

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-518399

(P2022-518399A)

(43)公表日 令和4年3月15日(2022.3.15)

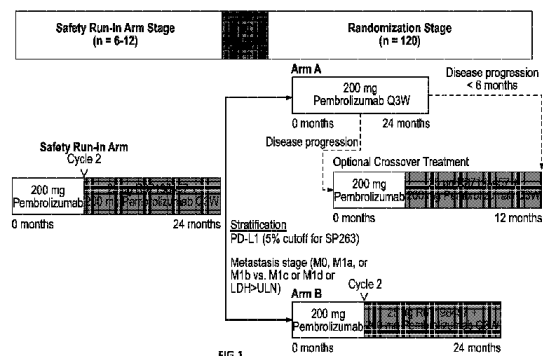
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	4 C 0 7 6	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	4 C 0 8 6
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全99頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-540124(P2021-540124)	(71)出願人	509012625		
(86)(22)出願日	令和2年1月13日(2020.1.13)		ジェネンテック, インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年9月8日(2021.9.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/013353		サンフランシスコ ディーエヌエー		
(87)国際公開番号	WO2020/150152		ウェイ 1		
(87)国際公開日	令和2年7月23日(2020.7.23)	(71)出願人	519258736		
(31)優先権主張番号	62/792,387		バイオエヌテック エスエー		
(32)優先日	平成31年1月14日(2019.1.14)		ドイツ国 5 5 1 3 1 マインツ, アン		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		デア ゴルトグルーベ 1 2		
(31)優先権主張番号	62/795,476	(74)代理人	110002077		
(32)優先日	平成31年1月22日(2019.1.22)		園田・小林特許業務法人		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ミュラー, ラルス		
(31)優先権主張番号	62/887,410		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0		
			8 0, サウス サンフランシスコ, デ		
			ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 PD-1 軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを用いてがんを処置する方法

(57)【要約】

本開示は、個体においてがんを処置するための方法、使用及びキットを提供する。該方法は、個体にPD-1 軸結合アンタゴニスト（抗PD-1 抗体又は抗PD-L 1 抗体等）及びRNAワクチン（例えば、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1 種以上のネオエピトープをコードする1 種以上のポリヌクレオチドを含む個別化がんワクチン）を投与することを含む。RNA分子（例えば、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1 種以上のネオエピトープをコードする1 種以上のポリヌクレオチドを含む個別化RNAがんワクチン）と並んで、RNAワクチンの製造又は使用に有用なDNA分子及び方法を、本明細書において更に提供する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体においてがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法であって、有効量の P D - 1 軸結合アンタゴニストと R N A ワクチンとを前記個体に投与することを含み、前記 R N A ワクチンが、前記個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する 1 種以上のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、方法。

【請求項 2】

前記 P D - 1 軸結合アンタゴニストが、P D - 1 結合アンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 P D - 1 結合アンタゴニストが、抗 P D - 1 抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブ又はペンブロリズマブである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗 P D - 1 抗体を前記個体に約 2 0 0 m g の用量で投与する、請求項 3 又は請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 P D - 1 軸結合アンタゴニストが、P D - L 1 結合アンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 P D - L 1 結合アンタゴニストが、抗 P D - L 1 抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗 P D - L 1 抗体が、アベルマブ又はデュルバルマブである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗 P D - L 1 抗体が、以下：

(a) G F T F S D S W I H のアミノ酸配列（配列番号 1）を含む H V R - H 1、A W I S P Y G G S T Y Y A D S V K G のアミノ酸配列（配列番号 2）を含む H V R - 2、及びアミノ酸 R H W P G G F D Y を含む H V R - 3（配列番号 3）を含む、重鎖可変領域（V H）と、

(b) R A S Q D V S T A V A のアミノ酸配列（配列番号 4）を含む H V R - L 1、S A S F L Y S のアミノ酸配列を含む H V R - L 2（配列番号 5）、及び Q Q Y L Y H P A T のアミノ酸配列を含む H V R - L 3（配列番号 6）を含む、軽鎖可変領域（V L）と、を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗 P D - L 1 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V H）と、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）と、を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗 P D - L 1 抗体が、アテゾリズマブである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗 P D - L 1 抗体を前記個体に約 1 2 0 0 m g の用量で投与する、請求項 7 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 P D - 1 軸結合アンタゴニストを、2 1 日間又は 3 週間の間隔で前記個体に投与する、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 R N A ワクチンが、前記腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する 1 0

10

20

30

40

50

～ 20 個のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 RNA ワクチンが、リポプレックスナノ粒子又はリポソームに製剤化される、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 RNA ワクチンが、約 15 μ g、約 25 μ g、約 38 μ g、約 50 μ g 又は約 100 μ g の用量で前記個体に投与される、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 RNA ワクチンが、21 日間又は 3 週間の間隔で前記個体に投与される、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト及び前記 RNA ワクチンが、8 回の 21 日間サイクルで前記個体に投与され、前記 RNA ワクチンが、サイクル 2 の 1、8 及び 15 日目、並びにサイクル 3 ～ 7 の 1 日目に前記個体に投与される、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、サイクル 1 ～ 8 の 1 日目に前記個体に投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト及び前記 RNA ワクチンが、サイクル 8 の後に前記個体に更に投与される、請求項 18 又は請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンが、17 回の追加の 21 日間のサイクルで前記個体に更に投与され、前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、サイクル 13 ～ 29 の 1 日目に前記個体に投与され、前記 RNA ワクチンが、サイクル 13、21、及び 29 の 1 日目に前記個体に投与される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト及び前記 RNA ワクチンが、8 回の 21 日間サイクルで前記個体に投与され、前記 PD-1 軸結合アンタゴニストがペンブロリズマブであり、サイクル 1 ～ 8 の 1 日目に約 200 mg の用量で前記個体に投与され、前記 RNA ワクチンが、サイクル 2 の 1、8 及び 15 日目、並びにサイクル 3 ～ 7 の 1 日目に約 25 μ g の用量で前記個体に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 RNA ワクチンが、サイクル 2 の 1 日目に約 25 μ g、サイクル 2 の 8 日目に約 25 μ g、サイクル 2 の 15 日目に約 25 μ g、及びサイクル 3 ～ 7 のそれぞれの 1 日目に約 25 μ g の用量で前記個体に投与される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト及び前記 RNA ワクチンが静脈内投与される、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記個体が、ヒトである、請求項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記がんが、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記がんがメラノーマである、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記メラノーマが、皮膚メラノーマ又は粘膜メラノーマである、請求項 27 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 29】

前記メラノーマが、眼メラノーマ又は肢端メラノーマではない、請求項 27 に記載の方法

。

【請求項 30】

前記メラノーマが、転移性メラノーマ又は切除不能な局所進行性メラノーマである、請求項 27 ～ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記メラノーマが、ステージ I V メラノーマである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記メラノーマが、ステージ I I I C メラノーマ又はステージ I I I D メラノーマである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記メラノーマが、事前に処置されていない進行性メラノーマである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 34】

前記方法が、無増悪生存期間（PFS）の改善をもたらす、請求項 1 ～ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記方法が、客観的奏効率（ORR）の増加をもたらす、請求項 1 ～ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

請求項 1 ～ 35 のいずれか一項に記載の方法に従ってがんを有する個体を処置するための RNA ワクチンと組み合わせて使用するための PD-1 軸結合アンタゴニストを含む、キット。

【請求項 37】

がんを有するヒト個体を処置する方法で使用するための PD-1 軸結合アンタゴニストであって、前記方法が、RNA ワクチンと組み合わせて有効量の前記 PD-1 軸結合アンタゴニストを前記個体に投与することを含み、前記 RNA ワクチンが、前記個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する 1 種以上のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、PD-1 軸結合アンタゴニスト。

【請求項 38】

がんを有するヒト個体を処置する方法で使用するための RNA ワクチンであって、前記方法が、PD-1 軸結合アンタゴニストと組み合わせて有効量の前記 RNA ワクチンを前記個体に投与することを含み、前記 RNA ワクチンが、前記個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する 1 種以上のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む、RNA ワクチン。

【請求項 39】

5' → 3' 方向に、

(1) 5' キャップ；

(2) 5' 非翻訳領域（UTR）；

(3) 分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

(4) 主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列；

(5) 3' UTR であって、

(a) Split (AES) mRNA のアミノ末端エンハンサーの 3' 非翻訳領域又はその断片；及び

(b) ミトコンドリアにコードされた 12S RNA の非コード RNA 又はその断片、を含む 3' UTR；並びに

(6) ポリ（A）配列、

10

20

30

40

50

を含む、RNA分子。

【請求項40】

少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、前記少なくとも1種のネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項39に記載のRNA分子。

【請求項41】

5'→3'方向に、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、

10

前記アミノ酸リンカー及び前記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成し、

前記第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成する前記ポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項39に記載のRNA分子。

【請求項42】

前記アミノ酸リンカーが、配列GGSGGGSGG（配列番号39）を含む、請求項41に記載のRNA分子。

【請求項43】

20

前記アミノ酸リンカーをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCGGAAGGC（配列番号37）を含む、請求項41に記載のRNA分子。

【請求項44】

5'→3'方向に、少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールを更に含み、前記少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールが、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含み、

前記第2のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成する前記ポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、前記第1のリンカー-ネオエピトープモジュールの前記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にあり、

30

前記第1のリンカー-エピトープモジュールの前記ネオエピトープが、前記第2のリンカー-エピトープモジュールの前記ネオエピトープとは異なる、請求項41～43のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項45】

前記RNA分子が5個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記5個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項44に記載のRNA分子。

【請求項46】

40

前記RNA分子が10個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記10個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項44に記載のRNA分子。

【請求項47】

前記RNA分子が20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記20個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項44に記載のRNA分子。

【請求項48】

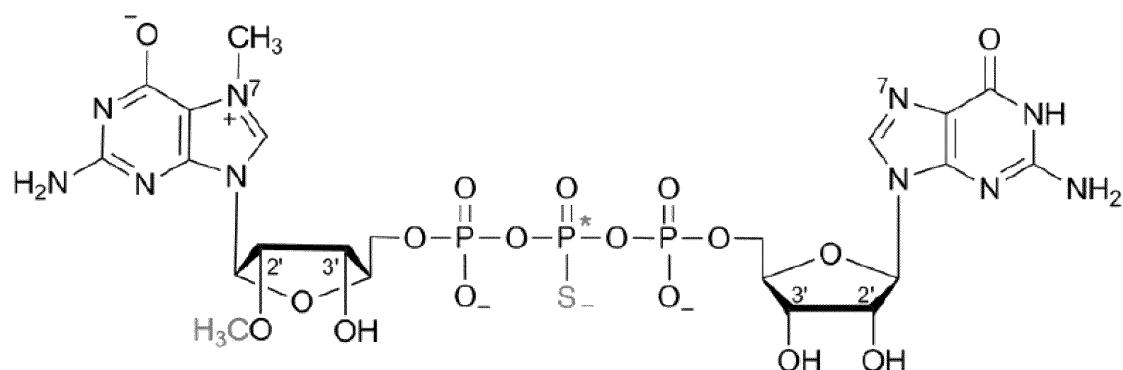
アミノ酸リンカーをコードする第2のポリヌクレオチド配列を更に含み、前記アミノ酸リンカーをコードする前記第2のポリヌクレオチド配列が、3'方向に、最も遠位にある前

50

記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項40～47のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項49】

前記5'キャップが、以下の構造：



10

のD1ジアステレオ異性体を含む、請求項39～48のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項50】

前記5'UTRが、配列UUCUUCUGGUC C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C（配列番号23）を含む、請求項39～49のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項51】

前記5'UTRが、配列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUC C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C（配列番号21）を含む、請求項39～49のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項52】

前記分泌シグナルペプチドが、アミノ酸配列MRVMAPRTLILLLSGALLALETWAGS（配列番号27）を含む、請求項39～51のいずれか一項に記載のRNA分子。

30

【請求項53】

前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列AUGAGAGUGAUGGCC C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C（配列番号25）を含む、請求項39～51のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項54】

前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部が、アミノ酸配列IVGIVAGLAVLAVVVI GAVVATVMCR RKSSGGK GGSYSQAASSDSAQGS DVS LTA（配列番号30）を含む、請求項39～53のいずれか一項に記載のRNA分子。

40

【請求項55】

前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列AUCGUGGGGA AUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCGCCAGCUCUGAUAGCGCC C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A C U G A C A G C C（配列番号28）を含む、請求項39～53のいずれか一項に記載のRNA分子。

【請求項56】

50

前記 A E S mRNA の前記 3' 非翻訳領域が、配列 C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G C C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C (配列番号 33) を含む、請求項 39～55 のいずれか一項に記載の RNA 分子。

【請求項 57】

前記ミトコンドリアにコードされる 12S RNA の前記非コード RNA が、配列 C A A G C A C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G (配列番号 35) を含む、請求項 39～56 のいずれか一項に記載の RNA 分子。

10

【請求項 58】

前記 3' UTR が、配列 C U C G A G C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G C C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C C A A G C A C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G A G A C C U G G U C C A G A G U C G C U A G C C G C G U C G C U (配列番号 31) を含む、請求項 39～57 のいずれか一項に記載の RNA 分子。

20

【請求項 59】

前記ポリ(A)配列が 120 個のアデニンヌクレオチドを含む、請求項 39～58 のいずれか一項に記載の RNA 分子。

【請求項 60】

5'→3' 方向に、ポリヌクレオチド配列 G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C A U G A G A G U G A U G G C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C (配列番号 19) ; 及びポリヌクレオチド配列 A U C G U G G G A A U U G U G G C A G G A C U G G C A G U G C U G G C C G U G G U G G U G A U C G G A G C C G U G G U G G C U A C C G U G A U G U G C A G A C G G A A G U C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C U A C A G C C A G G C C G C C A G C U C U G A U A G C G C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A C U G A C A G C C U A G U A A C U C G A G C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G C C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C C A A A G C A C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G A G A C C U G G U C C A G A G U C G C U A G C C G C G U C G C U (配列番号 20) を含む、RNA 分子。

30

40

【請求項 61】

配列番号 19 及び配列番号 20 の配列の間に、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含む、請求項 60 に記載の RNA 分子。

【請求項 62】

配列番号 19 及び配列番号 20 の配列の間の 5'→3' 方向に、

(a) 少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールであって、アミノ酸リンカ

50

ーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む、前記少なくとも第1のリンカー-ネオエピトープモジュールと、

(b) アミノ酸リンカーをコードする第2のポリヌクレオチド配列とを更に含む、請求項60に記載のRNA分子。

【請求項63】

5個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記5個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項62に記載のRNA分子。

【請求項64】

10個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記10個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項62に記載のRNA分子。

10

【請求項65】

20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記20個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項62に記載のRNA分子。

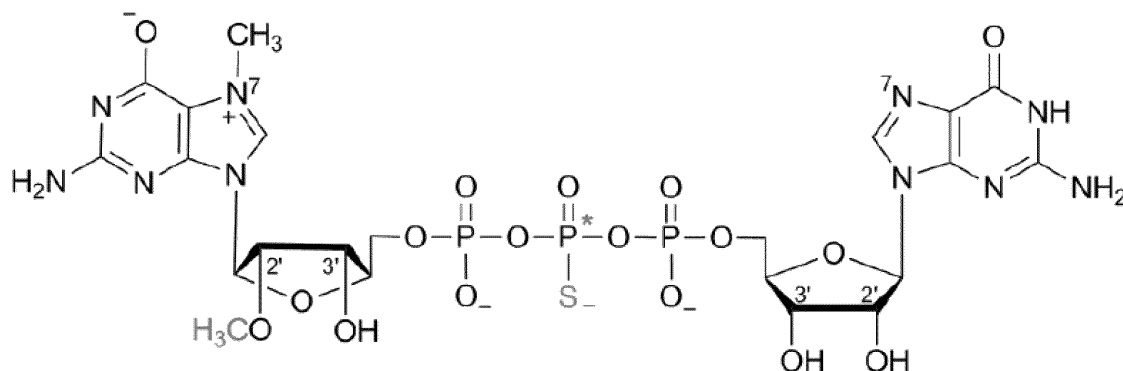
【請求項66】

5'キャップを更に含み、前記5'キャップが、配列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCUCGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(配列番号19)の5'側に位置する、請求項60～65のいずれか一項に記載のRNA分子。

20

【請求項67】

前記5'キャップが、以下の構造：



30

のD1ジステレオ異性体を含む、請求項66に記載のRNA分子。

【請求項68】

請求項39～67のいずれか一項に記載のRNA分子及び1種以上の脂質を含むリポソームであって、前記1種以上の脂質が、前記RNA分子をカプセル化する多層構造を形成する、リポソーム。

40

【請求項69】

前記1種以上の脂質が、少なくとも1種のカチオン性脂質及び少なくとも1種のヘルパー脂質を含む、請求項68に記載のリポソーム。

【請求項70】

前記1種以上の脂質が、(R)-N,N,N-トリメチル-2,3-ジオレイルオキシ-1-プロパンアミニウムクロリド(DOTMA)及び1,2-ジオレイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)を含む、請求項68に記載のリポソーム。

【請求項71】

生理学的pHにおいて、前記リポソームの正電荷対負電荷の全電荷比が1.3:2(0.

50

65) である、請求項70に記載のリボソーム。

【請求項72】

個体においてがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法であって、有効量の請求項39～67のいずれか一項に記載のRNA分子又は請求項68～71のいずれか一項に記載のリボソームを前記個体に投与することを含む方法。

【請求項73】

前記RNA分子が、前記個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記個体にPD-1軸結合アンタゴニストを投与することを更に含む、請求項72又は請求項73に記載の方法。

【請求項75】

前記がんが、メラノーマ、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される、請求項72～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項76】

個体においてがんを処置するか、又はがんの進行を遅延させる方法において使用するための、請求項39～67のいずれか一項に記載のRNA分子又は請求項68～71のいずれか一項に記載のリボソーム。

【請求項77】

5'→3'方向に、

- (1) 5'非翻訳領域(UTR)をコードするポリヌクレオチド配列；
- (2) 分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；
- (3) 主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列；
- (4) 3'UTRをコードするポリヌクレオチド配列であって、
 - (a) Split(AES)mRNAのアミノ末端エンハンサーの3'非翻訳領域又はその断片；及び
 - (b) ミトコンドリアにコードされた12S RNAの非コードRNA又はその断片、を含む3'UTR；並びに
- (5) ポリ(A)配列をコードするポリヌクレオチド配列、を含む、DNA分子。

【請求項78】

少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、前記少なくとも1種のネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項77に記載のDNA分子。

【請求項79】

5'→3'方向に、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、前記アミノ酸リンカー及び前記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成し、前記第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成する前記ポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項77に記載のDNA分子。

【請求項80】

前記アミノ酸リンカーが、前記配列GGSGGGGGSGG(配列番号39)を含む、請求

10

20

30

40

50

項 7 9 に記載の DNA 分子。

【請求項 8 1】

前記アミノ酸リンカーをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列 G G C G G C T C T G G A G G A G G C G G C T C C G G A G G C (配列番号 3 8) を含む、請求項 7 9 に記載の DNA 分子。

【請求項 8 2】

5' → 3' 方向に、少なくとも第 2 のリンカー-エピトープモジュールを更に含み、前記少なくとも第 2 のリンカー-エピトープモジュールが、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含み、

前記第 2 のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成する前記ポリヌクレオチド配列が、5' → 3' 方向に、前記第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールの前記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記 M H C 分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にあり、

前記第 1 のリンカー-エピトープモジュールの前記ネオエピトープが、前記第 2 のリンカー-エピトープモジュールの前記ネオエピトープとは異なる、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

【請求項 8 3】

前記 DNA 分子が、5 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 5 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 8 2 に記載の DNA 分子。

【請求項 8 4】

前記 DNA 分子が、10 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 10 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 8 2 に記載の DNA 分子。

【請求項 8 5】

前記 DNA 分子が、20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 20 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 8 2 に記載の DNA 分子。

【請求項 8 6】

アミノ酸リンカーをコードする第 2 のポリヌクレオチド配列を更に含み、前記アミノ酸リンカーをコードする前記第 2 のポリヌクレオチド配列が、3' 方向に、最も遠位にある前記ネオエピトープをコードする前記ポリヌクレオチド配列と、前記 M H C 分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列との間にある、請求項 7 8 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

【請求項 8 7】

前記 5' U T R をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列 T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G A A C C C G C C A C C (配列番号 2 4) を含む、請求項 7 7 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

【請求項 8 8】

前記 5' U T R をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列 G G C G A A C T A G T A T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G A A C C C G C C A C C (配列番号 2 2) を含む、請求項 7 7 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

【請求項 8 9】

前記分泌シグナルペプチドが、アミノ酸配列 M R V M A P R T L I L L L S G A L A L T E T W A G S (配列番号 2 7) を含む、請求項 7 7 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の DNA 分子。

【請求項 9 0】

前記分泌シグナルペプチドをコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列 A T G A G A G T G A T G G C C C C C A G A A C C C T G A T C C T G C T G C T G T C T G G C G

CCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCGGGAAGC（配列番号26）を含む、請求項77～88のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項91】

前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部が、アミノ酸配列IVGIVAGLAVLVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS DVSLTA（配列番号30）を含む、請求項77～90のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項92】

前記MHC分子の前記膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの前記少なくとも一部をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGAC
TGGCAGTGTCTGGCCGTGGTGGTGTATCGGAGCCCGTGGTGGC
TACCGTGTATGTGCAGACGGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGC
GGCAGCTACAGCCAGGCCGCGCAGCTCTGATAGCGCCCAAGG
GCAGCGACGTGTCACTGACAGCC（配列番号29）を含む、請求項77
～90のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項93】

前記AES mRNAの前記3'非翻訳領域をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、
配列CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCC
CGTCCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCA
GGTATGCTCCCACTCTCCACCTGCCCCACTCACCACTCTCTG
CTAGTTCCAGACACCTCC（配列番号34）を含む、請求項77～92のい
ずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項94】

前記ミトコンドリアにコードされる12S RNAの前記非コードRNAをコードする前
記ポリヌクレオチドが配列CAAGCACGCGAGCAATGCAGCTCAAAACG
CTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAACAGCAGTGATTAA
ACCTTTAGCAATAAACGAAGTTTAACCTAAGCTATACTAA
CCCCAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCCG（配列番号
36）を含む、請求項77～93のいずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項95】

前記3'UTRをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列CTGGTACTGCATG
CACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCCTGGGTACCC
GAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAAGGTATGCTCCCACT
CCACCTGCCCCACTCACCACTCTGTCTAGTTCCAGACACC
TCCCAAGCACGCGAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTA
GCCACACCCCCACGGGAACAGCAGTGATTAACTTTAGC
AATAAACGAAGTTTAACCTAAGCTATACTAACCCCAAGGGT
TGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCCGAGACCTGGTCCAGA
GTCGCTAGCCGCGCTCGCT（配列番号32）を含む、請求項77～94のい
ずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項96】

前記ポリ（A）配列が120個のアデニンヌクレオチドを含む、請求項77～95のい
ずれか一項に記載のDNA分子。

【請求項97】

5'→3'方向に、ポリヌクレオチド配列GGCGAAGCTAGTATTCTTCTGGT
CCCCACAGACTCAGAGAGAAACCCGCCACCATGAGAGTGAT
GGCCCCCAGAAACCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTG
GCCCTGACAGAGACATGGGCGGGAAGC（配列番号40）及びポリヌ
クレオチド配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGTCTG
GCCGTGGTGGTGTATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGT

G C A G A C G G A A G T C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C T A C A G
C C A G G C C G C C A G C T C T G A T A G C G C C C A G G G C A G C G A C G T G
T C A C T G A C A G C C T A G T A A C T C G A G C T G G T A C T G C A T G C A C
G C A A T G C T A G C T G C C C C T T T C C C G T C C T G G G T A C C C C G A G
T C T C C C C C G A C C T C G G G T C C C A G G T A T G C T C C C A C C T C C A
C C T G C C C C A C T C A C C A C C T C T G C T A G T T C C A G A C A C C T C C
C A A G C A C G C A G C A A T G C A G C T C A A A A C G C T T A G C C T A G C C
A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G T G A T T A A C C T T T A G C A A T
A A A C G A A A G T T T A A C T A A G C T A T A C T A A C C C C A G G G T T G G
T C A A T T T C G T G C C A G C C A C A C C G A G A C C T G G T C C A G A G T C
G C T A G C C G C G T C G C T (配列番号 41) を含む、DNA 分子。 10

【請求項 98】

配列番号 40 及び配列番号 41 の配列の間の 5' → 3' 方向に、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含む、請求項 97 に記載の DNA 分子。

【請求項 99】

配列番号 40 及び配列番号 41 の配列の間の 5' → 3' 方向に、

(a) 少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールであって、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む、前記少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールと、

(b) アミノ酸リンカーをコードする第 2 のポリヌクレオチド配列と、 20

を更に含む、請求項 97 に記載の DNA 分子。

【請求項 100】

5 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 5 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 99 に記載の DNA 分子。

【請求項 101】

10 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 10 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 99 に記載の DNA 分子。

【請求項 102】

20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、前記 20 個のリンカー-エピトープモジュールがそれぞれ異なるネオエピトープをコードする、請求項 99 に記載の DNA 分子。 30

【請求項 103】

RNA 分子を製造する方法であって、請求項 77 ~ 102 のいずれか一項に記載の DNA 分子を転写することを含む、方法。

【請求項 104】

個体においてがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法であって、前記個体に、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法に従って、請求項 39 ~ 67 のいずれか一項に記載の RNA 分子又は請求項 68 ~ 71 のいずれか一項に記載のリボソームを投与することを含む、方法。 40

【請求項 105】

個体においてがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法であって、前記個体に、請求項 39 ~ 67 のいずれか一項に記載の RNA 分子又は請求項 68 ~ 71 のいずれか一項に記載のリボソームを PD-1 軸結合アンタゴニストと組み合わせて投与することを含む、方法。

【請求項 106】

前記 RNA 分子又はリボソームが、約 15 µg、約 25 µg、約 38 µg、約 50 µg 又は約 100 µg の用量で前記個体に投与され、前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、約 200 mg 又は約 1200 mg の用量で前記個体に投与される、請求項 105 に記載の方法。 50

【請求項 107】

前記 RNA 分子又はリポソーム及び前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、8 回の 21 日間サイクルで前記個体に投与される、請求項 105 又は請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、ペンブロリズマブであり、サイクル 1～8 の 1 日目に約 200 mg の用量で前記個体に投与され、前記 RNA 分子又はリポソームがサイクル 2 の 1、8 及び 15 日目並びにサイクル 3～7 の 1 日目に約 25 µg の用量で前記個体に投与される、請求項 107 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 1 月 14 日に提出された米国仮出願第 62/792,387 号、2019 年 1 月 22 日に提出された第 62/795,476 号、及び 2019 年 8 月 15 日に提出された第 62/887,410 号の利益を主張するものであり、それぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

ASCII テキストファイルによる配列表の提出

【0002】

ASCII テキストファイルでの以下の提出内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態 (CRF) の配列表 (ファイル名：146392046940 SEQLIST.txt、記録日：2020 年 1 月 13 日、サイズ：41 KB)。

20

【0003】

本開示は、RNA ワクチンと組み合わせて PD-1 軸結合アンタゴニスト (例えば、抗 PD-1 抗体又は抗 PD-L1 抗体) を投与することによるがんの処置に関連する方法、使用及びキットに関する。RNA 分子 (例えば、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する 1 種以上のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む個別化 RNA がんワクチン)、並びに RNA ワクチンの製造又は使用に有用な DNA 分子及び方法を、本明細書中に更に提供する。

【背景技術】

30

【0004】

メラノーマは、メラノサイトに由来する命に関わる危険性がある形態の皮膚がんである。2012 年には、世界中でメラノーマにより約 232,000 例の新規症例及び 55,000 例の死亡があり、欧州では 100,000 例を超える新規症例及び 22,000 例の死亡があった (Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Eur J Cancer 2013; 49:1374-403)。2018 年に米国では、推定 91,270 人のメラノーマの新規診断が予測され、およそ 9,320 人の患者がこの疾患で死亡すると予想されている (American Cancer Society 2018)。更に、推定値は、メラノーマの発生率が 10～20 年毎に倍増することを示唆している (Garbe C, Leiter U. Clin Dermatol 2009; 27:3-9)。

40

【0005】

メラノーマ患者の臨床転帰は、発現時の病期に大きく依存する。最近まで、転移性メラノーマの処置選択肢は限られていた。ダカルバジン (Dacarbazine) は、標準的な第一選択処置であると考えられた、転帰は不良であり、奏効率は 5%～12%、無増悪生存期間 (PFS) の中央値は 2 ヶ月未満、全生存期間 (OS) の中央値は 6.4 ヶ月～9.1 ヶ月であった (Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. J Clin Oncol 2000; 18:158-66; Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, et al. J Clin Oncol 2006; 24:4738-45; Chapman PB, Ha

50

uschild A, Robert C, et al. N Engl J Med 2011; 364: 2507-16; Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. N Engl J Med 2011; 364: 2517-26) 。併用化学療法及びインターフェロン- α (IFN)- α 又はインターロイキン-2 (IL-2) と組み合わせた化学療法は、改善された奏効率を示すが、改善されたOSをもたらさなかった (Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, et al. J Clin Oncol 1999; 17: 2745-51; Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, et al. J Clin Oncol 2007; 25: 5426-34) 。

【0006】

共阻害受容体又はT細胞活性化を抑制する「免疫チェックポイント」を標的とする免疫療法剤は、進行したメラノーマ患者の転帰を改善した。これらの進歩にもかかわらず、多くの患者は現在の治療法に反応しないか、又はそれらの疾患のため脂肪し、より効果的な処置選択肢に対する未だ満たされていない医学的必要性を強調している。

【0007】

現在利用可能な免疫療法に関する臨床データ及び非臨床データは、単剤免疫療法が患者の大部分において完全で永続的な抗腫瘍応答を誘導する可能性は低いことを示唆している。悪性細胞による宿主免疫抑制は、複数の経路によって媒介されるため、2種以上の標的がん免疫療法 (CIT) 剤を採用する併用療法レジメンが、宿主免疫系の抗腫瘍能に完全に関与するために必要とされ得る。

【0008】

治療用ワクチンは、有望ではあるが、歴史的に期待外れとなっている。潜在的な理由の1つは、がん特異的T細胞ががん細胞への慢性曝露中に機能的に疲弊することである。

【0009】

特許出願、特許公報、及びUniProtKB/Swiss-Prot受託番号を含む、本明細書において引用される全ての参考文献は、個々の参考文献がそれぞれ参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているかのように、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0010】

がんを処置するためのPD-1軸結合アンタゴニスト (例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体) 及びRNAワクチンを含む方法、キット及び使用が本明細書で提供される。

【0011】

いくつかの態様では、個体においてがんを処置する方法であって、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを個体に投与することを含み、RNAワクチンが、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む方法が本明細書で提供される。

【0012】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体はニボルマブ又はペンブロリズマブである。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体を、個体に約200mgの用量で投与する。

【0013】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-L1結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体はアベルマブ又はデュルバルマブである。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、以下：(a) GFTFSDSWIHのアミノ酸配列 (配列番号1) を含むHVR-H1、AWISPYGGSTYYA

10

20

30

40

50

D S V K G のアミノ酸配列（配列番号 2）を含む H V R - 2、及びアミノ酸 R H W P G G F D Y（配列番号 3）を含む H V R - 3 を含む重鎖可変領域（V H）と、（b）R A S Q D V S T A V A のアミノ酸配列（配列番号 4）を含む H V R - L 1、S A S F L Y S のアミノ酸配列（配列番号 5）を含む H V R - L 2、及び Q Q Y L Y H P A T のアミノ酸配列（配列番号 6）を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変領域（V L）と、を含む。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V H）と、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）と、を含む。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体を、個体に約 1 2 0 0 m g の用量で投与する。

【0014】

上記の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニストを、21 日又は 3 週間の間隔で個体に投与する。

【0015】

いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる 10 ~ 20 個のネオエピトープをコードする 1 種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンはリポプレックスナノ粒子又はリポソームに製剤化される。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンを、約 15 μ g、約 25 μ g、約 38 μ g、約 50 μ g、又は約 100 μ g の用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンを、21 日又は 3 週間の間隔で個体に投与する。

【0016】

いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンを、8 回の 21 日間サイクルで個体に投与し、RNA ワクチンは、サイクル 2 の 1、8 及び 15 日目並びにサイクル 3 ~ 7 の 1 日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニストを、サイクル 1 ~ 8 の 1 日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンを、サイクル 8 の後に個体に更に投与する。いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンを、17 回の追加の 21 日間のサイクルで個体に更に投与し、P D - 1 軸結合アンタゴニストを、サイクル 13 ~ 29 の 1 日目に個体に投与し、RNA ワクチンを、サイクル 13、21、及び 29 の 1 日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンを、8 回の 21 日間サイクルで個体に投与し、P D - 1 軸結合アンタゴニストはペンブロリズマブであり、P D - 1 軸結合アンタゴニストを、サイクル 1 ~ 8 の 1 日目に約 200 m g の用量で個体に投与し、RNA ワクチンを、サイクル 2 の 1、8、及び 15 日目、並びにサイクル 3 ~ 7 の 1 日目に約 25 μ g の用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンを、サイクル 2 の 1 日目に約 25 μ g、サイクル 2 の 8 日目に約 25 μ g、サイクル 2 の 15 日目に約 25 μ g、及びサイクル 3 ~ 7 のそれぞれの 1 日目に約 25 μ g の用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、P D - 1 軸結合アンタゴニスト及び RNA ワクチンを、静脈内投与する。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

【0017】

いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、皮膚メラノーマ又は粘膜メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、眼メラノーマ又は肢端メラノーマではない。いくつかの実施形態では、メラノーマは、転移性（例えば、ステージ I V（再発性又は d e n o v o ステージ I V 等））又は切除不能な局所進行型（例えば、ステージ I I I C 又はステージ I I I D）のメラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、局所進行性メラノーマである。いくつかの実施形態では、上記方法は、改善された無増悪生存期間（P F S）をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、客観的奏効率（O R R）の増加をもたらす。

【0018】

いくつかの態様では、上記実施形態のいずれか1つの方法に従ってがんを有する個体を処置するためのRNAワクチンと組み合わせて使用するためのPD-1軸結合アンタゴニストを含むキット又は製造品が本明細書で提供される。

【0019】

いくつかの態様では、がんを有するヒト個体を処置する方法で使用するためのPD-1軸結合アンタゴニストが本明細書で提供され、該方法は、RNAワクチンと組み合わせて有効量のPD-1軸結合アンタゴニストを個体に投与することを含み、RNAワクチンは、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、がんを有するヒト個体を処置する方法で使用するためのRNAワクチンが本明細書で提供され、該方法は、PD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて有効量のRNAワクチンを個体に投与することを含み、RNAワクチンは、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。

10

【0020】

いくつかの態様では、5'→3'方向に、以下を含むRNA分子が本明細書で提供される：
(1) 5'キャップ；(2) 5'非翻訳領域(UTR)；(3) 分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；(4) 主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列；(5) 3'UTRであって、(a) Split(AES)mRNAのアミノ末端エンハンサーの3'非翻訳領域又はその断片；及び(b) ミトコンドリアにコードされた12S RNAの非コードRNA又はその断片を含む3'UTR；並びに(6) ポリ(A)配列。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列が、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチド(例えば、上記の(3))をコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部(例えば、上記の(4))をコードするポリヌクレオチド配列との間にある。いくつかの実施形態では、RNA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子は、5'→3'方向に、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、アミノ酸リンカー及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成し、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチド(例えば、上記の(3))をコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部(例えば、上記の(4))をコードするポリヌクレオチド配列との間にある。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカーは、配列GGSGGGGGSGG(配列番号39)を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列は、配列GGCGGCGUCUGGAGGAGGCGGCGUCGGAAGGC(配列番号37)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子は、5'→3'方向に、少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールを更に含み、少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールは、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列と、ネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列とを含み、第2のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールのネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの

30

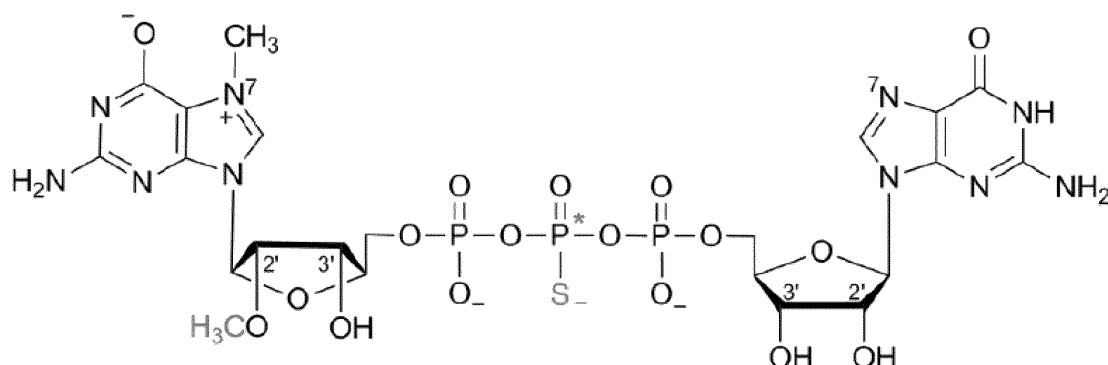
40

50

少なくとも一部（例えば、上記の（４））をコードするポリヌクレオチド配列との間にあり、第１のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープは、第２のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープとは異なる。いくつかの実施形態では、RNA分子は、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、又は２０個のリンカー-エピトープモジュールを含み、各リンカー-エピトープモジュールは異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、RNA分子は、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個又は２０個のリンカー-エピトープモジュールを含み、RNA分子は、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個又は２０個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNA分子は、アミノ酸リンカーをコードする第２のポリヌクレオチド配列を更に含み、アミノ酸リンカーをコードする第２のポリヌクレオチド配列は、３'方向において最も遠位にあるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列との間（例えば、上記の（４））にある。いくつかの実施形態では、RNA分子は、図４に示す配列を含む。いくつかの実施形態では、図４のNは、１種以上のネオエピトープをコードする（例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は２０個の異なるネオエピトープをコードする）ポリヌクレオチド配列を表す。いくつかの実施形態では、図４のNは、１種以上の（例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は２０個の異なる）リンカー-ネオエピトープモジュール（複数可）を表し、各モジュールは、５'→３'方向に１種以上のアミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、RNA分子の５'キャップ（例えば、上記の（１））は、以下の構造のD1ジアステレオ異性体を含む：



いくつかの実施形態では、RNA分子の５'UTR（例えば、上記の（２））は、配列UUCUUCUGGUC C C C A C A G A C U C A G A G A A C C C G C C A C C（配列番

号23)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子の5'UTR(例えば、上記の(2))は、配列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUC C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C(配列番号21)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子によってコードされる分泌シグナルペプチド(例えば、上記の(3)において、)は、アミノ酸配列MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(配列番号27)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子の分泌シグナルペプチド(例えば、上記の(3))をコードするポリヌクレオチド配列は、配列AUGAGAGUGAUGGCC C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C(配列番号25)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子によってコードされるMHC分子(例えば、上記の(4))の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部は、アミノ酸配列IVGIVAGLAVLAVVVI GAVVATVMCRKSSGGKGGSY SQAASSDSAQGS D V S L T A(配列番号30)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子のMHC分子(例えば、上記の(4))の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列は、配列AUCGUGGGGA AUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGGAAGUCCAGCGGAGGC AAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCCGCCAGCUCUGAUAGCG C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A C U G A C A G C C(配列番号28)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子のAES mRNA(例えば、上記の(5a))の3'非翻訳領域は、配列CUGGUACUGCAUGCACGCA AUUGCUAGCUGCC C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C(配列番号33)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子のミトコンドリアにコードされる12S RNA(例えば、上記の(5b))の非コードRNAは、配列CAAGCACGCAAGCA AUGCAGCUCAA AACGCUUAGCCUAGCCACAC C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G(配列番号35)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子の3'UTR(例えば、上記の(5))は、配列CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCA AUGCUAGCUGC C C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C C A A G C A C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A A C G A A A G U U U A A C U A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G A G U C G C U A G C C G C G U C G C U(配列番号31)を含む。いくつかの実施形態では、RNA分子のポリ(A)配列(例えば、上記の(6))は120個のアデニンヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0023】

いくつかの態様では、本明細書に提供されるのは、5'→3'方向に、ポリヌクレオチド配列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUC C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C(配列番号19)、及びポリヌクレオチド配列AUCGUGGGGA AUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCCGUGGUGGUGAUCG GAGCCGUGGUGGCUAACCGUGAUGUGCAGACGGGAAGUCCAG C G G A G G C A A G G G C G G C A G C U A C A G C C A G G C C G C C A G C U C U

GAUAGCGCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGU
AACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCC
CUUUC CCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCU CGG
GUCCCAGGU AUGCUCCCA CCUCCACCU G C C C C A C U C A C C A
CCUCUGCUAGUUC CAGACACCUCCCAAGCACG CAGCAAUG
CAGCUCAA AACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAA
CAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUA AACGAAAGUUUAACU
AAGCUAUACUAACCC CAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGC
CACACCGAGACCU GGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (

配列番号 20) を含む。

10

【0024】

いくつかの態様では、5' → 3' 方向に、以下のポリヌクレオチド配列を含む RNA 分子が本明細書で提供される：

GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCA
GAG AGAACCCGCC
ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGC
UGC UGUCUGGCGC
CCUGGCCCU G ACAGAGACA U GGGCCGGAAG CNAUCGU
GGGA AUUGUGGCAG
GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGU
GGU GGCUACCGUG
AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GCGGCA
GCU ACAGCCAGGC
CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCA
CUG ACAGCCUAGU
AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUG
CCC CUUUC CCGUC
CUGGGUA CCC CGAGUCUCC CCGACCU CGG GUCCCAG
GUA UGCUCCCA CC
UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGA
CAC CUCCCAAGCA
CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACA
CCC CCACGGGAAA
CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUA
ACU AAGCUAUACU
AACCC CAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCG
AGA CCUGGUCCAG
AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA
AAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA
AAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA (配列番号 42)

20

30

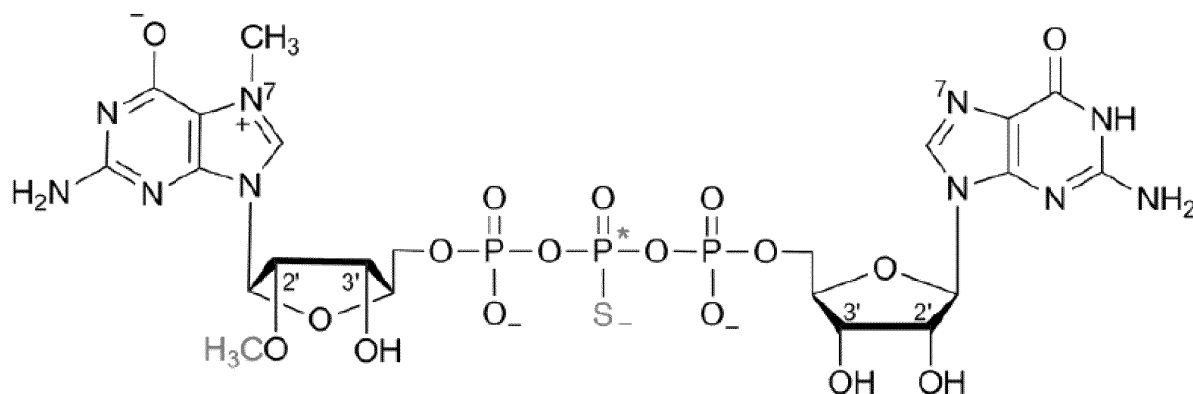
40

【0025】

いくつかの実施形態では、RNA 分子は、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 19 の配列と配列番号 20 の配列との間にあるか、又は配列番号 42 において「N」と記された位置にある。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少

50

なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個又は 20 個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、5' → 3' 方向（例えば、配列番号 19 の配列と配列番号 20 の配列との間、又は配列番号 42 の「N」と記された位置）に、（a）少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールであって、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む、少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールと、（b）アミノ酸リンカーをコードする第 2 のポリヌクレオチド配列と、を更に含む。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、又は 20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、各リンカー-エピトープモジュールは異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個又は 20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、RNA 分子は、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個又は 20 個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNA 分子は 5' キャップを更に含み、5' キャップは配列 G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C（配列番号 19）に対して 5' に位置する。いくつかの実施形態では、5' キャップは 2 つのグアニンヌクレオチドの間に位置する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、5' キャップを更に含み、5' キャップは、配列番号 42（例えば、図 4 に示す）の最初の 2 つの G 塩基の間に位置する。いくつかの実施形態では、5' キャップは、以下の構造の D 1 ジアステレオ異性体を含む：



【0026】

いくつかの態様では、上記の実施形態のいずれか 1 種の RNA 分子（例えば、本明細書に記載されるか、又は配列表若しくは図に記載される RNA 分子のいずれかを含む）及び 1 種以上の脂質を含むリボソームが本明細書で提供され、1 種以上の脂質は、RNA 分子をカプセル化する多層構造を形成する。いくつかの実施形態では、1 種以上の脂質は、少なくとも 1 種のカチオン性脂質及び少なくとも 1 種のヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態では、1 種以上の脂質は、（R）-N，N，N-トリメチル-2，3-ジオレイルオキシ-1-プロパンアミニウムクロリド（DOTMA）及び 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）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的 pH では、リボソームの正電荷対負電荷の全電荷比は 1.3 : 2（0.65）である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH では、リボソームの正電荷対負電荷の全

電荷比は1.0 : 2.0以上である。いくつかの実施形態では、生理学的pHでは、リボソームの正電荷対負電荷の全電荷比は1.9 : 2.0以下である。いくつかの実施形態では、生理学的pHでは、リボソームの正電荷対負電荷の全電荷比は、1.0 : 2.0以上1.9 : 2.0以下である。

【0027】

いくつかの態様では、個体においてがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法であって、有効量の上記の実施形態のいずれか1種のRNA分子（例えば、本明細書に記載されるか、又は配列表若しくは図に記載されるRNA分子のいずれかを含む）又は上記の実施形態のいずれか1種のリボソームを個体に投与することを含む方法が本明細書中に提供される。個体におけるがんを処置するか又はその進行を遅延させる方法において使用するための上記の実施形態のいずれか1種のRNA分子又は上記の実施形態のいずれか1種のリボソームも本明細書において提供され、該方法は、有効量のRNA分子又はリボソームを個体に投与することを含む。個体においてがんを処置するため又はがんの進行を遅延させるための医薬の製造において使用するための上記実施形態のいずれか1種のRNA分子（例えば、本明細書に記載されるか、又は配列表若しくは図に記載されるRNA分子のいずれかを含む）又は上記実施形態のいずれか1種のリボソームも本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、RNA分子は、個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、上記方法は、個体にPD-1軸結合アンタゴニスト（例えば、抗PD-L1抗体）を投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、がんは、メラノーマ、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RNA分子又はリボソームを、約15 µg、約25 µg、約38 µg、約50 µg又は約100 µgの用量で投与する。いくつかの実施形態では、RNA分子又はリボソームを、約15 µg、約25 µg、約38 µg、約50 µg又は約100 µgの用量で投与し、PD-1軸結合アンタゴニスト（例えば、抗PD-L1抗体）は、約200又は約1200 mgの用量で投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNA分子又はリボソームを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストはペンプロリズマブであり、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル1～8の1日目に約200 mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に約25 µgの用量で個体に投与する。

【0028】

いくつかの態様では、本明細書に記載のRNA分子のいずれかをコードするDNA分子が本明細書において提供される。いくつかの態様では、5' → 3' 方向に、以下を含むDNA分子が本明細書で提供される：（1）5' 非翻訳領域（UTR）をコードするポリヌクレオチド配列；（2）分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；（3）主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列；（4）3' UTRをコードするポリヌクレオチド配列であって、（a）Split (AES) mRNAのアミノ末端エンハンサー又はその断片の3' 非翻訳領域；及び（b）ミトコンドリアにコードされた12S RNA又はその断片の非コードRNAを含む3' UTR；並びに（5）ポリ（A）配列をコードするポリヌクレオチド。

【0029】

いくつかの実施形態では、DNA分子は、少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、少なくとも1種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、5' → 3' 方向に、分泌シグナルペプチド（例えば、上記の（2））をコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部（例えば、上記の（3））をコードするポリヌクレオチド配列との間にある。いくつかの実施形態では、DNA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なく

とも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA分子は、5'→3'方向に、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、アミノ酸リンカー及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成し、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチド（例えば、上記の(2)）をコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部（例えば、上記の(3)）をコードするポリヌクレオチド配列との間にある。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカーは、配列GGSGGGGGSGG（配列番号39）を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列は、配列GGCGGCTCTGGAAGGAGGCGGCTCCGGAAGGC（配列番号38）を含む。いくつかの実施形態では、DNA分子は、5'→3'方向に、少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールを更に含み、少なくとも第2のリンカー-エピトープモジュールは、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列と、ネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列とを含み、第2のリンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、第1のリンカー-ネオエピトープモジュールのネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部（例えば、上記の(3)）をコードするポリヌクレオチド配列との間にあり、第1のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープは、第2のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープとは異なる。いくつかの実施形態では、DNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、各リンカー-エピトープモジュールは異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、DNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、DNA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、DNA分子は、アミノ酸リンカーをコードする第2のポリヌクレオチド配列を更に含み、アミノ酸リンカーをコードする第2のポリヌクレオチド配列は、3'方向において最も遠位にあるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列との間（例えば、上記の(3)）にある。いくつかの実施形態では、5'UTRをコードするポリヌクレオチド（例えば、上記の(1)）は、配列TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAACCCGCCACCC（配列番号24）を含む。いくつかの実施形態では、5'UTRをコードするポリヌクレオチド（例えば、上記の(1)）は、配列GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAACCCGCCACCC（配列番号22）を含む。いくつかの実施形態では、分泌シグナルペプチド（例えば、上記の(2)）によって符号化される）は、アミノ酸配列MRVMAPRTLILLLSGALLALTE TWAGS（配列番号27）を含む。いくつかの実施形態では、分泌シグナルペプチド（例えば、上記の(2)）をコードするポリヌクレオチド配列は、配列ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCCTGATCCTGCTGCTGTCTGTGGCGCCCTGTGGCCCTGACAGAGACATGGGCGCGAAG

C（配列番号26）を含む。いくつかの実施形態では、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部（例えば、上記の（3）によってコードされる）は、アミノ酸配列IVGI VAGLAVLAVVVI GAVVATVMCR RKSSGGKGGSY SQAASSDSAQGS DVS LTA（配列番号30）を含む。いくつかの実施形態では、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部（例えば、上記の（3））をコードするポリヌクレオチド配列は、配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGTCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGTGTGTCAGACGGAAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCGAGCTACAGCCAGGCCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAAGGGCAGCGACGTGTCTCACTGACAGCC（配列番号29）を含む。いくつかの実施形態では、AES mRNAの3'非翻訳領域をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、上記の（4a））は、配列CTGGTACTGCAATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCCTGGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAAGGTATGCTCCCCACCTCCAACCTGCCCCACTCACCCACCTCTGCTAGTTTCCAGACACCTCC（配列番号34）を含む。いくつかの実施形態では、ミトコンドリアにコードされる12S RNA（例えば、上記の（4b））の非コードRNAをコードするポリヌクレオチドは、配列CAAGCACGCGAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACTTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACC C CAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCG（配列番号36）を含む。いくつかの実施形態では、3'UTRをコードするポリヌクレオチド（例えば、上記の（4））は、配列CTGGTACTGCAATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCCTGGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACTCTCCACCTGCCCCACTCACCACTCTCTGCTAGTTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCGAGCAATGCAAGCTCAAAACGCTTAGCCCTAGCCACACCC C CACGGGAAACAAGCAGTGATTAACTTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACC C CAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCAACCGAGACCTGGTCCAGAGTCTGCTAGCCGCGCTCGCT（配列番号32）を含む。いくつかの実施形態では、ポリ（A）配列（例えば、上記の（5））は120個のアデニンヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0030】

いくつかの態様では、本明細書に提供されるのは、5'→3'方向に、ポリヌクレオチド配列GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAAACCCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC（配列番号40）、及びポリヌクレオチド配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGTCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGTGTGTCAGACGGAAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCGAGCTACAGCCAGGCCCGCCAGCTCTGATAGCGCC CAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCAATGCACGCAATGCTAGCTGCCCTTTTCCCGTCCCTGGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCCAGGTATGCTCCCACTCTCCACCTGCCCCACTCACCAACCTCTGCTAGTTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCGAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCCTAGCCACACCC C CACGGGAAACAAGCAGTGATTAACTTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACC C CAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCAACCGAGACCTGGTCCAGAGTCTGCTAGCCGCGCTCGCT（

配列番号 41) を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、DNA 分子は、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、少なくとも 1 種のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 40 の配列と配列番号 41 の配列との間にある。いくつかの実施形態では、DNA 分子は、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個又は 20 個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA 分子は、配列番号 40 の配列と配列番号 41 の配列との間の 5' → 3' 方向に、(a) 少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールであって、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む、少なくとも第 1 のリンカー-ネオエピトープモジュールと、(b) アミノ酸リンカーをコードする第 2 のポリヌクレオチド配列と、を更に含む。いくつかの実施形態では、DNA 分子は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、又は 20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、各リンカー-エピトープモジュールは異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、DNA 分子は、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個又は 20 個のリンカー-エピトープモジュールを含み、DNA 分子は、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個又は 20 個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。

10

20

【0032】

いくつかの態様では、上記実施形態のいずれか 1 種の DNA 分子を転写することを含む、RNA 分子を産生する方法が本明細書で提供される。

30

【0033】

本明細書に記載の様々な実施形態の特性のうちの 1 つ、いくつか、又は全てを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形成することができることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者に明らかであろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の発明を実施するための形態によって更に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0034】

本特許又は出願ファイルには、カラーで作成された少なくとも 1 つの図面が含まれている。カラー図面を含む本特許又は特許出願公開のコピーは、申請に応じて、必要な手数料を支払うことにより、米国特許庁から提供されることになる。

40

【0035】

【図 1】図 1 は、RNA ベースの個別化がんワクチン (R07198457) + 抗 PD1 抗体 (ペンブロリズマブ) の有効性及び安全性を評価するように設計された第 II 相無作為化非盲検試験の研究スキームを示す。無作為化段階では、患者を実験的処置 (B 群) 又は対照処置 (A 群) に無作為化 (2:1) する。IMC = 内部モニタリング委員会; LDH = 乳酸脱水素酵素; Q3W = 3 週間ごと; TBD = 未定; ULN = 正常上限。

【0036】

【図 2】図 2 は、第 II 相試験の A 群 (ペンブロリズマブ) 及び安全性導入 (safety run-in) 段階及び B 群 (R07198457 + ペンブロリズマブ) の投薬スキームを示す。C = サイクル; D = 日。

50

【0037】

【図3】図3は、例示的RNAワクチン（すなわち、ポリネオエピトープRNA）の一般構造を示す。この図は、定常5'キャップ（ β -S-ARCA(D1)）、5'及び3'非翻訳領域（それぞれhAg-Kozak及びFI）、N末端及びC末端融合タグ（それぞれsec2.0及びMITD）、並びにポリ(A)尾部（A120）と並んで、GSリッチリンカーによって融合されたネオエピトープ（neo1~10）をコードする患者特異的配列を有するRNA薬物物質の一般構造の概略図である。

【0038】

【図4】図4は、例示的RNAワクチン（配列番号42）の定常領域のリボヌクレオチド配列（5'→3'）である。最初の2つのG残基間の結合は、5'キャップ構造について表 10
5及び図5に示されるような異常な結合（5'→5'）-ppp-である。患者のがん特異的配列の挿入部位は、C131残基とA132残基との間である（太字でマークされている）。「N」は、（任意のリンカーによって分離された）1種以上の（例えば、1~20の）ネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列（複数可）の位置を指す。

【0039】

【図5】図5は、RNA定常領域の5'末端で使用される5'-キャッピング構造 β -S-ARCA(D1)（m₂⁷ 2' QgppspG）である。ステレオジェニックP中心は、「D1」異性体においてRp配置である。注： β -S-ARCA(D1)と基本的なキャップ構造m⁷GpppGとの違いを赤色で示す；構成要素m⁷GのC2'位に-OC 20
H3基を有し、 β -ホスフェートの非架橋酸素が硫黄で置換されている。ステレオジェニックP中心（*で標識されている）の存在により、ホスホロチオエートキャップ類縁体 β -S-ARCAは2つのジアステレオマーとして存在する。逆相高速液体クロマトグラフィーにおける溶出順序に基づいて、これらを01及び02と命名した。

【発明を実施するための形態】

【0040】

I. 定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明が特定の組成物又は生物学的系に限定されず、それらが言うまでもなく多種多様であることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図していないことも理解されたい。

【0041】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの分子」への言及は、任意に、2つ以上のかかる分子の組合せ等を含む。

【0042】

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者であれば容易に理解する、それぞれの値に対する通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」の値又はパラメータへの言及は、その値又はパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。

【0043】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態が、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0044】

「PD-1軸結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1シグナル伝達軸上のシグナル伝達に起因するT細胞機能障害を除去するようにPD-1軸結合パートナーとその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上との相互作用を阻害し、結果として、T細胞機能（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞死滅）復元又は増強する分子を指す。本明細書で使用される場合、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、及びPD-L2結合アンタゴニストを含む。

【0045】

10

20

30

40

50

「PD-1 結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1 と、PD-L1、PD-L2 等の 1 種以上の結合パートナーとの相互作用の結果として生じるシグナル伝達を減少、遮断、阻害、侵害、又は妨害する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、PD-1 のその結合パートナーのうちの 1 つ以上への結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-1 結合アンタゴニストは、PD-1 の PD-L1 及び／又は PD-L2 への結合を阻害する。例えば、PD-1 結合アンタゴニストは、抗 PD-1 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、並びに PD-1 と PD-L1 及び／又は PD-L2 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、又は妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、PD-1 を介するシグナル伝達を媒介した T リンパ球で発現された細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害 T 細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、抗 PD-1 抗体である。PD-1 結合アンタゴニストの具体的な例を以下に提示する。

10

20

30

40

50

【0046】

「PD-L1 結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L1 とその結合パートナーのうちのいずれか 1 つ以上、例えば、PD-1、B7-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、又は妨害する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様において、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 の PD-1 及び／又は B7-1 への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、抗 PD-L1 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及び PD-L1 とその結合パートナーのうちの 1 つ以上、例えば、PD-1、B7-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、又は妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 を介するシグナル伝達を媒介した T リンパ球で発現された細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害 T 細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、抗 PD-L1 抗体である。PD-L1 結合アンタゴニストの具体的な例を以下に提示する。

【0047】

「PD-L2 結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L2 と PD-1 等の 1 種以上の結合パートナーのいずれかとの相互作用の結果として生じるシグナル伝達を減少させたり、遮断したり、阻害したり、妨害したりする分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 のその結合パートナーのうちの 1 種以上への結合を阻害する分子である。特定の態様において、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 の PD-1 への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L2 アンタゴニストは、抗 PD-L2 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及び PD-L2 とその結合パートナーのうちのいずれか 1 つ以上、例えば、PD-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、又は妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 を介するシグナル伝達を媒介した T リンパ球で発現された細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害 T 細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、イムノアドヘシンである。

【0048】

「持続的奏効」とは、処置の中止後の腫瘍成長の低減への持続的効果を指す。例えば、腫瘍サイズは、投与期の開始時のサイズと比較して同じままであるか、又はより小さくなり得る。いくつかの実施形態では、持続的奏効は、処置期間と少なくとも同じ期間、処置期間の少なくとも 1.5 倍、2.0 倍、2.5 倍、又は 3.0 倍の期間を有する。

【0049】

「薬学的製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象に許容できないほどに有毒な追加の成分を含有しない調製物を指す。このような製剤は、無菌である。「薬学的に許容可能な」賦形剤（ビヒクル、添加剤）は、対象哺乳動物に適度に投与されて、用いられる有効用量の活性成分を提供することができるものである。

【0050】

本明細書で使用される場合、「処置」という用語は、臨床病理学の過程中に処置される個体又は細胞の自然な経過を変えるように設計された臨床的介入を指す。処置の望ましい効果としては、疾患進行速度の低減、疾患状態の回復又は緩和、及び予後の寛解又は改善が挙げられる。例えば、個体は、がん性細胞の増殖の低減（若しくは破壊）、疾患に起因する症状の軽減、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の処置に必要な他の薬剤の用量の低減、及び／又は個体の生存期間の延長を含むが、これらに限定されない、がんに関連する1種以上の症候が軽減又は排除された場合、「処置」に成功する。

10

【0051】

本明細書で使用されるとき、「疾患の進行を遅延させる」とは、疾患（がん等）の発症を延期し、妨害し、減速し、遅らせ、安定させ、かつ／又は延ばすことを意味する。この遅延は、病歴及び／又は処置される個体に応じて様々な期間のものであり得る。当業者に明らかであるように、充分又は著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、予防を事実上包含し得る。例えば、転移の発症等の末期がんを遅延させることができる。

20

【0052】

「有効量」とは、特定の障害の測定可能な改善又は予防の達成に必要な少なくとも最小の量である。本明細書における有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに個体における所望の応答を誘発する抗体の能力等の要因に応じて異なり得る。有効量はまた、任意の処置の毒性又は有害な効果を治療上有益な効果が優る量である。予防的使用の場合、有益な又は所望の結果としては、疾患の生化学的、組織学的、及び／又は挙動的症候、その合併症、並びに疾患の発症中に現れる中間病理学的表現型を含む、疾患のリスクの排除又は低減、疾患の重症度の軽減、又は疾患の発生の遅延等の結果が挙げられる。治療的使用の場合、有益な又は所望の結果としては、疾患に起因する1種以上の症候の軽減、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の処置に必要な他の薬剤の用量の低減、別の薬剤の効果の増強（例えば、標的による）、疾患の進行の遅延、及び／又は生存期間の延長等の臨床結果が挙げられる。がん又は腫瘍の場合、有効量の薬物は、がん細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを低減させ、がん細胞の末梢器官への浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、又は望ましくは停止し）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、又は望ましくは停止し）、腫瘍成長をある程度阻害し、かつ／又は障害に関連する症候のうちの1種以上をある程度軽減する効果を有し得る。有効量は、1回の投与でも、複数回の投与でもよい。本発明では、薬物、化合物、又は医薬組成物の有効量は、予防的処置又は治療的処置を直接又は間接的に達成するのに十分な量である。臨床的に理解されるように、有効量の薬物、化合物、又は医薬組成物とは、別の薬物、化合物、又は医薬組成物と組み合わせて達成されてもよいし、達成されなくてもよい。したがって、「有効量」は、1種以上の治療剤を投与する文脈で考えられてよく、1種以上の他の薬剤と組み合わせて、望ましい結果が得られるか、又は達成される場合には、単一の薬剤が有効量で投与されると考えられてよい。

30

40

【0053】

本明細書で使用される場合、「～と共に」又は「～と組み合わせて」とは、ある処置様式を、別の処置様式に加えて適用することを指す。したがって、「～と共に」又は「～と組み合わせて」とは、個体への1種の処置様式の適用前、適用中、又は施行後の別の処置様式の適用を指す。

【0054】

「障害」とは、哺乳動物を問題の障害に罹患しやすくする病理学的状態を含む慢性及び急

50

性障害又は疾患を含むが、これらに限定されない、処置から恩恵を受けることになる任意の状態である

【0055】

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の細胞の異常増殖を伴う疾患を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害は、がんである。一実施形態では、細胞増殖性障害は、腫瘍である。

【0056】

本明細書で使用される「腫瘍」とは、悪性であるか良性であるかを問わず、全ての新芽細胞の増殖及び増殖、並びに全ての前がん性及びがん性の細胞及び組織を指す。「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、及び「腫瘍」という用語は、本明細書で言及されるとき、相互排他的ではない。

【0057】

処置の目的のための「対象」又は「個体」は、哺乳類に分類される任意の動物を指し、ヒト、家畜及び農場動物、及び動物園動物、スポーツ動物、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等を含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0058】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、具体的には、それらが所望の生物学的活性を呈する限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を包含する。

【0059】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から特定及び分離され、かつ／又は回収された抗体である。その自然環境の混入成分は、抗体の試験的、診断的、又は治療的使用を妨害するであろう物質であり、それらとしては、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、抗体は、（１）例えば、ローリー（Lowry）法によって決定される、９５重量％超になるまで、いくつかの実施形態では、９９重量％超になるまで、（２）例えば、スピニングカップシークエネーターを使用して、Ｎ末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも１５個の残基を得るのに十分な程度まで、又は（３）例えば、クマシーブルー又はシルバー染色を使用して、還元又は非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥによって均質性が得られるまで精製される。単離された抗体は、抗体の自然環境の少なくとも１つの成分が存在しないため、組換え細胞内の *in situ* 抗体を含む。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも１つの精製工程によって調製されることになる。

【0060】

「天然抗体」は、通常、２つの同一の軽（Ｌ）鎖及び２つの同一の重（Ｈ）鎖からなる、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖が１つのジスルフィド共有結合によって重鎖に連結される一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重及び軽鎖はまた、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の端に可変ドメイン（ＶＨ）を有し、その後いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一方の端に可変ドメイン（ＶＬ）を有し、その他方の端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。

【0061】

「定常ドメイン」という用語は、抗原結合部位を含有する可変ドメインである、免疫グロブリンの他の部分と比較して、より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分の指す。定常ドメインは、重鎖のＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３ドメイン（集合的に、ＣＨ）、並びに軽鎖のＣＨＬ（又はＣＬ）ドメインを含有する。

【0062】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメイン

10

20

30

40

50

を指す。重鎖可変ドメインは「VH」と称され得る。軽鎖可変ドメインは「VL」と称され得る。これらのドメインは、一般に、抗体の最も可変性の高い部分であり、抗原結合部位を含有する。

【0063】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分が、配列において抗体間で大きく異なり、かつ各特定の抗体の、その特定の抗原に対する結合及び特異性において使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等に分布してはいない。可変性は、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインの両方における超可変領域（HVR）と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、ベータシート構造を接続する、かついくつかの場合では、ベータシート構造の一部を形成する、ループを形成する3つのHVRによって接続されたベータシート立体配置を主に採用する4つのFR領域を含む。各鎖内のHVRは、FR領域によって近接して互いに保持され、他方の鎖からのHVRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞毒性への関与等の様々なエフェクター機能を呈する。

10

【0064】

任意の哺乳動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（「κ」）及びラムダ（「λ」）と呼ばれる2つの明らかに異なるタイプのうちの一方に割り当てられ得る。

20

【0065】

本明細書で使用されるIgG「アイソタイプ」又は「サブクラス」という用語は、それらの定常領域の化学的及び抗原的特徴によって定義される免疫グロブリンのサブクラスのうちのいずれかを意味する。

【0066】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体（免疫グロブリン）は、異なるクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンの主な5つのクラスは、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2へと更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、γ、ε、γ、及びμと呼ばれる。様々なクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成が周知であり、例えば、Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000)に一般的に記載されている。抗体は、抗体と1種以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有会合によって形成される、より大きい融合分子の一部であり得る。

30

【0067】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、以下で定義される抗体断片ではない、実質的にインタクトな形態の抗体を指すために、本明細書で互換的に使用される。これらの用語は、具体的には、Fc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

40

【0068】

本明細書における目的のための「裸抗体」は、細胞傷害性部分又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体である。

【0069】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体断片は、抗原結合断片である。抗体断片

50

の例としては、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、及び Fv 断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子、並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0070】

抗体のパパイン消化により、各々単一の抗原結合部位を有する「 Fab 」断片と、容易に結晶化するその能力を反映して命名された残りの「 Fc 」断片と呼ばれる、2つの同一の抗原結合断片が産生される。ペプシン処理は、 $F(ab')_2$ 断片をもたらし、これは、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができる。

【0071】

「 Fv 」は、完全な抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。一実施形態では、二本鎖 Fv 種は、密接に非共有会合した1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖 Fv ($scFv$) 種において、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が二本鎖 Fv 種における構造に類似の「二量体」構造で会合し得るように、可動性ペプチドリンカーによって共有結合し得る。各可変ドメインの3つのHVRが相互作用して、 $VH-VL$ 二量体の表面上の抗原結合部位を定義するのは、この立体配置においてである。集合的に、6つのHVRが、抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、全結合部位よりも低い親和性ではあるが、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的なHVRを3つしか含まない Fv の半分）でさえも、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【0072】

Fab 断片は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含有し、軽鎖定常ドメイン及び第1の重鎖定常ドメイン ($CH1$) も含有する。 Fab' 断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む、重鎖 $CH1$ ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によって、 Fab 断片とは異なる。 $Fab'-SH$ は、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が、遊離チオール基を持つ Fab' に対する本明細書での呼称である。 $F(ab')_2$ 抗体断片は、元々、間にヒンジシステインを有する Fab' 断片のペアとして産生されたものであった。抗体断片の他の化学的カップリングも既知である。

【0073】

「一本鎖 Fv 」又は「 $scFv$ 」抗体断片は、抗体の VH 及び VL ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、 $scFv$ ポリペプチドは、 VH ドメインと VL ドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含み、これにより、 $scFv$ が抗原結合に望ましい構造を形成することが可能になる。 $scFv$ に関するレビューについては、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315を参照されたい。

【0074】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指し、これらの断片は ($VH-VL$)、同じポリペプチド鎖に軽鎖可変ドメイン (VL) に接続した重鎖可変ドメイン (VH) を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、これらのドメインは、別の鎖の相補的なドメインとペアリングさせられ、2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)において、より完全に記載されている。トリアボディ及びテトラボディはまた、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)においても説明されている。

【0075】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、例えば、その集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る

10

20

30

40

50

可能な変異、例えば、天然に存在する変異を除いて同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。ある特定の実施形態では、このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、該標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスによって得られたものである。例えば、この選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、又は組換えDNAクローンのプール等の複数のクローンから特有のクローンを選択することであり得る。選択された標的結合配列が、例えば、標的への親和性を改善し、標的結合配列をヒト化し、細胞培養におけるその産生を改善し、*in vivo*でのその免疫原性を低減し、多特異性抗体を作製するように更に改変されてもよく、かつ改変された標的結合配列を含む抗体が本発明のモノクローナル抗体でもあることを理解されたい。通常、異なる決定基（エピトープ）に対して指向する様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、1つの抗原上の単一の決定基に対して指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、通常は他の免疫グロブリンによる混入がないという点で有利である。

10

20

30

40

50

【0076】

「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)におけるもの）、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及び Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)を参照）、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全てを有する動物において、ヒト又はヒト様抗体を産生するための技術（例えば、国際公開第1998/24893号、国際公開第1996/34096号、国際公開第1996/33735号、国際公開第1991/10741号、Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993)、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、及び同第5,661,016号、Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); 及び Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Imm*

unol. 13: 65-93 (1995) を参照) によって作製され得る。

【0077】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方で、鎖（複数可）の残りが、別の種に由来するか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である「キメラ抗体」、並びにそれらが所望の生物学的活性を呈する限り、そのような抗体の断片を含む（例えば、米国特許第4,816,567号及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984) を参照）。キメラ抗体としては、PRIMATIZED（登録商標）抗体が挙げられ、この抗体の抗原結合領域は、例えば、目的とする抗原でマカクザルを免疫化することによって産生された抗体に由来する。

10

【0078】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含有するキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントのHVR由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び／又は能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）のHVR由来の残基によって置き換えられるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの事例では、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含み得る。これらの修飾により、抗体の性能を更に洗練させることができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には、2つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含み、超可変ループのうちの全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FRのうちの全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。ヒト化抗体はまた、任意に、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。更なる詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) を参照されたい。また、例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994)、並びに米国特許第6,982,321号及び同第7,087,409号も参照されたい。

20

30

【0079】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生され、かつ／又は本明細書に開示されるヒト抗体を作製するための技法のうちのいずれかを使用して作製された抗体のアミノ酸配列に対応する、アミノ酸配列を有する抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特定の除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当技術分野で公知の様々な技法を使用して産生され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991) に記載されている方法もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001) もまた、参照されたい。ヒト抗体は、抗原投与に応答してこのような抗体を産生するよう改変されているが、その内在性遺伝子座は無能になっているトラ

40

50

ンスジェニック動物、例えば、免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによって調製することが可能である（例えば、XENOMOUSE（商標）技術に関する米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号を参照）。また、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により産生されるヒト抗体については、例えば、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) を参照されたい。

【0080】

「種依存性抗体」は、第2の哺乳動物種由来の抗原のホモログに対する結合親和性よりも、第1の哺乳動物種由来の抗原に対して、より強い結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原に「特異的に」結合する（例えば、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性（Kd）値を有する）が、ヒト抗原に対する結合親和性よりも少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、第2の非ヒト哺乳動物種由来の抗原のホモログに対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上で定義される様々な種類の抗体のうちのいずれかであり得るが、好ましくは、ヒト化抗体又はヒト抗体である。

【0081】

「超可変領域」、「HVR」、又は「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列が超可変性であり、かつ／又は構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVH（H1、H2、H3）に、3つがVL（L1、L2、L3）にある。天然抗体では、H3及びL3が、6つのHVRのうちで最も高い多様性を示し、特にH3が抗体に優れた特異性を与える上で特有の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003). を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる、天然に存在するラクダ抗体は、軽鎖の不在で機能的であり、安定している。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sherif et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996) を参照されたい。

【0082】

いくつかのHVR説明が本明細書で使用され、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。代わりに、Chothiaは、構造的ループの位置を指す（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM HVRは、KabatのHVRとChothiaの構造的ループとの間の折衷を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらHVRの各々に由来する残基が、以下に示される。

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(Kabatナンバリング)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothiaナンバリング)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0083】

H V Rは、以下の「伸長H V R」を含み得る：V Lにおいて、2 4～3 6又は2 4～3 4（L 1）、4 6～5 6又は5 0～5 6（L 2）、及び8 9～9 7又は8 9～9 6（L 3）、並びにV Hにおいて、2 6～3 5（H 1）、5 0～6 5又は4 9～6 5（H 2）、及び9 3～1 0 2、9 4～1 0 2、又は9 5～1 0 2（H 3）。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々について、K a b a t e t a l.（上記参照）に従ってナンバリングされる。

【0084】

H V Rは、以下の「伸長H V R」を含み得る：V Lにおいて、2 4～3 6又は2 4～3 4（L 1）、4 6～5 6又は5 0～5 6（L 2）、及び8 9～9 7又は8 9～9 6（L 3）、並びにV Hにおいて、2 6～3 5（H 1）、5 0～6 5又は4 9～6 5（H 2）、及び9 3～1 0 2、9 4～1 0 2、又は9 5～1 0 2（H 3）。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々について、K a b a t e t a l.（上記参照）に従ってナンバリングされる。

10

【0085】

「フレームワーク」又は「F R」残基は、本明細書で定義されるH V R残基以外の可変ドメイン残基である。

【0086】

「K a b a tにおけるような可変ドメイン残基ナンバリング」又は「K a b a tにおけるようなアミノ酸位置ナンバリング」という用語、及びそれらの変形は、K a b a tら（上記参照）における抗体の編集物の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに使用されるナンバリングシステムを指す。このナンバリングシステムを使用して、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのF R若しくはH V Rの短縮、又はそれへの挿入に対応する、より少ないアミノ酸又は追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H 2の残基5 2の後に単一のアミノ酸挿入（K a b a tに従う残基5 2 a）、及び重鎖F R残基8 2の後に挿入された残基（例えば、K a b a tに従う残基8 2 a、8 2 b、及び8 2 c等）を含んでもよい。残基のK a b a tナンバリングは、所与の抗体に対して、「標準の」K a b a tによってナンバリングされた配列を有する抗体の配列の相同領域での整列によって決定され得る。

20

【0087】

K a b a t番号付けシステムは一般に、可変ドメイン（およそ軽鎖の残基1～1 0 7及び重鎖の残基1～1 1 3）内の残基に言及するときに使用される（例えば、K a b a t e t a l. , Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。「E Uナンバリングシステム」又は「E Uインデックス」は、一般に、免疫グロブリン重鎖定常領域における残基について言及するときに使用される（例えば、K a b a t e t a l.（上記参照）で報告されるE Uインデックス）。「K a b a tにおけるようなE Uインデックス」は、ヒトI g G 1 E U抗体の残基ナンバリングを指す。

30

【0088】

「直鎖状抗体」という表現は、Z a p a t a e t a l. (1995 Protein Eng, 8 (10) : 1057-1062)に記載されている抗体を指す。簡潔には、これらの抗体は、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒にあって一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデムF dセグメント（V H－C H 1－V H－C H 1）を含む。直鎖状抗体は、二重特異性又は単一特異性であり得る。

40

【0089】

本明細書で使用されるとき、「結合する」、「に特異的に結合する」、又は「に特異的な」という用語は、生物学的分子等の異種分子集団の存在下で標的の存在を決定する標的と抗体との間の結合等の測定可能かつ再現可能な相互作用を指す。例えば、標的（エピトープであり得る）に結合するか、又はそれに特異的に結合する抗体は、この標的に、他の標的に結合するよりも高い親和性で、結合力で、より容易に、かつ／又はより長期間結合す

50

る抗体である。一実施形態では、抗体が無関係の標的に結合する程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される、抗体の標的への結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、標的に特異的に結合する抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、又は0.1 nM以下の解離定数（K_d）を有する。ある特定の実施形態では、抗体は、異なる種由来のタンパク質間で保存されるタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、それを必要としない。

【0090】

本明細書で使用される「試料」という用語は、例えば、物理的、生化学的、化学的、及び／又は生理学的特性に基づいて、特性評価及び／又は同定される細胞及び／又は他の分子の実体を含有する、目的とする対象及び／又は個体から得られるか、又はそれに由来する組成物を指す。例えば、「疾患試料」という語句及びその変化形は、特性評価される細胞及び／又は分子実体を含有することが予期されるか、又は含有することが既知である、目的の対象から得られた任意の試料を指す。試料としては、初代又は培養細胞又は細胞株、細胞上清、細胞溶解物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、全血、血液由来の細胞、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、汗、粘液、腫瘍溶解物、及び組織培養培地、組織抽出物、例えば、均質化組織、腫瘍組織、細胞抽出物、並びにそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍細胞及び任意に腫瘍浸潤免疫細胞を含む個体のがんから得られた試料（例えば、腫瘍試料）である。例えば、試料は、パラフィンブロックに包埋された腫瘍標本、又は新たに切断された連続非染色切片を含む腫瘍標本であり得る。いくつかの実施形態では、試料は生検からのものであり、50個以上の生存腫瘍細胞（例えば、コアニードル生検によるものであり、任意にパラフィンブロックに埋め込まれる；切除生検、切開生検、パンチ生検又は鉗子生検；又は腫瘍組織切除によるものである）を含む。

【0091】

「組織試料」又は「細胞試料」は、対象又は個体の組織から得られた同様の細胞の集合を意味する。組織又は細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結した、及び／又は保存された器官、組織試料、生検、及び／又は吸引液から等の固形組織；血漿等の血液又は任意の血液構成物；脳脊髄液、羊水、腹水、又は間質液等の体液；対象の妊娠又は発育における任意の時期の細胞であってもよい。組織試料はまた、初代又は培養細胞又は細胞株であってもよい。任意に、組織又は細胞試料は、疾患組織／器官から得られる。組織試料は、保存剤、抗凝固剤、緩衝液、固定剤、栄養剤、又は抗生物質等の天然の組織と天然では混合しない化合物を含有し得る。

【0092】

本明細書で使用される場合、「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」、又は「対照組織」とは、比較目的のために使用される試料、細胞、組織、標準物、又はレベルを指す。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は、同じ対象又は個体の身体の健常な及び／又は罹患していない部分（例えば、組織又は細胞）から得られる。例えば、罹患細胞又は組織に隣接する健常及び／又は非罹患の細胞又は組織（例えば、腫瘍に隣接する細胞又は組織）。別の実施形態では、参照試料は、同じ対象又は個体の身体の未処置な組織及び／又は細胞から得られる。更に別の実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は、対象又は個体ではない個体の身体の健常な及び／又は罹患していない部分（例えば、組織又は細胞）から得られる。更に別の実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は、対象又は個体ではない個体の身体の未処置の組織及び／又は細胞から得られる。

【0093】

薬品を用いた処置に対する患者の「有効な応答」又は患者の「応答性」及び類似の単語は、がん等の疾患若しくは障害の危険性があるか、又はそれを患う患者に付与される臨床的又は治療的有益性を指す。一実施形態では、そのような利益としては、生存期間（全生存

10

20

30

40

50

期間及び無増悪生存期間を含む)を延長すること、客観的奏効(完全奏効若しくは部分奏効を含む)をもたらすこと、又はがんの徴候若しくは症候を改善することのいずれか1つ以上が挙げられる。

【0094】

処置に「有効な応答を示さない」患者とは、生存期間(全体的な生存及び無増悪生存期間を含む)が延長すること、客観的応答(完全応答若しくは部分的応答を含む)がもたらされること、又はがんの徴候又は症候が改善されることのうちのいずれも有しない患者を指す。

【0095】

「機能的Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合;CDC;Fc受容体結合;ADCC;食作用;細胞表面受容体(例えば:B細胞受容体;BCR)等のダウンレギュレーションが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と結合することを必要とし、例えば、本明細書の定義に開示されているように、様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0096】

「ヒトエフェクター細胞を有する」がん又は生体試料は、診断研究において、試料中に存在するヒトエフェクター細胞(例えば、浸潤性ヒトエフェクター細胞)を有するものである。

【0097】

「FcR発現細胞を有する」がん又は生体試料は、診断研究において、試料中に存在するFcR発現(例えば、浸潤性FcR発現細胞)を有するものである。いくつかの実施形態では、FcRは、FcγRである。いくつかの実施形態では、FcRは、活性化FcγRである。

II. 概要

【0098】

個体におけるがんを処置するため又はがんの進行を遅延させるための方法であって、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト(例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体)及びRNAワクチンを個体に投与することを含む方法が、本明細書において中に提供される。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、がん中存在する、例えば個体から得られた腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異に起因する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

【0099】

いくつかの実施形態では、個体に有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト(例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体)及びRNAワクチンを投与することを含む、個体においてがんを処置する方法又はその信仰を遅延する方法が本明細書で提供され、RNAワクチンは、個体から得られた腫瘍試料中に存在する体細胞変異に基づいて同定された1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、個体に有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト(例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体)及びRNAワクチンを投与することを含む、個体においてがんを処置する方法又はその信仰を遅延する方法が本明細書で提供され、RNAワクチンは、個体から得られた腫瘍試料中に存在する体細胞変異に対応する1種以上のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、処置は、RNAワクチンの不在下でのPD-1軸結合アンタゴニストの投与を含む処置と比較して、個体の無増悪生存期間(PFS)及び／又は全生存期間(OS)を延長する。いくつかの実施形態では、処置は、RNAワクチンの不在下でのPD-1軸結合アンタゴニストの投与を含む処置と比較して全奏効率(ORR)を改善する。いくつかの実施形態では、ORRは、完全奏効(CR)又は部分奏効(PR)を伴

10

20

30

40

50

う患者の割合を指す。いくつかの実施形態では、処置は、RNAワクチンの不在下でのPD-1軸結合アンタゴニストの投与を含む処置と比較して、個体における応答期間(DOR)を延長する。いくつかの実施形態では、処置は、RNAワクチンの不在下でのPD-1軸結合アンタゴニストの投与を含む処置と比較して、個体における健康に関連した生活の質(HRQoL)スコアを改善する。

【0101】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、21日又は3週間の間隔で個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、21日又は3週間の間隔で、例えば約200mgの用量で個体に投与する抗PD-1抗体(例えば、ペンブロリズマブ)である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、21日又は3週間の間隔で、例えば約1200mgの用量で個体に投与する抗PD-L1抗体(例えば、アテゾリズマブ)である。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、21日又は3週間の間隔で個体に投与する。

【0103】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の第1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル1～8の1日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の第1、8及び15日目並びにサイクル3～7の1日目に個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル1～8の1日目に個体に投与する。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、サイクル8の後に個体に更に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、17回の追加の21日間のサイクルで個体に更に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル13～29の1日目に個体に投与し、及び／又はRNAワクチンを、サイクル13、21、及び29の1日目に個体に投与する。

【0105】

特定の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与を、PD-1軸結合アンタゴニストはペンブロリズマブであり、PD-1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に約200mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に約25μgの用量で個体に投与する。特定の実施形態では、PD-L1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-L1軸結合アンタゴニストはアテゾリズマブであり、PD-L1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に約1200mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に約25μgの用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の1日目に約25μg、サイクル2の8日目に約25μg、サイクル2の15日目に約25μg、及びサイクル3～7のそれぞれの1日目に約25μgの用量で個体に投与する(すなわち、合計約75μgのワクチンを、サイクル2の間に3回の用量にわたって個体に投与する)。いくつかの実施形態では、合計約75μgのワクチンを、RNAワクチンを投与するサイクル1の間に3回にわたって個体に投与する。いくつかの実施形態では、PCVを、例えばリボソーム製剤中で、15μg、25μg、38μg、50μg、又は100μgの用量で静脈内投与する。いくつかの実施形態では、15μg、25μg、38μg、50μg又は100μgのRNAが、用量あたりで送達される(すなわち、用量重量は投与されたRNAの重量を反映し、投与された製剤又はリポプレックスの総重量を反映しない)。

30

40

50

III. RNA ワクチン

【0106】

本開示の特定の態様は、個別化がんワクチン（PCV）に関する。いくつかの実施形態では、PCVはRNAワクチンである。例示的なRNAワクチンの特徴を以下に記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、以下に記載される1種以上のRNAワクチンの特徴／配列を含むRNAポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは一本鎖mRNAポリヌクレオチドである。いくつかの他の実施形態では、本開示は、以下に記載される1種以上のRNAワクチンの特徴／配列を含むRNAをコードするDNAポリヌクレオチドを提供する。

【0107】

個別化がんワクチンは、潜在的な免疫刺激活性を有すると同定された個別化ネオ抗原（すなわち、患者のがんにおいて特異的に発現される腫瘍関連抗原（TAA））を含む。本明細書に記載の実施形態では、PCVは核酸、例えばメッセンジャーRNAである。したがって、理論に拘束されることを望むものではないが、投与されると、個別化がんワクチンは、抗原提示細胞（APC）によって取り込まれ、翻訳され、発現されたタンパク質は、APCの表面上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子を介して提示されると考えられる。これは、TAAを発現するがん細胞（複数可）に対する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）及びメモリーT細胞依存性免疫応答の両方の誘導をもたらす。

【0108】

PCVは、典型的には、複数のネオ抗原エピトープ（「ネオエピトープ」）、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、28個、29個若しくは30個のネオエピトープ、又は少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、28個、29個若しくは30個のネオエピトープを含み、任意に個々のネオエピトープ間にリンカー配列を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるネオエピトープは、患者のがんに特異的であるが、患者の正常細胞には見られない新規エピトープを指す。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、MHCに結合した場合にT細胞に提示される。いくつかの実施形態では、PCVは、5' mRNA キャップ類縁体、5' UTR、シグナル配列、抗原発現を促進するドメイン、3' UTR、及び／又はポリAテールも含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる10～20個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる少なくとも5個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる5～20個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる5～10個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAワクチンの製造は多段階プロセスであり、それによって患者の腫瘍における体細胞変異が次世代シーケンシング（NGS）によって同定され、免疫原性ネオ抗原エピトープ（又は「ネオエピトープ」）が予測される。選択されたネオエピトープを標的とするRNAがんワクチンは、患者ごとに製造される。いくつかの実施形態では、ワクチンは、患者の腫瘍に特異的な最大10個のネオエピトープ（合計で最大20個のネオエピトープ）をそれぞれコードする最大2個のメッセンジャーRNA分子からなるRNAベースのがんワクチンである。

【0110】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、発現された非同義変異は、腫瘍DNA及び末梢血単核細胞（PBM C）DNAの全エクソームシーケンシング（WES）（患者由来の健康な組織の供給源として）並びに腫瘍RNAシーケンシング（発現を評価するため）によって同定される。得られた変異タンパク質のリストから、個々の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に対する予測エピトープの結合親和性、及び関連RNAの発現レベルを含む複数の因子に基づいて、それらの可能性のある免疫原性をランク付けするバイオインフォマティクスワークフローを使用して、潜在的ネオ抗原を予測する。突然変異の発見、優先順位付け、及び確認プロセスは、健康な組織におけるそれぞれの野生型遺伝子の発現レベルに関する包括的な情報を提供するデータベースによって補完される。この情報は、好ましくないリスクプロファイルを有する対象候補を除去することによって、個人向けリスク軽減戦略の開発を可能にする。重要な器官における可能性のあるより高い自己免疫リスクを有するタンパク質に生じる変異は除外され、ワクチン産生のために考慮されない。いくつかの実施形態では、個々の患者についてそれぞれCD8+T細胞及び／又はCD4+T細胞応答を誘発すると予測される最大20個のMHC I及びMHC IIネオエピトープが、ワクチンへの包含のために選択される。複数のネオエピトープに対するワクチン接種は、PCVに対する全体的な免疫応答の幅及び大きさを増加させると予想され、腫瘍が有効な免疫応答の選択圧に曝露された場合に起こり得る免疫回避のリスクを軽減するのに役立ち得る（Tran E, Robbins PF, Lu YC, et al. N Engl J Med 2016; 375: 2255-62; Verdegaa l EM, de Miranda NF, Visser M, et al. Nature 2016; 536: 91-5）。

10

20

【0111】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、アミノ酸リンカーをコードする1種以上のポリヌクレオチド配列を含む。例えば、アミノ酸リンカーは、2つの患者特異的ネオエピトープ配列の間、患者特異的ネオエピトープ配列と融合タンパク質タグ（例えば、MHC複合体ポリペプチドに由来する配列を含む）の間、又は分泌シグナルペプチドと患者特異的ネオエピトープ配列の間で使用することができる。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは複数のリンカーをコードする。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる5～20個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含み、各エピトープをコードするポリヌクレオチドは、リンカー配列をコードするポリヌクレオチドによって分離されている。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる5～10個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含み、各エピトープをコードするポリヌクレオチドは、リンカー配列をコードするポリヌクレオチドによって分離されている。幾つかの実施形態では、リンカー配列をコードするポリヌクレオチドはまた、N末端融合タグ（例えば、分泌シグナルペプチド）をコードするポリヌクレオチドとネオエピトープのうちの1つをコードするポリヌクレオチドとの間、及び／又はネオエピトープのうちの1つをコードするポリヌクレオチドとC末端融合タグ（例えば、MHCポリペプチドの一部を含む）をコードするポリヌクレオチドとの間に存在する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンによってコードされる2つ以上のリンカーは、異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、複数のリンカーをコードし、その全てが同じアミノ酸配列を共有する。

30

40

【0112】

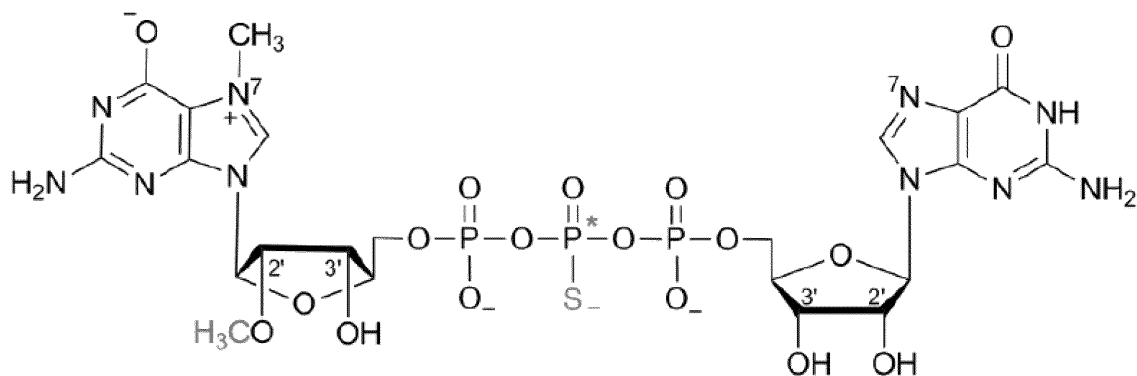
様々なリンカー配列が当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、リンカーは可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、G、S、A及び／又はT残基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーはグリシン残基及びセリン残基からなる。いくつかの実施形態では、リンカーは、約5～約20アミノ酸長又は約5～約12アミノ酸長、例えば、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19又は約20アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列GGSGGGSGG（配列番号39）を含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンのリンカーは、配列GGCGGCUCUGGAGGA

50

G G C G G C U C C G G A G G C (配列番号 37) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンのリンカーは、配列 G G C G G C T C T G G A G G A G G C G G C T C C G G A G G C (配列番号 38) を含む DNA によってコードされる。

【0113】

いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは 5' キャップを含む。基本的な mRNA キャップ構造は、2つのヌクレオシド（例えば、2つのグアニン）と遠位グアニン上の 7-メチル基、すなわち、 m^7GpppG との間に 5'-5' 三リン酸結合を含むことが知られている。例示的なキャップ構造は、例えば、米国特許第 8,153,773 号及び同第 9,295,717 号、並びに Kuhn, A. N. et al. (2010) Gene Ther. 17:961-971 に見ることができる。いくつかの実施形態では、5' キャップは、構造 $m_2^7, 2'-OgppspG$ を有する。いくつかの実施形態では、5' キャップはベータ-S-ARCA キャップである。S-ARCA キャップ構造は、（例えば、 m^7G の C2' 位に）2'-Oメチル置換及びリン酸基の 1 種以上に S 置換を含む。いくつかの実施形態では、5' キャップは、以下の構造を含む：



【0114】

いくつかの実施形態では、5' キャップは、 β -S-ARCA の D1 ジアステレオ異性体（例えば、米国特許第 9,295,717 号を参照）である。上記構造中の * は、2つのジアステレオ異性体（D1 及び D2 と命名）中に存在することができるステレオジェニック P 中心を示す。ベータ-S-ARCA 又はベータ-S-ARCA の D1 ジアステレオマー（D1）は、ベータ-S-ARCA の D2 ジアステレオマー（ベータ-S-ARCA (D2)）と比較して HPLC カラムで最初に溶出し、したがってより短い保持時間を示す β -S-ARCA のジアステレオマーである。HPLC は、好ましくは分析 HPLC である。一実施形態では、好ましくは、分離には $5\mu m$ 、 $4.6 \times 250mm$ のフォーマットの Supelcosil LC-18-T RP カラムを用いることにより、流速 $1.3ml/\text{分}$ を適用することができる。一実施形態では、15 分以内の酢酸アンモニウム中のメタノールの勾配、例えば $0.05M$ 酢酸アンモニウム中のメタノールの $0 \sim 25\%$ の直線勾配 ($pH=5.9$) が使用される。UV 検出 (VWD) は $260nm$ で行うことができ、蛍光検出 (FLD) は $280nm$ の励起及び $337nm$ の検出で行うことができる。

【0115】

いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは 5' UTR を含む。mRNA 中のタンパク質コード配列に対して 5' に見出される特定の非翻訳配列は、翻訳効率を高めることが示されている。例えば Kozak, M. (1987) J. Mol. Biol. 196:947-950 を参照されたい。いくつかの実施形態では、5' UTR は、ヒトアルファグロビン mRNA からの配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは、UUCUUUCUGGUC C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C (配列番号 23) の 5' UTR 配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 5' UTR 配列は、配列 T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G A A C C C G C C

A C C (配列番号 24) を含む DNA によってコードされる。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 5' UTR 配列は、配列 G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C (配列番号 21) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 5' UTR 配列は、配列 G G C G A A C T A G T A T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G A A C C C G C C A C C (配列番号 22) を含む DNA によってコードされる。

【0116】

いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。当技術分野で公知のように、分泌シグナルペプチドは、翻訳時にポリペプチドを小胞体から分泌経路に輸送するように指示するアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、MHC ポリペプチド等のヒトポリペプチドに由来する。例えば、ヒト樹状細胞における MHC クラス I 及び II エピトープのプロセッシング及び提示を改善する例示的な分泌シグナルペプチドを記載する Kreiter, S. et al. (2008) J. Immunol. 180:309-318 を参照されたい。いくつかの実施形態では、翻訳時に、シグナルペプチドは、RNA ワクチンによってコードされる 1 種以上のネオエピトープ配列 (複数可) に対して N 末端にある。いくつかの実施形態では、分泌シグナルペプチドは、配列 M R V M A P R T L I L L S G A L A L T E T W A G S (配列番号 27) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの分泌シグナルペプチドは、配列 A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C (配列番号 25) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの分泌シグナルペプチドは、配列 A T G A G A G T G A T G G C C C C C A G A A C C C T G A T C C T G C T G C T G T C T G G C G C C C T G G C C C T G A C A G A G A C A T G G G C C G G A A G C (配列番号 26) を含む DNA によってコードされる。

【0117】

いくつかの実施形態では、RNA ワクチンは、膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインは、MHC 分子の膜貫通／細胞質ドメインに由来する。「主要組織適合遺伝子複合体」という用語及び略語「MHC」は、全ての脊椎動物で生じる遺伝子の複合体に関する。正常な免疫応答におけるリンパ球と抗原提示細胞との間のシグナル伝達における MHC タンパク質又は分子の機能は、それらがペプチドに結合し、T 細胞受容体 (TCR) による可能な認識のためにそれらを提示することを含む。MHC 分子は、細胞内プロセッシング区画内のペプチドに結合し、抗原提示細胞の表面上のこれらのペプチドを T 細胞に提示する。HLA とも呼ばれるヒト MHC 領域は、6 番染色体上に位置し、クラス I 領域及びクラス II 領域を含む。クラス I アルファ鎖は、約 44 kDa の分子量を有する糖タンパク質である。ポリペプチド鎖は、350 アミノ酸残基を幾分超える長さを有する。これは、3 つの機能的領域、すなわち外部、膜貫通及び細胞質領域に分けることができる。外部領域は、283 アミノ酸残基の長さを有し、アルファ 1、アルファ 2 及びアルファ 3 の 3 つのドメインに分けられる。ドメイン及び領域は、通常、クラス I 遺伝子の別個のエクソンによってコードされる。膜貫通領域は、原形質膜の脂質二重層に及ぶ。これは、通常、アルファヘリックスに配置された 23 個の疎水性アミノ酸残基からなる。細胞質領域、すなわち細胞質に面し、膜貫通領域に接続している部分は、典型的には 32 アミノ酸残基の長さを有し、細胞骨格の要素と相互作用することができる。アルファ鎖は、ベータ 2-ミクログロブリンと相互作用し、したがって、細胞表面上にアルファ-ベータ 2 二量体を形成する。「MHC クラス II」又は「クラス II」という用語は、主要組織適合遺伝子複合体クラス II タンパク質又は遺伝子に関する。ヒト MHC クラス II 領域内には、クラス II α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子の DP、DQ 及び DR サブ領域がある (すなわち、DP α 、DP β 、DQ α 、DQ β 、DR α 及び DR β)。クラス II 分子は、それぞれアルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロ二量体である。両方の鎖は、31~34 kDa (α) 又は 26~29 kDa (ベータ) の分子量を有する糖タン

10

20

30

40

50

パク質である。アルファ鎖の全長は 229～233 アミノ酸残基まで変動し、ベータ鎖の全長は 225～238 残基まで変動する。アルファ鎖及びベータ鎖はいずれも、外部領域、接続ペプチド、膜貫通領域及び細胞質尾部からなる。外部領域は、2つのドメイン、アルファ1及びアルファ2、又はベータ1及びベータ2からなる。接続ペプチドは、それぞれアルファ鎖及びベータ鎖の9残基長である。これは、アルファ鎖及びベータ鎖の両方において23アミノ酸残基からなる膜貫通領域に2つのドメインを接続する。細胞質領域、すなわち細胞質に面し、膜貫通領域に接続している部分の長さは、アルファ鎖では3～16残基、ベータ鎖では8～20残基で変化する。例示的な膜貫通／細胞質ドメイン配列は、米国特許第8,178,653号及び同第8,637,006号に記載されている。いくつかの実施形態では、翻訳時に、膜貫通及び／又は細胞質ドメインは、RNAワクチンによってコードされる1種以上のネオエピトープ配列（複数可）のC末端にある。いくつかの実施形態では、RNAワクチンによってコードされるMHC分子の膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインは、配列IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSAASSDSAQGSDVSLTA（配列番号30）を含む。いくつかの実施形態では、MHC分子の膜貫通及び／又は細胞質ドメインは、配列AUCGUGGGA AUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCCGUGGUUGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGG AAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC（配列番号28）を含む。いくつかの実施形態では、MHC分子の膜貫通及び／又は細胞質ドメインは、配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGTCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGGCAGCTACAGCCAGGCCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC（配列番号29）を含むDNAによってコードされる。

10

20

30

40

50

【0118】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、1種以上のネオエピトープ配列（複数可）に対してN末端である分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、1種以上ネオエピトープ配列（複数可）に対してC末端である膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインをコードするポリヌクレオチド配列の両方を含む。そのような配列を組み合わせることにより、ヒト樹状細胞におけるMHCクラスI及びIIエピトープのプロセッシング及び提示が改善されることが示されている。例えば、Kreiter, S. et al. (2008) J. Immunol. 180: 309-318を参照されたい。

【0119】

骨髄DCでは、RNAはサイトゾルに放出され、ポリネオエピトープペプチドに翻訳される。ポリペプチドは、抗原提示を増強するための追加の配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのN末端のMHC I重鎖からのシグナル配列（sec）を使用して、新生分子を小胞体に標的化し、これはMHC I提示効率を高めることが示されている。理論に拘束されることを望むものではないが、MHC I重鎖の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインは、MHC II提示を改善することが示されたエンドソーム／リソソーム区画にポリペプチドを誘導すると考えられる。

【0120】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンは3'UTRを含む。mRNA中の3'対タンパク質コード配列に見られる特定の非翻訳配列は、RNA安定性、翻訳、及びタンパク質発現を改善することが示されている。3'UTRとしての使用に適したポリヌクレオチド配列は、例えば、PG公開番号、米国特許出願公開第20190071682号に記載されている。いくつかの実施形態では、3'UTRは、AESの3'非翻訳領域若しくはその断片及び／又はミトコンドリアにコードされた12S RNAの非コードRNAを含む。「AES」というのは、スプリットのアミノ末端エンハンサー（Amino-Termina

l Enhancer Of Split) に関し、AES 遺伝子を含む (例えば、NCBI 遺伝子 ID: 166 を参照)。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、タンパク質の groucho/TLE ファミリーに属し、ホモオリゴマーとして、又は他のファミリーメンバーと共にヘテロオリゴマーとして機能して、他のファミリーメンバー遺伝子の発現を優位に抑制することができる。例示的な AES mRNA 配列は、NCBI 参照配列アクセッション番号 NM_198969 で提供される。「MT_RNR1」という用語は、ミトコンドリアにコードされた 12S RNA に関し、MT_RNR1 遺伝子 (例えば、NCBI 遺伝子 ID: 4549 を参照) を含む。この RNA 遺伝子は Mt_rRNA クラスに属する。MT_RNR1 に関連する疾患には、拘束性心筋症及び聴覚神経障害が含まれる。その関連経路の中には、真核生物におけるリボソーム生合成及び CFTR 翻訳忠実度 (クラス I 変異) がある。例示的な MT_RNR1 RNA 配列は、NCBI 参照配列アクセッション番号 NC_012920 に存在する。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、配列 CUGGUACUGCAUGCACGCA AUGCUAGCUGCCCCCUUUC CCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUUCGGGUC C CAGGU AUGCUCC CACCUCCACCU G C C CACUCAC CACCUUCUGCUAGUUC CAGACACCUCC (配列番号 33) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、配列 CAAGCA CGCAGCAAUGCAGCUCAA AACGCUUAGCCUAGCCACACCC C CACGGGA AACAGCAGUGAUUA ACCUUAAGCAAUA AACGA AAGUUUAACUAAGCUAUACUA ACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGGCCAGCCACACCCG (配列番号 35) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、配列 CUGGUACUGCAUGCACGCA AUGCUAGCUGCCCCCUUUC CCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUUCGGGUC C CAGGU AUGCUCC CACCUCCACCU G C C CACUCAC CACCUUCUGCUAGUUC CAGACACCUCC (配列番号 33) 及び配列 CAAGCACG CAGCAAUGCAGCUCAA AACGCUUAGC CUAGCCACACCC C CACGGGA AACAGCAGUGAUUA ACCUUAAGCAAUA AACGA AAGUUUAACUAAGCUAUACUA ACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGGCCAGCCACACCCGAGACC UGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (配列番号 31) を含む。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、配列 CTGGTACTG CATGCACGCAATGCTAGCTGCC C C C T T T C C C G T C C T G G G T A C C C C G A G T C T C C C C G A C C T C G G G T C C C A G G T A T G C T C C C A C C T C C A C C T G C C C C A C T C A C C A C C T C T G C T A G T T C C A G A C A C C T C C (配列番号 34) を含む DNA によってコードされる。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、配列 CAAGCACG CAGCAAATGCAGCTC AAAACGCTTAGCCTAGCCACACCC C C C CACGGGA AACAGCAGTGATTAACTTTAGCAAATAAACGA AAGTTTAACTAAGCTATACTAAACCC CAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCCG (配列番号 36) を含む DNA によってコードされる。いくつかの実施形態では、RNA ワクチンの 3' UTR は、CTGGTACTG CATGCACGCAATGCTAGCTGCC C C C C T T T C C C G T C C T G G G T A C C C C G A G T C T C C C C C G A C

10

20

30

40

50

CTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCCACCTCCACCTGCCCCCACT
 CACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (配列番号34) の配列
 及びCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAG
 CCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACTTTAGCA
 ATAAACGAAGAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAAGGGTT
 GGTCAATTTCTGCTGCCAGCCACACCG (配列番号36) の配列を含むD
 NAによってコードされる。いくつかの実施形態では、RNAワクチンの3'UTRは、
 配列CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCTTTCC
 CGTCCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGGTCCCA
 GGTATGCTCCCCACCTCCACCTGCCCCCACTCACCACTCTG
 CTAGTTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTC
 AAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAG
 TGATTAACTTTAGCAATAAACGAAGAAGTTTAACTAAGCTA
 TACTAACCCCAAGGGTTGGTCAATTTCTGCTGCCAGCCACACC
 GAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCTCGCT (配列番号32
)を含むDNAによってコードされる。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、その3'末端にポリ(A)尾部を含む。い
 くつかの実施形態では、ポリ(A)尾部は、50個超又は100個超のアデニンヌクレオ
 チドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、ポリ(A)尾部は120個のアデニンヌ
 クレオチドを含む。このポリ(A)尾部は、RNA安定性及び翻訳効率を高めることが実
 証されている(Holtkamp, S. et al. (2006) Blood 108:
 4009-4017)。いくつかの実施形態では、ポリ(A)尾部を含むRNAは、少な
 くとも50、100又は120個のアデニン連続ヌクレオチドをコードするポリヌクレオ
 チド配列及びEIS型制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列を転写の5'→3'方向に
 含むDNA分子を転写することによって生成される。翻訳を改善する例示的なポリ(A)
 尾部及び3'UTR配列は、例えば、米国特許第9,476,055号に見られる。

20

【0122】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAワクチン又はRNA分子は、以下の一般構造(
 5'→3'方向)を含む：(1)5'キャップ；(2)5'非翻訳領域(UTR)；(3)分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；(4)主要組織適合遺伝子複
 合体(MHC)分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポ
 リヌクレオチド配列；(5)3'UTRであって、(a)Split(AES)mRNA
 のアミノ末端エンハンサーの3'非翻訳領域又はその断片；及び(b)ミトコンドリアに
 コードされた12S RNAの非コードRNA又はその断片を含む3'UTR；並びに(
 6)ポリ(A)配列。いくつかの実施形態では、本開示のRNAワクチン又はRNA分子
 は、5'→3'方向に、ポリヌクレオチド配列GGCGAACUAGUAUUCUUCUG
 GUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUG
 AUGGCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCCGCC
 UGGCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (配列番号19)；及び
 ポリヌクレオチド配列AUCGUGGGAAUUGUGGACAGGACUGGACAGUG
 CUGGCCGUGGUGGUGGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCCGUGA
 UGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUA
 CAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCACAGGGCAGCGAC
 GUGUCAUCUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUG
 CACGCAAUUGCUGCUGCCCCUUUCGCCUGGGUACCCC
 GAGUCUCCCCCGACCUCCGGGUCGCCAGGU AUGCUCCCCACCU
 CCACCUUGCCCCAUCACCAACCUUGCUAGUUCCAGACACC
 UCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAACGCUUAGCCUA
 GCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGC

40

50

AAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCAGGGU
UGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGA
GUCGCUAGCCGCGUCGCU（配列番号20）を含む。有利には、構造又は配
列のこの組合せ及び配向を含むRNAワクチンは、RNA安定性の改善、翻訳効率の向上
、抗原提示及び／又はプロセシングの改善（例えば、DCによる）、並びにタンパク質発
現の増加のうちの1つ以上を特徴とする。

【0123】

いくつかの実施形態では、本開示のRNAワクチン又はRNA分子は、配列番号42の配
列（5'→3'方向）を含む。例えば、図4を参照されたい。いくつかの実施形態では、N
は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6
個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも
11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、
少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくと
も20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個
、少なくとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個、少なくとも28個、少なく
とも29個、又は30個のネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を指す。い
くつかの実施形態では、Nは、1種以上のリンカー-エピトープモジュール（例えば、少
なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少
なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個
、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なく
とも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20
個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、少な
くとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個、少なくとも28個、少なくとも2
9個、又は30個の異なるリンカー-エピトープモジュール）をコードするポリヌクレオ
チド配列を指す。いくつかの実施形態では、Nは、1種以上のリンカー-エピトープモジ
ュール（例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、
少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個
、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なく
とも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19
個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少な
くとも24個、少なくとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個、少なくとも2
8個、少なくとも29個、又は30個の異なるリンカー-エピトープモジュール）及び3
'末端に追加のアミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列を指す。

【0124】

いくつかの実施形態では、RNAワクチン又はRNA分子は、少なくとも1種のネオエピ
トープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含み、少なくとも1種のネオエピトープ
をコードするポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチドをコード
するポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なく
とも一部をコードするポリヌクレオチド配列との間にある。いくつかの実施形態では、R
NA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少な
くとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少
なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも
15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又
は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、RNAワクチン又はRNA分子は、5'→3'方向に、アミノ酸
リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌク
レオチド配列を更に含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカー及びネオエピト
ープをコードするポリヌクレオチド配列は、リンカー-ネオエピトープモジュール（例え
ば、同じオープンリーディングフレーム内の5'→3'方向の連続配列）を形成する。いくつ

かの実施形態では、リンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列との間、又は配列番号19の配列と配列番号20の配列との間にある。いくつかの実施形態では、RNAワクチン又はRNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、28個、29個、又は30個のリンカー-エピトープモジュールを含む。いくつかの実施形態では、リンカー-エピトープモジュールのそれぞれは、異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、RNAワクチン又はRNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、RNAワクチン又はRNA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチン又はRNA分子は、5個、10個、又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含む。いくつかの実施形態では、リンカー-エピトープモジュールのそれぞれは、異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、リンカー-エピトープモジュールは、同じオープンリーディングフレーム内で5'→3'方向に連続配列を形成する。いくつかの実施形態では、第1のリンカー-エピトープモジュールのリンカーをコードするポリヌクレオチド配列は、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の3'である。いくつかの実施形態では、最後のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列の5'である。

10

20

30

40

50

【0126】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、少なくとも800ヌクレオチド、少なくとも1000ヌクレオチド、又は少なくとも1200ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは2000ヌクレオチド未満の長さである。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、少なくとも800ヌクレオチドであるが2000ヌクレオチド未満の長さ、少なくとも1000ヌクレオチドであるが2000ヌクレオチド未満の長さ、少なくとも1200ヌクレオチドであるが2000ヌクレオチド未満の長さ、少なくとも1400ヌクレオチドであるが2000ヌクレオチド未満の長さ、少なくとも800ヌクレオチドであるが1400ヌクレオチド未満の長さ、又は少なくとも800ヌクレオチドであるが2000ヌクレオチド未満の長さである。例えば、上記の要素を含むRNAワクチンの定常領域は、およそ800ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、5個の患者特異的ネオエピトープ（例えば、それぞれが27個のアミノ酸をコードする）を含むRNAワクチンは、1300ヌクレオチド長を超える。いくつかの実施形態では、10個の患者特異的ネオエピトープ（例えば、それぞれが27個のアミノ酸をコードする）を含むRNAワクチンは、1800ヌクレオチド長を超える。

【0127】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンはリポプレックスナノ粒子又はリポソームに製剤化される。いくつかの実施形態では、RNA（RNA-リポプレックス）のためのリポプレックスナノ粒子製剤を使用して、本開示のRNAワクチンのIV送達を可能にする。いくつかの実施形態では、合成カチオン性脂質（R）-N，N，N-トリメチル-2，3-ジオレイルオキシ-1-プロパンアミニウムクロリド（DOTMA）及びリン脂質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）を含むRNAがんワクチン用のリポプレックスナノ粒子製剤を、例えばIV送達を可能にするため

に使用する。DOTMA／DOPEリポソーム成分は、脾臓及び他のリンパ器官における抗原提示細胞のIV送達及び標的化のために最適化されている。

【0128】

一実施形態では、ナノ粒子は少なくとも1種の脂質を含む。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも1種のカチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、モノカチオン性又はポリカチオン性であり得る。任意のカチオン性両親媒性分子、例えば、少なくとも1つの親水性及び親油性部分を含む分子は、本発明の意味の範囲内のカチオン性脂質である。一実施形態では、正電荷は少なくとも1種のカチオン性脂質によって占められ、負電荷はRNAによって占められる。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも1種のヘルパー脂質を含む。ヘルパー脂質は、中性又はアニオン性脂質であり得る。ヘルパー脂質は、天然脂質、例えばリン脂質若しくは天然脂質の類縁体、又は完全合成脂質、又は天然脂質と類似性のない脂質様分子であり得る。一実施形態では、カチオン性脂質及び／又はヘルパー脂質は、二重層形成脂質である。

10

【0129】

一実施形態では、少なくとも1種のカチオン性脂質は、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)又はその類縁体若しくは誘導体、及び／又は1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)又はその類縁体若しくは誘導体を含む。

【0130】

一実施形態では、少なくとも1種のヘルパー脂質は、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(DOPE)又はその類縁体若しくは誘導体、コレステロール(Chol)又はその類縁体若しくは誘導体、及び／又は1,2-ジオレオイル-*s*n-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)又はその類縁体若しくは誘導体を含む。

20

【0131】

一実施形態では、少なくとも1種のカチオン性脂質対少なくとも1種のヘルパー脂質のモル比は、10:0~3:7、好ましくは9:1~3:7、4:1~1:2、4:1~2:3、7:3~1:1、又は2:1~1:1、好ましくは約1:1である。一実施形態では、この比において、カチオン性脂質のモル量は、カチオン性脂質のモル量にカチオン性脂質の正電荷の数を乗じたものから生じる。

30

【0132】

一実施形態では、脂質は、当該RNAをカプセル化する小胞に含まれる。小胞は、多層小胞、単層小胞、又はそれらの混合物であり得る。小胞は、リポソームであってもよい。

【0133】

本明細書に記載のナノ粒子又はリポソームを、RNAに対するカチオン性脂質の(+/-)電荷比に応じて正電荷対負電荷を調整し、RNAとカチオン性脂質を混合することによって形成することができる。本明細書に記載のナノ粒子中のRNAに対するカチオン性脂質の+/-電荷比を、以下の式によって計算することができる。
$$(+/-\text{電荷比}) = \left[\left(\text{カチオン性脂質量 (mol)} \right) * \left(\text{カチオン性脂質中の正電荷の総数} \right) \right] : \left[\left(\text{RNA量 (mol)} \right) * \left(\text{RNA中の負電荷の総数} \right) \right]$$
RNA量及びカチオン性脂質量は、ナノ粒子の調製時の負荷量を考慮して当業者が容易に決定することができる。例示的なナノ粒子の更なる説明については、例えば、PGの米国特許出願公開第20150086612号を参照されたい。

40

【0134】

一実施形態では、ナノ粒子又はリポソーム中の正電荷対負電荷の全電荷比(例えば、生理学的pHでは、1.4:1~1:8、好ましくは1.2:1~1:4、例えば1:1~1:3、例えば1:1.2~1:2、1:1.2~1:1.8、1:1.3~1:1.7、特に1:1.4~1:1.6、例えば約1:1.5である。いくつかの実施形態では、生理学的pHにおいて、ナノ粒子の正電荷対負電荷の全電荷比は、

50

1 : 1. 2 (0. 8 3) ~ 1 : 2 (0. 5)

である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH において、ナノ粒子又はリポソームの正電荷対負電荷の全電荷比は、1. 6 : 2 (0. 8) ~ 1 : 2 (0. 5) 又は 1. 6 : 2 (0. 8) ~ 1. 1 : 2 (0. 5 5) である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH において、ナノ粒子又はリポソームの正電荷対負電荷の全電荷比は 1. 3 : 2 (0. 6 5) である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH では、リポソームの正電荷対負電荷の全電荷比は 1. 0 : 2. 0 以上である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH では、リポソームの正電荷対負電荷の全電荷比は 1. 9 : 2. 0 以下である。いくつかの実施形態では、生理学的 pH では、リポソームの正電荷対負電荷の全電荷比は、1. 0 : 2. 0 以上 1. 9 : 2. 0 以下である。

10

【0135】

一実施形態では、ナノ粒子は、10 : 0 ~ 1 : 9、好ましくは 8 : 2 ~ 3 : 7、より好ましくは 7 : 3 ~ 5 : 5 のモル比で DOTMA 及び DOPE を含むリポプレックスであり、RNA 中の負電荷に対する DOTMA 中の正電荷の電荷比は、1. 8 : 2 ~ 0. 8 : 2、より好ましくは 1. 6 : 2 ~ 1 : 2、更により好ましくは 1. 4 : 2 ~ 1. 1 : 2、更により好ましくは約 1. 2 : 2 である。一実施形態では、ナノ粒子は、10 : 0 ~ 1 : 9、好ましくは 8 : 2 ~ 3 : 7、より好ましくは 7 : 3 ~ 5 : 5 のモル比で DOTMA 及びコレステロールを含むリポプレックスであり、RNA 中の負電荷に対する DOTMA 中の正電荷の電荷比は、1. 8 : 2 ~ 0. 8 : 2、より好ましくは 1. 6 : 2 ~ 1 : 2、更により好ましくは 1. 4 : 2 ~ 1. 1 : 2、更により好ましくは約 1. 2 : 2 である。一実施形態では、ナノ粒子は、10 : 0 ~ 1 : 9、好ましくは 8 : 2 ~ 3 : 7、より好ましくは 7 : 3 ~ 5 : 5 のモル比で DOTAP 及び DOPE を含むリポプレックスであり、RNA 中の負電荷に対する DOTMA 中の正電荷の電荷比は、1. 8 : 2 ~ 0. 8 : 2、より好ましくは 1. 6 : 2 ~ 1 : 2、更により好ましくは 1. 4 : 2 ~ 1. 1 : 2、更により好ましくは約 1. 2 : 2 である。一実施形態では、ナノ粒子は、DOTMA と DOPE とを 2 : 1 ~ 1 : 2、好ましくは 2 : 1 ~ 1 : 1 のモル比で含むリポプレックスであり、RNA 中の負電荷に対する DOTMA 中の正電荷の電荷比は 1. 4 : 1 以下である。一実施形態では、ナノ粒子は、DOTMA とコレステロールとを 2 : 1 ~ 1 : 2、好ましくは 2 : 1 ~ 1 : 1 のモル比で含むリポプレックスであり、RNA 中の負電荷に対する DOTAP 中の正電荷の電荷比は 1. 4 : 1 以下である。

20

30

【0136】

一実施形態では、ナノ粒子又はリポソームのゼータ電位は、-5 以下、-10 以下、-15 以下、-20 以下又は -25 以下である。様々な実施形態では、ナノ粒子又はリポソームのゼータ電位は、-35 以上、-30 以上又は -25 以上である。一実施形態では、ナノ粒子又はリポソームは、0 mV ~ -50 mV、好ましくは 0 mV ~ -40 mV 又は -10 mV ~ -30 mV のゼータ電位を有する。

40

【0137】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子又はリポソームの多分散指数は、動的光散乱によって測定される場合、0. 5 以下、0. 4 以下、又は 0. 3 以下である。

【0138】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子又はリポソームは、動的光散乱によって測定される場合、約 50 nm ~ 約 1000 nm、約 100 nm ~ 約 800 nm、約 200 nm ~ 約 600 nm、約 250 nm ~ 約 700 nm、又は約 250 nm ~ 約 550 nm の範囲の平均径を有する。

【0139】

50

いくつかの実施形態では、PCVを、例えばリポソーム製剤中で、15 μg、25 μg、38 μg、50 μg、又は100 μgの用量で静脈内投与する。いくつかの実施形態では、15 μg、25 μg、38 μg、50 μg又は100 μgのRNAが、用量あたりで送達される（すなわち、用量重量は投与されたRNAの重量を反映し、投与された製剤又はリポプレックスの総重量を反映しない）。2種以上のPCVを対象に投与してもよく、例えば、対象に、ネオエピトープの組合せを有する1種のPCVを投与し、ネオエピトープの異なる組合せを有する別個のPCVも投与する。いくつかの実施形態では、10個のネオエピトープを有する第1のPCVを、10個の代替エピトープを有する第2のPCVと組み合わせて投与する。

【0140】

いくつかの実施形態では、PCVを、脾臓に送達されるように投与する。例えば、1種以上抗原（複数可）（例えば、患者特異的ネオ抗原）が抗原提示細胞（例えば、脾臓において）に送達されるように、PCTを投与することができる。

【0141】

本開示のPCV又はRNAワクチンのいずれも、本明細書に記載の方法において用途を見出すことができる。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のPD-1軸結合アンタゴニストを、個別化がんワクチン（PCV）、例えば上記のRNAワクチンと組み合わせて投与する。

【0142】

本開示のRNAワクチンのいずれかをコードするDNA分子を、本明細書中に更に提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のDNA分子は、以下の一般構造（5'→3'方向）を含む：（1）5'非翻訳領域（UTR）をコードするポリヌクレオチド配列；（2）分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；（3）主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列；（4）3'UTRをコードするポリヌクレオチド配列であって、（a）Split（AES）mRNAのアミノ末端エンハンサー又はその断片の3'非翻訳領域；及び（b）ミトコンドリアにコードされた12S RNA又はその断片の非コードRNAを含む3'UTR；並びに（5）ポリ（A）配列をコードするポリヌクレオチド。いくつかの実施形態では、本開示のDNA分子は、5'→3'方向に、ポリヌクレオチド配列GGCGAAGCTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGGCCGGAAGC（配列番号40）及びポリヌクレオチド配列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGTATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGGTGATGTGTCAGACGGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGGCCGCGCCAGCTCTGATAGCGCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACCTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCTTTCCCGTCCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCCAGGTATGCTCCCCACCTCCACCTGCCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACTTTAGCAATAAACGAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCTGCTAGCCGCGTCTCT（配列番号41）を含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、DNA分子は、5'→3'方向に、アミノ酸リンカーをコードするポリヌクレオチド配列、及びネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列を更に含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸リンカー及びネオエピトープをコードするポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列は、リンカー-ネオエピトープモジュール（例えば、同じオープンリーディングフレーム内の5'→3'方向の連続配列）を形成する。いくつかの実施形態では、リンカー-ネオエピトープモジュールを形成するポリヌクレオチド配列は、5'→3'方向に、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列との間、又は配列番号40の配列と配列番号41の配列との間にある。いくつかの実施形態では、DNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、28個、29個、又は30個のリンカー-エピトープモジュールを含み、各リンカー-エピトープモジュールは異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、DNA分子は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含み、DNA分子は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は20個の異なるネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、DNA分子は、5個、10個、又は20個のリンカー-エピトープモジュールを含む。いくつかの実施形態では、リンカー-エピトープモジュールのそれぞれは、異なるネオエピトープをコードする。いくつかの実施形態では、リンカー-エピトープモジュールは、同じオープンリーディングフレーム内で5'→3'方向に連続配列を形成する。いくつかの実施形態では、第1のリンカー-エピトープモジュールのリンカーをコードするポリヌクレオチド配列は、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の3'である。いくつかの実施形態では、最後のリンカー-エピトープモジュールのネオエピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、MHC分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチド配列の5'である。

10

20

30

40

50

【0144】

本開示のDNA分子を転写すること（例えば、直鎖状の二本鎖DNA又はプラスミドDNAの転写によって、例えば*in vitro*転写によって）を含む、本開示のRNAワクチンのいずれかを製造する方法も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、該方法は、転写されたRNA分子をDNA分子から単離及び／又は精製する工程を更に含む。

【0145】

いくつかの実施形態では、本開示のRNA又はDNA分子は、5'RNAポリメラーゼプロモーターの制御下でRNAが転写されることを可能にし、ポリアデニルカセット（ポリ（A）配列）を含むIIS型制限切断部位を含み、認識配列はポリ（A）配列の3'側に位置するが、切断部位は上流側に位置し、したがってポリ（A）配列内に位置する。IIS型制限切断部位での制限切断は、米国特許第9,476,055号及び同第10,106,800号に記載されるように、プラスミドをポリ（A）配列内で線状化することを可能にする。次いで、線状化プラスミドを*in vitro*転写のための鋳型として使用することができ、得られた転写物はマスクされていないポリ（A）配列で終わる。米国特許第9,476,055号及び同第10,106,800号に記載されているIIS型制限切断部位のいずれかをを用いてもよい。

IV. PD-1軸結合アンタゴニスト

【0146】

いくつかの実施形態では、本開示のPCV（例えば、RNAワクチン）を、PD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて投与する。

【0147】

例えば、PD-1軸結合アンタゴニストとしては、PD-1結合アンタゴニスト、PDL1結合アンタゴニスト、及びPDL2結合アンタゴニストが挙げられる。「PD-1」の

代替名としては、CD279及びSLEB2が挙げられる。「PDL1」の代替名としては、B7-H1、B7-4、CD274及びB7-Hが挙げられる。「PDL2」の代替名としては、B7-DC、Btdc、及びCD273が挙げられる。いくつかの実施形態では、PD-1、PDL1、及びPDL2は、ヒトPD-1、PDL1、及びPDL2である。

【0148】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のそのリガンド結合パートナー（複数可）への結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、PD-1のリガンド結合パートナーは、PDL1及び／又はPDL2である。別の実施形態では、PDL1結合アンタゴニストは、PDL1のその結合パートナー（複数可）への結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、PDL1の結合パートナー（複数可）は、PD-1及び／又はB7-1である。別の実施形態では、PDL2結合アンタゴニストは、PDL2のその結合パートナー（複数可）への結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、PDL2の結合パートナーは、PD-1である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、又はオリゴペプチドであってもよい。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体）である。

【0150】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ（CAS登録番号946414-94-4）である。ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb/Ono）、別名、MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、及びOPDIVO（登録商標）は、国際公開第2006/121168号に記載の抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

20

(a) 該重鎖は、アミノ酸配列：QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY DGSKRYAYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND D YW G QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLG LTKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVE SKYGP P C P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G（配列番号11）、及び

30

(b)、を含み、該軽鎖は、アミノ酸配列：EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQSSSNWPRTFGQG T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C（配列番号12）を含む。

40

【0151】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号11及び配列番号12からの6つのHVR配列（例えば、配列番号11からの3つの重鎖HVR及び配列番号12からの3つの軽鎖HVR）を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号11からの重鎖可変ドメイン及び配列番号12からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0152】

50

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ペムブロリズマブ（CAS登録番号：1374853-91-4）である。ペムブロリズマブ（Merck）、別名、MK-3475、Merck 3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）、及びSCH-900475は、国際公開第2009/114335号に記載の抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

（a）該重鎖は、アミノ酸配列：

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTNYMYWVRQA
PGQGLEWMGG INPSNGGTNFKNRRVTLTTDSSTTTA
YME LKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDFW GQGTTVT
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCP APEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVHLHQLDNLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAK GQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLG（配列番号13）、及び

10

（b）、を含み、該軽鎖は、アミノ酸配列：

EIVLTQSPAT LSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHW
YQQKPGQAPRLLIYLYSLYLES GVPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFFGGGTKVEIKRTVAAPS
VF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号14）を含む。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号13及び配列番号14からの6種類のHVR配列（例えば、配列番号13からの3種類の重鎖HVR及び配列番号14からの3種類の軽鎖HVR）を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号13からの重鎖可変ドメイン及び配列番号14からの軽鎖可変ドメインを含む。

30

【0154】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、MEDI-0680（AMP-514；AstraZeneca）である。MEDI-0680はヒト化IgG4抗PD-1抗体である。

【0155】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PDR001（CAS登録番号1859072-53-9；Novartis）である。PDR001は、PD-1へのPDL1及びPDL2の結合をブロックする、ヒト化IgG4抗PD1抗体である。

【0156】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、REGN2810（Regeneron）である。REGN2810は、LIBTAYO（登録商標）及びセミプリマブ-rwlcとしても知られるヒト抗PD1抗体である。

40

【0157】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、BGB-108（BeiGene）である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、BGB-A317（BeiGene）である。

【0158】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、JS-001（Shanghai Junshi）である。JS-001はヒト化抗PD1抗体である。

【0159】

50

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体はSTI-A1110 (Sorrento) である。STI-A1110はヒト抗PD1抗体である。

【0160】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、INC SHR-1210 (Incyte) である。INC SHR-1210は、ヒトIgG4抗PD1抗体である。

【0161】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PF-06801591 (Pfizer) である。

【0162】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、TSR-042 (ANB011としても知られている; Tesaro / AnaptysBio) である。

10

【0163】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、AM0001 (ARMO Biosciences) である。

【0164】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ENUM 244C8 (Enumeral Biomedical Holdings) である。ENUM 244C8は、PDL1とPD-1の結合を阻害することなく、PD-1の機能を阻害する抗PD1抗体である。

【0165】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ENUM 388D4 (Enumeral Biomedical Holdings) である。ENUM 388D4は、PDL1のPD-1に対する結合を競合的に阻害する抗PD1抗体である。

20

【0166】

いくつかの実施形態では、PD-1抗体は、6つのHVR配列（例えば、3つの重鎖HVR及び3つの軽鎖HVR）及び／又は、国際公開第2015/112800号（出願人：Regeneron）、国際公開第2015/112805号（出願人：Regeneron）、国際公開第2015/112900号（出願人：Novartis）、米国特許出願公開第20150210769号（Novartisに譲渡）、国際公開第2016/089873号（出願人：Celgene）、国際公開第2015/035606号（出願人：Beigene）、国際公開第2015/085847号（出願人：Shanghai Hengrui Pharmaceutical / Jiangsu Hengrui Medicine）、国際公開第2014/206107号（出願人：Shanghai Junshi Biosciences / Junmeng Biosciences）、国際公開第2012/145493号（出願人：Amplimmune）、米国特許第9205148号（MedImmuneに譲渡）、国際公開第2015/119930号（出願人：Pfizer / Merck）、国際公開第2015/119923号（出願人：Pfizer / Merck）、国際公開第2016/032927号（出願人：Pfizer / Merck）、国際公開第2014/179664号（出願人：AnaptysBio）、国際公開第2016/106160号（出願人：Enumeral）、及び国際公開第2014/194302号（出願人：Sorrento）に記載されるPD-1抗体からの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。

30

40

【0167】

いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のFc領域に融合したPDL1又はPDL2の細胞外又はPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン）である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストはAMP-224である。B7-DCIgとしても知られるAMP-224（CAS登録番号1422184-00-6; GlaxoSmithKline / MedImmune）は、国際公開第2010/027827号及び同第2011/066342号に記載されているPDL2-Fc融合可溶性受容体である。

【0168】

50

いくつかの実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、ペプチド又は低分子化合物である。いくつかの実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、AUNP-12 (Pierre Fabre / Aurigene) である。例えば、国際公開第 2012 / 168944 号、同第 2015 / 036927 号、同第 2015 / 044900 号、同第 2015 / 033303 号、同第 2013 / 144704 号、同第 2013 / 132317 号及び同第 2011 / 161699 を参照。

【0169】

いくつかの実施形態では、PDL1 結合アンタゴニストは、PD-1 を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PDL1 結合アンタゴニストは、PDL1 を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PDL1 結合アンタゴニストは、PDL1 及び VISTA を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PDL1 結合アンタゴニストは、CA-170 (AUPM-170 としても知られている) である。いくつかの実施形態では、PDL1 結合アンタゴニストは、PDL1 及び TIM3 を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、小分子は、国際公開第 2015 / 033301 号及び同第 2015 / 033299 号に記載されている化合物である。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、PD-1 軸結合アンタゴニストは、抗 PDL1 抗体である。本明細書では、様々な抗 PDL1 抗体が企図され、記載されている。本明細書における実施形態のうちのいずれかでは、単離された抗 PDL1 抗体は、ヒト PDL1、例えば、UniProtKB / Swiss-Prot 受託番号 Q9NZQ7.1 に示されるヒト PDL1、又はその変異体に結合することができる。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、PDL1 と PD-1 との間の結合及び／又は PDL1 と B7-1 との間の結合を阻害することができる。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 及び (Fab')₂ 断片からなる群から選択される抗体断片である。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、ヒト抗体である。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、ヒト抗体である。本発明の方法に有用な抗 PDL1 抗体の例、及びそれらの作製方法は、PCT 特許出願第 2010 / 077634 A1 号及び米国特許第 8,217,149 号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0171】

いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含み、

30

(a) 重鎖可変領域が、それぞれ GFTFSDSWIH (配列番号 1)、AWISPYGGSTYYADSVKG (配列番号 2) 及び RHWPGGFDY (配列番号 3) の HVR-H1、HVR-H2 及び HVR-H3 の配列を含み、

(b) 軽鎖可変領域は、それぞれ RASQDVSTAVA (配列番号 4)、SASFLYS (配列番号 5) 及び QQYLYHPAT (配列番号 6) の HVR-L1、HVR-L2 及び HVR-L3 の配列を含む。

【0172】

いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、アテゾリズマブ及び TECENTRIQ (登録商標) (CAS 登録番号: 1422185-06-5) としても知られている MPDL3280A であり、2015 年 1 月 16 日に発行された WHO Drug Information (International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances)、Proposed INN: List 112, Vol. 28, No. 4 に記載されている (485 頁を参照) に記載されている。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

40

(a) 該重鎖可変領域配列は、アミノ酸配列: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR

50

HWPGGFDYWGQGT LVT VSS (配列番号7)、及び

(b)、を含み、該軽鎖可変領域配列は、アミノ酸配列：DIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYLY
HPATFGQGGTKVEIKR (配列番号8)を含む。

【0173】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

(a) 該重鎖は、アミノ酸配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF
DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC
LVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVS
VLT VLV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号9)、及び

(b)、を含み、該軽鎖は、アミノ酸配列：DIQMTQSPSSLSASVGDRT
ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQ
GTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号1
0)を含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、アベルマブ(CAS登録番号153703
2-82-8)である。MSB0010718Cとしても知られるアベルマブは、ヒトモ
ノクローナルIgG1抗PDL1抗体(Merck KGaA、Pfizer)である。

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

(a) 該重鎖は、アミノ酸配列：EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSSGGITFYADTVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVT
TVDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAL
GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRV
VSVLT VLV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号15)、及び

(b) 該軽鎖は、アミノ酸配列：QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT
SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFS
GSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSSYTSSSTRVFGTGT
KVTVLGQPKANPTVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLT
PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号16)を
含む。

10

20

30

40

50

【0175】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号15及び配列番号16からの6つのHVR配列を含む（例えば、配列番号15の3つの重鎖HVR及び配列番号16の3つの軽鎖HVR）。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号15からの重鎖可変ドメイン及び配列番号16からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、デュルバルマブ（CAS登録番号：1428935-60-7）MED I 4736としても知られるデュルバルマブは、国際公開第2011/066389号及び米国特許出願公開第2013/034559号に記載されている、Fc最適化ヒトモノクローナルIgG1カッパ抗PDL1抗体（MedImmune、AstraZeneca）である。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖及び軽鎖配列を含み、

10

（a）該重鎖は、アミノ酸配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEFEFGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号17）、及び

20

（b）該軽鎖は、アミノ酸配列：EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRA SQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQG TKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC（配列番号18）を含む。

30

【0177】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号17及び配列番号18からの6つのHVR配列を含む（例えば、配列番号17の3つの重鎖HVR及び配列番号18の3つの軽鎖HVR）。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号17からの重鎖可変ドメイン及び配列番号18からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0178】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、MDX-1105（Bristol Myers Squibb）である。MDX-1105、別名、BMS-936559は、国際公開第2007/005874号に記載の抗PDL1抗体である。

40

【0179】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、LY3300054（Eli Lilly）である。

【0180】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体はSTI-A1014（Sorrento）である。STI-A1014はヒト抗PDL1抗体である。

【0181】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体はKN035（Suzhou Alphama b）である。KN035は、ラクダファージディスプレイライブラリーから生成されたシングルドメイン抗体（dAB）である。

50

【0182】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、（例えば、腫瘍微小環境中のプロテアーゼによって）切断されると、抗体抗原結合ドメインを活性化して、例えば、非結合性立体部位を除去することによって、その抗原を結合させることができるようにする、切断可能な部位又はリンカーから構成される。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体はCX-072 (CytomX Therapeutics) である。

【0183】

いくつかの実施形態では、PDL1抗体は、6つのHVR配列（例えば、3つの重鎖HVR及び3つの軽鎖HVR）、並びに／又は米国特許出願公開第20160108123号（Novartisに譲渡）、国際公開第2016/000619号（出願人：Beigene）、同第2012/145493号（出願人：Amplimmune）、米国特許第9205148号（MedImmuneに譲渡）、国際公開第2013/181634号（出願人：Sorrento）、及び同第2016/061142号（出願人：Novartis）に記載されたPDL1抗体からの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0184】

なお更なる具体的な一態様では、本抗体は、ヒト又はマウス定常領域を更に含む。なお更なる一態様では、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なお更なる具体的な一態様では、ヒト定常領域は、IgG1である。なお更なる一態様では、マウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なお更なる態様では、マウス定常領域は、IgG2Aである。

20

【0185】

なお更なる具体的な一態様では、本抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。更に具体的な一態様では、最小のエフェクター機能は、「エフェクターのないFc突然変異」又はグリコシル化突然変異から生じる。なお更なる一実施形態では、エフェクターなしのFc変異は、定常領域内のN297A又はD265A/N297A置換である。いくつかの実施形態では、単離された抗PDL1抗体は、アグリコシル化される。抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド内でのこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O結合型グリコシル化とは、糖類、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの1種のヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はトレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用され得る。抗体からのグリコシル化部位の除去は、（N結合型グリコシル化部位について）上述のトリペプチド配列のうちの1種が除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成される。この改変は、グリコシル化部位内のアスパラギン、セリン、又はトレオニン残基の別のアミノ酸残基（例えば、グリシン、アラニン又は保存的置換）との置換によって行われ得る。

30

40

【0186】

なお更なる一実施形態では、本開示は、上述の抗PDL1抗体のうちのいずれかと少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体とを組み合わせる含む組成物を提供する。

【0187】

なお更なる一実施形態では、本開示は、本明細書に提供される抗PDL1、抗PD-1、若しくは抗PDL2抗体、又はその抗原結合断片と、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、個体に投与する抗PDL1、抗PD-1、若しくは抗PDL2抗体、又はその抗原結合断片は、1種以上の薬学的に許容可能な担体を含む組成物である。本明細書に記載の又は当該技術分野で既知の薬学的

50

に許容可能な担体のうちのいずれかが使用され得る。

V. 抗体調製

【0188】

本明細書に記載の抗体は、抗体を生成するための当該技術分野で利用可能な技法を使用して調製され、その例示的な方法は、以下の節により詳細に記載される。

【0189】

抗体は、目的の抗原（例えば、ヒトのPD-1又はPD-L1等のPD-1又はPD-L1）を対象とする。好ましくは、抗原は、生物学的に重要なポリペプチドであり、障害に罹患している哺乳動物への抗体の投与により、その哺乳動物に治療的利益がもたらされ得る。

【0190】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、 $1\mu\text{M}$ 以下、 150nM 以下、 100nM 以下、 50nM 以下、 10nM 以下、 1nM 以下、 0.1nM 以下、 0.01nM 以下、又は 0.001nM 以下（例えば、 10^{-8}M 以下、例えば $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（ K_d ）を有する。

【0191】

一実施形態では、 K_d は、以下のアッセイにより説明されるように、目的の抗体のFabバージョン及びその抗原を用いて行われる放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定系の存在下で、最小濃度の（ 125I ）標識抗原によりFabを平衡化し、次いで、結合した抗原を抗Fab抗体でコーティングしたプレートで捕捉することによって測定する（例えば、Chenら、J. Mol. Biol.、293：865～881（1999）を参照）。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、 50mM の炭酸ナトリウム（ $\text{pH}9.6$ ）中の $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の捕捉用抗Fab抗体（Cappel Labs）で一晩コーティングし、その後、PBS中の2%（w/v）ウシ血清アルブミンで2～5時間、室温（およそ 23°C ）でブロッキングする。非吸着性プレート（Nunc番号269620）中、 100pM 又は 26pM の $[125\text{I}]$ 抗原を、目的のFabの段階希釈液と混合する。次いで、目的のFabを一晩インキュベートするが、インキュベーションをより長い期間（例えば、約65時間）続けて、平衡に達することを保証してもよい。その後、室温でのインキュベーション（例えば、1時間）のために混合物を捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、PBS中の0.1%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150\mu\text{L}/\text{ウェル}$ のシンチラント（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を添加し、プレートを10分間、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）上で計数する。最大結合の20%以下をもたらす各Fabの濃度を、競合結合アッセイでの使用のために選択する。

【0192】

別の実施形態によると、 K_d は、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc.、Piscataway, NJ）を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、 25°C で、約10の応答ユニット（RU）で固定化抗原CM5チップを用いて測定される。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）を、供給業者の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を、 $\text{pH}4.8$ の 10mM の酢酸ナトリウムによって、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ （約 $0.2\mu\text{M}$ ）に希釈した後、 $5\mu\text{L}/\text{分}$ の流速でインジェクトし、カップリングされたタンパク質のおよそ10応答ユニット（RU）を達成する。抗原のインジェクション後、 1M のエタノールアミンをインジェクトして、未反応基をブロックする。キネティクス測定のために、Fab（ $0.78\text{nM}\sim 500\text{nM}$ ）の2倍段階希釈物（0.05%のポリソルベート20（TW

10

20

30

40

50

EEN-20 (商標) 界面活性剤 (PBST) を有する PBS 中) を、25℃で、およそ 25 μ l/分の流速でインジェクトする。会合速度 (kon) 及び解離速度 (koff) を、単純 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIAcore (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用して、会合及び解離センサグラムを同時にフィッティングすることによって、計算する。平衡解離定数 (Kd) は、koff/kon 比として算出される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が、106 M⁻¹s⁻¹ を超える場合、会合速度は、ストップフローを備えた分光光度計 (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを有する 8000 シリーズ SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) 等の分光計で測定されるように、増加する抗原濃度の存在下、25℃で、PBS (pH 7.2) 中の 20 nM 抗-抗原抗体 (Fab 形態) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm バンドパス) の増加又は減少を測定する蛍光消光技法を使用して決定することができる。

10

キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体

【0193】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第 4,816,567 号、及び Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域) 及びヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが、親抗体のそれから変更されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

20

【0194】

ある特定の実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減させる一方で、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持するようにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR (又はその一部) が非ヒト抗体由来であり、かつ FR (又はその一部) がヒト抗体配列由来である、1 つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかの FR 残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復、又は改善するように、非ヒト抗体 (例えば、HVR 残基が由来する抗体) 由来の対応する残基で置換される。

30

【0195】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) でレビューされ、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第 5,821,337 号、同第 7,527,791 号、同第 6,982,321 号、及び同第 7,087,409 号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) グラフトの記載)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」の記載)、Dall'Aquila et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FR シャッフリング」の記載)、並びに Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 及び Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FR シャッフリングの「ガイド付き選択」アプローチの記載) に更に記載されている。

40

【0196】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、以下のものが含まれるが、これらに

50

限定されるものではない：「ベストフィット」法を用いて選択されたフレームワーク領域（例えば、Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993) を参照）；軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；及び Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照）；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci., 13:1619-1633 (2008) を参照）；並びにFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem., 272:10678-10684 (1997)、及び Rosok et al., J. Biol. Chem., 271:22611-22618 (1996) を参照）。

10

【0197】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を使用して産生され得る。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol., 20:450-459 (2008) に記載されている。

【0198】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座に取って代わるヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含むか、又は染色体外に存在するか、又は動物の染色体にランダムに統合されている。そのようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法のレビューについては、Lonberg, Nat. Biotech., 23:1117-1125 (2005) を参照されたい。また、例えば、XENOMOUSE（商標）技術を記載する米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号；HuMab（登録商標）技術を記載する米国特許第5,770,429号；K-M MOUSE（登録商標）技術を記載する米国特許第7,041,870号；及び、VelociMouse（登録商標）技術を記載する米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたい。かかる動物によって生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって更に修飾され得る。

20

30

【0199】

また、ヒト抗体は、ハイブリドーマを用いた方法で作製することができる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髓腫細胞株及びマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及び Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991) を参照）ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体もまた、Lie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する）、及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する）を含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)

40

50

）及び Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3) : 185-91 (2005) にも記載されている。

【0200】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択される Fv クローン可変ドメイン配列を単離することによって生成することができる。その後、そのような可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組合せられ得る。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法を、以下に記載する。

抗体断片

【0201】

抗体断片は、酵素消化等の従来手段又は組換え技法によって生成され得る。ある特定の状況下では、全抗体ではなく抗体断片を使用する利点がある。より小さいサイズの断片により、迅速なクリアランスが可能になり、固形腫瘍へのアクセスの改善がもたらされ得る。ある特定の抗体断片のレビューについては、Hudson ら (2003) Nat. Med. 9 : 129-134 を参照されたい。

【0202】

抗体断片を産生するために、様々な技法が開発されている。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク分解を介して得られていた（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 : 107-117 (1992)、及び Brennan et al., Science, 229 : 81 (1985) を参照）。しかしながら、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接産生することができる。Fab、Fv、及び ScFv 抗体断片は全て、大腸菌中で発現され、大腸菌から分泌され得るため、これらの断片の容易な大量生産が可能である。抗体断片を、上記の抗体ファージライブラリから単離することができる。代替的に、Fab'-SH 断片は、大腸菌から直接回収され、化学的にカップリングして、F(ab')₂ 断片を形成することができる (Carter et al., Bio/Technology 10 : 163-167 (1992))。別のアプローチによると、F(ab')₂ 断片を、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivo 半減期が増加した、Fab 及び F(ab')₂ 断片については、米国特許第 5,869,046 号に記載されている。抗体断片を産生するための他の技法は、当業者に明らかであろう。ある特定の実施形態では、抗体は、一本鎖 Fv 断片 (scFv) である。国際公開第 93/16185 号、米国特許第 5,571,894 号、及び同第 5,587,458 号を参照されたい。Fv 及び scFv は、定常領域を欠くインタクトな結合部位を有する唯一の種であり、それゆえに、それらは、in vivo での使用中の非特異的結合の低減に好適であり得る。scFv 融合タンパク質を構築して、scFv のアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれかでのエフェクタータンパク質の融合をもたらすことができる。上記の Antibody Engineering, ed. Borrebaeck を参照されたい。抗体断片はまた、例えば、米国特許第 5,641,870 号に記載されているように、「直鎖状抗体」であり得る。このような直鎖状抗体は、単一特異性又は二重特異性であり得る。

単ドメイン抗体

【0203】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は単ドメイン抗体である。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部を含む、単一のポリペプチド鎖である。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, Mass.、例えば、米国特許第 6,248,516 B1 号を参照)。一実施形態では、単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部からなる。

抗体変異体

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列修飾（複数可）が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善させることが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な変化を導入することによって、又はペプチド合成によって調製することができる。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び／又は挿入、及び／又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組合せにより、最終構築物に到達することができるが、但し、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。主題の抗体のアミノ酸配列が作製されるときに、アミノ酸改変がその配列に導入されてもよい。

置換、挿入、及び欠失変異体

【0205】

ある特定の実施形態では、1種以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換による変異導入のための目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換を表3に示す。より実質的な変化は、表1において、「例示的な置換」という見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して以下に更に記載されている通りである。目的の抗体中にアミノ酸置換を導入することができ、その産物を、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、又は改善されたADCC若しくはCDCについてスクリーニングする。

表3. 保存的置換

元々の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l ; L e u ; I l e	V a l
A r g (R)	L y s ; G l n ; A s n	L y s
A s n (N)	G l n ; H i s ; A s p , L y s ; A r g	G l n
A s p (D)	G l u ; A s n	G l u
C y s (C)	S e r ; A l a	S e r
G l n (Q)	A s n ; G l u	A s n
G l u (E)	A s p ; G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n ; G l n ; L y s ; A r g	A r g
I l e (I)	L e u ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e ; ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン ; I l e ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e	I l e
L y s (K)	A r g ; G l n ; A s n	A r g
M e t (M)	L e u ; P h e ; I l e	L e u
P h e (F)	T r p ; L e u ; V a l ; I l e ; A l a ; T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l ; S e r	S e r
T r p (W)	T y r ; P h e	T y r
T y r (Y)	T r p ; P h e ; T h r ; S e r	P h e
V a l (V)	I l e ; L e u ; M e t ; P h e ; A l a ; ノルロイシン	L e u

【0206】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従ってグループ化され得る。

- a. 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- b. 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- c. 酸性：A s p、G l u；

d. 塩基性：H i s、L y s、A r g；

e. 影響する残基

鎖配向：G l y、P r o；

f. 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0207】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うことになる。

【0208】

一種の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、更なる研究のために選択される、得られた変異体（複数可）は、親抗体と比較して、ある特定の生物学的特性（例えば、増加した親和性、低減した免疫原性）における修飾（例えば、改善）を有し、かつ／又は実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的特性を有することになる。例示的な置換変異体は、親和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載のファージディスプレイに基づく親和性成熟技法等を使用して、簡便に作成されてもよい。簡潔には、1つ以上のHVR残基が変異を受け、変異体抗体がファージにディスプレイされ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

10

【0209】

改変（例えば、置換）をHVRに行い、例えば、抗体親和性を改善することができる。このような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で変異が起こるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179~196 (2008)を参照）、及び／又はSDR（a-CDR）において行われてもよく、得られた変異体VH又はVLが、結合親和性について試験される。二次ライブラリからの構築と再選択による親和性成熟化は、例えば、Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態では、多様な方法（例えば、エラープローンPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指向性変異導入）のいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリが作製される。次いで、このライブラリをスクリーニングして、所望の親和性を有する抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4~6個の残基）をランダム化する、HVR指向性アプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異導入又はモデリングを使用して、具体的に同定され得る。特に、CDR-H3及びCDR-L3が、標的にされることが多い。

20

30

【0210】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、このような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書で提供される保存的置換）が、HVR中になされてもよい。このような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDR外であってもよい。上に提供される変異体VH及びVL配列のある特定の実施形態では、各HVRは、改変されていないか、又は1つ、2つ、若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

40

【0211】

変異導入の標的となり得る抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャニング変異導入」と呼ばれる。この方法では、一残基又は一群の標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、及びglu等の荷電残基）が同定され、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置き換えられて、抗体の抗原との相互作用が影響を受けたかどうか

50

が判定される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入されてもよい。あるいは、又は加えて、抗体と抗原との間の接点を特定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。そのような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的とされるか、又は除去されてもよい。変異体は、所望の特性を有するか否かを判定するためにスクリーニングされてもよい。

【0212】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合、並びに1個又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異体としては、（例えば、ADEPTのために）抗体の血清半減期を増加させる酵素又はポリペプチドへの抗体のN末端又はC末端の融合が挙げられる。

10

グリコシル化変異体

【0213】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように変化する。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作り出されるか、又は除去されるようにアミノ酸配列を改変させることにより好都合に達成され得る。

【0214】

抗体がFc領域を構成する場合、抗体に付着している糖質を変化させてもよい。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297へのN-連結によって一般的に結合された分岐したバイアンテナリーオリゴ糖を含む。例えば、Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997) を参照されたい。オリゴ糖は、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びにバイアンテナリーオリゴ糖構造の「ステム」のGlcNAcに付着したフコースを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ある特定の特性が改善された抗体変異体を作製するために、本開示の抗体におけるオリゴ糖の修飾が行われ得る。

20

【0215】

一実施形態では、Fc領域を含む抗体変異体が提供され、Fc領域に結合した炭水化物構造は、フコースが減少しているか、又はフコースを欠き、これによりADCC機能が改善され得る。具体的には、野生型CHO細胞で産生される同じ抗体のフコースの量と比較してフコースが減少した抗体が本明細書で企図される。すなわち、それらは、それらが天然CHO細胞（例えば、天然FUT8遺伝子を含むCHO細胞等の天然グリコシル化パターンを産生するCHO細胞）によって産生された場合にさもないと有するであろう量よりも少ない量のフコースを有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、本抗体は、そのN結合型グリカンの約50%、40%、30%、20%、10%、又は5%未満がフコースを含む抗体である。例えば、かかる抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、又は20%~40%であり得る。ある特定の実施形態では、本抗体は、そのN結合型グリカンのいずれもフコースを含まない抗体であり、すなわち、本抗体は、フコースを全く有しないか、又はフコースを有しないか、又はアフコシル化されている。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されたように、Asn297（例えば、複合体構造、ハイブリッド構造、及び高マンノース構造）に付着した全ての糖鎖構造の合計に対するAsn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のEU番号付け）に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体におけるマイナーな配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸の上流又は下流、すなわち、294~300位の間に位置してもよい。このようなフコシル化変異体は、ADCCの機能を改善している可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号

30

40

50

(Presta, L.) ; 同第2004/0093621号 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠乏」抗体変異体に関する刊行物の例としては：米国特許出願公開第2003/0157108号；国際公開第2000/61739号；同第2001/29246号；米国特許出願公開第2003/0115614号；同第2002/0164328号；同第2004/0093621号；同第2004/0132140号；同第2004/0110704号；同第2004/0110282号；同第2004/0109865号；国際公開第2003/085119号；同第2003/084570号；同第2005/035586号；同第2005/035778号；同第2005/053742号；同第2002/031140号；Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) ; Yamané-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を生成可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化で欠失したLec13 CHO細胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986) ; 米国特許出願公開第2003/0157108A1号、Presta, L ; 及び国際公開第2004/056312A1号、Adamset al. , 特に実施例11において)、並びに α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞等のノックアウト細胞株 (例えば、Yamané-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004) ; Kanda, Y. et al. , Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006) ; 及び国際公開第2003/085107号を参照) が挙げられる。

10

20

【0216】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖を有する抗体変異体が更に提供される。そのような抗体変異体は、低減されたフコシル化及び／又は改善されたADCC機能を有していてもよい。このような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号 (Jean-Mairet et al.) ; 米国特許第6,602,684号 (Umana et al.) ; 米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umana et al.)、及びFerrara et al. , Biotechnology and Bioengineering, 93(5):851-861 (2006) に記載されている。Fc領域に付着したオリゴ糖の少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、CDCの機能を改善している可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号 (Patel et al.) ; 国際公開第1998/58964号 (Raju, S.)、及び国際公開第1999/22764号 (Raju, S.) に記載される。

30

【0217】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のFc領域を有する抗体変異体は、FcγRIIに結合することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のFc領域を含む抗体変異体は、ヒトエフェクター細胞の存在下でADCC活性を有するか、又はヒトエフェクター細胞の存在下でヒト野生型IgG1Fc領域を有するという点以外は同じ抗体と比較して増加したADCC活性を有する。

40

Fc領域変異体

【0218】

ある特定の実施形態では、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入され、それによって、Fc領域変異体が生成され得る。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含む、ヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 Fc領域) を含み得る。

【0219】

ある特定の実施形態では、本開示は、全てではないが一部のエフェクター機能を有し、それによりin vivoでの抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能 (例

50

例えば、補体及びADCC等)が不要又は有害である用途にとって望ましい候補となる、抗体変異体を企図する。in vitro及び／又はin vivoの細胞毒性アッセイを行い、CDC及び／又はADCC活性の低減／消失を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを行い、抗体がFcγR結合を欠く(ゆえに、ADCC活性を欠く可能性がある)が、FcRn結合能力を保持することを保証することができる。ADCCの媒介のための主要な細胞であるNK細胞は、Fc(RIIIのみを発現する一方で、単球は、Fc(RI、Fc(RII、及びFc(RIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現については、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)の464頁の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するためのin vitroアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059~7063(1986)を参照)、及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985); 5,821,337(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法が用いられ得る(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)、及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照)。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性を、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に開示されているように、動物モデルにおいて、in vivoで評価することができる。C1q結合アッセイを実施して、抗体がC1qに結合することができないために、CDC活性を欠くことを確認してもよい。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号における、C1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052(2003); 及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照)、FcRn結合及びin vivoクリアランス／半減期の判定はまた、当技術分野で公知の方法を使用して行うことができる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照)。

10

20

30

40

50

【0220】

低減したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有する抗体が挙げられる(米国特許第6,737,056号)。そのようなFc変異体には、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体が挙げられ、残基265及び297がアラニンに置換されている、いわゆる「DANA」Fc変異体が含まれる(米国特許第7,332,581号)。

【0221】

FcRへの結合が改善又は減少した特定の抗体変異体が記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照)。

【0222】

ある特定の実施形態では、抗体変異体は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、及び／又は334位(残基のEUナンバリング)で

の置換を有するFc領域を含む。例示的な一実施形態では、本抗体は、そのFc領域に以下のアミノ酸置換を含む：S298A、E333A、及びK334A。

【0223】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642、及びIndusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記載されているように、変化した（すなわち、改善されたか又は減少したかのいずれか）C1q結合及び／又は補体依存性細胞毒性（CDC）をもたらす改変が、Fc領域において行われる。

【0224】

半減期が増加し、母体のIgGの胎児への移行に關与する新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）は米国特許出願公開第2005/0014934号A1（Hinton et al.）に記載されている。これらの抗体は、Fc領域の、FcRnへの結合を改善する1つ以上の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、又は434のうちの1つ以上で置換（例えば、Fc領域残基434の置換（米国特許第7,371,826号））を伴う変異体を含む。Fc領域変異体の他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

VI. 医薬組成物及び製剤

【0225】

例えばがんの処置のための医薬組成物及び製剤も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物及び製剤は、薬学的に許容可能な担体を更に含む。

【0226】

目的の抗体を調製した後（例えば、本明細書に開示されているように製剤化することができる抗体を製造するための技術は、本明細書に精巧に記載されており、当技術分野で知られている）、それを構成する医薬製剤を調製する。ある特定の実施形態では、製剤化される抗体は、事前凍結乾燥に供されておらず、本明細書における目的とする製剤は、水性製剤である。ある特定の実施形態では、抗体は、完全長抗体である。一実施形態では、製剤中の抗体は、F(ab')₂等の抗体断片であり、この場合、完全長抗体では起こり得ない問題（抗体のFabへのクリッピング等）に対処しなければならない場合がある。製剤中に存在する抗体の治療有効量は、例えば、所望の用量体積及び投与様式（複数可）を考慮することによって決定される。約25mg/mL～約150mg/mL、又は約30mg/mL～約140mg/mL、又は約35mg/mL～約130mg/mL、又は約40mg/mL～約120mg/mL、又は約50mg/mL～約130mg/mL、又は約50mg/mL～約125mg/mL、又は約50mg/mL～約120mg/mL、又は約50mg/mL～約110mg/mL、又は約50mg/mL～約100mg/mL、又は約50mg/mL～約90mg/mL、又は約50mg/mL～約80mg/mL、又は約54mg/mL～約66mg/mLは、例示的な製剤中の抗体濃度である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗PD1抗体（アテゾリズマブ等）を、約1200mgの用量で投与する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗PD1抗体（ペンブロリズマブ等）を、約200mgの用量で投与する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗PD1抗体（ニボルマブ等）を、約240mg（例えば、2週間ごと）又は480mg（例えば、4週間ごと）の用量で投与する。

【0227】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のRNAワクチンを、約15µg、約25µg、約38µg、約50µg、又は約100µgの用量で投与する。

【0228】

本明細書に記載の医薬組成物及び製剤は、所望の純度を有する活性成分（例えば、抗体又はポリペプチド等）を1種以上の任意の薬学的に許容可能な担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製され得る。薬学的に許容可能な担体は、一般的に、採用される用量及び濃度において受領者に無毒であり、以下を含むが、これらに限定されるものではない：リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド。血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸。単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤。本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の介在性薬物分散剤を更に含む。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載される。一態様では、SHASEGPを、1種以上の更なるグリコサミノグリカナーゼ（例えば、コンドロイチナーゼ）と合わせる。

10

20

【0229】

例示的な凍結乾燥した抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及び国際公開第2006/044908号に記載されるものが挙げられ、後者の製剤は、酢酸ヒスチジン緩衝液を含む。

30

【0230】

本明細書における組成物及び製剤は、処置される特定の適応症に必要な1種より多くの活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有し得る。かかる有効成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせ好適に存在する。

【0231】

有効成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）内、又はマクロ乳濁液中にも取り込まれ得る。そのような技術が、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

40

【0232】

持続放出性製剤を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、これらのマトリクスは、成形物品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。in vivo投与に使用される製剤は一般に、滅菌される。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜によりフィルタにかけることによって、容易に達成され得る。

【0233】

アテゾリズマブ及びペンブロリズマブの医薬製剤は市販されている。例えば、アテゾリズ

50

マブは、（本明細書の他の箇所に記載されるような）TECENTRIQ（登録商標）の商品名で知られている。ペンブロリズマブは、（本明細書の他の箇所に記載されているように）KEYTRUDA（登録商標）の商品名で知られている。いくつかの実施形態では、アテゾリズマブ及びRNAワクチン、又はペンブロリズマブ及びRNAワクチンは、別々の容器で提供される。いくつかの実施形態では、アテゾリズマブ及びペンブロリズマブは、市販製品と共に入手可能な処方情報に記載されているように、個体への投与のために使用及び／又は調製される。

VII. 処置方法

【0234】

個体においてがんを処置するため又はがんの進行を遅延させるための方法であって、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを個体に投与することを含む方法が、本明細書中に提供される。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

【0235】

本開示のPD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンのいずれも、本明細書中に記載の処置方法において使用が見出され得る。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる10～20個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンは、腫瘍標本中に存在するがん特異的体細胞変異から生じる5～20個のネオエピトープをコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、RNAワクチンはリボプレックスナノ粒子又はリボソームに製剤化される。いくつかの実施形態では、RNA（RNA-リボプレックス）のためのリボプレックスナノ粒子製剤を使用して、本開示のRNAワクチンのIV送達を可能にする。いくつかの実施形態では、PCVを、例えばリボソーム製剤中で、15 µg、25 µg、38 µg、50 µg、又は100 µgの用量で静脈内投与する。いくつかの実施形態では、15 µg、25 µg、38 µg、50 µg又は100 µgのRNAが、用量あたりで送達される（すなわち、用量重量は投与されたRNAの重量を反映し、投与された製剤又はリボプレックスの総重量を反映しない）。2種以上のPCVを対象に投与してもよく、例えば、対象に、ネオエピトープの組合せを有する1種のPCVを投与し、ネオエピトープの異なる組合せを有する別個のPCVも投与する。いくつかの実施形態では、10個のネオエピトープを有する第1のPCVを、10個の代替エピトープを有する第2のPCVと組み合わせて投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、限定されないが、ペンブロリズマブを含む抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、限定されないが、アテゾリズマブを含む抗PD-L1抗体である。

【0236】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、21日又は3週間の間隔で個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、21日又は3週間の間隔で、例えば約200 mgの用量で個体に投与する抗PD-1抗体（例えば、ペンブロリズマブ）である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、21日又は3週間の間隔で、例えば約350 mgの用量で個体に投与する抗PD-1抗体（例えば、センプリマブ-rwlc）である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、21日又は3週間の間隔で、例えば約1200 mgの用量で個体に投与する抗PD-L1抗体（例えば、アテゾリズマブ）である。

【0237】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、14日又は28日の間隔で個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、2週間又は4週間の間隔で個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、14日間、2週間、28日間若しくは4週間の間隔で、例えば14日間若しくは2週間の間隔で約240 mgの用量で、又は28日間若しくは4週間の間隔で約480 mgの用量で個体に投与する抗PD-1抗体（例えば、ニボルマブ）である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、21日間又は3週間の間隔で、例えば、

1、2、3、又は4回の用量で約1mg/kgの用量で、任意に、抗CTLA-4抗体（例えば、イピリマブ）と組み合わせて個体に投与する抗PD-1抗体（例えば、ニボルマブ）であり、任意に、続いて、14日間、2週間、28日間、又は4週間の間隔で単独で、例えば14日間又は2週間の間隔で約240mgの用量で、又は28日間又は4週間の間隔で約480mgの用量で、抗PD-1抗体（例えば、ニボルマブ）を投与する。

【0238】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、14日又は2週間の間隔で個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、14日又は2週間の間隔で、例えば約10mg/kgの用量で（任意に、60分間にわたる静脈内注入によって）個体に投与する抗PD-L1抗体（例えば、デュルバルマブ）である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、14日又は2週間の間隔で、例えば約10mg/kgの用量で（任意に、60分間にわたる静脈内注入によって）個体に投与する抗PD-L1抗体（例えば、アベルマブ）である。

10

【0239】

いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、21日又は3週間の間隔で個体に投与する。

【0240】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の第1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル1～8の1日目に個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の第1、8及び15日目並びにサイクル3～7の1日目に個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストは、サイクル1～8の1日目に個体に投与する。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、サイクル8の後に個体に更に投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、17回の追加の21日間のサイクルで個体に更に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストを、サイクル13～29の1日目に個体に投与し、及び／又はRNAワクチンを、サイクル13、21、及び29の1日目に個体に投与する。

30

【0242】

特定の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストはペンブロリズマブであり、PD-1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に約200mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に約25µgの用量で個体に投与する。特定の実施形態では、PD-L1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-L1軸結合アンタゴニストはアテゾリズマブであり、PD-L1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に約1200mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に約25µgの用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の1日目に約25µg、サイクル2の8日目に約25µg、サイクル2の15日目に約25µg、及びサイクル3～7のそれぞれの1日目に約25µgの用量で個体に投与する（すなわち、合計約75µgのワクチンを、サイクル2の間に3回の用量にわたって個体に投与する）。いくつかの実施形態では、合計約75µgのワクチンを、RNAワクチンを投与するサイクル1の間に3回にわたって個体に投与する。

40

【0243】

特定の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストはペンブロリズマブであり、PD-1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に200mgの用量で個体に

50

投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に25 µgの用量で個体に投与する。特定の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、8回の21日間サイクルで個体に投与し、PD-1軸結合アンタゴニストはアテゾリズマブであり、PD-1軸結合アンタゴニストをサイクル1～8の1日目に1200mgの用量で個体に投与し、RNAワクチンを、サイクル2の1、8、及び15日目、並びにサイクル3～7の1日目に25 µgの用量で個体に投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、サイクル2の1日目に25 µg、サイクル2の8日目に25 µg、サイクル2の15日目に25 µg、及びサイクル3～7のそれぞれの1日目に25 µgの用量で個体に投与する（すなわち、合計75 µgのワクチンを、サイクル2の間に3回の用量にわたって個体に投与する）。いくつかの実施形態では、合計75 µgのワクチンを、RNAワクチンを投与するサイクル1の間に3回にわたって個体に投与する。

10

【0244】

PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンは、任意の順序で投与され得る。例えば、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンは、連続して（異なる時点で）又は同時に（同じ時点で）投与され得る。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストとRNAワクチンは別々の組成物中にある。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストとRNAワクチンは同じ組成物中にある。

【0245】

いくつかの実施形態では、がんは、メラノーマ、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、局所進行性又は転移性メラノーマ、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、又は頭頸部がんである。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、局所進行性又は転移性の、非小細胞肺癌、膀胱がん、結腸直腸がん、トリプルネガティブ乳がん、腎がん、又は頭頸部がんである。

20

【0246】

いくつかの実施形態では、がんは、メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、皮膚メラノーマ又は粘膜メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、皮膚メラノーマ、粘膜メラノーマ、又は肢端メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、眼メラノーマ又は肢端メラノーマではない。いくつかの実施形態では、メラノーマは、転移性又は切除不能な局所進行メラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、ステージIVメラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、ステージIIIC又はステージIIIDのメラノーマである。いくつかの実施形態では、メラノーマは、切除不能又は転移性メラノーマである。いくつかの実施形態では、本方法は、メラノーマのアジュバント処置を提供する。

30

【0247】

いくつかの実施形態では、がん（例えば、メラノーマ）は、事前に処置されていない。いくつかの実施形態では、がんは、局所進行性メラノーマである。

40

【0248】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のいずれかによるPD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンによる処置の前に、個体は、PD-1軸結合アンタゴニストに基づく単剤療法、例えばRNAワクチンの不在下でのペンブロリズマブによる処置による処置後に進行しているか、又は処置に十分に応答しなかった。

【0249】

PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンは、同じ投与経路によって、又は異なる投与経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストを、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、髄腔内、脳室内、又は鼻腔内投与する。いくつかの実施形態では、RNAワクチンを、（例え

50

ば、リポブレイクス粒子又はリポソームで）静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、埋め込み、吸入、髄腔内、心室内、又は鼻腔内投与する。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンを、静脈内注入を介して投与する。有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンは、疾患の予防又は処置のために投与され得る。

【0250】

いくつかの実施形態では、これらの方法は、更なる治療法を更に含み得る。追加の治療法は、放射線療法、外科手術（例えば腫瘍切除及び乳房切除）、化学療法、遺伝子治療、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノセラピー、モノクローナル抗体治療、又は前述の組合せであり得る。追加の治療法は、アジュバント療法又はネオアジュバント療法の形態であり得る。いくつかの実施形態では、更なる治療法は、小分子酵素阻害剤又は抗転移薬の投与である。いくつかの実施形態では、追加の治療法は、副作用制限剤（例えば、処置の副作用の発生及び／又は重症度を軽減するよう意図された薬剤、例えば、制吐剤等）の投与である。いくつかの実施形態では、追加の治療法は放射線療法である。いくつかの実施形態では、追加の治療法は外科手術である。いくつかの実施形態では、追加の治療法は放射線療法と外科手術との組合せである。いくつかの実施形態では、追加の治療法はγ線照射である。

10

VIII. 製品又はキット

【0251】

PD-1軸結合アンタゴニスト（例えば、アテゾリズマブ又はペンブロリズマブ）を含む製造品又はキットを本明細書中に更に提供する。いくつかの実施形態では、製造品又はキットは、個体においてがんを処置するか若しくはがんの進行を遅延させるために、又はがんを有する個体の免疫機能を増強するために、RNAワクチンと共にPD-1軸結合アンタゴニストを使用するための説明書を含む添付文書を更に含む。PD-1軸結合アンタゴニスト（例えば、アテゾリズマブ又はペンブロリズマブ）及びRNAワクチンを含む製品又はキットも本明細書で提供される。

20

【0252】

いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニスト及びRNAワクチンは、同じ容器内又は別々の容器内にある。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、袋、及びシリンジが挙げられる。容器は、ガラス、プラスチック（ポリ塩化ビニル若しくはポリオレフィン等）、又は金属合金（ステンレス鋼若しくはハステロイ等）等の様々な材料から形成され得る。いくつかの実施形態では、容器は、製剤を保持し、容器上のラベル又は容器に関連するラベルは、使用上の指示を示し得る。製品又はキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、シリンジ、及び使用上の指示を有する添付文書等の商業的視点及び使用者の視点から望ましい他の材料を更に含み得る。いくつかの実施形態では、製品は、別の薬剤（例えば、化学療法剤及び抗新生物薬）のうちの1種以上を更に含む。1種以上の薬剤に好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、袋、及びシリンジが挙げられる。

30

【0253】

本明細書は、当業者が本発明を実践することを可能にするのに十分なものであると見なされる。本明細書に示されて説明される修正に加えて、本発明の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかになり、それらは添付の特許請求の範囲内のものである。本明細書で引用される全ての公報、特許、及び特許出願は、あらゆる目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【実施例】

【0254】

本開示は、以下の実施例を参照することによってより完全に理解されることになる。しかしながら、本実施例は、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。本明細書に記載の例及び実施形態は、例証のみを目的とするものであり、それを考慮に入れた様々な修正又は変更が当業者に提案されるであろうが、それらは、本出願の趣旨及び範

50

図並びに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることを理解されたい。

実施例 1：事前に処置されていない進行性メラノーマの患者におけるペンブロリズマブと組み合わせた RNA ワクチンの有効性及び安全性の第 I I 相非盲検多施設無作為化試験理論的根拠

【0255】

上記のように、チェックポイント阻害剤は現在、転移性メラノーマの標準治療である。しかしながら、メラノーマを含む多様な悪性腫瘍にわたって PD-L1 / PD-1 を標的とする薬剤で観察された持続的な臨床的利益は、患者のサブセットに限定されるようである。PD-1 療法（ニボルマブ、ペンブロリズマブ）、又は抗 PD1 と抗-CTLA-4 療法との組合せ（ニボルマブ及びイピリムマブ）等の現在広く投与されている免疫療法の開発を伴う OS の進歩にもかかわらず、かなりの割合の患者はチェックポイント阻害剤による処置に反応しないか、又は一過性の疾患安定化のみを経験しており（Robert C, Long GV, Brady B, et al. N Engl J Med 2015a; 372:320-30; Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Lancet 2016; 387:1909-20）、これは転移性固形腫瘍を有する患者に対する依然として満たされていない必要性を実証している。PD-1 阻害剤による処置に応答する患者の約 10% - 30% における客観的応答は持続的である傾向があるが、これらの患者はそれにもかかわらず、進行のリスクがあるままである。PD-1 遮断で処置されたメラノーマ患者の最近の研究では、ペンブロリズマブに対する客観的応答を有していた 205 名の患者のうち 53 名（26%）が、21 ヶ月の追跡期間の中央値で疾患進行を有していた（Ribas A, Hamid O, Daud A, et al. JAMA 2016; 315:1600-9）。

10

20

【0256】

抗 PD1 及び抗 PD1 + 抗-CTLA-4 の組合せは、メラノーマ患者の長期転帰を有意に改善したが、メラノーマは処置関連毒性の増加という代償を払ってきた。これらの改善にもかかわらず、かなりの割合の患者が依然として疾患進行及び疾患に屈するリスクがある。毒性の増加に伴う耐性チェックポイント遮断の機序に対処する併用療法が必要である。

【0257】

抵抗性は、エフェクター T 細胞のレベルで起こり得、その活性は、T 細胞刺激が不十分であるために制限され得る。前臨床モデルでは、PD-L1 / PD-1 経路の同時遮断と組み合わせた抗原特異的免疫の誘導は、単一薬剤ワクチンに限られた活性を有するモデルであっても、これらの経路のそれぞれの単一薬剤阻害剤よりも優れた有効性を実証した。これらの研究では、腫瘍浸潤 T 細胞は、PD-L1 がブロックされた場合にのみ IFN-γ 発現の増加（T 細胞の活性化及び抗腫瘍活性の顕著な特徴）を示したが、単一剤ワクチンでは示さなかった（Duraishwamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, et al. Cancer Res 2013; 73:3591-603; Fu J, Malm IJ, Kadayakkara DK, et al. Cancer Res 2014; 74:4042-52）。これらの研究に基づいて、RO7198457 と抗-PD-L1 / PD-1 との組合せは、抗腫瘍免疫応答の活性化をもたらし、腫瘍細胞の死滅の増強及びがん患者における臨床応答の改善をもたらし得ると仮定される。

30

40

目的

【0258】

この研究では、事前に処置されていない進行性メラノーマの患者におけるペンブロリズマブ単独と比較した、個別化 RNA ネオエピトープワクチン（PCV）、RO7198457 + ペンブロリズマブの有効性、安全性、薬物動態及び患者報告の転帰（PRO）を評価する。本研究の具体的な目的及び対応するエンドポイントを以下に概説する。

【0259】

この研究の有効性に関する主要評価項目は、以下のエンドポイントに基づいて、ペンブロリズマブ単独と比較した RO7198457 + ペンブロリズマブの有効性を評価すること

50

である。

- ・無作為化後の無増悪生存期間（PFS）（固形がん効果判定基準（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors）バージョン1.1（RECIST v1.1）に従って治験責任医師が決定した、無作為化から最初に疾患進行が起こるまでの時間又は何らかの原因による死亡までの時間（いずれか早い方）として定義される）。

- ・客観的奏効率（ORR）（RECIST v1.1に従って治験責任医師が決定した、 ≥ 4 週間空けて連続する2回の場合における完全奏効（CR）又は部分奏効（PR）を有する患者の割合として定義される）

【0260】

この研究の有効性に関する副次評価項目は、以下のエンドポイントに基づいて、ペムブロリズマブ単独と比較したRNAネオエピトープワクチン+ペムブロリズマブの有効性を評価することである。

- ・無作為化後の全生存期間（OS）（無作為化から任意の原因による死亡までの時間として定義される）

- ・奏効期間（DOR）（RECIST v1.1に従って治験責任医師が決定した、疾患進行又は何らかの原因による死亡に対する実証された客観的応答の最初の発生からの時間として定義される）

- ・指定された時点での、がんの研究及び処置のための欧州機構Quality of Life-Core 30（EORTC QLQ-C30）の2項目の全体的健康状態（GHS）／HRQoLサブスケール（質問29及び30）の使用によって評価される健康関連の生活の質（HRQoL）スコアのベースラインからの平均変化

【0261】

この研究の別の有効性に関する副次評価項目は、ペンブロリズマブ単剤療法から併用療法（例えば、RNAネオエピトープワクチン+ペンブロリズマブ）への交差後のCR又はPRの客観的応答を有する参加者の割合を評価することである。

【0262】

別の副次評価項目は、以下のエンドポイントに基づいて、ペンブロリズマブ単剤療法後に進行した患者におけるRNAネオエピトープワクチン+ペンブロリズマブの有効性を評価することである。

- ・ORR：交差時に、RECIST v1.1に従って治験責任医師が決定した、4週間 $\geq$ の間隔の連続する2回の機会におけるCR又はPRを有する患者の割合として定義される

【0263】

この研究の別の目的は、有害事象（AE）の発生率及び重症度を評価することである。

研究計画

【0264】

これは、事前に処置されていない進行性メラノーマの患者においてペンブロリズマブ単独と比較して、RO7198457（PCV）+ペンブロリズマブの有効性及び安全性を評価するように設計された第II相無作為化非盲検多施設試験である。患者集団には、切除不能な局所進行型（ステージIIIC及びIIID）及び転移性（再発性又は新たなステージIV）メラノーマの患者が含まれる。この研究は、包括的に実施される。

【0265】

この研究は2つの段階からなる。初期安全性導入段階及び無作為化段階（図1）。各段階は、2パートのスクリーニング期間、処置期間、及び処置後フォローアップ期間を有する。

【0266】

安全性導入段階は、IV注入によって投与される200mgのペンブロリズマブの1サイクル（21日間）と、その後のサイクルのための3週間毎の25 μ gのRO7198457+200mgのペンブロリズマブのIV（Q3W）とを受ける約6-12人の患者を登

10

20

30

40

50

録する単一アームからなる。無作為化段階での付加 (Accrual) は、内部監視委員会 (IMC) が安全導入段階で処置された最初の 6 人の患者の安全性データを検討するまで開始されない。

【0267】

無作為化段階は、実験群又は対照群のいずれかに 2 : 1 の比で無作為化された約 120 人の患者を登録する：

- ・ A 群 (対照) : 200 mg のペンブロリズマブを Q3W での IV 注入によって投与
- ・ B 群 (実験) : IV 注入によって投与される 200 mg のペンブロリズマブを 1 サイクル、その後のサイクルでは 25 μ g の RO7198457 + 200 mg のペンブロリズマブの IV Q3W

【0268】

疾患の進行が確認されると (RECIST v1.1 に従って治験責任医師によって評価された場合)、A 群に無作為化された患者には、適格基準を満たす限り、RO7198457 とペンブロリズマブとの交差及び併用処置を受ける選択肢が与えられる。

【0269】

スクリーニング期間の最初の部分 (A 部) の間に、同意患者を予備的適格性 (例えば、Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] Performance Status、血液化学、HIV の血清学、B 型肝炎ウイルス [HBV] 及び C 型肝炎ウイルス [HCV]) について評価し、腫瘍組織及び血液試料を採取して腫瘍特異的体細胞変異を定義し、ヒト白血球抗原 (HLA) タイピングを行って RO7198457 の製造を可能にする。現在計画されている製造所要時間は、十分な量及び品質の血液試料及び腫瘍試料を受け取ってからおよそ 4-6 週間である。スクリーニング期間の第 2 の部分 (B 部) は、患者の適格性を確認するための 1 日目の前の 28 日間である。

【0270】

適格患者には、測定可能なステージ IIIC 若しくは IIID (切除不能) 又は転移性 (再発性又は de novo ステージ IV) の浸潤性皮膚又は粘膜メラノーマが組織学的に確認され、進行性疾患の事前の処置を受けていない 0 又は 1 の ECOG パフォーマンスステータスを有する ≥ 18 歳の男性及び女性患者が含まれる。眼メラノーマ若しくは肢端メラノーマ、又は未処置の CNS 転移を有する患者は適格ではない。イピリムマブ、BRA F 阻害剤、及び／又は MEK 阻害剤による事前のアジュバント療法が許容される。抗-PD-1/PD-L1 剤を用いた事前のアジュバント療法は、最終用量がサイクル 1 の 1 日目の少なくとも 6ヶ月前に投与されたことを条件として許容される。患者は、ワクチン製造及び PD-L1 試験のために腫瘍標本を提供できないとしない。

【0271】

図 2 に示すように、A 群の患者 (ペンブロリズマブ) には、サイクル 1 から開始して Q3W での IV 注入によって 200 mg のペンブロリズマブを投与した。安全性導入段階及び無作為化段階の B 群の患者 (25 μ g の RO7198457 + 200 mg のペンブロリズマブ) は、サイクル 1 から開始して Q3W で IV 注入によって投与されるペンブロリズマブを受ける。サイクル 1 は、ワクチン製造のための時間を可能にするペンブロリズマブ単剤療法導入 (run-in) である。RO7198457 + ペンブロリズマブはサイクル 2 から開始し、RO7198457 はペンブロリズマブ注入の完了の 30 分後に IV 注入によって投与される。安全性導入段階及び B 群については、RO7198457 の投与をサイクル 2 の 1 日目に開始し、次いで、サイクル 2 の 8 日目及び 15 日目、サイクル 3-7 の 1 日目、次いで、サイクル 13 から開始して 8 サイクル毎 (サイクル 13、21、及び 29) にメンテナンス処置として投与する。RO7198457 との併用処置の開始の遅延 (例えば、RO7198457 はサイクル 2 の 1 日目まで利用できない) 又は RO7198457 の導入中での中断を経験する患者は、サイクル 2 の 1 日目より後に併用処置を開始すること、及び／又は初期処置期間の後に RO7198457 の補給用量を受けて、メディカルモニターの承認を得て、合計 8 つの導入用量を達成することが許可され得る (

10

20

30

40

50

例えば、サイクル2の1日目を逃した患者は、サイクル2の8日目にRO7198457を開始し、予定されていない通院としてサイクル3の8日目に補給用量を受け、サイクル2の15日目にRO7198457を開始した患者は、予定されていない通院としてサイクル3の8日目と15日目の両方に補給用量を受ける等である）。

【0272】

この研究の処置期間は、放射線写真データ及び臨床状態の統合評価後の疾患進行に起因する許容できない毒性又は症候性悪化がない場合に治験責任医師によって評価された臨床的利益を経験している限り、全ての患者について最大24ヶ月である。患者は、進行性疾患に対するRECIST v1.1基準が満たされた後、処置を継続することが許可される。A群の患者は、交差適格基準が満たされている場合、疾患の進行が確認された後に、RO7198457+ペンブロリズマブとの併用処置に切り替える選択肢を有し得る。更に、A群の患者がペンブロリズマブの24ヶ月を完了し、ペンブロリズマブを中止したく6ヶ月後に確認された疾患進行を経験した場合、彼らはRO7198457+ペンブロリズマブによる交差処置を受ける選択肢を有し得る。

10

【0273】

患者は、サイクル1、1日目後の最初の48週間、ベースライン（サイクル1、1日目）、第12週、及びその後6週間毎（2サイクル毎）に腫瘍評価を受ける。示される場合、皮膚病変のデジタル写真撮影は、スクリーニング時及び各腫瘍評価後の最初の来院時に行われる。サイクル1、1日目から48週間後、患者は12（±1）週間ごとに（およそ4サイクルごとに）腫瘍評価を受ける。腫瘍評価は、研究処置の中止、同意の撤回、主催者による研究の中止、又は死亡のいずれかが最初に起こるまで継続する。処置の中断をもたらす疾患の進行を経験した後、患者は、実行可能であれば、確認のための腫瘍評価のためにおよそ6（±2）週間後にクリニックに戻ることも求められる。疾患の進行以外の理由（例えば、毒性）で処置を中止する患者は、疾患の進行、同意の撤回、主催者による研究の中止、又は死亡のいずれかが最初に起こるまで、予定された腫瘍評価を継続すべきである。腫瘍評価に使用される一次画像データは、必要に応じて応答エンドポイントの集中的かつ独立したレビューを可能にするために、主催者によって収集される。

20

【0274】

更に、患者はまた、疾患の進行又は処置の中止のいずれか遅い方まで、各サイクルの開始時にPRO評価を完了するように求められる。

30

組み入れ基準及び除外基準

【0275】

患者は、次の研究登録基準を満たさなければならない：

- ・インフォームドコンセント書類の署名時年齢18歳以上
- ・AJCC v8.0 (Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al., editors. AJCC cancer staging manual. 8th rev ed. New York: Springer; 2017) によって定義される組織学的に確認される、転移性（再発性又はde novoステージIV）又は切除不能な局所進行性（ステージIIIC又はIIID）の皮膚メラノーマ又は粘膜メラノーマ

40

○粘膜メラノーマ患者の登録は、およそ10名の患者に限定される。

- ・ECOGパフォーマンスステータス0又は1
- ・平均余命≥12週間
- ・最初の研究処置（サイクル1、1日目）の28日前以内に得られた以下の臨床検査結果によって定義される、適切な血液学的及び終末器官機能：

○ANC ≥ 1,500細胞/μL（サイクル1の1日目の前の2週間以内に顆粒球コロニー刺激因子〔G-CSF〕の支持なし）

○白血球数 ≥ 2,500/μL

○血小板数 ≥ 100,000/μL（サイクル1、1日目の前の14日間以内に輸血なし）

50

○ヘモグロビン $\geq 9 \text{ g/dL}$ （患者は輸血されてもよく、又は局所標準治療に従って赤血球造血処置を受けてもよい）

○総ビリルビン $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ 、但し以下の例外がある：既知のギルバート病患者：血清ビリルビン濃度 $\leq 3 \times \text{ULN}$ 。

○AST及びALT $\leq 3 \times \text{ULN}$

○ALP $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 、但し以下の例外がある：実証された肝臓又は骨転移を有する患者は、ALP $\leq 5 \times \text{ULN}$ を有し得る。

○血清アルブミン $\geq 2.5 \text{ g/dL}$

・Cockcroft Gault系球体濾過量推定に基づいて測定又は計算されたクレアチニンCL $\geq 50 \text{ mL/分}$ ：

$$\frac{(140 - \text{年齢}) \times (\text{キログラム単位の重量}) \times (\text{女性の場合は} 0.85)}{72 \times (\text{血清クレアチニン } \text{mg/dL})}$$

・RECIST v1.1による測定疾患。事前に照射された病変は、病変内に進行が実証され、他の標的病変が利用可能でない限り、標的病変としてカウントされるべきではない。生検が意図される病変は、標的病変としてカウントされるべきではない。身体検査によってのみ検出可能な皮膚病変及び他の表在性病変は、標的病変としてカウントされるべきではないが、非標的病変として含まれ得る。

・以下のアジュバント療法を除いて、進行性メラノーマ（例えば、化学療法、ホルモン療法、標的療法、免疫療法、又は他の生物学的療法）に対する以前の全身性抗がん療法にナীব：

○サイクル1、1日目の少なくとも6ヶ月前に中止され、以下の基準のいずれかを満たさない場合、抗-PD1/PD-L1又は抗CTLA-4によるアジュバント処置：

・以前のCITに起因する免疫関連グレード4有害事象の任意の病歴（置換療法で管理される内分泌不全症又は血清アミラーゼ若しくはリパーゼの無症候性上昇以外）

・局所処方情報、欧州臨床腫瘍学会（ESMO）ガイドライン（Haanen JBAG, Carbonnel F, Robert C, et al. Ann Oncol 2017; 28: iv119-iv142）又は米国臨床腫瘍学会（ASCO）ガイドライン（Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. J Clin Oncol 2018; 36: 1714-68）に従って事前の免疫療法剤の永続的な中断を必要とした事前のCITに起因する免疫関連グレード3有害事象の任意の病歴

・脱毛症、白斑、又は補充療法で管理された内分泌障害を除いて、グレード ≤ 1 に回復していない以前の抗がん療法からの有害事象。リパーゼ/アミラーゼの無症候性上昇を有する患者は、メディカルモニターとの議論後に適格となり得る。

・ベースラインまで回復していない以前のCIT（置換療法で管理された内分泌不全症又は安定白斑以外）に関連する免疫関連有害事象。免疫関連有害事象のためにコルチコステロイドで処置された患者は、コルチコステロイドの中止後 ≥ 4 週間、関連する症候又は徴候がないことを示さなければならない。

○研究処置開始の少なくとも2ヶ月前に中止された場合の標的療法（例えば、BRAFi/MEKi）によるアジュバント処置

○研究処置の開始の少なくとも7日前に中止された場合のハーブ療法によるアジュバント処置

・ホルマリン固定され、パラフィン包埋されたブロック（好ましい）、又は切片化された組織（実験マニュアルに記載されている）における代表的な腫瘍標本の利用可能性を、関連する病理報告と共に確認した。許容可能な試料はまた、深部腫瘍組織に対するコアニードル生検（最低5個のコア）、皮膚、皮下、又は粘膜病変に対する切除生検、切開生検、パンチ生検、又は鉗子生検を含み得る。5個未満のコアを有する患者は、メディカルモニターからの承認を得て適格であると見なされ得る。微細針吸引試料、ブラッシング（brushing）、滲出液又は腹水からの細胞ペレット、及び洗浄液試料は許容されない。骨転移からの腫瘍組織は、PD-L1発現について評価することが困難であり、回避され

10

20

30

40

50

るべきである。しかしながら、骨転移部位が唯一の実行可能な組織源である場合、それはメディカルモニターの承認を得て許容可能な腫瘍標本であり得る。多くの試薬は P D - L 1 I H C に使用される抗原及び配列決定のための核酸を損傷する強酸を有することから、脱灰された骨組織は脱灰前に許容され得る。異なる時点（例えば、初期診断時及び疾患再発時）及び／又は複数の転移腫瘍からの適切な組織が利用可能である場合、最も近時に（理想的には、最も近時の全身性アジュバント療法の後に）採取された組織が優先されるべきである。利用可能性に基づき、所与の患者から複数の試料が採取され得るが、ブロック又は切片組織の要件は、単一の生検又は切除検体によって満たされるべきである。保存用組織が不十分又は利用できない患者は、患者が腫瘍の前処理生検試料採取に同意し、それを受ける意思がない限り、P C V を作成するための評価可能な腫瘍組織の必要性のために適格ではない（許容可能な試料については上記を参照）。

10

・登録は、少なくとも5つの同定された腫瘍ネオ抗原及び提供者によって定義されるワクチンの製造を可能にするのに十分な腫瘍材料（品質及び量の両方）を有する患者に限定される。保存用腫瘍組織は C I T ナイブ患者に許容可能であり、これを登録前に突然変異の評価のために提出し、評価しなければならない。ベースライン腫瘍生検は、C I T 経験のある患者（すなわち、アジュバント療法において免疫チェックポイント阻害剤による処置を受けた患者）に必要であり、登録前に突然変異の評価のために提出及び評価しなければならない。C I T を受けた後であるが登録前に腫瘍生検を受けたことがある C I T 経験のある患者は、十分な材料が存在する場合、スクリーニングのためにその組織を使用し得る。利用可能な場合、患者は評価のために保存用腫瘍組織も提出すべきである。ベースラインの新鮮な腫瘍生検が製造に不十分である場合には、C I T 経験のある患者に保存用組織を使用することもできる。腫瘍組織が評価不能であるか、又はワクチンを製造するには不十分な数の突然変異を有する患者は、適格ではない。

20

・妊娠の可能性のある女性の場合：禁欲（異性間の性交を控える）又は避妊手段を使用することの合意、及び卵の提供を控えることの合意

・男性の場合：禁欲（異性との性交を控える）又はコンドームの使用の同意、及び精子の提供を控える旨の同意

【0276】

以下の基準のいずれかを満たす患者は、研究登録から除外される：

30

・眼メラノーマ又は肢端メラノーマ

・妊娠中若しくは授乳中、又は研究中若しくは R O 7 1 9 8 4 5 7 の最終投与後1ヶ月以内若しくはペンブロリズマブの最終投与後4ヶ月以内のいずれか遅い方で妊娠を意図している。妊娠の可能性のある女性（卵管結紮術を受けた女性を含む）は、研究薬の開始前14日以内（すなわち、サイクル1、1日目）に血清妊娠検査結果が陰性でなければならない。

・重大な心血管疾患、例えば、New York Heart Association の心臓病（クラスⅡ以上）、過去3カ月以内の心筋梗塞、不安定不整脈、及び／又は不安定狭心症。

・活動性のウイルス性、アルコール性又は他の肝炎、肝硬変、及び遺伝性肝疾患又は現在のアルコール乱用を含む、既知の臨床的に重要な肝疾患

40

・サイクル1の1日目の前の28日以内の主要な外科的処置、又は研究の経過中での主要な外科的処置の必要になるという予想

・治験の薬の使用に禁忌を示す疾患又は状態の合理的な疑いを与えるか、結果の解釈に影響を及ぼし得るか、及び／又は患者を処置合併症に対して高リスクにする可能性がある任意の他の疾患、代謝機能障害、健康診断所見、又は臨床研究所見

・7.5mgを超える用量のコルチコステロイド（生理学的置換のためでない場合）

・事前の脾臓摘出

・既知の原発性免疫不全、細胞性免疫不全（例えば、D i G e o r g e 症候群、T 陰性重症複合免疫不全症 [S C I D] ）又はT細胞及びB細胞の複合免疫不全（例えば、T 及び B 陰性 S C I D 、 W i s k o t t - A l d r i c h 症候群、毛細血管拡張性運動失調症、

50

一般的可変免疫不全)のいずれか

・症候性、未処置又は活発に進行するCNS転移。以下の基準の全てが満たされるならば、CNS病変の病歴を有する患者は適格である：

○RECIST v1.1による測定可能な疾患はCNS外に存在しなければならない

○テント上(supratentorial)及び小脳転移のみが許容された(すなわち、中脳、橋、延髄又は脊髄への転移なし)

○視神経(視神経及び視交叉)の10mm以内の転移の病歴

○CNS疾患の治療としてのコルチコステロイドの継続的な必要性はない

○7日以内に定位放射線照射なし

○事前の全脳照射なし

○CNSに向けられた治療の完了とスクリーニングX線検査との間の暫定的な進行の臨床的証拠はない

○スクリーニング検査で新たに無症候性CNS転移が検出された患者は、CNS転移に対する放射線療法及び／又は手術を受けていなければならない。処置後、これらの患者は、全ての他の基準が満たされる場合、サイクル1の1日目の前に追加の脳スキャンを必要とせずに適格となり得る。

○安定な用量の抗癌薬による処置が可能である

○CNS病変からの頭蓋内出血の病歴なし

・軟膜転移性疾患の病歴

・制御されない腫瘍関連疼痛。麻薬性鎮痛薬を必要とする患者は、研究登録時に安定したレジメンでなければならない。姑息的放射線療法を受けることができる症候性病変(例えば、骨転移又は神経インピンジメントを引き起こす転移)は、登録前に処置されなければならない。患者は、放射線の影響から回復されなければならない。必要とされる最低限の回復期間はない。更なる成長(例えば、脊髄圧迫に現在関連していない硬膜外転移)を伴う機能障害又は難治性疼痛を引き起こす可能性が高い無症候性転移性病変は、登録前に適切な場合、局所領域療法について検討されるべきである。

・制御されない胸水、心膜滲出液、又は28日ごとに複数回の繰り返し排液を必要とする腹水。留置型排液カテーテル(例えば、PleurX(登録商標))が可能である。

・研究処置の開始前の、化学療法、ホルモン療法、及び／又は放射線療法を含む、治験中であるか承認されているかにかかわらず、転移性の状況における任意の抗がん療法。但し、以下の例外がある。

○ハーブ療法>サイクル1、1日目の1週間前

○サイクル1、1日目の2週間前>の、感受性が高い可能性のある場所(例えば、硬膜外腔)における有痛性の転移又は転移に対する姑息的放射線治療

○事前のがんワクチン(例えば、T-vec)は許容されない

・転移又は死亡の無視できるリスクを有するもの(例えば、適切に処置された非浸潤性子宮頸癌、基底細胞若しくは扁平上皮皮膚がん、限局性前立腺がん、又は非浸潤性乳管癌)を除く、サイクル1の1日目の前5年以内の研究下にある疾患以外の悪性腫瘍

・制御されない高カルシウム血症($>1.5\text{ mmol/L}$ イオン化カルシウム又は $\text{Ca}^{2+} > 12\text{ mg/dL}$ 又は補正血清カルシウム $\geq \text{ULN}$)又はビスホスホネート療法の継続的な使用を必要とする症候性高カルシウム血症、特に骨格事象を予防するためにビスホスホネート療法又はデノスマブを受けており、臨床的に有意な高カルシウム血症の病歴がない患者が適格である。

・脊髄圧迫は、手術及び／又は放射線で確定的に処置されておらず、又は事前に診断及び処置された脊髄圧迫は、疾患がスクリーニング前の ≥ 2 週間にわたって臨床的に安定していたという証拠はない。

・全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、抗リン脂質症候群に関連する血管血栓症、ウェゲナー肉芽腫症、シェーグレン症候群、ベル麻痺、ギランバレー症候群、多発性硬化症、血管炎、又は糸球体腎炎を含むが、これらに限定されない自己免疫疾患の病歴；

10

20

30

40

50

○安定した用量の甲状腺補充ホルモンを受ける、自己免疫甲状腺機能低下症の病歴を有する患者は、適格であり得る。

○安定インスリン療法を受けている制御された1型糖尿病患者が適格であり得る。

○湿疹、乾癬、慢性単純性苔癬、又は皮膚症状のみを有する白斑（例えば、乾癬性関節炎なし）を有する患者は、以下の条件を満たすならば適格であり得る。

・発疹は体表面積の10%未満を覆っていなければならない

・疾患はベースラインで十分に制御されており、低効力の局所ステロイドのみを必要とする

・過去12ヶ月以内に基礎疾患の急性増悪はない（例えば、ソラレン+紫外線A照射、メトトレキサート、レチノイド、生物学的薬剤、経口カルシニューリン阻害剤、高効力又は経口のステロイドを必要としない）

・サイクル1、1日目の前の3週間以内のモノアミノキシダーゼ阻害剤（MAOI）による処置

・サイクル1、1日目の前の2週間以内の全身免疫抑制薬（プレドニゾン ≥ 7.5 mg/日、シクロホスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、サリドマイド及びTNF α アンタゴニストを含むが、これらに限定されない）による処置

○急性の低用量の全身性免疫抑制薬（例えば、悪心のためのデキサメタゾンの1回用量）を受けた患者は、メディカルモニターと協議及び承認後に研究に登録することができる：

○吸入コルチコステロイド（例えば、慢性閉塞性肺疾患のためのフルチカゾン）の使用は許容される

○経口ミネラルコルチコイド（例えば、起立性低血圧患者のためのフルドロコルチゾン）の使用は許容される

○副腎不全のためのコルチコステロイドの生理学的用量は許容される

・特発性肺線維症、肺臓炎（薬物誘発性を含む）、器質化肺炎（すなわち、閉塞性細気管支炎、潜在性器質化肺炎等）の病歴、又は胸部コンピュータ断層撮影（CT）スキャンのスクリーニングでの活動性肺臓炎の病歴。放射線領域における放射線肺臓炎（線維症）の病歴は許容される。

・HIV感染症の陽性検査

・活動性B型肝炎（スクリーニング時に陽性B型肝炎表面抗原〔HBsAg〕検査を有すると定義される）。過去に又は解決されたB型肝炎感染を有した患者（陰性HBsAg検査及びB型肝炎コア抗原に対する陽性IgG抗体〔抗HBc〕を有すると定義される）は適格である。HBV DNAは、サイクル1の1日目の前にこれらの患者で取得されなければならない、活動性感染を示してはならない。

・活動性C型肝炎。HCV抗体について陽性の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）がHCV RNAについて陰性である場合にのみ適格である。

・既知の活動性又は潜伏結核感染。調査者が潜在的な患者が結核菌（Mycobacterium tuberculosis）に感染するリスクが高いと考える場合、潜伏結核の診断手順は、スクリーニング期間中に現地の実務基準に従って従わなければならない。

・感染症、菌血症、又は重度の肺炎の合併症を含むがこれらに限定されない、サイクル1の1日目の前4週間以内の重度の感染症

・以下を含む、重度の感染症の基準を満たさない最近の感染症：

○サイクル1、1日目の前の2週間以内の感染の徴候又は症候

○サイクル1、1日目の前の2週間以内に経口又はIV抗生物質を受けた

○予防用抗生物質（例えば、尿路感染症又は慢性閉塞性肺疾患の予防のため）を受ける患者は適格である

・事前の同種骨髄移植又は事前の固形臓器移植

・サイクル1、1日目の4週間前以内の生弱毒化ワクチンの投与、又はそのような生弱毒化ワクチンが研究中に必要とされることの予想。インフルエンザワクチン接種は、インフルエンザシーズン中にのみ行われるべきである。患者は、サイクル1、1日目の前の4週間以内、又は研究中のいつでも、及び最後の研究処置後5ヶ月間、生弱毒化インフルエン

10

20

30

40

50

ザワクチン（例えば、F l u M i s t（登録商標））を受けてはならない。

- ・ワクチン中の活性物質又は賦形剤のいずれかに対する既知の過敏症
- ・キメラ抗体若しくはヒト化抗体又は融合タンパク質に対する重度のアレルギー反応、アナフィラキシー反応、又は他の過敏反応の病歴
- ・チャイニーズハムスター卵巣細胞生成物に対する既知の過敏症
- ・ペンブロリズマブ製剤の成分に対するアレルギー又は過敏症

実施例 2：

【0277】

この実施例は、本明細書中に記載される方法において使用される例示的なRNAワクチンを記載する。

10

全体説明

【0278】

RNAワクチンは、定常配列及び患者特異的腫瘍ネオ抗原配列をコードする一本鎖メッセンジャーリボ核酸（mRNA）分子である。具体的には、5'キャップされた一本鎖メッセンジャーRNA（mRNA）である。各mRNAは、同定及び選択された患者の腫瘍特異的変異によって定義される最大20個のネオエピトープをコードする。患者の腫瘍特異的突然変異を含有する配列は、典型的には81ヌクレオチドで構成される。mRNA（この実施例では、10個の患者特異的ネオエピトープをコードするmRNA）の概略図を図3に示す。

20

【0279】

定常配列エレメントは、以下を含む：5'キャップ（ β -S-ARCA）、5'-、3'-非翻訳領域[UTR]、分泌シグナルペプチド[sec2.0]、MHC[主要組織適合遺伝子複合体]クラスI膜貫通ドメイン及び細胞質ドメイン[MITD]、並びにポリ(A)尾部。これらの定常配列は、mRNAの翻訳効率及び安定性のために最適化されており、各バッチについて同一であり、したがって全ての患者について同一である。全ての定常配列要素の役割を表4に要約し、それらは、患者特異的ネオエピトープ領域及びグリシン／セリン(GS)リッチリンカーに隣接する。

30

40

50

表 4

エレメント	説明
5' - キャップ	ベーター-S-ARCA (D1) (図5を参照) は、RNA安定性及び翻訳効率を改善するために、RNA癌ワクチンの5'末端における特異的キャッピング構造として利用される (Kuhn et al. 2010)。
5' UTR (hAg-コザック)	5' - UTR配列はヒトαグロビンRNAに由来している。翻訳効率を高めるために最適化された「コザック配列」が付加されている (Kozak 1987)。
分泌 シグナルペプチド (sec2.0)	ヒトMHCクラスI複合体アルファ鎖「HLA-I、Cw*」をコードする配列に由来する分泌シグナルペプチド「sec2.0」は、抗原プロセッシング及び提示を改善するための融合タンパク質タグとして使用される (Kreiter et al. 2008)。最も高頻度のハプロタイプの1つに対応し、他の高頻度のMHCクラスI対立遺伝子と高い相同性を有することから、「HLA-I、Cw*」を選択した。
MITD	MITDは、MHCクラスI分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインに対応し、抗原プロセッシング及び提示を改善するための融合タンパク質タグとして使用される (Kreiter et al. 2008)。
3' - UTR (F1)	3' - UTRは、AES mRNA (Fと呼ばれる) 及びミトコンドリアコード12SリボソームRNA (Iと呼ばれる) に由来する2つの配列エレメントの組合せである。これらは、RNA安定性を付与する配列について <i>ex vivo</i> 選択プロセスを行うことによって同定された。
ポリ (A) 尾部	120ヌクレオチドを測定するポリ (A) 尾部 (A120) を付加して、高いRNA安定性及びタンパク質発現を確実にする (Holtkamp et al. 2006)。

10

20

30

40

略語：AES = スプリットのアミノ末端エンハンサー；MHC = 主要組織適合遺伝子複合体；

MITD = MHCクラスI膜貫通ドメイン及び細胞質ドメイン；UTR = 非翻訳領域。

定数配列の説明

【0280】

RNA [1, 2 - [m₂^{7・2'・0}G - (5' → 5') - p_{pp}-G (Rp - 異性体)]] (定常5' UTR + 定常MITDに連結されたsec2.0 + 3' UTR及びポリ (A) 尾部)

配列長：739ヌクレオチド (A：255、C：204、G：168、U：112)

【0281】

図4には、例示的RNAワクチンの定常領域のRNA配列が示されている。患者特異的配列 (C131 ~ A132) の挿入部位を太字で示す。RNA配列中の修飾塩基及び一般的でない連結については表5を参照されたい。

表 5

種類	遺伝子座	説明
修飾された塩基	G1	m ₂ ^{7・2'・0} G
非共通リンク	G1 - G2	(5' → 5') - p _{ps} p -
非共通リンク	C131 - A132	患者特異的配列の挿入部位

【0282】

50

全体として、各RNAの長さは、各ネオエピトープのサイズ及び各RNAにコードされるネオエピトープの数に応じて、約1000～2000ヌクレオチドの範囲を有する。RNAの定常領域は、患者特異的配列とは無関係に、739個のリボヌクレオチドを構成する。

【0283】

参考文献

Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increase stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. Blood 2006;108:4009-17

10

Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 1987;196:947-50.

Kreiter S, Selmi A, Diken M, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. J Immunol 2008;180:309-18.

20

Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. Gene Ther 2010;17:961-71.

Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, et al. Optimization of codon pair use within the (GGGS)3 linker sequence results in enhanced protein expression. Mol Immunol 2004;40:717-22.

30

配列

全てのポリヌクレオチド配列を5'→3方向に示す。全てのポリペプチド配列をN末端からC末端方向に示す。

抗PDL1抗体HVR-H1配列（配列番号1）

GFTTFSDSWIH

抗PDL1抗体HVR-H2配列（配列番号2）

AWISPYGGSTYYADSVKG

抗PDL1抗体HVR-H3配列（配列番号3）

RHWPGGFDY

抗PDL1抗体HVR-L1配列（配列番号4）

40

RASQDVSTAVA

抗PDL1抗体HVR-L2配列（配列番号5）

SASFLYS

抗PDL1抗体HVR-L3配列（配列番号6）

QQYLYHPAT

抗PDL1抗体VH配列（配列番号7）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS

抗PDL1抗体VL配列（配列番号8）

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF L YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGGTKVEIKR

抗PDL1抗体重鎖配列（配列番号9）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

抗PDL1抗体軽鎖配列（配列番号10）

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF L YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVKWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

ニボルマブ重鎖配列（配列番号11）

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY D GSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND D YWGQGGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSSSLGTQKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLG

30

ニボルマブ軽鎖配列（配列番号12）

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT G IPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVKWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

ペンブロリズマブ重鎖配列（配列番号13）

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGG I NPSNGGTNFNEKFKNRVTLT TDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCP APEFLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN

50

WYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLG

ペンブロリズマブ軽鎖配列（配列番号14）

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHW
YQQKPGQAPRLLIYLAAYLES GVPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLP LTFGGGTGVKVEIKRTVAAPS
VF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

アベルマブ重鎖配列（配列番号15）

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMMWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGT LVTVS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPS SSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

20

アベルマブ軽鎖配列（配列番号16）

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSSDVGGYNYVSWYQQ
HPGKAPKLM IYDVS NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL
QAED EADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVT
LFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTECS

30

デュルバルマブ重鎖配列（配列番号17）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSR YWMSWVRQA
PGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT LVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPS SSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

40

デュルバルマブ軽鎖配列（配列番号18）

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYGS LPWTFGQGTGVKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

50

Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
G L S S P V T K S F N R G E C

完全PCV RNA 5' 定常配列 (配列番号19)

G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G
A A C C C G C C A C C A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U
C C U G C U G C U G U C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G
G C C G G A A G C

完全PCV RNA 3' 定常配列 (配列番号20)

A U C G U G G G A A U U G U G G C A G G A C U G G C A G U G C U G G C C G U G G
U G G U G A U C G G A G C C G U G G U G G C U A C C G U G A U G U G C A G A C G
G A A G U C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C U A C A G C C A G G C C
G C C A G C U C U G A U A G C G C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A C U G A
C A G C C U A G U A A C U C G A G C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C
U A G C U G C C C C U U U C C C G U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C
C G A C C U C G G G U C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C
C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C C A A G C A C
G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C
C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A
A G U U U A A C U A A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U
C G U G C C A G C C A C A C C G A G A C C U G G U C C A G A G U C G C U A G C C
G C G U C G C U

10

20

完全PCVコザックRNA (配列番号21)

G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G
A A C C C G C C A C C

完全PCVコザックDNA (配列番号22)

G G C G A A C T A G T A T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G
A A C C C G C C A C C

短いコザックRNA (配列番号23)

U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A G A G A G A A C C C G C C A C C

短いコザックDNA (配列番号24)

T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G A A C C C G C C A C C

30

sec RNA (配列番号25)

A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C U G C U G U
C U G G C G C C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C

sec DNA (配列番号26)

A T G A G A G T G A T G G C C C C C A G A A C C C T G A T C C T G C T G C T G T
C T G G C G C C C T G G C C C T G A C A G A G A C A T G G G C C G G A A G C

secタンパク質 (配列番号27)

M R V M A P R T L I L L L S G A L A L T E T W A G S

M I T D RNA (配列番号28)

A U C G U G G G A A U U G U G G C A G G A C U G G C A G U G C U G G C C G U G G
U G G U G A U C G G A G C C G U G G U G G C U A C C G U G A U G U G C A G A C G
G A A G U C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C U A C A G C C A G G C C
G C C A G C U C U G A U A G C G C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A C U G A
C A G C C

40

M I T D DNA (配列番号29)

A T C G T G G G A A T T G T G G C A G G A C T G G C A G T G C T G G C C G T G G
T G G T G A T C G G A G C C G T G G T G G C T A C C G T G A T G T G C A G A C G
G A A G T C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C T A C A G C C A G G C C
G C C A G C T C T G A T A G C G C C C A G G G C A G C G A C G T G T C A C T G A

50

C A G C C

MITDタンパク質（配列番号30）

I V G I V A G L A V L A V V V I G A V V A T V M C R R K S S G G K G G S Y S Q A
A S S D S A Q G S D V S L T A

完全PCV FI RNA（配列番号31）

C U C G A G C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G C C C C U
U U C C C G U C C U G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U
C C C A G G U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C
U C U G C U A G U U C C A G A C A C C U C C C A A G C A C G C A G C A A U G C A
G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A C C C C C A C G G G A A A C A
G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A A C U A A
G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A
C A C C G A G A C C U G G U C C A G A G U C G C U A G C C G C G U C G C U

10

完全PCV FI DNA（配列番号32）

C T G G T A C T G C A T G C A C G C A A T G C T A G C T G C C C C T T T C C C G
T C C T G G G T A C C C C G A G T C T C C C C C G A C C T C G G G T C C C A G G
T A T G C T C C C A C C T C C A C C T G C C C C A C T C A C C A C C T C T G C T
A G T T C C A G A C A C C T C C C A A G C A C G C A G C A A T G C A G C T C A A
A A C G C T T A G C C T A G C C A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G T G
A T T A A C C T T T A G C A A T A A A C G A A A G T T T A A C T A A G C T A T A
C T A A C C C C A G G G T T G G T C A A T T T C G T G C C A G C C A C A C C G A
G A C C T G G T C C A G A G T C G C T A G C C G C G T C G C T

20

FエレメントRNA（配列番号33）

C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G C C C C U U U C C C G
U C C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G G
U A U G C U C C C A C C U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U
A G U U C C A G A C A C C U C C

FエレメントDNA（配列番号34）

C T G G T A C T G C A T G C A C G C A A T G C T A G C T G C C C C T T T C C C G
T C C T G G G T A C C C C G A G T C T C C C C C G A C C T C G G G T C C C A G G
T A T G C T C C C A C C T C C A C C T G C C C C A C T C A C C A C C T C T G C T
A G T T C C A G A C A C C T C C

30

IエレメントRNA（配列番号35）

C A A G C A C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C
A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U
A A A C G A A A G U U U A A C U A A G C U A U A C U A A C C C C A G G G U U G G
U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G

IエレメントDNA（配列番号36）

C A A G C A C G C A G C A A T G C A G C T C A A A A C G C T T A G C C T A G C C
A C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G T G A T T A A C C T T T A G C A A T
A A A C G A A A G T T T A A C T A A G C T A T A C T A A C C C C A G G G T T G G
T C A A T T T C G T G C C A G C C A C A C C G

40

リンカーRNA（配列番号37）

G G C G G C U C U G G A G G A G G C G G C U C C G G A G G C

リンカーDNA（配列番号38）

G G C G G C T C T G G A G G A G G C G G C T C C G G A G G C

リンカータンパク質（配列番号39）

G G S G G G S G G

完全PCV DNA 5'定常配列（配列番号40）

G G C G A A C T A G T A T T C T T C T G G T C C C C A C A G A C T C A G A G A G

50

A A C C C G C C A C C A T G A G A G T G A T G G C C C C C A G A A C C C T G A T
C C T G C T G C T G T C T G G C G C C C T G G C C C T G A C A G A G A C A T G G
G C C G G A A G C

完全PCV DNA 3' 定常配列 (配列番号 41)

A T C G T G G G A A T T G T G G C A G G A C T G G C A G T G C T G G C C G T G G
T G G T G A T C G G A G C C G T G G T G G C T A C C G T G A T G T G C A G A C G
G A A G T C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A G C T A C A G C C A G G C C
G C C A G C T C T G A T A G C G C C C A G G G C A G C G A C G T G T C A C T G A
C A G C C T A G T A A C T C G A G C T G G T A C T G C A T G C A C G C A A T G C
T A G C T G C C C C T T T C C C G T C C T G G G T A C C C C G A G T C T C C C C
C G A C C T C G G G T C C C A G G T A T G C T C C C A C C T C C A C C T G C C C
C A C T C A C C A C C T C T G C T A G T T C C A G A C A C C T C C C A A G C A C
G C A G C A A T G C A G C T C A A A A C G C T T A G C C T A G C C A C A C C C C
C A C G G G A A A C A G C A G T G A T T A A C C T T T A G C A A T A A A C G A A
A G T T T A A C T A A G C T A T A C T A A C C C C A G G G T T G G T C A A T T T
C G T G C C A G C C A C A C C G A G A C C T G G T C C A G A G T C G C T A G C C
G C G T C G C T

キャップ由来の5' GGを有する完全PCV RNA (配列番号 42)

G G G G C G A A C U A G U A U U C U U C U G G U C C C C A C A G A C U C A
G A G A G A A C C C G C C
A C C A U G A G A G U G A U G G C C C C C A G A A C C C U G A U C C U G C
U G C U G U C U G G C G C
C C U G G C C C U G A C A G A G A C A U G G G C C G G A A G C N A U C G U
G G G A A U U G U G G C A G
G A C U G G C A G U G C U G G C C G U G G U G G U G A U C G G A G C C G U
G G U G G C U A C C G U G
A U G U G C A G A C G G A A G U C C A G C G G A G G C A A G G G C G G C A
G C U A C A G C C A G G C
C G C C A G C U C U G A U A G C G C C C A G G G C A G C G A C G U G U C A
C U G A C A G C C U A G U
A A C U C G A G C U G G U A C U G C A U G C A C G C A A U G C U A G C U G
C C C C U U U C C C G U C
C U G G G U A C C C C G A G U C U C C C C C G A C C U C G G G U C C C A G
G U A U G C U C C C A C C
U C C A C C U G C C C C A C U C A C C A C C U C U G C U A G U U C C A G A
C A C C U C C C A A G C A
C G C A G C A A U G C A G C U C A A A A C G C U U A G C C U A G C C A C A
C C C C C A C G G G A A A
C A G C A G U G A U U A A C C U U U A G C A A U A A A C G A A A G U U U A
A C U A A G C U A U A C U
A A C C C C A G G G U U G G U C A A U U U C G U G C C A G C C A C A C C G
A G A C C U G G U C C A G
A G U C G C U A G C C G C G U C G C U A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A
A
A
A A

10

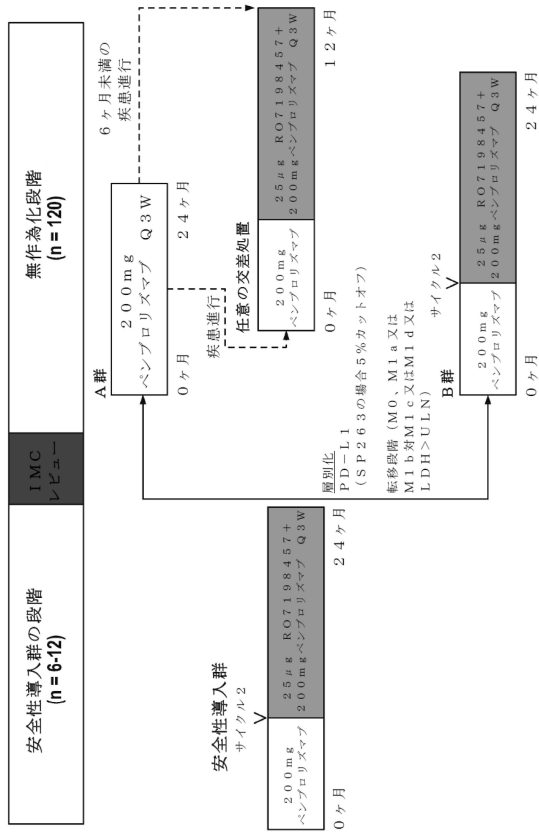
20

30

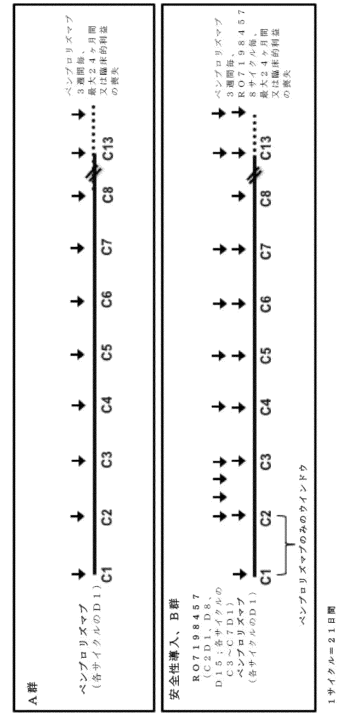
40

50

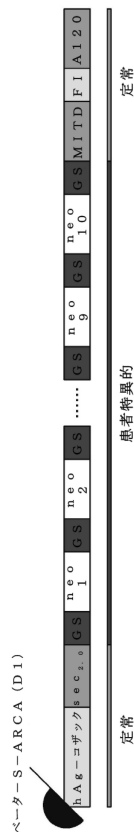
【図面】
【図 1】



【圖 2】



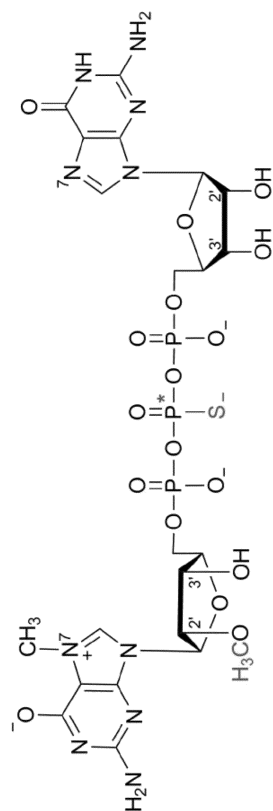
【圖 3】



【図 4】

GGGGGAACTU	AGUUAUUCU	UGGUCCCACT	AGACUCAGAG	AGAAACCGCC	50
ACCAUGAGAG	UGAUGGCCCT	CAGAAACCTCG	AUCCUGCUGC	UGUCUGCGC	100
CCUGGCCCTG	ACAGACATU	GGCGCGAAG	CNA UGUGGGA	AUUGUGGCAG	150
GACUGGCAGU	GCUGGCCCTG	GUGGUGAUCG	GAGCCGUGGU	GGCUACCTCG	200
AUGUGCAGAC	GGAAGUCCAG	CGGAGGCAAG	GGCGGCAGCU	ACAGCCAGGC	250
GCCTAGCTCU	GAAUGGCCCT	AGGGCAGCGA	CGUGUCACUG	ACAGCCUAGU	300
AACUGGAGCU	GGUACUGCAU	GCAGCAUUG	CUAGCUGCCC	CUUUCCTGUC	350
CUUGGUUACCT	CGAGUCUCCC	CCGACCTCGG	GUCCAGGUA	UGCUCCCACT	400
UCCACCTGCC	CCACUCACCA	CCUCUGCUAG	UUCCAGACAC	CUCCCAAGCA	450
CGCAGCAUUG	CAGCUCAAAA	CGCUUAGCCU	AGCCACATCC	CCACGGGAAA	500
CAGCAGUGAU	UAACCUUAG	CAUUAACGA	AGUUUUAUCU	AAGCUAUUCU	550
AACCCACGGG	UUUGGUCAUU	UCGUGCTCAG	CACATCCGAG	CCUGGUCCAG	600
AGUCGCUAGC	CGCGUCGCUA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	650
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	700
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	739

【 図 5 】



10

20

【 配 列 表 】

2022518399000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/013353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/144082 A1 (MODERNATX INC [US]) 9 August 2018 (2018-08-09) page 2, line 22 - page 3, line 21 page 13, line 2 - line 17 page 13, line 28 - page 15, line 13 page 19, line 24 - page 20, line 27 page 21, line 1 - page 22, line 6 page 164, line 31 - page 169, line 3; claims 1-130; table 10 ----- -/--	1-5, 13-38
☒ 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 14 April 2020		Date of mailing of the international search report 24/06/2020
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 Bayer, Annette

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/013353

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Clinical Trials Gov: "Clinical Trials.gov Study NTC03289962: A Study of R07198457 as a Single Agent and in Combination With Atezolizumab in Participants With Locally Advanced or Metastatic Tumors", 21 September 2017 (2017-09-21), XP055684091, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NC T03289962 [retrieved on 2020-04-08] the whole document & Anonymous: "BNT122", Drugs & Biologics Search Results, 6 February 2017 (2017-02-06), XP055684098, Retrieved from the Internet: URL:https://integrity.clarivate.com/integr ity/xmlxsl/pk_prod_list.exec_form_pro_pr [retrieved on 2020-04-08] -----	1-5, 13-38
X	UGUR SAHIN ET AL: "Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer", NATURE, SPRINGER NATURE PUBLISHING AG, LONDON vol. 547, no. 7662 13 July 2017 (2017-07-13), pages 222-226, XP002780019, ISSN: 1476-4687, DOI: 10.1038/NATURE23003 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/nature 23003.pdf [retrieved on 2017-07-05] the whole document, in particular page 224, left-hand column, 2nd paragraph and abstract -----	1-5, 13-38
A	LENA M. KRANZ ET AL: "Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy", NATURE, vol. 534, no. 7607, 16 June 2016 (2016-06-16), pages 396-401, XP05565453, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature18300 the whole document, in particular page 399, right-hand column - page 400, left-hand column, bridging paragraph ----- -/--	1-5, 13-38

7

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

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/013353

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O. TÜRECI ET AL: "Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neopeptide Vaccines", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 22, no. 8, 15 April 2016 (2016-04-15), pages 1885-1896, XP055300469, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1509 the whole document, in particular figures 2, 3 and table 2 on page 1891 -----	1-5, 13-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/013353

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-3, 5-7, 12-38(all partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 13-38(all partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2020/ 013353

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 13-38(all partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is nivolumab, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

2. claims: 1-5, 13-38(all partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is pembrolizumab, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter

3. claims: 6-8, 12-38(all partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is avelumab, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

4. claims: 6-8, 12-38(all partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is durvalumab, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

5. claims: 9(completely); 6, 7, 12-38(partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 013353

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is an anti-PD-L1 antibody as recited in present claim 9, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

10

6. claims: 10(completely); 6, 7, 12-38(partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is an anti-PD-L1 antibody as recited in present claim 10, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

20

7. claims: 11(completely); 6, 7, 12-38(partially)

A method of treating or delaying progression of cancer in an individual, comprising administering to the individual an effective amount of a PD-1 axis binding antagonist, which is atezolizumab, and an RNA vaccine, wherein the RNA vaccine comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual and related subject-matter.

30

8. claims: 39-76, 104-108

An RNA molecule as recited in present claim 39 and related subject-matter.

9. claims: 77-103

An DNA molecule as recited in present claim 77 and related subject-matter.

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 013353

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-3, 5-7, 12-38(all partially)

Present claims 1-3, 5-7, 12-13 and 18-38 relate to an extremely large number of possible PD-1 axis binding antagonists. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of such PD-1 axis binding antagonists, see the anti-PD1 and anti-PD-L1 antibodies defined by their generic names (see, e.g. claims 4, 8 and 11 or by at least their six sequences (see, e.g. claims 9, 10). The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of these claims (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). The search of claims 1-3, 5-7, 12-13 and 18-38 was restricted to those PD-1 axis binding antagonists which appear to be supported (see claims 4, 8-11).

Moreover, only the subject-matter which is supported by the description has been taken as a basis for defining the number of inventions, as the applicant is not invited to pay additional search fees for inventions which prima facie lack sufficiency of disclosure.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/013353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2018144082 A1	09-08-2018	AU 2017397458 A1	15-08-2019
		CA 3052255 A1	09-08-2018
		CN 110505877 A	26-11-2019
		EP 3576751 A1	11-12-2019
		JP 2020506189 A	27-02-2020
		KR 20190120233 A	23-10-2019
		SG 11201906895W A	27-08-2019
		US 2019351040 A1	21-11-2019
		W0 2018144082 A1	09-08-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	47/18 (2006.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/18	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
		C 1 2 N	15/13	

(32)優先日 令和1年8月15日(2019.8.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(72)発明者 フィーネ, グレグ ダニエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌイー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA31 AA65 BB13 CC18 CC27 DD49 DD51 DD63 EE41
4C084 AA19 MA24 MA65 MA66 NA05 NA14 ZA89 ZB26 ZC75
4C085 AA03 AA13 AA14 BB23 CC23 DD62 EE03 GG02
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA24 MA65 MA66 NA05 NA14
ZA89 ZB26 ZC75
4H045 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74