾患進行の遅れもしくは緩徐化、疾患状態の改善もしくは軽減、および寛解（部分的であろうと全体であろうと）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない個体の予測生存期間と比較した場合、生存期間を長くすることを意味し得る。さらに、「処置すること」および「処置」は、1 もしくは複数の治療剤の1 用量の投与によって起こり得るか、または1 もしくは複数の治療剤の一連の用量の投与の際に起こり得る。「処置すること」または「処置」は、徴候もしくは症状の完全な緩和を要求せず、治癒を要求せず、具体的には、個体に対する軽減効果のみを有するプロトコールを含む。疾患もしくは障害を「軽減すること (palliating)」は、予測される非処置の転帰と比較して、上記疾患もしくは障害の程度および/または 40 望ましくない臨床的発現が少なくなる、ならびに/または上記疾患もしくは障害の進行の時間経過が緩徐となることを意味する。

【0045】

用語「構成的に活性な (constitutively-active)」とは、cGAS に関連して本明細書で使用される場合、細胞質中のDNA に結合し、天然のcGAS がほとんどまたは全く酵素活性を有しないいくつかの状態下ですら、cGAMP 合成を触媒するcGAS バリエーションに言及する。いくつかの好ましい実施形態において、上記「構成的に活性なcGAS」は、N 末端の無秩序ドメインの非存在下で、C 末端のDNA を結合する酵素ドメインを含むcGAS Δ N のような「短縮型cGAS である。すなわち、cGAS Δ N は、全長cGAS のN 末端の無秩序ドメインによって損なわれた酵素活性の調 50

節を欠く構成的に活性な c G A S である。

【 0 0 4 6 】

I . 構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼ

環状 G M P - A M P シンターゼは、c G A M P シンターゼまたは c G A S とはいわれ、細胞質ゾル D N A の酵素センサーである。c G A S は、2 本鎖 D N A をその配列とは無関係に認識し、ダイマー化、液体様液滴の形成および二次メッセンジャーである 2 ' 3 ' 環状 G M P - A M P (c G A M P) の生成をもたらす。上記 c G A M P は、S T I N G に結合し、これを活性化し、インターフェロンおよび他の炎症メディエーターの発現を生じる。具体的には、S T I N G 活性化は、I R F 3 および N F - k B 転写因子を最終的に活性化するシグナル伝達カスケードを生じる。I R F 3 活性化は、I P - 1 0 および抗ウイルス免疫応答を誘導する I 型インターフェロンのような遺伝子の発現をもたらす。N F - k B 活性化は、炎症性サイトカイン (例えば、炎症性免疫応答を増強する I L - 6) の発現を誘導する。

10

【 0 0 4 7 】

ヒト c G A S は、5 2 2 アミノ酸の長さであり、N 末端ホスホイノシチド結合ドメイン (残基 1 ~ 5 9) および C 末端 D N A 結合および酵素ドメイン (残基 1 6 0 ~ 5 2 2) を含む (B a r n e t t ら, C e l l , 1 7 6 : 1 4 3 2 - 1 4 4 6 , 2 0 1 9) 。重要なことには、ヒト白血病単球性細胞株における c G A S Δ N の発現は、より高レベルのインターフェロンおよびインターフェロンで刺激される遺伝子の発現を生じることが見出された (B a r n e t t , 前出, 2 0 1 9) 。

20

【 0 0 4 8 】

ヒト c G A S のアミノ酸配列 (G e n B a n k N o . N P _ 6 1 2 4 5 0 . 2) は、以下である：

【 化 1 】

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLPVSAPILVRRDAAPGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVGVDHLLLRKCDLCLMRYLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINDIKDQTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLRIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEETWRLSFHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLEKLMKYLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF (配列番号 10) 。

30

【 0 0 4 9 】

c G A S の N 末端ドメインのアミノ酸配列は、以下である：

【 化 2 】

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLPVSAPILVRRDAA (配列番号 11) 。

40

【 0 0 5 0 】

c G A S の C 末端ドメイン (c G A S Δ N) のアミノ酸配列は、以下である：

【化 3】

PGASKLRVLEKLEKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSIYEHVKISAPNEFDVM
FKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMK
RKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKENG
FQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVK
TAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSNLIDKRSKEFLTKQIE
YERNNEFPVFDEF (配列番号 1)。

10

【0051】

ヒト c G A S Δ N をコードするヌクレオチド配列 (これは、マウス細胞における発現のためにコドン最適化された) は、配列番号 17 として示される。このヌクレオチド配列を有する DNA テンプレートを使用して、ヒト c G A S Δ N をコードする mRNA を調製し、これを LNP へと充填し、実施例 1、2 および 3 に記載されるように試験した。

【0052】

本開示の組成物および方法は、mRNA ワクチンによって誘発される適応免疫応答を改善するための触媒性アジュバントとして構成的に活性な c G A S をコードする核酸を含む。いくつかの好ましい実施形態において、上記構成的に活性な c G A S は、N 末端のホスホイノシチド結合ドメインを欠く短縮型 c G A S (c G A S Δ N) である。いくつかの好ましい実施形態において、上記構成的に活性な c G A S は、C 末端の DNA 結合および酵素ドメインを含む短縮型 c G A S (c G A S Δ N) である。

20

【0053】

c G A S のホモログは、動物界にわたる種において発現されており、c G A S アミノ酸配列は、より高等の霊長類において保存されている。ヒト c G A S の C 末端ドメインのアミノ酸配列と複数の非ヒト霊長類 c G A S タンパク質の C 末端ドメインのアミノ酸配列とのアラインメントを、図 1 に示す。

【表 I】

表 I. Clustal 12.1 によって作成したパーセント同一性マトリクス[^]

30

番号	種	1	2	3	4	5	6	7	8
1	M._mulatta	100.00	96.42	87.53	85.95	88.71	87.26	86.78	86.50
2	P._anubis	96.42	100.00	87.53	86.23	88.98	88.09	87.88	87.33
3	N._leucogenys	87.53	87.53	100.00	96.14	93.37	89.97	90.03	90.30
4	H._lar	85.95	86.23	96.14	100.00	92.31	88.92	88.98	88.71
5	P._abelii	88.71	88.98	93.37	92.31	100.00	93.07	93.39	92.84
6	P._troglodytes	87.26	88.09	89.97	88.92	93.07	100.00	97.51	96.95
7	H._sapiens	86.78	87.88	90.03	88.98	93.39	97.51	100.00	98.35
8	G._gorilla	86.50	87.33	90.30	88.71	92.84	96.95	98.35	100.00

40

[^]この表中の数字は、配列番号ではない。

【0054】

いくつかの好ましい実施形態において、上記構成的に活性な c G A S は、N 末端ドメインを欠く短縮型ヒト c G A S (配列番号 11) である。いくつかの好ましい実施形態において、上記構成的に活性な c G A S は、C 末端ドメインを含む短縮型ヒト (配列番号 1) である。いくつかの好ましい実施形態において、c G A S Δ N は、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 1 と少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの好ましい実施形態において、c

50

G A S Δ N は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 と少なくとも 95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの好ましい実施形態において、c G A S Δ N は、配列番号 9 のコンセンサスアミノ酸配列を含む。トランスフェクトした細胞における発現のために、c G A S Δ N をコードする核酸は、開始コドン (A T G) と作動可能な組み合わせの状態にある。

【0055】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント (%) 配列同一性」とは、配列を整列させ、必要であればギャップを導入して、最大のパーセント配列同一性を達成した後、配列同一性の一部としていかなる保存的置換をも考慮せず、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アラインメントは、当該分野の技術範囲内である種々の方法において、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア (例えば、B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェア) を使用して、達成され得る。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含め、配列を整列させるために適切なパラメータを決定し得る。例えば、所定のアミノ酸配列 B に対する (to)、配列 B との (with)、または配列 B に対する (against) 所定のアミノ酸配列 A の % 配列同一性 (これは、代わりに所定のアミノ酸配列 B に対する、配列 B との、または配列 B に対するある特定の % 配列同一性を有するかまたは含む所定のアミノ酸配列 A として表現され得る) は、以下のように計算され得る： $100 \times \frac{\text{X}}{\text{Y}}$ 。この場合、X は、A および B のそのプログラムのアラインメントにおける配列によって同一のマッチとスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Y は、B におけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さに等しくない場合、B に対する A の % 配列同一性は、A に対する B の % 配列同一性に等しくないことが理解される。

【0056】

I I . 抗原をコードする m R N A

本開示の組成物および方法は、抗原をコードする m R N A を含む得るか、またはそうでなければ、抗原をコードする m R N A を含む製剤との使用に適している。いくつかの実施形態において、上記抗原は、タンパク質性抗原である。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、少なくとも 8 アミノ酸の長さであるペプチド鎖を含む抗原に関連して、本明細書で交換可能に使用される。いくつかの実施形態において、上記抗原は、8 ~ 1800 アミノ酸、9 ~ 1000 アミノ酸、または 10 ~ 100 アミノ酸の長さである。上記ポリペプチドは、リン酸化、ヒドロキシル化、スルホン化、パルミトイル化、および/またはグリコシル化のような翻訳後修飾がされていてもよい。

【0057】

いくつかの実施形態において、上記抗原は、少なくとも 1 つの全長タンパク質またはそのフラグメントのアミノ酸配列を含む腫瘍抗原である。いくつかの実施形態において、上記腫瘍抗原は、腫瘍性タンパク質に由来するアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。いくつかの実施形態において、上記哺乳動物抗原は、ネオアンチゲンであるか、または哺乳動物被験体に由来する正常細胞における遺伝子と比べて変異を含む遺伝子によってコードされる。ネオアンチゲンは、T 細胞が、がん細胞と非がん細胞との間を区別することを可能にすることにおいて特に有用であると考えられている (例えば、S c h u m a c h e r and S c h r e i b e r , S c i e n c e , 348 : 69 - 74 , 2015 を参照のこと)。他の実施形態において、上記腫瘍抗原は、ウイルス抗原 (例えば、癌を引き起こすウイルスの抗原) を含む。

【0058】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍抗原は、2 またはこれより多くのポリペプチド

を含む融合タンパク質であり、ここで各タンパク質は、異なる腫瘍抗原からのアミノ酸配列またはその同じ腫瘍抗原からの連続していないアミノ酸配列を含む。これらの実施形態のうちのいくつかにおいて、上記融合タンパク質は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、ここで各ポリペプチドは、その同じ腫瘍抗原からの連続していないアミノ酸配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、上記抗原は、微生物抗原である。いくつかの実施形態において、上記微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、真菌抗原、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、上記微生物抗原は、表面タンパク質または微生物の他の抗原性サブユニットを含む。

10

【0060】

いくつかの好ましい実施形態において、上記mRNAは、コード領域の5'末端にある5'非翻訳領域(5'UTR)およびコード領域の3'末端にある3'非翻訳領域(3'UTR)を含む。いくつかの好ましい実施形態において、上記mRNAは、5'キャップ構造およびポリAテールのうちの一方または両方を含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、上記mRNAは、リボソームスキッピング配列(例えば、配列12として示される2A様配列)をさらにコードする。さらなる2AL配列は、配列番号13、配列番号14、および配列番号15に示される。上記mRNAが2またはこれより多くのコード領域を含むいくつかの実施形態において、上記コード領域は、2AL配列によって分離され得る。例えば、上記2AL配列は、構成的に活性な環状GMP-A-MPシンターゼ(cGAS)のコード領域と抗原のコード領域との間に位置し得る(例えば、cGASΔNs-2AL-抗原または抗原-2AL-cGASΔN)。同様に、上記mRNAが2またはこれより多くの抗原に関するコード領域を含むいくつかの実施形態において、上記コード領域は、2AL配列によって分離され得る(例えば、抗原1-2AL-抗原2)。本開示のmRNAでの使用のためのさらなる2AL配列は、当該分野で公知である(例えば、Lukeら, J. Gen. Virol., 89:1036-1042, 2008を参照のこと。図2の2AL配列は、本明細書に参考として援用される)。

20

【0062】

30

III. 脂質ベースの送達ビヒクル

本開示の組成物および方法は、mRNAワクチンのための脂質ベースの送達ビヒクルを含み得る。いくつかの実施形態において、上記ビヒクルは、脂質ナノ粒子(LNP)である。他の実施形態において、上記ビヒクルは、上記mRNAと複合体(RNA-Lipoplex)を形成する脂質である。

【0063】

いくつかの実施形態において、上記LNPは、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、リン脂質、peg化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、イオン化可能な脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、カチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、peg化脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、構造脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1つの脂質は、イオン化可能な脂質、リン脂質、peg化脂質、および構造脂質を含む。

40

【0064】

いくつかの実施形態において、RNA-Lipoplexの脂質構成成分は、1またはこれより多くの脂質を含む。いくつかの好ましい実施形態において、上記1またはこれより多くの脂質は、第1の脂質および第2の脂質を含み、ここで上記第1の脂質は、上記第2の脂質とは異なる。いくつかの実施形態において、上記第1の脂質は、カチオン性脂質

50

であり、上記第2の脂質は、中性またはアニオン性脂質である。

【0065】

本開示の脂質ベースのmRNA送達ビヒクルにおける使用に適した脂質の構造は、図13Aおよび図13Bに示され、これらは、Houら, Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021の図2から採用される。

【0066】

IV. 病原体認識レセプターアゴニスト

本開示の組成物および方法は、さらなる病原体認識レセプター(PRR)アゴニストを含み得る。いくつかの実施形態において、上記PRRアゴニストは、toll様レセプター(TLR)、NOD様レセプター(NLR)、RIG-I様レセプター(RLR)、またはCタイプレクチンレセプター(CLR)のアゴニストを含む。いくつかの実施形態において、上記PRRアゴニストは、TLR7/8アゴニストを含む。

10

【0067】

A. TLR7/8アゴニスト

用語「TLR7/8アゴニスト」とは、本明細書で使用される場合、TLR7および/またはTLR8のアゴニストに言及する。1つの局面において、上記TLR7/8アゴニストは、TLR7アゴニストである。別の局面において、上記TLR7/8アゴニストは、TLR8アゴニストである。さらなる局面において、上記TLR7/8アゴニストは、TLR7およびTLR8の両方のアゴニストである。本開示のTLR7/8アゴニストは、oxPAPCまたはPGPCのようなDAMPに応答してヒト樹状細胞を過剰活性化するために適している。

20

【0068】

いくつかの局面において、上記TLR7/8アゴニストは、低分子である。いくつかの実施形態において、上記TLR7/8アゴニストは、分子量900ダルトンもしくはこれ未満を有する低分子、またはその塩である。すなわち、上記低分子TLR7/8アゴニストは、U.S. FDA's Center for Biologics Evaluation and Researchによって規制可能である、組み換えタンパク質または合成オリゴヌクレオチドのような大きな分子ではない。むしろ、上記低分子TLR7/8アゴニストは、上記FDA's Center for Drug Evaluation and Researchによって規制可能である。いくつかの実施形態において、上記低分子は、分子量約90~約900ダルトンを有する。いくつかの実施形態において、上記TLR7/8アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む。いくつかの好ましい実施形態において、上記TLR7/8アゴニストは、レシキモド(R848)を含む。

30

【0069】

B. 他のPRRアゴニスト

いくつかの局面において、上記病原体認識レセプター(PRR)アゴニストは、toll様レセプター(TLR)アゴニストを含むが、ただし上記TLRアゴニストは、TLR7/8アゴニストを含まない。いくつかの実施形態において、上記TLRアゴニストは、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9およびTLR13のうちの1またはこれより多くのもののアゴニストを含む。いくつかの実施形態において、上記PRRアゴニストは、TLR2/6アゴニスト(例えば、Pam2CSK4)である。他の実施形態において、上記TLRアゴニストは、TLR4アゴニスト(例えば、モノホスホリルリピドA(MPLA))である。しかし、好ましい実施形態において、上記TLRアゴニストは、TLR2、TLR4および/またはTLR9のアゴニストではない。例えば、好ましい実施形態において、上記TLR9アゴニストは、TLR4リガンド(例えば、LPS(エンドトキシン))ではない。

40

【0070】

他の局面において、上記PRRアゴニストは、NOD様レセプター(NLR)アゴニストを含む。さらなる局面において、上記PRRアゴニストは、RIG-I様レセプター(

50

R L R) アゴニストを含む。追加の局面において、上記 P R R アゴニストは、C タイプレクチンレセプター (C L R) アゴニストを含む。

【0071】

V. 医薬製剤

本開示のいくつかの組成物は、薬学的に受容可能な添加剤を含む医薬製剤である。本開示の医薬製剤は、液剤または懸濁剤の形態にあり得る。あるいは、上記医薬製剤は、脱水された固体（例えば、凍結乾燥または噴霧乾燥された固体）であり得る。本開示の医薬製剤は、好ましくは無菌であり、好ましくは、エンドトキシンを本質的に含まない。用語「医薬製剤」は、本明細書で用語「医薬品」および「医薬と交換可能に使用される。いくつかの実施形態において、上記医薬製剤は、上記製剤の意図した目的に基づいて、特定の比の種々の構成成分を含む。

【0072】

本開示の薬学的に受容可能な添加剤としては、例えば、溶媒、緩衝剤、張度調整剤、増量剤、および保存剤が挙げられる（例えば、Pramanickら, Pharma Times, 45:65-77, 2013を参照のこと）。いくつかの実施形態において、上記医薬製剤は、溶媒、緩衝剤、張度調整剤、および増量剤のうちの1またはこれより多くのもので機能する添加剤を含み得る（例えば、塩類溶液中の塩化ナトリウムは、水性ビヒクルおよび張度調整剤の両方として役立ち得る）。

【0073】

いくつかの実施形態において、上記医薬製剤は、溶媒として水性ビヒクルを含む。適切なビヒクルとしては、例えば、滅菌水、塩類溶液、リン酸緩衝塩類溶液、およびリンゲル液が挙げられる。いくつかの実施形態において、上記組成物は、等張性である。

【0074】

上記医薬製剤は、緩衝剤を含み得る。緩衝剤は、処理、貯蔵および必要に応じて再構成の間に、活性薬剤の分解を阻害するためにpHを制御する。適切なバッファーは、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩または硫酸塩を含む塩を含む。他の適切なバッファーは、例えば、アミノ酸（例えば、アルギニン、グリシン、ヒスチジン、およびリジン）を含む。上記緩衝剤は、塩酸または水酸化ナトリウムをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、上記緩衝剤は、6~9の範囲内に上記組成物のpHを維持する。いくつかの実施形態において、そのpHは、（下限）6、7または8より高い。いくつかの実施形態において、そのpHは、（上限）9、8、または7より低い。すなわち、そのpHは、下限が上限より低い約6~9の範囲にある。

【0075】

上記医薬組成物は、張度調整剤を含み得る。適切な張度調整剤としては、例えば、デキストロース、グリセロール、塩化ナトリウム、グリセリンおよびマンニトールが挙げられる。

【0076】

上記医薬製剤は、増量剤を含み得る。増量剤は、上記医薬組成物が投与される前に凍結乾燥されることになる場合に特に有用である。いくつかの実施形態において、上記増量剤は、凍結もしくは噴霧乾燥の間に、および/または貯蔵の間に、活性薬剤の安定化およびその分解の防止を助ける保護剤である。適切な増量剤は、糖（モノサッカリド、ジサッカリドおよびポリサッカリド）（例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、グルコースおよびラフィノース）である。

【0077】

上記医薬製剤は、保存剤を含み得る。適切な保存剤としては、例えば、抗酸化剤および抗微生物剤が挙げられる。しかし、好ましい実施形態において、上記医薬製剤は、無菌条件下で調製され、単回使用の容器の中にあり、従って、保存剤を含めることを必要としない。

【0078】

本開示の医薬製剤は、非経口投与に適している。すなわち、本開示の医薬製剤は、経腸

投与に関しては意図されてない（例えば、経口、胃、または直腸によるものではない）。

【 0 0 7 9 】

V I . 使用方法

いくつかの局面において、本開示は、本明細書で記載される組成物または製剤のうちのいずれか1つの使用方法に関する。上記使用法は、免疫応答を刺激することを含む複数の使用に適している。いくつかの実施形態において、上記使用法は、がんを処置する方法を含む。いくつかの実施形態において、上記使用法は、異常な細胞増殖を阻害する方法を含む。いくつかの実施形態において、上記使用法は、感染性疾患を処置または防止する方法を含む。上記方法は、有効量の、本明細書で記載される製剤または組成物を、それを投与することを必要とする個体に投与して、特定の転帰を達成することを包含する。上記個体は、哺乳動物被験体（例えば、ヒト患者）である。他の実施形態において、上記個体は、非ヒト患者である。いくつかの実施形態において、上記個体は、イヌ患者である。すなわち、いくつかの実施形態において、上記使用法は、臨床使用を含むが、他の実施形態において、上記使用法は、前臨床的および/または獣医学的使用を含む。前臨床的使用に関しては、上記哺乳動物被験体は、非ヒト霊長類（例えば、サルまたは類人猿）または齧歯類（例えば、マウスまたはラット）であり得る。獣医学的使用に関しては、上記哺乳動物被験体は、農場動物（例えば、ウシ）、競技用動物（例えば、ウマ）、またはペット（例えば、コンパニオンアニマル（例えば、イヌまたはネコ））であり得る。

10

【 0 0 8 0 】

A . 免疫応答の刺激

簡潔には、本開示は、個体において免疫応答を刺激する方法であって、上記方法は、上記個体に、本明細書で記載される組成物または製剤を、上記個体において免疫応答を刺激するために十分な量において投与することを包含する方法を提供する。免疫応答を「刺激すること（*stimulating*）」（免疫応答を「誘発すること（*eliciting*）」と交換可能に使用される）とは、上記免疫応答を増加させることを意味し、これは、新規免疫応答を誘発する（例えば、初回のワクチン接種レジメンの結果として）または既存の免疫応答を増強する（例えば、ブースターワクチン接種レジメンの結果として）ことから生じ得る。いくつかの実施形態において、免疫応答を刺激することは、以下からなる群のうちの1またはこれより多くのものを含む：サイトカイン生成を刺激すること；Bリンパ球増殖を刺激すること；インターフェロン経路関連遺伝子発現を刺激すること；化学誘因物質関連遺伝子発現を刺激すること；および樹状細胞DC成熟を刺激すること。免疫応答の刺激を測定するための方法は、当該分野で公知である。

20

30

【 0 0 8 1 】

例えば、本開示は、個体に本明細書で記載される組成物または製剤を、個体において抗原特異的免疫応答を誘導するために十分な量において上記個体に投与することによって、個体において抗原特異的免疫応答を誘導する方法を提供する。好ましい実施形態において、上記組成物または製剤は、抗原を含む。いくつかの実施形態において、上記組成物または製剤は、上記抗原を含め、上記個体の組織に投与される。上記免疫応答は、抗原特異的抗体応答、抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答、および抗原特異的ヘルパーT（Th）細胞応答のうちの1またはこれより多くのものを含み得る。抗原特異的抗体応答を「誘導すること（*inducing*）」は、投与前のベースラインの力価または血清防御レベルのような閾値レベルを上回る抗原特異的抗体の力価の増加を意味する。抗原特異的CTL応答を「誘導すること」は、投与前のベースラインの頻度を上回る末梢血中で見出される抗原特異的CTLの頻度の増加を意味する。抗原特異的Th細胞応答を「誘導すること」は、投与前のベースラインの頻度を上回る末梢血中で見出される抗原特異的Th細胞の頻度の増加を意味する。

40

【 0 0 8 2 】

免疫応答の分析（定性的および定量的の両方）は、当該分野で公知の任意の方法によるものであり得、抗原特異的抗体生成（特異的抗体サブクラスの測定を含む）、B細胞およびヘルパーT細胞のようなリンパ球の特定の集団の活性化、IFN- α 、IFN- γ 、I

50

L - 6、IL - 12のようなサイトカインの生成、ならびにノまたはヒスタミンの放出を測定することが挙げられるが、これらに限定されない。抗原特異的抗体応答を測定するための方法としては、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) が挙げられる。リンパ球の特定の集団の活性化は、増殖アッセイ、および蛍光活性化セルソーティング (FACS) によって測定され得る。サイトカインの生成はまた、ELISAによって測定され得る。いくつかの実施形態において、免疫応答を刺激する方法は、単球由来樹状細胞または末梢血単核細胞によるインターロイキン - 1 β (IL - 1 β) 分泌、インターフェロン - γ (IFN - γ) 分泌、およびノまたは腫瘍壊死因子 α (TNF - α) 分泌の刺激を含む。いくつかの好ましい実施形態において、本開示の組成物と接触した細胞のうちの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%または75%は、接触後40~56時間(または約48時間)生存可能なままである。

【0083】

いくつかの実施形態において、上記方法は、抗腫瘍免疫応答を刺激するために適している。他の実施形態において、上記方法は、抗微生物免疫応答を刺激するために適している。いくつかの実施形態において、上記抗微生物応答は、抗細菌免疫応答である。いくつかの実施形態において、上記抗微生物応答は、抗真菌免疫応答である。いくつかの実施形態において、上記抗微生物応答は、抗ウイルス免疫応答である。いくつかの実施形態において、上記抗微生物応答は、抗原生動物免疫応答である

【0084】

B. 疾患の処置または防止

本開示は、個体において疾患を処置または防止する方法であって、上記方法は、上記個体に、本明細書で記載される組成物または製剤を、上記個体において疾患を処置または防止するために十分な量において投与することを包含する方法をさらに提供する。いくつかの実施形態において、上記疾患は、がんである。いくつかの実施形態において、上記疾患は、異常な細胞増殖である。他の実施形態において、上記疾患は、感染性疾患である。

【0085】

いくつかの実施形態において、上記方法は、個体においてがんを処置すること、またはそうでなければがんを有する哺乳動物被験体を処置することを包含する。いくつかの実施形態において、上記がんは、血液のがん(例えば、リンパ腫、白血病、または骨髄腫)である。他の実施形態において、上記がんは、非血液がん(例えば、肉腫、癌、または黒色腫)である。いくつかの実施形態において、上記がんは、悪性である。

【0086】

いくつかの実施形態において、上記方法は、個体において異常な細胞増殖を阻害することを含む。「異常な細胞増殖」とは、良性腫瘍または悪性腫瘍の増殖に言及する。悪性腫瘍は、転移性の腫瘍であり得る。

【0087】

いくつかの実施形態において、上記方法は、個体において感染性疾患を処置または防止することを含む。いくつかの実施形態において、上記感染性疾患は、ウイルス感染によって引き起こされる。他の実施形態において、上記感染性疾患は、細菌感染によって引き起こされる。さらなる実施形態において、上記感染性疾患は、真菌感染によって引き起こされる。なおさらなる実施形態において、上記感染性疾患は、原生動物感染によって引き起こされる。ヒトおよび他の動物(例えば、哺乳類または鳥類)に感染する人獣共通感染症の病原体によって引き起こされる感染性疾患は、特に重要である。いくつかの実施形態において、上記人獣共通感染症の病原体は、中間の種(媒介動物)を介してヒトへと伝染する。

番号付けされた実施形態

この節において、実施形態1は、実施形態1'および実施形態1"の両方に言及する。

実施形態1'、第1の脂質ナノ粒子(LNP)中に被包された第1のmRNAおよび第2のLNP中に被包された第2のmRNAを含む組成物であって、

ここで前記第1のmRNAは、構成的に活性な環状GMP - AMPシンターゼ(cGA 50

S) のコード領域を含み、

ここで前記第 2 の mRNA は、抗原のコード領域を含み、

ここで前記第 1 の LNP および前記第 2 の LNP は両方とも、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

実施形態 1 . 脂質ナノ粒子 (LNP) 中に被包された mRNA を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域を含み、前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含み、必要に応じてここで前記組成物は、さらなる脂質ナノ粒子中に被包されたさらなる mRNA をさらに含み、前記さらなる mRNA は、目的の抗原のコード領域を含み、前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

10

実施形態 2 . 脂質ナノ粒子 (LNP) に被包された第 1 の mRNA および第 2 の mRNA を含む組成物であって、ここで前記第 1 の mRNA は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域を含み、前記第 2 の mRNA は、抗原のコード領域を含み；前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

20

実施形態 3 . 脂質ナノ粒子 (LNP) に被包された mRNA を含む組成物であって、ここで前記 mRNA は、2A 様配列によって分離された第 1 のコード領域および第 2 のコード領域を含み、ここで前記第 1 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、抗原のコード領域であるか、または前記第 1 のコード領域は、抗原のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、構成的に活性な環状 GMP - AMP シンターゼ (cGAS) のコード領域であり、前記 LNP は、リン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、peg 化脂質、構造脂質、およびこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも 1 つの脂質を含む、組成物。

実施形態 4 . 前記少なくとも 1 つの脂質は、イオン化可能な脂質、peg 化脂質、および構造脂質を含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

30

実施形態 5 . 前記イオン化可能な脂質は、

i) 8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸, 1 - オクチルノニルエステル (SM - 102) またはそのアナログもしくは誘導体；および / あるいは

ii) 6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) - N - (6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) ヘキシル) - N - (4 - ヒドロキシブチル) ヘキサン - 1 - アミノウム (ALC - 0315) またはそのアナログもしくは誘導体；ならびに / あるいは

iii) (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (DLin - MC3 - DMA) ALC - 0315 またはそのアナログもしくは誘導体、

を含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

40

実施形態 6 . 前記 peg 化脂質は、PEG 改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG 改変ホスファチジン酸、PEG 改変セラミド、PEG 改変ジアルキルアミン、PEG 改変ジアシルグリセロール、PEG 改変ジアルキルグリセロール、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 7 . 前記 peg 化脂質は、ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリストイルグリセロール [DMG] を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 8 . 前記構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、 α - トコフェロール、およびこれらの組み合わせからなる群よ

50

り選択される、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 . 前記構造脂質は、コレステロールを含む、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 . 前記リン脂質は、

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

i i) ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α - リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群より選択される 1 またはこれより多くの脂肪酸尾部、

を含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 11 . 前記リン脂質は、

1 , 2 - ジリノレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D L P C) 、

1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - ホスホコリン (D M P C) 、

1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) 、

1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P P C) 、

1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) 、

1 , 2 - ジウンデカノイル - s n - グリセロ - ホスホコリン (D U P C) 、

1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P O P C)

、

1 , 2 - ジ - O - オクタデセニル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1 - オレオイル - 2 - コlesterylヘミスクシノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1 , 2 - ジリノレノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1 , 2 - ジアラキドノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

1 , 2 - ジドコサヘキサエノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

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

1 , 2 - ジフィタノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1 , 2 - ジリノレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1 , 2 - ジリノレノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

1 , 2 - ジアラキドノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、

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

1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - r a c - (1 - グリセロール)

ナトリウム塩 (D O P G) 、

スフィンゴミエリン、および

これらの組み合わせ、

からなる群より選択される、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 12 . 前記リン脂質は、1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) を含む、実施形態 11 に記載の組成物。

実施形態 13 . 前記組成物は、少なくとも 1 つの添加剤をさらに含み、必要に応じてここで前記添加剤は、スクロースを含む、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 14 . 前記組成物は、リゾホスファチジルコリン (L P C) を含まず、必要に応じてここで前記 L P C は、単一の C 13 - C 24 アシル鎖を有する、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 15 . 1 またはこれより多くの脂質と複合体化された m R N A (R N A - L i p o p l e x) を含む組成物であって、ここで前記 m R N A は、構成的に活性な環状 G

10

20

30

40

50

M P - A M P シンターゼ (c G A S) のコード領域を含み、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

実施形態 16 . 1 またはこれより多くの脂質と複合体化された第 1 の m R N A および第 2 の m R N A (R N A - L i p o p l e x) を含む組成物であって、ここで前記第 1 の m R N A は、構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼ (c G A S) のコード領域を含み、前記第 2 の m R N A は、抗原のコード領域を含み、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

実施形態 17 . 1 またはこれより多くの脂質と複合体化された m R N A (R N A - L i p o p l e x) を含む組成物であって、ここで前記 m R N A は、2 A 様配列によって分離された第 1 のコード領域および第 2 のコード領域を含み、前記第 1 のコード領域は、構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼ (c G A S) のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、抗原のコード領域であるか、または前記第 1 のコード領域は、抗原のコード領域であり、前記第 2 のコード領域は、構成的に活性な環状 G M P - A M P シンターゼ (c G A S) のコード領域であり、前記 1 またはこれより多くの脂質は、第 1 の脂質および第 2 の脂質を含む、組成物。

実施形態 18 . 前記第 1 の脂質は、カチオン性脂質であり、前記第 2 の脂質は、中性またはアニオン性脂質である、実施形態 15 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 19 . 前記カチオン性脂質は、

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

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

のうちの一方または両方を含む、実施形態 18 に記載の組成物。

実施形態 20 . 前記中性またはアニオン性脂質は、

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

i i) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体 ; および / あるいは

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

を含む、実施形態 18 または実施形態 19 に記載の組成物。

実施形態 21 . T L R 7 / 8 アゴニストをさらに含む、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 . 前記 T L R 7 / 8 アゴニストは、分子量 900 ダルトンまたはこれ未満を有する低分子である、実施形態 21 に記載の組成物。

実施形態 23 . 前記 T L R 7 / 8 アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態 22 に記載の組成物。

実施形態 24 . 前記 T L R 7 / 8 アゴニストは、レシキモド (R 848) を含む、実施形態 23 に記載の組成物。

実施形態 25 . 前記 m R N A または前記第 1 の m R N A および前記第 2 の m R N A は、5' 非翻訳領域 (5' U T R) および 3' 非翻訳領域 (3' U T R) を含む、実施形態 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 26 . 前記 m R N A は、5' キャップ構造を含む、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 27 . 前記 m R N A は、ポリ A テールを含む、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 28 . 前記 m R N A は、ヌクレオシド改変された m R N A である、実施形態 1 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 29 . 前記構成的に活性な c G A S は、その野生型対応物よりも自己 D N A 反応性が高い傾向がある、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 30 . 前記 c G A S は、アミノ末端ホスホイノシチド結合ドメインを欠く短

10

20

30

50

縮型 c G A S (c G A S Δ N) である、実施形態 1 ~ 2 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 3 1 . 前記 c G A S Δ N は、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一のアミノ酸配列を含む、実施形態 3 0 に記載の組成物。

実施形態 3 2 . 前記 c G A S Δ N は、

(i) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 もしくは配列番号 8 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一のアミノ酸配列；あるいは

10

(i i) 配列番号 9 のコンセンサスアミノ酸配列、を含む、実施形態 3 1 に記載の組成物。

実施形態 3 3 . 前記 c G A S Δ N は、配列番号 1 7 のヌクレオチド配列によってコードされる、実施形態 3 1 に記載の組成物。

実施形態 3 4 . 前記 c G A S Δ N のコード領域は、開始コドン (A T G) と作動可能な組み合わせの状態にある、実施形態 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 3 5 . 前記抗原は、腫瘍抗原である、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 3 6 . 前記腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原である、実施形態 3 5 に記載の組成物。

実施形態 3 7 . 前記腫瘍抗原は、ネオアンチゲンである、実施形態 3 5 に記載の組成物。

20

実施形態 3 8 . 前記抗原は、微生物抗原を含む、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 3 9 . 前記微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、または真菌抗原を含む、実施形態 3 8 に記載の組成物。

実施形態 4 0 . 前記抗原は、病原体の表面タンパク質またはそのフラグメントを含む、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 4 1 . 前記病原体は、ヒト被験体において疾患を引き起こし得る、実施形態 4 0 に記載の組成物。

実施形態 4 2 . 前記病原体は、ウイルスである、実施形態 4 0 または実施形態 4 1 に記載の組成物。

30

実施形態 4 3 . 前記ウイルスは、S A R S - C o V - 2 である、実施形態 4 2 に記載の組成物。

実施形態 4 4 . 前記抗原は、前記 S A R S - C o V - 2 のスパイク (S) 糖タンパク質であり、必要に応じてここで前記スパイク糖タンパク質は、融合前安定化バリエーションである、実施形態 4 3 に記載の組成物。

実施形態 4 5 . 前記組成物は、リポポリサッカリド (L P S) またはモノホスホリルリピド A (M P L A) を含まない、実施形態 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 4 6 . 前記組成物は、酸化型 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (o x P A P C) または o x P A P C の種を含まない、実施形態 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の組成物。

40

実施形態 4 7 . 前記組成物は、2 - [[(2 R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (H O d i A - P C)、[(2 R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - オキソヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (K O d i A - P C)、1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソ - オクテノイル) - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (H O O A - P C)、2 - [[(2 R) - 2 - [(E) - 5 , 8 - ジオキソオクタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチル

50

アザニウム (K O O A - P C)、[(2 R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - (5 - オキソペンタノイルオキシ) プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (P O V P C)、[(2 R) - 2 - (4 - カルボキシブタノイルオキシ) - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (P G P C)、[(2 R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (P E C P C)、[(2 R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [3 - ヒドロキシ - 2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンチリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウム) エチルホスフェート (P E I P C) および / または 1 - パルミトイル - 2 - アゼラオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P A z e P C) を含まない、実施形態 46 に記載の組成物。

実施形態 48 . 実施形態 1 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の組成物、および薬学的に受容可能な添加剤を含む、医薬製剤。

実施形態 49 . 過剰活性化した樹状細胞の生成のための方法であって、前記方法は、前記樹状細胞と、実施形態 1 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 21 ~ 47 のいずれか 1 つ、または実施形態 48 に記載の製剤の有効量とを接触させて、過剰活性化した樹状細胞を生成することであって、ここで前記過剰活性化した樹状細胞は、約 48 時間以内の曝露で細胞死を受けることなく I L - 1 β を分泌することを包含する方法。

実施形態 50 . 前記樹状細胞は、

(i) インビボで前記組成物と接触される ; または

(i i) エキソビボで前記組成物と接触される、

実施形態 49 に記載の方法。

実施形態 51 . 前記過剰活性化した樹状細胞は、

(i) 刺激されていない樹状細胞もしくは空の L N P と接触させた樹状細胞より高レベルの、R A N T E S、I P - 10 および I F N α のうちの 1 もしくはこれより多くのものを分泌する ; ならびに / または

(i i) より高レベルの、C D 40、C D 86、C D 69、M H C クラス I I、M H C クラス I、C C R 7、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも 1 つの細胞表面マーカーを発現する、

実施形態 49 または実施形態 50 に記載の方法。

実施形態 52 . 実施形態 49 ~ 51 のいずれか 1 つに記載の方法によって生成される少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または 10^6 の前記過剰活性化した樹状細胞、および薬学的に受容可能な添加剤を含む、医薬製剤。

実施形態 53 . 抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、前記方法は、有効量の、実施形態 48 または実施形態 52 に記載の医薬製剤を、抗原に対する免疫応答を刺激することを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答を刺激することを包含する方法。

実施形態 54 . がんを処置する方法であって、前記方法は、有効量の、実施形態 48 または実施形態 52 に記載の医薬製剤を、がんを処置することを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを包含する方法。

実施形態 55 . 異常な細胞増殖を阻害する方法であって、前記方法は、有効量の、実施形態 48 または実施形態 52 に記載の医薬製剤を、異常な細胞増殖を阻害することを必要とする個体に投与して、異常な細胞増殖を阻害することを包含する方法。

実施形態 56 . 感染性疾患を処置または防止する方法であって、前記方法は、有効量の、実施形態 48 に記載の医薬製剤を、感染性疾患を処置または防止することを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置または防止することを包含する方法。

実施形態 57 . 前記感染性疾患は、ウイルス性疾患である、実施形態 56 に記載の方法。

10

20

30

40

50

実施形態 58 . 前記感染性疾患は、細菌性疾患である、実施形態 56 に記載の方法。

実施形態 59 . 前記樹状細胞は、哺乳動物細胞である、実施形態 49 ~ 55 のいずれか 1 つに記載の方法または医薬製剤。

実施形態 60 . 前記哺乳動物細胞は、ヒト細胞である、実施形態 59 に記載の方法または医薬製剤。

実施形態 61 . 前記個体は、哺乳動物である。実施形態 53 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 62 . 前記哺乳動物は、ヒトである、実施形態 61 に記載の方法。

実施形態 63 . 前記哺乳動物は、イヌまたはネコである、実施形態 61 に記載の方法。

実施形態 64 . 前記リン脂質は、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) を含み、前記少なくとも 1 つの脂質は、8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸, 1 - オクチルノニルエステル (SM - 102) またはそのアナログもしくは誘導体、およびコレステロールを含む、実施形態 1 ~ 63 のいずれか 1 つに記載の組成物、製剤、または方法。

実施形態 65 . 前記少なくとも 1 つの脂質は、peg 化脂質をさらに含み、必要に応じてここで前記 peg 化脂質は、ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリスチルグリセロール [DMG] を含む、実施形態 64 に記載の組成物、製剤、または方法。

実施形態 66 . 前記 LNP は、約 250 ナノメートル未満、必要に応じて約 25 ~ 約 250 ナノメートル、必要に応じて約 50 ~ 約 200 ナノメートル、または必要に応じて約 75 ~ 約 175 ナノメートルの有効直径を有する、実施形態 1 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の組成物、製剤、または方法。

実施形態 67 . 前記 LNP は、約 200 ナノメートル未満の有効直径を有する、実施形態 66 に記載の組成物、製剤、または方法。

実施形態 68 . 前記 LNP は、約 150 ナノメートル未満の有効直径を有する、請求項 67 に記載の組成物、製剤、または方法。

【実施例】

【0088】

略語: BMDc (骨髄由来樹状細胞); CDS (細胞質ゾル DNA センサー); 環状 GMP - AMP シンターゼ (cGAS); CLR (C タイプレクチンレセプター); DAMP (ダメージ関連分子パターン); DC (樹状細胞); dLN (流入領域リンパ節); DLS (動的光散乱); DMG - PEG - 2000 (ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリスチルグリセロール [DMG]); DSPC (1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン); ELSd (蒸発光散乱検出器); FLT3L (Fms 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド); GFP (緑色蛍光タンパク質); GV (GenVoy ILMTM 製剤); (HOdiA - PC (1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソ - 6 - オクテノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン); HOOA - PC (1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソオクタ - 6 - エノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン); IFN γ (インターフェロン - ガンマ); IL - 1b / IL1 - ベータ / IL - 1 β (インターロイキン - 1 ベータ); KOdiA - PC (1 - (パルミトイル) - 2 - (5 - ケト - 6 - オクテン - ジオイル) ホスファチジルコリン); KOOA - PC (1 - パルミトイル - (5 - ケト - 8 - オキソ - 6 - オクテノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン); LNP (脂質ナノ粒子); LPC / Lyso PC (リゾホスファチジルコリン); Lyso PC (22:0) (1 - ベヘノイル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン); LPS (リボポリサッカリド); MC3 ((6Z, 9Z, 28Z, 31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (DLin - MC3 - DMA ともいわれる); mcg または μ g (マイクログラム); moDC (単球由来樹状細胞); MPLA (モノホスホリルリピド A); NLR (NOD 様レセプター); OVA (オ

ポアルブミン) ; oxPAPC (酸化型 1 - パルミトイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン) ; PAMP (病原体関連分子パターン) ; PBM C (末梢血単核細胞) ; PGPC (1 - パルミトイル - 2 - グルタリル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) ; POVPC (1 - パルミトイル - 2 - (5' - オキソ - バレロイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) ; PRR (病原体認識レセプター) ; RLR (RIG - I 様レセプター) ; R848 (レシキモド) ; SC (皮下に) ; STING (インターフェロン遺伝子刺激因子) ; TNF α (腫瘍壊死因子 - アルファ) ; および TLR (tol l 様レセプター)。

【0089】

本開示は、明瞭さおよび理解を目的として、例証および実施例によって、幾分詳細に記載されているが、ある特定の変更および改変が実施され得ることは、当業者に明らかである。従って、以下の実施例は、本開示の範囲を限定すると解釈されるべきでなく、本発明開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によって明確に示される。

【0090】

実施例 1 : マウス DC は、cGAS Δ N mRNA を含む LNP によってインビトロで活性化可能である。

材料および方法

材料 . GenVoy ILMTM イオン化可能な脂質混合物を、Precision Nanosystems から購入した。CleanCap OVA および GFP mRNA を、Trilink からの既製品を購入した (120 残基ポリ A テール、5 - メトキシウリジン塩基改変、および哺乳動物システムにおける発現のためのコドン最適化を伴う)。cGAS Δ N mRNA を Trilink から特注し、線状にしたテンプレート DNA からインビトロ転写を介して合成した。ヒト cGAS Δ N 配列のヌクレオチド配列を、マウス細胞における発現のためにコドン最適化した。合成ヌクレオチド配列は、配列番号 17 として示される。上記 mRNA 配列を、Trilink 専有の CleanCap mRNA 技術を使用してキャップした (N1 - メチルプソイドウリジン塩基改変、および 120 残基ポリ A テールを伴う)。上記配列は、BbsI 制限酵素部位を含む。その mRNA を、合成後にホスファターゼ処理した。

【0091】

LNP 合成。脂質ナノ粒子 (LNP) を、GenVoy ILMTM イオン化可能な脂質混合物 (Precision Nanosystems) を使用して調製した。OVA mRNA、GFP mRNA、および cGAS Δ N mRNA (Trilink) を各々、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中 0.17 mg/mL で調製した。GenVoy ILMTM を、12.5 mM で使用した。LNP を、NanoAssemblr Ignite 機器 (Precision Nanosystems) を使用して合成した。エタノール中の脂質を、mRNA 溶液と、個々に 1 : 3 容積比で流速 12 mL / 分を使用して合わせた。LNP を、10 容のリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) (pH 7.4) 中で洗浄して、残留エタノールを除去し、次いで、Amicon 10K MWCO 遠心分離フィルターを使用して濃縮した。LNP を、使用前に 0.2 μ m フィルターを通して濾過した。

【0092】

LNP 特徴づけ。LNP への mRNA の充填を、RiboGreen アッセイ (ThermoFisher) を使用して、製造業者のプロトコールに従って定量した。サンプルを、標準曲線の範囲内に入るように希釈した。LNP を、Triton (登録商標) X - 100 を使用して溶解して、LNP への mRNA の被包を評価した。全 mRNA および被包化 mRNA の両方を、定量した。LNP のサイズを、NanoBrook Omni (Brookhaven) での動的光散乱 (DLS) を使用して評価した。LNP を、DLS を実行する前に、PBS 中に 1 : 10 希釈した。3 回の 90 秒間の測定値を、各サンプルに関して記録した。

【0093】

10

20

30

40

50

マウス骨髄由来 F L T 3 L - D C の生成。脚の大腿骨および脛骨を、マウスから除去し、鋏で切断し、滅菌チューブへと洗い流した。骨髄懸濁物を、A C K 溶解緩衝液で 1 分間処理し、次いで、40 μ m 細胞ストレーナーに通した。細胞を計数し、10% F B S、ペニシリンおよびストレプトマイシン、ならびに L - グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムの補充物を含む完全 I M D M (I 10) からなる培地中で再懸濁した。次いで、細胞を、P 12 プレートのウェルあたり 8×10^6 の骨髄細胞で蒔いた。組換えマウス F L T 3 L (M i l t e n y i) を、200 ng / m L で培養物に添加した。分化した細胞を、8 日目に引き続くアッセイのために使用した。分化の効率を、B D S y m p h o n y A 3 を使用するフローサイトメトリーによってモニターしたところ、C D 11 c + M H C - I I + 細胞は、常に、生存している細胞のうちの 80 % を上回った。各実験に関しては、5 ~ 15 匹のマウスを使用して、骨髄から D C を生成した。

10

【0094】

マウス F L T 3 L - D C 刺激。 F L T 3 L - D C を、分化の 8 日後に採取し、計数し、m R N A 含有量に基づいて脂質ナノ粒子 (L N P) で処理した。細胞を、200 μ L 全培地 / ウェル中、1 μ g / m L m R N A で処理した。インキュベーションの約 24 時間後、細胞および培養上清を、下流の読み取りのために使用した。各ウェルから 150 m L の細胞上清を集めて、D C からのサイトカイン分泌を測定した。L E G E N D p l e x T M M o u s e A n t i - V i r u s R e s p o n s e P a n e l (B i o l e g e n d) を、製造業者のプロトコールに従って使用した。データを、B D F A C S S y m p h o n y を使用して集め、B i o l e g e n d によって提供されるクラウドベースのソフトウェアを使用して分析した。L N P 曝露後の D C 活性化を評価するために、F L T 3 L D C を、L N P 添加の 24 時間後に集め、染色して、以下の細胞表面マーカー： C D 11 c、M H C - I I、C D 24、S I R P 1 a、C D 40、C D 86、C D 69、および H 2 k b (M H C - I) の発現を測定した。グラフは、三連の平均および S D を示す。データは、2 回の実験の代表である。

20

【0095】

結果

c G A S Δ N をコードする m R N A を充填した L N P (c G A S Δ N L N P) は、モデル抗原をコードする m R N A を充填した L N P に類似のサイジングおよび充填プロフィールを示す。 c G A S Δ N m R N A 充填 L N P は、モデル抗原 m R N A - O V A および G F P を充填した L N P に類似のサイズおよび m R N A 充填プロフィールを示した。全ての m R N A 充填 L N P は、150 nm 未満の平均有効直径を有し (図 3 A)、0.3 未満の多分散指数によって示される比較的均一なサイズプロフィールを有した (図 3 B)。全ての m R N A は、G e n V o y I L M L N P に充填され、測定された m R N A 充填は、m R N A の理論的に充填される量のうちの 90 ~ 110 % を示した (図 3 C)。

30

【0096】

c G A S Δ N L N P s は、マウス D C において I F N - I 依存性応答を誘導する。F L T 3 L D C を、空の L N P (m R N A なし)、または G F P m R N A もしくは O V A m R N A もしくは c G A S Δ N m R N A 単独のいずれかを含む L N P で刺激した。あるいは、D C を、O V A m R N A を含む L N P + 空の L N P、または O V A m R N A + c G A S Δ N を含む L N P、または c G A S Δ N を含む L N P + G F P m R N A を含む L N P で刺激した。L N P を、1 μ g / m L での m R N A の濃度に基づいて、細胞培養物に添加した。刺激の 24 時間後、細胞上清を、多重化サイトカインビーズアレイ L e g e n d p l e x アッセイを使用してサイトカインの存在に関して測定した。興味深いことに、本発明者らは、c G A S Δ N L N P 処理の際に、B M D C が、R A N T E S、I P - 10、および I F N α を、m R N A 抗原充填 L N P 単独で処理した場合より有意に高いレベルで分泌することを見出した (図 4 A、図 4 B、図 4 C)。これらのデータは、構成的に活性な c G A S Δ N が成功裡に発現され、マウス D C において機能的であることを示した。I L - 6 および T N F α を含め、N F κ B に依存する炎症促進性

40

50

サイトカインは分泌されなかった。これは、構成的に活性な c G A S Δ N が特定の細胞タイプにおいて N F k B 活性化を誘導することを示唆する。本発明者らは、L N P 処理の際のこれらのサイトカインの誘導を、L P S および R 8 4 8 P A M P での刺激と比較した。興味深いことに、I P - 1 0、R A N T E S、および I F N α は、L P S もしくは R 8 4 8 のより高い用量と比較して、c G A S Δ N L N P 処理によってより強いまたは類似のレベルのいずれかで発現された。これは、I R F 3 経路が、構成的に活性な c G A S Δ N の発現によって強く誘導され得ることを示唆する。

【 0 0 9 7 】

c G A S Δ N L N P は、マウス D C 活性化を誘導する。D C 活性化を評価するために、L N P 処理 D C を、全 c D C、ならびに D C の c D C 1 および c D C 2 サブセット上の活性化マーカーでの処理の 2 4 時間後に染色した。T 細胞共刺激性表面分子 C D 4 0、C D 8 6 および C D 6 9 の発現は、メジアン蛍光強度 (M F I) によって評価した場合に、細胞を c G A S Δ N L N P で処理した場合に増加したが、空の L N P または G F P L N P または O V A 含有 L N P では増加しなかった (図 5 A、図 5 B、図 5 C)。この傾向は、c D C 1 サブセットに関してもあてはまった。さらに、M H C I I および H 2 k B 抗原提示分子は、標準的な m R N A 抗原 L N P と比較して、c D C 上でこれらを c G A S Δ N L N P で処理した場合に、増加した (図 5 D、5 E)。これはまた、c D C 1 サブセットに関してもあてはまった。さらに、C C R 7 表面発現 (D C が L N へ移動する可能性を示す) は、標準的な m R N A 抗原 L N P と比較して、c D C 上でこれらを c G A S Δ N L N P で処理した場合に、増加した (図 5 F)。この傾向は、c D C 1 サブセットに 10 20 関してもあてはまった。全体的に、これらのデータは、c G A S Δ N L N P が、D C 内の c G A S - S T I N G 経路活性化を誘導し、D C 活性化状態および I 型 I F N の生成をもたらすことを示す。

【 0 0 9 8 】

実施例 2 : ヒト細胞は、c G A S Δ N m R N A を含む L N P によって、インビトロで炎症状態へと活性化可能である。

材料および方法

材料。L N P のための脂質を、C a y m a n C h e m i c a l s (S M 1 0 2) または A v a n t i (2 2 : 0 L P C、D S P C、D M G - P E G 2 0 0 0) から購入した。コレステロールを、S i g m a から購入した。G e n V o y I L M 脂質を、P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s から購入した。C l e a n C a p O V A および G F P m R N A を、T r i l i n k からの既製品を購入した (1 2 0 ポリ A テールおよび塩基改変 5 - メトキシウリジンを伴い、哺乳動物システムのために最適化されている)。c G A S Δ N m R N A を特注し、線状にしたテンプレート DNA (T r i l i n k) からインビトロ転写を介して合成した。ヒト c G A S Δ N 配列を、マウスにおいて発現されるようにコドン最適化した。上記配列を、T r i l i n k 特有の C l e a n C a p m R N A 技術を使用してキャップした (塩基改変 N 1 - メチルプソイドウリジン、および 1 2 0 ポリ A テールを伴う)。上記配列は、B b s 1 制限酵素部位を含む。配列情報を、プラスミドを構築するために使用し、そこから m R N A を合成的に合成した。m R N A を、合成後にホスファターゼ処理した。 30 40

【 0 0 9 9 】

L N P 合成。脂質ナノ粒子 (L N P) を、G e n V o y I L M L N P 脂質ミックス (P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s) または特注の L N P 脂質ミックスを使用して調製した (表 2 - 1)。O V A m R N A、G F P m R N A、および c G A S Δ N m R N A (T r i l i n k) を各々、クエン酸ナトリウム緩衝液 (p H 4) 中 0 . 1 7 m g / m L で調製した。G e n V o y I L M および特注の L N P 脂質ミックスを、1 2 . 5 m M で使用した。L N P を、N a n o A s s e m b l e r I g n i t e 機器 (P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s) を使用して合成した。エタノール中の脂質を、m R N A 溶液と個々に 1 : 3 容積比で、流速 1 2 m L / 分を使用して合わせた。L N P を、1 0 容のリン酸緩衝塩類溶液 (P B S) (p H 7 . 4) 中で洗浄して、残留エタ 50

ノールを除去し、次いで、Amicon 10K MWCO遠心分離フィルターを使用して濃縮した。LNPを、使用前に、0.2 μmフィルターを通して濾過した。

【表 2 - 1】

表 2-1. LNP 製剤

脂質	GenVoy ILM™	特注の脂質ミックス
イオン化可能な脂質	専有の脂質 50%	SM102 40%
DSPC	10%	35%
コレステロール	37.5%	28.5%
安定化剤脂質	専有の脂質 2.5%	DMG-PEG2000 1.5%

10

【0100】

LNP特徴づけ。LNPへのmRNAの充填を、RiboGreenアッセイ(ThermoFisher)を使用して、製造業者のプロトコルに従って定量した。サンプルを、標準曲線の範囲内に入るように希釈した。LNPを、Triton(登録商標)X-100を使用して溶解して、LNPへのmRNAの被包を評価した。全mRNAおよび被包化mRNAの両方を、定量した。LNPのサイズを、NanoBrook Omni(Brookhaven)での動的光散乱(DLS)を使用して評価した。LNPを、DLSを実行する前に、PBS中に1:10希釈した。3回の90秒間の測定値を、各サンプルに関して記録した。

20

【0101】

ヒト単球由来樹状細胞(modC)生成。ヒト単球を、Miltenyiから購入したLeukopaksから、StraightFrom Leukopak CD14マイクロビーズキット(Miltenyi)を使用して単離した。単離を、製造業者の指示に従って完了した。次いで、単球をアリコートに分け、10%ジメチルスルホキシドを含むウシ胎仔血清中で凍結した。単球由来樹状細胞(modC)培養物での研究のために、単球を解凍し、10%FBS、50単位/mLペニシリン、50mg/mLストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、50mMβ-メルカプトエタノール、10mMHEPES、およびGibcoMEM非必須アミノ酸を含むRPMI培地(R10培地)中で培養した。単球をmodCへと分化させるために、組換えヒトGM-CSF(50ng/mL)およびIL-4(25ng/mL)を、R10培地に添加した。細胞をGM-CSFおよびIL-4とともに6日間培養し、3日目にGM-CSFおよびIL-4を含むR10培地で細胞にさらなる栄養補給した。分化の6日後に、modCを集め、計数した。細胞を、R10培地中、1E5細胞/ウェルにおいて96ウェル平底プレートに蒔いた。

30

【0102】

THP-1細胞生成。THP1-Null2(Invivogen)細胞を、10%熱非働化FBS、25mMHEPES、100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン、100μg/mLノルモシン(normocin)を含むRPMI培地へと解凍し、その中で維持し、100μg/mLゼオシンを2継代ごとに補充した。細胞を、T75培養フラスコにおいて0.4~0.6×10⁶細胞/mLの間で、1週間あたり2回細胞を継代して、継代した。細胞を、20継代まで維持する。その後新たなバイアルを解凍した。LNPで処理する前に、THP1-Null2細胞をフラスコから集め、96ウェル平底組織培養プレートにおいて100,000細胞/ウェルで、10%熱非働化FBS、25mMHEPES、および100U/mLペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI培地中に蒔いた。

40

【0103】

ヒト細胞活性化。THP-1細胞およびmodCを、mRNA内容物の濃度に基づいて、脂質ナノ粒子(LNP)で処理した。細胞を、200μL/ウェルの全刺激物容積

50

において、LNP中で送達される $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ mRNAで処理した。一晚のインキュベーション後、細胞および培養上清を、下流の読み取りのために使用した。細胞上清のうちの $150\mu\text{L}$ を、集めた。LNP添加の1日後に、THP-1培養物から細胞および上清を集めて、IL-6 (PromegaによるLumitアッセイ) およびIP-10 (BiolegendのELISAキット) サイトカインを測定した。THP-1細胞を、フローサイトメトリー分析のための活性化マーカーを染色するために使用した。moDCからのサイトカイン分泌を測定するために、LegendPlex Anti-virus Response Panel (Biolegend) を、製造業者のプロトコールに従って使用した。データを、BD FACS Symphonyを使用して集め、Biolegendによって提供されるクラウドベースのソフトウェアを使用して分析した。moDCおよびTHP-1細胞の両方を、LNP添加の1日後に集め、以下の細胞表面活性化マーカー: CD11c、CD209、CD40、CD80、CD83、CD86、HLA-ABC、およびHLA-DRの発現を測定するために染色した。2つの異なるヒトドナーサンプルおよびTHP-1細胞に対して研究を行い、各生物学的状態を三連で試験した。グラフは、2つのヒトサンプルまたはTHP-1細胞からのデータを示す。データは、2回の実験の代表である。

10

20

30

40

【0104】

HEK-Blue IL-1 β レポーターアッセイ。moDCを、mRNA内容物の濃度に基づいて、脂質ナノ粒子(LNP)で処理した。細胞を、 $200\mu\text{L}$ /ウェルの全刺激物容積において、LNP中で送達される $1\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA mRNA、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ cGAS ΔN mRNA、または $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ mRNAで処理した。LNPを、培地、R848、またはR848 + MCC950 (NLRP3インフラマソームのインヒビター) とともに送達した。MCC950の存在下では、IL-1 β は、インフラマソーム依存性様式において分泌されないはずである。HEK-Blue IL-1 β レポーター細胞 (InvivoGen) を使用して、48時間にわたるcGAS ΔN LNPでの処理に応答してヒトmoDCによって分泌される機能的IL-1 β を評価した。HEK-Blue IL-1 β レポーター細胞は、HEK293細胞に由来し、IL-1 β レセプターがいったん成熟IL-1 β と遭遇すると、SEAP生成を誘発するNK-kB/AP-1誘導性SEAP (分泌型の胚性アルカリホスファターゼ) レポーターを発現する。SEAP生成は、QUANTI-Blue溶液を使用する色の変化によってモニターされる。HEK-Blue IL-1 β レポーター細胞を、10% 熱非働化FBS、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ノルモシンを含むDMEM培地へと解凍し、その中で維持し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゼオシンを2継代ごとに補充した。細胞を、1週間あたり2回細胞を継代して、T75培養フラスコにおいて $0.4\sim 0.6\times 10^6$ 細胞/mLの間で継代した。細胞を、20継代まで維持する。その後新たなバイアルを解凍する。LNPで処理する前に、HEK-Blue IL-1 β レポーター細胞をフラスコから集め、96ウェル平底組織培養プレートにおいて50,000細胞/ウェルで、10% 熱非働化FBS、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン、および100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含むDMEM培地中に蒔いた。標準曲線を作成するためにcGAS ΔN 活性化moDCからの培地のうちの50 μL 、または既知の濃度の組換えヒトIL-1 β を含む培地のうちの50 μL を、HEK-Blue IL-1 β レポーター細胞を含むウェルに添加した。細胞を一晚インキュベートし、その後、インキュベートしたサンプルからの20 μL のSEAP含有上清を、180 μL のQUANTI-Blue溶液と混合した。この反応を、37℃で1時間実行し、その後、630nmでの吸光度を、分光測光によって測定した。

【0105】

結果

cGAS ΔN LNPが標準的LNPより大きな細胞活性化を可能にするかどうかを決定するために、Ova抗原をコードするmRNAまたは構成的に活性なcGAS ΔN をコ

50

ードする mRNA を含むように LNP を合成した。実験コントロールとして、LNP を、GFP をコードする mRNA で作製した。これらの LNP を、個々に、または組み合わせ、THP-1 細胞（ヒト骨髄系細胞株）および初代ヒト mDC で試験した。2 つの脂質製剤：GenVoy（Precision Nanosystems）および特注の脂質ミックスを、活性が LNP 製剤依存性であるかどうかを決定するために含めた。LNP を、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の濃度に基づいて、細胞培養物に添加した。

【0106】

cGASΔN LNP は、モデル抗原を充填した LNP に類似のサイジングおよび充填プロフィールを示す。cGASΔN mRNA 充填 LNP は、モデル抗原 mRNA（OVA および GFP）を充填した LNP に類似のサイズおよび mRNA 充填プロフィールを示した。全ての mRNA 充填 LNP は、 150 nm 未満の平均有効直径を有し（図 6 A）、 0.3 未満の多分散指数によって示される比較的均一なサイズプロフィールを有した（図 6 B）。全ての mRNA は、GenVoy ILM LNP へと充填され、mRNA の理論的に充填される量のうちの $70 \sim 90\%$ が、LNP に被包された（図 6 C）。GenVoy および特注の脂質ミックスの両方が、類似のサイジングで LNP 生成を可能にしたが、最適化された GenVoy 製剤は、より低い多分散指数によって示されるように、サイズの均一性の増加を示した（図 6 B）。GenVoy および特注の脂質ミックスの両方が、全ての mRNA の類似の充填レベルを可能にし、GenVoy 製剤は、mRNA をわずかにより効率的に被包した。

【0107】

cGASΔN LNP は、ヒト mDC において炎症経路を活性化する。2 名のドナーに由来する凍結した単球を解凍し、GM-CSF および IL-4 を使用して mDC へと分化させた。細胞を、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA 充填の LNP で処理した。多重化サイトカインビーズアレイアッセイを使用すると、複数の炎症性サイトカインがアップレギュレートされていることが見出された。cGASΔN LNP 処理の際には、IL-6（図 7 A）、TNFα（図 7 B）、IP-10（図 7 C）、IFNλ1（図 7 D）、IFNβ（図 7 E）、および IFNα2（図 7 F）は、モデル抗原を充填した LNP での処理と比較して、1 日以内に上昇したレベルで検出可能であった。IL-6 の発現は、構成的に活性な cGAS が NF-κB 活性化を誘導し得、おそらく細胞タイプ依存性であることを示唆した。興味深いことに、IP-10、IFNλ1、および IFNβ は、細胞を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS で処理した場合（これは、陽性コントロールとして役立った）より、cGASΔN LNP 処理によってより強く発現された。このことは、IRF3 経路が、構成的に活性な cGAS の発現によって強く誘導され得ることを示唆する。

【0108】

LNP 処理 mDC を、処理の 1 日後に染色して、活性化マーカーの発現を定量した。メジアン蛍光強度（MFI）を測定することによって、CD83 発現は、標準的な LNP と比較して、細胞を cGASΔN LNP で処理した場合に増加した（図 8 A）。T 細胞共刺激分子の発現も測定した。CD40、CD80 発現は、mDC の全体の集団において、およびそれらを cGASΔN LNP で処理した場合に単一細胞レベルでも増加した（図 8 B、図 8 C）。HLA-DR は、ほぼ全ての mDC によって発現されたが、MFI 測定は、MHC クラス II 分子が、mDC を cGASΔN LNP で処理した場合に、個々の細胞において増加することを明らかにした（図 8 D）。MHC クラス II 分子の場合には、HLA-ABC 染色は、いかなる cGASΔN LNP 依存性の変化をも明らかにしなかった。

【0109】

cGASΔN LNP は、THP-1 において炎症経路を活性化する。インキュベーションの 1 日後に、THP-1 細胞上清を、NF-κB または IRF3 活性化に依存するサイトカインの存在、それぞれ、IL-6 および IP-10 に関して測定した。両方の時点で、IL-6 は、cGAS LNP で処理した THP-1 細胞によって差次的に発現されなかった。これは、NF-κB が活性化されていないことを示唆する。対照的に、I

P - 10 (IRF3によって制御される遺伝子)は、cGAS LNP処理の1日以内に発現された(図9A)。cGAS LNPは、IP - 10発現を誘導したのに対して、他のコントロールLNPは、ほとんどまたは全くIP - 10を誘導しなかった。検出可能なIP - 10は、LNPへの構成的に活性なcGASの転写物のパッケージングが、自然免疫系を活性化する方法であり得ることを示した。

【0110】

cGAS LNPが自然免疫シグナル伝達を活性化することをさらに検証するために、THP - 1細胞を、活性化マーカーの細胞表面発現に関して染色するために、インキュベーションを開始して1日後に集めた。THP - 1サンプルを、生きている単一細胞事象に対してゲートをかけた。CD40発現は、cGAS LNPでの細胞処理後に増加することが観察されたのに対して、GFPまたはOVA転写物を有する他のコントロールLNPは、観察されなかった(図9B)。CD40は、その同族リガンドとの細胞間相互作用を介して免疫応答を高めるレセプターである。

10

【0111】

cGASΔN LNPs + R848での処理は、moDC過剰活性化を生じる。moDCを、R848およびcGASΔNで刺激して、NF - κB刺激およびcGAS - STING経路活性化の組み合わせが、より強力な炎症活性を可能にするかどうかを決定した。具体的には、moDCがこの組み合わせによって過剰活性化される能力を試験した。過剰活性化を、DCが生存可能なままであると同時にIL - 1βを分泌する能力によって代表とした。moDCは、培地、R848、またはR848およびMCC950の存在下で、刺激しないまま(PBS処理)、またはcGASΔN LNPもしくはOVA LNPで処理するかのいずれかであった。MCC950は、NLRP3インフラマソームインヒビターであるので、MCC950で処理した細胞は、インフラマソーム依存性様式でIL - 1βを生成できない。重要なことに、LNPで処理した全ての細胞は、PBS単独で処理したmoDCに類似の生存率を示した。これは、上記細胞のいずれも、LNP処理に応答してピロトーシスしていなかったことを示す(図10A)。任意の活性なIL - 1βが、R848およびcGASΔNでの処理に応答してこれらの細胞によって生成されたかを決定するために、moDC培養からの上清を、IL - 1βに応答してSEAPを生成するHEK - Blue IL - 1βレポーター細胞に添加した。予測されるように、PBS、R848、またはR848 + MCC950で処理したmoDCは、IL - 1βを生成しなかった(図10B)。過剰活性化がLNP脂質組成に依存したかを決定するために、OVAを含むLNPを、R848(IL - 1β生成を許容しない条件)とともに培養した。興味深いことに、cGASΔNを充填したLNPは、R848と組み合わせて送達した場合、moDCにおいてIL - 1β分泌を刺激した(図10B)。この応答は、MCC950での処理がIL - 1β生成を排除したことから、NLRP3インフラマソーム依存性であった。

20

30

【0112】

全体として、LNPでのTHP - 1およびヒトmoDCの処理から集めたデータは、いくつかの結論をもたらした。第1に、LNPは、成功裡に合成された。さらに、構成的に活性なcGASの発現は、製剤非依存性様式において、cGAS - STING経路と関連する遺伝子のアップレギュレーションを生じた。炎症性サイトカインが発現され、活性化マーカーのアップレギュレーションが細胞表面で観察された。mRNAとしてコードされ、LNP中にパッケージされる構成的に活性なcGASは、自然免疫シグナル伝達を標的化細胞において開始して、炎症応答を促進するために成功裡に利用され得る。最後に、R848と組み合わせた構成的に活性なcGASは、moDC過剰活性化を可能にし、IL - 1β分泌が生きているDCにおいて起こった。

40

【0113】

実施例3： マウス細胞は、cGASΔN mRNAを含むLNPによってインビボで活性化可能である

材料および方法

50

材料。 L N Pのための脂質を、C a y m a n C h e m i c a l s (S M 1 0 2) またはA v a n t i (2 2 : 0 L P C、D S P C、D M G - P E G 2 0 0 0) から購入した。コレステロールを、S i g m aから購入した。G e n V o y I L M脂質を、P r e c i s i o n N a n o s y s t e m sから購入した。C l e a n C a p O V AおよびG F P m R N Aを、T r i l i n kからの既製品を購入した(1 2 0 ポリAテールおよび塩基改変5 - メトキシウリジンを伴い、哺乳動物システムのために最適化されている)。c G A S Δ N m R N Aを特注し、線状にしたテンプレートDNA (T r i l i n k) からインビトロ転写を介して合成した。ヒトc G A S Δ N配列を、マウスにおいて発現されるようにコドン最適化した。上記配列を、T r i l i n k専有のC l e a n C a p m R N A技術を使用してキャップした(塩基改変N 1 - メチルプソイドウリジン、および1 2 0 ポリAテールを伴う)。上記配列は、B b s 1制限酵素部位を含む。配列情報を、プラスミドを構築するために使用し、そこからm R N Aを合成的に合成した。m R N Aを、合成後にホスファターゼ処理した。

【0114】

L N P合成。脂質ナノ粒子(L N P)を、G e n V o y I L M L N P脂質ミックス(P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s)または代表的なL N P脂質ミックス(表2 - 1、実施例2)を使用して、実施例2にあるように調製した。O V A m R N A、G F P m R N A、およびc G A S Δ N m R N A (T r i l i n k)を各々、クエン酸ナトリウム緩衝液(p H 4)中0 . 1 7 m g / m Lで調製した。G e n V o y I L Mおよび代表的なL N P脂質ミックスを、1 2 . 5 m Mで使用した。L N Pを、N a n o A s s e m b l e r I g n i t e機器(P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s)を使用して合成した。エタノール中の脂質を、m R N A溶液と個々に1 : 3 容積比で、流速1 2 m L / 分を使用して合わせた。L N Pを、1 0 容のリン酸緩衝塩類溶液(P B S) (p H 7 . 4)中で洗浄して、残留エタノールを除去し、次いで、A m i c o n 1 0 K M W C O遠心分離フィルターを使用して濃縮した。L N Pを、使用前に、0 . 2 μ mフィルターを通して濾過した。

【0115】

L N P特徴づけ。L N Pへのm R N Aの充填を、実施例2にあるように、R i b o G r e e nアッセイ(T h e r m o F i s h e r)を使用して、製造業者のプロトコールに従って定量した。サンプルを、標準曲線の範囲内に入るように希釈した。L N Pを、T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0を使用して溶解して、L N Pへのm R N Aの被包を評価した。全m R N Aおよび被包化m R N Aの両方を、定量した。L N Pのサイズを、N a n o B r o o k O m n i (B r o o k h a v e n)での動的光散乱(D L S)を使用して評価した。L N Pを、D L Sを実行する前に、P B S中に1 : 1 0希釈した。3回の9 0秒間の測定値を、各サンプルに関して記録した。

【0116】

c G A S Δ N m R N AおよびO V A抗原m R N Aを含むL N Pでのインビボ免疫付与。B L 6マウスに、以下の表(表3 - 1)に従ってL N Pを皮下で免疫した。抗原を、O V A m R N A充填L N P、ならびにアジュバントであるc G A S Δ N m R N Aもしくはアジュバント作用のないG F P m R N Aのいずれかを含むL N Pを使用して送達した。マウスに、表中に示されるm R N A用量を投与した。O V A m R N A用量を、5 μ g / マウスで固定したが、アジュバントm R N Aを、1 μ g / マウスから1 0 μ g / マウスまで変化させた。マウス(n = 5 / 群)に、0日目に初回免疫付与を施し、その同じ用量のブースト免疫付与を、7日目に施した。ブーストの7日後に、抗体およびT細胞応答のために血液を集めた。血清を、血清分離チューブを使用して血液から集めた一方で、細胞分析のための血液を、K 2 E D T Aチューブを使用して集めた。血液収集の後、マウスを安楽死させ、流入領域リンパ節および脾臓を集め、単一細胞懸濁物へと処理した。

【表 3 - 1】

表 3-1. cGASΔN LNP に対する T 細胞応答および B 細胞応答のインビボ評価において使用される LNP

群	OVA をコードする mRNA	GFP および/または cGASΔN をコードする mRNA	製剤
1	なし	なし	PBS
2	なし	GFP (5 μg/マウス) + cGASΔN (5 μg/マウス)	GV
3	OVA (5 μg/マウス)	GFP (1 μg/マウス)	GV
4	OVA (5 μg/マウス)	GFP (5 μg/マウス)	GV
5	OVA (5 μg/マウス)	cGASΔN (1 μg/マウス)	GV
6	OVA (5 μg/マウス)	cGASΔN (5 μg/マウス)	GV
7	OVA (5 μg/マウス)	GFP (5 μg/マウス)	特注
8	OVA (5 μg/マウス)	cGASΔN (5 μg/マウス)	特注

10

【0117】

OVA 特異的 T 細胞テトラマー評価。 OVA LNP 免疫付与を受けたマウスの血液中の OVA 特異的 T 細胞を、ブーストの 7 日後に評価した。 S I I N F E K L (配列番号 16) (OVA MHC - I エピトープ) に特異的な CD8 + T 細胞を、テトラマー分析を使用して血液において定量した。簡潔には、血液中の赤血球を、RBC 溶解緩衝液を使用して、溶解を血液中の任意の RBC を完全に除去するために 2 回完了させて、溶解した。細胞を洗浄し、次いで生存率 (生/死)、S I I N F E K L - テトラマー結合 (MBL)、ならびに CD3、CD4、および CD8 発現に関して染色した。細胞を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、全細胞計数を可能にするために、実行前に計数ビーズを添加した。データを、BD FACS Symphony を使用して集め、Flowjo (BD) を使用して分析した。

20

【0118】

OVA 特異的抗体評価。 OVA LNP 免疫を受けたマウスの血清中の OVA 特異的抗体を、ブーストの 7 日後に評価した。OVA 特異的全 IgG、IgG1、および IgG2b を、ELISA を使用して評価した。簡潔には、ELISA プレートを、10 μg/mL Endofit Ovalbumin (Invivogen) で一晩コーティングし、次いで、洗浄し、2% ウシ血清アルブミンでブロッキングした。プレートを再び洗浄し、次いで、血清を 1:500 希釈で上記プレートに添加し、続いて、1:5 希釈で、合計 7 回の血清希釈の試験を完了した。サンプルを洗浄し、次いで、HRP に結合体化した IgG、IgG1、または IgG2b に特異的な検出抗体 (Southern Biotech) とともにインキュベートして、それぞれ、全部の、Th2 に偏った、または Th1 に偏った OVA 特異的抗体を検出した。プレートを洗浄し、次いで、TMB とともにインキュベートし、いったん発色が完了した後に、停止溶液を添加した。

30

【0119】

結果

40

cGASΔN LNP がより大きな抗原特異的 T 細胞および B 細胞応答をインビボで誘導するかどうかを決定するために、マウスを、cGASΔN または GFP mRNA の異なる用量で、cGASΔN LNP または GFP LNP と組み合わせて OVA LNP で免疫した (表 3 - 1)。マウスを免疫し、次いで、1 週間後にブーストした。ブーストの 1 週間後、抗体および T 細胞テトラマー分析のために血液を集めた。活性が LNP 製剤依存性であるかどうかを決定するために、2 つの脂質製剤: GenVoy (Precision Nanosystems) および特注の脂質ミックスを含めた。

【0120】

cGASΔN LNP は、モデル抗原を充填した LNP に類似のサイジングおよび充填プロフィールを示す。 cGASΔN mRNA 充填 LNP を、実施例 2 に従って調製

50

したところ、特徴づけは、図 6 A ~ 6 C に示される傾向をたどった。全ての L N P は、モデル抗原 m R N A (O V A および G F P) を充填した L N P に類似のサイズおよび m R N A 充填プロフィールを示した。全ての m R N A 充填 L N P は、150 nm 未満の平均有効直径を有し、0.3 未満の多分散指数によって示される比較的均一なサイズプロフィールを有した。全ての m R N A は、GenVoy I L M L N P へと充填され、m R N A の理論的に充填される量のうちの 70 ~ 90 % が、L N P に被包された。

【0121】

O V A L N P および c G A S Δ N L N P での処置は、O V A 特異的 C D 8 + T 細胞を増加させる。c G A S Δ N L N P (1 または 5 μ g m R N A / マウス) またはコントロール G F P L N P (1 または 5 μ g m R N A / マウス) とともに送達される O V A L N P (5 μ g m R N A / マウス) での 2 回の免疫付与後に (表 3 - 1) 、血液中の O V A 特異的 T 細胞の存在を分析した。ブーストの 7 日後に血液を集め、赤血球を除去するために処理し、次いで、生 / 死、C D 3、C D 8、C D 4、および S I I N F E K L - テトラマー反応性 (配列番号 16 として示される O V A 特異的 C D 8 + T 細胞エピトープ) に関して染色した。生きている C D 8 + T 細胞の中での S I I N F E K L 特異的細胞の頻度を決定し、血液において集めた S I I N F E K L 特異的 C D 8 + T 細胞の合計の絶対数も決定した。マウスを c G A S Δ N または G F P L N P (1 または 5 μ g m R N A) とともに GenVoy L N P - O V A L N P (5 μ g m R N A) で処置した場合、S I I N F E K L 特異的 (O V A 特異的) C D 8 + T 細胞の頻度は、G F P m R N A を O V A に加えて送達した場合と比較して、c G A S Δ N m R N A を O V A に加えて送達した場合に有意に増加した (図 11 A) 。 O V A L N P を受容しなかったマウスは、S I I N F E K L 特異的 C D 8 + T 細胞を有しなかった。この傾向は、製剤特異的ではなかった。なぜなら特注の脂質ミックスで調製した O V A L N P (5 μ g m R N A) および c G A S Δ N (5 μ g m R N A) を受容したマウスは、O V A L N P + G F P L N P (5 μ g m R N A) を受容したマウスより血液中の S I I N F E K L 特異的 T 細胞の頻度が有意により高かったからである (図 11 B) 。この傾向は、GenVoy (図 11 C) または特注の脂質ミックス (図 11 D) のいずれかで調製した場合に、S I I N F E K L 特異的 C D 8 + T 細胞の絶対数にもあてはまった。興味深いことに、c G A S Δ N m R N A の用量を下げると、O V A 特異的 T 細胞の頻度に大きな影響を有しないようであった。これは、少量のこの c G A S Δ N m R N A が、抗原 m R N A を含む標準的脂質調製物と組み合わせさせて、抗原特異的 T 細胞応答を有意にブーストするために十分であり得ることを示唆する。

【0122】

c G A S Δ N L N P での処理は、T h 1 特異的 I g G 応答に影響することなく、T h 2 特異的 O V A 特異的抗体を減少させる。c G A S Δ N L N P (1 または 5 μ g m R N A / マウス) またはコントロール G F P L N P (1 または 5 μ g m R N A / マウス) とともに送達した O V A L N P (5 μ g m R N A / マウス) での 2 回の免疫付与後に (表 3 - 1) 、血液中の O V A 特異的抗体を定量した。ブーストの 7 日後に血液を集め、血清を単離し、その後、全 I g G、I g G 1 (T h 2 応答と関連) 、および I g G 2 a (T h 1 応答と関連) を分析した。旧来では、m R N A 抗原充填 L N P での免疫付与は、強い抗体応答を生じるので、抗体応答は、処置における c G A S Δ N L N P の添加が予測される応答を低減するかどうかを決定するために評価された。興味深いことに、GenVoy 製剤を使用して調製した O V A および c G A S Δ N L N P で処置したマウスは、O V A + G F P L N P 処置と比較して、測定された O V A 特異的全 I g G において有意な変化を示さなかった (図 12 A) 。 O V A L N P を受容しなかったマウスは、O V A 特異的抗体を生成しなかった。これは、製剤特異的応答ではなかった：測定された O V A 特異的全 I g G は、特注の脂質ミックスを使用して調製した L N P における c G A S Δ N の存在によって有意に影響しなかった (図 12 B) 。 I g G 1 は、代表的には、T h 2 免疫応答と関連することから、O V A 特異的 I g G 1 をも評価した。O V A 特異的 I g G 1 は、GenVoy 製剤を使用して調製した L N P における c G A S Δ N の存在

によって有意に低減した (GFP LNP に対する $1 \mu\text{g}$ および $5 \mu\text{g}$ cGAS Δ N の両方で、 $1:500$ および $1:2500$ 希釈に関して $p < 0.05$) (図 12C)。この低減したOVA特異的IgG1応答を、特注の脂質ミックスを使用して調製したcGAS Δ N LNPで処置したマウスにおいても測定した (GFP LNP に対する $5 \mu\text{g}$ cGAS Δ N において、 $1:500$ 、 $1:2500$ 、および $1:12500$ 希釈に関して $p < 0.05$) (図 12D)。IgG2aはより強い炎症性Th1応答と関連することから、IgG2aレベルも評価した。重要なことに、GenVoy製剤 (図 12E) または特注の脂質ミックス (図 12F) を使用して調製したOVAおよびcGAS Δ N LNPで処置したマウスは、OVA + GFP処置マウスと比較して、OVA特異的IgG2aにおいて有意な変化を示さなかった。

10

【0123】

まとめると、インビボ免疫実験から集められたデータは、抗原LNPと組み合わせたcGAS Δ N LNPでのマウスの処置が、抗原特異的適応免疫応答を有意に改善することを示す。cGAS Δ N LNPを受容するマウスは、抗体応答を犠牲にすることなく、抗原特異的T細胞数の有意な増加を示した。実際に、全抗原特異的IgGレベルに影響を与えることのない抗原特異的IgG1の減少は、Th1関連免疫応答への偏りを示す。これは、防御的免疫応答 (これは免疫治療のために必要とされる) を誘導することにおいて有益である。合わせると、これらのデータは、標準的な抗原LNP調製物への低用量のcGAS Δ N LNPの添加が、LNPワクチンに対して遙かにより強力な免疫応答を生じ得ることを示唆する。

20

【化4】

配列

配列番号 1

>ヒト

```
PGASKLRVLEKLRSLRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSEFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKE
RKIIKEEINDIKDQDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVITYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF
```

30

配列番号 2

>M._MULATTA

```
PGARKLRVLEKLRSLSHQDISKAQVNVGVGHLLRLKCEPEFGGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKNPLSLFLEDEILSASKMLSKE
RKIIKEEINNIDQDVIMKRKRPGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSPASTQEGRLAIKNWLSAKVRQ
KVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMCCRKDCLKLMKYLL
LEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVITYFLECLRTEQLKNYFIP
GFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF
```

配列番号 3

>P._ANUBIS

```
PGARKLRVLEKLRSLSHQDISKAQVNVGVGHLLRLKCESEFEGVEQLH
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEDEILSASKMLSQF
RKIIKEEINNIDQDVIMKRKRGGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSPASTQEGRLAIKNWLSAKVRQ
QLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMCCRKDCLKLMKYLLLEQL
KEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNL
FSSNLIDKSSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF
```

40

配列番号 4

>N._LEUCOGENYS

```
PGARKLRVLEKLRSLRQEISEAQVNVGVGHLLRLKQCDSEFRGVGLLRTGSYYEH
```

50

【化 5】

VKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSFRKIIKEE
INNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRRLRLKP
FYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKTKTCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKD
KKHLDDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDPKNLGFCDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLI
DKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFG

配列番号 5

>H_LAR

PGARKLPAVLEKLKLSRQ

EICEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTG
AYYFVKFKRNPKENPLCQFLEGEILSASKMLSFRKIIKEEINNIKDTDVILKRKRGGSPAVTLLISEKI
SVDITLALESKSSSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRLRLKPFYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKE
ILNNHGETKTCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKHLDDKFSSYHVKTAFFHVCTENPKDSQW
DPKDLGLCFDKCVIYFLQCLSTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFGK

10

配列番号 6

>P._ABELII

PGASKLRVLEKLKLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRT

GSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSFR
KIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQ
LRLKPFYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLK
ERFKDKHLDDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLF
SSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

20

配列番号 7

>P._TROGLODYTES

PGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN

TGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSFR
RKIIKEEINNIKDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQ
RLKPFYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCCEIKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLK
KFKDKHLDDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRIEKLNYFIPEFNLF
SDLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

配列番号 8

>G._GORILLA

PGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLN

TGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSFR
RKIIKEEINNIKDTDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRR
QLRLKPFYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KERFKDKHLDDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKQLGLCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFIPEFNLF
FSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

30

配列番号 9

>CGASAN_コンセンサス

PGAXKLXAVLEKLXLSXXXIXXAAXXVXXVXXHLLXRLXXXXXXFXGVXXLX

TGSSYYEHVKISAPNEFDVMFKLXVPRIQLEEYSXTXAYYFVKFKRNPXXNPLXXFLEXEILSASKMLSXF
RKIIKEEINXIXXXXXXDVIXKRKRXGSPAVTLLIXXXISVDITLALEXXXSWPASTQEGLXIXXWLS
XKVRXQLRLKPFYLVPKHAKGNGFQEETWRLSFSHIEKEILXNHGXXKTCCEXKXXKCCRKDCLKLMKY
LLEQLKEXFKDKHLDDKFSSYHVKTAFFHXCTXNPXDSQWDXKXLGXCFDXCVTXFLXCLXXEXLXNYFI
PXFNLFXXXLIDKXSKEFLXKQIEYERNNEXPVFXXX

40

【化 6】

配列番号 10

>ヒト CGAS_全長

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLEPVSAPILVRRDAAPGASKLRVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSA FRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKF
RKIIKEEINDIKD TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLRIQNWLSAKVRK
QLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKMKYLLLEQL
KERFKDKKHLDFSSYHVKTAF FHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLDKRSKEFLTQKIEYERNNEFPVFDEF

10

配列番号 11

>ヒト CGAS_N末端

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQE
RPPVVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGLEPVSAPILVRRDAA

配列番号 12

>THOSEA ASIGNA ウイルス T2A リボソームスキッピングペプチド

[GSG]EGRGSLLTCGDVEENPGP

配列番号 13

>ブタテシオウイルス-1 P2A リボソームスキッピングペプチド

[GSG]ATNFSLLKQAGDVEENPGP

20

配列番号 14

>ウマ鼻炎 A ウイルス E2A リボソームスキッピングペプチド

[GSG]QCTNYALLKLAGDVESNPGP

配列番号 15

>口蹄疫ウイルス F2A リボソームスキッピングペプチド

[GSG]VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

配列番号 16

>GALLUS GALLUS オボアルブミンペプチド

SIINFEKL

30

配列番号 17

>合成 CGASΔN

ATGCCCCGGCGCCAGCAAGCTGAGGGCCGTGCTGGAGAAGCTGAAGCTGAGCAGGGACGACATCA
GCACCGCCGCGCGCATGGTGAAGGGCGTGGTGGACCACCTGCTGCTGAGGCTGAAGTGCGACAG
CGCCTTCAGGGGCGTGGGCCTGCTGAACACCGGCAGCTACTACGAGCACGTGAAGATCAGCGCC
CCCAACGAGTTCGACGTGATGTTCAAGCTGGAGGTGCCAGGATCCAGCTGGAGGAGTACAGCA
ACACCAGGGCCTACTACTTTCGTGAAGTTCAAGAGGAACCCCAAGGAGAACCCCTGAGCCAGTT
CCTGGAGGGGCGAGATCCTGAGCGCCAGCAAGATGCTGAGCAAGTTCAGGAAGATCATCAAGGAG
GAGATCAACGACATCAAGGACACCGACGTGATCATGAAGAGGAAGAGGGGCGGCAGCCCCGCCG
TGACCCTGCTGATCAGCGAGAAGATCAGCGTGGACATCACCCCTGGCCCTGGAGAGCAAGAGCAG
CTGGCCCCGCCAGCACCCAGGAGGGCCTGAGGATCCAGAACTGGCTGAGCGCCAAGGTGAGGAAG

40

【化 7】

CAGCTGAGGCTGAAGCCCTTCTACCTGGTGCCCAAGCACGCCAAGGAGGGCAACGGCTTCCAGG
AGGAGACCTGGAGGCTGAGCTTCAGCCACATCGAGAAGGAGATCCTGAACAACCACGGCAAGAG
CAAGACCTGCTGCGAGAACAAGGAGGAGAAGTGCTGCAGGAAGGACTGCCTGAAGCTGATGAAG
TACCTGCTGGAGCAGCTGAAGGAGAGGTTCAAGGACAAGAAGCACCTGGACAAGTTCAGCAGCT
ACCACGTGAAGACCGCCTTCTTCCACGTGTGCACCCAGAACCCCCAGGACAGCCAGTGGGACAG
GAAGGACCTGGGCCTGTGCTTCGACAACCTGCGTGACCTACTTCCTGCAGTGCCTGAGGACCGAG
AAGCTGGAGAACTACTTTCATCCCCGAGTTCAACCTGTTTCAGCAGCAACCTGATCGACAAGAGGA
GCAAGGAGTTCCTGACCAAGCAGATCGAGTACGAGAGGAACAACGAGTTCCTCGTGTTCGACGA
GTTCTAATGA

10

【図面】

【図 1 - 1】

FIG. 1

M_mulatta PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRK-CEPEFGGVEQLHTGSYYEHV 59
P_anubis PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRK-CESEFEGVEQLHTGSYYEHV 59
N_leucogenys PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRKQKCDSEFRGVLRTGSYYEHV 60
H_lar PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRKQKCDSEFRGVLRTGSYYEHV 60
P_abelii PGASKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRKQKYNSEFRGVLRTGSYYEHV 60
P_troglodytes PGASKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRK-CDSEFRGVLRTGSYYEHV 59
G_gorilla PGASKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRK-CDSEFRGVLRTGSYYEHV 59
H_sapiens PGASKLRAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRK-CDSEFRGVLRTGSYYEHV 59
*****;*:*.**:**.*:***.*****
PGAxKLxAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRKQKYNSEFRGVLRTGSYYEHV
コンセンサス PGAxKLxAVLEKLRSLHQDISKAARVNVGVHLLRLRKQKYNSEFRGVLRTGSYYEHV
M_mulatta KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 119
P_anubis KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 119
N_leucogenys KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 120
H_lar KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 120
P_abelii KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 120
P_troglodytes KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 119
G_gorilla KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 119
H_sapiens KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS 119
*****;*:*.**:**.*:***.*****
KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS
コンセンサス KISAPNEFDVMFKLVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLS
M_mulatta KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 178
P_anubis KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 174
N_leucogenys KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 176
H_lar KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 176
P_abelii KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 175
P_troglodytes KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 172
G_gorilla KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 174
H_sapiens KFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS 174
*****;*:*.**:**.*:***.*****
xFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS
コンセンサス xFRKIIKEEINNKKDQVQDADVMKRRKGGSPAVTLLISEKISVDITLALSK-SSWPAS
M_mulatta TQEGLAIKNWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 238
P_anubis TQEGLAIKNWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 234
N_leucogenys TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 236
H_lar TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 236
P_abelii TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 235
P_troglodytes TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 232
G_gorilla TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 234
H_sapiens TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK 234
*****;*:*.**:**.*:***.*****
TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK
コンセンサス TQEGLPIDKWLAKVRQRLKPFYLVPHKAKEGNGFQETWRLSFSHIEKEILNNHGK

【図 1 - 2】

FIG. 1 続き

M_mulatta KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 298
P_anubis KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 294
N_leucogenys KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 296
H_lar KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 296
P_abelii KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 295
P_troglodytes KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 292
G_gorilla KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 294
H_sapiens KTCCENKEMKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS 294
*****;*:*.**:**.*:***.*****
KTCCExKxxKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS
コンセンサス KTCCExKxxKCCCKDCLKMLKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVHTAFFHVTCTNPQDS
M_mulatta QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 358
P_anubis QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 354
N_leucogenys QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 356
H_lar QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 356
P_abelii QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 355
P_troglodytes QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 352
G_gorilla QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 354
H_sapiens QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN 354
*****;*:*.**:**.*:***.*****
QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN
コンセンサス QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTKLENYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN
M_mulatta NEFFPVFGEF 367
P_anubis NEFFPVFGEF 363
N_leucogenys NEFFPVFGEF 363
H_lar NEFFPVFGEF 365
P_abelii NEFFPVFGEF 364
P_troglodytes NEFFPVFGEF 361
G_gorilla NEFFPVFGEF 363
H_sapiens NEFFPVFGEF 363
*****;*:*.**:**.*:***.*****
NEFFPVFGEF
コンセンサス NEFFPVFGEF

20

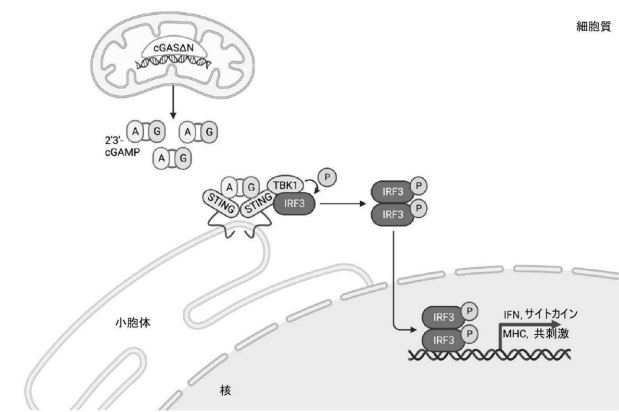
30

40

50

【 図 2 】

FIG. 2



【 図 3 A - C 】

FIG. 3A

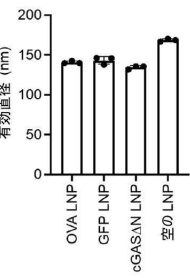


FIG. 3B

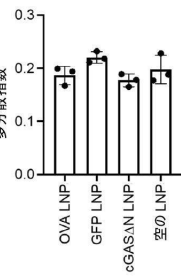
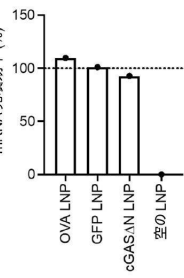


FIG. 3C



【 図 4 A - C 】

FIG. 4A

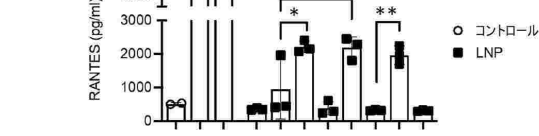


FIG. 4B

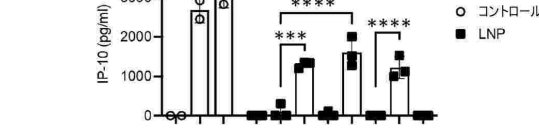
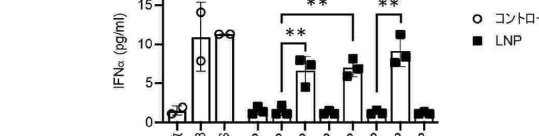


FIG. 4C



【 図 5 A - F 】

○ コントロール ■ LNP

FIG. 5A

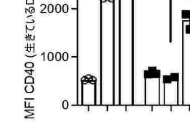


FIG. 5B

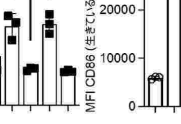


FIG. 5C

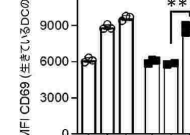


FIG. 5D

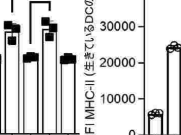


FIG. 5E

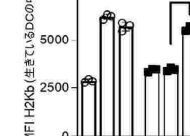
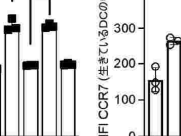


FIG. 5F



10

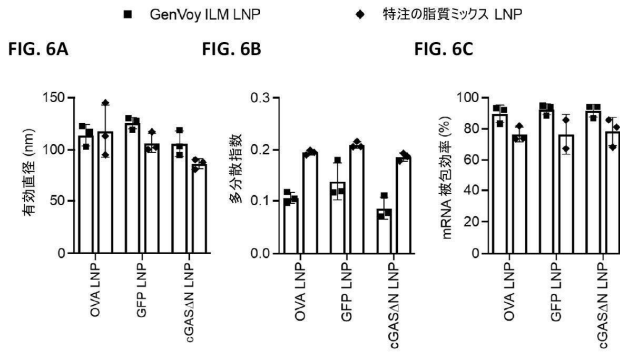
20

30

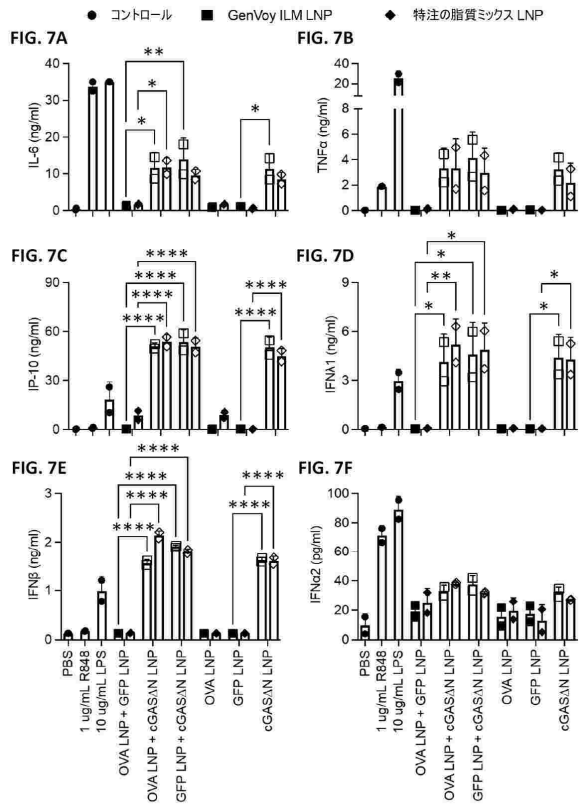
40

50

【図 6 A - C】



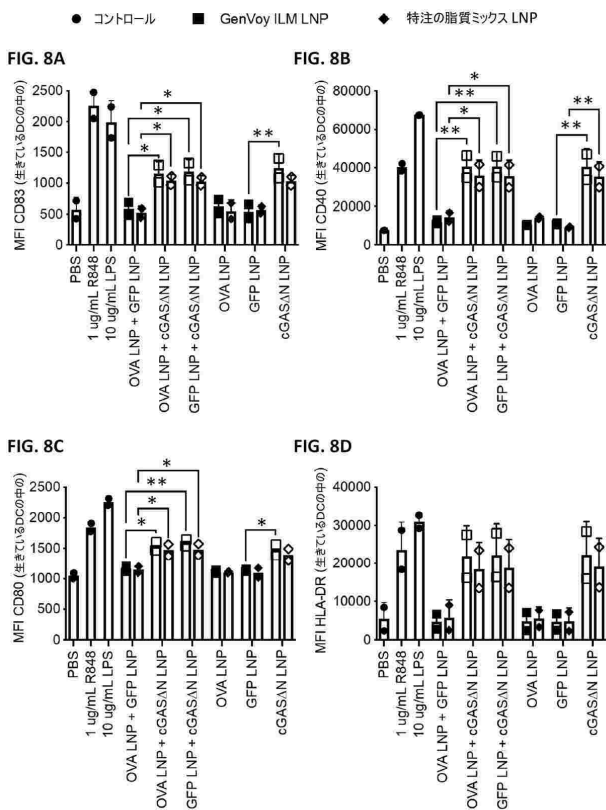
【図 7 A - F】



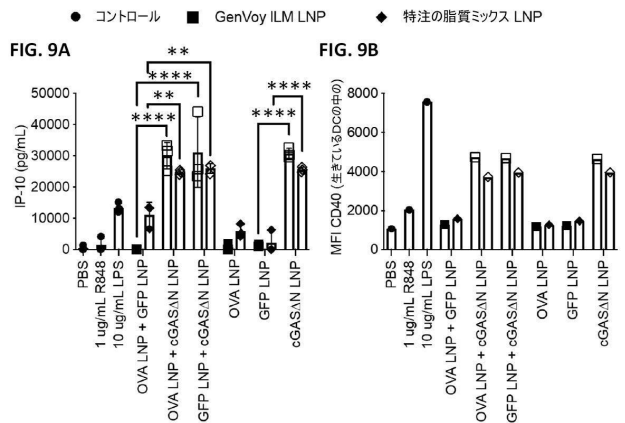
10

20

【図 8 A - D】



【図 9 A - B】

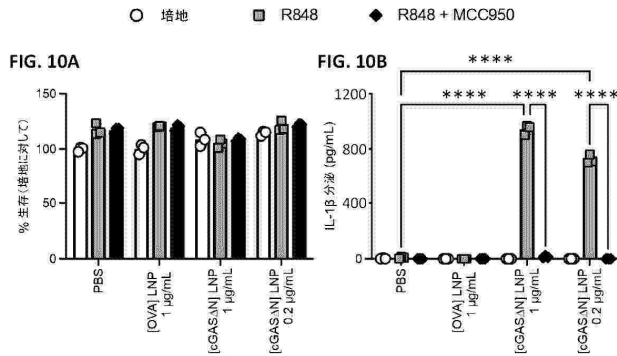


30

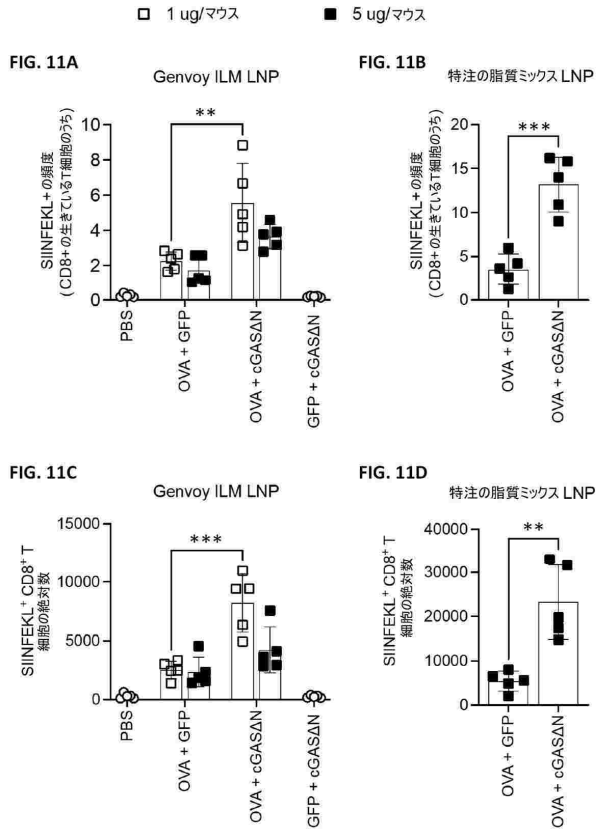
40

50

【図 10 A - B】



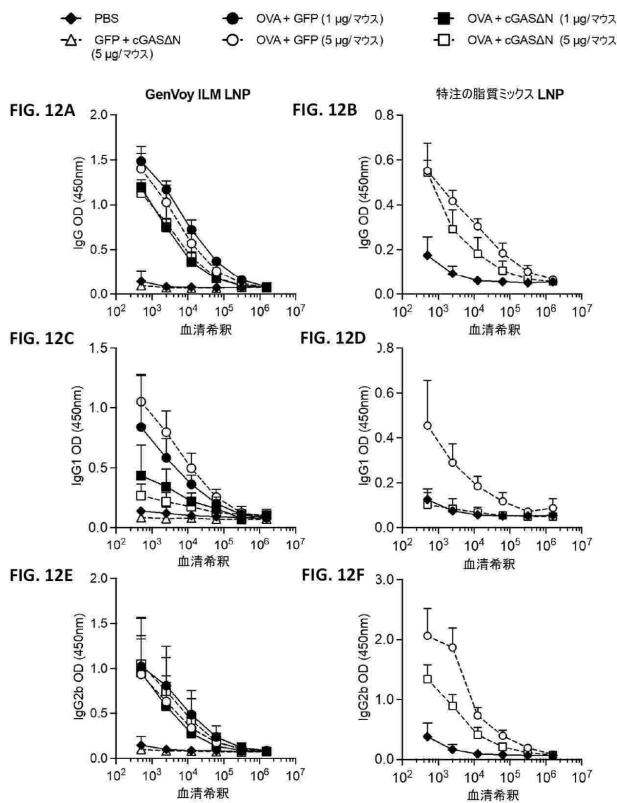
【図 11 A - D】



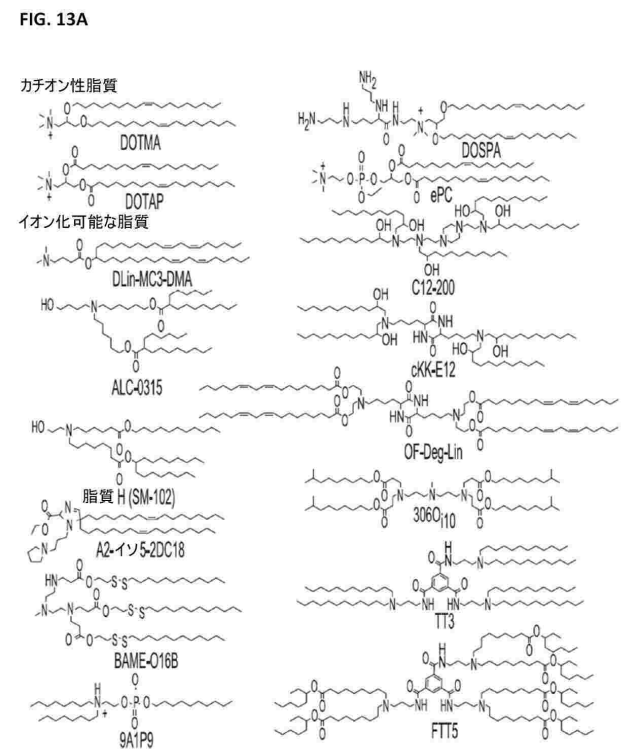
10

20

【図 12 A - F】



【図 13 A】



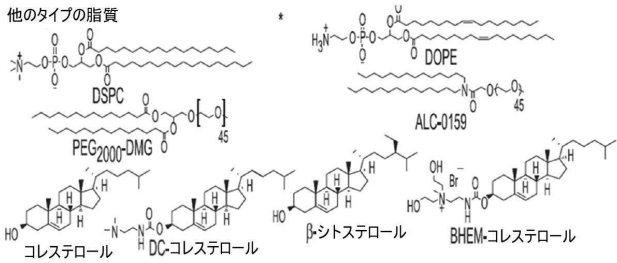
30

40

50

【 図 1 3 B 】

FIG. 13B



10

【 配 列 表 】

2 0 2 5 5 1 6 6 3 7 0 0 0 0 1 . x m l

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/00	A61K39/39
	C12N9/12	C12N15/88
ADD.	A61P37/00	A61P37/04
	C12N9/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/006038 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; KRANZUSCH PHILIP J [US]) 2 January 2020 (2020-01-02) see opinion for details -----	1-68
Y	WO 2016/170176 A1 (CUREVAC AG [DE]) 27 October 2016 (2016-10-27) see opinion for details -----	1-68
Y	WO 2021/250263 A1 (ETHERNA IMMUNOTHERAPIES NV [BE]) 16 December 2021 (2021-12-16) see opinion for details -----	1-68
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 October 2023		Date of mailing of the international search report 20/10/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Landré, Julien

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

International application No.

PCT/US2023/066974

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/066974

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020006038 A1	02-01-2020	AU 2019294632 A1	04-02-2021
		CA 3104515 A1	02-01-2020
		EP 3814487 A1	05-05-2021
		US 2021324351 A1	21-10-2021
		WO 2020006038 A1	02-01-2020
WO 2016170176 A1	27-10-2016	AU 2016251687 A1	24-08-2017
		AU 2020220157 A1	10-09-2020
		BR 112017018368 A2	17-04-2018
		CA 2975333 A1	27-10-2016
		CN 108064176 A	22-05-2018
		DK 3173092 T3	05-08-2019
		DK 3326641 T3	30-09-2019
		EP 3173092 A2	31-05-2017
		EP 3326641 A1	30-05-2018
		EP 3603661 A2	05-02-2020
		ES 2746340 T3	05-03-2020
		ES 2753259 T3	07-04-2020
		JP 6912384 B2	04-08-2021
		JP 2018517674 A	05-07-2018
		JP 2021178827 A	18-11-2021
		KR 20170138548 A	15-12-2017
		RU 2017140468 A	22-05-2019
		SG 10201907164S A	27-09-2019
		SG 11201707832R A	29-11-2017
		TW 201704250 A	01-02-2017
		US 2016331844 A1	17-11-2016
		US 2018207295 A1	26-07-2018
		US 2019054189 A1	21-02-2019
		US 2019151469 A1	23-05-2019
		WO 2016170176 A1	27-10-2016
WO 2021250263 A1	16-12-2021	AU 2021286911 A1	09-02-2023
		BR 112022025217 A2	03-01-2023
		CA 3186776 A1	16-12-2021
		CN 116133640 A	16-05-2023
		EP 4164596 A1	19-04-2023
		IL 298765 A	01-02-2023
		KR 20230050313 A	14-04-2023
		WO 2021250263 A1	16-12-2021

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)

4 H 0 4 5

A 6 1 K 47/34 (2017.01)
 A 6 1 K 47/28 (2006.01)
 A 6 1 K 47/22 (2006.01)
 A 6 1 K 47/12 (2006.01)
 A 6 1 K 47/26 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4745(2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/12 (2006.01)
 A 6 1 K 39/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/002(2006.01)
 A 6 1 K 39/215(2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 31/10 (2006.01)
 A 6 1 P 31/12 (2006.01)
 A 6 1 P 33/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0784(2010.01)
 C 1 2 N 15/54 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/50 (2006.01)
 C 0 7 K 14/56 (2006.01)
 C 0 7 K 14/715 (2006.01)

A 6 1 K 47/34
 A 6 1 K 47/28
 A 6 1 K 47/22
 A 6 1 K 47/12
 A 6 1 K 47/26
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 31/4745
 A 6 1 K 39/00 H
 A 6 1 K 39/12
 A 6 1 K 39/02
 A 6 1 K 39/002
 A 6 1 K 39/00 K
 A 6 1 K 39/215
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 33/02
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 43/00 1 0 7
 A 6 1 P 43/00 1 7 1
 C 1 2 N 5/0784
 C 1 2 N 15/54 Z N A
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/50
 C 0 7 K 14/56
 C 0 7 K 14/715

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,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,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゴセリン, エミリー

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

(72)発明者 ジヴァキ, ダニア

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

(72)発明者 チャウ, ジョナサン

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

(72)発明者 ニキフォロフ, アナスタシア

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

コーポレイテッド 気付
(72)発明者 セングプタ, デブラブ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付
F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA94X AA94Y AB01 AC14 BA05 CA24 CA44
4C076 AA31 CC26 DD43 DD49 DD51 DD59 DD63 DD67 DD70 EE23
4C084 AA13 AA19 MA41 NA05 NA10 NA14 ZB091 ZB211 ZB221 ZC411
ZC611
4C085 AA02 BA02 BA07 BA49 BA51 BA71 DD62 EE03 EE05
4C086 AA01 CB05 MA03 MA05 NA05 ZC41
4H045 AA10 AA30 CA01 CA40 DA01 DA16 DA50 EA20 EA29