(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-534900
(P2024-534900A)
(43)公表日　令和6年9月26日(2024.9.26)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61K	*47/24*	*(2006.01)*	A61K	47/24	ZNA	4C076
A61K	*9/51*	*(2006.01)*	A61K	9/51		4C084
A61K	*47/28*	*(2006.01)*	A61K	47/28		4C085
A61K	*47/22*	*(2006.01)*	A61K	47/22		4C086
A61K	*47/34*	*(2017.01)*	A61K	47/34		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全222頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-514020(P2024-514020)
(86)(22)出願日　令和4年9月2日(2022.9.2)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月25日(2024.4.25)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/074435
(87)国際公開番号　WO2023/031392
(87)国際公開日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2021/074342
(32)優先日　令和3年9月3日(2021.9.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　509014386
キュアバック エスイー
ＣｕｒｅＶａｃ ＳＥ
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５
Ｆｒｉｅｄｒｉｃｈ－Ｍｉｅｓｃｈｅｒ－Ｓｔｒａｓｓｅ １５，７２０７６ Ｔｕｅｂｉｎｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田 誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田 博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田 淳
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ホスファチジルセリンを含む核酸を送達するための新規な脂質ナノ粒子

(57)【要約】
本発明は、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸およびｂ）担体組成物を含むワクチン組成物に関し、当該担体組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンを含む。本発明はさらに、ワクチン組成物と、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む医薬組成物、ならびに対象における感染性疾患；がんまたは腫瘍疾患、障害または状態；特定の肝臓疾患；アレルギー；あるいは自己免疫疾患、障害または状態の処置または予防（ならびにその対応する処置方法）における使用のためのワクチン組成物または医薬組成物に関する。なおさらに、本発明は、ワクチン組成物または医薬組成物を含むキットまたはキットオブパーツ、ならびに対象において免疫応答を誘導する方法に関する。最後に、本発明は、対象において（ｉ）免疫応答を誘導するため、および（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するためのワクチン組成物または医薬組成物またはキットもしくはキットオブパーツの使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；
ｂ）リン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物であって、ホスファチジルセリンの量が、前記担体組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の９ｍｏｌ％以下、好ましくは５ｍｏｌ％以下である、担体組成物と
を含むワクチン組成物。
【請求項２】
前記少なくとも１つの核酸が免疫寛容誘導性核酸ではない；および／または前記少なくとも１つの核酸が免疫寛容誘導性ポリペプチドをコードしない；および／または前記ワクチン組成物が抗原もその断片もしくはバリアントも含まない；および／または前記ワクチン組成物が唯一のペイロードとして前記少なくとも１つの核酸を含む；および／または前記ワクチン組成物が免疫寛容誘導性組成物ではない、請求項１に記載のワクチン組成物。
【請求項３】
前記担体組成物が、前記少なくとも１つの核酸を少なくとも部分的にカプセル化する、請求項１または２に記載のワクチン組成物。
【請求項４】
前記担体組成物が前記少なくとも１つの核酸をカプセル化する、請求項１～３のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項５】
前記担体組成物が内表面および外側に面する外表面を含み、ホスファチジルセリンが前記担体組成物の前記外表面に位置する、請求項１～４のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項６】
ホスファチジルセリンの親水性頭部基が前記担体組成物の前記外表面に位置する、請求項５に記載のワクチン組成物。
【請求項７】
前記担体組成物に含まれるホスファチジルセリンの親水性頭部基が、前記担体組成物の外側からアクセス可能である、請求項１～６のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項８】
ホスファチジルセリンが、ＤＰｈｙＰＳ、ＷＴ－ＰＳ、１６：０－ＰＳ、１４：０－ＰＳ、１０：０－ＰＳ、６：０－ＰＳ、１８：１－ＰＳ　ＤＯＰＳ、１８：１－Ｌｙｓｏ　ＰＳ、および１８：０－Ｌｙｓｏ　ＰＳからなる群から選択される、請求項１～７のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項９】
前記担体組成物が脂質ナノ粒子組成物である、請求項１～８のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項１０】
前記脂質ナノ粒子組成物が、
（ｉ）カチオン性もしくはイオン化可能脂質；および／または
（ｉｉ）ステロイド；および／または
（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ；および／または
（ｉｖ）ポリマーコンジュゲート脂質
をさらに含む、請求項９に記載のワクチン組成物。
【請求項１１】
前記脂質ナノ粒子組成物が、
（ｉ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｉｉ）ステロイド；

（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ；および
（ｉｖ）ポリマーコンジュゲート脂質
をさらに含む、請求項９または１０に記載のワクチン組成物。
【請求項１２】
前記カチオン性またはイオン化可能脂質が生理的ｐＨで正味の正電荷を有し、好ましくは、前記カチオン性またはイオン化可能脂質が第３級窒素基または第４級窒素基を含み、より好ましくは、前記カチオン性またはイオン化可能脂質が、それぞれ図１Ａ、図１Ｂ、および図１Ｃに示される構造を有するＨＥＸＡ１、ＨＥＸＡ２、およびＴＨＩＯＥＴＨＥＲからなる群から選択される、請求項１０または１１に記載のワクチン組成物。
【請求項１３】
前記ステロイドが、コレステロール、コレステリルヘミスクシネート（ＣＨＥＭＳ）、およびこれらの誘導体からなる群から選択され、好ましくは、前記ステロイドがコレステロールである、請求項１０～１２のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項１４】
前記さらなるリン脂質が、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ；１，２－ジ－（３，７，１１，１５－テトラメチルヘキサデカノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ；ジオレオイルホスファチジルコリン）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ；ジパルミトイルホスファチジルコリン）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬｏＰＥ）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルホスホエタノールアミン、１６－Ｏ－ジメチルホスファチジルエタノールアミン、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１８－１－トランスホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、１，２－ジスクアレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＱＰＥ）、１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（トランスＤＯＰＥ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＳＬＰＥ）、１－トリデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＰＯＰＳ）、１－１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－Ｏ－ヘキサデカニル－２－Ｏ－（９Ｚ－オクタデセニル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジステアロ

イル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリンまたは１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－フィタニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１－パルミトイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＣｈｅｍｓＰＣ）、１，２－ジコレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＣｈｅｍｓＰＣ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチル水素ホスフェート（ＤＯＣＰ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチルエチルホスフェート（ＤＯＣＰｅ）、および１－Ｏ－オクタデシル－２－Ｏ－メチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（エデルホシン）からなる群から選択され、

好ましくは、前記さらなるリン脂質がＤＰｈｙＰＥであり；前記リン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥが、場合により、少なくとも２つのアルキル鎖を有するリン脂質であって、各アルキル鎖が独立に、好ましくはＣ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９またはＣ１０の長さ、より好ましくはＣ６、Ｃ７またはＣ８の長さ、最も好ましくはＣ７の長さを有する、リン脂質、さらに最も好ましくは、ＤＨＰＣ（１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０４：０ＰＣ（１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）からなる群から選択されるリン脂質との組合せで存在し、ＤＨＰＣが少なくとも２つのアルキル鎖を有する場合により存在するリン脂質として最も好ましい、

請求項１０～１３のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項１５】

前記ポリマーコンジュゲート脂質がペグ化脂質またはＰＭＯＺ－脂質である、請求項１０～１４のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項１６】

（ａ－ｉ）３０～７０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２０～５０ｍｏｌ％の量のステロイド；５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質；および０．５～５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ａ－ｉｉ）４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２０～４０ｍｏｌ％の量のステロイド；１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１～２ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ａ－ｉｉｉ）３０～７０ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２０～５０ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび請求項１４に記載のリン脂質；および０．５～５ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；ならびに

（ａ－ｉｖ）４０～６０ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２０～４０ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび請求項１４に記載のリン脂質；および１～２ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；

からなる群から選択される比の賦形剤を含む；

好ましくは、

（ｂ－ｉ）５９ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイド；１０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｂ－ｉｉ）５８ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイド；１１ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｂ－ｉｉｉ）４９ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイ

ド；２０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｉｖ）５９ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；１０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび請求項１４に記載のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｖ）５８ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；１１ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび請求項１４に記載のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；ならびに
（ｂ－ｖｉ）４９ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび請求項１４に記載のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
からなる群から選択される比の賦形剤を含む；
より好ましくは、
（ｃ－ｉ）５９ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥ；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｉ）５９ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；２ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび８ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥ；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｉ）５８ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥおよび１ｍｏｌ％の量のＤＨＰＣ；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｖ）４９ｍｏｌ％の量の請求項１２に記載のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の請求項１３に記載のステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥおよび１０ｍｏｌ％の量のＤＨＰＣ；および１．７ｍｏｌ％の量の請求項１５に記載のポリマーコンジュゲート脂質；
からなる群から選択される比の賦形剤を含む、請求項１１～１５のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項１７】
前記少なくとも１つの核酸がＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項１～１６のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項１８】
前記少なくとも１つの核酸が、ＲＮＡ、好ましくは少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするコード配列、および場合により少なくとも１つの自己増幅性酵素をコードするコード配列を含むｍＲＮＡである、請求項１７に記載のワクチン組成物。
【請求項１９】
前記脂質ナノ粒子が、
（ｉ）１０～２０、好ましくは約２～約１５、より好ましくは約３～約１０、一層より好ましくは約４～約９、最も好ましくは約６の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；もしくは
（ｉｉ）約５～約２０、より好ましくは約１０～約１８、一層より好ましくは約１２～約１６、最も好ましくは約１４の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；および／もしくは
（ｉｉｉ）約２０～約６０、好ましくは約３～約１５、約５～約１３、約４～約８もし

くは約７～約１１の範囲の脂質：ｍＲＮＡ重量比を達成するような量
のｍＲＮＡを含む、ならびに／または
前記脂質ナノ粒子が、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、もしくは約６０ｎｍ～約２５０ｎｍ、もしくは約６０ｎｍ～約２００ｎｍ、もしくは約７０ｎｍ～２００ｎｍ、もしくは約７５ｎｍ～約１６０ｎｍ、もしくは約９０ｎｍ～約１４０ｎｍ、もしくは約１００ｎｍ～約１４０ｎｍの動的光散乱によって決定される平均流体力学的径を有する；ならびに／または
前記脂質ナノ粒子が、－５０ｍＶ～＋５０ｍＶの範囲、好ましくは－２５ｍＶ～＋２５ｍＶの範囲、より好ましくは－１０ｍＶ～＋１０ｍＶの範囲、最も好ましくは－５ｍＶ～＋５ｍＶの範囲のゼータ電位を示す、請求項１８に記載のワクチン組成物。

【請求項２０】
前記ｍＲＮＡがモノ、バイ、またはマルチシストロン性ｍＲＮＡである、請求項１８または１９に記載のワクチン組成物。

【請求項２１】
前記ｍＲＮＡが少なくとも１つの化学修飾を含む、請求項１８～２０のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項２２】
前記化学修飾が塩基修飾、糖修飾、骨格修飾、および脂質修飾からなる群から選択され、好ましくは、前記化学修飾が塩基修飾であり、より好ましくは、前記塩基修飾が、好ましくは、シュードウリジン（プシーまたはψ）、Ｎ１－メチルシュードウラシル（Ｎ１ＭＰＵ、Ｎ１Ｍプシーまたは Ｎ１Ｍψ）、１－エチルシュードウラシル、２－チオウラシル（ｓ２Ｕ）、４－チオウラシル、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項２１に記載のワクチン組成物。

【請求項２３】
前記コード配列が配列修飾を示す、請求項１８～２２のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項２４】
前記配列修飾が配列のＧ／Ｃ含量修飾、コドン修飾、コドン最適化、またはＣ最適化から選択され；好ましくは、対応する野生型ｍＲＮＡのコード配列と比較して、
ａ）前記コード配列のＧ／Ｃ含量が増加している；
ｂ）前記コード配列のＣ含量が増加している；
ｃ）前記コード配列のコドン使用頻度がヒトコドン使用頻度に適合されている；および／または
ｄ）コドン適応指標（ＣＡＩ）が前記コード配列で増加もしくは最大化している、
請求項２３に記載のワクチン組成物。

【請求項２５】
前記ｍＲＮＡが、
ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；
ｂ）好ましくは、マイクロＲＮＡ結合部位がｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－２６ａ結合部位、好ましくはｍｉＲ－１２２もしくはｍｉＲ－１４２結合部位、またはこれらの上記ｍｉＲＮＡ結合部位の任意の組合せからなる群から選択されるマイクロＲＮＡのためのものである、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位配列；
ｃ）少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメント；
ｄ）少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｆ）少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；

ｇ）場合により、配列番号３もしくは４から選択されるヒストンステムループ；
ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント；
またはこれらの任意の組合せ
をさらに含む、請求項１８～２４のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項２６】
前記ｍＲＮＡが５’キャップ構造、好ましくはｍ７Ｇ、キャップ０、キャップ１、キャップ２、修飾キャップ０、または修飾キャップ１構造を含む、請求項１８～２５のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項２７】
前記少なくとも１つのコードＲＮＡが少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲおよび／または少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲを含み、好ましくは、前記少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲが、ＨＳＤ１７Ｂ４、ＲＰＬ３２、ＡＳＡＨ１、ＡＴＰ５Ａ１、ＭＰ６８、ＮＤＵＦＡ４、ＮＯＳＩＰ、ＲＰＬ３１、ＳＬＣ７Ａ３、ＴＵＢＢ４Ｂ、およびＵＢＱＬＮ２から選択される遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片、もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む；および／または好ましくは、前記少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲが、ＰＳＭＢ３、ＡＬＢ／アルブミン、アルファ－グロビン、ＣＡＳＰ１（好ましくは配列番号８１（ＤＮＡ）または配列番号８２（ＲＮＡ））、ＣＯＸ６Ｂ１（好ましくは配列番号８３（ＤＮＡ）または配列番号８４（ＲＮＡ））、ＧＮＡＳ（好ましくは配列番号８５（ＤＮＡ）または配列番号８６（ＲＮＡ））、ＮＤＵＦＡ１（好ましくは配列番号８７（ＤＮＡ）または配列番号８８（ＲＮＡ））およびＲＰＳ９（好ましくは配列番号７９（ＤＮＡ）または配列番号８０（ＲＮＡ））から選択される遺伝子の３’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片、もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む、請求項２５に記載のワクチン組成物。
【請求項２８】
前記少なくとも１つのコードＲＮＡが、（ｉ）ＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲおよびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ、または（ｉｉ）ＲＰＬ３２　５’－ＵＴＲおよびＡＬＢ／アルブミン　３’－ＵＴＲ、好ましくは変異アルファ－グロビン　３’－ＵＴＲ（配列番号１１、１２）、より好ましくはＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲ（配列番号２１、２２）およびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ（配列番号１９、２０）を含む、請求項２７に記載のワクチン組成物。
【請求項２９】
前記ｍＲＮＡが、５’→３’方向に、以下のエレメント：
ａ）好ましくはｍ７Ｇ（５’）、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）およびｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）からなる群から選択される、５’キャップ構造；
ｂ）ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含む５’－ＵＴＲエレメントであって、前記核酸配列は、好ましくは、配列番号２２、配列番号２４、配列番号２６による核酸配列、もしくは好ましくは配列番号７７／７８（ＳＬＣ７Ａ３）もしくは配列番号７５／７６（ＲＰＬ３１）、またはそのホモログ、断片もしくはバリアント；最も好ましくは配列番号２２（ＨＳＤ１７Ｂ４）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、５’－ＵＴＲエレメント；
ｃ）前記少なくとも１つのコード配列；
ｄ）α－グロビン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、前記核酸配列は、好ましくは、配列番号６、８もしくは配列番号１０、１２、１４、１６、１８、もしくは好ましくは配列番号２０による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアントに対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；および／またはアルブミン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、核酸配列は、好ましくは、配列番号１８（ＡＬＢ／アルブミン）もしくは好ましくは配列番号７９／８０（ＲＰＳ９）による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリ

アント；最も好ましくは配列番号２０（ＰＳＭＢ３）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、４０～８０、または５０～７０個のアデノシンヌクレオチド、より好ましくは少なくとも７０個のアデノシンヌクレオチド、一層より好ましくは約１００個のアデノシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｆ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、２０～７０、２０～６０または１０～４０個のシトシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；ならびに
ｇ）場合により、好ましくは配列番号４によるＲＮＡ配列を含む、少なくとも１つのヒストンステムループ
を含む、請求項１８～２４のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項３０】
前記抗原が病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原、または自己免疫自己抗原から誘導される、請求項１～２９のいずれか一項に記載のワクチン組成物。
【請求項３１】
前記病原性抗原が細菌抗原、ウイルス抗原、真菌抗原、および原生動物抗原からなる群から選択される、請求項３０に記載のワクチン組成物。
【請求項３２】
前記病原性抗原が、
（ｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、または卵形マラリア原虫）から誘導される；および／または
（ｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来の構造タンパク質、アクセサリータンパク質、もしくはレプリカーゼタンパク質、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアントから誘導される；および／または
（ｉｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のスパイクタンパク質（Ｓ）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、膜タンパク質（Ｍ）もしくはヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアント（好ましくは、スパイクタンパク質（Ｓ）は、スパイクタンパク質断片Ｓ１もしくはスパイクタンパク質断片Ｓ２、より好ましくはスパイクタンパク質断片Ｓ１、またはこれらの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアントを含むか、またはこれらからなる）から誘導される；および／または
（ｉｖ）少なくとも１つのプレフュージョン安定化突然変異を含む、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のプレフュージョン安定化スパイクタンパク質（Ｓ）（Ｓ＿ｓｔａｂ）から誘導される、

請求項３０または３１に記載のワクチン組成物。
【請求項３３】
好ましくは、無菌液体担体で再構成するための無菌固体組成物であり、ｐＨ修正剤、増量剤、安定剤、非イオン性界面活性剤、および抗酸化剤から選択される１種または複数の不活性成分をさらに含み、前記無菌液体担体が水性担体である、請求項３０～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物と、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む医薬組成物。
【請求項３４】
対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変、および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態の処置または予防に使用するための、請求項３０～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬組成物。
【請求項３５】
対象におけるウイルス、細菌、または原生動物感染性疾患を含む感染性疾患の処置または予防に使用するための、請求項３２に記載のワクチン組成物または請求項３２に記載のワクチン組成物を含む医薬組成物。
【請求項３６】
前記ワクチン組成物または医薬組成物が、対象に局所または局所領域注射、注入または埋込、特に皮内、皮下、筋肉内、前房内、結膜下、脈絡膜上注射、網膜下、テノン嚢下、眼球後、局所、後胸膜近傍投与、または肺内吸入、間質、局所領域、硝子体内、腫瘍内、リンパ内、節内、関節内、関節滑液嚢内、関節周囲、腹腔内、腹部内、心臓内、病巣内、心膜内、脳室内、胸膜内、神経周囲、胸腔内、硬膜外、硬膜内、硬膜周囲、髄腔内、髄内、脳内、空洞内、海綿体内、前立腺内、精巣内、軟骨内、骨内、円板内、脊髄内、仙骨内、嚢内、歯肉内、卵巣内、子宮内、眼周囲、歯周、眼球後、くも膜下、結膜下、脈絡膜上注射、注入、埋込、経鼻、頬側、舌下、耳または耳介、眼、結膜、膣、直腸、子宮頸部内、副鼻腔内、喉頭、中咽頭、尿管、尿道投与を介して投与され、より好ましくは前記脂質ナノ粒子が、対象に筋肉内、静脈内、皮内、皮下、腫瘍内、鼻腔内、または吸入により、好ましくは対象に局所または局所領域注射または注入を介して投与される、請求項３４または３５に記載の使用するためのワクチン組成物および医薬組成物。
【請求項３７】
場合により、可溶化のための液体ビヒクル、および場合により、成分の用法および用量についての情報を提供する技術的説明書を含む、請求項３０～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬組成物を含むキットまたはキットオブパーツ。
【請求項３８】
対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変、および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態を処置または予防する方法であって、
ａ）実施形態３０～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬組成物または請求項３７に記載のキットもしくはキットオブパーツを用意する工程と；
ｂ）前記ワクチン組成物または前記医薬組成物または前記キットもしくはキットオブパーツを前記対象の組織または生物に適用または投与する工程と
を含む方法。
【請求項３９】
対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の請求項１～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法。
【請求項４０】
請求項１～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬

組成物を対象に投与する工程を含む、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含むワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化する方法。

【請求項４１】

対象において、（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するため、ならびに／または（ｉｖ）ワクチン組成物もしくは医薬組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／もしくは脾臓に標的化するための、請求項１～３２のいずれか一項に記載のワクチン組成物または請求項３３に記載の医薬組成物または請求項３７に記載のキットもしくはキットオブパーツの使用。

【請求項４２】

対象において、前記ワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含む請求項１～４１のいずれか一項に記載のワクチンまたは請求項１～４１のいずれか一項に記載の担体組成物におけるホスファチジルセリンの使用。

【請求項４３】

前記対象が哺乳動物対象、好ましくはヒト対象である、請求項３４もしくは３５に記載の使用するためのワクチン組成物もしくは医薬組成物、請求項３８、３９もしくは４０に記載の方法、または請求項４１もしくは４２に記載の使用。

【請求項４４】

ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；

ｂ）リン脂質１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＨＰＣ）を含む担体組成物と

を含むワクチン組成物または担体組成物。

【請求項４５】

対象において、ワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）ワクチンまたは担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含むワクチン組成物の担体組成物におけるＤＨＰＣの使用。

【請求項４６】

前記対象が哺乳動物対象、好ましくはヒト対象である、請求項３４もしくは３５に記載の使用するためのＤＨＰＣを含むワクチン組成物もしくは医薬組成物、請求項３８、３９もしくは４０に記載の方法、または請求項４１もしくは４２に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸および担体組成物を含むワクチン組成物に関し、当該担体組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンを含む。少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントは、ワクチン組成物またはワクチン組成物を含む医薬組成物が、対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；特定の肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態の処置および防止のために使用され得るように、病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン性抗原または自己免疫性自己抗原に由来し得る。本発明はまた、対応するキットまたはキットオブパーツ、対象において免疫応答を誘導する対応する方法、ならびに対象において免疫応答を誘導するためおよび抗原特異的Ｔ細胞応答を誘

導するためのその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
一般的に、ワクチンは、「第１」、「第２」および「第３」世代ワクチンに細分され得る。「第１世代」ワクチンは、典型的には、生物全体ワクチンである。これらは、生弱毒化病原体または死滅病原体、例えば、ウイルス、細菌などのいずれかに基づく。生弱毒化ワクチンの主な欠点は、生命を脅かす変異体への復帰のリスクである。よって、このような病原体は、弱毒化されているが、依然として予測不能なリスクを本質的に有し得る。死滅病原体は、特異的免疫応答をもたらすために望まれるほど有効となり得ない。これらのリスクを最小化するために、「第２世代」ワクチンが開発された。これらは、典型的には、病原体から誘導される、定義される抗原または組換えタンパク質成分からなる、サブユニットワクチンである。
【０００３】
遺伝子ワクチン、すなわち、遺伝子ワクチン接種用のワクチンは通常、「第３世代」ワクチンとして理解される。これらは、典型的には、インビボで病原体または腫瘍抗原に特徴的なペプチドまたはタンパク質（抗原）断片の発現を可能にする遺伝子操作された核酸分子で構成される。遺伝子ワクチンは、患者に投与すると、標的細胞による取り込み後に発現される。投与された核酸分子の発現は、コードされたタンパク質の産生をもたらす。これらのタンパク質が患者の免疫系によって外来性と認識されると、免疫応答が誘引される。
【０００４】
ＤＮＡならびにＲＮＡは、遺伝子ワクチン接種の状況において投与するための核酸分子として使用され得る。ＤＮＡは比較的安定で、取り扱いやすいことが知られている。しかしながら、ＤＮＡの使用は、障害のある遺伝子の機能の喪失などの変異原性イベントを潜在的にもたらす、患者のゲノムへの投与されたＤＮＡ断片の望まない挿入のリスクを有する。さらなるリスクとして、抗ＤＮＡ抗体の望まない産生が現れている。別の欠点は、得られたｍＲＮＡが翻訳され得る前に、ＤＮＡが転写されるために核に入らなければならないので、ＤＮＡ投与で達成可能なコードされるペプチドまたはタンパク質の発現レベルが限られることである。数ある理由の中でも、投与されたＤＮＡの発現のレベルは、ＤＮＡ転写を調節する特異的転写因子の存在に依存する。このような因子の非存在下では、ＤＮＡ転写は満足な量のＲＮＡを生じない。結果として、得られる翻訳されたペプチドまたはタンパク質のレベルが限られる。
【０００５】
遺伝情報を標的細胞に送達するためのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の使用は、ＤＮＡの魅力的な代替を提供する。ｍＲＮＡを使用することの利点としては、一過的な発現および非形質転換特性が挙げられる。ｍＲＮＡは、発現されるために核に進入する必要がなく、その上、宿主ゲノムに一体化することができず、それによって、発癌のリスクが排除されるのである。すなわち、遺伝子ワクチン接種にＤＮＡの代わりにＲＮＡを使用することによって、望まないゲノム組み込みおよび抗ＤＮＡ抗体の産生のリスクが最小化または回避される。ワクチンにおけるｍＲＮＡの使用に関する２つの主な問題は、分解および細胞内アクセスに関連している。したがって、遊離ＲＮＡは、血漿中でのヌクレアーゼ消化を受けやすく、遊離ＲＮＡは、関連する翻訳機構が存在する細胞内区画へのアクセスを得る能力が限られている。
【０００６】
カチオン性脂質と中性脂質、コレステロール、およびポリマーコンジュゲート脂質などの他の脂質成分、ならびにｍＲＮＡとから形成される脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が、血漿中でのＲＮＡの分解を遮断し、オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを促進するために使用されてきた。特許文献１および特許文献２は、この点で異なる抗原をコードする非修飾およびヌクレオチド修飾ＲＮＡを含む脂質ナノ粒子組成物を記載している。
【０００７】

上述の脂質ナノ粒子の使用は、既にｍＲＮＡベースのワクチンの効果的な使用に向けた大きな前進であったが、例えば、ワクチンがｍＲＮＡによってコードされる抗原に対してより大きな免疫応答をもたらすように、少なくとも１つのさらなる成分をｍＲＮＡベースのワクチンに添加することによって、ｍＲＮＡベースのワクチンをさらに改善する必要がある。

【０００８】

さらに、標準的なＬＮＰは、通常、肝臓を標的とする。これは、場合によっては、例えば免疫療法において、これらの器官に対する免疫応答が誘発され得るので、不利であり得る。したがって、肝臓標的化を回避する、全身投与することができるｍＲＮＡ製剤が必要とされている。さらに、脾臓、マクロファージ、またはそれぞれＤＣを標的とするＬＮＰを提供することが有利であろう。これに関して、ｍＲＮＡのような核酸は、腫瘍に対するＴ細胞応答を誘導するために、抗原提示細胞（ＡＰＣ）においてｍＲＮＡをコードすることによる腫瘍抗原発現に基づく、患者における様々な治療的介入、例えば腫瘍治療アプローチのために非常に興味深い。そのような介入の標的細胞は、例えば、リンパ節（ＬＮ）または脾臓に存在する樹状細胞（ＤＣ）である。したがって、１つまたは複数のエピトープを含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡは、過剰にアップレギュレートされたＲＮＡ転写物によってコードされる腫瘍関連抗原に由来するエピトープを患者に送達するために使用され得る。脾臓に存在する樹状細胞（ＤＣ）は、エピトープのｍＲＮＡ発現について特に目的の抗原提示細胞を表す。したがって、本発明の１つの目的は、患者に適用するための製品の基準を満たす、高い脾臓選択性を有する注射可能なＲＮＡ製剤の開発である。本発明の特許請求の範囲は、上記の課題または目的に対する解決策を提供する。本発明によれば、ホスファチジルセリンを含むＬＮＰは、驚くべきことに、それらのＬＮＰの投与後に脾臓またはそれぞれ樹状細胞において実質的なｍＲＮＡ発現をもたらす。標的細胞（脾臓）におけるレポーター遺伝子の強い発現が測定されたが、他の器官における発現は低かった。通常、ＬＮＰは投与時に肝臓において主要な発現を示すため、これは予想外であった。

【０００９】

よって、全ての先行技術にもかかわらず、分子、例えば核酸の減少した細胞毒性、より優れた標的化能力、増強された短期および／もしくは長期免疫性、またはエンドソーム脱出の促進のうちの１つまたは複数の特性を提供する、代替脂質を含む代替脂質ナノ粒子製剤が依然として必要である。したがって、脂質ナノ粒子製剤の分野において今日までに行われてきた膨大な量の研究にもかかわらず、上記の課題、またはトランスフェクション工程のインビボ有効性、毒性、費用および設計の単純性のうちの１つまたは複数を改善または除去することができるさらなる脂質ナノ粒子製剤を開発することが望まれている。

【００１０】

したがって、本発明の目的は、上記の課題またはトランスフェクション工程のインビボ有効性、毒性、費用および設計の単純性のうちの１つまたは複数を改善または除去する新規な脂質ナノ粒子製剤の提供に関しても見ることができる。これらの課題および「背景技術（Ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｉｎｖｅｎｔｉｏｎ）」に記載されるさらなる課題は、本発明の主題および特許請求の範囲によって解決された。本発明の課題に対する１つの例示的な解決策は、

ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；

ｂ）リン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物であって、ホスファチジルセリンの量が、担体組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の９ｍｏｌ％以下、好ましくは５ｍｏｌ％以下である、担体組成物と

を含むワクチン組成物の提供である。

【００１１】

さらに、上記の課題は、本明細書に開示されるように、より短いアルキル鎖を有するリン脂質、具体的には（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ；１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリ

セロ－３－ホスホコリン）をＬＮＰ製剤に添加することによって解決された。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１２】
【特許文献１】国際公開第２０１８０７８０５３号
【特許文献２】国際公開第２０１６１７６３３０号
【発明の概要】
【００１３】
本発明者らは、驚くべきことに、抗原をコードする核酸を含む担体組成物（好ましくは脂質ナノ粒子）を含むワクチン組成物へのリン脂質ホスファチジルセリンの添加が、理論に束縛されることを望むものではないが最も有力には、免疫系の食細胞による食作用のためのワクチン組成物を標的とし、最終的に食細胞中のコードされた抗原またはその断片もしくはバリアントの存在をもたらすことによって、より有効なワクチンをもたらすことを見出したという点で、上記の必要性を解決した。
【００１４】
さらに、驚くべきことに、ワクチン組成物へのホスファチジルセリンの上記の添加は、ホスファチジルセリンを含まないワクチン組成物、好ましくはｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチン組成物であるワクチン組成物と比較した場合、それぞれ、例えばＤＣ、マクロファージのような抗原提示細胞（ＡＰＣ）または脾臓自体へのワクチン組成物の標的化の実質的な増加をもたらすことが見出された。また驚くべきことに、ｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチン組成物へのホスファチジルセリンの上記の添加は、ホスファチジルセリンを含まないｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチン組成物と比較した場合、リンパ節へのｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチン組成物の標的化の実質的な増加をもたらすことが見出された。
【００１５】
第１の態様において、本発明は
ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；
ｂ）リン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物と
を含むワクチン組成物に関する。
【００１６】
別の態様では、本発明は、少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸を含むワクチン組成物を脾臓またはリンパ節に送達する方法であって、ホスファチジルセリンを含まないワクチン組成物と比較した場合、担体組成物が、リン脂質ホスファチジルセリンを含む方法に関する。
【００１７】
第１の態様の実施形態において、抗原は、病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原、または自己免疫自己抗原から誘導される。
第１の態様の別の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の９ｍｏｌ％以下、好ましくは５ｍｏｌ％以下である。
【００１８】
第１の態様の別の実施形態において、担体組成物は脂質ナノ粒子組成物である。さらに別の実施形態において、脂質ナノ粒子組成物は、
（ｉ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｉｉ）ステロイド；
（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質；および
（ｉｖ）ポリマーコンジュゲート脂質
をさらに含む。
【００１９】
第２の態様において、本発明は、第１の態様のワクチン組成物と、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む医薬組成物であって、好ましくは、医薬組成物は、

無菌液体担体で再構成するための無菌固体組成物であり、ｐＨ修正剤、増量剤、安定剤、非イオン性界面活性剤、および抗酸化剤から選択される１種または複数の不活性成分をさらに含み、無菌液体担体が水性担体である医薬組成物に関する。

【００２０】

第３の態様において、本発明は、対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変、および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態の処置または予防に使用するための、第１の態様のワクチン組成物または第２の態様の医薬組成物に関する。本発明の第３の態様の非常に好ましい実施形態において、本発明は、がんまたは腫瘍疾患の処置または予防に使用するためのワクチン組成物に関する。

【００２１】

第４の態様において、本発明は、場合により、可溶化のための液体ビヒクル、および場合により、成分の用法および用量についての情報を提供する技術的説明書を含む、第１の態様のワクチン組成物または第２の態様の医薬組成物を含むキットまたはキットオブパーツ（ｋｉｔ　ｏｆ　ｐａｒｔｓ）に関する。

【００２２】

第５の態様において、本発明は、対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変、および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態を処置または予防する方法であって、

ａ）第１の態様のワクチン組成物または第２の態様の医薬組成物または第４の態様のキットもしくはキットオブパーツを用意する工程と；

ｂ）ワクチン組成物または医薬組成物またはキットもしくはキットオブパーツを対象の組織または生物に適用または投与する工程と

を含む方法に関する。

【００２３】

第６の態様において、本発明は、対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の第１の態様のワクチン組成物または第２の態様の医薬組成物を対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法に関する。

【００２４】

第７の態様において、本発明は、対象において、（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、または好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための、第１の態様のワクチン組成物または第２の態様の医薬組成物または第４の態様のキットもしくはキットオブパーツの使用に関する。

【００２５】

定義

明確性および読みやすさのために、以下の科学背景情報および定義を提供する。本明細書で言及されるまたはそれによって開示されるいずれの技術的特徴も、本発明の各実施形態および全ての実施形態の一部となることができるか、または本発明の各実施形態および全ての実施形態で読まれ得る。追加の定義および説明を本開示の文脈で提供することができる。

【００２６】

特に定義しない限り、または具体的な文脈が要求しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語は、関連する技術分野における当業者によって一般的に理解される技術用語と同じ意味を有する。

【００２７】

文脈が別段の指示または要求をしない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という単語ならびに同様の表現は、本明細書および特許請求の範囲において「限定されるものではないが、～を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ，ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」として、開いた包

括的な意味で解釈されるべきである。本発明の目的のために、「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という用語は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語の好ましい実施形態であるとみなされることも理解される必要がある。以下、ある群が少なくともある特定の数の実施形態を含むと定義される場合、これはまた、好ましくはこれらの実施形態のみからなる群を包含することも意図している。

【００２８】

「一実施形態」、「実施形態」、「具体的な実施形態」などの表現は、それぞれの表現と組み合わせて言及される、特定の特徴（ｆｅａｔｕｒｅ）、特性もしくは特徴（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）、または特徴、特性もしくは特徴の特定の群もしくは組合せが、本発明の実施形態の少なくとも１つに存在することを意味する。本明細書の全体にわたる様々な場所でのこれらの表現の出現は、必ずしも同じ実施形態に言及するものではない。さらに、特定の特徴、特性または特徴を、１つまたは複数の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。

【００２９】

単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数の言及を含むものとして理解されるべきである。

数の文脈におけるパーセンテージは、それぞれの項目の総数に対するものとして理解されるべきである。他の場合では、文脈が別段の指示をしない限り、パーセンテージは重量パーセンテージ（重量％）として理解されるべきである。

【００３０】

本明細書で使用される場合、「化合物」は、本質的に同じ化学構造および特性を有する分子からなる材料である、化学物質を意味する。低分子化合物については、分子が、典型的にはその原子組成および構造配置に関して同一である。高分子またはポリマー化合物については、化合物の分子が極めて類似であるが、それらのうちの全てが必ずしも同一というわけではない。例えば、５０モノマー単位からなると指定されているポリマーのセグメントは、例えば４８または５３モノマー単位を有する個々の分子も含有し得る。

【００３１】

「分子」という用語は、「化合物」または個々の（すなわち、単一）分子の同義語として使用され得る。

生理的条件下でイオン化可能な官能基を有する化合物または部分へのいずれの言及も、それぞれの化合物または部分のイオン化形態を含むものとして理解されるべきである。逆もまた同様に、生理的条件下で非イオン化形態でも存在し得るイオン化官能基を有する化合物または部分へのいずれの言及も、それぞれの化合物または部分の非イオン化形態を含むものとして理解されるべきである。例えば、カルボキシル基を有する化合物の開示は、非イオン化カルボキシル基を有するか、またはイオン化カルボキシレート基を有するそれぞれの化合物に言及するものとして解釈されるべきである。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「生理的条件」とは、細胞外条件と細胞内条件の両方を含む、ヒト生理学から公知のｐＨ範囲内にあるｐＨを有する水性環境を指す。このｐＨ範囲の近似は約ｐＨ１～約ｐＨ９である。文脈に応じて、生理的条件はまた、約ｐＨ５～約ｐＨ８．５、または約５．５～約ｐＨ８などのほぼ中性条件を指し得る。

【００３３】

リピドイド化合物は、単にリピドイド（ｌｉｐｉｄｏｉｄ）とも呼ばれ、脂質様化合物、すなわち、脂質様物理特性を有する両親媒性化合物である。本発明の文脈において、脂質という用語は、リピドイドを包含すると考えられる。

【００３４】

本発明の文脈において、ある特定の要素の群（例えば、「Ａ、ＢおよびＣ」）が続く「～からなる群から選択される」という用語は、本発明の文脈内において、前記群に限定されないことを意図している。換言すれば、このような用語は、本開示が列挙されていない要素に閉ざされていることを示さない、すなわち、代わりの意味もこの用語に続く群内に

含まれる。したがって、本発明の文脈において、ある特定の要素の群（すなわち、「Ａ、ＢおよびＣ」）が続く「～からなる群から選択される」という用語は、他の構造的および機能的に関連するならびに関連せず、言及されていない要素も包含する「Ａ、ＢおよびＣから選択される」あるいは「Ａ、ＢまたはＣである」として理解されるべきである。

【００３５】

「約」という用語は、パラメータまたは値が必ずしも同一、すなわち、１００％同じである必要がない場合に使用される。したがって、「約」は、パラメータまたは値が０．１％～２０％、好ましくは０．１％～１０％；特に、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％逸脱し得ることを意味する。当業者であれば、例えばある特定のパラメータまたは値が、パラメータを決定した方法に基づいてわずかに変動し得ることが分かるだろう。例えば、ある特定のパラメータまたは値が、例えば「約１０００ヌクレオチド」の長さを有すると本明細書に定義される場合、その長さは０．１％～２０％、好ましくは０．１％～１０％；特に、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％逸脱し得る。したがって、当業者であれば、その具体例において、その長さが１～２００ヌクレオチド、好ましくは１～１００ヌクレオチド；特に５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００ヌクレオチド逸脱し得ることが分かるだろう。

【００３６】

「カチオン性」という用語は、異なる意味が具体的な文脈から明らかでない限り、それぞれの構造が、永続的に、または永続的ではなく、例えばｐＨなどのある特定の条件に応じて、正の電荷を有することを意味する。よって、「カチオン性」という用語は、「永続的にカチオン性」と「カチオン化可能（ｃａｔｉｏｎｉｓａｂｌｅ）」の両方を網羅する。本明細書で使用される「カチオン化可能」という用語は、化合物、または基もしくは原子が、低ｐＨの環境で正に帯電しており、高ｐＨの環境で帯電していないことを意味する。ｐＨ値を決定することができない非水性環境においても、カチオン化可能化合物、基または原子は、高水素イオン濃度で正に帯電しており、低濃度または活性の水素イオンで帯電していない。これはカチオン化可能またはポリカチオン化可能化合物の個々の特性、特にそのｐＨまたは水素イオン濃度で帯電しているか、または帯電していない、それぞれのカチオン化可能基または原子のｐＫａに依存する。希釈水性環境においては、正の電荷を有するカチオン化可能化合物、基または原子の分率が、当業者に周知のいわゆるヘンダーソン・ハッセルバルヒの式を使用して推定され得る。例えば、化合物または部分がカチオン化可能である場合、約１～９、好ましくは４～９、５～８またはさらには６～８のｐＨ値、より好ましくは９以下、８以下、７以下のｐＨ値、最も好ましくは生理的ｐＨ値、例えば約７．３～７．４、すなわち生理的条件下、特にインビボでの細胞の生理的塩条件下でこれが正に帯電していることが好ましい。実施形態において、カチオン化可能化合物または部分が、生理的ｐＨ値、例えば約７．０～７．４で主に中性であるが、より低いｐＨ値で正に帯電することが好ましい。一部の実施形態において、カチオン化可能化合物または部分のｐＫａの好ましい範囲は約５～約７である。一部の実施形態において、プロトン化可能脂質は、約４～約１１の範囲のプロトン化可能基のｐＫａ、例えば、約５～約７のｐＫａを有する。

【００３７】

異なる意味が具体的な文脈から明らかである場合を除いて、「カチオン性」という用語は、それぞれの構造が、永続的に、または永続的ではなく、ｐＨなどのある特定の条件に応じて、正の電荷を有することを意味する。よって、「カチオン性」という用語は、「永続的にカチオン性」と「カチオン化可能（ｃａｔｉｏｎｉｓａｂｌｅ）」の両方を網羅する。例えば、第１級、第２級または第３級アミノ基を有する化合物または部分は、生理的条件下で主に正に帯電した状態で存在し得るので、カチオン性であり、より具体的には、

カチオン化可能である。

【００３８】

本明細書で使用される場合、「永続的にカチオン性」は、それぞれの化合物、または基もしくは原子が、その環境のいずれのｐＨ値または水素イオン活性でも正に帯電していることを意味する。多くの場合、正の電荷は第４級窒素原子の存在から生じる。化合物が複数のこのような正の電荷を有する場合、永続的にカチオン性のサブカテゴリーである、永続的にポリカチオン性と呼ばれ得る。

【００３９】

同様に、「アニオン性」、「アニオン化可能（ａｎｉｏｎｉｚａｂｌｅ）」および「永続的にアニオン性」という用語は、それぞれの化合物、基または原子の電荷が正ではなく負であることを除いて、「カチオン性」、「カチオン化可能」および「永続的にカチオン性」と類似の意味を有するものとして使用される。

【００４０】

「中性」という表現は、脂質もしくはステロイドなどの化合物、または基もしくは部分に適用される場合、それがカチオン性でもアニオン性でもない、例えば炭化水素などの、生理的条件下でイオン化可能な官能基を有さない化合物であること；またはそれが典型的な天然ホスファチジルコリンなどの、典型的な生理的条件下でカチオン性とアニオン性の両方、すなわち双性イオン性（ｚｗｉｔｔｅｒｉｏｎｉｃ）であることを意味する。

【００４１】

本明細書で使用される「脂質」は、脂肪酸の誘導体（例えば、エステル）であり、一般的に水に不溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする有機化合物の群を指す。脂質は通常、少なくとも３つのクラスに分けられる：（１）脂肪および油ならびにワックスを含む「単純脂質」；（２）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質（ｃｏｍｐｏｕｎｄ　ｌｉｐｉｄｓ）」；および（３）ステロイドなどの「誘導脂質（ｄｅｒｉｖｅｄ　ｌｉｐｉｄｓ）」。糖脂質に関して、ある特定の実施形態において、ＬＮＰが糖脂質（例えば、モノシアロガングリオシドＧＭ$_1$）を含む。

【００４２】

この文脈において、接頭辞「ポリ（ｐｏｌｙ）－」は、化合物においてそれぞれの特性を有する複数の原子または基を指す。括弧内に入れる場合、複数の存在は任意選択である。例えば、（ポリ）カチオン性はカチオン性および／またはポリカチオン性を意味する。しかしながら、接頭辞の非存在は、複数を除外するなどと解釈されるべきではない。例えば、ポリカチオン性化合物もカチオン性化合物であり、そのように呼ばれ得る。

【００４３】

「核酸」という用語は、ＤＮＡまたはＲＮＡを含むか、またはそれらからなる任意の化合物を意味する。この用語はポリヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチドに使用され得る。本明細書で特定のタンパク質および／またはペプチドをコードする核酸または核酸配列に言及する場合はいつでも、前記核酸または核酸配列はそれぞれ、好ましくは、適切な宿主、例えばヒトにおいて、その発現、すなわち、特定のタンパク質またはペプチドをコードする核酸配列の転写および／または翻訳を可能にする制御配列も含む。好ましくは、本発明による核酸は、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ９）リガンドＣｐＧオリゴヌクレオチド（ＯＤＮ）または環状グアノシン一リン酸－アデノシン一リン酸（ｃＧＡＭＰ）などの環状ジヌクレオチドではない。

【００４４】

非常に好ましい実施形態において、本発明の「核酸」は「人工ｍＲＮＡ」または「単離ｍＲＮＡ」である。「人工ｍＲＮＡ」（配列）という用語は、典型的には天然には存在しないｍＲＮＡ分子であると理解され得る。換言すれば、人工ｍＲＮＡ分子は、非天然ｍＲＮＡ分子として理解され得る。このようなｍＲＮＡ分子は、その個々の配列（天然には存在しない）のために、および／または他の修飾、例えば天然には存在しないヌクレオチドの構造修飾のために非天然であり得る。典型的には、人工ｍＲＮＡ分子は、ヌクレオチドの所望の人工配列（異種配列）に対応する遺伝子操作法によって設計および／作製され得

る。この文脈において、人工配列は通常、天然には存在し得ない配列である、すなわち、人工配列は少なくとも１個のヌクレオチドによって野生型配列と異なる。「野生型」という用語は、天然に存在する配列として理解され得る。さらに、「人工核酸分子」という用語は、「１つの単一分子」を意味するように制限されず、典型的には、同一分子のアンサンブルを含むと理解される。したがって、この用語は、アリコートに含有される複数の同一分子に関し得る。

【００４５】

非常に好ましい実施形態において、本発明の核酸は「単離」ｍＲＮＡである。

「単離（ｉｓｏｌａｔｅｄ）」：本明細書で使用される場合、核酸分子、好ましくは単離ｍＲＮＡまたはポリペプチドに関する「単離（ｉｓｏｌａｔｅｄ）」という用語は、核酸分子、好ましくは単離ｍＲＮＡまたはポリペプチドが、血液および／または動物組織から離れているなど、その自然環境以外の状態にあることを意味する。一部の実施形態において、単離核酸分子、好ましくは単離ｍＲＮＡまたはポリペプチドは、他の核酸分子または他のポリペプチド、特に動物起源の他の核酸分子またはポリペプチドを実質的に含まない。一部の実施形態において、核酸分子、好ましくは単離ｍＲＮＡまたはポリペプチドは、高度に精製された形態、すなわち、９５％超純粋または９９％超純粋であり得る。この文脈において使用される場合、「単離（ｉｓｏｌａｔｅｄ）」という用語は、二量体または代わりにリン酸化形態もしくは誘導体化形態などの、代わりの物理的形態の同じ核酸分子またはポリペプチドの存在を排除しない。単離物質はまた、それらが会合していた物質に関して様々なレベルの純度を有し得る。単離物質および／または実体はまた、それらが最初に会合していた他の成分の少なくとも約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、またはそれを超えるものから分離され得る。一部の実施形態において、単離剤は、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％超、または約９９％超純粋である。本明細書で使用される場合、物質は、他の成分を実質的に含まない場合に、「純粋（ｐｕｒｅ）」である。本発明、明細書および特許請求の範囲の文脈において、「ｍＲＮＡ」という用語は、好ましくは「単離ｍＲＮＡ（ｉｓｏｌａｔｅｄ　ｍＲＮＡ）」を意味し、逆もまた同様である。

【００４６】

特に好ましい実施形態において、人工核酸、核酸またはＲＮＡはｍＲＮＡ、より好ましくは単離ｍＲＮＡである。ｍＲＮＡはウイルス系と比較して調節された投与量、一過的で制御された発現、タンパク質合成後のｍＲＮＡの完全な分解を可能にし、挿入変異のリスクをもたらさないので、ｍＲＮＡ技術は本発明の文脈において特に好ましい。

【００４７】

本発明の文脈において、「ヌクレオシド修飾」という用語は、天然ｍＲＮＡには通常存在しないヌクレオシド、好ましくは非天然ヌクレオシドを含むｍＲＮＡ化合物または分子などの核酸を指す。特に、この用語は、好ましくは、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびチミン以外のｍＲＮＡヌクレオシドを指す。

【００４８】

「ヌクレオシド」という用語は、一般的に、糖、通常はリボースまたはデオキシリボース、およびプリンまたはピリミジン塩基からなる化合物を指す。「ヌクレオチド」という用語は、一般的に、糖に結合したリン酸基を含むヌクレオシドを指す。

【００４９】

「ペプチド」は、ペプチド結合によって連結された少なくとも２つのアミノ酸モノマーのオリゴマーまたはポリマーを意味する。この用語は、アミノ酸のポリマー鎖の長さを限定しない。ペプチドは、例えば、５０モノマー単位未満を含有し得る。典型的には５０～６００モノマー単位、より具体的には５０～３００モノマー単位を有する、より長いペプチドはポリペプチドとも呼ばれる。

【００５０】

「タンパク質」は、生物機能を促進する、３次元形態に折り畳まれた１つまたは複数の

ポリペプチドを含むか、またはそれからなる。

免疫系：免疫系は、生物を感染から防御し得る。病原体が生物の物理的障壁を破り、この生物に侵入すると、自然免疫系が、即時であるが非特異的な応答をもたらす。病原体がこの自然応答を回避した場合、脊椎動物は防御の第２層である適応免疫系を備える。ここで、免疫系は、感染中に病原体の認識を改善するようその応答を適応させる。そのため、病原体が排除された後も、この改善された応答が免疫学的記憶の形態で保持され、適応免疫系が、この病原体に遭遇する度により速く、より強力な攻撃を開始することを可能にする。これによると、免疫系は自然免疫系および適応免疫系を含む。これらの２つの部分の各々が、いわゆる液性成分および細胞性成分を含有する。

【００５１】

免疫応答：免疫応答は、典型的には、特定の抗原に対する適応免疫系の特異的反応（いわゆる特異的もしくは適応免疫応答）または自然免疫系の非特異的反応（いわゆる非特異的もしくは自然免疫応答）のいずれかであり得る。本発明は、適応免疫系の特異的反応（適応免疫応答）のコアに関する。特に、本発明は、例えばインフルエンザウイルスなどのウイルスによる感染に対する適応免疫応答に関する。しかしながら、この特異的応答は、追加の非特異的反応（自然免疫応答）によって支持され得る。したがって、本発明はまた、効率的な適応免疫応答を引き起こすための自然免疫系と適応免疫系の同時刺激のための化合物に関する。

【００５２】

適応免疫系：適応免疫系は、病原性増殖を排除または防止する高度に専門化された全身細胞および工程で構成される。適応免疫応答は、脊椎動物免疫系に、具体的な病原体を認識および記憶し（免疫を生成する）、病原体に遭遇する度により強力な攻撃を開始する能力を提供する。この系は、体細胞超変異（体細胞変異の頻度が増加した工程）、およびＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子再構成（抗原受容体遺伝子セグメントの不可逆的遺伝子組換え）のために、高度に適合性である。この機序は、少数の遺伝子が膨大な数の異なる抗原受容体を生成することを可能にし、次いで、これらが各個々のリンパ球上でユニークに発現される。遺伝子再構成は各細胞のＤＮＡにおける不可逆的変化をもたらすので、その細胞の後代（子孫）の全てが、長寿命特異的免疫の鍵となるメモリーＢ細胞およびメモリーＴ細胞を含む、同じ受容体特異性をコードする遺伝子を受け継ぐ。免疫ネットワーク理論は、Ｔ細胞、Ｂ細胞の受容体の可変領域と可変領域を有するＴ細胞およびＢ細胞によって作られる分子との間の相互作用に基づいた、どのように適応免疫系が働くかについての理論である。

【００５３】

適応免疫応答：適応免疫応答は、典型的には抗原特異的であると理解される。抗原特異性は、具体的な抗原、病原体または病原体感染細胞に適合された応答の生成を可能にする。これらの適合された応答を開始する能力は、「メモリー細胞」によって体内に維持される。病原体が体に２回以上感染したら、これらの特異的メモリー細胞がこの病原体を迅速に排除するために使用される。この文脈において、適応免疫応答の第１の工程は、ナイーブ抗原特異的Ｔ細胞または抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって抗原特異的免疫応答を誘導することができる異なる免疫細胞の活性化である。これは、ナイーブＴ細胞が絶えず通過するリンパ組織および器官で起こる。抗原提示細胞として働くことができる細胞型は、とりわけ、樹状細胞、マクロファージ、およびＢ細胞である。これらの細胞の各々が、免疫応答の誘発において別個の機能を有する。樹状細胞は食作用およびマクロピノサイトーシスによって抗原を取り込み、例えば外来抗原との接触によって刺激されて局所リンパ組織に移動し、そこで成熟樹状細胞に分化する。マクロファージは、細菌などの粒子状抗原を摂取し、感染因子または他の適切な刺激によってＭＨＣ分子を発現するよう誘導される。Ｂ細胞がその受容体を介して可溶性タンパク質抗原に結合し、これらを内在化するユニークな能力もＴ細胞を誘導するのに重要となり得る。ＭＨＣ分子上での抗原の提示がＴ細胞の活性化をもたらし、それによってこれらの増殖および武装エフェクターＴ細胞（ａｒｍｅｄ　ｅｆｆｅｃｔｏｒ　Ｔ　ｃｅｌｌ）への分化が誘導される。エフェクターＴ細胞の最も重要な機能は、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞による感染細胞の死滅および共に細胞媒介性

免疫を構成するＴｈ１細胞によるマクロファージの活性化、および異なるクラスの抗体を産生し、よって、液性免疫応答を駆動するためのＴｈ２細胞とＴｈ１細胞の両方によるＢ細胞の活性化である。Ｔ細胞は、直接抗原を認識し、これに結合せず、代わりに、例えば、他の細胞の表面上のＭＨＣ分子に結合している、病原体誘導タンパク質抗原の短いペプチド断片を認識するＴ細胞受容体によって抗原を認識する。

【００５４】

細胞性免疫／細胞性免疫応答：細胞性免疫は、典型的にはマクロファージ、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）、抗原特異的細胞傷害性Ｔリンパ球の活性化、および抗原に応じた様々なサイトカインの放出に関する。より一般的な方法では、細胞性免疫は、抗体に関連せず、免疫系の細胞の活性化に関連する。細胞性免疫応答は、例えばウイルス感染細胞、細胞内細菌を有する細胞、および腫瘍抗原を示すがん細胞などの、その表面上に抗原のエピトープを示す体細胞においてアポトーシスを誘導することができる抗原特異的細胞傷害性Ｔリンパ球を活性化すること；マクロファージおよびナチュラルキラー細胞を活性化し、これらが病原体を破壊することができるようにすること；ならびに細胞を刺激して、適応免疫応答および自然免疫応答に関与する他の細胞の機能に影響を及ぼす様々なサイトカインを分泌させることを特徴とする。

【００５５】

液性免疫／液性免疫応答：液性免疫は、典型的には抗体産生およびこれに付随し得る補助的工程を指す。液性免疫応答は、典型的には、例えばＴｈ２活性化およびサイトカイン産生、胚中心形成およびアイソタイプスイッチ、親和性成熟およびメモリー細胞産生を特徴とし得る。液性免疫はまた、典型的には、病原体および毒素中和、古典的補体活性化、ならびに食作用のオプソニン促進および病原体排除を含む、抗体のエフェクター機能を指し得る。

【００５６】

先天性免疫系：これは、自然系の細胞が一般的な方法で病原体を認識し、これに応答するが、適応免疫系とは異なり、宿主に持続性免疫も防御免疫も付与しないことを意味する。自然免疫系は、例えば病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）受容体、例えばＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）のリガンド、またはリポ多糖、ＴＮＦ－アルファ、ＣＤ４０リガンド、もしくはサイトカイン、モノカイン、リンホカイン、インターロイキンもしくはケモカイン、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２４、ＩＬ－２５、ＩＬ－２６、ＩＬ－２７、ＩＬ－２８、ＩＬ－２９、ＩＬ－３０、ＩＬ－３１、ＩＬ－３２、ＩＬ－３３、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、ＩＦＮ－ガンマ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＬＴ－ベータ、ＴＮＦ－アルファ、成長因子、およびｈＧＨ、ヒトＴｏｌｌ様受容体ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１０のリガンド、マウスＴｏｌｌ様受容体ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１０、ＴＬＲ１１、ＴＬＲ１２もしくはＴＬＲ１３のリガンド、ＮＯＤ様受容体のリガンド、ＲＩＧ－Ｉ様受容体のリガンド、免疫賦活性核酸、免疫賦活性ＲＮＡ（ｉｓＲＮＡ）、ＣｐＧ－ＤＮＡ、抗菌剤、もしくは抗ウイルス剤などの他の補助物質によって活性化され得る。典型的には、自然免疫系の応答は、サイトカインと呼ばれる、専門化された化学伝達物質を含む化学因子の産生を通した、感染部位への免疫細胞の動員；補体カスケードの活性化；専門化された白血球による、器官、組織、血液およびリンパ中に存在する外来物質の識別および除去；抗原提示として知られる工程を通した適応免疫系の活性化；ならびに／あるいは感染因子に対する物理的および化学的障壁として作用することを含む。

【００５７】

アジュバント／アジュバント成分：アジュバントまたはアジュバント成分は、広義には、典型的には薬物またはワクチンなどの他の薬剤の有効性を修飾、例えば増強し得る（例

えば、薬理学的または免疫学的）薬剤または組成物である。慣用的には、この用語は、本発明の文脈において、免疫原用の担体もしくは補助物質および／または他の薬学的に活性な化合物として働く化合物または組成物を指す。この用語は広義に解釈されるべきであり、当のアジュバントと共に組み込まれるまたは共投与される抗原の免疫原性を増加させることができる広範囲の物質を指す。本発明の文脈において、アジュバントは、好ましくは本発明の活性剤の特異的免疫原性効果を増強する。典型的には、「アジュバント」または「アジュバント成分」は同じ意味を有し、相互に使用され得る。アジュバントは、例えば免疫賦活薬、抗原性送達システムまたはさらにはこれらの組合せに分けられ得る。

【００５８】

「アジュバント」という用語は、典型的にはそれ自体が免疫を付与する薬剤を含まないと理解される。アジュバントは、例えば免疫系への抗原の提示または非特異的自然免疫応答の誘導を促進することによって抗原特異的免疫応答を増強するために、免疫系を非特異的に支援する。さらに、アジュバントは、好ましくは例えば支配的なＴｈ２ベースの抗原特異的応答をよりＴｈ１ベースの抗原特異的応答にシフトすることによって、またはその逆によって、抗原特異的免疫応答を調節することができる。したがって、アジュバントは、サイトカイン発現／分泌、抗原提示、免疫応答の種類等を有利に調節することができる。

【００５９】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、インタクト（ｉｎｔａｃｔ）抗体と抗体断片の両方を含む。典型的には、インタクト「抗体」は、特定の抗原に特異的に結合する免疫グロブリンである。抗体は、ヒトクラス：ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤのいずれかを含む、いずれかの免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。典型的には、インタクト抗体はテトラマーである。各テトラマーは、各ペアが「軽」鎖および「重」鎖を有する、ポリペプチド鎖の２つの同一のペアからなる。本発明の文脈における「抗原」という用語は、典型的には免疫系によって、好ましくは適応免疫系によって認識され得、例えば適応免疫応答の一部としての抗体および／または抗原特異的Ｔ細胞の形成により、抗原特異的免疫応答を誘引することができる物質を指す。典型的には、抗原は、ＭＨＣによってＴ細胞に提示され得るペプチドもしくはタンパク質であり得るか、またはこれを含み得る。本発明の意味において、抗原は、提供された核酸分子、好ましくは本明細書に定義されるｍＲＮＡの翻訳の産物であり得る。この文脈において、少なくとも１つのエピトープを含むペプチドおよびタンパク質の断片、バリアントおよび誘導体も抗原として理解される。したがって、本明細書で使用される「抗原」という用語は、当業者によって認識および理解され、例えば免疫系、好ましくは適応免疫系によって認識され得、例えば適応免疫応答の一部としての抗体および／または抗原特異的Ｔ細胞の形成により、抗原特異的免疫応答を誘引することができる物質を指すことを意図している。典型的には、抗原は、ＭＨＣによってＴ細胞に提示され得るペプチドもしくはタンパク質であり得るか、またはこれを含み得る。少なくとも１つのエピトープを含む、例えばがん抗原から誘導されるペプチドまたはタンパク質の断片、バリアントおよび誘導体も抗原として理解され得る。本発明の文脈において、抗原は、提供されたＲＮＡ（例えば、コードＲＮＡ、レプリコンＲＮＡ、ｍＲＮＡ）の翻訳の産物であり得る。「抗原性ペプチドまたはタンパク質」という用語は、当業者によって認識および理解され、例えば体の適応免疫系を刺激して適応免疫応答をもたらし得る（抗原性）タンパク質から誘導されるペプチドまたはタンパク質を指すことを意図している。したがって、「抗原性ペプチドまたはタンパク質」は、それが誘導されるタンパク質の少なくとも１つのエピトープまたは抗原（例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原）を含む。

【００６０】

核酸の文脈において、すなわち、（別の）核酸「から誘導される」核酸について、本明細書を通して使用される「から誘導される」という用語は、（別の）核酸から誘導される核酸が、例えばそれが誘導される核酸と少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または約９

９％の配列同一性を共有することを意味する。当業者であれば、配列同一性が、典型的には同じ種類の核酸について、すなわちＤＮＡ配列またはＲＮＡ配列について計算されることに気づく。よって、ＤＮＡがＲＮＡ「から誘導される」場合、またはＲＮＡがＤＮＡ「から誘導される」場合、第１の工程で、ＲＮＡ配列が対応するＤＮＡ配列に変換される（特に、配列を通してＵをＴによって置換することによって）、または逆もまた同様で、ＤＮＡ配列が対応するＲＮＡ配列に変換される（特に、配列を通してＴをＵによって置換することによって）ことが理解される。その後、ＤＮＡ配列の配列同一性またはＲＮＡ配列の配列同一性が決定される。好ましくは、核酸「から誘導される」核酸はまた、例えばＲＮＡ安定性をなおさらに増加させるため、ならびに／あるいはタンパク質産生を延長および／または増加させるために、それが誘導される核酸と比較して修飾されている核酸を指す。アミノ酸配列の文脈において、「から誘導される」という用語は、（別の）アミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列が、例えばそれが誘導されるアミノ酸配列と少なくとも約７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または約９９％の配列同一性を共有することを意味する。

【００６１】

エピトープ（「抗原決定基」とも呼ばれる）：本発明の文脈におけるタンパク質のＴ細胞エピトープまたは部分は、好ましくは約６～約２０またはさらに多いアミノ酸長を有する断片、例えば好ましくは約８～約１０、例えば８、９または１０（またはさらに１１または１２アミノ酸）のアミノ酸長を有する、ＭＨＣクラスＩ分子によって処理および提示される断片、または好ましくは約１３以上のアミノ酸長、例えば１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上のアミノ酸長を有する、ＭＨＣクラスＩＩ分子によって処理および提示される断片を含み得、これらの断片はアミノ酸配列の任意の部分から選択され得る。これらの断片は、典型的にはペプチド断片およびＭＨＣ分子からなる複合体の形態でＴ細胞によって認識される。

【００６２】

Ｂ細胞エピトープは、典型的には、抗体によって、すなわちその天然形態で認識され得る、好ましくは５～１５個のアミノ酸を有する、より好ましくは５～１２個のアミノ酸を有する、さらにより好ましくは６～９個のアミノ酸を有する、本明細書に定義される（天然）タンパク質またはペプチド抗原の外表面上に位置する断片である。

【００６３】

タンパク質またはペプチドのこのようなエピトープはさらに、このようなタンパク質またはペプチドの本明細書で言及されるバリアントのいずれかから選択され得る。この文脈において、抗原決定基は、本明細書に定義されるタンパク質またはペプチドのアミノ酸配列において不連続であるが、単一ポリペプチド鎖で構成される３次元構造または連続もしくは直鎖状エピトープにまとめられる、本明細書に定義されるタンパク質またはペプチドのセグメントで構成される立体構造または不連続エピトープであり得る。

【００６４】

「免疫寛容誘導性組成物（ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ　ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ）」は、抗原に対する細胞または細胞系における免疫寛容を促進する組成物であり、抗原は自己抗原であっても非自己抗原であってもよい。換言すれば、抗原に対する免疫応答がないか、または免疫応答が低下している。それとは逆に、本発明によるワクチン組成物は、特異抗原またはその断片もしくはバリアント、すなわち少なくとも１つの核酸によってコードされる抗原またはその断片もしくはバリアントに対する免疫応答を誘導する。抗原はまた、自己抗原であっても非自己抗原であってもよく、本発明のワクチン組成物の全体的な目的は、この抗原またはその断片もしくはバリアントに対する（強力な）免疫応答を作り出すことであり、免疫寛容誘導性組成物の全体的な目的は、この抗原に対する免疫応答を少なくとも部分的に、最高の状態で完全に抑制することである。

【００６５】

「免疫寛容誘導性核酸（ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）」は、抗原に対する細胞または細胞系における免疫寛容を促進する核酸であり、核酸は化学修飾

ｍＲＮＡである得る、および／または免疫寛容誘導性ポリペプチドをコードし得る。それとは逆に、本発明に使用される少なくとも１つの核酸は、投与すると（強力な）免疫応答が望まれ、誘導される少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする。

【００６６】

「免疫寛容誘導性ポリペプチド（ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ　ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ）」は、典型的には根底にある経路に作用することを介して免疫応答を減少させることによって、特にこのような経路における根底にある媒介因子を阻害することによって、細胞または細胞系において免疫寛容を促進するポリペプチドである。よって、免疫寛容誘導性ポリペプチドは、ｍＴＯＲ、ＩＬ－２、ＩＬ－１０の阻害剤またはＣＤ３もしくはＣＤ４０に反応性の抗体であり得る。それとは逆に、本発明による少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントは、細胞または細胞系において免疫寛容を誘導しないが、それ自体に対する（強力な）免疫応答を誘導する。

【００６７】

免疫寛容誘導性組成物は、特に、上記の免疫寛容を促進する免疫寛容誘導性核酸を含み得る。免疫寛容誘導性組成物は、さらに、特異抗原を含んでよく、その結果、免疫寛容誘導性核酸の存在のために、この特異抗原に対する免疫応答がなくなるか、またはこの特異抗原に対する免疫応答が減少する。それとは逆に、本発明によるワクチン組成物は、コードされた少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントに向けた（強力な）免疫応答を明らかにすることが本発明のワクチン組成物の全体的な目的である（そして、免疫寛容誘導性組成物の目的がそうであるように、共投与された抗原に向けた免疫応答を遮断するか、または減少させることではない）ので、好ましい実施形態において、抗原またはその断片もしくはバリアントを含まないが、当然、少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸を依然として含む。さらに別の好ましい実施形態において、本発明によるワクチン組成物は、唯一のペイロードとして少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸を含み、したがって、抗原を含むことができない（免疫寛容誘導性核酸に加えてこの段落で論じられる免疫寛容誘導性組成物も同様である）。

【００６８】

「ワクチン」または「ワクチン組成物」という用語は、典型的には少なくとも１つの抗原もしくは抗原性機能、または抗原もしくはその断片もしくはバリアントをコードする核酸を提供する予防用または治療用材料であると理解される。抗原または抗原性機能は、体の適応免疫系を刺激して適応免疫応答をもたらさせることができる。

【００６９】

本発明の文脈における「抗原提供ｍＲＮＡ」という用語は、典型的にはそのｍＲＮＡを提供された細胞または生物によって翻訳され得る少なくとも１つのオープンリーディングフレームを有するｍＲＮＡであり得る。この翻訳の産物は、抗原、好ましくは免疫原として作用し得るペプチドまたはタンパク質である。産物はまた、２つ以上の免疫原で構成される融合タンパク質、例えば同じまたは異なるウイルスタンパク質から誘導される２つ以上のエピトープ、ペプチドまたはタンパク質からなる融合タンパク質であってもよく、エピトープ、ペプチドまたはタンパク質はリンカー配列によって連結され得る。

【００７０】

核酸配列またはアミノ酸配列の文脈において本明細書を通して使用される「異種」または「異種配列」という用語は、当業者によって認識および理解される配列（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、アミノ酸）を指し、別の遺伝子、別の対立遺伝子、別の種から誘導される配列を指すことを意図している。２つの配列が同じ遺伝子または同じ対立遺伝子から誘導することができない場合、これらの配列は典型的には「異種」であると理解される。すなわち、異種配列は同じ生物から誘導することができてもよいが、例えば同じＲＮＡまたはタンパク質などの同じ核酸分子で天然に（自然に）存在しない。

【００７１】

バイ／マルチシストロン性ｍＲＮＡ：典型的には２つの（バイシストロン性）またはより多くの（マルチシストロン性）オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（コード領域またはコード配列）を有し得る、ｍＲＮＡ。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ペプチドまたはタンパク質に翻訳され得るいくつかのヌクレオチドトリプレット（コドン）の配列である。このようなｍＲＮＡの翻訳は、２つの（バイシストロン性）またはより多くの（マルチシストロン性）別個の翻訳産物（ＯＲＦが同一ではない場合）をもたらす。真核生物における発現については、このようなｍＲＮＡが、例えば、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列を含み得る。

【００７２】

モノシストロン性ｍＲＮＡ：モノシストロン性ｍＲＮＡは、典型的にはただ１つのオープンリーディングフレーム（コード配列またはコード領域）を含む、ｍＲＮＡであり得る。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ペプチドまたはタンパク質に翻訳され得るいくつかのヌクレオチドトリプレット（コドン）の配列である。

【００７３】

３’非翻訳領域（３’－ＵＴＲ）：３’－ＵＴＲは、典型的にはｍＲＮＡのタンパク質コード領域（すなわち、オープンリーティングフレーム）とポリ（Ａ）配列との間に位置するｍＲＮＡの部分である。ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲはアミノ酸配列に翻訳されない。３’－ＵＴＲ配列は、一般的に遺伝子発現工程中にそれぞれのｍＲＮＡに転写される遺伝子によってコードされる。ゲノム配列は最初に、任意選択のイントロンを含む、ｍＲＮＡ前駆体に転写される。次いで、ｍＲＮＡ前駆体が成熟工程で成熟ｍＲＮＡにさらにプロセシングされる。この成熟工程は、５’キャッピング、任意選択のイントロンを切除するためのｍＲＮＡ前駆体のスプライシング、ならびにｍＲＮＡ前駆体の３’末端のポリアデニル化および任意選択のエンド－またはエキソヌクレアーゼ切断等などの３’末端の修飾の工程を含む。本発明の文脈において、３’－ＵＴＲは、タンパク質コード領域の終止コドンに対して３’、好ましくはタンパク質コード領域の終止コドンに対して直ぐ３’に位置し、ポリ（Ａ）配列の５’側、好ましくはポリ（Ａ）配列に対して直ぐ５’のヌクレオチドまで伸長する成熟ｍＲＮＡの配列に対応する。「対応する」という用語は、３’－ＵＴＲ配列が、例えば３’－ＵＴＲ配列を定義するために使用されるｍＲＮＡにおける、ＲＮＡ配列、またはこのようなＲＮＡ配列に対応するＤＮＡ配列であり得ることを意味する。本発明の文脈において、「アルブミン遺伝子の３’－ＵＴＲ」などの「遺伝子の３’－ＵＴＲ」という用語は、この遺伝子から誘導される成熟ｍＲＮＡ、すなわち、遺伝子の転写およびｍＲＮＡ前駆体の成熟によって得られるｍＲＮＡの３’－ＵＴＲに対応する配列である。「遺伝子の３’－ＵＴＲ」という用語は、３’－ＵＴＲのＤＮＡ配列およびＲＮＡ配列を包含する。

【００７４】

５’非翻訳領域（５’－ＵＴＲ）：５’－ＵＴＲは、典型的にはメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の特定のセクションであると理解される。これはｍＲＮＡのオープンリーティングフレームの５’に位置する。典型的には、５’－ＵＴＲは、転写開始部位で始まり、オープンリーティングフレームの開始コドンの１ヌクレオチド前で終わる。５’－ＵＴＲは、調節エレメントとも呼ばれる、遺伝子発現を制御するためのエレメントを含み得る。このような調節エレメントは、例えば、リボソーム結合部位または５’末端オリゴピリミジントラクトであり得る。５’－ＵＴＲは、例えば５’キャップの付加によって、転写後修飾され得る。本発明の文脈において、５’－ＵＴＲは、５’キャップと開始コドンとの間に位置する成熟ｍＲＮＡの配列に対応する。好ましくは、５’－ＵＴＲは、５’キャップに対して３’に位置するヌクレオチド、好ましくは５’キャップに対して直ぐ３’に位置するヌクレオチドから、タンパク質コード領域の開始コドンに対して５’に位置するヌクレオチド、好ましくはタンパク質コード領域の開始コドンに対して直ぐ５’に位置するヌクレオチドまで伸長する配列に対応する。成熟ｍＲＮＡの５’キャップに対して直ぐ３’に位置するヌクレオチドは、典型的には転写開始部位に対応する。「対応する」という用語は、５’－ＵＴＲ配列が、例えば５’－ＵＴＲ配列を定義するために使用されるｍＲＮＡにおける

、ＲＮＡ配列、またはこのようなＲＮＡ配列に対応するＤＮＡ配列であり得ることを意味する。本発明の文脈において、「ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲ」などの「遺伝子の５’－ＵＴＲ」という用語は、この遺伝子から誘導される成熟ｍＲＮＡ、すなわち、遺伝子の転写およびｍＲＮＡ前駆体の成熟によって得られるｍＲＮＡの５’－ＵＴＲに対応する配列である。「遺伝子の５’－ＵＴＲ」という用語は、５’－ＵＴＲのＤＮＡ配列およびＲＮＡ配列を包含する。

【００７５】

５’末端オリゴピリミジントラクト（ＴＯＰ）：５’末端オリゴピリミジントラクト（ＴＯＰ）は、典型的にはある特定のｍＲＮＡ分子の５’末端領域またはある特定の遺伝子の機能的実体、例えば転写された領域の５’末端領域などの、核酸分子の５’末端領域に位置するピリミジンヌクレオチドの伸長である。この配列は、通常は転写開始部位に対応する、シチジンで始まり、これに通常約３～３０個のピリミジンヌクレオチドの伸長が続く。例えば、ＴＯＰは、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０個またはさらに多くのヌクレオチドを含み得る。ピリミジン伸長、よって、５’－ＴＯＰは、ＴＯＰの下流に位置する最初のプリンヌクレオチドに対して１ヌクレオチド５’で終わる。５’末端オリゴピリミジントラクトを含有するメッセンジャーＲＮＡはしばしばＴＯＰ　ｍＲＮＡと呼ばれる。したがって、このようなメッセンジャーＲＮＡを提供する遺伝子はＴＯＰ遺伝子と呼ばれる。ＴＯＰ配列は、例えば、ペプチド伸長因子およびリボソームタンパク質をコードする遺伝子およびｍＲＮＡに見られる。

【００７６】

ＴＯＰモチーフ：本発明の文脈において、ＴＯＰモチーフは、上に定義される５’－ＴＯＰに対応する核酸配列である。よって、本発明の文脈におけるＴＯＰモチーフは、好ましくは３～３０ヌクレオチド長を有するピリミジンヌクレオチドの伸長である。好ましくは、ＴＯＰモチーフは、少なくとも３個のピリミジンヌクレオチド、好ましくは少なくとも４個のピリミジンヌクレオチド、好ましくは少なくとも５個のピリミジンヌクレオチド、より好ましくは少なくとも６個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも７個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも８個のピリミジンヌクレオチドからなり、ピリミジンヌクレオチドの伸長は、好ましくはその５’末端においてシトシンヌクレオチドで始まる。ＴＯＰ遺伝子およびＴＯＰ　ｍＲＮＡにおいて、ＴＯＰモチーフは、好ましくはその５’末端において転写開始部位で始まり、前記遺伝子またはｍＲＮＡ中の最初のプリン残基に対して１ヌクレオチド５’で終わる。本発明の意味におけるＴＯＰモチーフは、好ましくは、５’－ＵＴＲを表す配列の５’末端、または５’－ＵＴＲをコードする配列の５’末端に位置する。よって、好ましくは、３個以上のピリミジンヌクレオチドの伸長が、本発明のｍＲＮＡ、本発明のｍＲＮＡの５’－ＵＴＲエレメント、または本明細書に記載されるＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列などのそれぞれの配列の５’末端に位置する場合、本発明の意味において「ＴＯＰモチーフ」と呼ばれる。換言すれば、５’－ＵＴＲまたは５’－ＵＴＲエレメントの５’末端に位置せず、５’－ＵＴＲまたは５’－ＵＴＲエレメント内のどこかに位置する３個以上のピリミジンヌクレオチドの伸長は、好ましくは「ＴＯＰモチーフ」と呼ばれない。

【００７７】

ＴＯＰ遺伝子：ＴＯＰ遺伝子は、典型的には５’末端オリゴピリミジントラクトの存在を特徴とする。さらに、ほとんどのＴＯＰ遺伝子は成長関連翻訳調節を特徴とする。しかしながら、組織特異的翻訳調節を有するＴＯＰ遺伝子も知られている。上に定義されるように、ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲは、好ましくは５’キャップに対して３’に位置するヌクレオチドから開始コドンに対して５’に位置するヌクレオチドまで伸長する、ＴＯＰ遺伝子から誘導される成熟ｍＲＮＡの５’－ＵＴＲの配列に対応する。ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲは、典型的にはいずれの開始コドンも、好ましくは上流ＡＵＧ（ｕＡＵＧ）も上流オープンリーティングフレーム（ｕＯＲＦ）も含まない。その中で、上流ＡＵＧおよび上流オープンリーティングフレームは、典型的には翻訳されるべきオープンリーティングフ

レームの開始コドン（ＡＵＧ）の５’に存在するＡＵＧおよびオープンリーティングフレームであると理解される。ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲは一般的にかなり短い。ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲの長さは、２０ヌクレオチド～最大５００ヌクレオチドの間で変動し得、典型的には約２００ヌクレオチド未満、好ましくは約１５０ヌクレオチド未満、より好ましくは約１００ヌクレオチド未満である。本発明の意味におけるＴＯＰ遺伝子の例示的な５’－ＵＴＲは、その開示を本願明細書に援用する、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２による配列またはそのホモログもしくはバリアントにおける５位のヌクレオチドから開始コドン（例えば、ＡＴＧ）に対して直ぐ５’に位置するヌクレオチドまで伸長する核酸配列である。この文脈において、ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲの特に好ましい断片は、５’－ＴＯＰモチーフを欠くＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲである。「ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲ」という用語は、好ましくは天然に存在するＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲを指す。

【００７８】

安定化核酸、好ましくはｍＲＮＡ：安定化核酸、好ましくは、ｍＲＮＡは、典型的にはインビボ分解（例えば、エキソ－もしくはエンド－ヌクレアーゼによる分解）および／またはエキソビボ分解（例えば、ワクチン投与前の製造工程による、例えば、投与されるワクチン溶液の調製の過程において）に対する耐性を増加させる修飾を示す。ＲＮＡの安定化は、例えば５’キャップ構造、ポリＡ尾部、または任意の他のＵＴＲ修飾を提供することによって達成され得る。これはまた、化学修飾または核酸のＧ／Ｃ含量の修飾によっても達成され得る。様々な他の方法が当技術分野で公知であり、本発明の文脈において考えられる。

【００７９】

ＲＮＡインビトロ転写：「ＲＮＡインビトロ転写」または「インビトロ転写」という用語は、ＲＮＡが無細胞系（インビトロ）で合成される工程に関する。ＤＮＡ、特にプラスミドＤＮＡがＲＮＡ転写産物を生成するための鋳型として使用される。ＲＮＡは、本発明によると、好ましくは直鎖状プラスミドＤＮＡ鋳型である、適切なＤＮＡ鋳型のＤＮＡ依存性インビトロ転写によって得られ得る。インビトロ転写を制御するためのプロモータは、任意のＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼのための任意のプロモータであり得る。ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼの具体例にはＴ７、Ｔ３、およびＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼがある。インビトロＲＮＡ転写のためのＤＮＡ鋳型は、核酸、特にインビトロ転写されるそれぞれのＲＮＡに対応するｃＤＮＡをクローニングし、これをインビトロ転写のための適切なベクター、例えばプラスミドＤＮＡに導入することによって得ることができる。本発明の好ましい実施形態において、ＤＮＡ鋳型が、インビトロで転写される前に、適切な制限酵素により直線化される。ｃＤＮＡはｍＲＮＡの逆転写または化学合成によって得ることができる。さらに、インビトロＲＮＡ合成のためのＤＮＡ鋳型は、遺伝子合成によっても得ることができる。

【００８０】

インビトロ転写のための方法は当技術分野で公知である（例えば、ゲールら（Ｇｅａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．）（２０１３）Ｓｅｍｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５（２）：１５２－１５９；ブリュネルら（Ｂｒｕｎｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．）（２０１３）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．５３０：１０１－１４参照）。前記方法で使用される試薬には、典型的には以下が含まれる：

１）バクテリオファージによってコードされるＲＮＡポリメラーゼなどのそれぞれのＲＮＡポリメラーゼに対する高い結合親和性を有するプロモータ配列を有する直線化ＤＮＡ鋳型；

２）４つの塩基（アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシル）についてのリボヌクレオシド三リン酸（ＮＴＰ）；

３）場合により、上に定義されるキャップアナログ（例えば、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（ｍ７Ｇ））；

４）直線化ＤＮＡ鋳型内のプロモータ配列に結合することができるＤＮＡ依存性ＲＮＡ

ポリメラーゼ（例えば、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）；
５）場合により、任意の汚染ＲＮアーゼを不活性化するためのリボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）阻害剤；
６）場合により、転写を阻害し得るピロリン酸を分解するピロホスファターゼ；
７）ポリメラーゼのための補因子としてのMg^{2+}イオンを供給する$MgCl_2$；
８）最適な濃度の抗酸化剤（例えば、ＤＴＴ）、および／またはスペルミジンなどのポリアミンを含有することもできる、適切なｐＨ値を維持するための緩衝剤。

【００８１】

完全長タンパク質：本明細書で使用される「完全長タンパク質」という用語は、典型的には天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列全体を実質的に含むタンパク質を指す。それにもかかわらず、タンパク質中の例えば突然変異によるアミノ酸の置換も完全長タンパク質という用語に包含される。

【００８２】

タンパク質の断片：本発明の文脈におけるタンパク質またはペプチドの「断片」は、典型的にはそのアミノ酸配列（またはそのコード核酸分子）に関して、元の（天然）タンパク質のアミノ酸配列（またはそのコード核酸分子）と比較してＮ末端および／またはＣ末端切断されている、本明細書に定義されるタンパク質またはペプチドの配列を含み得る。よって、このような切断は、アミノ酸レベルで、または対応して核酸レベルで存在し得る。したがって、本明細書に定義されるこのような断片に関する配列同一性は、好ましくは本明細書に定義されるタンパク質もしくはペプチド全体、またはこのようなタンパク質もしくはペプチドの（コード）核酸分子全体を指し得る。

【００８３】

遺伝子の核酸配列の文脈における「バリアント」という用語は、核酸配列バリアント、すなわち、参照（または「親」）核酸または遺伝子の参照（または「親」）核酸配列と少なくとも１個の核酸が異なる核酸配列を含む核酸配列または遺伝子を指す。よって、バリアント核酸または遺伝子は、好ましくはその核酸配列中に、それぞれの参照配列と比較して少なくとも１つの変異、置換、挿入または欠失を含み得る。好ましくは、本明細書で使用される「バリアント」という用語は、核酸配列または遺伝子の天然に存在するバリアント、および操作されたバリアントを含む。したがって、本明細書で定義される「バリアント」は、参照核酸配列から誘導され得る、参照核酸配列から単離され得る、参照核酸配列に関連し得る、参照核酸配列に基づき得る、または参照核酸配列と相同であり得る。「バリアント」は、好ましくはそれぞれの天然に存在する（野生型）核酸配列もしくは遺伝子、またはそのホモログ、断片もしくは誘導体の核酸配列との少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％、好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、さらにより好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％またはさらには９７％の配列同一性を有し得る。

【００８４】

また、タンパク質またはペプチドの文脈において本明細書を通して使用される「バリアント」という用語は、当業者によって認識および理解され、例えば、１つまたは複数の置換、挿入および／または欠失アミノ酸などの１つまたは複数の変異において元の配列とは異なるアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドバリアントを指すことを意図している。好ましくは、これらの断片および／またはバリアントは、完全長天然タンパク質と比較して同じ生物学的機能または特異的活性、例えばその特異的抗原性特性を有する。本明細書で定義されるタンパク質またはペプチドの「バリアント」は、その天然の、すなわち、変異していない生理的配列と比較して保存的アミノ酸置換を含み得る。これらのアミノ酸配列ならびにそのコードヌクレオチド配列は特に、本明細書に定義されるバリアントという用語に入る。同じクラスに由来するアミノ酸が互いに交換される置換は保存的置換と呼ばれる。特に、これらは、脂肪族側鎖を有するアミノ酸、正または負に帯電した側鎖

を有するアミノ酸、側鎖またはアミノ酸中に芳香族基を有するアミノ酸、その側鎖が水素架橋に入ることができる、例えばヒドロキシル官能基を有する側鎖を有するアミノ酸である。これは、例えば極性側鎖を有するアミノ酸が、同様の極性側鎖を有する別のアミノ酸によって置換されるか、または例えば疎水性側鎖を特徴とするアミノ酸が、同様の疎水性側鎖を有する別のアミノ酸によって置換される（例えば、セリン（トレオニン）がトレオニン（セリン）によって、またはロイシン（イソロイシン）がイソロイシン（ロイシン）によって）ことを意味する。特に、３次元構造に修飾を引き起こさず、結合領域に影響も及ぼさない配列位置において、挿入および置換が可能である。挿入または欠失による３次元構造への修飾は、例えばＣＤスペクトル（円二色性スペクトル）を使用して容易に決定することができる。タンパク質またはペプチドの「バリアント」は、このようなタンパク質またはペプチドの少なくとも１０個、２０個、３０個、５０個、７５個または１００個のアミノ酸の伸長にわたって少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％のアミノ酸同一性を有し得る。好ましくは、タンパク質のバリアントはタンパク質の機能的バリアントを含み、これはバリアントが、それが誘導されるタンパク質と同じ効果もしくは機能性または効果もしくは機能性の少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは９５％を発揮することを意味する。

【００８５】

また、核酸配列または遺伝子の文脈における「断片」という用語は、完全長参照（または「親」）核酸配列または遺伝子の連続部分配列を指す。換言すれば、「断片」は、典型的には完全長核酸配列または遺伝子のより短い部分であり得る。したがって、断片は、典型的には完全長核酸配列または遺伝子内の対応する伸長と同一である配列からなる。この用語は、天然に存在する断片ならびに操作された断片を含む。本発明の文脈における配列の好ましい断片は、その断片が誘導される全（すなわち、完全長）核酸配列または遺伝子の少なくとも２０％、好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、さらにより好ましくは少なくとも６０％、さらにより好ましくは少なくとも７０％、最も好ましくは少なくとも８０％を表す、その断片が誘導される核酸または遺伝子中の実体の連続伸長に対応する核酸の連続伸長からなる。このような断片に関して示される配列同一性は、好ましくは核酸配列または遺伝子全体を指す。好ましくは、「断片」は、それが誘導される参照核酸配列または遺伝子との少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％、好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、さらにより好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％またはさらには９７％の配列同一性を有する核酸配列を含み得る。

【００８６】

また、この文脈において、タンパク質の断片は、典型的にはそれぞれの天然に存在する完全長タンパク質のアミノ酸配列との少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％、好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、さらにより好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％またはさらには９７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【００８７】

本発明の文脈におけるタンパク質またはペプチドの断片は、例えば少なくとも５アミノ酸長、好ましくは少なくとも６アミノ酸長、好ましくは少なくとも７アミノ酸長、より好ましくは少なくとも８アミノ酸長、さらにより好ましくは少なくとも９アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１０アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１１アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１２アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１３アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１４アミノ酸長；さらにより好ま

しくは少なくとも１５アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１６アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１７アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１８アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも１９アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも２０アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも２５アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも３０アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも３５アミノ酸長；さらにより好ましくは少なくとも５０アミノ酸長；最も好ましくは少なくとも１００アミノ酸長を有する、本明細書に定義されるタンパク質またはペプチドの配列をさらに含み得る。例えば、このような断片は約６～約２０またはさらに多いアミノ酸長を有し得る、例えば好ましくは約８～約１０、例えば８、９もしくは１０アミノ酸（またはさらに６、７、１１、もしくは１２アミノ酸）長を有する、ＭＨＣクラスＩ分子によって処理および提示される断片、または好ましくは約１３以上のアミノ酸、例えば１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０もしくはさらに多いアミノ酸長を有する、ＭＨＣクラスＩＩ分子によって処理および提示される断片であり得、これらの断片はアミノ酸配列の任意の部分から選択され得る。これらの断片は、典型的にはペプチド断片およびＭＨＣ分子からなる複合体の形態でＴ細胞によって認識される、すなわち、断片は典型的にはその天然形態で認識されない。タンパク質またはペプチドの断片は、これらのタンパク質またはペプチドの少なくとも１つのエピトープを含み得る。さらにまた、タンパク質のドメイン、例えばタンパク質の細胞外ドメイン、細胞内ドメインまたは膜貫通ドメインおよび短縮または切断バージョンがタンパク質の断片を構成すると理解され得る。

【００８８】

タンパク質のバリアント：１つまたは複数の置換、挿入および／または欠失アミノ酸などの１つまたは複数の変異において元の配列とは異なるアミノ酸配列を有する、本発明の文脈において定義されるタンパク質またはペプチドの「バリアント」が作製され得る。好ましくは、これらの断片および／またはバリアントは、完全長天然タンパク質と比較して同じ生物学的機能または特異的活性、例えばその特異的抗原性特性を有する。本明細書の文脈において定義されるタンパク質またはペプチドの「バリアント」は、その天然の、すなわち、変異していない生理的配列と比較して保存的アミノ酸置換を含み得る。これらのアミノ酸配列ならびにそのコードヌクレオチド配列は特に、本明細書に定義されるバリアントという用語に入る。同じクラスに由来するアミノ酸が互いに交換される置換は保存的置換と呼ばれる。特に、これらは、脂肪族側鎖を有するアミノ酸、正または負に帯電した側鎖を有するアミノ酸、側鎖またはアミノ酸中に芳香族基を有するアミノ酸、その側鎖が水素架橋に入ることができる、例えばヒドロキシル官能基を有する側鎖を有するアミノ酸である。これは、例えば極性側鎖を有するアミノ酸が、同様の極性側鎖を有する別のアミノ酸によって置換されるか、または例えば疎水性側鎖を特徴とするアミノ酸が、同様の疎水性側鎖を有する別のアミノ酸によって置換される（例えば、セリン（トレオニン）がトレオニン（セリン）によって、またはロイシン（イソロイシン）がイソロイシン（ロイシン）によって）ことを意味する。特に、３次元構造に修飾を引き起こさず、結合領域に影響も及ぼさない配列位置において、挿入および置換が可能である。挿入または欠失による３次元構造への修飾は、例えばＣＤスペクトル（円二色性スペクトル）を使用して容易に決定することができる（アーリ（Ｕｒｒｙ）、１９８５、Ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ、ポリペプチドの円二色性およびＯＲＤ（Ｃｉｒｃｕｌａｒ Ｄｉｃｈｒｏｉｓｍ ａｎｄ ＯＲＤ ｏｆ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ）、Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、ニューバーガーら（Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．）（編）、エルゼビア社（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ）、アムステルダム（Ａｍｓｔｅｒｄａｍ）所在）。

【００８９】

タンパク質またはペプチドの「バリアント」は、このようなタンパク質またはペプチドの１０個、２０個、３０個、５０個、７５個または１００個のアミノ酸の伸長にわたって少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％のアミノ酸同一性を有し得る。

【００９０】
さらに、核酸分子によってコードされ得る、本明細書に定義されるタンパク質またはペプチドのバリアントはまた、コード核酸配列のヌクレオチドが、タンパク質またはペプチドのそれぞれのアミノ酸配列の変化をもたらすことなく、遺伝暗号の縮重により交換されている、すなわち、アミノ酸配列またはその少なくとも一部が、上記の意味内の１つまたは複数の変異において元の配列と異ならない、配列を含み得る。
【００９１】
配列の同一性：２つの配列、例えば本明細書に定義される核酸配列またはアミノ酸配列、好ましくは本明細書に定義されるポリマー担体の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列またはアミノ酸配列自体が同一であるパーセンテージを決定するために、配列を整列させてその後、互いに比較することができる。したがって、例えば第１の配列の位置を第２の配列の対応する位置と比較することができる。第１の配列中の位置が第２の配列中の位置の場合と同じ成分（残基）によって占められている場合、２つの配列はこの位置で同一である。そうでない場合、配列はこの位置で異なる。第１の配列と比較して第２の配列で挿入が起こっている場合、ギャップを第１の配列に挿入してさらなるアラインメントを可能にすることができる。第１の配列と比較して第２の配列で欠失が起こっている場合、ギャップを第２の配列に挿入してさらなるアラインメントを可能にすることができる。そのため、２つの配列が同一であるパーセンテージは、同一の位置の数を、１つの配列中でのみ占められる位置を含む位置の総数で割った関数である。２つの配列が同一であるパーセンテージは、数学的アルゴリズムを使用して決定することができる。使用することができる数学的アルゴリズムの好ましいが限定的ではない例は、カーリンら（Ｋａｒｌｉｎ ｅｔ ａｌ．）（１９９３）、ＰＮＡＳ ＵＳＡ、９０：５８７３－５８７７またはアルトシュルら（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．）（１９９７）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２５：３３８９－３４０２のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、ＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている。ある特定の程度で本発明の配列と同一である配列は、このプログラムによって識別することができる。
【００９２】
タンパク質またはペプチドの誘導体：ペプチドまたはタンパク質の誘導体は、典型的には前記ペプチドまたはタンパク質などの別の分子から誘導される分子であると理解される。ペプチドまたはタンパク質の「誘導体」は、本発明で使用されるペプチドまたはタンパク質を含む融合体も包含する。例えば、融合体は、例えば、エピトープ、例えばＦＬＡＧエピトープまたはＶ５エピトープなどの標識を含む。例えば、エピトープはＦＬＡＧエピトープである。このようなタグは、例えば、融合タンパク質を精製するのに有用である。
【００９３】
薬学的有効量：本発明の文脈における薬学的有効量は、典型的には免疫応答を誘導するのに十分な量であると理解される。
担体：本発明の文脈における「担体」または「担体組成物」は、別の化合物、例えば核酸の輸送および／または複合体化を促進する化合物または複数の化合物である。前記担体は前記他の化合物、例えば核酸と複合体を形成し得る。好ましくは、担体または担体組成物は、本明細書で以下に、例えば「脂質ナノ粒子組成物」の段落で記載されるように、脂質ナノ粒子または脂質ナノ粒子組成物である。ポリマー担体は、ポリマー、例えば、正電荷を有するアミノ酸を含むカチオン性ポリマー（例えば、アミノ酸Ｇ、ＨまたはＲを含み、好ましくはシステインをさらに含むペプチド）で形成される担体である。担体としてのプロタミンは、例えば、ＰＭＩＤ２７３３６８３０または２３１５９８８２、欧州特許第１０８３２３２号明細書、国際公開第２０１００３７５３９号、国際公開第２０１２１１６８１１号、国際公開第２０１２１１６８１０号、および国際公開第２０１５０２４６６５号に開示されている。
【００９４】
ビヒクル：典型的には、医薬組成物またはワクチンの成分の個体への投与を促進するために、医薬組成物またはワクチン内で使用される薬剤、例えば担体。

【図面の簡単な説明】
【００９５】
【図１】（カチオン性脂質の化学構造）－ＨＥＸＡ１（ＨＥＸＡ－Ｃ５ＤＥ－ＰｉｐＳＳ、図１Ａを参照のこと）、ＨＥＸＡ２（ＨＥＸＡ－Ｃ５ＤＥ－ＰｉｐＣ３ＳＳ、図１Ｂを参照のこと）、およびＴＨＩＯＥＴＨＥＲ（ＶｉＴＥ－Ｃ４ＤＥ－Ｐｉｐ－チオエーテル、図１Ｃを参照のこと）の構造を示す－完全な詳細は実施例１に見ることができる）。
【図２】（インビボマラリアワクチン接種のためのＬＮＰ－ＩｇＧ$_{総}$力価）－ＣＳＰをコードする試験されたｍＲＮＡマラリアワクチンが、ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、マウスにおいて非常に強力な液性免疫応答を誘導したことを示す（コーティング：［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチド、プライム後３５日目の固定力価でのＩｇＧ総検出シグナル（完全な詳細は実施例３に見出すことができる））。
【図３】（インビボマラリアワクチン接種のためのＬＮＰ－細胞内染色（ＩＣＳ））－ＣＳＰをコードするＬＮＰ製剤化ｍＲＮＡマラリアワクチンが、マウスにおいて細胞性免疫応答を誘導したことを示す：ＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、図３Ａにおいて再刺激設定について示され、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、図３Ｂにおいて再刺激設定について示される。細胞内サイトカイン染色アッセイ（ワクチン接種後３５日目）を使用した。完全な詳細は実施例３で見ることができる。
【図４】実施例４の例示的なＰＭＯＺ－脂質を示す。
【図５】（ＬＮＰの器官ターゲティング）－ＰｐＬｕｃをコードするＬＮＰ８製剤化ｍＲＮＡの、２つの異なる時点、すなわち４時間および２４時間での、器官採取後の異なる組織溶解物におけるＰｐＬｕｃ発現の結果を示し、ＬＮＰ８はＤＰｈｙＰＳを含む。両方の時点で、脾臓において最も高い発現が観察される（発現レベルは、総ルシフェラーゼタンパク質／器官のｐｇとして示される）。完全な詳細は実施例５で見ることができる。
【図６】（ＬＮＰの器官ターゲティング）－ＰｐＬｕｃをコードするＬＮＰ８製剤化ｍＲＮＡの、２つの異なる時点、すなわち４時間および２４時間での、膵臓（図６Ａ参照）および肝臓（図６Ｂ参照）おけるＰｐＬｕｃ発現の結果を示す（発現レベルは、総タンパク質に対して正規化され、総タンパク質のｐｇ／ｍｇとして与えられる；脾臓における発現が肝臓における発現よりもはるかに高いという事実を説明するために、図６Ａおよび図６Ｂのｙ軸が異なることに留意されたい）。完全な詳細は実施例５で見ることができる。
【図７Ａ】（ＬＮＰの免疫原性／ＶＮＴ分析）－図は、１μｇのＬＮＰ製剤化ＲＡＢＶ－Ｇ－ｍＲＮＡによる筋肉内（ｉ．ｍ．）免疫化は、ブーストワクチン接種の７日後である２８日目に、全ての動物において０．５ＩＵ／ｍｌの防御力価（破線で示される）を十分に上回る非常に強いＶＮＴを誘導したことを示す（図７Ａ）。完全な詳細は実施例６で見ることができる。
【図７Ｂ】ＲＡＢＶ－Ｇタンパク質をコードするｍＲＮＡによるワクチン接種後のマウスを用いた実験における、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を含むＲＡＢＶ－Ｇタンパク質特異的Ｔ細胞の誘導を示すスポットの数を示す。最後のブーストワクチン接種の１週間後、プライム後２８日目に、ワクチン接種したマウスの脾臓中の抗原特異的細胞をＥＬＩＳｐｏｔ（酵素結合免疫スポットアッセイ）分析によって分析した。脾細胞を、１２９個のペプチドのＲＡＢＶ－Ｇペプチドミックス（ＰｅｐＭｉｘ）（５μｇ／ペプチドの最終濃度）で再刺激した。ｙ軸は、１ｍｉｏ．細胞あたりの検出されたＩＦＮ－ガンマスポットの数を示す：バーは平均を表す。ＩＦＮ－ガンマ（インターフェロン－ガンマ）は、炎症条件下で様々な免疫細胞によって、特にＴ細胞およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって産生されるプロトタイプの炎症促進性サイトカインであると考えられている。１型ヘルパーＴ細胞（Ｔｈ１細胞－細胞媒介性応答の増加をもたらす）の発生および活性化、単球およびマクロファージの化学誘引および活性化、ならびに抗原提示分子のアップレギュレーションを促進することによって、ＩＦＮ－ガンマは宿主防御において重要な役割を果たす。ＩＦＮ－ガンマはまた、抗ウイルス効果、抗増殖効果、およびアポトーシス効果を示す。結果：見られるように、特定のＬＮＰ製剤へのＰＳの添加は、対照ＬＮＰ製剤と比較して、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を含むＲＡＢＶ－Ｇタンパク質特異的Ｔ細胞の誘導を示

す検出されたＩＦＮ－ガンマスポットの数を非常に増加させた。この実験の完全な詳細は実施例６で見ることができる。

【図８Ａ】（インビボマラリアワクチン接種のためのＬＮＰ－長期実験）－ＣＳＰをコードする試験されたｍＲＮＡマラリアワクチンが、ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、マウスにおいて液性免疫応答を誘導したことを示す（コーティング：［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチド、プライム後３５日目のＩｇＧ$_{総}$力価（完全な詳細は実施例７に見ることができる））。

【図８Ｂ】（インビボマラリアワクチン接種のためのＬＮＰ－長期実験）－ＣＳＰをコードする試験されたｍＲＮＡマラリアワクチンが、ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、マウスにおいて非常に強力な液性免疫応答を誘導したことを示す（コーティング：［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチド、プライム後１０５日目のＩｇＧ$_{総}$力価（完全な詳細は実施例７に見ることができる））。

【図９】（筋肉内ＬＮＰ注射後のＰｐＬｕｃの器官分布）－２つの異なる時点（４時間および２４時間）でのＰｐＬｕｃをコードするＬＮＰ製剤化ｍＲＮＡの器官採取後の異なる組織溶解物中のＰｐＬｕｃ発現を示す。発現レベルは、総ルシフェラーゼタンパク質／器官のｐｇとして示される。完全な詳細は実施例１２で見ることができる；以下の表は、図９に対応する凡例である。

【００９６】

【表１】

表　図９の凡例:

群/順序	図９凡例/群	時点	イオン化可能脂質	コレステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
1	白丸	4時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
2	白四角	24時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
3	黒丸	4時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
4	黒四角	24時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
5	上向き三角形	4時間	PBS緩衝液			
6	下向き三角形	24時間	PBS緩衝液			

【図１０】（皮内ＬＮＰ注射後のＰｐＬｕｃの器官分布）－２つの異なる時点（４時間および２４時間）でのＰｐＬｕｃをコードするＬＮＰ製剤化ｍＲＮＡの器官採取後の異なる組織溶解物中のＰｐＬｕｃ発現を示す。発現レベルは、総ルシフェラーゼタンパク質／器官のｐｇとして示される；完全な詳細は実施例１３で見ることができる；以下の表は、図１０に対応する凡例である。

【００９７】

【表２】

表　図10の凡例:

群/順序	図10凡例/群	時点	イオン化可能脂質	コレステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
1	白丸	4時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
2	白四角	24時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
3	黒丸	4時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
4	黒四角	24時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50個のモノマー反復(n=50)を有する)
5	上向き三角形	4時間	PBS緩衝液			
6	下向き三角形	24時間	PBS緩衝液			

【図１１】（ＰＳを含むＬＮＰ中に製剤化されたチロシン関連タンパク質２（Ｔｒｐ２）でのマウス免疫）－Ｔｒｐ２免疫優性エピトープでのペプチド再刺激後に、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ（黒四角）およびＤＨＰＣを含むＬＮＰ（黒丸）が、ＤＰｈｙＰＳもＤＨＰＣも含まないＬＮＰ（白丸）と比較して有意に高いＣＤ８Ｔ細胞応答を示したことを示す；完全な詳細は実施例１４で見ることができる。

【図１２】（ＰＳまたはＤＨＰＣを含むＬＮＰ中に製剤化されたチロシン関連タンパク質２（Ｔｒｐ２）でのマウス免疫）－ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ（黒四角）およびＤＨＰＣを含むＬＮＰ（黒丸）が、ＤＰｈｙＰＳもＤＨＰＣも含まないＬＮＰ（白丸）と比較して有意に高いＩｇＧ２ａエンドポイント力価を示したことを示す；完全な詳細は実施例１４で見ることができる。

【発明を実施するための形態】

【００９８】

本開示は以下に詳細に説明されるが、本開示は本明細書に記載される特定の方法論、プロトコルおよび試薬に限定されず、これらは変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本開示の範囲を限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解される技術用語および科学用語と同じ意味を有する。

【００９９】

本発明は、ホスファチジルセリン含有核酸ベースのワクチン（特に、脂質ナノ粒子によって少なくとも部分的にカプセル化された核酸を含むワクチンであって、脂質ナノ粒子がホスファチジルセリンを含むワクチン）が、リン脂質ホスファチジルセリンを含まないワクチンと比較して改善された特性を有するという本発明者らの驚くべき発見に基づく。理論に束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、現在、これは、アポトーシスの間のリン脂質ホスファチジルセリンの役割に起因し得ると考えている。したがって、ホ

スファチジルセリンは、健康な細胞では、もっぱら細胞の脂質二重層膜の内側脂質層に位置するが、ホスファチジルセリンは、アポトーシス中に脂質二重層膜の外側脂質層に移動し、その結果、ホスファチジルセリンの頭部基は、アポトーシス細胞の細胞表面に露出される。ホスファチジルセリンのこの露出した頭部基は、免疫系の細胞、すなわち食細胞、特にマクロファージおよび樹状細胞によるアポトーシス細胞の迅速な取り込みのマーカーとして働く。したがって、マーカーホスファチジルセリンは、ワクチン組成物の食作用のプロセスを増加させ得、したがって、少なくとも部分的にカプセル化された核酸を食細胞中に導入するプロセスを増加させ得、核酸は翻訳され、最終的に、食細胞中にコードされた抗原またはその断片もしくはバリアントの存在を生じる。やはり理論に束縛されることを望むものではないが、本発明者らは現在、このことがとりわけ、特に単核食細胞系の活性の中心であり、リンパ球の主な貯蔵場所として働く脾臓へのホスファチジルセリン含有ワクチンの観察された標的化を説明し得ると考えている（本出願の実施例５を参照されたい）。

【０１００】

リン脂質ホスファチジルセリン

本明細書で使用される「ホスファチジルセリン」という用語は、グリセリンの炭素原子にホスホジエステルを介して結合したセリンである頭部基と、１つまたは複数の尾部基とからなる化合物に関する。好ましくは、前記尾部基は、グリセリンの別の炭素原子にエステルを介して結合した脂肪酸である。好ましくは、本明細書で使用される「ホスファチジルセリン」という用語は、グリセリンの炭素原子にホスホジエステルを介して結合したセリンである頭部基と、１つまたは複数の尾部基とからなる化合物であって、尾部基がグリセリンの別の炭素原子にエステルを介して結合した脂肪酸である、化合物に関する。脂肪酸は、好ましくは、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、およびセロチン酸からなる群から選択される飽和脂肪酸であり得る。脂肪酸はまた、好ましくは、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノエライジン酸、α－リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸（ｅｉｃｏｓａｐｅｎｔｉａｅｎｏｉｃ　ａｃｉｄ）、エルカ酸、およびドコサヘキサン酸からなる群から選択される不飽和脂肪酸であり得る。脂肪酸は、特にフィタン酸などの分岐鎖脂肪酸であってもよい。

【０１０１】

実施例が以下に与えられ、例えば、ＤＰｈｙＰＳ、ＷＴ－ＰＳ（すなわち、動物、植物、および微生物の間に広く分布しているＷＴ－ＰＳの２つの異なる脂肪酸／アルキル鎖による、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリンまたは１８：０－１８：１ＰＳ）、１６：０－ＰＳ、１４：０－ＰＳ、１０：０－ＰＳ、６：０－ＰＳ、および１８：１－ＰＳ　ＤＯＰＳの場合、セリンはホスホジエステルを介してグリセリンの第１の炭素原子に結合しており、グリセリンの第２の炭素原子および第３の炭素原子は、各々エステルを介して脂肪酸に結合している。この配置において、２つの脂肪酸は同一であってもよく（例えば、ＤＰｈｙＰＳ、１６：０ＰＳ、１４：０－ＰＳ、１０：０－ＰＳ、６：０－ＰＳおよび１８：１－ＰＳ　ＤＯＰＳ参照）、または異なっていてもよい（例えば、ＷＴ－ＰＳまたは１８：０－１８：１ＰＳ参照）。他の例において、例えば、１８：１－Ｌｙｓｏ　ＰＳおよび１８：０－Ｌｙｓｏ　ＰＳの場合、セリンは同様にホスホジエステルを介してグリセリンの第１の炭素原子に結合しており、グリセリンのただ１個のさらなる炭素原子は、エステルを介して脂肪酸に結合しており、単一ＯＨ基がグリセリンの残りの炭素原子に残っている。このような配置は、典型的には「リゾホスファチジルセリン（ｌｙｓｏｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ）」と呼ばれ、これは上記定義に照らして、本明細書で使用される「ホスファチジルセリン（ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ）」という用語に含まれる。

【０１０２】

好ましい実施形態において、ホスファチジルセリンは、ＤＰｈｙＰＳ、ＷＴ－ＰＳ、１

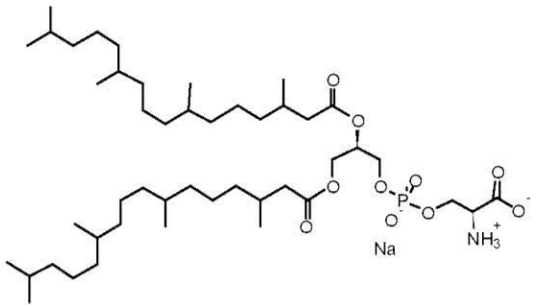
６：０－ＰＳ、１４：０－ＰＳ、１０：０－ＰＳ、６：０－ＰＳ、１８：１－ＰＳ　ＤＯＰＳ、１８：１－Ｌｙｓｏ　ＰＳ、および１８：０－Ｌｙｓｏ　ＰＳからなる群から選択される。ホスファチジルセリンがＤＰｈｙＰＳまたはＷＴ－ＰＳ（１８：０－１８：１ＰＳ）のいずれかであることが最も好ましい。

【０１０３】

上記のホスファチジルセリンの構造は以下の通りである（これらの脂質の全ては例えば、アバンティポーラーリピッド社（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）で商業的に入手可能であることに留意する）：

【０１０４】

【化１】

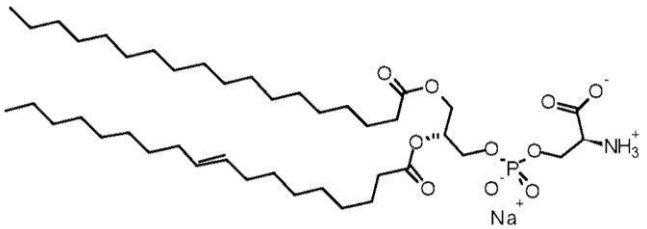


【０１０５】

ＤＰｈｙＰＳ

【０１０６】

【化２】

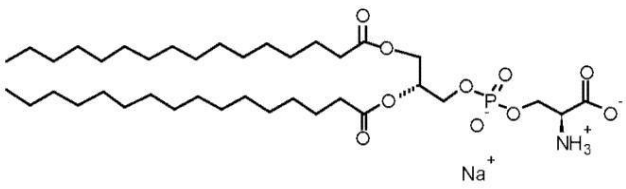


【０１０７】

ＷＴ－ＰＳ（１８：０－１８：１　ＰＳ）

【０１０８】

【化３】

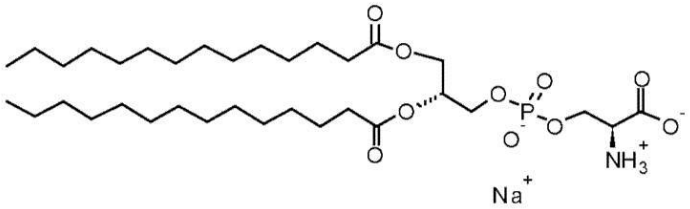


【０１０９】

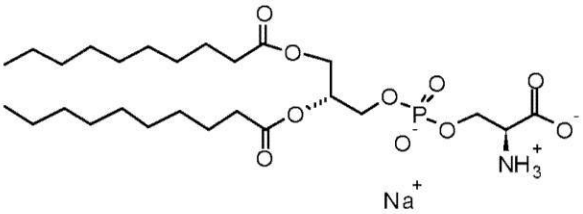
１６：０　ＰＳ

【０１１０】

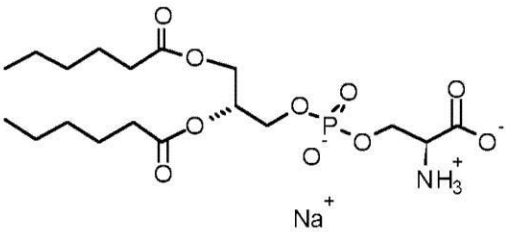
【化４】



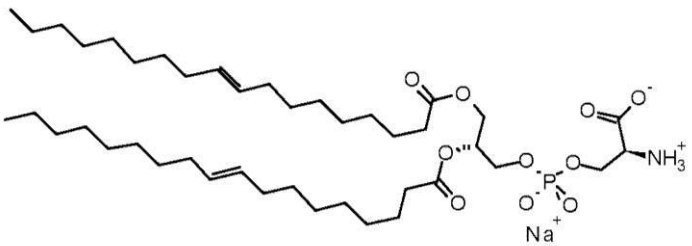
【０１１１】
１４：０　ＰＳ
【０１１２】
【化５】



【０１１３】
１０：０　ＰＳ
【０１１４】
【化６】

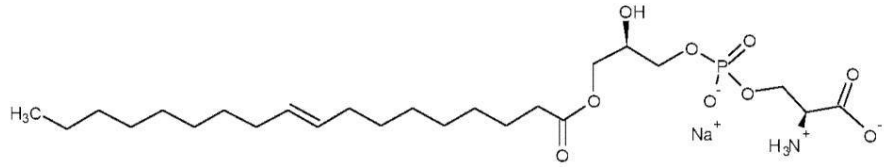


【０１１５】
６：０　ＰＳ
【０１１６】
【化７】

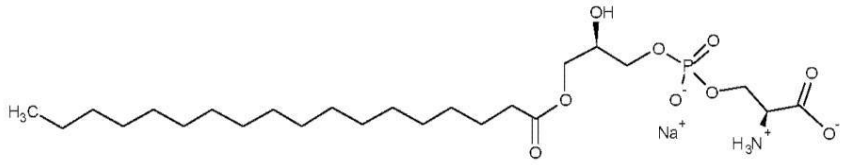


【０１１７】
１８：１　ＰＳ　ＤＯＰＳ
【０１１８】

【化８】

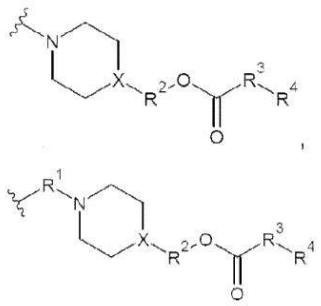


【０１１９】
１８：１　Ｌｙｓｏ　ＰＳ
【０１２０】
【化９】

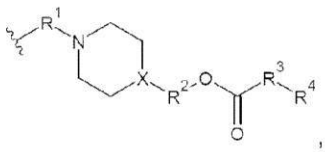


【０１２１】
１８：０　Ｌｙｓｏ　ＰＳ
飽和ホスファチジルセリンのさらなる例としては、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＤＬＰＳ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ジミリストイルホスファチジルセリン；ＤＭＰＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ジステアロイルホスファチジルセリン；ＤＳＰＳ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ジパルミトイルホスファチジルセリン；ＤＰＰＳ）、１－ミリストイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＰＭＰＳ）、１－ミリストイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＭＳＰＳ）、１－パルミトイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＰＳＰＳ）、１－ステアロイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＳＰＰＳ）、および１－ステアロイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ＳＭＰＳ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ホスファチジルセリンは、ステアロイル（１８：０）部分、オレオイル（１８：１）部分、エイコサテトラエノイル（２０：４）部分、ドコサヘキサエノイル（２２：０６）部分、またはそれらの組み合わせを含む。他の実施形態では、ＰＳはＬ－α－ホスファチジルセリン（脳、ブタ；ＣＡＳ．登録番号３８３９０７－３２－２）である。
【０１２２】
カチオン性またはイオン化可能脂質
ＬＮＰのカチオン性またはイオン化可能脂質はカチオン化可能である、すなわち、ｐＨが脂質のイオン化可能基のｐＫ未満に低下するとプロトン化するが、より高いｐＨ値では進行的により中性になる。ｐＫ未満のｐＨ値では、脂質は負に帯電した核酸と会合することができる。ある特定の実施形態において、カチオン性脂質は、ｐＨ低下で正電荷を帯びる双性イオン性脂質を含む。
【０１２３】
好ましいカチオン性脂質は、式（Ｃａｔ－Ｉ）による化合物として定義される：
R^a-A-R^b　式（Ｃａｔ－Ｉ）
（式中、
R^aは
【０１２４】

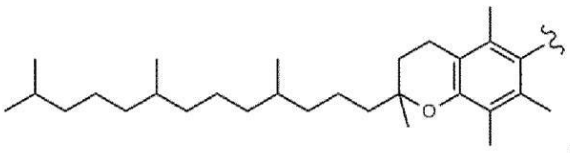
【化１０】



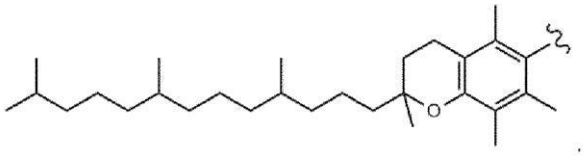
【０１２５】
または
－Ｒ^{1}－Ｎ（Ｈ）－Ｃ（Ｏ）－Ｒ^{3}－Ｒ^{4}
から選択され；
Ｒ^{b}は
【０１２６】
【化１１】



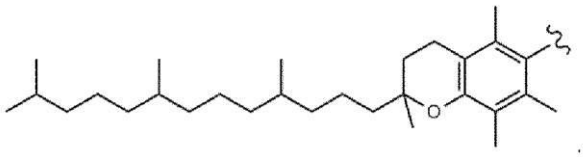
【０１２７】
－Ｒ^{1}－Ｎ（Ｈ）－Ｃ（Ｏ）－Ｒ^{3}－Ｒ^{4}、または
－Ｒ^{1}－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$；
から選択され；
Ａは－Ｓ－、－Ｓ－Ｓ－、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－Ｓ－Ｃ（Ｏ）－Ｎ（Ｈ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、または－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－であり；
Ｒ^{1}は場合により置換されたエタンジイル、プロパンジイル、ブタンジイル、または２～８個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルカンジイルであり；
Ｒ^{2}は２～８個の炭素原子を有するアルカンジイルであり；
Ｒ^{3}は任意選択であり、存在する場合、－Ｒ^{5}－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－、－Ｒ^{5}－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－、－Ｒ^{5}－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－、－Ｒ^{5}－ＯＣ（Ｏ）－ＮＨ－、またはＲ^{5}－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であり；
Ｒ^{4}は１２～３６個の炭素原子を有する親油性置換基であり；
Ｒ^{5}は１～６個の炭素原子を有するアルカンジイルであり；
Ｘは炭素原子または窒素原子であり；
全ての選択は互いに独立しており、
但し、場合により、Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、およびＲ^{5}が全て直鎖非置換エタンジイルであり、Ａが－Ｓ－Ｓ－であり、Ｒ^{a}およびＲ^{b}が同一である場合、Ｒ^{4}は
【０１２８】
【化１２】



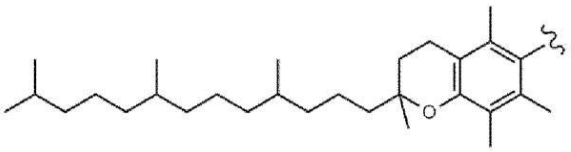
【０１２９】
ではない）。
他の実施形態において、Ｒ^{4}は
【０１３０】
【化１３】



【０１３１】
である。
１つの好ましい実施形態において、Ａは－Ｓ－であり、Ｒ^{a}およびＲ^{b}は同一であり、Ｒ^{4}は
【０１３２】
【化１４】



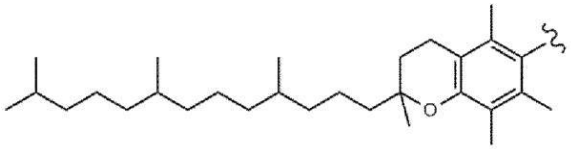
【０１３３】
である。
別の好ましい実施形態において、Ａは－Ｓ－であり、Ｒ^{4}は
【０１３４】
【化１５】



【０１３５】
である。
式（Ｃａｔ－Ｉ）のＲ^{4}は１２～３６個の炭素原子を有する親油性置換基として定義される。Ｒ^{a}および場合によりまたＲ^{b}（Ｒ^{b}が－Ｒ^{1}－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$でない限り）のこの「尾部（ｔａｉｌ）」末端は、分子が生体膜を横切ることができるために典型的に必要とされる親油性度を提供すると考えられる。したがって、Ｒ^{4}は、原則として、実質的に親油性の任意の構造であり得る。例えば、炭化水素構造は親油性である。一実施形態において、Ｒ^{4}は、その出現の少なくとも１つにおいて、炭素および水素原子のみからなり得る。１つの好ましい実施形態において、Ｒ^{4}は、好ましくは１２～２５個の炭素原子を有する、直鎖または分岐のアルキルまたはアルケニルを表す。分岐アルキルまたはアルケニルは、場合により２個、３個、４個またはそれ以上のメチル側鎖などの、複数の側鎖を有し得る。別の実施形態において、Ｒ^{4}は、例えば２～１０個の炭素原子を有する単一アルキルまたはアルケニル側鎖を含むアルキルまたはアルケニルであり得る。例えば、Ｒ^{4}は１－ｎ－ヘキシル－ｎ－ノニル（もしくは７－ｎ－ペンタデシル）、または２－ｎ－ヘキシル－ｎ－デシルであり得る。他の実施形態において、親油性置換基は、場合によりＯ、Ｓ、またはＮなどの１個または複数のヘテロ原子を含み得る。他の実施形態において、親油性置換基は、場合によりＯ、Ｓ、またはＮなどの１個または複数のヘテロ原子を含み得る、１個または複数の飽和、不飽和、または芳香族環構造を場合により含み得る。

【０１３６】
Ｒ^{4}はまた、主に親油性の性質は維持される限り、少数の酸素原子などのヘテロ原子を含み得る。一実施形態において、Ｒ^{4}は１個または複数の酸素原子を含み、他のヘテロ原子を含まない。Ｒ^{4}はまた、場合により１個または複数の酸素原子を含む芳香族または脂肪族環構造などの環状構造を含み得る。存在する場合、ヘテロ原子および／または環状構造は、「尾部」の末端に向かってではなく任意選択のＲ^{3}構造に向かって位置することが好ましい。一実施形態において、Ｒ^{4}はトコフェロールまたはトコトリエノールから誘導される親油性基である。一実施形態において、特にＲ^{1}、Ｒ^{2}、およびＲ^{5}の全てが直鎖非置換エタンジイルではなく、Ａが－Ｓ－Ｓ－であり、Ｒ^{a}およびＲ^{b}が同一である場合、Ｒ^{4}はアルファ－トコフェロールから誘導される親油性基、特に

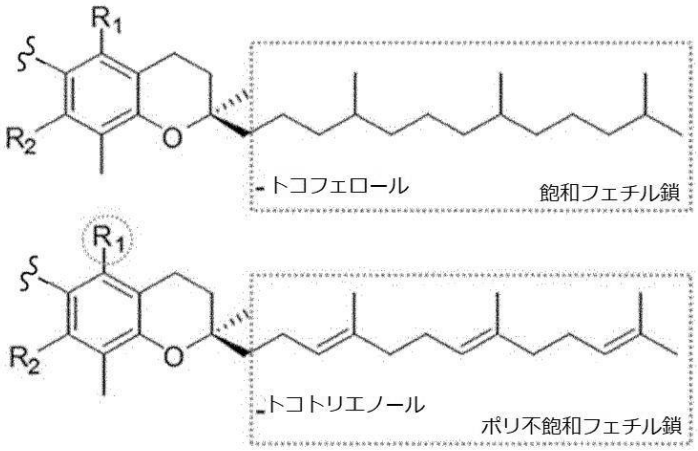
【０１３７】
【化１６】



【０１３８】
である。

本明細書で言及される「トコフェロールまたはトコトリエノールから誘導される親油性基」は、トコフェロールおよびトコトリエノールの誘導体、特に以下のスキーム１に示される構造を有する誘導体、すなわち、アルファ－トコフェロール、ベータ－トコフェロール、ガンマ－トコフェロール、デルタ－トコフェロール、アルファ－トコトリエノール、ベータ－トコトリエノール、ガンマ－トコトリエノールおよびデルタ－トコトリエノールから誘導される誘導体を含む。

【０１３９】
【化１７】



【０１４０】

【表３】

アイソフォーム	R_1	R_2
アルファ (α)	CH3	CH3
ベータ (β)	CH3	H
ガンマ (γ)	H	CH3
デルタ (δ)	H	H

【０１４１】

スキーム１：トコフェロールの誘導体は、飽和フィチル鎖を有し、トコトリエノールの誘導体は、ポリ不飽和フィチル鎖を有する。トコフェロールの誘導体およびトコトリエノールの誘導体の両方について、アイソフォームは、CH_3およびＨから選択されるR_1およびR_2によって定義される。したがって、示されるように、例えばR_1がCH_3でありR_2がCH_3である場合、得られる誘導体は、それぞれトコフェロールおよびトコトリエノールのアルファアアイソフォームである（それぞれ、アルファ－トコフェロールおよびアルファ－トコトリエノールの誘導体と呼ばれる）。ＯＨ基は、２つの構造中、左に示されるように結合点なので、当然誘導体中に存在しない。

【０１４２】

他の好ましい実施形態において、組成物の少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、ＬＮＰを形成し、ＬＮＰのカチオン性脂質は、ＰＣＴ特許出願ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５またはＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５の優先権を主張するその後の特許出願、すなわち、国際公開第２０２１１２３３３２号の表１の構造Ｃ１～Ｃ２３、もしくはそれぞれＣ１～Ｃ２７または式（Ｉ）から誘導される脂質から選択される。他の実施形態において、組成物の少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、ＬＮＰを形成し、ＬＮＰのカチオン性脂質は、ＰＣＴ特許出願ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５またはＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５の優先権を主張するその後の特許出願、すなわち、国際公開第２０２１１２３３３２号の表１の構造Ｃ１～Ｃ２３、またはそれぞれＣ１～Ｃ２７から誘導され、ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５の式（Ｉ）の要素「Ａ」は－Ｓ－である。したがって、ＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５またはＰＣＴ／ＥＰ２０１９／０８６８２５の優先権を主張するその後の特許出願、すなわち、国際公開第２０２１１２３３３２号の式Ｃ１～Ｃ２３、またはそれぞれＣ１～Ｃ２７、およびそれに関連する具体的な開示を本願明細書に援用する。

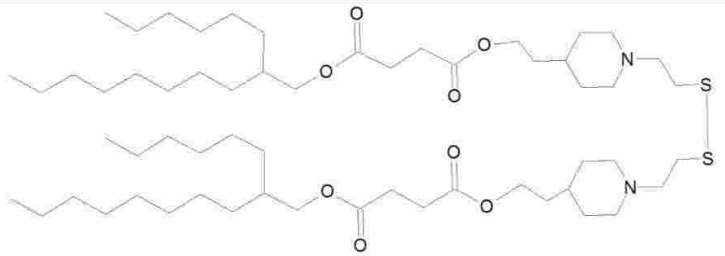
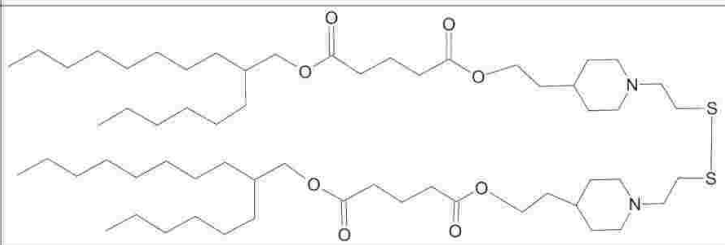
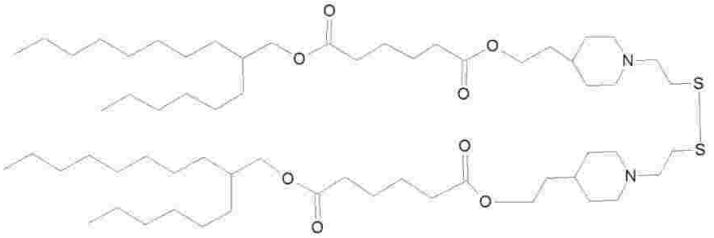
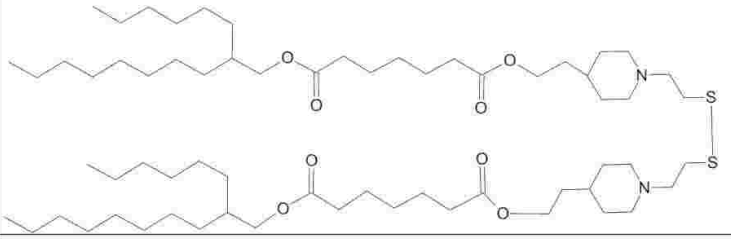
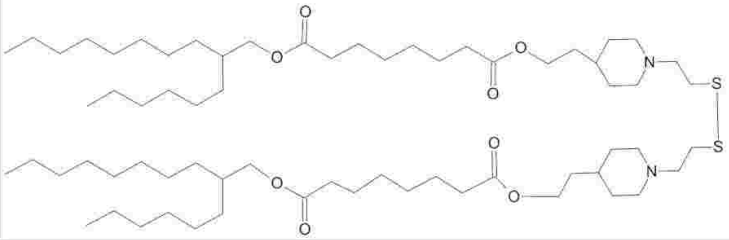
【０１４３】

なおさらなる実施形態において、カチオン性脂質は、好ましくは表１において本明細書に列挙されるカチオン性脂質から選択される。

【０１４４】

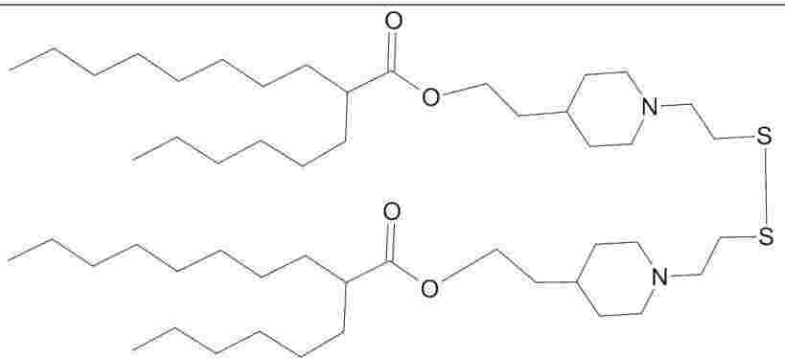
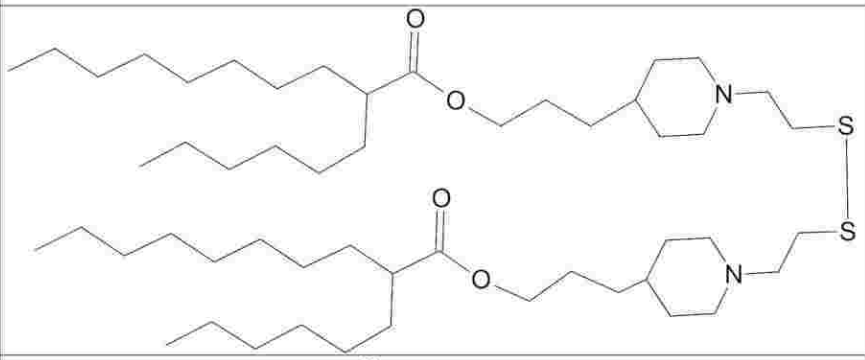
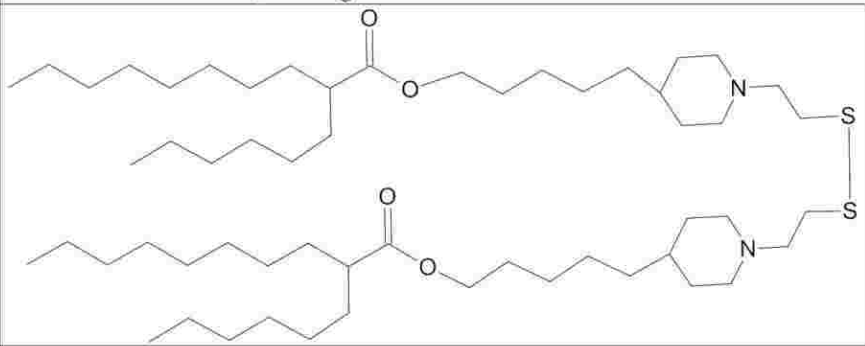
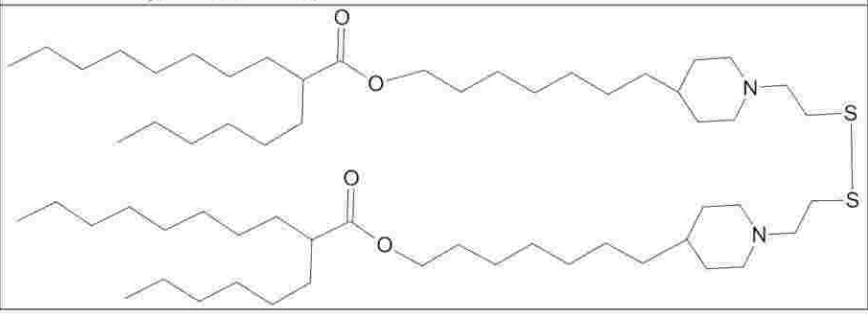
【表４－１】

表１　式（Ｉ）による好ましいカチオン性脂質　－　この表の具体的な脂質、例えば脂質Ｃ１が参照される場合、例えば「脂質Ｃ１」、「脂質化合物１」、「ＨＥＸＡ－Ｃ４ＤＥ－ＰｉｐＳＳ」または「Ｃ１」が参照される。

カチオン性脂質化合物番号	構造	名称
C1		HEXA-C4DE-PipSS
C2		HEXA-C5DE-PipSS (GN02-脂質) (図 1A も参照のこと)
C3		HEXA-C6DE-PipSS
C4		HEXA-C7DE-PipSS
C5		HEXA-C8DE-PipSS

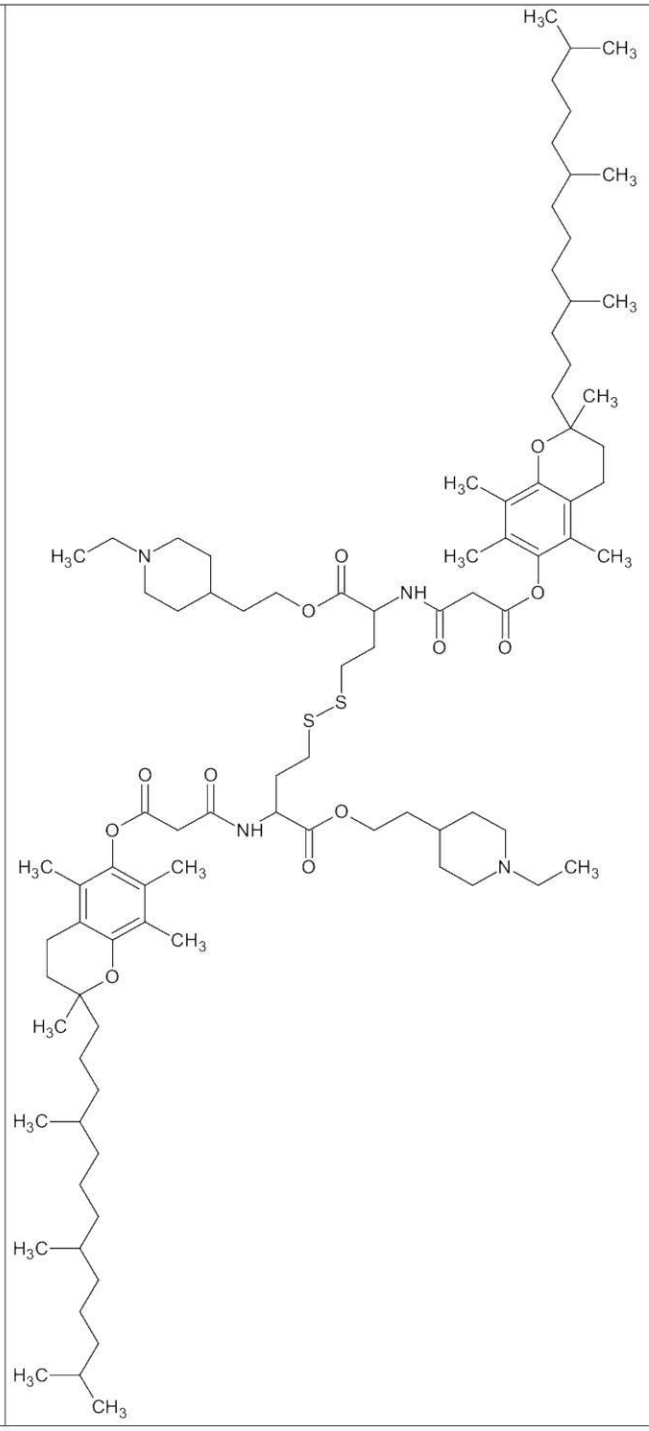
【０１４５】

【表４－２】

C6		HEXACA-C3ME-PiPSS
C7		HEXACA-C4ME-PipSS
C8		HEXACA-C6ME-PipSS
C9		HEXACA-C8ME-PipSS

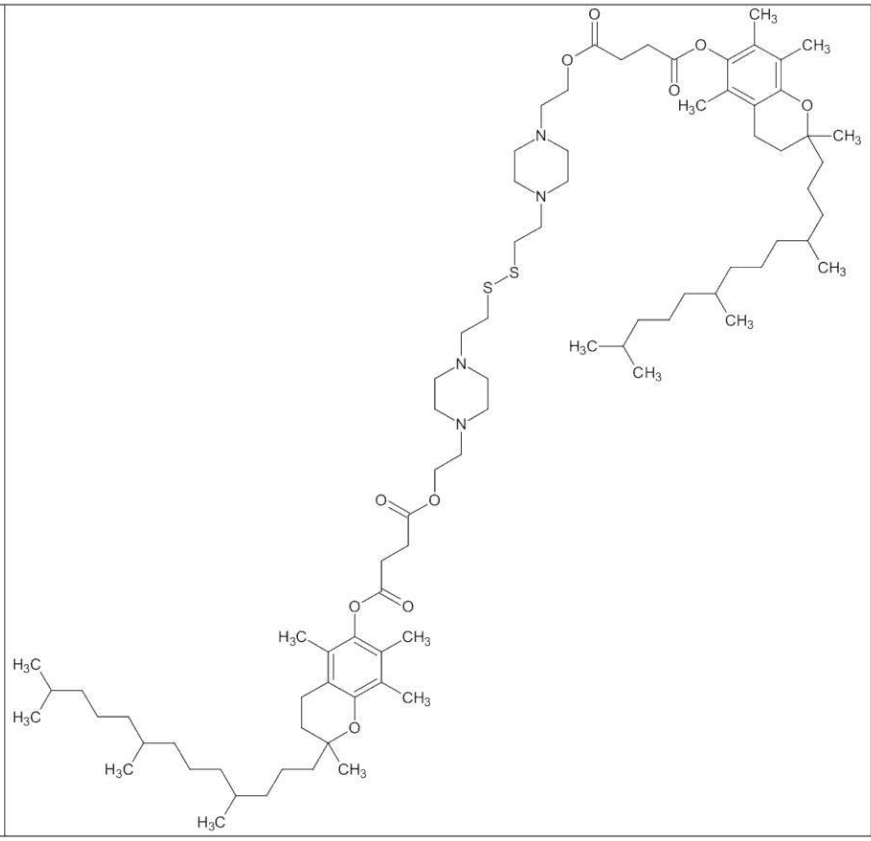
【０１４６】

【表４－３】

C10		C10/化合物 10

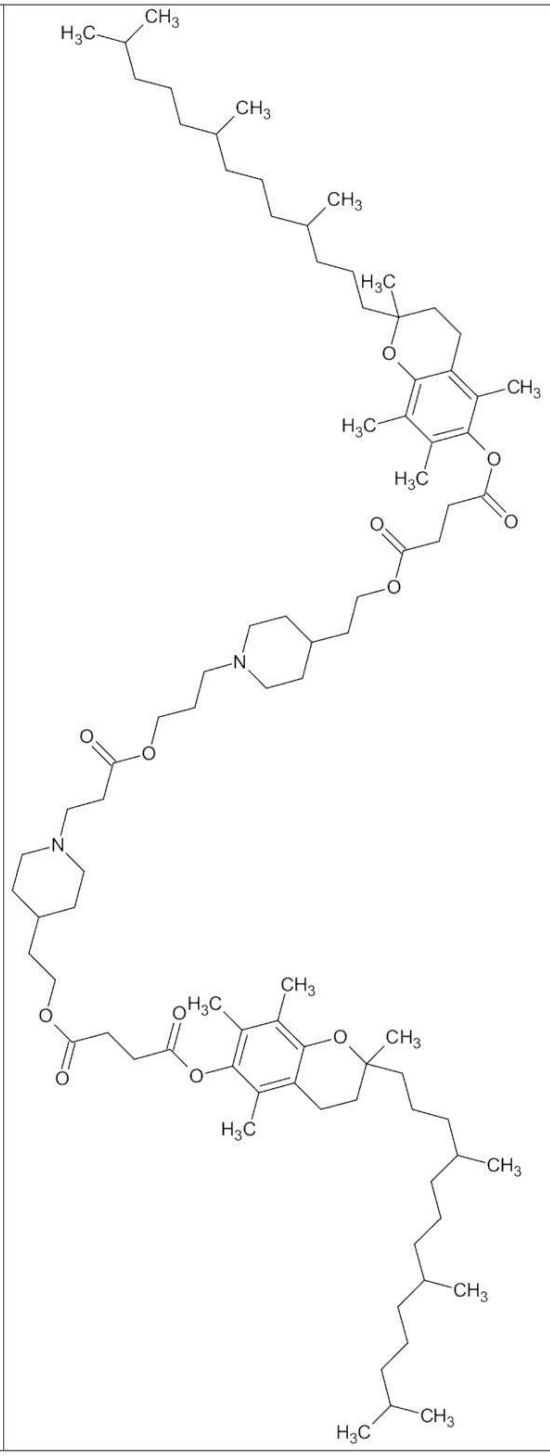
【０１４７】

【表４－４】

C11		C11/化合物 11

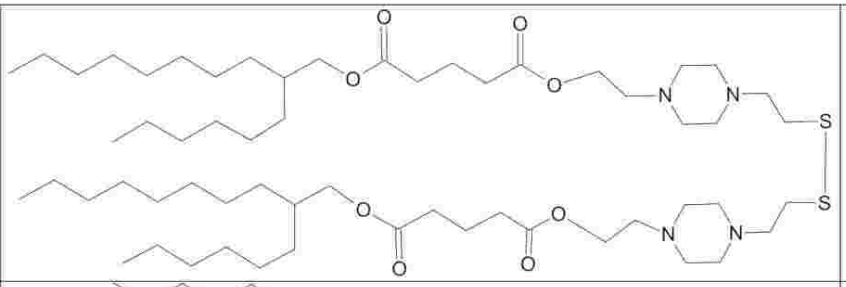
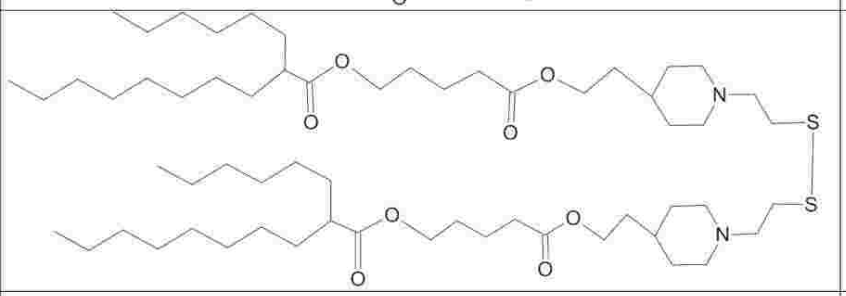
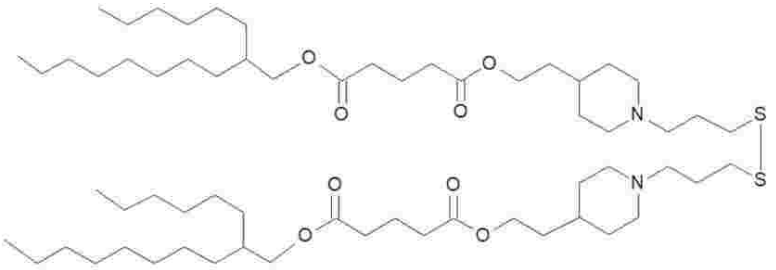
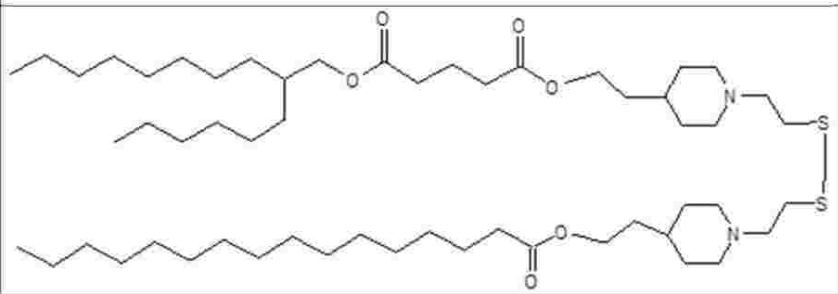
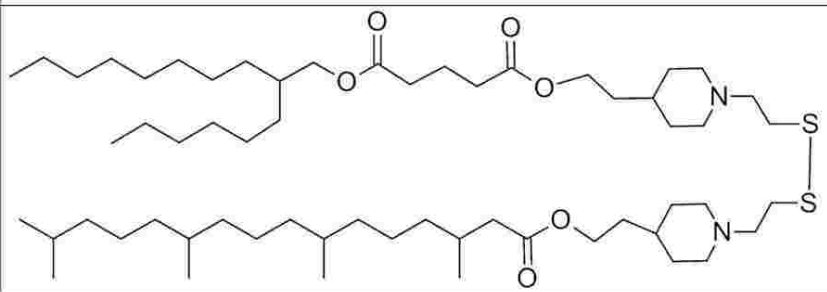
【０１４８】

【表４－５】

C12		C12/化合物 12

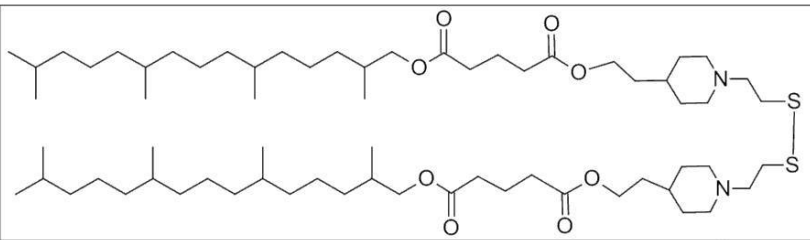
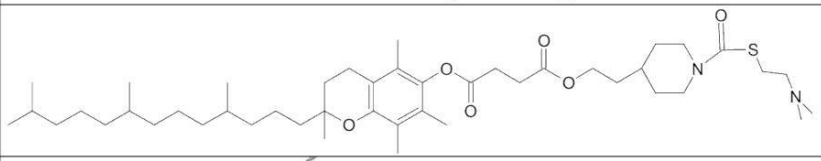
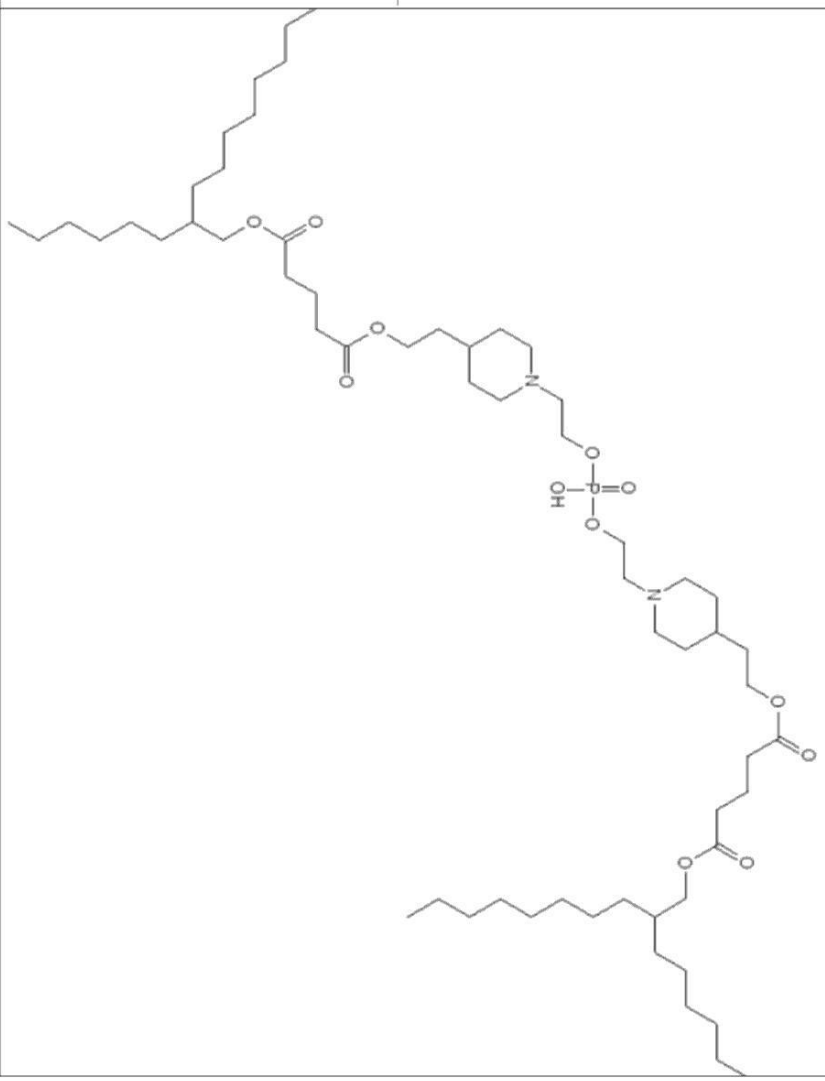
【０１４９】

【表４－６】

C13		HEXA-C5DE-PipAZSS
C14		HEXACA-C5DE-PipSS
C15		HEXA-C5DE-PipC3SS (図 1B も参照のこと)
C16		C 16-HEXA-C5DE-PiPSS
C17		「Phy-HEXA-C5DE-PipSS」または「DPhy-HEXA-C5DE-PipSS」

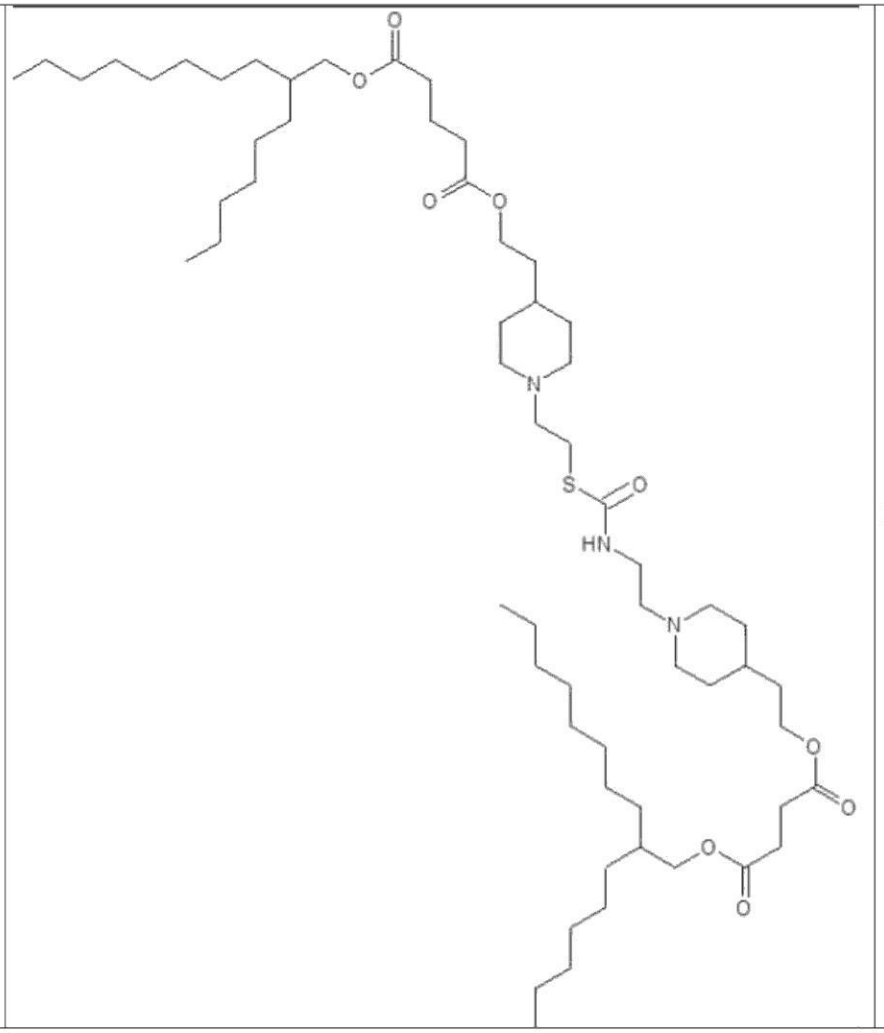
【０１５０】

【表４－７】

C18		「DPhy-C5DE-PipSS」または「2DPhy-C5DE-PipSS」
C19		Vit E-C5DE-Pip-TEN
C20		HEXA-C5DE-Pip-リン酸

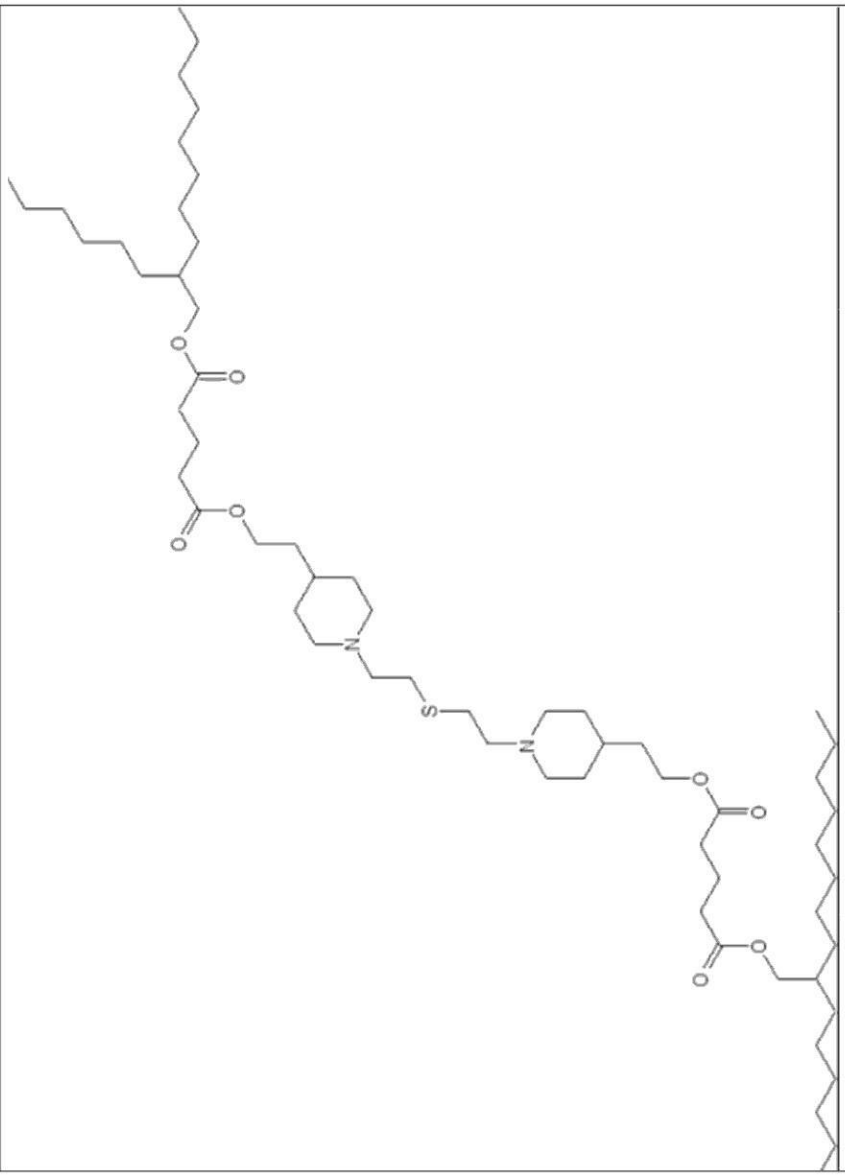
【０１５１】

【表４－８】

C21		HEXA-C5DE-Pip-チオカルバメート

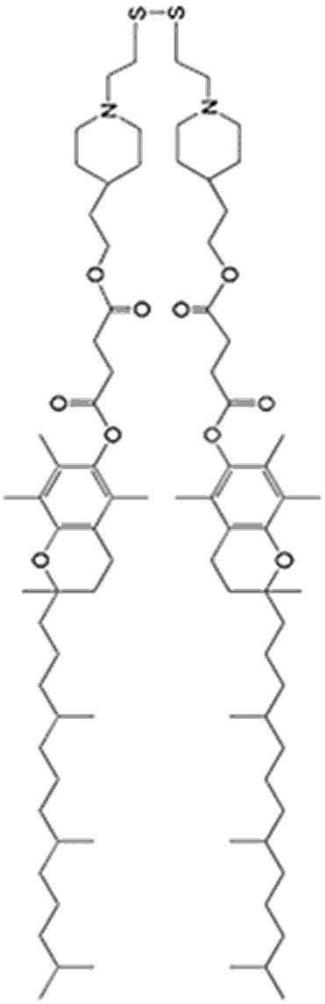
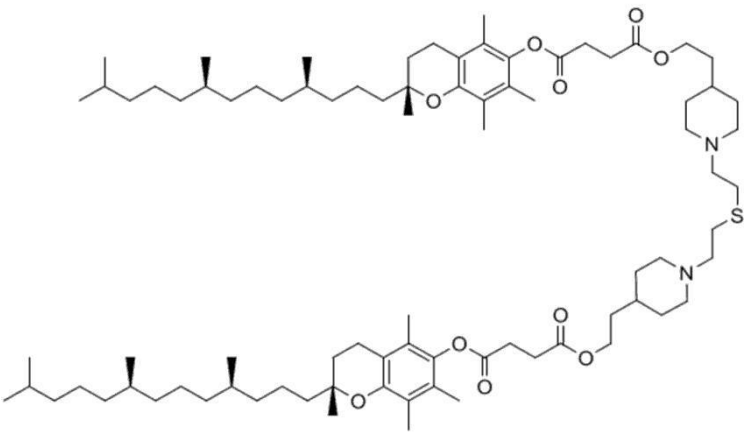
【０１５２】

【表４－９】

C22		HEXA-C5DE-Pip-チオエーテル

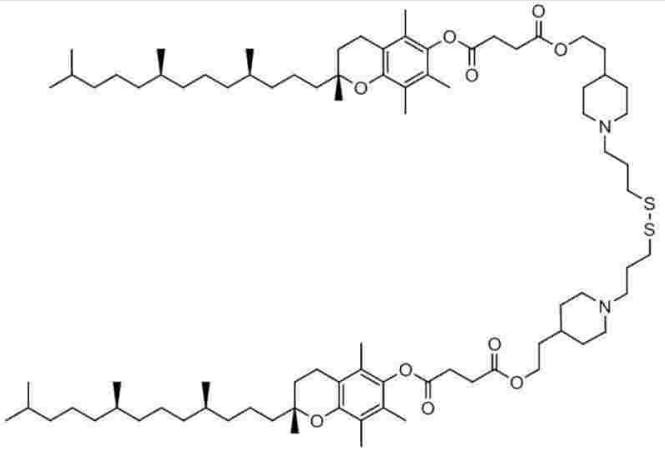
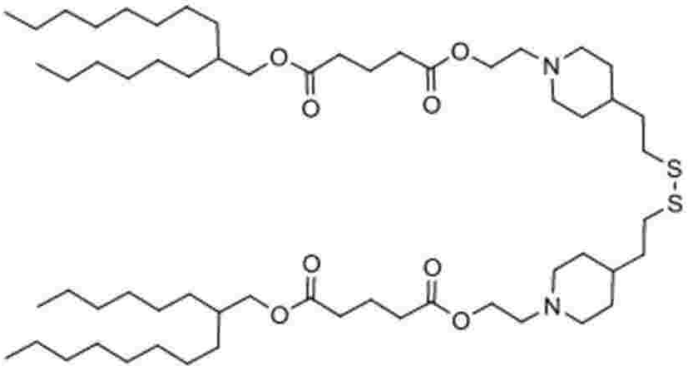
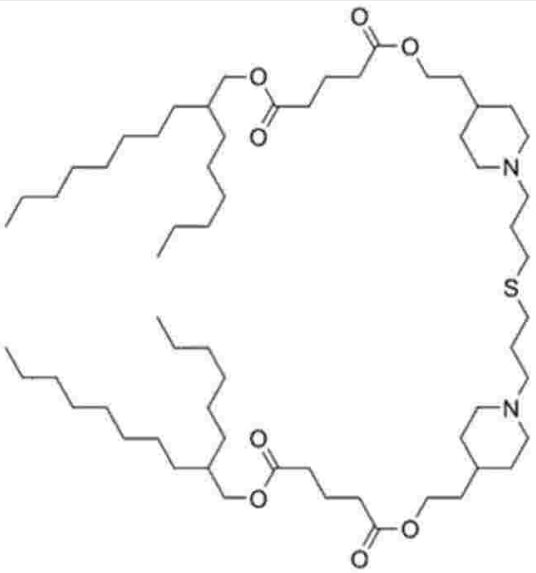
【０１５３】

【表４－１０】

C23		COATSOME (登録商標) SS-EC
C24		THIOETHER またはViTE-C4DE-ピペリジン-チオエーテル (図1Cも参照のこと)

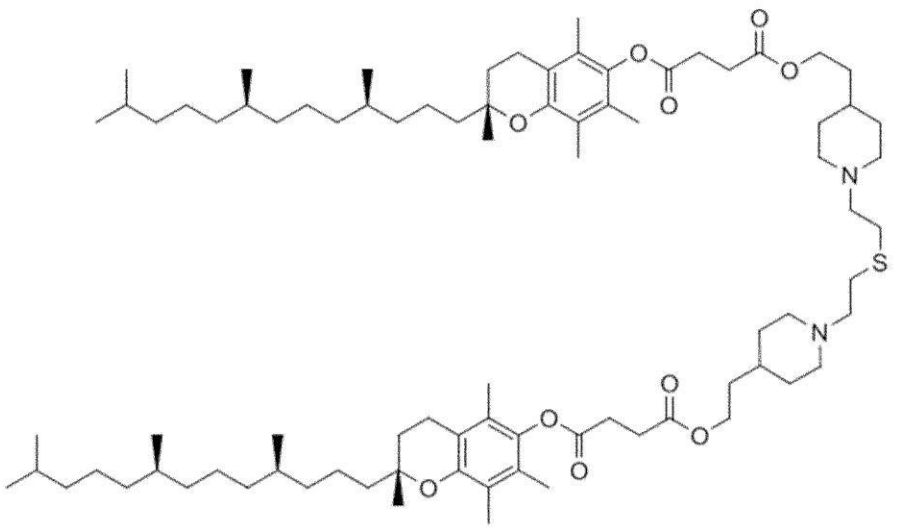
【０１５４】

【表４－１１】

C25		「C3SS」または「ViTE-C4DE-ピペリジン-C3SS」
C26		HEXA-C5DE-反転－PipSS
C27		HEXA-C5DE-Pip-C3チオエーテルまたはHEXA-C5DE-ピペリジン-C3チオエーテル

【０１５５】
したがって、本発明は、上記のカチオン性脂質を含むワクチン組成物を包含する。例えば、組成物は、表１の化合物Ｃ１～Ｃ２７から選択されるカチオン性脂質を含み得る。
他の好ましい実施形態において、組成物の少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、ＬＮＰを形成し、ＬＮＰのカチオン性脂質は、カチオン性脂質について最も好ましい構造である構造「Ｃ２４」を有する
【０１５６】

【化１８】



【０１５７】

（Ｃ２４またはＴＨＩＯＥＴＨＥＲ）。

カチオン性、イオン化可能またはカチオン化可能脂質としては、限定されるものではないが、ＤＳＤＭＡ、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、１，２－ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンクロリド（ＤＯＴＡＰ）（Ｎ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリドおよび１，２－ジオレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩としても知られる）、Ｎ－（１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，３－ジオレイルオキシ）プロピルアミン（ＤＯＤＭＡ）、ｃｋｋ－Ｅ１２、ｃｋｋ、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、１，２－ジ－ｙ－リノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（γ－ＤＬｅｎＤＭＡ）、９８Ｎ１２－５、１，２－ジリノレイルカルバモイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ（Ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｏｘｙ）－３－（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＡＣ）、１，２－ジリノレイルオキシ（Ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｏｘｙ）－３－モルホリノプロパン（ＤＬｉｎ－ＭＡ）、１，２－ジリノレオイル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルチオ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｓ－ＤＭＡ）、１－リノレオイル－２－リノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＭＡ．Ｃｌ）、ＩＣＥ（イミダゾールベース）、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴ５００１、ＤＭＤＭＡ、ＣＬｉｎＤＭＡ、ＣｐＬｉｎＤＭＡ、ＤＭＯＢＡ、ＤＯｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎｃａｒｂＤＡＰ、ＤＬｉｎＣＤＡＰ、ＫＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＸＴＣ２－ＤＭＡ、ＸＴＣ（２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン）、ＨＧＴ４００３、１，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＡＰ．Ｃｌ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ－メチルピペラジノ）プロパン（ＤＬｉｎ－ＭＰＺ）、または３－（Ｎ，Ｎ－ジリノレイルアミノ）－１，２－プロパンジオール（ＤＬｉｎＡＰ）、３－（Ｎ，Ｎ－ジオレイルアミノ）－１，２－プロパンジオール（ｐｒｏｐａｎｅｄｉｏ）（ＤＯＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキソ－３－（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭ　Ａ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）またはその類似体、（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル

－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－アミン、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＭＣ３）、ＡＬＮＹ－１００（（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－アミン））、１，１’－（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチルアザンジイル）ジドデカン－２－オール（Ｃ１２－２００）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－Ｃ２－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ＮＣ９８－５（４，７，１３－トリス（３－オキソ－３－（ウンデシルアミノ）プロピル）－Ｎ１，Ｎ１６－ジウンデシル－４，７，１０，１３－テトラアザヘキサデカン－１，１６－ジアミド）、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ３－ＤＭＡ）、３－（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－１－アミン（ＭＣ３エーテル）、４－（（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルブタン－１－アミン（ＭＣ４エーテル）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（登録商標）（ＤＯＴＭＡおよび１，２－ジオレオイル－ｓｎ－３ホスホ－エタノールアミン（ＤＯＰＥ）を含む商業的に入手可能なカチオン性リポソーム、ジーアイビーシーオー／ビーアールエル社（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ）［米国ニューヨーク州グランドアイランド（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ）所在］製）；ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）（Ｎ－（１－（２，３ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ－（２－（スペルミンカルボキサミド）エチル）－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）および（ＤＯＰＥ）を含む商業的に入手可能なカチオン性リポソーム、ジーアイビーシーオー／ビーアールエル社（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ）製）；およびＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭ（登録商標）（エタノール中ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン（ＤＯＧＳ）を含む商業的に入手可能なカチオン性脂質、プロメガ社（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．）［米国ウィスコンシン州マディソン（Ｍａｄｉｓｏｎ）所在］製）または前記のいずれかの任意の組合せも挙げられる。本発明の組成物および方法に使用するためのさらに好適なカチオン性脂質としては、国際特許公開である国際公開第２０１００５３５７２号（および特に、段落［００２２５］に記載されるＣＩ２－２００）および国際公開第２０１２１７０９３０号（これらを共に本願明細書に援用する）に記載されるカチオン性脂質、ＨＧＴ４００３、ＨＧＴ５０００、ＨＧＴＳ００１、ＨＧＴ５００１、ＨＧＴ５００２（米国特許出願公開第２０１５０１４００７０号参照）が挙げられる。

【０１５８】

実施形態において、カチオン性脂質はアミノ脂質であり得る。

代表的なアミノ脂質としては、限定されるものではないが、１，２－ジリノレイルオキシ（ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｏｘｙ）－３－（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＡＣ）、１，２－ジリノレイルオキシ（ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｏｘｙ）－３モルホリノプロパン（ＤＬｉｎ－ＭＡ）、１，２－ジリノレオイル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルチオ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｓ－ＤＭＡ）、１－リノレオイル－２－リノレイルオキシ－３ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＭＡ．Ｃｌ）、１，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアミノプロパンクロリド塩（ＤＬｉｎ－ＴＡＰ．Ｃｌ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ－メチルピペラジノ）プロパン（ＤＬｉｎ－ＭＰＺ）、３－（Ｎ，Ｎジリノレイルアミノ）－１，２－プロパンジオール（ＤＬｉｎＡＰ）、３－（Ｎ，Ｎ－ジオレイル

アミノ）－１，２－プロパンジオール（ＤＯＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキソ－３－（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ）、および２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）；ジリノレイル－メチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）；ＭＣ３（米国特許出願公開第２０１００３２４１２０号）が挙げられる。

【０１５９】

実施形態において、カチオン性脂質はアミノアルコールリピドイドであり得る。

本発明で使用され得るアミノアルコールリピドイドは、全体を本願明細書に援用する米国特許第８４５０２９８号に記載される方法によって調製され得る。好適な（イオン化可能）脂質はまた、本願明細書に援用する国際公開第２０１７０７５５３１号の表１、２および３に開示され、その請求項１乃至２４に定義される化合物であり得る。

【０１６０】

別の実施形態において、好適な脂質はまた、全体を本願明細書に援用する国際公開第２０１５０７４０８５号（すなわち、ＡＴＸ－００１～ＡＴＸ－０３２または請求項１乃至２６に指定される化合物）、米国特許出願公開第６１／９０５，７２４号および同第１５／６１４，４９９号または米国特許第９，５９３，０７７号および同第９，５６７，２９６号に開示される化合物であり得る。

【０１６１】

他の実施形態において、好適なカチオン性脂質はまた、全体を本願明細書に援用する国際公開第２０１７１１７５３０号に開示される化合物（すなわち、脂質１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または請求項に指定される化合物）であり得る。

【０１６２】

好ましい実施形態において、イオン化可能またはカチオン性脂質はまた、国際公開第２０１８０７８０５３号に開示される脂質（すなわち、国際公開第２０１８０７８０５３号の式Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩから誘導される脂質、または国際公開第２０１８０７８０５３号の請求項１～１２に指定される脂質）（国際公開第２０１８０７８０５３号の開示全体を本願明細書に援用する）から選択され得る。その文脈において、国際公開第２０１８０７８０５３号の表７に開示される脂質（例えば、式Ｉ－１～Ｉ－４１から誘導される脂質）および国際公開第２０１８０７８０５３号の表８に開示される脂質（例えば、式ＩＩ－１～ＩＩ－３６から誘導される脂質）が本発明の文脈において好適に使用され得る。したがって、国際公開第２０１８０７８０５３号の式Ｉ－１～式Ｉ－４１および式ＩＩ－１～式ＩＩ－３６、ならびにこれに関連する具体的な開示を本願明細書に援用する。

【０１６３】

好ましい実施形態において、カチオン性脂質は、公開されたＰＣＴ特許出願である国際公開第２０１８０７８０５３号の式ＩＩＩから誘導され得る。したがって、国際公開第２０１８０７８０５３号の式ＩＩＩ、およびこれに関連する具体的な開示を本願明細書に援用する。

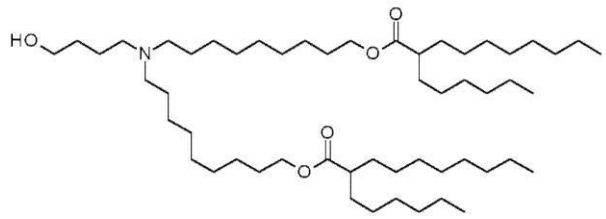
【０１６４】

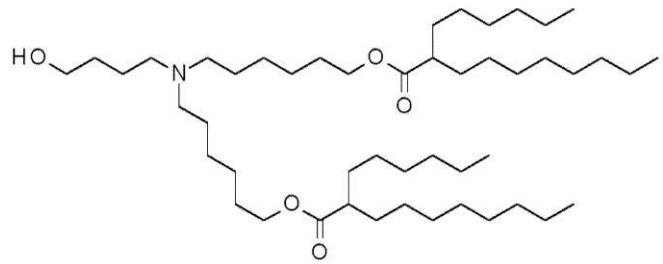
特に好ましい実施形態において、組成物の少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、ＬＮＰを形成し、ＬＮＰのカチオン性脂質は、公開されたＰＣＴ特許出願である国際公開第２０１８０７８０５３号の表９の構造ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－３６から選択される。したがって、国際公開第２０１８０７８０５３号の式ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－３６、およびこれに関連する具体的な開示を本願明細書に援用する。

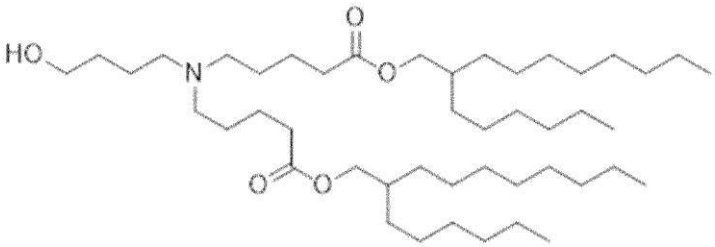
【０１６５】

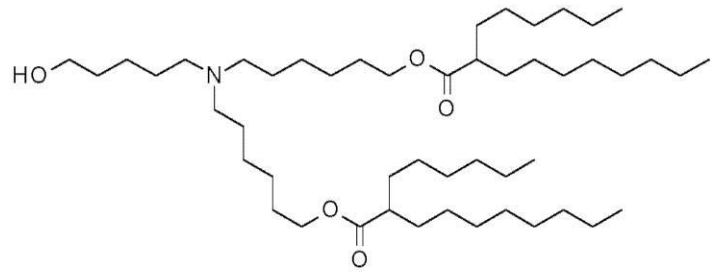
第２の態様の特に好ましい実施形態において、少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、ＬＮＰを形成し、ＬＮＰは、

【０１６６】
【化１９】

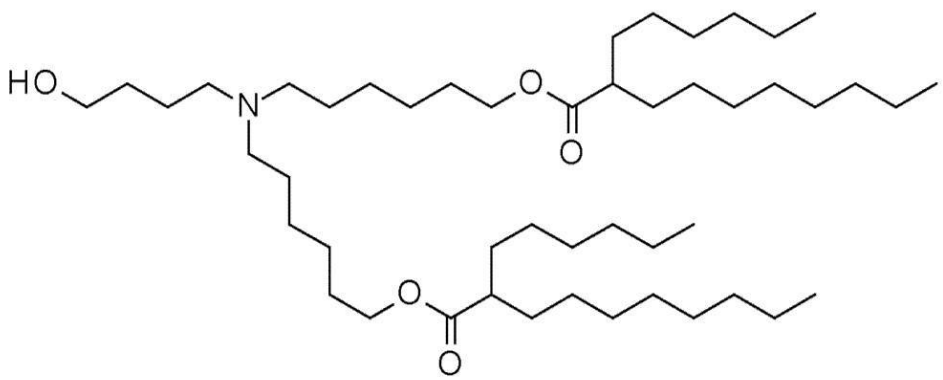

;


;


；または



【０１６７】
または最も好ましくは国際公開第２０１８０７８０５３号の式ＩＩＩ－３、すなわち、（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）：
【０１６８】
【化２０】


(III-3).

【０１６９】
によるカチオン性脂質を含む。
ある特定の実施形態において、本明細書で定義されるカチオン性脂質、より好ましくはカチオン性脂質化合物ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））は、ＬＮＰの総脂質含量に対して約３０～約８０モルパーセント、好ましくは約３０～約６０モルパーセント、より好ましくは約４０～約５５モルパーセント、より好ましくは約４７．４モルパーセントの量でＬＮＰ中に存在する。２つ以上のカチオン性脂質がＬＮＰ内に組み込まれる場合、このようなパーセンテージを組み合わせたカチオン性脂質に適用する。
【０１７０】
実施形態において、カチオン性脂質は、約３０～約７０モルパーセントの量でＬＮＰ中に存在する。一実施形態において、カチオン性脂質は、約４０～約６０モルパーセント、例えばそれぞれ約４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０モルパーセントの量でＬＮＰ中に存在する。実施形態において、カチオン性脂質は、約４７～約４８モルパーセント、例えばそれぞれ約４７．０、４７．１、４７．２、４７．３、４７．４、４７．５、４７．６、４７．７、４７．８、４７．９、５０．０モルパーセントの量でＬＮＰ中に存在し、４７．４モルパーセントが特に好ましい。
【０１７１】
一部の実施形態において、カチオン性脂質は、ＬＮＰ中に存在する全脂質の約２０ｍｏｌ％～約７０もしくは７５ｍｏｌ％または約４５～約６５ｍｏｌ％または約２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、または約７０ｍｏｌ％の比で存在する。さらなる実施形態において、ＬＮＰは、モルベースで約２５ｍｏｌ％～約７５ｍｏｌ％、例えば、モルベースで（脂質ナノ粒子中の脂質の１００％総モルに基づいて）約２０～約７０％、約３５～約６５％、約４５～約６５％、約６０％、約５７．５％、約５７．１％、約５０％，または約４０％のカチオン性脂質を含む。一部の実施形態において、カチオン性脂質対核酸（例えば、コードＲＮＡまたはＤＮＡ）の比は、約３～約１５、例えば約５～約１３または約７～約１１である。
【０１７２】
他の好適な（カチオン性またはイオン化可能）脂質は、国際公開第２００９０８６５５８号、国際公開第２００９１２７０６０号、国際公開第２０１００４８５３６号、国際公開第２０１００５４４０６号、国際公開第２０１００８８５３７号、国際公開第２０１０１２９７０９号、国際公開第２０１１１５３４９３号、国際公開第２０１３０６３４６８号、米国特許出願公開第２０１１０２５６１７５号、米国特許出願公開第２０１２０１２８７６０号、米国特許出願公開第２０１２００２７８０３号、米国特許第８１５８６０１号、国際公開第２０１６１１８７２４号、国際公開第２０１６１１８７２５号、国際公開第２０１７０７０６１３号、国際公開第２０１７０７０６２０号、国際公開第２０１７０９９８２３号、国際公開第２０１２０４０１８４号、国際公開第２０１１１５３１２０号、国際公開第２０１１１４９７３３号、国際公開第２０１１０９０９６５号、国際公開第２０１１０４３９１３号、国際公開第２０１１０２２４６０号、国際公開第２０１２０６１２５９号、国際公開第２０１２０５４３６５号、国際公開第２０１２０４４６３８号、国際公開第２０１００８０７２４号、国際公開第２０１０２１８６５号、国際公開第２００８１０３２７６号、国際公開第２０１３０８６３７３号、国際公開第２０１３０８６３５４号、米国特許第７，８９３，３０２号、同第７，４０４，９６９号、同第８，２８３，３３３号、同第８，４６６，１２２号および同第８，５６９，２５６号ならびに米国特許出願公開第２０１０００３６１１５号、同第２０１２０２０２８７１号、同第２０１３００６４８９４号、同第２０１３０１２９７８５号、同第２０１３０１５０６２５号、同第２０１３０１７８５４１号、同第２０１３０２２５８３６号、同第２０１４００３９０３２号ならびに国際公開第２０１７１１２８６５号に開示されている。その文脈において、ＬＮＰに適した（カチオン性）脂質に具体的に関連する国際公開第２００９０８６５５

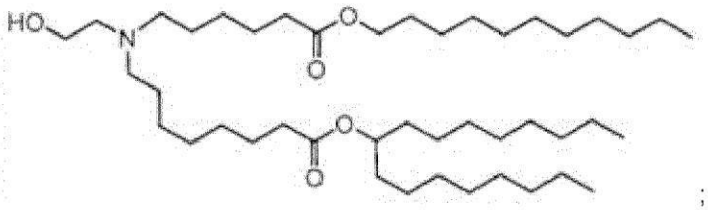
８号、国際公開第２００９１２７０６０号、国際公開第２０１００４８５３６号、国際公開第２０１００５４４０６号、国際公開第２０１００８８５３７号、国際公開第２０１０１２９７０９号、国際公開第２０１１１５３４９３号、国際公開第２０１３０６３４６８号、米国特許出願公開第２０１１０２５６１７５号、米国特許出願公開第２０１２０１２８７６０号、米国特許出願公開第２０１２００２７８０３号、米国特許第８１５８６０１号、国際公開第２０１６１１８７２４号、国際公開第２０１６１１８７２５号、国際公開第２０１７０７０６１３号、国際公開第２０１７０７０６２０号、国際公開第２０１７０９９８２３号、国際公開第２０１２０４０１８４号、国際公開第２０１１１５３１２０号、国際公開第２０１１１４９７３３号、国際公開第２０１１０９０９６５号、国際公開第２０１１０４３９１３号、国際公開第２０１１０２２４６０号、国際公開第２０１２０６１２５９号、国際公開第２０１２０５４３６５号、国際公開第２０１２０４４６３８号、国際公開第２０１００８０７２４号、国際公開第２０１０２１８６５号、国際公開第２００８１０３２７６号、国際公開第２０１３０８６３７３号、国際公開第２０１３０８６３５４号、米国特許第７，８９３，３０２号、同第７，４０４，９６９号、同第８，２８３，３３３号、同第８，４６６，１２２号および同第８，５６９，２５６号ならびに米国特許出願公開第２０１０００３６１１５号、同第２０１２０２０２８７１号、同第２０１３００６４８９４号、同第２０１３０１２９７８５号、同第２０１３０１５０６２５号、同第２０１３０１７８５４１号、同第２０１３０２２５８３６号および同第２０１４００３９０３２号ならびに国際公開第２０１７１１２８６５号の開示を本願明細書に援用する。

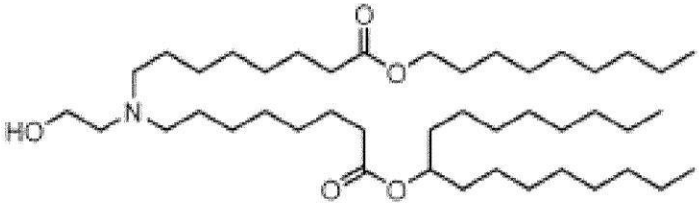
【０１７３】

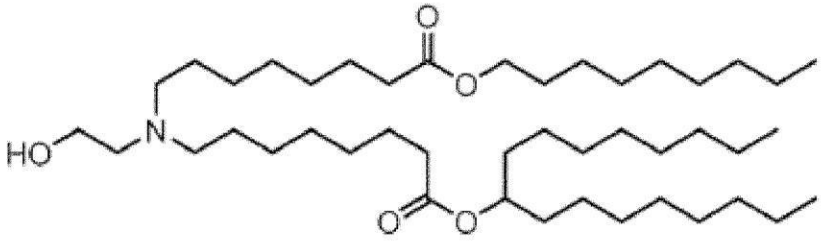
他の実施形態において、カチオン性またはイオン化可能脂質は、

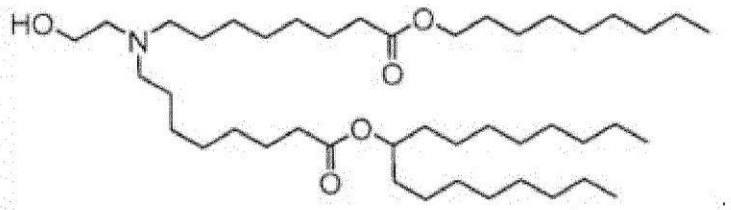
【０１７４】

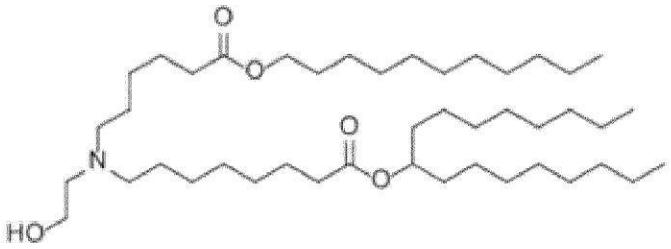
【化２１－１】


;


;

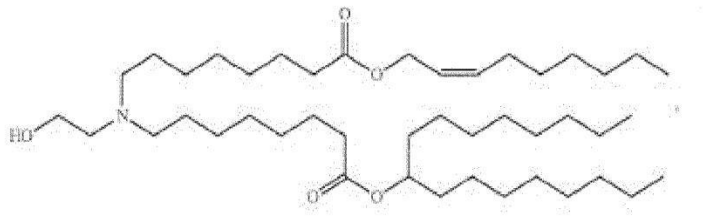

;

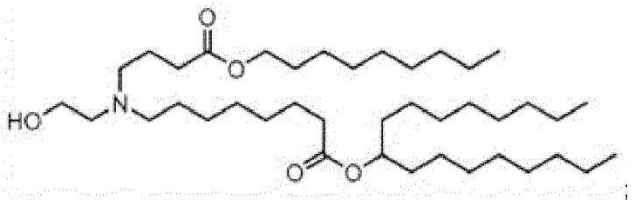

;

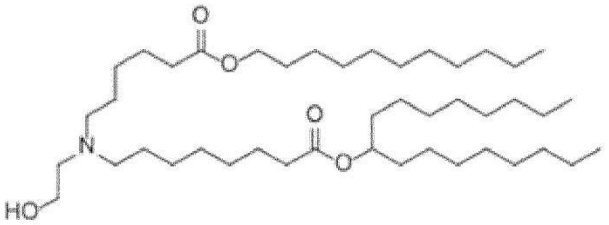

;

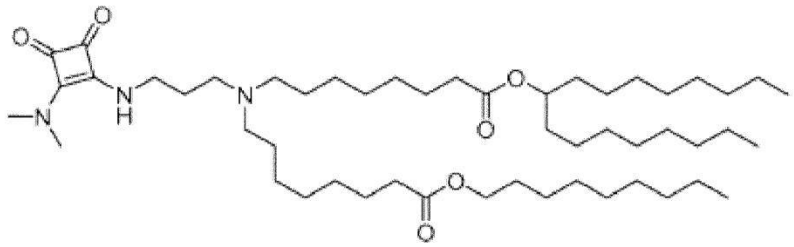
【０１７５】

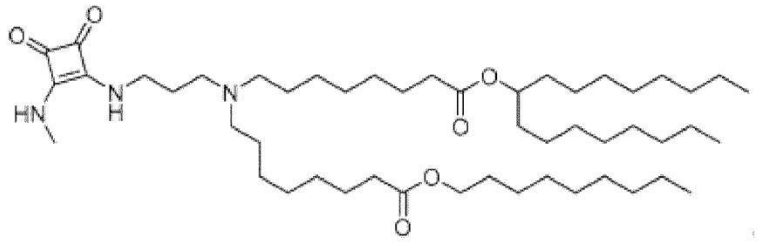
【化２１－２】


;


;


;


; または


.

【０１７６】

である。

実施形態において、本明細書で定義されるアミノまたはカチオン性脂質は、脂質が生理的ｐＨ（例えば、ｐＨ７．４）以下のｐＨで正に帯電し、第２のｐＨ、好ましくは生理的ｐＨ以上で中性であるように、少なくとも１つのプロトン化可能または脱プロトン化可能基を有する。当然、ｐＨの関数としてのプロトンの付加または除去は平衡過程であり、帯電または中性脂質への言及は優勢な種の性質を指し、脂質の全てが帯電または中性形態で存在しなければならないことを要するわけではないことが理解されよう。２つ以上のプロトン化可能もしくは脱プロトン化可能基を有するか、または双性イオン性である脂質は除

外されず、同様に本発明の文脈において好適であり得る。一部の実施形態において、プロトン化可能脂質は、約４～約１１の範囲のプロトン化可能基のｐＫａ、例えば、約５～約７のｐＫａを有する。

【０１７７】

ＬＮＰは、本明細書に定義される２つ以上の（異なる）カチオン性脂質を含むことができる。カチオン性脂質は、様々な有利な特性に寄与するように選択され得る。例えば、アミンｐＫａ、化学的安定性、循環中の半減期、組織中の半減期、組織中の正味の蓄積、または毒性などの特性が異なるカチオン性脂質をＬＮＰに使用することができる。特に、カチオン性脂質は、混合型ＬＮＰの特性が個々の脂質の単一ＬＮＰの特性よりも望ましくなるように選択することができる。

【０１７８】

核酸カーゴの量を考慮して、永続的カチオン性脂質、リピドイドまたは好ましくはイオン化可能カチオン性脂質の量が選択され得る。一実施形態において、これらの量は、約０．１～約２０の範囲のナノ粒子もしくは組成物のＮ／Ｐ比をもたらすように、または

（ｉ）約１～約２０、好ましくは約２～約１５、より好ましくは約３～約１０、一層より好ましくは約４～約９、最も好ましくは約６の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；

（ｉｉ）約５～約２０、より好ましくは約１０～約１８、一層より好ましくは約１２～約１６、最も好ましくは約１４の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；

（ｉｉｉ）２０～６０、好ましくは約３～約１５、５～約１３、約４～約８または約７～約１１の範囲の脂質：ｍＲＮＡ重量比を達成するような量；もしくは

（ｉｖ）本発明による脂質ナノ粒子、特にカチオン性脂質ＩＩＩ－３を含む脂質ナノ粒子について約６の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；もしくは

（ｖ）本発明による脂質ナノ粒子について、好ましくは約１７または約１７．５の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量

で選択される。

【０１７９】

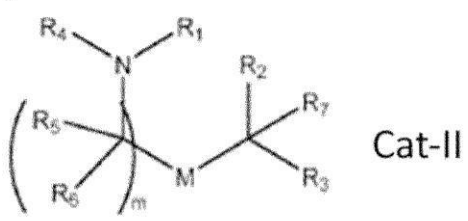
この文脈において、Ｎ／Ｐ比は、脂質またはリピドイドの塩基性窒素含有基の窒素原子（「Ｎ」）対カーゴとして使用される核酸のホスフェート基（「Ｐ」）のモル比として定義される。Ｎ／Ｐ比は、例えば、ＲＮＡが塩基の統計学的分布を示すという条件で、１μｇのＲＮＡが典型的には約３ｎｍｏｌのホスフェート残基を含有することに基づいて計算され得る。カチオン性脂質またはリピドイドの「Ｎ」値は、その分子量ならびに永続的カチオン性基、および存在する場合はカチオン化可能基の相対含量に基づいて計算され得る。２つ以上のカチオン性脂質が存在する場合、脂質ナノ粒子に含まれる全てのカチオン性脂質に基づいてＮ値を計算すべきである。

【０１８０】

他の態様において、本開示のイオン化可能脂質は、式（Ｃａｔ－ＩＩ）の化合物：

【０１８１】

【化２２】



Cat-II

【０１８２】

またはそれらのＮ－オキシド、もしくはその塩もしくは異性体

（式中、

R_1はＣ５～３０アルキル、Ｃ５～２０アルケニル、－Ｒ＊ＹＲ’’、－ＹＲ’’、および－Ｒ’’Ｍ’Ｒ’からなる群から選択され；

R_2およびR_3は独立に、H、$C_{1\sim14}$アルキル、$C_{2\sim14}$アルケニル、－R＊YR’’、－YR’’、および－OR’’からなる群から選択されるか、あるいはR_2およびR_3は、これらが結合している原子と一緒になって複素環または炭素環を形成し；

R_4は水素、$C_{3\sim6}$炭素環、－（CH_2）$_n$Q、－（CH_2）$_n$CHQR、－CHQR、－CQ（R）$_2$、および非置換$C_{1\sim6}$アルキルからなる群から選択され、Qは炭素環、複素環、－OR、－O（CH_2）$_n$N（R）$_2$、－C（O）OR、－OC（O）R、－CX_3、－CX_2H、－CXH_2、－CN、－N（R）$_2$、－C（O）N（R）$_2$、－N（R）C（O）R、－N（R）S（O）$_2$R、－N（R）C（O）N（R）$_2$、－N（R）C（S）N（R）$_2$、－N（R）R_8、－N（R）S（O）$_2$RS、－O（CH_2）$_n$OR、－N（R）C（＝NR_9）N（R）$_2$、－N（R）C（＝CHR_9）N（R）$_2$、－OC（O）N（R）$_2$、－N（R）C（O）OR、－N（OR）C（O）R、－N（OR）S（O）$_2$R、－N（OR）C（O）OR、－N（OR）C（O）N（R）$_2$、－N（OR）C（S）N（R）$_2$、－N（OR）C（＝NR_9）N（R）$_2$、－N（OR）C（＝CHR_9）N（R）$_2$、－C（＝NR_9）N（R）$_2$、－C（＝NR_9）R、－C（O）N（R）OR、および－C（R）N（R）$_2$C（O）ORから選択され、各nは独立に１、２、３、４、および５から選択され；

各R_5は独立に、$C_{1\sim3}$アルキル、$C_{2\sim3}$アルケニル、およびHからなる群から選択され；

各R_6は独立に、$C_{1\sim3}$アルキル、$C_{2\sim3}$アルケニル、およびHからなる群から選択され；

MおよびM’は独立に、－C（O）O－、－OC（O）－、－OC（O）－M’’－C（O）O－、－C（O）N（R’）－、－N（R’）C（O）－、－C（O）－、－C（S）－、－C（S）S－、－SC（S）－、－CH（OH）－、－P（O）（OR’）O－、－S（O）$_2$－、－S－S－、アリール基、およびヘテロアリール基から選択され、M’’は結合、$C_{1\sim13}$アルキル、または$C_{2\sim13}$アルケニルであり；

R_7は$C_{1\sim3}$アルキル、$C_{2\sim3}$アルケニル、およびHからなる群から選択され；

R_8は$C_{3\sim6}$炭素環および複素環からなる群から選択され；

R_9はH、CN、NO_2、$C_{1\sim6}$アルキル、－OR、－S（O）$_2$R、－S（O）$_2$N（R）$_2$、$C_{2\sim6}$アルケニル、$C_{3\sim6}$炭素環および複素環からなる群から選択され；

各Rは独立に$C_{1\sim3}$アルキル、$C_{2\sim3}$アルケニル、およびHからなる群から選択され；

各R’は独立に$C_{1\sim18}$アルキル、$C_{2\sim18}$アルケニル、－R＊YR’’、－YR’’、およびHからなる群から選択され；

各R’’は独立に$C_{3\sim15}$アルキルおよび$C_{3\sim15}$アルケニルからなる群から選択され；

各R＊は独立に$C_{1\sim12}$アルキルおよび$C_{2\sim12}$アルケニルからなる群から選択され；

各Yは独立に$C_{3\sim6}$炭素環であり；

各Xは独立にF、Cl、Br、およびIからなる群から選択され；mは５、６、７、８、９、１０、１１、１２、および１３から選択され；R_4が－（CH_2）$_n$Q、－（CH_2）$_n$CHQR、－CHQR、または－CQ（R）$_2$である場合、（ｉ）nが１、２、３、４もしくは５である場合、Qは－N（R）$_2$でないか、または（ｉｉ）nが１もしくは２である場合、Qは５員ヘテロシクロアルキルでも、６員ヘテロシクロアルキルでも、７員ヘテロシクロアルキルでもない）

の１つまたは複数であり得る。

【０１８３】

本明細書で使用される場合、「イオン化可能脂質（ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　ｌｉｐｉｄ）」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、１つまたは複数の帯電した部分を含む脂質を指し得る。一部の実施形態において、イオン化可能脂質は正に帯電していても、負に帯電していてもよい。イオン化可能脂質は正に帯電していてもよく、その場

合、「カチオン性脂質（ｃａｔｉｏｎｉｃ　ｌｉｐｉｄ）」と呼ばれ得る。ある特定の実施形態において、イオン化可能脂質分子はアミン基を含んでよく、イオン化可能アミノ脂質と呼ばれ得る。本明細書で使用される場合、「帯電した部分（ｃｈａｒｇｅｄ　ｍｏｉｅｔｙ）」は、形式電荷、例えば、一価（＋１または－１）、二価（＋２または－２）、三価（＋３または－３）等を有する化学部分である。帯電した部分は、アニオン性（すなわち、負に帯電している）であっても、カチオン性（すなわち、正に帯電している）であってもよい。正に帯電した部分の例としては、アミン基（第１級、第２級および／または第３級アミン）、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基、およびイミダゾリウム基が挙げられる。特定の実施形態において、帯電した部分はアミン基を含む。負に帯電した基またはその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、サルフェート基、ホスホネート基、ホスフェート基、ヒドロキシル基などが挙げられる。帯電した部分の電荷は、場合によって、環境条件で変化することがあり、例えば、ｐＨの変化が部分の電荷を変化させ得る、および／または部分を帯電もしくは非帯電にさせ得る。一般に、分子の電荷密度は所望のように選択され得る。「帯電した（ｃｈａｒｇｅｄ）」または「帯電した部分（ｃｈａｒｇｅｄ　ｍｏｉｅｔｙ）」という用語は、分子上の「部分的負電荷（ｐａｒｔｉａｌ　ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｈａｒｇｅ）」も「部分的正電荷（ｐａｒｔｉａｌ　ｐｏｓｉｔｉｖｅ　ｃｈａｒｇｅ）」も指さないことが理解されるべきである。「部分的負電荷（ｐａｒｔｉａｌ　ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｈａｒｇｅ）」および「部分的正電荷（ｐａｒｔｉａｌ　ｐｏｓｉｔｉｖｅ　ｃｈａｒｇｅ）」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を与えられる。電子密度が結合の１個の原子に向けて引っ張られて、その原子上に部分的負電荷を作り出すように分極する結合を官能基が含む場合、「部分的負電荷（ｐａｒｔｉａｌ　ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｈａｒｇｅ）」が生じ得る。当業者であれば、一般的に、このように分極することができる結合を認識するだろう。一部の実施形態において、イオン化可能脂質は、当技術分野において「イオン化可能カチオン性脂質（ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　ｃａｔｉｏｎｉｃ　ｌｉｐｉｄ）」と呼ばれることがある、イオン化可能アミノ脂質である。一実施形態において、イオン化可能アミノ脂質は、リンカー構造を介して接続されている正に帯電した親水性頭部および疎水性尾部を有し得る。

【０１８４】

賦形剤の以下の組合せが脂質ナノ粒子を製剤化するために使用される場合に、本発明の脂質ナノ粒子についてのさらに特に好ましい実施形態が与えられる、すなわち、５９ｍｏｌ％のカチオン性脂質としての表１に開示されるＣ２またはＣ１５またはＣ２４脂質（すなわち、それぞれ表１のカチオン性脂質化合物Ｃ２であるＨＥＸＡ－Ｃ５ＤＥ－ＰｉｐＳＳ、表１のカチオン性脂質化合物Ｃ１５であるＨＥＸＡ－Ｃ５ＤＥ－ＰｉｐＣ３ＳＳ、または表１のカチオン性脂質化合物Ｃ２４であるＶｉｔＥ－Ｃ４ＤＥ－ピペリジン－チオエーテル）、２９．３ｍｏｌ％のステロイドとしてのコレステロール、さらなる中性脂質／リン脂質としてのＤＰｈｙＰＥと組み合わせたホスファチジルセリンについての合計１０ｍｏｌ％、および１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質としてのＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である。

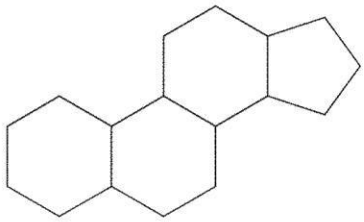
【０１８５】

ステロイド

「ステロイド」は、特定の分子配置で配列された４個の環を有する有機化合物である。ステロイドは以下の炭素骨格を含む：

【０１８６】

【化２３】



【０１８７】

ステロイドおよび中性ステロイドは、共に天然に存在するステロイドおよびその類似体を含む（例えば、コレステロール誘導体としてコレステロールのベータ－ヒドロキシル基にエステル化されたコハク酸からなる両親媒性脂質コレステリルヘミスクシネート（ＣＨＥＭＳ）である）。本明細書で提供される「中性」についての定義を使用すると、中性ステロイドは、生理的条件下でイオン化可能な原子も基も有さないステロイドであり得るか、または双性イオン性ステロイドであり得る。好ましい実施形態の１つでは、中性ステロイドは、生理的条件下でイオン化可能な原子も基も含まない。一部の好ましい実施形態において、ステロイドまたはステロイド類似体はコレステロールである。「ステロイド」および「中性ステロイド」という用語は本明細書において互換的に使用される。他の実施形態において、ステロールは、フィトステロール、例えば、β－シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、フコステロール、スチグマスタノール、ジヒドロコレステロール、ｅｎｔ－コレステロール、エピコレステロール、デスモステロール、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、コレステリル－２’－ヒドロキシエチルエーテル、コレステリル－４’－ヒドロキシブチルエーテル、３β－［Ｎ－（Ｎ’Ｎ’－ジメチルアミノエチル）カルバモイルコレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、２４（Ｓ）－ヒドロキシコレステロール、２５－ヒドロキシコレステロール、２５（Ｒ）－２７－ヒドロキシコレステロール、２２－オキサコレステロール、２３－オキサコレステロール、２４－オキサコレステロール、シクロアルテノール、２２－ケトステロール、２０－ヒドロキシステロール、７－ヒドロキシコレステロール、１９－ヒドロキシコレステロール、２２－ヒドロキシコレステロール、２５－ヒドロキシコレステロール、７－デヒドロコレステロール、５ａ－コレスタ－７－エン－３β－オール、３，６，９－トリオキサオクタン－１－オール－コレステリル－３ｅ－オール、デヒドロエルゴステロール、デヒドロエピアンドロステロン、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、ラノステノール、ルミステロール、シトカルシフェロール、カルシポトリオール、コプロスタノール、コレカルシフェロール、ルペオール、エルゴカルシフェロール、２２－ジヒドロエルゴカルシフェロール（２２－ｄｉｈｙｄｒｏｅｇｏｃａｌｃｉｆｅｒｏｌ）、エルゴステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、コール酸、ケノデオキシコール酸、ジモステロール、ジオスゲニン、フコステロール、フェコステロールもしくはフェコステロール、またはこれらの塩もしくはエステル、コレステロール、コレステロールコハク酸、コレステロールサルフェート、コレステロールヘミスクシネート、コレステロールフタレート、コレステロールホスフェート、コレステロールバレレート、コレステロールアセテート、コレステリルオレエート、コレステリルリノレート、コレステリルミリステート、コレステリルパルミテート、コレステリルアラキデート、コレステリルホスホリルコリン、およびコール酸ナトリウムからなる群から選択され得る。

【０１８８】

さらなる実施形態において、ステロイドは、全体を本願明細書に援用する、国際公開第２０１９２２６９２５号の段落［０３２０］および［０３３９］～［０３４０］に開示されるイミダゾールコレステロールエステルまたは「ＩＣＥ」である。

【０１８９】

さらなるリン脂質

「中性脂質」または「ヘルパー脂質」とも呼ばれ得るさらなるリン脂質は、典型的には

２つの疎水性脂肪酸「尾部」およびリン酸基を含む親水性「頭部（ｈｅａｄ）」を有する分子からなる両親媒性化合物である。リン酸基は、コリン、エタノールアミンまたはセリンなどの単純な有機分子で修飾され得る。リン脂質は自然界に豊富に存在する。例えば、リン脂質は生体膜の添加物のかなりの割合となる。本明細書で使用される場合、「リン脂質」または「中性リン脂質」という表現は、天然リン脂質と合成リン脂質の両方を網羅する。

【０１９０】

本明細書で互換的に使用される「中性脂質（ｎｅｕｔｒａｌ　ｌｉｐｉｄ）」、「中性リン脂質（ｎｅｕｔｒａｌ　ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐｉｄ）」または「双性イオン性化合物（ｚｗｉｔｔｅｒｉｏｎｉｃ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」という用語は、生理的ｐＨで非帯電または中性双性イオン性形態のいずれかで存在するいくつかの脂質種のいずれか１つを指す。代表的な中性脂質としては、以下で本明細書にさらに記載されるジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが挙げられる。

【０１９１】

好ましい実施形態の１つによると、組成物は、ホスファチジルコリンまたはホスファチジルエタノールアミンなどの、双性イオン性の中性脂質を含む。適切なホスファチジルコリンの例としては、通常、卵黄もしくは大豆から誘導される、時々「レシチン」もしくは「ホスファチジルコリン」と呼ばれる、天然もしくは精製混合物；またはミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイルなどから選択される２つの脂肪アシル部分を有するホスファチジルコリンなどの高度精製もしくは半合成化合物が挙げられる。

【０１９２】

別の好ましい実施形態において、中性脂質または中性リン脂質は、限定されるものではないが、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ；１，２－ジ－（３，７，１１，１５－テトラメチルヘキサデカノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンとも呼ばれる）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ；ジオレオイルホスファチジルコリンとも呼ばれる）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ、ジパルミトイルホスファチジルコリンとも呼ばれる）、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）、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬｏＰＥ）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルホスホエタノールアミン、１６－Ｏ－ジメチルホスファチジルエタノールアミン、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１８－１－トランスホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、１，２－ジスクアレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＱＰＥ）、１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（トランスＤＯＰＥ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＳＬＰＥ）、１－トリデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩

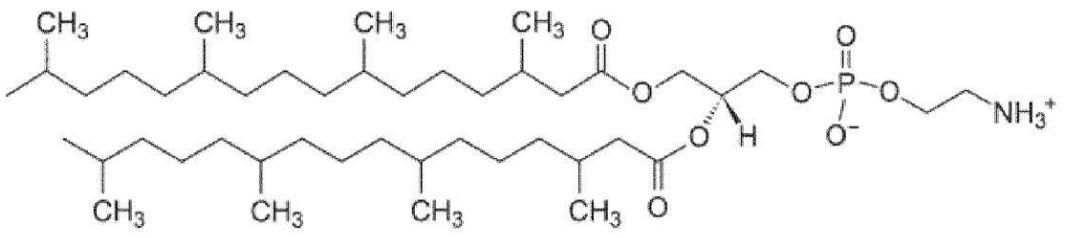
）、１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＰＯＰＳ）、１－１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－Ｏ－ヘキサデカニル－２－Ｏ－（９Ｚ－オクタデセニル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリンまたは１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－フィタニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１－パルミトイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＣｈｅｍｓＰＣ）、１，２－ジコレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＣｈｅｍｓＰＣ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチル水素ホスフェート（ＤＯＣＰ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチルエチルホスフェート（ＤＯＣＰｅ）、および１－Ｏ－オクタデシル－２－Ｏ－メチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（エデルホシン）からなる群から選択される双性イオン性化合物である。

【０１９３】

好ましい実施形態において、本発明による中性脂質は、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）または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）である。より好ましい実施形態において、本発明による中性脂質は１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）である。さらにより好ましい、特に好ましい実施形態において、本発明による中性脂質は１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）である。ＤＰｈｙＰＥの使用に関連する本発明の利点は、嵩高い尾部による膜融合性の高い能力であり、これにより、エンドソーム脂質と高いレベルで融合することが可能である。換言すれば、ＤＰｈｙＰＥの使用に関連する本発明の別の利点は、嵩高い尾部による膜融合性の高い能力であり、これにより、エンドソーム脂質と高いレベルで融合することが可能である。したがって、別の実施形態において、本発明は、脂質ベースの担体または核酸－脂質粒子、好ましくはここに示されるＤＰｈｙＰＥ：

【０１９４】

【化２４】



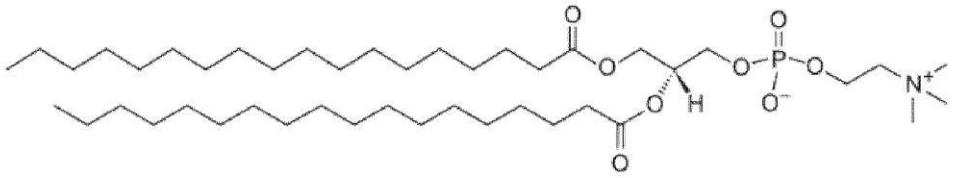
(DPhyPE).

【０１９５】

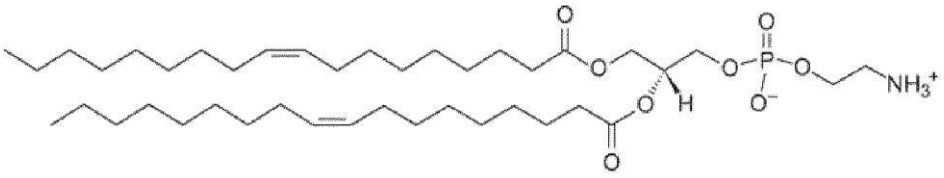
における高い膜融合性を有する脂質の使用に関する。

「膜融合性の（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）」または「膜融合性（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃｉｔｙ）」という用語は、脂質ベースの担体または核酸－脂質粒子と細胞膜の融合を助けて、脂質ベースの担体または核酸－脂質粒子に含有される核酸が細胞に進入するのと助ける脂質を指すことを意図している。

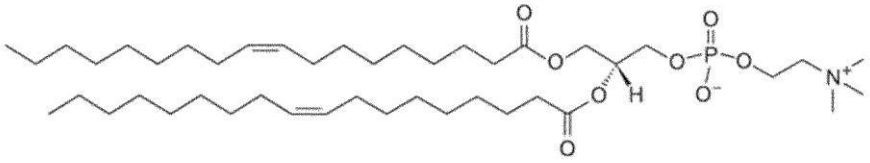
【０１９６】
ＬＮＰ中のリン脂質として当技術分野において日常的に使用される、ＤＳＰＣ、ＤＯＰＣまたはＤＯＰＥはそれぞれ、以下で本明細書に示される構造：
【０１９７】
【化２５】



(DSPC)

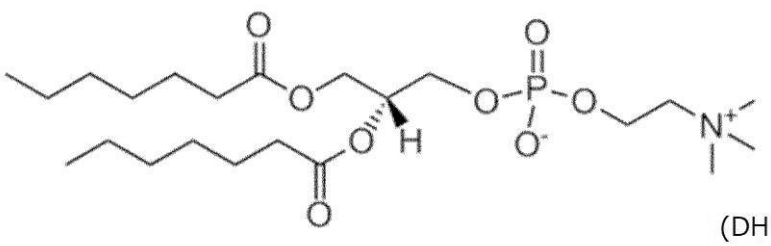


(DOPE)



(DOPC).

【０１９８】
から明らかなように２つのＣ１８鎖側方アームを有する。
驚くべきことに、本発明のさらなる態様において、本発明者らは、例えば先行技術のＤＳＰＣまたはＤＯＰＥよりも短いアルキル鎖を有するリン脂質の付加が、式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質を含む本発明の脂質ナノ粒子の有効性に高度に有益であることを見出した。具体的には、インビボでｍＲＮＡワクチンを送達して、有意に増強された免疫応答をもたらすための、例えば、好ましくは本明細書に開示される本発明のポリマーコンジュゲート脂質と組み合わせた、本明細書に開示される先行技術のＤＳＰＣよりも短いアルキル鎖を有する（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ；１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）の有利な使用は、本発明者らによって行われたさらに非常に驚くべき発見であり、本発明の具体的な態様および実施形態に似ている。
【０１９９】
（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ；１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）の構造は、以下で本明細書に示される：
【０２００】
【化２６】



(DHPCまたは「(0:7)PC」)

【０２０１】
本発明者らはさらに驚くべきことに、少なくとも１つのさらなる中性脂質、特に第３の

中性脂質を上記中性脂質に添加することによっても免疫応答を増強することができることを見出した（対応する実施例参照）。上記のように、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイルなどから選択される２つの脂肪アシル部分を有する（これは特に、脂肪アシル部分が１４個の炭素原子を有する部分から始まるかなり長い部分であることを意味する）ことが本発明のさらなる（第２の）中性脂質にとって好ましい。本発明者らは、特に、追加の中性脂質がペンタノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル（ｎｏｎａｏｙｌ）およびデカノイルから選択される２つの脂肪酸部分、すなわち、最大で１０個の炭素原子を有する部分を有する場合、より短い脂肪アシル部分を有する中性脂質の添加が有益な効果を提供することを見出した。特に好ましい追加の中性脂質は、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリンであるが、関連する中性脂質、例えば０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および１０：０ＰＣ（１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）などは、同様に使用され得る。

【０２０２】

したがって、本発明の一態様において、本発明の脂質ナノ粒子は、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}またはC_{14}の長さを有する、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、またはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有する少なくとも１つのアルキル鎖を有する中性脂質またはリン脂質を含む。本発明の別の実施形態において、本発明の脂質ナノ粒子は、各アルキル鎖が独立に、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}またはC_{14}の長さを有する、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、またはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有する、少なくとも２つのアルキル鎖を有する中性脂質またはリン脂質を含む。好ましい実施形態において、本発明の脂質ナノ粒子はさらにＤＨＰＣを含む。さらなる実施形態において、１つまたは複数のアルキル鎖は炭素二重結合を含み得る。

【０２０３】

他の実施形態において、脂質ナノ粒子は、０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０４：０ＰＣ（１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）からなる群から選択される追加のリン脂質を含む。

【０２０４】

ポリマーコンジュゲート脂質

一部の実施形態において、ＬＮＰは、脂質コンジュゲート、好ましくはポリマーコンジュゲート脂質を含む。「ポリマーコンジュゲート脂質（ｐｏｌｙｍｅｒ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｌｉｐｉｄ）」という用語は、脂質部分とポリマー部分との両方を含む分子を指す。

【０２０５】

ＰＥＧ－脂質

ポリマーコンジュゲート脂質は、ペグ化脂質またはＰＥＧ－脂質であり得る。「ペグ化脂質」または「ＰＥＧ－脂質」という用語は、脂質部分とポリエチレングリコール部分との両方を含む分子を指す。ペグ化脂質は、当分野で公知であり、ＰＥＧ－ＤＭＧなどが挙げられる。

【０２０６】

特定の実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、式（Ｉ）による化合物として定義される：

Ｐ－Ａ－Ｌ　式（Ｉ）
（式中、Ｐは親水性ポリマー部分であり、Ａは任意選択のリンカーまたはスペーサーであり、Ｌは脂質部分である）。
【０２０７】
親水性ポリマー部分Ｐ
式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質中の親水性ポリマー部分Ｐは、ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）部分であり得る。特定の実施形態では、ＰＥＧ部分は、１ｋＤａ～３ｋＤａ、例えば、１．５～２．５ｋＤａ、１．７～２．３ｋＤａ、１．８～２．２ｋＤａ、１．９～２．１ｋＤａ、または２ｋＤａの平均分子量を有する。したがって、ＰＥＧは、「ＰＥＧ２０００」または「ＰＥＧ２ｋ」として一般に知られるＰＥＧであり得るが、より短い「ＰＥＧ１０００」およびより長い「ＰＥＧ３０００」もまた使用され得る。ＰＥＧ部分は、通常、直鎖ポリマー鎖を含むが、一部の実施形態では、ＰＥＧ部分は、分岐ポリマー鎖を含み得る。あるいは、企図されるＰＥＧ修飾脂質としては、脂質に共有結合された長さが最大２ｋＤａ、最大３ｋＤａ、最大４ｋＤａ、または最大５ｋＤａのポリエチレングリコール鎖が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２０８】
別の実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質の親水性ポリマー部分Ｐは、上記の親水性ポリマー部分とは異なる実質的に親水性ポリマーであり得る、すなわち、ポリマーコンジュゲート脂質中の親水性ポリマー部分Ｐは、ポリ（プロピレンオキシド）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ－Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタアクリルアミド、ヘシル化プロセス（ｈｅｓｙｌａｔｉｏｎ－ｐｒｏｃｅｓｓ）（ＰＭＩＤ２４６８１３９６による）、ＰＡＳ化アプローチ（すなわち、プロリン－アラニン－セリン）、当該分野で公知のＸＴＥＮアプローチ（すなわち、ペプチドベースのＰＥＧ）、ポリサルコシン（ｐｏｌｙｓａｒｃｏｓｉｎ）またはポリ（ビニルアセテート）に基づき得る。
【０２０９】
任意選択のリンカーまたはスペーサーＡ
式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質中の任意選択のリンカーまたはスペーサーＡは、任意の有用なスペーサー構造（例えば、ペグ化脂質において有用であることが一般に見出されているスペーサーから選択されるスペーサー（例えば、スクシンイミド、アミン、エーテル、エステル、無水物、アルデヒド、ケトン、アミド、カルバメートリンカー、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない））であり得る。
【０２１０】
脂質部分Ｌ
式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質中の脂質部分Ｌは、リン脂質、スフィンゴ脂質、またはセラミドから誘導され得る。本明細書で使用される場合、「リン脂質またはセラミドから誘導される」という表現は、リン脂質およびセラミドの基を含む。例は、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルグリセロール部分を含むポリマーコンジュゲート脂質である。
【０２１１】
特定の実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、ペグ化脂質である。より具体的な実施形態において、本発明の組成物に含まれるポリマーコンジュゲート脂質は、ペグ化ジアシルグリセロール脂質（ＰＥＧ－ＤＡＧ）；ペグ化セラミド脂質（ＰＥＧ－Ｃｅｒ）；ペグ化ホスファチジルエタノールアミン脂質（ＰＥＧ－ＰＥ）；ペグ化スクシネートジアシルグリセロール脂質（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ）；ペグ化ジアルコキシプロピルカルバメート脂質；１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール（「ＰＥＧ－ＤＭＧ」または「ＤＭＧ－ＰＥＧ」）；１，２－ジカプリル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレングリコール（C_{10}ジアシルグリセロールＰＥＧ）；Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－｛サクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝（ＰＥＧ－セラミド８、C_8－セラミド－ＰＥＧ、ＰＥ

Ｇ－Ｃｅｒ８、Ｃ８ＰＥＧ２０００セラミド、またはセラミド８ＰＥＧとも呼ばれるＮ－オクタノイル－Ｄ－エリスロ－スフィンゴシン（ｄ１８：１／８：０）を含む）；４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－Ｏ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）；２－ｍＰＥＧ２０００－ｎ，ｎジテトラデシルアセトアミド；Ｎ－［（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバミル］－１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン（ペグ－ｃ－ＤＭＡ）；ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル－Ｎ－（２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル）カーバメート；国際公開第２０１８１２６０８４号、国際公開第２０２００９３０６１号、または国際公開第２０２０２１９９４１号（３つの参考文献はすべて参照により本明細書に援用される）に開示されているＰＥＧ－脂質、本明細書に開示されているペグ化コレステロールまたはペグ化コレステロール誘導体、および２，３－ジ（テトラデカノキシ）プロピル－Ｎ－（ω－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）カーバメートからなる群より選択されるポリマーコンジュゲート脂質である。

【０２１２】

さらに好ましい実施形態において、脂質部分Ｌは、１、２、３、４またはそれ以上の疎水性脂肪酸（偶数の炭素原子を含む脂肪族鎖に対応する「尾部」）を含む。より好ましい実施形態では、脂質部分Ｌは、同じまたは異なる数の炭素原子を有する２つの疎水性脂肪酸（「尾部」）を含む。

【０２１３】

好ましくは、脂質部分Ｌは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、もしくは２６個の炭素原子またはそれらの組合せを含む脂肪酸（「尾部」）を含む。より好ましくは、脂質部分Ｌは、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、もしくは１８個の炭素原子またはそれらの組合せを含む脂肪酸（「尾部」）を含む。より具体的な実施形態では、脂質部分Ｌは、カプリル酸またはオクタン酸（８：０）；カプリン酸（１０：０）；ラウリン酸（１２：０）；ミリスチン酸（１４：０）；パルミチン酸（１６：０）；ステアリン酸（１８：０）；アラキジン酸（２０：０）；ベヘン酸（２２：０）；リグノセリン酸（２４：０）；およびセロチン酸（２６：０）からなる群から選択される脂肪酸（「尾部」）を含む。

【０２１４】

さらにより好ましい実施形態では、脂質部分Ｌは、８、１０、または１２個の炭素原子、好ましくは８または１０個の炭素原子を含む少なくとも１つの脂肪酸（「尾部」）を含む。

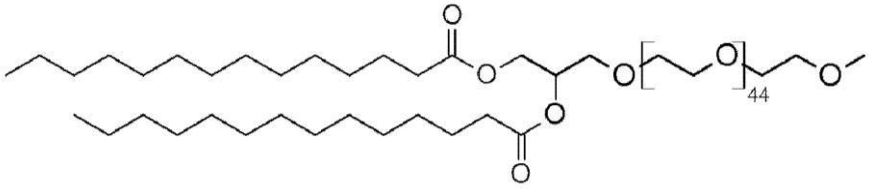
【０２１５】

さらに好ましい実施形態では、組成物は、ポリマーコンジュゲート脂質を含む。

－１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）

【０２１６】

【化２７】

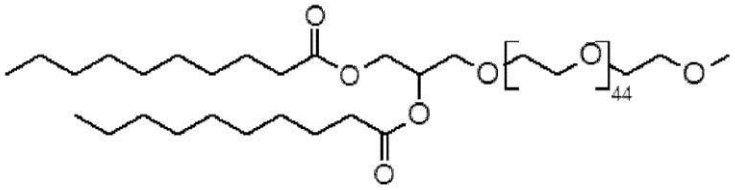


【０２１７】

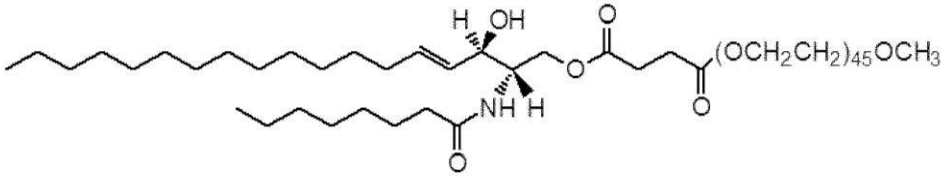
好ましくは、当技術分野で使用される場合、「ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００」は、約９７：３の比の１，２－ＤＭＧ　ＰＥＧ２０００と１，３－ＤＭＧ　ＰＥＧ２０００との混合物と考えられる。

【０２１８】

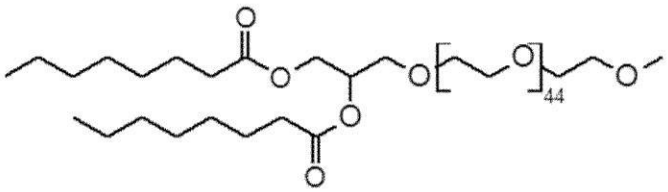
さらなる特定の実施形態において、上記組成物は、
－１，２－ジカプリル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレングリコール２０００（C_{10}－ＰＥＧ２０００
【０２１９】
【化２８】



【０２２０】
および
－Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝（Ｃｅｒ８－ＰＥＧ２０００）
【０２２１】
【化２９】

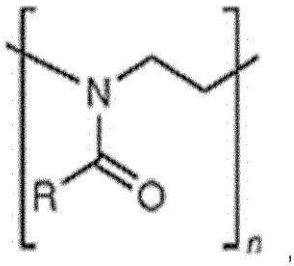


【０２２２】
からなる群より選択されるポリマーコンジュゲート脂質を含む。
さらなる実施形態において、上記組成物は、以下の化学構造
【０２２３】
【化３０】

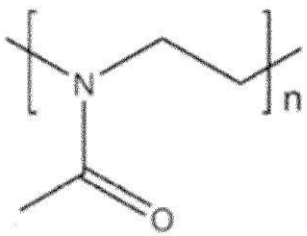


【０２２４】
を有する「C_8－ＰＥＧ２０００」に類似する以下の構造からなる群より選択されるポリマーコンジュゲート脂質を含む。
本発明の特定の実施形態において、「C_{10}－ＰＥＧ２０００」を含む本明細書内に開示される各組成物は、「C_{10}－ＰＥＧ２０００」の代わりに「C_8－ＰＥＧ２０００」を用いて製剤化することもできる。
【０２２５】
したがって、一例として、ポリマーコンジュゲート脂質、またはそれぞれ脂質部分Ｌは、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、またはそれらの組合せを含む２つの脂肪酸尾部（「尾部」）を有してもよく、例えば、１つの飽和脂肪酸鎖（８：０；カプリル酸またはそれぞれオクタン酸）および８個を超える炭素原子を有する異なる長さの１つの不飽和脂肪酸鎖を含むＣｅｒ８－ＰＥＧ２０００などである。
【０２２６】
ＰＯＺ－脂質
ポリマーコンジュゲート脂質は、式（ＩＩ）による化合物として定義されるＰＯＺ－脂

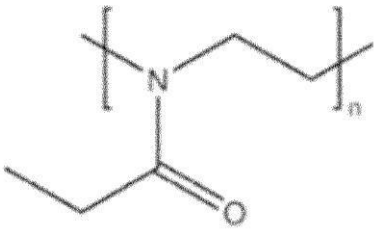
質であってもよい：
［Ｈ］－［リンカー］－［Ｍ］　　式（ＩＩ）
（式中、
［Ｈ］は、少なくとも１つのポリオキサゾリン（ＰＯＺ）モノマー単位
【０２２７】
【化３１】



【０２２８】
（ＲはＣ$_{1}$～$_{9}$アルキルまたはＣ$_{2}$～$_{9}$アルケニルであり、ｎが２～２００、好ましくは２０～１００、より好ましくは２４～２６もしくは４５～５０の範囲の平均値を有する）
を含むホモポリマー部分であり、
［リンカー］は任意選択のリンカー基であり、
［Ｍ］は脂質部分である）。
【０２２９】
実施形態において、［Ｈ］は、
ポリ（２－メチル－２－オキサゾリン）（ＰＭＯＺ）
【０２３０】
【化３２】

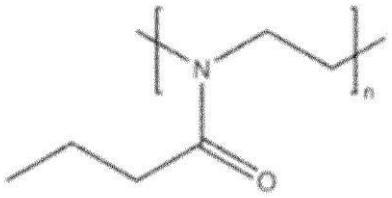


【０２３１】
ポリ（２－エチル－２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）
【０２３２】
【化３３】

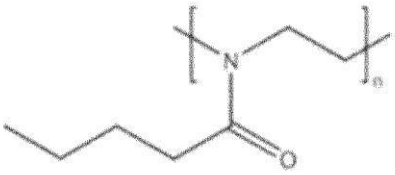


【０２３３】
ポリ（２－プロピル－２－オキサゾリン）（ＰＰＯＺ）
【０２３４】

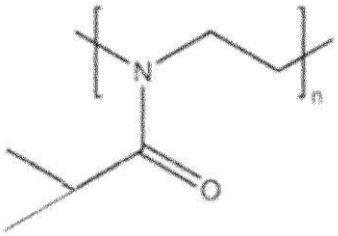
【化３４】



【０２３５】
ポリ（２－ブチル－２－オキサゾリン）（ＰＢＯＺ）
【０２３６】
【化３５】

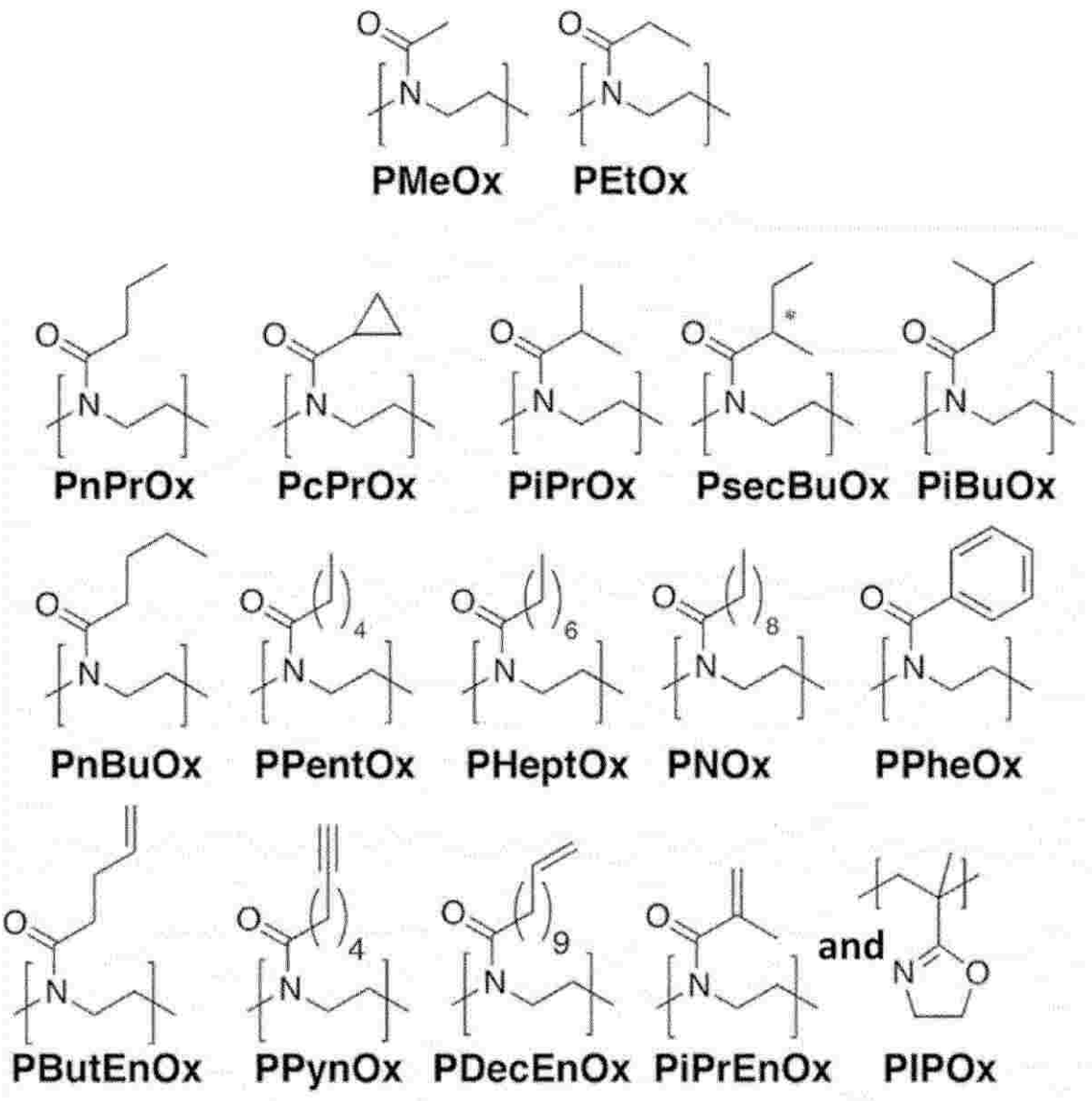


【０２３７】
ポリ（２－イソプロピル－２－オキサゾリン）（ＰＩＰＯＺ）
【０２３８】
【化３６】



【０２３９】
ポリ（２－メトキシメチル－２－オキサゾリン）（ＰＭｅＯＭｅＯｘ）、および
ポリ（２－ジメチルアミノ－２－オキサゾリン）（ＰＤＭＡＯｘ）
からなる群から選択される複数のモノマー単位を含むヘテロポリマー部分またはホモポリマー部分であり、
好ましくは、［Ｈ］が複数のＰＭＯＺモノマー単位またはＰＥＯＺモノマー単位を含むホモポリマー部分であり、より好ましくは、［Ｈ］が複数のＰＭＯＺモノマー単位を含むか、または好ましくは複数のＰＭＯＺモノマー単位からなり、
（ｉ）ｎが２～２００、好ましくは２０～１００、より好ましくは２４～２６もしくは４５～５０の範囲の平均値を有するか、または
（ｉｉ）ｎが、［Ｈ］部分が１．５～２２ｋＤａ、より好ましくは２～１９ｋＤａ、一層より好ましくは約７．５ｋＤａもしくは約１５ｋＤａ、好ましくは１～１５ｋＤａ、より好ましくは２～１２．５ｋＤａ、より好ましくは約５ｋＤａもしくは約１０ｋＤａの平均分子量を有するように選択される。
【０２４０】
別の実施形態において、［Ｈ］は、
【０２４１】

【化３７】



【０２４２】

からなる群から選択される複数のモノマー単位を含むヘテロポリマー部分またはホモポリマー部分である。

さらに別の実施形態において、式（ＩＩ）によるポリマーコンジュゲート脂質の［Ｈ］は、ポリ（２－メトキシメチル－２－オキサゾリン）（ＰＭｅＯＭｅＯｘ）およびポリ（２－ジメチルアミノ－２－オキサゾリン）（ＰＤＭＡＯｘ）からなる群から選択される。

【０２４３】

なおさらなる実施形態において、式（ＩＩ）によるポリマーコンジュゲート脂質は、ＰＯＺ－モノアシルグリセロールコンジュゲート、ＰＯＺ－ジアシルグリセロールコンジュゲート、ＰＯＺ－ジアルキルオキシプロピルコンジュゲート、ＰＯＺ－ステロイドまたはＰＯＺ－ステロールコンジュゲート、ＰＯＺ－リン脂質コンジュゲート、ＰＯＺ－セラミドコンジュゲート、図４に示されるようなＰＭＯＺ－脂質、およびこれらの混合物からなる群から選択される。

【０２４４】

一実施形態において、式（ＩＩ）に示される脂質部分［Ｍ］は、６～３０個の炭素原子を含有する少なくとも１つの直鎖または分岐の、飽和または不飽和アルキル鎖を含み、好ましくは、脂質部分［Ｍ］は少なくとも１つの直鎖または分岐飽和アルキル鎖を含み、ア

ルキル鎖は、場合により１つもしくは複数の生分解性基によって中断されている、および／または場合により１つの末端生分解性基を含み、生分解性基は、限定されるものではないが、ｐＨ感受性部分、双性イオン性リンカー、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－）、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、エーテル（－Ｏ－）、チオエーテル（－Ｓ－）、オキシム（例えば、－Ｃ（Ｈ）＝Ｎ－Ｏ－または－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｈ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－、－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－Ｏ－、－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）（ＮＲ^{5}）－、（ＮＲ^{5}）Ｃ（Ｓ）－、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｓ）－、－ＯＳｉ（Ｒ^{5}）$_{2}$Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、または－ＯＣ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）－、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、ホスフェートエステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、環状化合物、複素環式化合物、ピペリジン、ピラジン、ピリジン、ピペラジン、およびスルホネートエステル、ならびにこれらの組合せからなる群から選択され、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}は独立にＨまたはアルキル（例えば、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキル）である。

【０２４５】

別の実施形態において、脂質部分［Ｍ］は、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０個の炭素原子、好ましくは１０～２０個の炭素原子の範囲、より好ましくは１２～１８個の炭素原子の範囲、一層より好ましくは１４、１６または１８個の炭素原子、一層より好ましくは１６または１８個の炭素原子、最も好ましくは１４個の炭素原子を含む少なくとも１つの直鎖または分岐の、飽和または不飽和アルキル鎖を含み、全ての選択は、互いに独立である。

【０２４６】

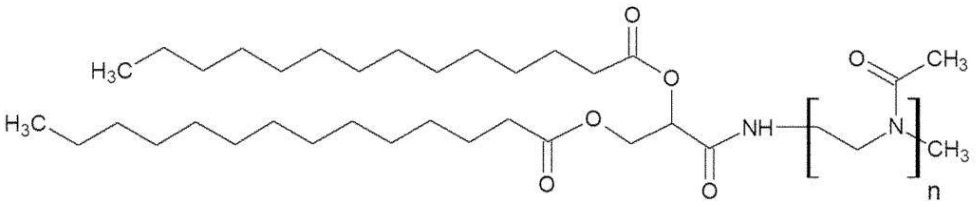
一実施形態において、式（ＩＩ）に示されるリンカー基［リンカー］は、限定されるものではないが、ｐＨ感受性部分、双性イオン性リンカー、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－）、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、エーテル（－Ｏ－）、チオエーテル（－Ｓ－）、オキシム（例えば、－Ｃ（Ｈ）＝Ｎ－Ｏ－または－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｈ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－、－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－Ｏ－、－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）（ＮＲ^{5}）－、（ＮＲ^{5}）Ｃ（Ｓ）－、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｓ）－、－ＯＳｉ（Ｒ^{5}）$_{2}$Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、または－ＯＣ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）－、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、スクシノイル、ホスフェートエステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホネートエステル、ならびにこれらの組合せからなる群から選択され、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}は独立にＨまたはアルキル（例えば、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキル）である。

【０２４７】

非常に好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、

【０２４８】

【化３８】



["PMOZ 1"].

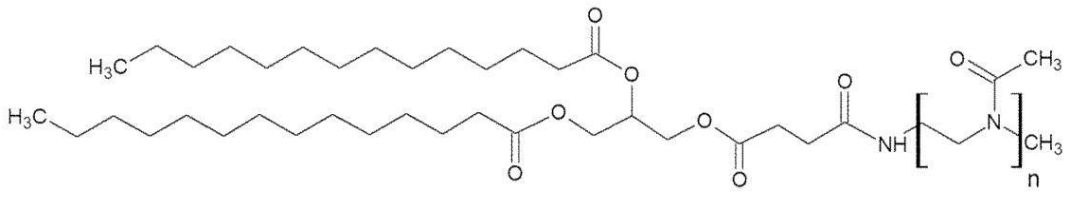
【０２４９】

の構造を有する。

別の非常に好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、

【０２５０】

【化３９】



["PMOZ 2"].

【０２５１】

の構造を有する。

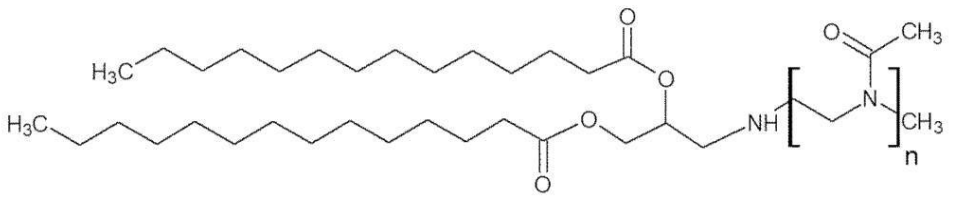
別の好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、ｎ＝５０、すなわち、５０個のモノマー繰り返しを有する「ＰＭＯＺ２」の構造を有する。

【０２５２】

一層さらに好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、

【０２５３】

【化４０】



["PMOZ 3"].

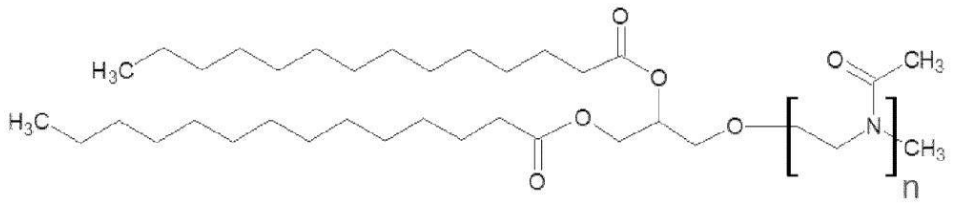
【０２５４】

の構造を有する。

別の好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、

【０２５５】

【化４１】



["PMOZ 5"].

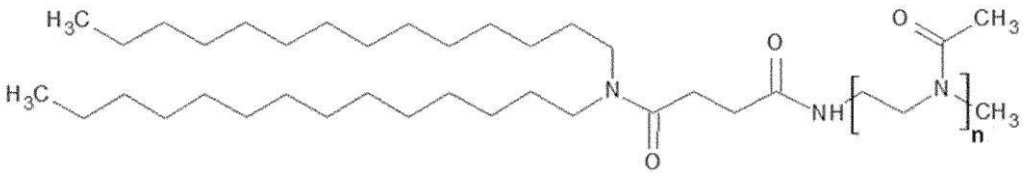
【０２５６】

の構造を有する。

一層さらに非常に好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、

【０２５７】

【化４２】



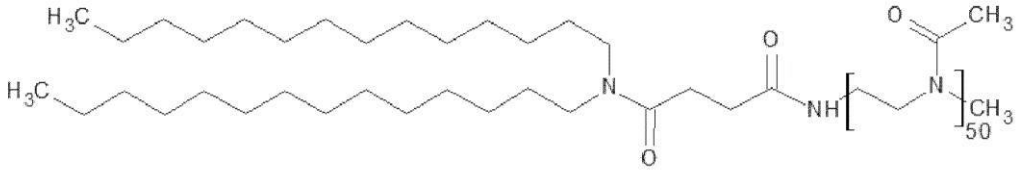
["PMOZ 4"],

【０２５８】

好ましくはｎ＝５０である、すなわち、５０個のモノマー繰り返しを有する、すなわち、

【０２５９】

【化４３】



[n=50、すなわち50個のモノマー繰り返しを有する「PMOZ4」]

【０２６０】

の構造を有する。

「ＰＭＯＺ１」～「ＰＭＯＺ５」について、好ましくは、ｎは２～２００、好ましくは２０～１００、より好ましくは２４～２６、一層より好ましくは約１００、またはさらに一層より好ましくは４５～５０、最も好ましくは５０の範囲の平均値を有するか、またはｎは、［Ｐ］部分が約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される。

【０２６１】

別の非常に好ましい実施形態において、リンカー基［リンカー］は、好ましくはアミドリンカー部分を含む。

さらに非常に好ましい実施形態において、リンカー基［リンカー］は、好ましくはエステルリンカー部分を含む。

【０２６２】

さらに非常に好ましい実施形態において、リンカー基［リンカー］は、好ましくはスクシネートリンカー部分を含む。

別の非常に好ましい実施形態において、リンカー基［リンカー］は、エステルリンカー部分とアミドリンカー部分の両方を含む。別の好ましい実施形態において、リンカー基［リンカー］は、エステルリンカー部分、アミンリンカー部分、およびアミドリンカー部分の全てを含む。

【０２６３】

本明細書において、明細書全体を通して言及される全ての化学化合物は、当業者に公知の方法を介して製造され得；これらの方法で使用される出発物質および／または試薬は、一般常識に基づいて当業者の日常的な知識を通して得ることができることが理解される（例えば、教科書または特許出願国際公開第２０２２１７３６６７号、国際公開第２００９０４３０２７号、国際公開第２０１３０６７１９９号、国際公開第２０１０００６２８２号、国際公開第２００９０８９５４２号、国際公開第２０１６０１９３４０号、国際公開第２００８１０６１８６号、国際公開第２０２０２６４５０５号、および国際公開第２００２３９４７号から、前記特許出願の完全な開示を本願明細書に援用する）。

【０２６４】

なおさらなる実施形態において、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール－（ＰＥＧ）－脂質コンジュゲートもＰＥＧと脂質様材料のコンジュゲートも含まず、好ましくはＰＥＧを含まない、ならびに／あるいは（ｉｉ）本発明のポリマーコンジュゲート脂質は、硫黄基（－Ｓ－）、末端求核剤を含まない、および／またはＲＮＡ、人工ｍＲＮＡ、少なくとも１つのコード配列を含む化学修飾もしくは非修飾メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、自己複製ＲＮＡ、環状ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ、およびレプリコンＲＮＡ；もしくはこれらの任意の組合せからなる群から選択される核酸化合物である生物活性成分に共有結合的にカップリングしており、好ましくは、生物活性成分は化学修飾ｍＲＮＡまたは化学非修飾ｍＲＮＡであり、より好ましくは、生物活性成分は化学非修飾ｍＲＮＡである。

【０２６５】

別の非常に好ましい実施形態において、本発明のポリマーコンジュゲート脂質は硫黄（Ｓ）も硫黄基（－Ｓ－）も含まない。

脂質ナノ粒子組成物

「脂質ナノ粒子組成物」および「組成物」という用語はこの節において互換的に使用される。本発明の文脈においては、脂質ナノ粒子がいずれの特定の形態にも制限されず、カチオン性脂質および場合により１つまたは複数のさらなる脂質を、例えば水性環境中で、および／または核酸化合物の存在下で、合わせると生成される任意の形態を含むと解釈されるべきである。例えば、リポソーム、脂質複合体、リポプレックスなどは脂質ナノ粒子の範囲内にある。

【０２６６】

本発明の文脈において、「組成物」は、指定された成分が、場合により任意のさらなる賦形剤と、通常は少なくとも１つの薬学的に許容される担体または賦形剤と共に組み込まれ得る任意の種類の組成物を指す。よって、組成物は、粉末もしくは顆粒などの乾燥組成物、または凍結乾燥形態もしくは錠剤などの固体単位であり得る。あるいは、組成物は液体形態であり得、各賦形剤が独立に、溶解または分散（例えば、懸濁または乳化）形態で組み込まれ得る。好ましい実施形態の１つでは、組成物が、水性液体担体による再構成のための粉末または凍結乾燥形態などの、無菌固体組成物として製剤化される。このような製剤はまた、以下にさらに詳細に記載される核酸カーゴを含む組成物のバージョンにも好ましい。

【０２６７】

本明細書で使用される「ナノ粒子」は、任意の構造または形態を有するサブミクロン粒子である。サブミクロン粒子はコロイドまたはコロイド状とも呼ばれ得る。ナノ粒子がベースとする材料、および構造または形態に関して、ナノ粒子は、特定の種類のナノ粒子の可能な呼称のほんのわずかだけ言及すると、例えば、ナノカプセル、小胞、リポソーム、脂質ナノ粒子、ミセル、架橋ミセル、リポプレックス、ポリプレックス、混合またはハイブリッド複合体として分類され得る。「脂質ナノ粒子（ｌｉｐｉｄ　ｎａｎｏｐａｒｔｉ

ｃｌｅ）」（ＬＮＰ）は、典型的には少なくとも１つの両親媒性膜形成脂質、および場合により他の脂質を含み、さらに場合により核酸化合物などのカーゴ材料を含む脂質によって形成されるナノ粒子である。本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子（ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ）」または「ＬＮＰ」という表現はリポソームおよびリポプレックスなどの、脂質によって形成または共形成されるナノ粒子の任意のサブタイプおよび形態を含む。

【０２６８】

上に定義されるように、脂質ナノ粒子は、脂質によって形成または共形成された任意の種類のナノ粒子を含む。特に、脂質ナノ粒子は、少なくとも１つの両親媒性、小胞形成脂質を含む脂質の組合せによって共形成され得る。リポソームおよびリポプレックスは脂質ナノ粒子の例である。

【０２６９】

本発明によるＬＮＰは、リン脂質ホスファチジルセリンを、好ましくは本明細書に概説されるさらなる脂質と組み合わせて含む。

原則として、ＬＮＰは、１つもしくは複数の核酸分子が結合しているか、または１つもしくは複数の核酸分子がカプセル化されている粒子を形成することができる任意の脂質を含み得る。一部の実施形態において、ｍＲＮＡ、またはその一部が、脂質ナノ粒子の脂質部分、または脂質ナノ粒子の脂質部分の一部もしくは全部によって包まれている水性空間にカプセル化されており、それによってこれが宿主生物または細胞の機序によって誘導される酵素分解または他の望ましくない効果、例えば有害免疫応答から保護されている。一部の実施形態において、ｍＲＮＡまたはその一部が脂質ナノ粒子と会合している（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ）。

【０２７０】

言及されるように、本明細書に記載される脂質賦形剤を含む組成物は通常、少なくとも水性環境中で、脂質ナノ粒子を形成する。本明細書に定義されるように、ナノ粒子は主にサブミクロンサイズを有する。ある特定の実施形態において、ｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子中に存在する場合、水溶液中で、ヌクレアーゼによる分解に耐性である。本明細書で使用される場合、平均直径は、動的光散乱によって決定されるｚ平均によって表され得る。一実施形態において、組成物は、約３０ｎｍ～約８００ｎｍの動的レーザー散乱によって決定される平均流体力学直径（または平均粒径）を有する脂質ナノ粒子を含む無菌液体組成物である。様々な実施形態では、脂質ナノ粒子は、約３０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約２００ｎｍ、約６０ｎｍ～約２００ｎｍ、約７０ｎｍ～約２００ｎｍ、約８０ｎｍ～約２００ｎｍ、約９０ｎｍ～約２００ｎｍ、約９０ｎｍ～約１９０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１８０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１７０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１６０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１４０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約９０ｎｍ～約１００　ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、または約３０ｎｍ、３５ｎｍ、４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、１５０ｎｍ、１６０ｎｍ、１７０ｎｍ、１８０ｎｍ、１９０ｎｍ、もしくは２００ｎｍの平均径を有し、実質的に非毒性である。本発明の別の好ましい実施形態では、脂質ナノ粒子は、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、または約６０ｎｍ～約２５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１５０ｎｍ、または約６０ｎｍ～約１２０ｎｍ、または約８０ｎｍ～約１６０ｎｍ、または約９０ｎｍ～約１４０ｎｍ、５０ｎｍ～約３００ｎｍ、または約６０ｎｍ～約２５０ｎｍ、または約６０ｎｍ～約２００ｎｍ、または約７０ｎｍ～２００ｎｍ、または約７５ｎｍ～約１６０ｎｍ、または約１００ｎｍ～約１４０ｎｍ、または約９０ｎｍ～約１４０ｎｍの範囲の流体力学的径を有する。約５０ｎｍ～約６０ｎｍの範囲または約６０ｎｍ～約８０ｎｍの範囲も好ましい。

【０２７１】

本発明の脂質ナノ粒子をもたらす、本明細書に記載される脂質賦形剤を含む組成物は比較的均質であり得る。多分散指数（ＰＤＩ）を使用して、ナノ粒子組成物の均質性、例えばナノ粒子組成物の粒径分布を示すことができる。小さな（例えば、０．３未満）多分散指数は、一般的に狭い粒径分布を示す。本発明のナノ粒子組成物は、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、０．２５、０．２６、０．２７、０．２８、０．２９、０．３０、０．３１、０．３２、０．３３、０．３４または０．３５など、約０～約０．３５の多分散指数を有し得る。一部の実施形態において、ナノ粒子組成物の多分散指数（ＰＤＩ）が約０．１～約０．２であり得る。

【０２７２】

本発明の組成物に関する様々な任意選択の特徴、選択および選好は、一般的に本明細書に記載されている：当業者によって明確に理解されるように、これらの全てが脂質ナノ粒子にも適用される。同様に、選択肢および選好はこのような脂質ナノ粒子を含む組成物にも適用される。

【０２７３】

それぞれの賦形剤の量に関しては、カチオン性脂質が、式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質が存在するモル量と比較して比較的高いモル量で、本発明による脂質ナノ粒子または組成物に組み込まれることが好ましい。さらに、カチオン性脂質のモル量はまた、好ましくはそれぞれ組成物またはナノ粒子中の中性脂質のモル量よりも高い。さらに、ステロイドのモル量は、場合により式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質のモル量よりも高い。

【０２７４】

ある特定の実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、ナノ粒子の総脂質含有量に対して、約１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％の量でＬＮＰ中に存在する。一実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、約１ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％の量でＬＮＰ中に存在する。一実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、約１ｍｏｌ％または約１．５ｍｏｌ％でＬＮＰ中に存在する。好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質は、全ての脂質成分または賦形剤の１００％に対するｍｏｌパーセンテージの組成に基づいて、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ｍｏｌ％の量；好ましくは５ｍｏｌ％の量、より好ましくは２．５ｍｏｌ％の量または同様に好ましくは１．７ｍｏｌ％の量でＬＮＰ中に存在する。

【０２７５】

様々な実施形態において、カチオン性脂質のポリマーコンジュゲート脂質に対するモル比は、約１００：１～約２５：１、約５０：１～約２５：１、または約４０：１～約２５：１の範囲である。

【０２７６】

ある特定の実施形態において、ＬＮＰは、粒子の形成中にその形成を安定化する１種または複数の追加の脂質を含む。適切な安定化脂質には、中性脂質およびアニオン性脂質が含まれる。様々な実施形態において、カチオン性脂質の中性脂質に対するモル比は、約２：１～約８：１、約３：１～約７：１、または約４：１～約６：１の範囲である。

【０２７７】

本明細書で使用される場合、脂質ナノ粒子は、典型的にはそれぞれの賦形剤によって形成され、ナノ粒子を含有する組成物全体と同じ定量的比の賦形剤を反映するので、本発明の組成物中の脂質賦形剤のモル量への言及は、組成物に含まれる脂質ナノ粒子中のそれぞれの賦形剤のモル量を記載するものとしても理解されるべきである。

【０２７８】

リン脂質ホスファチジルセリンは、モルパーセンテージの同じ基準を使用して、それぞれ約１ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、または約２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％の範囲；例えば約１ｍｏｌ％、２ｍｏｌ％、３ｍｏｌ％、４ｍｏｌ％、約５ｍｏｌ％、６ｍｏｌ％、７ｍ

ｏｌ％、８ｍｏｌ％、９ｍｏｌ％、１０ｍｏｌ％、１１ｍｏｌ％、１２ｍｏｌ％、１３ｍｏｌ％、１４ｍｏｌ％、または１５ｍｏｌ％の量で組成物中に存在し得る。一部の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の１０ｍｏｌ％以下または約１０ｍｏｌ％である。一部の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の９ｍｏｌ％以下または約９ｍｏｌ％である。一部の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の８ｍｏｌ％以下または約８ｍｏｌ％である。一部の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の７ｍｏｌ％以下または約７ｍｏｌ％である。一部の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の６ｍｏｌ％以下または約６ｍｏｌ％である。他の実施形態において、ホスファチジルセリンの量は、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の５ｍｏｌ％以下または約５ｍｏｌ％である。

【０２７９】

一般的に、組成物中（よって、脂質ナノ粒子中）のカチオン性脂質の量は、典型的には組成物（またはナノ粒子）中の全ての脂質賦形剤の総モル量に対して、少なくとも約２０ｍｏｌ％である。別の実施形態において、カチオン性脂質の量が、それぞれ少なくとも約２５ｍｏｌ％、または少なくとも３０ｍｏｌ％である。他の好ましい実施形態において、組成物中のカチオン性脂質の量は、それぞれ約３０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、または約４０ｍｏｌ％～約７０ｍｏｌ％、または約４５ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％；例えばそれぞれ約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、もしくは７０ｍｏｌ％、または約４０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％；例えばそれぞれ約４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９もしくは６０ｍｏｌ％である。

【０２８０】

組成物中のステロイドの量は、場合により少なくとも約１０ｍｏｌ％であり得るか、またはそれぞれ約１０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％、もしくは約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％、もしくは約２５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％の範囲；例えばそれぞれ約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、もしくは６０ｍｏｌ％であり得る。また、疑義を回避するために、モルパーセンテージは、組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものとする。

【０２８１】

中性脂質は、場合により少なくとも約５ｍｏｌ％の量で存在し得る。一部の実施形態において、組成物中の中性脂質の量は、モルパーセンテージの同じ基準を使用して、それぞれ約５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％、または約５ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、または約８ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％の範囲；例えばそれぞれ約５ｍｏｌ％、６ｍｏｌ％、７ｍｏｌ％、８ｍｏｌ％、９ｍｏｌ％、１０ｍｏｌ％、１１ｍｏｌ％、１２ｍｏｌ％、１３ｍｏｌ％、１４ｍｏｌ％、１５ｍｏｌ％、１６ｍｏｌ％、１７ｍｏｌ％、１８ｍｏｌ％、１９ｍｏｌ％、２０ｍｏｌ％、２１ｍｏｌ％、２２ｍｏｌ％、２３ｍｏｌ％、２４ｍｏｌ％または２５ｍｏｌ％である。

【０２８２】

組成物または脂質ナノ粒子中のポリマーコンジュゲート脂質の量は、例えば、約０．１ｍｏｌ％以上となるよう選択され得る。ある特定の実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質の量は、同様にモルパーセンテージの基礎として全ての脂質賦形剤の総モル量を使用して、約１ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％、または約２ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％である。他のある特定の実施形態において、組成物または脂質ナノ粒子は、０．１；０．２；０．３；０．４；０．５；０．６；０．７；０．８；０．９；１．０；１．１；１．２；１．３；１．４；１．５；１．６；１．７；１．８；１．９；２．０；２．１；２．２；２．３；２．４；２．５；２．６；２．７；２．８；２．９；３．０；３．１；３．２；３．３；３．４；３．５；３．６；３．７；３．８；３．９；４．０；４．１；４．２；４．３；４．４；４．５；４．６；４．７；４．８；４．９；５．０；５．１；５．２；

５．３；５．４；５．５；５．６；５．７；５．８；５．９；６；６．１；６．２；６．３；６．４；６．５；６．６；６．７；６．８；６．９；７；７．１；７．２；７．３；７．４；７．５；７．６；７．７；７．８；７．９；８；８．１；８．２；８．３；８．４；８．５；８．６；８．７；８．８；８．９；９；９．１；９．２；９．３；９．４；９．５；９．６；９．７；９．８；９．９；１０；１０．１；１０．２；１０．３；１０．４；１０．５；１０．６；１０．７；１０．８；１０．９；１１；１１．１；１１．２；１１．３；１１．４；１１．５；１１．６；１１．７；１１．８；１１．９；もしくは１２ｍｏｌ％または１２ｍｏｌ％超のポリマーコンジュゲート脂質を含み得る。好ましい実施形態において、ポリマーコンジュゲート脂質の含量は、製剤の全脂質含量の約１ｍｏｌ％～５ｍｏｌ％、好ましくは１．７ｍｏｌ％または２．５ｍｏｌ％である。非限定的な好ましい例として、脂質ナノ粒子は５ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。好ましい別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は１０ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は７．５ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。

【０２８３】

一実施形態において、組成物は、

（ａ）３０～７０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；

（ｂ）２０～５０ｍｏｌ％の量のステロイド；

（ｃ）５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質；および

（ｄ）０．５～５ｍｏｌ％の量の式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質

（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）

を含む脂質ナノ粒子を含む。

【０２８４】

別の実施形態において、組成物は、

（ａ）４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；

（ｂ）２０～４０ｍｏｌ％の量のステロイド；

（ｃ）１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および

（ｄ）１～２ｍｏｌ％の量の式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質

（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）

を含む脂質ナノ粒子を含む。

【０２８５】

一実施形態において、組成物は、

（ａ）３０～７０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；

（ｂ）２０～５０ｍｏｌ％の量のコレステロール；

（ｃ）５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよびさらなるリン脂質（好ましくはＤＰｈｙＰＥ）；ならびに

（ｄ）０．５～５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）；

（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）

を含む脂質ナノ粒子を含む。

【０２８６】

さらなる実施形態において、組成物は、

（ａ）４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；

（ｂ）２０～４０ｍｏｌ％の量のコレステロール；

（ｃ）１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよびさらなるリン脂質（好ましくはＤＰｈｙＰＥ）；ならびに

（ｄ）１～２ｍｏｌ％、好ましくは１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）；

（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）

を含む脂質ナノ粒子を含む。

【０２８７】
一実施形態において、組成物は、
（ａ）３０～７０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；
（ｂ）２０～５０ｍｏｌ％の量のコレステロール；
（ｃ）５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリン、ＤＰｈｙＰＥおよびＤＨＰＣ；および
（ｄ）０．５～５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）；
（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）
を含む脂質ナノ粒子を含む。
【０２８８】
さらなる実施形態において、組成物は、
（ａ）４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；
（ｂ）２０～４０ｍｏｌ％の量のコレステロール；
（ｃ）１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリン、ＤＰｈｙＰＥおよびＤＨＰＣ；および
（ｄ）１～２ｍｏｌ％、好ましくは１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）；
（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）
を含む脂質ナノ粒子を含む。
【０２８９】
これらの実施形態において、カチオン性脂質は、好ましくは本明細書に開示される選好のいずれか１つにより選択される化合物である。例えば、カチオン性脂質は表１に列挙される化合物から選択され得る。さらに、これらの実施形態はまた、本明細書に開示される選好のいずれか１つにより選択されるステロイド、リン脂質、および／またはポリマーコンジュゲート脂質を含み得る。本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子を列挙し、ｍｏｌ％値が各賦形剤について与えられる全ての実施形態において、各量が脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものであるとみなされるべきである。
【０２９０】
さらに好ましい実施形態において、組成物は、
（ａ）好ましくは３０～７０ｍｏｌ％の量、より好ましくは４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質「ＴＨＩＯＥＴＨＥＲ」；
（ａ）好ましくは２０～５０ｍｏｌ％の量、より好ましくは２０～４０ｍｏｌ％の量のコレステロール；
（ｃ）好ましくは５～２５ｍｏｌ％の量；より好ましくは１０～２０ｍｏｌ％の量の、リン脂質ホスファチジルセリンおよびさらなるリン脂質（好ましくは、ＤＰｈｙＰＥ、場合によりＤＨＰＣと組み合わせて）；ならびに
（ｄ）好ましくは０．５～５ｍｏｌ％の量、より好ましくは２．５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質「ＰＭＯＺ２」；
（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）
を含む脂質ナノ粒子を含む。
【０２９１】
特に好ましい実施形態において、組成物は、
（ａ）好ましくは３０～７０ｍｏｌ％の量、より好ましくは４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質「ＴＨＩＯＥＴＨＥＲ」；
（ａ）好ましくは２０～５０ｍｏｌ％の量、より好ましくは２０～４０ｍｏｌ％の量のコレステロール；
（ｃ）好ましくは５～２５ｍｏｌ％の量；より好ましくは１０～２０ｍｏｌ％の量の、リン脂質ホスファチジルセリンおよびさらなるリン脂質（好ましくは、ＤＰｈｙＰＥ、場合によりＤＨＰＣと組み合わせて）；ならびに

（ｄ）好ましくは０．５～５ｍｏｌ％の量、より好ましくは２．５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質「ＰＭＯＺ４」；
（各量は脂質ナノ粒子の全ての脂質賦形剤の総モル量に対するものである）
を含む脂質ナノ粒子を含む。

【０２９２】

さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、５９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、１０ｍｏｌ％のリン脂質、２９．３ｍｏｌ％のステロイド、および１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、５８ｍｏｌ％のカチオン性脂質、１１ｍｏｌ％のリン脂質、２９．３ｍｏｌ％のステロイド、および１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、４９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、２０ｍｏｌ％のリン脂質、２９．３ｍｏｌ％のステロイド、および１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。

【０２９３】

さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、５９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、１０ｍｏｌ％のホスファチジルセリンおよびＤＰｈｙＰＥ、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、ならびに１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）を含む。さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、５８ｍｏｌ％のカチオン性脂質、１１ｍｏｌ％のホスファチジルセリン、ＤＰｈｙＰＥ、およびＤＨＰＣ、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、ならびに１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）を含む。さらに好ましい実施形態において、本明細書に記載される組成物または脂質ナノ粒子は、４９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、２０ｍｏｌ％のホスファチジルセリン、ＤＰｈｙＰＥ、およびＤＨＰＣ、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、ならびに１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質（好ましくはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００またはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００）を含む。

【０２９４】

これらの実施形態において、カチオン性脂質は、好ましくは本明細書に開示される選好のいずれか１つにより選択される化合物である。例えば、カチオン性脂質は表１に列挙される化合物から選択され得る。

【０２９５】

賦形剤について別個の％値を有する具体的な組成物または脂質ナノ粒子を開示するこの節における上記実施形態のいずれにおいても、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）がリン脂質として言及される場合、さらなる実施形態において、ＤＰｈｙＰＥが別のリン脂質、好ましくは１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）と交換され得る。さらに、賦形剤について別個の％値を有する具体的な組成物または脂質ナノ粒子を開示するこの節における上記実施形態のいずれにおいても、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）がリン脂質として言及される場合、なおさらなる実施形態において、ＤＰｈｙＰＥが別のリン脂質、好ましくは１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ；ジオレオイルホスファチジルコリンとも呼ばれる）または代わりに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）と交換され得る。

【０２９６】

さらに好ましい脂質組成物は、表Ｅにおいて本明細書に開示される少なくとも５種の脂質賦形剤を含む。例えば、好ましい脂質組成物は、カチオン性脂質としての「Ｃ１」（表１において本明細書に開示される）、リン脂質組み合わせとしてのＤＰｈｙＰＥ＋ＤＰｈｙＰＳ、ステロールとしてのコレステロール、およびポリマーコンジュゲート脂質（およ

びしたがって、合計５種の脂質賦形剤）としてのＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である、「Ｅ１」行に開示される賦形剤を含む。別の例として、好ましい脂質組成物は、カチオン性脂質としての「Ｃ２」（表１において本明細書に開示される）、リン脂質組み合わせとしてのＤＰｈｙＰＥ＋ＤＰｈｙＰＳ＋ＤＨＰＣ、ステロールとしてのコレステロール、およびポリマーコンジュゲート脂質（およびしたがって、合計６種の脂質賦形剤）としてのＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である、「Ｅ５６」行に開示される賦形剤を含む。

【０２９７】

【表５－１】

表Ｅ：好ましい組成物のための脂質賦形剤の組合せ(Chol=コレステロール;表を２つの表に分ける)

賦形剤組合せ［呼称］	カチオン性脂質	ステロール	リン脂質組み合わせ	ポリマーコンジュゲート脂質
E1	C1	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E2	C2	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E3	C3	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E4	C4	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E5	C5	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E6	C6	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E7	C7	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E8	C8	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E9	C9	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E10	C10	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E11	C11	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E12	C12	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E13	C13	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E14	C14	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E15	C15	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E16	C16	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E17	C17	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E18	C18	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E19	C19	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E20	C20	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E21	C21	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E22	C22	Chol	DPhyPE+	DMG-PEG

賦形剤組合せ［呼称］	カチオン性脂質	ステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
E36	C9	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E37	C10	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E38	C11	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E39	C12	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E40	C13	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E41	C14	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E42	C15	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E43	C16	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E44	C17	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E45	C18	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E46	C19	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E47	C20	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E48	C21	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E49	C22	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E50	C23	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E51	C24	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E52	C25	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E53	C26	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E54	C27	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E55	C1	Chol	DPhyPE+ DPhyPS＋ DHPC	DMG-PEG 2000
E56	C2	Chol	DPhyPE+ DPhyPS＋ DHPC	DMG-PEG 2000
E57	C3	Chol	DPhyPE+	DMG-PEG

【０２９８】

【表５－２】

			DPhyPS	2000
E23	C23	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E24	C24	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E25	C25	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E26	C26	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E27	C27	Chol	DPhyPE+ DPhyPS	DMG-PEG 2000
E28	C1	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E29	C2	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E30	C3	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E31	C4	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E32	C5	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E33	C6	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E34	C7	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000
E35	C8	Chol	DPhyPE+ WT-PS	DMG-PEG 2000

			DPhyPS + DHPC	2000
E58	C4	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E59	C5	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E60	C6	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E61	C7	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E62	C8	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E63	C9	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E64	C10	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E65	C11	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E66	C12	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E67	C13	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E68	C14	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000
E69	C15	Chol	DPhyPE+ DPhyPS + DHPC	DMG-PEG 2000

【０２９９】

【表５－３】

賦形剤組合せ［呼称］	カチオン性脂質	ステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
E70	C16	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E71	C17	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E72	C18	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E73	C19	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E74	C20	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E75	C21	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E76	C22	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E77	C23	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E78	C24	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E79	C25	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E80	C26	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E81	C27	Chol	DPhyPE+DPhyPS+DHPC	DMG-PEG 2000
E82	C1	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E83	C2	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E84	C3	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E85	C4	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E86	C5	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E87	C6	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E88	C7	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E89	C8	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E90	C9	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E91	C10	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E92	C11	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E93	C12	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E94	C13	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E95	C14	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E96	C15	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E97	C16	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E98	C17	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000

【０３００】

【表５－４】

E99	C18	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E100	C19	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E101	C20	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E102	C21	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E103	C22	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E104	C23	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E105	C24	Chol	DPhyPE+WT-PS＋DHPC	DMG-PEG 2000
E106	C25	Chol	DPhyPE+WT-PS ＋ DHPC	DMG-PEG 2000
E107	C26	Chol	DPhyPE+WT-PS ＋ DHPC	DMG-PEG 2000
E108	C27	Chol	DPhyPE+WT-PS ＋ DHPC	DMG-PEG 2000

【０３０１】
好ましい実施形態において、表Ｅに示されるポリマーコンジュゲート脂質ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００は、図４に示されるＰＭＯＺ－脂質、好ましくはポリマーコンジュゲート脂質「ＰＭＯＺ２」、より好ましくはポリマーコンジュゲート脂質「ＰＭＯＺ４」、さらにより好ましくはｎ＝５０の、すなわち５０個のモノマー繰り返しを有するポリマーコンジュゲート脂質「ＰＭＯＺ４」で置換される。
【０３０２】
さらに、少なくとも５種の脂質賦形剤の別個のｍｏｌパーセンテージを示す好ましい脂質製剤を表Ｆに示す。例えば、好ましい脂質組成物は、「Ｆ１」行に開示される脂質のｍｏｌパーセンテージ、すなわち、５９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、２９．３ｍｏｌ％のステロール、１０ｍｏｌ％のリン脂質組み合わせ、および１．７ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。別の例として、好ましい脂質組成物は、「Ｆ９」行に開示される脂質のｍｏｌパーセンテージ、すなわち、４９ｍｏｌ％のカチオン性脂質、３１ｍｏｌ％のステロール、２０ｍｏｌ％のリン脂質組み合わせ、および０ｍｏｌ％のポリマーコンジュゲート脂質を含む。リン脂質組み合わせは、２種または３種のリン脂質の組み合わせからなってもよく、各場合において、リン脂質の少なくとも１つはホスファチジルセリンである。
【０３０３】

【表６】

製剤[呼称]	カチオン性脂質[mol%]	ステロール[mol%]	リン脂質組み合わせ[mol%]	ポリマーコンジュゲート脂質[mol%]	合計[mol%]
F1	59	29.3	10	1.7	100
F2	59	29.5	10	1.5	100
F3	59	31	10	0	100
F4	58	29.3	11	1.7	100
F5	58	29.5	11	1.5	100
F6	58	31	11	0	100
F7	49	29.3	20	1.7	100
F8	49	29.5	20	1.5	100
F9	49	31	20	0	100
F10	30~70	5~25	8~25	0.5~5	**
F11	40~70	5~15	8~25	0.5~5	**
F12	20~60	5~25	8~25	0.5~15	**
F13	45~65	8~12	8~26	1~3	**

**自明であるが、表Ｆの最後の４つの製剤F10、F11、F12、およびF13の合計[mol%]は、100 mol%であると定義される。すなわち、当業者は、当然ながら、本発明の好ましい組成物の各賦形剤のモルパーセンテージが合計で 100 モル%になるように、4 つの賦形剤の所与の範囲から値を選択することができる。

【０３０４】

したがって、本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明の組成物は、製剤呼称

Ｆ１、Ｆ２、Ｆ３、Ｆ４、Ｆ５、Ｆ６、Ｆ７、Ｆ８、Ｆ９、Ｆ１０、Ｆ１１、Ｆ１２、およびＦ１３

からなる群から選択される、表Ｆに開示される別個のｍｏｌパーセンテージの、賦形剤組合せ呼称

Ｅ１、Ｅ２、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ５、Ｅ６、Ｅ７、Ｅ８、Ｅ９、Ｅ１０、Ｅ１１、Ｅ１２、Ｅ１３、Ｅ１４、Ｅ１５、Ｅ１６、Ｅ１７、Ｅ１８、Ｅ１９、Ｅ２０、Ｅ２１、Ｅ２２、Ｅ２３、Ｅ２４、Ｅ２５、Ｅ２６、Ｅ２７、Ｅ２８、Ｅ２９、Ｅ３０、Ｅ３１、Ｅ３２、Ｅ３３、Ｅ３４、Ｅ３５、Ｅ３６、Ｅ３７、Ｅ３８、Ｅ３９、Ｅ４０、Ｅ４１、Ｅ４２、Ｅ４３、Ｅ４４、Ｅ４５、Ｅ４６、Ｅ４７、Ｅ４８、Ｅ４９、Ｅ５０、Ｅ５１、Ｅ５２、Ｅ５３、Ｅ５４、Ｅ５５、Ｅ５６、Ｅ５７、Ｅ５８、Ｅ５９、Ｅ６０、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６３、Ｅ６４、Ｅ６５、Ｅ６６、Ｅ６７、Ｅ６８、Ｅ６９、Ｅ７０、Ｅ７１、Ｅ７２、Ｅ７３、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｅ７６、Ｅ７７、Ｅ７８、Ｅ７９、Ｅ８０、Ｅ８１、Ｅ８２、Ｅ８３、Ｅ８４、Ｅ８５、Ｅ８６、Ｅ８７、Ｅ８８、Ｅ８９、Ｅ９０、Ｅ９１、Ｅ９２、Ｅ９３、Ｅ９４、Ｅ９５、Ｅ９６、Ｅ９７、Ｅ９８、Ｅ９９、Ｅ１００、Ｅ１０１、Ｅ１０２、Ｅ１０３、Ｅ１０４、Ｅ１０５、Ｅ１０６、Ｅ１０７、およびＥ１０８からなる群から選択される、表Ｅに開示される賦形剤を含む。

【０３０５】

ナノ粒子組成物のゼータ電位を使用して、組成物の界面動電位を示すことができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を記載し得る。本発明による脂質ナノ粒子は、負に帯電した化合物と正に帯電した化合物の両方の存在により、比較的中性のゼータ電位を示し得る。ゼータ電位（時々、「電荷」と略される）は、例えばＭａｌｖｅｒｎ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ（マルバーンインスツルメンツ社（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ．）；英国マルバーン（Ｍａｌｖｅｒｎ）所在）を使用して

、動的光散乱およびレーザードップラ微小電気泳動法によって、粒子の粒径と共に決定され得る。脂質ナノ粒子中の帯電した化合物の量および性質に応じて、ナノ粒子はゼータ電位によって特徴付けられ得る。好ましい実施形態において、ゼータ電位は約－５０ｍＶ～約＋５０ｍＶの範囲にある。他の好ましい実施形態において、ゼータ電位は約－２５ｍＶ～約＋２５ｍＶの範囲にある。一部の実施形態において、本発明の脂質ナノ粒子のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、または約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。

【０３０６】

ある特定の実施形態において、ＬＮＰは、ＬＮＰを細胞または細胞集団に標的化することはできる１つまたは複数の標的化部分を含む。例えば、一実施形態において、標的化部分は、ＬＮＰを細胞表面上に見られる受容体に向けるリガンドである。

【０３０７】

ある特定の実施形態において、ＬＮＰは１つまたは複数の内在化ドメインを含む。例えば、一実施形態において、ＬＮＰは、細胞に結合してＬＮＰの内在化を誘導する１つまたは複数のドメインを含む。例えば、一実施形態において、１つまたは複数の内在化ドメインは、細胞表面上に見られる受容体に結合して、ＬＮＰの受容体媒介取り込みを誘導する。ある特定の実施形態において、ＬＮＰはインビボで生体分子に結合することができ、それによって、ＬＮＰ結合生体分子が細胞表面受容体によって認識されて内在化を誘導し得る。例えば、一実施形態において、ＬＮＰは全身性ＡｐｏＥに結合し、これがＬＮＰおよび会合したカーゴの取り込みにつながる。本発明のある特定の実施形態において、ＡｐｏＥを使用される媒体または医薬組成物に補充することができる。

【０３０８】

好ましくは、本発明のＬＮＰは

（ｉ）少なくとも１つのカチオン性脂質と

（ｉｉ）少なくとも１つのリン脂質；

（ｉｉｉ）少なくとも１つのステロイドまたはステロイド類似体、好ましくはコレステロール；および

（ｉｖ）少なくとも１つのポリマーコンジュゲート脂質、好ましくはＰＥＧ－脂質；

を含み、

（ｉ）～（ｉｖ）は、約２０～６０％のカチオン性脂質、５～２５％の中性脂質、２５～５５％のステロール、および０．５～１５％のポリマーコンジュゲート脂質のモル比である。

【０３０９】

また、好ましくは、本発明のＬＮＰは

（ｉ）少なくとも１つのカチオン性脂質；

（ｉｉ）少なくとも２つのリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥおよびホスファチジルセリン；

（ｉｉｉ）少なくとも１つのステロイドまたはステロイド類似体、好ましくはコレステロール；および

（ｉｖ）少なくとも１つのポリマーコンジュゲート脂質、好ましくはＰＥＧ－脂質；

を含み、

（ｉ）～（ｉｖ）は、約２０～６０％のカチオン性脂質、５～２５％の中性脂質、２５～５５％のステロール、および０．５～１５％のポリマーコンジュゲート脂質のモル比である。

【０３１０】

また、好ましくは、本発明のＬＮＰは

（ｉ）少なくとも１つのカチオン性脂質；
（ｉｉ）少なくとも３つのリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、ＤＨＰＣ、およびホスファチジルセリン；
（ｉｉｉ）少なくとも１つのステロイドまたはステロイド類似体、好ましくはコレステロール；および
（ｉｖ）少なくとも１つのポリマーコンジュゲート脂質、好ましくはＰＥＧ－脂質；
を含み、
（ｉ）～（ｉｖ）は、約２０～６０％のカチオン性脂質、５～２５％の中性脂質、２５～５５％のステロール、および０．５～１５％のポリマーコンジュゲート脂質のモル比である。

【０３１１】
また、好ましくは、本発明のＬＮＰは
（ｉ）少なくとも１つのカチオン性脂質；
（ｉｉ）少なくとも２つのリン脂質、好ましくはＤＳＰＣおよびホスファチジルセリン；
（ｉｉｉ）少なくとも１つのステロイドまたはステロイド類似体、好ましくはコレステロール；および
（ｉｖ）少なくとも１つのポリマーコンジュゲート脂質、好ましくはＰＥＧ－脂質；
を含み、
（ｉ）～（ｉｖ）は、約２０～６０％のカチオン性脂質、５～２５％の中性脂質、２５～５５％のステロール、および０．５～１５％のポリマーコンジュゲート脂質のモル比である。

【０３１２】
ＬＮＰへのカプセル化／複合体化
好ましい実施形態において、少なくとも１つの核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡは、リン脂質ホスファチジルセリンおよび１つまたは複数の脂質（例えば、カチオン性脂質および／または中性脂質）と複合体化して、またはリン脂質ホスファチジルセリンおよび１つまたは複数の脂質でカプセル化されて、またはリン脂質ホスファチジルセリンおよび１つまたは複数の脂質で部分的にカプセル化されて、またはリン脂質ホスファチジルセリンおよび１つまたは複数の脂質と会合して、それによって、リポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームを形成する。

【０３１３】
リポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームに組み込まれる核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）は、リポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／もしくはナノリポソームの内部空間、脂質層／膜内に完全にもしくは部分的に位置し得るか、または脂質層／膜の外部表面と会合し得る。核酸のリポソーム／ＬＮＰへの組み込みは本明細書において「カプセル化（ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｏｎ）」と呼ばれ、核酸、例えば、ＲＮＡがリポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームの内部空間に完全に含有される。核酸をリポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームに組み込む目的は、核酸、好ましくはＲＮＡを、核酸を分解する酵素もしくは化学物質もしくは条件および／または核酸の迅速な排出を引き起こす系もしくは受容体を含有し得る環境から保護することである。さらに、核酸、好ましくはＲＮＡをリポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームに組み込むことにより、核酸の取り込みが促進され、したがって、核酸、例えば、抗原性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ｎＣｏＶ－２０１９）タンパク質をコードするＲＮＡの治療効果が増強され得る。したがって、核酸、例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡをリポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームに組み込むことは、例えば筋肉内および／または皮内投与のための、コロナウイルスワクチン（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２

ワクチン）に特に好適となり得る。
【０３１４】
この文脈において、「複合体化（ｃｏｍｐｌｅｘｅｄ）」または「会合（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）」という用語は、共有結合を用いない、核酸と１つまたは複数の脂質のより大きな複合体または集合体への本質的に安定な組合せを指す。
【０３１５】
「ＬＮＰ」とも呼ばれる、「脂質ナノ粒子（ｌｉｐｉｄ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ）」という用語は、いかなる特定の形態にも制限されず、カチオン性脂質と場合により１つまたは複数のさらなる脂質が、例えば、水性環境中で、および／または核酸、例えば、ＲＮＡの存在下で組み合わされる場合に生成される任意の形態を含む。例えば、リポソーム、脂質複合体、リポプレックスなどは脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の範囲内にある。
【０３１６】
リポソーム、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポプレックス、および／またはナノリポソームは、限定されるものではないが、直径が数百ナノメートルであり得、狭い水性コンパートメントによって分離された一連の同心円二重層を含有し得る多層小胞（ＭＬＶ）、直径が５０ｎｍ未満であり得る小型単細胞小胞（ＳＵＶ）、および直径が５０ｎｍ～５００ｎｍの間であり得る大型単層小胞（ＬＵＶ）などの様々な径であり得る。
【０３１７】
本発明のＬＮＰは、好適には、１つまたは複数の二重層の膜によって外側媒体から隔離された内部水性空間を有する微小小胞として特徴付けられる。ＬＮＰの二重層膜は、典型的には空間的に分離された親水性ドメインおよび疎水性ドメインを含む合成起源または天然起源の脂質などの両親媒性分子によって形成される。リポソームの二重層膜は、両親媒性ポリマーおよび界面活性剤（例えば、ポリメロソーム（ｐｏｌｙｍｅｒｏｓｏｍｅ）、ニオソーム等）によっても形成され得る。本発明の文脈において、ＬＮＰは、典型的には少なくとも１つの核酸、好ましくは少なくとも１つのＲＮＡを標的組織に輸送するのに役立つ。したがって、本発明の態様の好ましい実施形態において、少なくとも１つのＲＮＡは、１つまたは複数の脂質と複合体化して、それによって、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を形成する。ＬＮＰは、典型的に、カチオン性脂質と、中性脂質、帯電した脂質、ステロイド、およびポリマーコンジュゲート脂質から選択される１種または複数の賦形剤とを含む。
【０３１８】
ｍＲＮＡ
好ましい実施形態の１つでは、核酸化合物はｍＲＮＡまたはｍＲＮＡ化合物である。本発明者らによって見出されたように、本発明によるリン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物を含むワクチン組成物は、抗原を発現するｍＲＮＡ化合物のインビボ送達に特に適しており、よって、手頃なコストで迅速に開発することができる、高度に有効で、強力で、汎用性が高く、安全なワクチンを可能にする。本発明を行うための目的の具体的な抗原を以下でさらに詳細に記載する。本発明によるｍＲＮＡ化合物は、好ましくは、脂質ナノ粒子中にカプセル化されるか、または脂質ナノ粒子と会合している。
【０３１９】
少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡを含むホスファチジルセリン含有ワクチンの利点は、
脾臓への標的化
強力な液性免疫応答の誘導；
Ｂ細胞記憶の誘導；
免疫防御のより速い開始；
誘導された免疫応答の長寿命；
広範な細胞性Ｔ細胞応答の誘導；
（局所的かつ一過的）炎症促進環境の誘導；
優れた忍容性、副作用がない、非毒性；
有利な安定性特徴；

多くの異なる抗原と適合性の製剤：同じ（製造）技術に基づいて実行可能なより大きな抗原カクテル；
ベクター免疫がない、すなわち、複数の（異なる）抗原に対して複数回、同じ対象にワクチン接種するために技術を使用することができる；
製造の速度、適合性、簡潔性およびスケーラビリティ；
それぞれの適用に依存する全身性サイトカインまたはケモカイン応答の誘導の好ましいパターン
である。

【０３２０】

ある特定の実施形態において、脂質ナノ粒子組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンとは別に、
（ａ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｂ）ステロイド；
（ｃ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質；
（ｄ）ポリマーコンジュゲート脂質；および／または
（ｅ）抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡ化合物
を含む。

【０３２１】

他の実施形態において、脂質ナノ粒子組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンとは別に、
（ａ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｂ）ステロイド；
（ｃ）ポリマーコンジュゲート脂質；および
（ｄ）抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡ化合物
を含む。

【０３２２】

他の実施形態において、脂質ナノ粒子組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンとは別に、
（ａ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｂ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質；
（ｃ）ポリマーコンジュゲート脂質；および
（ｄ）抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡ化合物
を含む。

【０３２３】

特定の好ましいの実施形態において、脂質ナノ粒子組成物は、リン脂質ホスファチジルセリンとは別に、
（ａ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｂ）ステロイド；
（ｃ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質；
（ｄ）ポリマーコンジュゲート脂質；および
（ｅ）抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡ化合物
を含む。

【０３２４】

リン脂質ホスファチジルセリン、カチオン性もしくはイオン化可能脂質、ステロイド、リン脂質、ポリマーコンジュゲート脂質、および抗原をコードするｍＲＮＡ化合物に関して、上記のこれらの特徴に関して記載されているのと同じ選択肢、選好および代替を適用する。

【０３２５】

脂質ナノ粒子中のｍＲＮＡ化合物の量に対するカチオン性もしくはイオン化可能脂質の量も重量比（例えば、「ｍ／ｍ」と略される）として表され得る。例えば、脂質ナノ粒子

は、約２０～約６０、または約１０～約５０の範囲の脂質対ｍＲＮＡ重量比を達成するような量でｍＲＮＡ化合物を含む。他の実施形態において、カチオン性もしくはイオン化可能脂質の核酸またはｍＲＮＡに対する比は、約５～約１３、約４～約８または約７～約１１など、約３～約１５である。本発明の非常に好ましい実施形態において、全脂質／ｍＲＮＡ質量比は約４０または４０、すなわち、ｍＲＮＡカプセル化を確保するために約４０または４０倍質量過剰である。別の好ましいＲＮＡ／脂質比は約１～約１０、約２～約５、約２～約４の間、または好ましくは約３である。

【０３２６】

さらに、カチオン性もしくはイオン化可能脂質の量は、ｍＲＮＡ化合物などの核酸カーゴの量を考慮して選択され得る。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は約１～約５０の範囲にあり得る。別の実施形態において、範囲は約１～約２０、約１～約１０、約１～約５である。１つの好ましい実施形態において、これらの量は、約１０～約２０の範囲の脂質ナノ粒子または組成物のＮ／Ｐ比をもたらすように選択される。さらなる非常に好ましい実施形態において、Ｎ／Ｐが１４（すなわち、ｍＲＮＡカプセル化を確保するために１４倍ｍｏｌ過剰の正の電荷）である。他の非常に好ましい実施形態において、Ｎ／Ｐは１７．５（すなわち、ｍＲＮＡカプセル化を確実にするために１７．５倍ｍｏｌ過剰の正電荷）であるか、または

（ｉ）約１～約２０、好ましくは約２～約１５、より好ましくは約３～約１０、一層より好ましくは約４～約９、最も好ましくは約６の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；

（ｉｉ）約５～約２０、より好ましくは約１０～約１８、一層より好ましくは約１２～約１６、最も好ましくは約１４の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；

または

（ｉｉｉ）２０～６０、好ましくは約３～約１５、５～約１３、約４～約８もしくは約７～約１１の範囲の脂質：ｍＲＮＡ重量比を達成するような量

である。

【０３２７】

他の好ましい実施形態において、Ｎ／Ｐ比は約１～約５０の範囲であり得る。他の実施形態において、範囲は約１～約２０、好ましくは約１～約１５である。本発明の脂質ナノ粒子について、好ましいＮ／Ｐ（脂質対ＲＮＡのｍｏｌ比）は約１４または約１７である。さらに好ましいＮ／Ｐ、すなわち、脂質対ＲＮＡのｍｏｌ比は約６である。別の好ましいＮ／Ｐ比は約４．８５または５（脂質対ＲＮＡのｍｏｌ比）である。

【０３２８】

脂質ナノ粒子中のｍＲＮＡの総量は変動し、ｍＲＮＡ対全脂質ｗ／ｗ比に応じて定義され得る。本発明の１実施形態において、ｍＲＮＡ対全脂質比は０．０６ｗ／ｗ未満、好ましくは０．０３～０．０４ｗ／ｗの間である。

【０３２９】

好ましくは、ｍＲＮＡ化合物またはそのコード配列は、約５０～約２０００、または１００～約２００００ヌクレオチド、好ましくは約２５０～約２００００ヌクレオチド、より好ましくは約５００～約１００００、さらにより好ましくは約５００～約５０００の長さを有する。

【０３３０】

病原性または病原体誘導抗原

病原性抗原または病原体誘導抗原は、病原性生物、特に細菌、ウイルス、原生動物学的（多細胞）病原性生物から誘導され、対象、特に哺乳動物対象、さらに特にヒトによる免疫学的反応を引き起こす。より具体的には、病原性抗原は、好ましくはウイルスまたは細菌または原生動物学的生物の表面に位置する表面抗原、例えばタンパク質（またはタンパク質の断片、例えば表面抗原の外部部分）である。

【０３３１】

したがって、一部の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡは、その少なくとも１つのコード領域において、細菌、ウイルス、真菌、または原生動物抗原から選択される少なくと

も１つの病原性抗原をコードし得る。コードされる（ポリ）ペプチドまたはタンパク質は、病原性抗原またはその断片もしくはバリアントからなり得るか、またはこれを含み得る。

【０３３２】

病原性抗原は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の２１～３５頁に開示される病原体から誘導される抗原の群から選択される感染性疾患に関連する病原体から誘導されるペプチドまたはタンパク質抗原である；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。さらに、病原性抗原は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１９０７７００１号の５７頁３段落～６３頁２段落に開示される病原体から誘導される抗原の群から選択される感染性疾患に関連する病原体から誘導されるペプチドまたはタンパク質抗原である；国際公開第２０１９０７７００１号全体を本願明細書に援用する。

【０３３３】

なおさらなる病原性抗原は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１３１２０６２８号の３２頁２６行～３４頁２７行に開示される病原体から誘導される抗原の群から選択される病原体から誘導される抗原から選択される感染性疾患に関連する病原体から誘導されるペプチドまたはタンパク質である。さらに、この点で、病原性抗原（感染性疾患に関連する病原体から誘導される抗原）は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１３１２０６２８号の３４頁２９行～５９頁５行に開示される抗原の群から選択される抗原から誘導される抗原から選択され得る（括弧中は、特定の病原体または抗原が誘導される病原体のファミリーおよび病原体が関連する感染性疾患である）；国際公開第２０１３１２０６２８号全体を本願明細書に援用する。

【０３３４】

本発明の組成物に組み込まれるｍＲＮＡ化合物によって発現される好ましい抗原の中には、限定されるものではないが、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（Ｌａｓｓａ ｍａｍｍａｒｅｎａｖｉｒｕｓ）（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、およびマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））からなる群から選択される病原体である。好ましい実施形態の別の１つでは、病原性抗原が、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、マラリア原虫、インフルエンザウイルスまたは狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）から誘導される。

【０３３５】

さらに、病原性抗原はさらに好ましくは、限定されるものではないが、アシネトバクター・バウマニ（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｕｍａｎｎｉｉ）、アナプラズマ属（Ａｎａｐｌａｓｍａ）、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム（Ａｎａｐｌａｓｍａ ｐ

ｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、ブラジル鉤虫（Ａｎｃｙｌｏｓｔｏｍａ ｂｒａｚｉｌｉｅｎｓｅ）、ズビニ鉤虫（Ａｎｃｙｌｏｓｔｏｍａ ｄｕｏｄｅｎａｌｅ）、アルカノバクテリウム・ヘモリティクム（Ａｒｃａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｍ）、ヒト回虫（Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ）、アスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、アストロウイルス科（Ａｓｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、バベシア属（Ｂａｂｅｓｉａ）、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）、バルトネラ・ヘンセレ（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｈｅｎｓｅｌａｅ）、ＢＫウイルス、ブラストシスチス・ホミニス（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｉｓ ｈｏｍｉｎｉｓ）、ブラストミセス・デルマチチジス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、百日咳菌（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、ボレリア属（Ｂｏｒｒｅｌｉａ）、ボレリア属種（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｓｐｐ）、ブルセラ属（Ｂｒｕｃｅｌｌａ）、マレー糸状虫（Ｂｒｕｇｉａ ｍａｌａｙｉ）、ブニヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、バークホルデリア・セパシア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａ）もしくは他のバークホルデリア属（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）種、鼻疽菌（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｍａｌｌｅｉ）、類鼻疽菌（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ）、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）種、クラミジア・トラコマチス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クラミドフィラ・ニューモニアエ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、オウム病クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）、ＣＪＤプリオン、肝吸虫（Ｃｌｏｎｏｒｃｈｉｓ ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、クロストリジウム・ディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）種、破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、コクシジオイデス属（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ）種、コロナウイルス、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コクシエラ・バーネッティイ（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、クリプトスポリジウム属（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、二核アメーバ（Ｄｉｅｎｔａｍｏｅｂａ ｆｒａｇｉｌｉｓ）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ － 例えば、エンベロープ糖タンパク質）、エキノコックス属（Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）、エーリキア・シャフェンシス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ）、エーリキア・エウィンギイ（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｅｗｉｎｇｉｉ）、エーリキア属（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、エンテロウイルス属（Ｅｎｔｅｒｏｖｉｒｕｓ）、エンテロウイルス、主に、コクサッキーＡウイルスもしくはエンテロウイルス７１（ＥＶ７１）、エピデルモフィトン属（Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ）種、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、大腸菌株Ｏ１５７：Ｈ７、Ｏ１１１もしくはＯ１０４：Ｈ４、肝蛭（Ｆａｓｃｉｏｌａ ｈｅｐａｔｉｃａ）もしくは巨大肝蛭（Ｆａｓｃｉｏｌａ ｇｉｇａｎｔｉｃａ）、ＦＦＩプリオン、猫免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、フィラリア上科（Ｆｉｌａｒｉｏｉｄｅａ）、フラビウイルス、野兎病菌（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、フソバクテリウム属（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ゲオトリクム・カンジドゥム（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｕｍ ｃａｎｄｉｄｕｍ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌｉｓ）、顎口虫属（Ｇｎａｔｈｏｓｔｏｍａ）種、ＧＳＳプリオン、グアナリト（Ｇｕａｎａｒｉｔｏ）ウイルス、ヘモフィルス・デュクレイ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒ

ｅｙｉ）、インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、ヘニパウイルス（Ｈｅｎｉｐａｖｉｒｕｓ）（ヘンドラウイルス（Ｈｅｎｃｌｒａ ｖｉｒｕｓ）ニパウイルス（Ｎｉｐａｈ ｖｉｒｕｓ））、Ａ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、ヒストプラズマ・カプスラツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、ホルテア・ウェルネッキ（Ｈｏｒｔａｅａ ｗｅｒｎｅｃｋｉｉ）、ヒトボカウイルス（ＨＢｏＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、日本脳炎ウイルス、ＪＣウイルス、フニンウイルス（Ｊｕｎｉｎ ｖｉｒｕｓ）、キンゲラ・キンゲ（Ｋｉｎｇｅｌｌａ ｋｉｎｇａｅ）、クレブシエラ・グラニュロマティス（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｇｒａｎｕｌｏｍａｔｉｓ）、クレブシレラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クループリオン、ラッサウイルス、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、リーシュマニア属（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ）、レプトスピラ属（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）、マチュポウイルス（Ｍａｃｈｕｐｏ ｖｉｒｕｓ）、マラセチア属（Ｍａｌａｓｓｅｚｉａ）種、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、横川吸虫（Ｍｅｔａｇｏｎｉｍｕｓ ｙｏｋａｇａｗａｉ）、微胞子虫（Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｉｄｉａ ｐｈｙｌｕｍ）、伝染性軟属腫ウイルス（Ｍｏｌｌｕｓｃｕｍ ｃｏｎｔａｇｉｏｓｕｍ ｖｉｒｕｓ）（ＭＣＶ）、ムンプスウイルス、らい菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）もしくはマイコバクテリウム・レプロマトーシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ）、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、マイコバクテリウム・ウルセランス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ）、肺炎マイコプラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、フォーラーネグレリア（Ｎａｅｇｌｅｒｉａ ｆｏｗｌｅｒｉ）、アメリカ鉤虫（Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ）、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ノカルディア・アステロイデス（Ｎｏｃａｒｄｉａ ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ）、ノカルディア属（Ｎｏｃａｒｄｉａ）種、回旋糸状虫（Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ ｖｏｌｖｕｌｕｓ）、オリエンティア・ツツガムシ（Ｏｒｉｅｎｔｉａ ｔｓｕｔｓｕｇａｍｕｓｈｉ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）（インフルエンザ）、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス（Ｐａｒａｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ）、肺吸虫属（Ｐａｒａｇｏｎｉｍｕｓ）種、ウェステルマン肺吸虫（Ｐａｒａｇｏｎｉｍｕｓ ｗｅｓｔｅｒｍａｎｉ）、パルボウイルスＢ１９、パスツレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、プラスモジウム属（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、ニューモシスチス・イロベチイ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｊｉｒｏｖｅｃｉｉ）、ポリオウイルス、ライノウイルス、ライノウイルス、リケッチア・アカリ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ａｋａｒｉ）、リケッチア属（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）、発疹チフスリケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ）、ロッキー山紅斑熱リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、発疹熱リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｙｐｈｉ）、リフトバレー熱ウイルス、ロタウイルス（好ましくは、例えばＶＰ８抗原）、風疹ウイルス、サビアウイルス（Ｓａｂｉａ ｖｉｒｕｓ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、ヒゼンダニ（Ｓａｒｃｏｐｔｅｓ ｓｃａｂｉｅｉ）、ＳＡＲＳコロナウイルス、住血吸虫属（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ）、シゲラ属（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、シンノンブル（Ｓｉｎ Ｎｏｍｂｒｅ）ウイルス、ハンタウイルス、スポロトリックス・シェンキイ（Ｓｐｏｒｏｔｈｒｉｘ ｓｃｈｅｎｃｋｉｉ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、ストレプトコッカス・アガラクティアエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、糞線虫

（Ｓｔｒｏｎｇｙｌｏｉｄｅｓ ｓｔｅｒｃｏｒａｌｉｓ）、テニア属（Ｔａｅｎｉａ）、有鉤条虫（Ｔａｅｎｉａ ｓｏｌｉｕｍ）、ダニ媒介性脳炎ウイルス（ＴＢＥＶ）、犬回虫（Ｔｏｘｏｃａｒａ ｃａｎｉｓ）もしくは猫回虫（Ｔｏｘｏｃａｒａ ｃａｔｉ）、トキソプラズマ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、トリチネラ・スピラリス（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ ｓｐｉｒａｌｉｓ）、膣トリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ ｖａｇｉｎａｌｉｓ）、トリコフィトン属（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ）種、鞭虫（Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ）、ブルーストリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）、クルーズトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、ウレアプラズマ・ウレアリティカム（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）、ワクシニアウイルス（好ましくは、例えば免疫回避タンパク質Ｅ３、Ｋ３、もしくはＢ１８）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、バリオラ・メジャー（Ｖａｒｉｏｌａ ｍａｊｏｒ）もしくはバリオラ・マイナー（Ｖａｒｉｏｌａ ｍｉｎｏｒ）、ｖＣＪＤプリオン、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ウエストナイルウイルス、西部馬脳炎ウイルス、バンクロフト糸状虫（Ｗｕｃｈｅｒｅｒｉａ ｂａｎｃｒｏｆｔｉ）、エルシニア・エンテロコリティカ（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、ペスト菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、もしくは仮性結核菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、ジカウイルス株ジカＳＰＨ２０１５－ブラジル、Ｚ１１０６０３３－スリナム、ＭＲ７６６－ウガンダもしくはＮａｔａｌ ＲＧＮからなる群から選択される病原体から誘導される抗原またはこれらのタンパク質のいずれかのアイソフォーム、ホモログ、断片、バリアントもしくは誘導体、好ましくはコロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）から選択される病原体から誘導される抗原またはこれらのタンパク質のいずれかのアイソフォーム、ホモログ、断片、バリアントもしくは誘導体から選択され得る。

【０３３６】

さらなる実施形態において、感染症を処置する（すなわち抗原をコードする核酸、好ましくはｍＲＮＡを投与することによって）のに有用な抗原は、以下の抗原から選択され得る（関連する感染症および関連する病原体はそれぞれの抗原の後の括弧内に示される－当然、括弧内の以下の病原体から誘導され得る他の抗原も本発明により誘導および使用され得る）：

・スパイクタンパク質（Ｓ）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、膜タンパク質（Ｍ）もしくはヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくはバリアント（感染性疾患は「ＣＯＶＩＤ－１９疾患」である；病原体：ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ））；

・スパイクタンパク質（Ｓ）、スパイクＳ１断片（Ｓ１）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、膜タンパク質（Ｍ）またはヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）（感染性疾患はＭＥＲＳ感染症である；病原体：中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳコロナウイルス／ＭＥＲＳ－ＣｏＶ））；

・複製タンパク質Ｅ１、調節タンパク質Ｅ２、タンパク質Ｅ３、タンパク質Ｅ４、タンパク質Ｅ５、タンパク質Ｅ６、タンパク質Ｅ７、タンパク質Ｅ８、メジャーカプシドタンパク質Ｌ１、マイナーカプシドタンパク質Ｌ２（感染性疾患はヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染症である；病原体：ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）またはＨＰＶ１６）；

・融合タンパク質Ｆ、ヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ（ｎｅｕｒａｍｉｄａｓｅ）ＨＮ、糖タンパク質Ｇ、マトリックスタンパク質Ｍ、リンタンパク質Ｐ、核タンパク質Ｎ、ポリメラーゼＬ、ヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ、融合（Ｆ）糖タンパク質Ｆ０、Ｆ１またはＦ２、組換えＨＰＩＶ３／ＨＰＩＶ１融合糖タンパク質（Ｆ）およびヘマグルチニン（ＨＮ）、Ｃタンパク質、リンタンパク質、Ｄタンパク質、マトリックスタンパク質（Ｍ）、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）、ウイルスレプリカーゼ（Ｌ）、非構造Ｖ

タンパク質（感染性疾患はヒトパラインフルエンザウイルス感染症である；病原体：ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ／ＰＩＶ）ＨＰＩＶ－１、ＨＰＩＶ－２、ＨＰＩＶ－３、またはＨＰＩＶ－４血清型、好ましくはＨＰＩＶ－３血清型、好ましくはＰＩＶ－３）；

・融合（Ｆ）糖タンパク質、糖タンパク質Ｇ、リンタンパク質Ｐ、核タンパク質Ｎ、ヌクレオカプシド（Ｎｕｃｌｅｏｃａｐｓｉｎ）タンパク質（感染性疾患：ＨＭＰＶ感染症；病原体：ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ））；

・ヘマグルチニン（ＨＡ）、ノイラミニダーゼ（ＮＡ）、核タンパク質（ＮＰ）、Ｍ１タンパク質、Ｍ２タンパク質、ＮＳ１タンパク質、ＮＳ２タンパク質（ＮＥＰタンパク質：核外輸送タンパク質）、ＰＡタンパク質、ＰＢ１タンパク質（ポリメラーゼ塩基性１タンパク質）、ＰＢ１－Ｆ２タンパク質およびＰＢ２タンパク質、Ｈ１０Ｎ８、Ｈ７Ｎ９、Ｈ１０、Ｈ１Ｎ１、Ｈ３Ｎ２（Ｘ３１）、Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｈ４、Ｈ５、Ｈ６、Ｈ７、Ｈ８、Ｈ９、Ｈ１０、Ｈ１１、Ｈ１２、Ｈ１３、Ｈ１４、Ｈ１５、Ｈ１６、Ｈ１７、Ｈ１８、ＨＡの抗原性サブドメイン、ＨＡ１、ＨＡ２、ノイラミニダーゼ（ＮＡ）、核タンパク質（ＮＰ）、マトリックスタンパク質１（Ｍ１）、マトリックスタンパク質２（Ｍ２）、非構造タンパク質１（ＮＳ１）、非構造タンパク質２（ＮＳ２）、ＨＡ７抗原、Ｈ７またはＨ１０およびＢ、病原体：オルソミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）、インフルエンザウイルス（インフル）またはインフルエンザＡウイルス（ＦＬＵＡＶ）および／またはインフルエンザＢウイルス（ＦＬＵＢＶ））；

・核タンパク質Ｎ、大型構造タンパク質Ｌ、リンタンパク質Ｐ、マトリックスタンパク質Ｍ、糖タンパク質Ｇ、Ｇタンパク質（感染性疾患は狂犬病である；病原体：狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ））；

・ｐ２４抗原、エンベロープタンパク質（Ｇｐ１２０、Ｇｐ４１、Ｇｐ１６０）、ポリタンパク質ＧＡＧ、ネガティブ因子タンパク質Ｎｅｆ、転写のトランス活性化因子Ｔａｔ、Ｂｒｅｃ１（感染性疾患ＨＩＶ；病原体：ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ））；

・主要外膜タンパク質ＭＯＭＰ、可能性が高い外膜タンパク質ＰＭＰＣ、外膜複合タンパク質Ｂ　ＯｍｃＢ、ヒートショックタンパク質Ｈｓｐ６０　ＨＳＰ１０、タンパク質ＩｎｃＡ、ＩＩＩ型分泌系のタンパク質、リボヌクレオチドレダクターゼ小型鎖タンパク質ＮｒｄＢ、プラスミドタンパク質Ｐｇｐ３、クラミジア外側タンパク質Ｎ　ＣｏｐＮ、抗原ＣＴ５２１、抗原ＣＴ４２５、抗原ＣＴ０４３、抗原ＴＣ００５２、抗原ＴＣ０１８９、抗原ＴＣ０５８２、抗原ＴＣ０６６０、抗原ＴＣ０７２６、抗原ＴＣ０８１６、抗原ＴＣ０８２８（感染性疾患：トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）による感染症；病原体：トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）；

・ｐｐ６５抗原、膜タンパク質ｐｐ１５、カプシド近位外被タンパク質ｐｐ１５０、タンパク質Ｍ４５、ＤＮＡポリメラーゼＵＬ５４、ヘリカーゼＵＬ１０５、糖タンパク質ｇＭ、糖タンパク質ｇＮ、糖タンパク質Ｈ、糖タンパク質Ｂ　ｇＢ、タンパク質ＵＬ８３、タンパク質ＵＬ９４、タンパク質ＵＬ９９、ｇＨ　ｇＬ、ｇＢ、ｇＯ、ｇＮ、およびｇＭから選択されるＨＣＭＶ糖タンパク質、ＵＬ８３、ＵＬ１２３、ＵＬ１２８、ＵＬ１３０およびＵＬ１３１Ａから選択されるＨＣＭＶタンパク質、外被タンパク質ｐｐ１５０（ｐｐ１５０）、外被タンパク質ｐｐ６５／下部マトリックスリンタンパク質（ｐｐ６５）、エンベロープ糖タンパク質Ｍ（ＵＬ１００）、調節タンパク質ＩＥ１（ＵＬ１２３）、エンベロープタンパク質（ＵＬ１２８）、エンベロープ糖タンパク質（１３０）、エンベロープタンパク質（ＵＬ１３１Ａ）、エンベロープ糖タンパク質Ｂ（ＵＬ５５）、構造糖タンパク質Ｎ　ｇｐＵＬ７３（ＵＬ７３）、構造糖タンパク質Ｏ　ｇｐＵＬ７４（ＵＬ７４）（感染性疾患はサイトメガロウイルス感染症である；病原体：サイトメガロウイルス（ＣＭＶ／ＨＣＭＶ））；

・カプシドタンパク質Ｃ、膜前駆体タンパク質ｐｒＭ、膜タンパク質Ｍ、エンベロープタンパク質Ｅ（ドメインＩ、ドメインＩＩ、ドメインＩＩ）、タンパク質ＮＳ１、タンパク質ＮＳ２Ａ、タンパク質ＮＳ２Ｂ、タンパク質ＮＳ３、タンパク質ＮＳ４Ａ、タンパク

質２Ｋ、タンパク質ＮＳ４Ｂ、タンパク質ＮＳ５（感染性疾患デング熱；病原体：デング熱ウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４））；

・糖タンパク質（ＧＰ）、表面ＧＰ、野生型プロＧＰ、成熟ＧＰ、分泌野生型プロＧＰ、分泌成熟ＧＰ、核タンパク質（ＮＰ）、ＲＮＡポリメラーゼＬ、ならびにＶＰ３５、ＶＰ４０、ＶＰ２４、およびＶＰ３０から選択されるマトリックスタンパク質（感染性疾患：エボラ；病原体：エボラウイルス（ＥＢＯＶ））；

・Ｂ型肝炎表面抗原ＨＢｓＡｇ、Ｂ型肝炎コア抗原ＨｂｃＡｇ、ポリメラーゼ、タンパク質Ｈｂｘ、プレＳ２、中央表面タンパク質、表面タンパク質Ｌ、大型Ｓタンパク質、ウイルスタンパク質ＶＰ１、ウイルスタンパク質ＶＰ２、ウイルスタンパク質ＶＰ３、ウイルスタンパク質ＶＰ４（感染性疾患はＢ型肝炎である；病原体：Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ））；

・融合タンパク質Ｆ、Ｆタンパク質、核タンパク質Ｎ、マトリックスタンパク質Ｍ、マトリックスタンパク質Ｍ２－１、マトリックスタンパク質Ｍ２－２、リンタンパク質Ｐ、小型疎水性タンパク質ＳＨ、主要表面糖タンパク質Ｇ、ポリメラーゼＬ、非構造タンパク質１　ＮＳ１、非構造タンパク質２　ＮＳ２、ＲＳＶ付着タンパク質（Ｇ）（糖タンパク質Ｇ）、融合（Ｆ）糖タンパク質（糖タンパク質Ｆ）、核タンパク質（Ｎ）、リンタンパク質（Ｐ）、大型ポリメラーゼタンパク質（Ｌ）、マトリックスタンパク質（Ｍ、Ｍ２）、小型疎水性タンパク質（ＳＨ）、非構造タンパク質１（ＮＳ１）、非構造タンパク質２（ＮＳ２）、膜結合ＲＳＶ　Ｆタンパク質、膜結合ＤＳ－Ｃａｖｌ（安定化前融合ＲＳＶＦタンパク質）（感染性疾患は呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）による感染症である：病原体：呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ））；

・分泌抗原ＳｓｓＡ（スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ブドウ球菌食中毒）；分泌抗原ＳｓｓＡ（スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、例えば黄色ブドウ球菌、ブドウ球菌感染症）；

・分子シャペロンＤｎａＫ、細胞表面リポタンパク質Ｍｐｔ８３、リポタンパク質Ｐ２３、リン酸輸送系パーミアーゼタンパク質ｐｓｔＡ、１４ｋＤａ抗原、フィブロネクチン結合タンパク質Ｃ　ＦｂｐＣ１、アラニンデヒドロゲナーゼＴＢ４３、グルタミン合成酵素１、ＥＳＸ－１タンパク質、タンパク質ＣＦＰ１０、ＴＢ１０．４タンパク質、タンパク質ＭＰＴ８３、タンパク質ＭＴＢ１２、タンパク質ＭＴＢ８、Ｒｐｆ様タンパク質、タンパク質ＭＴＢ３２、タンパク質ＭＴＢ３９、クリスタリン、ヒートショックタンパク質ＨＳＰ６５、タンパク質ＰＳＴ－Ｓ（感染性疾患は結核である；病原体：結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ））：

・ゲノムポリタンパク質、タンパク質Ｅ、タンパク質Ｍ、カプシドタンパク質Ｃ、プロテアーゼＮＳ３、タンパク質ＮＳ１、タンパク質ＮＳ２Ａ、タンパク質ＡＳ２Ｂ、タンパク質ＮＳ４Ａ、タンパク質ＮＳ４Ｂ、タンパク質ＮＳ５（感染性疾患は黄熱病である；病原体：黄熱病ウイルス（ＹＦＶ））；

・スポロゾイト周囲タンパク質（ＣＳＰ）（感染性疾患はマラリアである；病原体：熱帯熱マラリア原虫（Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）および三日熱マラリア原虫（Ｐ．ｖｉｖａｘ））；および

・国際公開第２０１７１４０９０５号によるジカウイルスタンパク質、すなわち、カプシドタンパク質（Ｃ）、膜前駆体タンパク質（ｐｒＭ）、ｐｒタンパク質（ｐｒ）、膜タンパク質（Ｍ）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、非構造タンパク質、ｐｒＭＥ抗原、カプシドタンパク質、膜前駆体／膜タンパク質、ＺＩＫＶ非構造タンパク質１、非構造タンパク質２Ａ、非構造タンパク質２Ｂ、非構造タンパク質３、非構造タンパク質４Ａ、非構造タンパク質４Ｂ、非構造タンパク質５、またはジカウイルスエンベロープタンパク質（Ｅ）（ドメインＩＩの融合ループが国際公開第２０１７１４０９０５号により変異している）；国際公開第２０１７１４０９０５号全体を本願明細書に援用する（感染性疾患はジカウイルス感染症である；病原体：ジカウイルス（ＺＩＫＶ））。

【０３３７】

別の実施形態では、感染症を処置する（すなわち、抗原をコードする核酸、好ましくは

ｍＲＮＡを投与することによって）のに有用な抗原は、病原性抗原から選択されてもよく、好ましくは、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、および原生動物抗原からなる群から選択される。

【０３３８】

本発明の一部の実施形態において、抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の本明細書で提供されるＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンのいずれかを対象に投与する工程を含む、対象において抗原特異的免疫応答を誘導する方法についての開示が提供される。

【０３３９】

一部の実施形態において、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンは、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））ワクチンである。他の実施形態において、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンが狂犬病、インフルエンザまたはマラリアワクチンである。

【０３４０】

一部の実施形態において、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンは、インフルエンザワクチンの組合せを含む混合ワクチン（広範囲インフルエンザワクチン）である。一部の実施形態において、抗原特異的免疫応答はＴ細胞応答またはＢ細胞応答を含む。

【０３４１】

一部の実施形態において、抗原特異的免疫応答をもたらす方法は、単回投与（すなわち、ブースタ投与なし）の本開示のＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））ＲＮ

Ａ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンを対象に投与する工程を含む。

【０３４２】

一部の実施形態において、方法は、第２の（ブースタ）投与のＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンを対象に投与する工程をさらに含む。

【０３４３】

一部の実施形態において、対象は、ワクチンの第１の投与または第２の（ブースタ）投与後に少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％）の抗体陽転率を示す。抗体陽転は、特異的抗体が発達し、血液中で検出可能になる期間である。抗体陽転が起こった後、ウイルスを抗体についての血液検査で検出することができる。感染または免疫化中、抗原は血液に侵入し、免疫系が応答して抗体を産生し始める。抗体陽転前は、抗原自体は検出可能な場合と検出可能でない場合があるが、抗体は存在しないと考えられる。抗体陽転中は、抗体は存在するが、まだ検出可能ではない。抗体陽転後はいつでも、抗体を血液中で検出することができ、以前または現在の感染を示す。一部の実施形態において、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンは、皮内注射、筋肉内注射、または鼻腔内投与によって対象に投与される。一部の実施形態において、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンは筋肉内注射によって対象に投与される。

【０３４４】

本開示の一部の実施形態は、対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量のＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａ

ｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンを対象に投与する工程を含む、対象において抗原特異的免疫応答を誘導する方法を提供する。

【０３４５】

対象における抗原特異的免疫応答は、一部の実施形態において、本開示のブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ワクチンのいずれかの対象への投与後に、抗体価（ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））抗原性ポリペプチドに結合する抗体の力価）をアッセイすることによって決定され得る。一部の実施形態において、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体価は、対照に対して少なくとも１ｌｏｇ増加する。一部の実施形態において、対象において産生される抗抗原性ポリペプチド抗体価は、対照に対して１～３ｌｏｇ増加する。

【０３４６】

腫瘍抗原

さらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡは、好ましくは本明細書に定義される腫瘍抗原、またはその断片もしくはバリアントをコードし、腫瘍抗原は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の４７～５１頁に開示される腫瘍抗原からなる群から選択される；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。

【０３４７】
さらに、本発明に、例えばがん処置に有用な、腫瘍またはがん発達に関連するタンパク質に対して向けられた、サイトカイン、ケモカイン、自殺酵素および遺伝子産物、アポトーシス誘導因子、内因性血管新生阻害剤、ヒートショックタンパク質、腫瘍抗原、自然免疫活性化因子、抗体は、限定されるものではないが、国際公開第２０１６１７０１７６号の表１、表２、表３、表４、表５、表６、表７、表８、表９、表１０、表１１および表１２に開示される、腫瘍またはがん発達に関連するタンパク質に対して向けられたサイトカイン、ケモカイン、自殺酵素および遺伝子産物、アポトーシス誘導因子、内因性血管新生阻害剤、ヒートショックタンパク質、腫瘍抗原、自然免疫活性化因子、抗体の群から選択される；国際公開第２０１６１７０１７６号および特に表１～１２全体を本願明細書に援用する。

【０３４８】
他の抗原
本発明に有用なさらなる抗原は、国際公開第２０１８０７８０５３号の４８～５１頁に列挙される；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。

【０３４９】
アレルゲン抗原および自己免疫自己抗原
言及されるように、ｍＲＮＡは、アレルゲン、またはアレルゲン抗原、または自己抗原（ａｕｔｏａｎｔｉｇｅｎ）もしくは自己免疫抗原とも呼ばれる自己抗原を表す抗原をコードし得る。アレルギーまたはアレルギー性疾患に関連するこのような抗原および自己抗原（アレルゲンまたはアレルゲン抗原）は、限定されるものではないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の５９～７３頁に開示される抗原の群から誘導されるか、または好ましくは選択される；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。

【０３５０】
分子療法－酵素補充療法－ｍＲＮＡ補充療法
他の好ましい実施形態では、核酸化合物は、非存在、欠損、もしくは変異したタンパク質を置換する治療用タンパク質；遺伝病もしくは後天性疾患；感染性疾患、もしくは新生物（例えば、がんもしくは腫瘍疾患）を処置するために有益な治療用タンパク質；アジュバントもしくは免疫刺激治療用タンパク質；治療用抗体もしくは抗体断片、バリアント、もしくは誘導体；ペプチドホルモン；遺伝子編集剤；免疫チェックポイント阻害剤；Ｔ細胞受容体、もしくは断片、バリアント、もしくは誘導体Ｔ細胞受容体；および／または酵素をコードする少なくとも１つのコード領域を含むｍＲＮＡである。別の実施形態において、核酸化合物によって発現されるペプチドまたはタンパク質が治療用タンパク質、またはその断片もしくはバリアントであり、治療用タンパク質が遺伝病もしくは後天性疾患の処置もしくは予防に有用であるか、または個体の状態を改善する。特に、治療用タンパク質は、数ある機能の中でも、遺伝子欠損を修飾および修復する、がん細胞もしくは病原体感染細胞を破壊する、免疫系障害を処置もしくは防止する、または代謝もしくは内分泌障害を処置もしくは防止することができる新たな治療剤の設計において重要な役割を果たす。実際、一実施形態において、少なくとも１つのコード配列を含むｍＲＮＡは、
（ａ）ペプチドまたはタンパク質が抗原であり、抗原が、好ましくは、病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原もしくは自己免疫自己抗原、またはその断片もしくはバリアントから誘導される、ペプチドもしくはタンパク質、またはその断片もしくはバリアント；あるいは
（ｂ）治療用タンパク質、またはその断片もしくはバリアント
をコードし得る。治療用タンパク質は、例えば、
（ｉ）代謝、内分泌もしくはアミノ酸障害を処置するための酵素補充療法に使用するため、または非存在、欠損もしくは変異タンパク質の置換に使用するための治療用タンパク質；
（ｉｉ）血液障害、循環系の疾患、呼吸器系の疾患、感染性疾患または免疫不全の処置に使用するための治療用タンパク質；

（ｉｉｉ）がんまたは腫瘍疾患の処置に使用するための治療用タンパク質；
（ｉｖ）ホルモン補充療法に使用するための治療用タンパク質；
（ｖ）体細胞を多能性または全能性幹細胞に再プログラミングするのに使用するための治療用タンパク質；
（ｖｉ）アジュバントまたは免疫賦活として使用するための治療用タンパク質；
（ｖｉｉ）治療用抗体である治療用タンパク質；
（ｖｉｉｉ）遺伝子編集剤である治療用タンパク質；および
（ｉｘ）肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患の処置または防止に使用するための治療用タンパク質
からなる群から選択され得る。

【０３５１】
ｍＲＮＡエレメント
本発明のある特定の実施形態によると、ｍＲＮＡ配列は、好ましくは本明細書に定義されるように、モノ、バイ、またはマルチシストロン性である。バイまたはマルチシストロン性ｍＲＮＡのコード配列は、好ましくは本明細書に定義される別個の抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする。好ましくは、２つ以上の抗原をコードするコード配列は、以下に定義される、少なくとも１つのＩＲＥＳ（内部リボソーム進入部位）配列によって、バイまたはマルチシストロン性ｍＲＮＡに分離され得る。よって、「２つ以上の抗原をコードする」という用語は、これに限定されないが、バイまたはさらにはマルチシストロン性ｍＲＮＡが、例えば、本明細書で提供される定義内の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つもしくはそれ以上の（好ましくは異なる）抗原またはこれらの断片もしくはバリアントをコードし得ることを意味し得る。より好ましくは、これに限定されないが、バイまたはさらにはマルチシストロン性ｍＲＮＡが、例えば、本明細書に定義される少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つもしくはそれ以上の（好ましくは異なる）抗原、または本明細書に定義されるこれらの断片もしくはバリアントをコードし得る。この文脈において、いわゆるＩＲＥＳ（内部リボソーム進入部位）配列は、唯一のリボソーム結合部位として機能することができるが、これはまた、互いに独立に、リボソームによって翻訳される数個の抗原をコードする、上に定義されるバイまたはさらにはマルチシストロン性ｍＲＮＡを提供するよう働くこともできる。本発明により使用することができる、ＩＲＥＳ配列の例としては、ピコルナウイルス（例えば、ＦＭＤＶ）、ペスチウイルス（ＣＦＦＶ）、ポリオウイルス（ＰＶ）、脳心筋炎ウイルス（ＥＣＭＶ）、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、豚熱ウイルス（ＣＳＦＶ）、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）またはコオロギ麻痺ウイルス（ＣｒＰＶ）由来のものである。

【０３５２】
さらなる実施形態によると、本発明によるｍＲＮＡ配列の少なくとも１つのコード領域またはコード配列は、アミノ酸リンカー配列を用いてまたは用いないで連結された本明細書に定義される少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つおよびそれ以上の抗原またはその断片もしくはバリアントをコードし得、前記リンカー配列はリジッドリンカー、フレキシブルリンカー、切断可能なリンカー（例えば、自己切断ペプチド）またはこれらの組合せを含むことができる。その中で、抗原は同一であっても、異なっていても、その組合せであってもよい。特定の抗原組合せは、本明細書で説明される少なくとも２つの抗原をコードする前記ｍＲＮＡによってコードされ得る（本明細書においては「マルチ抗原構築物／ｍＲＮＡ」とも呼ばれる）。

【０３５３】
別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡは、そのアミノ酸配列がそれぞれの野生型アミノ酸配列に関して修飾されていない病原性抗原をコードする。この場合、ｍＲＮＡ化合物は、それぞれの野生型ｍＲＮＡ配列に関して修飾されていない核酸配列と共にコード領域も含み得る。例えば、ｍＲＮＡ化合物は天然および非修飾ｍＲＮＡであり得る。本明細書で使用される場合、天然および非修飾ｍＲＮＡは、化学修飾も配列の変化も有さない、

インビトロで生成されたｍＲＮＡを包含する。

【０３５４】

自己複製ＲＮＡ

一実施形態において、本発明の核酸、特にＲＮＡ配列は自己複製が可能である。したがって、ポリヌクレオチドは、宿主細胞に導入されると、自己複製が可能であり得る。例えば、ポリヌクレオチドの例としては、例えば、レプリコン、プラスミド、コスミド、ファージミド、トランスポゾン、ウイルスベクター、人工染色体（例えば、細菌、酵母等）ならびに他の自己複製種から選択される自己複製ＲＮＡおよびＤＮＡが挙げられる。ポリヌクレオチドには、真核生物または原核生物から誘導される天然または合成配列（例えば、ゲノムＤＮＡ配列、ゲノムＲＮＡ配列、ｃＤＮＡ配列等）が挿入された自己複製ポリヌクレオチドが含まれる。自己複製ポリヌクレオチドの具体的な例としては、中でも、ＲＮＡベクター構築物およびＤＮＡベクター構築物が挙げられる。発現され得る配列は、中でも、天然配列ならびに天然配列に対する欠失、付加および置換（一般的に本質的に保存的）などの修飾を含む。これらの修飾は、部位特異的突然変異導入を通すように意図的であっても、抗原を産生する宿主の突然変異を通すように偶発的であってもよい。一態様において、自己複製ＲＮＡ分子は、アルファウイルスから誘導されるか、またはアルファウイルスに基づく。他の態様において、自己複製ＲＮＡ分子は、アルファウイルス以外のウイルス、好ましくは、プラス鎖ＲＮＡウイルス、より好ましくはピコルナウイルス、フラビウイルス、ルビウイルス、ペスチウイルス、ヘパシウイルス、カリシウイルス、またはコロナウイルスから誘導されるか、またはこれらに基づく。好適な野生型アルファウイルス配列は周知であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）［メリーランド州ロックビル（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ）所在］などの配列保管所から入手可能である。好適なアルファウイルスの代表的な例としては、アウラ（Ａｕｒａ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－３６８）、ベバル（Ｂｅｂａｒｕ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－６００、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４０）、カバソウ（Ｃａｂａｓｓｏｕ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－９２２）、チクングニア（Ｃｈｉｋｕｎｇｕｎｙａ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－６４、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４１）、東部ウマ脳炎ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－６５、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４２）、フォートモーガン（Ｆｏｒｔ Ｍｏｒｇａｎ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－９２４）、ゲタ（Ｇｅｔａｈ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－３６９、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４３）、キジラガッチ（Ｋｙｚｙｌａｇａｃｈ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－９２７）、マヤロ（Ｍａｙａｒｏ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－６６）、マヤロ（Ｍａｙａｒｏ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－１２７７）、ミドルブルグ（Ｍｉｄｄｌｅｂｕｒｇ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７０）、ムカンボ（Ｍｕｃａｍｂｏ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－５８０、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４４）、ヌドゥム（Ｎｄｕｍｕ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７１）、ピクスナ（Ｐｉｘｕｎａ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７２、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４５）、ロスリバー（Ｒｏｓｓ Ｒｉｖｅｒ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７３、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４６）、セムリキ森林（Ｓｅｍｌｉｋｉ Ｆｏｒｅｓｔ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－６７、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４７）、シンドビス（Ｓｉｎｄｂｉｓ）ウイルス（ＡＴＣＣ ＶＲ－６８、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４８）、トナテ（Ｔｏｎａｔｅ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－９２５）、トリニチ（Ｔｒｉｎｉｔｉ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－４６９）、ウナ（Ｕｎａ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７４）、ベネズエラウマ脳炎（ＡＴＣＣ ＶＲ－６９、ＡＴＣＣ ＶＲ－９２３、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２５０、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２４９、ＡＴＣＣ ＶＲ－５３２）、西部ウマ脳炎（ＡＴＣＣ ＶＲ－７０、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２５１、ＡＴＣＣ ＶＲ－６２２、ＡＴＣＣ ＶＲ－１２５２）、ワタロア（Ｗｈａｔａｒｏａ）（ＡＴＣＣ ＶＲ－９２６）、およびＹ－６２－３３（ＡＴＣＣ ＶＲ－３７５）が挙げられる。

【０３５５】

ｍＲＮＡ修飾および配列

本発明の別の実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は人工ｍＲＮＡを含む。この文脈において、人工ｍＲＮＡは、化学修飾、配列修飾または非天然配列を有するｍＲＮＡを包含す

る。
【０３５６】
化学修飾
本発明の別の実施形態によると、組成物に含まれるｍＲＮＡ化合物は少なくとも１つの化学修飾を含む。一実施形態において、化学修飾は、塩基修飾、糖修飾、骨格修飾、および脂質修飾からなる群から選択され得る。本発明に関する骨格修飾は、本明細書に定義されるｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物に含有されるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学修飾される修飾である。本発明に関する糖修飾は、本明細書に定義されるｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物のヌクレオチドの糖の化学修飾である。さらに、本発明に関する塩基修飾は、ｍＲＮＡを含むｍＲＮＡ化合物のヌクレオチドの塩基部分の化学修飾である。この文脈において、ヌクレオチド類似体または修飾は、好ましくは転写および／または翻訳に適用可能な、ヌクレオチド類似体から選択される。
【０３５７】
糖修飾
本明細書に記載されるｍＲＮＡ配列を含む修飾ｍＲＮＡ化合物に組み込まれ得る、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、糖部分が修飾され得る。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換され得る。「オキシ」－２’ヒドロキシル基修飾の例としては、限定されるものではないが、アルコキシまたはアリールオキシ（－ＯＲ、例えば、Ｒ＝Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、－Ｏ（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎＣＨ２ＣＨ２ＯＲ；２’ヒドロキシルが、例えばメチレン架橋によって、同じリボース糖の４’炭素に結合している「ロック（ｌｏｃｋｅｄ）」核酸（ＬＮＡ）；およびアミノ基（アミノ基、例えば、ＮＲＲがアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノであり得る、－Ｏ－アミノ）またはアミノアルコキシが挙げられる。
【０３５８】
「デオキシ」修飾は、水素、アミノ（例えば、ＮＨ２；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸）を含む；またはアミノ基がリンカーを通して糖に結合していてもよく、リンカーが原子Ｃ、Ｎ、およびＯの１つまたは複数を含む。
【０３５９】
糖基はまた、リボースの対応する炭素と反対の立体化学配置を有する１個または複数の炭素を含有することができる。よって、修飾ｍＲＮＡは、例えば、糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。
【０３６０】
骨格修飾
骨格のリン酸基は、酸素原子の１個または複数を異なる置換基で置換することによって修飾され得る。さらに、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、非修飾リン酸部分の本明細書に記載される修飾リン酸による完全な置換を含むことができる。修飾リン酸基の例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが挙げられる。ホスホロジチオエートは共に硫黄によって置換された非連結酸素を有する。リン酸リンカーはまた、連結酸素の窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）および炭素（架橋メチレン－ホスホネート）による置換によっても修飾され得る。
【０３６１】
脂質修飾
脂質修飾ｍＲＮＡは、典型的にはｍＲＮＡと共有結合的に連結した少なくとも１つのリンカー、およびそれぞれのリンカーと共有結合的に連結した少なくとも１つの脂質を含む

。あるいは、脂質修飾ｍＲＮＡは、少なくとも１つの本明細書に定義されるｍＲＮＡ、およびそのｍＲＮＡと共有結合的に連結した（リンカーを用いないで）少なくとも１つの（二官能性）脂質を含む。第３の代替によると、脂質修飾ｍＲＮＡは、本明細書に定義されるｍＲＮＡ分子、そのｍＲＮＡと共有結合的に連結した少なくとも１つのリンカー、およびそれぞれのリンカーと共有結合的に連結した少なくとも１つの脂質、およびまたそのｍＲＮＡと共有結合的に連結した（リンカーを用いないで）少なくとも１つの（二官能性）脂質を含む。この文脈において、脂質修飾が直鎖ｍＲＮＡ配列の末端に存在することが特に好ましい。

【０３６２】

別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、ヌクレオシド修飾を含まない、特に塩基修飾を含まない。さらなる実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、１－メチルシュードウリジン修飾も、シュードウリジン修飾も、５－メチルウリジン修飾も含まない。１つの好ましい実施形態において、ｍＲＮＡは天然に存在するヌクレオシドのみを含む。さらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物はいずれの化学修飾も含まず、場合により配列修飾を含む。本発明のさらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、天然に存在するヌクレオシドアデニン、ウラシル、グアニンおよびシトシンのみを含む。

【０３６３】

塩基修飾

代替実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は少なくとも１つの塩基修飾を含む。

本明細書に記載されるｍＲＮＡ配列を含む修飾ｍＲＮＡ化合物に組み込まれ得る、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、核酸塩基部分がさらに修飾され得る。ｍＲＮＡに見られる核酸塩基の例としては、限定されるものではないが、アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルが挙げられる。例えば、本明細書に記載されるヌクレオシドおよびヌクレオチドは、主溝面上で化学修飾され得る。一部の実施形態において、主溝化学修飾は、アミノ基、チオール基、アルキル基、またはハロ基を含むことができる。

【０３６４】

本発明の特に好ましい実施形態において、ヌクレオチド類似体／修飾は、好ましくは２－アミノ－６－クロロプリンリボシド－５’－トリホスフェート、２－アミノプリン－リボシド－５’－トリホスフェート、２－アミノアデノシン－５’－トリホスフェート、２’－アミノ－２’－デオキシシチジン－トリホスフェート、２－チオシチジン－５’－トリホスフェート、２－チオウリジン－５’－トリホスフェート、２’－フルオロチミジン－５’－トリホスフェート、２’－Ｏ－メチル－イノシン－５’－トリホスフェート、４－チオウリジン－５’－トリホスフェート、５－アミノアリルシチジン－５’－トリホスフェート、５－アミノアリルウリジン－５’－トリホスフェート、５－ブロモシチジン－５’－トリホスフェート、５－ブロモウリジン－５’－トリホスフェート、５－ブロモ－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５－ブロモ－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、５－ヨードシチジン－５’－トリホスフェート、５－ヨード－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５－ヨードウリジン－５’－トリホスフェート、５－ヨード－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、５－メチルシチジン－５’－トリホスフェート、５－メチルウリジン－５’－トリホスフェート、５－プロピニル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５－プロピニル－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、６－アザシチジン－５’－トリホスフェート、６－アザウリジン－５’－トリホスフェート、６－クロロプリンリボシド－５’－トリホスフェート、７－デアザアデノシン－５’－トリホスフェート、７－デアザグアノシン－５’－トリホスフェート、８－アザアデノシン－５’－トリホスフェート、８－アジドアデノシン－５’－トリホスフェート、ベンズイミダゾール－リボシド－５’－トリホスフェート、Ｎ１－メチルアデノシン－５’－トリホスフェート、Ｎ１－メチルグアノシン－５’－トリホスフェート、Ｎ６－メチルアデノシン－５’－トリホスフェート、Ｏ６－メチルグアノシン－５’－トリホスフェート、シュードウリジン－５’－トリホスフェート、またはピューロマイシン－５’－トリホスフェート、キサントシン－５’－トリホスフェートから選択される、塩基

修飾から選択される。５－メチルシチジン－５’－トリホスフェート、７－デアザグアノシン－５’－トリホスフェート、５－ブロモシチジン－５’－トリホスフェート、およびシュードウリジン－５’－トリホスフェートからなる塩基修飾ヌクレオチドの群から選択される塩基修飾についてのヌクレオチドが特に好ましい。一部の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、ピリジン－４－オンリボヌクレオシド、５－アザ－ウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオウリジン、４－チオ－シュードウリジン、２－チオ－シュードウリジン、５－ヒドロキシウリジン、３－メチルウリジン、５－カルボキシメチル－ウリジン、１－カルボキシメチル－シュードウリジン、５－プロピニル－ウリジン、１－プロピニル－シュードウリジン、５－タウリノメチルウリジン、１－タウリノメチル－シュードウリジン、５－タウリノメチル－２－チオ－ウリジン、１－タウリノメチル－４－チオ－ウリジン、５－メチル－ウリジン、１－メチル－シュードウリジン、４－チオ－１－メチル－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－シュードウリジン、１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－ジヒドロシュードウリジン、２－メトキシウリジン、２－メトキシ－４－チオウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、および４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジンを含む。一部の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、５－アザ－シチジン、シュードイソシチジン、３－メチル－シチジン、Ｎ４－アセチルシチジン、５－ホルミルシチジン、Ｎ４－メチルシチジン、５－ヒドロキシメチルシチジン、１－メチル－シュードイソシチジン、ピロロ－シチジン、ピロロ－シュードイソシチジン、２－チオ－シチジン、２－チオ－５－メチル－シチジン、４－チオ－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－シュードイソシチジン、４－チオ－１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、１－メチル－１－デアザ－シュードイソシチジン、ゼブラリン、５－アザ－ゼブラリン、５－メチル－ゼブラリン、５－アザ－２－チオ－ゼブラリン、２－チオ－ゼブラリン、２－メトキシ－シチジン、２－メトキシ－５－メチル－シチジン、４－メトキシ－シュードイソシチジン、および４－メトキシ－１－メチル－シュードイソシチジンを含む。他の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－アデニン、７－デアザ－８－アザ－アデニン、７－デアザ－２－アミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２－アミノプリン、７－デアザ－２，６－ジアミノプリン、７－デアザ－８－アザ－２，６－ジアミノプリン、１－メチルアデノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン、Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、２－メチルチオ－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン、Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン、７－メチルアデニン、２－メチルチオ－アデニン、および２－メトキシ－アデニンを含む。他の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、イノシン、１－メチル－イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、７－デアザ－グアノシン、７－デアザ－８－アザ－グアノシン、６－チオ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－グアノシン、６－チオ－７－デアザ－８－アザ－グアノシン、７－メチル－グアノシン、６－チオ－７－メチル－グアノシン、７－メチルイノシン、６－メトキシ－グアノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ２－メチルグアノシン、Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン、８－オキソ－グアノシン、７－メチル－８－オキソ－グアノシン、１－メチル－６－チオ－グアノシン、Ｎ２－メチル－６－チオ－グアノシン、およびＮ２，Ｎ２－ジメチル－６－チオ－グアノシンを含む。一部の実施形態において、ヌクレオチドは、主溝面上で修飾され得、ウラシルのＣ－５上の水素のメチル基またはハロ基による置換を含むことができる。具体的な実施形態において、修飾ヌクレオシドは、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－アデノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－シチジン、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－グアノシン、５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－ウリジンまたは５’－Ｏ－（１－チオホスフェート）－シュードウリジンである。

【０３６５】

さらに具体的な実施形態において、修飾ｍＲＮＡは、６－アザ－シチジン、２－チオ－シチジン、α－チオ－シチジン、シュード－イソ－シチジン、５－アミノアリル－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５，６－ジヒドロウリジン、α－チオ－ウリジン、４－チオ－ウリジン、６－アザ－ウリジン、５－ヒドロキシ－ウリジン、デオキシ－チミジン、５－メチル－ウリジン、ピロロ－シチジン、イノシン、α－チオ－グアノシン、６－メチル－グアノシン、５－メチル－シチジン、８－オキソ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、Ｎ１－メチル－アデノシン、２－アミノ－６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－２－アミノ－プリン、シュード－イソ－シチジン、６－クロロ－プリン、Ｎ６－メチル－アデノシン、α－チオ－アデノシン、８－アジド－アデノシン、７－デアザ－アデノシンから選択されるヌクレオシド修飾を含み得る。

【０３６６】

さらなる実施形態において、化学修飾は、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、Ｎ１－エチルシュードウリジン、２－チオウリジン、４’－チオウリジン、５－メチルシトシン、５－メチルウリジン、２－チオ－１－メチル－１－デアザ－プソイドウリジン、２－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、２－チオ－ジヒドロウリジン、２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－２－チオ－プソイドウリジン、４－メトキシ－プソイドウリジン、４－チオ－１－メチル－プソイドウリジン、４－チオ－プソイドウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、５－メトキシウリジンおよび２’－Ｏ－メチルウリジンから選択される。

【０３６７】

具体的な実施形態において、化学修飾は、シュードウラシル（プシー（ｐｓｉ）またはψ）、Ｎ１－メチルシュードウラシル（Ｎ１ＭＰＵ、Ｎ１ＭプシーまたはＮ１Ｍψ）、１－エチルシュードウラシル、２－チオウラシル（ｓ２Ｕ）、４－チオウラシル、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、化学修飾はＮ１－メチルシュードウラシル（Ｎ１ＭＰＵ、Ｎ１ＭプシーまたはＮ１Ｍψ）である。

【０３６８】

配列修飾

さらなる実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物は修飾ｍＲＮＡ配列を含む。例えば、ｍＲＮＡ配列の修飾は、ｍＲＮＡ配列の安定化をもたらし得る。一実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、少なくとも１つの本明細書に定義されるコード領域を含む安定化ｍＲＮＡ配列を含む。特に、本明細書に記載される本発明の組成物は、本明細書に記載される実施形態のいずれかに定義されるような、抗原をコードするコード領域を含むｍＲＮＡ化合物を含み得、前記コード領域は配列修飾を示す。

【０３６９】

一実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物は、「安定化ｍＲＮＡ配列」、すなわち、インビボ分解（例えば、エキソ－またはエンド－ヌクレアーゼによる）に対して本質的に耐性のｍＲＮＡを含む。このような安定化は、例えば、本発明のｍＲＮＡの修飾リン酸骨格によってもたらされ得る。本発明に関する骨格修飾は、ｍＲＮＡに含有されるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学修飾される修飾である。好ましくはこれに関して使用され得るヌクレオチドは、例えばホスホロチオエート修飾リン酸骨格を含有し、好ましくはリン酸骨格に含有されるリン酸酸素の少なくとも１個が硫黄原子によって置換されている。安定化ｍＲＮＡは、例えば：帯電したリン酸酸素がアルキルもしくはアリール基によって置換されているアルキルおよびアリールホスホネート、または帯電した酸素残基がアルキル化形態で存在する、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステルなどの非イオン性リン酸類似体をさらに含み得る。このような骨格修飾は、典型的には、いかなる限定も意味しないが、メチルホスホネート、ホスホロアミダートおよびホスホロチオエート（例えば、シチジン－５’－Ｏ－（１－チオホスフェート））からなる群の修飾を含む。

【０３７０】

以下では、好ましくは本明細書に定義されるｍＲＮＡを「安定化する」ことができる具体的な修飾を記載する。

Ｇ／Ｃ含量修飾

一実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物は、そのグアノシン／シトシン（Ｇ／Ｃ）含量の修飾によって、修飾、よって安定化されているｍＲＮＡ配列を含む。このような修飾、またはこれらの修飾の少なくとも１つは、ｍＲＮＡ化合物のコード領域に位置する。

【０３７１】

１つの好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物のコード領域のＧ／Ｃ含量は、それぞれの野生型ｍＲＮＡ、すなわち、非修飾ｍＲＮＡのコード領域のＧ／Ｃ含量と比較して増加している。同時に、ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸配列は、好ましくは、それぞれの野生型ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸配列と比較して修飾されていない。例えば、上記の組成物は、そのアミノ酸配列がそれぞれの野生型核酸のコードアミノ酸配列に関して修飾されていない病原性抗原をコードするｍＲＮＡ化合物を含み得る。

【０３７２】

本発明のｍＲＮＡ配列のこの修飾は、翻訳されるいずれのｍＲＮＡ領域の配列もそのｍＲＮＡの効率的な翻訳にとって重要であるという事実に基づく。よって、ｍＲＮＡの組成および様々なヌクレオチドの配列が重要である。特に、増加したＧ（グアノシン）／Ｃ（シトシン）含量を有する配列は、増加したＡ（アデノシン）／Ｕ（ウラシル）含量を有する配列よりも安定である。したがって、本発明によると、ｍＲＮＡのコドンは、増加した量のＧ／Ｃヌクレオチドを含むように、翻訳されたアミノ酸配列を保持しながら、それぞれの野生型ｍＲＮＡと比較して変動する。いくつかのコドンは１つの、同じアミノ酸をコードするという事実（いわゆる、遺伝暗号の縮重）に関して、安定性にとって最も有利なコドンを決定することができる（いわゆる、代替コドン使用頻度）。ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸に応じて、その野生型配列と比較して、ｍＲＮＡ配列の修飾についての様々な可能性が存在する。もっぱらＧまたはＣヌクレオチドを含有するコドンによってコードされるアミノ酸の場合、コドンの修飾は必要ではない。よって、Ｐｒｏ（ＣＣＣまたはＣＣＧ）、Ａｒｇ（ＣＧＣまたはＣＧＧ）、Ａｌａ（ＧＣＣまたはＧＣＧ）およびＧｌｙ（ＧＧＣまたはＧＧＧ）のコドンは、ＡもＵも存在しないので、修飾を要さない。対照的に、Ａおよび／またはＵヌクレオチドを含有するコドンは、同じアミノ酸をコードするが、Ａおよび／またはＵを含有しない他のコドンの置換によって修飾され得る。これらの例としては以下がある：ＰｒｏのコドンはＣＣＵまたはＣＣＡからＣＣＣまたはＣＣＧに修飾され得る；ＡｒｇのコドンはＣＧＵまたはＣＧＡまたはＡＧＡまたはＡＧＧからＣＧＣまたはＣＧＧに修飾され得る；ＡｌａのコドンはＧＣＵまたはＧＣＡからＧＣＣまたはＧＣＧに修飾され得る；ＧｌｙのコドンはＧＧＵまたはＧＧＡからＧＧＣまたはＧＧＧに修飾され得る。他の場合、ＡヌクレオチドもＵヌクレオチドもコドンから排除することができないが、より低い含量のＡおよび／またはＵヌクレオチドを含有するコドンを使用することによって、ＡおよびＵ含量を減少させることが可能である。これらの例としては以下がある：ＰｈｅのコドンはＵＵＵからＵＵＣに修飾され得る；ＬｅｕのコドンはＵＵＡ、ＵＵＧ、ＣＵＵまたはＣＵＡからＣＵＣまたはＣＵＧに修飾され得る；ＳｅｒのコドンはＵＣＵまたはＵＣＡまたはＡＧＵからＵＣＣ、ＵＣＧまたはＡＧＣに修飾され得る；ＴｙｒのコドンはＵＡＵからＵＡＣに修飾され得る；ＣｙｓのコドンはＵＧＵからＵＧＣに修飾され得る；ＨｉｓのコドンはＣＡＵからＣＡＣに修飾され得る；ＧｌｎのコドンはＣＡＡからＣＡＧに修飾され得る；ＩｌｅのコドンはＡＵＵまたはＡＵＡからＡＵＣに修飾され得る；ＴｈｒのコドンはＡＣＵまたはＡＣＡからＡＣＣまたはＡＣＧに修飾され得る；ＡｓｎのコドンはＡＡＵからＡＡＣに修飾され得る；ＬｙｓのコドンはＡＡＡからＡＡＧに修飾され得る；ＶａｌのコドンはＧＵＵまたはＧＵＡからＧＵＣまたはＧＵＧに修飾され得る；ＡｓｐのコドンはＧＡＵからＧＡＣに修飾され得る；ＧｌｕのコドンはＧＡＡからＧＡＧに修飾され得る；終止コドンＵＡＡはＵＡＧまたはＵＧＡに修飾され得る。他方、Ｍｅｔ（ＡＵＧ）およびＴｒｐ（ＵＧＧ）のコドンの場合、配列修飾の可能性がない。上に列挙される置換を個別にまたは全ての可能な組合せで使用して、本発明のｍＲＮ

Ａ配列のＧ／Ｃ含量をその特定の野生型ｍＲＮＡ（すなわち、元の配列）と比較して増加させることができる。よって、例えば、野生型配列で存在するＴｈｒの全てのコドンがＡＣＣ（またはＡＣＧ）に修飾され得る。しかしながら、好ましくは、例えば、上記置換の可能性の組合せが使用される：

－元の配列（野生型ｍＲＮＡ）のＴｈｒをコードする全てのコドンのＡＣＣ（またはＡＣＧ）への置換、および

－Ｓｅｒを元々コードする全てのコドンのＵＣＣ（またはＵＣＧまたはＡＧＣ）への置換；

－元の配列でＩｌｅをコードする全てのコドンのＡＵＣへの置換、および

－Ｌｙｓを元々コードする全てのコドンのＡＡＧへの置換、および

－Ｔｙｒを元々コードする全てのコドンのＵＡＣへの置換；

－元の配列でＶａｌをコードする全てのコドンのＧＵＣ（またはＧＵＧ）への置換、および

－Ｇｌｕを元々コードする全てのコドンのＧＡＧへの置換、および

－Ａｌａを元々コードする全てのコドンのＧＣＣ（またはＧＣＧ）への置換、および

－Ａｒｇを元々コードする全てのコドンのＣＧＣ（またはＣＧＧ）への置換；

－元の配列でＶａｌをコードする全てのコドンのＧＵＣ（またはＧＵＧ）への置換、および

－Ｇｌｕを元々コードする全てのコドンのＧＡＧへの置換、および

－Ａｌａを元々コードする全てのコドンのＧＣＣ（またはＧＣＧ）への置換、および

－Ｇｌｙを元々コードする全てのコドンのＧＧＣ（またはＧＧＧ）への置換、および

－Ａｓｎを元々コードする全てのコドンのＡＡＣへの置換；

－元の配列でＶａｌをコードする全てのコドンのＧＵＣ（またはＧＵＧ）への置換、および

－Ｐｈｅを元々コードする全てのコドンのＵＵＣへの置換、および

－Ｃｙｓを元々コードする全てのコドンのＵＧＣへの置換、および

－Ｌｅｕを元々コードする全てのコドンのＣＵＧ（またはＣＵＣ）への置換、および

－Ｇｌｎを元々コードする全てのコドンのＣＡＧへの置換、および

－Ｐｒｏを元々コードする全てのコドンのＣＣＣ（またはＣＣＧ）への置換；等。

【０３７３】

好ましくは、本発明のｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物のコード領域のＧ／Ｃ含量が、本明細書中に定義される抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする野生型ＲＮＡのコード領域のＧ／Ｃ含量と比較して、少なくとも７％、より好ましくは少なくとも１５％、特に好ましくは少なくとも２０％増加する。具体的な実施形態によると、本明細書に定義されるペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリアントをコードする領域あるいは野生型ｍＲＮＡ配列の全配列の置換可能なコドンの少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、より好ましくは少なくとも７０％、さらにより好ましくは少なくとも８０％、最も好ましくは少なくとも９０％、９５％またはさらには１００％が置換され、それによって、前記配列のＧ／Ｃ含量が増加する。この文脈において、本発明のｍＲＮＡ配列、好ましくは本発明によるｍＲＮＡ配列の少なくとも１つのコード領域のＧ／Ｃ含量を、野生型配列と比較して最大限に（すなわち、置換可能なコドンの１００％）増加させることが特に好ましい。本発明によると、本発明のｍＲＮＡ配列のさらに好ましい修飾は、翻訳効率が細胞中のｔＲＮＡの出現の異なる頻度によっても決定されるという所見に基づく。よって、いわゆる「希少コドン」が本発明のｍＲＮＡ配列中に増加した程度に存在する場合、対応する修飾ｍＲＮＡ配列が、比較的「頻度が高い」ｔＲＮＡをコードするコドンが存在する場合よりも有意に低い程度に翻訳される。本発明によると、本発明の修飾ｍＲＮＡ配列において、本明細書に定義されるペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリアントをコードする領域は、細胞中で比較的希少なｔＲＮＡをコードする野生型配列の少なくとも１つのコドンが、細胞中で比較的頻度が高く、比較的希少なｔＲＮＡと同じアミノ酸を運ぶｔＲＮＡをコードするコドンと

交換されるように、野生型ｍＲＮＡ配列の対応する領域と比較して修飾される。この修飾によって、本発明のｍＲＮＡの配列が、頻繁に存在するｔＲＮＡが利用可能なコドンが挿入されるように修飾される。換言すれば、本発明によると、この修飾によって、細胞中で比較的希少なｔＲＮＡをコードする野生型配列の全てのコドンが、各場合で、細胞中で比較的頻度が高く、各場合で、比較的希少なｔＲＮＡと同じアミノ酸を運ぶｔＲＮＡをコードするコドンに交換され得る。どのｔＲＮＡが細胞中で比較的高い頻度で存在し、対照的に、どれが比較的希少で存在するのかは当業者に公知である；例えば、アカシ（Ａｋａｓｈｉ）、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．２００１、１１（６）：６６０－６６６を参照されたい。特定のアミノ酸について、最も頻繁に存在するｔＲＮＡを使用するコドン、例えば、（ヒト）細胞中で最も頻繁に存在する、ｔＲＮＡを使用する、Ｇｌｙコドンが特に好ましい。本発明によると、本発明の修飾ｍＲＮＡ配列において、増加、特に最大化される連続的Ｇ／Ｃ含量を、ｍＲＮＡ配列のコード領域によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を修飾することなく、「頻度が高い」コドンと連結させることが特に好ましい。この好ましい実施形態により、本発明の特に効率的に翻訳される、安定化（修飾）ｍＲＮＡ配列の提供が可能になる。上記の本発明の修飾ｍＲＮＡ配列（増加したＧ／Ｃ含量；ｔＲＮＡの交換）の決定は、その開示の内容が本発明の全範囲に含まれる、国際公開第２００２０９８４４３号に説明されるコンピュータプログラムを使用して行うことができる。このコンピュータプログラムを使用して、最大のＧ／Ｃ含量が、細胞中で可能な限り高い頻度で存在するｔＲＮＡをコードするコドンの使用と組み合わせて、好ましくは非修飾配列と比較して修飾されていない修飾ｍＲＮＡ配列によってコードされるアミノ酸配列をもたらすように、所望のｍＲＮＡ配列のヌクレオチド配列を遺伝暗号またはその縮重性質を用いて修飾することができる。あるいは、元の配列と比較して、Ｇ／Ｃ含量のみ、またはコドン使用頻度のみを修飾することも可能である。Ｖｉｓｕａｌ Ｂａｓｉｃ ６．０のソースコード（使用した開発環境：サービスパック３を用いたマイクロソフト・ビジュアル・スタジオ・エンタープライズ６．０（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｔｕｄｉｏ Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅ ６．０ ｗｉｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｐａｃｋ ３））も国際公開第０２／０９８４４３号に記載される。本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明のｍＲＮＡ配列のリボソーム結合部位の環境中のＡ／Ｕ含量が、そのそれぞれの野生型ｍＲＮＡのリボソーム結合部位の環境中のＡ／Ｕ含量と比較して増加している。この修飾（リボソーム結合部位の周りの増加したＡ／Ｕ含量）によって、リボソームのｍＲＮＡへの結合効率が増加する。リボソームのリボソーム結合部位への有効な結合（コザック配列：配列番号１または配列番号２、ＡＵＧは開始コドンを形成する、または最小コザック結合部位ＡＣＣ）が、今度は、ｍＲＮＡの効率的な翻訳の効果を有する。本発明のさらなる実施形態によると、本発明のｍＲＮＡ配列は、潜在的不安定化配列エレメントに関して修飾され得る。特に、このｍＲＮＡ配列のコード領域ならびに／あるいは５’および／または３’非翻訳領域は、修飾ｍＲＮＡ配列のコードアミノ酸配列が好ましくはそのそれぞれの野生型ｍＲＮＡと比較して修飾されないで、不安定化配列エレメントを含有しないように、それぞれの野生型ｍＲＮＡと比較して修飾され得る。例えば、真核生物ｍＲＮＡの配列において、シグナルタンパク質が結合し、インビボでｍＲＮＡの酵素分解を調節する、不安定化配列エレメント（ＤＳＥ）が存在することが知られている。したがって、場合により少なくとも１つの本明細書に定義されるペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリアントをコードする領域における、修飾ｍＲＮＡ配列のさらなる安定化のために、不安定化配列エレメントが全くまたは実質的にそこに含有されないように、野生型ｍＲＮＡの対応する領域と比較した１つまたは複数のこのような修飾を行うことができる。本発明によると、非翻訳領域（３’－および／または５’－ＵＴＲ）に存在するＤＳＥも、このような修飾によって、本発明のｍＲＮＡ配列から排除することができる。このような不安定化配列は、例えば、多数の不安定なｍＲＮＡの３’－ＵＴＲセクションに存在する、ＡＵリッチ配列（ＡＵＲＥＳ）である（カプトら（Ｃａｐｕｔ ｅｔ ａｌ．）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９８６、８３：１６７０－１６７４）。したがって、本発明のｍＲＮＡ配列は、好ましくは本発明のｍＲＮＡ配列

がこのような不安定化配列を含有しないように、それぞれの野生型ｍＲＮＡと比較して修飾される。これはまた、可能なエンドヌクレアーゼによって認識される配列モチーフ、例えば、トランスフェリン受容体をコードする遺伝子の３’－ＵＴＲセグメントに含有される、配列ＧＡＡＣＡＡＧにも当てはまる（バインダーら（Ｂｉｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、ＥＭＢＯ　Ｊ．１９９４、１３：１９６９－１９８０）。これらの配列モチーフも、好ましくは本発明のｍＲＮＡ配列において除去される。

【０３７４】

さらなる実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物は、国際公開第２０１８０７８０５３号の表１～表５、図２０～図２４または配列表に開示されるＲＮＡ配列のいずれか１つを含むか、またはからなるコード領域を含むｍＲＮＡ配列を含む；国際公開第２０１８０７８０５３号の表１～表５または図２０～図２４；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。

【０３７５】

ヒトコドン使用頻度に適合した配列

ｍＲＮＡ化合物のさらに好ましい修飾は、同じアミノ酸をコードするコドンが、典型的には異なる頻度で存在するという所見に基づく。この実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物のコード領域中の同じアミノ酸をコードするコドンの頻度は、例えば表２（ヒトコドン使用頻度表）に示されるヒトコドン使用頻度に従ってそのコドンの天然に存在する頻度とは異なる。例えば、アミノ酸アラニン（Ａｌａ）の場合、野生型コード領域は、好ましくは、コドン「ＧＣＣ」が０．４０の頻度で使用され、コドン「ＧＣＴ」が０．２８の頻度で使用され、コドン「ＧＣＡ」が０．２２の頻度で使用され、コドン「ＧＣＧ」が０．１０の頻度で使用される等のように、適合される（表２参照）。

【０３７６】

【表７】

表２：ヒトコドン使用頻度表、最も頻度の高いコドンはアスタリスクでマークされる

アミノ酸	コドン	画分	／1000	アミノ酸	コドン	画分	／1000
Ala	GCG	0.10	7.4	Pro	CCG	0.11	6.9
Ala	GCA	0.22	15.8	Pro	CCA	0.27	16.9
Ala	GCT	0.28	18.5	Pro	CCT	0.29	17.5
Ala	GCC*	0.40	27.7	Pro	CCC*	0.33	19.8
Cys	TGT	0.42	10.6	Gln	CAG*	0.73	34.2
Cys	TGC*	0.58	12.6	Gln	CAA	0.27	12.3
Asp	GAT	0.44	21.8	Arg	AGG	0.22	12.0
Asp	GAC*	0.56	25.1	Arg	AGA*	0.21	12.1
Glu	GAG*	0.59	39.6	Arg	CGG	0.19	11.4
Glu	GAA	0.41	29.0	Arg	CGA	0.10	6.2
Phe	TTT	0.43	17.6	Arg	CGT	0.09	4.5
Phe	TTC*	0.57	20.3	Arg	CGC	0.19	10.4
Gly	GGG	0.23	16.5	Ser	AGT	0.14	12.1
Gly	GGA	0.26	16.5	Ser	AGC*	0.25	19.5
Gly	GGT	0.18	10.8	Ser	TCG	0.06	4.4
Gly	GGC*	0.33	22.2	Ser	TCA	0.15	12.2
His	CAT	0.41	10.9	Ser	TCT	0.18	15.2
His	CAC*	0.59	15.1	Ser	TCC	0.23	17.7
Ile	ATA	0.14	7.5	Thr	ACG	0.12	6.1
Ile	ATT	0.35	16.0	Thr	ACA	0.27	15.1
Ile	ATC*	0.52	20.8	Thr	ACT	0.23	13.1
Lys	AAG*	0.60	31.9	Thr	ACC*	0.38	18.9
Lys	AAA	0.40	24.4	Val	GTG*	0.48	28.1
Leu	TTG	0.12	12.9	Val	GTA	0.10	7.1
Leu	TTA	0.06	7.7	Val	GTT	0.17	11.0
Leu	CTG*	0.43	39.6	Val	GTC	0.25	14.5
Leu	CTA	0.07	7.2	Trp	TGG*	1	13.2
Leu	CTT	0.12	13.2	Tyr	TAT	0.42	12.2
Leu	CTC	0.20	19.6	Tyr	TAC*	0.58	15.3
Met	ATG*	1	22.0	終止	TGA*	0.61	1.6
Asn	AAT	0.44	17.0	終止	TAG	0.17	0.8
Asn	AAC*	0.56	19.1	終止	TAA	0.22	1.0

*最も頻度の高いコドン

【０３７７】

コドン最適化配列

一実施形態において、細胞中で比較的希少な、ｔＲＮＡをコードする野生型配列の全てのコドンが、細胞中で比較的頻度が高く、各場合で、比較的希少なｔＲＮＡと同じアミノ酸を運ぶ、ｔＲＮＡをコードするコドンに交換される。したがって、最も頻度が高いコドンが各コードアミノ酸に使用されることが特に好ましい（表２参照）。このような最適化手順は、コドン適応指標（ＣＡＩ）を増加させ、最終的にはＣＡＩを最大化する。本発明の文脈において、増加または最大化したＣＡＩを有する配列は、典型的には「コドン最適化」配列ならびに／あるいはＣＡＩ増加および／または最大化配列と呼ばれる。好ましい実施形態によると、本発明のｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物は少なくとも１つのコー

ド領域を含み、コード領域／配列は本明細書に記載されるようにコドン最適化されている。より好ましくは、少なくとも１つのコード配列のコドン適応指標（ＣＡＩ）が少なくとも０．５、少なくとも０．８、少なくとも０．９または少なくとも０．９５である。最も好ましくは、少なくとも１つのコード配列のコドン適応指標（ＣＡＩ）が１である。

【０３７８】

例えば、本発明によるＲＮＡの少なくとも１つのコード配列によってコードされるアミノ酸配列中に存在するアミノ酸アラニン（Ａｌａ）の場合、野生型コード配列が、最も頻度が高いヒトコドン「ＧＣＣ」が常に前記アミノ酸に使用されるように適合されるか、またはアミノ酸システイン（Ｃｙｓ）について、野生型配列が、最も頻度が高いヒトコドン「ＴＧＣ」が常に前記アミノ酸に使用されるように適合される、等々である。

【０３７９】

Ｃ最適化配列

別の実施形態によると、それぞれの野生型ｍＲＮＡ、すなわち、非修飾ｍＲＮＡのコード領域のＣ含量と比較して、好ましくはｍＲＮＡ配列のコード領域の、修飾された－特に増加した－シトシン（Ｃ）含量を有するｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物。同時に、本発明のｍＲＮＡ配列の少なくとも１つのコード領域によってコードされるアミノ酸配列は、好ましくはそれぞれの野生型ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸配列と比較して修飾されていない。

【０３８０】

本発明の好ましい実施形態において、修飾ｍＲＮＡ配列は、理論上可能な最大のシトシン含量の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％もしくは８０％、もしくは少なくとも９０％またはさらには最大シトシン含量が達成されるように修飾される。

【０３８１】

さらに好ましい実施形態において、「シトシン含量最適化可能」な標的ｍＲＮＡ野生型配列のコドンの少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはさらには１００％が、野生型配列中に存在するシトシン含量より高いシトシン含量を有するコドンによって置換される。

【０３８２】

さらに好ましい実施形態において、野生型コード配列のコドンの一部は、比較的頻度が高いｔＲＮＡの置換コドンが元の野生型コドンの比較的希少なｔＲＮＡと同じアミノ酸を運ぶという条件で、細胞中の比較的希少なｔＲＮＡのコドンが細胞中の比較的頻度が高いｔＲＮＡのコドンによって交換されるようにさらに修飾され得る。好ましくは、シトシンを含有しないコドンによってもっぱらコードされるアミノ酸をコードするコドンを除いて、またはそれぞれ同じ数のシトシンを含有する２つのコドンによってコードされるグルタミン（Ｇｌｎ）を除いて、比較的希少なｔＲＮＡのコドンの全てが、細胞中の比較的頻度が高いｔＲＮＡのコドンによって置換される。

【０３８３】

本発明のさらに好ましい実施形態において、修飾標的ｍＲＮＡは、理論上可能な最大のシトシン含量の少なくとも８０％、もしくは少なくとも９０％、またはさらには最大のシトシン含量は、細胞中の比較的頻度が高いｔＲＮＡをコードするコドンによって達成され、アミノ酸配列は変化しないままであるように修飾される。

【０３８４】

遺伝暗号の天然に存在する縮重のために、２つ以上のコドンが特定のアミノ酸をコードし得る。したがって、２０種のうちの１８種の天然に存在するアミノ酸が、２つ以上のコドンによって（ＴｒｐおよびＭｅｔは例外である）、例えば、２つのコドンによって（例えば、Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、３つのコドンによって（例えば、Ｉｌｅ）、４つのコドンによって（例えば、Ａｌ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ）、または６つのコドンによって（例えば、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ）コードされる。しかしながら、同じアミノ酸をコードする全てのコドンが、インビボ条件下で、同じ頻度で利用されるわけではない。各単一生物に応

じて、典型的なコドン使用頻度プロファイルが確立されている。

【０３８５】

本発明の文脈内で使用される「シトシン含量最適化可能コドン」という用語は、同じアミノ酸をコードする他のコドンよりも低い含量のシトシンを示すコドンを指す。したがって、同じアミノ酸をコードし、そのコドン内でより多数のシトシンを示す別のコドンによって置換され得る、いずれの野生型コドンもシトシン最適化可能（Ｃ最適化可能）であると考えられる。野生型コード領域内のＣ最適化可能野生型コドンの具体的なＣ最適化コドンによるいずれのこのような置換も、その全体的なＣ含量を増加させ、Ｃ濃縮修飾ｍＲＮＡ配列を反映する。好ましい実施形態によると、本発明のｍＲＮＡ配列、好ましくは本発明のｍＲＮＡ配列の少なくとも１つのコード領域は、全ての潜在的なＣ最適化可能コドンについてのＣ最適化コドンを含有するＣ最大化ｍＲＮＡ配列を含むか、またはからなる。したがって、理論上置換可能なＣ最適化可能コドンの１００％または全てが、好ましくはコード領域の全長にわたってＣ最適化コドンによって置換されている。

【０３８６】

この文脈において、シトシン含量最適化可能コドンは、同じアミノ酸をコードする他のコドンよりも少数のシトシンを含有するコドンである。

コドンＧＣＧ、ＧＣＡ、ＧＣＵのいずれもアミノ酸Ａｌａをコードし、同じアミノ酸をコードするコドンＧＣＣによって交換され得る、および／または

Ｃｙｓをコードするコドンの１つＵＧＵは同じアミノ酸をコードするコドンＵＧＣによって交換され得る、および／または

Ａｓｐをコードするコドンの１つＧＡＵは同じアミノ酸をコードするコドンＧＡＣによって交換され得る、および／または

Ｐｈｅをコードするコドンの１つＵＵＵは同じアミノ酸をコードするコドンＵＵＣに交換され得る、および／または

Ｇｌｙをコードするコドンの１つＧＧＧ、ＧＧＡ、ＧＧＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＧＧＣによって交換され得る、および／または

Ｈｉｓをコードするコドンの１つＣＡＵは同じアミノ酸をコードするコドンＣＡＣによって交換され得る、および／または

Ｉｌｅをコードするコドンの１つＡＵＡ、ＡＵＵのいずれもコドンＡＵＣによって交換され得る、および／または

Ｌｅｕをコードするコドンの１つＵＵＧ、ＵＵＡ、ＣＵＧ、ＣＵＡ、ＣＵＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＣＵＣによって交換され得る、および／または

Ａｓｎをコードするコドンの１つＡＡＵは同じアミノ酸をコードするコドンＡＡＣによって交換され得る、および／または

Ｐｒｏをコードするコドンの１つＣＣＧ、ＣＣＡ、ＣＣＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＣＣＣによって交換され得る、および／または

Ａｒｇをコードするコドンの１つＡＧＧ、ＡＧＡ、ＣＧＧ、ＣＧＡ、ＣＧＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＣＧＣによって交換され得る、および／または

Ｓｅｒをコードするコドンの１つＡＧＵ、ＡＧＣ、ＵＣＧ、ＵＣＡ、ＵＣＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＵＣＣによって交換され得る、および／または

Ｔｈｒをコードするコドンの１つＡＣＧ、ＡＣＡ、ＡＣＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＡＣＣによって交換され得る、および／または

Ｖａｌをコードするコドンの１つＧＵＧ、ＧＵＡ、ＧＵＵのいずれも同じアミノ酸をコードするコドンＧＵＣによって交換され得る、および／または

Ｔｙｒをコードするコドンの１つＵＡＵは同じアミノ酸をコードするコドンＵＡＣによって交換され得る。

【０３８７】

上記例のいずれにおいても、シトシンの数が交換されたコドン１つ当たり１だけ増加する。コード領域の全ての非Ｃ最適化コドンの交換（Ｃ最適化可能コドンに対応する）が、Ｃ最大化コード配列をもたらす。本発明の文脈において、本発明によるｍＲＮＡ配列の少

なくとも１つのコード領域内の非Ｃ最適化コドンの少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％がＣ最適化コドンによって置換される。

【０３８８】

一部のアミノ酸について、Ｃ最適化コドンによって置換されるＣ最適化可能コドンのパーセンテージが７０％未満であり、他のアミノ酸について、置換コドンのパーセンテージが７０％より高く、コード領域の全てのＣ最適化可能野生型コドンの少なくとも７０％のＣ最適化の全体的パーセンテージを満たすことが好ましいだろう。

【０３８９】

好ましくは、Ｃ最適化ｍＲＮＡ配列において、いずれかの所与のアミノ酸についてのＣ最適化可能野生型コドンの少なくとも５０％がＣ最適化コドンによって置換される、例えば、いずれかの修飾Ｃ濃縮ｍＲＮＡ配列が、好ましくは上に言及されるアミノ酸Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｐｈｅ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ａｓｎ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＶａｌおよびＴｙｒのいずれか１つをコードするＣ最適化可能野生型コドン位置で少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％のＣ最適化コドンを含有する。

【０３９０】

この文脈において、シトシン含量最適化可能ではないが、少なくとも２つのコドンによってコードされるアミノ酸をコードするコドンが、いずれのさらなる選択工程も用いることなく使用され得る。しかしながら、細胞、例えばヒト細胞中で比較的希少なｔＲＮＡをコードする野生型配列のコドンは、細胞中で比較的頻度が高いｔＲＮＡをコードするコドンに交換され得る（共に同じアミノ酸をコードする）。したがって、Ｇｌｕをコードする比較的希少なコドンＧＡＡは同じアミノ酸をコードする比較的頻度が高いコドンＧＡＧによって交換され得る、および／または

Ｌｙｓをコードする比較的希少なコドンＡＡＡは同じアミノ酸をコードする比較的頻度が高いコドンＡＡＧによって交換され得る、および／または

Ｇｌｎをコードする比較的希少なコドンＣＡＡは同じアミノ酸をコードする比較的頻度が高いコドンＣＡＧに交換され得る。

【０３９１】

この文脈において、それぞれただ１つのコドンによってコードされるアミノ酸Ｍｅｔ（ＡＵＧ）およびＴｒｐ（ＵＧＧ）は変化しないままである。終止コドンはシトシン含量最適化されないが、比較的希少な終止コドンであるａｍｂｅｒ、ｏｃｈｒｅ（ＵＡＡ、ＵＡＧ）は、比較的頻度が高い終止コドンｏｐａｌ（ＵＧＡ）によって交換され得る。

【０３９２】

上に列挙される単一置換は、野生型ｍＲＮＡ配列と比較して修飾ｍＲＮＡ配列のシトシン含量を最適化するために、個別に、ならびに全ての可能な組合せで使用され得る。

したがって、少なくとも１つの本明細書に定義されるコード配列は、アミノ酸が、その１つが１個の追加のシトシンを含む少なくとも２つ以上のコドンによってコードされ、このようなコドンが１個の追加のシトシンを含むＣ最適化コドンによって交換され得、アミノ酸が好ましくは野生型配列と比較して変化していないように、それぞれの野生型ｍＲＮＡのコード領域と比較して変化し得る。

【０３９３】

さらに好ましい実施形態によると、本発明の組成物は、そのコード領域が対応する野生型ｍＲＮＡの対応するコード領域のＧ／Ｃ含量と比較して増加したＧ／Ｃ含量、および／または対応する野生型ｍＲＮＡの対応するコード領域のＣ含量と比較して増加したＣ含量を有する、ならびに／あるいはコード領域中のコドンがヒトコドン使用頻度に適合されており、コドン適応指標（ＣＡＩ）が好ましくは増加または最大化されている、ならびにｍＲＮＡ配列によってコードされるアミノ酸配列が好ましくは対応する野生型ｍＲＮＡによってコードされるアミノ酸配列と比較して修飾されていない、ｍＲＮＡ化合物を含む。

【０３９４】

本発明の１つの好ましい実施形態において、組成物はペプチドまたはタンパク質をコー

ドするコード領域を含むｍＲＮＡ化合物を含み、コード領域は、配列のＧ／Ｃ含量修飾、コドン修飾、コドン最適化またはＣ最適化から選択される配列修飾を示す。

【０３９５】

別の好ましい実施形態において、本明細書に定義される組成物または脂質ナノ粒子は、本明細書に定義されるペプチドまたはタンパク質をコードするコード領域を含むｍＲＮＡを含み、対応する野生型ｍＲＮＡのコード領域と比較して、

－コード領域のＧ／Ｃ含量が増加している；

－コード領域のＣ含量が増加している；

－コード領域のコドン使用頻度がヒトコドン使用頻度に適合されている；および／またはコドン適応指標（ＣＡＩ）がコード領域で増加もしくは最大化している。

【０３９６】

５’キャップ構造

好適には、コードＲＮＡは、５’－キャップ構造の付加によって修飾されてもよく、それによって、好ましくは、コードＲＮＡを安定化し、かつ／またはコードされた抗原の発現を増強し、かつ／または自然免疫系の刺激を低減する（対象への投与後）。５’－キャップ構造は、核酸がＲＮＡ、特に直鎖状コードＲＮＡ、例えば直鎖状ｍＲＮＡまたは直鎖状コードレプリコンＲＮＡである実施形態において特に重要である。

【０３９７】

したがって、ＲＮＡ、特にコードＲＮＡは、５’キャップ構造、好ましくはキャップ０、キャップ１、キャップ２、修飾キャップ０、または修飾キャップ１構造を含む。

本明細書で使用される「５’－キャップ構造」という用語は、当業者によって認識および理解され、例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡの５’末端に位置する５’修飾ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドを指すことを意図している。好ましくは、５’キャップ構造は、５’－５’－三リン酸結合を介してＲＮＡに結合される。

【０３９８】

本発明の文脈において好適であり得る５’キャップ構造は、キャップ０（第１の核酸塩基のメチル化、例えばｍ７ＧｐｐｐＮ）、キャップ１（ｍ７ＧｐｐｐＮの隣接ヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、キャップ２（ｍ７ＧｐｐｐＮの下流の第２のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、キャップ３（ｍ７ＧｐｐｐＮの下流の第３のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、キャップ４（ｍ７ＧｐｐｐＮの下流の第４のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、ＡＲＣＡ（アンチリバースキャップアナログ）、修飾ＡＲＣＡ（例えば、ホスホチオエート修飾ＡＲＣＡ）、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’－フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、および２－アジド－グアノシンである。

【０３９９】

５’キャップ（キャップ０またはキャップ１）構造はまた、キャップアナログを使用した化学ＲＮＡ合成もしくはＲＮＡインビトロ転写（共転写キャッピング）で形成され得る。

【０４００】

本明細書で使用される「キャップアナログ」という用語は、当業者によって認識および理解され、例えば、核酸分子の５’末端に組み込まれた場合に、翻訳もしくは局在化を促進し、かつ／または核酸分子、特にＲＮＡ分子の分解を防止するという点でキャップ機能性を有する非重合性ジヌクレオチドもしくはトリヌクレオチドを指すことが意図される。非重合性とは、キャップアナログが、５’三リン酸を有さず、したがって、鋳型依存的ポリメラーゼによって、好ましくは、鋳型依存的ＲＮＡポリメラーゼによって３’方向に伸長され得ないため、５’末端でのみ組み込まれることを意味する。キャップアナログの例には、限定されるものではないが、ｍ７ＧｐｐｐＧ、ｍ７ＧｐｐｐＡ、ｍ７ＧｐｐｐＣ；非メチル化キャップアナログ（例えば、ＧｐｐｐＧ）；ジメチル化キャップアナログ（例えば、ｍ２，７ＧｐｐｐＧ）、トリメチル化キャップアナログ（例えば、ｍ２，２，７Ｇ

ｐｐｐＧ）、ジメチル化対称キャップアナログ（例えば、ｍ７Ｇｐｐｐｍ７Ｇ）、またはアンチリバースキャップアナログ（例えば、ＡＲＣＡ；ｍ７，２’ＯｍｅＧｐｐｐＧ、ｍ７，２’ｄＧｐｐｐＧ、ｍ７，３’ＯｍｅＧｐｐｐＧ、ｍ７，３’ｄＧｐｐｐＧおよびこれらの四リン酸誘導体）からなる群から選択される化学構造が含まれる。さらに、キャップアナログは以前記載されている（国際公開第２００８０１６４７３号、国際公開第２００８１５７６８８号、国際公開第２００９１４９２５３号、国際公開第２０１１０１５３４７号、および国際公開第２０１３０５９４７５号）。その文脈におけるさらに適切なキャップアナログは、国際公開第２０１７０６６７９３号、国際公開第２０１７０６６７８１号、国際公開第２０１７０６６７９１号、国際公開第２０１７０６６７８９号、国際公開第２０１７０５３２９７号、国際公開第２０１７０６６７８２号、国際公開第２０１８０７５８２７号、および国際公開第２０１７０６６７９７号に記載されており、キャップアナログに言及する開示を本願明細書に援用する。

【０４０１】

一部の実施形態において、修飾キャップ１構造は、国際公開第２０１７０５３２９７号、国際公開第２０１７０６６７９３号、国際公開第２０１７０６６７８１号、国際公開第２０１７０６６７９１号、国際公開第２０１７０６６７８９号、国際公開第２０１７０６６７８２号、国際公開２０１８０７５８２７号、および国際公開第２０１７０６６７９７号に開示されるようなトリヌクレオチドキャップアナログを使用して生成される。特に、国際公開第２０１７０５３２９７号の請求項１～５に開示される構造から誘導可能ないずれのキャップ構造も、修飾キャップ１構造を共転写的に生成するために適切に使用され得る。さらに、国際公開第２０１８０７５８２７号の請求項１または請求項２１に定義される構造から誘導可能ないずれのキャップ構造も、修飾キャップ１構造を共転写的に生成するために適切に使用され得る。

【０４０２】

好ましい実施形態において、（コード）ＲＮＡ、特にｍＲＮＡは、キャップ１構造を含む。

好ましい実施形態において、５’キャップ構造は、本明細書で定義されるＲＮＡインビトロ転写反応において、本明細書で定義されるトリヌクレオチドキャップアナログを使用して、共転写的に適切に付加され得る。

【０４０３】

好ましい実施形態において、本発明のコードＲＮＡのキャップ１構造は、トリヌクレオチドキャップアナログｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧまたはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧを使用する共転写キャッピングを使用して形成される。その文脈における好ましいキャップアナログは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧである。

【０４０４】

他の好ましい実施形態では、本発明のＲＮＡのキャップ１構造は、トリヌクレオチドキャップアナログ３’ＯＭｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧを使用する共転写キャッピングを使用して形成される。

【０４０５】

他の実施形態では、本発明のＲＮＡのキャップ０構造は、キャップアナログ３’ＯＭｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇを使用する共転写キャッピングを使用して形成される。

【０４０６】

他の実施形態において、５’キャップ構造は、キャップ０またはキャップ１またはキャップ２構造を生成するために、キャッピング酵素（例えば、ワクシニアウイルスキャッピング酵素および／またはキャップ依存性２’－Ｏメチルトランスフェラーゼ）を使用する酵素的キャッピングを介して形成される。５’キャップ構造（キャップ０またはキャップ１）は、国際公開第２０１６１９３２２６号に開示されている方法および手段を使用して、固定化キャッピング酵素および／またはキャップ依存性２’－Ｏメチルトランスフェラーゼを使用して付加することができる。

【０４０７】
好ましい実施形態では、ＲＮＡ（種）の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％が、キャッピングアッセイを使用して決定されるキャップ１構造を含む。好ましい実施形態において、ＲＮＡ（種）の約２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満は、キャッピングアッセイを使用して決定されるキャップ１構造を含まない。他の好ましい実施形態において、ＲＮＡ（種）の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％が、キャッピングアッセイを使用して決定されるキャップ０構造を含む。好ましい実施形態において、ＲＮＡ（種）の約２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満は、キャッピングアッセイを使用して決定されるキャップ０構造を含まない。

【０４０８】
「ＲＮＡ種」という用語は、「１つの単一分子」を意味するように制限されず、本質的に同一のＲＮＡ分子のアンサンブルを含むと理解される。したがって、この用語は、複数の実質的に同一の（コード）ＲＮＡ分子に関し得る。

【０４０９】
キャップ０またはキャップ１構造の存在／非存在を決定するために、公開されたＰＣＴ出願国際公開第２０１５１０１４１６号に記載されるような、特に、公開されたＰＣＴ出願国際公開第２０１５１０１４１６号の請求項２７～４６に記載されるようなキャッピングアッセイが使用され得る。ＲＮＡのキャップ０またはキャップ１構造の存在／非存在を決定するために使用され得る他のキャッピングアッセイは、国際公開第２０２０１２７９５９号、または公開されたＰＣＴ出願国際公開第２０１４１５２６７３号および国際公開第２０１４１５２６５９号に記載されている。

【０４１０】
好ましい実施形態において、ＲＮＡは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ＣＡＰ構造を含む。そのような実施形態において、コードＲＮＡは、５’末端ｍ７Ｇキャップ、およびｍ７ＧｐｐｐＮの隣接ヌクレオチドのリボースの追加のメチル化、その場合、２’Ｏメチル化アデノシンを含む。好ましくは、ＲＮＡ（種）の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％が、キャッピングアッセイを使用して決定されるこのようなキャップ１構造を含む。

【０４１１】
他の好ましい実施形態では、ＲＮＡは、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）キャップ構造を含む。そのような実施形態において、コードＲＮＡは、５’末端ｍ７Ｇキャップ、および隣接ヌクレオチドのリボースの追加のメチル化、その場合、２’Ｏメチル化グアノシンを含む。好ましくは、コードＲＮＡ（種）の約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％が、キャッピングアッセイを使用して決定されるこのようなキャップ１構造を含む。

【０４１２】
したがって、前記ＲＮＡまたはｍＲＮＡ配列の最初のヌクレオチド、すなわち、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ構造の下流のヌクレオチドは、２’Ｏメチル化グアノシンまたは２’Ｏメチル化アデノシンであり得る。

【０４１３】
一実施形態において、ｍＲＮＡの５’末端は、好ましくはｍＣａｐアナログが使用されるｍＲＮＡの場合、「ＧＧＧＡＧＡ」である。別の実施形態において、ｍＲＮＡの５’末端は、好ましくはＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ＡＧキャップアナログが使用されるｍＲＮＡの場合、「ＡＧＧＡＧＡ」である。さらなる実施形態において、ｍＲＮＡの５’末端は、好ましくはＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ＧＧキャップアナログが使用されるｍＲＮＡの場合、「ＧＧＧＡＧＡ」である。

【０４１４】
本発明の文脈において、５’キャップ構造はまた、キャップアナログを使用した化学ＲＮＡ合成もしくはＲＮＡインビトロ転写（共転写キャッピング）で形成され得るか、また

はキャップ構造はキャッピング酵素を使用してインビトロで形成され得る。キャッピング酵素を含むキットは商業的に入手可能である（例えば、ＳｃｒｉｐｔＣａｐ（商標）Ｃａｐｐｉｎｇ　ＥｎｚｙｍｅおよびＳｃｒｉｐｔＣａｐ（商標）２’－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（共にセルスクリプト社（ＣｅｌｌＳｃｒｉｐｔ）製）。したがって、ＲＮＡ転写産物は、好ましくは製造業者の説明書に従って処理される。

【０４１５】

実際、キャップアナログは、翻訳もしくは局在化を促進する、および／またはＲＮＡ分子の５’末端で組み込まれると、ＲＮＡ分子の分解を防止するという点でキャップ機能性を有する非重合性ジヌクレオチドを指す。非重合性とは、キャップアナログが、５’三リン酸を有さず、したがって、鋳型依存的ＲＮＡポリメラーゼによって３’方向に伸長され得ないために、５’末端でのみ組み込まれることを意味する。

【０４１６】

５’キャップ構造のさらなる例としては、グリセリル、逆位デオキシ脱塩基残基（ｉｎｖｅｒｔｅｄ　ｄｅｏｘｙ　ａｂａｓｉｃ　ｒｅｓｉｄｕｅ）（部分）、４’，５’メチレンヌクレオチド、１－（ベータ－Ｄ－エリスロフラノシル）ヌクレオチド、４’－チオヌクレオチド、炭素環状ヌクレオチド、１，５－アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、Ｌ－ヌクレオチド、アルファ－ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、トレオ－ペントフラノシルヌクレオチド、非環状３’，４’－セコヌクレオチド、非環状３，４－ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環状３，５ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、３’－３’逆位ヌクレオチド部分、３’－３’－逆位脱塩基部分、３’－２’－逆位ヌクレオチド部分、３’－２’－逆位脱塩基部分、１，４－ブタンジオールホスフェート、３’－ホスホロアミダート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、３’－ホスフェート、３’ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、または架橋もしくは非架橋メチルホスホネート部分が挙げられる。これらの修飾５’キャップ構造は、この文脈において、少なくとも１つの修飾とみなされ、本発明の文脈において、本発明の組成物のｍＲＮＡ配列を修飾するために使用され得る。

【０４１７】

特に好ましい修飾５’キャップ構造は、キャップ１（ｍ７Ｇの隣接ヌクレオチドのリボースのメチル化）、キャップ２（ｍ７Ｇの下流の第２のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、キャップ３（ｍ７Ｇの下流の第３のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化）、キャップ４（ｍ７Ｇの下流の第４のヌクレオチドのリボースのメチル化）、ＡＲＣＡ（アンチリバースキャップアナログ）、修飾ＡＲＣＡ（例えば、ホスホチオエート修飾ＡＲＣＡ）、ＣｌｅａｎＣａｐまたはそれぞれｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧもしくはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ（トリリンク社（ＴｒｉＬｉｎｋ））および／または国際公開第２０１７０５３２９７号（本願明細書に援用する）に開示されるキャップ構造、イノシン、Ｎ１－メチル－グアノシン、２’－フルオロ－グアノシン、７－デアザ－グアノシン、８－オキソ－グアノシン、２－アミノ－グアノシン、ＬＮＡ－グアノシン、および２－アジド－グアノシンである。特に、国際公開第２０１７０５３２９７号の請求項１～５に開示される構造から誘導可能ないずれのキャップ構造も、修飾キャップ１構造を共転写的に生成するために適切に使用され得る。さらに、国際公開第２０１８０７５８２７号の請求項１または請求項２１に定義される構造から誘導可能ないずれのキャップ構造も、修飾キャップ１構造を共転写的に生成するために適切に使用され得る。

【０４１８】

さらに、キャップアナログは以前記載されている（米国特許第７０７４５９６号、国際公開第２００８０１６４７３号、国際公開第２００８１５７６８８号、国際公開第２００９１４９２５３号、国際公開第２０１１０１５３４７号、および国際公開第２０１３０５９４７５号）。Ｎ７－（４－クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチドキャップアナログの合成が最近記載されている（コレら（Ｋｏｒｅ　ｅｔ　ａｌ．）（２０１３）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２１（１５）：４５７０－４）。その文脈におけるさらに

適切なキャップアナログは、国際公開第２０１７０６６７９３号、国際公開第２０１７０６６７８１号、国際公開第２０１７０６６７９１号、国際公開第２０１７０６６７８９号、国際公開第２０１７０６６７８２号、国際公開第２０１８０７５８２７号および国際公開第２０１７０６６７９７号に記載されており、キャップアナログに言及する具体的な開示を本願明細書に援用する。

【０４１９】

ポリ（Ａ）配列／ポリＡ尾部

「３’ポリ（Ａ）尾部」、「ポリＡ配列」または「ポリ（Ａ）配列」とも呼ばれるポリＡ尾部は、典型的にはＲＮＡの３’末端に付加された、最大約４００個のアデノシンヌクレオチド、例えば１０～２００個、１０～１００個、４０～８０個、５０～７０個、約２５～約４００個、好ましくは約５０個～約４００個、より好ましくは約５０個～約３００個、さらにより好ましくは約５０個～約２５０個、最も好ましくは約６０個～約２５０個のアデノシンヌクレオチド、または約４０個～約１５０個のアデノシンヌクレオチドの長いアデノシンヌクレオチド配列である。特に好ましい実施形態において、ポリ（Ａ）配列は約６４個のアデノシンヌクレオチドを含む。別の特に好ましい実施形態において、ポリ（Ａ）配列は約１００個のアデノシンヌクレオチドを含む。さらに、ポリ（Ａ）配列、またはポリ（Ａ）尾部は、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）または酵母から誘導されるポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用した、ＲＮＡの酵素的ポリアデニル化によってインビトロで生成され得る。適切には、コードＲＮＡのポリ（Ａ）配列は、ポリＡ結合タンパク質の少なくとも２つ、３つ、４つ、５つまたはそれ以上のモノマーに結合するのに十分長くなり得る。

【０４２０】

ポリアデニル化は、典型的にはポリ（Ａ）配列のＲＮＡ分子などの核酸分子、例えばｍＲＮＡ前駆体への付加であると理解される。ポリアデニル化は、いわゆるポリアデニル化シグナルによって誘導され得る。このシグナルは、好ましくはポリアデニル化される、ＲＮＡ分子などの核酸分子の３’末端のヌクレオチドの伸長内に位置する。ポリアデニル化シグナルは、典型的にはアデニンおよびウラシル／チミンヌクレオチドからなるヘキサマー、好ましくはヘキサマー配列ＡＡＵＡＡＡを含む。他の配列、好ましくはヘキサマー配列も考えられる。ポリアデニル化は、典型的にはプレｍＲＮＡ（ｍＲＮＡ前駆体とも呼ばれる）のプロセシング中に起こる。典型的には、ＲＮＡ成熟（プレｍＲＮＡから成熟ｍＲＮＡへ）は、ポリアデニル化の工程を含む。

【０４２１】

実際、さらに好ましい実施形態によると、組成物は、典型的には約１０個～２００個のアデノシンヌクレオチド、好ましくは約１０個～１００個のアデノシンヌクレオチド、より好ましくは約４０個～８０個のアデノシンヌクレオチド、またはさらにより好ましくは約５０個～７０個のアデノシンヌクレオチドの３’末端のポリＡ尾部を含有するｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物を含む。好ましくは、ポリ（Ａ）配列は、ＲＮＡインビトロ転写によってＤＮＡ鋳型から誘導される。あるいは、ポリ（Ａ）配列はまた、必ずしもＤＮＡ前駆体から転写されることなく、一般的な化学合成法によってインビトロで得ることもできる。さらに、ポリ（Ａ）配列、またはポリ（Ａ）尾部は、商業的に入手可能なポリアデニル化キットおよび当技術分野で公知の対応するプロトコルを使用して、本発明によるＲＮＡの酵素的ポリアデニル化によって生成され得る。

【０４２２】

あるいは、本明細書に記載されるｍＲＮＡは、場合により特異的タンパク質因子（例えば、切断・ポリアデニル化特異的因子（ＣＰＳＦ）、切断刺激因子（ＣｓｔＦ）、切断因子ＩおよびＩＩ（ＣＦＩおよびＣＦＩＩ）、ポリ（Ａ）ポリメラーゼ（ＰＡＰ））によって（転写された）ＲＮＡにポリアデニル化を伝達するシグナルとして本明細書に定義されるポリアデニル化シグナルを含む。この文脈において、ＮＮ（Ｕ／Ｔ）ＡＮＡコンセンサス配列を含むコンセンサスポリアデニル化シグナルが好ましい。特に好ましい態様において、ポリアデニル化シグナルは以下の配列の１つを含む：ＡＡ（Ｕ／Ｔ）ＡＡＡまたはＡ

（Ｕ／Ｔ）（Ｕ／Ｔ）ＡＡＡ（式中、ウリジンは通常、ＲＮＡ中に存在し、チミジンは通常、ＤＮＡ中に存在する）。

【０４２３】

ポリ（Ｃ）配列

ポリ（Ｃ）配列は、典型的には約１０個～約２００個のシトシンヌクレオチド、好ましくは約１０個～約１００個のシトシンヌクレオチド、より好ましくは約１０個～約７０個のシトシンヌクレオチドまたはさらにより好ましくは約２０個～約５０個またはさらには約２０個～約３０個のシトシンヌクレオチドの、典型的には長いシトシンヌクレオチド配列である。ポリ（Ｃ）配列は、好ましくは核酸に含まれるコード領域の３’に位置し得る。

【０４２４】

実際、さらに好ましい実施形態によると、本発明の組成物は、典型的には約１０個～２００個のシトシンヌクレオチド、好ましくは約１０個～１００個のシトシンヌクレオチド、より好ましくは約２０個～７０個のシトシンヌクレオチドまたはさらにより好ましくは約２０個～６０個またはさらには１０個～４０個のシトシンヌクレオチドの３’末端のポリ（Ｃ）尾部を含むｍＲＮＡ化合物を含む。

【０４２５】

１つの好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、好ましくは５’→３’方向に：

ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；

ｂ）場合により、５’－ＵＴＲエレメント、

ｃ）少なくとも１つの抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも１つのコード領域、

ｄ）場合により、好ましくは６４個のアデノシンまたは１００個のアデノシンを含む、ポリ（Ａ）配列；

ｅ）場合により、好ましくは３０個のシトシンを含む、ポリ（Ｃ）配列；

ｆ）場合により、配列番号３または４から選択されるヒストンステムループ；および／または

ｇ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント

を含む。

【０４２６】

ＵＴＲ

好ましい実施形態において、組成物は、少なくとも１つの５’－または３’－ＵＴＲエレメントを含むｍＲＮＡ化合物を含む。この文脈において、ＵＴＲエレメントは、いずれかの天然に存在する遺伝子の５’－もしくは３’－ＵＴＲから誘導される、または遺伝子の５’－もしくは３’－ＵＴＲの断片、ホモログもしくはバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。好ましくは、本発明により使用される５’－または３’－ＵＴＲエレメントは、本発明のｍＲＮＡ配列の少なくとも１つのコード領域に対して異種である。天然に存在する遺伝子から誘導される５’－または３’－ＵＴＲエレメントが好ましいとしても、合成的に設計されたＵＴＲエレメントが本発明の文脈で使用され得る。

【０４２７】

「３’－ＵＴＲエレメント」という用語は、典型的には３’－ＵＴＲまたは３’－ＵＴＲのバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる核酸配列を指す。本発明の意味における３’－ＵＴＲエレメントは、ＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡの３’－ＵＴＲを表し得る。よって、本発明の意味において、好ましくは、３’－ＵＴＲエレメントは、ＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡの３’－ＵＴＲであり得るか、またはＲＮＡの３’－ＵＴＲの転写鋳型であり得る。よって、３’－ＵＴＲエレメントは、好ましくはＲＮＡの３’－ＵＴＲ、好ましくは遺伝子操作されたベクター構築物の転写によって得られるｍＲＮＡなどのｍＲＮＡの３’－ＵＴＲに対応する核酸配列である。好ましくは、３’－ＵＴＲエレメントは、３’－ＵＴＲの機能を果たすか、または３’－ＵＴＲの機能を果たす配列をコードする。

【０４２８】

好ましくは、少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメントは、脊索動物遺伝子、好ましくは脊椎動物遺伝子、より好ましくは哺乳動物遺伝子、最も好ましくはヒト遺伝子の３’－ＵＴＲ、または脊索動物遺伝子、好ましくは脊椎動物遺伝子、より好ましくは哺乳動物遺伝子、最も好ましくはヒト遺伝子の３’－ＵＴＲのバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる。

【０４２９】

好ましくは、組成物は、増強された半減期を有するｍＲＮＡに関する（安定なｍＲＮＡを提供する）遺伝子から誘導可能であり得る、３’－ＵＴＲエレメント、例えば以下に定義および記載される３’－ＵＴＲエレメントを含むｍＲＮＡ化合物を含む。好ましくは、３’－ＵＴＲエレメントが、好ましくは安定なｍＲＮＡをコードする、遺伝子の３’－ＵＴＲ、または前記遺伝子のホモログ、断片もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる。

【０４３０】

１つの好ましい実施形態において、国際公開第２０１９０７７００１号の表１、請求項１および請求項４、請求項６～８および請求項９に開示されるＵＴＲ組合せは、本発明のｍＲＮＡ化合物にとって好ましいＵＴＲ組合せである。さらに、好ましくは、国際公開第２０１９０７７００１号の２４頁、表１の後の第２段落全体および２４頁、最後の段落～２９頁、第２段落に開示されるＵＴＲ組合せは、本発明のｍＲＮＡ化合物にとって好ましいＵＴＲ組合せである。国際公開第２０１９０７７００１号全体を本願明細書に援用する。

【０４３１】

さらに好ましい実施形態において、その３’－ＵＴＲエレメントは、ＰＳＭＢ３（配列番号１９、配列番号２０）、ＡＬＢ／アルブミン（配列番号１３～配列番号１８）、α－グロビン（「ｍｕａｇ」、すなわち、変異α－グロビン３’－ＵＴＲと呼ばれる；配列番号１１、配列番号１２）、ＣＡＳＰ１（好ましくは配列番号８１（ＤＮＡ）または配列番号８２（ＲＮＡ））、ＣＯＸ６Ｂ１（好ましくは配列番号８３（ＤＮＡ）または配列番号８４（ＲＮＡ））、ＧＮＡＳ（好ましくは配列番号８５（ＤＮＡ）または配列番号８６（ＲＮＡ））、ＮＤＵＦＡ１（好ましくは配列番号８７（ＤＮＡ）または配列番号８８（ＲＮＡ））およびＲＰＳ９（好ましくは配列番号７９（ＤＮＡ）または配列番号８０（ＲＮＡ））から選択される遺伝子、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片もしくはバリアントの３’－ＵＴＲからなる群から選択される遺伝子の３’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる（例えば、本願明細書に援用する、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３６９に開示されるヒトアルブミン／ａｌｂ　３’－ＵＴＲ）。さらに好ましい実施形態において、３’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３７６によるヒトアルブミン遺伝子の断片から誘導される核酸配列を含む（アルブミン／ａｌｂ　３’－ＵＴＲ）。さらに好ましい実施形態において、３’－ＵＴＲエレメントは、アルブミン遺伝子、好ましくは脊椎動物アルブミン遺伝子、より好ましくは哺乳動物アルブミン遺伝子、最も好ましくはヒトアルブミン遺伝子の３’－ＵＴＲ、例えばＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿０００４７７．５によるヒトアルブミン遺伝子の３’－ＵＴＲ、またはその断片もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる。別の好ましい実施形態において、３’－ＵＴＲエレメントは、α－グロビン遺伝子、例えば好ましくは（配列番号５もしくは配列番号６（共にＨＢＡ１）または配列番号７もしくは配列番号８（共にＨＢＡ２）による）ヒトα－グロビン遺伝子、またはα－グロビン遺伝子のホモログ、断片もしくはバリアントの３’－ＵＴＲの中心、α－複合体結合部分、あるいはα－グロビン遺伝子の３’－ＵＴＲのα複合体結合部分（本明細書で「ｍｕａｇ」とも呼ばれる、本明細書の配列番号１１または配列番号１２；国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３９３に対応する）を含むか、またはからなる。

【０４３２】

別の好ましい実施形態において、３’－ＵＴＲエレメントは、配列番号５、７、９、１

１、または対応するＲＮＡ配列　配列番号６、８、１０、１２による、α－またはβ－グロビン遺伝子、好ましくは脊椎動物α－またはβ－グロビン遺伝子、好ましくは哺乳動物α－またはβ－グロビン遺伝子、好ましくはヒトα－またはβ－グロビン遺伝子の３’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる。別の好ましい実施形態において、３’－ＵＴＲエレメントは、ＡＬＢ／アルブミン（配列番号１３～配列番号１８）またはＰＳＭＢ３（配列番号１９／２０）の３’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる。

【０４３３】

この文脈において、本発明によるｍＲＮＡ配列の３’－ＵＴＲエレメントが、配列番号１２に示される、配列番号１１による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアントの対応するＲＮＡ配列を含むか、またはからなることも好ましい。

【０４３４】

ＵＴＲ組合せＳＬＣ７Ａ３（マウス溶質キャリアファミリー（ｍｏｕｓｅ　ｓｏｌｕｔｅ　ｃａｒｒｉｅｒ　ｆａｍｉｌｙ）７（カチオン性アミノ酸輸送体、ｙ＋系）、メンバー３の５’－ＵＴＲ）／ＰＳＭＢ３：別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、カチオン性アミノ酸輸送体３（溶質キャリアファミリー７メンバー３、ＳＬＣ７Ａ３；好ましくは、配列番号７７（ＤＮＡ）または配列番号７８（ＲＮＡ））遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントを含み、前記５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１５によるＤＮＡ配列またはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１６によるＲＮＡ配列を含むか、またはからなる。別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、プロテアソームサブユニットβ３型（ＰＳＭＢ３）遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメントを含み、前記３’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号２３によるＤＮＡ配列またはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号２４によるＲＮＡ配列を含むか、またはからなる。さらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、国際公開第２０１９０７７００１号に開示されるＵＴＲ組合せ、すなわち、ＳＬＣ７Ａ３遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントとＰＳＭＢ３遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメントとの両方を含む。

【０４３５】

ＵＴＲ組合せＲＰＬ３１（マウスリボソームタンパク質Ｌ３１の５’－ＵＴＲ；好ましくは、配列番号７５（ＤＮＡ）または配列番号７６（ＲＮＡ））／ＲＰＳ９（ヒトリボソームタンパク質Ｓ９の３’－ＵＴＲ（ＲＰＳ９；好ましくは、配列番号７９（ＤＮＡ）または配列番号８０（ＲＮＡ））：別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、６０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３１（ＲＰＬ３１）遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントを含み、前記５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１３によるＤＮＡ配列またはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１４もしくは好ましくは配列番号７５／７６によるＲＮＡ配列を含むか、またはからなる。別の好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ９（ＲＰＳ９）遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメントを含み、前記３’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号３３によるＤＮＡ配列またはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号３４によるＲＮＡ配列を含むか、またはからなる。さらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、国際公開第２０１９０７７００１号に開示されるＵＴＲ組合せ、すなわち、ＲＰＬ３１遺伝子から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントとＲＰＳ９遺伝子から誘導される核酸配列（好ましくは、配列番号７９／８０）を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメントとの両方を含む。

【０４３６】

非常に好ましい実施形態において、本発明によるｍＲＮＡ配列の５’－ＵＴＲエレメントは、配列番号２１または配列番号２２による核酸配列の対応するＲＮＡ配列、すなわち、ＨＳＤ１７Ｂ４を含むか、またはからなる。同様に、非常に好ましい実施形態において、本発明によるｍＲＮＡ配列の３’－ＵＴＲエレメントは、配列番号１９または配列番号２０による核酸配列の対応するＲＮＡ配列、すなわち、ＰＳＭＢ３を含むか、またはからなる。同様に非常に好ましい実施形態において、本発明によるｍＲＮＡ配列の５’－ＵＴＲエレメントおよび３’－ＵＴＲエレメントは、上記ＨＳＤ１７Ｂ４とＰＳＭＢ３－ＵＴＲの組合せを含むか、またはからなる。

【０４３７】

「［．．．］遺伝子の３’－ＵＴＲから誘導される核酸配列」という用語は、好ましくはアルブミン遺伝子、α－グロビン遺伝子、β－グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナーゼ遺伝子、またはコラーゲンアルファ１（Ｉ）遺伝子などのコラーゲンアルファ遺伝子、好ましくはアルブミン遺伝子の３’－ＵＴＲ、またはその一部などの、［．．．］遺伝子の３’－ＵＴＲ配列またはその一部に基づく核酸配列を指す。この用語は、アルブミン遺伝子、α－グロビン遺伝子、β－グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナーゼ遺伝子、またはコラーゲンアルファ１（Ｉ）遺伝子などのコラーゲンアルファ遺伝子などの遺伝子、好ましくはアルブミン遺伝子の３’－ＵＴＲ配列全体、すなわち、遺伝子の完全長３’－ＵＴＲに対応する配列、および遺伝子の３’－ＵＴＲ配列の断片に対応する配列を含む。

【０４３８】

「［．．．］遺伝子の３’－ＵＴＲのバリアントから誘導される核酸配列」という用語は、好ましくは上記のアルブミン遺伝子、α－グロビン遺伝子、β－グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナーゼ遺伝子、もしくはコラーゲンアルファ１（Ｉ）遺伝子などのコラーゲンアルファ遺伝子の３’－ＵＴＲのバリアント、またはその一部などの、遺伝子の３’－ＵＴＲ配列のバリアントに基づく核酸配列を指す。この用語は、遺伝子の３’－ＵＴＲのバリアントの配列全体、すなわち、遺伝子の完全長バリアント３’－ＵＴＲ配列に対応する配列、および遺伝子のバリアント３’－ＵＴＲ配列の断片に対応する配列を含む。この文脈における断片は、好ましくは完全長バリアント３’－ＵＴＲの少なくとも２０％、好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、さらにより好ましくは少なくとも６０％、さらにより好ましくは少なくとも７０％、さらにより好ましくは少なくとも８０％、最も好ましくは少なくとも９０％を表す、完全長バリアント３’－ＵＴＲ中のヌクレオチドの連続伸長に対応するヌクレオチドの連続伸長からなる。本発明の意味における、このようなバリアントの断片は、好ましくは本明細書に記載されるバリアントの機能的断片である。

【０４３９】

好ましい実施形態によると、本発明によるｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物は、好ましくは本明細書に定義される、５’キャップ構造および／または少なくとも１つの３’非翻訳領域エレメント（３’－ＵＴＲエレメント）を含む。より好ましくは、ＲＮＡは、本明細書に定義される５’－ＵＴＲエレメントをさらに含む。

【０４４０】

１つの好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、好ましくは５’→３’方向に：

ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；

ｂ）場合により、５’－ＵＴＲエレメント、

ｃ）少なくとも１つの抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも１つのコード領域、

ｄ）場合により、好ましくは配列番号１２に示される配列番号１１による核酸配列の対応するＲＮＡ配列を含むαグロビン遺伝子から誘導される核酸配列、そのホモログ、断片またはバリアントを含むか、またはからなる、３’－ＵＴＲエレメント；

ｅ）場合により、好ましくは６４個のアデノシンまたは１００個のアデノシンを含む、

ポリ（Ａ）配列；
ｆ）場合により、好ましくは３０個のシトシンを含む、ポリ（Ｃ）配列；
ｇ）場合により、配列番号３または４から選択されるヒストンステムループ；および／または
ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント
を含む。

【０４４１】

さらに好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、好ましくは５’→３’方向に：
ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；
ｂ）場合により、５’－ＵＴＲエレメント；
ｃ）好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））のタンパク質から誘導される、少なくとも１つの抗原性ペプチドもしくはタンパク質、またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つのコード領域；
ｄ）場合により、好ましくは配列番号１２に示される配列番号１１による核酸配列の対応するＲＮＡ配列を含むαグロビン遺伝子から誘導される核酸配列、そのホモログ、断片またはバリアントを含むか、またはからなる、３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）場合により、好ましくは６４個のアデノシンまたは１００個のアデノシンを含む、ポリ（Ａ）配列；
ｆ）場合により、好ましくは３０個のシトシンを含む、ポリ（Ｃ）配列；
ｇ）場合により、配列番号３または４から選択されるヒストンステムループ；および／または
ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント
を含む。

【０４４２】

さらに好ましい実施形態において、組成物は、少なくとも１つの５’非翻訳領域エレメント（５’－ＵＴＲエレメント）を含むｍＲＮＡ化合物を含む。好ましくは、少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメントが、ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される、またはＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲの断片、ホモログもしくはバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。５’－ＵＴＲエレメントは、上に定義されるＴＯＰモチーフも５’－ＴＯＰも含まないことが好ましい。

【０４４３】

一部の実施形態において、ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される、５’－ＵＴＲエレメントの核酸配列は、それが誘導される遺伝子またはｍＲＮＡの開始コドン（例えば、

Ａ（Ｕ／Ｔ）Ｇ）の上流１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０位に位置するヌクレオチドによりその３’末端で終結する。よって、５’－ＵＴＲエレメントはタンパク質コード領域のいずれの部分も含まない。よって、好ましくは、少なくとも１つのｍＲＮＡ配列のタンパク質コード部分のみがコード領域によって提供される。

【０４４４】

ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列は、好ましくは真核生物ＴＯＰ遺伝子、好ましくは植物または動物ＴＯＰ遺伝子、より好ましくは脊索動物ＴＯＰ遺伝子、さらにより好ましくは脊椎動物ＴＯＰ遺伝子、最も好ましくは哺乳動物ＴＯＰ遺伝子、例えばヒトＴＯＰ遺伝子から誘導される。

【０４４５】

例えば、５’－ＵＴＲエレメントは、その開示全体を本願明細書に援用する、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２からなる群から選択される核酸配列、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２のホモログ、そのバリアント、または好ましくは対応するＲＮＡ配列から誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントから選択され得る。「国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２のホモログ」という用語は、ヒト（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）以外の種の配列を指し、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２による配列と相同である。

【０４４６】

好ましい実施形態において、ｍＲＮＡ化合物の５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２から選択される核酸配列、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２のホモログ、そのバリアント、または対応するＲＮＡ配列の、５位のヌクレオチド（すなわち、配列中５位に位置するヌクレオチド）から開始コドン（配列の３’末端に位置する）に対して直ぐ５’位のヌクレオチド、例えばＡＴＧ配列に対して直ぐ５’位のヌクレオチドまで伸長する核酸配列から誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２から選択される核酸配列、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１～１３６３、配列番号１３９５、配列番号１４２１および配列番号１４２２のホモログ、そのバリアント、または対応するＲＮＡ配列の、５’－ＴＯＰに対して直ぐ３’位のヌクレオチドから開始コドン（配列の３’末端に位置する）に対して直ぐ５’位のヌクレオチド、例えばＡＴＧ配列に対して直ぐ５’位のヌクレオチドまで伸長する核酸配列から誘導されることが特に好ましい。

【０４４７】

さらに好ましい実施形態において、５’－ＵＴＲエレメントは、リボソームタンパク質をコードするＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはリボソームタンパク質をコードするＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲのバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。例えば、５’－ＵＴＲエレメントは、好ましくは５’－ＴＯＰモチーフを欠く、本明細書に記載される国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号６７、１７０、１９３、２４４、２５９、５５４、６５０、６７５、７００、７２１、９１３、１０１６、１０６３、１１２０、１１３８、および１２８４～１３６０のいずれかによる核酸配列の５’－ＵＴＲ、対応するＲＮＡ配列、そのホモログ、またはそのバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。上記のように、５位からＡＴＧ（配列の３’末端に位置する）に対して直ぐ５’のヌクレオチドまで伸長する配列は、前記配列の５’－ＵＴＲに対応する。

【０４４８】

好ましくは、５’－ＵＴＲエレメントは、リボソームラージ（Ｌａｒｇｅ）タンパク質（ＲＰＬ）をコードするＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはリボソームラージタンパク質（ＲＰＬ）をコードするＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲのホモログもしくはバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。例えば、５’－ＵＴＲエレメントは、好ましくは５’－ＴＯＰモチーフを欠く、本明細書に記載される国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号６７、２５９、１２８４～１３１８、１３４４、１３４６、１３４８～１３５４、１３５７、１３５８、１４２１、および１４２２のいずれかによる核酸配列の５’－ＵＴＲ、対応するＲＮＡ配列、そのホモログ、またはそのバリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなる。

【０４４９】

特に好ましい実施形態において、５’－ＵＴＲエレメントは、リボソームタンパク質ラージ（Ｌａｒｇｅ）３２遺伝子、好ましくは脊椎動物リボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子、より好ましくは哺乳動物リボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはリボソームタンパク質ラージ３２遺伝子、好ましくは脊椎動物リボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子、より好ましくは哺乳動物リボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子の５’ＵＴＲのバリアントから誘導された核酸配列を含むか、またはからなり、好ましくは、５’－ＵＴＲエレメントは、上記遺伝子の５’－ＴＯＰを含まない。

【０４５０】

したがって、好ましい実施形態において、５’－ＵＴＲエレメントは、配列番号２３もしくは配列番号２４による核酸配列（５’末端オリゴピリミジントラクトを欠くヒトリボソームタンパク質ラージ３２の５’－ＵＴＲ；国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３６８に対応する）、または好ましくは対応するＲＮＡ配列との少なくとも約４０％、好ましくは少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、さらにより好ましくは少なくとも約９５％、さらにより好ましくは少なくとも約９９％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはからなる、あるいは少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメントは、配列番号２３による核酸配列またはより好ましくは対応するＲＮＡ配列（配列番号２４）との少なくとも約４０％、好ましくは少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、さらにより好ましくは少なくとも約９５％、さらにより好ましくは少なくとも約９９％の同一性を有する核酸配列の断片を含むか、またはからなり、好ましくは、断片が上記の通りである、すなわち、完全長５’－ＵＴＲの少なくとも２０％等を表すヌクレオチドの連続伸長である。好ましくは、断片が少なくとも約２０ヌクレオチド長以上、好ましくは少なくとも約３０ヌクレオチド長以上、より好ましくは少なくとも約４０ヌクレオチド長以上を示す。好ましくは、断片が本明細書に記載される機能的断片である。

【０４５１】

一部の実施形態において、ｍＲＮＡ化合物は、ＲＰＳＡ、ＲＰＳ２、ＲＰＳ３、ＲＰＳ３Ａ、ＲＰＳ４、ＲＰＳ５、ＲＰＳ６、ＲＰＳ７、ＲＰＳ８、ＲＰＳ９、ＲＰＳ１０、ＲＰＳ１１、ＲＰＳ１２、ＲＰＳ１３、ＲＰＳ１４、ＲＰＳ１５、ＲＰＳ１５Ａ、ＲＰＳ１６、ＲＰＳ１７、ＲＰＳ１８、ＲＰＳ１９、ＲＰＳ２０、ＲＰＳ２１、ＲＰＳ２３、ＲＰＳ２４、ＲＰＳ２５、ＲＰＳ２６、ＲＰＳ２７、ＲＰＳ２７Ａ、ＲＰＳ２８、ＲＰＳ２９、ＲＰＳ３０、ＲＰＬ３、ＲＰＬ４、ＲＰＬ５、ＲＰＬ６、ＲＰＬ７、ＲＰＬ７Ａ、ＲＰＬ８、ＲＰＬ９、ＲＰＬ１０、ＲＰＬ１０Ａ、ＲＰＬ１１、ＲＰＬ１２、ＲＰＬ１３、ＲＰＬ１３Ａ、ＲＰＬ１４、ＲＰＬ１５、ＲＰＬ１７、ＲＰＬ１８、ＲＰＬ１８Ａ、ＲＰＬ１９、ＲＰＬ２１、ＲＰＬ２２、ＲＰＬ２３、ＲＰＬ２３Ａ、ＲＰＬ２４、ＲＰＬ２６、ＲＰＬ２７、ＲＰＬ２７Ａ、ＲＰＬ２８、ＲＰＬ２９、ＲＰＬ３０、ＲＰＬ３１、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３４、ＲＰＬ３５、ＲＰＬ３５Ａ、ＲＰＬ３６、ＲＰＬ３６Ａ、ＲＰＬ３７

、ＲＰＬ３７Ａ、ＲＰＬ３８、ＲＰＬ３９、ＲＰＬ４０、ＲＰＬ４１、ＲＰＬＰ０、ＲＰＬＰ１、ＲＰＬＰ２、ＲＰＬＰ３、ＲＰＬＰ０、ＲＰＬＰ１、ＲＰＬＰ２、ＥＥＦ１Ａ１、ＥＥＦ１Ｂ２、ＥＥＦ１Ｄ、ＥＥＦ１Ｇ、ＥＥＦ２、ＥＩＦ３Ｅ、ＥＩＦ３Ｆ、ＥＩＦ３Ｈ、ＥＩＦ２Ｓ３、ＥＩＦ３Ｃ、ＥＩＦ３Ｋ、ＥＩＦ３ＥＩＰ、ＥＩＦ４Ａ２、ＰＡＢＰＣ１、ＨＮＲＮＰＡ１、ＴＰＴ１、ＴＵＢＢ１、ＵＢＡ５２、ＮＰＭ１、ＡＴＰ５Ｇ２、ＧＮＢ２Ｌ１、ＮＭＥ２、ＵＱＣＲＢから選択される、哺乳動物、例えばヒトＴＯＰ遺伝子などの脊椎動物ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはそのホモログもしくはバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメントを含み、好ましくは、５’－ＵＴＲエレメントが前記遺伝子のＴＯＰモチーフも５’－ＴＯＰも含まず、場合により、５’－ＵＴＲエレメントが、５’末端オリゴピリミジントラクト（ＴＯＰ）の下流１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０位に位置するヌクレオチドによりその５’末端で始まり、さらに場合により、ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される５’－ＵＴＲエレメントが、それが誘導される遺伝子の開始コドン（Ａ（Ｕ／Ｔ）Ｇ）の上流１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０位に位置するヌクレオチドによりその３’末端で終結する。

【０４５２】

さらに好ましい実施形態において、５’－ＵＴＲエレメントは、リボソームタンパク質ラージ３２遺伝子（ＲＰＬ３２）、リボソームタンパク質ラージ３５遺伝子（ＲＰＬ３５）、リボソームタンパク質ラージ２１遺伝子（ＲＰＬ２１）、溶出キャリアファミリー７（カチオン性アミノ酸輸送体、γ＋系）、メンバー３、リボソームタンパク質Ｌ３１（ＲＰＬ３１；好ましくは配列番号７５（ＤＮＡ）もしくは配列番号７６（ＲＮＡ））、ＡＴＰ合成酵素、Ｈ＋輸送、ミトコンドリアＦ１複合体、αサブユニット１、心筋遺伝子（ＡＴＰ５Ａ１）、ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ４遺伝子（ＨＳＤ１７Ｂ４；配列番号２１、配列番号２２）、アンドロゲン誘導１遺伝子（ＡＩＧ１）、チトクロムｃオキシダーゼサブユニットＶＩｃ遺伝子（ＣＯＸ６Ｃ）、もしくはＮ－アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ（酸性セラミダーゼ）１遺伝子（ＡＳＡＨ１）の５’－ＵＴＲまたはそのバリアント、好ましくは脊椎動物リボソームタンパク質ラージ３２遺伝子（ＲＰＬ３２）、脊椎動物リボソームタンパク質ラージ３５遺伝子（ＲＰＬ３５）、脊椎動物リボソームタンパク質ラージ２１遺伝子（ＲＰＬ２１）、脊椎動物ＡＴＰ合成酵素、Ｈ＋輸送、ミトコンドリアＦ１複合体、αサブユニット１、心筋（ＡＴＰ５Ａ１）遺伝子、脊椎動物ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ４遺伝子（ＨＳＤ１７Ｂ４；配列番号２１、配列番号２２）、脊椎動物アンドロゲン誘導１遺伝子（ＡＩＧ１）、脊椎動物チトクロムｃオキシダーゼサブユニットＶＩｃ遺伝子（ＣＯＸ６Ｃ）、もしくは脊椎動物Ｎ－アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ（酸性セラミダーゼ）１遺伝子（ＡＳＡＨ１）またはそのバリアント、より好ましくは哺乳動物リボソームタンパク質ラージ３２遺伝子（ＲＰＬ３２）、リボソームタンパク質ラージ３５遺伝子（ＲＰＬ３５）、リボソームタンパク質ラージ２１遺伝子（ＲＰＬ２１）、哺乳動物ＡＴＰ合成酵素、Ｈ＋輸送、ミトコンドリアＦ１複合体、αサブユニット１、心筋遺伝子（ＡＴＰ５Ａ１）、哺乳動物ヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ４遺伝子（ＨＳＤ１７Ｂ４；配列番号２１、配列番号２２）、哺乳動物アンドロゲン誘導１遺伝子（ＡＩＧ１）、哺乳動物チトクロムｃオキシダーゼサブユニットＶＩｃ遺伝子（ＣＯＸ６Ｃ）、もしくは哺乳動物Ｎ－アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ（酸性セラミダーゼ）１遺伝子（ＡＳＡＨ１）またはそのバリアント、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質ラージ３２遺伝子（ＲＰＬ３２）、ヒトリボソームタンパク質ラージ３５遺伝子（ＲＰＬ３５）、ヒトリボソームタンパク質ラージ２１遺伝子（ＲＰＬ２１）、ヒトＡＴＰ合成酵素、Ｈ＋輸送、ミトコンドリアＦ１複合体、αサブユニット１、心筋遺伝子（ＡＴＰ５Ａ１）、ヒトヒドロキシステロイド（１７－β）デヒドロゲナーゼ４遺伝子（ＨＳＤ１７Ｂ４；配列番号２１、配列番号２２）、ヒトアンドロゲン誘導１遺伝子（ＡＩＧ１）、ヒトチトクロムｃオキシダーゼサブユニットＶＩｃ遺伝子（ＣＯＸ６Ｃ）、もしくはヒトＮ－アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ（酸性セラミダーゼ）１遺伝子（ＡＳＡＨ１）またはその

バリアントから誘導される、核酸配列を含むか、またはからなり、好ましくは、５’－ＵＴＲエレメントは前記遺伝子の５’－ＴＯＰを含まない。

【０４５３】

したがって、好ましい実施形態において、５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３６８もしくは配列番号１４１２～１４２０による核酸配列、または対応するＲＮＡ配列との少なくとも約４０％、好ましくは少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、さらにより好ましくは少なくとも約９５％、さらにより好ましくは少なくとも約９９％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはからなる、あるいは少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメントは、国際公開第２０１３１４３７００号の配列番号１３６８または配列番号１４１２～１４２０による核酸配列との少なくとも約４０％、好ましくは少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは少なくとも約９０％、さらにより好ましくは少なくとも約９５％、さらにより好ましくは少なくとも約９９％の同一性を有する核酸配列の断片を含むか、またはからなり、好ましくは、断片が上記の通りである、すなわち、完全長５’－ＵＴＲの少なくとも２０％等を表すヌクレオチドの連続伸長である。好ましくは、断片が少なくとも約２０ヌクレオチド長以上、好ましくは少なくとも約３０ヌクレオチド長以上、より好ましくは少なくとも約４０ヌクレオチド長以上を示す。好ましくは、断片が本明細書に記載される機能的断片である。

【０４５４】

好ましくは、少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメントと少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメントは相乗的に作用して、少なくとも１つの上記のｍＲＮＡ配列からのタンパク質産生を増加させる。

【０４５５】

好ましい実施形態によると、本発明の組成物は、好ましくは５’→３’方向に：

ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；

ｂ）場合により、より好ましくは配列番号２１、２３、２５またはそれぞれ配列番号２２、２４もしくは２６による、最も好ましくは配列番号２２（ＨＳＤ１７Ｂ４）による核酸配列、そのホモログ、断片、もしくはバリアントの対応するＲＮＡ配列を含むか、またはからなる、好ましくはＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる、５’－ＵＴＲエレメント、または好ましくは溶出キャリアファミリー７（カチオン性アミノ酸輸送体、γ＋系）、メンバー３（国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１５もしくはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１６によるＲＮＡ配列）、もしくは６０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３１（ＲＰＬ３１）遺伝子（国際公開第２０１９０７７００１に開示される配列番号１３もしくはそれぞれ国際公開第２０１９０７７００１号に開示される配列番号１４によるＲＮＡ配列）から誘導される核酸配列を含むか、またはからなる５’－ＵＴＲエレメント；

ｃ）好ましくは全体を本願明細書に援用する、ＰＣＴ／ＥＰ２０１６／０７５８４３号または国際公開第２０１８０７８０５３号の「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｗｔ）」もしくは「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｏｐｔ１）」、「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｏｐｔ２）」、「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｏｐｔ３）」、「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｏｐｔ４）」、もしくは「誘導および／または修飾ＣＤＳ配列（ｏｐｔ５）」により始まる識別番号＜２２３＞を有する配列表、またはそれぞれ表１～表５もしくは図２０～図２４の「Ｂ列」もしくは「Ｃ列」、またはそれぞれの配列表に開示される核酸配列；または配列番号２７～４０、もしくは７１～７４に含まれるＯＲＦ、またはこれらの配列のいずれか１つの断片もしくはバリアントのいずれか１つを含むか、またはからなる、好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－Ｃｏ

Ｖ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））のタンパク質から誘導される少なくとも１つの抗原、またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つのコード領域；あるいは好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））のタンパク質から誘導される少なくとも１つの抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも１つのコード領域；

ｄ）場合により、好ましくは配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０による、より好ましくは配列番号１２もしくは配列番号１８による、最も好ましくは配列番号２０（ＰＳＭＢ３）による核酸配列の対応するＲＮＡ配列を含むか、またはからなる、好ましくは安定なｍＲＮＡを提供する遺伝子またはそのホモログ、断片もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメント、または好ましくは４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ９（ＲＰＳ９）遺伝子（国際公開第ＷＯ２０１９０７７００１号に開示される配列番号３３もしくはそれぞれ国際公開第ＷＯ２０１９０７７００１号に開示される配列番号３４によるＲＮＡ配列）から誘導される核酸配列もしくは配列番号７９／８０を含むか、またはからなる３’－ＵＴＲエレメント；

ｅ）場合により、好ましくは６４個のアデノシンまたは１００個のアデノシンを含む、ポリ（Ａ）配列；および

ｆ）場合により、好ましくは３０個のシトシンを含む、ポリ（Ｃ）配列；

ｇ）場合により、配列番号３または４から選択されるヒストンステムループ；および／または

ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント

を含むｍＲＮＡ化合物を含む。

【０４５６】

一実施形態によると、ｍＲＮＡ化合物がｍｉＲＮＡ結合部位を含む。ｍｉＲＮＡ（マイクロＲＮＡ）は、典型的には遺伝子制御において、例えば、限定されるものではないが、ｍＲＮＡ分解または翻訳阻害もしくは抑制によって、機能し得る、約２０～２５ヌクレオチド長の小さな非コード一本鎖ＲＮＡ分子である。ｍｉＲＮＡは、典型的にはヘアピンＲＮＡ前駆体（プレｍｉＲＮＡ）から生成され、タンパク質と機能的複合体を形成し得る。さらに、ｍｉＲＮＡは、標的ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲ領域に結合し得る。好ましくは、マイクロＲＮＡ結合部位は、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－２６ａ結合部位、好ましくはｍｉＲ－１２２もしくはｍｉＲ－１４２結合部位、または上記ｍｉＲＮＡ結合部位の任意の組合せからなる群から選択されるマイクロＲＮＡのためのものである。

【０４５７】

一実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、天然に存在するｍｉＲＮＡ結合部位である。別の実施形態では、ｍｉＲＮＡ結合部位は、天然に存在するｍｉＲＮＡ結合部位の模倣物または修飾であり得る。

【０４５８】

一部の実施形態において、３’－ＵＴＲは、ポリアデニル化シグナル、細胞中の位置の核酸安定性に影響を及ぼすタンパク質の結合部位、または１つもしくは複数のｍｉＲＮＡまたはｍｉＲＮＡの結合部位のうちの１つまたは複数を含む。

【０４５９】

マイクロＲＮＡ（またはｍｉＲＮＡ）は、核酸分子の３’－ＵＴＲに結合し、核酸分子の安定性を低下させることによって、または翻訳を阻害することによって遺伝子発現を下方制御する１９～２５ヌクレオチド長のノンコーディングＲＮＡである。例えば、マイクロＲＮＡは、例えば、肝臓（ｍｉＲ－１２２）、心臓（ｍｉＲ－ｌｄ、ｍｉＲ－１４９）、内皮細胞（ｍｉＲ－１７～９２、ｍｉＲ－１２６）、脂肪組織（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－３０ｃ）、腎臓（ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－２０４）、骨髄細胞（ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１４２－５ｐ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７）、筋肉（ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－２０８）、および肺上皮細胞（ｌｅｔ－７、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１２６）におけるＲＮＡ、およびそれによって、タンパク質発現を制御することが知られている。ＲＮＡは、１つまたは複数のマイクロＲＮＡ標的配列、マイクロＲＮＡ配列、またはマイクロＲＮＡシードを含み得る。このような配列は、例えば、米国特許出願公開第２００５０２６１２１８号および米国特許出願公開第２００５００５９００５号に教示されるマイクロＲＮＡなどの任意の公知のマイクロＲＮＡに対応し得る。

【０４６０】

１つの好ましい実施形態によると、本発明によるｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物は、本明細書に定義されるように：

ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；

ｂ）好ましくは、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－２６ａ結合部位、好ましくはｍｉＲ－１２２もしくはｍｉＲ－１４２結合部位、または上記ｍｉＲＮＡ結合部位の任意の組合せからなる群から選択される、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位；

ｃ）少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメント；

ｄ）少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメント；

ｅ）少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；

ｆ）少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；

ｇ）場合により、配列番号３または４から選択されるヒストンステムループ；
ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント
またはこれらの任意の組合せ
をさらに含み得る。

【０４６１】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２１１５６２６７号に開示される配列番号２２８４８～２２８７５から選択される配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる５’－ＵＴＲを含む。

【０４６２】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２１１５６２６７号に開示される配列番号２２８７６～２２８９１から選択される配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる３’－ＵＴＲを含む。

【０４６３】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２２１３７１３３号に開示される配列番号１７６～１７７および２２８４０～２２８４４からなる群から選択される単一配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる５’末端を含む。

【０４６４】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２２１３７１３３号に開示される配列番号１８０～１８１および２２８４５～２２８４７からなる群から選択される単一配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなるコザック配列を含む。

【０４６５】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２１１５６２６７号に開示される配列番号２３１～２５２、２２８４８～２２８７５および２８５２２～２８５２５からなる群から選択される単一配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる５’－ＵＴＲを含む。

【０４６６】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２１１５６２６７号に開示される配列番号２５３～２６８、２２８７６～２２９１１、２６９９６～２７００３および２８５２６～２８５３９からなる群から選択される単一配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる３’－ＵＴＲを含む。

【０４６７】

他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２１１５６２６７号に開示される配列番号１８２～２３０および２７００４～２７００６からなる群から選択される単一配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなる３

’末端を含む。
【０４６８】
ヒストンステムループ（ＨＳＬ）／ヒストン３’ＵＴＲステムループ
さらに好ましい実施形態において、組成物は、ヒストンステムループ配列／構造（ＨＳＬ、ｈＳＬ、ヒストンＳＬ、好ましくは配列番号３または配列番号４による）を含むｍＲＮＡ化合物を含む。前記実施形態において、ｍＲＮＡ配列は、少なくとも１つ（または複数）のヒストンステムループ配列または構造を含み得る。このようなヒストンステムループ配列は、好ましくはその開示を本願明細書に援用する、国際公開第２０１２０１９７８０号に開示されるヒストンステムループ配列から選択される。本発明内で使用され得るヒストンステムループ配列は、好ましくは国際公開第２０１２０１９７８０号の式（Ｉ）または（ＩＩ）から誘導され得る。さらに好ましい実施形態によると、コードＲＮＡは、国際公開第２０１２０１９７８０号の具体的な式（Ｉａ）または（ＩＩａ）の少なくとも１つから誘導される少なくとも１つのヒストンステムループ配列を含み得る。さらに好ましい実施形態によると、コードＲＮＡは、国際公開第２０１８１０４５３８号の式（Ｉ）、式（ＩＩ）、式（Ｉａ）または４９～５２頁の「ヒストンステムループ」の節に開示されるヒストンステムループから誘導される少なくとも１つのヒストンステムループ配列および国際公開第２０１８１０４５３８号に開示される国際公開第２０１８１０４５３８号－配列番号１４５１～１４５２を含み得る；国際公開第２０１８１０４５３８号全体、特に配列番号１４５１～１４５２を本願明細書に援用する。
【０４６９】
特に好ましい実施形態において、本発明のＲＮＡは少なくとも１つのヒストンステムループ配列を含み、前記ヒストンステムループ配列は、配列番号３もしくは４と同一または少なくとも７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含む。
【０４７０】
他の実施形態において、核酸は、国際公開第２０２２１３７１３３号に開示される配列番号１７８および１７９からなる群から選択される配列と同一または少なくとも７０％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一である核酸配列、またはその断片もしくはバリアントを含むか、またはからなるヒストンステムループを含む。
【０４７１】
シグナルペプチド／シグナル配列／リーダー配列
別の実施形態によると、本発明の組成物は、さらにまたは代わりに、分泌シグナルペプチドをコードし得るｍＲＮＡ化合物を含む。このようなシグナルペプチドは、これに限定されないが、典型的には約１５～３０アミノ酸長を示し、好ましくはコードされるペプチドのＮ末端に位置する配列である。本明細書に定義されるシグナルペプチドは、好ましくは少なくとも１つのｍＲＮＡ配列によってコードされる抗原の、定義される細胞区画、好ましくは細胞表面、小胞体（ＥＲ）またはエンドソーム－リソソーム区画への輸送を可能にする。本明細書に定義される分泌シグナルペプチド配列の例としては、これに限定されないが、古典的または非古典的ＭＨＣ分子のシグナル配列（例えば、ＭＨＣ　ＩおよびＩＩ分子、例えばＭＨＣクラスＩ分子ＨＬＡ－Ａ＊０２０１のシグナル配列）、本明細書に定義されるサイトカインまたは免疫グロブリンのシグナル配列、本明細書に定義される免疫グロブリンまたは抗体のインバリアント鎖のシグナル配列、Ｌａｍｐ１、タパシン（Ｔａｐａｓｉｎ）、Ｅｒｐ５７、カルレティキュリン（Ｃａｌｒｅｔｉｃｕｌｉｎ）、カルネキシン（Ｃａｌｎｅｘｉｎ）、およびさらなる膜結合タンパク質、または小胞体（ＥＲ）もしくはエンドソーム－リソソーム区画に関連するタンパク質のシグナル配列が挙げられる。最も好ましくは、ＭＨＣクラスＩ分子ＨＬＡ－Ａ＊０２０１のシグナル配列が本発明により使用され得る。例えば、本明細書に定義されるコードされる抗原またはその断片もしくはバリアントの分泌を促進するために、好ましくは、ＨＬＡ－Ａから誘導されるシ

グナルペプチドが使用される。より好ましくは、ＨＬＡ－Ａシグナルペプチドが、本明細書に定義されるコードされる抗原またはその断片もしくはバリアントに融合される。

【０４７２】

本発明による組成物に組み込まれるｍＲＮＡ化合物は、例えば固相ＲＮＡ合成などの合成法、ならびに特に実施例に記載される、ＲＮＡインビトロ転写反応などのインビトロ法を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して調製され得る。

【０４７３】

脂質ナノ粒子を調製する方法

本発明の脂質ナノ粒子を調製する典型的な方法は、

（ｉ）

ａ）リン脂質ホスファチジルセリン；

ｂ）カチオン性またはイオン化可能脂質；

ｃ）ポリマーコンジュゲート脂質；

ｄ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡ配列を含む少なくとも１つのｍＲＮＡ化合物；

ｅ）場合により、ステロイド；および

ｆ）場合により、ホスファチジルセリンに加えて少なくとも１つのさらなるリン脂質；

を用意する工程と；

（ｉｉ）工程（ｉ）で用意された脂質をエタノールなどのアルコールに可溶化する工程と；

（ｉｉｉ）アルコール性脂質溶液を、ｍＲＮＡポリヌクレオチドを含む水溶液と混合する工程と；

（ｉｖ）アルコールを除去して、ｍＲＮＡポリヌクレオチドをカプセル化しているか、またはこれと会合している脂質ナノ粒子を形成する工程と；場合により

（ｖ）脂質ナノ粒子を分離または精製する工程と

を含む。

【０４７４】

アルコールは、脂質または形成する脂質ナノ粒子に悪影響を及ぼさない任意の適切な方法によって除去され得る。本発明の一実施形態において、アルコールは透析によって除去される。代替実施形態において、アルコールが透析濾過によって除去される。

【０４７５】

脂質ナノ粒子の分離および任意選択の精製も任意の適切な方法によって実施され得る。好ましくは、脂質ナノ粒子が濾過され、より好ましくは脂質ナノ粒子が滅菌フィルタを通して濾過によって分離または精製される。

【０４７６】

一部の実施形態において、組成物を得るために溶液がマイクロ流体ミキサー中で混合される。適切には、マイクロ流体混合条件が、８０％超、好ましくは９０％超、より好ましくは９４％超のカプセル化効率（ＥＥ）で薬学的に活性な化合物のカプセル化を与えるように選択される。

【０４７７】

投与経路

薬学的に許容される担体の選択は、原則として、本発明による医薬組成物またはワクチン組成物が投与される方法によって決定される。本発明の組成物またはワクチン組成物は、例えば、全身または局所投与することができる。全身投与のための経路には、一般的に、例えば、経皮、経口、非経口経路（皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内および腹腔内注射ならびに／あるいは鼻腔内投与経路を含む）が含まれる。好ましくは、全身投与は、静脈内（ｉ．ｖ．）、皮下（ｓ．ｃ．）、皮内（ｉ．ｄ．）、または肺に行うことができる。

【０４７８】

局所投与のための経路には、一般的に、例えば、局所投与経路が含まれるが、皮内、経

皮、皮下、もしくは筋肉内注射、または病巣内、頭蓋内、肺内、心臓内、および舌下投与もしくは注射も含まれる。呼吸器系への投与は噴霧投与によって実施され得る、または吸入は、特に肺、気管支、細気管支、肺胞、もしくは副鼻腔へのエアゾール投与によって実施され得る。

【０４７９】

さらに好ましい実施形態において、投与経路は、血管外注射、注入もしくは埋込；皮膚もしくは粘膜への局所投与；組成物を呼吸器系に送達するためなどの吸入；または経皮もしくは経皮的投与などによる対象への血管外投与からなる群から選択される。一層さらに好ましい実施形態において、本発明の組成物またはワクチン組成物は、局所または局所領域注射、注入または埋込、特に皮内、皮下、筋肉内、前房内、結膜下、脈絡膜上注射、網膜下、テノン嚢下、眼球後、局所、後胸膜近傍投与、または肺内吸入、間質、局所領域、硝子体内、腫瘍内、リンパ内、節内、関節内、関節滑液嚢内、関節周囲、腹腔内、腹部内、心臓内、病巣内、心膜内、脳室内、胸膜内、神経周囲、胸腔内、硬膜外、硬膜内、硬膜周囲、髄腔内、髄内、脳内、空洞内、海綿体内、前立腺内、精巣内、軟骨内、骨内、円板内、脊髄内、仙骨内、嚢内、歯肉内、卵巣内、子宮内、眼周囲、歯周、眼球後、くも膜下、結膜下または脈絡膜上注射、注入または埋込を介して投与され得る。

【０４８０】

さらに、皮膚または粘膜への局所投与は、真皮または皮膚、鼻、頬側、舌下、耳または耳介、眼、結膜、膣、直腸、子宮頸部内、副鼻腔内、喉頭、中咽頭、尿管、尿道投与によって実施され得る。ワクチンのためのさらにより好ましい投与経路は、筋肉内、皮内、鼻腔内および経口投与（例えば、錠剤を介した）である。

【０４８１】

好ましくは、本発明による組成物またはワクチン組成物は、皮内、皮下、または筋肉内経路によって、好ましくは無針および／または針注射であり得る注射によって投与され得る。したがって、本発明による組成物またはワクチン組成物は、好ましくは液体または固体形態に製剤化される。投与される本発明によるワクチンまたは組成物の適切な量は、日常的な実験によって、例えば動物モデルを使用することによって決定することができる。このようなモデルには、いかなる限定も意味しないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラット、イヌおよび非ヒト霊長類モデルが含まれる。

【０４８２】

注射用の好ましい単位用量形態は、水、生理的食塩水またはこれらの混合物の無菌溶液を含む。このような溶液のｐＨは、約７．４など、生理的に許容されるｐＨに調整されるべきである。注射用の適切な担体には、ヒドロゲル、制御または遅延放出用のデバイス、ポリ乳酸およびコラーゲンマトリックスが含まれる。局所適用のための適切な薬学的に許容される担体には、ローション、クリーム、ゲルなどに使用するのに適したものが含まれる。本発明の組成物またはワクチンを経口的に投与する場合、錠剤、カプセル剤などが好ましい単位用量形態である。経口投与に使用することができる単位用量形態を調製するための薬学的に許容される担体は先行技術において周知である。その選択は、本発明の目的にとって重要ではない、味、費用および貯蔵性などの２次的考慮事項に依存し、当業者によってたやすく行われ得る。

【０４８３】

医薬組成物およびキット

疾患の「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」または「処置（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」という用語は、疾患を防止するかもしくは疾患から防御する（すなわち、臨床症状を発症させない）こと；疾患を阻害する（すなわち、臨床症状の発症を停止もしくは抑制する）こと；および／または疾患を軽減する（すなわち、臨床症状を退行させる）ことを含む。好ましい実施形態において、「対象（ｓｕｂｊｅｃｔ）」という用語はヒトを指す。

【０４８４】

本発明はさらに、少なくとも１つの本発明による脂質ナノ粒子を含む医薬組成物に関する。

本発明の一実施形態において、ｍＲＮＡ配列は１つの抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする。本発明の代替実施形態において、ｍＲＮＡ配列は２つ以上の抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードする。

【０４８５】

本発明の一実施形態において、医薬組成物は本発明による脂質ナノ粒子を含み、脂質ナノ粒子は、各々が抗原又はその断片もしくはバリアントをコードする異なるｍＲＮＡ配列を含む２つ以上のｍＲＮＡ化合物を含む。

【０４８６】

本発明の代替実施形態において、医薬組成物は第２の脂質ナノ粒子を含み、第２の脂質ナノ粒子によって含まれるｍＲＮＡ化合物は第１の脂質ナノ粒子によって含まれるｍＲＮＡ化合物と異なる。

【０４８７】

さらなる態様において、本発明は、ｍＲＮＡが少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸をコードする少なくとも１つのコード領域を含むｍＲＮＡ配列を含む、ｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子と、薬学的に許容される担体とを含む組成物に関する。本発明による組成物は、ワクチンとして提供される。

【０４８８】

本発明による組成物はまた、適切な薬学的に許容されるアジュバントを含み得る。好ましい実施形態において、組成物の免疫賦活特性を増強するために、好ましくは、アジュバントが添加される。この文脈において、アジュバントは、本発明による組成物の投与および送達を支持するのに適した、任意の化合物として理解され得る。さらに、このようなアジュバントは、これに拘束されないが、自然免疫系の免疫応答、すなわち、非特異的免疫応答を開始し得るか、または増加させ得る。換言すれば、本発明による組成物は、投与されると、典型的には本発明の組成物に含有される本発明のｍＲＮＡの少なくとも１つのコード配列によってコードされる、本明細書に定義される抗原またはその断片もしくはバリアントによる適応免疫応答を開始する。さらに、本発明による組成物は、本明細書に定義されるアジュバントの本発明による組成物への添加による（支持）自然免疫応答をもたらし得る。

【０４８９】

一部の実施形態において、本発明は、対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の本発明のワクチンを対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法を提供する。他の実施形態において、本発明は、抗原をコードする有効用量のｍＲＮＡを含む、対象のワクチン接種に使用するための、本明細書に記載される組成物またはキットもしくはキットオブパーツを含む医薬組成物を提供する。

【０４９０】

このようなアジュバントは、当業者に公知で、本ケースに適した、すなわち、哺乳動物における免疫応答の誘導を支持する任意のアジュバントから選択され得る。好ましくは、アジュバントが、これに限定されないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の１６０頁３行～１６１頁８行に開示されるアジュバントからなる群から選択され得る；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。

【０４９１】

特に好ましくは、アジュバントが、Ｔｈ１免疫応答の誘導またはナイーブＴ細胞の成熟を支持するアジュバント、例えばＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－ガンマ、上に定義される任意の免疫賦活性核酸、好ましくは免疫賦活性ＲＮＡ、ＣｐＧ　ＤＮＡ等から選択され得る。

【０４９２】

さらに好ましい実施形態において、本発明の組成物は、抗原を提供するｍＲＮＡに加えて、さらなる免疫療法剤；１種もしくは複数の補助物質；またはヒトＴｏｌｌ様受容体に対する結合親和性（リガンドとして）により免疫賦活性であることが知られている任意のさらなる化合物；および／またはアジュバント核酸、好ましくは免疫賦活性ＲＮＡ（ｉｓ

ＲＮＡ）を含む群から選択されるさらなる成分を含有することも可能である。

【０４９３】

本発明の組成物は、所望であれば、その免疫原性または免疫賦活性能力を増加させるために、１種または複数の補助物質をさらに含有することができる。本明細書に定義されるｍＲＮＡと本発明の組成物に場合により含有され得る補助物質の相乗作用が好ましくはそれによって達成される。補助物質の様々な種類に応じて、様々な機序をこの点で考慮に入れることができる。例えば、樹状細胞（ＤＣ）の成熟を可能にする化合物、例えばリポ多糖、ＴＮＦ－アルファまたはＣＤ４０リガンドは、適切な補助物質の第１のクラスを形成する。一般的に、免疫応答を増強させる、および／または標的化された方法でこれに影響を及ぼすことを可能にする、ＧＭ－ＣＦＳなどの、「デンジャーシグナル」（ＬＰＳ、ＧＰ９６等）またはサイトカインの方法で免疫系に影響を及ぼす任意の薬剤を補助物質として使用することが可能である。特に好ましい補助物質は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２４、ＩＬ－２５、ＩＬ－２６、ＩＬ－２７、ＩＬ－２８、ＩＬ－２９、ＩＬ－３０、ＩＬ－３１、ＩＬ－３２、ＩＬ－３３、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、ＩＦＮ－ガンマ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＬＴ－ベータまたはＴＮＦ－アルファ、ｈＧＨなどの成長因子などの、自然免疫応答をさらに促進する、モノカイン、リンホカイン、インターロイキンまたはケモカインなどのサイトカインである。好ましくは、このような免疫原性増加剤または化合物が別々に（本発明のワクチンまたは組成物と共製剤化されないで）提供され、個別に投与される。

【０４９４】

適切なアジュバントはさらに、式ＧｌＸｍＧｎ（式中、グアノシン、ウラシルまたはグアノシンもしくはウラシルの類似体であり；Ｘはグアノシン、ウラシル、アデノシン、チミジン、シトシンまたは上記ヌクレオチドの類似体であり；ｌは１～４０の整数であり、ｌ＝１の場合、Ｇはグアノシンまたはその類似体であり、ｌ＞１の場合、ヌクレオチドの少なくとも５０％はグアノシンまたはその類似体であり；ｍは整数であり、少なくとも３であり；ｍ＝３の場合、Ｘはウラシルまたはその類似体であり、ｍ＞３の場合、少なくとも３つの連続するウラシルまたはウラシルの類似体が存在し；ｎは１～４０の整数であり、ｎ＝１の場合、Ｇはグアノシンまたはその類似体であり、ｎ＞１の場合、ヌクレオチドの少なくとも５０％はグアノシンまたはその類似体である）、または式：（ＮｕＧｌＸｍＧｎＮｖ）ａ（式中、Ｇはグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）またはグアノシン（グアニン）もしくはウリジン（ウラシル）の類似体、好ましくはグアノシン（グアニン）またはその類似体であり；Ｘはグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、またはこれらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の類似体、好ましくはウリジン（ウラシル）またはその類似体であり；Ｎは約４～５０、好ましくは約４～４０、より好ましくは約４～３０または４～２０個の核酸長を有する核酸配列であり、各Ｎは独立に、グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）またはこれらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の類似体から選択され；ａは１～２０、好ましくは１～１５、最も好ましくは１～１０の整数であり；ｌは１～４０の整数であり、ｌ＝１の場合、Ｇはグアノシン（グアニン）またはその類似体であり、ｌ＞１の場合、これらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の少なくとも５０％はグアノシン（グアニン）またはその類似体であり；ｍは整数であり、少なくとも３であり；ｍ＝３の場合、Ｘはウリジン（ウラシル）またはその類似体であり、ｍ＞３の場合、少なくとも３つの連続するウリジン（ウラシル）またはウリジン（ウラシル）の類似体が存在し；ｎは１～４０の整数であり、ｎ＝１の場合、Ｇはグアノシン（グアニン）またはその類似体であり、ｎ＞１の場合、これらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の少なくとも５０％はグアノシン（グアニン）またはその類似体であり；ｕ、ｖは互いに独立に、０～５０の整数であり得、好

ましくは、ｕ＝０、ｖ≧１の場合、またはｖ＝０、ｕ≧１の場合；式（$N_uG_lX_mG_nN_v$）$_a$の核酸分子は少なくとも５０ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも１００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも１５０ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも２００ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも２５０ヌクレオチド長を有する）を有する核酸から選択され得る。他の適切なアジュバントはさらに、式：$C_lX_mC_n$（式中、Ｃはシトシン、ウラシル、またはシトシンもしくはウラシルの類似体であり；Ｘはグアノシン、ウラシル、アデノシン、チミジン、シトシン、または上記ヌクレオチドの類似体であり；ｌは１～４０の整数であり、ｌ＝１の場合、Ｃはシトシンまたはその類似体であり、ｌ＞１の場合、ヌクレオチドの少なくとも５０％はシトシンまたはその類似体であり；ｍは整数であり、少なくとも３であり；ｍ＝３の場合、Ｘはウラシルまたはその類似体であり、ｍ＞３の場合、少なくとも３つの連続したウラシルまたはウラシルの類似体が存在し；ｎは１～４０の整数であり、ｎ＝１の場合、Ｃはシトシンまたはその類似体であり、ｎ＞１の場合、ヌクレオチドの少なくとも５０％はシトシンまたはその類似体である）を有する核酸から選択され得る。

【０４９５】

この文脈において、国際公開第２００８０１４９７９号（その開示、特に請求項１、請求項２、請求項３、請求項４および請求項５の主題）および国際公開第２００９０９５２６号の開示も全体を本願明細書に援用する。

【０４９６】

ワクチンが、ｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子中にカプセル化された２つ以上のｍＲＮＡ配列（各々が別個の抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする、複数のＲＮＡ配列など）を含む実施形態において、ワクチンが物理的に別々の形態で提供され得、別々の投与工程によって投与され得る。本発明によるワクチンは、特にｍＲＮＡ配列がただ１つの組成物によって提供される場合、本明細書に記載される（医薬）組成物に対応し得る。しかしながら、本発明のワクチンはまた、物理的に分かれて提供されてもよい。例えば、ワクチンが、本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子中にカプセル化された２つ以上のｍＲＮＡ配列／種を含む実施形態において、これらのＲＮＡ種が、例えば、各々が別個の抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする、各少なくとも１つのｍＲＮＡ種／配列（例えば、３つの別個のｍＲＮＡ種／配列）を含有し得る、例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの別々の組成物が提供されるように提供され得る（これらは組み合わされても、されなくてもよい）。また、本発明のワクチンは、各組成物が少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つ少なくとも１つのｍＲＮＡを含む、少なくとも２つの別個の組成物の組合せであり得る。あるいは、ワクチンが、各々が抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする、少なくとも１つのｍＲＮＡ、好ましくは少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたはそれ以上のｍＲＮＡの組合せとして提供され得る。ワクチンをその使用前に組み合わせてただ１つの組成物を提供してもよいし、または本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子中にカプセル化された抗原もしくはその断片もしくはバリアントのいずれかをコードする別個のｍＲＮＡ配列／種を投与するために２回以上の投与が要求されるように使用してもよい。ワクチンが、典型的には本明細書に定義される抗原組合せをコードする少なくとも２つのｍＲＮＡ配列を含む、少なくとも１つのｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子を含有する場合、ワクチンは、例えばただ１回の投与（全てのｍＲＮＡ種／配列を組み合わせた）によって、または少なくとも２回の別々の投与によって投与され得る。したがって、別々の実体（１つのｍＲＮＡ種を含有する）または組み合わせた実体（２つ以上のｍＲＮＡ種を含有する）として提供される、本明細書に定義される少なくとも１つの抗原もしくはその断片もしくはバリアントまたは抗原（および場合によりさらなる抗原）の任意の組合せをコードするモノ、バイ、またはマルチシストロン性ｍＲＮＡの任意の組合せが、本発明によるワクチンとして理解される。本発明のワクチンの特に好ましい実施形態によると、全体として本発明の組成物によってコードされる少なくとも１つの抗原、好ましくは少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたはそれ以上の抗原の本明細書に定義される組合せが

、別々に投与される、個別の（モノシストロン性）ｍＲＮＡとして提供される。

【０４９７】

ワクチンの実体は液体およびまたは乾燥（例えば、凍結乾燥）形態で提供され得る。これらは、さらなる成分、特にその医薬用途を可能にするさらなる成分を含有し得る。ワクチンまたは（医薬）組成物は、例えば薬学的に許容される担体ならびに／あるいはさらなる補助物質および添加剤および／またはアジュバントをさらに含有し得る。

【０４９８】

ワクチンまたは（医薬）組成物は、典型的には脂質ナノ粒子内にカプセル化された、および／またはこれと会合した、抗原もしくはその断片もしくはバリアントまたは抗原の組合せをコードする、安全かつ有効量の本明細書に定義される本発明によるｍＲＮＡ化合物を含む。本明細書で使用される場合、「安全かつ有効量」は、がんまたはがんに関連する疾患もしくは障害の正の修飾を有意に誘導するのに十分なｍＲＮＡの量を意味する。しかしながら、同時に、「安全かつ有効量」は、深刻な副作用を回避する、すなわち、利点とリスクとの間の賢明な関係を可能にするのに十分少ない。これらの限界の決定は、典型的には賢明な医学的判断の範囲内にある。本発明のワクチンまたは（医薬）組成物に関して、「安全かつ有効量」という表現は、好ましくは過度の免疫反応も有害な免疫反応も達成されないが、好ましくは、測定可能なレベル未満のこのような免疫反応も達成されないように、適応免疫系を刺激するのに適したｍＲＮＡ（よって、コードされる抗原）の量を意味する。バイまたはさらにはマルチシストロン性ｍＲＮＡは、等量のモノシストロン性ｍＲＮＡの使用よりも有意に高いコードされる抗原の発現をもたらし得るので、本明細書に定義される（医薬）組成物またはワクチンのｍＲＮＡのこのような「安全かつ有効量」はさらに、ｍＲＮＡの種類、例えばモノシストロン性、バイまたはさらにはマルチシストロン性ｍＲＮＡに応じて選択され得る。上に定義される（医薬）組成物またはワクチンのｍＲＮＡの「安全かつ有効量」はさらに、付き添いの医師の知識および経験の範囲内で、処置される特定の状態ならびにまた処置される患者の年齢および健康状態、状態の重症度、処置の持続時間、不随する治療、使用される特定の薬学的に許容される担体の性質、ならびに同様の因子に関連して変動するだろう。本発明によるワクチンまたは組成物は、医薬組成物またはワクチンとして、ヒトおよびまた獣医学的医療目的のために本発明により使用することができる。

【０４９９】

好ましい実施形態において、本発明による（医薬）組成物、ワクチンまたはキットオブパーツのｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子は凍結乾燥形態で提供される。好ましくは、凍結乾燥されたｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子は、投与前に、有利には水性担体に基づく適切な緩衝液、例えば乳酸リンゲル液、リンゲル液、リン酸緩衝液に再構成される。好ましい実施形態において、本発明による（医薬）組成物、ワクチンまたはキットオブパーツは、場合により凍結乾燥形態で（場合により少なくとも１種のさらなる添加剤と一緒に）、脂質ナノ粒子の単一種として、または各ＬＮＰ種について別々に提供され得、好ましくは（モノシストロン性）ｍＲＮＡの各々の個別の投与を可能にするために、使用前に適切な緩衝液（乳酸リンゲル液など）に別々に再構成される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたはそれ以上のｍＲＮＡ化合物を含有する。

【０５００】

本発明によるワクチンまたは（医薬）組成物は、典型的には薬学的に許容される担体または賦形剤を含有し得る。適切な担体および賦形剤の例は、当業者に公知であり、限定されるものではないが、投与様式および剤形の性質に応じて、保存剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、抗菌剤、抗真菌剤、潤滑剤および分散剤が挙げられる。本発明の文脈における「医薬組成物」という用語は、活性剤を含み、１種または複数の薬学的に許容される担体をさらに含む組成物を意味する。組成物は、例えば、投与様式および剤形の性質に応じて、希釈剤、賦形剤、ビヒクル、保存剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、抗菌剤、抗真菌剤、潤滑剤および分散剤から選択される成分をさらに含有し得る。

【０５０１】
本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という表現は、好ましくは本発明のワクチンの液体または非液体基剤を含む。本発明のワクチンが液体形態で提供される場合、担体は、水、典型的にはパイロジェンフリー水；等張生理食塩水または緩衝（水性）溶液、例えばリン酸、クエン酸等緩衝液となる。特に、本発明のワクチンの注射については、ナトリウム塩、好ましくは少なくとも５０ｍＭのナトリウム塩、カルシウム塩、好ましくは少なくとも０．０１ｍＭのカルシウム塩、および場合によりカリウム塩、好ましくは少なくとも３ｍＭのカリウム塩を含有する、水、または好ましくは緩衝液、より好ましくは水性緩衝液が使用され得る。好ましい実施形態によると、ナトリウム、カルシウムおよび場合により、カリウム塩は、そのハロゲン化物、例えば塩化物、ヨウ化物または臭化物の形態、その水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩または硫酸塩等の形態で存在し得る。これに限定されないが、ナトリウム塩の例としては、例えばＮａＣｌ、ＮａＩ、ＮａＢｒ、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、Na_2SO_4が挙げられ、任意選択のカリウム塩の例としては、例えばＫＣｌ、ＫＩ、ＫＢｒ、K_2CO_3、$KHCO_3$、K_2SO_4が挙げられ、カルシウム塩の例としては、例えば$CaCl_2$、CaI_2、$CaBr_2$、$CaCO_3$、$CaSO_4$、Ｃａ（ＯＨ）$_2$が挙げられる。さらに、上記カチオンの有機アニオンが緩衝液に含有され得る。より好ましい実施形態によると、上に定義される注射目的に適した緩衝液は、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）、塩化カルシウム（$CaCl_2$）および場合により塩化カリウム（ＫＣｌ）から選択される塩を含有し得、さらなるアニオンが塩化物に加えて存在し得る。$CaCl_2$をＫＣｌなどの別の塩によって置換することもできる。典型的には、注射緩衝液中の塩が、少なくとも５０ｍＭの塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）、少なくとも３ｍＭの塩化カリウム（ＫＣｌ）および少なくとも０．０１ｍＭの塩化カルシウム（$CaCl_2$）の濃度で存在する。注射緩衝液は、具体的な参照媒体に関して高張性、等張性または低張性であり得る、すなわち、緩衝液は、具体的な参照媒体に関して高い、同一の、または低い塩含有量を有し得、好ましくは、浸透または他の濃度効果による細胞の損傷をもたらさない、上記塩のこのような濃度が使用され得る。参照媒体は、例えば、血液、リンパ液、サイトゾル液、もしくは他の体液などの「インビボ」法で生じる液体、または例えば一般的な緩衝液もしくは液体などの、「インビトロ」法で参照媒体として使用され得る液体である。このような一般的な緩衝液または液体は当業者に公知である。

【０５０２】
しかしながら、人への投与に適した、１種または複数の適合性の固体または液体の充填剤または希釈剤またはカプセル化化合物も使用され得る。本明細書で使用される「適合性」という用語は、本発明のワクチンの賦形剤を、典型的な使用条件下で本発明のワクチンの医薬有効性を実質的に低下させるような相互作用が起こらないように、本明細書に定義される本発明によるｍＲＮＡと混合することができることを意味する。薬学的に許容される担体、充填剤および希釈剤は、当然、それらが処置される人への投与に適したものとなるよう十分に高い純度および十分に低い毒性を有さなければならない。その薬学的に許容される担体、充填剤または賦形剤として使用することができる化合物の一部の例としては、例えば、ラクトース、グルコース、トレハロースおよびスクロースなどの糖；例えば、コーンスターチまたはジャガイモデンプンなどのデンプン；デキストロース；例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；粉末状トラガント；麦芽；ゼラチン；獣脂；例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなどの固体滑剤；硫酸カルシウム；例えば、落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびカカオ属の油などの植物油；例えば、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；アルギン酸がある。

【０５０３】
薬学的に許容される担体の選択は、原則として、本発明による医薬組成物またはワクチンが投与される方法によって決定される。組成物またはワクチンは、例えば、全身または局所投与することができる。

【０５０４】
全身投与のための経路には、一般的に、例えば、経皮、経口、非経口経路（皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内および腹腔内注射ならびに／あるいは鼻腔内投与経路を含む）が含まれる。ワクチンを投与するための本発明による好ましい投与経路は、筋肉内注射、皮内注射、または本明細書において言及される投与経路のいずれかである。
【０５０５】
局所投与のための経路には、一般的に、例えば、局所投与経路が含まれるが、皮内、経皮、皮下、もしくは筋肉内注射、または病巣内、頭蓋内、肺内、心臓内、および舌下投与もしくは注射も含まれる。より好ましくは、本発明による組成物またはワクチンは、皮内、皮下、もしくは筋肉内経路によって、好ましくは無針および／もしくは針注射であり得る注射、または本明細書において言及される投与経路のいずれかによって投与され得る。
【０５０６】
好ましい実施形態によると、人工核酸（ＲＮＡ）分子、（医薬）組成物またはワクチンまたはキットは、非経口経路によって、好ましくは皮内、皮下、または筋肉内経路を介して投与される。好ましくは、前記人工核酸（ＲＮＡ）分子、（医薬）組成物またはワクチンまたはキットが、例えば無針および／または針注射であり得る、注射、例えば皮下、筋肉内または皮内注射によって投与され得る。したがって、好ましい実施形態において、本発明による医学的使用および／または処置方法が、皮下、筋肉内または皮内注射による、好ましくは筋肉内または皮内注射による、より好ましくは皮内注射による、前記人工核酸（ＲＮＡ）分子、（医薬）組成物またはワクチンまたはキットの投与を伴う。このような注射は、慣用的な針注射または（無針）ジェット注射を使用することによって、好ましくは（無針）ジェット注射を使用することによって行われ得る。
【０５０７】
本明細書で使用される「ジェット注射」という用語は、少なくとも１つの本発明のｍＲＮＡ配列および場合により、さらなる適切な賦形剤を含有する流体がオリフィスを通して押し出されて、よって、哺乳動物の皮膚、および注射設定に応じて、皮下組織または筋組織を貫通することができる高圧の超微細液体流を生成する、無針注射法を指す。原則として、液体流が皮膚に孔を形成し、この孔を通して液体流が標的組織に押し入れられる。好ましくは、ジェット注射が、本発明によるｍＲＮＡ配列の皮内、皮下または筋肉内注射に使用される。好ましい実施形態において、ジェット注射が、本発明によるｍＲＮＡ配列の筋肉内注射に使用される。さらに好ましい実施形態において、ジェット注射が、本発明によるｍＲＮＡ配列の皮内注射に使用される。
【０５０８】
したがって、組成物／ワクチンは、好ましくは液体または固体形態に製剤化される。投与される本発明によるワクチンまたは組成物の適切な量は、日常的な実験によって、例えば動物モデルを使用することによって決定することができる。このようなモデルには、いかなる限定も意味しないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラット、イヌおよび非ヒト霊長類モデルが含まれる。注射用の好ましい単位用量形態は、水、生理的食塩水またはこれらの混合物の無菌溶液を含む。このような溶液のｐＨは、約７．４など、生理的に許容されるｐＨに調整されるべきである。注射用の適切な担体には、ヒドロゲル、制御または遅延放出用のデバイス、ポリ乳酸およびコラーゲンマトリックスが含まれる。局所適用のための適切な薬学的に許容される担体には、ローション、クリーム、ゲルなどに使用するのに適したものが含まれる。本発明の組成物またはワクチンを経口的に投与する場合、錠剤、カプセル剤などが好ましい単位用量形態である。経口投与に使用することができる単位用量形態を調製するための薬学的に許容される担体は先行技術において周知である。その選択は、本発明の目的にとって重要ではない、味、費用および貯蔵性などの２次的考慮事項に依存し、当業者によってたやすく行われ得る。
【０５０９】
本発明のワクチンまたは組成物に含まれ得るさらなる添加剤は、例えば、Ｔｗｅｅｎなどの乳化剤；例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤；着色剤；味付与剤、医薬担

体；錠剤形成剤；安定剤；抗酸化剤；保存剤である。

【０５１０】

本発明のワクチンまたは組成物はまた、ヒトＴｏｌｌ様受容体ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１０に対する結合親和性（リガンドとして）により、またはマウスＴｏｌｌ様受容体ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１０、ＴＬＲ１１、ＴＬＲ１２もしくはＴＬＲ１３に対する結合親和性（リガンドとして）により、免疫賦活性であることが知られている任意のさらなる化合物をさらに含有することができる。

【０５１１】

この文脈において、本発明のワクチンまたは組成物に添加され得る、別のクラスの化合物は、ＣｐＧ核酸、特にＣｐＧ－ＲＮＡまたはＣｐＧ－ＤＮＡであり得る。ＣｐＧ－ＲＮＡまたはＣｐＧ－ＤＮＡは、一本鎖ＣｐＧ－ＤＮＡ（ｓｓＣｐＧ－ＤＮＡ）、二本鎖ＣｐＧ－ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）、一本鎖ＣｐＧ－ＲＮＡ（ｓｓＣｐＧ－ＲＮＡ）または二本鎖ＣｐＧ－ＲＮＡ（ｄｓＣｐＧ－ＲＮＡ）であり得る。ＣｐＧ核酸は、好ましくはＣｐＧ－ＲＮＡの形態、より好ましくは一本鎖ＣｐＧ－ＲＮＡ（ｓｓＣｐＧ－ＲＮＡ）の形態である。ＣｐＧ核酸は、好ましくは少なくとも１つまたは複数の（マイトジェン）シトシン／グアニンジヌクレオチド配列（ＣｐＧモチーフ）を含有する。第１の好ましい代替によると、これらの配列に含有される少なくとも１つのＣｐＧモチーフ、すなわち、ＣｐＧモチーフのＣ（シトシン）およびＧ（グアニン）がメチル化されていない。場合によりこれらの配列に含有される全てのさらなるシトシンまたはグアニンはメチル化されていても、メチル化されていなくてもよい。しかしながら、さらに好ましい代替によると、ＣｐＧモチーフＣ（シトシン）およびＧ（グアニン）はメチル化形態で存在することもできる。

【０５１２】

本発明の別の態様によると、本発明はまた、本明細書に定義されるｍＲＮＡ配列を含むｍＲＮＡ化合物を含む、キット、特にキットオブパーツを提供する。さらなる実施形態において、キットは、上に定義される脂質ナノ粒子または上に定義される脂質ナノ粒子を含む（医薬）組成物、および／または本発明によるワクチン、場合により可溶化のための液体ビヒクル、および場合によりｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、組成物および／またはワクチンの用法および用量についての情報を含む技術的説明書を含む。技術的説明書は、ｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、組成物および／またはワクチンの用法および用量についての情報を含有し得る。このようなキット、好ましくは、キットオブパーツは、例えば上記の用途または使用のいずれかのために、好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害を処置または予防するため

の、（本発明の医薬、好ましくはワクチンを調製するための）本発明による脂質ナノ粒子の使用のために適用され得る。

【０５１３】

キットはまた、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害を処置または予防するための、（本発明のワクチンを調製するための）本明細書に定義される脂質ナノ粒子、組成物またはワクチンの使用にも適用され得、脂質ナノ粒子、組成物および／またはワクチンは、上に定義される哺乳動物において免疫応答を誘導または増強することができる。

【０５１４】

このようなキットはさらに、例えば上に定義される哺乳動物において免疫応答を調節、好ましくは誘発、例えば誘導または増強するための、および好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害の処置または予防を支持するための、（本発明のワクチンを調製するための）本明細書に定義される脂質ナノ粒子、組成物またはワクチンの使用に適用され得る。

【０５１５】

キットの特別な形態としての、キットオブパーツは、異なるキットオブパーツ中に、本明細書に記載される１種もしくは複数の同一のもしくは異なる組成物および／または１種もしくは複数の同一のもしくは異なるワクチンを含有し得る。キットオブパーツはまた、

例えば各キットオブパーツが、好ましくは別個の抗原をコードする、本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子を含有する、異なるキットオブパーツ中に本発明による（例えば１つの）組成物、（例えば１つの）ワクチンおよび／またはｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子を含有し得る。好ましくは、キットまたはキットオブパーツが、パーツとして、場合により乳酸リンゲル液である、本発明によるｍＲＮＡを可溶化するためのビヒクルを含有する。上記キットのいずれも上に定義される処置または予防に使用され得る。

【０５１６】

この態様の別の実施形態において、本発明によるキットは、少なくとも１種のアジュバントをさらに含有し得る。さらなる実施形態において、本発明によるキットは、少なくとも１種のさらなる薬学的に活性な成分、好ましくはがんまたは関連する障害の処置および／または予防に適した治療用化合物をさらに含有し得る。さらに、別の実施形態において、キットは、針、アプリケータ、パッチ、注射デバイスを含む、本発明による組成物またはワクチンの投与に必要なまたは適したパーツおよび／またはデバイスをさらに含有し得る。

【０５１７】

ＲＮＡセンシングパターン認識受容体のアンタゴニスト：

好ましい実施形態において、特に、組成物の核酸がＲＮＡである実施形態において、医薬組成物は、少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニストを含み得る。

【０５１８】

その文脈の好ましい実施形態において、医薬組成物は、Ｔｏｌｌ様受容体から選択される少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニスト、好ましくはＴＬＲ７アンタゴニストおよび／またはＴＬＲ８アンタゴニストを含む。

【０５１９】

少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の好適なアンタゴニストは、開示全体を本願明細書に援用する、公開されたＰＣＴ特許出願である国際公開第２０２１０２８４３９号に開示されている。特に、国際公開第２０２１０２８４３９号の請求項１乃至９４のいずれか一項に定義される少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の好適なアンタゴニストに関する開示を本願明細書に援用する。

【０５２０】

好ましい実施形態において、少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニストは、国際公開第２０２１０２８４３９号の配列番号８５～２１２からなる群から選択される核酸配列と同一または少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％同一である核酸配列、またはこれらの配列のいずれかの断片を含むか、またはからなる一本鎖オリゴヌクレオチドである。その文脈において特に好ましいアンタゴニストは、５’－ＧＡＧ　ＣＧｍＧ　ＣＣＡ－３’（国際公開第２０２１０２８４３９号の配列番号８５）またはその断片もしくはバリアントである。

【０５２１】

好ましい実施形態において、少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニスト対少なくとも１つのＲＮＡのモル比は、好適には約２０：１～約８０：１の範囲である。

【０５２２】

好ましい実施形態において、少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニスト対少なくとも１つのＲＮＡの重量対重量比は、好適には約１：２～約１：１０の範囲である。

【０５２３】

実施形態において、少なくとも１つのＲＮＡセンシングパターン認識受容体の少なくとも１つのアンタゴニストと少なくとも１つのＲＮＡは、本明細書に定義される脂質ベース

の担体に別々に製剤化されるか、または本明細書に定義される脂質ベースの担体に共製剤化される。

【０５２４】

組成物の使用

本発明による組成物は、組成物内に組み込まれ、組成物および／またはその中に含有される脂質ナノ粒子によって、ヒト対象などの対象に送達され得る活性成分の説明から明らかなように、医薬として有用である。よって、本発明のさらなる態様は、医薬としての上記の組成物の使用である。このような使用は、医薬を製造するための組成物の使用としても表され得る。関連する態様によると、本発明は、組成物を、それを必要とするヒト対象などの対象に投与する工程を含む、処置方法を提供する。関連する態様によると、本発明は、組成物を、それを必要とするヒト対象などの対象に投与する工程を含む、処置する方法を提供する。

【０５２５】

好ましい実施形態において、本発明の組成物が医薬として使用され、医薬がワクチンである。

別の好ましい実施形態において、本発明の組成物は医薬として使用され、医薬はウイルス、細菌、または原生動物感染性疾患を含む感染性疾患、がんもしくは腫瘍疾患、肝臓疾患、自己免疫疾患、およびアレルギーから選択される疾患を防止、予防、処置、および／または改善するためのものであるか、またはこれに適したものである。

【０５２６】

別の好ましい実施形態において、本発明の組成物は医薬として使用され、医薬はウイルス、細菌または原生動物感染性疾患を含む感染性疾患を防止、予防、処置および／または改善するためのものであるか、またはこれに適しており、医薬はワクチンである。

【０５２７】

別の実施形態において、本発明のワクチンは、ウイルス、細菌、または原生動物感染性疾患を含む感染性疾患、がんまたは腫瘍疾患から選択される疾患を防止、予防、処置および／または改善するための、本明細書に記載される組成物またはキットもしくはキットオブパーツを含む。

【０５２８】

本発明のさらに別の態様において、感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態を処置する方法、処置または予防する方法であって、

ａ）本明細書に記載されるｍＲＮＡ、組成物、ワクチン、キットまたはキットオブパーツを用意する工程と；

ｂ）ｍＲＮＡ、組成物、ワクチン、またはキットもしくはキットオブパーツを組織または生物に適用または投与する工程と

を含む方法が提供される。

【０５２９】

別の実施形態において、組成物、ワクチン、またはキットもしくはキットオブパーツが静脈内、筋肉内、皮下または皮内注射によって組織または生物に投与される、方法が提供される。

【０５３０】

なおさらなる実施形態において、対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の本発明のワクチンを対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法が提供される。

【０５３１】

さらなる実施形態において、有効用量のウイルス抗原をコードするｍＲＮＡを含む、対象のワクチン接種に使用するための、または使用に適した、本明細書に記載される組成物またはキットもしくはキットオブパーツを含む医薬組成物が提供される。

【０５３２】
別の好ましい実施形態において、（ｉ）免疫応答を誘導するため、または（ｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための、本明細書に記載される組成物またはキットもしくはキットオブパーツを含む医薬組成物の使用が提供される。
【０５３３】
具体的な実施形態において、本明細書に記載される組成物またはキットもしくはキットオブパーツを、それを必要とする対象に投与する工程を含む、対象における疾患または状態を防止、改善または処置する方法が提供される。
【０５３４】
さらに、組成物の投与が抗原特異的抗体応答をもたらし、好ましくは、抗原特異的抗体応答が血清中の抗原特異的抗体の存在によって測定される、方法が提供される。
好ましい実施形態の１つでは、医薬は、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））ワクチンである。
【０５３５】
代替実施形態において、本発明は、医薬の製造における医薬組成物またはｍＲＮＡを含む脂質の使用に関する。特に、前記医薬は、それを必要とする対象の免疫応答を治療的または予防的に高めるためのものである。
【０５３６】
特に、医薬は、対象、好ましくは脊椎動物を処置するためのものである。好ましい実施形態において、対象は、好ましくはヤギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ロバ、サル、類人猿、齧歯類、例えばマウス、ハムスター、ウサギ、および特にヒトを含む群から選択される哺乳動物である。
【０５３７】
対象、特にヒト対象への組成物の投与に関して、任意の適切な経路が使用され得る。一実施形態において、組成物は、注射または注入による投与に適合される。本明細書で使用される場合、「に適合される」という表現は、組成物が、それぞれの投与経路に適するように製剤化および処理されることを意味する。
【０５３８】
本発明はさらに、本明細書に定義される哺乳動物において免疫応答を調節、好ましくは誘導または増強するため、より好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）

、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害を防止および／または処置するための、本明細書に定義される本発明によるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、（医薬）組成物またはワクチンの使用を含む。

【０５３９】

この文脈において、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））感染症の処置または予防の支持は、慣用的なＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））治療法、

例えばノイラミニダーゼ阻害剤（例えば、オセルタミビルおよびザナミビル）およびＭ２タンパク質阻害剤（例えば、アダマンタン誘導体）などの抗ウイルス薬による治療と本明細書に定義されるＲＮＡまたは医薬組成物を使用した治療の任意の組合せであり得る。

【０５４０】

ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症の処置または予防の支持はまた、本明細書に定義される他の実施形態のいずれかでも想起され得る。したがって、任意の他のアプローチ、好ましくは上記治療アプローチの１つまたは複数との共治療における、特に抗ウイルス薬と組み合わせた、本発明によるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、（医薬）組成物またはワクチンのいずれの使用も本発明の範囲内にある。

【０５４１】

投与について、好ましくは投与経路のいずれも本明細書に定義されるように使用され得る。特に、本発明によるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子によってコードされる抗原に基づいて適応免疫応答を誘導または増強することによって、本明細書に定義されるＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害を処置または防止するのに適した投与経路が使用される。

【０５４２】

そのため、本発明による組成物および／またはワクチンの投与は、さらに、異なる抗原または抗原の組合せをコードする別のｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子またはｍＲＮＡを含む

脂質ナノ粒子の組合せを含有し得る、本明細書に定義される別の組成物および／またはワクチンを投与する前、これと同時および／またはこの後に行われ得、本発明によるｍＲＮＡ配列によってコードされる各抗原は、好ましくはＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病（ＹＦＶ）ウイルス、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症およびこれに関連する疾患または障害を処置または予防するのに適している。

【０５４３】

この文脈において、本明細書に定義される処置はまた、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、または卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症に関連する疾患およびこれに関連する疾患または障害の調節を含み得る。

【０５４４】

本発明のこの態様の好ましい実施形態によると、本発明による（医薬）組成物またはワクチンは注射によって投与される。当技術分野で公知の任意の適切な注射技術が採用され得る。好ましくは、本発明の組成物が、注射によって、好ましくは無針注射によって、例えばジェット注射によって投与される。

【０５４５】

一実施形態において、本発明の組成物は、その各々が好ましくは別々に、好ましくは無針注射によって注射される、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２またはそれ以上の本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む。あるいは、本発明の組

成物が、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２またはそれ以上のｍＲＮＡを含み、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２またはそれ以上のｍＲＮＡは、混合物として、好ましくは本明細書に定義される注射によって、投与される。

【０５４６】

さらなる態様において、本発明は、対象を抗原または抗原の組合せに対して免疫化する方法に関する。

本明細書に定義される抗原または少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２もしくはそれ以上の抗原の組合せに対して対象を免疫化するための免疫化プロトコルは、典型的には本発明による（医薬）組成物またはワクチンの一連の単回投与または投薬を含む。本明細書で使用される単回投薬は、初回／第１の投与、第２の投与またはそれぞれ好ましくは免疫反応を「ブーストする」ために投与される任意のさらなる投与を指す。この文脈において、各単回投薬は、好ましくは本明細書に定義されるのと同じ抗原または同じ抗原の組合せの投与を含み、２回の単回投薬の投与間の間隔は、少なくとも１日間、好ましくは２、３、４、５、６または７日間から少なくとも１週間、好ましくは２、３、４、５、６、７または８週間まで異なり得る。単回投薬間の間隔は一定であってもよいし、または免疫化プロトコルの過程にわたって変動してもよい、例えば、間隔はプロトコルの開始においてより短く、終わりに向けてより長くなり得る。単回投薬の総数および単回投薬間の間隔に応じて、免疫化プロトコルは、好ましくは少なくとも１週間、より好ましくは数週間（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２週間）、さらにより好ましくは数か月間（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１８または２４か月間）続く期間にわたって広がり得る。各単回投薬は、好ましくは本明細書に定義される抗原、好ましくは少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２またはそれ以上の抗原の組合せの投与を包含するので、少なくとも１回、好ましくは１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２回の注射を伴い得る。一部の場合、本発明による組成物またはワクチンは、典型的には１回の注射で、単回投薬として投与される。本発明によるワクチンが、本明細書に定義される別個の抗原をコードする別々のｍＲＮＡ製剤を含む場合、単回投薬の投与中に行われる注射の最小回数がワクチンの別々の成分の数に対応する。ある特定の実施形態において、単回投薬の投与が、ワクチンの各成分（例えば、１つの本明細書に定義される抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む具体的なｍＲＮＡ製剤）のための２回以上の注射を包含し得る。例えば、ワクチンの個別の成分の総量の一部が異なる体の部分に注射され得るので、２回以上の注射を伴い得る。より具体的な例では、各々が２つの異なる体の部分に投与される４つの別々のｍＲＮＡ製剤を含むワクチンの単回投薬が、８回の注射を含む。典型的には、単回投薬がワクチンの全ての成分を投与するのに必要な全ての注射を含み、単一成分が上に概説される２回以上の注射を伴い得る。本発明によるワクチンの単回投薬の投与が２回以上の注射を包含する場合、注射は本質的に同時にまたは同時発生的に、すなわち、典型的には開業医が次々に単回注射工程を行うのに必要な時間枠内で時間をずらして（ｉｎ　ａ　ｔｉｍｅ－ｓｔａｇｇｅｒｅｄ　ｆａｓｉｏｎ）行われる。したがって、単回投薬の投与は、好ましくは数分間、例えば２、３、４、５、１０、１５、３０または６０分間の期間にわたって広がる。

【０５４７】

本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、本発明による（医薬）組成物またはワクチンの投与は、時間をずらした処置で行われ得る。時間をずらした処置は、例えばＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマ

ウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害を処置または予防するのに適した治療または治療薬の投与の前、これと同時および／またはこの後のｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、組成物またはワクチンの投与による、例えばＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目（Ｂｕｎｙａｖｉｒａｌｅｓ）ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合抱体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、もしくはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅ）、もしくは卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ））感染症、またはこれに関連する疾患もしくは障害の慣用的な治療の前、これと同時および／またはこの後のｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、組成物またはワクチンの投与であり得る。このような時間をずらした処置は、例えば本明細書に定義されるキット、好ましくはキットオブパーツを使用して行われ得る。

【０５４８】

時間をずらした処置は、さらにまたは代わりに、好ましくは組成物またはワクチンの一部を形成する、本明細書に定義される抗原性ペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリアントをコードするｍＲＮＡが、好ましくは同じ本発明の組成物またはワクチンの一部を形成する、上に定義される別のｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子と並行して、これの前にまたはこの後に投与される形態での、本明細書に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子、本発明による（医薬）組成物またはワクチンの投与も含む。好ましくは、（全てのｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子の）投与が、１時間以内、より好ましくは３０分以内、さらにより好ましくは１５、１０、５、４、３、または２分以内、さらには１分以内に行われる。このような時間をずらした処置は、例えば本明細書に定義されるキット、好ましくはキットオブパーツを使用して行われ得る。

【０５４９】

好ましい実施形態において、本発明の医薬組成物またはワクチンが繰り返し投与され、各投与が好ましくは本発明の組成物またはワクチンの少なくとも１つのｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子の個別の投与を含む。投与の各時点で、少なくとも１つのｍＲＮＡが２回以上（例えば、２回または３回）投与され得る。本発明の特に好ましい実施形態において、ｍ

ＲＮＡ配列が同じまたは異なる脂質ナノ粒子のｍＲＮＡ化合物の一部である、上に定義されるｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子にカプセル化されたまたはこれと会合した少なくとも２、３、４、５、６またはそれ以上のｍＲＮＡ配列（それぞれ本明細書に定義される抗原の別個のものをコードする）が各時点で投与され、各ｍＲＮＡが、四肢にわたって分配される、注射によって２回投与される。

【０５５０】

別の好ましい実施形態において、（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、または好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための本発明の組成物または本発明のキットもしくはキットオブパーツを含む医薬組成物の使用が提供される。（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、または好ましくは（ｉｉｉ）対象においてＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための前記方法が、少なくとも１つの同様に本明細書に記載される免疫原性ペプチドまたはポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含む、有効量の本明細書に記載される組成物を、それを必要とする対象に少なくとも１回投与する工程を含む。別の実施形態において、参照（脂質ナノ粒子）製剤または組成物と比較して、（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、または好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための本発明の組成物または本発明のキットもしくはキットオブパーツを含む医薬組成物の使用が提供される。好ましい実施形態において、前記参照（脂質ナノ粒子）製剤または組成物が、ＤＰｈｙＰＥおよび／または式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質を含まない。

【０５５１】

実施形態において、本明細書に定義される核酸を送達するために使用される、本発明の組成物に含まれる核酸が、約１００ｎｇ～約５００μｇの量、約１μｇ～約２００μｇの量、約１μｇ～約１００μｇの量、約５μｇ～約１００μｇの量、好ましくは約１０μｇ～約５０μｇの量、具体的には、約１μｇ、２μｇ、３μｇ、４μｇ、５μｇ、１０μｇ、１５μｇ、２０μｇ、２５μｇ、３０μｇ、３５μｇ、４０μｇ、４５μｇ、５０μｇ、５５μｇ、６０μｇ、６５μｇ、７０μｇ、７５μｇ、８０μｇ、８５μｇ、９０μｇ、９５μｇまたは１００μｇの量で提供される。

【０５５２】

一実施形態において、コロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コロナウイルスに対して対象を処置または予防するための免疫化プロトコルは組成物またはワクチンの単回投与を含み、本発明の脂質賦形剤を含む、本発明の組成物は、前記核酸を送達するために使用される。

【０５５３】

一部の実施形態では、有効量は、１回のワクチン接種で対象に投与される１μｇ、２μｇ、３μｇ、４μｇ、５μｇ、６μｇ、７μｇ、８μｇ、９μｇ、１０μｇ、１１μｇ、１２μｇ、１３μｇ、１４μｇ、１５μｇ、１６μｇ、２０μｇ、３０μｇ、４０μｇ、５０μｇ、７５μｇ、１００μｇ、または２００μｇの用量であり、本発明の組成物は、前記核酸を送達するために使用される。好ましい実施形態において、コロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コロナウイルス感染症を処置または予防するための免疫化プロトコルは、組成物またはワクチンの一連の単回投与または投薬、好ましくは合計２回の投与を含み、本発明の脂質賦形剤を含む、本発明の組成物は、前記核酸を送達するために使用される。本明細書で使用される単回投薬は、初回／第１の投与、第２の投与またはそれぞれ好ましくは免疫反応を「ブーストする」ために投与される任意のさらなる投与を指し、本発明の脂質賦形剤を含む、本発明の組成物は、前記核酸を送達するために使用される。

【０５５４】

好ましい実施形態において、ワクチン／組成物は、（本明細書に定義されるように投与すると）コロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コロナウイルス感染症に対して対象を少なくとも１年間、好ましくは少なくとも２年間免疫化し、免疫化のために、本

発明の脂質賦形剤を含む、本発明の組成物は、前記核酸を送達するために使用される。
【０５５５】
標準治療
本発明のＲＮＡを含むワクチンを受ける対象は、本明細書に記載される腫瘍またはがん疾患を患っており、化学療法（例えば、第１選択もしくは第２選択化学療法）、放射線療法、化学放射線療法／化学放射線（化学療法と放射線療法の組合せ）、キナーゼ阻害剤、抗体療法および／またはチェックポイントモジュレータ（例えば、ＣＴＬＡ４阻害剤、ＰＤ１経路阻害剤）を受けたか、または受けている患者、あるいは上に指定される処置の１つまたは複数を受けた後に部分奏功または安定な疾患を達成した患者であり得る。より好ましくは、対象が、本明細書に記載される腫瘍またはがん疾患を患っており、本明細書に記載されるこれらの疾患のいずれかで慣用的に使用される化合物を受けたか、または受けている患者、より好ましくはチェックポイントモジュレータを受けているか、または受けた患者である。
【０５５６】
好ましくは標準治療で使用され、本発明のＲＮＡを含む医薬組成物またはワクチンと組み合わせて適用され得る化合物には、限定されるものではないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の５６～５８頁に開示されるものが含まれる；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。
【０５５７】
腫瘍適応症
本明細書で使用される場合、「腫瘍」、「がん」または「がん疾患」という用語は、好ましくは、限定されるものではないが、国際公開第２０１８０７８０５３号の５８～５９頁に開示される悪性疾患の群から選択される悪性疾患を指す；国際公開第２０１８０７８０５３号全体を本願明細書に援用する。
【０５５８】
例示的な実施形態
以下では、本発明の様々な実施形態を開示する。本明細書においては、各実施形態および全ての実施形態を互いに組み合わせることができる、すなわち、実施形態１を、例えば実施形態４もしくは１４もしくは２４、または例えば「実施形態１．１」などの部分実施形態と組み合わせることができることが意図される。また、本発明の様々な実施形態のいくつかのセットを開示する。本明細書においては、実施形態の様々なセットから生じる各実施形態および全ての実施形態を互いに組み合わせることができる、すなわち、実施形態の第１のセットからの実施形態１を、例えば実施形態の第２のセットからの実施形態５または実施形態２５と組み合わせることができることも意図される。また、例えば「実施形態１」への後方参照は、例えば部分実施形態１．１、１．２等への後方参照も含むことを意図している。
【０５５９】
実施形態の第１のセット
実施形態１．
ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；
ｂ）リン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物と
を含むワクチン組成物。
【０５６０】
実施形態１．１
ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；
ｂ）リン脂質ホスファチジルセリンを含む担体組成物であって、ホスファチジルセリンの量が、担体組成物中の全ての脂質賦形剤の総モル量の９ｍｏｌ％以下、好ましくは５ｍｏｌ％以下である、担体組成物と

を含むワクチン組成物。

【０５６１】

実施形態２．少なくとも１つの核酸が免疫寛容誘導性核酸ではない；および／または少なくとも１つの核酸が免疫寛容誘導性ポリペプチドをコードしない；および／またはワクチン組成物が抗原もその断片もしくはバリアントも含まない；および／またはワクチン組成物が唯一のペイロードとして少なくとも１つの核酸を含む；および／またはワクチン組成物が免疫寛容誘導性組成物ではない、実施形態１に記載のワクチン組成物。

【０５６２】

実施形態３．担体組成物が、少なくとも１つの核酸を少なくとも部分的にカプセル化する、実施形態１または２に記載のワクチン組成物。

実施形態４．担体組成物が少なくとも１つの核酸をカプセル化する、実施形態１乃至３のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５６３】

実施形態５．担体組成物が内表面および外側に面する外表面を含み、ホスファチジルセリンが担体組成物の外表面に位置する、実施形態１乃至４のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５６４】

実施形態６．ホスファチジルセリンの親水性頭部基が担体組成物の外表面に位置する、実施形態５に記載のワクチン組成物。

実施形態７．担体組成物に含まれるホスファチジルセリンの親水性頭部基が、担体組成物の外側からアクセス可能である、実施形態１乃至６のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５６５】

実施形態８．ホスファチジルセリンが、ＤＰｈｙＰＳ、ＷＴ－ＰＳ、１６：０－ＰＳ、１４：０－ＰＳ、１０：０－ＰＳ、６：０－ＰＳ、１８：１－ＰＳ　ＤＯＰＳ、１８：１－Ｌｙｓｏ　ＰＳおよび１８：０－Ｌｙｓｏ　ＰＳからなる群から選択される、実施形態１乃至７のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５６６】

実施形態９．担体組成物が脂質ナノ粒子組成物である、実施形態１乃至８のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

実施形態１０．脂質ナノ粒子組成物が、

（ｉ）カチオン性もしくはイオン化可能脂質；および／または

（ｉｉ）ステロイド；および／または

（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ；および／または

（ｉｖ）ポリマーコンジュゲート脂質

をさらに含む、実施形態９に記載のワクチン組成物。

【０５６７】

実施形態１０．１　脂質ナノ粒子組成物が、

（ｉ）カチオン性もしくはイオン化可能脂質；および／または

（ｉｉ）ステロイド；および／または

（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えて第２のリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ；および／または

（ｉｖ）ＰＭＯＺ４

をさらに含む、実施形態９に記載のワクチン組成物。

【０５６８】

実施形態１１．脂質ナノ粒子組成物が、

（ｉ）カチオン性またはイオン化可能脂質；

（ｉｉ）ステロイド；

（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えてさらなるリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ

；および
（ｉｖ）ポリマーコンジュゲート脂質
をさらに含む、実施形態９または１０に記載のワクチン組成物。
【０５６９】
実施形態１１．１　脂質ナノ粒子組成物が、
（ｉ）カチオン性またはイオン化可能脂質；
（ｉｉ）ステロイド；
（ｉｉｉ）ホスファチジルセリンに加えて第２のリン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥ；および
（ｉｖ）ＰＭＯＺ４
をさらに含む、実施形態９または１０に記載のワクチン組成物。
【０５７０】
実施形態１２．カチオン性またはイオン化可能脂質が生理的ｐＨで正味の正電荷を有し、好ましくは、カチオン性またはイオン化可能脂質が第３級窒素基または第４級窒素基を含み、より好ましくは、カチオン性またはイオン化可能脂質が、それぞれ図１Ａ、図１Ｂおよび図１Ｃに示される構造を有するＨＥＸＡ１、ＨＥＸＡ２およびＴＨＩＯＥＴＨＥＲからなる群から選択される、実施形態１０または１１に記載のワクチン組成物。
【０５７１】
実施形態１３．ステロイドが、コレステロール、コレステリルヘミスクシネート（ＣＨＥＭＳ）およびこれらの誘導体からなる群から選択され、好ましくは、ステロイドがコレステロールである、実施形態１０乃至１２のいずれか１つに記載のワクチン組成物。
【０５７２】
実施形態１４．さらなるリン脂質が、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ；１，２－ジ－（３，７，１１，１５－テトラメチルヘキサデカノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ；ジオレオイルホスファチジルコリン）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ；ジパルミトイルホスファチジルコリン）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬｏＰＥ）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルホスホエタノールアミン、１６－Ｏ－ジメチルホスファチジルエタノールアミン、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１８－１－トランスホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、１，２－ジスクアレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＱＰＥ）、１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（トランスＤＯＰＥ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＳＬＰＥ）、１－トリデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩

）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＰＯＰＳ）、１－１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－Ｏ－ヘキサデカニル－２－Ｏ－（９Ｚ－オクタデセニル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリンまたは１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－フィタニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１－パルミトイル－２－コレステリル－ヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＣｈｅｍｓＰＣ）、１，２－ジコレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＣｈｅｍｓＰＣ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチル水素ホスフェート（ＤＯＣＰ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチルエチルホスフェート（ＤＯＣＰｅ）、および１－Ｏ－オクタデシル－２－Ｏ－メチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（エデルホシン）からなる群から選択され、

好ましくは、さらなるリン脂質がＤＰｈｙＰＥであり；リン脂質、好ましくはＤＰｈｙＰＥが、場合により、少なくとも２つのアルキル鎖を有するリン脂質であって、各アルキル鎖が独立に、好ましくはＣ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９またはＣ１０の長さ、より好ましくはＣ６、Ｃ７またはＣ８の長さ、最も好ましくはＣ７の長さを有する、リン脂質、さらに最も好ましくは、ＤＨＰＣ（１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０４：０ＰＣ（１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）からなる群から選択されるリン脂質との組合せで存在し、ＤＨＰＣが少なくとも２つのアルキル鎖を有する場合により存在するリン脂質として最も好ましい、実施形態１０乃至１３のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５７３】

実施形態１４．１　ホスファチジルセリンおよび１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）の隣に第３のリン脂質を含み、第３のリン脂質がＤＨＰＣ（１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）である、実施形態１０乃至１３のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５７４】

実施形態１５．ポリマーコンジュゲート脂質がペグ化脂質またはＰＭＯＺ－脂質である、実施形態１０乃至１４のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

実施形態１６．

（ａ－ｉ）３０～７０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２０～５０ｍｏｌ％の量のステロイド；５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質；および０．５～５ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ａ－ｉｉ）４０～６０ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２０～４０ｍｏｌ％の量のステロイド；１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１～２ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；

（ａ－ｉｉｉ）３０～７０ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２０～５０ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；５～２５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび実施形態１４に記載されるリン脂質；ならびに０．５～５ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；ならびに

（ａ－ｉｖ）４０～６０ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２０～４０ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；１０～２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび実施形態１４に記載されるリン脂質；ならびに１～２ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質
からなる群から選択される比の賦形剤を含み；
好ましくは、
（ｂ－ｉ）５９ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイド；１０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｉｉ）５８ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイド；１１ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｉｉｉ）４９ｍｏｌ％の量のカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量のステロイド；２０ｍｏｌ％の量のリン脂質；および１．７ｍｏｌ％の量のポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｉｖ）５９ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；１０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび実施形態１４に記載されるリン脂質；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；
（ｂ－ｖ）５８ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；１１ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび実施形態１４に記載されるリン脂質；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；ならびに
（ｂ－ｖｉ）４９ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；２０ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび実施形態１４に記載されるリン脂質；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質
からなる群から選択される比の賦形剤を含み；
より好ましくは、
（ｃ－ｉ）５９ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥ；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｉ）５９ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；２ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリンおよび８ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥ；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｉｉ）５８ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリン、５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥおよび１ｍｏｌ％の量のＤＨＰＣ；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質；
（ｃ－ｉｖ）４９ｍｏｌ％の量の実施形態１２に記載されるカチオン性脂質；２９．３ｍｏｌ％の量の実施形態１３に記載されるステロイド；５ｍｏｌ％の量のリン脂質ホスファチジルセリン、５ｍｏｌ％の量のＤＰｈｙＰＥおよび１０ｍｏｌ％の量のＤＨＰＣ；ならびに１．７ｍｏｌ％の量の実施形態１５に記載されるポリマーコンジュゲート脂質
からなる群から選択される比の賦形剤を含む、実施形態１１乃至１５のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５７５】

実施形態１７．少なくとも１つの核酸がＤＮＡまたはＲＮＡである、実施形態１乃至１６のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

実施形態１８．少なくとも１つの核酸が、ＲＮＡ、好ましくは少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードするコード配列、および場合により少なくとも１つの自己増幅性酵素をコードするコード配列を含むｍＲＮＡである、実施形態１７に記載のワクチン組成物。

【０５７６】

実施形態１９．脂質ナノ粒子が、

（ｉ）１０～２０、好ましくは約２～約１５、より好ましくは約３～約１０、一層より好ましくは約４～約９、最も好ましくは約６の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；もしくは

（ｉｉ）約５～約２０、より好ましくは約１０～約１８、一層より好ましくは約１２～約１６、最も好ましくは約１４の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量；および／もしくは

（ｉｉｉ）約２０～約６０、好ましくは約３～約１５、約５～約１３、約４～約８もしくは約７～約１１の範囲の脂質：ｍＲＮＡ重量比を達成するような量

のｍＲＮＡを含み、ならびに／または

脂質ナノ粒子が、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、もしくは約６０ｎｍ～約２５０ｎｍ、もしくは約６０ｎｍ～約２００ｎｍ、もしくは約７０ｎｍ～２００ｎｍ、もしくは約７５ｎｍ～約１６０ｎｍ、もしくは約９０ｎｍ～約１４０ｎｍ、もしくは約１００ｎｍ～約１４０ｎｍの動的光散乱によって決定される平均流体力学的径を有する；ならびに／または

脂質ナノ粒子が、－５０ｍＶ～＋５０ｍＶの範囲のゼータ電位を示す、実施形態１８に記載のワクチン組成物。

【０５７７】

実施形態２０．ｍＲＮＡがモノ、バイ、またはマルチシストロン性ｍＲＮＡである、実施形態１８または１９に記載のワクチン組成物。

実施形態２１．ｍＲＮＡが少なくとも１つの化学修飾を含む、実施形態１８乃至２０のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５７８】

実施形態２２．化学修飾が塩基修飾、糖修飾、骨格修飾、および脂質修飾からなる群から選択され、好ましくは、化学修飾が塩基修飾であり、より好ましくは、塩基修飾が、好ましくは、シュードウリジン（プシーまたはψ）、Ｎ１－メチルシュードウラシル（Ｎ１ＭＰＵ、Ｎ１Ｍプシーまたは Ｎ１Ｍψ）、１－エチルシュードウラシル、２－チオウラシル（ｓ２Ｕ）、４－チオウラシル、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、実施形態２１に記載のワクチン組成物。

【０５７９】

実施形態２３．コード配列が配列修飾を示す、実施形態１８乃至２２のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

実施形態２４．配列修飾が配列のＧ／Ｃ含量修飾、コドン修飾、コドン最適化またはＣ最適化から選択され；好ましくは、対応する野生型ｍＲＮＡのコード配列と比較して、

ａ）コード配列のＧ／Ｃ含量が増加している；

ｂ）コード配列のＣ含量が増加している；

ｃ）コード配列のコドン使用頻度がヒトコドン使用頻度に適合されている；および／または

ｄ）コドン適応指標（ＣＡＩ）がコード配列で増加もしくは最大化している、実施形態２３に記載のワクチン組成物。

【０５８０】

実施形態２５．ｍＲＮＡが、

ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；

ｂ）好ましくは、マイクロＲＮＡ結合部位がｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－

２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－２６ａ結合部位、好ましくはｍｉＲ－１２２もしくはｍｉＲ－１４２結合部位、またはこれらの上記ｍｉＲＮＡ結合部位の任意の組合せからなる群から選択されるマイクロＲＮＡのためのものである、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ結合部位配列；
ｃ）少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメント；
ｄ）少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｆ）少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；
ｇ）場合により、配列番号３もしくは４から選択されるヒストンステムループ；
ｈ）場合により、配列番号４１～７０から選択される３’末端配列エレメント；
またはこれらの任意の組合せ
をさらに含む、実施形態１８乃至２４のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５８１】

実施形態２６．ｍＲＮＡが５’キャップ構造、好ましくはｍ７Ｇ、キャップ０、キャップ１、キャップ２、修飾キャップ０、または修飾キャップ１構造を含む、実施形態１８乃至２５のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５８２】

実施形態２７．少なくとも１つのコードＲＮＡが少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲおよび／または少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲを含み、好ましくは、少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲが、ＨＳＤ１７Ｂ４、ＲＰＬ３２、ＡＳＡＨ１、ＡＴＰ５Ａ１、ＭＰ６８、ＮＤＵＦＡ４、ＮＯＳＩＰ、ＲＰＬ３１、ＳＬＣ７Ａ３、ＴＵＢＢ４Ｂ、およびＵＢＱＬＮ２から選択される遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片、もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む；および／または好ましくは、少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲが、ＰＳＭＢ３、ＡＬＢ／アルブミン、アルファ－グロビン、ＣＡＳＰ１（好ましくは配列番号８１（ＤＮＡ）または配列番号８２（ＲＮＡ））、ＣＯＸ６Ｂ１（好ましくは配列番号８３（ＤＮＡ）または配列番号８４（ＲＮＡ））、ＧＮＡＳ（好ましくは配列番号８５（ＤＮＡ）または配列番号８６（ＲＮＡ））、ＮＤＵＦＡ１（好ましくは配列番号８７（ＤＮＡ）または配列番号８８（ＲＮＡ））およびＲＰＳ９（好ましくは配列番号７９（ＤＮＡ）または配列番号８０（ＲＮＡ））から選択される遺伝子の３’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片、もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む、実施形態２５に記載のワクチン組成物。

【０５８３】

実施形態２８．少なくとも１つのコードＲＮＡが、（ｉ）ＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲおよびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ、または（ｉｉ）ＲＰＬ３２　５’－ＵＴＲおよびＡＬＢ／アルブミン３’－ＵＴＲ、好ましくは変異アルファ－グロビン３’－ＵＴＲ（配列番号１１、１２）、より好ましくはＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲ（配列番号２１、２２）およびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ（配列番号１９、２０）を含む、実施形態２７に記載のワクチン組成物。

【０５８４】

実施形態２９．ｍＲＮＡが、５’→３’方向に、以下のエレメント：
ａ）好ましくはｍ７Ｇ（５’）、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）およびｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）からなる群から選択される、５’キャップ構造；
ｂ）ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含む５’－ＵＴＲエレメントであって、前記核酸配列は、好ましくは、配列番号２２、配列番号２４、配列番号２６による核酸配列、もしくは好ましくは配列番号７７／７８（ＳＬＣ７Ａ３）もしくは配列番号７５／７６（ＲＰＬ３１）、またはそのホモログ、断片もしくはバリアント；最も好ましくは配列番号２２（ＨＳＤ１７Ｂ４）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、５’－ＵＴＲエレメント；

ｃ）少なくとも１つのコード配列；
ｄ）α－グロビン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、核酸配列は、好ましくは、配列番号６、８もしくは配列番号１０、１２、１４、１６、１８、もしくは好ましくは配列番号２０による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアントに対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；および／またはアルブミン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、核酸配列は、好ましくは、配列番号１８（ＡＬＢ／アルブミン）もしくは好ましくは配列番号７９／８０（ＲＰＳ９）による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアント；最も好ましくは配列番号２０（ＰＳＭＢ３）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、４０～８０、または５０～７０個のアデノシンヌクレオチド、より好ましくは少なくとも７０個のアデノシンヌクレオチド、一層より好ましくは約１００個のアデノシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｆ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、２０～７０、２０～６０または１０～４０個のシトシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；ならびに
ｇ）場合により、好ましくは配列番号４によるＲＮＡ配列を含む、少なくとも１つのヒストンステムループ
を含む、実施形態１８乃至２４のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

【０５８５】
実施形態３０．抗原が病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原または自己免疫自己抗原から誘導される、実施形態１乃至２９のいずれか１つに記載のワクチン組成物。
実施形態３１．病原性抗原が細菌抗原、ウイルス抗原、真菌抗原、および原生動物抗原からなる群から選択される、実施形態３０に記載のワクチン組成物。

【０５８６】
実施形態３２．病原性抗原が、
（ｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス（ＥＢＯＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス（ＲＡＢＶ）、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、または卵形マラリア原虫）から誘導される；および／または
（ｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来の構造タンパク質、アクセサリータンパク質、もしくはレプリカーゼタンパク質、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアントから誘導される；および／または
（ｉｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のスパイクタンパク質（Ｓ）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、膜タンパク質（Ｍ）もしくはヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアント（好ましくは、スパイクタンパク質（Ｓ）は、スパイクタンパク質断片Ｓ１もしくはス

パイクタンパク質断片Ｓ２、より好ましくはスパイクタンパク質断片Ｓ１、またはこれらの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアントを含むか、またはこれらからなる）から誘導される；および／または

（ｉｖ）少なくとも１つのプレフュージョン安定化突然変異を含む、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のプレフュージョン安定化スパイクタンパク質（Ｓ）（Ｓ＿ｓｔａｂ）から誘導される、実施形態３０または３１に記載のワクチン組成物。

【０５８７】

実施形態３３．好ましくは、無菌液体担体で再構成するための無菌固体組成物であり、ｐＨ修正剤、増量剤、安定剤、非イオン性界面活性剤および抗酸化剤から選択される１種または複数の不活性成分をさらに含み、無菌液体担体が水性担体である、実施形態３０乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物と、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む医薬組成物。

【０５８８】

実施形態３４．対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態の処置または予防に使用するための、実施形態３０乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物。

【０５８９】

実施形態３５．対象におけるウイルス、細菌、または原生動物感染性疾患を含む感染性疾患の処置または予防に使用するための、実施形態３２に記載のワクチン組成物、または実施形態３２に記載のワクチン組成物を含む医薬組成物。

【０５９０】

実施形態３６．ワクチン組成物または医薬組成物が、対象に局所または局所領域注射、注入または埋込、特に皮内、皮下、筋肉内、前房内、結膜下、脈絡膜上注射、網膜下、テノン嚢下、眼球後、局所、後胸膜近傍投与、または肺内吸入、間質、局所領域、硝子体内、腫瘍内、リンパ内、節内、関節内、関節滑液嚢内、関節周囲、腹腔内、腹部内、心臓内、病巣内、心膜内、脳室内、胸膜内、神経周囲、胸腔内、硬膜外、硬膜内、硬膜周囲、髄腔内、髄内、脳内、空洞内、海綿体内、前立腺内、精巣内、軟骨内、骨内、円板内、脊髄内、仙骨内、嚢内、歯肉内、卵巣内、子宮内、眼周囲、歯周、眼球後、くも膜下、結膜下、脈絡膜上注射、注入、埋込、経鼻、頬側、舌下、耳または耳介、眼、結膜、膣、直腸、子宮頸部内、副鼻腔内、喉頭、中咽頭、尿管、尿道投与を介して投与され、より好ましくは前記脂質ナノ粒子が、対象に筋肉内、静脈内、皮内、皮下、腫瘍内、鼻腔内、または吸入により、好ましくは対象に局所または局所領域注射または注入を介して投与される、実施形態３４または３５に記載の使用するためのワクチン組成物および医薬組成物。

【０５９１】

実施形態３７．場合により、可溶化のための液体ビヒクル、および場合により、成分の用法および用量についての情報を提供する技術的説明書を含む、実施形態３０乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物を含むキットまたはキットオブパーツ。

【０５９２】

実施形態３８．対象における感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態を処置または予防する方法であって、

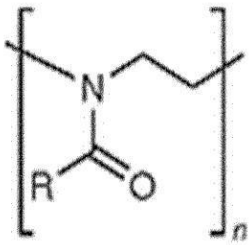
ａ）実施形態３０乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物または実施形態３７に記載のキットもしくはキットオブパーツを用意する工程と；

ｂ）ワクチン組成物または医薬組成物またはキットもしくはキットオブパーツを対象の組織または生物に適用または投与する工程と

を含む方法。

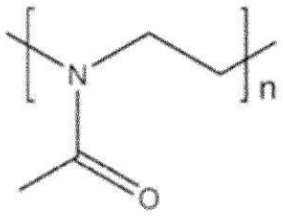
【０５９３】
実施形態３９．対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の実施形態１乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法。
【０５９４】
実施形態４０．実施形態１乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含むワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化する方法。
【０５９５】
実施形態４１．対象において、（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するため、ならびに／または（ｉｖ）ワクチン組成物もしくは医薬組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／もしくは脾臓に標的化するための、実施形態１乃至３２のいずれか１つに記載のワクチン組成物または実施形態３３に記載の医薬組成物または実施形態３７に記載のキットもしくはキットオブパーツの使用。
【０５９６】
実施形態４２．対象において、ワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含む上記実施形態のいずれか１つに記載のワクチンまたは上記実施形態のいずれか１つに記載の担体組成物におけるホスファチジルセリンの使用。
【０５９７】
実施形態４２．１　対象において、ワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含むワクチン組成物の上記実施形態のいずれか１つに記載の担体組成物におけるホスファチジルセリンの使用。
【０５９８】
実施形態４２．２　対象において、ワクチン組成物を、抗原提示細胞に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含む上記実施形態のいずれか１つに記載の担体組成物におけるホスファチジルセリンの使用。
【０５９９】
実施形態４２．３　対象において、ワクチン組成物を、脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ｂ）担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含む上記実施形態のいずれか１つに記載の担体組成物におけるホスファチジルセリンの使用。
【０６００】
実施形態４３．対象が哺乳動物対象、好ましくはヒト対象である、実施形態３４もしくは３５に記載の使用するためのワクチン組成物もしくは医薬組成物、実施形態３８、３９もしくは４０に記載の方法、または実施形態４１もしくは４２に記載の使用。
【０６０１】
実施形態４４．ポリエチレングリコール－（ＰＥＧ）－部分も残基も含まない；ならびに／または硫黄基（－Ｓ－）および／もしくは末端求核剤を含まない、前述の実施形態に記載の任意のポリマーコンジュゲート脂質。
【０６０２】

実施形態４５．ポリエチレングリコール－（ＰＥＧ）－部分も残基も含まない、前述の実施形態に記載の任意のポリマーコンジュゲート脂質。
実施形態４６．硫黄基（－Ｓ－）を含まない、前述の実施形態に記載の任意のポリマーコンジュゲート脂質。
【０６０３】
実施形態４７．末端求核剤を含まない、前述の実施形態に記載の任意のポリマーコンジュゲート脂質。
実施形態４８．硫黄基（－Ｓ－）および末端求核剤を含まない、前述の実施形態に記載の任意のポリマーコンジュゲート脂質。
【０６０４】
実施形態４９．
ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸と；
ｂ）リン脂質１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＨＰＣ）を含む担体組成物と
を含むワクチン組成物または担体組成物。
【０６０５】
実施形態５０．対象において、ワクチン組成物を、樹状細胞およびマクロファージを含む抗原提示細胞、および／または脾臓に標的化するための、ａ）少なくとも１つの抗原またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つの核酸、好ましくはｍＲＮＡと；ワクチンまたは担体組成物、好ましくは脂質ナノ粒子組成物とを含むワクチン組成物の担体組成物におけるＤＨＰＣの使用。
【０６０６】
実施形態５１．対象が哺乳動物対象、好ましくはヒト対象である、実施形態３４もしくは３５に記載の使用するためのＤＨＰＣを含むワクチン組成物もしくは医薬組成物、実施形態３８、３９もしくは４０に記載の方法、または実施形態４１もしくは４２に記載の使用。
【０６０７】
実施形態の第２のセット
実施形態１．式（Ｉ）によるポリマーコンジュゲート脂質：
［Ｐ］－［リンカー］－［Ｌ］　　式（Ｉ）
またはその薬学的に許容される塩、プロドラッグ、互変異性体もしくは立体異性体（式中、
［Ｐ］は、少なくとも１つのポリオキサゾリン（ＰＯＺ）モノマー単位
【０６０８】
【化４４】

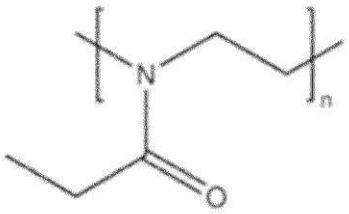


【０６０９】
（ＲはＣ１～９アルキルまたはＣ２～９アルケニル、好ましくはＣ１またはＣ２アルキルであり、ｎは約４５～約５５の範囲の平均値を有し、好ましくは、ｎは約５０であるか、またはｎは、［Ｐ］部分が約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される）
を含むヘテロポリマー部分またはホモポリマー部分、好ましくはホモポリマー部分であ

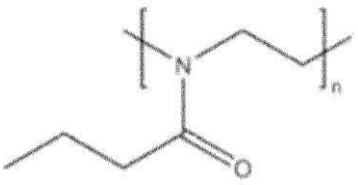
り、
［リンカー］は任意選択のリンカー基であり、
［Ｌ］は脂質部分である）。
【０６１０】
実施形態２．［Ｐ］が、
ポリ（２－メチル－２－オキサゾリン）（ＰＭＯＺ）
【０６１１】
【化４５】



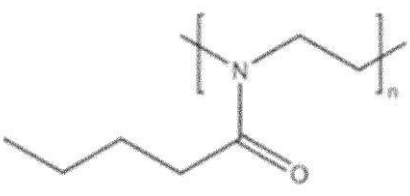
【０６１２】
ポリ（２－エチル－２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）
【０６１３】
【化４６】



【０６１４】
ポリ（２－プロピル－２－オキサゾリン）（ＰＰＯＺ）
【０６１５】
【化４７】



【０６１６】
ポリ（２－ブチル－２－オキサゾリン）（ＰＢＯＺ）
【０６１７】
【化４８】

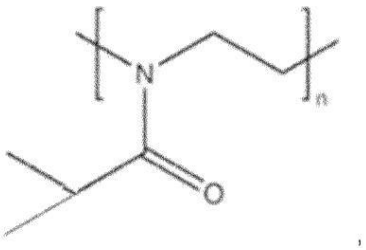


【０６１８】

ポリ（２－イソプロピル－２－オキサゾリン）（ＰＩＰＯＺ）

【０６１９】

【化４９】



【０６２０】

ポリ（２－メトキシメチル－２－オキサゾリン）（ＰＭｅＯＭｅＯｘ）、および

ポリ（２－ジメチルアミノ－２－オキサゾリン）（ＰＤＭＡＯｘ）

からなる群から選択される複数のモノマー単位を含むヘテロポリマー部分またはホモポリマー部分であり、

好ましくは、［Ｐ］が複数のＰＭＯＺモノマー単位またはＰＥＯＺモノマー単位を含むホモポリマー部分であり、より好ましくは、［Ｐ］が複数のＰＭＯＺモノマー単位を含むか、または好ましくは複数のＰＭＯＺモノマー単位からなり、

式中、

（ｉ）ｎが約４５～約５５の範囲の平均値を有し、好ましくは、ｎが約５０であるか、または

（ｉｉ）ｎが、［Ｐ］部分が約３ｋＤａ～約６ｋＤａの平均分子量、好ましくは約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される、実施形態１に記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２１】

実施形態３．ＰＯＺ－モノアシルグリセロールコンジュゲート、ＰＯＺ－ジアシルグリセロールコンジュゲート、ＰＯＺ－ジアルキルオキシプロピルコンジュゲート、ＰＯＺ－ステロイドまたはＰＯＺ－ステロールコンジュゲート、ＰＯＺ－リン脂質コンジュゲート、ＰＯＺ－セラミドコンジュゲート、およびこれらの混合物からなる群から選択される、実施形態１乃至実施形態２のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２２】

実施形態４．

（ｉ）脂質部分［Ｌ］が、６～３０個の炭素原子を含有する少なくとも１つの直鎖または分岐の、飽和または不飽和アルキル鎖を含み、好ましくは、脂質部分［Ｌ］が、少なくとも１つの直鎖または分岐飽和アルキル鎖を含み、

アルキル鎖が、場合により１つもしくは複数の生分解性基によって中断されている、および／または場合により１つの末端生分解性基を含み、生分解性基が、限定されるものではないが、ｐＨ感受性部分、アルキルまたはアルケニル部分（$C_{1\sim9}$アルキルまたは$C_{2\sim9}$アルケニル）、双性イオン性リンカー、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－）、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、エーテル（－Ｏ－）、チオエーテル（－Ｓ－）、オキシム（例えば、－Ｃ（Ｈ）＝Ｎ－Ｏ－または－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｈ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣH_2ＣH_2Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣH_2ＣH_2Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣH_2ＣH_2Ｃ（Ｏ）－）、－Ｃ（R^5）＝Ｎ－、－Ｎ＝Ｃ（R^5）－、－Ｃ（R^5）＝Ｎ－Ｏ－、－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（R^5）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^5）、－Ｎ（R^5）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）（ＮR^5）－、（ＮR^5）Ｃ（Ｓ）－、－Ｎ（R^5）Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^5）－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｓ）－、－ＯＳｉ（R^5）$_2$Ｏ－、－Ｃ（

Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、または－ＯＣ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）－、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、窒素（Ｎ）、スクシノイル、スクシネート、ホスフェートエステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、環状化合物、複素環式化合物、ピペリジン、ピラジン、ピリジン、ピペラジン、およびスルホネートエステル、ならびにこれらの組合せからなる群から選択され、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}が独立にＨまたはアルキル（例えば、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキル）であるか、または

（ｉｉ）脂質部分［Ｌ］がジテトラデシルアミンを含み、好ましくはリンカー基［リンカー］が（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）－）である、

実施形態１乃至実施形態３のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２３】

実施形態５．脂質部分［Ｌ］が、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個の炭素原子、好ましくは１０～２０個の炭素原子の範囲、より好ましくは１２～１８個の炭素原子の範囲、一層より好ましくは１４、１６または１８個の炭素原子、一層より好ましくは１６または１８個の炭素原子、最も好ましくは１４個の炭素原子を含む少なくとも１つ、好ましくは２つの直鎖または分岐の、飽和または不飽和アルキル鎖を含み、

全ての選択が互いに独立している、

実施形態１乃至実施形態４のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２４】

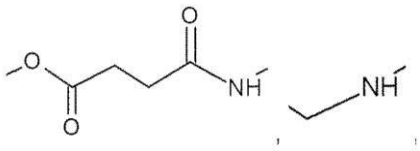
実施形態６．リンカー基［リンカー］が、限定されるものではないが、ｐＨ感受性部分、ペプチドまたはアミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、アルキルまたはアルケニル部分（Ｃ$_{1}$～$_{9}$アルキルまたはＣ$_{2}$～$_{9}$アルケニル）、双性イオン性リンカー、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－）、アミド（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、ジスルフィド（－Ｓ－Ｓ－）、カルボニル（－Ｃ（Ｏ）－）、エーテル（－Ｏ－）、チオエーテル（－Ｓ－）、オキシム（例えば、－Ｃ（Ｈ）＝Ｎ－Ｏ－または－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｈ）－）、カルバメート（－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－）、尿素（－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－）、スクシニル（－（Ｏ）ＣＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）－）、スクシンアミジル（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）、（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）－）、（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$Ｃ（Ｏ）Ｏ－）、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－、－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｒ^{5}）＝Ｎ－Ｏ－、－Ｏ－Ｎ＝Ｃ（Ｒ^{5}）－、－Ｏ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）（ＮＲ^{5}）－、（ＮＲ^{5}）Ｃ（Ｓ）－、－Ｎ（Ｒ^{5}）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{5}）－、－Ｃ（Ｏ）Ｓ－、－ＳＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｓ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｓ）－、－ＯＳｉ（Ｒ^{5}）$_{2}$Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）Ｏ－、または－ＯＣ（Ｏ）（ＣＲ^{3}Ｒ^{4}）Ｃ（Ｏ）－、カーボネート（－ＯＣ（Ｏ）Ｏ－）、窒素（Ｎ）、スクシノイル、スクシネート、ホスフェートエステル（－Ｏ－（Ｏ）ＰＯＨ－Ｏ－）、およびスルホネートエステル、ならびにこれらの組合せからなる群から選択され、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、およびＲ^{5}が独立にＨまたはアルキル（例えば、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{4}$アルキル）であり、好ましくは、リンカー基［リンカー］が、（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）－）、ペプチド結合またはアミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ２ＣＨ２Ｃ（Ｏ）Ｏ－）、および－ＮＨ－ＣＨ２－からなる群から選択される、実施形態１乃至実施形態５のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２５】

実施形態７．リンカー基［リンカー］がアミドリンカー部分、好ましくはエステルリンカー部分を含むか、またはリンカー基［リンカー］が

【０６２６】

【化５０】



【０６２７】

スクシネート、ペプチドもしくはアミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）、アミン、もしくは第２級アミンを含み、最も好ましくは、リンカー基［リンカー］が（－ＮＨＣ（Ｏ）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）－）を含む、実施形態１乃至実施形態６のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２８】

実施形態８．ポリマーコンジュゲート脂質が、「ＰＭＯＺ１」、「ＰＭＯＺ２」、「ＰＭＯＺ３」、「ＰＭＯＺ４」、および「ＰＭＯＺ５」からなる群から選択され、最も好ましくはポリマーコンジュゲート脂質が「ＰＭＯＺ４」であり、

式中、ｎは２～２００、好ましくは２０～１００、より好ましくは２４～２６、一層より好ましくは約１００、もしくはさらに一層より好ましくは４５～５０、最も好ましくは５０の範囲の平均値を有するか、またはｎは、［Ｐ］部分が約３ｋＤａ～約６ｋＤａの平均分子量、好ましくは約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択され、

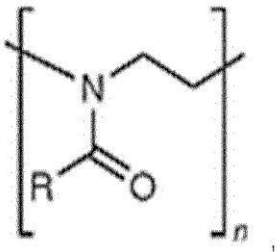
最も好ましくは、ｎが４５～５０、最も好ましくは５０の平均値を有する「ＰＭＯＺ４」である、実施形態１乃至実施形態７のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質。

【０６２９】

実施形態９．少なくとも１つのポリオキサゾリン（ＰＯＺ）モノマー単位

【０６３０】

【化５１】



【０６３１】

（式中、Ｒは$Ｃ_1$～$Ｃ_9$アルキルまたは$Ｃ_2$～$Ｃ_9$アルケニル、好ましくはＣ１またはＣ２アルキルであり、ｎは約４５～約５５の範囲の平均値を有し、好ましくは、ｎは約５０であるか、またはｎは、［Ｐ］部分が約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される）

を含むホモポリマー部分を含み、

好ましくは、複数のモノマー単位を含むホモポリマー部分は、ポリ（２－メチル－２－オキサゾリン）（ＰＭＯＺ）、ポリ（２－エチル－２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）、ポリ（２－プロピル－２－オキサゾリン）（ＰＰＯＺ）、ポリ（２－ブチル－２－オキサゾリン）（ＰＢＯＺ）、ポリ（２－イソプロピル－２－オキサゾリン）（ＰＩＰＯＺ）、ポリ（２－メトキシメチル－２－オキサゾリン）（ＰＭｅＯＭｅＯｘ）、またはポリ（２－ジメチルアミノ－２－オキサゾリン）（ＰＤＭＡＯｘ）を含む、

より好ましくは、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む、脂質ナノ粒子。

【０６３２】

実施形態１０．カチオン性またはイオン化可能脂質をさらに含む、実施形態９に記載の脂質ナノ粒子。

実施形態１１．

（ｉ）ポリエチレングリコール－（ＰＥＧ）－脂質コンジュゲートもＰＥＧと脂質様材料とのコンジュゲートも含まず、好ましくはＰＥＧを含まない；および／または

（ｉｉ）硫黄基（－Ｓ－）、末端求核剤を含む、ならびに／またはＲＮＡ、人工ｍＲＮＡ、少なくとも１つのコード配列を含む化学修飾もしくは非修飾メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、自己複製ＲＮＡ、環状ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ、およびレプリコンＲＮＡからなる群から選択される核酸化合物である生物活性成分に共有結合的にカップリングしている、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含まない、

実施形態９乃至実施形態１０に記載の脂質ナノ粒子。

【０６３３】

実施形態１２．カチオン性またはイオン化可能脂質が生理的ｐＨで正味の正電荷を有し、より好ましくは、カチオン性またはイオン化可能脂質が第３級窒素基または第４級窒素基を含む、実施形態９乃至実施形態１１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３４】

実施形態１３．リン脂質をさらに含み、好ましくは、リン脂質は、限定されるものではないが、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ；１，２－ジ－（３，７，１１，１５－テトラメチルヘキサデカノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰｈｙＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ；ジオレオイルホスファチジルコリン）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ；ジパルミトイルホスファチジルコリン）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬｏＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルホスホエタノールアミン、１６－Ｏ－ジメチルホスファチジルエタノールアミン、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１８－１－トランスホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、１，２－ジスクアレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＱＰＥ）、１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（トランスＤＯＰＥ）、１－ステアロイル－２－リノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＳＬＰＥ）、１－トリデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－オレオイル－２－ヒドロキシ－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＰＯＰＳ）、１－１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－

Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリン（ナトリウム塩）、１－Ｏ－ヘキサデカニル－２－Ｏ－（９Ｚ－オクタデセニル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリンまたは１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－フィタニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１－パルミトイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＣｈｅｍｓＰＣ）、１，２－ジコレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＣｈｅｍｓＰＣ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチル水素ホスフェート（ＤＯＣＰ）、２－（（２，３－ビス（オレオイルオキシ）プロピル）ジメチルアンモニオ）エチルエチルホスフェート（ＤＯＣＰｅ）、および１－Ｏ－オクタデシル－２－Ｏ－メチル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（エデルホシン）からなる群から選択される双性イオン性化合物であり、好ましくは、リン脂質はＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、最も好ましくはＤＰｈｙＰＥである、実施形態９乃至実施形態１２のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３５】

実施形態１４．好ましくはコレステロール、コレステリルヘミスクシネート（ＣＨＥＭＳ）およびこれらの誘導体からなる群から選択される、ステロールまたはステロイドをさらに含み、好ましくはコレステロールをさらに含む、実施形態９乃至実施形態１３のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３６】

実施形態１５．

好ましくは全ての脂質成分または賦形剤の１００％に対するｍｏｌパーセンテージの組成に基づいて、

（ｉ）１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ｍｏｌ％の量の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｉ）好ましくは、５ｍｏｌ％の量の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質、

（ｉｉｉ）より好ましくは、２．５ｍｏｌ％の量の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

を含む、実施形態９乃至実施形態１４のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３７】

実施形態１６．ポリマーコンジュゲート脂質が実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載されるＰＭＯＺ－脂質である、実施形態９乃至実施形態１５のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３８】

実施形態１７．

（ｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％の中性脂質および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２８．５ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％の中性脂質および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｉｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２

４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２８．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、１ｍｏｌ％のＤＨＰＣ、および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｖ）４９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、１０ｍｏｌ％のＤＨＰＣ、および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖ）４７．４ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２７のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．１ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉｉ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉｉｉ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．１ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび２．５ｍｏｌ％の２－［（ＰＭＯＺ）ｎ－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド］；

（ｉｘ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび１．７ｍｏｌ％の２－［（ＰＭＯＺ）ｎ－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド］；ならびに最も好ましくは

（ｘ）５９ｍｏｌ％のＣ２４、２８．５ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＰｈｙＰＥおよび２．５ｍｏｌ％の「ＰＭＯＺ４」

からなる群から選択される比から選択される賦形剤を含み、

ポリマーコンジュゲート脂質のｎは約４５～約５５の範囲の平均値を有し、好ましくは、ｎは約５０であるか、またはｎは、ポリマー部分が約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される、

実施形態９乃至実施形態１６のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６３９】

実施形態１８．実施形態１乃至実施形態８に記載のポリマーコンジュゲート脂質が脂質ナノ粒子の凝集を阻害する、実施形態９乃至実施形態１７のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４０】

実施形態１９．生物活性成分をさらに含む、実施形態９乃至実施形態１８のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

実施形態２０．生物活性成分が、ＲＮＡ、人工ｍＲＮＡ、少なくとも１つのコード配列

を含む化学修飾もしくは非修飾メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、自己複製ＲＮＡ、環状ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ、およびレプリコンＲＮＡ；またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される核酸化合物であり、より好ましくは、生物活性成分が化学修飾ｍＲＮＡまたは化学非修飾ｍＲＮＡである、実施形態１９に記載の脂質ナノ粒子。

【０６４１】

実施形態２１．ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子と会合しており、好ましくは、ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子にカプセル化されている、実施形態９乃至実施形態２０のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４２】

実施形態２２．約５～約２０、より好ましくは約１０～約１８、一層より好ましくは約１２～約１６、最も好ましくは約１４の範囲のＮ／Ｐ比を達成するような量のｍＲＮＡを含む、実施形態９乃至実施形態２１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４３】

実施形態２３．無菌液体担体で再構成するための無菌固体組成物であり、ｐＨ修正剤、増量剤、安定剤、非イオン性界面活性剤および抗酸化剤から選択される１種または複数の不活性成分をさらに含み、無菌液体担体が水性担体である、実施形態９乃至実施形態２２のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４４】

実施形態２４．無菌液体組成物であり、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、または約６０ｎｍ～約２５０ｎｍ、または約６０ｎｍ～約２００ｎｍ、または約７０ｎｍ～２００ｎｍ、または約７５ｎｍ～約１６０、または約８５ｎｍ～約１４０ｎｍ、または約９０ｎｍ～約１３０ｎｍ、または約５０ｎｍ～約１２０ｎｍの動的光散乱によって決定される平均流体力学的径を有する、実施形態９乃至実施形態２３のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４５】

実施形態２５．－５０ｍＶ～＋５０ｍＶの範囲、好ましくは－２５ｍＶ～＋２５ｍＶの範囲、より好ましくは－１０ｍＶ～＋１０ｍＶの範囲、最も好ましくは－５ｍＶ～＋５ｍＶの範囲のゼータ電位を示す、実施形態９乃至実施形態２４のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４６】

実施形態２６．ｍＲＮＡ化合物がモノ、バイ、またはマルチシストロン性ｍＲＮＡである、実施形態９乃至実施形態２５のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

実施形態２７．ｍＲＮＡ化合物が少なくとも１つの化学修飾を含む、実施形態９乃至実施形態２６のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４７】

実施形態２８．化学修飾が塩基修飾、糖修飾、骨格修飾および脂質修飾からなる群から選択され、好ましくは、化学修飾が塩基修飾であり、より好ましくは、塩基修飾が、好ましくは、シュードウリジン（プシーまたはψ）、Ｎ１－メチルシュードウリジン（Ｎ１ＭＰＵ、Ｎ１Ｍプシーまたは Ｎ１Ｍψ）、１－エチルシュードウラシル、２－チオウラシル（ｓ２Ｕ）、４－チオウラシル、５－メチルシトシン、５－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、実施形態２７に記載の脂質ナノ粒子。

【０６４８】

実施形態２９．ｍＲＮＡ化合物がペプチドまたはタンパク質をコードするコード領域を含み、コード領域が配列修飾を示す、実施形態９乃至実施形態２８のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６４９】

実施形態３０．配列修飾が配列のＧ／Ｃ含量修飾、コドン修飾、コドン最適化、またはＣ最適化から選択され；好ましくは、対応する野生型ｍＲＮＡのコード領域と比較して、

－コード領域のＧ／Ｃ含量が増加している；

－コード領域のＣ含量が増加している；

－コード領域のコドン使用頻度がヒトコドン使用頻度に適合されている；および／または
－コドン適応指標（ＣＡＩ）がコード領域で増加もしくは最大化している、実施形態２９に記載の脂質ナノ粒子。
【０６５０】
実施形態３１．ｍＲＮＡ化合物が、
ａ）５’キャップ構造、好ましくはｍ７ＧｐｐｐＮ、より好ましくはキャップ１またはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；
ｂ）場合により、好ましくは、マイクロＲＮＡ結合部位がｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－２６ａ、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択されるマイクロＲＮＡのためのものである、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ配列；
ｃ）少なくとも１つの５’－ＵＴＲエレメント；
ｄ）コード配列；
ｅ）少なくとも１つの３’－ＵＴＲエレメント；
ｆ）少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｇ）少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；
またはこれらの任意の組合せ
をさらに含む、実施形態９乃至実施形態３０のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。
【０６５１】
実施形態３２．少なくとも１つのコードＲＮＡが、５’キャップ構造、好ましくはｍ７Ｇ、キャップ０、キャップ１、キャップ２、修飾キャップ０、または修飾キャップ１構造を含む、実施形態９乃至実施形態３１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。
【０６５２】
実施形態３３．少なくとも１つのコードＲＮＡが少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲおよび／または少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲを含み、好ましくは、少なくとも１つの異種５’－ＵＴＲが、ＨＳＤ１７Ｂ４、ＲＰＬ３２、ＡＳＡＨ１、ＡＴＰ５Ａ１、ＭＰ６８、ＮＤＵＦＡ４、ＮＯＳＩＰ、ＲＰＬ３１、ＳＬＣ７Ａ３、ＴＵＢＢ４ＢおよびＵＢＱＬＮ２から選択される遺伝子の５’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む；および／または
好ましくは、少なくとも１つの異種３’－ＵＴＲが、ＰＳＭＢ３、ＡＬＢ７、アルファ－グロビン、ＣＡＳＰ１、ＣＯＸ６Ｂ１、ＧＮＡＳ、ＮＤＵＦＡ１およびＲＰＳ９から選択される遺伝子の３’－ＵＴＲ、またはこれらの遺伝子のいずれか１つのホモログ、断片もしくはバリアントから誘導される核酸配列を含む、
実施形態９乃至実施形態３２のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。
【０６５３】
実施形態３４．少なくとも１つのコードＲＮＡが、（ｉ）ＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲおよびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ、または（ｉｉ）ＲＰＬ３２　５’－ＵＴＲおよびＡＬＢ７　３’－ＵＴＲ、好ましくは変異アルファ－グロビン　３’－ＵＴＲ（配列番号１１／１２）、より好ましくはＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲ（配列番号２１／２２）およびＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ（配列番号１９／２０）を含む、実施形態９乃至実施形態３３のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。
【０６５４】
実施形態３５．　５’→３’方向に、以下のエレメント：
ａ）好ましくはｍ７Ｇ（５’）、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧおよびｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧからなる群から選択される、５’キャップ構造；
ｂ）ＴＯＰ遺伝子の５’－ＵＴＲから誘導される核酸配列を含む５’－ＵＴＲエレメントであって、前記核酸配列は、好ましくは、配列番号２２、２４、２６による核酸配列、ま

たはそのホモログ、断片もしくはバリアント、最も好ましくは配列番号２２（ＨＳＤ１７Ｂ４）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、５’－ＵＴＲエレメント；
ｃ）少なくとも１つのコード配列；
ｄ）α－グロビン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、核酸配列は、好ましくは、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアントに対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；および／またはアルブミン遺伝子から誘導される核酸配列を含む３’－ＵＴＲエレメントであって、核酸配列は、好ましくは、配列番号１８による核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリアント、最も好ましくは配列番号２０（ＰＳＭＢ３）による核酸配列に対応するＲＮＡ配列を含む、３’－ＵＴＲエレメント；
ｅ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、４０～８０、または５０～７０個のアデノシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ａ）配列；
ｆ）場合により、好ましくは１０～２００、１０～１００、２０～７０、２０～６０または１０～４０個のシトシンヌクレオチドからなる、少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列；ならびに
ｇ）場合により、好ましくは配列番号４によるＲＮＡ配列を含む、少なくとも１つのヒストンステムループ
を含む、実施形態９乃至実施形態３４のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６５５】

実施形態３６．生物活性成分が、
（ａ）ペプチドもしくはタンパク質、またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つのコード配列を含むｍＲＮＡであって、ペプチドまたはタンパク質が抗原であり、抗原が、好ましくは、病原性抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原もしくは自己免疫自己抗原、またはその断片もしくはバリアントから誘導される、ｍＲＮＡ；または
（ｂ）治療用タンパク質、またはその断片もしくはバリアントをコードする少なくとも１つのコード配列を含むｍＲＮＡであって、治療用タンパク質が、
（ｉ）代謝、内分泌もしくはアミノ酸障害を処置するための酵素補充療法に使用するため、または非存在、欠損もしくは変異タンパク質の置換に使用するための治療用タンパク質；
（ｉｉ）血液障害、循環系の疾患、呼吸器系の疾患、感染性疾患または免疫不全の処置に使用するための治療用タンパク質；
（ｉｉｉ）がんまたは腫瘍疾患の処置に使用するための治療用タンパク質；
（ｉｖ）ホルモン補充療法に使用するための治療用タンパク質；
（ｖ）体細胞を多能性または全能性幹細胞に再プログラミングするのに使用するための治療用タンパク質；
（ｖｉ）アジュバントまたは免疫賦活として使用するための治療用タンパク質；
（ｖｉｉ）治療用抗体である治療用タンパク質；
（ｖｉｉｉ）遺伝子編集剤である治療用タンパク質；および
（ｉｘ）肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患の処置または防止に使用するための治療用タンパク質
からなる群から選択される、ｍＲＮＡ
である、実施形態９乃至実施形態３５のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６５６】

実施形態３７．病原性抗原をコードする少なくとも１つのコード配列が、細菌、ウイルス、真菌および原生動物抗原からなる群から選択される、実施形態３６部分項目（ａ）に記載の脂質ナノ粒子。

【０６５７】

実施形態３８．病原性抗原をコードする少なくとも１つのコード配列が、
（ｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏｖ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、ブニヤウイルス目ウイルス

、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３およびＤＥＮＶ－４）、エボラウイルス、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、フラビウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトメタニューモウイルス（ＨＭＰＶ）、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトパラインフルエンザウイルス（ＨＰＩＶ）、インフルエンザウイルス、腸管外病原性大腸菌（ＥｘＰＥＣ）、ラッサ・マムアレナウイルス（ＬＡＳＶ）、ＭＥＲＳコロナウイルス、結核菌、ニパウイルス、ノロウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ライノウイルス、ロタウイルス、ワクシニアウイルス、黄熱病ウイルス（ＹＦＶ）、ジカウイルス（ＺＩＫＶ）、トラコーマクラミジア（すなわち、クラミジアを引き起こす細菌クラミジア）、またはマラリア原虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、または卵形マラリア原虫）から誘導される；および／または

（ｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来の構造タンパク質、アクセサリータンパク質、もしくはレプリカーゼタンパク質、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアントから誘導される；および／または

（ｉｉｉ）ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のスパイクタンパク質（Ｓ）、エンベロープタンパク質（Ｅ）、膜タンパク質（Ｍ）もしくはヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ）、またはこれらのいずれかの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアント（好ましくは、スパイクタンパク質（Ｓ）は、スパイクタンパク質断片Ｓ１もしくはスパイクタンパク質断片Ｓ２、より好ましくはスパイクタンパク質断片Ｓ１、またはこれらの免疫原性断片もしくは免疫原性バリアント（例えば、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）、主要中和ドメイン（ＣＮＤ））を含むか、またはこれらからなる）から誘導される；および／または

（ｉｖ）少なくとも１つのプレフュージョン安定化突然変異を含む、ＳＡＲＳコロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ｎＣｏＶ－２０１９コロナウイルス、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）由来のプレフュージョン安定化スパイクタンパク質（Ｓ）（Ｓ＿ｓｔａｂ）から誘導される、

実施形態３７に記載の脂質ナノ粒子。

【０６５８】

実施形態３９．

（ｉ）感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態の処置または予防において；および／または

（ｉｉ）代謝もしくは内分泌障害を処置するための酵素補充療法に使用するための、または非存在、欠損もしくは変異タンパク質の置換に使用するための、

使用するための、実施形態９乃至実施形態３８のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６５９】

実施形態４０．感染性疾患の処置または予防に使用するための、実施形態９乃至実施形態３９のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

実施形態４１．疾患、障害または状態の処置または防止に使用するための少なくとも１つのペプチドまたはタンパク質をコードする少なくとも１つのコード配列を含む、少なくとも１つのコードＲＮＡを含み、それを必要とする対象に局所または局所領域注射、注入または埋込、特に皮内、皮下、筋肉内、前房内、結膜下、脈絡膜上注射、網膜下、テノン嚢下、眼球後、局所、後胸膜近傍投与、または肺内吸入、間質、局所領域、硝子体内、腫瘍内、リンパ内、節内、関節内、関節滑液嚢内、関節周囲、腹腔内、腹部内、心臓内、病巣内、心膜内、脳室内、胸膜内、神経周囲、胸腔内、硬膜外、硬膜内、硬膜周囲、髄腔内、髄内、脳内、空洞内、海綿体内、前立腺内、精巣内、軟骨内、骨内、円板内、脊髄内、仙骨内、嚢内、歯肉内、卵巣内、子宮内、眼内、眼周囲、歯周、眼球後、くも膜下、結膜

下、脈絡膜上注射、注入、埋込、経鼻、頬側、舌下、耳または耳介、眼、結膜、膣、直腸、子宮頸部内、副鼻腔内、喉頭、中咽頭、尿管、尿道投与を介して投与される、より好ましくはそれを必要とする対象に筋肉内、静脈内、皮内、皮下、腫瘍内、鼻腔内、または吸入により、最も好ましくは筋肉内投与される、実施形態９または実施形態４０に記載の脂質ナノ粒子。

【０６６０】

実施形態４２．場合により、可溶化のための液体ビヒクル、および場合により、成分の用法および用量についての情報を提供する技術的説明書を含む、実施形態９乃至実施形態４１に記載の脂質ナノ粒子のいずれか１つを含む、キットまたはキットオブパーツ。

【０６６１】

実施形態４３．インビボ薬物送達に使用するための、好ましくは核酸、好ましくはｍＲＮＡを送達するのに使用するための、実施形態９乃至実施形態４１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツ。

【０６６２】

実施形態４４．医薬として使用するための、実施形態９乃至実施形態４１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態４３に記載のキットもしくはキットオブパーツ。

実施形態４５．医薬が、ウイルス、細菌または原生動物学的感染性疾患を含む感染性疾患、がんまたは腫瘍疾患、肝臓疾患、自己免疫疾患、アレルギー、遺伝病を含む単一遺伝子疾患、遺伝子疾患全般、遺伝的背景を有し、典型的には定義される遺伝子欠陥によって引き起こされ、メンデルの法則に従って遺伝する疾患；心血管疾患、神経疾患、呼吸器系の疾患、消化器系の疾患、皮膚の疾患、筋骨格障害、結合組織の障害、新生物、免疫不全、内分泌、栄養および代謝疾患、眼疾患、耳疾患、およびペプチドまたはタンパク質欠損に関連する疾患から選択される疾患を防止、予防、処置および／または改善するためのものである、実施形態４４に記載の医薬として使用するための脂質ナノ粒子。

【０６６３】

実施形態４６．医薬がワクチン組成物である、実施形態４４または実施形態４５に記載の医薬として使用するための脂質ナノ粒子。

実施形態４７．医薬として使用するための、ならびに／またはウイルス、細菌もしくは原生動物学的感染性疾患を含む感染性疾患、がんもしくは腫瘍疾患から選択される疾患を防止、予防、処置および／もしくは改善するための、実施形態９乃至実施形態４６のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツを含むワクチン組成物。

【０６６４】

実施形態４８．感染性疾患；がんもしくは腫瘍疾患、障害もしくは状態；肝線維症、肝硬変および肝臓がんからなる群から選択される肝臓疾患；アレルギー；または自己免疫疾患、障害もしくは状態を処置または予防する方法であって、

ａ）少なくとも１つのポリオキサゾリン（ＰＯＺ）モノマーを含むホモポリマー部分、好ましくは実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む実施形態９乃至実施形態４５のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子、実施形態４７に記載のワクチン組成物、または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツを用意する工程と；

ｂ）ｍＲＮＡ、脂質ナノ粒子、ワクチン組成物、またはキットもしくはキットオブパーツを組織または生物に適用または投与する工程と

を含む方法。

【０６６５】

実施形態４９．実施形態１乃至３３のいずれか１つに記載される脂質ナノ粒子を対象に投与する工程を含む、抗原または治療用ペプチドもしくはタンパク質をコードするｍＲＮＡを対象に送達する方法であって、ｍＲＮＡは抗原または治療用ペプチドもしくはタンパク質をコードし、ｍＲＮＡを対象に送達することは疾患または障害の処置または防止において有益であり、好ましくは、対象は哺乳動物であり、より好ましくは、対象はヒトであ

る、方法。
【０６６６】
実施形態５０．ｍＲＮＡ、実施形態９乃至実施形態４８のいずれか１つに記載される脂質ナノ粒子、実施形態４７に記載のワクチン組成物または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツが、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腫瘍内注射または任意の前述の実施形態に開示される任意の投与経路によって組織または生物に投与される、実施形態４８乃至実施形態４９のいずれか１つに記載の方法。
【０６６７】
実施形態５１．対象において抗原特異的免疫応答をもたらすのに有効な量の実施形態４７に記載のワクチン組成物を対象に投与する工程を含む、対象において免疫応答を誘導する方法。
【０６６８】
実施形態５２．有効用量のウイルス抗原をコードするｍＲＮＡを含む、対象のワクチン接種に使用するための、実施形態９乃至実施形態４８のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツまたは実施形態４７に記載のワクチン組成物を含む医薬組成物。
【０６６９】
実施形態５３．（ｉ）免疫応答を誘導するため、（ｉｉ）抗原特異的Ｔ細胞応答を誘導するため、または好ましくは（ｉｉｉ）ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するための、実施形態５２に記載の医薬組成物または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツの使用。
【０６７０】
実施形態５４．感染性疾患を予防するための、または感染性疾患を予防するための医薬の製造における、実施形態５２に記載の医薬組成物の使用であって、前記医薬が、好ましくはワクチン組成物である、使用。
【０６７１】
実施形態５５．実施形態９乃至実施形態４８のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態５２に記載の医薬組成物または実施形態４２に記載のキットもしくはキットオブパーツを、それを必要とする対象に投与する工程を含む、対象における疾患または状態を防止、改善または処置する方法。
【０６７２】
実施形態５６．脂質ナノ粒子の投与が、対象のリンパ球においてｍＲＮＡによってコードされる抗原の発現をもたらす、前述の方法実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５７．障害が、コロナウイルスによる感染症またはこのような感染症に関連する障害である、実施形態３６、３９、４１、４５、４８または４９のいずれか１つに記載される障害を処置または防止する方法。
【０６７３】
実施形態５８．必要とする対象が哺乳動物対象、好ましくはヒト対象である、実施形態３６、３９、４１、４５、４８または４９のいずれか１つに記載される障害を処置または防止する方法。
【０６７４】
実施形態５９．脂質ナノ粒子の投与が抗原特異的抗体応答をもたらし、好ましくは、抗原特異的抗体応答が血清中の抗原特異的抗体の存在によって測定される、前述の方法実施形態のいずれか１つに記載の方法。
【０６７５】
実施形態６０．
（ｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％

の中性脂質および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２８．５ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％の中性脂質および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｉｉ）５９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２８．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、１ｍｏｌ％のＤＨＰＣ、および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｉｖ）４９ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２４のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、２９．３ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、１０ｍｏｌ％のＤＨＰＣ、および２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖ）４７．４ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２７のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣまたはＤＰｈｙＰＥ、好ましくはＤＰｈｙＰＥ、および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉ）４７．４ｍｏｌ％のカチオン性またはイオン化可能脂質、好ましくはＣ１～Ｃ２７のイオン化可能脂質構造の１つ、より好ましくはイオン化可能脂質構造Ｃ２４または式ＩＩＩ－３（（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．１ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび２．５ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉｉ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、および１．７ｍｏｌ％の実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質；

（ｖｉｉｉ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．１ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび２．５ｍｏｌ％の２－［（ＰＭＯＺ）ｎ－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド］；

（ｉｘ）４７．４ｍｏｌ％の式ＩＩＩ－３（（（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート））、４０．９ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＳＰＣおよび１．７ｍｏｌ％の２－［（ＰＭＯＺ）ｎ－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド］；ならびに最も好ましくは

（ｘ）５９ｍｏｌ％のＣ２４、２８．５ｍｏｌ％のコレステロール、１０ｍｏｌ％のＤＰｈｙＰＥおよび２．５ｍｏｌ％の「ＰＭＯＺ４」

からなる群から選択される比から選択される賦形剤を含み、

ポリマーコンジュゲート脂質のｎは約４５～約５５の範囲の平均値を有し、好ましくは

、ｎは約５０であるか、またはｎは、ポリマー部分が約４．２ｋＤａ～約４．４ｋＤａ、もしくは最も好ましくは約４．３ｋＤａの平均分子量を有するように選択される、実施形態９乃至実施形態１６のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６７６】

実施形態６１．C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}もしくはC_{14}の長さを有する、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、もしくはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有する少なくとも１つのアルキル鎖を有する中性脂質もしくはリン脂質を含むか、またはさらに最も好ましくは、２つの中性脂質の組合せを含み、組合せは、少なくとも２つのアルキル鎖を有する中性脂質またはリン脂質であって、各アルキル鎖は独立に、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、またはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有する、中性脂質またはリン脂質を含み、さらに最も好ましくは、０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０４：０ＰＣ（１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０７：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、好ましくは０７：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）からなる群から選択されるリン脂質を含む、実施形態９乃至実施形態１６または実施形態６０のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６７７】

実施形態６２．脂質ナノ粒子が、少なくとも２つのアルキル鎖を有する中性脂質またはリン脂質を含み、各アルキル鎖は独立に、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}もしくはC_{14}の長さを有する、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、もしくはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有し、またはさらに最も好ましくは、脂質ナノ粒子が、２つの中性脂質の組合せを含み、組合せは、少なくとも２つのアルキル鎖を有する中性脂質またはリン脂質であって、各アルキル鎖は独立に、好ましくはC_6、C_7、C_8、C_9、またはC_{10}の長さを有する、より好ましくはC_6、C_7、C_8の長さを有する、最も好ましくはC_7の長さを有する、中性脂質またはリン脂質を含み、さらに最も好ましくは、０５：０ＰＣ（１，２－ジペンタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０４：０ＰＣ（１，２－ジブチリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０６：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘキサノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０７：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、０８：０ＰＣ（１，２－ジオクタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、および０９：０ＰＣ（１，２－ジノナノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、好ましくは０７：０ＰＣ（ＤＨＰＣ、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）からなる群から選択されるリン脂質を含む、実施形態９乃至実施形態１６または実施形態６０乃至実施形態６１のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子。

【０６７８】

実施形態６３．実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質の代わりにＰＥＧ－脂質を含む対照脂質ナノ粒子と比較して、（ｉ）凍結および解凍、または（ｉｉ）フリーズドライ（凍結乾燥）および再構成すると、低いＰＤＩおよび／または小さい径を有する、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む脂質ナノ粒子。

【０６７９】

実施形態６４．脂質ナノ粒子が、解凍すると、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質の代わりにＰＥＧ－脂質を含む対照脂質ナノ粒子と比較して、低いＰＤＩおよび／または小さい径を有する、実施形態９乃至実施形態１６

もしくは実施形態６０乃至実施形態６２のいずれか１つに記載の凍結脂質ナノ粒子または実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む脂質ナノ粒子を作製する方法。

【０６８０】

実施形態６５．脂質ナノ粒子が、再構成すると、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質の代わりにＰＥＧ－脂質を含む対照脂質ナノ粒子と比較して、低いＰＤＩおよび／または小さい径を有する、実施形態９乃至実施形態１６もしくは実施形態６０乃至実施形態６２のいずれか１つに記載の凍結乾燥脂質ナノ粒子または実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む脂質ナノ粒子を作製する方法。

【０６８１】

実施形態６６．ＰＥＧ－脂質の代わりに賦形剤として実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を使用する工程を含み、脂質ナノ粒子が、再構成すると、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質の代わりにＰＥＧ－脂質を含む対照脂質ナノ粒子と比較して、低いＰＤＩおよび／または小さい径を有する、実施形態９乃至実施形態１６または実施形態６０乃至実施形態６２のいずれか１つに記載の凍結乾燥脂質ナノ粒子を調製するための改善された凍結乾燥方法。

【０６８２】

実施形態６７．実施形態９乃至実施形態１６もしくは実施形態６０乃至実施形態６２のいずれか１つに記載の脂質ナノ粒子または実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含むワクチン組成物。

【０６８３】

実施形態６８．製剤が、凍結／解凍サイクル前のＬＮＰ平均径と比較して、１回または複数回の凍結／解凍サイクル後に、約３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、実施形態１乃至実施形態８のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む実施形態９乃至実施形態１６、実施形態６０乃至実施形態６２または実施形態６７のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８４】

実施形態６９．製剤が、凍結／解凍サイクル前のＬＮＰ平均径と比較して、１回または複数回の凍結／解凍サイクル後に、約１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８５】

実施形態７０．製剤が、凍結乾燥前のＬＮＰ平均径と比較して、凍結乾燥後に、約３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８６】

実施形態７１．製剤が、凍結乾燥前のＬＮＰ平均径と比較して、凍結乾燥後に、約１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８７】

実施形態７２．製剤が、希釈前のＬＮＰ平均径と比較して、希釈後に、約３０％、２９％、２８％、２７％、２６％、２５％、２４％、２３％、２２％、２１％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８８】

実施形態７３．製剤が、希釈前のＬＮＰ平均径と比較して、希釈後に、約１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満のＬＮＰ平均径の増加を有する、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６８９】

実施形態７４．製剤のカプセル化効率が、約４℃以下で少なくとも１か月間の貯蔵後に実質的に同じである、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【０６９０】

実施形態７５．ＬＮＰのＬＮＰ平均径が、約４℃以下で少なくとも１か月間の貯蔵後に実質的に同じである、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリマーコンジュゲート脂質を含む前述の実施形態のいずれか１つに記載のワクチン組成物または脂質ナノ粒子。

【実施例】

【０６９１】

以下の節では、本発明の様々な実施形態および態様を例示する特定の実施例を提示する。しかしながら、本発明は、例示される実施形態によって範囲が限定されず、これらの実施形態は単に本発明の単一態様の例示として意図されているものであり、機能的に等価な方法は本発明の範囲内にある。実際、本明細書に記載されるものに加えて、本発明の様々な修正が、以下の説明、不随する図面および以下の実施例から当業者に容易に明らかとなろう。全てのこのような修正が本明細書に開示される特許請求の範囲の範囲に入る。

【０６９２】

実施例１：ＲＮＡ構築物の作製

以下のＲＮＡ構築物を実施例３～７に記載の実験で使用した：ｉ）スポロゾイト周囲タンパク質（ｃｉｒｃｕｍｓｐｏｒｏｚｏｉｔｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ）をコードするＲＮＡ（ＣＳＰ　ｍＲＮＡ）；ｉｉ）狂犬病ウイルス糖タンパク質をコードするＲＮＡ（ＲＡＢＶ－Ｇ　ｍＲＮＡ）；ｉｉｉ）フォティヌス・ピラリス（Ｐｈｏｔｉｎｕｓ　ｐｙｒａｌｉｓ）ルシフェラーゼをコードするＲＮＡ（ＰｐＬｕｃ　ｍＲＮＡ）；およびｉｖ）チロシン関連タンパク質２（Ｔｒｐ２）またはドーパクロムトートメラーゼ（ｄｏｐａｃｈｒｏｍｅ　ｔａｕｔｏｍｅｒａｓｅ）をそれぞれコードするＲＮＡ。

【０６９３】

ＲＮＡ構築物を調製するために、上に列挙される所望のタンパク質（すなわち、ＣＳＰ、ＲＡＢＶ－Ｇ、ＰｐＬｕｃ、およびＴｒｐ２）をコードするＤＮＡ配列を調製し、その後のＲＮＡインビトロ転写に使用した（ＤＮＡ配列を、場合により、ＧＣ最適化ＣＤＳを導入することによって野生型ＣＤＳを修飾することによって調製した）。配列を、下記のモチーフ（ＵＴＲ配列、アデノシンの伸長、場合によりヒストンステムループ構造、および３０個のシトシンの伸長）を含むプラスミドベクターに導入した。得られたプラスミドＤＮＡを、一般的なプロトコルを使用して、細菌で形質転換および増殖させ、プラスミドＤＮＡを抽出し、精製し、制限酵素を使用して酵素的に線状化し、適切な緩衝液条件下、ヌクレオチド混合物（ＡＴＰ／ＧＴＰ／ＣＴＰ／ＵＴＰ）およびキャップアナログ（例えば、ｍ７ＧｐｐｐＧまたはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧまたはｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ）の存在下で、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用したＤＮＡ依存性ＲＮＡインビトロ転写に使用した。得られたＲＮＡを、ＲＰ－ＨＰＬＣ（ＰｕｒｅＭｅｓｓｅｎｇｅｒ（登録商標）；国際公開第２００８０７７５９２号

による）を使用して精製し、さらなる実験に使用した。得られたｍＲＮＡを、商業的ポリアデニル化キットを使用して酵素的にポリアデニル化した。

【０６９４】

全ての実施例で使用したＲＮＡ構築物の詳細は以下の通りである：

Ａｄ（ｉ）：Ｐｆ－ＣＳＰ　ｍＲＮＡは、ＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲ、ＧＣ最適化熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲タンパク質ＯＲＦ、ＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ、６４×アデノシン（ポリＡ尾部）；５ヌクレオチド、３０×シトシン（ポリＣ尾部）、ヒストンステムループ配列、および３’末端に５つの追加のヌクレオチドを含んでいた（配列番号３８）；

Ａｄ　ｉｉ）：ＲＡＢＶ－Ｇ　ｍＲＮＡは、ｍＣａｐ、ＧＣ最適化狂犬病ウイルス糖タンパク質ＯＲＦ、ｍｕａｇ　３’－ＵＴＲ；６４×アデノシン（ポリＡ尾部）；５ヌクレオチド、３０×シトシン（ポリＣ尾部）、ヒストンステムループ配列、および３’末端に５つの追加のヌクレオチドを含んでいた（配列番号３２）；

Ａｄ　ｉｉｉ）：ＰｐＬｕｃ　ｍＲＮＡは、ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ＡＧキャップアナログ、ＨＳＤ１７Ｂ４　５’－ＵＴＲ、ＧＣ最適化フォティヌス・ピラリスルシフェラーゼＯＲＦ（ホタルルシフェラーゼ）、ＰＳＭＢ３　３’－ＵＴＲ、１００×アデノシンを有するポリＡ尾部、およびヒストンステムループ配列を含んでいた（配列番号７１）；

Ａｄ　ｉｖ）Ｔｒｐ２　ｍＲＮＡは、ＲＰＬ３２　５’－ＵＴＲ、ＡＬＢ７　３’－ＵＴＲ、６４×アデノシン（ポリＡ尾部）；５ヌクレオチド、３０×シトシン（ポリＣテール）、ヒストンステムループ配列、および３’末端に５つの追加のヌクレオチドを含み、配列番号２９に詳述される。

【０６９５】

実施例２：脂質の合成およびＬＮＰの調製

本実施例は、本明細書で使用されるカチオン性脂質を得るための方法および情報、ならびに本発明のＬＮＰを作製する方法を提供する。

【０６９６】

実施例２．１：脂質の合成

以下の３つの脂質を、キロブロック社（ＣｈｉｒｏＢｌｏｃｋ　ＧｍｂＨ）（ドイツ、ビターフェルト＝ヴォルフェン（Ｂｉｔｔｅｒｆｅｌｄ－Ｗｏｌｆｅｎ）所在）の一般的なプロトコルに従って合成した。表Ｅｘ－１および図１に示される３つの脂質を合成した（実施例７～９参照）。

【０６９７】

【表８】

表 Ex-1:合成された脂質の概要

本明細書で使用される脂質名	図１参照。	化合物名*** [尾部-リンカー-頭部]	エステル構造
HEXA1	図 1A	HEXA-C5DE-PipSS	ジエステル
HEXA2	図 1B	HEXA-C5DE-PipC3SS	ジエステル
THIOETHER	図 1C	VitE-C4DE-Pip-チオエーテル	ジエステル

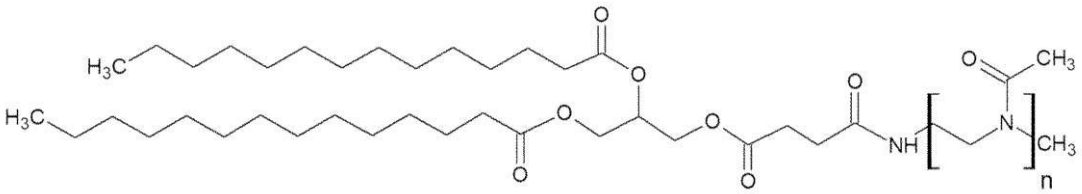
***脂質の名称は以下の通り誘導された：基本名称は３つの部分からなる：「尾部－リンカー－頭部」。尾部は、ヘキシルデカン酸(ヘキシル-1-デカノール)を指す「HEXA」またはビタミンＥを指す「VitE」である。リンカーは、ジエステルリンカー(C5=2 つのエステルを有するリンカーの 5 個の炭素原子;C4=2 つのエステルを有するリンカーの 4 個の炭素原子)を含む C5 または C4 基を指す「C5DE」または「C4DE」である。頭部「ＰｉｐＳＳ」への参照はジスルフィド架橋を介して接続されたピペリジン残基を示し、「ＰｉｐC3ＳＳ」はピペリジン環とジスルフィド架橋との間に 3 個の炭素原子を有する構造に関し、「Pip－チオエーテル」はチオエーテル架橋を介して接続されたピペリジン残基を示す。

【０６９８】

実施例節全体を通して本明細書で使用される「ＰＭＯＺ２」は、

【０６９９】

【化５２】



【０７００】

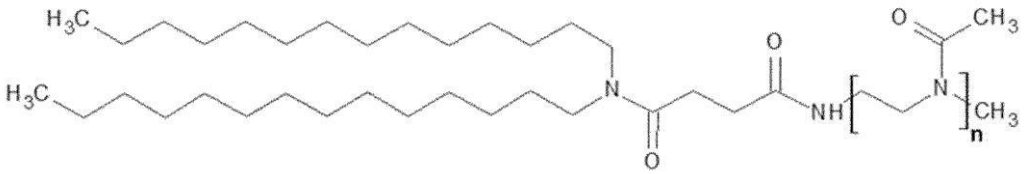
の構造を有し、

ｎ＝５０である、すなわち、５０個のモノマー繰り返しを有する。

実施例節全体を通して本明細書で使用される「ＰＭＯＺ４」は、

【０７０１】

【化５３】



【０７０２】

の構造を有し、

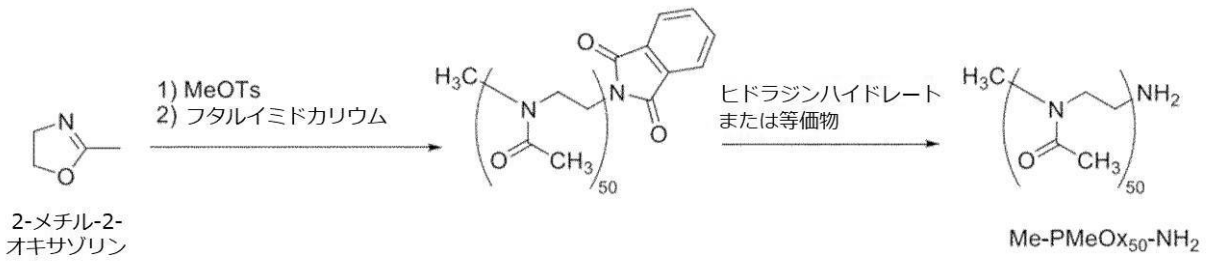
ｎ＝５０である、すなわち、５０個のモノマー繰り返しを有する。

要約すると、「ＰＭＯＺ２」を以下の通り合成した：

工程１（ＰＭＯＺ－ポリマーの合成）：

【０７０３】

【化５４】



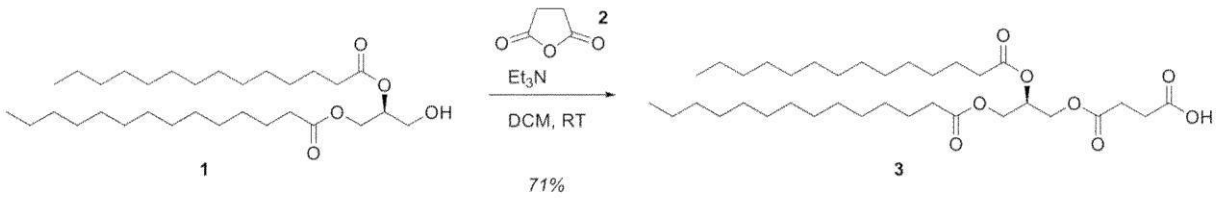
【０７０４】

その後、ＤＭＧ（１）１．０ｇを無水コハク酸（２）と反応させて、エステル（３）８４８ｍｇ（７１％）を得た。この物質３４４ｍｇを、工程１からのＰＭＯｚポリマー（４）１．９２ｇと反応させた：

工程２：

【０７０５】

【化５５】

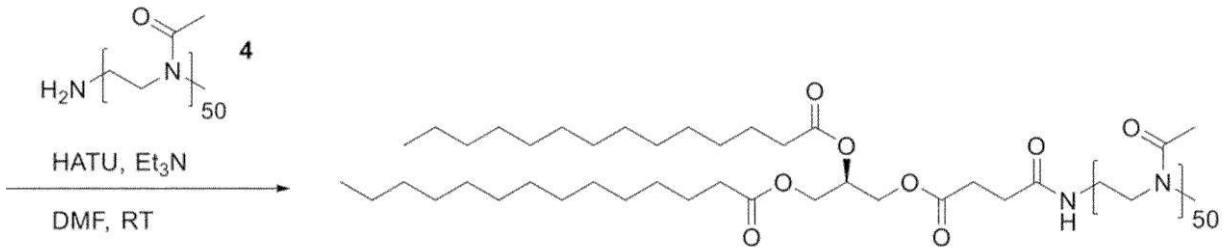


【０７０６】

工程３：

【０７０７】

【化５６】



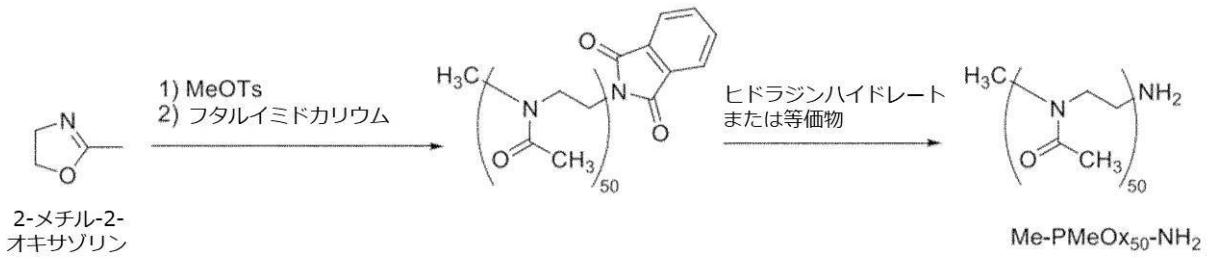
【０７０８】

要約すると、「ＰＭＯＺ４」を以下の通り合成した：

工程１（ＰＭＯＺ－ポリマーの合成）：

【０７０９】

【化５７】



【０７１０】

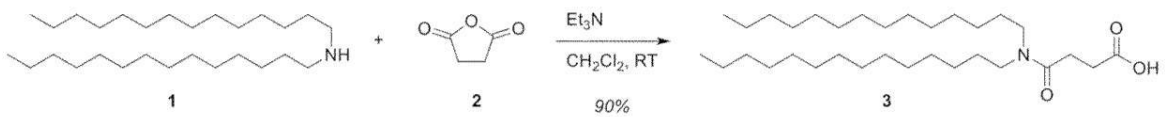
その後、ジ（テトラデシル）アミン（１）０．５ｇを無水コハク酸（２）と反応させて、アミド（３）５６３ｍｇ（９０％）を得た。この物質３１２ｍｇを、工程１からのＰＭＯｚポリマー（４）２．１０ｇと反応させた。

【０７１１】

工程２：

【０７１２】

【化５８】

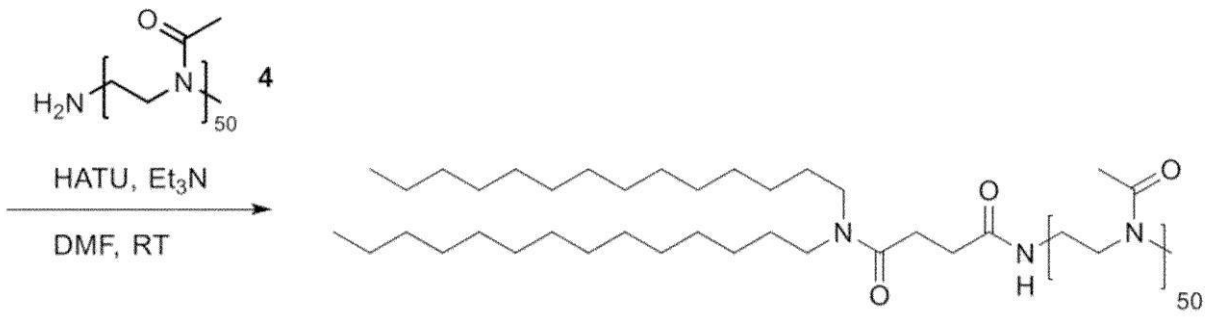


【０７１３】

工程３：

【０７１４】

【化５９】



【０７１５】

全ての脂質について、脂質の純度および構造の同一性を核磁気共鳴分光法（Ｈ－ＮＭＲ、５００．１３ＭＨｚ）および質量分析法（エレクトロスプレーイオン化－ＥＳＩまたは大気圧化学イオン化－ＡＰＣＩ、直接注入を介する）によって確認した。

【０７１６】

実施例２．２：ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標）マイクロ流体システムを使用したＬＮＰの調製

ナノリットルスケールでのナノ粒子成分のミリ秒混合を可能にするカスタム仕様マイクロ流体混合チップを介して、ナノ粒子の制御された、ボトムアップ式、分子自己組織化を可能にする標準的なプロトコルに従って、ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標）マイクロ流体システム（プレシジョンナノシステムズ社（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）、ブリティッシュコロンビア州バンクーバー（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ）所在）を使用してＬＮＰを調製した。

【０７１７】

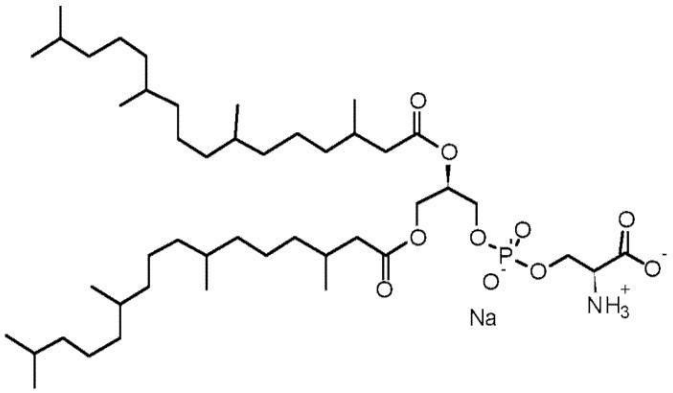
本実施例においては、カチオン性脂質（ｉ）ＨＥＸＡ１、ｉｉ）ＨＥＸＡ２、またはｉｉｉ）ＴＨＩＯＥＴＨＥＲのいずれか）を脂質ナノ粒子組成物の調製のために、コレステロール、少なくとも１つの中性脂質またはリン脂質、およびポリマーコンジュゲート脂質とともに使用した。より詳細には、コレステロール（アバンティポーラーリピッド社（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）；アラバマ州アラバスター（Ａｌａｂａｓｔｅｒ）所在）、以下に示す構造を有する中性脂質／リン脂質ｉ）ＤＰｈｙＰＥ（アバンティポーラーリピッド社；アラバマ州アラバスター所在）および／またはｉｉ）ＤＰｈｙＰＳ（アバンティポーラーリピッド社；アラバマ州アラバスター所在）および／またはＷＴ－ＰＳもしくは１８：０－１８：１ＰＳ（アバンティポーラーリピッド社；アラバマ州アラバスター所在）および／またはｉｖ）（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）（アバンティポーラーリピッド社；アラバマ州アラバスター所在）、またはｖ）ＤＳＰＣ（アバンティポーラーリピッド社；アラバマ州アラバスター所在）を使用した。なおさらに、ｉ）ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００（エヌオーエフコーポレーション（ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、日本東京所在）またはｉｉ）ＤＳＧ－ＰＥＧ２０００（エヌオーエフコーポレーション（ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、日本東京所在）のいずれかを、ポリマーコンジュゲート脂質として使用した。

【０７１８】

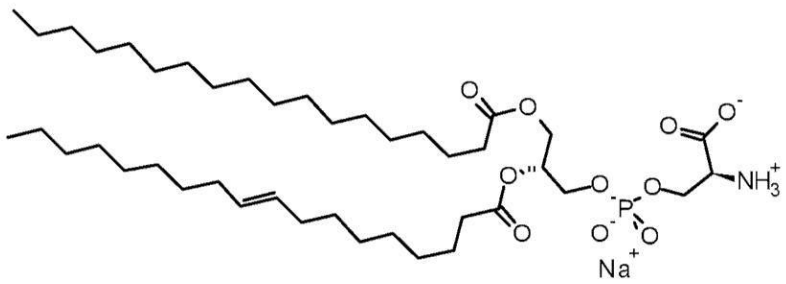
ＤＰｈｙＰＳの構造は、

【０７１９】

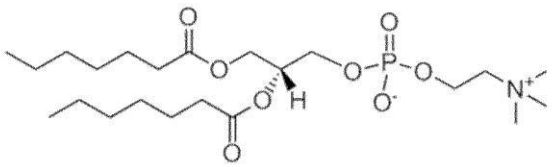
【化６０】



【０７２０】
である。
ＷＴ－ＰＳ（１８：０－１８：１　ＰＳ）の構造は：
【０７２１】
【化６１】

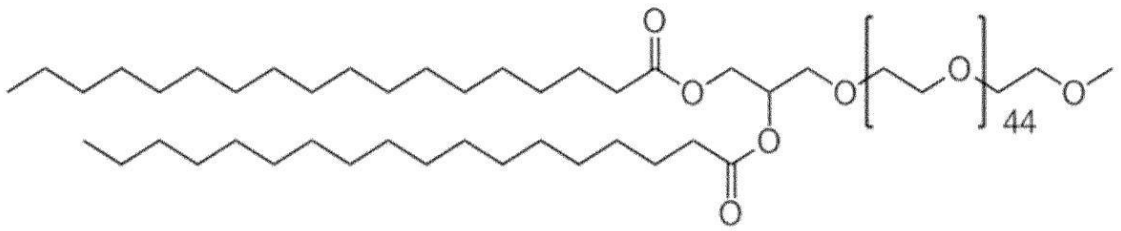


【０７２２】
である。
（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）、すなわち、１，２－ジヘプタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリンの構造は：
【０７２３】
【化６２】



【０７２４】
である。
本発明の実施例およびまた開示の文脈において、「ＤＭＧ－ＰＥＧ」または「ＤＭＧｍＰＥＧ」のみが示される場合、本明細書においてはＤＭＧ－ＰＥＧ２０００が参照される。本発明の実施例およびまた開示の文脈において、「ＤＳＧ－ＰＥＧ」または「ＤＳＧｍＰＥＧ」のみが示される場合、本明細書においてはＤＳＧ－ＰＥＧ２０００が参照される。
【０７２５】

【化６３】



【０７２６】

本発明の実施例およびまた開示の文脈において、「ＰＭＯＺ」のみが示される場合、本明細書においては図４による例示的なＰＭＯＺ－脂質が参照される。

脂質のストック溶液を、標準的な手順に従って、アルコール溶液中に脂質を可溶化することによって調製した（以下の詳細を参照）。適切な体積のアルコール溶液（１００％エタノール緩衝液）中脂質ストック溶液を、本明細書中以下に示される適切な量のｍＲＮＡを含有する水相と混合することによって、ＬＮＰを調製した。カチオン性脂質、コレステロール、リン脂質（ＤＰｈｙＰＳおよびＷＴ－ＰＳを除く）、およびポリマーコンジュゲート脂質についての脂質ストック溶液は、ＥｔＯＨ中２０～３０ｍｇ／ｍｌであった；ＴＨＩＯＥＴＨＥＲ脂質を、ｔ－ブタノール中３０ｍｇ／ｍｌで溶解した。ＤＰｈｙＰＳのストック溶液は、図１～３に示される結果をもたらす実験手順についてはＥｔＯＨ：ｔ－ブタノール（１：１）中１０ｍｇ／ｍｌであり、図５～７に示される結果をもたらす実験手順についてはｔ－ブタノール中１０ｍｇ／ｍｌであった。ＷＴ－ＰＳの溶液は、ＥｔＯＨ中の予め混合した脂質で水和したＷＴ－ＰＳの「プレミックス溶液」であった。このプレミックス溶液に到達するために、Cl_3CHに溶解したＷＴ－ＰＳをストック溶液として使用し、Cl_3CHを除去し、以下に記載される実際の混合工程の前に、ＷＴ－ＰＳ乾燥フィルムをＥｔＯＨ中のプレミックス脂質で水和した。（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）の溶液はまた、ＥｔＯＨ中の予め混合した脂質で水和された（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）の「プレミックス溶液」であった。このプレミックス溶液に到達するために、Cl_3CHに溶解した（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）をストック溶液として使用し、Cl_3CHを除去し、以下に記載される実際の混合工程の前に、（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）乾燥フィルムをＥｔＯＨ中のプレミックス脂質で水和した。

【０７２７】

ｍＲＮＡを、場合により（０７：０）ＰＣ（ＤＨＰＣ）を含む５０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ４）中０．１６ｍｇ／ｍｌに希釈した。シリンジをＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標）（プレシジョンナノシステムズ社（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）、ブリティッシュコロンビア州バンクーバー（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ）所在）の入口部分に挿入し、使用して、エタノール性脂質溶液（場合によりＷＴ－ＰＳプレミックスを含む）とｍＲＮＡ水溶液を約１４ｍｌ／分～約１８ｍｌ／分の総流量において約１：３（ｖｏｌ／ｖｏｌ）の比で混合した。

【０７２８】

次いで、エタノールを除去し、外部緩衝液を透析（Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ（商標）Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅｓ、サーモフィッシャー社（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ））によってＰＢＳ／スクロース緩衝液と交換した。最後に、脂質ナノ粒子を、０．２μｍ孔滅菌フィルタを通して濾過した。Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ（マルバーンインストルメンツ社（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ．）；英国マルバーン（Ｍａｌｖｅｒｎ）所在）を使用して準弾性光散乱によって決定すると、脂質ナノ粒子の粒子直径サイズは約９０ｎｍ～約１４０ｎｍであり、最終ＬＮＰはスクロースを含む１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に存在した。

【０７２９】

表Ｅｘ－２～Ｅｘ－５のＬＮＰ製剤を調製した：

【０７３０】
【表９】

表 Ex－2

LNP 製剤の名称/組成物番号	賦形剤[カチオン性脂質:ステロイド:リン脂質(場合により、示されるように３つ):ポリマーコンジュゲート化脂質]	賦形剤のモルパーセンテージ[mol%]
LNP1	HEXA1:Chol:DPhyPE+DPhyPS:DMG-PEG2000	59:29.3:5+5:1.7
LNP2	HEXA1:Chol:DPhyPE+WT-PS:DMG-PEG2000	59:29.3:8+2:1.7
LNP3(GN02)	HEXA1:Chol:DPhyPE:DMG-PEG2000	59:29.3:10:1.7

【０７３１】
【表１０】

表 Ex-3[仮想的実施例 4 について]:

LNP 製剤の名称/組成物番号	賦形剤[カチオン性脂質:ステロイド:リン脂質(場合により、示されるように３つ):ポリマーコンジュゲート化脂質]	賦形剤のモルパーセンテージ[mol%]
LNP4	HEXA1:Chol:DPhyPE+DPhyPS:PMOZ-脂質*	59:29.3:5+5:1.7
LNP5	HEXA1:Chol:DPhyPE+WT-PS:PMOZ-脂質*	59:29.3:8+2:1.7
LNP6	HEXA1:Chol:DPhyPE+WT-PS+(07:0)PC(DHPC):PMOZ-脂質*	49 : 29.3:8+2+10:1.7
LNP7(GN02-PMOZ)	HEXA1:Chol:DPhyPE:PMOZ-脂質*	59:29.3:10:1.7

*例示的な PMOZ-脂質を図 4 に示し、好ましくは、使用される PMOZ 脂質は、n=50 を有する「PMOZ4」である。

【０７３２】
【表１１】

表 Ex-4

LNP 製剤の名称/組成物番号	賦形剤[カチオン性脂質:ステロイド:リン脂質(場合により、示されるように３つ):ポリマーコンジュゲート化脂質]	賦形剤のモルパーセンテージ[mol%]
LNP8	HEXA2：Chol:DPhyPE+DPhyPS:DSG-PEG2000	59:29.3:5+5:1.7
LNP-C	CL*:Chol:DSPC:PL**	47.4：40.9：10:1.7

*「CL」という用語は、技術水準のカチオン性脂質を示す。
**「PL」という用語は、mPEG2000 を含む技術水準のポリマーコンジュゲート脂質を示す。

【０７３３】

【表１２】

表 Ex-5

LNP 製剤の名称/組成物呼称	賦形剤[表 Ex-24 に開示されるカチオン性脂質:ステロイド:中性脂質(場合により、示されるように 3 つ):ポリマーコンジュゲート化脂質]	賦形剤のモルパーセンテージ[mol%]
LNP9	THIOETHER : Chol:DPhyPE+DPhyPS:DMG-PEG2000	59:29.3:5+5:1.7
LNP10	THIOETHER : Chol:DPhyPE+(07:0)PC(DHPC):DMG-PEG2000	58 : 29.3:10+1:1.7
LNP11	THIOETHER : Chol:DPhyPE+DPhyPS+(07:0)PC(DHPC)DMG-PEG2000	58 : 29.3:5+5+1:1.7
LNP12	THIOETHER : Chol:DPhyPE+(07:0)PC(DHPC):DMG-PEG2000	49 : 29.3:10+10:1.7
LNP13	THIOETHER : Chol:DPhyPE+DPhyPS+(07:0)PC(DHPC)DMG-PEG2000	49 : 29.3:5+5+10:1.7
LNP14	THIOETHER : Chol:DPhyPE+DPhyPS+(07:0)PC(DHPC)DMG-PEG2000	39 : 39.3 : 5+5+10:1.7
LNP15	THIOETHER : Chol:DPhyPE:DMG-PEG2000	59:29.3:10:1.7
LNP16	THIOETHER : Chol:DPhyPE:DMG-PEG2000	49 : 39.3 : 10:1.7

【０７３４】

上記のＬＮＰにおいて、Ｎ／Ｐ（脂質対ｍＲＮＡ　ｍｏｌ比）は、好ましくは約１７．５であり、全脂質／ｍＲＮＡ質量比は、好ましくは約４０であった；

実施例３：インビボマラリアワクチン接種に対するＰＳの存在の効果

Ｐｆ－ＣＳＰ　ｍＲＮＡを、上の実施例２．２に記載されるように、表Ｅｘ－２のＬＮＰ１～３に製剤化した。

【０７３５】

得られたＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－６に示す用量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目および２１日目に雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用した。陰性対照群には緩衝液のみを与えた。マウスを３５日目に　　殺した。血清試料を１日目、２１日目、および３５日目に採取し、脾臓を３５日目に単離した。

【０７３６】

【表１３】

表 Ex-6　実施例 3 のワクチン接種スキーム

群	マウスの番号	RNA 処理	製剤	ｍＲＮＡ	用量	経路	体積
1	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP1	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
2	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP2	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
3	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP3(GN02)	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
4	6	なし	緩衝液(PBS)	なし	n.a.	i.m.	1×25μl

【０７３７】

ＥＬＩＳＡによる特異的液性免疫応答の決定：

コーティングのためにマラリア［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチド（１００％ＤＭＳＯ中１μｇ／ｍｌ）を使用してＥＬＩＳＡを実施した。コーティングプレートを、それぞれの血清希釈を使用してインキュベートし、特異抗体のそれぞれのマラリア［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチドへの結合をビオチン化アイソタイプ特異抗マウス抗体、引き続いて基質としてのＡｍｐｌｅｘ（商標）Ｒｅｄ　Ｒｅａｇｅｎｔによるストレプトアビジン－ＨＲＰ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）を使用して検出した。マラリア［ＮＡＮＰ］$_7$ペプチドに対して向けられたエンドポイント抗体価（全ＩｇＧ）をプライム（ｐｒｉｍｅ）後３５日目（第１のブースト後１４日目）にＥＬＩＳＡによって測定した。結果を図２に示す（力価３１２５でのＩｇＧ総検出シグナル）。

【０７３８】

細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）：

ワクチン接種したマウス由来の脾細胞を、当技術分野で公知の標準的なプロトコルに従って、３５日目に単離した。手短に言えば、単離した脾臓を、セルストレーナを通して粉砕し、ＰＢＳ／１％ＦＢＳ中で洗浄し、引き続いて赤血球を溶解した。ＰＢＳ／１％ＦＢＳによる大規模な洗浄工程後、脾細胞を９６ウェルプレートに播種した（２×１０^{6}個の細胞／ウェル）。細胞を、３７℃で６時間、２．５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ２８抗体（ビーディーバイオサイエンス社（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））およびタンパク質輸送阻害剤の存在下、ＣＳＰペプチドの混合物（０．５μｇ／ｍｌ）で刺激した。刺激後、細胞を洗浄し、製造業者の説明書に従って、Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ（商標）試薬（ビーディーバイオサイエンス社（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））を使用して細胞内サイトカインについて染色した。以下の分子に対する抗体：Ｔｈｙ１．２－ＦＩＴＣ（１：１００）、ＣＤ８－ＰＥ－Ｃｙ７（１：２００）、ＣＤ１０７ａ－ＰＥ－Ｃｙ７　（１：１００）、ＴＮＦ－ＰＥ（１：１００）、ＩＦＮγ－ＡＰＣ（１：１００）（イーバイオサイエンス社（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））、ＣＤ４－ＢＤ　Ｈｏｒｉｚｏｎ　Ｖ４５０（１：２００）（ビーディーバイオサイエンス社（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ））を染色に使用し、１：１００希釈したＦｃγブロックとインキュベートした。ＡｑｕａＤｙｅを使用して生／死細胞を区別した（インビトロジェン社（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））。ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメータ（ベクトンディッキンソン社（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ））を使用して細胞を獲得した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（ツリースター社（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ，Ｉｎｃ．））を使用して、フローサイトメトリデータを分析した。結果を図３に示す。

【０７３９】

結果：

図２に示されるように、ＰＳを含むＬＮＰ（ＤＰｈｙＰＳ［ＬＮＰ１］またはＷＴ－ＰＳ［ＬＮＰ２］のいずれかの形態）は、マウスにおいて、ＰＳを含まないＬＮＰ［ＬＮＰ３］よりも強い液性免疫応答を誘導した。予想通り、３つ全てのＬＮＰ製剤は、対照としての緩衝液と比較して液性免疫応答を誘導した。

【０７４０】

図３に示されるように、ＰＳを含むＬＮＰ（ＤＰｈｙＰＳ［ＬＮＰ１］またはＷＴ－ＰＳ［ＬＮＰ２］のいずれかの形態）は、マウスにおけるＣＤ８＋Ｔ細胞応答を見た場合、ＰＳを含まないＬＮＰ［ＬＮＰ３］よりも強い細胞性免疫応答を誘導した（図３Ａ参照）。ＣＤ４＋Ｔ細胞応答に関していえば、ＷＴ－ＰＳを含むＬＮＰ［ＬＮＰ２］は、マウスにおいて、ＰＳを含まないＬＮＰ［ＬＮＰ３］よりも強い細胞免疫応答を誘導したが、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ［ＬＮＰ１］に対する応答は、ＰＳを含まないＬＮＰ［ＬＮＰ３］のものと同等であった（図３Ｂ参照）。ＣＤ８＋Ｔ細胞がマラリア原虫によって引き起こされる細胞内感染症に対する主要な防御免疫機序であるので、有効なマラリアワクチンは強力なＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導すべきである。ＰＳを含むＬＮＰをワクチンとして使用した場合に、最も強い応答が得られた。

【０７４１】

実施例４［仮想的］：インビボ狂犬病ワクチン接種に対するＰＳの存在の効果

ＲＡＢＶ－Ｇ　ｍＲＮＡを、上の実施例２．２に記載されるように、表Ｅｘ－３のＬＮＰ４～ＬＮＰ７に製剤化する。

【０７４２】

ＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－７に示す用量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目および２１日目に７週齢の雌Ｂａｌｂ／Ｃマウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用する。陰性対照群には緩衝液のみを与える。マウスを２８日目に　　殺する。血清試料を１日目、２１日目、および２８日目に採取し、脾臓を２８日目に単離する。

【０７４３】

【表１４】

表 Ex-7　実施例 4 のワクチン接種スキーム。

群	マウスの番号	RNA 処理	製剤	ｍＲＮＡ	用量	経路	体積
1	8	RABV-G をコードする mRNA	LNP4	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
2	8	RABV-G をコードする mRNA	LNP5	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
3	8	RABV-G をコードする mRNA	LNP6	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
4	8	RABV-G をコードする mRNA	LNP7	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
5	8	なし	緩衝液(PBS)	なし	n.a.	i.m.	1×25μl

【０７４４】

血清中の狂犬病ウイルスに対する抗体のレベルを決定するために、古典的ウイルス中和試験を実施する（蛍光抗体ウイルス中和（ＦＡＶＮ）アッセイ）。したがって、第１のｍＲＮＡ投与の２８日後に、マウスを　　殺し、血液試料をさらなる分析、すなわち、ＦＡＶＮアッセイを介したウイルス中和抗体（ＶＮＡ）分析のために回収する。前記免疫原性アッセイのために、ＶＮＴを測定する、すなわち、血清中の抗狂犬病ウイルス中和価（ＶＮＴ）を、ＦＡＶＮアッセイを使用したＥｕｒｏｖｉｒ（登録商標）ハイジーン－レイバー社（Ｈｙｇｉｅｎｅ－Ｌａｂｏｒ　ＧｍｂＨ）［ドイツ所在］およびＷＨＯプロトコルによるＳｔａｎｄａｒｄ　Ｃｈａｌｌｅｎｇｅ　Ｖｉｒｕｓ　ＣＶＳ－１１によって分析する。

【０７４５】

実施例５：器官標的化に対するＰＳの存在の効果

ＰｐＬｕｃ　ｍＲＮＡを、上の実施例２．２に記載されるように、表Ｅｘ－４のＬＮＰ８およびＬＮＰ－Ｃに製剤化した。

【０７４６】

ＬＮＰ８およびＬＮＰ－Ｃ製剤を、表Ｅｘ－８に示すｍＲＮＡの用量で、０日目に雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに静脈内（ｉ．ｖ．）適用した。以下に示す時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で終了し、器官を回収した。さらに、血清試料を適用１４日前および以下に示される時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で採取した。

【０７４７】

【表１５】

表 Ex-8　実施例５の設定

群	マウスの番号	RNA	製剤	時点	用量	経路	体積
1	5	PpLuc をコードするmRNA	LNP8	4 時間	20μg	i.v.	100μl
2	5	PpLuc をコードするmRNA	LNP8	24 時間	20μg	i.v.	100μl
3	6	PpLuc をコードするmRNA	LNP-C	4 時間	20μg	i.v.	100μl

【０７４８】
ＰｐＬｕｃ発現を、器官回収後に標準的な方法に従って調製された組織溶解物においてルシフェラーゼアッセイによって決定した。以下の器官を採取し、分析した：ｉ）心臓；ｉｉ）脳；ｉｉｉ）腎臓；ｉｖ）リンパ節；ｖ）肺；ｖｉ）脾臓；およびｖｉｉ）肝臓。ＬＮＰ－Ｃについては、脾臓および肝臓を調製し、分析した。
【０７４９】
さらに、血清中のサイトカインおよびケモカインのレベルを、製造業者の説明書に従ってＬＥＧＥＮＤｐｌｅｘ　ＣＢＡアッセイによって決定した。
結果：
図５は、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ８（すなわち、表Ｅｘ－８の群１および群２）の結果を示す。図５から、ｉ．ｖ．適用によって全身投与されたＰＳを含むＬＮＰは、大部分が脾臓を標的としたことが導き出され得る。したがって、４時間でのルシフェラーゼ発現率は、明らかに脾臓で最も高く、肝臓、肺、およびリンパ節（ほぼ同じレベルである）が続き、心臓、腎臓、および脳が続き、後者の２つの器官ではルシフェラーゼ発現はほとんどない。２４時間では、心臓、脳、腎臓、肺、および肝臓においてシグナルはないかまたは弱い。ルシフェラーゼ発現はリンパ節においてある程度まで検出することができるが、それは明らかに２４時間で脾臓において依然として最高レベルである。結果は、総ルシフェラーゼタンパク質／器官のｐｇとして示される。
【０７５０】
図６はまた、ＬＮＰ８（表Ｅｘ－８の群１および２）の結果を示すが、今回は脾臓および肝臓についてのみ、総タンパク質のｐｇ／ｍｇとして示す。したがって、総ルシフェラーゼタンパク質のｐｇが器官ごとに示される図５に示される結果とは異なり、脾臓および肝臓において検出された総ルシフェラーゼのｐｇが、それぞれ脾臓および肝臓において決定された総タンパク質のｍｇに対して設定されたという点で、結果を正規化した。脾臓における発現が肝臓における発現よりもはるかに高いという事実を説明するために、図６に示される２つのグラフのｙ軸が異なることに留意されたい。結果は、ＰＳを含むＬＮＰが主に脾臓を標的とし、ルシフェラーゼの発現が４時間後に検出されるだけでなく、２４時間後にも検出されることを確認する。
【０７５１】
表Ｅｘ－９は、表Ｅｘ－８の群１および３についての結果を示し、脾臓および肝臓の器官をルシフェラーゼの発現について４時間後に分析し、群１ではＰＳ含有ＬＮＰ製剤を使用したのに対し、群３ではＰＳを含まない標準ＬＮＰを使用した。ＰＳ含有ＬＮＰ製剤は脾臓に送られる（「標的化する」）が、標準ＬＮＰ製剤では、主に肝臓で発現が検出されることが明らかである。
【０７５２】

【表１６】

表 Ex-9　脾臓および肝臓におけるルシフェラーゼ発現

群	LNP 製剤	4 時間後の脾臓における発現(pg/mg 総タンパク質)、中央値	4 時間後の肝臓における発現(pg/mg 総タンパク質)、中央値	4 時間後の脾臓/肝臓比
1	PpLuc を有する LNP8	26898	562	48
3	PpLuc を有する LNP-C	98671	652108	0.2

【０７５３】

最後に、表Ｅｘ－１０は、ＰＳ含有ＬＮＰ製剤が、ＰＳを含まない対照ＬＮＰ製剤と比較して、異なるサイトカインプロファイルをもたらしたことを示す。

【０７５４】

【表１７】

表 Ex-10　血清中のサイトカインおよびケモカインのレベル

血清	PpLuc を有する LNP8	PpLuc を有する LNP-C
IL-6	+++	-
TNF-α	+	-/+
IL-12p70	++	-
IL-1β	+/-	+
KC (CXCL1)	+++	+++
MCP-1(CCL2)	++++	+++
CXCL10(IP-10)	++++	++++
RANTES(CCL5)	++	-
GM-CSF	-	-
IL-10	-	-
IFN-α	+++	-
IFN-β	+++	-
IFN-γ	+++	-

++++　=6000～20000pg/ml
+++　=1000～5000pg/ml
++　=400～1000pg/ml
+　=50～300pg/ml
-　=LLOQ 下/ベースラインまたは緩衝液に対して変化なしまたは非常に小さい変化/高い変動性

【０７５５】

実施例６：インビボ狂犬病ワクチン接種に対するＰＳの存在の効果－（ｉ）ＶＮＴおよび（ｉｉ）ＥＬＩｓｐｏｔ測定

ＲＡＢＶ－Ｇ　ｍＲＮＡを、上の実施例２．２に記載されるように、表Ｅｘ－５のＬＮＰ９～ＬＮＰ１６および表Ｅｘ－４のＬＮＰ－Ｃに製剤化した。

【０７５６】

ＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－１１に示す用量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目および２１日目に７週齢の雌Ｂａｌｂ／Ｃマウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用した。示されるように、ｉ．ｍ．免疫化は、表Ｅｘ－５／４およびＥｘ－１１に示されるように製剤化された１μｇのＲＡＢＶ－Ｇ－ｍＲＮＡを用いて行った。陰性対照群には緩衝液のみを与えた。マウスを２８日目に　　殺した。

【０７５７】

（ｉ）ＶＮＴおよび（ｉｉ）ＥＬＩＳｐｏｔ分析のために、血清試料を２１日目および

２８日目に採取し、脾臓を２８日目に単離した。ワクチン接種したマウス由来の脾細胞を、当該技術分野で公知の標準的なプロトコルに従って、そして上記のように単離し、次いで、さらなる実験が開始されるまで、標準的な条件下で凍結保存した。

【０７５８】

【表１８】

表 Ex-11　実施例 6 のワクチン接種スキーム

群	マウスの番号	RNA 処理	製剤	ｍＲＮＡ	用量	経路	体積
1	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP9	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
2	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP10	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
3	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP11	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
4	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP12	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
5	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP13	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
6	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP14	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
7	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP15	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
8	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP16	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
9	6	RABV-G をコードする mRNA	LNP-C	RABV-G	1μg	i.m.	1×25μl
10	6	なし	緩衝液(PBS)	なし	n.a.	i.m.	1×25μl

【０７５９】

（ｉ）ＶＮＴ分析

プライム後（プライム後２１日目）およびブースト後７日目（プライム後２８日目）の抗狂犬病ウイルス中和価（ＶＮＴ）分析

血清中の狂犬病ウイルスに対する抗体のレベルを決定するために、古典的ウイルス中和試験を実施した（蛍光抗体ウイルス中和（ＦＡＶＮ）アッセイ）。したがって、第１のｍＲＮＡ投与の２１日後に、さらなる分析のためにｂｌｏｏｋ試料を回収し、第１のｍＲＮＡ投与の２８日後に、マウスを　　殺し、血液試料をさらなる分析、すなわち、ＦＡＶＮアッセイを介したウイルス中和抗体（ＶＮＡ）分析のために回収した。前記免疫原性アッセイのために、ＶＮＴを測定した、すなわち、血清中の抗狂犬病ウイルス中和価（ＶＮＴ）を、ＦＡＶＮアッセイを使用したＥｕｒｏｖｉｒ（登録商標）Ｈｙｇｉｅｎｅ－Ｌａｂｏｒ　ＧｍｂＨ、ドイツおよびＷＨＯプロトコルによるＳｔａｎｄａｒｄ　Ｃｈａｌｌｅｎｇｅ　Ｖｉｒｕｓ　ＣＶＳ－１１によって分析した。２８日目のＶＮＴ分析の結果を図７Ａに示す（２１日目のＶＮＴ分析の結果は示していない）。

【０７６０】

プライム後（プライム後２１日目）およびブースト後７日目（プライム後２８日目）の抗狂犬病ウイルス中和価（ＶＮＴ）分析の結果

図７Ａ（２８日目、ブーストの７日後）から明らかなように、ブースターワクチン接種後に有意に増加したＶＮＴレベルを見ることができ、一方、記載された添加剤は、有意な有効性増加の原因であると思われた。予想通り、緩衝液対照は防御力価をもたらさなかった。しかし、防御力価を超える力価は、プライム後（すなわち、ブースターワクチン接種なし）、すなわちプライム後２１日目に既に達成されていた（２１日目のＶＮＴ分析、データは示さず）。

【０７６１】
（ｉｉ）ＥＬＩＳｐｏｔ分析
ブーストの７日後（プライム後２８日）のＲＡＢＶ－Ｇペプチドライブラリを用いた脾臓細胞再刺激によるＥＬＩＳｐｏｔ分析によるＲＡＢＶ－Ｇ抗原特異的細胞性免疫応答の検出
異なるＲＡＢＶ－ＧコードｍＲＮＡ製剤ＬＮＰ９～ＬＮＰ１６で免疫化したマウスから上記のように単離した凍結保存脾細胞を解凍し、狂犬病ウイルスＧタンパク質ペプチドライブラリ（１２９個のＲＡＢＶ－Ｇペプチドを含むＲＡＢＶ－Ｇペプチドカクテル）で再刺激した。その結果、ＲＡＢＶ－Ｇ特異的細胞活性化をＥＬＩＳｐｏｔアッセイによって分析した。ＩＦＮ－ガンマの検出のために、９６ウェルＥＬＩＳｐｏｔプレート（Ｎｉｔｒｏｃｅｌｌｕｌｏｓｅ Ｍｕｌｔｉｓｃｒｅｅｎ ＨＴＳ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を、ＩＦＮ－ガンマに対する抗体（ビオチン化ラット抗マウスＩＦＮ－ガンマ抗体、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、ドイツ、ハイデルベルク所在）を含む１００μｌのコーティング緩衝液（１５ｍＭ Na_2CO_3、１５ｍＭ $NaHCO_3$、０．０２％Ｎａ－アジド、ｐＨ９．６）と共に一晩インキュベートした。翌日、５×10^5個の脾細胞／ウェルを添加し、１２９個のペプチドのＲＡＢＶ－Ｇペプチドミックス（狂犬病ペプチドライブラリペプチドミックス（Ｒａｂｉｅｓ ｐｅｐｔｉｄｅ ｌｉｂｒａｒｙ ＰｅｐＭｉｘ），ＪＰＴ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＧｍｂＨ、ドイツ、ベルリン所在）で再刺激した（５μｇ／ペプチドの最終濃度－前記ペプチドミックスは、隣接するペプチド間に１１個のアミノ酸の重複を有する１５個のアミノ酸ペプチドとして示される、国際公開第２０１５０２４６６５号の配列番号１による狂犬病ウイルスのパスツールワクチン株由来の狂犬病Ｇタンパク質のアミノ酸配列を含んでいた）。その後、細胞を３７℃で２４時間インキュベートした。翌日、プレートをＰＢＳで２回、水で１回、ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で１回洗浄し、その後、ビオチン結合二次抗体（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）と共に４℃で１１～２４時間インキュベートした。次いで、プレートをＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、ブロッキング緩衝液中のストレプトアビジンに結合したアルカリホスファターゼと共に２時間インキュベートした。ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄した後、基質（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ（ドイツ、タウフキルヘン所在）からの５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルホスフェート／ニトロブルーテトラゾリウム（Ｎｉｔｒｏ Ｂｌｕｅ Ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ）液体基質系）をプレートに添加し、基質の変換を視覚的に検出することができた。次いで、プレートを水で洗浄することによって反応を停止させた。次いで、乾燥させたプレートをＥＬＩＳＰＯＴプレートリーダー（ＥＬＩＳｐｏｔプレートリーダーＢＡ－Ｒ－０５６４）によって読み取った。スポットレベルの可視化のために、数をバックグラウンド減算によって補正した。

【０７６２】
ワクチン接種実験中の陰性対照として、マウスを緩衝液で処置し、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイ中の陽性対照として、ホルボール－１２－ミリスタット－１３－アセテート（ＰＭＡ）／イオノマイシンを使用して、リンパ球の活性化を介してサイトカイン産生を刺激した。

【０７６３】
ブーストの７日後（プライム後２８日目）のＲＡＢＶ－Ｇペプチドライブラリを用いた脾臓細胞再刺激によるＥＬＩＳｐｏｔ分析によるＲＡＢＶ－Ｇ抗原特異的細胞性免疫応答の検出の結果
図７Ｂから明らかなように、それぞれのＬＮＰ製剤へのホスファチジルセリンの添加は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を含むＲＡＢＶ－Ｇタンパク質特異的Ｔ細胞の誘導を示す検出されたＩＦＮ－ガンマスポットの数を有意に増加させた。

【０７６４】
実施例７：長期実験におけるインビボマラリアワクチン接種に対するＰＳの存在の効果

Ｐｆ－ＣＳＰ　ｍＲＮＡを、上の実施例２．２に記載されるように、表Ｅｘ－５のＬＮＰ９～１６および表Ｅｘ－４のＬＮＰ－Ｃに製剤化した。

【０７６５】

ＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－１２に示す用量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目、２１日目、および９８日目に７週齢の雌Ｂａｌｂ／Ｃマウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用した。陰性対照群には緩衝液のみを与えた。マウスを１０５日目に　　殺した。血清試料を１日目、２１日目、３５日目、９８日目、および１０５日目に採取し、脾臓を１０５日目に単離した。

【０７６６】

【表１９】

表 Ex-12　実施例 7 のワクチン接種スキーム

群	マウスの番号	RNA 処理	製剤	ｍＲＮＡ	用量	経路	体積
1	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP9	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
2	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP10	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
3	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP11	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
4	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP12	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
5	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP13	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
6	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP14	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
7	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP15	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
8	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP16	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
9	6	Pf-CSP をコードする mRNA	LNP-C	Pf-CSP	1μg	i.m.	1×25μl
10	6	なし	緩衝液(PBS)	なし	n.a.	i.m.	1×25μl

【０７６７】

ＥＬＩＳＡおよび細胞内サイトカイン染色による特異的液性免疫応答の決定を実施例３と同様に行った。

結果：

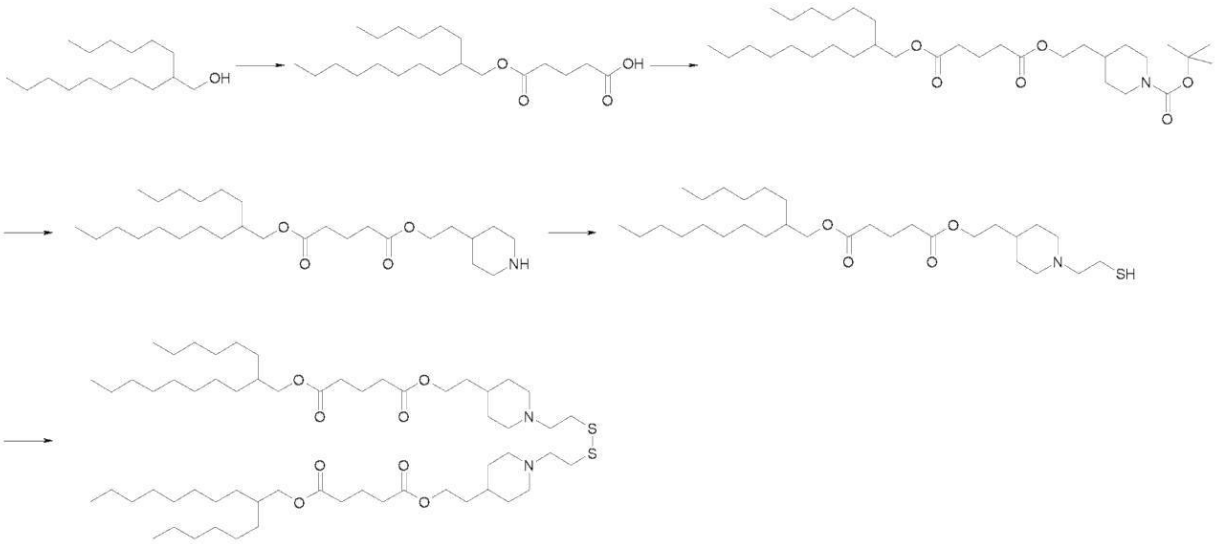
図８Ａは、ＰＳを含むＬＮＰを用いた１μｇのＰｆ－ＣＳＰ－ｍＲＮＡによるｉ．ｍ．免疫化は、３５日目に、ＰＳを含まないＬＮＰと比較して、マウスにおいて液性免疫応答を誘導したことを示す。図８Ｂは、ＰＳを含むＬＮＰを用いた１μｇのＰｆ－ＣＳＰ－ｍＲＮＡによるｉ．ｍ．免疫化は、１０５日目に、ＰＳを含まないＬＮＰと比較して、マウスにおいて非常に強力な液性免疫応答を誘導したことを示す。

【０７６８】

実施例８：ＨＥＸＡ１の合成

【０７６９】

【化６４】

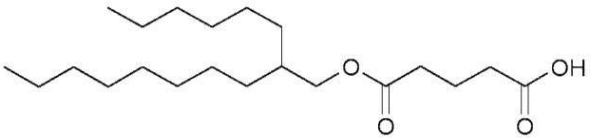


【０７７０】

実施例８．１

【０７７１】

【化６５】



【０７７２】

５－（２－ヘキシルデコキシ）－５－オキソ－ペンタン酸の合成

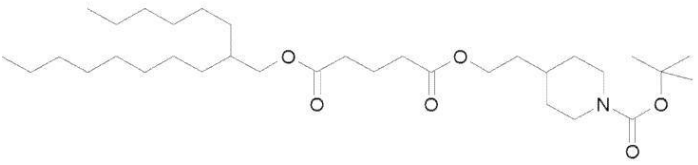
２－ヘキシル－１－デカノール（１５０ｇ）およびグルタル酸無水物（７４．１３ｇ）の脱水ジクロロメタン１０００ｍｌ中溶液に、ジメチルアミノピリジン（９０．７１ｇ）を添加し、反応混合物を窒素下、室温で６５時間攪拌した。形成した白色沈殿を濾別し、排出した。濾液を真空下で濃縮し、石油エーテル２００ｍｌと４０分間混合して、白色懸濁液を得た。沈殿を濾別し、濾液を濃縮した。粗生成物を１Ｎ塩酸３００ｍｌと酢酸エチル５００ｍｌに分配した。有機相を分離し、水５００ｍｌで洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、溶媒を真空中で蒸発させた。粗残渣を、勾配ジクロロメタン→ジクロロメタン：メタノール９０：１０で溶出するシリカフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物を含有する画分を合わせ、濃縮すると、純粋な標的化合物が、黄色油（１２３．９ｇ、収率５６．１％）として得られた。

【０７７３】

実施例８．２

【０７７４】

【化６６】



【０７７５】

Ｏ１－［２－（１－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－４－ピペリジル）エチル］Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）ペンタンジオエートの合成

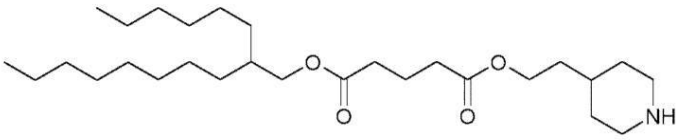
実施例８．１からの生成物（５２．６ｇ）およびｔｅｒｔ－ブチル４－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－１－カルボキシレート（３７．２ｇ）を、室温で、ジクロロメタン６００ｍｌに溶解して、透明な黄色溶液を得る。Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（３３．４８ｇ）を添加し、反応混合物を室温で２２時間撹拌した。さらなるＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（１５．２ｇ）を添加し、混合物を室温でさらに４２時間撹拌した。形成した白色沈殿を濾別し、少量の石油エーテルで洗浄した。合わせた濾液を真空中で濃縮し、残渣を、純粋な石油エーテルから石油エーテル：酢酸エチル９０：１０までの溶媒勾配を用いるシリカフラッシュクロマトグラフィーによって精製する。生成物の純粋な画分を合わせ、濃縮すると、標的化合物が油（３２．８ｇ、収率３９．２％）として得られる。

【０７７６】

実施例８．３

【０７７７】

【化６７】



【０７７８】

Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）Ｏ１－［２－（４－ピペリジル）エチル］ペンタンジオエートの合成

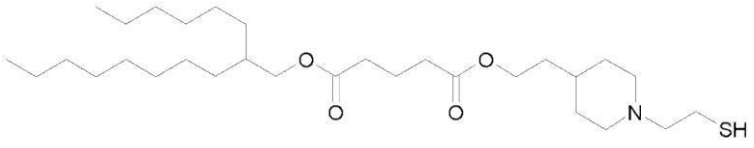
実施例８．２からの生成物（３２．８ｇ）を室温でジクロロメタン１０００ｍｌに溶解した。溶液を氷浴中で冷却し、トリフルオロ酢酸（３５．６ｍｌ）を約０℃でゆっくり添加した。混合物を室温まで加温させ、一晩撹拌した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄し、水相をジクロロメタンで逆抽出した。合わせた有機溶液をブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮すると、標的化合物が黄色油（２７．１５ｇ、定量的収率）として得られる。生成物をさらに精製することなく次の工程に使用した。

【０７７９】

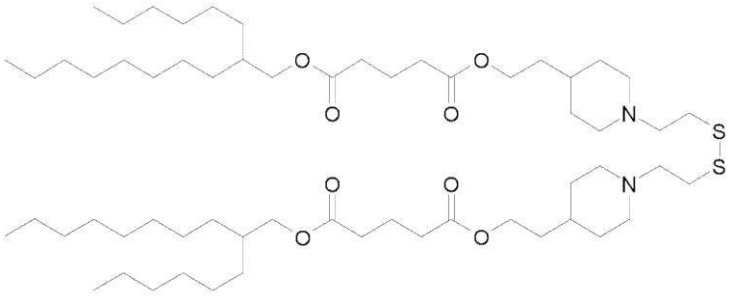
実施例８．４

【０７８０】

【化６８】

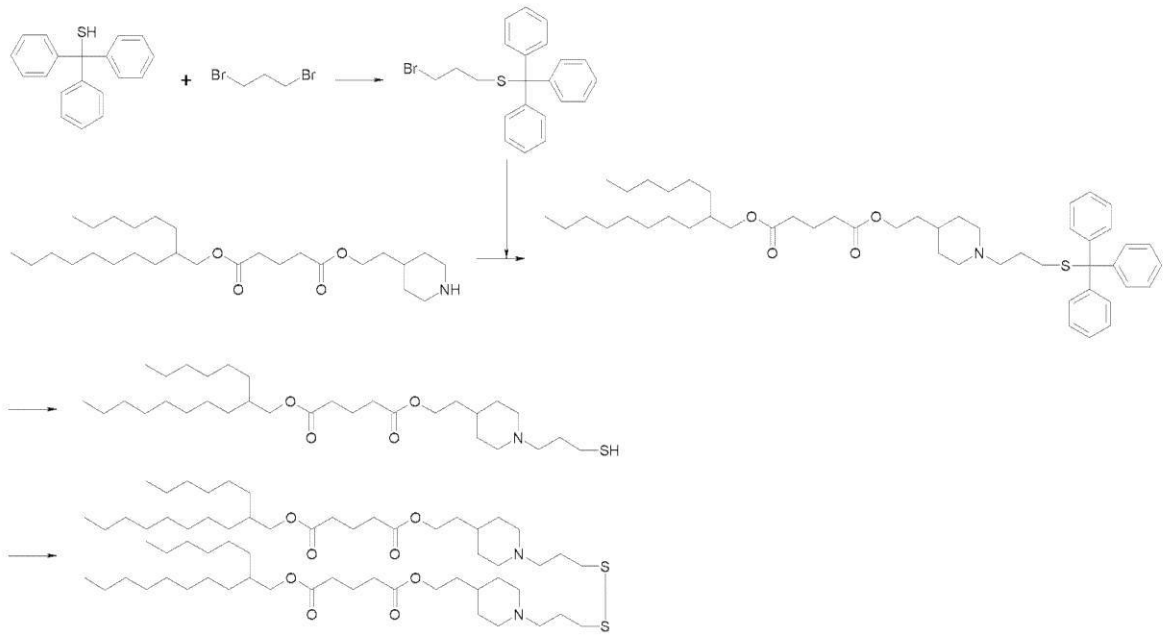


【０７８１】
Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）Ｏ１－［２－［１－（２－スルファニルエチル）－４－ピペリジル］エチル］ペンタンジオエートの合成
実施例８．３からの粗生成物（１．３７ｇ）を脱水トルエン１０ｍｌに溶解した。Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．５３３ｍｌ）を室温で添加して、透明な溶液を得た。混合物を圧力バイアルに移し、エチレンスルフィド０．７ｍｌを添加した。バイアルを密封し、６５℃の油浴中で一晩加熱した。室温に冷却した後、複合反応混合物を濃縮し、得られたままの状態でその後の工程に使用した。
【０７８２】
実施例８．５
【０７８３】
【化６９】



【０７８４】
Ｏ１－［２－［１－［２－［２－［４－［２－［５－（２－ヘキシルデコキシ）－５－オキソ－ペンタノイル］オキシエチル］－１－ピペリジル］エチルジスルファニル］エチル］－４－ピペリジル］エチル］Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）ペンタンジオエートの合成
実施例８．４からの粗生成物混合物をアセトニトリル１５ｍｌに溶解した。ヨウ素のアセトニトリル：水９：１中溶液を、褐色が残るまで、撹拌しながら室温で滴加した。反応混合物を濃縮し、酢酸エチルに溶解した。その後、この溶液を炭酸水素ナトリウム溶液およびチオ硫酸ナトリウム溶液で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。標的化合物を、勾配クロロホルム→クロロホルム：メタノール８０：２０で溶出する、シリカフラッシュクロマトグラフィーによって単離した。それぞれの画分を合わせ、溶媒を蒸発させると、純粋な標的化合物が黄色油（５６２ｍｇ、２工程にわたる収率２２％）として得られる。
【０７８５】
１Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）：４．１１ｐｐｍ（４Ｈ）、３．９８ｐｐｍ（４Ｈ）、３．１５～２．５ｐｐｍ（１２Ｈ）、２．３７（８Ｈ）、２．１７～１．８４ｐｐｍ（８Ｈ）、１．８１～１．５ｐｐｍ（１０Ｈ）、１．４９～１．０８ｐｐｍ（５４Ｈ）、０．８８（１２Ｈ）。
【０７８６】
実施例９：ＨＥＸＡ２の合成
【０７８７】

【化７０】

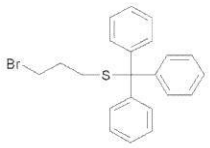


【０７８８】

実施例９．１

【０７８９】

【化７１】



【０７９０】

［３－ブロモプロピルスルファニル（ジフェニル）メチル］ベンゼンの合成

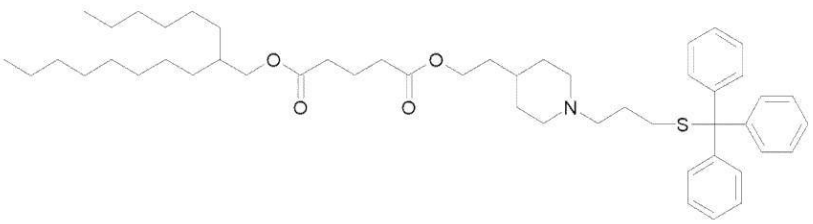
乾燥テトラヒドロフラン２２５ｍｌ中のトリフェニルメタンチオール（１２ｇ）および１，３－ジブロモプロパン（２２ｍｌ）の溶液に、カリウムカーボネート（６．６ｇ）を添加した。反応混合物を窒素下、５０℃で２日間、６０℃でさらに４日間撹拌した。不溶性の塩を濾別し、濾液を真空中で濃縮した。ジクロロメタン１５０ｍｌ中の残渣の溶液を水５００ｍｌで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣を石油エーテル：ジクロロメタン４：１で溶出するシリカフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。関連する画分を合わせ、溶媒を真空中で蒸発させると、純粋な標的化合物が、固体（４．２ｇ、収率２４．３％）として得られる。

【０７９１】

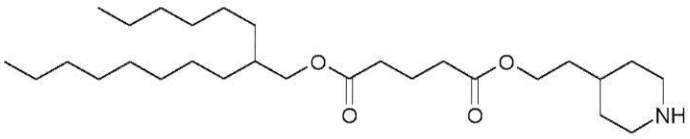
実施例９．２

【０７９２】

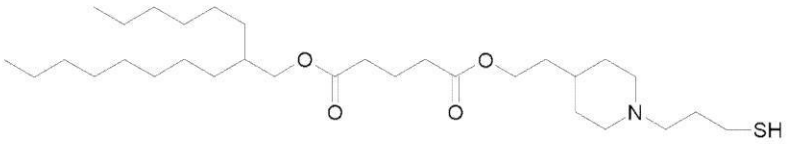
【化７２】



【０７９３】
　Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）Ｏ１－［２－［１－（３－トリチルスルファニルプロピル）－４－ピペリジル］エチル］ペンタンジオエート
の合成
【０７９４】
【化７３】

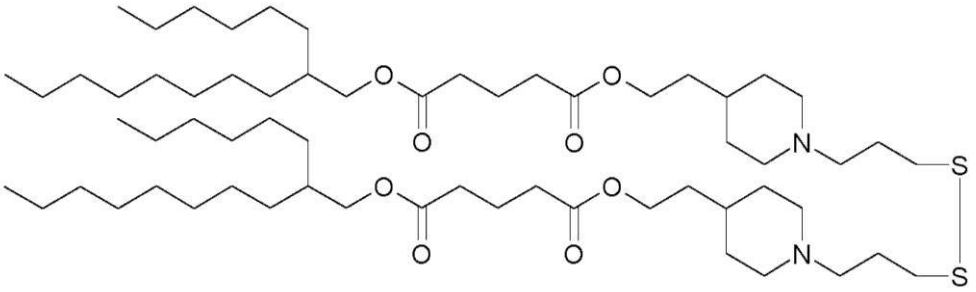


【０７９５】
　（４ｇ）および実施例９．１からの生成物（３．４ｇ）をアセトニトリル８５ｍｌと室温で混合して懸濁液を得た。ジメチルホルムアミド（２ｍｌ）を添加し、混合物を５５℃で１６時間、さらに６５℃で２４時間撹拌した。炭酸カリウム（６００ｍｇ）を添加し、混合物をさらに３時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー（シリカ、溶離液としてジクロロメタン：メタノール９０：１０）によって精製すると、いくらかの残留ジメチルホルムアミドを含有する本質的に純粋な標的化合物（３．５５ｇ、収率５２．９％）が得られた。
【０７９６】
　実施例９．３
【０７９７】
【化７４】



【０７９８】
　Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）Ｏ１－［２－［１－（３－スルファニルエチル）－４－ピペリジル］エチル］ペンタンジオエートの合成
　実施例９．２からの生成物（１ｇ）を乾燥ジクロロメタン５ｍＬに溶解し、溶液を氷浴で冷却して０℃とした。その後、トリフルオロ酢酸（１．９６５ｍｌ）およびトリエチルシラン（０．２０６ｍｌ）を添加して、わずかに褐色がかった溶液を得た。反応混合物を０℃で３０分間撹拌し、ジクロロメタン５０ｍｌで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液１００ｍｌで洗浄した。有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮した。残渣を勾配ジクロロメタン→ジクロロメタン：メタノール９５：５で溶出するシリカフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、標的化合物（０．４７ｇ、収率６８％）を得た。
【０７９９】
　実施例９．４
【０８００】

【化７５】



【０８０１】

Ｏ１－［２－［１－［３－［３－［４－［２－［５－（２－ヘキシルデコキシ）－５－オキソ－ペンタノイル］オキシエチル］－１－ピペリジル］プロピルジスルファニル］プロピル］－４－ピペリジル］エチル］－Ｏ５－（２－ヘキシルデシル）ペンタンジオエートの合成

実施例９．３からの生成物（０．４７ｇ）をアセトニトリル１０ｍｌに溶解した。ヨウ素のアセトニトリル：水９：１中溶液を、褐色が残るまで、室温で滴加した。反応混合物を室温で５８時間撹拌し、濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー（シリカ、ジクロロメタン→ジクロロメタン：メタノール９５：５）により精製すると、標的化合物が、ヨウ化水素酸塩（２４０ｍｇ、収率４５．８％）として得られた。

【０８０２】

１Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）：１０．０１ｐｐｍ（２Ｈ）、４．１５ｐｐｍ（４Ｈ）、３．９９ｐｐｍ（４Ｈ）、３．８３ｐｐｍ（４Ｈ）、３．２８ｐｐｍ（４Ｈ）、２．９４～２．８０ｐｐｍ（８Ｈ）、２．５３～２．４４ｐｐｍ（４Ｈ）、２．４３～２．３６ｐｐｍ（８Ｈ）、２．２１～２．０９ｐｐｍ（４Ｈ）、２．０４～１．９１ｐｐｍ（８Ｈ）、１．８４～１．６７ｐｐｍ（６Ｈ）、１．３６～１．２ｐｐｍ（５０Ｈ）、０．９０ｐｐｍ（１２Ｈ）

実施例１０：ＴＨＩＯＥＴＨＥＲの合成

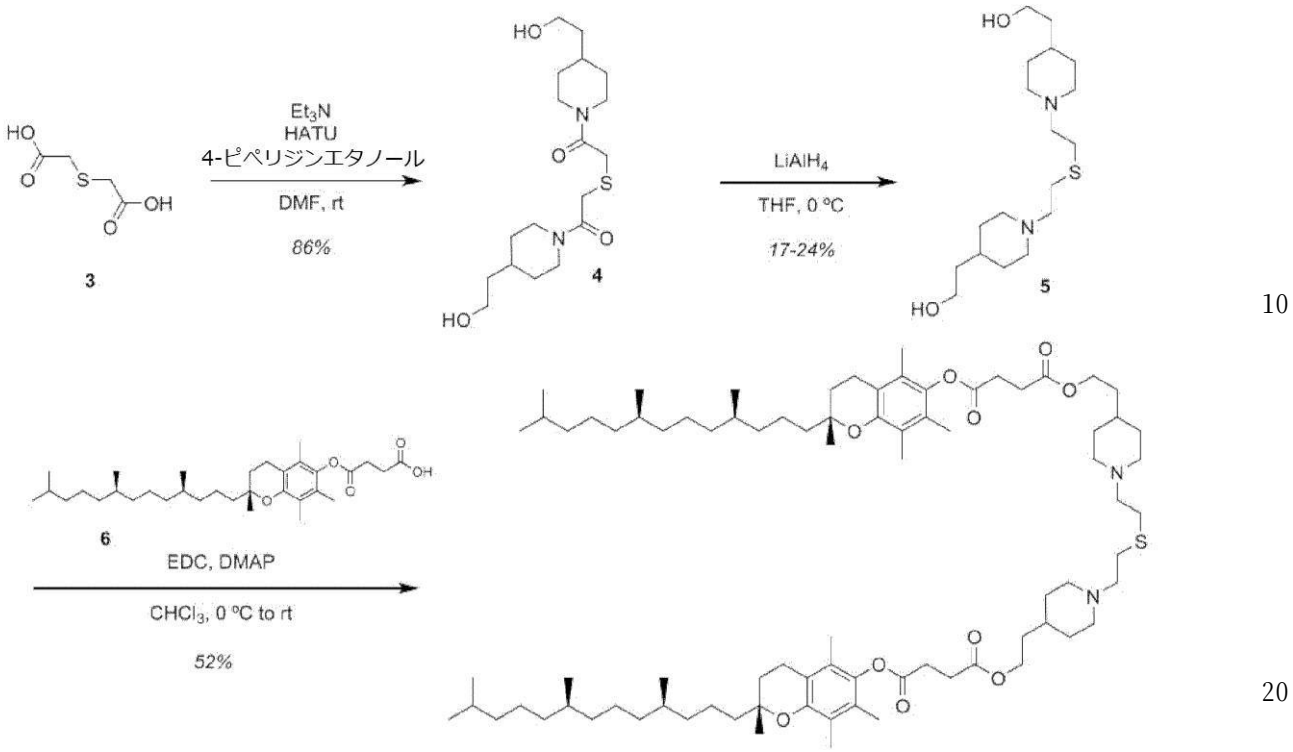
ＴＨＩＯＥＴＨＥＲ（Ｍｅｒｃａｃｈｅｍ　Ｂ．Ｖ．、オランダ、ナイメーヘン（Ｎｉｊｍｅｇｅｎ）所在）を合成するために、ジカルボン酸誘導体３と４－ピペリジンエタノールのカップリングにより、ビスアミド４を８６％で得た。ＬｉＡｌＨ$_4$によるその後の還元により、フラッシュクロマトグラフィーによる精製後に、５を２４％で得た。商業的に入手可能なビタミンＥ誘導体６との最終的なカップリングにより、ＴＨＩＯＥＴＨＥＲを５２％で得て、これをヘプタンとＭｅＣＮとの間の抽出、引き続いてフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。

【０８０３】

反応スキーム：

【０８０４】

【化７６】



【０８０５】

実施例１１：ＰＳを含むＬＮＰ中に製剤化されたチロシナーゼ関連タンパク質２（Ｔｒｐ２）をコードするｍＲＮＡによるマウスの免疫化［仮想的］

Ｔｒｐ２をコードするｍＲＮＡ（配列番号２９）を、上記の表Ｅｘ－２または表Ｅｘ－４の製剤に従って、表Ｅｘ－７に示されるＬＮＰに製剤化する。

【０８０６】

得られるＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－７に示す量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目および２１日目に雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用する。陰性対照群には緩衝液のみを与える。マウスを３５日目に　　殺する。血清試料を１日目、２１日目、および３５日目に採取し、脾臓を３５日目に単離する。

【０８０７】

【表２０】

表 Ex-7　実施例 11 のワクチン接種スキーム

群	マウスの番号	RNA 処理	製剤	ｍＲＮＡ	用量	経路	体積
1	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP9	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
2	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP10	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
3	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP11	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
4	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP12	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
5	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP13	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
6	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP14	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
7	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP15	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
8	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP16	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
9	6	Trp2 をコードするｍＲＮＡ	LNP-C	Trp2	1μg	i.m.	1×25μl
10	6	なし	緩衝液(PBS)	なし	n.a.	i.m.	1×25μl

【０８０８】

ＥＬＩＳＡによる特異的液性免疫応答の決定：

ＥＬＩＳＡを、標準的な技術に従って行う。コーティングプレートを、それぞれの血清希釈を使用してインキュベートし、特異抗体のそれぞれのペプチドへの結合をビオチン化アイソタイプ特異抗マウス抗体、引き続いて基質としてのＡｍｐｌｅｘ（商標）Ｒｅｄ Ｒｅａｇｅｎｔによるストレプトアビジン－ＨＲＰ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）を使用して検出する。それぞれのペプチドに対して向けられたエンドポイント抗体価（全ＩｇＧ）をプライム後３５日目（第１のブースト後１４日目）にＥＬＩＳＡによって測定する。

【０８０９】

実施例１２：筋肉内ＬＮＰ注射後のＰｐＬｕｃの器官分布

２０μｇ用量のＰｐＬｕｃ ｍＲＮＡを、先の実施例に従って、表Ｅｘ－１３に従って製剤化した。次いで、ＬＮＰを雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに０日目に筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）に適用した。以下に示す時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で終了し、器官を回収した。さらに、血清試料を適用１４日前および以下に示される時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で採取した。

【０８１０】

【表２１】

表 Ex-13　実施例 12 の製剤設定

群/順序	図９凡例/群	時点	イオン化可能脂質	コレステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
1	白丸	4時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
2	白四角	24時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
3	黒丸	4時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
4	黒四角	24時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
5	上向き三角形	4時間	PBS 緩衝液			
6	下向き三角形	24時間	PBS 緩衝液			

【０８１１】

ＰｐＬｕｃ発現を、器官回収後に標準的な方法に従って調製された組織溶解物においてルシフェラーゼアッセイによって決定した。

結果：図９から、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰは、ＤＰｈｙＰＳを含まないＬＮＰ（４時間および２４時間；白抜きの記号）と比較して、両方の時点（４時間および２４時間；黒塗りの記号）でより高いＰｐＬｕｃ濃度を示したことが明らかである。これは、鼠径リンパ節、膝窩リンパ節、および筋肉（すなわち、注射部位（ＳＯＩ））の場合である。

【０８１２】

実施例１３：皮内ＬＮＰ注射後のＰｐＬｕｃの器官分布

２０μｇ用量のＰｐＬｕｃ　ｍＲＮＡを、先の実施例に従って、表Ｅｘ－１４に従って製剤化した。次いで、ＬＮＰを雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに０日目に皮内（ｉ．ｄ．）に適用した。以下に示す時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で終了し、器官を回収した。さらに、血清試料を適用１４日前および以下に示される時点（すなわち、適用の４時間後または２４時間後のいずれか）で採取した。

【０８１３】

【表２２】

表 Ex-14　実施例 13 の製剤設定

群/順序	図 10 凡例/群	時点	イオン化可能脂質	コレステロール	中性脂質	ポリマーコンジュゲート脂質
1	白丸	4時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
2	白四角	24時間	49mol% THIOETHER	38.5mol%	10mol%DPhyPE	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
3	黒丸	4時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
4	黒四角	24時間	59mol% THIOETHER	28.5mol%	5mol%DPhyPE 5mol%DPhyPS	2.5mol%の「PMOZ4」(50 個のモノマー反復(n=50)を有する)
5	上向き三角形	4時間	PBS 緩衝液			
6	下向き三角形	24時間	PBS 緩衝液			

【０８１４】

結果：図１０から、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰは、ＤＰｈｙＰＳを含まないＬＮＰ（４時間および２４時間；白抜きの記号）と比較して、両方の時点（４時間および２４時間；黒塗りの記号）でより高いＰｐＬｕｃ濃度を示したことが明らかである。これは、鼠径リンパ節、腋窩リンパ節、および皮膚（すなわち、注射部位（ＳＯＩ））の場合である。

【０８１５】

実施例１４：ＰＳまたはＤＨＰＣを含むＬＮＰ中に製剤化されたＴｒｐ２によるマウスの免疫化

さらなるがん治療設定におけるＬＮＰに対するＰＳまたはＤＨＰＣの添加の効果を評価するために、Ｔｒｐ２をコードするｍＲＮＡ（配列番号２９）を、表Ｅｘ－１５および表Ｅｘ－１６に示されるようにＬＮＰに製剤化した。得られたＬＮＰ製剤を、表Ｅｘ－１５に示す用量のｍＲＮＡ、製剤、および対照群とともに、０日目、７日目、および２１日目に雌Ｃ５７ＢＬ／６マウスに筋肉内（ｉ．ｍ．；脛骨筋）適用した。陰性対照群にはＰＢＳ緩衝液のみを与えた。血液試料を、最初のワクチン接種の８時間後および２回目のワクチン接種の１８時間後に採取した。マウスを２１日目に　殺し、ＩＣＳでの分析のために脾臓を採取し、抗体ＥＬＩＳＡでの分析のために血清を採取した。

【０８１６】

続いて、Ｔ細胞性応答についてアッセイした（ＣＤ８；（ＩＦＮｙ／ＴＮＦα産生ＣＤ８　Ｔ細胞およびＩＦＮｙＴＮＦα産生ＣＤ８　Ｔ細胞）、すなわち、脾試料を、Ｔｒｐ２免疫優性エピトープ、すなわち、国際公開２０２０１７６９８４号に開示されている配列番号１によるチロシナーゼ関連タンパク質２（Ｔｒｐ２、１８０～１８８）ペプチドで再刺激した。ＤＭＳＯ群が対照としての役割を果たしたので、以前に記載されたように、および当技術分野で公知のようにアッセイを実施した。

【０８１７】

Ｔｒｐ２に対して向けられたエンドポイント抗体価（ＩｇＧ２）を、標準的な技術に従って抗体ＥＬＩＳＡによって測定した。すなわち、ＥＬＩＳＡプレートをＤＣＴ（Ｔｒｐ

２承認ＨＧＮＣ記号は、ドーパクロムトートメラーゼ（ＤＣＴ）である）でコーティングし、コーティングプレートを、それぞれの血清希釈を使用してインキュベートし、特異的抗体のそれぞれのペプチドへの結合をビオチン化アイソタイプ特異的抗マウス検出抗体、引き続いて基質としてのＡｍｐｌｅｘ（商標）Ｒｅｄ　Ｒｅａｇｅｎｔによるストレプトアビジン－ＨＲＰ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）を使用して検出した。

【０８１８】

【表２３】

表 Ex-15　実施例 14 のワクチン接種スキーム

群	図 11 において	マウスの番号	RNA 処理	製剤	用量	経路	体積
1	白丸	5	Trp2 をコードする ｍＲＮＡ （配列番号２９）	LNP9	1μg	i.m.	1×25μl
2	黒四角	5	Trp2 をコードする ｍＲＮＡ （配列番号２９）	LNP10	1μg	i.m.	1×25μl
3	黒丸	5	Trp2 をコードする ｍＲＮＡ （配列番号２９）	LNP10	1μg	i.m.	1×25μl
4	黒三角	5	なし	緩衝液 (PBS)	n.a.	i.m.	1×25μl

【０８１９】

【表２４】

表 Ex－16　実施例 14 の表 Ex-15 の群 1～3 の LNP 製剤

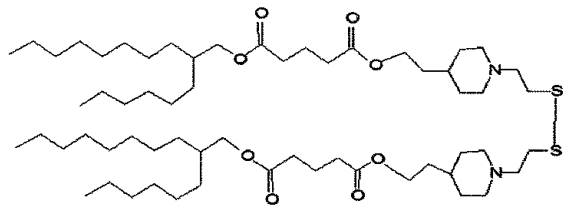
群	脂質(mol%) イオン化可能脂質-ステロイド-中性脂質-ポリマー脂質-添加剤					N:P 比
	THIOETHER	Chol	DPhyPE	「PMOZ4」 (50 個の モノマー反復 (n=50)を有する)	添加剤	
1	49	38.5	10	2.5	---	14
2	49	38.5	8	2.5	2 ホスファチジルセリン	14
3	49	28.5	10	2.5	10 DHPC	14

【０８２０】

結果：Ｔｒｐ２免疫優性エピトープでのペプチド再刺激後に、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ（黒四角）およびＤＨＰＣを含むＬＮＰ（黒丸）が、ＤＰｈｙＰＳもＤＨＰＣも含まないＬＮＰ（白丸）と比較して有意に高いＣＤ８Ｔ細胞応答を示したことが図１１から明らかである。さらに、ＤＰｈｙＰＳを含むＬＮＰ（黒四角）およびＤＨＰＣを含むＬＮＰ（黒丸）が、ＤＰｈｙＰＳもＤＨＰＣも含まないＬＮＰ（白丸）と比較して有意に高いＩｇＧ２エンドポイント力価を示したことが図１２から明らかである。

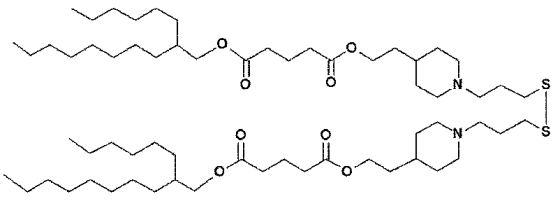
【図面】

【図１Ａ】



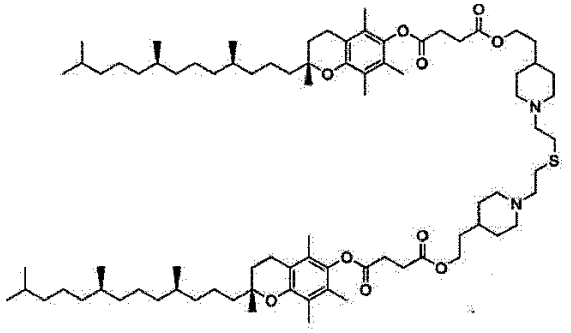
A

【図１Ｂ】



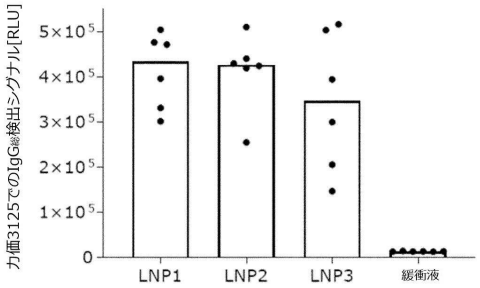
B

【図１Ｃ】

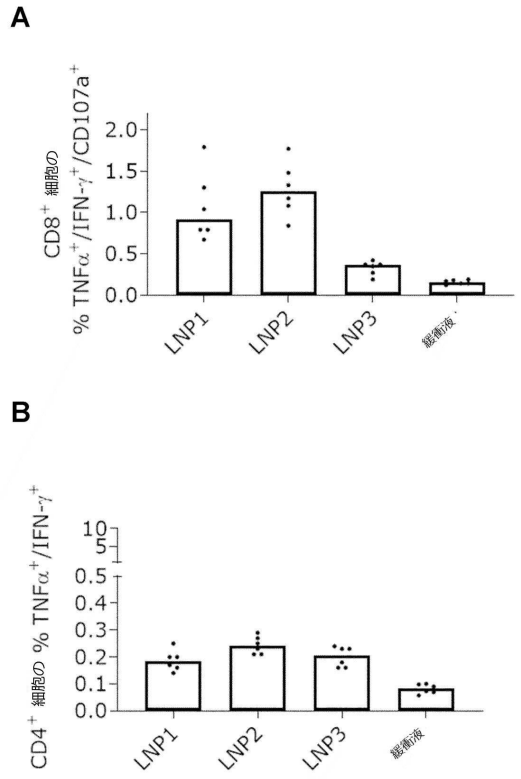


C

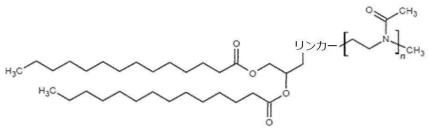
【図２】



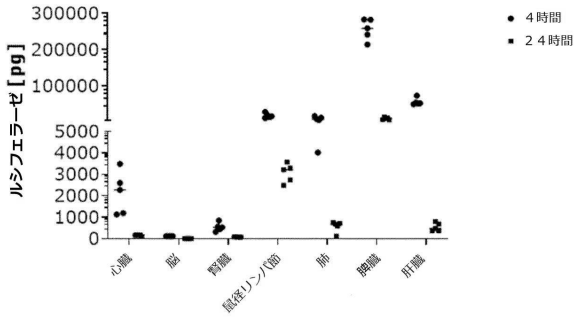
【図３】


A
CD8+ 細胞の
% TNFα+ /IFN-γ+ /CD107a+
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LNP1
LNP2
LNP3
緩衝液
B
CD4+ 細胞の % TNFα+ /IFN-γ+
10
5
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
LNP1
LNP2
LNP3
緩衝液

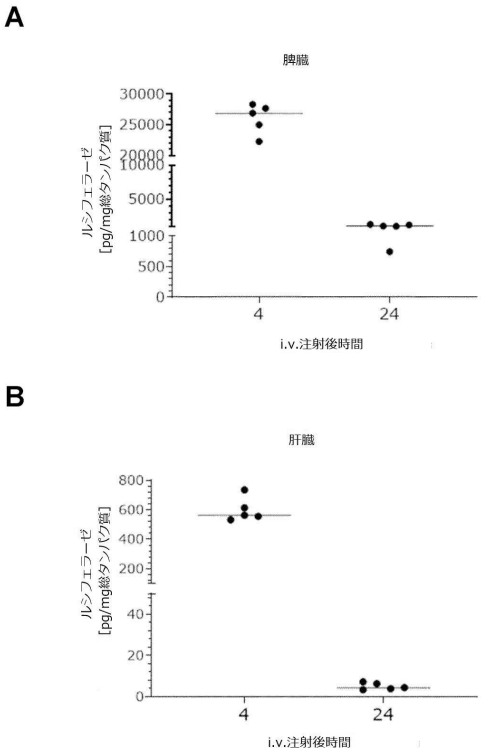
【図４】


リンカー
n

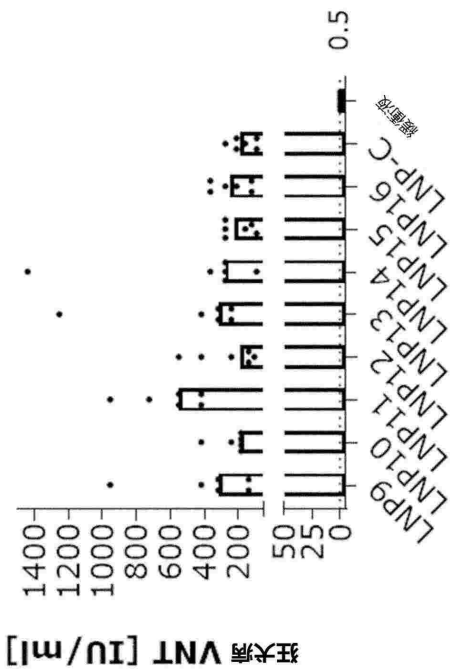
【図５】


ルシフェラーゼ [pg]
300000
200000
100000
5000
4000
3000
2000
1000
0
心臓
脳
腎臓
鼠径リンパ節
肺
脾臓
肝臓
4時間
24時間

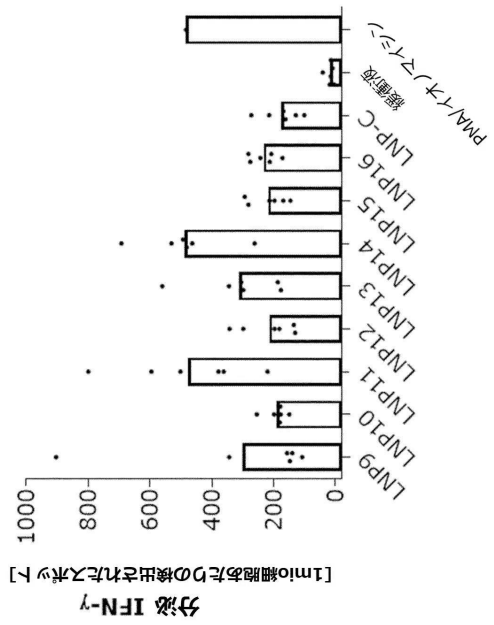
【図６】


A
脾臓
ルシフェラーゼ
[pg/mg総タンパク質]
30000
25000
20000
10000
5000
1000
500
0
4
24
i.v.注射後時間
B
肝臓
ルシフェラーゼ
[pg/mg総タンパク質]
800
600
400
200
40
20
0
4
24
i.v.注射後時間

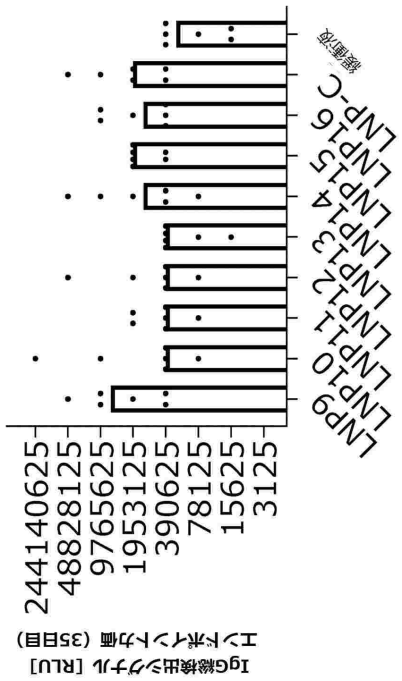
【図７Ａ】



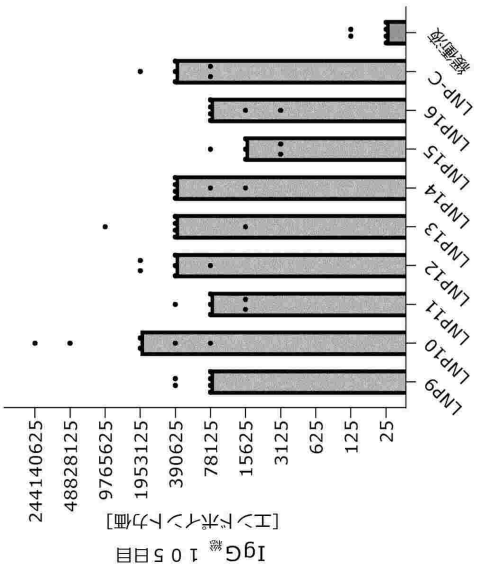
【図７Ｂ】



【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図９】

【図１０】

【図１１】

【図１２】

【配列表】
20245349000000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/074435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/39 A61K39/015 A61K39/12
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)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTINON F ET AL: "INDUCTION OF VIRUS-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN VIVO BY LIPOSOME-ENTRAPPED MRNA", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY-VCH, HOBOKEN, USA, vol. 23, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 1719-1722, XP000618955, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.1830230749 abstract page 1719, right-hand column, paragraph 2 page 1720, right-hand column, paragraph 2 - page 1721, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-43

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 2022	17/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Noë, Veerle

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/074435

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SEZER OKAY ET AL: "Nanoparticle-based delivery platforms for mRNA vaccine development", AIMS BIOPHYSICS, vol. 7, no. 4, 1 January 2020 (2020-01-01) , pages 323-338, XP055768438, ISSN: 2377-9098, DOI: 10.3934/biophy.2020023 abstract page 324, paragraph 1 - page 326, paragraph 2 page 330, paragraph 1 - page 331, paragraph 1 -----	1-43
Y	KUROSAKI TOMOAKI ET AL: "Splenic Gene Delivery System Using Self-assembling Nano-complex with Phosphatidylserine Analog", BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN , vol. 38, no. 1 1 January 2015 (2015-01-01), pages 23-29, XP055921330, JP ISSN: 0918-6158, DOI: 10.1248/bpb.b14-00478 Retrieved from the Internet: URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/38/1/38_b14-00478/_pdf/-char/ja abstract page 23, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 24, left-hand column, line 2 - paragraph 3; table 1 page 26, right-hand column - page 27, right-hand column, paragraph 1 page 28, right-hand column, paragraph 3 - page 29, left-hand column, paragraph 1 -----	1-43
X	WO 2021/123332 A1 (CUREVAC AG [DE]) 24 June 2021 (2021-06-24) the whole document -----	1-43

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/074435

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.:
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:

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).

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.:
1-43

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2022/074435

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-43

a vaccine composition comprising a) at least one nucleic acid encoding at least one antigen and b) a carrier composition comprising phosphatidylserine in an amount of not more than 9 mol% of the total amount of all lipidic excipients in the carrier composition.

---

2. claims: 44-46

a vaccine composition comprising a) at least one nucleic acid encoding at least one antigen and b) a carrier composition comprising the phospholipid DHPC.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/074435

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/074435

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021123332 A1	24-06-2021	AU 2020407285 A1	11-08-2022
		BR 112022011803 A2	30-08-2022
		CA 3162019 A1	24-06-2021
		CN 114901360 A	12-08-2022
		EP 4076647 A1	26-10-2022
		IL 293890 A	01-08-2022
		JP 2023507465 A	22-02-2023
		KR 20220121246 A	31-08-2022
		WO 2021123332 A1	24-06-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*31/711(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｐ	*1/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｐ	*31/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10		
Ａ６１Ｐ	*31/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12		
Ａ６１Ｐ	*31/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｐ	*33/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｐ	*37/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*39/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｇ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/50 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/50		
Ｃ１２Ｎ	*15/44 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/44		
Ｃ１２Ｎ	*15/49 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/49		
Ｃ１２Ｎ	*15/48 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/48		
Ｃ１２Ｎ	*15/46 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/46		
Ｃ１２Ｎ	*15/45 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/45		
Ｃ１２Ｎ	*15/40 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/40		
Ｃ１２Ｎ	*15/31 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/31		
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/38 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/38		
Ｃ１２Ｎ	*15/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/34		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　100152489
弁理士　中村 美樹
(72)発明者　バウムホフ、パトリック
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５ キュアバック エスイー アイピー デパートメント内
(72)発明者　ナバロ、ジェマ
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５ キュアバック エスイー アイピー デパートメント内
(72)発明者　パーマストン メンデス、リビア
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５ キュアバック エスイー アイピー デパートメント内
(72)発明者　リュッケルト、クリスティーネ
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５ キュアバック エスイー アイピー デパートメント内
(72)発明者　ラザロ、サンドラ
ドイツ連邦共和国 ７２０７６ テュービンゲン フリードリッヒ－ミエッシャー－シュトラーセ １５ キュアバック エスイー アイピー デパートメント内

Fターム（参考） 4C076 AA65 BB16 BB25 BB27 BB28 BB29 BB30 BB32 CC06 CC27 DD60 DD63 DD70 EE17 EE23
4C084 AA13 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA66 MA67 NA14 ZA75 ZB07 ZB09 ZB13 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37
4C085 AA03 BA01 BB01 BB03 BB23 GG04 GG05
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 MA37 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA66 MA67 NA14 ZA75 ZB07 ZB09 ZB13 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37