

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7613685号
(P7613685)

(45)発行日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(24)登録日 令和7年1月6日(2025.1.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/40 (2006.01)

C 1 2 N 15/40

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

Z N A

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 39/385 (2006.01)

A 6 1 K 39/385

請求項の数 46 (全193頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-553650(P2020-553650)

(86)(22)出願日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(65)公表番号 特表2021-519595(P2021-519595
A)

(43)公表日 令和3年8月12日(2021.8.12)

(86)国際出願番号 PCT/EP2019/060000

(87)国際公開番号 WO2019/202035

(87)国際公開日 令和1年10月24日(2019.10.24)

審査請求日 令和4年4月15日(2022.4.15)

(31)優先権主張番号 PCT/EP2018/059799

(32)優先日 平成30年4月17日(2018.4.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 PCT/EP2018/060810

(32)優先日 平成30年4月26日(2018.4.26)

最終頁に続く

(73)特許権者 509014386

キュアバック エスイー

CureVac SE

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービ

ンゲン フリードリッヒ・ミエッシャー

ーシュトラッセ 15

Friedrich-Miescher

-Strasse 15, 7 2 0 7 6 T

uebingen, Germany

(74)代理人 100107766

弁理士 伊東 忠重

(74)代理人 100070150

弁理士 伊東 忠彦

(74)代理人 100135079

弁理士 宮崎 修

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規RSV RNA分子及びワクチン接種用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの異種3'非翻訳領域(3'-UTR)と；

b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結され、RSV融合(F)タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド若しくはタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列と、

を含み、

前記少なくとも1つのコード配列は、配列番号4957と同一である、又は少なくとも97%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列をコードし、

前記RSV融合(F)タンパク質に由来する前記少なくとも1つの抗原性ペプチド若しくはタンパク質は、C末端が欠失したFタンパク質(F-del)であり、

前記RSV融合(F)タンパク質は、融合前コンフォメーションで抗原を安定化するように設計され、

前記RSV融合(F)タンパク質は、DSCav1変異(S155C、S290C、S190F、及びV207L)を含み、

前記RSV融合(F)タンパク質は、1本のポリペプチド鎖に2つのサブユニットF2及びサブユニットF1を含み、前記サブユニットF2及び前記サブユニットF1が、リンカーエレメントを介して接続され、安定したF2-リンカー-F1タンパク質を生成し、

前記F2-リンカー-F1タンパク質は、aa104～aa144を含まず、

さらに、前記 RSV 融合 (F) タンパク質が、(A149C、Y458C) 変異を含むことを特徴とする人工 RNA。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの異種 3' - UTR が、PSMB3、ALB7、アルファグロビン、CASP1、COX6B1、GNAS、NDUFA1、及び RPS9 から選択される遺伝子の 3' - UTR に由来する核酸配列を含む請求項 1 に記載の人工 RNA。

【請求項 3】

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、及び UBQLN2 から選択される遺伝子の 5' - UTR に由来する核酸配列を含む請求項 1 から 2 のいずれかに記載の人工 RNA。

10

【請求項 4】

a-1. HSD17B4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び PSMB3 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

a-2. NDUFA4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び PSMB3 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

a-3. SLC7A3 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び PSMB3 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

20

a-4. NOSIP 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び PSMB3 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

a-5. MP68 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び PSMB3 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

b-1. UBQLN2 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

30

b-2. ASAH1 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

b-3. HSD17B4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

b-4. HSD17B4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び CASP1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

b-5. NOSIP 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び COX6B1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

40

c-1. NDUFA4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

c-2. NOSIP 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び NDUFA1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

c-3. NDUFA4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列に由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び COX6B1 遺伝子の 3' - UTR に由来す

50

f-4. HSD17B4 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列

50

に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びGNAS遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

f - 5. MP68遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCOX6B1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

g - 1. MP68遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びNDUFA1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

g - 2. NDUFA4遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCASP1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

g - 3. NDUFA4遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びGNAS遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

g - 4. NOSIP遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCASP1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

g - 5. RPL31遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCASP1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

h - 1. RPL31遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCOX6B1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

h - 2. RPL31遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びGNAS遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

h - 3. RPL31遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びNDUFA1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

h - 4. SLC7A3遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCASP1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

h - 5. SLC7A3遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCOX6B1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

i - 1. SLC7A3遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びRPS9遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

i - 2. RPL32遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びALB7遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

i - 3. アルファグロビン遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列に由来する少なくとも1つの3' - UTR、を含む請求項1から3のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項5】

a - 1 (HSD17B4 / PSMB3)、a - 4 (NDUFA4 / PSMB3)、c - 1 (NDUFA4 / RPS9)、e - 4 (NOSIP / RPS9)、g - 2 (NDUFA4 / CASP1)、i - 2 (RPL32 / ALB7)、又はi - 3 (アルファグロビン) に係るUTRエレメントを含む請求項4に記載の人工RNA。

【請求項6】

10

20

30

40

50

- － HSD17B4 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 1 又は 2 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － ASAH1 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 3 又は 4 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － ATP5A1 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 5 又は 6 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － MP68 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 7 又は 8 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － NDUF A4 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 9 又は 10 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － NOSIP 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 11 又は 12 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － RPL31 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 13 又は 14 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － SLC7A3 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 15 又は 16 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － TUBB4B 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 17 又は 18 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － UBQLN2 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 19 又は 20 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － RPL32 遺伝子に由来する前記 5' - UTR が、配列番号 21 又は 22 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － PSMB3 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 23 又は 24 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － CASP1 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 25 又は 26 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － COX6B1 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 27 又は 28 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － GNAS 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 29 又は 30 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － NDUF A1 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 31 又は 32 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；
- － RPS9 遺伝子に由来する前記 3' - UTR が、配列番号 33 又は 34 と同一である又は少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 同一である核酸配列を含む又ははからなる；

10

20

30

40

50

%、又は99%同一である核酸配列を含む又はからなる；

－ A L B 7 遺伝子に由来する前記3'－UTRが、配列番号35又は36と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列を含む又はからなる；

－ アルファグロビン遺伝子に由来する前記3'－UTRが、配列番号37又は38と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列を含む又はからなる、

請求項1から5のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項7】

前記リンカーがG S リンカーである、請求項1から6のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項8】

前記R S V 融合（F）タンパク質が、F__D S C a v 1__mut 4である請求項1から7のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項9】

前記少なくとも1つのコード配列は、配列番号4958～4965、16524～16531のいずれかと同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの核酸配列をコードする請求項1から8のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項10】

前記少なくとも1つのコード配列が、コドン改変コード配列であり、

少なくとも1つの前記コドン改変コード配列によってコードされるアミノ酸配列が、対応する野生型コード配列によってコードされるアミノ酸配列と比較して変更がない請求項1から9のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項11】

少なくとも1つの前記コドン改変コード配列が、C 最大化コード配列、C A I 最大化コード配列、ヒトコドン使用適合理化コード配列、G / C 含量改変コード配列、及びG / C 最適化コード配列、又はこれらの任意の組合せから選択される請求項10に記載の人工RNA。

【請求項12】

前記人工RNAが、mRNA、自己複製RNA、環状RNA、又はレプリコンRNAである請求項1から11のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項13】

前記人工RNAが、mRNAである請求項12に記載の人工RNA。

【請求項14】

前記人工RNAが、5'－キャップ構造を含む、請求項1から13のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項15】

前記人工RNAが、少なくとも1つのポリ（A）配列、及び／又は少なくとも1つのポリ（C）配列を含む請求項1から14のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項16】

前記人工RNAが、少なくとも1つのヒストンステムループを含む、請求項1から15のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項17】

以下のエレメント：

- a) 5'－キャップ構造；
- b) 本明細書に記載される5'－UTR；
- c) リボソーム結合部位；

を含む、請求項1から16のいずれかに記載の人工RNA。

【請求項18】

以下のエレメント：

10

20

30

40

50

- a) 5' - キャップ構造；
 - b) a - 1、a - 4、c - 1、e - 4、g - 2、i - 2、又は i - 3 に係る 5' - UTR 及び／又は 3' - UTR；
 - c) 請求項 9 に記載の少なくとも 1 つのコード配列、又は請求項 1 又は 8 に記載のタンパク質をコードする少なくとも 1 つのコード配列；
- を含む請求項 1 から 17 のいずれかに記載の人工 RNA。

【請求項 19】

以下のエレメント：

- a) 5' - キャップ構造；
 - b) a - 1、a - 4、c - 1、e - 4、g - 2、i - 2、又は i - 3 に係る 5' - UTR 及び／又は 3' - UTR；
 - c) 請求項 9 に記載の少なくとも 1 つのコード配列、又は請求項 1 又は 8 に記載のタンパク質をコードする少なくとも 1 つのコード配列であって、前記 5' - UTR と前記 3' - UTR との間に位置する少なくとも 1 つのコード配列；
- を含む、請求項 1 から 18 のいずれかに記載の人工 RNA。

【請求項 20】

少なくとも 1 つの又は 1 より多くのウラシルヌクレオチドが、シュードウリジン (Ψ) ヌクレオチド又は N1 - メチルシュードウリジン (m1Ψ) ヌクレオチドで置換されている、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の人工 RNA。

【請求項 21】

前記人工 RNA が、配列番号 4966 ~ 5325、16532 ~ 16891、21454 ~ 21456、21600 ~ 21602、21526 ~ 21528、21672 ~ 21674 からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である RNA 配列を含む、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の人工 RNA。

【請求項 22】

請求項 1 から 21 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの人工 RNA を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 23】

マトリックスタンパク質 M、核タンパク質 N、M2 - 1 タンパク質、及び／又はリンタンパク質 P、又はそれらの組合せから選択される RSV に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又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 つの更なる人工 RNA を含む請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

一配列番号 9693 ~ 10052、19853 ~ 20212、21481、21482、21627、21628、21553、21554、21699、21700 からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である更なる人工 RNA；又は
一配列番号 10143 ~ 10502、20222 ~ 20581、21483、21484、21629、21630、21555、21556、21701、21702 からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である更なる人工 RNA；
又は

一配列番号 10646 ~ 11005、20591 ~ 20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704 からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である更なる人工 RNA；
又は

一配列番号 11192 ~ 11551、20960 ~ 21319、21487、21488、21633、21634、21559、21560、21705、21706 からなる

10

20

30

40

50

群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA；又は

一配列番号9693～10052、19853～20212、21481、21482、21627、21628、21553、21554、21699、21700からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA及び

配列番号10646～11005、20591～20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA及び配列番号10646～11005、20591～20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA、及び配列番号10143～10502、20222～20581、21483、21484、21629、21630、21555、21556、21701、21702からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNAを含む請求項22から23のいずれかに記載の組成物。

【請求項25】

前記少なくとも1つの人工RNAが、1以上のカチオン性若しくはポリカチオン性化合物、又はそれらの任意の組合せと複合体化若しくは会合される又は少なくとも部分的に複合体化若しくは会合される請求項22から24のいずれかに記載の組成物。

【請求項26】

前記人工RNAが、1以上の脂質と複合体化又は会合されて、リボソーム、脂質ナノ粒子、リボプレックス、及び／又はナノリボソームを形成する請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

前記人工RNAが、1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成する請求項26に記載の組成物。

【請求項28】

前記更なる人工RNAが、1以上の脂質と複合体化又は会合されて、リボソーム、脂質ナノ粒子、リボプレックス、及び／又はナノリボソームを形成する、又は1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成する、請求項23から27のいずれかに記載の組成物。

【請求項29】

前記脂質ナノ粒子（LNP）が、1以上の中性脂質及び／又はステロイド又はステロイド類似体を含む、請求項27又は28に記載の組成物。

【請求項30】

前記中性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、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ーホスファチジルエタノールアミン（POPE）、及びジオレオイルー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カルボキシラート

(D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(D M P E)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(D S P E)、16-O-モノメチル P E、16-O-ジメチル P E、18-1-トランス P E、1-ステアリオイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン(S O P E)、及び1,2-ジエライドイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(トランス D O P E)を含む群から選択される請求項29に記載の組成物。

【請求項31】

前記中性脂質が、1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン(D S P C)である、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

前記ステロイドが、コレステロールである、請求項29に記載の組成物。

【請求項33】

前記脂質ナノ粒子(L N P)が、

- (i) 少なくとも1つのカチオン性脂質；
- (i i) 中性脂質；
- (i i i) ステロイド又はステロイド類似体；及び
- (i v) P E G - 脂質

から本質的になり、

(i) ~ (i v) は、モル比で、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、及び0.5 ~ 15 % の P E G - 脂質である請求項27から32のいずれかに記載の組成物。

【請求項34】

前記脂質ナノ粒子(L N P)が、

- (i) 少なくとも1つのカチオン性脂質；
 - (i i) 中性脂質として、1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン(D S P C)；
 - (i i i) コレステロール；及び
 - (i v) 少なくとも1つの P E G 脂質
- から本質的になる請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

請求項1から21のいずれかに記載の人工RNAによってコードされることを特徴とするポリペプチド。

【請求項36】

前記ポリペプチドが、配列番号1267、2005、2743、3481、4219、4957、5695、6433、7171、7909、12833、14309、15047、15785、13571、16523、17261、17999、18737、19475と同一である又は少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項35に記載のポリペプチド。

【請求項37】

請求項35又は36に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする組成物。

【請求項38】

少なくとも1つの薬学的に許容される担体若しくは請求項1から21のいずれかに記載の少なくとも1つの人工RNA、又は請求項22から34のいずれかに記載の組成物を含むことを特徴とする組成物。

【請求項39】

請求項1から21のいずれかに記載の人工RNA、請求項22から34のいずれかに記載の組成物、請求項35又は36に記載のポリペプチド、又は請求項37又は38に記載の組成物を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項40】

請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の人工 RNA、請求項 2 2 から 3 4 のいずれかに記載の組成物、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のポリペプチド、又は請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物が、適応免疫応答を誘導する請求項 3 9 に記載のワクチン。

【請求項 4 1】

前記ワクチンが、薬学的に許容される担体を更に含む、請求項 3 9 又は 4 0 に記載のワクチン。

【請求項 4 2】

請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の人工 RNA、請求項 2 2 から 3 4 のいずれかに記載の組成物、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のポリペプチド、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物、及び／又は請求項 3 9 から 4 1 のいずれかに記載のワクチンを含むことを特徴とするキット又はキットオブパーツ。

【請求項 4 3】

少なくとも以下の成分を含む請求項 4 2 に記載のキット又はキットオブパーツ：

a) RSV 融合 (F) タンパク質に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの人工 RNA；及び、

b) M、N、M2-1、又は P から選択される RSV に由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をそれぞれがコードする少なくとも 1 つ、2 つ、又は 3 つの更なる人工 RNA

ここで、成分 a) 及び b) は、別々の実体又は単一の実体として提供される。

【請求項 4 4】

Ringer ラクタート溶液を更に含む、請求項 4 2 又は 4 3 に記載のキット又はキットオブパーツ。

【請求項 4 5】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の人工 RNA、請求項 2 2 から 3 4 のいずれかに記載の組成物、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のポリペプチド、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物、請求項 3 9 から 4 1 のいずれかに記載のワクチン、又は請求項 4 2 から 4 4 のいずれかに記載のキット又はキットオブパーツ。

【請求項 4 6】

ウイルスによる感染症、又はそのような感染症に関連する障害の治療又は予防における使用のための、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の人工 RNA、請求項 2 2 から 3 4 のいずれかに記載の組成物、請求項 3 5 又は 3 6 に記載のポリペプチド、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の組成物、請求項 3 9 から 4 1 のいずれかに記載のワクチン、又は請求項 4 2 から 4 4 のいずれかに記載のキット又はキットオブパーツ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

序

本発明は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) による感染症又は係る感染症に関連する障害の治療又は予防における使用に好適な人工 RNA に関する。特に、本発明の人工 RNA は、少なくとも 1 つの異種非翻訳領域 (UTR)、好ましくは 3' -UTR 及び／又は 5' -UTR と、RSV に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又はタンパク質、特に、RSV 融合 (F) タンパク質に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードするコード領域とを含む。前記人工 RNA は、好ましくは、前記 UTR エlement に機能可能に連結されたコード領域の発現効率の上昇によって特徴付けられる。本発明はまた、ポリマー担体、ポリカチオン性タンパク質若しくはペプチド、又は脂質ナノ粒子 (LNP) と共に前記人工 RNA を含む組成物及びワクチンに関する。更に、本発明は、前記人工 RNA 又は組成物若しくはワクチンを含むキット、特に、キットオブパーツ (kit of parts) に関する。本発明は更に、障害又は疾患を治療又は予防する方法、並びに人工 RNA、組成物、又はワクチンの第 1 及び第 2 の医学的使用に関する。

【背景技術】

【0002】

呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、Paramyxoviridae科、Pneumovirus属のエンベロープ非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルス（enveloped non-segmented negative-strand RNA virus）である。それは、生誕後、最初の年の小児における、細気管支炎と肺炎の最も一般的な原因である。RSVはまた、あらゆる年齢、特に高齢者、又は心臓、肺、又は免疫系が不全である人々の間で発生し得る重度の下気道疾患などの反復感染を引き起こす。現在、受動免疫が、特に未熟児、気管支肺異形成症、又は先天性心疾患の乳幼児において、RSV感染によって引き起こされる重篤な病気を防ぐために用いられている。

【0003】

RSV細気管支炎の推奨される治療は、主に呼吸補助と水分補給とからなる。特定の抗ウイルス療法は推奨されていない。中和モノクローナル抗体パリビズマブは、重篤な感染のリスクが最も高い乳幼児の予防に使用されるが、非常に高価であり、広範な使用には実用的ではない。現在、認可／承認されたRSVワクチンはなく、安全で効果的なRSVワクチンの開発は、世界規模での公衆衛生の優先事項である。

【0004】

1960年代のワクチン試験では、乳幼児と小児を、ホルマリンで不活化された全ビリオンRSV製剤（FIRSV）又は同等のパラミクソウイルス製剤（FIPIV）で免疫感作した。FIPIVで免疫感作した後、次のRSVシーズン中にRSVに自然感染した被験者の5%が入院し、FIRSVで免疫感作した後、RSVに感染した被験者の80%が入院し、2名の小児が死亡した。ワクチン接種によるRSV感染の上昇は、RSV感染症に対するワクチン開発の具体的な問題である。

【0005】

したがって、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染症は、先進国において、未充足の幼児用ワクチンのニーズが最も大きく、世界的にも重要な未充足幼児用ワクチンのニーズがある。40年間を超える努力にもかかわらず、未だ、ヒトに対して認可されたRSVワクチンは得られていない。

【0006】

前記したヒト化モノクローナル抗体パリビズマブにもかかわらず、強力な免疫応答を誘発する生弱毒化ワクチンウイルスが開発されたが、特定の標的群（乳幼児、小児、高齢者、及び免疫不全患者）における使用は推奨されていない。また、B細胞エпитープを有するRSV Fタンパク質を発現するDNAベクターを使用して、中和抗体の産生を誘導した。この文脈において、特許文献1及び特許文献2は、ワクチンとしての使用のためのRSV Fタンパク質をコードするDNA配列を含むベクターを開示している。しかし、ワクチンとしてのDNAの使用は、ゲノムへの不所望の挿入により危険である場合があり、機能的な遺伝子の阻害や癌、又は抗DNA抗体の形成に至ることがある。

【0007】

特許文献3は、RSV抗原性ペプチドと、融合タンパク質F、糖タンパク質G、短い疎水性タンパク質SH、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、ラージポリメラーゼL、M2-1タンパク質、M2-2タンパク質、リンタンパク質P、非構造タンパク質NS1、又は非構造タンパク質NS2から選択されるタンパク質とをコードするRNA配列、及び皮内投与に適したプロタミン複合体化RNAを含む抗原性組成物を開示する。

【0008】

特許文献4は、RSV抗原性ペプチドと、糖タンパク質F及び糖タンパク質Gから選択されるタンパク質とをコードするRNAを含み、前記RNAが脂質ナノ粒子中にあるワクチンを開示する。

【0009】

上に引用した幾つかのアプローチとは別に、RSV感染症の予防又は治療のための効率的なワクチンに対する充足されていない医学的ニーズが依然として存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】国際公開第2008/077527号

【文献】国際公開第96/040945号

【文献】国際公開第2015/024668号

【文献】国際公開第2017/070622号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、RSVの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする新規人工RNA、及びRSV感染症のための予防又は治療、特に乳幼児、新生児、妊娠女性、高齢者、及び免疫不全患者における予防又は治療のためのワクチンとしての使用のための前記RNAを含む組成物／ワクチンを提供することが、根底にある発明の課題である。

【0012】

更に、RNAベースの組成物又はワクチンが以下の有利な特徴の幾つかを有することが望ましい。

- － 注射部位（例えば、筋肉など）でのRNA構築物の翻訳の改善
- － 非常に低用量の投与計画での、コードされた抗原性ペプチド又はタンパク質に対するRSV抗原特異的免疫応答の非常に効率的な誘導
- － 母体免疫感作に対する好適性
- － 乳幼児及び／又は新生児のワクチン接種に対する好適性
- － 筋肉内投与に対する好適性
- － RSV特異的な機能的体液性免疫応答の誘導
- － RSV特異的なB細胞記憶の誘導
- － RSVに対する免疫防御のより速い開始
- － RSVに対する誘導免疫応答の寿命
- － RSVに対する広範な細胞T細胞応答の誘導
- － （局所的及び一過性の）炎症誘発性環境の誘導
- － ワクチン適用後の全身性サイトカイン又はケモカイン応答の誘導がない
- － 十分な耐容性、副作用がない、無毒である
- － ワクチン接種によるRSV感染の増強がない
- － ワクチンの有利な安定性特性
- － RSVワクチン製造のスピード、適応性、簡便性、スケーラビリティ

【0013】

上に概説した課題は、特許請求する主題によって解決することができる。

【0014】

定義

明確さ及び読み易さのために、以下の定義を提供する。これらの定義について言及された技術的特徴は、本発明の各実施形態で読むことができる。これらの実施形態の文脈において、更なる定義及び説明が具体的に提供されることがある。

【0015】

数の文脈におけるパーセンテージは、各項目の総数に対するものとして理解されたい。他の場合、及び特段の断りがない限り、パーセンテージは重量パーセンテージ（wt. %）として理解されたい。

【0016】

適応免疫応答：本明細書で使用される「適応免疫応答」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、免疫系（適応免疫系）の抗原特異的応答を意味することが意図される。抗原特異性は、特定の病原体又は病原体に感染した細胞に合わせた応答の生成を可能にする。これらの調整された応答をもたらす能力は、通常、「記憶細胞」（B細胞）によって体内で維持される。本発明の文脈において、抗原は、少なくとも1つの抗原性ペ

プチド又はタンパク質をコードする人工RNAコード配列によって提供される。

【0017】

抗原：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及び理解され、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、抗原特異的免疫応答を、例えば、適応免疫応答の一部としての抗体及び／又は抗原特異的T細胞の生成によって誘発することができる物質を意味することが意図される。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又はタンパク質であり得る又は含み得る。また、例えば、少なくとも1つのエピトープを含むRSV Fタンパク質に由来するペプチド又はタンパク質の断片、バリエント、及び誘導体は、本発明の文脈において抗原と理解される。本発明の文脈において、抗原は、本明細書で特定される、提供された人工RNAの翻訳産物であり得る。

10

【0018】

抗原性ペプチド又はタンパク質：「抗原性ペプチド又はタンパク質」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、体の適応免疫系を刺激して適応免疫応答を提供し得る（抗原性）タンパク質／ポリタンパク質に由来するペプチド、タンパク質（又はポリタンパク質）を意味することが意図される。したがって、「抗原性ペプチド又はタンパク質」は、それが由来するタンパク質（例えば、本発明の文脈では、RSVペプチド又はタンパク質、好ましくはRSV Fタンパク質又はそのバリエント）の少なくとも1つのエピトープ（本明細書にて定義）又は抗原（本明細書にて定義）を含む。

【0019】

人工核酸：本明細書で使用される「人工核酸」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、天然に存在しない人工核酸を意味することが意図される。人工核酸は、DNA分子、RNA分子、又はDNA及びRNA部分を含むハイブリッド分子であり得る。典型的には、人工核酸は、ヌクレオチドの所望の人工配列（異種配列）に対応するように遺伝子工学的な方法によって設計及び／又は生成され得る。この文脈では、人工配列は、通常、天然には存在し得ない配列であり、即ち、野生型配列と少なくとも1つのヌクレオチドが異なる。本明細書で使用される「野生型」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、天然に存在する配列を意味することが意図される。更に、「人工核酸」という用語は、「1つの単一分子」を意味することに制限されず、典型的には、本質的に同一の分子の集合を含むと理解される。

20

30

【0020】

人工RNA：本明細書で使用される「人工RNA」という用語は、天然には存在しないRNAを意味することが意図される。換言すれば、人工RNAは非天然の核酸分子と理解され得る。そのようなRNA分子は、その個々の配列（これは天然には存在しない、例えば、G/C含量が改変されたコード配列、UTR）により、及び／又は他の改変、例えば天然には存在しないヌクレオチドの構造修飾により、非天然であり得る。典型的には、人工RNAは、ヌクレオチドの所望の人工配列（異種配列）に対応するように遺伝子工学的な方法によって設計及び／又は生成され得る。これに関連して、人工RNA配列は、通常、天然には存在し得ない配列であり、即ち、野生型配列とは少なくとも1ヌクレオチド異なる。「人工RNA」という用語は、「1つの単一分子」を意味することに制限されず、典型的には、本質的に同一の分子の集合を含むと理解される。したがって、それは、アリコート又はサンプルに含まれる複数種の本質的に同一のRNA分子に関し得る。本発明の文脈において、本発明のRNAは、本明細書で定義される人工RNAである。

40

【0021】

カチオン性：具体的な文脈から別の意味が明らかでない限り、「カチオン性」という用語は、それぞれの構造が、恒久的又は非恒久的に、pHなどの特定の条件に応じて正電荷を帯びていることを意味する。したがって、「カチオン性」という用語は、「恒久的にカチオン性である」及び「カチオン化可能である」の両方を包含する。

【0022】

カチオン化可能：本明細書で使用される「カチオン化可能」という用語は、化合物又は基

50

若しくは原子が、それが置かれた環境のより低い pH では正に帯電し、より高い pH では帯電しないことを意味する。また、pH 値を決定できない非水環境では、カチオン化可能な化合物、基、又は原子は、水素イオン濃度が高いと正に帯電し、水素イオン濃度又は水素イオン活量が低いと帯電しない。それは、カチオン化可能又はポリカチオン化可能化合物の個々の特性、特に、それぞれのカチオン化可能基又は原子の pK_a に依存し、その pH 又は水素イオン濃度で、それは帯電又は非帯電である。希釈された水性環境では、正電荷を有するカチオン化可能な化合物、基、又は原子の割合は、当業者に周知のいわゆるヘンダーソン-ハッセルバルヒ方程式を使用して推定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、化合物又は部分がカチオン化可能である場合、それは、約 1~9、好ましくは 4~9、5~8、又は更に 6~8、より好ましくは、9 未満、8 未満、7 未満の pH 値、最も好ましくは生理学的 pH 値、例えば約 7.3~7.4、即ち生理学的条件下、特にインビボでの細胞の生理学的塩条件下で正に帯電することが好ましい。他の実施形態では、カチオン化可能な化合物又は部分は、生理学的 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。いくつかの実施形態では、カチオン化可能な化合物又は部分の pK_a の好ましい範囲は、約 5~約 7 である。

【0023】

コード配列／コード領域：本明細書で使用される「コード配列」又は「コード領域」という用語及び対応する略称「cds」は、当業者によって認識及び理解され、例えば、ペプチド又はタンパク質に翻訳される得るいくつかのヌクレオチドトリプレットの配列を意味することが意図される。本発明の文脈におけるコード配列は、開始コドンで始まり、好ましくは終止コドンで終結する、3 で除することができるいくつかのヌクレオチドからなる RNA 配列であることが好ましい。

【0024】

組成物：本発明の文脈において、「組成物」は、特定の成分（例えば、LNP と会合する本発明の人工 RNA）が、任意の更なる構成成分、通常、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体又は賦形剤と共に含有され得る任意のタイプの組成物を意味する。したがって、組成物は、粉末又は顆粒などの乾燥組成物、又は凍結乾燥形態又は錠剤などの固体単位であってよい。或いは、組成物は液体形態であってもよく、各構成成分は、溶解又は分散した（例えば、懸濁又は乳化した）形態で独立して含有されてもよい。

【0025】

化合物：本明細書で使用されるとき、「化合物」は、本質的に同一の化学構造及び性質を有する分子からなる材料である化学物質を意味する。低分子化合物の場合、分子は通常、それらの原子組成及び構造配置が同一である。高分子又は高分子化合物の場合、化合物の分子は非常に類似しているが、それらの全てが必ずしも同一ではない。例えば、50 個のモノマー単位からなると記述されたポリマーのセグメントは、例えば、48 個又は 53 個のモノマー単位で個々の分子を含むこともある。

【0026】

由来する：核酸に関連して本明細書全体で使用される用語「由来する」、即ち、（別の）核酸に「由来」の核酸について、（別の）核酸に由来する核酸は、それが由来する核酸と、少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 55%、好ましくは少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 65%、好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、より好ましくは少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、更により好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、更により好ましくは少なくとも 95%、96%、97%、特に好ましくは少なくとも 98%、99% の配列同一性を共有する。当業者は、配列同一性が、典型的には、同一タイプの核酸について、即ち、DNA 配列又は RNA 配列について計算されることを理解している。したがって、DNA が RNA に「由来する」場合、又は RNA が DNA に「由来する」場合、第 1 の工程で、RNA 配列を対応する DNA 配列に変換する（特に、配列全体において、ウラシル（U）をチミジン（T）で

置換する）、又は反対に、DNA配列を対応するRNA配列に変換する（特に、配列全体において、チミジン（T）をウラシル（U）で置換する）。その後、DNA配列の配列同一性又はRNA配列の配列同一性が決定される。好ましくは、核酸に「由来する」核酸は、それが由来する核酸と比較して、例えば、RNAの安定性を更に向上させるために、及び／又はタンパク質産生を延長及び／又は増加させるために、修飾されている核酸も意味する。言うまでもなく、そのような修飾は、それが由来する核酸と比較して、RNAの安定性を損なわないことが好ましい。アミノ酸配列（例えば、抗原性ペプチド又はタンパク質）の文脈において、「由来する」という用語は、（別の）アミノ酸配列（例えば、RSV Fタンパク質）に由来するアミノ酸配列が、それが由来するアミノ酸配列と、少なくとも50%、好ましくは少なくとも55%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、より好ましくは少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、更により好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、更により好ましくは少なくとも95%、96%、97%、特に好ましくは少なくとも98%、99%の配列同一性を共有することを意味する。

【0027】

したがって、抗原性ペプチド又はタンパク質がRSV融合（F）タンパク質に「由来する」場合、前記RSV Fタンパク質に「由来する」抗原性ペプチド又はタンパク質は、RSV Fタンパク質のバリエーション又は断片、例えば、F0（完全長前駆体）、F-del、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3（本明細書にて記載）を表し得ることが理解される。更に、前記RSV Fタンパク質に「由来する」抗原性ペプチド又はタンパク質（例えば、F0、F-del、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3）は、上で定義されるように、アミノ酸配列が異なることがあり、特定の同一性パーセンテージを共有する。抗原性ペプチド又はタンパク質が「由来する」ことがあるRSV Fタンパク質の好適な更なる例を表1に示す。

【0028】

エピトープ：本明細書で使用する「エピトープ」（当技術分野では「抗原決定基」とも呼ばれる）という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、T細胞エピトープ及びB細胞エピトープを意味することが意図される。抗原性ペプチド又はタンパク質のT細胞エピトープ又は一部は、好ましくは約6～約20、更にはそれ以上のアミノ酸の長さを有する断片、例えば、MHCクラスI分子によって処理及び提示された断片であり、好ましくは約8～約10、例えば、8、9、又は10アミノ酸（更には11又は12アミノ酸）、又はMHCクラスII分子によって処理及び提示された断片であり、好ましくは約13～約20、更にはそれ以上のアミノ酸の長さを有する断片（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）を含み得る。これらの断片は通常、ペプチド断片とMHC分子からなる複合体の形でT細胞によって認識される。即ち、断片は通常、ネイティブな形で認識されない。B細胞エピトープは、典型的には（ネイティブ）タンパク質又はペプチド抗原の外表面に位置する断片であり、好ましくは5～15アミノ酸、より好ましくは5～12アミノ酸、更により好ましくは6～9アミノ酸を有し、抗体によって認識され得る（即ち、ネイティブな形態である）。タンパク質又はペプチドのそのようなエピトープは更に、そのようなタンパク質又はペプチドの本明細書中に言及されるバリエーションのいずれかから選択することができる。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又はペプチドのアミノ酸配列において不連続であるが、三次元構造においては同一部分を形成する、本明細書に定義されるタンパク質又はペプチドのセグメントから構成される立体配座又は不連続エピトープであることができる、又は単一のポリ

ペプチド鎖から構成される連続的又は線形のエピトープであることができる。本発明の文脈において、エピトープは、本明細書で特定されるように、提供される人工RNAの翻訳産物であり得る。

【0029】

断片：核酸配列又はアミノ酸配列の文脈において本明細書全体で使用される「断片」という用語は、典型的には、例えば、核酸配列又はアミノ酸配列の完全長配列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、完全長配列内の対応する一続きと同一である配列からなる。本発明の文脈における配列の好ましい断片は、断片が由来する分子中のエンティティの連続する一続きに対応するヌクレオチド又はアミノ酸などのエンティティの連続する一続きからなり、断片が由来する全（即ち、完全長）分子（例えば、RSVFタンパク質）の少なくとも5%、10%、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%、更により好ましくは少なくとも60%、更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。タンパク質又はペプチドに関連して本明細書全体で使用される「断片」という用語は、通常、本明細書に定義されるタンパク質又はペプチドの配列を含むことができ、これは、元の（ネイティブの）タンパク質（又はそのコードされた核酸分子）のアミノ酸配列と比較して、N末端及び／又はC末端がトランケートされた、そのアミノ酸配列（又はそのコードされた核酸分子）に関するものである。したがって、そのようなトランケーションは、アミノ酸レベル又は対応する核酸レベルのいずれかで起こり得る。したがって、本明細書で定義されるそのような断片に関する配列同一性は、好ましくは、本明細書で定義されるタンパク質又はペプチド全体、又はそのようなタンパク質又はペプチドの（コード）核酸分子全体をに言及し得る。抗原との関連で、そのような断片は、約6～約20、又はそれ以上のアミノ酸の長さを有し得る。例えば、MHCクラスI分子によって処理及び提示された断片であり、好ましくは約8～約10アミノ酸の長さ、例えば、8、9、又は10アミノ酸（又は6、7、11、又は12アミノ酸）の長さを有する、又はMHCクラスII分子によって処理及び提示された断片であり、好ましくは約13以上のアミノ酸の長さ、例えば、13、14、15、16、17、18、19、20、又はそれ以上のアミノ酸の長さを有する。これらの断片は、アミノ酸配列の任意の部分から選択することができる。これらの断片は、通常、ペプチド断片とMHC分子とからなる複合体の形態でT細胞によって認識される。即ち、断片は、通常、ネイティブの形態では認識されない。タンパク質又はペプチドの断片（例えば、抗原の文脈における）は、それらのタンパク質又はペプチドの少なくとも1つのエピトープを含み得る。更にまた、細胞外ドメイン、細胞内ドメイン、又は膜貫通ドメインなどのタンパク質のドメイン、及びタンパク質の短縮された又はトランケートされたバージョンは、タンパク質の断片を含むと理解することができる。

【0030】

異種：核酸配列又はアミノ酸配列の文脈において本明細書全体で使用される「異種」又は「異種配列」という用語は、配列（例えば、DNA、RNA、アミノ酸）を意味することが当業者によって認識及び理解され、別の遺伝子、別の対立遺伝子、別の種に由来する配列を意味することが意図される。2つの配列が同一遺伝子又は同一対立遺伝子に由来することができない場合、これらは、通常、「異種」であると理解される。即ち、異種配列は、同一生物から由来可能であり得るが、それらは天然に（自然界において）同一核酸分子（例えば、同一RNA）又は同一タンパク質内には存在しない。

【0031】

体液性免疫応答：「体液性免疫」又は「体液性免疫応答」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、B細胞媒介性抗体産生及び任意に抗体産生に伴う付随プロセスを意味することが意図される。体液性免疫応答は、典型的には、例えば、Th2活性化とサイトカイン産生、胚中心形成とアイソタイプスイッチング、親和性成熟と記憶細胞生成などによって特徴付けることができる。体液性免疫はまた、典型的には、病原体及び毒素の中和、古典的な補体活性化、並びに食作用及び病原体排除のオプソニン促進を含む、

抗体のエフェクター機能を意味し得る。

【0032】

（配列の）同一性：核酸配列又はアミノ酸配列の文脈において本明細書全体を通して使用される「同一性」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、2つの配列が同一であるパーセンテージを意味することが意図される。2つの配列、例えば、本明細書で定義される核酸配列又はアミノ酸配列、好ましくは本明細書で定義される人工核酸配列によってコードされるアミノ酸配列又はアミノ酸配列それ自体が同一であるパーセンテージを決定するために、前記配列を、後に互いに比較するためにアラインメントさせることができる。したがって、例えば、第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と比較され得る。第1の配列のある位置が、第2の配列のある位置における場合と同一コンポーネント（残基）で占有されている場合、2つの配列はこの位置で同一である。そうではない場合、配列はこの位置で異なる。第1の配列と比較して第2の配列に挿入が生じた場合、第1の配列にギャップを挿入して、更なるアラインメントを行うことができる。第1の配列と比較して第2の配列に欠失が生じた場合、第2の配列にギャップを挿入して、更なるアラインメントを行うことができる。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つの配列においてのみ占有される位置を含む位置の総数で除する関数である。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できる。使用できる数学的アルゴリズムの好ましいが限定されない例は、BLASTプログラムに統合されたアルゴリズムである。このプログラムにより、本発明の配列とある程度同一である配列を同定することができる。

10

20

【0033】

免疫原、免疫原性：「免疫原」又は「免疫原性」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、免疫応答を刺激／誘導することができる化合物を意味することが意図される。好ましくは、免疫原は、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質である。本発明の意味における免疫原は、本明細書で定義されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド、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、提供される人工核酸、好ましくはRNAの翻訳産物である。通常、免疫原は、適応免疫応答を誘導する。

【0034】

免疫応答：「免疫応答」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、特定の抗原に対する適応免疫系の特異的反応（いわゆる特異的又は適応的免疫応答）、自然免疫系の非特異的反応（いわゆる非特異的又は自然免疫応答）、又はそれらの組合せを意味することが意図される。

30

【0035】

免疫系：「免疫系」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、生物を感染から保護し得る生物の系を意味することが意図される。病原体が生物の物理的障壁を通過することに成功し、この生物に侵入すると、自然免疫系は、即時では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ても、脊椎動物は第2の保護層である適応免疫系を有する。ここで、免疫系は感染中にその応答に適応して、病原体の認識を改善する。次いで、この改善された応答は、病原体が排除された後も免疫学的記憶の形態で保持され、この病原体に遭遇するたびに適応免疫系がより速くより強力な攻撃を開始できるようにする。これによれば、免疫系は、自然免疫系と適応免疫系を含む。これらの2つの部分のそれぞれは、通常、いわゆる体液性成分と細胞性成分とを含む。

40

【0036】

自然免疫系：「自然免疫系」（非特異的（non-specific）又は非特異的（unspecific）免疫系としても知られる）という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、典型的には、他の生物による感染から宿主を非特異的に防御する細胞とメカニズムを含む系を意味することが意図される。これは、自然な系の細胞が病原体を広く認識して応答することができることを意味するが、適応免疫系とは異なり、長期間続く防御免疫を宿主に付与しない。自然免疫系は、例えば、Toll様受容体（TLR）の

50

リガンド、又はリポ多糖、 $TNF-\alpha$ 、CD40リガンド、又はサイトカイン、モノカイン、リンホカイン、インターロイキン、又はケモカイン、 $IL-1\sim IL-33$ 、 $IFN-\alpha$ 、 $IFN-\beta$ 、 $IFN-\gamma$ 、 $GM-CSF$ 、 $G-CSF$ 、 $M-CSF$ 、 $LT-\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、成長因子、及びhGH、ヒトToll様受容体のリガンド（例えば、 $TLR1\sim TLR10$ ）、マウスToll様受容体のリガンド（例えば、 $TLR1\sim TLR13$ ）、NOD様受容体のリガンド、RIG-I様受容体のリガンド、免疫刺激性核酸、免疫刺激性RNA（isRNA）、CpG-DNA、抗菌剤、又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。

【0037】

リピドイド化合物：リピドイド化合物（単にリピドイドとも呼ばれる）は、脂質様化合物、即ち、脂質様物理的性質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、リピドイド化合物を包含すると考える。

10

【0038】

一価ワクチン、一価組成物：「一価（monovalent）ワクチン」、「一価（monovalent）組成物」、「一価（univalent）ワクチン」、又は「一価（univalent）組成物」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、ウイルス由来の1つの抗原のみを含む組成物又はワクチンを意味することが意図される。したがって、前記ワクチン又は組成物は、単一の生物に対する単一の抗原をコードする唯一のRNA種を含む。「一価ワクチン」という用語は、一価に対する免疫化を含む。本発明の文脈において、一価のRSVワクチン又は組成物は、1つの特定のRSV（例えば、RSV F）に由来する1つの単一の抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする人工RNAを含む。

20

【0039】

核酸：「核酸」又は「核酸分子」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、核酸成分を含む、好ましくは核酸成分からなる分子を意味することが意図される。核酸分子という用語は、好ましくはDNA又はRNA分子を意味する。これは、ポリヌクレオチドという用語と同義に使用されることが好ましい。好ましくは、核酸又は核酸分子は、ヌクレオチドモノマーを含む又はからなるポリマーであり、糖／リン酸骨格のホスホジエステル結合によって互いに共有結合されている。「核酸分子」という用語は、本明細書で定義される、塩基修飾、糖修飾、又は骨格修飾されたDNA又はRNA分子などの修飾された核酸分子も包含する。

30

【0040】

核酸配列／RNA配列／アミノ酸配列：「核酸配列」、「RNA配列」、又は「アミノ酸配列」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、それぞれ、そのヌクレオチド又はアミノ酸の連続する特定且つ個別の順序を意味することが意図される。

【0041】

恒久的カチオン性：本明細書で使用される「恒久的カチオン性」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、それぞれの化合物又は基若しくは原子が任意のpH値又はそれが置かれた環境の水素イオン活量で正に帯電していることを意味する。通常、正帯電は、4級窒素原子の存在に起因する。化合物が複数のそのような正電荷を有するとき、それを、恒久的カチオン性のサブカテゴリである恒久的ポリカチオン性と呼ぶことがある。

40

【0042】

薬学的有効量：「薬学的有効量」又は「有効量」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、薬学的効果、本発明の文脈においては免疫応答（例えば、本明細書で定義される抗原性ペプチド、タンパク質、ポリタンパク質に対する）などを誘導するのに十分である化合物（例えば、本発明の人工RNA）の量を意味することが意図される。

【0043】

多価（Polyvalent）／多価（multivalent）ワクチン、多価／多価組成物：「多価（polyvalent）ワクチン」、「多価（polyvalent）

50

組成物」、「多価（multivalent）ワクチン」、又は「多価（multivalent）組成物」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、ウイルスの1種超の株に由来する抗原を含む組成物又はワクチン、同一ウイルスの異なる抗原を含む組成物又はワクチン、又はそれらの任意の組合せを意味することが意図される。これらの用語は、前記ワクチン又は組成物が1超の価数を有することを記述する。本発明の文脈において、多価RSVワクチンは、いくつかの異なるRSV株に由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする人工RNAを含むワクチン、同一RSV株由来の異なる抗原をコードする人工RNAを含むワクチン、又はそれらの組合せを含む。好ましい実施形態では、多価RSVワクチン又は組成物は、RSVの少なくとも1つの異なる抗原性ペプチド又はタンパク質（例えば、RSV F及びRSV M又はRSV F及びRSV N）をコードする1超、好ましくは2、3、4、又はそれ以上の異なる人工RNA種を含む。多価mRNAワクチンを製造する方法は、PCT出願PCT/EP2016/082487又は公開された国際公開第2017/1090134A1号に開示されている。

【0044】

「安定化された核酸分子」又は「安定化されたRNA」：「安定化された核酸分子」又は「安定化されたRNA」という用語は、環境要因又は酵素消化（例えば、エキソ又はエンドヌクレアーゼ分解など）による崩壊又は分解に対して、修飾されていない核酸分子よりも安定であるように修飾された核酸分子、好ましくはRNA分子を意味する。本発明の文脈において、好ましくは安定化された核酸分子、例えば安定化されたRNAは、原核細胞又は真核細胞などの細胞中で、好ましくはヒト細胞などの哺乳動物細胞中で安定化される。安定化効果は、細胞外、例えば緩衝溶液などにおいて、例えば、安定化された核酸分子を含む医薬組成物の製造プロセスにおいても発揮されることがある。

【0045】

T細胞応答：本明細書で使用される「細胞性免疫」又は「細胞性免疫応答」又は「細胞性T細胞応答」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、抗原に対する、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、及び各種サイトカインの放出を意味することが意図される。より一般的に言えば、細胞性免疫は抗体ではなく、免疫系の細胞の活性化に基づく。典型的には、細胞性免疫応答は、例えば、細胞、例えば、外来抗原のエピトープをその表面に提示する、樹状細胞又は他の細胞のような特定の免疫細胞などに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により、特徴付けることができる。本発明の文脈において、抗原は、RSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、好適にT細胞応答を誘導する人工RNAによって提供される。本発明の人工RNA、組成物、ワクチンは、RSV F抗原に対する細胞T細胞応答の誘発に有利である。

【0046】

（配列の）バリエーション：核酸配列の文脈において本明細書全体で使用される「バリエーション」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、核酸配列の基礎を形成する核酸配列のバリエーションを意味することが意図される。例えば、バリエーション核酸配列は、バリエーションが由来する核酸配列と比較して、1以上のヌクレオチドの欠失、挿入、付加、及び／又は置換を伴い得る。好ましくは、核酸配列のバリエーションは、バリエーションが由来する核酸配列と、少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、更により好ましくは少なくとも80%、更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%同一である。好ましくは、バリエーションは機能的バリエーションである。核酸配列の「バリエーション」は、そのような核酸配列の10、20、30、50、75、又は100個の一続きのヌクレオチドに亘って、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%のヌクレオチド同一性を有してもよい。

【0047】

タンパク質又はペプチドに関して本明細書全体で使用される「バリエーション」という用語

は、当業者によって認識及び理解され、例えば、1以上の置換、挿入、及び／又は欠失されたアミノ酸など1以上変異において、元の配列と異なるアミノ酸配列を有するタンパク質又はペプチドバリエーションを意味することが意図される。好ましくは、これらの断片及び／又はバリエーションは、完全長ネイティブタンパク質と比較して、例えば、その特異的抗原特性など、同一の生物学的機能又は特異的活性を有する。本発明の文脈で定義されるタンパク質又はペプチドの「バリエーション」は、それらのネイティブの配列、即ち変異していない生理学的な配列と比較して、保存的アミノ酸置換を含み得る。それらのアミノ酸配列及びそれらをコードするヌクレオチド配列は、特に、本明細書で定義されるバリエーションという用語に該当する。同一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、正又は負に帯電した側鎖、側鎖又はアミノ酸中の芳香族基を有するアミノ酸であり、その側鎖は、水素結合に入ることができる、例えば、ヒドロキシル機能を有する側鎖である。このことは、例えば極性側鎖を有するアミノ酸は、同様に極性側鎖を有する別のアミノ酸で置換される、又は、例えば、疎水性側鎖を特徴とするアミノ酸は、同様に疎水性側鎖を有する別のアミノ酸で置換される（例えば、セリン（スレオニン）をトレオニン（セリン）で置換する、又はロイシン（イソロイシン）をイソロイシン（ロイシン）で置換する）。挿入及び置換は、特に、三次元構造に変化を引き起こさない、又は結合領域に影響を及ぼさない配列位置で行うことができる。挿入又は欠失による3次元構造に対する変化は、例えば、CDスペクトル（円偏光二色性スペクトル）を使用して容易に決定できる。タンパク質又はペプチドの「バリエーション」は、そのようなタンパク質又はペプチドの10、20、30、50、75、又は100個のアミノ酸の一続きに亘って、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有することができる。好ましくは、タンパク質のバリエーションは、タンパク質の機能的バリエーションを含み、これは、バリエーションが、それが由来するタンパク質と同一の効果又は機能性を発揮することを意味する。

【0048】

3' - 非翻訳領域、3' - UTRエレメント、3' - UTR 3' - 非翻訳領域又は「3' - UTRエレメント」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、コード配列の3'（即ち、「下流」）に位置し、典型的にはタンパク質に翻訳されない核酸分子の一部を意味することが意図される。通常、3' - UTRは、mRNAのコード配列（cds）とポリ（A）配列との間に位置するmRNAの一部である。本発明の文脈において、3' - UTRという用語はまた、人工RNAが転写されるDNAテンプレートにコードされないが、成熟中の転写後に付加されるポリ（A）配列などのエレメントを含んでもよい。

【0049】

5' - 非翻訳領域、5' - UTRエレメント、5' - UTR 5' - 非翻訳領域（5' - UTR）という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、コード配列の5'（即ち、「上流」）に位置し、タンパク質に翻訳されない核酸分子の一部を意味することが意図される。5' - UTRは、通常、メッセンジャーRNA（mRNA）のコード配列の5'に位置するmRNAの特定のセクションであると理解される。通常、5' - UTRは転写開始部位で始まり、コード配列の開始コドンの1ヌクレオチド前で終わる。好ましくは、5' - UTRは、20、30、40、又は50ヌクレオチドを超える長さを有する。5' - UTRは、遺伝子発現を制御するためのエレメントを含むことがあり、これは調節エレメントとも呼ばれる。そのような調節エレメントは、例えば、リボソーム結合部位であり得る。5' - UTRは、例えば、5' キャップの付加によって、転写後に修飾することができる。

【0050】

5' - 末端オリゴピリミジントラクト（TOP）、TOP-UTR：「5' - 末端オリゴピリミジントラクト（TOP）」という用語は、核酸分子の5' - 末端領域、例えば、特定のmRNA分子の5' - 末端領域又は特定の遺伝子の機能的エンティティ（例えば、転写領域）の5' - 末端領域などに位置するピリミジンヌクレオチドの一続きとして理解されるべきである。この配列は、通常、転写開始部位に対応するシチジンで始まり、通常は約3～30個の一続きのピリミジンヌクレオチドが続く。例えば、TOPは、3～30個又はそれ

以上のヌクレオチドを含み得る。一続きのピリミジン、即ち、5' - TOP は、TOP の下流にある最初のプリンヌクレオチドの5' 側の1ヌクレオチドで終わる。5' - 末端オリゴピリミジントラクトを含むメッセンジャーRNAは、TOP mRNAと呼ばれることが多い。したがって、そ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 モチーフ」又は「5' - TOP モチーフ」という用語は、上で定義した5' - TOP に対応する核酸配列として理解すべきである。したがって、本発明の文脈におけるTOP モチーフは、好ましくは、3 ~ 30ヌクレオチドの長さを有する一続きのピリミジンヌクレオチドである。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、一続きのピリミジンヌクレオチドは、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 遺伝子及びTOP mRNAでは、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、前記遺伝子又はmRNAの最初のプリン残基の5' 側の1ヌクレオチドで終わる。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、又は5' - UTRをコードする配列の5' - 末端に位置する。したがって、好ましくは、3個以上のピリミジンヌクレオチドの一続きは、この一続きが、人工核酸、人工核酸の5' - UTRエレメント、又は本明細書に記載のTOP 遺伝子の5' - UTRに由来する核酸配列などの各配列の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。換言すると、好ましくは、5' - UTR又は5' - UTRエレメントの5' - 末端ではなく、5' - UTR又は5' - UTRエレメントの内部に位置する3個以上のピリミジンヌクレオチドの一続きは、「TOP モチーフ」と呼ばれない。いくつかの実施形態では、TOP 遺伝子の5' - UTRに由来する5' - UTRエレメントの核酸配列は、その3' - 末端において、それが由来する遺伝子又はRNAの開始コドン（例えば、A (U/T) G）の上流の1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の位置にあるヌクレオチドで終わる。したがって、5' - UTRエレメントは、タンパク質コード配列のいかなる部分も含まない。したがって、好ましくは、少なくとも1つの核酸配列、特にRNA配列のタンパク質コード部分は、コード配列によってのみ提供される。

【0051】

発明の簡単な説明

本発明は、本発明の人工RNAによってコードされる呼吸器合胞体ウイルス（RSV）Fタンパク質に由来する少なくとも1つのペプチド又はタンパク質が、哺乳動物細胞において効率的に発現され得るという本発明者の驚くべき知見に基づく。更に予想外なことには、本発明者らは、本発明の人工RNAが、例えば、特異的な機能的及び防御の免疫応答をコットンラットにおいて誘導できることを示した（例えば、実施例2、3を参照）。RSV F抗原設計の様々な最適化により、免疫応答を更に改善することができた。更に、好適な異種5' 非翻訳領域（UTR）と好適な異種3' 非翻訳領域（UTR）を選択することにより、人工核酸RNAによってコードされるRSV F抗原の発現を上昇させることができた（例えば、実施例4を参照）。有利なことに、有利な3' - UTR / 5' - UTRの組合せを含む本発明の前記人工RNAは、コードされたRSV Fに対する非常に効率的な抗原特異的免疫応答を誘導する。更に、脂質ナノ粒子（LNP）に含有される本発明の人工RNAは、非常に低い用量の投与計画でRSV Fに対する抗原特異的免疫応答を非常に効率的に誘導する（例えば、実施例3を参照）。更に、例えば、実施例8及び実施例12は、更なる抗原をコードする更なる人工RNAを含む組成物／ワクチンを提供し、更なる抗原をコードする前記人工RNAは、T細胞応答を好適に誘導又は増強し、Th1バイアス免疫応答をもたらし、これは、潜在的なRSVワクチンの重要な前提条件（Th2バイアス応答は、動物モデルにおいて呼吸器疾患の亢進（ERD）と関連している）であると考えられる。更に、組成物は、T細胞応答を誘導するのに適している。したがって、人工RNA、及び本発明の前記人工RNAを含む組成物／ワクチンは、哺乳動物対象に

において RSV F に対する免疫応答を誘発するのに適している。したがって、人工 RNA 及び前記人工 RNA を含む組成物／ワクチンは、ワクチンとしての使用、例えば、ヒトのワクチンとしての使用、例えば、妊娠女性又は乳幼児のためのワクチンとしての使用に適している。

【0052】

第1の態様では、本発明は、少なくとも1つの5'非翻訳領域(UTR)及び／又は少なくとも1つの3'非翻訳領域(UTR)と、前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結され、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド若しくはタンパク質又はその断片若しくはバリエントをコードする少なくとも1つのコード配列とを含む人工核酸、好ましくは人工RNAを提供する。

10

【0053】

好ましい実施形態においては、前記人工RNAは、ALB7遺伝子、アルファグロビン遺伝子、PSMB3、CASP1、COX6B1、GNAS、NDUFA1、及びRPS9から選択される遺伝子の3'-UTR、又はこれらの遺伝子のいずれかのホモログ、断片、又はバリエントに由来する少なくとも1つの核酸配列を含む。

【0054】

好ましい実施形態においては、前記人工RNAは、RPL32遺伝子、HSD17B4、ASAH1、ATP5A1、MP68、NDUFA4、NOSIP、RPL31、SLC7A3、TUBB4B、及びUBQLN2から選択される遺伝子の5'-UTR、又はこれらの遺伝子のいずれかのホモログ、断片、又はバリエントに由来する少なくとも1つの核酸配列を含む。

20

【0055】

好適には、本発明の人工RNAは、a-1(HSD17B4/PSMB3)、a-2(Ndufa4/PSMB3)、a-3(SLC7A3/PSMB3)、a-4(NOSIP/PSMB3)、a-5(MP68/PSMB3)、b-1(UBQLN2/RPS9)、b-2(ASAH1/RPS9)、b-3(HSD17B4/RPS9)、b-4(HSD17B4/CASP1)、b-5(NOSIP/COX6B1)、c-1(NDUFA4/RPS9)、c-2(NOSIP/NDUFA1)、c-3(NDUFA4/COX6B1)、c-4(NDUFA4/NDUFA1)、c-5(ATP5A1/PSMB3)、d-1(RPL31/PSMB3)、d-2(ATP5A1/CASP1)、d-3(SLC7A3/GNAS)、d-4(HSD17B4/NDUFA1)、d-5(SLC7A3/Ndufa1)、e-1(TUBB4B/RPS9)、e-2(RPL31/RPS9)、e-3(MP68/RPS9)、e-4(NOSIP/RPS9)、e-5(ATP5A1/RPS9)、e-6(ATP5A1/COX6B1)、f-1(ATP5A1/GNAS)、f-2(ATP5A1/NDUFA1)、f-3(HSD17B4/COX6B1)、f-4(HSD17B4/GNAS)、f-5(MP68/COX6B1)、g-1(MP68/NDUFA1)、g-2(NDUFA4/CASP1)、g-3(NDUFA4/GNAS)、g-4(NOSIP/CASP1)、g-5(RPL31/CASP1)、h-1(RPL31/COX6B1)、h-2(RPL31/GNAS)、h-3(RPL31/NDUFA1)、h-4(SLC7A3/CASP1)、h-5(SLC7A3/COX6B1)、i-1(SLC7A3/RPS9)、i-2(RPL32/ALB7)、又はi-3(α -グロビン遺伝子)から選択される3'-UTR及び5'-UTRに機能可能に連結されるRSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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み、a-1(HSD17B4/PSMB3)、a-4(NDUFA4/PSMB3)、c-1(NDUFA4/RPS9)、e-4(NOSIP/RPS9)、g-2(NDUFA4/CASP1)、i-2(RPL32/ALB7)、又はi-3(アルファグロビン)が特に好ましい。

30

40

【0056】

RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、

50

完全長Fタンパク質（「F0」、aa 1-574と呼ばれる）又はC末端を欠失させたFタンパク質（「F-del」、aa 1-553）、又はその断片若しくはバリエーションであることができる。

【0057】

少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、コンフォメーション前状態（pre-conformation state）／融合前コンフォメーション（pre-fusion conformation）で、抗原又はその断片若しくはバリエーション又は機能的バリエーション（「DSCav1」、例えば、「F0_DSCav1」又は「F-del_DSCav1」と呼ばれる）を安定化させる変異、好ましくはDSCav1変異（S155C、S290C、S190F、及びV207L）を更に含むことができる。

10

【0058】

少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、タンパク質の安定性を高めるためにリンカー（GS）を介して結合された、成熟Fの2個のサブユニットF1及びF2を1本の鎖に含む融合タンパク質（F（1-103）-GS-F（145-574）；F（1-103）-GS-F（145-553））であることができる。

【0059】

成熟Fの2個のサブユニットを1本の鎖に含むタンパク質（「F2-リンカー-F1」と呼ばれる）、例えば、（F（1-103）-GS-F（145-574）；F（1-103）-GS-F（145-553））は、DSCav1変異（本明細書では「mut0」と呼ばれる）を更に含むことができる。

20

【0060】

成熟Fの2個のサブユニットを1本の鎖に含むタンパク質（「F2-リンカー-F1」と呼ぶ）は、DSCav1変異に加えて、プロトマー間ジスルフィド結合を促進する少なくとも1つの更なる変異を含むことができ、これらの変異は、（S46G、A149C、S215P、Y458C、K465Q；本明細書では、「mut1」と呼ぶ）、（S46G、E92D、A149C、S215P、Y458C、K465Q；本明細書では、「mut2」と呼ぶ）、又は（S46G、N67I、E92D、A149C、S215P、Y458C、K465Q；本明細書では、「mut3」と呼ぶ）、（A149C、Y458C；本明細書では、「mut4」と呼ぶ）、（N183GC、N428C；本明細書では、「mut5」と呼ぶ）、（Q98C、Q361C、S46G、E92D、L95M、S215P、I217P、I221M、R429K、K465Q；本明細書では、「mut6」と呼ぶ）、（Q98C、Q361C、L95M、I221M、R429K、本明細書中では、「mut7」と呼ぶ）、又は（N183GC、N428C、S46G、N67I、E92D、S215P、K465Q；本明細書では、「mut8」と呼ぶ）又はその断片若しくはバリエーション、又は機能的バリエーションから選択することができる。

30

【0061】

本発明の人工RNAによってコードされるRSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、F0、F-del、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut8、F-del_DSCav1_mut0から好ましく選択することができる。

40

【0062】

少なくとも1つのコード配列は、配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540

50

、7909、8279～9683、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475のいずれか又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一であるアミノ酸配列又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列の少なくとも1つをコードすることができる。

【0063】

好ましくは、人工RNAは、配列番号69～77、484～492、899～906、1268～1275、1637～1644、2006～2013、2375～2382、2744～2751、3113～3120、3482～3489、3851～3858、4220～4227、4589～4596、4958～4965、5327～5334、5696～5703、6065～6072、6434～6441、6803～6810、7172～7179、7541～7548、7910～7917、21363～21384、11727～11734、12096～12103、12465～12472、12834～12841、13941～13948、14310～14317、14679～14686、15048～15055、15417～15424、15786～15793、13203～13210、13572～13579、16155～16162、16524～16531、16893～16900、17262～17269、17631～17638、18000～18007、18369～18376、18738～18745、19107～19114、19476～19483、21389～21410のいずれか又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一であるコード配列又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコード配列を含むことができる。

【0064】

人工RNAは、C最大化コード配列、CAI最大化コード配列、ヒトコドン使用適合理化コード配列、G/C含量改変コード配列、及びG/C最適化コード配列、又はそれらの任意の組合せから選択されるコドン改変コード配列を含むことができる。

【0065】

人工RNAは、mRNA、ウイルスRNA、自己複製RNA、環状RNA、又はレプリコンRNAであることができる。好ましい実施形態では、人工RNAは、mRNAである。

【0066】

人工RNA、好ましくはmRNAは、キャップ構造、ポリ(A)配列、ポリ(C)配列、ヒストンステムループ、及び／又は3'-末端配列エレメントから選択される少なくとも1つを更に含むことができる。

【0067】

本発明の人工RNAは、好ましくは、下記からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる：配列番号78～482、11735～12094、21415～21417、21561～21563、21489、21490、21635、21636又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエーション(F0をコードする)、配列番号493～897、12104～12463、21418～21420、21564～21566、21491、21492、21637、21638又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエーション(Fidelをコードする)、配列番号907～1266、12473～12832、21421～21423、21567～21569、21493～21495、21639～21641又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエーション(F0_DScav1をコードする)、配列番号1276～1635、8278、1

2 8 4 2 ~ 1 3 2 0 1、2 1 4 2 4 ~ 2 1 4 2 6、2 1 5 7 0 ~ 2 1 5 7 2、2 1 4 9 6
~ 2 1 4 9 8、2 1 6 4 2 ~ 2 1 6 4 4又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント
(F - d e l _ D S C a v 1をコードする)、配列番号1 6 4 5 ~ 2 0 0 4、1 3 9 4 9
~ 1 4 3 0 8、2 1 4 3 3 ~ 2 1 4 3 5、2 1 5 7 9 ~ 2 1 5 8 1、2 1 5 0 5 ~ 2 1 5
0 7、2 1 6 5 1 ~ 2 1 6 5 3又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D
S C a v 1 _ m u t 1をコードする)、配列番号2 0 1 4 ~ 2 3 7 3、1 4 3 1 8 ~ 1 4
6 7 7、2 1 4 3 6 ~ 2 1 4 3 8、2 1 5 8 2 ~ 2 1 5 8 4、2 1 5 0 8 ~ 2 1 5 1 0、
2 1 6 5 4 ~ 2 1 6 5 6又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _
D S C a v 1 _ m u t 1をコードする)、配列番号2 3 8 3 ~ 2 7 4 2、1 4 6 8 7 ~ 1
5 0 4 6、2 1 4 3 9 ~ 2 1 4 4 1、2 1 5 8 5 ~ 2 1 5 8 7、2 1 5 1 1 ~ 2 1 5 1 3
、2 1 6 5 7 ~ 2 1 6 5 9又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C
a v 1 _ m u t 2をコードする)、配列番号2 7 5 2 ~ 3 1 1 1、1 5 0 5 6 ~ 1 5 4 1
5、2 1 4 4 2 ~ 2 1 4 4 4、2 1 5 8 8 ~ 2 1 5 9 0、2 1 5 1 4 ~ 2 1 5 1 6、2 1
6 6 0 ~ 2 1 6 6 2又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S
C a v 1 _ m u t 2をコードする)、配列番号3 1 2 1 ~ 3 4 8 0、1 5 4 2 5 ~ 1 5 7
8 4、2 1 4 4 5 ~ 2 1 4 4 7、2 1 5 9 1 ~ 2 1 5 9 3、2 1 5 1 7 ~ 2 1 5 1 9、2
1 6 6 3 ~ 2 1 6 6 5又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v
1 _ m u t 3をコードする)、配列番号3 4 9 0 ~ 3 8 4 9、1 5 7 9 4 ~ 1 6 1 5 3、
2 1 4 4 8 ~ 2 1 4 5 0、2 1 5 9 4 ~ 2 1 5 9 6、2 1 5 2 0 ~ 2 1 5 2 2、2 1 6 6
6 ~ 2 1 6 6 8又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a
v 1 _ m u t 3をコードする)、配列番号3 8 5 9 ~ 4 2 1 8、1 3 2 1 1 ~ 1 3 5 7 0
、2 1 4 2 7 ~ 2 1 4 2 9、2 1 5 7 3 ~ 2 1 5 7 5、2 1 4 9 9 ~ 2 1 5 0 1、2 1 6
4 5 ~ 2 1 6 4 7又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v 1 _
m u t 0をコードする)、配列番号4 2 2 8 ~ 4 5 8 7、1 3 5 8 0 ~ 1 3 9 3 9、2 1
4 3 0 ~ 2 1 4 3 2、2 1 5 7 6 ~ 2 1 5 7 8、2 1 5 0 2 ~ 2 1 5 0 4、2 1 6 4 8 ~
2 1 6 5 0又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a v 1
_ m u t 0をコードする)、配列番号4 5 9 7 ~ 4 9 5 6、1 6 1 6 3 ~ 1 6 5 2 2、2
1 4 5 1 ~ 2 1 4 5 3、2 1 5 9 7 ~ 2 1 5 9 9、2 1 5 2 3 ~ 2 1 5 2 5、2 1 6 6 9
~ 2 1 6 7 1又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v 1 _ m u
t 4をコードする)、配列番号4 9 6 6 ~ 5 3 2 5、1 6 5 3 2 ~ 1 6 8 9 1、2 1 4 5
4 ~ 2 1 4 5 6、2 1 6 0 0 ~ 2 1 6 0 2、2 1 5 2 6 ~ 2 1 5 2 8、2 1 6 7 2 ~ 2 1
6 7 4又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a v 1 _ m
u t 4をコードする)、配列番号5 3 3 5 ~ 5 6 9 4、1 6 9 0 1 ~ 1 7 2 6 0、2 1 4
5 7 ~ 2 1 4 5 9、2 1 6 0 3 ~ 2 1 6 0 5、2 1 5 2 9 ~ 2 1 5 3 1、2 1 6 7 5 ~ 2
1 6 7 7又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v 1 _ m u t 5
をコードする)、配列番号5 7 0 4 ~ 6 0 6 3、1 7 2 7 0 ~ 1 7 6 2 9、2 1 4 6 0 ~
2 1 4 6 2、2 1 6 0 6 ~ 2 1 6 0 8、2 1 5 3 2 ~ 2 1 5 3 4、2 1 6 7 8 ~ 2 1 6 8
0又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t
5をコードする)、配列番号6 0 7 3 ~ 6 4 3 2、1 7 6 3 9 ~ 1 7 9 9 8、2 1 4 6 3
~ 2 1 4 6 5、2 1 6 0 9 ~ 2 1 6 1 1、2 1 5 3 5 ~ 2 1 5 3 7、2 1 6 8 1 ~ 2 1 6
8 3又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v 1 _ m u t 6をコ
ードする)、配列番号6 4 4 2 ~ 6 8 0 1、1 8 0 0 8 ~ 1 8 3 6 7、2 1 4 6 6 ~ 2 1
4 6 8、2 1 6 1 2 ~ 2 1 6 1 4、2 1 5 3 8 ~ 2 1 5 4 0、2 1 6 8 4 ~ 2 1 6 8 6又
はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 6を
コードする)、配列番号6 8 1 1 ~ 7 1 7 0、1 8 3 7 7 ~ 1 8 7 3 6、2 1 4 6 9 ~ 2
1 4 7 1、2 1 6 1 5 ~ 2 1 6 1 7、2 1 5 4 1 ~ 2 1 5 4 3、2 1 6 8 7 ~ 2 1 6 8 9
又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント (F _ D S C a v 1 _ m u t 7をコード
する)、配列番号7 1 8 0 ~ 7 5 3 9、1 8 7 4 6 ~ 1 9 1 0 5、2 1 4 7 2 ~ 2 1 4 7
4、2 1 6 1 8 ~ 2 1 6 2 0、2 1 5 4 4 ~ 2 1 5 4 6、2 1 6 9 0 ~ 2 1 6 9 2又はこ
れらのいずれかの断片若しくはバリエント (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 7をコー

10

20

30

40

50

ドする)、配列番号7549~7908、19115~19474、21475~21477、21621~21623、21547~21549、21693~21695又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント(F₋DSCav1₋mut8をコードする)、又は配列番号7918~8277、19484~19843、21478~21480、21624~21626、21550~21552、21696~21698又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエント(F₋del₋DSCav1₋mut8をコードする)。

【0068】

第2の態様において、本発明は、第1の態様の人工RNAを含む組成物を提供する。

【0069】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAを含む組成物は、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1タンパク質、及び／又はリンタンパク質P、又はそれらの組合せから選択されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAを含む。

【0070】

マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1タンパク質、M2-2タンパク質、及び／又はリンタンパク質Pは、好適なT細胞抗原であり、対象に投与したときに、組成物又はワクチンの効率的なT細胞応答を促進する。

【0071】

更なる人工RNAは、配列番号9685~9692、10135~10142、10638~10645、11184~11191、21385~21388、19845~19852、20214~20221、20583~20590、20952~20959、21411~21414のいずれか又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントのいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコード配列を含むことができる。

【0072】

好適には、前記更なる人工RNAは、配列番号9693~10052、10143~10502、10646~11005、11192~11551、19853~20212、20222~20581、20591~20950、20960~21319、21481~21488、21627~21634、21553~21560、21699~21706又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントから選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる。

【0073】

好適には、組成物は、1以上の脂質と複合体化、カプセル化、又は会合して脂質ナノ粒子を形成する本発明の人工RNAを含むことができる。

【0074】

組成物は、好ましくは、1以上の脂質と複合体化して脂質ナノ粒子(LNP)を形成する本発明の人工RNAを含み、LNPは、下記：

(i) 本明細書で定義される少なくとも1つのカチオン性脂質、好ましくは式(III)の脂質、より好ましくは脂質III-3；

(ii) 本明細書で定義される中性脂質、好ましくは1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)；

(iii) 本明細書で定義されるステロイド又はステロイド類似体、好ましくはコレステロール；及び

(iv) 本明細書で定義されるPEG-脂質、例えば、PEG-DMG又はPEG-cDMA、好ましくは式(IVa)のPEG化脂質；

10

20

30

40

50

から本質的になり、

(i) から (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；0.5～15% PEG-脂質のモル比である。

【0075】

本発明はまた、前記人工RNA又は前記組成物を含むRSVワクチンに関する。

【0076】

本発明はまた、RSVによる感染症の治療又は予防における人工RNA、組成物、及びワクチンの使用に関する。

【0077】

特に、本発明は、RSVによる感染症又はそのような感染症に関連する障害の治療又は予防における人工RNA、組成物、及びワクチンの使用に関する。

【0078】

本発明は更に、対象における障害又は疾患を治療又は予防する方法、人工RNA、組成物、及びワクチンの第1及び第2の医学的使用に関する。更に、本発明は、人工RNA、組成物、及びワクチンを含むキット、特にキットオブパーツに関する。

【0079】

発明の詳細な説明

本願は、本願の説明の一部である電子フォーマットの配列表と共に提出される(WIPO標準ST.25)。この出願と共に提出された配列表の電子フォーマットに含まれる情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で「配列番号」に言及する場合、それぞれの識別子を有する配列表の対応する核酸配列又はアミノ酸(aa)配列が言及される。多くの配列について、配列表は、例えば、特定の構造上の特徴、配列の最適化、GenBank識別子に関する追加の詳細情報、又はそのコード能力に関する追加の詳細情報も提供する。特に、そのような情報は、WIPO標準ST.25配列表の数値識別子<223>で与えられる。したがって、前記数値識別子<223>の下に提供される情報は、その全体が本明細書に明示的に含まれ、根底にある発明の説明の不可欠な部分として理解されるべきである。

【0080】

人工核酸：

第1の態様では、本発明は、

a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの3'非翻訳領域(3'-UTR)と；
b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結され、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド若しくはタンパク質又はその断片若しくはバリエーションをコードする少なくとも1つのコード配列とを含む人工核酸に関する。

【0081】

第1の態様の好ましい実施形態においては、本発明は、

a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの異種3'非翻訳領域(3'-UTR)と；
b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結され、RSV融合(F)タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド若しくはタンパク質又はその断片若しくはバリエーションをコードする少なくとも1つのコード配列とを含む人工RNA、好ましくはワクチン接種に適したRNAを提供する。

【0082】

一般に、本発明のRNAは、タンパク質コード領域、並びに5'-及び／又は3'-非翻訳領域(UTR)から構成され得る。3'-UTRは、その配列及びサイズが可変であり、終止コドンとポリ(A)テールとの間に存在する。重要なこととしては、3'-UTR配列は、RNAのターンオーバー、安定性、及び局在化を決定するいくつかの調節モチーフを有し、転写後調節の多くの側面を司っている。RNAの医学用途(例えば、免疫療法用途

10

20

30

40

50

、ワクチン接種など）では、RNAのタンパク質への翻訳の調節は、治療の安全性と有効性にとって非常に重要である。本発明者らは、驚くべきことに、3' - UTR及び／又は5' - UTRの特定の組合せが協調して作用して、RSV抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする機能可能に連結された核酸配列の発現を相乗的に増強することを見出した。本発明のUTRの組合せを有する人工RNA分子は、RSV Fに由来する大量のRSV抗原性ペプチド又はタンパク質の迅速且つ一過性の発現を可能にする点で有利である。したがって、本明細書に提供される人工RNAは、RSVに対するワクチン接種をはじめとする、インビボでの各種用途に特に有用且つ好適である。

【0083】

好適には、人工RNAは、少なくとも1つの異種5' - UTR及び／又は少なくとも1つの異種3' - UTRを含むことができる。この文脈において、本発明のUTRは、任意の天然に存在する遺伝子又はその断片、ホモログ、若しくはバリエーションの5' - UTR又は3' - UTRに由来する核酸配列を含む又はからなる。好ましくは、本発明の5' - UTR又は3' - UTRは、RSV Fに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列に対して異種である。好適な異種5' - UTR又は異種3' - UTRは、(RSVには由来しない)天然に存在する遺伝子に由来する。他の実施形態においては、合成的に操作された5' - UTR又は3' - UTRを、本発明の文脈において使用することができる。

【0084】

好ましい実施形態では、少なくとも1つの人工RNAは、少なくとも1つの異種3' - UTRを含む。

【0085】

好ましくは、少なくとも1つの異種3' - UTR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に由来する、又は脊索動物遺伝子、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のバリエーションに由来する核酸配列を含む又はからなる。

【0086】

好ましくは、本発明の人工RNAは、半減期が延びたRNAに関する(安定なRNAを提供する)遺伝子に由来し得る3' - UTR、例えば、以下に定義し説明する3' - UTRを含む。

【0087】

好ましくは、少なくとも1つの異種3' - UTRは、好ましくは安定なmRNAをコードする遺伝子の3' - UTRに由来する、又は前記遺伝子のホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する核酸配列を含む。

【0088】

第1の態様の好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つの異種3' - UTRを含み、前記少なくとも1つの異種3' - UTRは、PSMB3、ALB7、アルファグロビン(「muag」と呼ぶ)、CASP1、COX6B1、GNAS、NDUFA1、及びRPS9から選択される遺伝子の3' - UTRに由来する、又はこれらの遺伝子のいずれかのホモログ、断片、又はバリエーションに由来する核酸配列を含む。

【0089】

ALB7由来の3' - UTR 好ましい実施形態においては、3' - UTRは、脊椎動物アルブミン遺伝子の3' - UTRに由来する又はそのバリエーションに由来する、好ましくは哺乳動物アルブミン遺伝子の3' - UTRに由来する又はそのバリエーションに由来する、より好ましくはヒトアルブミン遺伝子の3' - UTRに由来する又はそのバリエーションに由来する、更により好ましくはGenBankアクセッション番号NM_000477.5に係るヒトアルブミン遺伝子の3' - UTRに由来する又はそのホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する核酸配列を含む又はからなる。したがって、本発明の人工RNAは、ALB7遺伝子に由来する3' - UTRを含むことができ、ALB7遺伝子に由来する前記3' - U

10

20

30

40

50

T R は、配列番号 3 5 又は 3 6 と同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

【0090】

アルファグロビン遺伝子由来の 3' - UTR 好ましい実施形態においては、3' - UTR は、脊椎動物アルファグロビン遺伝子（「muag」と呼ぶ）の 3' - UTR に由来する又はそのバリエーションに由来する、好ましくは哺乳動物アルファグロビン遺伝子の 3' - UTR に由来する又はそのバリエーションに由来する、より好ましくはヒトアルファグロビン遺伝子の 3' - UTR に由来する又はそのバリエーションに由来する、更により好ましくはヒトアルファグロビン遺伝子の 3' - UTR に由来する核酸配列を含む又ははからなる。したがって、本発明の RNA は、アルファグロビン遺伝子に由来する 3' - UTR を含むことができ、アルファグロビン遺伝子に由来する前記 3' - UTR は、配列番号 3 7 又は 3 8 と同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

10

【0091】

PSMB3 由来の 3' - UTR 本発明の人工 RNA は、プロテアソームサブユニットベータタイプ 3（PSMB3）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の 3' - UTR に由来する 3' - UTR を含むことができる。そのような 3' - UTR は、好ましくは、プロテアソームサブユニットベータタイプ 3（PSMB3）遺伝子の 3' - UTR に由来する、又は好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトのプロテアソームサブユニットベータタイプ 3（PSMB3）遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトプロテアソームサブユニットベータタイプ 3（PSMB3）タンパク質（UniProt Ref. No. P49720、2017 年 8 月 30 日のエントリーバージョン #183）に対応するプロテアソームサブユニットベータタイプ 3（PSMB3）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工 RNA は、PSMB3 遺伝子に由来する 3' - UTR を含むことができ、PSMB3 遺伝子に由来する前記 3' - UTR は、配列番号 2 3 又は 2 4 と同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

20

30

【0092】

CASP1 由来の 3' - UTR 本発明の人工 RNA は、カスパーゼー 1（CASP1）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の 3' - UTR に由来する 3' - UTR を含むことができる。そのような 3' - UTR は、好ましくは、カスパーゼー 1（CASP1）遺伝子の 3' - UTR、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトのカスパーゼー 1（CASP1）遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。したがって、本発明の RNA は、CASP1 遺伝子に由来する 3' - UTR を含むことができ、CASP1 遺伝子に由来する前記 3' - UTR は、配列番号 2 5 又は 2 6 と同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

40

【0093】

COX6B1 由来の 3' - UTR 本発明の人工 RNA は、シトクロム c オキシダーゼサブユニット 6 B 1（COX6B1）タンパク質をコードする COX6B1 遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の 3' - UTR に由来する 3' - UTR を含むことができる。そのような 3' - UTR は、好ましくは、シトクロム c オキシダーゼサブ

50

ユニット6B1 (COX6B1) 遺伝子の3'-UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトのシトクロムcオキシダーゼサブユニット6B1 (COX6B1) 遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトシトクロムcオキシダーゼサブユニット6B1 (COX6B1) タンパク質 (UniProt Ref. No. P14854、2017年8月30日のエントリバージョン#166) に対応するシトクロムcオキシダーゼサブユニット6B1 (COX6B1) タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、COX6B1遺伝子に由来する3'-UTRを含むことができ、COX6B1遺伝子に由来する前記3'-UTRは、配列番号27又は28と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

10

【0094】

GNAS由来の3'-UTR 本発明の人工RNAは、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G(s)サブユニットアルファアイソフォームショート (GNAS) タンパク質をコードするGNAS遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の3'-UTRに由来する3'-UTRを含むことができる。そのような3'-UTRは、好ましくは、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G(s)サブユニットアルファアイソフォームショート (GNAS) 遺伝子の3'-UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物のグアニンヌクレオチド結合タンパク質G(s)サブユニットアルファアイソフォームショート (GNAS) 遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトグアニンヌクレオチド結合タンパク質G(s)サブユニットアルファアイソフォームショート (GNAS) タンパク質 (UniProt Ref. No. P63092、2017年8月30日のエントリバージョン#153) に対応するグアニンヌクレオチド結合タンパク質G(s)サブユニットアルファアイソフォームショート (GNAS) タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、GNAS遺伝子に由来する3'-UTRを含むことができ、GNAS遺伝子に由来する前記3'-UTRは、配列番号29又は30と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

20

30

【0095】

NDUFA1由来の3'-UTR 本発明の人工RNAは、NADHデヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1アルファサブコンプレックスサブユニット1 (NDUFA1) タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の3'-UTRに由来する3'-UTRを含むことができる。そのような3'-UTRは、好ましくは、NADHデヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1アルファサブコンプレックスサブユニット1 (NDUFA1) 遺伝子の3'-UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物のNADHデヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1アルファサブコンプレックスサブユニット1 (NDUFA1) 遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトNADHデヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1アルファサブコンプレックスサブユニット1 (NDUFA1) タンパク質 (UniProt Ref. No. O15239、2017年8月30日のエントリバージョン#152) に対応するNADHデヒドロゲナーゼ [ユビキノ] 1アルファサブコンプレックスサブユニット1 (NDUFA1) タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、NDUFA1遺伝子に由来する3'-UTRを含むことができ、NDUFA1遺伝子に由来する前記3'-UTRは、配列番号31又は32と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、9

40

50

8%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

【0096】

RPS9由来の3'-UTR 本発明の人工RNAは、40Sリボソームタンパク質S9（RPS9）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の3'-UTRに由来する3'-UTRを含むことができる。そのような3'-UTRは、好ましくは、40Sリボソームタンパク質S9（RPS9）遺伝子の3'-UTR、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの40Sリボソームタンパク質S9（RPS9）遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト40Sリボソームタンパク質S9（RPS9）タンパク質（UniProt Ref. No. P46781、2017年8月30日のエントリバージョン#179）に対応する40Sリボソームタンパク質S9（RPS9）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、RPS9遺伝子に由来する3'-UTRを含むことができ、RPS9遺伝子に由来する前記3'-UTRは、配列番号33又は34と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

10

【0097】

更なる3'-UTR 実施形態では、本明細書で定義される人工RNAは、国際公開第2016/107877号に記載される3'-UTRを含む。この文脈において、3'-UTR配列に関する国際公開第2016/107877号の開示を、参照により本明細書に援用する。特に好適な3'-UTRは、国際公開第2016/107877号の配列番号1~24及び配列番号49~318、又はこれらの配列の断片又はバリエーションである。したがって、本発明の人工RNAの3'-UTRは、国際公開第2016/107877号の配列番号1~24及び配列番号49~318に係る核酸配列の対応するRNA配列を含む又ははからることができる。他の実施形態においては、本明細書で定義される人工RNAは、国際公開第2017/036580号に記載される3'-UTRを含む。この文脈において、3'-UTR配列に関する国際公開第2017/036580号の開示を、参照により本明細書に援用する。特に好適な3'-UTRは、国際公開第2017/036580号の配列番号152~204、又はこれらの配列の断片又はバリエーションである。したがって、本発明の人工RNAの3'-UTRは、国際公開第2017/036580号の配列番号152~204に係る核酸配列の対応するRNA配列を含む又ははからることができる。

20

30

【0098】

好ましい実施形態によれば、人工RNAは、少なくとも1つの異種5'-UTRを含む。

【0099】

好ましい実施形態においては、本明細書で定義される少なくとも1つの人工核酸、特に本明細書で定義されるRNAは、少なくとも1つの異種5'-UTRを含むことができる。

【0100】

好ましくは、少なくとも1つの5'-UTRは、脊索動物の遺伝子、好ましくは脊椎動物の遺伝子、より好ましくは哺乳動物の遺伝子、最も好ましくはヒトの遺伝子の5'-UTRに由来する、又は脊索動物の遺伝子、好ましくは脊椎動物の遺伝子、より好ましくは哺乳動物の遺伝子、最も好ましくはヒトの遺伝子の5'-UTRのバリエーションに由来する核酸配列を含む又ははからなる。

40

【0101】

好ましくは、本発明の人工RNAは、半減期が延びたRNAに関する（安定なRNAを提供する）遺伝子に由来し得る5'-UTR、例えば、以下に定義し説明する5'-UTRを含む。

【0102】

好ましくは、少なくとも1つの異種5'-UTRは、好ましくは安定なmRNAをコード

50

する遺伝子の5' - UTRに由来する、又は前記遺伝子のホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する核酸配列を含む。

【0103】

第1の態様の好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つの異種5' - UTRを含み、前記少なくとも1つの異種5' - UTRは、HSD17B4、RPL32、ASAH1、ATP5A1、MP68、NDUFA4、NOSIP、RPL31、SLC7A3、TUBB4B、及びUBQLN2から選択される遺伝子の5' - UTRに由来する、又はこれらの遺伝子のいずれかのホモログ、断片、又はバリエーションに由来する核酸配列を含む。

【0104】

RPL32由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、60Sリボソームタンパク質L32をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の5' - UTRに由来する5' - UTRを含むことができ、前記5' - UTRは、好ましくは5' TOPモチーフを欠いている。そのような5' - UTRは、好ましくは、60Sリボソームタンパク質L32 (RPL32) 遺伝子の5' - UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの60Sリボソームタンパク質L32 (RPL32) 遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又はからなり、5' - UTRは、好ましくは、前記遺伝子の5' TOPを含まない。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト60Sリボソームタンパク質L32 (RPL32) (UniProt Ref. No. P62899、2017年8月30日のエンリーバージョン#138) に対応する60Sリボソームタンパク質L32 (RPL32) をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、RPL32遺伝子に由来する5' - UTRを含むことができ、RPL32遺伝子に由来する前記5' - UTRは、配列番号21又は22と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又はからなる。

【0105】

HSD17B4由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、17-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ4をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の5' - UTRに由来する5' - UTRを含むことができ、好ましくは5' TOPモチーフを欠いている。そのような5' - UTRは、17-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ4 (ペルオキシソーム多機能酵素タイプ2とも呼ばれる) 遺伝子の5' - UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの17-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ4 (HSD17B4) 遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又はからなり、好ましくは5' - UTRは前記遺伝子の5' TOPを含まない。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト17-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ4 (UniProt Ref. No. Q9BPX1、2017年8月30日のエンリーバージョン#139) に対応する17-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ4タンパク質、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくはその誘導体をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、HSD17B4遺伝子に由来する5' - UTRを含むことができ、HSD17B4遺伝子に由来する前記5' - UTRは、配列番号1又は2と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又はからなる。

【0106】

ASAH1由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、酸性セラミダーゼ (ASAH1) をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、又は誘導体の5' - UTRに由来する5' - UTRを含むことができる。そのような5' - UTRは、好ましくは酸性セラミダーゼ (ASAH1) 遺伝子の5' - UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好

ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの酸性セラミダーゼ（A S A H 1）遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト酸性セラミダーゼ（A S A H 1）（U n i P r o t R e f . N o . Q 1 3 5 1 0、2017年6月7日のエントリーバージョン#177）に対応する酸性セラミダーゼ（A S A H 1）タンパク質、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、A S A H 1 遺伝子に由来する5' - U T Rを含むことができ、A S A H 1 遺伝子に由来する前記5' - U T Rは、配列番号3又は4と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

10

【0107】

A T P 5 A 1由来の5' - U T R 本発明の人工RNAは、ミトコンドリアA T Pシンターゼサブユニットアルファ（A T P 5 A 1）をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の5' - U T Rに由来する5' - U T Rを含むことができ、前記5' - U T Rは、好ましくは5' T O Pモチーフを欠いている。そのような5' - U T Rは、好ましくはミトコンドリアA T Pシンターゼサブユニットアルファ（A T P 5 A 1）遺伝子の5' - U T R、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトのミトコンドリアA T Pシンターゼサブユニットアルファ（A T P 5 A 1）遺伝子に由来する核酸配列、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体を含む又ははからなり、5' - U T Rは、好ましくは、前記遺伝子の5' T O Pを含まない。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト酸性ミトコンドリアA T Pシンターゼサブユニットアルファ（U n i P r o t R e f . N o . P 2 5 7 0 5、2017年8月30日のエントリーバージョン#208）に対応するミトコンドリアA T Pシンターゼサブユニットアルファタンパク質、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、A T P 5 A 1 遺伝子に由来する5' - U T Rを含むことができ、A T P 5 A 1 遺伝子に由来する前記5' - U T Rは、配列番号5又は6と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

20

30

【0108】

M P 6 8由来の5' - U T R 本発明の人工RNAは、M P 6 8をコードする遺伝子又はそのホモログ、断片、若しくはバリエーションの5' - U T Rに由来する5' - U T Rを含むことができる。そのような5' - U T Rは、好ましくは、6.8 k D aミトコンドリアプロテオリピド（M P 6 8）遺伝子の5' - U T Rに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物の6.8 k D aミトコンドリアプロテオリピド（M P 6 8）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト6.8 k D aミトコンドリアプロテオリピド（M P 6 8）タンパク質（U n i P r o t R e f . N o . P 5 6 3 7 8、2017年2月15日のエントリーバージョン#127）に対応する6.8 k D aミトコンドリアプロテオリピド（M P 6 8）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、M P 6 8 遺伝子に由来する5' - U T Rを含むことができ、M P 6 8 遺伝子に由来する前記5' - U T Rは、配列番号7又は8と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

40

【0109】

N D U F A 4由来の5' - U T R 本発明の人工RNAは、シトクロムcオキシダーゼサブユニット（N D U F A 4）をコードする遺伝子、又はそのホモログ、断片、若しくはバリエーションの5' - U T Rに由来する5' - U T Rを含むことができる。そのような5' - U T R

50

は、好ましくは、シトクロムcオキシダーゼサブユニット（NDUFA4）遺伝子の5' - UTR、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物のシトクロムcオキシダーゼサブユニット（NDUFA4）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトシトクロムcオキシダーゼサブユニット（NDUFA4）タンパク質（UniProt Ref. No. O00483、2017年8月30日のエントリーバージョン#149）に対応するシトクロムcオキシダーゼサブユニット（NDUFA4）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、NDUFA4遺伝子に由来する5' - UTRを含むことができ、NDUFA4遺伝子に由来する前記5' - UTRは、配列番号9又は10と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

【0110】

NOSIP由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、一酸化窒素シンターゼ相互作用（NOSIP）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の5' - UTRに由来する5' - UTRを含むことができる。そのような5' - UTRは、好ましくは、一酸化窒素シンターゼ相互作用タンパク質（NOSIP）遺伝子の5' - UTR、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトの一酸化窒素シンターゼ相互作用タンパク質（NOSIP）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト一酸化窒素シンターゼ相互作用タンパク質（NOSIP）タンパク質（UniProt Ref. No. Q9Y314、2017年6月7日のエントリーバージョン#130）に対応する一酸化窒素シンターゼ相互作用タンパク質（NOSIP）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、NOSIP遺伝子に由来する5' - UTRを含むことができ、NOSIP遺伝子に由来する前記5' - UTRは、配列番号11又は12と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

【0111】

RPL31由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、60Sリボソームタンパク質L31をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体の5' - UTRに由来する5' - UTRを含むことができ、前記5' - UTRは、好ましくは5' TOPモチーフを欠いている。そのような5' - UTRは、好ましくは60Sリボソームタンパク質L31（RPL31）遺伝子の5' - UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物の60Sリボソームタンパク質L31（RPL31）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなり、5' - UTRは、好ましくは前記遺伝子の5' TOPを含まない。前記遺伝子は、好ましくは、ヒト60Sリボソームタンパク質L31（RPL31）（UniProt Ref. No. P62899、2017年8月30日のエントリーバージョン#138）に対応する60Sリボソームタンパク質L31（RPL31）をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、RPL31遺伝子に由来する5' - UTRを含むことができ、RPL31遺伝子に由来する前記5' - UTRは、配列番号13又は14と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

【0112】

SLC7A3由来の5' - UTR 本発明の人工RNAは、カチオン性アミノ酸トランスポーター3（溶質担体ファミリー7メンバー3、SLC7A3）タンパク質、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体をコードする遺伝子の5' - UTRに由来する5

５'－UTRを含むことができる。そのような５'－UTRは、好ましくはカチオン性アミノ酸トランスポーター３（SLC7A3）遺伝子の５'－UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物のカチオン性アミノ酸トランスポーター３（SLC7A3）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトカチオン性アミノ酸トランスポーター３（SLC7A3）タンパク質（UniProt Ref. No. Q8WY07、2017年8月30日のエントリバージョン#139）に対応するカチオン性アミノ酸トランスポーター３（SLC7A3）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、SLC7A3遺伝子に由来する５'－UTRを含むことができ、SLC7A3遺伝子に由来する前記５'－UTRは、配列番号15又は16と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

10

【0113】

TUBB4B由来の５'－UTR 本発明の人工RNAは、チューブリンベータ４B鎖（TUBB4B）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、又は誘導体の５'－UTRに由来する５'－UTRを含むことができる。そのような５'－UTRは、好ましくはチューブリンベータ４B鎖（TUBB4B）遺伝子の５'－UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトのチューブリンベータ４B鎖（TUBB4B）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、ヒトチューブリンベータ４B鎖（TUBB4B）タンパク質（UniProt Ref. No. Q8WY07、2017年8月30日のエントリバージョン#142）に対応するチューブリンベータ４B鎖（TUBB4B）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、TUBB4B遺伝子に由来する５'－UTRを含むことができ、TUBB4B遺伝子に由来する前記５'－UTRは、配列番号17又は18と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

20

【0114】

UBQLN2由来の５'－UTR 本発明の人工RNAは、ユビキリン２（UBQLN2）タンパク質をコードする遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、若しくは断片の５'－UTRに由来する５'－UTRを含むことができる。そのような５'－UTRは、好ましくは、ユビキリン２（UBQLN2）遺伝子の５'－UTRに由来する、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物のユビキリン２（UBQLN2）遺伝子、又はそのホモログ、バリエーション、断片、若しくは誘導体に由来する核酸配列を含む又ははからなる。前記遺伝子は、好ましくは、UniProt Ref. No. Q9UHD9、2017年8月30日のエントリバージョン#151に対応するユビキリン２（UBQLN2）タンパク質をコードすることができる。したがって、本発明の人工RNAは、UBQLN2遺伝子に由来する５'－UTRを含むことができ、UBQLN2遺伝子に由来する前記５'－UTRは、配列番号19又は20と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む又ははからなる。

30

40

【0115】

更なる５'－UTR 実施形態では、本明細書で定義される人工RNAは、国際公開第2013/143700号に記載される５'－UTRを含む。この文脈において、５'－UTR配列に関する国際公開第2013/143700号の開示を、参照により本明細書に援用する。特に好適な５'－UTRは、国際公開第2013/143700号の配列番号1～1363、配列番号1395、配列番号1421、及び配列番号1422、又はこれらの配

50

列の断片又はバリエーションである。この文脈において、本発明に係る人工RNAの5'-UTRは、国際公開第2013/143700号配列番号1~1363、配列番号1395、配列番号1421、及び配列番号1422に係る核酸配列の対応するRNA配列を含む又ははからなることが好ましい。他の実施形態では、本発明の人工RNAは、国際公開第2016/107877号に記載される5'-UTRを含む。これに関して、5'-UTR配列に関する国際公開第2016/107877号の開示を、参照により本明細書に援用する。特に好ましい5'-UTRは、国際公開第2016/107877号の配列番号25~30及び配列番号319~382に係る核酸配列、又はこれらの配列の断片又はバリエーションである。この文脈において、人工RNAの5'-UTRが、国際公開第2016/107877号の配列番号25~30及び配列番号319~382に係る核酸配列の対応するRNA配列を含む又ははからなることが特に好ましい。他の実施形態では、本発明の人工RNAは、国際公開第2017/036580号に記載される5'-UTRを含む。この文脈において、5'-UTR配列に関する国際公開第2017/036580号の開示を、参照により本明細書に援用する。特に好ましい5'-UTRは、国際公開第2017/036580号の配列番号1~151に係る核酸配列、又はこれらの配列の断片又はバリエーションである。この文脈において、人工RNAの5'-UTRが、国際公開第2017/036580号の配列番号1~151に係る核酸配列の対応するRNA配列を含む又ははからなることが特に好ましい。

10

【0116】

発明者らは、少なくとも1つの異種5'-UTR及び／又は少なくとも1つの異種3'-UTRの特定の組合せが、標的組織（例えば、筋肉、真皮）中のRSVFタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする、前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結された少なくとも1つのコード配列の翻訳を有利に高めていることを見出した。

20

【0117】

したがって、本明細書で定義される少なくとも1つの異種5'-UTR及び本明細書で定義される少なくとも1つの異種3'-UTRは、相乗的に作用して、本発明の人工RNAからの抗原性ペプチド又はタンパク質の産生（即ち、翻訳）を高めることが好ましい。5'-UTRと3'-UTRのこれらの有利な組合せを以下に示す。以下の記載で導入する略称、即ち、「a-1」、「a-2」、「a-3」、「a-4」、「a-5」、「b-1」、「b-2」、「b-3」、「b-4」、「b-5」、「c-1」、「c-2」、「c-3」、「c-4」、「c-5」、「d-1」、「d-2」、「d-3」、「d-4」、「d-5」、「e-1」、「e-2」、「e-3」、「e-4」、「e-5」、「e-6」、「f-1」、「f-2」、「f-3」、「f-4」、「f-5」、「g-1」、「g-2」、「g-3」、「g-4」、「g-5」、「h-1」、「h-2」、「h-3」、「h-4」、「h-5」、「i-1」、「i-2」、「i-3」のそれぞれは、本発明の明細書全体を通して使用され、本発明の5'-UTR及び／又は3'-UTRの1つの有利な組合せを表す。

30

【0118】

したがって、第1の態様の好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、
a-1. HSD17B4遺伝子の5'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの5'-UTR、及びPSMB3遺伝子の3'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの3'-UTR；又は
a-2. NDUFA4遺伝子の5'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの5'-UTR、及びPSMB3遺伝子の3'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの3'-UTR；又は
a-3. SLC7A3遺伝子の5'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの5'-UTR、及びPSM

40

50

d-1. RPL31遺伝子の5'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも1つの5'-UTR、及びPSMB3遺伝子の3'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも1つの3'-UTR；又は

d-2. ATP5A1遺伝子の5' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも1つの5' - UTR、及びCASP1遺伝子の3' - UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも1つの3' - UTR；又は

d-3. SLC7A3 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び GNAS 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

d-4. HSD17B4 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び NDUF A1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

d-5. SLC7A3 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び NDUFA1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

e-1. TUBB4B 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

e-2. RPL31 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5'-UTR、及び RPS9 遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR；又は

e-3. MP68 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び RPS9 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

e-4. **NOSIP** 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び **RPS9** 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

e-5. ATP5A1 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5'-UTR、及び RPS9 遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR；又は

e-6. ATP5A1 遺伝子の 5' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 5' - UTR、及び COX6B1 遺伝子の 3' - UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3' - UTR；又は

ｴｰ 1. A T P 5 A 1 遺伝子の 5' - U T R に由来する、又はその対応する R N A 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 5' - U T R、及び G N A S 遺伝子の 3' - U T R に由来する、又はその対応する R N A 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも 1 つの 3' - U T R；又は

f-2. ATP5A1遺伝子の5'-UTRに由来する、又はその対応するRNA配列、ホモログ、断片、若しくはバリエントに由来する少なくとも1つの5'-UTR、及びNDU

50

h-5. SLC7A3 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 5'-UTR、及び COX6B1 遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR；又は

i-1. SLC7A3 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 5'-UTR、及び RPS9 遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR；又は

i-2. RPL32 遺伝子の 5'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 5'-UTR、及び ALB7 遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR；又は

i-3. アルファグロビン遺伝子の 3'-UTR に由来する、又はその対応する RNA 配列、ホモログ、断片、若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの 3'-UTR。

【0119】

好適には、本発明の人工 RNA は、a-1 (HSD17B4/PSMB3)、a-2 (Ndufa4/PSMB3)、a-3 (SLC7A3/PSMB3)、a-4 (NOSIP/PSMB3)、a-5 (MP68/PSMB3)、b-1 (UBQLN2/RPS9)、b-2 (ASAH1/RPS9)、b-3 (HSD17B4/RPS9)、b-4 (HSD17B4/CASP1)、b-5 (NOSIP/COX6B1)、c-1 (NDUFA4/RPS9)、c-2 (NOSIP/NDUFA1)、c-3 (NDUFA4/COX6B1)、c-4 (NDUFA4/NDUFA1)、c-5 (ATP5A1/PSMB3)、d-1 (Rpl31/PSMB3)、d-2 (ATP5A1/CASP1)、d-3 (SLC7A3/GNAS)、d-4 (HSD17B4/NDUFA1)、d-5 (Slc7a3/Ndufa1)、e-1 (TUBB4B/RPS9)、e-2 (RPL31/RPS9)、e-3 (MP68/RPS9)、e-4 (NOSIP/RPS9)、e-5 (ATP5A1/RPS9)、e-6 (ATP5A1/COX6B1)、f-1 (ATP5A1/GNAS)、f-2 (ATP5A1/NDUFA1)、f-3 (HSD17B4/COX6B1)、f-4 (HSD17B4/GNAS)、f-5 (MP68/COX6B1)、g-1 (MP68/NDUFA1)、g-2 (NDUFA4/CASP1)、g-3 (NDUFA4/GNAS)、g-4 (NOSIP/CASP1)、g-5 (RPL31/CASP1)、h-1 (RPL31/COX6B1)、h-2 (RPL31/GNAS)、h-3 (RPL31/NDUFA1)、h-4 (Slc7a3/CASP1)、h-5 (SLC7A3/COX6B1)、i-1 (SLC7A3/RPS9)、i-2 (RPL32/ALB7)、又は i-3 (α-グロビン遺伝子) から選択される 3'-UTR 及び 5'-UTR に機能可能に連結された、本明細書に記載される RSV F タンパク質に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又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。

【0120】

第 1 の態様の特に好ましい実施形態においては、本発明の人工 RNA は、a-1 (HSD17B4/PSMB3)、a-4 (NDUFA4/PSMB3)、c-1 (NDUFA4/RPS9)、e-4 (NOSIP/RPS9)、g-2 (NDUFA4/CASP1)、i-2 (RPL32/ALB7)、又は i-3 (アルファグロビン (muag)) に係る UTR エlement を含む。

【0121】

第 1 の態様の特に好ましい実施形態においては、本発明の人工 RNA は、a-1 (HSD17B4/PSMB3) に係る UTR エlement を含む。

【0122】

本発明は、上に定義した少なくとも 1 つの異種 5'-UTR 及び／又は上に定義した少なくとも 1 つの異種 3'-UTR と、前記 3'-UTR 及び／又は 5'-UTR に機能可能に連

10

20

30

40

50

結された少なくとも1つのコード配列とを含み、前記コード配列が、呼吸器合胞体ウイルス（「RSV」）に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片又はバリエントをコードする人工核酸、好ましくはワクチン接種に適したRNAに関する。

【0123】

本明細書で使用する時、「呼吸器合胞体ウイルス」という用語又は対応する略称「RSV」は、任意の起源の呼吸器合胞体ウイルスを含む、特定のウイルス株、バリエント、血清型、又は分離株などに限定されない。

【0124】

様々な実施形態によれば、人工RNA、好ましくは人工RNAのコード配列は、ウイルスに由来する核酸配列を含む又はからなり、NCBI分類ID（「NCBI-ID」）を以下のリスト1に提供する。

【0125】

リスト1：RSVウイルス株：

ヒトオルトニューモウイルス、HRSV（NCBI-ID 11250）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスA、HRSV-A、呼吸器合胞体ウイルスグループA（NCBI-ID 208893）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスA株ロング、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（サブグループA／株ロング）（NCBI-ID 11260）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスA2、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株A2）、HRSVA（NCBI-ID 11259）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB1734）、（NCBI-ID 11253）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB5857）（NCBI-ID 11254）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB6190）、（NCBI-ID 11255）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB6256）、（NCBI-ID 11256）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB642）、（NCBI-ID 11252）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSB6614）、（NCBI-ID 11257）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスB、HRSV-B、呼吸器合胞体ウイルスグループB、（NCBI-ID 208895）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス9320（NCBI-ID 253182）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスB1（NCBI-ID 79692）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（サブグループB／株18537）、（NCBI-ID 11251）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（サブグループB／株8／60）、（NCBI-ID 11258）；ヒト呼吸器合胞体ウイルスS2、（NCBI-ID 410078）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス株RSS-2、（NCBI-ID 11261）；未分類ヒト呼吸器合胞体ウイルス、（NCBI-ID 410233）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP112／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410237）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP120／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410238）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP121／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410239）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP122／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410247）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP13／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410241）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP140／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410248）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP16／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410242）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP171／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410246）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP183／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410249）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP191／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410240）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP199／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410250）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP212／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410251）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP41／スウェーデン／02-03）、（NCBI-ID 410234）；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（株RSP45／スウェーデン／

10

20

30

40

50

02-03)、(NCBI-ID 410235); ヒト呼吸器合胞体ウイルス(株 RSP56/スウェーデン/02-03)、(NCBI-ID 410243); ヒト呼吸器合胞体ウイルス(株 RSP58/スウェーデン/02-03)、(NCBI-ID 410236); ヒト呼吸器合胞体ウイルス(株 RSP67/スウェーデン/02-03)、(NCBI-ID 410244); ヒト呼吸器合胞体ウイルス(株 RSP94/スウェーデン/02-03)(NCBI-ID 410245); 呼吸器合胞体ウイルス分離株 RSV メンフィス-37、(株メンフィス-37)(NCBI-ID 12814)。

【0126】

本発明の好ましい実施形態においては、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、呼吸器合胞体ウイルス分離株 RSV メンフィス-37 (株メンフィス-37) (NCBI-ID: 12814) に由来する。ST25 配列表に含まれる情報を含む本発明全体を通して、略称「HRSV (メンフィス-37)」が、前記特に好ましい RSV ウイルスに使用される。

10

【0127】

本発明の好ましい実施形態においては、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、ヒト呼吸器合胞体ウイルス A2、ヒト呼吸器合胞体ウイルス(株 A2) (NCBI-ID: 11259) に由来する。ST25 配列表に含まれる情報を含む本発明全体を通して、略称「HRSV (A2)」が、前記特に好ましい RSV ウイルスに使用される。

【0128】

当業者はまた、本発明の教示を適合させ、本発明に係る RNA 構築物、組成物、及びワクチンを得るために、リスト1に提供される任意の RSV 株に由来するアミノ酸配列及び核酸配列を使用することができることを理解されたい。

20

【0129】

様々な実施形態においては、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の融合タンパク質 (F)、糖タンパク質 G、ショート疎水性タンパク質 SH、マトリックスタンパク質 M、核タンパク質 N、ラージポリメラーゼ L、M2-1 タンパク質、M2-2 タンパク質、リンタンパク質 P、非構造タンパク質 NS1、又は非構造タンパク質 NS2、又はその断片、バリエーション、若しくは誘導体から選択することができる。

【0130】

第1の態様の特に好ましい実施形態においては、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、RSV 融合 (F) タンパク質に由来する。これに関連して、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列は、RSV 融合タンパク質 F に由来する任意のペプチド又はタンパク質、又はその断片、バリエーション、若しくは誘導体から選択することができる。

30

【0131】

RSV F タンパク質は、最初、(宿主細胞の感染後) 完全長融合タンパク質 F (本明細書では「F0」と呼ぶ) と呼ばれる単一のポリペプチド前駆体として発現される。F0 は小胞体で三量体を形成し、2箇所の保存された部位で細胞/宿主のフューリン様プロテアーゼによって処理され、F1、F2、及び Pep27 ポリペプチドを生成する。Pep27 ポリペプチドは切除され、成熟 F タンパク質の一部を形成しない。F2 ポリペプチドは、F0 前駆体の N 末端部分に由来し、2つのジスルフィド結合を介して F1 ポリペプチドに結合する。F1 ポリペプチドは、F0 前駆体の C 末端部分に由来し、細胞質側末端に結合されている膜貫通ドメインを介して成熟 F タンパク質を膜に固定する。3つの F2-F1 ヘテロダイマーユニット (「プロトマー」) が集合して、成熟 F タンパク質を形成する。初期は、成熟 F タンパク質は準安定型である (本明細書では、「融合前コンフォメーション」と呼ぶ)。刺激に伴い、それは、ウイルスと標的細胞膜とを融合させる大きな不可逆的構造変化 (本明細書では、「融合後コンフォメーション」と呼ぶ) を受ける。

40

【0132】

したがって、第1の態様の人工 RNA、好ましくはワクチン接種に適した人工 RNA は

50

、RSV Fタンパク質又はその断片若しくはバリエーションに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする。

【0133】

好ましい実施形態においては、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、以下のリスト2に提供されるアミノ酸配列（NCBIタンパク質アクセッション番号）のいずれかに由来することができる。

【0134】

リスト2：RSV融合（F）タンパク質のNCBIタンパク質アクセッション番号：

アクセッション番号タンパク質、AJF44801.1、AJF44759.1、AJF44661.1、AJF44602.1、2207424A、AAB38520.1、AAB38517.1、AAB38519.1、AAB38518.1、AVQ93587.1、AVQ93599.1、AVQ93571.1、AVQ93568.1、AVQ93589.1、AVQ93597.1、AVQ93563.1、AVQ93594.1、AVQ93606.1、AVQ93601.1、AVQ93562.1、AVQ93561.1、AVQ93607.1、AVQ93588.1、AVQ93575.1、AVQ93468.1、AVQ93467.1、AVQ93590.1、AVQ93552.1、AVQ93556.1、AVQ93471.1、AVQ93458.1、AVQ93494.1、AVQ93470.1、AVQ93489.1、AVQ93542.1、AVQ93472.1、AVQ93514.1、AVQ93485.1、AVQ93533.1、AVQ93481.1、AVQ93546.1、AVQ93512.1、AVQ93554.1、AVQ93551.1、AVQ93547.1、AVQ93558.1、AVQ93461.1、AVQ93500.1、AVQ93426.1、AVQ93398.1、AVQ93401.1、AVQ93361.1、AVQ93408.1、AVQ93443.1、AVQ93429.1、AVQ93359.1、AVQ93365.1、AVQ93366.1、AVQ93402.1、AVQ93377.1、AVQ93412.1、AVQ93391.1、AVQ93457.1、AVQ93372.1、AVQ93455.1、AVQ93364.1、AVQ93378.1、AVQ93393.1、AVQ93362.1、AVQ93585.1、ART28504.1、AVQ93404.1、AOS49123.1、AOS48496.1、AMT78271.1、AHX57174.1、AHW81390.1、AHV81506.1、AFX60128.1、AFX60129.1、AEQ63389.1、ARB66328.1、ANZ80034.1、AMN91253.1、P03420.1、AIO08046.1、NP_056863.1、AFX60234.1、AFX60231.1、AFX60232.1、AFX60222.1、AFX60219.1、AFX60215.1、AFX60214.1、AFX60212.1、AFX60208.1、AFX60202.1、AFX60220.1、AFX60213.1、AFX60190.1、AFX60187.1、AFX60201.1、AFX60173.1、AFX60169.1、AFX60162.1、AFX60156.1、AFX60151.1、AFX60150.1、AFX60148.1、AFX60141.1、AFX60127.1、AFX60137.1、AFX60135.1、AFV46420.1、AFX60200.1、AFV46419.1、AFV46417.1、AFV46413.1、AFV46414.1、AFV46410.1、AFV46403.1、AFV46409.1、AFP99061.1、AFM95400.1、AFV46401.1、AFP99064.1、AFM95376.1、AFX60138.1、AFP99060.1、AFM95365.1、AFM55563.1、AFM55530.1、AFM55442.1、AFM55420.1、AFM55552.1、AFM55365.1、AFP99059.1、AFM95385.1、AFM55354.1、AFM55343.1、AFM55387.1、AFM55299.1、AFM55288.1、AFM55266.1、AFM55277.1、AFM55255.1、AFM55222.1、AFM55211.1、AFI25262.1、AFD34266.1、AFM55332.1、AFD342

10

20

30

40

50

64. 1、AFD34262. 1、AFD34265. 1、AFD34261. 1、AFD34260. 1、AFD34259. 1、AEQ63641. 1、AEQ63487. 1、AEQ63520. 1、AEQ63378. 1、AEQ63367. 1、4CCF__A、AEQ63334. 1、AEO45949. 1、AEO45939. 1、AEQ63312. 1、AEQ63586. 1、AEO45919. 1、AEO45909. 1、AEO45889. 1、AEO45879. 1、AEO45869. 1、AEO45929. 1、AEO45850. 1、AEO45859. 1、AEQ63444. 1、AEO23054. 1、AEO23052. 1、AEO23051. 1、AEC32087. 1、ADZ95785. 1、AEC32085. 1、ADZ95784. 1、ADZ95783. 1、ADZ95782. 1、ADZ95781. 1、ADZ95779. 1、ADZ95780. 1、ADZ95777. 1、ADZ95778. 1、ADZ95776. 1、ADZ95775. 1、ACY68435. 1、ACO83302. 1、ABI35685. 1、AFI25251. 1、AAX23994. 1、AAQ97026. 1、AAR14266. 1、AAQ97027. 1、AAQ97030. 1、AAQ97028. 1、AAC57027. 1、AAQ97029. 1、AAQ97031. 1、AAM68160. 1、AAM44851. 1、P11209. 2、P13843. 1、AAO72325. 1、AAM68157. 1、CAA26143. 1、1512372A、AAB86664. 1、AAO72324. 1、AAB82446. 1、AAO72323. 1、AAM68154. 1、AAA47410. 1、P12568. 1、ARB07894. 1、AGG39517. 1、BBC54612. 1、BBC54636. 1、BBC54627. 1、BBC54621. 1、BBC54570. 1、BBC54579. 1、BBC54595. 1、BBC54555. 1、BBC54552. 1、BBC54564. 1、BBC54581. 1、BBC54571. 1、BBC54553. 1、BBC54565. 1、BBC54245. 1、BBC54243. 1、BBC54238. 1、BBC54242. 1、BBC54239. 1、BBC54235. 1、BBC54234. 1、BBC54236. 1、BBC54244. 1、BBC54186. 1、BBC54178. 1、BBC54202. 1、BBC54151. 1、BBC54142. 1、BBC54134. 1、BBC54170. 1、BBC54210. 1、BBC54169. 1、BBC54213. 1、BBC54203. 1、BBC54160. 1、BBC54163. 1、BBC54215. 1、BBC54156. 1、BBC54179. 1、BBC54150. 1、BBC54207. 1、BBC54194. 1、BBC54149. 1、BBC54138. 1、BBC54199. 1、BBC54220. 1、BBC54181. 1、BBC54132. 1、BBC54146. 1、BBC54122. 1、BBC54124. 1、BBB35202. 1、BBB35201. 1、BBB35192. 1、BBB35193. 1、BBB35199. 1、BBB35184. 1、BBB35126. 1、BBB35133. 1、BBB35130. 1、BBB35160. 1、BBB35162. 1、BBB35181. 1、BBB35165. 1、BBB35121. 1、BBB35138. 1、BBB35176. 1、BBB35142. 1、BBB35136. 1、BBB35153. 1、BBB35115. 1、BBB35150. 1、BBB35097. 1、BBB35109. 1、BBB35094. 1、BBB35183. 1、BBB35104. 1、BBB35099. 1、BBB35188. 1、AKA45871. 1、ASV65838. 1、AGG39373. 1、AII22107. 1、AGG39400. 1、AGG39457. 1、ARR29240. 1、ARR29251. 1、ARR29189. 1、ARR29207. 1、AUH15164. 1、ATV81343. 1、AUC68654. 1、AUC68577. 1、AUC68566. 1、AUC68555. 1、AUC68478. 1、AUC68445. 1、AUC68500. 1、AUC68522. 1、AUC68291. 1、AUC68149. 1、AUC68094. 1、AMA67097. 1、AMA66866. 1、AMA66580. 1、AIZ95750. 1、AIZ95541. 1、AIZ95519. 1、AHY21419. 1、AHY21331. 1、AHY21165. 1、AHY21

10

20

30

40

50

143. 1、AHY21132. 1、AGG39478. 1、ATV93506. 1、A
TV93509. 1、AIZ95717. 1、ATV81354. 1、ART28317
. 1、BBA57890. 1、BBA57901. 1、ASZ70099. 1、ART2
8361. 1、AQX36844. 1、ASK05520. 1、ART28427. 1、
ART28339. 1、ART28297. 1、ART28328. 1、ARQ1596
6. 1、ARN61507. 1、ARA15413. 1、AGG39394. 1、APW
78845. 1、APW78867. 1、APW78900. 1、APW78878. 1
、APW78779. 1、APW78702. 1、APW78713. 1、APW786
80. 1、APW78658. 1、APW78647. 1、APW78636. 1、AO
S48870. 1、APW78614. 1、AMT78905. 1、AMT77402.
1、AOZ15479. 1、AGN28484. 1、AHX57240. 1、AHX57
031. 1、AOS48980. 1、AOS48848. 1、AOS48815. 1、A
OS48738. 1、AOS49068. 1、AOS48727. 1、AOS48716
. 1、AOS48683. 1、AOS48551. 1、AOS48485. 1、AOS4
8518. 1、AOS48441. 1、AOS48397. 1、AOS48375. 1、
AOS48353. 1、AOS48287. 1、AOS48320. 1、AOS4826
5. 1、AOS48254. 1、AOS48221. 1、ANZ79638. 1、ALC
74025. 1、AHV81286. 1、AOD40888. 1、AOD40516. 1
、AOD40214. 1、AOD40125. 1、AOD40104. 1、AOD400
82. 1、AOD39908. 1、AJF44826. 1、AJF44506. 1、AJ
F44535. 1、ANZ80463. 1、ANZ80408. 1、ANZ80397.
1、ANZ80386. 1、ANZ80331. 1、ANZ80320. 1、ANZ80
364. 1、ANZ80276. 1、ANZ80221. 1、ANZ80188. 1、A
NZ80144. 1、ANZ80133. 1、ANZ80111. 1、ANZ80122
. 1、ANZ80056. 1、ANZ80012. 1、ANZ80067. 1、ANZ7
9979. 1、ANZ79935. 1、ANZ79990. 1、ANZ79902. 1、
ANZ79759. 1、ANZ79715. 1、ANZ79671. 1、AMT7971
8. 1、AMT79586. 1、AMT79553. 1、AMT79542. 1、AMT
79476. 1、AMT79388. 1、AMT79201. 1、AMT79190. 1
、AMT79157. 1、AMT79124. 1、AMT79091. 1、AMT790
47. 1、AMT79014. 1、AMT79003. 1、AMT78872. 1、AM
T78832. 1、AMT78689. 1、AMT78645. 1、AMT78513.
1、AMT78480. 1、AMT78447. 1、AMT78392. 1、AMT78
194. 1、AMT78084. 1、AMT78051. 1、AMT77963. 1、A
MT77908. 1、AMT77776. 1、AMT77710. 1、AMT77424
. 1、AMN91385. 1、AMN91264. 1、AMN91242. 1、AHX5
7504. 1、CUS01881. 1、CUS01880. 1、CUS01877. 1、
CUS01874. 1、CUS01870. 1、CUS01875. 1、AMA6735
0. 1、AMA67251. 1、AMA67262. 1、AMA67229. 1、AMA
67196. 1、AMA67130. 1、AMA67185. 1、AMA67163. 1
、AMA67086. 1、AMA67075. 1、AMA66998. 1、AMA669
87. 1、AMA66976. 1、AMA66965. 1、AMA66921. 1、AM
A66844. 1、AMA66833. 1、AMA66624. 1、AMA66613.
1、AMA66591. 1、AMA66569. 1、AMA66547. 1、AMA66
503. 1、AMA66492. 1、AMA66481. 1、AMA66448. 1、A
MA66415. 1、AMA66393. 1、AMA66360. 1、AGG39553
. 1、AGG39469. 1、AJZ70144. 1、AJZ70166. 1、AJZ7
0155. 1、AJZ70133. 1、AJZ70067. 1、AJZ70001. 1、
AJZ69990. 1、AJZ69968. 1、AJZ69946. 1、AJZ6991
3. 1、AJZ69880. 1、AJZ69847. 1、AJZ69869. 1、AJZ

10

20

30

40

50

69770. 1、AJZ69748. 1、AJZ69726. 1、AJZ69682. 1
、AJZ69671. 1、AJZ69704. 1、AJZ69660. 1、AJZ697
15. 1、AJZ69627. 1、AJZ69616. 1、AJZ69638. 1、AJ
O16077. 1、AJO16055. 1、AKE31881. 1、AKE31882.
1、AKE31878. 1、AJF44835. 1、AJF44790. 1、AJF44
737. 1、AJF44716. 1、AJF44725. 1、AJF44643. 1、A
JF44628. 1、AJF44624. 1、AJF44613. 1、AJF44566
. 1、AJF44555. 1、AJF44526. 1、AJF44517. 1、AKA4
5882. 1、AKA45849. 1、AHA83913. 1、AGN28715. 1、
AHA83902. 1、AHA83837. 1、AHA83826. 1、AHA8370
5. 1、AHA83630. 1、AGG39505. 1、AIY70242. 1、AIY
70198. 1、AII30203. 1、AHY21463. 1、AHY21397. 1
、AHY21320. 1、AHY21298. 1、AHY21287. 1、AHY212
76. 1、AHY21254. 1、AHY21199. 1、AHY21176. 1、AH
X57537. 1、AHX57471. 1、AHX57427. 1、AHX57042.
1、AIZ95981. 1、AIZ95893. 1、AIZ95871. 1、AIZ95
816. 1、AIZ95772. 1、AIZ95629. 1、AIZ95673. 1、A
IZ95596. 1、AIZ95585. 1、AIZ95552. 1、AEQ63553
. 2、AEQ63542. 2、AEQ63575. 1、AEQ63531. 1、AEQ6
3498. 1、AEQ63422. 1、AEQ63411. 1、AHX57570. 1、
AHX57152. 1、AHX57064. 1、AHX57009. 1、AHX5698
7. 1、AHV82100. 1、AHV82001. 1、AHV81891. 1、AHV
81880. 1、AHV81836. 1、AHV81682. 1、AHV81649. 1
、AHV81484. 1、AHV81462. 1、AHV81385. 1、AHV813
63. 1、AHV81330. 1、AHV81253. 1、AHV81154. 1、AH
V81122. 1、AHV81089. 1、AHV81012. 1、AHV80957.
1、AHV80880. 1、AHV80869. 1、AHV80836. 1、AHV80
803. 1、AGG39559. 1、AGG39562. 1、AGG39556. 1、A
GG39550. 1、AGG39547. 1、AGG39544. 1、AGG39541
. 1、AGG39529. 1、AGG39526. 1、AGG39523. 1、AGG3
9514. 1、AGG39502. 1、AGG39499. 1、AGG39496. 1、
AGG39493. 1、AGG39484. 1、AGG39490. 1、AGG3948
7. 1、AGG39475. 1、AGG39472. 1、AGG39466. 1、AGG
39463. 1、AGG39454. 1、AGG39442. 1、AGG39439. 1
、AGG39436. 1、AGG39415. 1、AGG39403. 1、AGG393
97. 1、AGG39391. 1、AGG39379. 1、AHL84194. 1、AH
A84012. 1、AHJ60043. 1、BAO49770. 1、BAO49766.
1、BAO49767. 1、AHA84034. 1、AHA84023. 1、AHA83
990. 1、AHA83957. 1、AHA83924. 1、AHA83891. 1、A
HA83880. 1、AHA83782. 1、AHA83760. 1、AHA83694
. 1、AGT75357. 1、AGN92848. 1、AGN28792. 1、AGN2
8781. 1、AGN28759. 1、AGN28748. 1、AGN28693. 1、
AGN28638. 1、AGN28627. 1、AGN28539. 1、AGN2852
8. 1、AGN28462. 1、AGN28440. 1、AGL96787. 1、AGL
96786. 1、AGL96784. 1、AAS93662. 1、AAS93657. 1
、AAS93656. 1、AAS93659. 1、AAS93660. 1、AAS936
63. 1、AAS93664. 1、AAS93655. 1、CUS01869. 1、AH
G54517. 1、ASF87348. 1、ASF87341. 1、ASF87344.
1、ASF87351. 1、ASF87338. 1、ASF87342. 1、ASF87
352. 1、ASF87337. 1、ASF87336. 1、AEQ98756. 1、A

10

20

30

40

50

EQ98757. 1、AEQ98755. 1、AEQ98752. 1、AEQ98753. 1、AEQ98747. 1、ASF87325. 1、ASF87326. 1、5W23_A、5EA3_F、5UDD_A、5EA8_F、AHG54458. 1、AEN74947. 1、AHG54485. 1、AHG54477. 1、AHG54451. 1、AHG54463. 1、AHG54445. 1、AEO12131. 1、AEN74945. 1、AEN74944. 1、ASF87335. 1、AHG54515. 1、AHA61605. 1、AHV81660. 1、AHG54441. 1、又はAIY60640. 1。

【0135】

本発明の文脈において、「RSV Fタンパク質」、「RSV融合タンパク質(F)」、「RSV F」、又は「F」は、その最も広い意味で理解することができ、F0 (Fポリペプチド前駆体)、F1、F2、及びPep27ポリペプチド、F2-F1ヘテロダイマー、又は成熟Fタンパク質(3つのF2-F1ヘテロダイマーを含む)、又はこれらのいずれかの断片及びバリエントを意味すると理解することができる。したがって、「RSV融合(F)タンパク質に由来するペプチド又はタンパク質」という用語は、例えば、F0 (Fタンパク質ポリペプチド前駆体)、F1、F2、及びPep27ポリペプチド、F2-F1ヘテロダイマー、又は成熟Fタンパク質に由来するペプチド、タンパク質、断片、又はバリエントを意味する。更に、「RSV融合(F)タンパク質に由来するペプチド又はタンパク質」という用語は、上に定義した「RSV Fタンパク質」又は「RSV融合タンパク質(F)」に由来するペプチド、タンパク質、断片、又はバリエントを意味し、これらは、例えば、特定のタンパク質エレメント(例えば、細胞質側末端、フューリン切断部位、Pep27)を欠如する、又は追加のエレメント(例えば、リンカーエレメント、異種シグナルペプチドなど)を含むように遺伝子改変することができる。例えば、「RSV融合(F)タンパク質に由来するペプチド又はタンパク質」という用語は、F0、F-del、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut8、F-del_DSCav1_mut0(これらの構築物の説明については、表1を参照)に由来するペプチド、タンパク質、断片、又はバリエントを意味する。第1の態様のRNAによってコードされ得る特に好適なFタンパク質バリエントを、以下に特定し、表1に示す。

【0136】

RSV Fタンパク質におけるアミノ酸(aa)残基及びそれらの位置に言及する場合、本明細書で使用される任意の番号付け(特段の断りが無い限り)は、HRSV(A2)(配列番号68)の対応するF0前駆体タンパク質又はHRSV(メンフィス-37)の対応するF0前駆体タンパク質(配列番号8937又は11726)におけるそれぞれのaa残基の位置に関し、位置「1」は、1番目のaa残基、即ち、HRSV(A2)F0前駆体タンパク質又はHRSV(メンフィス-37)F0前駆体タンパク質のN末端のaa残基に対応することに留意すべきである。

【0137】

好ましい実施形態では、第1の態様のRNAの少なくとも1つのコード配列は、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、RSV Fタンパク質は、完全長Fタンパク質(F0)又はC末端が欠失したFタンパク質(F-del)、又はその断片若しくはバリエントである。

【0138】

この文脈では、任意のRSV F完全長タンパク質(前駆体タンパク質、「F0」と呼

ばれる)を好適な抗原として使用することができ、好ましくは、リスト2に提供される任意のNCBIタンパク質アクセッション番号に由来する又は配列番号68、8279~8967、又は11726のいずれかから選択することができる。本発明の好ましい実施形態では、HRSV(A2)の完全長Fタンパク質(F0)(配列番号68)が好適に使用される(表1を参照)。本発明の他の好ましい実施形態においては、HRSV(メンフィス-37)の完全長Fタンパク質(F0)(配列番号8937又は11726)が好適に使用される(表1を参照)。

【0139】

これに関連して、C末端が欠失した任意のRSV F(F-del)を好適な抗原として使用することができ、好ましくは、リスト2に示される任意のNCBIタンパク質アクセッション番号に由来することができる、又は配列番号483、8968~9683、又は12095いずれかから選択することができる。そのような欠失バリエーションの例は、(Oomensら、2006、J. Virol. 80(21):10465~77)によるRSV-Fdel554-574タンパク質であり、全長F0タンパク質のaa残基554-574が除去されている。F0の細胞質側末端(aa554-574)の主要部分を欠失すると、インビトロでの細胞内輸送/細胞表面輸送の改善につながり、RSV Fの細胞表面発現が大幅に増加する。細胞表面の提示が増加すると、B細胞の認識が向上する(これは、公開データと一致する;国際公開第2015024668号を参照)。本発明の好ましい実施形態においては、本明細書で「F-del」(配列番号483、9653、又は12095)と呼ばれる、C末端が欠失したFタンパク質が好適に使用される(表1を参照)。異なるRSV株間でのRSV Fタンパク質の構造上の保存レベルが高いことに照らすと(例えば、Hauserら、2017、PLOS ONE 12(6):e0180623を参照)、aa554-574の欠失は、各種RSV分離株の各種RSV Fタンパク質配列に適用可能である。

【0140】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、前記RSV Fタンパク質は、融合前コンフォメーションで抗原を安定化するように設計される。中和抗体のためのいくつかの潜在的エピトープは、前記タンパク質コンフォメーションにおいて接近可能であるので、融合前コンフォメーションは、効率的なRSVワクチンの場合において特に有利である。

【0141】

いくつかの実施形態では、RSV Fタンパク質は、融合前コンフォメーションでFタンパク質を安定化させる1以上のアミノ酸置換、例えば、Fタンパク質の膜遠位部(F1ポリペプチドのN末端領域を含む)を安定化させる置換を融合前コンフォメーションを含む。例えば、アミノ酸置換は、非天然ジスルフィド結合を導入することができ、又はキャビティを満たすアミノ酸置換であることができる。

【0142】

したがって、いくつかの実施形態では、好ましいRSV Fタンパク質は、融合前コンフォメーション(即ち、1以上の融合前仕様抗体に特異的に結合する、及び/又はRSV Fタンパク質の融合後構造ではなく融合前構造に存在する好適な抗原性部位を示すコンフォメーション)でタンパク質を安定化させる非天然ジスルフィド結合を形成するS155C及びS290C置換を含む。更なる実施形態において、組換えRSV Fタンパク質は、位置190、位置207、又は位置190及び207にF、L、W、Y、H、又はM置換を更に含むことができる。

【0143】

融合前コンフォメーションで抗原を安定化させるように設計されたRSV Fタンパク質の例は、DSCav1変異(S155C、S290C、S190F、及びV207L)を含むRSV Fタンパク質、又はその断片若しくはバリエーションである。そのようなRSV F DSCav1タンパク質は、当技術分野において記載されている(国際公開第201

10

20

30

40

50

4160463号)。

【0144】

したがって、特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、RSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、RSV Fタンパク質は、DSCav1変異(S155C、S290C、S190F、及びV207L)、又はその断片若しくはバリエーションを含む。

【0145】

本発明の文脈では、RSV Fを、S155C、S290C、S190F、及びV207Lの位置で変異させて、融合前コンフォメーションのタンパク質を安定化させることができ、本発明の文脈で好適に使用することができることが理解されるべきである。したがって、上に提供し任意のNCBIタンパク質アクセッション番号、又は配列番号68、8279～8967、483、8968～9683、12095、又は11726から選択される任意のタンパク質、又はそれらの断片若しくはバリエーションは、S155C、S290C、S190F、及びV207Lによるアミノ酸変化を導入して、各種RSV F DSCav1タンパク質を生成するために当業者によって選択することができる。

【0146】

好ましい実施形態においては、HRSV(A2)のRSV F完全長タンパク質(前駆体タンパク質、「F0」)(配列番号68)を使用し、S155C、S290C、S190F、及びV207Lのアミノ酸変化を導入することによって、配列番号898に係るアミノ酸配列がもたらされる。そのようなRSV Fタンパク質は、本発明全体を通して、本明細書では、「F0_DSCav1」と呼ばれる(表1を参照(好ましいRSV Fタンパク質抗原設計))。

【0147】

他の好ましい実施形態においては、HRSV(A2)(配列番号483)のRSV F__delタンパク質(細胞質側末端(aa554-574)が欠失した)を使用し、S155C、S290C、S190F、及びV207Lアミノ酸変化を導入することによって、配列番号1267に係るアミノ酸配列がもたらされる。そのようなRSV Fタンパク質は、本発明全体を通して、本明細書では、「F-del__DSCav1」と呼ばれる(表1を参照(好ましいRSV Fタンパク質抗原設計))。

【0148】

好ましい実施形態においては、HRSV(メンフィス-37)のRSV F完全長タンパク質(前駆体タンパク質、「F0」)(配列番号8937又は11726)を使用して、S155C、S290C、S190F、及びV207Lのアミノ酸変化を導入することにより、配列番号16464に係るアミノ酸配列がもたらされる。そのようなRSV Fタンパク質は、本発明全体を通して、本明細書では、「F0_DSCav1」と呼ばれる(表1を参照(好ましいRSV Fタンパク質抗原設計))。

【0149】

他の好ましい実施形態においては、HRSV(メンフィス-37)のRSV F__delタンパク質(細胞質側末端(aa554-574)が欠失)(配列番号9653又は12095)を使用し、S155C、S290C、S190F、及びV207Lのアミノ酸変化を導入することによって、配列番号12833に係るアミノ酸配列がもたらされる。このようなRSV Fタンパク質は、本発明全体を通して、本明細書では、「F-del__DSCav1」と呼ばれる(表1を参照(好ましいRSV Fタンパク質抗原設計))。

【0150】

好ましい実施形態においては、少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質は、成熟Fの2つのサブユニットF1及びF2を1本のポリペプチド鎖として含有する操作されたタンパク質であることができ、F2及びF1は、好ましくはリンカー(GS)を介して接続されている。前記操作されたF2-リンカー-F1融合タンパク質(例えば、F(1-103)-GS-F(145-574)又はF(1-103)-GS-F(145-553))の例は、当技術分野において記載されている(Joyce, M. Gordonら

10

20

30

40

50

、 “ Iterative structure-based improvement of a fusion-glycoprotein vaccine against RSV . ” Nature structural & molecular biology 23.9 (2016) : 811 ; 国際公開第2017172890号) 。 前記 F2-リンカー-F1 RSV Fタンパク質は、 aa104~144 (フューリン切断部位及び P e p 27を含む) を含まず、 F2ポリペプチドと F1ポリペプチドとの間にリンカーエレメント (例えば、 GSリンカー) を含む。 前記 F2-リンカー-F1タンパク質は、 安定性及び／又は抗原性の点で優れた性質を示すことができる。

【0151】

したがって、 好ましい実施形態においては、 RSV Fタンパク質は、 1本のポリペプチド鎖に融合された2つのサブユニット F2及び F1を含み、 F2及び F1は、 リンカーエレメント、 好ましくは本明細書で特定される GSリンカーを介して接続され、 好ましくは安定した F2-リンカー-F1タンパク質を生成する。

10

【0152】

好ましくは、 前記 F2-リンカー-F1融合タンパク質、 例えば、 F (1-103) -GS-F (145-574) 又は F (1-103) -GS-F (145-553) は、 上に概説した DScav1変異 (本明細書では、 「mut0」と呼ぶ ; 例えば、 配列番号3850、 4219又は13940、 14309) を更に含む。

【0153】

特に好ましい実施形態においては、 RSV Fタンパク質は、 (S46G、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q)、 (S46G、 E92D、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q)、 (S46G、 N67I、 E92D、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q)、 (A149C、 Y458C)、 (N183GC、 N428C)、 (Q98C、 Q361C、 S46G、 E92D、 L95M、 S215P、 I217P、 I221M、 R429K、 K465Q)、 (Q98C、 Q361C、 L95M、 I221M、 R429K)、 又は (N183GC、 N428C、 S46G、 N67I、 E92D、 S215P、 K465Q)、 又はそれらの断片若しくはバリエーションから選択される少なくとも1つの更なる変異を更に含むことができる。

20

【0154】

特に好ましい実施形態においては、 前記 F2-リンカー-F1タンパク質 (F (1-103) -GS-F (145-574) 又は F (1-103) -GS-F (145-553)) は、 好ましくは DScav1変異に加えて、 S46G、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q (本明細書では、 「mut1」と呼ぶ ; 例えば、 配列番号1636、 2005、 又は14678、 15047) ; 又は S46G、 E92D、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q (本明細書では、 「mut2」と呼ぶ ; 例えば、 配列番号2374、 2743又は15416、 15785) ; 又は S46G、 N67I、 E92D、 A149C、 S215P、 Y458C、 K465Q (本明細書では、 「mut3」と呼ぶ ; 例えば、 配列番号3112、 3481又は13202、 13571) から選択される少なくとも1つの変異、 又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエーションを更に含むことができる (表1を参照 (好ましい RSV Fタンパク質抗原設計)) 。

30

40

【0155】

他の実施形態においては、 前記 F2-リンカー-F1タンパク質 (F (1-103) -GS-F (145-574) 又は F (1-103) -GS-F (145-553)) は、 好ましくは DScav1変異に加えて、 A149C、 Y458C (本明細書では、 「mut4」と呼ぶ、 例えば、 配列番号4588、 4957又は16154、 16523) ; 又は N183GC、 N428C (本明細書では、 「mut5」と呼ぶ、 例えば、 配列番号5326、 5695又は16892、 17261) ; 又は Q98C、 Q361C、 S46G、 E92D、 L95M、 S215P、 I217P、 I221M、 R429K、 K465Q (本明細書では、 「mut6」と呼ぶ、 例えば、 配列番号6064、 6433又は17630、 17999) ; 又は Q98C、 Q361C、 L95M、 I221M、 R429K (

50

本明細書では、「mut 7」と呼ぶ、例えば、配列番号 6802、7171 又は 18368、18737) ; 又は N183GC、N428C、S46G、N67I、E92D、S215P、K465Q (本明細書では、配列番号 7540、7909 又は 19106、19475) から選択される少なくとも 1 つの変異、又はこれら断片若しくはバリエントを更に含むことができる。

【0156】

本発明の文脈において、任意の RSV F は、2 個のサブユニット F1 及び F2 が 1 本のポリペプチド鎖に含まれるように (F2 及び F1 は、リンカー、例えば、変異「mut 1」、「mut 2」、及び「mut 3」について説明されるタンパク質の安定性を高めるための (GS) リンカーを介して連結することができる)、例えば、F0 ポリペプチド鎖の aa104~144 を欠失させることによって (上で説明)、上で説明される F2 と F1 との間にリンカーエレメントを導入することによって、及び上で説明される好適なアミノ酸置換を導入することによって、適合させることができることが理解されるべきである。したがって、上に提供される NCBI タンパク質アクセッション番号 (リスト 2 を参照)、又は配列番号 68、8279~8967、483、8968~9683、11726、12095 から選択される任意のタンパク質、又はそれらの断片若しくはバリエントを、本明細書で概説するように F2-リンカー-F1 融合タンパク質を生成するように当業者であれば適合させることができ、(S46G、A149C、S215P、Y458C、K465Q)、(S46G、E92D、A149C、S215P、Y458C、K465Q)、(S46G、N67I、E92D、A149C、S215P、Y458C、K465Q)、(A149C、Y458C)、(N183GC、N428C)、(Q98C、Q361C、S46G、E92D、L95M、S215P、I217P、I221M、R429K、K465Q)、(Q98C、Q361C、L95M、I221M、R429K)、又は (N183GC、N428C、S46G、N67I、E92D、S215P、K465Q) aa 置換及び/又は DSCav1 変異を導入することによって更に適合させることができる。更に、上で概説した GS リンカーの使用とは別に、当業者であれば言うまでもなく、各種の知られたリンカーエレメントから選択して、類似した同様に好適な RSV F タンパク質バリエント (例えば、国内公開第 2017/172890 号の配列番号 117~162 又はこれらの配列の断片若しくはバリエントから選択される、又は国内公開第 2017/081082 号の配列番号 1509~1565 又はこれらの配列の断片若しくはバリエントから選択される) に到達することができる。

【0157】

好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1 タンパク質 (F(1-103)-GS-F(145-574) 又は F(1-103)-GS-F(145-553)) は、上で概説した DSCav-1 変異を含む (本明細書では、F__DSCav1__mut0 又は F-del__DSCav1__mut0 と呼ぶ)。好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1 タンパク質 (F(1-103)-GS-F(145-574) 又は F(1-103)-GS-F(145-553)) は、上で概説した DSCav-1 変異と、上で定義したアミノ酸置換 mut1 を更に含む (本明細書では、F__DSCav1__mut1 又は F-del__DSCav1__mut1 と呼ぶ)。好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1 タンパク質 (F(1-103)-GS-F(145-574) 又は F(1-103)-GS-F(145-553)) は、上で概説した DSCav-1 変異と、上で定義したアミノ酸置換 mut2 を更に含む (本明細書では、F__DSCav1__mut2 又は F-del__DSCav1__mut2 と呼ぶ)。好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1 タンパク質 (F(1-103)-GS-F(145-574) 又は F(1-103)-GS-F(145-553)) は、上で概説した DSCav-1 変異と、上で定義したアミノ酸置換 mut3 を更に含む (本明細書では、F__DSCav1__mut3 又は F-del__DSCav1__mut3 と呼ぶ)。好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1 タンパク質 (F(1-103)-GS-F(145-574) 又は F(1-103)-GS-F(145-553)) は、上で概説した DSCav-1 変異

と、上で定義したアミノ酸置換mut 4を更に含む（本明細書では、F__DSCav1__mut 4又はF-del__DSCav1__mut 4と呼ぶ）。好ましい実施形態では、F2-リンカー-F1タンパク質（F（1-103）-GS-F（145-574）又はF（1-103）-GS-F（145-553）は、上で概説したDSCav-1変異と、上で定義したアミノ酸置換mut 5を更に含む（本明細書では、F__DSCav1__mut 5又はF-del__DSCav1__mut 5と呼ぶ）。好ましい実施形態では、F2-リンカー-F1タンパク質（F（1-103）-GS-F（145-574）又はF（1-103）-GS-F（145-553）は、上で概説したDSCav-1変異と、上で定義したアミノ酸置換mut 6を更に含む（本明細書ではF__DSCav1__mut 6又はF-del__DSCav1__mut 6と呼ぶ）。好ましい実施形態においては、F2-リンカー-F1タンパク質（F（1-103）-GS-F（145-574）又はF（1-103）-GS-F（145-553）は、上で概説したDSCav-1変異と、上で定義したアミノ酸置換mut 7を更に含む（本明細書では、F__DSCav1__mut 7又はF-del__DSCav1__mut 7と呼ぶ）。好ましい実施形態では、F2-リンカー-F1タンパク質（F（1-103）-GS-F（145-574）又はF（1-103）-GS-F（145-553））は、上で概説したDSCav-1変異と、上で定義したアミノ酸置換mut 8を更に含む（本明細書では、F__DSCav1__mut 8又はF-del__DSCav1__mut 8と呼ぶ）。

【0158】

特に好ましいRSV Fタンパク質の詳細な説明を、表1に記載する。

【0159】

表1において、RSV Fタンパク質におけるアミノ酸（aa）残基及びそれらの位置に関する言及はいずれも、HRSV（A2）（配列番号68）又はHRSV（メンフィス-37）（配列番号8937又は11726）の対応するF0前駆体タンパク質における各aa残基の位置に関する。更に、表1における好適なRSV Fタンパク質抗原設計の略称は、本発明の説明全体で使用される（例えば、「F0」、「F-del」、「F0__DSCav1」、「F-del__DSCav1」、「F__DSCav1__mut1」、「F-del__DSCav1__mut1」、「F__DSCav1__mut2」、「F-del__DSCav1__mut2」、「F__DSCav1__mut3」、「F-del__DSCav1__mut3」、「F__DSCav1__mut4」、「F-del__DSCav1__mut4」、「F__DSCav1__mut5」、「F-del__DSCav1__mut5」、「F__DSCav1__mut6」、「F-del__DSCav1__mut6」、「F__DSCav1__mut7」、「F-del__DSCav1__mut7」、「F__DSCav1__mut8」、「F-del__DSCav1__mut8」、「F__DSCav1__mut0」、「F-del__DSCav1__mut0」）。表1の列Aは、HRSV（A2）に由来するそれぞれのRSV Fタンパク質抗原設計のタンパク質配列番号を提供し；表1の列Bは、HRSV（メンフィス-37）に由来するそれぞれのRSV Fタンパク質抗原設計のタンパク質配列番号を提供する。なお、本発明の説明は、本願のST25配列表の<223>識別子の下で提供される情報を明示的に含む。

【0160】

【表 1 - 1】

表 1 : 好ましい RSV Fタンパク質抗原設計

抗原名	タンパク質設計の説明	A	B
F0	aa1-574, 完全長 RSV F0 前駆体	68	8937, 11726
F-del	aa1-553, C 末端の aa 554-574 の欠失	483	9653, 12095
F0_DSCav1	aa1-574, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L	898	12464
F-del_DSCav1	aa1-553, C 末端の aa 554-574 の欠失, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L	1267	12833
F_DSCav1_mut0	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物 aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L	3850	13940
F-del_DSCav1_mut0	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物 aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L	4219	14309
F_DSCav1_mut1	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, A149C, S215P, Y458C, K465Q	1636	14678
F-del_DSCav1_mut1	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, A149C, S215P, Y458C, K465Q	2005	15047
F_DSCav1_mut2	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, E92D, A149C, S215P, Y458C, K465Q	2374	15416
F-del_DSCav1_mut2	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, E92D, A149C, S215P, Y458C, K465Q	2743	15785
F_DSCav1_mut3	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, N67I, E92D, A149C, S215P, Y458C, K465Q	3112	13202
F-del_DSCav1_mut3	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; S46G, N67I, E92D, A149C, S215P, Y458C, K465Q	3481	13571

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

F_DSCav1_mut4	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; A149C, Y458C	4588	16154
F-del_DSCav1_mut4	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; A149C, Y458C	4957	16523
F_DSCav1_mut5	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; N183GC, N428C	5326	16892
F-del_DSCav1_mut5	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; N183GC, N428C	5695	17261
F_DSCav1_mut6	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; Q98C, Q361C, S46G, E92D, L95M, S215P, I217P, I221M, R429K, K465Q	6064	17630
F-del_DSCav1_mut6	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; Q98C, Q361C, S46G, E92D, L95M, S215P, I217P, I221M, R429K, K465Q	6433	17999
F_DSCav1_mut7	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; Q98C, Q361C, L95M, I221M, R429K	6802	18368
F-del_DSCav1_mut7	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; Q98C, Q361C, L95M, I221M, R429K	7171	18737
F_DSCav1_mut8	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-574 F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; N183GC, N428C, S46G, N67I, E92D, S215P, K465Q	7540	19106
F-del_DSCav1_mut8	aa1-103 - GS(リンカー) - aa145-553 C 末端の aa 554-574 の欠失, F2-リンカー-F1 構築物, aa 置換: S155C, S290C, S190F, 及び V207L; N183GC, N428C, S46G, N67I, E92D, S215P, K465Q	7909	19475

【0161】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様に係る人工RNAは、RSV融合(F)タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、前記RSV Fタンパク質は、F0、F-del、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut

10

20

30

40

50

3、F-del_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut8（例えば、表1を参照）、又はこれらの断片若しくはバリエーションから選択される。

【0162】

本発明において、特に好ましく且つ有利なものは、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut8（例えば、表1を参照）、又はこれらの断片若しくはバリエーションから選択されるRSVタンパク質である。

【0163】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475（例えば、表1を参照）又は8279～9683のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなる少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、以下に説明するように、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0164】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475（例えば、表1を参照）のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなる少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、以下に説明するように、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0165】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号1267、2005、2743、3481、4219、4957、5695、6433、7171、7909、12833、14309、15047、15785、13571、16523、17261、17999、18737、19475（例えば、表1を参照）のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99

%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなる少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、以下に説明するように、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0166】

他の実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号8279～9683のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列の少なくとも1つ、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなる少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、以下に説明するように、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

10

【0167】

他の実施形態においては、本明細書に定義される人工RNAは、国際公開第2014/160463号の配列番号1～1428のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。この文脈において、国際公開第2014/160463号の配列番号1～1428及びそれらに関連する開示を、参照により本明細書に援用する。

20

【0168】

他の実施形態においては、本明細書に定義される人工RNAは、国際公開第2015/024668号の配列番号1～11のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。この文脈において、国際公開第2015/024668号の配列番号1～11及びそれらに関連する開示を、参照により本明細書に援用する。

30

【0169】

他の実施形態においては、本明細書に定義される人工RNAは、国際公開第2017/070622号の配列番号3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、243、又は245のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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。この文脈において、国際公開第2017/070622号の配列番号3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、243、又は245及びそれらに関連する開示を、参照により本明細書に援用する。

40

【0170】

他の実施形態においては、本明細書に定義される人工RNAは、国際公開第2017/172890号の配列番号1～65、81～95、110～116のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つのアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーションを含む又はからなるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質を

50

コードする少なくとも1つのコード配列を含む。この文脈において、国際公開第2017/172890号の配列番号1～65、81～95、110～116及びそれらに関連する開示を、参照により本明細書に援用する。

【0171】

別の好ましい実施形態によれば、本発明の人工RNAは、上で定義した少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードし、更に少なくとも1つの更なる異種ペプチド又はタンパク質エレメントをコードすることができる。

【0172】

好適には、少なくとも1つの更なるペプチド又はタンパク質エレメントは、本発明のコード化抗原性ペプチド又はタンパク質の分泌を促進する（例えば、分泌シグナル配列を介して）、本発明のコード化抗原性ペプチド又はタンパク質の原形質膜への結合を促進する（例えば、膜貫通エレメントを介して）、抗原複合体の形成を促進する（例えば、多量体化ドメインを介して）、ウイルス様粒子の形成を促進する（VLP形成配列）ことができる。更に、本発明に係る人工核酸配列は、ペプチドリinkerエレメント、自己切断ペプチド、免疫学的アジュバント配列、又は樹状細胞標的化配列を更にコードすることができる。好適な多量体化ドメインは、国際公開第2017/081082号の配列番号1116～1167に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。三量体化及び四量体化エレメントは、例えば、エンジニアードロイシンジッパー（平行三量体状態を採用するエンジニアード α -ヘリックスコイルドコイルペプチド）、腸内細菌ファージT4、GCN4pII、GCN4-pLI、及びp53に由来するフィブリチンフォールドドメインから選択することができる。その文脈において、腸内細菌ファージT4、GCN4pII、GCN4-pLI、及びp53からのフィブリチンフォールドドメインが好ましい。好適な膜貫通エレメントは、国際公開第2017/081082号の配列番号1228～1343に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適なVLP形成配列は、国際公開第2017/081082号の配列番号1168～1227に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適なペプチドリinkerは、国際公開第2017/081082号の配列番号1509～1565に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適な自己切断ペプチドは、国際公開第2017/081082号の配列番号1434～1508に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適な免疫学的アジュバント配列は、国際公開第2017/081082号の配列番号1360～1421に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適な樹状細胞（DC）標的化配列は、国際公開第2017/081082号の配列番号1344～1359に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。好適な分泌シグナルペプチドは、国際公開第2017/081082号の配列番号1～1115及び配列番号1728に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションから選択することができる。核酸レベルでは、そのようなアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列（例えば、RNA配列）を選択することができる。この文脈において、国際公開第2017/081082号の開示を、参照により本明細書に援用する。異種分泌シグナル配列は、コードされた抗原性ペプチド又はタンパク質の分泌を増加させることができる。

【0173】

実施形態によれば、分泌シグナル配列は、配列番号21329～21362のいずれかと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列、又はこれらの配列の断片若しくはバリエーションを含む。分泌シグナル配列をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

10

20

30

40

50

【0174】

好ましい実施形態によれば、人工核酸、特に人工RNAは、本明細書に定義されるRSVに由来する、好ましくはRSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質コードする少なくとも1つのコード配列、又はその断片及びバリエーションを含む。その文脈において、RSVに由来する、好ましくはRSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする任意のコード配列、又はその断片及びバリエーションは、好適なコード配列として理解することができ、したがって第1の態様の人工RNAに包含され得る。

【0175】

好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNAは、本明細書に定義されるRSV Fタンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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、好ましくは配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475のいずれか、又はそれらのバリエーションの断片をコードする少なくとも1つのコード配列を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475と同一であるアミノ酸配列、又はその断片若しくはバリエーションをコードする任意のRNA配列である、又は配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

【0176】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、配列番号8279～9683のいずれかをコードする少なくとも1つのコード配列又はそのバリエーションの断片を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、配列番号8279～9683と同一であるアミノ酸配列をコードする任意のRNA配列、又はその断片若しくはバリエーション、又は配列番号8279～9683のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

【0177】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2014/160463号の配列番号1～1428のいずれかコードする少なくとも1つのコード配列又はそのバリエーションの断片を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、国際公開第2014/160463号の配列番号1～1428と同一であるアミノ酸配列をコードする任意のRNA配列、又はその断片若しくはバリエーション、又は国際公開第2014/160463号の配列番号1～1428のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

10

【0178】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2015/024668号の配列番号1～11のいずれかコードする少なくとも1つのコード配列又はそのバリエーションの断片を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、国際公開第2015/024668号の配列番号1～11と同一であるアミノ酸配列をコードする任意のRNA配列、又はそれらの断片若しくはバリエーション、又は国際公開第2015/024668号の配列番号1～11のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

20

【0179】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2017/070622号の配列番号3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、243、又は245のいずれかコードする少なくとも1つのコード配列又はそのバリエーションの断片を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、国際公開第2017/070622号の配列番号3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、243、又は245と同一であるアミノ酸配列をコードする任意のRNA配列、又はそれらの断片若しくはバリエーション、又は国際公開第2017/070622号の配列番号3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、243、又は245のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

30

【0180】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2017/172890号の配列番号1～65、81～95、110～116のいずれかコードする少なくとも1つのコード配列又はそのバリエーションの断片を含む又はからなることができる。核酸レベルでは、任意の核酸配列、特に、国際公開第2017/172890号の配列番号1～65、81～95、110～116と同一であるアミノ酸配列をコードする任意のRNA配列、又はそれらの断片若しくはバリエーション、又は国際公開第2017/172890号の配列番号1～65、81～95、110～116のいずれかと少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする任意の核酸配列（例えば、DNA配列、RNA配列）を選

40

50

択することができ、したがって好適なコード配列として理解することができ、したがって本発明の第1の態様の人工RNAに包含され得ることが理解されるべきである。

【0181】

好適には、特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、前記5' - UTRと前記3' - UTRとの間、好ましくは前記5' - UTRの下流且つ前記3' - UTRの上流に位置するコード配列を含む。

【0182】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号69～482、484～897、899～1266、1268～1635、1637～2004、2006～2373、2375～2742、2744～3111、3113～3480、3482～3849、3851～4218、4220～4587、4589～4956、4958～5325、5327～5694、5696～6063、6065～6432、6434～6801、6803～7170、7172～7539、7541～7908、7910～8277、8278、11727～12094、12096～12463、12465～12832、12834～13201、13941～14308、14310～14677、14679～15046、15048～15415、15417～15784、15786～16153、13203～13570、13572～13939、16155～16522、16524～16891、16893～17260、17262～17629、17631～17998、18000～17998、18369～18736、18738～19105、19107～19474、19476～19843、21363～21706、又はこれらの配列のいずれかの断片、又は断片若しくはバリエーション（表3～6も参照）と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。これらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0183】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号69～77、484～492、899～906、1268～1275、1637～1644、2006～2013、2375～2382、2744～2751、3113～3120、3482～3489、3851～3858、4220～4227、4589～4596、4958～4965、5327～5334、5696～5703、6065～6072、6434～6441、6803～6810、7172～7179、7541～7548、7910～7917、21363～21384、11727～11734、12096～12103、12465～12472、12834～12841、13941～13948、14310～14317、14679～14686、15048～15055、15417～15424、15786～15793、13203～13210、13572～13579、16155～16162、16524～16531、16893～16900、17262～17269、17631～17638、18000～18007、18369～18376、18738～18745、19107～19114、19476～19483、21389～21410、又はこれらの配列のいずれかの断片、又は断片若しくはバリエーション（表3及び4も参照）と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。これらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0184】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2014/160463号の配列番号383～388又はこれらの配列のいずれかの断片又は断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89

10

20

30

40

50

%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。

【0185】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2015/024668号の配列番号12~22又はこれらの配列のいずれかの断片又は断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。

【0186】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2017/070622号の配列番号1、2、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、242、244、246、257、258~280又はこれらの配列のいずれかの断片又は断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。

【0187】

他の実施形態では、第1の態様の人工RNAは、国際公開第2017/172890号の配列番号96~99又はこれらの配列のいずれかの断片又は断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含むコード配列を含む。

【0188】

好ましい実施形態によれば、人工RNAは、修飾（改変）及び／又は安定化された人工RNAである。

【0189】

したがって、好ましい実施形態によれば、本発明の人工RNAは、「安定化された人工RNA」、即ち、インビボでの分解に対して改善された耐性を示すRNA、及び／又はインビボで改善された安定性を示す人工RNA、及び／又はインビボで改善された翻訳能を示す人工RNAとして提供することができる。以下に、人工RNAを「安定化」させるために好適である、この文脈における具体的で好適な修飾について記載する。

【0190】

このような安定化は、本明細書に明記される「乾燥RNA」及び／又は「精製RNA」を提供することによってもたらされ得る。それに代えて又はそれに加えて、そのような安定化は、例えば、本発明の人工RNAの修飾されたリン酸骨格によってもたらされ得る。本発明に関連する骨格修飾は、RNAに含まれるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学的に修飾される修飾である。これに関連して好ましく使用され得るヌクレオチドは、例えば、ホスホロチオアート修飾リン酸骨格（好ましくはリン酸骨格に含まれるリン酸酸素の少なくとも1つが硫黄原子で置換されている）を含む。安定化されたRNAは更に、例えば、非イオン性リン酸類似体、例えば、荷電ホスホン酸酸素がアルキル又はアリール基で置換されたアルキル及びアリールホスホン酸、又は荷電酸素残基がアルキル化された形態で存在するアルキルホスホトリエステル及びホスホジエステルなどを含み得る。このような骨格修飾は、通常、メチルホスホネート、ホスホリアミデート、及びホスホロチオアート（例えば、シチジン-5'-O-（1-チオホスファート））からなる群の修飾を含むが、これらに限定されない。

【0191】

以下に、本発明の人工RNAを「安定化」させることができる好適な修飾を記載する。

【0192】

実施形態によれば、本発明に係る人工RNAは、修飾された人工RNAであり、修飾は、骨格修飾及び糖修飾又は塩基修飾を含む化学修飾に関する。

【0193】

この文脈において、本明細書で定義される修飾人工RNAは、ヌクレオチドの類似体／修飾、例えば、骨格修飾、糖修飾、又は塩基修飾を含むことができる。本発明に関連する骨格修飾は、核酸、例えば、人工RNAに含まれるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学的に修飾される修飾である。本発明に関連する糖修飾は、本明細書で定義されるRNAのヌクレオチドの糖の化学修飾である。更に、本発明に関連する塩基修飾は、RNA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又は修飾は、好ましくは、転写及び／又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。

【0194】

本発明の特に好ましい実施形態では、修飾核酸又は特に本明細書に記載される修飾RNAに導入することができるヌクレオチド類似体／変異は、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド-5'-トリホスファート、2-アミノプリン-リボシド-5'-トリホスファート；2-アミノアデノシン-5'-トリホスファート、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン-トリホスファート、2-チオシチジン-5'-トリホスファート、2-チオウリジン-5'-トリホスファート、2'-フルオロチミジン-5'-トリホスファート、2'-O-メチル-イノシン-5'-トリホスファート、4-チオウリジン-5'-トリホスファート、5-アミノアシルシチジン-5'-トリホスファート、5-アミノアシルウリジン-5'-トリホスファート、5-ブロモシチジン-5'-トリホスファート、5-ブロモウリジン-5'-トリホスファート、5-ブロモ-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスファート、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン-5'-トリホスファート、5-ヨードシチジン-5'-トリホスファート、5-ヨード-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスファート、5-ヨードウリジン-5'-トリホスファート、5-ヨード-2'-デオキシウリジン-5'-トリホスファート、5-メチルシチジン-5'-トリホスファート、5-メチルウリジン-5'-トリホスファート、5-プロピニル-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスファート、5-プロピニル-2'-デオキシウリジン-5'-トリホスファート、6-アザシチジン-5'-トリホスファート、6-アザウリジン-5'-トリホスファート、6-クロロプリンリボシド-5'-トリホスファート、7-デアザアデノシン-5'-トリホスファート、7-デアザグアノシン-5'-トリホスファート、8-アザアデノシン-5'-トリホスファート、8-アジダデノシン-5'-トリホスファート、ベンズイミダゾール-リボシド-5'-トリホスファート、N1-メチルアデノシン-5'-トリホスファート、N1-メチルグアノシン-5'-トリホスファート、N6-メチルアデノシン-5'-トリホスファート、O6-メチルグアノシン-5'-トリホスファート、シュードウリジン-5'-トリホスファート、又はピューロマイシン-5'-トリホスファート、キサントシン-5'-トリホスファートから好ましく選択される。5-メチルシチジン-5'-トリホスファート、7-デアザグアノシン-5'-トリホスファート、5-ブロモシチジン-5'-トリホスファート、及びシュードウリジン-5'-トリホスファート、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、及び4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、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

ロローシチジン、ピロローシュードイソシチジン、2-チオーシチジン、2-チオー5-メチル-シチジン、4-チオーシュードイソシチジン、4-チオー1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオー1-メチル-1-デアザーシュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザーシュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザーゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザー2-チオーゼブラリン、2-チオーゼブラリン、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、及び4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザーアデニン、7-デアザー8-アザーアデニン、7-デアザー2-アミノプリン、7-デアザー8-アザー2-アミノプリン、7-デアザー2, 6-ジアミノプリン、7-デアザー8-アザー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-メチルチオー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-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオーN6-ス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-メチルチオーアデニン、及び2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウィオシン (w y o s i n e)、ウィブトシン (w y b u t o s i n e)、7-デアザーグアノシン、7-デアザー8-アザーグアノシン、6-チオーグアノシン、6-チオー7-デアザーグアノシン、6-チオー7-デアザー8-アザーグアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオー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-チオーグアノシン、N2-メチル-6-チオーグアノシン、及びN2, N2-ジメチル-6-チオーグアノシン、5'-O-(1-チオホスファート)-アデノシン、5'-O-(1-チオホスファート)-シチジン、5'-O-(1-チオホスファート)-グアノシン、5'-O-(1-チオホスファート)-ウリジン、5'-O-(1-チオホスファート)-シュードウリジン、6-アザーシチジン、2-チオーシチジン、アルファ-チオーシチジン、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、アルファ-チオーウリジン、4-チオーウリジン、6-アザーウリジン、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、ピロローシチジン、イノシン、アルファ-チオーグアノシン、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-デアザーグアノシン、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、アルファ-チオーアデノシン、8-アジド-アデノシン、7-デアザーアデノシンからなる群から選択される塩基修飾のためのヌクレオチドが特に好ましい。本発明の文脈において特に好ましく且つ好適なものは、シュードウリジン (Ψ)、N1-メチルシュードウリジン ($m1\Psi$)、5-メチルシトシン、及び5-メトキシウリジンである。したがって、本明細書に定義される人工RNAは、シュードウリジン (Ψ)、N1-メチルシュードウリジン ($m1\Psi$)、5-メチルシトシン、及び5-メトキシウリジンから選択される少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むことができる。

【0195】

好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのコード配列を含み、少なくとも1つのコード配列は、シュードウリジン (Ψ) 修飾コード配列である。

【0196】

したがって、好ましい実施形態においては、本発明の人工RNA、又は少なくとも1つのコード配列は、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン (Ψ) ヌクレオチドで置換された核酸配列を含む。

【0197】

更に好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのコード配

10

20

30

40

50

列を含み、少なくとも1つのコード配列は、N1-メチルシュードウリジン (m1Ψ) 修飾コード配列である。

【0198】

したがって、好ましい実施形態においては、本発明の人工RNA、又は少なくとも1つのコード配列は、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがN1-メチルシュードウリジン (m1Ψ) ヌクレオチドで置換された核酸配列を含む。

【0199】

好ましい実施形態では、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのコード配列を含み、少なくとも1つのコード配列は、コドン改変コード配列である。

【0200】

好ましい実施形態においては、本発明の少なくとも1つのコード配列は、コドン改変コード配列であり、少なくとも1つのコドン改変コード配列によってコードされるアミノ酸配列は、対応する野生型コード配列によってコードされるアミノ酸配列と比較して変更がないことが好ましい。

【0201】

「コドン改変コード配列」という用語は、対応する野生型コード配列と比較して、少なくとも1つのコドン（1つのアミノ酸をコードするヌクレオチドのトリプレット）が異なるコード配列に関する。好適には、本発明の文脈におけるコドン改変コード配列は、インビボでの分解に対して改善された耐性、及び／又はインビボでの改善された安定性、及び／又はインビボでの改善された翻訳能を示すことができる。最も広い意味でのコドン改変は、遺伝暗号の縮重を利用しており、この遺伝暗号の縮重は、複数のコドンが同一アミノ酸をコードすることができ、相互変換可能（表2を参照）に使用して、上で概説したインビボ用途のためのコード配列を最適化／改変することができる。

【0202】

第1の態様の特に好ましい実施形態では、少なくとも1つの配列は、コドン改変コード配列であり、コドン改変コード配列は、C最大化コード配列、CAI最大化コード配列、ヒトコドン使用適合化コード配列、G／C含量改変コード配列、及びG／C最適化コード配列、又はこれらの任意の組合せから選択される。

【0203】

好ましい実施形態によれば、本発明の人工RNAを改変して、少なくとも1つのコード配列のC含量を、対応する野生型コード配列のC含量に対して増大させた、好ましくは最大化させることができる（本明細書では、「C最大化コード配列」と呼ぶ）。RNAのC最大化コード配列によりコードされるアミノ酸配列は、それぞれの野生型核酸コード配列によりコードされるアミノ酸配列と比較して変更がないことが好ましい。C最大化核酸配列の生成は、国際公開第2015／062738号に係る改変方法を使用して好適に行うことができる。この文脈において、国際公開第2015／062738号の開示を、参照により本明細書に援用する。配列表の<223>識別子を含む本発明の開示全体を通して、好適なRSV核酸配列のC最大化コード配列は、略称「opt2」で示される。

【0204】

いくつかの実施形態によれば、本発明の人工RNAを改変して、本発明の少なくとも1つのコード配列のG／C含量を、対応する野生型コード配列と比較して変更することができる（本明細書では、「G／C含量改変コード配列」と呼ぶ）。この文脈において、「G／C最適化」又は「G／C含量改変」という用語は、対応する野生型核酸配列と比較して変更された、好ましくは増加した数のグアノシン及び／又はシトシンヌクレオチドを含む、本発明の核酸、好ましくは人工核酸に関する。そのような増加した数は、アデノシン又はチミジンヌクレオチドを含むコドンを、グアノシン又はシトシンヌクレオチドを含むコドンで置換することによって生成することができる。濃縮されたG／C含量をDNA又はRNAのコード配列で生じさせる場合、遺伝暗号の縮重を利用する。特に、RNAの場合、G（グアノシン）／C（シトシン）含量が増加した配列は、A（アデノシン）／U（ウ

10

20

30

40

50

ラシル) 含量が増加した配列よりも安定している。核酸配列の G / C 含量修飾コード配列によりコードされるアミノ酸配列は、それぞれの野生型核酸コード配列によりコードされるアミノ酸配列と比較して変わらないことが好ましい。好ましくは、本発明の人工核酸配列、例えば、RNA 配列のコード配列の G / C 含量は、本明細書に定義される RSV 抗原又はその断片若しくはバリエーションをコードする、対応する野生型核酸配列 (例えば、RNA 配列) のコード配列の G / C 含量と比較して、少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 20 %、より好ましくは少なくとも 30 %、最も好ましくは少なくとも 40 % 増加する。

【0205】

好ましい実施形態によれば、本発明の人工 RNA を改変して、本発明の少なくとも 1 つのコード配列の G / C 含量を、対応する野生型コード配列の G / C 含量と比較して変更することができる (本明細書では、「G / C 含量最適化コード配列」と呼ぶ)。その文脈における「最適化された」とは、G / C 含量が、好ましくは本質的に可能な限り最大の G / C 含量にまで増加されたコード配列を意味する。核酸配列の G / C 含量最適化コード配列によりコードされるアミノ酸配列は、それぞれの野生型核酸コード配列によりコードされるアミノ酸配列と比較して変わらないことが好ましい。前記した G / C 含量最適化 RNA 配列の生成は、国際公開第 2002 / 098443 号に説明される G / C 含量最適化方法を使用して好適に行うことができる。この文脈において、国際公開第 2002 / 098443 号の開示の全範囲が、本発明に含まれる。配列表の < 223 > 識別子を含む本発明の開示全体を通して、好適な RSV 核酸配列の G / C 含量最適化コード配列は、略称「opt1、opt5、opt6、opt11」で示される。

【0206】

いくつかの実施形態によれば、本発明の人工 RNA を改変して、本発明の少なくとも 1 つのコード配列のコドンを、ヒトのコドン使用に適合させることができる (本明細書では、「ヒトコドン使用適合化コード配列」と呼ぶ)。同一アミノ酸をコードするコドンは、対象、例えば、ヒトで異なる頻度で生じる。したがって、人工 RNA のコード配列は、同じアミノ酸をコードするコドンの頻度が、ヒトのコドン使用 (例えば、表 2 を参照) に係るそのコドンの自然発生頻度に対応するように変更されることが好ましい。例えば、アミノ酸アラニン (Ala) の場合、野生型コード配列は、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 (表 2 を参照) で使用されるなどのように適合されることが好ましい。したがって、(Ala で例示される) このような手順を、本発明の人工核酸のコード配列に適用することによって、ヒトコドン使用に適合された配列を得る。配列表の < 223 > 識別子を含む本発明の開示全体を通して、好適な RSV 核酸配列のヒトコドン使用適合化コード配列は、略称「opt3」で示される。

【0207】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：各アミノ酸の頻度について示したヒトコドン使用表

アミノ酸	コドン	頻度		アミノ酸	コドン	頻度
Ala	GCG	0.10		Pro	CCG	0.11
Ala	GCA	0.22		Pro	CCA	0.27
Ala	GCT	0.28		Pro	CCT	0.29
Ala	GCC*	0.40		Pro	CCC*	0.33
Cys	TGT	0.42		Gln	CAG*	0.73
Cys	TGC*	0.58		Gln	CAA	0.27
Asp	GAT	0.44		Arg	AGG	0.22
Asp	GAC*	0.56		Arg	AGA*	0.21
Glu	GAG*	0.59		Arg	CGG	0.19
Glu	GAA	0.41		Arg	CGA	0.10
Phe	TTT	0.43		Arg	CGT	0.09
Phe	TTC*	0.57		Arg	CGC	0.19
Gly	GGG	0.23		Ser	AGT	0.14
Gly	GGA	0.26		Ser	AGC*	0.25
Gly	GGT	0.18		Ser	TCG	0.06
Gly	GGC*	0.33		Ser	TCA	0.15
His	CAT	0.41		Ser	TCT	0.18
His	CAC*	0.59		Ser	TCC	0.23
Ile	ATA	0.14		Thr	ACG	0.12
Ile	ATT	0.35		Thr	ACA	0.27
Ile	ATC*	0.52		Thr	ACT	0.23
Lys	AAG*	0.60		Thr	ACC*	0.38
Lys	AAA	0.40		Val	GTG*	0.48
Leu	TTG	0.12		Val	GTA	0.10
Leu	TTA	0.06		Val	GTT	0.17
Leu	CTG*	0.43		Val	GTC	0.25
Leu	CTA	0.07		Trp	TGG*	1
Leu	CTT	0.12		Tyr	TAT	0.42
Leu	CTC	0.20		Tyr	TAC*	0.58
Met	ATG*	1		Stop	TGA*	0.61
Asn	AAT	0.44		Stop	TAG	0.17
Asn	AAC*	0.56		Stop	TAA	0.22

*: 最も高頻度のヒトコドン

【0208】

いくつかの実施形態によれば、本発明の人工RNAを改変して、本発明の少なくとも1つのコード配列において、コドン適応指数（CAI）を増加させる又は好ましくは最大化することができる（本明細書では、「CAI最大化コード配列」と呼ぶ）。したがって、例えば、ヒト細胞において比較的稀な野生型核酸配列のコドンを含めて、例えば、ヒト細胞において高頻度であるそれぞれのコドンに置き換えることが好ましく、ここで高頻度コドンは、比較的稀なコドンと同じアミノ酸をコードする。好適には、最も頻度の高いコドンが、コードされた各アミノ酸に使用される（表2を参照、最も高頻度のヒトコドンのアスタリスクで示す）。好適には、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのコード配列を含

み、少なくとも1つのコード配列のコドン適応指数（CAI）は、少なくとも0.5、少なくとも0.8、少なくとも0.9、又は少なくとも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数（CAI）は、1である。例えば、アミノ酸Alaの場合、野生型コード配列は、最も高頻度のヒトコドン「GCC」が常に前記アミノ酸に使用されるように適合される。したがって、（Alaで例示される）そのような手順を、本発明の人工RNAのコード配列によってコードされる各アミノ酸に適用して、CAI最大化コード配列を得る。配列表の<223>識別子を含む本発明の開示全体を通して、好適なRSV核酸配列のCAI最大化コード配列は、略称「opt4」で示される。

【0209】

したがって、特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号70～77、485～492、899～906、1268～1275、1637～1644、2006～2013、2375～2382、2744～2751、3113～3120、3482～3489、3851～3858、4220～4227、4589～4596、4958～4965、5327～5334、5696～5703、6065～6072、6434～6441、6803～6810、7172～7179、7541～7548、7910～7917、11728～11734、12097～12103、12465～12472、12834～12841、13941～13948、14310～14317、14679～14686、15048～15055、15417～15424、15786～15793、13203～13210、13572～13579、16155～16162、16524～16531、16893～16900、17262～17269、17631～17638、18000～18007、18369～18376、18738～18745、19107～19114、19476～19483、21363～21384、21389～21410からなる群から選択されるコドン改変核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーション（表3及び表4も参照）と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコドン改変核酸配列を含む少なくとも1つのコード配列を含む。これらの好適な核酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0210】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号70～71、75～77、485～486、490～492、899～900、904～906、1268～1269、1273～1275、1637～1638、1642～1644、2006～2007、2011～2013、2375～2376、2380～2382、2744～2745、2749～2751、3113～3114、3118～3120、3482～3483、3487～3489、3852、4221、4590、4959、5328、5697、6066、6435、6804、7173、7542、7911、3856～3858、4225～4227、4594～4596、4963～4965、5332～5334、5701～5703、6070～6072、6439～6441、6808～6810、7177～7179、7546～7548、7915～7917、11728、11732～11734、12097、12101～12103、12465、12466、12470～12472、12834、12835、12839～12841、13941、13942、13946～13948、14310、14311、14315～14317、14679、14680、14684～14686、15048、15049、15053～15055、15417、15418、15422～15424、15786、15787、15791～15793、13203、13204、13208～13210、13572、13573、13577～13579、16155、16156、16160～16162、16524、16525、16529～16531、16893、16894、16898～16900、17262、17263、17267～17269、17631、17632、17636～17638、18000、

18001、18005～18007、18369、18370、18374～18376、18738、18739、18743～18745、19107、19108、19112～19114、19476、19477、19481～19483、21363～21384、21389～21410に係るG/C含量最適化又はG/C含量改変核酸配列のいずれか、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーション（表3及び表4も参照；opt1、5、6、11）と同一である又は少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコドン改変核酸配列を含む少なくとも1つのコード配列を含む。これらの好適な核酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

10

【0211】

好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、配列番号73、488、902、1271、1640、2009、2378、2747、3116、3485、3854、4223、4592、4961、5330、5699、6068、6437、6806、7175、7544、7913、11730、12099、12468、12837、13944、14313、14682、15051、15420、15789、13206、13575、16158、16527、16896、17265、17634、18003、18372、18741、19110、19479に係るヒトコドン使用適化核酸配列のいずれか、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーション（表3及び表4も参照；opt3）と同一である又は少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコドン改変核酸配列を含む少なくとも1つのコード配列を含む。これらの好適な核酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

20

【0212】

特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、配列番号72、487、901、1270、1639、2008、2377、2746、3115、3484、3853、4222、4591、4960、5329、5698、6067、6436、6805、7174、7543、7912、11729、12098、12467、12836、13943、14312、14681、15050、15419、15788、13205、13574、16157、16526、16895、17264、17633、18002、18371、18740、19109、19478に係るC最大化核酸配列のいずれか、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーション（表3及び表4も参照；opt2）と同一である又は少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコドン改変核酸配列を含む少なくとも1つのコード配列を含む。これらの好適な核酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

30

【0213】

好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、配列番号74、489、903、1272、1641、2010、2379、2748、3117、3486、3855、4224、4593、4962、5331、5700、6069、6438、6807、7176、7545、7914、11731、12100、12469、12838、13945、14314、14683、15052、15421、15790、13207、13576、16159、16528、16897、17266、17635、18004、18373、18742、19111、19480に係るCAI最大化核酸配列のいずれか、又はこれらの配列のいずれかの断片又はバリエーション（表3及び表4も参照；opt4）と同一である又は少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるコドン改変核酸配列を含む少なくとも1つの

40

50

コード配列を含む。これらの好適な核酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に与えられる詳細から得ることもできる。

【0214】

いくつかの実施形態においては、人工核酸、特に本発明の人工RNAのリボソーム結合部位の環境におけるA/U含量は、そのそれぞれの野生型核酸のリボソーム結合部位の環境におけるA/U含量と比較して増加させることができる。この改変（リボソーム結合部位の周りのA/U含量の増加）は、核酸、好ましくはRNAへのリボソーム結合の効率を上昇させる。リボソームのリボソーム結合部位への効果的な結合は、次に、RNAの効率的な翻訳という効果を有する。したがって、特に好ましい実施形態においては、本発明の人工核酸は、配列番号41、42の配列のいずれか、又はそれらの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも80%、85%、90%、95%同一である「コザック配列」とも呼ばれるリボソーム結合部位を含む。

【0215】

好ましいRSVポリペプチド及び核酸コード配列（「cds」）は、表3A及び表3B並びに表4A及び表4Bに与えられる。

【0216】

表3A及び表3Bの列A～列Jは、RSV融合（F）タンパク質に由来する本発明の具体的且つ好適な構築物を表し、列Aは、F0に好適な配列を与え、列Bは、F-delに好適な配列を与え、列Cは、F0_DSCav1に好適な配列を与え、列Dは、F-del_DSCav1に好適な配列を与え、列Eは、F_DSCav1_mut1に好適な配列を与え、列Fは、F-del_DSCav1_mut1に好適な配列を与え、列Gは、F_DSCav1_mut2に好適な配列を与え、列Hは、F-del_DSCav1_mut2に好適な配列を与え、列Iは、F_DSCav1_mut3に好適な配列を与え、列JはF-del_DSCav1_mut3に好適な配列を与える。配列表に与えられる具体的なタンパク質の配列番号は、行2（「PRT」）に与えられる。対応する野生型／非改変コード配列の配列番号は、行3（「wt」）に与えられる。各タンパク質構築物に対応するコドン改変コード配列の配列番号は、行4～行10に与えられる（「opt1」、「opt2」、「opt3」、「opt4」、「opt5」、「opt6」、「opt11」）。表3Aでは、HRSV（A2）に由来するコード配列が与えられ、表3Bでは、HRSV（メンフィス-37）に由来するコード配列が与えられる。更なる情報は、配列表の各配列番号の<223>識別子に与えられる。

【0217】

【表3A】

表3A：HRSV（A2）に由来するRSV Fをコードする好ましいコード配列（列A～J）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
PRT	68	483	898	1267	1636	2005	2374	2743	3112	3481
wt	69	484								
opt1	70, 71, 21363	485, 486, 21364	899, 900, 21365	1268, 1269, 21366	1637, 1638, 21369	2006, 2007, 21370	2375, 2376, 21371	2744, 2745, 21372	3113, 3114, 21373	3482, 3483, 21374
opt2	72	487	901	1270	1639	2008	2377	2746	3115	3484
opt3	73	488	902	1271	1640	2009	2378	2747	3116	3485
opt4	74	489	903	1272	1641	2010	2379	2748	3117	3486
opt5	75	490	904	1273	1642	2011	2380	2749	3118	3487
opt6	76	491	905	1274	1643	2012	2381	2750	3119	3488
opt11	77	492	906	1275	1644	2013	2382	2751	3120	3489

【0218】

【表 3 B】

表 3 B : HRSV (メンフィスー 37) に由来する RSV F をコードする好ましいコード配列 (列 A ~ J)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
PRT	11726	12095	12464	12833	13940	14309	14678	15047	15416	15785
wt	11727	12096								
opt1	11728, 21389	12097, 21390	12465, 12466, 21391	12834, 12835, 21392	13941, 13942, 21395	14310, 14311, 21396	14679, 14680, 21397	15048, 15049, 21398	15417, 15418, 21399	15786, 15787, 21400
opt2	11729	12098	12467	12836	13943	14312	14681	15050	15419	15788
opt3	11730	12099	12468	12837	13944	14313	14682	15051	15420	15789
opt4	11731	12100	12469	12838	13945	14314	14683	15052	15421	15790
opt5	11732	12101	12470	12839	13946	14315	14684	15053	15422	15791
opt6	11733	12102	12471	12840	13947	14316	14685	15054	15423	15792
opt11	11734	12103	12472	12841	13948	14317	14686	15055	15424	15793

10

【 0 2 1 9】

表 4 A 及び表 4 B の列 K ~ 列 V は、RSV 融合 (F) タンパク質に由来する本発明の具体的且つ好適な構築物を表し、列 K は、F__DSCav1__mut0 に好適な配列を与え、列 L は、F-del__DSCav1__mut0 に好適な配列を与え、列 M は、F__DSCav1__mut4 に好適な配列を与え、列 N は、F-del__DSCav1__mut4 に好適な配列を与え、列 O は、F__DSCav1__mut5 に好適な配列を与え、列 P は、F-del__DSCav1__mut5 に好適な配列を与え、列 Q は、F__DSCav1__mut6 に好適な配列を与え、列 R は、F-del__DSCav1__mut6 に好適な配列を与え、列 S は、F__DSCav1__mut7 に好適な配列を与え、列 T は、F-del__DSCav1__mut7 に好適な配列を与え、列 U は、F__DSCav1__mut8 に好適な配列を与え、列 V は、F-del__DSCav1__mut8 に好適な配列を与える。配列表に与えられる具体的なタンパク質の配列番号は、行 2 (「PRT」) に与えられる。各タンパク質構築物の対応するコドン改変コード配列の配列番号は、行 3 ~ 行 9 に与えられる (「opt1」、「opt2」、「opt3」、「opt4」、「opt5」、「opt6」、「opt11」)。表 4 A では、HRSV (A2) に由来するコード配列が与えられ、表 4 B では、HRSV (メンフィスー 37) に由来するコード配列が与えられる。更なる情報は、配列表の各配列番号の < 2 2 3 > 識別子に与えられる。

20

30

【 0 2 2 0】

【表 4 A】

表 4 A : HRSV (A2) に由来する RSV F をコードする好ましいコード配列 (列 K ~ V)

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
PRT	3850	4219	4588	4957	5326	5695	6064	6433	6802	7171	7540	7909
opt1	3851, 3852, 21367	4220, 4221, 21368	4589, 4590, 21375	4958, 4959, 21376	5327, 5328, 21377	5696, 5697, 21378	6065, 6066, 21379	6434, 6435, 21380	6803, 6804, 21381	7172, 7173, 21382	7541, 7542, 21383	7910, 7911, 21384
opt2	3853	4222	4591	4960	5329	5698	6067	6436	6805	7174	7543	7912
opt3	3854	4223	4592	4961	5330	5699	6068	6437	6806	7175	7544	7913
opt4	3855	4224	4593	4962	5331	5700	6069	6438	6807	7176	7545	7914
opt5	3856	4225	4594	4963	5332	5701	6070	6439	6808	7177	7546	7915
opt6	3857	4226	4595	4964	5333	5702	6071	6440	6809	7178	7547	7916
opt11	3858	4227	4596	4965	5334	5703	6072	6441	6810	7179	7548	7917

40

【 0 2 2 1】

50

【表 4 B】

表 4 B : HRSV (メンフィス-37) に由来するRSV Fをコードする好ましいコード配列 (列K~V)

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
PRT	13202	13571	16154	16523	16892	17261	17630	17999	18368	18737	19106	19475
opt1	13203,	13572,	16155,	16524,	16893,	17262,	17631,	18000,	18369,	18738,	19107,	19476,
	13204,	13573,	16156,	16525,	16894,	17263,	17632,	18001,	18370,	18739,	19108,	19477,
	21393	21394	21401	21402	21403	21404	21405	21406	21407	21408	21409	21410
opt2	13205	13574	16157	16526	16895	17264	17633	18002	18371	18740	19109	19478
opt3	13206	13575	16158	16527	16896	17265	17634	18003	18372	18741	19110	19479
opt4	13207	13576	16159	16528	16897	17266	17635	18004	18373	18742	19111	19480
opt5	13208	13577	16160	16529	16898	17267	17636	18005	18374	18743	19112	19481
opt6	13209	13578	16161	16530	16899	17268	17637	18006	18375	18744	19113	19482
opt11	13210	13579	16162	16531	16900	17269	17638	18007	18376	18745	19114	19483

【0222】

いくつかの実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、モノシストロン性、バイシストロン性、又はマルチシストロン性である。

【0223】

好ましい実施形態では、本発明の人工RNAは、モノシストロン性である。

【0224】

「モノシストロン性核酸」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、本明細書で定義されるコード配列を1つだけ含む人工RNAを意味することが意図される。本明細書に使用される「バイシストロン性核酸、マルチシストロン性核酸」又は「モノシストロン性RNA」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、2つ（バイシストロン性）又は更にそれ以上（マルチシストロン性）のコード配列を有し得る人工RNAを意味することが意図される。

【0225】

いくつかの実施形態においては、本発明の人工RNAはモノシストロン性であり、前記モノシストロン性人工RNAのコード配列は、本明細書で定義されるRSV Fに由来する少なくとも2つの異なる抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片若しくはバリエーションをコードする。したがって、モノシストロン性人工RNAの少なくとも1つのコード配列は、アミノ酸リンカー配列と連結された又は連結されない、RSV、好ましくは本明細書で定義されるRSV Fに由来する少なくとも2、3、4、5、6、7、8個、及びそれ以上の抗原性ペプチド又はタンパク質をコードすることができ、前記リンカー配列は、上で定義した剛性リンカー、可撓性リンカー、切断可能リンカー（例えば、自己切断ペプチド）、又はそれらの組合せ（本明細書では、「マルチ抗原構築物／核酸」と呼ぶ）を含むことができる。

【0226】

いくつかの実施形態においては、本発明の人工RNAは、バイシストロン性又はマルチシストロン性であり、少なくとも2つのコード配列を含み、少なくとも2つのコード配列は、RSV、好ましくは本明細書で定義されるRSV F、又はこれらのいずれかの断片若しくはバリエーションに由来する2つ以上の異なる抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする。したがって、バイシストロン性又はマルチシストロン性人工RNAにおけるコード配列は、好適には、本明細書で定義される異なる抗原性タンパク質又はペプチド、又はそれらの断片若しくはバリエーションをコードする。好ましくは、前記バイシストロン性又はマルチシストロン性人工RNAにおけるコード配列は、少なくとも1つのIRES（内部リボソーム侵入部位）配列によって分離され得る。したがって、「2つ以上の抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする」という用語は、限定されるものではないが、バイシストロン性又はマルチシストロン性人工RNAが、例えば、異なるRSVの少なくとも2、3、4、5、6個、又はそれ以上の（好ましくは異なる）抗原性ペプチド又はタンパク質、

又は本明細書に記載される定義の範囲内のそれらの断片若しくはバリエントをコードする。或いは、バイシストロン性又はマルチシストロン性人工RNAは、例えば、同一のRSVに由来する少なくとも2、3、4、5、6個、又はそれ以上の（好ましくは異なる）抗原性ペプチド若しくはタンパク質、又は本明細書に記載される定義の範囲内の断片若しくはバリエントをコードする。その文脈において、好適なIRES配列は、国際公開第2017/081082号の配列番号1566～1662に係る核酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片若しくはバリエントから選択することができる。この文脈において、IRES配列に関する国際公開第2017/081082号の開示を、参照により本明細書に援用する。

【0227】

本発明の文脈において、コード配列の特定の組合せは、モノシストロン性、バイシストロン性、及びマルチシストロン性人工核酸及び／又はマルチ抗原構築物／核酸の任意の組合せによって生成され、本明細書に定義される複数の抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする核酸組成物を得ることができることが理解されるべきである。

【0228】

好ましくは、本明細書に定義される少なくとも1つのコード配列を含む人工RNAは、典型的には、約50～約20000、又は500～約20000ヌクレオチド、又は約500～約20000ヌクレオチド、又は約500～約10000ヌクレオチド、又は約1000～約10000ヌクレオチド、又は好ましくは約1000～約5000ヌクレオチド、又は更により好ましくは約1000～約2500ヌクレオチドの長さを含む。

【0229】

好ましい実施形態によれば、第1の態様の人工RNAは、mRNA、自己複製RNA、環状RNA、又はレプリコンRNAであることができる。

【0230】

いくつかの実施形態においては、人工RNAは環状RNAである。本明細書で使用される「環状RNA」又は「circRNA」は、本明細書で定義される少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードすることができる環状ポリヌクレオチドとして理解されるべきである。したがって、好ましい実施形態においては、前記環状RNAは、RSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又は本明細書で定義されるそれらの断片若しくはバリエントをコードする少なくとも1つのコード配列を含む。circRNAの生成は、当技術分野で提供される様々な方法を使用して行うことができる。例えば、米国特許第6210931号明細書は、自発的切断及び自己環化の能力を有する配列を含むプラスミドにDNA断片を挿入することにより、circRNAを合成する方法を教示する。米国特許第5773244号明細書は、RNAシクラーゼリボザイムをコードするDNA構築物を作製し、DNA構築物をRNAとして発現させ、次いでRNAを自己スプライスさせることにより、インビトロでイントロンのないcircRNAを生成することにより、circRNAを生成することを教示する。国際公開第1992/001813号は、線状ポリヌクレオチドを合成し、線状ヌクレオチドをハイブリダイゼーション条件下で相補的連結オリゴヌクレオチドと組み合わせ、線状ポリヌクレオチドをライゲーションすることによって一本鎖環状核酸を作製するプロセスを教示する。当業者はまた、国際公開第2015/034925号又は国際公開第2016/011222号で提供される方法を使用して、環状RNAを生成することができる。したがって、米国特許第6210931号明細書、米国特許第5773244号明細書、国際公開第1992/001813号、国際公開第2015/034925号、及び国際公開第2016/011222号で提供される環状RNAを生成する方法を、参照により本明細書に援用する。

【0231】

いくつかの実施形態においては、人工RNAはレプリコンRNAである。「レプリコンRNA」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、最適化された自己複製人工RNA構築物であることが意図される。そのような構築物は、アルファウイルス由来の複製エレメント（レプリカーゼ）、及び目的の人工核酸による構造ウイルスタンパク

10

20

30

40

50

質の置換（本発明の文脈では、R S Vに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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人工核酸）を含む。或いは、レプリカーゼは、例えば、セムリキ森林ウイルス（S F V）、シンドビスウイルス（S I N）、ベネズエラ馬脳炎ウイルス（V E E）、ロスリバーウイルス（R R V）、又はアルファウイルス科に属する他のウイルスなどに由来するレプリカーゼRNA配列を含む独立した構築物に提供することができる。レプリカーゼの下流には、本発明の人工核酸の複製を制御するサブゲノムプロモーター、即ち、R S Vに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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人工核酸が存在する。

【0232】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAはmRNAである。

10

【0233】

「RNA」及び「mRNA」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、リボ核酸分子、即ちヌクレオチドからなるポリマーであることが意図される。これらのヌクレオチドは通常、いわゆる骨格に沿って互いに結合されているアデノシンーリン酸、ウリジンーリン酸、グアノシンーリン酸、及びシチジンーリン酸モノマーである。骨格は、第1の糖、即ちリボースと、第2の隣接するモノマーのリン酸部分との間のホスホジエステル結合によって形成される。モノマーの特定の連続がRNA配列と呼ばれる。mRNA（メッセンジャーRNA）は通常、特定のペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列に翻訳され得るヌクレオチド配列を提供する。

【0234】

20

本発明の人工RNA、好ましくはmRNAは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して調製することができ、例えば、固相RNA合成、及びRNAインビトロ転写反応などのインビトロ法などの化学合成などがその方法として挙げられる。

【0235】

好ましい実施形態では、人工RNA、好ましくはmRNAは、RNAのインビトロ転写によって得られる。

【0236】

したがって、本発明のRNAは、好ましくはインビトロ転写されたRNAである。

【0237】

「RNAインビトロ転写」又は「インビトロ転写」という用語は、RNAが無細胞系（インビトロ）で合成されるプロセスに関する。RNAは、本発明にしたがう、線状化プラスミドDNAテンプレート又はPCR増幅DNAテンプレートである適切なDNAテンプレートのDNA依存性インビトロ転写によって得ることができる。RNAインビトロ転写を制御するためのプロモーターは、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ーであることができる。DNA依存性RNAポリメラーゼの具体例は、T7、T3、SP6、又はSyn5 RNAポリメラーゼである。本発明の好ましい実施形態においては、DNAテンプレートは、それがRNAのインビトロ転写に付される前に、適切な制限酵素で線状化される。

30

【0238】

RNAのインビトロ転写で使用される試薬は、通常、バクテリオファージがコードされたRNAポリメラーゼ（T7、T3、SP6、又はSyn5）などのそれぞれのRNAポリメラーゼに対して高い結合親和性を有するプロモーター配列を有するDNAテンプレート（線状化プラスミドDNA又はPCR産物）；4塩基（アデニン、シトシン、グアニン、及びウラシル）のリボヌクレオチド三リン酸（NTP）；任意に、本明細書に定義されるキャップアナログ（例えば、m7G（5'）ppp（5'）G（m7G、m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）pG又はm7G（5'）ppp（5'）（2'OMeA）pG））；任意に、本明細書に定義される更なる修飾ヌクレオチド；DNAテンプレート内のプロモーター配列に結合できるDNA依存性RNAポリメラーゼ（例えば、T7、T3、SP6、又はSyn5 RNAポリメラーゼ）；任意に、汚染の可能性があるRNaseを不活性化するリボヌクレアーゼ（RNase）阻害剤；任意に、RNAのインビトロ転写

40

50

を阻害する可能性があるピロリン酸を分解するピロホスファターゼ；ポリメラーゼの補因子としてMg²⁺イオンを供給するMgCl₂；適切なpH値を維持するためのバッファー（TRIS又はHEPES）（これは、抗酸化剤（例えば、DTT）、及び／又はスペルミジンなどのポリアミンを最適濃度で含むこともでき、例としては、国際公開第2017/109161号に開示されるTRIS-クエン酸塩を含む緩衝系がある）を含む。

【0239】

いくつかの実施形態においては、RNAのインビトロ転写で使用されるヌクレオチド混合物は、本明細書で定義される修飾ヌクレオチドを更に含むことができる。その文脈において、好ましい修飾ヌクレオチドは、シュードウリジン（Ψ）、N¹-メチルシュードウリジン（m¹Ψ）、5-メチルシトシン、及び／又は5-メトキシウリジンを含む。

10

【0240】

好ましい実施形態においては、RNAのインビトロ転写反応に使用されるヌクレオチド混合物（即ち、混合物中の各ヌクレオチドの画分）は、好ましくは国際公開第2015/188933号に記載されるように、所定のRNA配列に対して最適化させることができる。

【0241】

本明細書で定義される1超の異なる人工RNAを生成する必要がある実施形態、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上の異なる人工RNAを生成する必要がある場合（例えば、異なるRSV F抗原、又は例えばRSV FとRSV Gの組合せをコードする；第2の態様を参照）、国際公開第2017/109134号に記載される手順を好適に使用することができる。

20

【0242】

RNAワクチン製造の文脈においては、GMPグレードのRNAを提供する必要がある。GMPグレードのRNAは、規制当局によって承認された製造プロセスを使用して製造され得る。したがって、特に好ましい実施形態においては、RNA製造は、現行の適正製造基準（GMP）の下で行われ、好ましくは国際公開第2016/180430号にしたがって、DNA及びRNAレベルでの様々な品質管理工程を行う。好ましい実施形態においては、本発明のRNAは、GMPグレードのRNA、特にGMPグレードのmRNAである。

【0243】

得られたRNA産物は、好ましくは、Pure Messenger（登録商標）（CureVac、チュービンゲン、ドイツ；国際公開第2008/077592号にしたがうRP-HPLC）及び／又はタンジェンシャルフローろ過（国際公開第2016/193206号に記載）を使用して精製される。

30

【0244】

更に好ましい実施形態においては、RNA、特に精製されたRNAは、国際公開第2016/165831号又は国際公開第2011/069586号にしたがって凍結乾燥され、本明細書に定義される温度安定性乾燥人工RNA（粉末）を得る。本発明のRNA、特に精製されたRNAはまた、国際公開第2016/184575号又は国際公開第2016184576号にしたがって噴霧乾燥又は噴霧凍結乾燥を使用して乾燥させて、本明細書に定義される温度安定性RNA（粉末）を得ることができる。したがって、RNAの製造及び精製に関して、国際公開第2017/109161号、国際公開第2015/188933号、国際公開第2016/180430号、国際公開第2008/077592号、国際公開第2016/193206号、国際公開第2016/165831号、国際公開第2011/069586号、国際公開第2016/184575号、及び国際公開第2016/184576号の開示を、参照により本明細書に援用する。

40

【0245】

したがって、好ましい実施形態においては、RNAは乾燥RNA、特に乾燥mRNAである。

【0246】

50

本明細書で使用される「乾燥RNA」という用語は、温度安定性乾燥RNA（粉末）を得るために、上で定義した凍結乾燥、又は噴霧乾燥、又は噴霧凍結乾燥されたRNAとして理解されるべきである。

【0247】

好ましい実施形態では、本発明の人工RNAは、精製されたRNA、特に精製されたmRNAである。

【0248】

本明細書で使用される「精製されたRNA」又は「精製されたmRNA」という用語は、特定の精製工程（例えば、HPLC、TFF、オリゴd（T）精製、沈殿工程）後に出発材料（例えば、インビトロ転写されたRNA）よりも高い精製度を有するRNAとして理解されるべきである。精製されたRNAに本質的には存在しない典型的な不純物としては、ペプチド又はタンパク質（例えば、DNA依存性RNAインビトロ転写に由来する酵素、例えば、RNAポリメラーゼ、RNase、ピロホスファターゼ、制限エンドヌクレアーゼ、DNase）、スペルミジン、BSA、不完全RNA配列、RNA断片（短い二本鎖RNA断片、不完全配列など）、遊離ヌクレオチド（修飾ヌクレオチド、従来のNTP、キャップアナログ）、テンプレートDNA断片、バッファー成分（HEPES、TRIS、MgCl₂）などがある。例えば、発酵手順に由来し得るその他の考えられ得る不純物は、細菌不純物（バイオバーデン、細菌DNA）又は精製手順に由来する不純物（有機溶媒など）を含む。したがって、この点に関して、「RNA純度の程度」は可能な限り100%に近いことが望ましい。完全長のRNA転写産物の量が可能な限り100%に近いことも、RNA純度の程度にとって望ましい。したがって、本明細書で使用される「精製されたRNA」は、75%、80%、85%、非常に特に90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは99%以上の純度を有する。純度の程度は、例えば、分析用HPLCによって決定することができ、前記のパーセンテージは、標的RNAのピークの面積と副生成物を表す全ピークの総面積との間の比に対応する。或いは、純度の程度は、例えば、分析用アガロースゲル電気泳動又はキャピラリーゲル電気泳動によって決定することができる。

【0249】

本明細書で定義される「乾燥されたRNA」及び本明細書で定義される「精製されたRNA」又は本明細書で定義される「GMPグレードのmRNA」は、優れた安定特性（インビトロ、インビボ）及び改善された効率（例えば、インビボでのmRNAのより優れた翻訳能）を有することができ、したがって、本発明の状況において特に好適である。更に、本明細書で定義される「乾燥されたRNA」及び本明細書で定義される「精製されたRNA」又は「GMPグレードのmRNA」は、本明細書で定義される医学用途に特に適している場合がある。

【0250】

人工RNAは、5'-キャップ構造の付加によって好適に修飾することができ、これは、本明細書に記載されるように、核酸を安定化することが好ましい。したがって、好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、5'-キャップ構造、好ましくはm⁷G、cap0（例えば、m⁷G（5'）ppp（5'）G）、cap1（例えば、m⁷G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）又はm⁷G（5'）ppp（5'）（2'OMeA））、cap2、修飾されたcap0、又は修飾されたcap1構造（これらは、以下に定義されるキャップアナログを使用して生成される）。

【0251】

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及び理解され、例えば、修飾されたヌクレオチド（キャップ類似体）、特にグアニンヌクレオチドを意味することが意図され、RNA分子、例えばmRNA分子の5'末端に付加される。好ましくは、5'-キャップは、5'-5'-三リン酸結合を使用して付加される（m⁷GpppNとも呼ばれる）。5'-キャップ構造の更なる例としては、グリセリル、反転デオキシ脱塩基残基（部分）、4', 5'メチレンヌクレオチド、1-（ベーター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、炭素環式ヌクレオチド、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'-反転ヌクレオチド部分、3'-3'-反転脱塩基部分、3'-2'-反転ヌクレオチド部分、3'-2'-反転脱塩基部分、1,4-ブタンジオールリン酸、3'-ホスホリアミデート、ヘキシルリン酸、リン酸アミノヘキシル、3'-リン酸、3'-ホスホリチオアート、ホスホロジチオアート、又は架橋又は非架橋メチルホスホナート部分が挙げられる。

【0252】

本発明の文脈において好適であり得る更なる5'-キャップ構造は、cap1 (m7GpppNの隣接ヌクレオチドのリボースの更なるメチル化)、cap2 (m7GpppNの下流の2番目のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化)、cap3 (m7GpppNの下流の3番目のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化)、cap4 (m7GpppNの下流の4番目のヌクレオチドのリボースの追加のメチル化)、ARCA (アンチリバーシキャップアナログ)、修飾されたARCA (例えば、ホスホチオアート修飾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、及び2'-アジドグアノシンである。

【0253】

5'-キャップ (cap0又はcap1) 構造は、化学的RNA合成又は、好ましくはキャップアナログを使用したRNAインビトロ転写 (共転写キャッピング) においても形成され得る。

【0254】

本明細書で使用される「キャップ類似体」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、核酸分子の5'末端に組み込まれたときに、翻訳又は局在化を促進する及び/又は核酸分子、特に、RNA分子の分解を防止するというキャップ機能性を有する非重合性ジヌクレオチドを意味することが意図される。非重合性とは、キャップアナログが5'末端にのみ組み込まれることを意味する。これは、5'三リン酸を有さず、テンプレート依存性ポリメラーゼ、特にテンプレート依存性RNAポリメラーゼによって3'方向に伸長できないからである。キャップ類似体の例としては、m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC；非メチル化キャップ類似体 (例えば、GpppG)；ジメチル化キャップ類似体 (例えば、m2,7GpppG)、トリメチル化キャップ類似体 (例えば、m2,2,7GpppG)、ジメチル化対称キャップ類似体 (例えば、m7Gpppm7G)、又はアンチ反転キャップ類似体 (例えば、ARCA；m7,2'OmeGpppG、m7,2'dGpppG、m7,3'OmeGpppG、m7,3'dGpppG、及びそ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挙げられるが、これらに限定されない。更なるキャップ類似体は、これまでに記載されている (国際公開第2008/016473号、国際公開第2008/157688号、国際公開第2009/149253号、国際公開第2011/015347号、及び国際公開第2013/059475号)。その文脈における更なる適切なキャップ類似体は、国際公開第2017/066793号、国際公開第2017/066781号、国際公開第2017/066791号、国際公開第2017/066789号、国際公開第2017/053297号、国際公開第2017/066782号、国際公開第2018075827号、及び国際公開第2017/066797号に記載されており、これらのキャップ類似体に関する開示を、参照により本明細書に援用する。

【0255】

5'-キャップ構造は、本明細書に定義されるRNAインビトロ転写反応において、本明細書に定義されるキャップアナログを使用して共転写により好適に付加することができる。

【0256】

好ましい実施形態では、修飾されたcap1構造は、国際公開第2017/053297号、国際公開第2017/066793号、国際公開第2017/066781号、国際公開第2017/066791号、国際公開第2017/066789号、国際公開第2017/066782号、国際公開第2018075827号、及び国際公開第2017/066797号に開示されるキャップ類似体を使用して生成される。特に、国際公開第2017/053297号の請求項1～5に開示された構造から誘導可能な任意のキャップ構造は、修飾されたキャップ1構造を共転写により生成するために好適に使用することができる。更に、国際公開第2018075827号の請求項1又は請求項21で定義された構造から誘導可能な任意のキャップ構造は、修飾されたcap1構造を共転写により生成するために好適に使用することができる。

10

【0257】

好ましいキャップ類似体は、cap0構造を共転写により生成するジヌクレオチドキャップアナログm7G(5')ppp(5')G(m7G)又は3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')Gである。特に好ましいキャップアナログは、cap1構造を共転写により生成するトリヌクレオチドキャップアナログm7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG又はm7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pGである。

【0258】

その文脈において、本発明のRNAは、上で定義したCap1構造を含むことが好ましく、これは、好ましくは、高いキャッピング効率と翻訳効率の向上などによって、タンパク質発現の増大をもたらす。更に好適には、Cap1構造を含む本発明のRNAは、同一核酸配列のCap0構築物と比較して、自然免疫系の刺激の低下を示す。当業者であれば、翻訳効率、キャッピング度、及び免疫刺激を決定する方法を認識している。

20

【0259】

特に好ましい実施形態においては、本発明の第1の態様の人工RNAは、cap1構造を含み、前記cap1構造は、酵素的又は共転写的に（例えば、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG又はm7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG類似体を用いて）形成することができる。

【0260】

好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pGキャップ構造を含む。そのような実施形態においては、コードRNAは、5'末端のm7Gキャップ、及びm7GppNの隣接ヌクレオチドのリボースの更なるメチル化（その場合は、2'OMeメチル化アデノシン）を含む。

30

【0261】

他の好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNAは、m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pGキャップ構造を含む。そのような実施形態においては、コードRNAは、5'末端のm7Gキャップ、及び隣接ヌクレオチドのリボースの更なるメチル化（その場合は、2'OMeメチル化グアノシン）を含む。

【0262】

したがって、本発明の文脈において好適なRNA又はmRNA配列に言及する場合は、常に、前記RNA又はmRNA配列の最初のヌクレオチド、即ち、m7G(5')ppp構造の下流のヌクレオチドは、2'OMeメチル化グアノシン又は2'OMeメチル化アデノシンであり得る。

40

【0263】

したがって、他の実施形態においては、本発明の人工RNAは、配列番号43又は21321に係る5'キャップ配列エレメント、又はその断片若しくはバリエーションを含むことができる。

【0264】

他の実施形態においては、5'-キャップ構造は、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、市販のキャッピングキット）を使用する酵素的キャッピングを介して付加され、cap0又はcap1又はcap2構造を生成する。他の実施形態

50

においては、5' - キャップ構造 (cap 0、cap 1) は、固定化キャッピング酵素を使用する、例えば、キャッピングリアクターを使用する (国際公開第 2016/193226 号) 酵素的キャッピングを介して付加される。

【0265】

好ましい実施形態においては、本発明の人工 RNA は、好ましくは 30 ~ 150 個のアデノシンヌクレオチドを含む、少なくとも 1 つのポリ (A) 配列を含む。

【0266】

好ましい実施形態においては、好適には 3' 末端に位置するポリ (A) 配列は、10 ~ 500 個のアデノシンヌクレオチド、10 ~ 200 個のアデノシンヌクレオチド、40 ~ 200 個のアデノシンヌクレオチド、又は 40 ~ 150 個のアデノシンヌクレオチドを含む。特に好ましい実施形態においては、ポリ (A) 配列は、約 64 個のアデノシンヌクレオチドを含む。更に特に好ましい実施形態においては、ポリ (A) 配列は、約 75 個のアデノシンヌクレオチドを含む。更に特に好ましい実施形態においては、ポリ (A) 配列は、約 100 個のアデノシンヌクレオチドを含む。

【0267】

本明細書で使用される「ポリ (A) 配列」、「ポリ (A) テール」、又は「3' - ポリ (A) テール」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、RNA の 3' 末端に位置する一連のアデノシンヌクレオチド、典型的には、最大約 1000 個までのアデノシンヌクレオチドであることが意図される。好ましくは、前記ポリ (A) 配列は、本質的にホモポリマーであり、例えば、本質的に 100 ヌクレオチドの長さを有する 100 アデノシンヌクレオチドなどのポリ (A) 配列である。他の実施形態においては、ポリ (A) 配列は、アデノシンヌクレオチドとは異なる少なくとも 1 つのヌクレオチドによって中断されてもよく、例えば、100 アデノシンヌクレオチドのポリ (A) 配列は、100 個を超えるヌクレオチドの長さを有し得る (100 個のアデノシンヌクレオチドと、更にアデノシンヌクレオチドとは異なる前記少なくとも 1 つのヌクレオチドとを含む)。

【0268】

本発明の文脈において、ポリ (A) 配列は、mRNA 又は他の任意の核酸分子内、例えば、DNA ベクター内、例えば、前記 DNA ベクターの転写による、RNA、好ましくは mRNA 生成のためのテンプレートとして機能するベクター内などに位置し得る。

【0269】

好ましくは、人工 RNA のポリ (A) 配列は、RNA のインビトロ転写中、DNA テンプレートから得られる。他の実施形態においては、ポリ (A) 配列は、必ずしも DNA テンプレートからの転写ではなく、化学合成の一般的な方法によってインビトロで得られる。他の実施形態においては、ポリ (A) 配列は、RNA の酵素的ポリアデニル化 (RNA のインビトロ転写後) に、市販のポリアデニル化キット及び当技術分野で公知の対応するプロトコルを使用して、又はこれに代えて、例えば、ポリアデニル化リアクタ (国際公開第 2016/174271 号に記載) で固定化ポリ (A) ポリメラーゼを使用することによって生成される。

【0270】

いくつかの実施形態においては、本発明の人工 RNA は、ベクターに由来するポリ (A) 配列を含むことができ、酵素的ポリアデニル化 (例えば、国際公開第 2016/091391 号に記載) によって生成される少なくとも 1 つの更なるポリ (A) 配列を含むことができる。

【0271】

好ましい実施形態においては、本発明の人工 RNA は、少なくとも 1 つのポリ (C) 配列を含み、好ましくは 10 ~ 40 個のシトシンヌクレオチドを含む。

【0272】

好ましい実施形態においては、好適には 3' 末端に位置するポリ (C) 配列は、10 ~ 200 個のシトシンヌクレオチド、10 ~ 100 個のシトシンヌクレオチド、20 ~ 70 個のシトシンヌクレオチド、20 ~ 60 個のシトシンヌクレオチド、又は 10 ~ 40 個のシ

トシンヌクレオチドを含む。特に好ましい実施形態においては、ポリ（Ｃ）配列は、約３０個のシトシンヌクレオチドを含む。

【０２７３】

本明細書で使用される「ポリ（Ｃ）配列」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、シトシンヌクレオチドの配列であり、典型的には、ＲＮＡの３'末端に位置する最大約２００個までのシトシンヌクレオチドのことが意図される。本発明の文脈において、ポリ（Ｃ）配列は、ｍＲＮＡ又は他の任意の核酸分子内、例えば、ＤＮＡベクター内、例えば、ベクターの転写による、ＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡ生成のためのテンプレートとして機能するベクター内などに位置し得る。

【０２７４】

好ましくは、本発明のＲＮＡ配列におけるポリ（Ｃ）配列は、ＲＮＡのインビトロ転写によりＤＮＡテンプレートから得られる。他の実施形態では、ポリ（Ｃ）配列は、必ずしもＤＮＡテンプレートからの転写ではなく、化学合成の一般的な方法によってインビトロで得られる。

【０２７５】

他の実施形態においては、本発明の人工ＲＮＡは、本明細書で定義されるポリ（Ｃ）配列を含まない。

【０２７６】

好ましい実施形態では、第１の態様の人工ＲＮＡは、少なくとも１つのヒストンステムループを含む。

【０２７７】

本明細書で使用される「ヒストンステムループ」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、主にヒストンｍＲＮＡに見られる核酸配列を意味することが意図される。例示的なヒストンステムループ配列は、ロペスら（Davila Lopezら（２００８），ＲＮＡ，１４（１））に記載されている。ヒストンプレｍＲＮＡのステムループには、通常、ヒストンダウンストリームエレメント（ＨＤＥ）として知られるプリンリッチ配列が続く。これらのプレｍＲＮＡは、Ｕ７ snRNAとＨＤＥとの塩基対合を介してＵ７ snRNPによって触媒される、ステムループの約５ヌクレオチド下流の単一のエンドヌクレアーゼ開裂によって核内でプロセッシングされる。

【０２７８】

ヒストンステムループ配列／構造は、国際公開第２０１２／０１９７８０号に開示されるヒストンステムループ配列から好適に選択することができ、ヒストンステムループ配列／構造に関する開示を、参照により本明細書に援用する。本発明において使用することができるヒストンステムループ配列は、好ましくは、国際公開第２０１２／０１９７８０号の式（Ⅰ）又は（ⅠⅠ）に由来する。更に好ましい実施形態によれば、本明細書で定義されるＲＮＡは、国際公開第２０１２／０１９７８０号の特定の式（Ⅰa）又は（ⅠⅠa）の少なくともいずれかに由来する少なくとも１つのヒストンステムループ配列を含み得る。

【０２７９】

特に好ましい実施形態においては、本発明の人工ＲＮＡは、少なくとも１つのヒストンステムループを含み、前記ヒストンステムループは、配列番号３９又は４０に係る核酸配列又はその断片若しくはバリエーションを含む。

【０２８０】

他の実施形態においては、第１の態様の人工ＲＮＡは、本明細書で定義されるヒストンステムループを含まない。

【０２８１】

更なる実施形態においては、本発明の人工ＲＮＡは、３'末端配列エレメントを含む。前記３'末端配列エレメントは、ポリ（Ａ）配列及びヒストンステムループ配列を含む配列エレメントとして理解されるべきであり、前記配列エレメントは、本発明の人工ＲＮＡの３'末端に位置する。

【０２８２】

10

20

30

40

50

他の実施形態においては、本発明の人工RNAは、配列番号44～63又は21322～21328に係る3'末端配列エレメント又はその断片若しくはバリエーションを含むことができる。

【0283】

好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのシュードウリジン(Ψ)修飾コード配列を含む。

【0284】

したがって、好ましい実施形態においては、本発明の人工RNA、又は少なくとも1つのコード配列は、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン(Ψ)ヌクレオチドで置換された核酸配列を含む。

【0285】

更に好ましい実施形態においては、本発明の人工RNAは、少なくとも1つのN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)修飾コード配列を含む。

【0286】

したがって、好ましい実施形態においては、本発明の人工RNA、又は少なくとも1つのコード配列は、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)ヌクレオチドで置換された核酸配列を含む。

【0287】

第1の態様の好ましい実施形態においては、人工RNA、好ましくはmRNAは、好ましくは5'から3'方向に、以下のエレメントa)～i)：

- a) 5'-キャップ構造、好ましくは本明細書に記載される5'-キャップ構造；
- b) 任意に、本明細書に記載される5'-UTR、好ましくは配列番号1～22から選択される少なくとも1つ；
- c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
- d) 本明細書に記載される少なくとも1つのコード配列、好ましくは表3及び表4に記載される少なくとも1つのコード配列；
- e) 本明細書に記載される3'-UTR、好ましくは配列番号23～38から選択される少なくとも1つ；
- f) 任意に、ポリ(A)配列、好ましくは本明細書に記載されるポリ(A)配列；
- g) 任意に、ポリ(C)配列、好ましくは本明細書に記載されるポリ(C)配列；
- h) 任意に、ヒストンステムループ、好ましくは本明細書に記載されるヒストンステムループ；
- i) 任意に、本明細書に記載される3'末端配列エレメント、好ましくは配列番号44～63、又は21322～21328に係る3'末端配列エレメント、を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン(Ψ)ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)ヌクレオチドで置換されている。

【0288】

第1の態様の更に好ましい実施形態においては、人工RNA、好ましくはmRNAは、好ましくは5'から3'方向に、以下のエレメント：

- a) 5'-キャップ構造、好ましくは本明細書に記載される5'-キャップ構造、最も好ましくはCap1構造；
- b) 本明細書に記載されるa-1、a-4、c-1、e-4、g-2、i-2、又はi-3に係る3'-UTR及び5'-UTRエレメント；
- c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
- d) 本明細書に記載される少なくとも1つのコード配列であって、前記5'-UTRと前記3'-UTRとの間、好ましくは前記5'-UTRの下流且つ前記3'-UTRの上流に位置し、好ましくは表3及び表4に記載されるいずれかから選択される少なくとも1つのコード配列；

10

20

30

40

50

- e) 任意に、ポリ (A) 配列、好ましくは本明細書に記載されるポリ (A) 配列；
- f) 任意に、ポリ (C) 配列、好ましくは本明細書に記載されるポリ (C) 配列；
- g) 任意に、ヒストンステムループ、好ましくは本明細書に記載されるヒストンステムループ；
- h) 任意に、本明細書に記載される 3' 末端配列エレメント、好ましくは配列番号 44～63、21322～21328 に係る 3' 末端配列エレメント、
を含み、任意に、少なくとも 1 つの又は 1 より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン (Ψ) ヌクレオチド又は N1-メチルシュードウリジン (m1Ψ) ヌクレオチドで置換されている。

【0289】

第 1 の態様の更に好ましい実施形態においては、人工 RNA、好ましくは mRNA は、好ましくは 5' から 3' 方向に、以下のエレメント：

- a) 5' - キャップ構造、好ましくは本明細書に記載される 5' - キャップ構造、最も好ましくは Cap1 構造；
- b) 本明細書に記載される a-1 又は i-3 に係る 3' - UTR 及び 5' - UTR エレメント；
- c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
- d) 本明細書に記載される少なくとも 1 つのコード配列であって、前記 5' - UTR と前記 3' - UTR との間、好ましくは前記 5' - UTR の下流且つ前記 3' - UTR の上流に位置し、好ましくは表 3 及び表 4 に記載されるいずれかから選択される少なくとも 1 つのコード配列；
- e) 任意に、ヒストンステムループ、好ましくは本明細書に記載されるヒストンステムループ；
- f) ポリ (A) 配列、好ましくは約 100 個のアデノシンヌクレオチドを含むポリ (A) 配列；
- g) 任意に、本明細書に記載される 3' 末端配列エレメント、好ましくは配列番号 21322～21328 に係る 3' 末端配列エレメント、
を含み、任意に、少なくとも 1 つの又は 1 より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン (Ψ) ヌクレオチド又は N1-メチルシュードウリジン (m1Ψ) ヌクレオチドで置換されている。

【0290】

第 1 の態様の更に好ましい実施形態においては、人工 RNA、好ましくは mRNA は、5' から 3' 方向に、以下のエレメント：

- a) 5' - キャップ構造、好ましくは本明細書に記載される 5' - キャップ構造、最も好ましくは Cap1 構造；
- b) 本明細書に記載される a-1、a-4、c-1、e-4、g-2、i-2、又は i-3 に係る 3' - UTR 及び 5' - UTR エレメント；
- c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
- d) 本明細書に記載される少なくとも 1 つのコード配列であって、前記 5' - UTR と前記 3' - UTR との間、好ましくは前記 5' - UTR の下流且つ前記 3' - UTR の上流に位置し、好ましくは配列番号 69～77、484～492、899～906、1268～1275、1637～1644、2006～2013、2375～2382、2744～2751、3113～3120、3482～3489、3851～3858、4220～4227、4589～4596、4958～4965、5327～5334、5696～5703、6065～6072、6434～6441、6803～6810、7172～7179、7541～7548、7910～7917、11727～11734、12096～12103、12465～12472、12834～12841、13941～13948、14310～14317、14679～14686、15048～15055、15417～15424、15786～15793、13203～13210、13572～13579、16155～16162、16524～16531、16893～169

00、17262～17269、17631～17638、18000～18007、18369～18376、18738～18745、19107～19114、19476～19483、21363～21384、21389～21410（又はこれらの断片若しくはバリエーション）のいずれかから選択される少なくとも1つのコード配列；

e) 約64個のアデノシンを含むポリ（A）配列；

f) 約30個のシステインを含むポリ（C）配列；

g) 配列番号39又は40に係るヒストンステムループ、を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン（Ψ）ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン（m1Ψ）ヌクレオチドで置換されている。

【0291】

第1の態様の更に好ましい実施形態においては、人工RNA、好ましくはmRNAは、5'から3'方向に、以下のエレメント：

a) 5'-キャップ構造、好ましくは本明細書に記載される5'-キャップ構造、最も好ましくはCap1構造；

b) 本明細書に記載されるa-1、a-4、c-1、e-4、g-2、i-2、又はi-3に係る3'-UTR及び5'-UTRエレメント；

c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；

d) 本明細書に記載される少なくとも1つのコード配列であって、前記5'-UTRと前記3'-UTRとの間、好ましくは前記5'-UTRの下流且つ前記3'-UTRの上流に位置

し、好ましくは配列番号69～77、484～492、899～906、1268～1275、1637～1644、2006～2013、2375～2382、2744～2751、3113～3120、3482～3489、3851～3858、4220～4227、4589～4596、4958～4965、5327～5334、5696～5703、6065～6072、6434～6441、6803～6810、7172～7179、7541～7548、7910～7917、11727～11734、12096～12103、12465～12472、12834～12841、13941～13948、14310～14317、14679～14686、15048～15055、15417～15424、15786～15793、13203～13210、13572～13579、16155～16162、16524～16531、16893～16900、17262～17269、17631～17638、18000～18007、18369～18376、18738～18745、19107～19114、19476～19483、21363～21384、21389～21410（又はこれらの断片若しくはバリエーション）のいずれかから選択される少なくとも1つのコード配列；

e) 約64個のアデノシンを含むポリ（A）配列；

f) 配列番号39又は40に係るヒストンステムループ、を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン（Ψ）ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン（m1Ψ）ヌクレオチドで置換されている。

【0292】

好ましいRSVポリペプチド、核酸、及びmRNA配列を、表5A、5B及び表6A、6Bに示す。

【0293】

表5A及び表5Bでは、タンパク質設計を行1に示す。表中、列A～Jは、RSV融合（F）タンパク質に由来する本発明の具体的な適切な構築物を表し、列Aは、F0に好適な配列を示し、列Bは、F-delに好適な配列を示し、列Cは、F0_DSCav1に好適な配列を示し、列Dは、F-del_DSCav1に好適な配列を示し、列Eは、F_DSCav1_mut1に好適な配列を示し、列Fは、F-del_DSCav1_mut1に好適な配列を示し、列Gは、F_DSCav1_mut2に好適な配列を示し、列Hは、F-del_DSCav1_mut2に好適な配列を示し、列Iは、F_DSC

10

20

30

40

50

a v 1 __ m u t 3 に好適な配列を示し、列 J は、F - d e l __ D S C a v 1 __ m u t 3 に好適な配列を示す。

【 0 2 9 4 】

タンパク質設計を行 1（列 A ～ J）に示し、配列表に示す具体的なタンパク質配列番号を行 2（「タンパク質」）に示す。各タンパク質構築物の対応するコード配列の配列番号を行 3 に示す（「c d s」、各種 c d s 最適化については表 3 と比較されたい）。コドン改変コード配列のタイプ（例えば、o p t 1、o p t 2、o p t 3、o p t 4、o p t 5、o p t 6、o p t 1 1）などに関する更なる情報は、配列表の各配列番号の< 2 2 3 > 識別子と表 3 に記載される。前記コード配列を含む対応する m R N A 構築物の配列番号及び本発明に係る好適な 3' - U T R 及び 5' - U T R は、行 4 ～ 4 7 に示す（本明細書に記載 m R N A 設計 a - 1 ～ i - 3）。表 5 A では、H R S V（A 2）に由来する m R N A 配列が示され、表 5 B では、H R S V（メンフィス - 3 7）に由来する m R N A 配列が示される。m R N A 構築物に含まれるコード配列のタイプ（例えば、w t、o p t 1、o p t 2、o p t 3、o p t 4、o p t 5、o p t 6、o p t 1 1）などに関する更なる情報は、配列表の各配列番号の< 2 2 3 > 識別子に記載される。

【 0 2 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 A - 1】

表 5 A : HRSV (A2) に由来する RSV F をコードする好ましい mRNA 構築物 (列 A ~ J)

1		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
2	クパク質	68	483	898	1267	1636	2005	2374	2743	3112	3481
3	cds	69-77, 21363	484- 492, 21364	899- 906, 21365	1268- 1275, 21366	1637- 1644, 21369	2006- 2013, 21370	2375- 2382, 21371	2744- 2751, 21372	3113- 3120, 21373	3482- 3489, 21374
4	mRNA 設計 a-1	78-86, 21415- 21417, 21561- 21563	493- 501, 21418- 21420, 21564- 21566	907- 914, 21421- 21423, 21567- 21569	1276- 1283, 21424- 21426, 21570- 21572	1645- 1652, 21433- 21435, 21579- 21581	2014- 2021, 21436- 21438, 21582- 21584	2383- 2390, 21439- 21441, 21585- 21587	2752- 2759, 21442- 21444, 21588- 21590	3121- 3128, 21445- 21447, 21591- 21593	3490- 3497, 21448- 21450, 21594- 21596
5	mRNA 設計 a-2	87-95	502-510	915-922	1284- 1291	1653- 1660	2022- 2029	2391- 2398	2760- 2767	3129- 3136	3498- 3505
6	mRNA 設計 a-3	96-104	511-519	923-930	1292- 1299	1661- 1668	2030- 2037	2399- 2406	2768- 2775	3137- 3144	3506- 3513
7	mRNA 設計 a-4	105-113	520-528	931-938	1300- 1307	1669- 1676	2038- 2045	2407- 2414	2776- 2783	3145- 3152	3514- 3521
8	mRNA 設計 a-5	114-122	529-537	939-946	1308- 1315	1677- 1684	2046- 2053	2415- 2422	2784- 2791	3153- 3160	3522- 3529
9	mRNA 設計 b-1	123-131	538-546	947-954	1316- 1323	1685- 1692	2054- 2061	2423- 2430	2792- 2799	3161- 3168	3530- 3537
10	mRNA 設計 b-2	132-140	547-555	955-962	1324- 1331	1693- 1700	2062- 2069	2431- 2438	2800- 2807	3169- 3176	3538- 3545
11	mRNA 設計 b-3	141-149	556-564	963-970	1332- 1339	1701- 1708	2070- 2077	2439- 2446	2808- 2815	3177- 3184	3546- 3553
12	mRNA 設計 b-4	150-158	565-573	971-978	1340- 1347	1709- 1716	2078- 2085	2447- 2454	2816- 2823	3185- 3192	3554- 3561
13	mRNA 設計 b-5	159-167	574-582	979-986	1348- 1355	1717- 1724	2086- 2093	2455- 2462	2824- 2831	3193- 3200	3562- 3569
14	mRNA 設計 c-1	168-176	583-591	987-994	1356- 1363	1725- 1732	2094- 2101	2463- 2470	2832- 2839	3201- 3208	3570- 3577
15	mRNA 設計 c-2	177-185	592-600	995- 1002	1364- 1371	1733- 1740	2102- 2109	2471- 2478	2840- 2847	3209- 3216	3578- 3585
16	mRNA 設計 c-3	186-194	601-609	1003- 1010	1372- 1379	1741- 1748	2110- 2117	2479- 2486	2848- 2855	3217- 3224	3586- 3593
17	mRNA 設計 c-4	195-203	610-618	1011- 1018	1380- 1387	1749- 1756	2118- 2125	2487- 2494	2856- 2863	3225- 3232	3594- 3601
18	mRNA 設計 c-5	204-212	619-627	1019- 1026	1388- 1395	1757- 1764	2126- 2133	2495- 2502	2864- 2871	3233- 3240	3602- 3609
19	mRNA 設計 d-1	213-221	628-636	1027- 1034	1396- 1403	1765- 1772	2134- 2141	2503- 2510	2872- 2879	3241- 3248	3610- 3617
20	mRNA 設計 d-2	222-230	637-645	1035- 1042	1404- 1411	1773- 1780	2142- 2149	2511- 2518	2880- 2887	3249- 3256	3618- 3625
21	mRNA 設計 d-3	231-239	646-654	1043- 1050	1412- 1419	1781- 1788	2150- 2157	2519- 2526	2888- 2895	3257- 3264	3626- 3633
22	mRNA 設計 d-4	240-248	655-663	1051- 1058	1420- 1427	1789- 1796	2158- 2165	2527- 2534	2896- 2903	3265- 3272	3634- 3641
23	mRNA 設計 d-5	249-257	664-672	1059- 1066	1428- 1435	1797- 1804	2166- 2173	2535- 2542	2904- 2911	3273- 3280	3642- 3649
24	mRNA 設計 e-1	258-266	673-681	1067- 1074	1436- 1443	1805- 1812	2174- 2181	2543- 2550	2912- 2919	3281- 3288	3650- 3657

10

20

30

40

【表 5 A - 2】

25	mRNA 設計 e-2	267-275	682-690	1075- 1082	1444- 1451	1813- 1820	2182- 2189	2551- 2558	2920- 2927	3289- 3296	3658- 3665
26	mRNA 設計 e-3	276-284	691-699	1083- 1090	1452- 1459	1821- 1828	2190- 2197	2559- 2566	2928- 2935	3297- 3304	3666- 3673
27	mRNA 設計 e-4	285-293	700-708	1091- 1098	1460- 1467	1829- 1836	2198- 2205	2567- 2574	2936- 2943	3305- 3312	3674- 3681
28	mRNA 設計 e-5	294-302	709-717	1099- 1106	1468- 1475	1837- 1844	2206- 2213	2575- 2582	2944- 2951	3313- 3320	3682- 3689
29	mRNA 設計 e-6	303-311	718-726	1107- 1114	1476- 1483	1845- 1852	2214- 2221	2583- 2590	2952- 2959	3321- 3328	3690- 3697
30	mRNA 設計 f-1	312-320	727-735	1115- 1122	1484- 1491	1853- 1860	2222- 2229	2591- 2598	2960- 2967	3329- 3336	3698- 3705
31	mRNA 設計 f-2	321-329	736-744	1123- 1130	1492- 1499	1861- 1868	2230- 2237	2599- 2606	2968- 2975	3337- 3344	3706- 3713
32	mRNA 設計 f-3	330-338	745-753	1131- 1138	1500- 1507	1869- 1876	2238- 2245	2607- 2614	2976- 2983	3345- 3352	3714- 3721
33	mRNA 設計 f-4	339-347	754-762	1139- 1146	1508- 1515	1877- 1884	2246- 2253	2615- 2622	2984- 2991	3353- 3360	3722- 3729
34	mRNA 設計 f-5	348-356	763-771	1147- 1154	1516- 1523	1885- 1892	2254- 2261	2623- 2630	2992- 2999	3361- 3368	3730- 3737
35	mRNA 設計 g-1	357-365	772-780	1155- 1162	1524- 1531	1893- 1900	2262- 2269	2631- 2638	3000- 3007	3369- 3376	3738- 3745
36	mRNA 設計 g-2	366-374	781-789	1163- 1170	1532- 1539	1901- 1908	2270- 2277	2639- 2646	3008- 3015	3377- 3384	3746- 3753
37	mRNA 設計 g-3	375-383	790-798	1171- 1178	1540- 1547	1909- 1916	2278- 2285	2647- 2654	3016- 3023	3385- 3392	3754- 3761
38	mRNA 設計 g-4	384-392	799-807	1179- 1186	1548- 1555	1917- 1924	2286- 2293	2655- 2662	3024- 3031	3393- 3400	3762- 3769
39	mRNA 設計 g-5	393-401	808-816	1187- 1194	1556- 1563	1925- 1932	2294- 2301	2663- 2670	3032- 3039	3401- 3408	3770- 3777
40	mRNA 設計 h-1	402-410	817-825	1195- 1202	1564- 1571	1933- 1940	2302- 2309	2671- 2678	3040- 3047	3409- 3416	3778- 3785
41	mRNA 設計 h-2	411-419	826-834	1203- 1210	1572- 1579	1941- 1948	2310- 2317	2679- 2686	3048- 3055	3417- 3424	3786- 3793
42	mRNA 設計 h-3	420-428	835-843	1211- 1218	1580- 1587	1949- 1956	2318- 2325	2687- 2694	3056- 3063	3425- 3432	3794- 3801
43	mRNA 設計 h-4	429-437	844-852	1219- 1226	1588- 1595	1957- 1964	2326- 2333	2695- 2702	3064- 3071	3433- 3440	3802- 3809
44	mRNA 設計 h-5	438-446	853-861	1227- 1234	1596- 1603	1965- 1972	2334- 2341	2703- 2710	3072- 3079	3441- 3448	3810- 3817
45	mRNA 設計 i-1	447-455	862-870	1235- 1242	1604- 1611	1973- 1980	2342- 2349	2711- 2718	3080- 3087	3449- 3456	3818- 3825
46	mRNA 設計 i-2	456-473	871-888	1243- 1258	1612- 1627	1981- 1996	2350- 2365	2719- 2734	3088- 3103	3457- 3472	3826- 3841
47	mRNA 設計 i-3	474-482	889-897	1259- 1266	1628- 1635	1997- 2004	2366- 2373	2735- 2742	3104- 3111	3473- 3480	3842- 3849
48	mRNA 設計 i-4				8278						

【 0 2 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 5 B - 1】

表 5 B : HRSV (メンフィス 37) に由来する RSV F をコードする好ましい mRNA 構築物 (列 A ~ J)

1		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
2	タンパク質	11726	12095	12464	12833	13940	14309	14678	15047	15416	15785
3	cds	11727- 11734, 21389	12096- 12103, 21390	12465- 12472, 21391	12834- 12841, 21392	13941- 13948, 21395	14310- 14317, 21396	14679- 14686, 21397	15048- 15055, 21398	15417- 15424, 21399	15786- 15793, 21400
4	mRNA 設計 a-1	11735- 11742, 21489, 21490, 21635, 21636	12104- 12111, 21491, 21492, 21637, 21638	12473- 12480, 21493- 21496, 21495, 21639- 21641	12842- 12849, 21496- 21498, 21642- 21644	13949- 13956, 21505- 21507, 21651- 21653	14318- 14325, 21508- 21510, 21654- 21656	14687- 14694, 21511- 21513, 21657- 21659	15056- 15063, 21514- 21516, 21660- 21662	15425- 15432, 21517- 21519, 21663- 21665	15794- 15801, 21520- 21522, 21666- 21668
5	mRNA 設計 a-2	11743- 11750	12112- 12119	12481- 12488	12850- 12857	13957- 13964	14326- 14333	14695- 14702	15064- 15071	15433- 15440	15802- 15809
6	mRNA 設計 a-3	11751- 11758	12120- 12127	12489- 12496	12858- 12865	13965- 13972	14334- 14341	14703- 14710	15072- 15079	15441- 15448	15810- 15817
7	mRNA 設計 a-4	11759- 11766	12128- 12135	12497- 12504	12866- 12873	13973- 13980	14342- 14349	14711- 14718	15080- 15087	15449- 15456	15818- 15825
8	mRNA 設計 a-5	11767- 11774	12136- 12143	12505- 12512	12874- 12881	13981- 13988	14350- 14357	14719- 14726	15088- 15095	15457- 15464	15826- 15833
9	mRNA 設計 b-1	11775- 11782	12144- 12151	12513- 12520	12882- 12889	13989- 13996	14358- 14365	14727- 14734	15096- 15103	15465- 15472	15834- 15841
10	mRNA 設計 b-2	11783- 11790	12152- 12159	12521- 12528	12890- 12897	13997- 14004	14366- 14373	14735- 14742	15104- 15111	15473- 15480	15842- 15849
11	mRNA 設計 b-3	11791- 11798	12160- 12167	12529- 12536	12898- 12905	14005- 14012	14374- 14381	14743- 14750	15112- 15119	15481- 15488	15850- 15857
12	mRNA 設計 b-4	11799- 11806	12168- 12175	12537- 12544	12906- 12913	14013- 14020	14382- 14389	14751- 14758	15120- 15127	15489- 15496	15858- 15865
13	mRNA 設計 b-5	11807- 11814	12176- 12183	12545- 12552	12914- 12921	14021- 14028	14390- 14397	14759- 14766	15128- 15135	15497- 15504	15866- 15873
14	mRNA 設計 c-1	11815- 11822	12184- 12191	12553- 12560	12922- 12929	14029- 14036	14398- 14405	14767- 14774	15136- 15143	15505- 15512	15874- 15881
15	mRNA 設計 c-2	11823- 11830	12192- 12199	12561- 12568	12930- 12937	14037- 14044	14406- 14413	14775- 14782	15144- 15151	15513- 15520	15882- 15889
16	mRNA 設計 c-3	11831- 11838	12200- 12207	12569- 12576	12938- 12945	14045- 14052	14414- 14421	14783- 14790	15152- 15159	15521- 15528	15890- 15897
17	mRNA 設計 c-4	11839- 11846	12208- 12215	12577- 12584	12946- 12953	14053- 14060	14422- 14429	14791- 14798	15160- 15167	15529- 15536	15898- 15905
18	mRNA 設計 c-5	11847- 11854	12216- 12223	12585- 12592	12954- 12961	14061- 14068	14430- 14437	14799- 14806	15168- 15175	15537- 15544	15906- 15913
19	mRNA 設計 d-1	11855- 11862	12224- 12231	12593- 12600	12962- 12969	14069- 14076	14438- 14445	14807- 14814	15176- 15183	15545- 15552	15914- 15921
20	mRNA 設計 d-2	11863- 11870	12232- 12239	12601- 12608	12970- 12977	14077- 14084	14446- 14453	14815- 14822	15184- 15191	15553- 15560	15922- 15929
21	mRNA 設計 d-3	11871- 11878	12240- 12247	12609- 12616	12978- 12985	14085- 14092	14454- 14461	14823- 14830	15192- 15199	15561- 15568	15930- 15937
22	mRNA 設計 d-4	11879- 11886	12248- 12255	12617- 12624	12986- 12993	14093- 14100	14462- 14469	14831- 14838	15200- 15207	15569- 15576	15938- 15945

10

20

30

40

50

【表 5 B - 2】

23	mRNA 設計 d-5	11887- 11894	12256- 12263	12625- 12632	12994- 13001	14101- 14108	14470- 14477	14839- 14846	15208- 15215	15577- 15584	15946- 15953
24	mRNA 設計 e-1	11895- 11902	12264- 12271	12633- 12640	13002- 13009	14109- 14116	14478- 14485	14847- 14854	15216- 15223	15585- 15592	15954- 15961
25	mRNA 設計 e-2	11903- 11910	12272- 12279	12641- 12648	13010- 13017	14117- 14124	14486- 14493	14855- 14862	15224- 15231	15593- 15600	15962- 15969
26	mRNA 設計 e-3	11911- 11918	12280- 12287	12649- 12656	13018- 13025	14125- 14132	14494- 14501	14863- 14870	15232- 15239	15601- 15608	15970- 15977
27	mRNA 設計 e-4	11919- 11926	12288- 12295	12657- 12664	13026- 13033	14133- 14140	14502- 14509	14871- 14878	15240- 15247	15609- 15616	15978- 15985
28	mRNA 設計 e-5	11927- 11934	12296- 12303	12665- 12672	13034- 13041	14141- 14148	14510- 14517	14879- 14886	15248- 15255	15617- 15624	15986- 15993
29	mRNA 設計 e-6	11935- 11942	12304- 12311	12673- 12680	13042- 13049	14149- 14156	14518- 14525	14887- 14894	15256- 15263	15625- 15632	15994- 16001
30	mRNA 設計 f-1	11943- 11950	12312- 12319	12681- 12688	13050- 13057	14157- 14164	14526- 14533	14895- 14902	15264- 15271	15633- 15640	16002- 16009
31	mRNA 設計 f-2	11951- 11958	12320- 12327	12689- 12696	13058- 13065	14165- 14172	14534- 14541	14903- 14910	15272- 15279	15641- 15648	16010- 16017
32	mRNA 設計 f-3	11959- 11966	12328- 12335	12697- 12704	13066- 13073	14173- 14180	14542- 14549	14911- 14918	15280- 15287	15649- 15656	16018- 16025
33	mRNA 設計 f-4	11967- 11974	12336- 12343	12705- 12712	13074- 13081	14181- 14188	14550- 14557	14919- 14926	15288- 15295	15657- 15664	16026- 16033
34	mRNA 設計 f-5	11975- 11982	12344- 12351	12713- 12720	13082- 13089	14189- 14196	14558- 14565	14927- 14934	15296- 15303	15665- 15672	16034- 16041
35	mRNA 設計 g-1	11983- 11990	12352- 12359	12721- 12728	13090- 13097	14197- 14204	14566- 14573	14935- 14942	15304- 15311	15673- 15680	16042- 16049
36	mRNA 設計 g-2	11991- 11998	12360- 12367	12729- 12736	13098- 13105	14205- 14212	14574- 14581	14943- 14950	15312- 15319	15681- 15688	16050- 16057
37	mRNA 設計 g-3	11999- 12006	12368- 12375	12737- 12744	13106- 13113	14213- 14220	14582- 14589	14951- 14958	15320- 15327	15689- 15696	16058- 16065
38	mRNA 設計 g-4	12007- 12014	12376- 12383	12745- 12752	13114- 13121	14221- 14228	14590- 14597	14959- 14966	15328- 15335	15697- 15704	16066- 16073
39	mRNA 設計 g-5	12015- 12022	12384- 12391	12753- 12760	13122- 13129	14229- 14236	14598- 14605	14967- 14974	15336- 15343	15705- 15712	16074- 16081
40	mRNA 設計 h-1	12023- 12030	12392- 12399	12761- 12768	13130- 13137	14237- 14244	14606- 14613	14975- 14982	15344- 15351	15713- 15720	16082- 16089
41	mRNA 設計 h-2	12031- 12038	12400- 12407	12769- 12776	13138- 13145	14245- 14252	14614- 14621	14983- 14990	15352- 15359	15721- 15728	16090- 16097
42	mRNA 設計 h-3	12039- 12046	12408- 12415	12777- 12784	13146- 13153	14253- 14260	14622- 14629	14991- 14998	15360- 15367	15729- 15736	16098- 16105
43	mRNA 設計 h-4	12047- 12054	12416- 12423	12785- 12792	13154- 13161	14261- 14268	14630- 14637	14999- 15006	15368- 15375	15737- 15744	16106- 16113
44	mRNA 設計 h-5	12055- 12062	12424- 12431	12793- 12800	13162- 13169	14269- 14276	14638- 14645	15007- 15014	15376- 15383	15745- 15752	16114- 16121
45	mRNA 設計 i-1	12063- 12070	12432- 12439	12801- 12808	13170- 13177	14277- 14284	14646- 14653	15015- 15022	15384- 15391	15753- 15760	16122- 16129
46	mRNA 設計 i-2	12071- 12086	12440- 12455	12809- 12824	13178- 13193	14285- 14300	14654- 14669	15023- 15038	15392- 15407	15761- 15776	16130- 16145
47	mRNA 設計 i-3	12087- 12094	12456- 12463	12825- 12832	13194- 13201	14301- 14308	14670- 14677	15039- 15046	15408- 15415	15777- 15784	16146- 16153

10

20

30

40

【0 2 9 7】

表 6 A 及び表 6 B では、タンパク質設計を行 1 に示す。表中、列 K ~ V は、R S V 融合 (F) タンパク質に由来する本発明の具体的な適切な構築物を表し、列 K は、F _ D S C a v 1 _ m u t 0 に好適な配列を示し、列 L は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 0 に好適な配列を示し、列 M は、F _ D S C a v 1 _ m u t 4 に好適な配列を示し、列 N は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 4 に好適な配列を示し、列 O は、F _ D S C a v 1 _ m u t 5 に好適な配列を示し、列 P は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 5 に好適な配列を示し、列 Q は、F _ D S C a v 1 _ m u t 6 に好適な配列を示し、列 R は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 6 に好適な配列を示し、列 S は、F _ D S C a v 1 _ m u t 7

50

に好適な配列を示し、列 T は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 7 に好適な配列を示し、列 U は、F _ D S C a v 1 _ m u t 8 に好適な配列を示し、列 V は、F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 8 に好適な配列を示す。

【0298】

タンパク質設計は、最初の行（列 K ～ V）に示される。配列表に示す具体的なタンパク質配列番号は、行 2 の「P R T」に記載する。各タンパク質構築物の対応するコード配列の配列番号を、行 3 の「c d s」に示す（各種 c d s 最適化については表 4 と比較されたい）。コドン改変コード配列のタイプ（例えば、o p t 1、o p t 2、o p t 3、o p t 4、o p t 5、o p t 6、o p t 1 1）などに関する更なる情報は、配列表の各配列番号の<223>識別子と表 4 に記載される。前記コード配列を含む対応する m R N A 構築物の配列番号及び本発明に係る好適な 3' - U T R 及び 5' - U T R は、以下の各行に記載する（本明細書に記載する m R N A 設計「a - 1」～「i - 3」）。表 6 A では、H R S V（A 2）に由来する m R N A 配列が示され、表 6 B では、H R S V（メンフィス - 37）に由来する m R N A 配列が示される。

【0299】

m R N A 構築物に含まれるコード配列のタイプ（例えば、w t、o p t 1、o p t 2、o p t 3、o p t 4、o p t 5、o p t 6、o p t 1 1）などに関する更なる情報は、配列表の各配列番号の<223>識別子に記載される。

【0300】

表 6 A : H R S V（A 2）に由来する R S V F をコードする好ましい m R N A 構築物（列 K ～ V）

10

20

30

40

50

【表 6 A - 1】

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
PRT	3850	4219	4588	4957	5326	5695	6064	6433	6802	7171	7540	7909
cds	3851- 3858, 21367	4220- 4227, 21368	4589- 4596, 21375	4958- 4965, 21376	5327- 5334, 21377	5696- 5703, 21378	6065- 6072, 21379	6434- 6441, 21380	6803- 6810, 21381	7172- 7179, 21382	7541- 7548, 21383	7910- 7917, 21384
a-1	3859- 3866, 21427- 21429, 21573- 21575	4228- 4235, 21430- 21432, 21576- 21578	4597- 4604, 21451- 21453, 21597- 21599	4966- 4973, 21454- 21456, 21600- 21602	5335- 5342, 21457- 21459, 21603- 21605	5704- 5711, 21460- 21462, 21606- 21608	6073- 6080, 21463- 21465, 21609- 21611	6442- 6449, 21466- 21468, 21612- 21614	6811- 6818, 21469- 21471, 21615- 21617	7180- 7187, 21472- 21474, 21618- 21620	7549- 7556, 21475- 21477, 21621- 21623	7918- 7925, 21478- 21480, 21624- 21626
a-2	3867- 3874	4236- 4243	4605- 4612	4974- 4981	5343- 5350	5712- 5719	6081- 6088	6450- 6457	6819- 6826	7188- 7195	7557- 7564	7926- 7933
a-3	3875- 3882	4244- 4251	4613- 4620	4982- 4989	5351- 5358	5720- 5727	6089- 6096	6458- 6465	6827- 6834	7196- 7203	7565- 7572	7934- 7941
a-4	3883- 3890	4252- 4259	4621- 4628	4990- 4997	5359- 5366	5728- 5735	6097- 6104	6466- 6473	6835- 6842	7204- 7211	7573- 7580	7942- 7949
a-5	3891- 3898	4260- 4267	4629- 4636	4998- 5005	5367- 5374	5736- 5743	6105- 6112	6474- 6481	6843- 6850	7212- 7219	7581- 7588	7950- 7957
b-1	3899- 3906	4268- 4275	4637- 4644	5006- 5013	5375- 5382	5744- 5751	6113- 6120	6482- 6489	6851- 6858	7220- 7227	7589- 7596	7958- 7965
b-2	3907- 3914	4276- 4283	4645- 4652	5014- 5021	5383- 5390	5752- 5759	6121- 6128	6490- 6497	6859- 6866	7228- 7235	7597- 7604	7966- 7973
b-3	3915- 3922	4284- 4291	4653- 4660	5022- 5029	5391- 5398	5760- 5767	6129- 6136	6498- 6505	6867- 6874	7236- 7243	7605- 7612	7974- 7981
b-4	3923- 3930	4292- 4299	4661- 4668	5030- 5037	5399- 5406	5768- 5775	6137- 6144	6506- 6513	6875- 6882	7244- 7251	7613- 7620	7982- 7989
b-5	3931- 3938	4300- 4307	4669- 4676	5038- 5045	5407- 5414	5776- 5783	6145- 6152	6514- 6521	6883- 6890	7252- 7259	7621- 7628	7990- 7997
c-1	3939- 3946	4308- 4315	4677- 4684	5046- 5053	5415- 5422	5784- 5791	6153- 6160	6522- 6529	6891- 6898	7260- 7267	7629- 7636	7998- 8005
c-2	3947- 3954	4316- 4323	4685- 4692	5054- 5061	5423- 5430	5792- 5799	6161- 6168	6530- 6537	6899- 6906	7268- 7275	7637- 7644	8006- 8013
c-3	3955- 3962	4324- 4331	4693- 4700	5062- 5069	5431- 5438	5800- 5807	6169- 6176	6538- 6545	6907- 6914	7276- 7283	7645- 7652	8014- 8021
c-4	3963- 3970	4332- 4339	4701- 4708	5070- 5077	5439- 5446	5808- 5815	6177- 6184	6546- 6553	6915- 6922	7284- 7291	7653- 7660	8022- 8029
c-5	3971- 3978	4340- 4347	4709- 4716	5078- 5085	5447- 5454	5816- 5823	6185- 6192	6554- 6561	6923- 6930	7292- 7299	7661- 7668	8030- 8037
d-1	3979- 3986	4348- 4355	4717- 4724	5086- 5093	5455- 5462	5824- 5831	6193- 6200	6562- 6569	6931- 6938	7300- 7307	7669- 7676	8038- 8045
d-2	3987- 3994	4356- 4363	4725- 4732	5094- 5101	5463- 5470	5832- 5839	6201- 6208	6570- 6577	6939- 6946	7308- 7315	7677- 7684	8046- 8053
d-3	3995- 4002	4364- 4371	4733- 4740	5102- 5109	5471- 5478	5840- 5847	6209- 6216	6578- 6585	6947- 6954	7316- 7323	7685- 7692	8054- 8061
d-4	4003- 4010	4372- 4379	4741- 4748	5110- 5117	5479- 5486	5848- 5855	6217- 6224	6586- 6593	6955- 6962	7324- 7331	7693- 7700	8062- 8069
d-5	4011- 4018	4380- 4387	4749- 4756	5118- 5125	5487- 5494	5856- 5863	6225- 6232	6594- 6601	6963- 6970	7332- 7339	7701- 7708	8070- 8077

10

20

30

40

50

【表 6 A - 2】

e-1	4019- 4026	4388- 4395	4757- 4764	5126- 5133	5495- 5502	5864- 5871	6233- 6240	6602- 6609	6971- 6978	7340- 7347	7709- 7716	8078- 8085
e-2	4027- 4034	4396- 4403	4765- 4772	5134- 5141	5503- 5510	5872- 5879	6241- 6248	6610- 6617	6979- 6986	7348- 7355	7717- 7724	8086- 8093
e-3	4035- 4042	4404- 4411	4773- 4780	5142- 5149	5511- 5518	5880- 5887	6249- 6256	6618- 6625	6987- 6994	7356- 7363	7725- 7732	8094- 8101
e-4	4043- 4050	4412- 4419	4781- 4788	5150- 5157	5519- 5526	5888- 5895	6257- 6264	6626- 6633	6995- 7002	7364- 7371	7733- 7740	8102- 8109
e-5	4051- 4058	4420- 4427	4789- 4796	5158- 5165	5527- 5534	5896- 5903	6265- 6272	6634- 6641	7003- 7010	7372- 7379	7741- 7748	8110- 8117
e-6	4059- 4066	4428- 4435	4797- 4804	5166- 5173	5535- 5542	5904- 5911	6273- 6280	6642- 6649	7011- 7018	7380- 7387	7749- 7756	8118- 8125
f-1	4067- 4074	4436- 4443	4805- 4812	5174- 5181	5543- 5550	5912- 5919	6281- 6288	6650- 6657	7019- 7026	7388- 7395	7757- 7764	8126- 8133
f-2	4075- 4082	4444- 4451	4813- 4820	5182- 5189	5551- 5558	5920- 5927	6289- 6296	6658- 6665	7027- 7034	7396- 7403	7765- 7772	8134- 8141
f-3	4083- 4090	4452- 4459	4821- 4828	5190- 5197	5559- 5566	5928- 5935	6297- 6304	6666- 6673	7035- 7042	7404- 7411	7773- 7780	8142- 8149
f-4	4091- 4098	4460- 4467	4829- 4836	5198- 5205	5567- 5574	5936- 5943	6305- 6312	6674- 6681	7043- 7050	7412- 7419	7781- 7788	8150- 8157
f-5	4099- 4106	4468- 4475	4837- 4844	5206- 5213	5575- 5582	5944- 5951	6313- 6320	6682- 6689	7051- 7058	7420- 7427	7789- 7796	8158- 8165
g-1	4107- 4114	4476- 4483	4845- 4852	5214- 5221	5583- 5590	5952- 5959	6321- 6328	6690- 6697	7059- 7066	7428- 7435	7797- 7804	8166- 8173
g-2	4115- 4122	4484- 4491	4853- 4860	5222- 5229	5591- 5598	5960- 5967	6329- 6336	6698- 6705	7067- 7074	7436- 7443	7805- 7812	8174- 8181
g-3	4123- 4130	4492- 4499	4861- 4868	5230- 5237	5599- 5606	5968- 5975	6337- 6344	6706- 6713	7075- 7082	7444- 7451	7813- 7820	8182- 8189
g-4	4131- 4138	4500- 4507	4869- 4876	5238- 5245	5607- 5614	5976- 5983	6345- 6352	6714- 6721	7083- 7090	7452- 7459	7821- 7828	8190- 8197
g-5	4139- 4146	4508- 4515	4877- 4884	5246- 5253	5615- 5622	5984- 5991	6353- 6360	6722- 6729	7091- 7098	7460- 7467	7829- 7836	8198- 8205
h-1	4147- 4154	4516- 4523	4885- 4892	5254- 5261	5623- 5630	5992- 5999	6361- 6368	6730- 6737	7099- 7106	7468- 7475	7837- 7844	8206- 8213
h-2	4155- 4162	4524- 4531	4893- 4900	5262- 5269	5631- 5638	6000- 6007	6369- 6376	6738- 6745	7107- 7114	7476- 7483	7845- 7852	8214- 8221
h-3	4163- 4170	4532- 4539	4901- 4908	5270- 5277	5639- 5646	6008- 6015	6377- 6384	6746- 6753	7115- 7122	7484- 7491	7853- 7860	8222- 8229
h-4	4171- 4178	4540- 4547	4909- 4916	5278- 5285	5647- 5654	6016- 6023	6385- 6392	6754- 6761	7123- 7130	7492- 7499	7861- 7868	8230- 8237
h-5	4179- 4186	4548- 4555	4917- 4924	5286- 5293	5655- 5662	6024- 6031	6393- 6400	6762- 6769	7131- 7138	7500- 7507	7869- 7876	8238- 8245
i-1	4187- 4194	4556- 4563	4925- 4932	5294- 5301	5663- 5670	6032- 6039	6401- 6408	6770- 6777	7139- 7146	7508- 7515	7877- 7884	8246- 8253
i-2	4195- 4210	4564- 4579	4933- 4948	5302- 5317	5671- 5686	6040- 6055	6409- 6424	6778- 6793	7147- 7162	7516- 7531	7885- 7900	8254- 8269
i-3	4211- 4218	4580- 4587	4949- 4956	5318- 5325	5687- 5694	6056- 6063	6425- 6432	6794- 6801	7163- 7170	7532- 7539	7901- 7908	8270- 8277

10

20

30

40

【 0 3 0 1】

表 6 B : H R S V (メンフィスー 3 7) に由来する R S V F をコードする好ましい m R N A 構築物 (列 K ~ V)

【表 6 B - 1】

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
PRT	13202	13571	16154	16523	16892	17261	17630	17999	18368	18737	19106	19475
cds	13203-	13572-	16155-	16524-	16893-	17262-	17631-	18000-	18369-	18738-	19107-	19476-
	13210,	13579,	16162,	16531,	16900,	17269,	17638,	18007,	18376,	18745,	19114,	19483,
	21393	21394	21401	21402	21403	21404	21405	21406	21407	21408	21409	21410
a-1	13211-	13580-	16163-	16532-	16901-	17270-	17639-	18008-	18377-	18746-	19115-	19484-
	13218,	13587,	16170,	16539,	16908,	17277,	17646,	18015,	18384,	18753,	19122,	19491,
	21499-	21502-	21523-	21526-	21529-	21532-	21535-	21538-	21541-	21544-	21547-	21550-
	21501,	21504,	21525,	21528,	21531,	21534,	21537,	21540,	21543,	21546,	21549,	21552,
	21645-	21648-	21669-	21672-	21675-	21678-	21681-	21684-	21687-	21690-	21693-	21696-
	21647	21650	21671	21674	21677	21680	21683	21686	21689	21692	21695	21698
a-2	13219-	13588-	16171-	16540-	16909-	17278-	17647-	18016-	18385-	18754-	19123-	19492-
	13226	13595	16178	16547	16916	17285	17654	18023	18392	18761	19130	19499
a-3	13227-	13596-	16179-	16548-	16917-	17286-	17655-	18024-	18393-	18762-	19131-	19500-
	13234	13603	16186	16555	16924	17293	17662	18031	18400	18769	19138	19507
a-4	13235-	13604-	16187-	16556-	16925-	17294-	17663-	18032-	18401-	18770-	19139-	19508-
	13242	13611	16194	16563	16932	17301	17670	18039	18408	18777	19146	19515
a-5	13243-	13612-	16195-	16564-	16933-	17302-	17671-	18040-	18409-	18778-	19147-	19516-
	13250	13619	16202	16571	16940	17309	17678	18047	18416	18785	19154	19523
b-1	13251-	13620-	16203-	16572-	16941-	17310-	17679-	18048-	18417-	18786-	19155-	19524-
	13258	13627	16210	16579	16948	17317	17686	18055	18424	18793	19162	19531
b-2	13259-	13628-	16211-	16580-	16949-	17318-	17687-	18056-	18425-	18794-	19163-	19532-
	13266	13635	16218	16587	16956	17325	17694	18063	18432	18801	19170	19539
b-3	13267-	13636-	16219-	16588-	16957-	17326-	17695-	18064-	18433-	18802-	19171-	19540-
	13274	13643	16226	16595	16964	17333	17702	18071	18440	18809	19178	19547
b-4	13275-	13644-	16227-	16596-	16965-	17334-	17703-	18072-	18441-	18810-	19179-	19548-
	13282	13651	16234	16603	16972	17341	17710	18079	18448	18817	19186	19555
b-5	13283-	13652-	16235-	16604-	16973-	17342-	17711-	18080-	18449-	18818-	19187-	19556-
	13290	13659	16242	16611	16980	17349	17718	18087	18456	18825	19194	19563
c-1	13291-	13660-	16243-	16612-	16981-	17350-	17719-	18088-	18457-	18826-	19195-	19564-
	13298	13667	16250	16619	16988	17357	17726	18095	18464	18833	19202	19571
c-2	13299-	13668-	16251-	16620-	16989-	17358-	17727-	18096-	18465-	18834-	19203-	19572-
	13306	13675	16258	16627	16996	17365	17734	18103	18472	18841	19210	19579
c-3	13307-	13676-	16259-	16628-	16997-	17366-	17735-	18104-	18473-	18842-	19211-	19580-
	13314	13683	16266	16635	17004	17373	17742	18111	18480	18849	19218	19587
c-4	13315-	13684-	16267-	16636-	17005-	17374-	17743-	18112-	18481-	18850-	19219-	19588-
	13322	13691	16274	16643	17012	17381	17750	18119	18488	18857	19226	19595
c-5	13323-	13692-	16275-	16644-	17013-	17382-	17751-	18120-	18489-	18858-	19227-	19596-
	13330	13699	16282	16651	17020	17389	17758	18127	18496	18865	19234	19603
d-1	13331-	13700-	16283-	16652-	17021-	17390-	17759-	18128-	18497-	18866-	19235-	19604-
	13338	13707	16290	16659	17028	17397	17766	18135	18504	18873	19242	19611
d-2	13339-	13708-	16291-	16660-	17029-	17398-	17767-	18136-	18505-	18874-	19243-	19612-
	13346	13715	16298	16667	17036	17405	17774	18143	18512	18881	19250	19619
d-3	13347-	13716-	16299-	16668-	17037-	17406-	17775-	18144-	18513-	18882-	19251-	19620-
	13354	13723	16306	16675	17044	17413	17782	18151	18520	18889	19258	19627
d-4	13355-	13724-	16307-	16676-	17045-	17414-	17783-	18152-	18521-	18890-	19259-	19628-
	13362	13731	16314	16683	17052	17421	17790	18159	18528	18897	19266	19635
d-5	13363-	13732-	16315-	16684-	17053-	17422-	17791-	18160-	18529-	18898-	19267-	19636-
	13370	13739	16322	16691	17060	17429	17798	18167	18536	18905	19274	19643

10

20

30

40

50

【表 6 B - 2】

e-1	13371- 13378	13740- 13747	16323- 16330	16692- 16699	17061- 17068	17430- 17437	17799- 17806	18168- 18175	18537- 18544	18906- 18913	19275- 19282	19644- 19651
e-2	13379- 13386	13748- 13755	16331- 16338	16700- 16707	17069- 17076	17438- 17445	17807- 17814	18176- 18183	18545- 18552	18914- 18921	19283- 19290	19652- 19659
e-3	13387- 13394	13756- 13763	16339- 16346	16708- 16715	17077- 17084	17446- 17453	17815- 17822	18184- 18191	18553- 18560	18922- 18929	19291- 19298	19660- 19667
e-4	13395- 13402	13764- 13771	16347- 16354	16716- 16723	17085- 17092	17454- 17461	17823- 17830	18192- 18199	18561- 18568	18930- 18937	19299- 19306	19668- 19675
e-5	13403- 13410	13772- 13779	16355- 16362	16724- 16731	17093- 17100	17462- 17469	17831- 17838	18200- 18207	18569- 18576	18938- 18945	19307- 19314	19676- 19683
e-6	13411- 13418	13780- 13787	16363- 16370	16732- 16739	17101- 17108	17470- 17477	17839- 17846	18208- 18215	18577- 18584	18946- 18953	19315- 19322	19684- 19691
f-1	13419- 13426	13788- 13795	16371- 16378	16740- 16747	17109- 17116	17478- 17485	17847- 17854	18216- 18223	18585- 18592	18954- 18961	19323- 19330	19692- 19699
f-2	13427- 13434	13796- 13803	16379- 16386	16748- 16755	17117- 17124	17486- 17493	17855- 17862	18224- 18231	18593- 18600	18962- 18969	19331- 19338	19700- 19707
f-3	13435- 13442	13804- 13811	16387- 16394	16756- 16763	17125- 17132	17494- 17501	17863- 17870	18232- 18239	18601- 18608	18970- 18977	19339- 19346	19708- 19715
f-4	13443- 13450	13812- 13819	16395- 16402	16764- 16771	17133- 17140	17502- 17509	17871- 17878	18240- 18247	18609- 18616	18978- 18985	19347- 19354	19716- 19723
f-5	13451- 13458	13820- 13827	16403- 16410	16772- 16779	17141- 17148	17510- 17517	17879- 17886	18248- 18255	18617- 18624	18986- 18993	19355- 19362	19724- 19731
g-1	13459- 13466	13828- 13835	16411- 16418	16780- 16787	17149- 17156	17518- 17525	17887- 17894	18256- 18263	18625- 18632	18994- 19001	19363- 19370	19732- 19739
g-2	13467- 13474	13836- 13843	16419- 16426	16788- 16795	17157- 17164	17526- 17533	17895- 17902	18264- 18271	18633- 18640	19002- 19009	19371- 19378	19740- 19747
g-3	13475- 13482	13844- 13851	16427- 16434	16796- 16803	17165- 17172	17534- 17541	17903- 17910	18272- 18279	18641- 18648	19010- 19017	19379- 19386	19748- 19755
g-4	13483- 13490	13852- 13859	16435- 16442	16804- 16811	17173- 17180	17542- 17549	17911- 17918	18280- 18287	18649- 18656	19018- 19025	19387- 19394	19756- 19763
g-5	13491- 13498	13860- 13867	16443- 16450	16812- 16819	17181- 17188	17550- 17557	17919- 17926	18288- 18295	18657- 18664	19026- 19033	19395- 19402	19764- 19771
h-1	13499- 13506	13868- 13875	16451- 16458	16820- 16827	17189- 17196	17558- 17565	17927- 17934	18296- 18303	18665- 18672	19034- 19041	19403- 19410	19772- 19779
h-2	13507- 13514	13876- 13883	16459- 16466	16828- 16835	17197- 17204	17566- 17573	17935- 17942	18304- 18311	18673- 18680	19042- 19049	19411- 19418	19780- 19787
h-3	13515- 13522	13884- 13891	16467- 16474	16836- 16843	17205- 17212	17574- 17581	17943- 17950	18312- 18319	18681- 18688	19050- 19057	19419- 19426	19788- 19795
h-4	13523- 13530	13892- 13899	16475- 16482	16844- 16851	17213- 17220	17582- 17589	17951- 17958	18320- 18327	18689- 18696	19058- 19065	19427- 19434	19796- 19803
h-5	13531- 13538	13900- 13907	16483- 16490	16852- 16859	17221- 17228	17590- 17597	17959- 17966	18328- 18335	18697- 18704	19066- 19073	19435- 19442	19804- 19811
i-1	13539- 13546	13908- 13915	16491- 16498	16860- 16867	17229- 17236	17598- 17605	17967- 17974	18336- 18343	18705- 18712	19074- 19081	19443- 19450	19812- 19819
i-2	13547- 13562	13916- 13931	16499- 16514	16868- 16883	17237- 17252	17606- 17621	17975- 17990	18344- 18359	18713- 18728	19082- 19097	19451- 19466	19820- 19835
i-3	13563- 13570	13932- 13939	16515- 16522	16884- 16891	17253- 17260	17622- 17629	17991- 17998	18360- 18367	18729- 18736	19098- 19105	19467- 19474	19836- 19843

10

20

30

40

【0302】

好ましい実施形態においては、人工RNAは、配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、7549～7908、7918～8277、8278、21415～21480、21561～21626、11735～12094、12104～12463、12473～12832、12842～13201、139

50

49～14308、14318～14677、14687～15046、15056～15415、15425～15784、15794～16153、13211～13570、13580～13939、16163～16522、16532～16891、16901～17260、17270～17629、17639～17998、18008～18367、18377～18736、18746～19105、19115～19474、19484～19843、21489～21552、21635～21698からなる群から選択される核酸配列、これらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなり、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン(Ψ)ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)ヌクレオチドで置換されている。

10

【0303】

好ましい実施形態においては、人工RNAは、(a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの異種3'非翻訳領域(3'-UTR)及び(b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結された、RSVFに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片若しくはバリエーションをコードする少なくとも1つのコード配列を含み、

— 前記人工RNAは、配列番号78～482、11735～12094、21415～21417、21561～21563、21489、21490、21635、21636(F0をコードする)からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

20

— 前記人工RNAは、配列番号493～897、12104～12463、21418～21420、21564～21566、21491、21492、21637、21638(F-delをコードする)からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

30

— 前記人工RNAは、配列番号907～1266、12473～12832、21421～21423、21567～21569、21493～21495、21639～21641(F0_DSCav1をコードする)からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

— 前記人工RNAは、配列番号1276～1635、8278、12842～13201、21424～21426、21570～21572、21496～21498、21642～21644(F-del_DSCav1をコードする)からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

40

— 前記人工RNAは、配列番号1645～2004、13949～14308、21433～21435、21579～21581、21505～21507、21651～21653(F_DSCav1_mut1をコードする)からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を

50

含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号2014～2373、14318～14677、21436～21438、21582～21584、21508～21510、21654～21656（F-de l _D S C a v 1 _m u t 1をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号2383～2742、14687～15046、21439～21441、21585～21587、21511～21513、21657～21659（F _D S C a v 1 _m u t 2をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号2752～3111、15056～15415、21442～21444、21588～21590、21514～21516、21660～21662（F-de l _D S C a v 1 _m u t 2をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号3121～3480、15425～15784、21445～21447、21591～21593、21517～21519、21663～21665（F _D S C a v 1 _m u t 3をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号3490～3849、15794～16153、21448～21450、21594～21596、21520～21522、21666～21668（F-de l _D S C a v 1 _m u t 3をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号3859～4218、13211～13570、21427～21429、21573～21575、21499～21501、21645～21647（F _D S C a v 1 _m u t 0をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号4228～4587、13580～13939、21430～21432、21576～21578、21502～21504、21648～21650（F-de l _D S C a v 1 _m u t 0をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

10

20

30

40

50

－ 前記人工RNAは、配列番号4597～4956、16163～16522、21451～21453、21597～21599、21523～21525、21669～21671（F__DSCav1__mut4をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号4966～5325、16532～16891、21454～21456、21600～21602、21526～21528、21672～21674（F-del__DSCav1__mut4をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号5335～5694、16901～17260、21457～21459、21603～21605、21529～21531、21675～21677（F__DSCav1__mut5をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号5704～6063、17270～17629、21460～21462、21606～21608、21532～21534、21678～21680（F-del__DSCav1__mut5をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号6073～6432、17639～17998、21463～21465、21609～21611、21535～21537、21681～21683（F__DSCav1__mut6をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号6442～6801、18008～18367、21466～21468、21612～21614、21538～21540、21684～21686（F-del__DSCav1__mut6をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号6811～7170、18377～18736、21469～21471、21615～21617、21541～21543、21687～21689（F__DSCav1__mut7をコードする）からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はからなる；

－ 前記人工RNAは、配列番号7180～7539、18746～19105、214

10

20

30

40

50

7 2 ~ 2 1 4 7 4、2 1 6 1 8 ~ 2 1 6 2 0、2 1 5 4 4 ~ 2 1 5 4 6、2 1 6 9 0 ~ 2 1 6 9 2 (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 7 をコードする) からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である R N A 配列を含む又ははからなる；

— 前記人工 R N A は、配列番号 7 5 4 9 ~ 7 9 0 8、1 9 1 1 5 ~ 1 9 4 7 4、2 1 4 7 5 ~ 2 1 4 7 7、2 1 6 2 1 ~ 2 1 6 2 3、2 1 5 4 7 ~ 2 1 5 4 9、2 1 6 9 3 ~ 2 1 6 9 5 (F _ D S C a v 1 _ m u t 8 をコードする) からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である R N A 配列を含む又ははからなる；

— 前記人工 R N A は、配列番号 7 9 1 8 ~ 8 2 7 7、1 9 4 8 4 ~ 1 9 8 4 3、2 1 4 7 8 ~ 2 1 4 8 0、2 1 6 2 4 ~ 2 1 6 2 6、2 1 5 5 0 ~ 2 1 5 5 2、2 1 6 9 6 ~ 2 1 6 9 8 (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 8 をコードする) からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である R N A 配列を含む又ははからなり、

任意に、少なくとも 1 つの又は 1 より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン (Ψ) ヌクレオチド又は N 1 - メチルシュードウリジン (m 1 Ψ) ヌクレオチドで置換されている。

【0304】

特に好ましい実施形態においては、人工 R N A は、(a) 少なくとも 1 つの異種 5' 非翻訳領域 (5' - U T R) 及び／又は少なくとも 1 つの異種 3' 非翻訳領域 (3' - U T R) 及び (b) 前記 3' - U T R 及び／又は 5' - U T R に機能可能に連結された、R S V F に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片若しくはバリエントをコードする少なくとも 1 つのコード配列を含み、前記人工 R N A が、配列番号 5 7 0 4 ~ 6 0 6 3、1 7 2 7 0 ~ 1 7 6 2 9、2 1 4 6 0 ~ 2 1 4 6 2、2 1 6 0 6 ~ 2 1 6 0 8、2 1 5 3 2 ~ 2 1 5 3 4、2 1 6 7 8 ~ 2 1 6 8 0 (F - d e l _ D S C a v 1 _ m u t 5 をコードする) からなる群から選択される核酸配列、又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントと同一である又は少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 同一である R N A 配列を含む又ははからなる。

【0305】

明細書全体を通して説明されるように、好適なアミノ酸配列又は核酸配列 (コード配列、m R N A 配列) に関する更なる情報を、配列表、特に、以下に説明するように、識別子 < 2 2 3 > の下に与えられる詳細からも得られる。

【0306】

例えば、配列表の配列番号 6 8 の数値識別子 < 2 2 3 > は、以下の通りである：「d e r i v e d a n d / o r m o d i f i e d p r o t e i n s e q u e n c e (a r t i f i c i a l) f r o m H R S V (A 2) _ F 0」。配列表全体を通して、数値識別子 < 2 2 3 > の下に与えられる情報は、同一の構造：「< C O N S T R U C T _ I D E N T I F I E R > から < S E Q U E N C E _ D E S C R I P T O R >」に当てはまると考えるべきである。< S E Q U E N C E _ D E S C R I P T O R > は、配列のタイプ (例えば、「誘導及び／又は修飾されたタンパク質配列」、「誘導及び／又は修飾された C D S」、「誘導及び／又は修飾された配列を含む m R N A 生成物設計 a - 1」、「又は「誘導及び／又は修飾された配列を含む m R N A 生成物設計 b - 4」、「又は「誘導及び／又は修飾された配列を含む m R N A 生成物設計 c - 5」、「又は「誘導及び／又は修飾された配列

を含むmRNA生成物設計g-4」など)及び野生型配列(「wt」)を含む又ははからなるかどうか、又は配列が配列最適化配列(例えば、「opt1」、「opt2」、「opt3」、「opt4」、「opt5」、「opt6」、「opt11」;配列最適化については、以下に更に詳細に記載する)を含む又ははからなるかどうかに関する。例えば、配列番号68の数値識別子<223>の下に与えられる<SEQUENCE_DESCRIPTOR>は、以下の通りである:「derived and/or modified protein sequence (artificial)」。数値識別子<223>の下に与えられる<CONSTRUCT_IDENTIFIER>は、以下の構造: (「生物__構築物名」、又は「生物__アクセッション番号__構築物名」)を有し、当業者が、本発明に係る同一RSVタンパク質をコードする好適な核酸配列(例えば、RNA、mRNA)を明確に誘導する助けとなることが意図される。例えば、配列番号68の数値識別子<223>の下に与えられる<CONSTRUCT_IDENTIFIER>は、「HRSV(A2) __F0」である。この例において、各タンパク質配列は、「HRSV(A2)」(生物)に由来し、タンパク質は、構造エレメント「F0」(構築物名、完全長F)を含む。当業者が配列番号68の構築物識別子、即ち「HRSV(A2) __F0」を使用する場合、前記当業者は、本発明の配列表から容易に取得できるRNAコード配列及びmRNA配列などの好適な核酸コード配列のリストに容易に到達する。

【0307】

組成物:

第2の態様は、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAを含む組成物に関する。

【0308】

第2の態様の好ましい実施形態においては、組成物は、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、任意に、少なくとも1つの薬学的に許容される担体とを含む。

【0309】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、好ましくは組成物の液体又は非液体ベースを含むことが好ましい。組成物が液体形態で提供される場合、担体は、好ましくは水、典型的にはパイロジェンフリー水;等張生理食塩水又は緩衝(水)溶液、例えば、リン酸、クエン酸などの緩衝溶液である。水又は好ましくは緩衝液、より好ましくは水性緩衝液を用いることができ、これらは、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、任意にカリウム塩、好ましくは少なくとも3mMのカリウム塩を含有する。好ましい実施形態によれば、ナトリウム塩、カルシウム塩、及び任意に、カリウム塩は、それらのハロゲン化物(例えば、塩化物、ヨウ化物、又は臭化物)、水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩、又は硫酸塩などの形態で存在してもよい。限定されるものではないが、ナトリウム塩の例としては、例えば、NaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₃、NaHCO₃、Na₂SO₄が挙げられ、任意のカリウム塩の例としては、例えば、KCl、KI、KBr、K₂CO₃、KHCO₃、K₂SO₄が挙げられ、カルシウム塩の例としては、例えば、CaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₃、CaSO₄、Ca(OH)₂が挙げられる。更に、前記カチオンの有機アニオンが緩衝液に含有されていてもよい。

【0310】

いくつかの実施形態においては、本明細書に定義される組成物は、本発明の第1の態様又は第2の態様の文脈で定義される複数又は少なくとも1超の人工RNAを含むことができる。

【0311】

いくつかの実施形態においては、組成物に含まれる少なくとも1つのRNAは、バイ又はマルチシストロン性核酸、特に、本明細書に定義されるバイ又はマルチシストロン性核酸であり、これは、同一のRSV及び/又は異なるRSVに由来する少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個の異なる抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする。

【0312】

実施形態においては、組成物は、遺伝的に同一の R S V 又はその断片若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又はタンパク質をそれぞれがコードする、本発明の第 1 の態様の文脈で定義される少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、又はそれ以上の異なる人工 RNA を含むことができる。ウイルス、例えば、「同一のウイルス」の文脈で使用される「同一」又は「同一の R S V」という用語は、遺伝的に同一であると理解されるべきである。特に、前記（遺伝的に）同一のウイルスは同一のタンパク質又はペプチドを発現し、全てのタンパク質又はペプチドが同一のアミノ酸配列を有する。特に、前記（遺伝的に）同一の R S V は、本質的に同一のタンパク質、ペプチド、又はポリタンパク質を発現し、これらのタンパク質、ペプチド、又はポリタンパク質は、それらのアミノ酸配列において好ましくは相違がない。例示的な R S V ウイルスの非限定的なリストをリスト 1 に示す。

10

【0313】

いくつかの実施形態においては、組成物は、遺伝的に異なる R S V 又はその断片若しくはバリエーションに由来する少なくとも 1 つのペプチド又はタンパク質をそれぞれがコードする、本発明の第 1 の態様の文脈で定義される少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、又はそれ以上の異なる RNA を含むことができる。ウイルス、例えば、「異なるウイルス」の文脈で使用される「異なる」又は「異なる R S V」という用語は、少なくとも 2 つのそれぞれのウイルス間の違いとして理解されるべきであり、この違いは、それぞれの異なるウイルスの RNA ゲノム上に現れる。特に、前記（遺伝的に）異なる R S V は、少なくとも 1 つの異なるタンパク質、ペプチド、又はポリタンパク質を発現し、少なくとも 1 つの異なるタンパク質、ペプチド、又はポリタンパク質は、好ましくは少なくとも 1 つのアミノ酸が異なる。

20

【0314】

他の実施形態においては、組成物は、糖タンパク質 G、ショート疎水性タンパク質 S H、マトリックスタンパク質 M、核タンパク質 N、ラージポリメラーゼ L、M2-1 タンパク質、M2-2 タンパク質、リンタンパク質 P、非構造タンパク質 NS1、又は非構造タンパク質 NS2、又はそれらの任意の組合せから選択される R S V 抗原をコードする少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、又はそれ以上の更なる RNA 構築物を含む。

【0315】

R S V をコードする少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個の更なる RNA 構築物を含む組成物の製造のために、P C T 出願 P C T / E P 2 0 1 6 / 0 8 2 4 8 7 又は公開特許出願国際公開第 2 0 1 7 / 1 0 9 0 1 3 4 A 1 号に開示される方法を使用し、適宜、適合させることが好ましい。

30

【0316】

好ましい態様においては、第 2 の態様の組成物は、第 1 の態様の少なくとも 1 つの人工 RNA と、マトリックスタンパク質 M、核タンパク質 N、M2-1 タンパク質、及び／又はリンタンパク質 P、又はそれらの任意の組合せから選択される R S V に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又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 つの更なる人工 RNA とを含む。R S V M、N、M2-1、及び／又はリンタンパク質 P（又はそれらの組合せ）に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又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更なる人工 RNA の追加は、例えば、T 細胞免疫応答を促進する。

40

【0317】

なお、第 1 の態様の人工 RNA に関連する実施形態は、第 2 の態様の少なくとも 1 つの更なる人工 RNA にも同様に当てはまり、好適な実施形態として理解され得る（例えば、U T R の組合せ、C D S 最適化、ヒストンステムループ、ポリ A、ポリ C、キャップ構造、m R N A 構造、m R N A 生成、m R N A 精製などに関する実施形態）。

【0318】

したがって、第 2 の態様の組成物は、R S F F をコードする第 1 の態様の少なくとも

50

1つの人工RNAと、及びRSVマトリックスタンパク質Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0319】

或いは、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVNに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0320】

或いは、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVM2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0321】

或いは、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVPに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0322】

好ましい実施形態においては、第2の態様の組成物は、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1、及びリンタンパク質Pから選択されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列をそれぞれが含む2つの更なる人工RNA種を含む。

【0323】

したがって、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVMに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSVNに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0324】

したがって、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVNに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSVM2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0325】

したがって、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVPに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSVM2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0326】

したがって、第2の態様の組成物は、RSFFをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSVPに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSVNに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

10

20

30

40

50

る。

【0327】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0328】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0329】

好ましい実施形態においては、第2の態様の組成物は、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1、及びリントタンパク質Pから選択されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列をそれぞれが含む3つの更なる人工RNA種を含む。

【0330】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Nに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0331】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Nに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0332】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0333】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV

10

20

30

40

50

Nに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0334】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0335】

好ましい態様においては、第2の態様の組成物は、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1、及びリンタンパク質Pから選択されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つのコード配列をそれぞれが含む4つの更なる人工RNA種を含む。

【0336】

したがって、第2の態様の組成物は、RSF Fをコードする第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、RSV Mに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Nに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAと、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAとを好適に含み得る。

【0337】

第2の態様の好ましい実施形態においては、更なる人工RNAのコード配列は、配列番号9684、10053~10133、10134、10503~10636、10637、11006~11182、11183、11552~11725、19844、20213、20582、20951のいずれか又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列の少なくとも1つをコードする。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に以下に記載するように、識別子<223>の下に記載される詳細からも得られる。

【0338】

第2の態様の更なる実施形態においては、更なる人工RNAのコード配列は、本明細書に定義される少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質と、更に異種分泌シグナル配列又は異種分泌シグナルペプチドをコードする。異種分泌シグナル配列は、コードされた抗原性ペプチド又はタンパク質の分泌を増大させることができる。

【0339】

好適な分泌シグナルペプチドは、国際公開第2017/081082号の配列番号1~1115及び配列番号1728に係るアミノ酸配列のリスト、又はこれらの配列の断片又はバリエーションから選択することができる。核酸レベルでは、そのようなアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列（例えば、RNA配列）を選択することができる。この文脈において、国際公開第2017/081082号の開示を、参照により本明細書に援用する。

【0340】

いくつかの実施形態によれば、分泌シグナル配列は、配列番号21329~21362のいずれか又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。分泌シグナル配列をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に、識別子<223>の下に記載される詳細からも得ら

10

20

30

40

50

れる。

【0341】

好ましい実施形態においては、組成物の更なる人工RNAは、

(a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの異種3'非翻訳領域(3'-UTR)；及び

(b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結された、RSV M、N、M2-1、及び／又はリンタンパク質Pに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片若しくはバリエントをコードする、好ましくは配列番号9684、10053～10133、10134、10503～10636、10637、11006～11182、11183、11552～11725、19844、20213、20582、20951のいずれかから選択されるアミノ酸配列又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントをコードする少なくとも1つのコード配列を含む。

10

【0342】

好ましい実施形態においては、組成物の更なる人工RNAは、

(a) 少なくとも1つの異種5'非翻訳領域(5'-UTR)及び／又は少なくとも1つの異種3'非翻訳領域(3'-UTR)；及び

(b) 前記3'-UTR及び／又は5'-UTRに機能可能に連結された、RSV M2-1に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質、又はその断片若しくはバリエントをコードする、好ましくは配列番号11183、20953、21414のいずれかから選択されるアミノ酸配列又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエントをコードする少なくとも1つのコード配列を含む。

20

【0343】

好適には、組成物の更なる人工RNAは、a-1、a-2、a-3、a-4、a-5、b-1、b-2、b-3、b-4、b-5、c-1、c-2、c-3、c-4、c-5、d-1、d-2、d-3、d-4、d-5、e-1、e-2、e-3、e-4、e-5、e-6、f-1、f-2、f-3、f-4、f-5、g-1、g-2、g-3、g-4、g-5、h-1、h-2、h-3、h-4、h-5、i-1、i-2、又はi-3（第1の態様の文脈にて定義されている）から選択される3'-UTR及び5'-UTRに機能可能に連結されたコード配列を含む。

【0344】

好適には、組成物の更なる人工RNAは、少なくとも1つの又は1より多くのウラシルヌクレオチド又は好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン(Ψ)ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)ヌクレオチドで置換されている。

30

【0345】

したがって、他の実施形態においては、組成物の更なる人工RNAは、配列番号43又は21321に係る5'キャップ配列エレメント、又はその断片若しくはバリエントを含み得る。

【0346】

第2の態様の好ましい実施形態においては、更なるRNAのコード配列は、配列番号9685～9692、10135～10142、10638～10645、11184～11119、19845～19852、20214～20221、20583～20590、20952～20959、21385～21388、21411～21414又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエント（第1の態様の文脈にて定義したcds最適化）と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である核酸配列の少なくとも1つを含む。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に以下に記載するように、識別子<223>の下に記載される詳細からも得られる。

40

【0347】

第2の態様の好ましい実施形態においては、組成物の更なる人工RNA、好ましくは更

50

なるmRNAは、好ましくは5'から3'方向に、以下のエレメントa)～i)：

- a) 5'－キャップ構造、好ましくは第1の態様の文脈において記載される5'－キャップ構造、最も好ましくはCap1構造；
 - b) 任意に、第1の態様の文脈において記載される5'－UTR、好ましくは配列番号1～22から選択される少なくとも1つ；
 - c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
 - d) 配列番号9685～9692、10135～10142、10638～10645、11184～11191、19845～19852、20214～20221、20583～20590、20952～20959、21385～21388、21411～21414から選択される少なくとも1つのコード配列；
 - e) 第1の態様の文脈において記載される3'－UTR、好ましくは配列番号23～38から選択される少なくとも1つ；
 - f) 任意に、ポリ（A）配列、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるポリ（A）配列；
 - g) 任意に、ポリ（C）配列、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるポリ（C）配列；
 - h) 任意に、ヒストンステムループ、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるヒストンステムループ；
 - i) 任意に、第1の態様の文脈において記載される3'末端配列エレメント、好ましくは配列番号44～63、21322～21328に係る3'末端配列エレメント、
- を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン（Ψ）ヌクレオチド又はN1－メチルシュードウリジン（m1Ψ）ヌクレオチドで置換されている。

【0348】

第2の態様の特に好ましい実施形態においては、組成物の更なる人工RNA、好ましくは更なるmRNAは、好ましくは5'から3'方向に、以下のエレメントa)～i)：

- a) 5'－キャップ構造、好ましくは第1の態様の文脈において記載される5'－キャップ構造、最も好ましくはCap1構造；
 - b) 任意に、第1の態様の文脈において記載される5'－UTR、好ましくは配列番号1～22から選択される少なくとも1つ；
 - c) リボソーム結合部位、好ましくは本明細書に記載されるリボソーム結合部位；
 - d) 配列番号11185～11191、21388、20952～20959、21414から選択される少なくとも1つのコード配列；
 - e) 第1の態様の文脈において記載される3'－UTR、好ましくは配列番号23～38から選択される少なくとも1つ；
 - f) 任意に、ポリ（A）配列、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるポリ（A）配列；
 - g) 任意に、ポリ（C）配列、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるポリ（C）配列；
 - h) 任意に、ヒストンステムループ、好ましくは第1の態様の文脈において記載されるヒストンステムループ；
 - i) 任意に、第1の態様の文脈において記載される3'末端配列エレメント、好ましくは配列番号44～63、21322～21328に係る3'末端配列エレメント、
- を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの、好ましくは全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン（Ψ）ヌクレオチド又はN1－メチルシュードウリジン（m1Ψ）ヌクレオチドで置換されている。

【0349】

その文脈において、第2の態様の好ましいRSVポリペプチド、核酸、及びmRNA配列を表7Aに示す。

【0350】

表 7 A では、列 A ～列 D は、R S V タンパク質に由来する第 2 の態様の具体的な好適な構築物を示す。列 A は、M に好適な配列を示し、列 B は、N に好適な配列を示し、列 C は、P に好適な配列を示し、列 D は、M 2 - 1 に好適な配列を示す。

【 0 3 5 1 】

タンパク質名／設計は、行 1（列 A ～列 D）に示し、配列表に示されるタンパク質配列番号は、行 2（「P R T」）に示す。H R S V（A 2）の好ましいタンパク質配列番号は、行 3 に示す（「H R S V（A 2）P R T」）。示された各 H R S V（A 2）タンパク質の対応するコード配列の配列番号は、行 4 ～11 に示す（それぞれ、「c d s w t」、「c d s o p t 1」、「c d s o p t 2」、「c d s o p t 3」、「c d s o p t 4」、「c d s o p t 5」、「c d s o p t 6」、「c d s o p t 1 1」）。本発明に係る前記コード配列と好適な 3' - U T R 及び 5' - U T R とを含む対応する m R N A 構築物の配列番号は、行 12 ～55 に示す（本明細書に記載される「m R N A 設計 a - 1」～「m R N A 設計 i - 3」）。

10

【 0 3 5 2 】

H R S V（メンフィス - 37）の好ましいタンパク質配列番号は、列 56 に示す（「メンフィス - 37 P R T」）。示された各 H R S V（メンフィス - 37）タンパク質の対応するコード配列の配列番号は、行 57 ～64 に示す（それぞれ、「c d s w t」、「c d s o p t 1」、「c d s o p t 2」、「c d s o p t 3」、「c d s o p t 4」、「c d s o p t 5」、「c d s o p t 6」、「c d s o p t 1 1」）。本発明に係る前記コード配列と好適な 3' - U T R 及び 5' - U T R とを含む対応する m R N A 構築物の配列番号は、行 65 ～108 に示す（本明細書に記載される「m R N A 設計 a - 1」～「m R N A 設計 i - 3」））。

20

【 0 3 5 3 】

示された m R N A 構築物に含まれるコード配列のタイプなどに関する更なる情報は、配列表のそれぞれの配列番号の < 2 2 3 > 識別子に示す。

【 0 3 5 4 】

30

40

50

【表 7 A - 1】

表 7 A : 組成物及びワクチンの好ましい更なるコード配列並びに mRNA 構築物

1	株	説明	A	B	C	D
			RSV M	RSV N	RSV P	RSV M2-1
2	divers	PRT	10053-10133	10503-10636	11006-11182	11552-11725
3	HRSV(A2)	PRT	9684	10134	10637	11183
4	HRSV(A2)	cds wt	9685	10135	10638	11184
5	HRSV(A2)	CDS opt1	9686, 21385	10136, 21386	10639, 21387	11185, 21388
6	HRSV(A2)	cds opt2	9687	10137	10640	11186
7	HRSV(A2)	cds opt3	9688	10138	10641	11187
8	HRSV(A2)	cds opt4	9689	10139	10642	11188
9	HRSV(A2)	cds opt5	9690	10140	10643	11189
10	HRSV(A2)	cds opt6	9691	10141	10644	11190
11	HRSV(A2)	cds opt11	9692	10142	10645	11191
12	HRSV(A2)	mRNA 設計 a-1	9693-9700, 21481, 21482, 21627, 21628	10143-10150, 21483, 21484, 21629, 21630	10646-10653, 21485, 21486, 21631, 21632	11192-11199, 21487, 21488, 21633, 21634
13	HRSV(A2)	mRNA 設計 a-2	9701-9708	10151-10158	10654-10661	11200-11207
14	HRSV(A2)	mRNA 設計 a-3	9709-9716	10159-10166	10662-10669	11208-11215
15	HRSV(A2)	mRNA 設計 a-4	9717-9724	10167-10174	10670-10677	11216-11223
16	HRSV(A2)	mRNA 設計 a-5	9725-9732	10175-10182	10678-10685	11224-11231
17	HRSV(A2)	mRNA 設計 b-1	9733-9740	10183-10190	10686-10693	11232-11239
18	HRSV(A2)	mRNA 設計 b-2	9741-9748	10191-10198	10694-10701	11240-11247
19	HRSV(A2)	mRNA 設計 b-3	9749-9756	10199-10206	10702-10709	11248-11255
20	HRSV(A2)	mRNA 設計 b-4	9757-9764	10207-10214	10710-10717	11256-11263
21	HRSV(A2)	mRNA 設計 b-5	9765-9772	10215-10222	10718-10725	11264-11271
22	HRSV(A2)	mRNA 設計 c-1	9773-9780	10223-10230	10726-10733	11272-11279
23	HRSV(A2)	mRNA 設計 c-2	9781-9788	10231-10238	10734-10741	11280-11287
24	HRSV(A2)	mRNA 設計 c-3	9789-9796	10239-10246	10742-10749	11288-11295
25	HRSV(A2)	mRNA 設計 c-4	9797-9804	10247-10254	10750-10757	11296-11303
26	HRSV(A2)	mRNA 設計 c-5	9805-9812	10255-10262	10758-10765	11304-11311
27	HRSV(A2)	mRNA 設計 d-1	9813-9820	10263-10270	10766-10773	11312-11319
28	HRSV(A2)	mRNA 設計 d-2	9821-9828	10271-10278	10774-10781	11320-11327
29	HRSV(A2)	mRNA 設計 d-3	9829-9836	10279-10286	10782-10789	11328-11335
30	HRSV(A2)	mRNA 設計 d-4	9837-9844	10287-10294	10790-10797	11336-11343
31	HRSV(A2)	mRNA 設計 d-5	9845-9852	10295-10302	10798-10805	11344-11351
32	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-1	9853-9860	10303-10310	10806-10813	11352-11359
33	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-2	9861-9868	10311-10318	10814-10821	11360-11367
34	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-3	9869-9876	10319-10326	10822-10829	11368-11375
35	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-4	9877-9884	10327-10334	10830-10837	11376-11383
36	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-5	9885-9892	10335-10342	10838-10845	11384-11391
37	HRSV(A2)	mRNA 設計 e-6	9893-9900	10343-10350	10846-10853	11392-11399
38	HRSV(A2)	mRNA 設計 f-1	9901-9908	10351-10358	10854-10861	11400-11407
39	HRSV(A2)	mRNA 設計 f-2	9909-9916	10359-10366	10862-10869	11408-11415

10

20

30

40

50

【表 7 A - 2】

40	HRSV(A2)	mRNA 設計 f-3	9917-9924	10367-10374	10870-10877	11416-11423
41	HRSV(A2)	mRNA 設計 f-4	9925-9932	10375-10382	10878-10885	11424-11431
42	HRSV(A2)	mRNA 設計 f-5	9933-9940	10383-10390	10886-10893	11432-11439
43	HRSV(A2)	mRNA 設計 g-1	9941-9948	10391-10398	10894-10901	11440-11447
44	HRSV(A2)	mRNA 設計 g-2	9949-9956	10399-10406	10902-10909	11448-11455
45	HRSV(A2)	mRNA 設計 g-3	9957-9964	10407-10414	10910-10917	11456-11463
46	HRSV(A2)	mRNA 設計 g-4	9965-9972	10415-10422	10918-10925	11464-11471
47	HRSV(A2)	mRNA 設計 g-5	9973-9980	10423-10430	10926-10933	11472-11479
48	HRSV(A2)	mRNA 設計 h-1	9981-9988	10431-10438	10934-10941	11480-11487
49	HRSV(A2)	mRNA 設計 h-2	9989-9996	10439-10446	10942-10949	11488-11495
50	HRSV(A2)	mRNA 設計 h-3	9997-10004	10447-10454	10950-10957	11496-11503
51	HRSV(A2)	mRNA 設計 h-4	10005-10012	10455-10462	10958-10965	11504-11511
52	HRSV(A2)	mRNA 設計 h-5	10013-10020	10463-10470	10966-10973	11512-11519
53	HRSV(A2)	mRNA 設計 i-1	10021-10028	10471-10478	10974-10981	11520-11527
54	HRSV(A2)	mRNA 設計 i-2	10029-10044	10479-10494	10982-10997	11528-11543
55	HRSV(A2)	mRNA 設計 i-3	10045-10052	10495-10502	10998-11005	11544-11551
56	ノファイヌ-37	PRT	19844	20213	20582	20951
57	ノファイヌ-37	CDS wt	19845	20214	20583	20952
58	ノファイヌ-37	CDS opt1	19846, 21411	20215, 21412	20584, 21413	20953, 21414
59	ノファイヌ-37	CDS opt2	19847	20216	20585	20954
60	ノファイヌ-37	CDS opt3	19848	20217	20586	20955
61	ノファイヌ-37	CDS opt4	19849	20218	20587	20956
62	ノファイヌ-37	CDS opt5	19850	20219	20588	20957
63	ノファイヌ-37	CDS opt6	19851	20220	20589	20958
64	ノファイヌ-37	CDS opt11	19852	20221	20590	20959
65	ノファイヌ-37	mRNA 設計 a-1	19853-19860, 21553, 21554, 21699, 21700	20222-20229, 21555, 21556, 21701, 21702	20591-20598, 21557, 21558, 21703, 21704	20960-20967, 21559, 21560, 21705, 21706
66	ノファイヌ-37	mRNA 設計 a-2	19861-19868	20230-20237	20599-20606	20968-20975
67	ノファイヌ-37	mRNA 設計 a-3	19869-19876	20238-20245	20607-20614	20976-20983
68	ノファイヌ-37	mRNA 設計 a-4	19877-19884	20246-20253	20615-20622	20984-20991
69	ノファイヌ-37	mRNA 設計 a-5	19885-19892	20254-20261	20623-20630	20992-20999
70	ノファイヌ-37	mRNA 設計 b-1	19893-19900	20262-20269	20631-20638	21000-21007
71	ノファイヌ-37	mRNA 設計 b-2	19901-19908	20270-20277	20639-20646	21008-21015
72	ノファイヌ-37	mRNA 設計 b-3	19909-19916	20278-20285	20647-20654	21016-21023
73	ノファイヌ-37	mRNA 設計 b-4	19917-19924	20286-20293	20655-20662	21024-21031
74	ノファイヌ-37	mRNA 設計 b-5	19925-19932	20294-20301	20663-20670	21032-21039
75	ノファイヌ-37	mRNA 設計 c-1	19933-19940	20302-20309	20671-20678	21040-21047
76	ノファイヌ-37	mRNA 設計 c-2	19941-19948	20310-20317	20679-20686	21048-21055
77	ノファイヌ-37	mRNA 設計 c-3	19949-19956	20318-20325	20687-20694	21056-21063
78	ノファイヌ-37	mRNA 設計 c-4	19957-19964	20326-20333	20695-20702	21064-21071
79	ノファイヌ-37	mRNA 設計 c-5	19965-19972	20334-20341	20703-20710	21072-21079
80	ノファイヌ-37	mRNA 設計 d-1	19973-19980	20342-20349	20711-20718	21080-21087
81	ノファイヌ-37	mRNA 設計 d-2	19981-19988	20350-20357	20719-20726	21088-21095
82	ノファイヌ-37	mRNA 設計 d-3	19989-19996	20358-20365	20727-20734	21096-21103
83	ノファイヌ-37	mRNA 設計 d-4	19997-20004	20366-20373	20735-20742	21104-21111

10

20

30

40

50

【表 7 A - 3】

84	メンフィス-37	mRNA 設計 d-5	20005-20012	20374-20381	20743-20750	21112-21119
85	メンフィス-37	mRNA 設計 e-1	20013-20020	20382-20389	20751-20758	21120-21127
86	メンフィス-37	mRNA 設計 e-2	20021-20028	20390-20397	20759-20766	21128-21135
87	メンフィス-37	mRNA 設計 e-3	20029-20036	20398-20405	20767-20774	21136-21143
88	メンフィス-37	mRNA 設計 e-4	20037-20044	20406-20413	20775-20782	21144-21151
89	メンフィス-37	mRNA 設計 e-5	20045-20052	20414-20421	20783-20790	21152-21159
90	メンフィス-37	mRNA 設計 e-6	20053-20060	20422-20429	20791-20798	21160-21167
91	メンフィス-37	mRNA 設計 f-1	20061-20068	20430-20437	20799-20806	21168-21175
92	メンフィス-37	mRNA 設計 f-2	20069-20076	20438-20445	20807-20814	21176-21183
93	メンフィス-37	mRNA 設計 f-3	20077-20084	20446-20453	20815-20822	21184-21191
94	メンフィス-37	mRNA 設計 f-4	20085-20092	20454-20461	20823-20830	21192-21199
95	メンフィス-37	mRNA 設計 f-5	20093-20100	20462-20469	20831-20838	21200-21207
96	メンフィス-37	mRNA 設計 g-1	20101-20108	20470-20477	20839-20846	21208-21215
97	メンフィス-37	mRNA 設計 g-2	20109-20116	20478-20485	20847-20854	21216-21223
98	メンフィス-37	mRNA 設計 g-3	20117-20124	20486-20493	20855-20862	21224-21231
99	メンフィス-37	mRNA 設計 g-4	20125-20132	20494-20501	20863-20870	21232-21239
100	メンフィス-37	mRNA 設計 g-5	20133-20140	20502-20509	20871-20878	21240-21247
101	メンフィス-37	mRNA 設計 h-1	20141-20148	20510-20517	20879-20886	21248-21255
102	メンフィス-37	mRNA 設計 h-2	20149-20156	20518-20525	20887-20894	21256-21263
103	メンフィス-37	mRNA 設計 h-3	20157-20164	20526-20533	20895-20902	21264-21271
104	メンフィス-37	mRNA 設計 h-4	20165-20172	20534-20541	20903-20910	21272-21279
105	メンフィス-37	mRNA 設計 h-5	20173-20180	20542-20549	20911-20918	21280-21287
106	メンフィス-37	mRNA 設計 i-1	20181-20188	20550-20557	20919-20926	21288-21295
107	メンフィス-37	mRNA 設計 i-2	20189-20204	20558-20573	20927-20942	21296-21311
108	メンフィス-37	mRNA 設計 i-3	20205-20212	20574-20581	20943-20950	21312-21319

【 0 3 5 5 】

したがって、好ましい実施形態においては、第2の態様の組成物は、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、M2-1タンパク質、リンタンパク質Pから選択されるRSVに由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又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つの更なる人工RNAを含み、更なる人工RNAは、配列番号9693～10052、10143～10502、10646～11005、11192～11551、19853～20212、20222～20581、20591～20950、20960～21319、21481～21488、21627～21634、21553～21560、21699～21706から選択される核酸配列又はこれらの配列のいずれかの断片若しくはバリエーションと同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるRNA配列を含む又はかなり、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの又は全てのウラシルヌクレオチドがシュードウリジン(Ψ)ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)ヌクレオチドで置換されている。RSVタンパク質をコードするこれらの好適なアミノ酸配列のそれぞれに関する更なる情報は、配列表、特に以下に記載するように、識別子<223>の下に記載される詳細からも得られる。

【 0 3 5 6 】

第2の態様の特に好ましい実施形態においては、第2の態様の組成物は、

- 一 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、

4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、
6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、
7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、121
04～12463、12473～12832、12842～13201、13949～1
4308、14318～14677、14687～15046、15056～15415
、15425～15784、15794～16153、13211～13570、135
80～13939、16163～16522、16532～16891、16901～1
7260、17270～17629、17639～17998、18008～18367
、18377～18736、18746～19105、19115～19474、194
84～19843、21415～21480、21561～21626、21489～2
1552、21635～21698（第1の態様において定義したRSV Fをコードす
る）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86
%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96
%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号9
693～10052、19853～20212、21481、21482、21627、
21628、21553、21554、21699、21700（RSV Mをコードす
る）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、8
5%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、9
5%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA；又は

ー 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、
1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、
3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、
4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、
6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、
7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、121
04～12463、12473～12832、12842～13201、13949～1
4308、14318～14677、14687～15046、15056～15415
、15425～15784、15794～16153、13211～13570、135
80～13939、16163～16522、16532～16891、16901～1
7260、17270～17629、17639～17998、18008～18367
、18377～18736、18746～19105、19115～19474、194
84～19843、21415～21480、21561～21626、21489～2
1552、21635～21698（第1の態様において定義したRSV Fをコードす
る）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86
%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96
%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号1
0143～10502、20222～20581、21483、21484、21629
、21630、21555、21556、21701、21702（RSV Nをコード
する）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、
85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、
95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA；又は

ー 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、
1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、
3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、
4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、
6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、
7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、121
04～12463、12473～12832、12842～13201、13949～1
4308、14318～14677、14687～15046、15056～15415
、15425～15784、15794～16153、13211～13570、135

10

20

30

40

50

80～13939、16163～16522、16532～16891、16901～17260、17270～17629、17639～17998、18008～18367、18377～18736、18746～19105、19115～19474、19484～19843、21415～21480、21561～21626、21489～21552、21635～21698（第1の態様において定義したRSVFをコードする）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号10646～11005、20591～20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704（RSVPをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの更なる人工RNA；又は

10

－ 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、12104～12463、12473～12832、12842～13201、13949～14308、14318～14677、14687～15046、15056～15415、15425～15784、15794～16153、13211～13570、13580～13939、16163～16522、16532～16891、16901～17260、17270～17629、17639～17998、18008～18367、18377～18736、18746～19105、19115～19474、19484～19843、21415～21480、21561～21626、21489～21552、21635～21698（第1の態様において定義したRSVFをコードする）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号11192～11551、20960～21319、21487、21488、21633、21634、21559、21560、21705、21706（RSVM2-1をコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの更なる人工RNA；又は

20

30

－ 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、12104～12463、12473～12832、12842～13201、13949～14308、14318～14677、14687～15046、15056～15415、15425～15784、15794～16153、13211～13570、13580～13939、16163～16522、16532～16891、16901～17260、17270～17629、17639～17998、18008～18367、18377～18736、18746～19105、19115～19474、19484～19843、21415～21480、21561～21626、21489～2

40

50

1552、21635～21698（第1の態様において定義したRSVFをコードする）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号9693～10052、19853～20212、21481、21482、21627、21628、21553、21554、21699、21700（RSVMをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる少なくとも1つの人工RNA及び配列番号10646～11005、20591～20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704（RSVPをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA；

— 配列番号78～482、493～897、907～1266、1276～1635、1645～2004、2014～2373、2383～2742、2752～3111、3121～3480、3490～3849、3859～4218、4228～4587、4597～4956、4966～5325、5335～5694、5704～6063、6073～6432、6442～6801、6811～7170、7180～7539、7549～7908、7918～8277、8278、11735～12094、12104～12463、12473～12832、12842～13201、13949～14308、14318～14677、14687～15046、15056～15415、15425～15784、15794～16153、13211～13570、13580～13939、16163～16522、16532～16891、16901～17260、17270～17629、17639～17998、18008～18367、18377～18736、18746～19105、19115～19474、19484～19843、21415～21480、21561～21626、21489～21552、21635～21698（第1の態様において定義したRSVFをコードする）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工RNA及び配列番号9693～10052、19853～20212、21481、21482、21627、21628、21553、21554、21699、21700（RSVMをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる少なくとも1つの人工RNA及び配列番号10646～11005、20591～20950、21485、21486、21631、21632、21557、21558、21703、21704（RSVPをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA及び配列番号10143～10502、20222～20581、21483、21484、21629、21630、21555、21556、21701、21702（RSVNをコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である更なる人工RNA；又は

— 配列番号78～86、21415～21417、21561～21563、474～482、11735～11742、21489、21490、21635、21636、

1 2 0 8 7 ~ 1 2 0 9 4、4 9 3 ~ 5 0 1、2 1 4 1 8 ~ 2 1 4 2 0、2 1 5 6 4 ~ 2 1
5 6 6、8 8 9 ~ 8 9 7、1 2 1 0 4 ~ 1 2 1 1 1、2 1 4 9 1、2 1 4 9 2、2 1 6 3
7、2 1 6 3 8、1 2 4 5 6 ~ 1 2 4 6 3、9 0 7 ~ 9 1 4、2 1 4 2 1 ~ 2 1 4 2 3、
2 1 5 6 7 ~ 2 1 5 6 9、1 2 5 9 ~ 1 2 6 6、1 2 4 7 3 ~ 1 2 4 8 0、2 1 4 9 3 ~
2 1 4 9 5、2 1 6 3 9 ~ 2 1 6 4 1、1 2 8 2 5 ~ 1 2 8 3 2、1 2 7 6 ~ 1 2 8 3、
2 1 4 2 4 ~ 2 1 4 2 6、2 1 5 7 0 ~ 2 1 5 7 2、1 6 2 8 ~ 1 6 3 5、1 2 8 4 2 ~
1 2 8 4 9、2 1 4 9 6 ~ 2 1 4 9 8、2 1 6 4 2 ~ 2 1 6 4 4、1 3 1 9 4 ~ 1 3 2 0
1、1 6 4 5 ~ 1 6 5 2、2 1 4 3 3 ~ 2 1 4 3 5、2 1 5 7 9 ~ 2 1 5 8 1、1 9 9 7
~ 2 0 0 4、1 3 9 4 9 ~ 1 3 9 5 6、2 1 5 0 5 ~ 2 1 5 0 7、2 1 6 5 1 ~ 2 1 6 5
3、1 4 3 0 1 ~ 1 4 3 0 8、2 0 1 4 ~ 2 0 2 1、2 1 4 3 6 ~ 2 1 4 3 8、2 1 5 8
2 ~ 2 1 5 8 4、2 3 6 6 ~ 2 3 7 3、1 4 3 1 8 ~ 1 4 3 2 5、2 1 5 0 8 ~ 2 1 5 1
0、2 1 6 5 4 ~ 2 1 6 5 6、1 4 6 7 0 ~ 1 4 6 7 7、2 3 8 3 ~ 2 3 9 0、2 1 4 3
9 ~ 2 1 4 4 1、2 1 5 8 5 ~ 2 1 5 8 7、2 7 3 5 ~ 2 7 4 2、1 4 6 8 7 ~ 1 4 6 9
4、2 1 5 1 1 ~ 2 1 5 1 3、2 1 6 5 7 ~ 2 1 6 5 9、1 5 0 3 9 ~ 1 5 0 4 6、2 7
5 2 ~ 2 7 5 9、2 1 4 4 2 ~ 2 1 4 4 4、2 1 5 8 8 ~ 2 1 5 9 0、3 1 0 4 ~ 3 1 1
1、1 5 0 5 6 ~ 1 5 0 6 3、2 1 5 1 4 ~ 2 1 5 1 6、2 1 6 6 0 ~ 2 1 6 6 2、1 5
4 0 8 ~ 1 5 4 1 5、3 1 2 1 ~ 3 1 2 8、2 1 4 4 5 ~ 2 1 4 4 7、2 1 5 9 1 ~ 2 1
5 9 3、3 4 7 3 ~ 3 4 8 0、1 5 4 2 5 ~ 1 5 4 3 2、2 1 5 1 7 ~ 2 1 5 1 9、2 1
6 6 3 ~ 2 1 6 6 5、1 5 7 7 7 ~ 1 5 7 8 4、3 4 9 0 ~ 3 4 9 7、2 1 4 4 8 ~ 2 1
4 5 0、2 1 5 9 4 ~ 2 1 5 9 6、3 8 4 2 ~ 3 8 4 9、1 5 7 9 4 ~ 1 5 8 0 1、2 1
5 2 0 ~ 2 1 5 2 2、2 1 6 6 6 ~ 2 1 6 6 8、1 6 1 4 6 ~ 1 6 1 5 3、3 8 5 9 ~ 3
8 6 6、2 1 4 2 7 ~ 2 1 4 2 9、2 1 5 7 3 ~ 2 1 5 7 5、4 2 1 1 ~ 4 2 1 8、1 3
2 1 1 ~ 1 3 2 1 8、2 1 4 9 9 ~ 2 1 5 0 1、2 1 6 4 5 ~ 2 1 6 4 7、1 3 5 6 3 ~
1 3 5 7 0、4 2 2 8 ~ 4 2 3 5、2 1 4 3 0 ~ 2 1 4 3 2、2 1 5 7 6 ~ 2 1 5 7 8、
4 5 8 0 ~ 4 5 8 7、1 3 5 8 0 ~ 1 3 5 8 7、2 1 5 0 2 ~ 2 1 5 0 4、2 1 6 4 8 ~
2 1 6 5 0、1 3 9 3 2 ~ 1 3 9 3 9、4 5 9 7 ~ 4 6 0 4、2 1 4 5 1 ~ 2 1 4 5 3、
2 1 5 9 7 ~ 2 1 5 9 9、4 9 4 9 ~ 4 9 5 6、1 6 1 6 3 ~ 1 6 1 7 0、2 1 5 2 3 ~
2 1 5 2 5、2 1 6 6 9 ~ 2 1 6 7 1、1 6 5 1 5 ~ 1 6 5 2 2、4 9 6 6 ~ 4 9 7 3、
2 1 4 5 4 ~ 2 1 4 5 6、2 1 6 0 0 ~ 2 1 6 0 2、5 3 1 8 ~ 5 3 2 5、1 6 5 3 2 ~
1 6 5 3 9、2 1 5 2 6 ~ 2 1 5 2 8、2 1 6 7 2 ~ 2 1 6 7 4、1 6 8 8 4 ~ 1 6 8 9
1、5 3 3 5 ~ 5 3 4 2、2 1 4 5 7 ~ 2 1 4 5 9、2 1 6 0 3 ~ 2 1 6 0 5、5 6 8 7
~ 5 6 9 4、1 6 9 0 1 ~ 1 6 9 0 8、2 1 5 2 9 ~ 2 1 5 3 1、2 1 6 7 5 ~ 2 1 6 7
7、1 7 2 5 3 ~ 1 7 2 6 0、5 7 0 4 ~ 5 7 1 1、2 1 4 6 0 ~ 2 1 4 6 2、2 1 6 0
6 ~ 2 1 6 0 8、6 0 5 6 ~ 6 0 6 3、1 7 2 7 0 ~ 1 7 2 7 7、2 1 5 3 2 ~ 2 1 5 3
4、2 1 6 7 8 ~ 2 1 6 8 0、1 7 6 2 2 ~ 1 7 6 2 9（第1の態様において定義したR
S V Fをコードする）から選択される核酸配列と同一である又は少なくとも70%、8
0%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少なくとも1つの人工R
NA及び配列番号11192~11551、20960~21319、21487、21
488、21633、21634、21559、21560、21705、21706（
R S V M2-1をコードする）からなる群から選択される核酸配列と同一である又は少
なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、
92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である少な
くとも1つの更なる人工RNA、
を含み、任意に、少なくとも1つの又は1より多くの又は全てのウラシルヌクレオチドが
シュードウリジン（Ψ）ヌクレオチド又はN1-メチルシュードウリジン（m1Ψ）ヌク
レオチドで置換されている。

【0357】

各種実施形態においては、R S V F（F0、F-del、F0_DSCav1、F-
del_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mu

10

20

30

40

50

t0、F_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、F-del_DSCav1_mut8) RNA構築物と、RSV T-細胞抗原RNA構築物(RSV M、N、M2-1、又はP)との各種組合せが好適に組成物に含まれる(表7Bに開示する; 組合せ1~64)。組合せ49~64が好ましく、組合せ64が特に好ましい。

【0358】

10

20

30

40

50

【表 7 B - 1】

表 7 B : RSV F をコードする RNA 構築物と T 細胞抗原をコードする RNA 構築物の好適な組合せ

組合せ	RSV F 構築物	配列番号: タバク質	T 細胞抗原 構築物	配列番号: タバク質
1	F0	68	M	9684
2	F-del	483	M	9684
3	F_DSCav1	898	M	9684
4	F-del_DSCav1	1267	M	9684
5	F_DSCav1_mut1	1636	M	9684
6	F-del_DSCav1_mut1	2005	M	9684
7	F_DSCav1_mut2	2374	M	9684
8	F-del_DSCav1_mut2	2743	M	9684
9	F_DSCav1_mut3	3112	M	9684
10	F-del_DSCav1_mut3	3481	M	9684
11	F_DSCav1_mut0	3850	M	9684
12	F-del_DSCav1_mut0	4219	M	9684
13	F_DSCav1_mut4	4588	M	9684
14	F-del_DSCav1_mut4	4957	M	9684
15	F_DSCav1_mut5	5326	M	9684
16	F-del_DSCav1_mut5	5695	M	9684
17	F0	68	N	10134
18	F-del	483	N	10134
19	F_DSCav1	898	N	10134
20	F-del_DSCav1	1267	N	10134
21	F_DSCav1_mut1	1636	N	10134
22	F-del_DSCav1_mut1	2005	N	10134
23	F_DSCav1_mut2	2374	N	10134
24	F-del_DSCav1_mut2	2743	N	10134
25	F_DSCav1_mut3	3112	N	10134
26	F-del_DSCav1_mut3	3481	N	10134
27	F_DSCav1_mut0	3850	N	10134
28	F-del_DSCav1_mut0	4219	N	10134
29	F_DSCav1_mut4	4588	N	10134
30	F-del_DSCav1_mut4	4957	N	10134
31	F_DSCav1_mut5	5326	N	10134
32	F-del_DSCav1_mut5	5695	N	10134
33	F0	68	P	10637
34	F-del	483	P	10637
35	F_DSCav1	898	P	10637
36	F-del_DSCav1	1267	P	10637
37	F_DSCav1_mut1	1636	P	10637
38	F-del_DSCav1_mut1	2005	P	10637
39	F_DSCav1_mut2	2374	P	10637
40	F-del_DSCav1_mut2	2743	P	10637

10

20

30

40

50

【表 7 B - 2】

41	F_DSCav1_mut3	3112	P	10637
42	F-del_DSCav1_mut3	3481	P	10637
43	F_DSCav1_mut0	3850	P	10637
44	F-del_DSCav1_mut0	4219	P	10637
45	F_DSCav1_mut4	4588	P	10637
46	F-del_DSCav1_mut4	4957	P	10637
47	F_DSCav1_mut5	5326	P	10637
48	F-del_DSCav1_mut5	5695	P	10637
49	F0	68	M2-1	11183
50	F-del	483	M2-1	11183
51	F_DSCav1	898	M2-1	11183
52	F-del_DSCav1	1267	M2-1	11183
53	F_DSCav1_mut1	1636	M2-1	11183
54	F-del_DSCav1_mut1	2005	M2-1	11183
55	F_DSCav1_mut2	2374	M2-1	11183
56	F-del_DSCav1_mut2	2743	M2-1	11183
57	F_DSCav1_mut3	3112	M2-1	11183
58	F-del_DSCav1_mut3	3481	M2-1	11183
59	F_DSCav1_mut0	3850	M2-1	11183
60	F-del_DSCav1_mut0	4219	M2-1	11183
61	F_DSCav1_mut4	4588	M2-1	11183
62	F-del_DSCav1_mut4	4957	M2-1	11183
63	F_DSCav1_mut5	5326	M2-1	11183
64	F-del_DSCav1_mut5	5695	M2-1	11183

【0359】

表 7 B は、第 1 の態様において定義した株 A 2 に由来する R S V F をコードする少なくとも 1 つの RNA と、マトリックスタンパク質 M、核タンパク質 N、M 2 - 1 タンパク質、リンタンパク質 P から選択される株 A 2 に由来する R S V に由来する少なくとも 1 つの抗原性ペプチド又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 つの更なる人工 RNA とを含む第 2 の態様の組成物を開示する。本発明の更なる実施形態においては、表 7 B における開示組成物はいずれも、R S V 分離株メンフィス - 3 7 (株メンフィス - 3 7) に由来する抗原性ペプチド又はタンパク質にも適用可能である。

【0360】

特に好ましい実施形態においては、組成物は、1 つの R S V F RNA 構築物 (F 0、F - del、F 0 _ D S C a v 1、F - del _ D S C a v 1、F _ D S C a v 1 _ m u t 0、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 0、F _ D S C a v 1 _ m u t 1、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 1、F _ D S C a v 1 _ m u t 2、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 2、F _ D S C a v 1 _ m u t 3、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 3、F _ D S C a v 1 _ m u t 4、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 4、F _ D S C a v 1 _ m u t 5、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 5、F _ D S C a v 1 _ m u t 6、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 6、F _ D S C a v 1 _ m u t 7、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 7、F _ D S C a v 1 _ m u t 8、F - del _ D S C a v 1 _ m u t 8) と、更に 1 つの R S V M 2 - 1 RNA 構築物、好ましくは F - del _ D S C a v 1 _ m u t 5 及び M 2 - 1 とを含む。

【0361】

特に好ましい実施形態においては、配列番号 5 7 0 4 ~ 5 7 1 1、2 1 4 6 0 ~ 2 1 4 6 2、2 1 6 0 6 ~ 2 1 6 0 8、1 7 2 7 0 ~ 1 7 2 7 7、2 1 5 3 2 ~ 2 1 5 3 4、2

1678～21680から選択されるRSV Fをコードする1つのRNA構築物及び配列番号11192～11199、21487、21488、21633、21634、20960～20967、21559、21560、21705、21706から選択されるM2-1をコードする1つのRNA構築物が、本発明の組成物に含まれる。

【0362】

各種実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び本明細書に記載される少なくとも1つの更なる人工RNAは、同一のRSV（例えば、リスト1から選択される任意のウイルス）に由来する。

【0363】

好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAは、HRSV（A2）に由来し、本明細書に記載される少なくとも1つの更なる人工RNAは、HRSV（A2）に由来する。

【0364】

好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAは、HRSV（メンフィス-37）に由来し、本明細書に記載される少なくとも1つの更なる人工RNAは、HRSV（メンフィス-37）に由来する。

【0365】

本発明の文脈において、コード配列の特定の組合せは、モノシストロン性、バイシストロン性、及びマルチシストロン性の人工核酸及び／又はマルチ抗原構築物／核酸の任意の組合せによって生成され、本明細書に定義される複数の抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする核酸組成物を得ることができることが理解されるべきである。

【0366】

更に、人への投与に適した、1以上の相溶性の固体又は液体の充填剤又は希釈剤又は封入化合物も使用することができる。本明細書で使用される「相溶性」という用語は、組成物の構成成分が、通常の使用条件下で組成物の生物活性又は薬効を実質的に低下させ得る相互作用が生じないように、組成物の少なくとも1つのRNA及び任意に更なる人工RNAと混合され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、及び希釈剤は、それらが治療対象者への投与に適するようにするために、十分に高い純度及び十分に低い毒性でなければならない。薬学的に許容される担体、充填剤、又はそれらの構成成分として使用され得る化合物としては、例えば、ラクトース、グルコース、トレハロース、及びスクロースなどの糖；コーンスターチ又はポテトスターチなどのスターチ；デキストロース；セルロース及びその誘導体、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；粉末状トラガカント；麦芽；ゼラチン；獣脂；固体流動促進剤、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム；植物油、例えば、落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及びカカオ油；ポリオール、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、及びポリエチレングリコール；アルギン酸などである。

【0367】

組成物に含まれ得る更なる添加剤は、乳化剤、例えば、Tween；湿潤剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム；着色剤；味感付与剤、医薬担体；錠剤形成剤；安定化剤；抗酸化剤；保存料である。

【0368】

複合体化

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1つ以上のカチオン性又はポリカチオン性化合物、好ましくはカチオン性又はポリカチオン性ポリマー、カチオン性又はポリカチオン性多糖、カチオン性又はポリカチオン性脂質、カチオン性又はポリカチオン性タンパク質、カチオン性又はポリカチオン性ペプチド、又はそれらの任意の組合せと複合体化若しくは会合される又は少なくとも部分的に複合体化若しくは会合される。

【0369】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「カチオン性又はポリカチオン性化合物」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、約1～9のpH値、約3～8のpH値、約4～8のpH値、約5～8のpH値、より好ましくは約6～8のpH値、より好ましくは約7～8のpH値、最も好ましくは生理学的pH、例えば、約7.2～約7.5の範囲で正に帯電された帯電分子を意味することが意図される。したがって、カチオン性成分、例えば、カチオン性ペプチド、カチオン性タンパク質、カチオン性ポリマー、カチオン性多糖、カチオン性脂質は、生理学的条件下で正に帯電する任意の正に荷電した化合物又はポリマーであり得る。「カチオン性又はポリカチオン性のペプチド又はタンパク質」は、少なくとも1つの正に帯電したアミノ酸、又は1超の正に帯電したアミノ酸、例えば、Arg、His、Lys、又はOrnから選択されるアミノ酸を含み得る。したがって、「ポリカチオン性」成分も、所定条件下で1超の正電荷を示す範囲内にある。

【0370】

この文脈において特に好ましいカチオン性又はポリカチオン性化合物は、カチオン性又はポリカチオン性ペプチド又はその断片のタンパク質の以下のリストから選択することができる：プロタミン、ヌクレオリン、スペルミン、若しくはスペルミジン、又は他のカチオン性ペプチド又はタンパク質、例えば、ポリ-L-リジン（PLL）、ポリアルギニン、塩基性ポリペプチド、細胞透過性ペプチド（CPP）、例えば、HIV結合ペプチド、HIV-1 Tat（HIV）、Tat由来ペプチド、ペネトラチン、VP22由来又はアナログペプチド、HSV VP22（単純ヘルペス）、MAP、KALA、又はタンパク質伝達ドメイン（PTD）、PpT620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リジンリッチペプチド、MPGペプチド、Pep-1、L-オリゴマー、カルシトニンペプチド、アンテナペディア由来ペプチド、pAntp、pIsl、FGF、ラクトフェリン、トランスポーター、ブフォリン-2、Bac715-24、SynB、SynB（1）、pVEC、hCT由来ペプチド、SAP、又はヒストンを含む。より好ましくは、本明細書で定義される核酸、好ましくは本明細書で定義されるmRNAは、1以上のポリカチオン、好ましくはプロタミン又はオリゴフェクタミン、最も好ましくはプロタミンと複合体化される。

【0371】

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNAと、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、プロタミンと複合体化される。

【0372】

トランスフェクション又は錯化剤として使用することができる更に好ましいカチオン性又はポリカチオン性化合物は、カチオン性多糖、例えば、キトサン、ポリブレンなど；カチオン性脂質、例えば、DOTMA、DMRIE、ジ-C14-アミジン、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTC、CTAP、DOPC、DODAP、DOPE；ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPIC、DOGS、DIMRI、DOTAP、DC-6-14、CLIP1、CLIP6、CLIP9、オリゴフェクタミンなど；又はカチオン性又はポリカチオン性ポリマー、例えば、ベーターアミノ酸ポリマー又は逆ポリアミドなどの修飾ポリアミノ酸、PVPなどの修飾ポリエチレン、pDMAEMAなどの修飾アクリレート、pAMAMなどの修飾アミドアミン、ジアミン末端修飾1,4-ブタンジオールジアクリレート-5-アミノ-1-ペンタノールポリマーなどの修飾ポリベーターアミノエステル（PBAE）、ポリプロピレンアミンデンドリマー又はpAMAMベースのデンドリマーなどのデンドリマー、PEI、ポリ（プロピレンイミン）などのポリイミン、ポリアリルアミン、シクロデキストリンベースのポリマー、デキストランベースのポリマーなどの糖骨格ベースのポリマー、PMOXA-PDMSコポリマーなどのシラン骨格ベースのポリマー、1以上のカチオンブロックの組合せからなるブロックポリマー（例えば、前記カチオン性ポリマーから選択される）及び1以上の親水性又は疎水性ブロック（例えば、ポリエチレングリコールなど）の組合せからなるブロックポリマー；などを含む。

【0373】

この文脈においては、本明細書で定義される少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAが、カチオン性又はポリカチオン性化合物及び／又はポリマー担体、好ましくはカチオン性タンパク質又はペプチドと複合体化又は少なくとも部分的に複合体化されることが特に好ましい。この文脈において、国際公開第2010/037539号及び国際公開第2012/113513号の開示を、参照により本明細書に援用する。部分的には、人工核酸の一部のみがカチオン性化合物と複合体化し、人工核酸の残りの部分が（本発明（医薬）組成物に含まれ）非複合型（「遊離」）であることを意味する。

【0374】

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1つ以上のカチオン性又はポリカチオン性化合物、好ましくはプロタミンと、第1の態様の少なくとも1つの遊離人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なるRNAと複合体化される。

10

【0375】

この文脈において、本明細書に定義される少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、プロタミンと複合体化される又は少なくとも部分的に複合体化されることが特に好ましい。好ましくは、核酸、特にプロタミン複合体化RNAのRNAと遊離RNAのモル比は、約1：1の比を含む約0.001：1～約1：0.001のモル比から選択することができる。好適には、複合化されたRNAは、プロタミンートレハロース溶液を2：1のRNA：プロタミン重量対重量比（w/w）でRNAサンプルに添加することによってプロタミンと複合化される。

20

【0376】

複合体化に使用できる更に好ましいカチオン性又はポリカチオン性のタンパク質又はペプチドは、国際公開第2009/030481号又は国際公開第2011/026641号の式（Arg）_l；（Lys）_m；（His）_n；（Orn）_o；（Xaa）_xから誘導することができる。これに関連する国際公開第2009/030481号又は国際公開第2011/026641号の開示を、参照により本明細書に援用する。

【0377】

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、好ましくは、配列番号64～67、21320又はそれらの任意の組合せから選択される少なくとも1つのカチオン性又はポリカチオン性タンパク質又はペプチドと複合体化又は少なくとも部分的に複合体化される。

30

【0378】

いくつかの実施形態によれば、本発明の組成物は、本明細書で定義されるRNA及びポリマー担体を含む。

【0379】

本明細書で使用される「ポリマー担体」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、別の化合物（カーゴ）の輸送及び／又は錯化を促進する化合物を意味することが意図される。ポリマー担体は、典型的には、ポリマーから形成される担体である。ポリマー担体は、共有的又は非共有的相互作用によって、そのカーゴ（核酸、RNA）と会合し得る。

40

【0380】

好適なポリマー担体は、ジスルフィド架橋されたカチオン性化合物によって形成されるポリマー担体であり得る。ジスルフィド架橋されたカチオン性化合物は、互いに同一であっても異なってもよい。ポリマー担体はまた、更なる成分も含み得る。本発明にしたがって使用されるポリマー担体が、ジスルフィド結合によって（-SH基を介して）架橋される、本明細書に定義のカチオン性ペプチド、タンパク質、又はポリマー、及び任意に更なる成分の混合物を含むことができる。

【0381】

この文脈において、国際公開第2012/013326号の式 {（Arg）_l；（Ly

50

s) m; (H i s) n; (O r n) o; (X a a') x (C y s) y} 及び式 C y s, { (A r g) l; (L y s) m; (H i s) n; (O r n) o; (X a a) x} C y s₂に係るポリマー担体が好ましく、それに関する国際公開第2012/013326号の開示を、参照により本明細書に援用する。

【0382】

いくつかの実施形態においては、本明細書で定義されるRNAを複合体化するために使用できるポリマー担体は、国際公開第2011/026641号の式(L-P¹-S-[S-P²-S]_n-S-P³-L)に係るポリマー担体に由来することができ、それに関する国際公開第2011/026641号の開示を、参照により本明細書に援用する。

【0383】

いくつかの実施形態においては、ポリマー担体化合物は、ペプチドエレメント C y s A r g₁₂ C y s (配列番号64) 又は C y s A r g₁₂ (配列番号65) 又は T r p A r g₁₂ C y s (配列番号66) によって形成される又は含む又はからなる。特に好ましい実施形態では、ポリマー担体化合物は、(R₁₂C)-(R₁₂C)二量体、(W R₁₂C)-(W R₁₂C)二量体、又は(C R₁₂)-(C R₁₂C)-(C R₁₂)三量体からなり、二量体(例えば、(W R₁₂C))又は三量体(例えば、(C R₁₂))中の個々のペプチドエレメントは、-SH基を介して結合される。

【0384】

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、HO-PEG5000-S-(S-CH H H H H R R R R H H H H H C-S-)7-S-PEG5000-OH(ペプチドモノマーとしての配列番号67)を含むポリエチレングリコール/ペプチドポリマーと複合体化又は会合される。

【0385】

第2の態様の更に好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、HO-PEG5000-S-(S-CH H H H H H R R R R H H H H H C-S-)4-S-PEG5000-OH(ペプチドモノマーとしての配列番号67)を含むポリエチレングリコール/ペプチドポリマーと複合体化又は会合される。

【0386】

第2の態様の更に好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、HO-PEG5000-S-(S-C G H H H H H R R R R H H H H H G C-S-)7-S-PEG5000-OH(ペプチドモノマーとしての配列番号21320)を含むポリエチレングリコール/ペプチドポリマーと複合体化又は会合される。

【0387】

第2の態様の更に好ましい実施形態では、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、HO-PEG5000-S-(S-C G H H H H H R R R R H H H H H G C-S-)4-S-PEG5000-OH(ペプチドモノマーとしての配列番号21320)を含むポリエチレングリコール/ペプチドポリマーと複合体化又は会合される。

【0388】

他の実施形態においては、組成物は、本明細書に記載される少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAを含み、少なくとも1つの人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAは、ポリマー担体と、任意に、公開PCT出願国際公開第2017/212008A1号、同2017/212006A1号、同2017/212007A1号、及び同2017/212009A1号に記載される少なくとも1つの脂質成分と複合体化又は会合される。この文脈において、国際公開第2017/212008A1号、同2017/212006A1号、同2017/212007A1号、及び同2017/212009A1号の開示を、参照により本明細書に援用する。

10

20

30

40

50

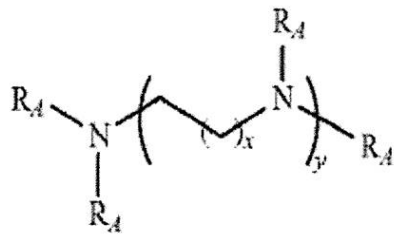
【0389】

特に好ましい実施形態においては、ポリマー担体は、ペプチドポリマー、好ましくは上に定義したポリエチレングリコール／ペプチドポリマー、及び脂質成分、好ましくはリピドイド成分、より好ましくはリピドイド成分である。

【0390】

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、ポリマー担体、好ましくは上に定義したポリエチレングリコール／ペプチドポリマー、及びリピドイド成分と複合体化又は会合され、リピドイド成分は式Aに係る化合物又はその薬学的に許容される塩である。

【化1】

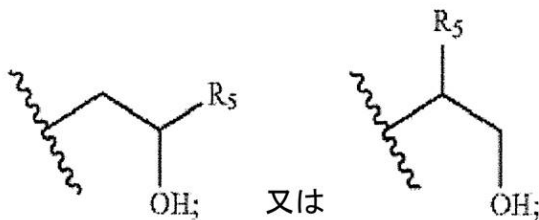


(式A)

式中、

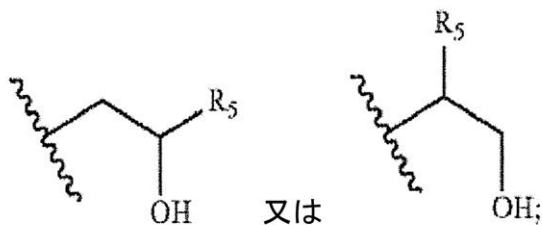
— R_A は、それぞれ独立して、非置換、環状又は非環状、分岐又は非分岐の C_{1-20} の脂肪族基；置換又は非置換、環状又は非環状、分岐又は非分岐の C_{1-20} のヘテロ脂肪族基；置換又は非置換のアリール；置換又は非置換のヘテロアリールから選択され；

【化2】



式中、少なくとも1つの R_A は、

【化3】



— R_5 は、それぞれ独立して、非置換、環状又は非環状、分岐又は非分岐の C_{8-16} の脂肪族基；置換又は非置換のアリール；又は置換又は非置換のヘテロアリールから選択され；
 — x は、それぞれ1～10の整数であり；
 — y は、それぞれ1～10の整数である。

【0391】

好ましい実施形態では、リピドイド成分は、式Bに係る3-C12-OHである。

10

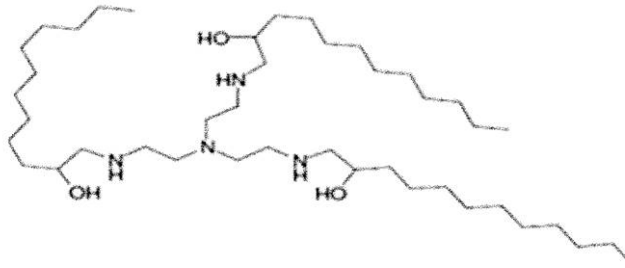
20

30

40

50

【化 4】



(式B)

10

【0392】

好ましい実施形態においては、上に記載したリポイド3-C12-OHを含むペプチドポリマーを使用して、第1の態様のRNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAを複合体化して、約0.1～約20、又は約0.2～約15、又は約2～約15、又は約2～約12のN/P比を有する複合体を形成する。N/P比は、カチオン性ペプチド又はポリマーの塩基性基の窒素原子の、人工核酸のリン酸基も対するモル比として定義される。その文脈において、国際公開第2017/212009A1号の開示、特に、国際公開第2017/212009A1号の請求項1～10、及びそれに関する具体的な開示を、参照により本明細書に援用する。

20

【0393】

LNPにおける封入化／複合体化：

第2の態様の好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質（例えば、カチオン性脂質及び／又は中性脂質）と複合体化又は会合されて、リポソーム、脂質ナノ粒子（LNP）、リボプレックス、及び／又はナノリポソームを形成する。

【0394】

本明細書で定義される1超の人工RNA構築物（例えば、F-del及びM2-1）を含む組成物の場合、前記構築物を、例えば、LNP中に共存させて、各組成物を形成することができる。

30

【0395】

或いは、前記1超の人工RNA構築物は、別々に調製した後、組み合わせて、各組成物を形成してもよい。

【0396】

この文脈において、「複合体化された」又は「会合された」という用語は、第1の態様の人工RNAと、任意に、第2の態様の更なる人工RNAと、共有結合なしでより大きな複合体又はアセンブリをなす1以上の脂質との本質的に安定な組合せを意味する。

【0397】

本発明の文脈において、「脂質ナノ粒子」という用語（「LNP」とも呼ぶ）は、特定の形態に限定されず、例えば、水性環境及び／又はRNAの存在下で、カチオン性脂質と任意に1以上の更なる脂質とが組み合わされたときに生成される形態を含む。例えば、リポソーム、脂質複合体、リボプレックスなどは、脂質ナノ粒子（LNP）の範囲内である。

40

【0398】

したがって、第2の態様の好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子（LNP）を形成する。

【0399】

LNPは通常、カチオン性脂質と、中性脂質、荷電脂質、ステロイド、及びポリマーコンジュゲート脂質（例えば、PEG化脂質）から選択される1以上の賦形剤とを含む。RNAは、LNPの脂質部分内、又はLNPの一部又は全体の脂質部分によって包囲される

50

水性空間に封入され得る。RNA又はその一部はまた、LNPと会合及び複合体化され得る。LNPは、核酸が結合する粒子、又は1以上の核酸が封入される粒子を形成することができる任意の脂質を含むことができる。好ましくは、LNPを含む核酸は、1以上のカチオン性脂質、及び1以上の安定化脂質を含む。安定化脂質には、中性脂質及びPEG化脂質が含まれる。

【0400】

LNPのカチオン性脂質はカチオン化可能であることがある。即ち、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、pH値がより高くなると次第に中性になる。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。特定の実施形態では、カチオン性脂質は、pH低下時に正電荷を帯びる両性イオン性脂質を含む。

【0401】

LNPは、任意の更なるカチオン性又はカチオン化可能な脂質、即ち、生理学的pHなどの選択的pHで正味の正電荷を有する多くの脂質種のいずれかを含み得る。

【0402】

そのような脂質としては、限定されるものではないが、例えば、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-ジステアシル-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及び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）、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-γ-ノレニルオキシ-N，N-ジメチルアミノプロパン（γ-DLenDMA）、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-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-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）又は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（DOAP）、1，2-ジリノレイルオキシ-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）又はその類似体、（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-6，9，28，31-テトラエン-19-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタノアート（MC3）、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）、（6Z，9Z，28Z，31Z）-ヘプタトリアコ

10

20

30

40

50

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
アート (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
) (GIBCO/BRL, Grand Island, NYからの市販されている、DO
TMA及び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
カチオン性リポソーム); LIPOFECTAMINE (登録商標) (GIBCO/BRL
から市販されている、N-(1-(2, 3ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-
(スベ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
セタート (DOSPA) 及び (DOPE)を含むカチオン性リポソーム); 及びTRAN
SFECTAM (登録商標) (Promega Corp., Madison, Wis.
から市販されている、エタノール中にジオクタデシルアミドグリシルカルボキシルペルミ
ン (DOGS)を含む市販のカチオン性脂質)又はこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0403】

いくつかの実施形態においては、脂質は、98N12-5、C12-200、及びck
k-E12からなる群から選択される。

【0404】

一実施形態においては、更なるカチオン性脂質はアミノ脂質である。

【0405】

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-ジリノレイオキシ
-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
イオキシ-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
ノレイルオキシ-3-(2-N, N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin-E
G-DMA)、及び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号明細書)が挙げられる。

【0406】

一実施形態においては、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人
工RNAは、アミノアルコールリピドイド中に含有させることができる。本発明で使用する
ことができるアミノアルコールリピドイドは、その全体を参照により本明細書に援用す
る米国特許第8, 450, 298号明細書に記載される方法によって調製することができる。
好適な(イオン化可能な)脂質はまた、表1、表2、及び表3に開示され、参照により
本明細書に援用する国際公開第2017/075531A1号の請求項1~24に定義
される化合物であってもよい。

【0407】

別の実施形態においては、イオン化可能な脂質はまた、国際公開第2015/0740
85A1号に開示される化合物(即ち、ATX-001~ATX-032又は請求項1~
26で特定される化合物)、米国特許出願第61/905, 724号明細書及び同第15

10

20

30

40

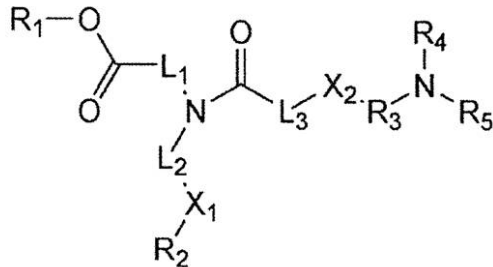
50

／ 6 1 4 , 4 9 9 号明細書、又は米国特許第 9 , 5 9 3 , 0 7 7 号明細書及び同第 9 , 5 6 7 , 2 9 6 号明細書に開示される化合物であってもよく、これらの全体を参照により本明細書に援用する。

【 0 4 0 8 】

その文脈においては、一般式 (X 1) に由来する脂質、又はその薬学的に許容される塩を好適に使用することができる。

【化 5】



式中、 R_1 と R_2 は同一又は異なっており、それぞれ1～9個の炭素からなる直鎖又は分岐したアルキル、2～11個の炭素からなるアルケニル又はアルキニル、 L_1 と L_2 は同一又は異なっており、それぞれ5～18個の炭素からなる直鎖のアルキレン又はアルケニレンである、又はNと複素環を形成している、 X_1 は結合、又は-CO-O-であり、それによって-L2-CO-O- R_2 が形成され、 X_2 はS又はO、 L_3 は結合又は直鎖又は分岐した1～6個の炭素からなるアルキレン、又はNと複素環を形成している、 R_3 は1～6個の炭素からなる直鎖又は分岐したアルキレン、 R_4 と R_5 は同一又は異なっており、各水素又は直鎖又は分岐した1～6個の炭素からなるアルキルである。

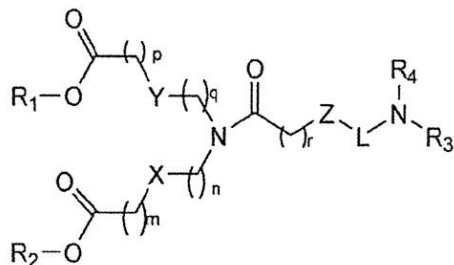
【 0 4 0 9 】

他の実施形態においては、好適なカチオン性脂質は、その全体を参照により援用する国際公開第 2 0 1 7 / 1 1 7 5 3 0 A 1 号に開示される化合物（即ち、脂質 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、又は特許請求の範囲で特定されている化合物）であってもよい。

【 0 4 1 0 】

この文脈においては、一般式 (X 2) に由来する脂質、又はその薬学的に許容される塩である。

【化 6】



式中、

X は、直鎖又は分岐したアルキレン又はアルケニレン、単環式、二環式、又は三環式のアレン又はヘテロアレンであり；

Y は、結合、エテン、又は非置換又は置換芳香族又はヘテロ芳香族環であり；

Z は、S 又は O であり；

L は、炭素数 1～6 の直鎖又は分岐したアルキレンであり；

R_3 及び R_4 は、独立して、炭素数 1～6 の直鎖又は分岐したアルキルであり；

R_1 及び R_2 は、独立して、炭素数 1～20 の直鎖又は分岐したアルキル又はアルケニルであり；

r は、0～6であり；

m 、 n 、 p 、及び q は、独立して、1～18であり；

$n = q$ 、 $m = p$ 、 $R_1 = R_2$ のとき、 X と Y は異なり；

$X = Y$ 、 $n = q$ 、 $m = p$ のとき、 R_1 と R_2 は異なり；

$X = Y$ 、 $n = q$ 、 $R_1 = R_2$ のとき、 m と p は異なり；

$X = Y$ 、 $m = p$ 、 $R_1 = R_2$ のとき、 n と q は異なる。

【0411】

好ましい実施形態においては、式(X2)に由来する脂質を使用することができ、式中、 X は、結合、直鎖又は分岐したアルキレン、アルケニレン、又は単環式、二環式、又は三環式アレン又はヘテロアレンであり； Y は、単環式、二環式、又は三環式のアレン又はヘテロアレンであり； Z は、 S 又は O であり； L は、炭素数1～6の直鎖又は分岐したアルキレンであり； R_3 と R_4 は、独立して、炭素数1～6の直鎖又は分岐したアルキルであり； R_1 と R_2 は、独立して、炭素数1～20の直鎖又は分岐したアルキル又はアルケニルであり； r は、0～6であり； m 、 n 、 p 、及び q は、独立して、1～18であり；又はその薬学的に許容される塩を好適に使用することができる。

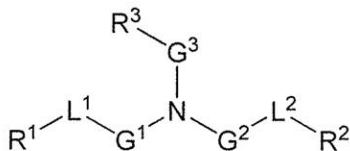
【0412】

好ましい実施形態においては、イオン化可能な脂質は、PCT出願PCT/EP2017/077517に開示される脂質化合物（即ち、PCT/EP2017/077517の式I、II、及びIIIに由来する脂質化合物、又はPCT/EP2017/077517の請求項1～12に特定されている脂質化合物）から選択することもでき、PCT/EP2017/077517の開示は、参照によりその全体を本明細書に援用する。この文脈では、PCT/EP2017/077517の表7に開示される脂質化合物（例えば、式I-1～I-41に由来する脂質化合物）及びPCT/EP2017/077517の表8に開示される脂質化合物（例えば、式II-1～II-36）が、本発明の文脈において好適に使用することができる。したがって、PCT/EP2017/077517の式I-1～式I-41及び式II-1～式II-36、及びそれらに関する具体的な開示を、参照により本明細書に援用する。

【0413】

第2の態様の特に好ましい実施形態においては、好適な脂質は、式(III)に係るカチオン性脂質、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグ、若しくは立体異性体であり得る。

【化7】



式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 L_1 、 L_2 、 G_1 、 G_2 、及び G_3 は、以下の通りである。

【0414】

式(III)は、更に、以下のように定義される：

L_1 又は L_2 は、その一方が、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、又は $-NR^aC(=O)O-$ であり、 L_1 又は L_2 の他方が、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、若しくは $-NR^aC(=O)O-$ 、又は直接結合であり；

G_1 及び G_2 は、それぞれ独立して、非置換の $C_{1-C_{12}}$ アルキレン又は $C_{1-C_{12}}$

アルケニレンであり；

G^3 は、 C_1-C_{24} アルキレン、 C_1-C_{24} アルケニレン、 C_3-C_8 シクロアルキレン、 C_3-C_8 シクロアルケニレンであり；

R^a は、H又は C_1-C_{12} アルキルであり；

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、 C_6-C_{24} アルキル又は C_6-C_{24} アルケニルであり；

R^3 は、H、 OR^5 、 CN 、 $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$ 、又は $-NR^5C(=O)R^4$ であり；

R^4 は、 C_1-C_{12} アルキルであり；

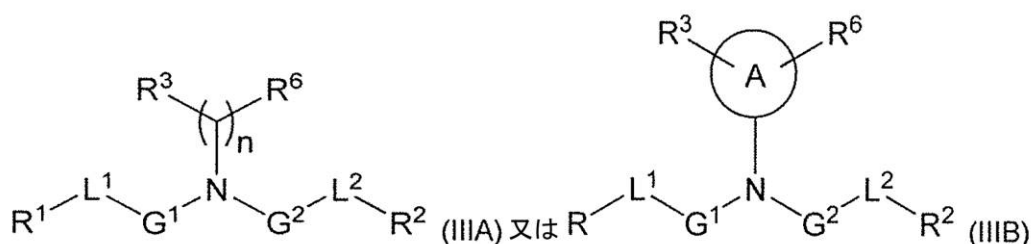
R^5 は、H又は C_1-C_6 アルキルであり；

x は、0、1、又は2である。

【0415】

前記した式(III)のいくつかの実施形態においては、脂質は、以下の構造(IIIA)又は(IIIB)のいずれかを有する。

【化8】



式中、

Aは、3～8員のシクロアルキル又はシクロアルキレン環であり； R^6 は、それぞれ独立して、H、OH、又は C_1-C_{24} アルキルであり； n は、1～15の整数である。

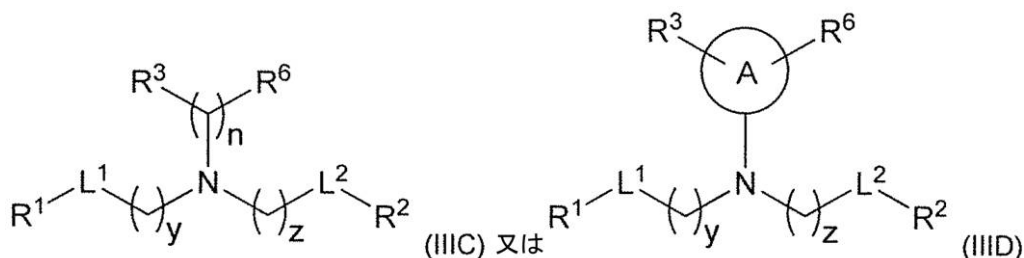
【0416】

前記した式(III)の実施形態のいくつかにおいては、脂質は構造(IIIA)を有し、他の実施形態においては、脂質は構造(IIIB)を有する。

【0417】

式(III)の他の実施形態においては、脂質は、以下の構造(IIIC)又は(IIID)のいずれかを有する。

【化9】



式中、 y 及び z は、それぞれ独立して、1～12の整数である。

【0418】

式(III)の前記したの実施形態のいずれかにおいては、 L^1 又は L^2 のいずれかは、 $-O(C=O)-$ である。例えば、いくつかの実施形態においては、 L^1 又は L^2 は、それぞれ、 $-O(C=O)-$ である。前記のいずれかのいくつかの異なる実施形態においては、 L^1 又は L^2 は、それぞれ独立して、 $-(C=O)O-$ 又は $-O(C=O)-$ である。例えば、いくつかの実施形態においては、 L^1 又は L^2 は、それぞれ、 $-(C=O)O-$ である。

【0419】

10

20

30

40

50

第2の態様の好ましい実施形態では、LNPのカチオン性脂質は、式IIIの化合物であり、

式中、

L^1 又は L^2 は、それぞれ独立して、 $-O(C=O)-$ 又は $(C=O)-O-$ であり；

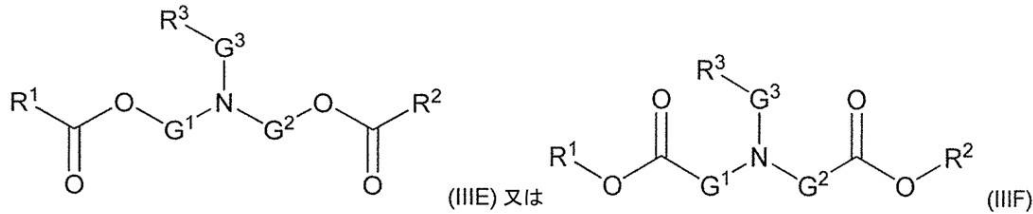
G^3 は、 C_1-C_{24} アルキレン又は C_1-C_{24} アルケニレンであり；

R^3 は、H又は OR^5 である。

【0420】

式(III)のいくつかの異なる実施形態においては、脂質は、以下の構造(IIIE)又は(IIIF)のいずれかを有する。

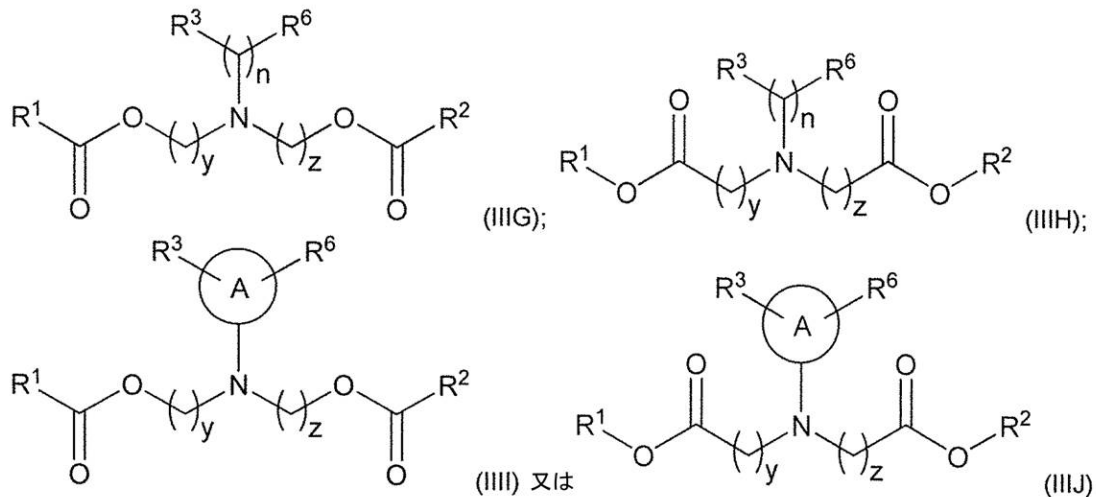
【化10】



【0421】

式(III)の前記した実施形態のいくつかにおいては、脂質は、以下の構造(IIIG)、(IIIH)、(IIII)、又は(IIIJ)のいずれかを有する。

【化11】



【0422】

式(III)の前記した実施形態のいくつかにおいては、 n は、2~12であり、例えば、2~8又は2~4の整数である。いくつかの実施形態においては、 n は、3、4、5、又は6である。いくつかの実施形態においては、 n は、4である。いくつかの実施形態においては、 n は、5である。いくつかの実施形態においては、 n は、6である。式(III)の前記したいくつかの他の実施形態においては、 y 及び z は、それぞれ独立して、2~10の整数である。例えば、いくつかの実施形態においては、 y 及び z は、それぞれ独立して、4~9又は4~6の整数である。式(III)の前記した実施形態のいくつかにおいては、 R^6 は、Hである。前記した実施形態の他の実施形態においては、 R^6 は、 C_1-C_{24} アルキルである。他の実施形態においては、 R^6 は、OHである。式(III)のいくつかの実施形態においては、 G^3 は、非置換である。他の実施形態においては、 G^3 は、置換されている。様々な異なる実施形態においては、 G^3 は、直鎖 C_1-C_{24} アルキレン又は直鎖 C_1-C_{24} アルケニレンである。式(III)のいくつかの他の前記した実施形態においては、 R^1 又は R^2 、若しくはその両方は、 C_6-C_{24} アルケニルである。例えば、いくつかの実施形態においては、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して以下

10

20

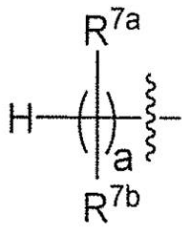
30

40

50

の構造を有する。

【化 1 2】



10

式中、

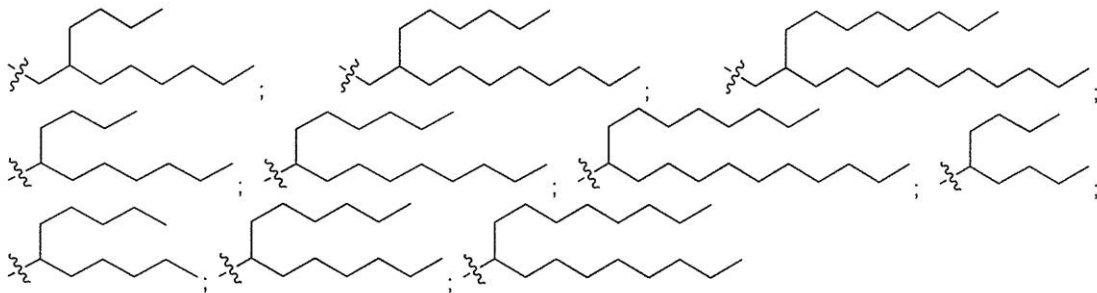
R^{7a} 及び R^{7b} は、各場合に独立して、H 又は C_1-C_{12} アルキルであり； a は、2～12 の整数であり； R^{7a} 、 R^{7b} 、及び a はそれぞれ、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して 6～20 個の炭素原子を含むように選択される。例えば、いくつかの実施形態においては、 a は、5～9 又は 8～12 の整数である。式 (I I I) の前記した実施形態のいくつかにおいては、 R^{7a} の少なくとも 1 つは、H である。例えば、いくつかの実施形態においては、 R^{7a} はいずれも H である。前記した他の異なる実施形態においては、 R^{7b} の少なくとも 1 つは、 C_1-C_8 アルキルである。例えば、いくつかの実施形態においては、 C_1-C_8 アルキルは、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 $tert$ -ブチル、 n -ヘキシル、又は n -オクチルである。

20

【0 4 2 3】

式 (I I I) の異なる実施形態においては、 R^1 又は R^2 、若しくはその両方は、以下の構造のうちの 1 つを有する。

【化 1 3】



30

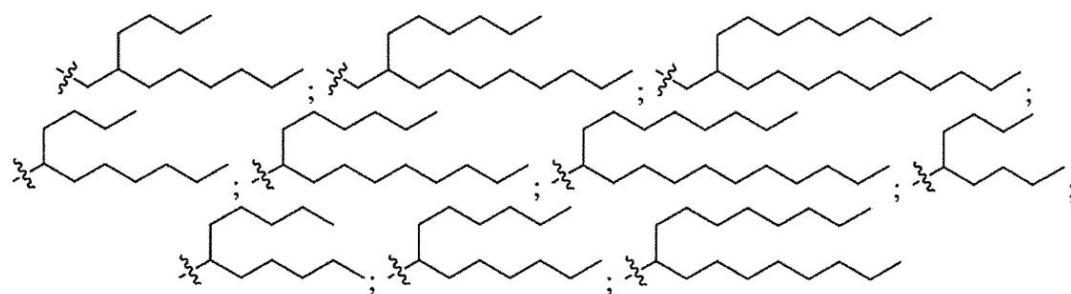
【0 4 2 4】

第 2 の態様の好ましい実施形態においては、LNP のカチオン性脂質は、式 I I I の化合物であり、式中、

L^1 及び L^2 は、それぞれ独立して、 $-O(C=O)-$ 又は $(C=O)-O-$ であり；

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、以下の構造のうちの 1 つを有する。

【化 1 4】



40

【0 4 2 5】

50

式 (I I I) の前記した実施形態のいくつかにおいては、 R^3 は、 OH 、 CN 、 $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$ 、又は $-NHC(=O)R^4$ である。いくつかの実施形態においては、 R^4 は、メチル又はエチルである。

【0426】

第2の態様の好ましい実施形態においては、LNPのカチオン性脂質は、式 I I I の化合物であり、 R^3 が OH である。

【0427】

第2の態様の特に好ましい実施形態においては、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子 (LNP) を形成し、LNPは、構造 I I I - 1 ~ I I I - 36 (表8を参照) から選択される。

【0428】

表8：式 (I I I) に由来する代表的な脂質化合物

10

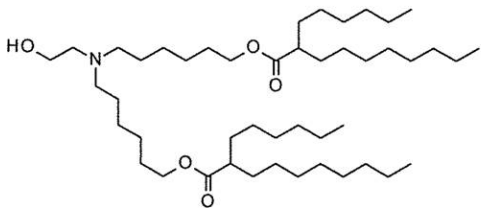
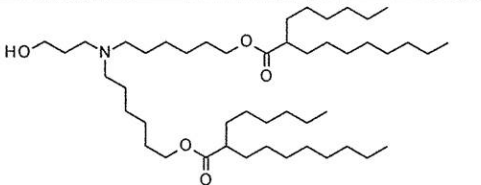
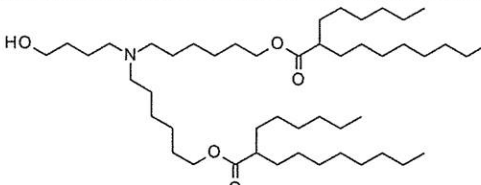
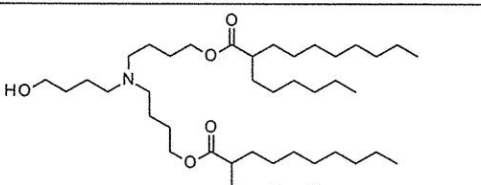
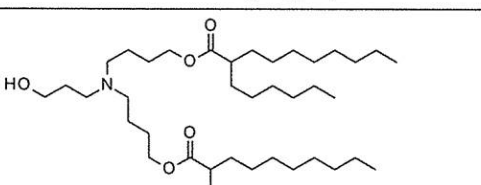
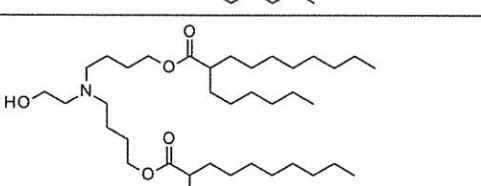
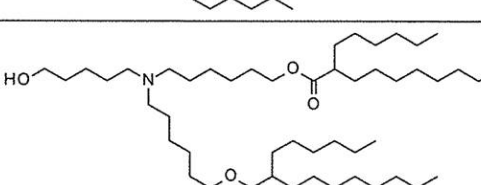
20

30

40

50

【表 8 - 1】

番号	構造
III-1	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-2	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-3	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-4	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-5	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-6	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>
III-7	 <chem>CCCCCCCC(=O)OCCN(CCCCCCOC(=O)CCCCCCCC)CCCCCCCC(=O)OCC</chem>

10

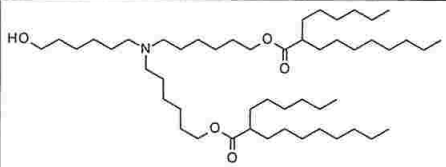
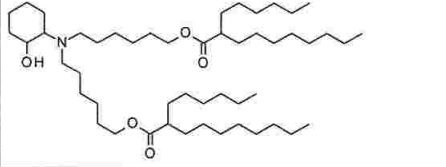
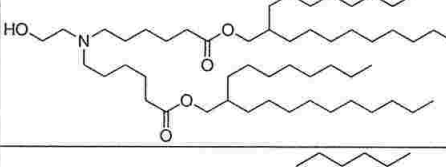
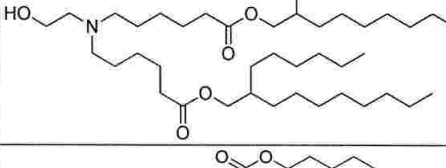
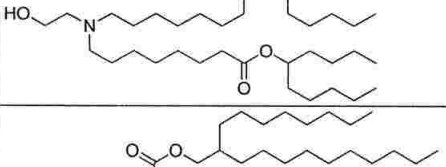
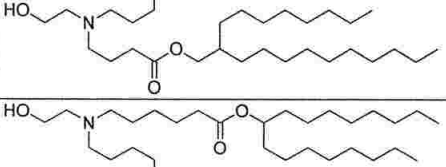
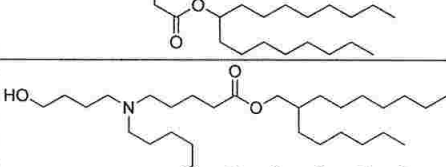
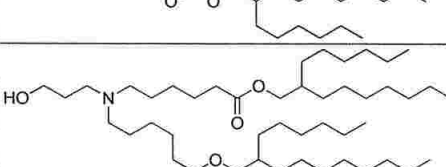
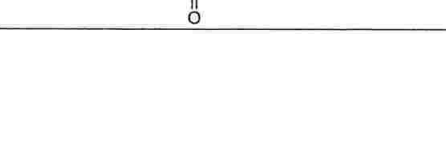
20

30

40

50

【表 8 - 2】

番号	構造
III-8	
III-9	
III-10	
III-11	
III-12	
III-13	
III-14	
III-15	
III-16	

10

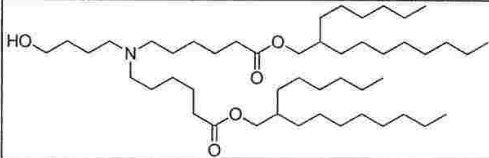
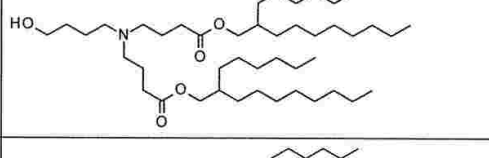
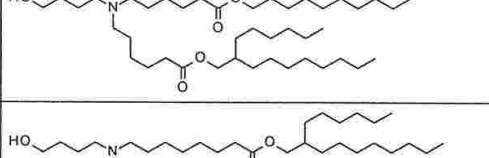
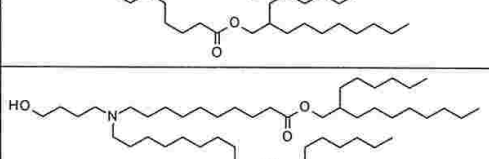
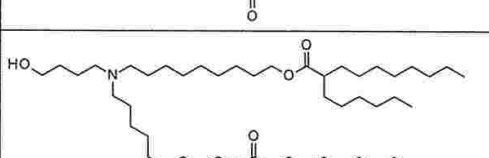
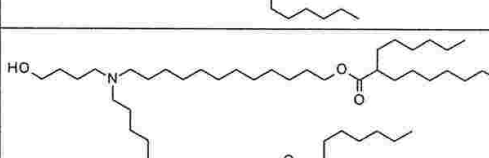
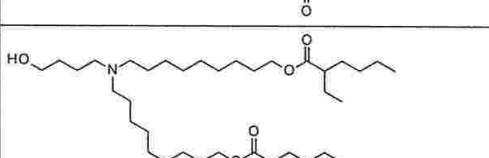
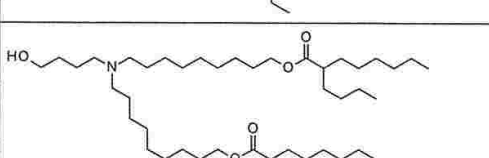
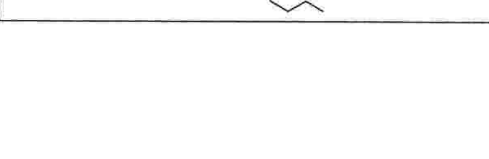
20

30

40

50

【表 8 - 3】

番号	構造
III-17	
III-18	
III-19	
III-20	
III-21	
III-22	
III-23	
III-24	
III-25	

10

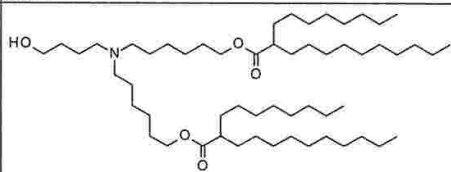
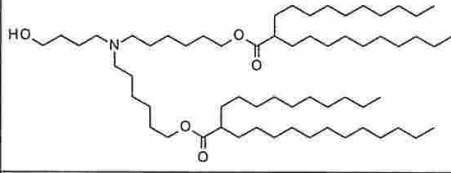
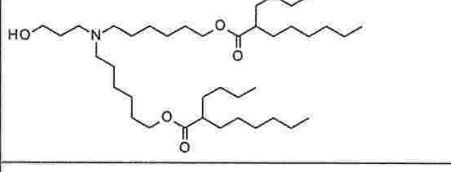
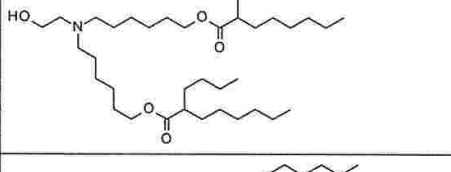
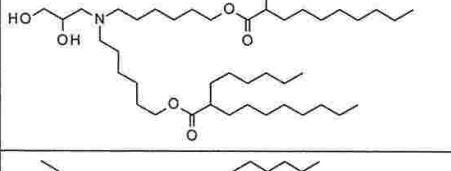
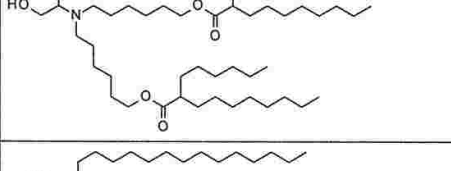
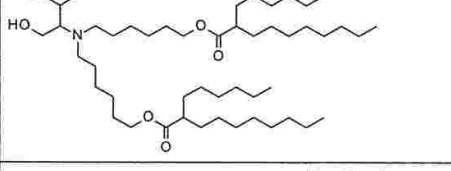
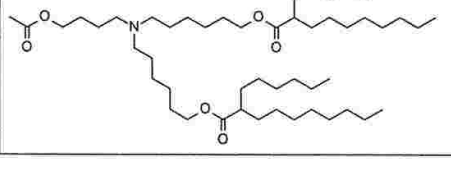
20

30

40

50

【表 8 - 4】

番号	構造
III-26	
III-27	
III-28	
III-29	
III-30	
III-31	
III-32	
III-33	

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

番号	構造
III-34	
III-35	
III-36	

10

20

【 0 4 2 9】

いくつかの実施形態においては、LNPは、式（ⅠⅠⅠ）の脂質、第1の態様の人工RNA、及び任意に、第2の態様の更なる人工RNA、並びに中性脂質、ステロイド、及びPEG化脂質から選択される1以上の賦形剤を含む。いくつかの実施形態においては、式（ⅠⅠⅠ）の脂質は、化合物ⅠⅠⅠ-3である。いくつかの実施形態においては、式（ⅠⅠⅠ）の脂質は、化合物ⅠⅠⅠ-7である。

【 0 4 3 0】

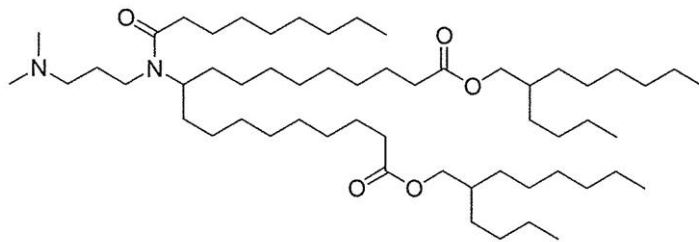
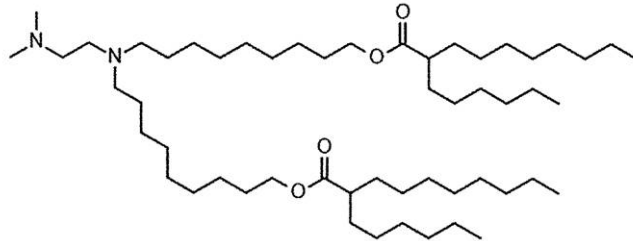
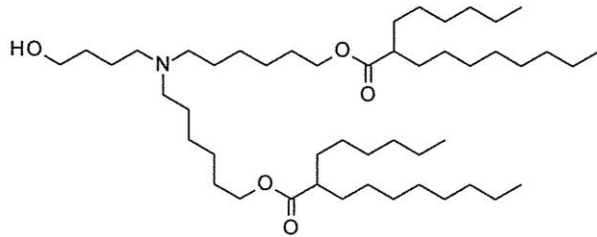
好ましい実施形態においては、LNPは、以下から選択されるカチオン性脂質を含む。

30

40

50

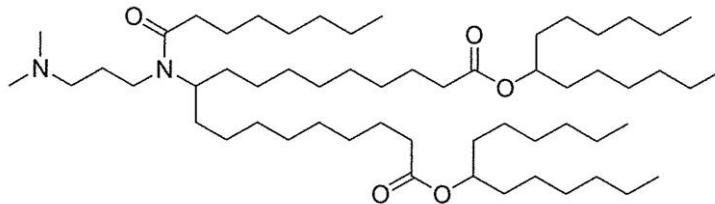
【化 1 5】



10

20

【化 1 6】

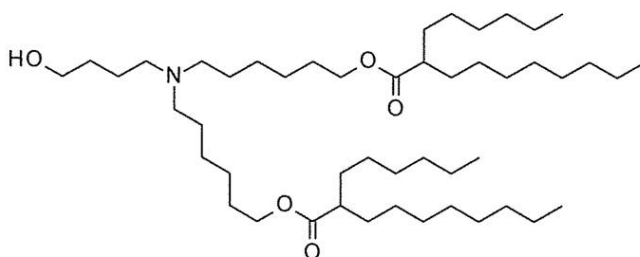


30

【 0 4 3 1】

第 2 の態様の特に好ましい実施形態においては、第 1 の態様の人工 RNA 及び、任意に、第 2 の態様の更なる人工 RNA は、1 以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子 (LNP) を形成し、LNP は、以下のカチオン性脂質 (表 8 の式 III-3 に係る脂質) を含む。

【化 1 7】



40

【 0 4 3 2】

特定の実施形態においては、本明細書に定義されるカチオン性脂質、好ましくは表 8 に開示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 は、LNP

50

の総脂質含量に対して約30～約95モルパーセントの量でLNPに存在する。1超のカチオン性脂質がLNPに含有される場合、そのパーセンテージは、組み合わされたカチオン性脂質に適用される。

【0433】

一実施形態においては、カチオン性脂質は、約30～約70モルパーセントの量でLNPに存在する。一実施形態においては、カチオン性脂質は、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、又は60モルパーセントなど、約40～約60モルパーセントの量でLNPに存在する。いくつかの実施形態においては、カチオン性脂質は、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モルパーセントなど、約47～約48モルパーセントの量でLNPに存在し、47.7モルパーセントが特に好ましい。

10

【0434】

いくつかの実施形態においては、カチオン性脂質は、LNPに存在する総脂質の約20mol%～約70又は75mol%、又は約45～約65mol%、又は約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、又は約70mol%の比率で存在する。更なる実施形態においては、LNPは、カチオン性脂質のモル基準で約25%～約75%、例えば、(脂質ナノ粒子中の脂質の総モル100%に基づく)モル基準で約20～約70%、約35～約65%、約45～約65%、約60%、約57.5%、約57.1%、約50%、又は約40%を含む。いくつかの実施形態においては、カチオン性脂質と核酸、好ましくは第1の態様の人工RNA及び、任意に第2の態様の更なる人工RNAの割合は、約3～約15であり、例えば、約5～約13又は約7～約11である。

20

【0435】

本発明のいくつかの実施形態においては、LNPは、前記した任意の脂質の組合せ又は混合物を含む。

【0436】

他の好適な(カチオン性)脂質は、国際公開第2009/086558号、国際公開第2009/127060号、国際公開第2010/048536号、国際公開第2010/054406号、国際公開第2010/088537号、国際公開第2010/129709号、国際公開第2011/153493号、米国特許出願公開第2011/0256175号、米国特許出願公開第2012/0128760号、米国特許出願公開第2012/0027803号、米国特許第8158601号、国際公開第2016/118724号、国際公開第2016/118725号、国際公開第2017/070613号、国際公開第2017/070620号、国際公開第2017/099823号、及び国際公開第2017/112865号に開示される。この文脈において、LNPに好適な(カチオン性)脂質に具体的に関連する国際公開第2009/086558号、国際公開第2009/127060号、国際公開第2010/048536号、国際公開第2010/054406号、国際公開第2010/088537号、国際公開第2010/129709号、国際公開第2011/153493号、米国特許出願公開第2011/0256175号明細書、米国特許出願公開第2012/0128760号明細書、米国特許出願公開第2012/0027803号明細書、米国特許出願公開第8158601号明細書、国際公開第2016/118724号、国際公開第2016/118725号、国際公開第2017/070613号、国際公開第2017/070620号、国際公開第2017/099823号、及び国際公開第2017/112865号を参照により本明細書に援用する。

30

40

【0437】

いくつかの実施形態においては、脂質は、98N12-5、C12-200、及びckk-E12からなる群から選択される。

【0438】

いくつかの実施形態においては、本明細書に定義されるアミノ脂質又はカチオン性脂質

50

は、少なくとも1つのプロトン化可能基又は脱プロトン化可能基を有し、脂質は、生理学的pH（例えば、pH7.4）以下のpHで正に帯電し、第2のpH、好ましくは生理学的pHで中性である。言うまでもなく、pHの関数としてのプロトンの追加又は除去は平衡プロセスであり、荷電脂質又は中性脂質への言及は主として存在する種の性質を意味し、全て脂質が荷電又は中性の形態で存在しなければならないということではない。1超のプロトン化可能基又は脱プロトン化可能基（即ち、両性イオン性である）を有する脂質は除外せず、本発明の文脈において同様に好適であり得る。

【0439】

いくつかの実施形態においては、プロトン化可能な脂質は、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。

【0440】

LNPは、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、異なる有利な特性に寄与するように選択することができる。例えば、アミンpKa、化学的安定性、循環中の半減期、組織での半減期、組織での正味の蓄積、又は毒性などの性質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LNPの性質が個々の脂質の単一LNPの性質よりも望ましいように選択することができる。

【0441】

恒久的にカチオン性の脂質又はリピドイドの量は、核酸カーゴの量を考慮して選択することができる。一実施形態では、これらの量は、ナノ粒子又は組成物のN/P比が約0.1～約20の範囲となるように選択される。この文脈において、N/P比は、脂質又はリピドイドの塩基性窒素含有基の窒素原子（「N」）の、カーゴとして使用されるRNAのリン酸基（「P」）に対するモル比として定義される。N/P比は、RNAが塩基の統計的分布を示すという条件で、例えば、1μgのRNAが典型的に約3nmolのリン酸残基を含有することに基づいて計算することができる。脂質又はリピドイドの「N」値は、その分子量と、恒久的にカチオン性の及び存在する場合にはカチオン化可能な基の相対含量に基づいて計算できる。

【0442】

LNPのインビボ特性と挙動は、親水性ポリマーコーティング、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）をLNP表面に添加して、立体的安定性を付与することにより変更することができる。更に、LNPは、リガンド（例えば、抗体、ペプチド、及び炭水化物）をその表面又はPEG鎖の末端（例えば、PEG化脂質を介して）に結合させることにより、特異的なターゲティングに使用することができる。

【0443】

いくつかの実施形態では、LNP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」という用語は、脂質部分とポリマー部分の両方を含む分子を意味する。ポリマーコンジュゲート脂質の例は、PEG化脂質である。「PEG化脂質」という用語は、脂質部分とポリエチレングリコール部分の両方を含む分子を意味する。PEG化脂質は、当技術分野で知られており、1-（モノメトキシーポリエチレングリコール）-2,3-ジミリスチルグリセロール（PEG-s-DMG）などが挙げられる。

【0444】

特定の実施形態では、LNPは、ポリエチレングリコール脂質（PEG化脂質）である更なる安定化脂質を含む。好適なポリエチレングリコール脂質としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド（例えば、PEG-CerC14又はPEG-CerC20）、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロールが挙げられる。代表的なポリエチレングリコール脂質としては、PEG-c-DOMG、PEG-c-DMA、及びPEG-s-DMGが挙げられる。一実施形態では、ポリエチレングリコール脂質は、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（PEG-c-DMA）である。好ましい実施

10

20

30

40

50

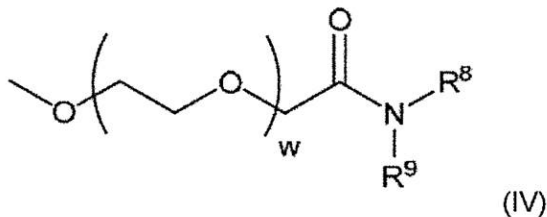
形態では、ポリエチレングリコール脂質は、PEG-2000-DMGである。一実施形態では、ポリエチレングリコール脂質は、PEG-c-DMGである。他の実施形態では、LNPは、PEG化ジアシルグリセロール（PEG-DAG）、例えば、1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2，3-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG）、PEG化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）、PEGスクシナートジアシルグリセロール（PEG-S-DAG）、例えば、4-O-（2'，3'-ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル-1-O-（ ω -メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオアート（PEG-S-DMG）、PEG化セラミド（PEG-cer）、又はPEGジアルコキシプロピルカルバマート、例えば、 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）カルバマート又は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）カルバマートを

10

【0445】

第2の態様の好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子（LNP）を形成し、LNPは更に、式（IV）を有するPEG化脂質、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体、若しくは立体異性体を含む。

【化18】



20

式中、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、10～30個の炭素原子を含む、直鎖又は分岐した飽和又は不飽和のアルキル鎖であり、アルキル鎖は、1以上のエステル結合を途中に有していてもよく； w の平均値は、30～60である。

【0446】

式（IV）に係るPEG化脂質の前記した実施形態のいくつかでは、 w が42であるとき、 R^8 及び R^9 の両方は、 n -オクタデシルではない。いくつかの他の実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、10～18個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。いくつかの実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、12～16個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。いくつかの実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、12個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。いくつかの実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、14個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。他の実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、16個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。更に他の実施形態では、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、18個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和のアルキル鎖である。更に他の実施形態では、 R^8 は、12個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和アルキル鎖であり、 R^9 は、14個の炭素原子を含む直鎖又は分岐の飽和又は不飽和アルキル鎖である。

30

40

【0447】

様々な実施形態では、 w は、式（IV）に係るPEG化脂質のPEG部分が約400～約6000 g/molの平均分子量を有するように選択される範囲を有する。いくつかの実施形態では、平均 w は、約50である。

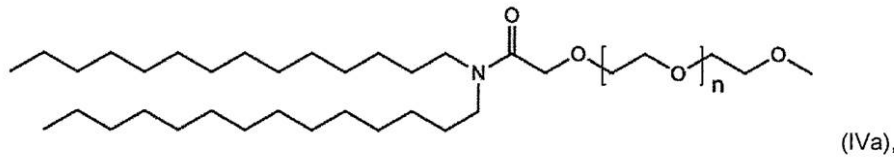
【0448】

第2の態様の好ましい実施形態では、式（IV）に係るPEG化脂質の R^8 及び R^9 は、飽和アルキル鎖である。

50

【0449】

第2の態様の特に好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子(LNP)を形成し、LNPは、PEG化脂質を更に含み、PEG脂質は、式(IVa)のものである。
【化19】



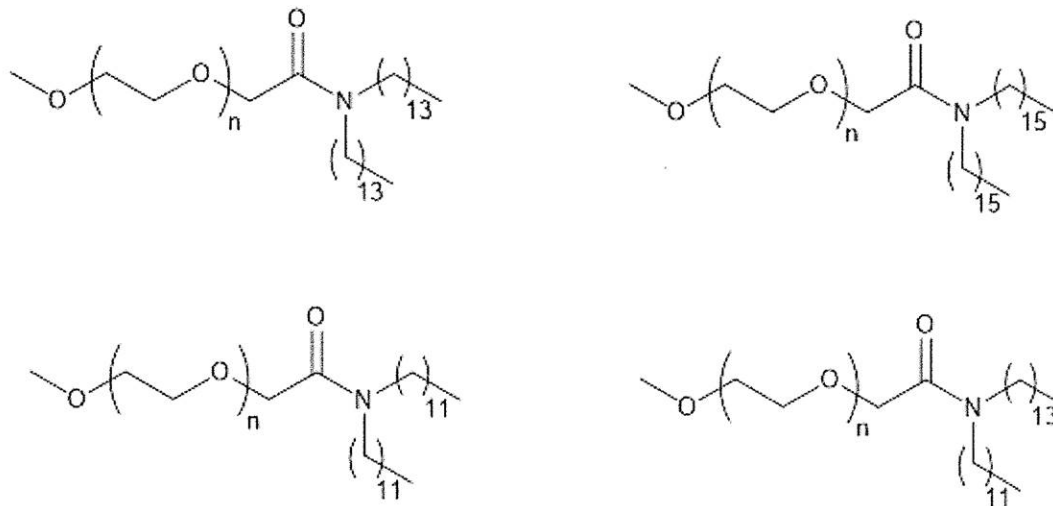
10

式中、 n は、30～60の範囲の平均値を有し、例えば、約28～約32、約30～約34、約32～約36、約34～約38、約36～約40、約38～約42、約40～約44、約42～約46、約44～約48、約46～約50、約48～約52、約50～約54、約52～約56、約54～約58、約56～約60、約58～約62である。好ましい実施形態では、 n は、約45、46、47、48、49、50、51、52、53、54である。最も好ましい実施形態では、 n は、49の平均値を有する。

【0450】

他の実施形態では、PEG化脂質は、以下の構造のうちの1つを有する。

【化20】



20

30

式中、 n は、PEG化脂質の平均分子量が約2500 g/molになるように選択される整数であり、最も好ましくは、 n は、約49である。

【0451】

その文脈において好適なPEG脂質の更なる例は、米国特許出願公開第2015/0376115A1号明細書及び国際公開第2015/199952号に記載されており、これらのそれぞれの全体を参照により援用する。

40

【0452】

いくつかの実施形態では、LNPは、LNP中の脂質の総モルに基づいて、約3、2、又は1モルパーセント未満のPEG又はPEG修飾脂質を含む。更なる実施形態では、LNPは、モル基準で、約0.1%～約20%のPEG修飾脂質、例えば、(LNP中の脂質の総モル100%に基づく)モル基準で、約0.5～約10%、約0.5～約5%、約10%、約5%、約5%、約3.5%、約3%、約2.5%、約2%、約1.5%、約1%、約0.5%、又は約0.3%を含む。好ましい実施形態では、LNPは、モル基準で、約1.0%～約2.0%のPEG修飾脂質、例えば、約1.2～約1.9%、約1.2～約1.8%、約1.3～約1.8%、約1.4～約1.8%、約1.5～約1.8%、約1.6～約1.8%、特に、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1

50

・ 8 %、約 1.9 %、最も好ましくは 1.7 % (LNP 中の脂質の総モル数 100 % に基づく) を含む。各種実施形態では、カチオン性脂質の PEG 化脂質に対するモル比は、約 100 : 1 ~ 約 25 : 1 の範囲である。

【0453】

好ましい実施形態では、LNP は、それらの形成中に粒子の形成を安定化させる 1 以上の更なる脂質 (例えば、中性脂質及び／又は 1 以上のステロイド又はステロイド類似体) を更に含む。

【0454】

第 2 の態様の好ましい実施形態では、第 1 の態様の人工 RNA 及び、任意に、第 2 の態様の更なる人工 RNA は、1 以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子 (LNP) を形成し、LNP は、更に、1 以上の中性脂質及び／又は 1 以上のステロイド又はステロイド類似体を含む。

【0455】

好適な安定化脂質としては、中性脂質及びアニオン性脂質が挙げられる。「中性脂質」という用語は、生理学的 pH で非荷電又は中性な両性イオン形態のいずれかで存在する多くの脂質種のいずれかを意味する。代表的な中性脂質としては、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、及びセレブロシドが挙げられる。

【0456】

第 2 の態様の実施形態では、LNP は、1 以上の中性脂質を更に含み、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、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)、及び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 カルボキシラート (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、16-O-モノメチル PE、16-O-ジメチル PE、18-1-トランス PE、1-ステアリオイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、及び 1, 2-ジェライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (トランス DOPE) を含む群から選択される。

【0457】

いくつかの実施形態では、LNP は、DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE、及び SM から選択される中性脂質を含む。各種実施形態では、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 の範囲である。

【0458】

第 2 の態様の好ましい実施形態では、中性脂質は、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) である。カチオン性脂質の DSPC に対するモル比は、約 2 : 1 ~ 8 : 1 の範囲であることができる。

【0459】

第 2 の態様の好ましい実施形態では、ステロイドは、コレステロールである。カチオン性脂質のコレステロールに対するモル比は、約 2 : 1 ~ 1 : 1 の範囲であることができる。

【0460】

ステロールは、脂質粒子の約 10 モル % ~ 約 60 モル % 又は約 25 モル % ~ 約 40 モル % であることができる。一実施形態では、ステロールは、脂質粒子中に存在する総脂質の約 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、又は約 60 モル % である。別の実施形態では、LNP は、ステロールのモル基準で、約 5 % ~ 約 50 %、例えば、(脂質ナノ粒子中の脂質の総モル 100 % に基づく) モル基準で、約 15 % ~ 約 45

10

20

30

40

50

％、約 20％～約 40％、約 48％、約 40％、約 38.5％、約 35％、約 34.4％、約 31.5％、又は約 31％を含む。

【0461】

好ましくは、脂質ナノ粒子（LNP）は、（a）第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNA、（b）カチオン性脂質、（c）凝集抑制剤（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）脂質又はPEG修飾脂質など）、（d）任意に、非カチオン性脂質（例えば、中性脂質など）、及び（e）任意に、ステロールを含む。

【0462】

他の好ましい実施形態では、脂質ナノ粒子（LNP）は、（a）第1の態様のFをコードする少なくとも1つの人工RNA又はその誘導体若しくは断片及び第2の態様のN、M、P、又はM2-1をコードする少なくとも1つの人工RNA又はその誘導体若しくは断片、（b）カチオン性脂質、（c）凝集抑制剤（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）脂質又はPEG修飾脂質など）、（d）任意に、非カチオン性脂質（例えば、中性脂質など）、及び（e）任意に、ステロールを含む。

【0463】

いくつかの実施形態では、LNPは、式（III）の脂質、本明細書に定義される人工RNA、中性脂質、ステロイド、及びPEG化脂質を含む。好ましい実施形態では、式（III）の脂質は脂質化合物III-3であり、中性脂質はDSPCであり、ステロイドはコレステロールであり、PEG化脂質は式（IVa）の化合物である。

【0464】

第2の態様の好ましい実施形態では、LNPは、（i）少なくとも1つのカチオン性脂質；（ii）中性脂質；（iii）ステロール、例えば、コレステロール；及び（iv）PEG-脂質、例えば、PEG-DMG又はPEG-cDMAから本質的になり、モル比で、約20～60％カチオン性脂質：5～25％中性脂質：25～55％ステロール；0.5～15％PEG-脂質である。

【0465】

第2の態様の特に好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAは、1以上の脂質と複合体化して、脂質ナノ粒子（LNP）を形成し、LNPは、

（i）本明細書に定義される少なくとも1つのカチオン性脂質、好ましくは式（III）の脂質、より好ましくは脂質III-3；

（ii）本明細書に定義される中性脂質、好ましくは1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）；

（iii）本明細書に定義されるステロイド又はステロイド類似体、好ましくはコレステロール；及び

（iv）本明細書に定義されるPEG-脂質、例えば、PEG-DMG又はPEG-cDMA、好ましくは式（IVa）のPEG化脂質から本質的になり、

（i）～（iv）は、モル比で、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：0.5～15％のPEG-脂質である。

【0466】

好ましい一実施形態では、脂質ナノ粒子は、式（III）を有するカチオン性脂質及び／又は式（IV）を有するPEG脂質、任意に、中性脂質、好ましくは、1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、及び任意に、ステロイド、好ましくはコレステロールを含み、カチオン性脂質のDSPCに対するモル比は、任意に、約2：1～8：1であり、カチオン性脂質のコレステロールに対するモル比は、任意に、約2：1～1：1である。

【0467】

特に好ましい実施形態では、第1の態様の人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAを含む第2の態様の組成物は、約50：10：38.5：1.5、好ましく

10

20

30

40

50

は47.5:10:40.8:1.7、又はより好ましくは47.4:10:40.9:1.7（即ち、カチオン性脂質（好ましくは脂質III-3）、DSPC、コレステロール、及びPEG脂質の比率（mol%）（（好ましくは、n=49の式（IVa）のPEG脂質）；エタノールに可溶）のモル比を有する脂質ナノ粒子（LNP）を含む。

【0468】

特に好ましい実施形態では、第2の態様の組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）を含み、約50:10:38.5:1.5、好ましくは47.5:10:40.8:1.7、又はより好ましくは47.4:10:40.9:1.7（即ち、カチオン性脂質（好ましくは脂質III-3）、DSPC、コレステロール、及びPEG脂質の比率（mol%）（（好ましくはn=49の式（IVa）のPEG脂質）；エタノールに可溶）のモル比を有し、脂質ナノ粒子は、F（F0、F-del、F0_DSCav1、F-del_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut0、F_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、又はF-del_DSCav1_mut8）をコードする少なくとも1つのRNAと、更に、脂質ナノ粒子（LNP）を含み、約50:10:38.5:1.5、好ましくは47.5:10:40.8:1.7、又はより好ましくは47.4:10:40.9:1.7（即ち、カチオン性脂質（好ましくは脂質III-3）、DSPC、コレステロール、及びPEG脂質の比率（mol%）（（好ましくはn=49の式（IVa）のPEG脂質）；エタノールに可溶）のモル比を有し、脂質ナノ粒子は、M、N、M2-1、又はPをコードする少なくとも1つのRNAを含む。

【0469】

特に好ましい実施形態では、第2の態様の組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）を含み、約50:10:38.5:1.5、好ましくは47.5:10:40.8:1.7、又はより好ましくは47.4:10:40.9:1.7（即ち、カチオン性脂質（好ましくは脂質III-3）、DSPC、コレステロール、及びPEG脂質の比率（mol%）（（好ましくはn=49の式（IVa）のPEG脂質）；エタノールに可溶）のモル比を有し、脂質ナノ粒子は、F（F0、F-del、F0_DSCav1、F-del_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut0、F_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut5、F_DSCav1_mut6、F-del_DSCav1_mut6、F_DSCav1_mut7、F-del_DSCav1_mut7、F_DSCav1_mut8、又はF-del_DSCav1_mut8）をコードする少なくとも1つのRNAと、M、N、M2-1、又はPをコードする少なくとも1つのRNAを含む。

【0470】

脂質ナノ粒子中のRNAの総量は変動することがあり、例えば、RNAの総脂質に対するw/w比などによって定義される。本発明の一実施形態では、人工RNAの総脂質に対する比は、0.06w/w未満、好ましくは0.03w/w~0.04w/wである。

【0471】

各種実施形態では、本明細書で定義されるLNPは、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

10

20

30

40

50

～約140nm、約90nm～約130nm、約90nm～約120nm、約90nm～約100nm、約70nm～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、又は約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、又は200nmの平均直径を有し、実質的に非毒性である。本明細書で使用する時、平均直径は、当技術分野で一般に知られている動的光散乱によって決定されるz平均で表すことができる。

【0472】

本発明の別の好ましい実施形態では、脂質ナノ粒子は、それぞれ約50nm～約300nm、又は約60nm～約250nm、約60nm～約150nm、又は約60nm～約120nmの範囲の流体力学的直径を有する。

【0473】

更なる実施形態によれば、第2の態様の組成物は、少なくとも1つのアジュバントを含むことができる。好適には、アジュバントは、好ましくは、組成物の免疫刺激性を増強するために添加される。

【0474】

本明細書に使用される「アジュバント」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、他の剤の効果（本明細書では、本発明の人工核酸の効果）を変える、例えば、増強する又は組成物の投与及び送達を支援するのに好適であり得る薬理学的及び／又は免疫学的な剤を意味することが意図される。「アジュバント」という用語は、広範囲の物質を意味する。通常、これらの物質は、抗原の免疫原性を高めることができる。例えば、アジュバントは、自然免疫系によって認識され得、そして例えば、自然免疫応答（即ち、非特異的免疫応答）を誘発することができる。「アジュバント」は、通常、適応免疫応答を誘導しない。本発明の文脈においては、アジュバントは、本明細書に定義される人工核酸又は本明細書に定義されるポリタンパク質によってもたらされる抗原性ペプチド又はタンパク質の効果を増強することができる。

【0475】

この文脈において、少なくとも1つのアジュバントは、当業者に知られ且つ本件に適した、即ち、対象、例えば、ヒト対象における免疫応答の誘導を支援するアジュバントから選択することができる。

【0476】

したがって、第2の態様の組成物は、少なくとも1つのアジュバントを含み得、少なくとも1つのアジュバントは、公開されたPCT出願国際公開第2016/203025号に記載される任意のアジュバントから好適に選択することができる。国際公開第2016/203025号の請求項2～17のいずれかに開示されたアジュバント、好ましくは国際公開第2016/203025号の請求項17に開示されたアジュバントが特に好適であり、それらに関する具体的内容を、参照により本明細書に援用する。

【0477】

第2の態様の組成物は、本明細書に特定される成分に加えて、更なる抗原（例えば、ペプチド又はタンパク質の形態で）又は更なる抗原コード核酸からなる群から選択することができる少なくとも1つの更なる成分；更なる免疫療剤；1以上の補助物質（サイトカイン、例えば、モノカイン、リンホカイン、インターロイキン、又はケモカインなど）；又は、ヒトToll様受容体に対する（リガンドとしての）その結合親和性のために免疫刺激性であることが知られている任意の更なる化合物；及び／又はアジュバント核酸、好ましくは免疫刺激性RNA（isRNA）、例えば、CpG-RNAなどを含むことができる。

【0478】

ポリペプチド及びポリペプチドを含む組成物

第3の態様において、本発明は、ポリペプチド、好ましくは抗原ポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは、第1の態様の人工RNAによってコードされるアミノ酸配列又はその断片を含む。

【0479】

いくつかの実施形態においては、前記ポリペプチドは、配列番号68、483、898、1267、1636、2005、2374、2743、3112、3481、3850、4219、4588、4957、5326、5695、6064、6433、6802、7171、7540、7909、11726、12095、12464、12833、13940、14309、14678、15047、15416、15785、13202、13571、16154、16523、16892、17261、17630、17999、18368、18737、19106、19475と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列、又はこれらのポリペプチドのいずれかのバリエーションを有する。

10

【0480】

好ましい実施形態においては、前記ポリペプチドは、配列番号1267、2005、2743、3481、4219、4957、5695、6433、7171、7909、12833、14309、15047、15785、13571、16523、17261、17999、18737、19475と同一である又は少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列、又はこれらのポリペプチドのいずれかのバリエーションを有する。

20

【0481】

第4の態様では、本発明は、第3の態様のポリペプチドを含む免疫原性組成物に関する。好ましい実施形態では、第4の態様の組成物は、本明細書で定義される少なくとも1つの薬学的に許容される担体を更に含むことができる。好ましい実施形態では、第4の態様の組成物は、第1の態様の少なくとも1つの人工RNA及び、任意に、第2の態様の少なくとも1つの更なる人工RNA、又は第2の態様のRNA組成物を更に含むことができる。

【0482】

なお、第2の態様の組成物又は第5の態様のワクチンに関する実施形態は、第4の態様の組成物の好適な実施形態として同様に理解することができる。

30

【0483】

ワクチン：

第5の態様において、本発明は、第1の態様のRNA及び、任意に、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、又は第4の態様の組成物を含むワクチンを提供する。

【0484】

なお、第2の態様の組成物又は第4の態様の組成物に関する実施形態は、第5の態様のワクチンの好適な実施形態として同様に理解することができる。また、第5の態様のワクチンに関する実施形態も、第2の態様の組成物（第1の態様のRNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAを含む）又は第4の態様の組成物（第3の態様のポリペプチドを含む）の好適な実施形態として同様に理解することができる。

40

【0485】

「ワクチン」という用語は、当業者によって認識及び理解され、例えば、少なくとも1つのエпитープ又は抗原、好ましくは免疫原を提供する予防又は治療物質であることが意図される。本発明の文脈において、抗原又は抗原機能は、第1の態様の本発明RNA（RSV Fタンパク質に由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードするコード配列を含むRNA）、第2の態様の組成物（第1の態様のRNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNA）、第3の態様のポリペプチド、又は第4の態様の組成物（前記ポリペプチドを含む）によってもたらされる。

【0486】

50

第5の態様の好ましい実施形態では、ワクチンは、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物（第1の態様のRNA及び、任意に、第2の態様の更なる人工RNAを含む）、第3の態様のポリペプチド、又は第4の態様の組成物を含み、前記RNA、第2の態様の前記組成物、前記ポリペプチド、又は第4の態様の前記組成物（前記ポリペプチドを含む）が、適応免疫応答を誘導する。

【0487】

特に好ましい実施形態では、ワクチンは、第1の態様のRNA又は第2の態様の組成物を含み、前記RNA又は前記組成物は、適応免疫応答、好ましくはRSVに対する適応免疫応答を誘導する。

【0488】

特に好ましい実施形態では、ワクチンは、第1の態様のRNA又は第2の態様の組成物を含み、前記RNA又は前記組成物は、T細胞免疫応答を誘導する。

【0489】

第5の態様の好ましい実施形態によれば、本明細書に定義されるワクチンは、第2の態様の文脈で特定された薬学的に許容される担体及び任意の少なくとも1つのアジュバントを更に含むことができる。

【0490】

この文脈において好適なアジュバントは、国際公開第2016/203025号の請求項17に開示されるアジュバントから選択することができる。

【0491】

好ましい実施形態では、ワクチンは、一価のワクチンである。

【0492】

いくつかの実施形態では、ワクチンは、文脈で定義される複数の又は少なくとも1より多い人工RNA及び、任意に、第2の態様の文脈で定義される少なくとも1より多い更なる人工RNAを含む多価ワクチンである。第2の態様の文脈で開示される多価組成物に関する実施形態は、第5の態様の多価ワクチンの好適な実施形態として同様に理解することができる。

【0493】

第5の態様のワクチンは、典型的には、第1の態様のRNAの安全且つ有効な量及び、任意に、第2の態様の更なるRNAを含む。本明細書に使用されるとき、「安全且つ有効な量」とは、RSVの感染に関連する疾患又は障害のポジティブな変化を有意に誘導するのに十分なRNAの量を意味する。同時に、「安全且つ有効な量」は、重篤な副作用を回避するのに十分少ない量である。本発明のワクチン又は組成物に関し、「安全且つ有効な量」という表現は、好ましくは、過剰又は損傷免疫反応が生じず、好ましくは測定可能レベルを下回るそのような免疫反応もないように適応免疫系を刺激するのに適したRNAの量を意味する。

【0494】

上で定義した組成物又はワクチンのRNAの「安全且つ有効な量」は、治療対象となる特定の状態、及び治療対象患者の年齢及び身体状態、状態の重篤度、治療期間、付随する治療の性質、使用される具体的な薬学的に許容される担体、及び同様の要因に関連して、主治医の知識と経験の範囲内で更に変化しよう。更に、RNA、組成物、ワクチンの「安全且つ有効な量」は、投与経路（皮内、筋肉内）、投与装置（ジェット注射、針注射、マイクロニードルパッチ）、及び／又は複合体形成（プロタミン複合体形成又はLNP封入）に依存し得る。更に、人工RNA、組成物、ワクチンの「安全且つ有効な量」は、治療対象（乳児、妊娠女性、免疫不全のヒト対象など）の状態に依存し得る。したがって、好適な「安全且つ有効な量」は、それに応じて適合させる必要があり、当業者によって選択及び決定される。

【0495】

ワクチンは、本発明にしたがって、ヒトの医療目的及び獣医学的目的（哺乳動物、脊椎動物、鳥類）のために、医薬組成物として、又はワクチンとして使用することができる。

【0496】

好ましい実施形態では、RNA、組成物（前記RNA及び、任意に、更なるRNAを含む）、ポリペプチド、組成物（前記ポリペプチドを含む）、又はワクチンは、凍結乾燥形態で提供される（例えば、国際公開第2016/165831号、国際公開第2011/069586号、国際公開第2016/184575号、又は国際公開第2016/184576号に記載される凍結乾燥法を使用する）。好ましくは、凍結乾燥されたRNA、凍結乾燥された組成物、凍結乾燥されたポリペプチド、ポリペプチドを含む凍結乾燥された組成物、又は凍結乾燥されたワクチンは、投与前に、有利には水性担体に基づく好適な緩衝液（例えば、Ringerラクトート溶液又はリン酸緩衝液など）中で再構成される。

【0497】

したがって、本明細書に使用される薬学的に許容される担体は、好ましくは、本発明ワクチンの液体又は非液体ベースを含む。本発明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；等張生理食塩水又は緩衝（水）溶液、例えば、リン酸、クエン酸などの緩衝液である。好ましくは、Ringerラクトート溶液が、国際公開第2006/122828号に記載されるように、本発明に係るワクチン又は組成物の液体ベースとして使用され、好適な緩衝液に関する開示を、参照により本明細書に援用する。

【0498】

本明細書に定義される薬学的に許容される担体の選択は、原則として、本発明に係る医薬組成物又はワクチンが投与される方法によって決定される。ワクチンは、例えば、全身的又は局所的に投与することができる。全身投与の経路には、一般に、例えば、経皮、経口、非経口経路を含み、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、及び腹腔内注射、及び／又は鼻腔内投与経路を含む。一般的な局所投与経路は、例えば、局所投与経路だけでなく、皮内、経皮、皮下、又は筋肉内注射、又は病変内、頭蓋内、肺内、心臓内、関節内、及び舌下注射も含む。より好ましくは、本発明に係る組成物又はワクチンは、皮内、皮下、又は筋肉内経路によって、好ましくは注射によって投与でき、これは無針及び／又は針注射であり得る。したがって、組成物／ワクチンは、好ましくは液体又は固体の形態に処方される。投与される本発明に係るワクチン又は組成物の好適な量は、動物モデルなどを用いる通常の実験によって決定することができる。そのようなモデルとしては、限定することを意図するものではないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラット、イヌ、及び非ヒト霊長類モデルが挙げられる。注射用の好ましい単位剤形は、水、生理食塩水、又はそれらの混合物の滅菌溶液を含む。そのような溶液のpHは、約7.4に調整する必要がある。注射に適した担体は、ヒドロゲル、制御放出又は遅延放出のためのデバイス、ポリ乳酸、及びコラーゲンマトリックスを含む。局所適用に適した薬学的に許容される担体には、ローション、クリーム、ゲルなどでの使用に適したものが含まれる。本発明組成物又はワクチンが経口投与される場合、錠剤、カプセルなどが好ましい単位剤形である。経口投与に使用することができる単位剤形を調製するための薬学的に許容される担体は、先行技術でよく知られている。それらの選択は、本発明の目的にとって重要ではないが、味、コスト、及び保存性などの副次的な事項に依存し、当業者であれば何ら困難性なく選択することができる。

【0499】

本明細書に定義される本発明ワクチン又は組成物は、免疫原性を更に増加させるために、上に定義した1以上の補助物質を更に含むことができる。本発明組成物に含まれる核酸と補助物質とは、前記したように本発明ワクチン又は組成物と共に製剤化されてもよい（又は別々に製剤化されてもよい）が、相乗作用がそれらによってもたらされることが好ましい。そのような免疫原性増加剤又は化合物は、別々に提供され（本発明のワクチン又は組成物と共に製剤化されるのではなく）、個別に投与してもよい。

【0500】

本発明ワクチン又は組成物に含まれ得る更なる添加剤は、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；味感付与剤、医薬担体；

10

20

30

40

50

錠剤形成剤；安定化剤；抗酸化剤；保存料である。

【0501】

キット又はキットオブパーツ、用途、医学用途、治療方法：

第6の態様において、本発明は、キット又はキットオブパーツを提供し、キット又はキットオブパーツは、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物（前記RNAを含む）、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物（前記ポリペプチドを含む）、及び／又は第5の態様のワクチン、任意に、可溶化のための液体ビヒクル、及び任意に、成分の用法用量に関する情報を提供する技術的説明書を含む。

【0502】

好ましい実施形態では、第6の態様のキットは、少なくとも以下の成分を含む。

a) 第1の態様の少なくとも1つのRNA、好ましくはRSV融合（F）タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードするRNA（好ましくは表5又は表6から選択されるRNA配列）であって、前記人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

b) M、N、M2-1、又はPから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つ、2つ、又は3つの更なる人工RNA（好ましくは表7Aから選択されるRNA配列）であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している、

ここで、成分a)及びb)は、別々の実体又は単一の実体として提供される。

【0503】

好ましい実施形態では、第6の態様のキットは、少なくとも以下の成分を含む。

a) 第1の態様の少なくとも1つのRNA、好ましくはRSV融合（F）タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードするRNA（好ましくは表5又は表6から選択されるRNA配列）であって、前記人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

b) Mから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つの更なる人工RNA（好ましくは表7A、列Aから選択されるRNA配列）であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

c) Pから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つの更なる人工RNA（好ましくは表7A、列Cから選択されるRNA配列）であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している、

ここで、成分a)、b)、及びc)は、別々の実体又は単一の実体として提供される。

【0504】

好ましい実施形態では、第6の態様のキットは、少なくとも以下の成分を含む。

a) 第1の態様の少なくとも1つのRNA、好ましくはRSV融合（F）タンパク質に由来する少なくとも1つの抗原性ペプチド又はタンパク質をコードするRNA（好ましくは表5又は表6から選択されるRNA配列）であって、前記人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

b) Mから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つの更なる人工RNA（好ましくは表7A、列Aから選択されるRNA配列）であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

c) Pから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つの更なる人工RNA（好ましくは表7A、列Cから選択されるRNA配列）であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している；及び

d) Pから選択されるRSVに由来する抗原性ペプチド又はタンパク質をコードする少なくとも1つの更なる人工RNA（好ましくは表7A、列Bから選択されるRNA配列）

10

20

30

40

50

であって、前記更なる人工RNAは、好ましくは1以上の脂質と複合体化されて、脂質ナノ粒子（LNP）を形成している、

ここで、成分a）、b）、c）、及びd）は、別々の実体又は単一の実体として提供される。

【0505】

キットは、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、及び／又は第5の態様のワクチンに関して記載される更なる成分を更に含むことができる。

【0506】

前記キットの技術的説明書は、用法用量及び患者群に関する情報を含み得る。そのようなキット、好ましくはキットオブパーツは、例えば、本明細書で言及される用途又は使用のいずれか、好ましくは第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、又は第5の態様のワクチンの、RSV又はそれに関連する障害によって引き起こされる感染又は疾患の治療又は予防のための使用に適用することができる。好ましくは、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、又は第5の態様のワクチンは、キットの別々のパーツで提供され、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、又は第5の態様のワクチンは、好ましくは凍結乾燥される。キットは、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、又は第5の態様のワクチンを可溶化するためのビヒクル（例えば、緩衝液など）を一部として更に含むことができる。

【0507】

好ましい実施形態では、本明細書に定義されるキット又はパーツオブパーツは、Ringeraラクトート溶液を含む。

【0508】

前記キットはいずれも、本明細書に定義される治療又は予防に使用することができる。より好ましくは、前記キットのいずれかは、ワクチン、好ましくは、本明細書に定義されるRSVによって引き起こされる感染に対するワクチンとして使用することができる。

【0509】

医学的使用：

更なる態様においては、本発明は、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット又はキットオブパーツの第1の医学的使用に関する。

【0510】

したがって、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット又はキットオブパーツは、医薬として使用のためのものである。

【0511】

本発明は更に、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツのいくつかの用途及び使用を提供する。

【0512】

特に、前記RNA、組成物（前記RNAを含む）、ポリペプチド、組成物（前記ポリペプチドを含む）、ワクチン、又はキット若しくはキットオブパーツは、ヒトの医療目的及び獣医学的目的、好ましくはヒトの医療目的に使用することができる。

【0513】

特に、前記RNA、組成物（前記RNAを含む）、ポリペプチド、組成物（前記ポリペプチドを含む）、ワクチン、又はキット若しくはキットオブパーツは、ヒトの医療目的の医薬として使用するためのものであることができ、前記RNA、組成物（前記RNAを含む）、ポリペプチド、組成物（前記ポリペプチドを含む）、ワクチン、又はキット若しくはキットオブパーツは、乳幼児、新生児、免疫不全のレシピエント、妊娠中及び授乳中の

女性、並びに高齢者に特に好適であり得る。

【0514】

更に別の態様において、本発明は、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツの第2の医学的使用に関する。

【0515】

したがって、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツは、病原体（例えば、ウイルスなど）による感染、特に、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）による感染症、又はそのような感染症に関連する障害の治療又は予防における使用のためのものである。

10

【0516】

特に、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツは、ヒト及び獣医学的目的、好ましくはヒトの医学的目的で、ウイルスによる感染症、特にRSVによる感染症、又はそのような感染症に関連する障害の治療又は予防に使用される。

【0517】

特に、前記RNA、組成物（前記RNAを含む）、ポリペプチド、組成物（前記ポリペプチドを含む）、ワクチン、又はキット若しくはキットオブパーツは、RSV感染症の治療又は予防における使用のために、乳幼児及び新生児、免疫不全のレシピエント、妊娠中及び授乳中の女性、並びに高齢者に特に好適であり得る。

20

【0518】

本明細書に使用されるとき、「RSV感染に関連する障害」は、好ましくは、RSV感染の典型的な症状又は合併症を含み得る。

【0519】

特に、第1の態様の人工RNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット又はキットオブパーツは、RSVによって引き起こされる感染症の予防的方法（曝露前予防又は曝露後予防）及び／又は治療的処置に使用することができる。

30

【0520】

本明細書に定義される組成物又はワクチンは、好ましくは局所的に投与され得る。特に、組成物又はワクチンは、皮内、皮下、鼻腔内、又は筋肉内経路によって投与することができる。したがって、本発明の本発明組成物又はワクチンは、好ましくは液体（又は、場合により固体）の形態で調製される。いくつかの実施形態においては、本発明ワクチンは、従来の針注射又は無針ジェット注射によって投与することができる。この文脈においては、RNA、組成物、ワクチンを、筋肉内針注射によって投与することが好ましい。

【0521】

本明細書に使用するとき、「ジェット注射」という用語は、無針注射法を意味し、例えば、第1の態様の少なくとも1つのRNAなどを含む流体（本発明のワクチン、組成物）を強制的にオリフィスに通して、哺乳動物の皮膚、及び注射のセッティングに応じて、皮下組織又は筋肉組織に透過することができる高圧の超微細液体流を生成させる。原理上は、液体流が皮膚を貫通し、そこを通過して液体流が標的組織に押し込まれる。好ましくは、ジェット注射は、本明細書に開示されるRNA、組成物、ワクチンの皮内、皮下、又は筋肉内注射に使用される。

40

【0522】

いくつかの実施形態では、本明細書に定義される組成物又はワクチンに含まれるRNAは、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5μg、10μg、15μg、20μg、25μg、30μg、35μg、

50

40 μ g、45 μ g、50 μ g、55 μ g、60 μ g、65 μ g、70 μ g、75 μ g、80 μ g、85 μ g、90 μ g、95 μ g、又は100 μ gの量で提供される。

【0523】

投与経路（皮内、筋肉内、鼻腔内）、投与装置（ジェット注射、針注射、マイクロニードルパッチ）、及び／又は複合体形成（好ましくはLNPカプセル化）に応じて、好適な量に適宜調整する必要があるが、これは当業者によって選択及び決定されよう。

【0524】

本明細書に定義される感染症の治療又は予防のための免疫感作プロトコル、即ち、RSVに対する対象の免疫感作は、典型的には、組成物又はワクチンの一連の単回用量又は複数回用量を含む。本明細書に使用される単回用量とは、初回／1回目用量、（免疫反応を「ブースト」するために好ましくは投与される）2回目用量、又は任意の更なる用量をそれぞれ意味する。

【0525】

一実施形態では、本明細書に定義される感染症の治療又は予防のための免疫感作プロトコル、即ち、RSVに対する対象の免疫化は、組成物又はワクチンの単回用量を含む。

【0526】

好ましい実施形態では、RSVによる感染の予防のための免疫感作プロトコルは、本明細書に定義される組成物又はワクチンの少なくとも1回の単回用量を含み、前記少なくとも1回の単回用量は、母体免疫のために妊娠女性に投与され、それにより、胎児の免疫化及び／又は前記少なくとも1回の単回用量が授乳中の女性に投与され、それにより授乳中の小児の受動免疫を達成する。

【0527】

上に定義した治療又は予防は、更なる活性医薬成分の投与を含むことができる。第1の態様の人工RNAに基づく本発明ワクチン又は組成物の場合、好ましくは、第3の態様のポリペプチドを、更なる活性医薬成分として共投与してもよい。

【0528】

例えば、本明細書に記載される少なくとも1つのRSVタンパク質又はペプチド、又はその断片若しくはバリエーションは、免疫応答を誘導又は増強するために共投与してもよい。更に、第1の態様の2つの異なる人工RNA及び、任意に、第2の態様の更なるRNAは、異なる時点で、好ましくはプライムブーストシナリオで投与することができる。これは、例えば、初回ワクチン接種として少なくとも1つのRSVポリペプチドを含む組成物、及び追加ワクチン接種として第1の態様の少なくとも1つの人工RNAを含む組成物／ワクチンを使用する。

【0529】

好適には、上に定義される治療又は予防は、更なる活性医薬成分の投与を含み、更なる活性医薬成分は、免疫グロブリン、好ましくはIgG、モノクローナル又はポリクローナル抗体、ポリクローナル血清又は複数の血清などから選択できる免疫療法剤であり得る。最も好ましくは、本明細書に定義されるRSVタンパク質又はペプチドに対する免疫グロブリンである。好ましくは、そのような更なる免疫療法剤は、ペプチド／タンパク質として提供されてもよく、又は核酸、好ましくはDNA又はRNA、より好ましくはmRNAによってコードされてもよい。このような免疫療法剤は、本発明人工RNA又は本発明ポリペプチドによって引き起こされる能動的ワクチン接種に加えて、受動的ワクチン接種を提供することを可能にする。

【0530】

治療及び使用の方法、診断方法、並びに使用：

別の態様において、本発明は、障害を治療又は予防する方法に関する。

【0531】

好ましい実施形態では、本発明は、障害を治療又は予防する方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しく

10

20

30

40

50

はキットオブパーツを適用又は投与することを含む。

【0532】

好ましい実施形態では、障害は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）による感染、又はそのような感染症に関連する障害である。

【0533】

好ましい実施形態においては、本発明は、障害を治療又は予防する方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチドを、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツを適用又は投与することを含み、前記必要とする対象が、好ましくは哺乳動物対象である。特に好ましい実施形態では、哺乳動物対象は、ヒト対象、特に、乳幼児、新生児、妊娠女性、授乳中の女性、高齢者、又は免疫不全のヒト対象である。

【0534】

特に、そのような方法は、好ましくは以下の工程を含むことができる：

- a) 第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツを準備する工程；
- b) 第1の態様の前記RNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツを組織又は生物に適用又は投与する工程；
- c) 任意に、RSVに対する免疫グロブリン（IgG）を投与する工程；
- d) 任意に、更なる物質（アジュバント、補助物質、更なる抗原）を投与する工程。

【0535】

更なる態様によれば、本発明はまた、RSVに由来する少なくとも1つのペプチド若しくはタンパク質、又はその断片若しくはバリエーションを含む少なくとも1つのポリペプチドの発現のための方法を提供し、前記方法は、好ましくは以下の工程を含む：

- a) 第1の態様のRNA又は第2の態様の組成物を準備する工程；及び
- b) 前記RNA又は組成物を発現系（細胞）、組織、生物に適用又は投与する工程。

【0536】

前記方法は、実験室、研究、診断、ペプチド又はタンパク質の商業的生産、及び／又は治療目的に適用することができる。前記方法は更に、特定の疾患の治療、特に感染症疾患、特にRSV感染症の治療において行うことができる。

【0537】

同様に、別の態様によれば、本発明はまた、第1の態様の人工RNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット若しくはキットオブパーツの、好ましくは診断又は治療目的、例えば、コードされたRSV抗原性ペプチド又はタンパク質の発現のため、例えば、前記RNA、前記RNAを含む組成物、前記RNAを含むワクチンを、例えば、無細胞発現系、細胞（例えば、発現宿主細胞又は体細胞）、組織、又は生物に適用又は投与することによる使用を提供する。具体的な実施形態では、前記RNA、前記RNAを含む組成物、前記RNAを含むワクチンを組織又は生物に適用又は投与した後に、例えば、誘導されたRSV F抗体、例えば、RSV F特異的（モノクローナル）抗体を取得する工程が行われる。

【0538】

前記使用は、（診断用）実験室、研究、診断、ペプチド、タンパク質、又はRSV抗体の商業的生産、及び／又は治療目的に適用することができる。前記使用は、インビトロ、インビボ、又はエクスピボで行うことができる。更に、前記使用は、特定の疾患の治療、特にRSV感染症又は関連障害の治療において行うことができる。

【0539】

特に好ましい実施形態においては、本発明は、医薬として使用、治療又は予防における使用、好ましくはRSV感染又は関連障害の治療又は予防、又はワクチンとして使用のた

10

20

30

40

50

めの第1の態様のRNA、第2の態様の組成物、第3の態様のポリペプチド、第4の態様の組成物、第5の態様のワクチン、又は第6の態様のキット又はキットオブパーツを提供する。

【0540】

リスト及び表の簡単な説明

- リスト1：好適なRSVウイルス株
- リスト2：好適なRSV融合（F）タンパク質のNCBIタンパク質アクセッション番号
- 表1：好ましいRSV Fタンパク質抗原デザイン
- 表2：各アミノ酸の使用頻度が示されたヒトコドン使用表
- 表3A：HRSV（A2）に由来する、RSV Fをコードする好ましいコード配列（列A～J） 10
- 表3B：HRSV（メンフィス－37）に由来する、RSV Fをコードする好ましいコード配列（列A～J）
- 表4A：HRSV（A2）に由来する、RSV Fをコードする好ましいコード配列（列K～V）
- 表4B：HRSV（メンフィス－37）に由来する、RSV Fをコードする好ましいコード配列（列K～V）
- 表5A：HRSV（A2）に由来する、RSV Fをコードする好ましいmRNA構築物（列A～J）
- 表5B：HRSV（メンフィス－37）に由来する、RSV Fをコードする好ましいmRNA構築物（列A～J） 20
- 表6A：HRSV（A2）に由来する、RSV Fをコードする好ましいmRNA構築物（列K～V）
- 表6B：HRSV（メンフィス－37）に由来する、RSV Fをコードする好ましいmRNA構築物（列K～V）
- 表7A：組成物又はワクチンの好ましい更なるコード配列及びmRNA構築物
- 表7B：RNA構築物の好適な組合せ
- 表8：式（III）に由来する代表的な脂質化合物
- 表9：本実施例で使用されるmRNA構築物（実施例セクションを参照）
- 表10：実施例2の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照） 30
- 表11：実施例3の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表12：実施例4のUTRの各種組合せのmRNA構造（実施例セクションを参照）
- 表13：実施例5の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表14：実施例6の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表15：実施例7の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表15：実施例7の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表16：実施例8に使用されるmRNA構築物の概要（実施例セクションを参照）
- 表17：実施例9の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表18：実施例10の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）
- 表19：実施例11に使用されるmRNA構築物の概要（実施例セクションを参照） 40
- 表20：実施例12の動物群とワクチン接種スケジュール（実施例セクションを参照）

【図面の簡単な説明】

【0541】

【図1】図1は、RSV F-タンパク質（F-del_DSCav1）をコードするLNP配合mRNAが、i.m. 及びi.d. ワクチン接種後のコットンラットの血清中に高いウイルス中和力価（VNT）を誘導することを示す。プロタミン配合mRNAによるワクチン接種は、弱い応答しか誘導しない。ワクチン接種スケジュールは、表10を参照されたい。更なる詳細は、実施例2に示す。

【図2】図2は、RSV F-タンパク質（F-del_DSCav1）をコードするLNP配合mRNAが、i.m. 及びi.d. ワクチン接種後のコットンラットの肺のRS

V感染を低減することを示す。ワクチン接種スケジュールは、表10を参照されたい。更なる詳細は、実施例2に示す。

【図3】図3は、実施例2で説明したRSVコットンラット接種試験の肺組織病理学的分析の結果を示す。LNP配合mRNAでワクチン接種された動物は、ホルマリン不活化RSVウイルスによるワクチン接種とは異なり、ウイルス接種後に肺組織病理／炎症の亢進を示さない。ワクチン接種スケジュールは、表10を参照されたい。更なる詳細は、実施例2に示す。

【図4】図4は、RSV Fタンパク質（F0、F-de l、及びF-de l__D S C a v 1）をコードするLNP配合mRNAが、2回のi.m. ワクチン接種後のコットンラットの血清中に高い（ウイルス中和力価）VNTを誘導することを示す。VNTの決定は、48日目に行った。ワクチン接種スケジュールは、表11を参照されたい。更なる詳細は、実施例3に記載する。

【図5】図5は、RSV Fタンパク質（F0、F-de l、及びF-de l__D S C a v 1）をコードするLNP製剤化mRNAが、コットンラットにおいてRSV-Fタンパク質に対する特異的な体液性免疫応答を誘導することを示す。実験は、実施例3に記載されるように行い、抗体の総IgG力価は、ELISAによって決定した。RSV-F（LNPに配合）及びRSV-F-de l（LNPに配合）ワクチンは、初回ウイルス接種後（28日目）に、生ウイルスよりも高い力価のRSV-F特異的IgGを誘導する。図5a：49日目に決定された抗体価；図5b及び5c：RSV Fタンパク質（F、F-de l、及びF-de l__D S C a v 1）をコードする10μgのmRNA（図5b）又は100μgのmRNA（図5c）を含む血清中の時間依存性IgG力価。ワクチン接種スケジュールは、表11を参照されたい。更なる詳細は、実施例3に示す。

【図6】図6は、RSV Fタンパク質（F0、F-de l、及びF-de l__D S C a v 1）をコードするLNP配合mRNAが、i.m. ワクチン接種後のコットンラットの肺のRSV感染を低減させることを示す。実験は、実施例3に記載されるように行った。mRNAワクチンでワクチン接種した動物群はいずれも、肺のウイルス力価に関し、ワクチン接種されたコットンラットの防御を示す検出レベルよりも低いウイルス力価を示した。mRNAワクチンと比較して、ホルマリン不活化ウイルスに基づくワクチンは、肺のウイルス力価を防ぐことができなかった。ワクチン接種スケジュールは、表11を参照されたい。更なる詳細は、実施例3に示す。

【図7】図7は、RSV Fタンパク質（F0、F-de l、及びF-de l__D S C a v 1）をコードするLNP配合mRNAが、i.m. ワクチン接種後のコットンラットの鼻のRSV力価を低下させることを示す。実験は、実施例3に記載されるように行った。mRNAワクチンでワクチン接種された動物群はいずれも、ウイルス接種感染実験で鼻組織のウイルス力価を大きく低下させたことを示す。mRNAワクチンと比較して、ホルマリン不活化ウイルスに基づくワクチンは、鼻のウイルス力価を低下させることはできなかった。ワクチン接種スケジュールは、表11を参照されたい。更なる詳細は、実施例3に示す。

【図8】図8は、実施例3に記載されたRSVコットンラット接種試験の肺組織病理学分析の結果を示す。LNP配合mRNAでワクチン接種された動物は、ホルマリン不活化RSVウイルスワクチンによるワクチン接種とは異なり、ウイルス接種後に肺組織病理／炎症の亢進を示さない。ワクチン接種スケジュールは、表11を参照されたい。更なる詳細は、実施例3に示す。

【図9】図9は、本発明に係るUTRの組合せが、インビトロでRSV Fタンパク質の発現を増大させることを示す。HEK 293T細胞は、リポフェクタミン配合した各種mRNA構築物でトランスフェクトした。これらはいずれも、融合前の安定化されたトランケートされたRSV-F（F-de l__D S C a v 1）をコードする同一コード配列を含むが、5'及び3'-UTRの異なる組合せを用いている（表12を参照）。RSV-F発現をフローサイトメトリーで分析した。値は、検出されたRSV-Fシグナルの%を示す。参照mRNA構築物（UTRの組合せRPL32／ALB7）の発現を100%に

して規格化した。注射用水（WFI）を対照とした。N = 2。更なる詳細は、実施例 4 に示す。

【図 10】図 10 は、使用した mRNA が、RSV F タンパク質をコードする構築物（図 10 a : F0、F-del、F0_DSCav1、F-del_DSCav1、F_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut3、図 10 b : F0、F-del、F0_DSCav1、F-del_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut0、F_DSCav1_mut4、F-del_DSCav1_mut4、F_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut5）は、細胞内 RSV F タンパク質発現及び細胞表面の検出可能なタンパク質発現をもたらしたことを示す。更なる詳細は、表 16 と実施例 8 に示す。

10

【図 11】図 11 は、各種 RSV F タンパク質（F0、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）をコードする RSV F タンパク質をコードする試験した LNP 配合 mRNA がいずれも、RSV-F タンパク質に対するコottonラットの体液性免疫応答を誘導する。抗体の総 IgG 力価を ELISA で決定した。ワクチン接種スケジュールは、表 17 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 9 に示す。

20

【図 12】図 12 は、LNP 配合 RSV-F（F0、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）mRNA ワクチンがいずれも、高いウイルス中和抗体力価により示されるように、コottonラットにおける RSV 特異的機能性抗体の形成を誘導した。ワクチン接種スケジュールは、表 17 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 9 に示す。

【図 13】図 13 は、RSV コottonラット接種試験からの肺組織病理学的分析を示す。ホルマリン不活化 RSV ワクチンを使用してワクチン接種した群の場合と同様に、mRNA ワクチン接種群はいずれも、肺病変の亢進を示さなかった。ワクチン接種スケジュールは、表 17 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 9 に示す。

30

【図 14】図 14 は、RSV ウイルスを接種したコottonラットにおける肺のウイルス力価（図 14 a）及び鼻のウイルス力価（図 14 b）の分析結果を示す。ワクチン接種スケジュールは、表 17 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 9 に示す。

【図 15】図 15 は、各種 RSV F タンパク質（F-del、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）をコードする試験した LNP 配合 mRNA 構築物がいずれも、コottonラットにおいて RSV-F タンパク質に対する体液性免疫応答を誘導することを示す。抗体の総 IgG 力価を ELISA で決定した。ワクチン接種スケジュールは、表 18 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 10 に示す。

40

【図 16】図 16 は、LNP 配合 RSV-F（F-del、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）mRNA ワクチンがいずれも、高いウイルス中和抗体価によって示されるように、コottonラットにおいて RSV 特異的機能性抗体の形成を誘導したことを示す。融合前安定化のための LNP 配合構築物は、F-del よりも高い又は同等の応答を誘導する。ワクチン接種スケジュールは、表 18 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 10 に示す。

【図 17】図 17 は、RSV コottonラット接種試験の肺組織病理学的分析を示す。ホルマリン不活化 RSV ワクチンを使用してワクチン接種した群の場合と同様に、mRNA ワクチン接種群はいずれも、肺病変の亢進を示さなかった。ワクチン接種スケジュールは、

50

表 18 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 10 に示す。

【図 18】図 18 は、RSV ウイルスを接種したコットラットにおける肺のウイルス力価（図 18 a）及び鼻のウイルス力価（図 18 b）の分析結果を示す。ワクチン接種スケジュールは、表 18 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 10 に示す。

【図 19】図 19 は、RSV 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、及び マトリックスタンパク質 M2-1 タンパク質をコードする使用した mRNA 構築物が、ウサギ網状赤血球溶解物システムを使用して検出可能なタンパク質発現をもたらしたことを示す。更なる詳細は、表 19 と実施例 11 に示す。

【図 20】図 20 は、マウスにおける免疫原性試験（ELISA）の結果を示す。体液性免疫応答は、図 20 a：抗 RSV F IgG 及び図 20 b：抗 RSV F IgG2a に見ることができる。全ての群が体液性免疫応答を誘導した。一般に、IgG2a の力価は、IgG1 の力価よりも 10 倍高く、Th1 応答が主であることを示す。ワクチン接種スケジュールは、表 20 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 12 に示す。

【図 21】図 21 は、特定の抗原 IgG が免疫化マウスの血清で検出されたことを示し、適用された mRNA 構築物が特異的な体液性免疫応答を誘導するのに適していることを示す。ワクチン接種スケジュールは、表 20 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 12 に示す。

【図 22】図 22 は、LNP 配合 mRNA ワクチン（F、M+F、P+F、N+F、M2-1+F）がいずれも、高いウイルス中和抗体力価により示されるように、RSV 特異的な機能性抗体の生成を誘導したことを示す。ワクチン接種スケジュールは、表 20 を参照されたい。更なる詳細は、実施例 12 に示す。

【図 23】図 23 は、RSV F、RSV M2-1、又はその両方を含むワクチンがいずれも、驚くべきことに、筋肉内免疫感作時に肺に組織常駐記憶 T 細胞（TRM）応答を誘導したことを示す（図 23 a）。脾細胞分析により、RSV F、特に RSV M2-1 による免疫感作により、IFN- γ と TNF を分泌する抗原特異的 CD8+ 及び CD4+ T 細胞が増加をもたらした、部位特異的応答に加えて全身 T 細胞応答の誘導を示すことが分かった（図 23 b 及び図 23 c）。

【実施例】

【0542】

以下において、本発明の様々な実施形態及び態様を示す特定の実施例例が示される。しかしながら、本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではない。以下の調製物及び実施例は、当業者が本発明をより明確に理解し、実施することを可能にするために与えられる。しかしながら、本発明は、本発明の一態様の例示のみが意図された例示的な実施形態によって範囲が限定されることはなく、機能的に同等である方法は本発明の範囲内である。実際に、本明細書に記載されているものに加えて、本発明の様々な変更は、前述の説明、添付の図面、及び以下の実施例から当業者に容易に明らかになる。このような変更はいずれも、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【0543】

実施例 1：インビトロ及びインビボ実験のための DNA 及び mRNA 構築物及び組成物の調製

本実施例は、本発明の人工 RNA を得る方法、及び本発明の組成物又はワクチンを生成する方法を提供する。

【0544】

1. 1. DNA 及び mRNA 構築物の調製：

本実施例では、異なる RSV F タンパク質（例えば、F0、F-del、F-del__DSCav1、F-del__DSCav1__mut5 など）をコードする DNA 配列を調製し、その後の RNA インビトロ転写反応に使用した。前記 DNA 配列は、安定化のために G/C 最適化コード配列（例えば、「cds opt1」）を導入することにより野生型コード DNA 配列を改変することによって調製した。PSMB3、ALB7、 α -グロビン、CASP1、COX6B1、GNAS、NDUFA1、及び RPS9 から選択さ

れる遺伝子の3'-UTRに由来する3'-UTR配列及びHSD17B4、RPL32、ASAHI1、ATP5A1、MP68、NDUFA4、NOSIP、RPL31、SLC7A3、TUBB4B、及びUBQLN2から選択される遺伝子の5'-UTR配列を安定化させることと、更に、一続きのアデノシン（例えば、64A又はA100）及びヒストンステムループ（hSL）構造、並びに任意に、表9に記載される30個の一続きのシトシン（例えば、C30）を含むように、pUC19由来ベクターに配列を導入した。

【0545】

得られたプラスミドDNA構築物は、当技術分野で知られる一般的プロトコルを使用して、細菌内で形質転換及び増殖させた。最終的に、プラスミドDNA構築物を抽出、精製し、後続のRNAインビトロ転写に使用した（セクション1.2を参照）。

10

【0546】

或いは、パラグラフ1にしたがって調製したDNAプラスミドを、PCRベースの増幅用のDNAテンプレートとして使用する。最終的に、生成されたPCR産物を精製し、後続のRNAインビトロ転写に使用する（セクション1.3を参照）。

【0547】

1.2. プラスミドDNAテンプレートからのRNAインビトロ転写：

パラグラフ1.1にしたがって調製したDNAプラスミドを、EcoRI又はSapIを使用して酵素的に線状化し、好適なバッファー条件下にて、ヌクレオチド混合物（ATP/GTP/CTP/UTP）とキャップアナログ（例えば、m7GpppG、m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeA）pG、又はm7G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）pG）の存在下でT7 RNAポリメラーゼを使用するDNA依存性RNAインビトロ転写に使用した。得られたmRNA構築物をRP-HPLC（Pure Messenger（登録商標）、CureVac AG、チュービンゲン、独国；国際公開第2008/077592号）を使用して精製し、インビトロ及びインビボ実験に使用した。臨床開発用のRNA（実施例6を参照）は、DNA及びRNAレベルで様々な品質管理手順を実行する、例えば、国際公開第2016/180430号にしたがう現行の適正製造基準の下で製造する。生成したRNA配列／構築物を表9に示し、コード化されたFタンパク質及びそこに示される各UTRエレメントと共に示す。表9に示す情報に加えて、特定のmRNA構築物の配列番号に関する更なる情報が、ST.25配列表に与えられる<223>識別子の下に記載される情報からも得られる。

30

【0548】

或いは、好適なバッファー条件下にて、修飾ヌクレオチド混合物（ATP、GTP、CTP、N（1）-メチルシュードウリジン（m1Ψ）又はシュードウリジン（Ψ））とキャップアナログ（m7GpppG、m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeA）pG、又はm7G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）pG）の存在下でRNAポリメラーゼを使用するDNA依存性RNAインビトロ転写に、EcoRI又はSapIで線状化したDNAを使用する。得られたm1Ψ又はΨ修飾mRNAは、RP-HPLC（Pure Messenger（登録商標）、CureVac、チュービンゲン、独国；国際公開第2008/077592号）を使用して精製し、更なる実験に用いる。

【0549】

40

一部のmRNA構築物は、キャップアナログの非存在下でインビトロ転写する。キャップ構造（cap1）は、当技術分野で一般に知られているキャッピング酵素を使用して酵素的に付加される。即ち、インビトロ転写されたmRNAは、2'-O-メチルトランスフェラーゼを含むm7Gキャッピングキットを使用してキャッピングし、cap1でキャッピングされたmRNAを得る。Cap1-キャッピングmRNAは、RP-HPLC（Pure Messenger（登録商標）、CureVac、チュービンゲン、独国；国際公開第2008/077592号）を使用して精製し、更なる実験に用いる。

【0550】

1.3. PCR増幅DNAテンプレートからのRNAインビトロ転写：

パラグラフ1.1にしたがって調製した精製済みPCR増幅DNAテンプレートを、好

50

適なバッファー条件下にて、ヌクレオチド混合物（ATP／GTP／CTP／UTP）とキャップアナログ（m7GpppG）の存在下でDNA依存性T7RNAポリメラーゼを使用してインビトロ転写する。或いは、PCR増幅したDNAは、好適なバッファー条件下にて、修飾ヌクレオチド混合物（ATP、GTP、CTP、N（1）-メチルシュードウリジン（m1Ψ））とキャップアナログ（m7GpppG）の存在下でDNA依存性T7RNAポリメラーゼを使用してインビトロ転写する。一部のmRNA構築物は、キャップ類似体の非存在下でインビトロ転写し、キャップ構造（cap1）は、当技術分野で一般に知られているキャッピング酵素、例えば、2'-O-メチルトランスフェラーゼを含むm7Gキャッピングキットを使用して酵素的に付加される。得られたmRNAは、例えば、RP-HPLC（Pure Messenger（登録商標）、CureVac、チュービンゲン、独国；国際公開第2008／077592号）を使用して精製し、インビトロ及びインビボ実験に用いる。

【0551】

表9：本実施例で用いられるmRNA構築物

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

RNA ID	抗原名	5'-UTR/3'-UTR; UTR 設計	3'-末端 エレメント (3'-末端)	配列 番号 RNA	配列 番号 タンパク質
R6939/ R7003	F0	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	475	68
R3737/ R3938	F0	RPL32/ALB7; i-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	466	68
R6940	F-del	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	890	483
R3738/ R3939	F-del	RPL32/ALB7; i-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	881	483
R6808	F0_DSCav1	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1259	898
R5453	F-del_DSCav1	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1628	1267
R6122	F-del_DSCav1	RPL32/ALB7; i-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1620	1267
R4745/ R5717	F-del_DSCav1	HSD17B4/ALB7; i-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	8278	1267
R6771	F_DSCav1_mut1	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1997	1636
R6774	F-del_DSCav1_mut1	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	2366	2005
R6772	F_DSCav1_mut2	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	2735	2374
R6773	F-del_DSCav1_mut2	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	3104	2743
R6770	F_DSCav1_mut3	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	3473	3112
R6775	F-del_DSCav1_mut3	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	3842	3481
	F-del_DSCav1	HSD17B4/PSMB3; a-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1276	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/PSMB3; a-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1284	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/PSMB3; a-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1292	1267
	F-del_DSCav1	Nosip/PSMB3; a-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1300	1267
	F-del_DSCav1	Mp68/PSMB3; a-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1308	1267
	F-del_DSCav1	Ubqln2/RPS9; b-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1316	1267
	F-del_DSCav1	ASAHI1/RPS9; b-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1324	1267
	F-del_DSCav1	HSD17B4/RPS9; b-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1332	1267
	F-del_DSCav1	HSD17B4/CASP1; b-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1340	1267
	F-del_DSCav1	Nosip/COX6B1; b-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1348	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/RPS9; c-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1356	1267
	F-del_DSCav1	Nosip/Ndufa1; c-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1364	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/COX6B1; c-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1372	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/Ndufa1; c-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1380	1267
	F-del_DSCav1	ATP5A1/PSMB3; c-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1388	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/PSMB3; d-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1396	1267
	F-del_DSCav1	ATP5A1/CASP1; d-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1404	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/Gnas; d-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1412	1267
	F-del_DSCav1	HSD17B4/Ndufa1; d-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1420	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/Ndufa1; d-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1428	1267
	F-del_DSCav1	TUBB4B/RPS9; e-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1436	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/RPS9; e-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1444	1267
	F-del_DSCav1	Mp68/RPS9; e-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1452	1267
	F-del_DSCav1	Nosip/RPS9; e-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1460	1267
	F-del_DSCav1	ATP5A1/RPS9; e-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1468	1267

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

	F-del_DSCav1	ATP5A1/COX6B1; e-6	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1476	1267
	F-del_DSCav1	ATP5A1/Gnas; f-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1484	1267
	F-del_DSCav1	ATP5A1/Ndufa1; f-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1492	1267
	F-del_DSCav1	HSD17B4/COX6B1; f-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1500	1267
	F-del_DSCav1	HSD17B4/Gnas; f-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1508	1267
	F-del_DSCav1	Mp68/COX6B1; f-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1516	1267
	F-del_DSCav1	Mp68/Ndufa1; g-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1524	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/CASP1; g-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1532	1267
	F-del_DSCav1	Ndufa4/Gnas; g-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1540	1267
	F-del_DSCav1	Nosip/CASP1; g-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1548	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/CASP1; g-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1556	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/COX6B1; h-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1564	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/Gnas; h-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1572	1267
	F-del_DSCav1	Rpl31/Ndufa1; h-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1580	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/CASP1; h-4	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1588	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/COX6B1; h-5	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1596	1267
	F-del_DSCav1	Slc7a3/RPS9; i-1	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1604	1267
	F-del_DSCav1	RPL32(32L4)/ALB7; i-2	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	1612	1267
R7454	F_DSCav1_mut0	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	4211	3850
R7455	F-del_DSCav1_mut0	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	4580	4219
R7458	F_DSCav1_mut4	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	4949	4588
R7459	F-del_DSCav1_mut4	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	5318	4957
R7456	F_DSCav1_mut5	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	5687	5326
R7457	F-del_DSCav1_mut5	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	6056	5695
	F_DSCav1_mut6	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	6425	6064
	F-del_DSCav1_mut6	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	6794	6433
	F_DSCav1_mut7	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	7163	6802
	F-del_DSCav1_mut7	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	7532	7171
	F_DSCav1_mut8	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	7901	7540
	F-del_DSCav1_mut8	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	8270	7909
R7595	M	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	10046	9684
R7597	N	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	10496	10134
R7598	M2-1	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	11545	11183
R7596	P	-/muag; i-3	A64-N5-C30-ヒストン SL-N5	10999	10637

【 0 5 5 2 】

1. 4. LNP 配合 mRNA 組成物の調製：

脂質ナノ粒子（LNP）、カチオン性脂質、及びポリマーコンジュゲート脂質（PEG-脂質）は、国際公開第 2015/199952 号、国際公開第 2017/004143 号、及び国際公開第 2017/075531 号（これらの開示内容全体を参照により本明細書に援用する）に記載される一般的な手順に本質的にしたがって調製及び試験した。LNP 配合 mRNA は、イオン化可能なアミノ脂質（カチオン性脂質）、リン脂質、コレステロール、及び PEG 化脂質を使用して調製した。簡単に説明すれば、式 III-3 のカチオン性脂質化合物、DSPC、コレステロール、及び式 IVa の PEG 脂質を、約 50 : 10 : 38.5 : 1.5 又は 47.4 : 10 : 40.9 : 1.7 のモル比（%）でエタノールに可溶化した。式 III-3 のカチオン性脂質化合物及び式 IVa の PEG-脂質化合物を含む LNP は、mRNA の全脂質に対する比が 0.03 ~ 0.04 w/w で調製した。mRNA は、pH 4 の 10 mM ~ 50 mM のクエン酸緩衝液中に、0.05 mg /

mL～0.2mg/mLに希釈した。シリンジポンプを使用して、エタノール脂質溶液をmRNA水溶液と約1:5～1:3 (vol/vol) の比で混合し、総流量は15 mL/min超とした。次いで、エタノールを除去し、透析により外部緩衝液を、スクロースを含むPBS緩衝液で置換した。最後に、脂質ナノ粒子を0.2 μmポアの滅菌フィルタで濾過し、LNP配合mRNA組成物を約1mg/mLの総mRNAに調整した。脂質ナノ粒子の粒径は、Malvern Zetasizer Nano (Malvern、UK) を使用した準弾性光散乱によって測定すると、60～90 nmであった。本明細書に言及される他のカチオン性脂質化合物について、製剤化プロセスは本質的に同様である。得られたLNP配合mRNA組成物 (1mg/mL (全mRNA)) を、生理食塩水を使用して所望の目的濃度に希釈してから、インビボで適用した。

10

【0553】

1.5. プロタミン複合体化mRNA組成物の調製：

mRNA構築物は、インビボ免疫感作実験での使用に先立ち、プロタミンと複合体を形成させた。mRNA製剤は、50%遊離mRNAと、2:1の重量比でプロタミンと複合体化した50%mRNAとの混合物からなった。まず、mRNAを、プロタミン-Ringer乳酸溶液をmRNAに添加することによりプロタミンと複合体化させた。10分間のインキュベーションの後、安定な複合体が生成されたら、遊離mRNAを添加し、最終濃度をRingerラクトート溶液で調整した。

【0554】

実施例2：RSV-FをコードするLNP配合mRNAを用いたコットンラットのワクチン接種及びRSVコットンラット接種試験

20

本実施例は、RSV-FをコードするLNP配合mRNAが、コットンラットにおいて強力かつ機能的な免疫応答を誘導することを示す。

【0555】

RSVワクチンの開発において、コットンラットは、特に接種感染において、認められている動物モデルである。ホルマリン不活化RSVウイルスワクチン製剤を投与したコットンラットは、RSV感染に対する応答として、肺の病理亢進を示す。これは、亢進した疾患現象の点で、ワクチン接種の安全性評価を可能にする。

【0556】

RSV特異的免疫応答を最適化するために、融合前安定化RSV Fタンパク質F-de l_DSCavをコードするmRNAワクチンを、実施例1にしたがって調製し、LNP (実施例1.4を参照) 又はプロタミン (実施例1.5を参照) のいずれかと配合して、表10に示すように、0日目と28日目に異なる用量のRNAを筋肉内 (i.m.) 又は皮内 (i.d.) に適用した。対照動物は、105 pfu生RSV/A2ウイルスを鼻腔内に0日目に1回ワクチン接種する、又はホルマリン不活化RSVウイルス (FIERSV) を筋肉内に、0日目と28日目の2回ワクチン接種した。別の対照動物には緩衝液のみを投与した。本実施例では、UTRの組合せHSD17B4/ALB7を使用し、本明細書では、これを「i-4」と呼ぶ。

30

【0557】

表10：実施例2の動物群及びワクチン接種スケジュール

40

【表 10】

群	コottonラット	処理	mRNA	用量	経路	体積
1	5	mRNA/LNP	R4745	10μg	i.m.	1x100uL
2	5	mRNA/LNP	R4745	2μg	i.m.	1x100uL
3	5	mRNA/LNP	R4745	10μg	i.d.	2x50uL
4	5	mRNA/LNP	R4745	2μg	i.d.	2x50uL
5	5	mRNA/プロタミン	R5717	80μg	i.m.	1x100uL
6	5	mRNA/プロタミン	R5717	80μg	i.d.	2x50uL
7	5	生 RSV/A2 ウイルス		105 pfu	i.n.	1x100uL
8	5	FI-RSV		1:100	i.m.	1x100uL
9	5	緩衝液		-	i.m.	1x100uL
10	5	未処理/未感染		-	-	

10

【0558】

ウイルス中和力価の決定：

49日目に血清を採取し、ブランク減少中和試験（PRNT）を使用してRSVウイルス中和力価（VNT）を測定した。希釈した血清サンプルをRSV/A2と共に室温で1時間インキュベートし、24ウェルプレートのコンフルエントなHEp-2の単層上に2連で接種しました。5%CO₂インキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定、染色した。対応する相互中和抗体力価（reciprocal neutralizing antibody titers）は、ウイルス対照の60%減少エンドポイントで決定した。

20

【0559】

コottonラット接種試験：

ワクチン接種した動物に、63日目に、100μL中の105pfuの生RSV/A2ウイルスを鼻腔内接種した。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態とした（群10）。68日目に全動物を殺し、鼻組織及び肺を採取した。

【0560】

接種したコottonラットの肺におけるRSV力価：

動物の肺を68日目（即ち、105pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、RSV/A2力価をブランクアッセイによって1つの肺葉で定量した。肺ホモジネートを遠心分離により清澄化し、EMEMで希釈した。コンフルエントなHEp-2単層を、24ウェルプレート中、希釈ホモジネートで2連で感染させた。5%CO₂インキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定し、0.1%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、リンスして風乾した。ブランクをカウントし、ウイルス力価を組織1グラム当たりのブランク形成単位として表した。ウイルス力価は、所定時点における群内の全動物の幾何平均±標準誤差として計算した。

30

40

【0561】

接種したコottonラットの肺組織病理：

動物の肺を68日目（即ち、105pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、1つの肺葉を組織病理学的に分析した。肺を解剖し、10%中性緩衝ホルマリンで通常の容量まで膨潤させた後、同一の固定溶液に浸漬した。固定後、肺をパラフィンに包埋し、切片状にし、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）で染色した。肺の炎症の4つのパラメーターを評価した。即ち、細気管支周囲炎（細気管支周囲の炎症性細胞浸潤）、血管周囲炎（小血管周囲の炎症性細胞浸潤）、間質性肺炎（炎症性細胞浸潤と肺胞壁の肥厚）、及び肺肺炎（肺胞空間内の細胞）。スライドは、0～4の重篤度ス

50

ケールで盲目的にスコア化した。その後、スコアを0～100%の組織病理学的スケールに変換した。

【0562】

結果：

図1から分かるように、LNP配合RSV-F (F-del_DSCav1) mRNA ワクチンは、高いウイルス中和抗体価（群1～4）により示されるように、コットンラットにおいてRSV特異的機能抗体の形成を誘導する。プロタミン配合mRNAによるワクチン接種は、弱い応答しか誘導しない。

【0563】

図2から分かるように、LNP配合RSV-F (F-del_DSCav1) mRNA ワクチンは、RSVウイルスを接種したコットンラットの肺ウイルス力価を低下させ、肺のRSV感染を制限する（群1～4）。LNPワクチンに配合したmRNAでワクチン接種し動物群はいずれも、実施したウイルス滴定の検出レベルを下回るウイルス力価を示し、このことは、ウイルス肺力価に関し、ワクチン接種されたコットンラットの防御を示している。対照的に、プロタミン配合mRNAワクチン（i.m.投与）とホルマリン不活化ウイルスワクチンは、緩衝液対照群と比較して、肺ウイルス力価を最小限に低下させるに留まった。

【0564】

図3から分かるように、RSVコットンラット接種試験の肺組織病理学的分析は、各種動物群の様々な病理学スコアを示す。組織病理学から、ホルマリン不活化RSVワクチンを使用してワクチン接種した群の場合と同様に、mRNAワクチン接種群はいずれも肺病変の亢進を示さなかったと結論付けることができる。細気管支周囲炎、血管周囲炎、間質性肺炎、及び肺炎の平均病理学スコアは、ホルマリン不活化RSV接種群（群8）と比較して、mRNAによるワクチン接種をした全て群（群1～6）の場合に、遥かに低くなっている。

【0565】

実施例3：RSV-FをコードするLNP配合mRNAを用いたコットンラットのワクチン接種及びRSVコットンラット接種試験

本実施例は、各種RSV-F抗原をコードするLNP配合mRNAが、UTR組合せRPL32/ALB7を有するmRNA構築物（i-2）の場合に、コットンラットにおいて強力且つ機能的な免疫応答を誘導することを示す。

【0566】

この実験では、3種の異なるRSV-Fバリエーション、即ち、完全長RSV F0、トランケートされたRSV F-del、及び融合前の安定化されトランケートされたF-del_DSCav1をコードするmRNA-LNPを比較した。mRNA-LNPワクチンは実施例1にしたがって調製した。コットンラットは、0日目と28日目にmRNA-LNPワクチンによる2回の筋肉内ワクチンを投与した。各用量は、10μg又は100μgのmRNA-LNPを含んだ。対照動物には、0日目に105pfuの生RSV/A2ウイルスを鼻腔内に1回、又は0日目と28日目にホルマリン不活化RSVウイルス（FI RSV）を筋肉内に2回投与した。別の対照動物には緩衝液のみを投与した（表11を参照）。

【0567】

表11：実施例3の動物群及びワクチン接種スケジュール

10

20

30

40

50

【表 1 1】

群	試験項目	RNA ID	用量	経路
1	F0 コード mRNA LNP-配合	R3737	10μg	i.m.
2	F0 コード mRNA LNP-配合	R3737	100μg	i.m.
3	F-del コード mRNA LNP-配合	R3738	10μg	i.m.
4	F-del コード mRNA LNP-配合	R3738	100μg	i.m.
5	F-delDSCav1 コード mRNA LNP-配合	R6122	10μg	i.m.
6	F-delDSCav1 コード mRNA LNP-配合	R6122	100μg	i.m.
7	生 RSV/A2 ウイルス		105 pfu	i.n.
8	FIRSV		1:100	i.m.
9	緩衝液		-	i.m.
10	未処理/未感染		-	-

【0568】

ELISAによる抗RSV Fタンパク質抗体の決定：

抗RSV F抗体力価を決定するために、28日目、49日目、63日目に血液サンプルを採取した。ELISAプレートは、組換えヒトRSV融合糖タンパク質（C末端のポリヒスチジンタグと融合したヒトRSV融合糖タンパク質（529）の細胞外ドメイン、凍結乾燥粉末として提供されるバキュロウイルス昆虫細胞で発現）でコーティングする。コーティングしたプレートは、所定の血清希釈液を使用してインキュベートする。Fタンパク質への特異的抗体の結合は、ABTS基質と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）を組み合わせたビオチン化アイソタイプ特異的抗マウス抗体を使用して検出する。

【0569】

ウイルス中和力価の決定：

49日目に血清を採取し、プラーク減少中和試験（PRNT）を使用してRSVウイルス中和力価（VNT）を測定した。希釈した血清サンプルをRSV/A2と室温で1時間インキュベートし、24ウェルプレート中のコンフルエントなHEp-2単層に2連で接種した。5%CO₂インキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定、染色した。対応する相互中和抗体力価は、ウイルス対照の60%減少エンドポイントで決定した。

【0570】

コットンラット接種試験：

ワクチン接種した動物に、63日目に、100μL中の105 pfuの生RSV/A2ウイルスを鼻腔内接種した。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態とした。68日目に全動物を殺し、鼻組織及び肺を採取した。

【0571】

接種したコットンラットの肺におけるRSV力価：

動物の肺を68日目（即ち、10⁵ pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、RSV/A2力価を、前記したようにプラークアッセイによって1つの肺葉で定量した。

【0572】

接種したコットンラットの鼻組織におけるRSV力価：

動物の鼻組織を68日目（即ち、 10^5 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取した。鼻ホモジネートを肺ホモジネートと同様に遠心分離により清澄化し、EMEMで希釈した。コンフルエントなHEp-2単層に、24ウェルプレート中、希釈ホモジネートで2連で感染させた。5%COインキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定し、0.1%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、リンスして風乾した。プラークをカウントし、ウイルス力価を組織1グラム当たりのプラーク形成単位として表した。ウイルス力価は、所定時点における群内の全動物の幾何平均±標準誤差として計算した。

10

【0573】

接種したコットンラットの肺組織病理：

動物の肺を68日目（即ち、 10^5 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、1つの肺葉を、前記したように組織病理学的に分析した。

【0574】

結果：

図4から分かるように、LNP配合RSV-F（F0、F-del、F-del_DSCav1）mRNAワクチンはいずれも、高いウイルス中和抗体価によって示されるように、コットンラットにおいてRSV特異的機能抗体の生成を誘導した。

【0575】

20

図5a、図5b、及び図5cは、RSV Fタンパク質（F0、F-del、及びF-del_DSCav1）をコードするLNP配合mRNAが、コットンラットにおいて、RSV-Fタンパク質に対する体液性免疫応答を誘導することを示す。抗体の総IgG力価をELISAで決定した。図5a：49日目に決定された抗体価。図5b及び図5c：RSV Fタンパク質（F、F-del、及びF-del_DSCav1）をコードする10µgのmRNA（図5b）又は100µgのmRNA（図5c）を含む血清中の時間依存性IgG力価。いずれの用量、即ち、10µg及び100µgの場合にも、F0及びF-delワクチンは、生ウイルスによるワクチン接種と比較して、初回ワクチン接種後（28日目）既に、RSV-F特異的IgGをより高い力価で誘導する。追加ワクチン接種後、試験したLNP配合RSV-F（F0、F-del、F-del_DSCav1）mRNAワクチンはいずれも、ELISAで測定される液性免疫応答を誘導し、これは、対照ワクチン接種の応答よりも顕著である。

30

【0576】

図6から分かるように、LNP配合RSV-F（F0、F-del、F-del_DSCav1）mRNAワクチンは、RSVウイルスを接種したコットンラットの肺ウイルス力価を低下させ、肺のRSV感染を制限した。LNPワクチンに配合されたmRNAでワクチン接種された動物群はいずれも、実施したウイルス滴定の検出レベルを下回るウイルス力価を示した。これらの結果は、肺のウイルス力価の点で、ワクチン接種されたコットンラットの防御を示す。対照的に、ホルマリン不活化ウイルスワクチン（FI RSV）は、緩衝液対照群と比較して、肺ウイルス力価を最小限に抑えるに留まった。

40

【0577】

図7から分かるように、LNP配合RSV-F（F0、F-del、F-del_DSCav1）mRNAワクチンは、RSVウイルスを接種したコットンラットの鼻組織のウイルス力価を大きく低下させ、鼻のRSV感染を低減した。mRNAワクチンと比較して、ホルマリン不活化ウイルス（FI RSV）に基づくワクチンは、鼻のウイルス力価を低下させることはできなかった。

【0578】

図8から分かるように、RSVコットンラット接種試験の肺組織病理学的分析は、各種動物群の様々な病理学スコアを明らかにする。組織病理から、ホルマリン不活化RSVワクチンを使用してワクチン接種した群の場合と同様に、mRNAワクチン接種群のいずれ

50

も肺病変の亢進を示さなかったと結論付けることができる。細気管支周囲炎、血管周囲炎、間質性肺炎、及び肺炎の平均病理スコアは、ホルマリン不活化RSVの群と比較して、mRNAを接種した全ての群で遥かに低くなっている。

【0579】

mRNAベースのワクチンの効率を更に改善するために、mRNAの翻訳効率を向上させ得るUTRの異なる組合せを有するいくつかの代替RSV-F mRNA構築物を設計した。これらのmRNA構築物は、以下の実施例において理解できるように試験した。

【0580】

実施例4：RSV-F mRNA構築物のインビトロ発現スクリーニング

本実施例は、本発明に係るUTRの組合せが、例えば、実施例3（UTRの組合せRPL32／ALB7（i-2））で用いた参照mRNA構築物（RPL32／ALB7UTRを有する）と比較して、前記mRNA構築物の発現性能を強力に改善することを示す。

【0581】

RSV-F mRNAの発現性能を更に改善するために、スクリーニング実験を行って、本発明に係る有利なUTRの組合せを同定した。様々なUTRの組合せを含むRSV-F mRNA構築物のタンパク質発現性能を決定するために、HEK 293T細胞に、リポフェクタミンを配合した各種mRNA構築物をトランスフェクトした。これらの構築物はいずれも、融合前の安定化されトランケートされたF-del_DSCav1をコードする同一コード配列を含むが、使用する5'-及び3'-UTRは異なる（表12を参照）。RSV-F発現をトランスフェクションの24時間後にフローサイトメトリーで分析した。

【0582】

表12：実施例4で用いられる各種UTR組合せを有するmRNA構築物の概要

10

20

30

40

50

【表 1 2】

抗原	UTR 設計	配列番号 RNA	配列番号 抗体
F-del_DSCav1	HSD17B4/PSMB3; a-1	1276	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/PSMB3; a-2	1284	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/PSMB3; a-3	1292	1267
F-del_DSCav1	Nosip/PSMB3; a-4	1300	1267
F-del_DSCav1	Mp68/PSMB3; a-5	1308	1267
F-del_DSCav1	Ubqln2/RPS9; b-1	1316	1267
F-del_DSCav1	ASAH1/RPS9; b-2	1324	1267
F-del_DSCav1	HSD17B4/RPS9; b-3	1332	1267
F-del_DSCav1	HSD17B4/CASP1; b-4	1340	1267
F-del_DSCav1	Nosip/COX6B1; b-5	1348	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/RPS9; c-1	1356	1267
F-del_DSCav1	Nosip/Ndufa1; c-2	1364	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/COX6B1; c-3	1372	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/Ndufa1; c-4	1380	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/PSMB3; c-5	1388	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/PSMB3; d-1	1396	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/CASP1; d-2	1404	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/Gnas; d-3	1412	1267
F-del_DSCav1	HSD17B4/Ndufa1; d-4	1420	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/Ndufa1; d-5	1428	1267
F-del_DSCav1	TUBB4B/RPS9; e-1	1436	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/RPS9; e-2	1444	1267
F-del_DSCav1	Mp68/RPS9; e-3	1452	1267
F-del_DSCav1	Nosip/RPS9; e-4	1460	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/RPS9; e-5	1468	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/COX6B1; e-6	1476	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/Gnas; f-1	1484	1267
F-del_DSCav1	ATP5A1/Ndufa1; f-2	1492	1267
F-del_DSCav1	HSD17B4/COX6B1; f-3	1500	1267
F-del_DSCav1	HSD17B4/Gnas; f-4	1508	1267
F-del_DSCav1	Mp68/COX6B1; f-5	1516	1267
F-del_DSCav1	Mp68/Ndufa1; g-1	1524	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/CASP1; g-2	1532	1267
F-del_DSCav1	Ndufa4/Gnas; g-3	1540	1267
F-del_DSCav1	Nosip/CASP1; g-4	1548	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/CASP1; g-5	1556	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/COX6B1; h-1	1564	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/Gnas; h-2	1572	1267
F-del_DSCav1	Rpl31/Ndufa1; h-3	1580	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/CASP1; h-4	1588	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/COX6B1; h-5	1596	1267
F-del_DSCav1	Slc7a3/RPS9; i-1	1604	1267
F-del_DSCav1	RPL32(32L4)/ALB7; i-2	1612	1267

【0 5 8 3】

トランスフェクションとフローサイトメトリー分析の詳細：

293T細胞を6ウェルプレートに、200000細胞／ウェル（200000細胞／2ml）の密度で播種しました。Opti-MEM中で、各RNAをLipofectamine 2000と1／1.5（w／v）の比で20分間複合体化した。次いで、リポ複合体化したmRNAを細胞に添加して、合計容量500μLで1ウェル当たり2μgのRNAをトランスフェクションした。トランスフェクション開始後の4時間で、トランスフェクション溶液を2000μL／ウェルで完全培地と交換した。FACS分析を行う前に、細胞を更に37℃、5%CO₂で維持した。

10

20

30

40

50

【0584】

トランスフェクションの24時間後、目的抗原の発現を、標準的な手順を使用してFACS分析によって定量した。簡単に説明すれば、細胞を剥離し(40mMのTris HCl pH7.5 150mMのNaCl、H2O中1mMのEDTA; RTで5分間)、PBSで洗浄し、RSV-Fに対するマウス抗体(Millipore、Cat: MAB8262)と蛍光標識したヤギ抗マウスIgG抗体(Sigma、Cat: F5262)で表面を染色した。細胞を、100uLのPFEA緩衝液(PBS+2%FCS+2mMのEDTA+0.01%NaN3)に再懸濁し、BD FACS Canto IIを用いて分析した。Live/Dead染色を、Aqua蛍光反応性染料(Invitrogen)で行った。

10

【0585】

結果を、100%のレベルに設定したRPL32/ALB7のUTRの組合せ(配列番号1612)を含む実施例3の参照構築物からの発現と比較した。分析結果を、図9に示す。

【0586】

結果

図9から分かるように、本発明に係るUTRの組合せを含むmRNA構築物の発現性能は、参照UTR組合せ(RPL32/ALB7; i-2)を含む構築物と比較して、大幅に向上した。

【0587】

実施例5: RSV-FをコードするLNP配合mRNAによるコットンラットのワクチン接種及びコットンラット接種試験

実施例4のUTRスクリーニングの結果に基づき、mRNA発現を最適化するためのUTR組合せを有するmRNA構築物を、ワクチン接種実験で使用する。

【0588】

この実験では、本発明に係るUTRの各種組合せを有するRSV-F(F、F-del、又はF-del_DSCav1)をコードするmRNAワクチンを比較する。mRNA-LNPワクチンは実施例1にしたがって調製する。コットンラットには、0日目と28日目に、mRNA-LNPワクチンによる2回の筋肉内ワクチン接種を施す。各用量は、2µg又は10µgのmRNA-LNPを含む。対照動物には、0日目に、鼻腔内に105pfuの生RSV/A2ウイルス又は筋肉内にホルマリン不活化RSVウイルスを1回ワクチン接種する。別の対照動物には、緩衝液のみを投与する(表13を参照)。

20

30

【0589】

表13: 実施例5の動物群及びワクチン接種スケジュール

40

50

【表 13】

群	試験項目	5'-UTR/3'-UTR;	配列番号 RNA	用量	経路
1	F0, F-del or F-del_DSCav1	Nosip/RPS9; e-4	286, 701 or 1460	10μg	i.m.
2	F0, F-del or F-del_DSCav1	Nosip/RPS9; e-4	286, 701 or 1460	2μg	i.m.
3	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/CASP1; g-2	367, 782 or 1532	10μg	i.m.
4	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/CASP1; g-2	367, 782 or 1532	2μg	i.m.
5	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/RPS9; c-1	169, 584 or 1356	10μg	i.m.
6	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/RPS9; c-1	169, 584 or 1356	2μg	i.m.
7	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/PSMB3; a-2	88, 503 or 1284	10μg	i.m.
8	F0, F-del or F-del_DSCav1	Ndufa4/PSMB3; a-2	88, 503 or 1284	2μg	i.m.
9	F0, F-del or F-del_DSCav1	HSD17B4/PSMB3; a-1	79, 494 or 1276	10μg	i.m.
10	F0, F-del or F-del_DSCav1	HSD17B4/PSMB3; a-1	79, 494 or 1276	2μg	i.m.
11	F0, F-del or F-del_DSCav1	-/muag; i-3	475, 890 or 1628 (R6939, R6940 or R5453)	10μg	i.m.
12	F0, F-del or F-del_DSCav1	-/muag; i-3	475, 890 or 1628 (R6939, R6940 or R5453)	2μg	i.m.
13	生 RSV/A2 ウイルス			5.0Log IM	i.n.
14	UV-Inact. RSV/A2			5.0Log IM	i.m.
15	FI-RSV			1:100	i.m.
16	緩衝液				i.m.
17	未処理/未感染				

【0590】

ELISA又はPRNTを使用した抗RSV免疫応答の決定

抗RSV免疫応答の誘導は、前記したように決定される。

【0591】

コットンラット接種試験

ワクチン接種した動物に、63日目に、100μL中の10exp5pfuの生RSV/A2ウイルスを鼻腔内接種する。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にする。68日目に全動物を 殺し、鼻組織及び肺を採取する。

【0592】

接種したコットンラットの肺におけるRSV力価

動物の肺を68日目（即ち、10exp5pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、RSV/A2力価を、前記したようにブラックアッセイによって1つの肺葉で定量した。更に、RSVウイルスゲノムのコピー数と（RSV NS-1遺伝子のコピー数を測定することによって）サイトカインmRNAレベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）によって決定した。

【0593】

接種したコットンラットの鼻組織におけるRSV力価

動物の鼻組織を68日目（即ち、105pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取する。ウイルス力価を、前記したように定量する。更に、RSVウイルスゲノムのコピー数（RSV NS-1遺伝子のコピー数を測定することによって）とサイトカインmRNAレベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）によって決定した。

【0594】

接種したコットンラットの肺組織病理

動物の肺を68日目（即ち、105pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、1つの肺葉を、前記したように組織病理学的に分析する。

【0595】

実施例6：RSV-FをコードするLNP配合mRNAを用いたコットンラットのワクチン接種及びコットンラット接種試験

この実験では、RSV-FをコードするmRNAワクチン（F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut3（及び／又は更には、F_DSCav1_mut0、_mut4、_mut5、_mut6、_mut7、_mut8及び／又はF-del_DSCav1_mut0、_mut4、_mut5、_mut6、_mut7、_mut8）を比較する。mRNA-LNPワクチンは、実施例1にしたがって調製する。コットンラットは、0日目と28日目に、mRNA-LNPワクチンによる2回の筋肉内ワクチン接種を施す。各用量は、2 µg又は10 µgのmRNAを含む。対照動物には、0日目に、鼻腔内に105 pfuの生RSV/A2ウイルス又はホルマリン不活化RSVウイルスを筋肉内に1回ワクチン接種する。別の対照動物には、緩衝液のみを投与する（表14を参照）。

【0596】

表14：実施例6の動物群

【表14】

群	試験項目	RNA ID	配列番号 RNA	配列番号 タパク質	経路
1	F_DSCav1_mut1	R6771	1997	1636	i.m.
2	F-del_DSCav1_mut1	R6774	2366	2005	i.m.
3	F_DSCav1_mut2	R6772	2735	2374	i.m.
4	F-del_DSCav1_mut2	R6773	3104	2743	i.m.
5	F_DSCav1_mut3	R6770	3473	3112	i.m.
6	F-del_DSCav1_mut3	R6775	3842	3481	i.m.
7	生RSV/A2 ウイルス				i.n.
8	UV-Inact. RSV/A2				i.m.
9	FI-RSV				i.m.
10	緩衝液				i.m.
11	未処理/未感染				

【0597】

ELISA又はPRNTを使用した抗RSV免疫応答の決定

抗RSV免疫応答の誘導は、前記したように決定する。

【0598】

コットンラット接種試験

ワクチン接種した動物に、63日目に、100 µL中の10 exp 5の生RSV/A2ウイルスを鼻腔内接種する。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にする。68日目に全動物を 殺し、鼻組織及び肺を採取する。

【0599】

接種したコットンラットの肺におけるRSV力価

動物の肺を68日目（即ち、10 exp 5 pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、RSV/A2力価を、前記したようにブランクアッセイによって1つの肺葉で定量する。更に、RSVウイルスゲノムのコピー数（RSV NS-1遺伝子のコピー数を測定することによって）とサイトカインmRNAレベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）によって決定した。

【0600】

接種したコットンラットの鼻組織におけるRSV力価

動物の鼻組織を68日目（即ち、105 pfuの生RSV/A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取する。ウイルス力価を、前記したように定量する。更に、RSVウ

イルスゲノムのコピー数（RSV NS-1 遺伝子のコピー数を測定することによって）とサイトカイン mRNA レベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）によって決定した。

【0601】

接種したコットンラットの肺組織病理

動物の肺を68日目（即ち、 10^5 pfu の生 RSV/A2 ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、1つの肺葉を、前記したように組織病理学的に分析する。

【0602】

実施例7：RSV-F及び更なるRSV抗原をコードするLNP配合mRNAによるコットンラットのワクチン接種、並びにコットンラット接種試験

RSV 特異的免疫応答の幅を広げ最適化するために、特にT細胞依存性免疫応答を増大させるために、各種 RSV タンパク質（RSV F（F0、F、F-del、F-DSCav1 F-del-DSCav1、又は F-DSCav1mut0~mut8、又は F-del-DSCav1mut0~mut8）をコードする mRNA ワクチンを、実施例1にしたがって調製する。単一又は混合ワクチンの効果を評価するために、これらのワクチンを、表9に示すように、単独又は組み合わせて投与する。コットンラットに、0日目と28日目に、各抗原において、 $2\mu\text{g}$ 又は $10\mu\text{g}$ の mRNA を含む mRNA-LNP ワクチンで2回筋肉内（i.m.）ワクチン接種を施す。別の群には、ホルマリン不活化 RSV 及び／又は生 RSV/A2 で筋肉内（i.m.）に免疫感作して、それらの免疫原性を mRNA ワクチンと比較する。更なる対照動物には、緩衝液のみを投与する（表15を参照）。RSV 特異的免疫応答は、ELISA 又は細胞内サイトカイン染色（ICS）によって決定する。

【0603】

表15：実施例7の動物群

10

20

30

40

50

【表 15】

群	試験項目	配列番号 RNA	経路
1	F	475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270	i.m.
2	M	10046	i.m.
3	N	10496	i.m.
4	M2-1	11545	i.m.
5	P	10999	i.m.
6	F + M	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + M (配列番号 10046)	i.m.
7	F+N	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + N (配列番号 10496)	i.m.
8	F + M2-1	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + M2-1 (配列番号 11545)	i.m.
9	F+P	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + P (配列番号 10999)	i.m.
10	F + M + P	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + P (配列番号 10999) + M (配列番号 10046).	i.m.
11	F + M + N + P	F (配列番号 475, 890, 1259, 1628, 1997, 2366, 2735, 3104, 3473, 3842, 4211, 4580, 4949, 5318, 5687, 6056, 6425, 6794, 7163, 7532, 7901, 又は 8270) + P (配列番号 10999) + M (配列番号 10046) + N (配列番号 10496)	i.m.
12	生 RSV/A2 ウイルス		i.n.
13	UV-Inact. RSV/A2		i.m.
14	FI-RSV		i.m.
15	緩衝液		i.m.
16	未処理/未感染		

10

20

30

【0604】

実施例 7 のワクチン接種実験では、少なくとも 2 つの異なる配列最適化 DNA テンプレート（そのそれぞれは、実施例 1 に記載されるように生成される）を使用する PCT 出願国際公開第 2017/109134 号に開示される手順にしたがって、多価 mRNA 組成物／ワクチンを生成する（例えば、群 6～10）。簡単に説明すると、DNA 構築物混合物（それぞれが各種コード配列及び T7 プロモーターを含む）を、mRNA 構築物の混合物を生成するための同時 RNA インビトロ転写用テンプレートとして使用する。続いて、得られた RNA 混合物を、RP-HPLC を使用する共精製に使用する。その後、得られた精製 RNA 混合物を LNP に配合し（セクション 1.4 で説明）、多価の LNP 配合 RNA 組成物／ワクチンを生成する。

40

【0605】

ELISA PRNT を使用した抗 RSV 免疫応答の決定：

抗 RSV 免疫応答の誘導は、その検出に適した組換えタンパク質又はペプチドを用いて

50

、前記したように決定する。

【0606】

細胞内サイトカイン染色（ICS）：

ワクチン接種したマウスと対照マウスの脾細胞を、標準的なプロトコルにしたがって単離する。簡単に説明すれば、単離した脾臓をセルストレーナーで粉碎し、PBS／1％FBSで洗浄した後、赤血球を溶解する。十分な洗浄工程の後、PBS／1％FBS脾細胞を96ウェルプレートに播種する（2×10⁶細胞／ウェル）。翌日、GolgiPlugTM／GolgiStopTM（それぞれ、プレフェルジンAとモネンシンを含むタンパク質輸送阻害剤；BD Biosciences）の混合物の存在下で、好適なRSVペプチド又は無関係の対照ペプチドと2.5 µg／mlの抗CD28抗体（BD Biosciences）で37℃にて6時間、細胞を刺激する。刺激後、細胞を洗浄し、製造元の指示書にしたがってCytifix／Cytoperm試薬（BD Biosciences）を使用して細胞内サイトカインを染色する。以下の抗体：CD8－PECy7（1：200）、CD3－FITC（1：200）、IL2－PerCP－Cy5.5（1：100）、TNFα－PE（1：100）、IFNγ－APC（1：100）（eBioscience）、CD4－BD Horizon V450（1：200）（BD Biosciences）を染色に使用し、1：100に希釈したFcγブロッックと共にインキュベートする。Aqua Dyeを用いて、生細胞と死細胞を区別する（Invitrogen）。Canto IIフローサイトメーター（Beckton Dickinson）を使用して、細胞を回収する。フローサイトメトリデータは、FlowJoソフトウェア（Tree Star, Inc.）を用いて分析する。

【0607】

コットンラット接種試験

ワクチン接種した動物に、63日目に、100 µL中の10 exp 5の生RSV／A2ウイルスを鼻腔内接種する。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にする。68日目に全動物を殺し、鼻組織及び肺を採取する。

【0608】

コットンラット接種試験：

ワクチン接種した動物に、63日目に、100 µL中の10 exp 5の生RSV／A2ウイルスを鼻腔内接種する。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にする。68日目に全動物を殺し、鼻組織及び肺を採取する。血清を49日目に採取し、RSVウイルス中和力価（VNT）を、実施例2に記載されているブランク減少中和試験（PRNT）を用いて測定する。

【0609】

接種したコットンラットの肺におけるRSV力価：

動物の肺を68日目（即ち、10 exp 5 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取し、RSV／A2力価を、前記したようにブランクアッセイによって1つの肺葉で定量する。更に、RSVウイルスゲノムのコピー数（RSV NS－1遺伝子のコピー数を測定することによって）とサイトカインmRNAレベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT－PCR）によって決定した。

【0610】

接種したコットンラットの鼻組織におけるRSV力価：

動物の鼻組織を68日目（即ち、105 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取する。ウイルス力価を、前記したように定量する。更に、RSVウイルスゲノムのコピー数（RSV NS－1遺伝子のコピー数を測定することによって）とサイトカインmRNAレベルを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT－PCR）によって決定した。

【0611】

接種したコットンラットの肺組織病理

動物の肺を68日目（即ち、105 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種

10

20

30

40

50

の5日後)に採取し、1つの肺葉を、前記したように組織病理学的に分析する。

【0612】

実施例8：HeLa細胞における各種RSV Fタンパク質の発現及びFACSによる分析

mRNA構築物のインビトロでのタンパク質発現を決定するために、HeLa細胞を、RSV F抗原をコードするmRNAで一過性にトランスフェクトし、好適な抗Fタンパク質抗体(マウスにて生成)をRSV融合するために染色し、FITC結合抗マウス二次抗体で対比染色した(SigmaのF5262)。HeLa細胞を、トランスフェクションの24時間前に、細胞培養培地(RPMI、10%FCS、1%L-グルタミン、1%Pen/Strep)で、400,000細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種した。HeLa細胞に、Lipofectamine 2000(Invitrogen)を使用して、2μgの未配合mRNAをトランスフェクトした。実施例1にしたがって調製され、表16に列挙されるmRNA構築物は、陰性対照(注射用水)を含む実験(表9も参照されたい)で使用した。トランスフェクションの24時間後、HeLa細胞を好適な抗RSV-F抗体(マウスにて生成、1:500)及び抗マウスFITC標識二次抗体(1:500)で染色し、FACS Divaソフトウェアを使用するBD FACS Canto IIにおけるフローサイトメトリー(FACS)で分析した。FlowJoソフトウェアパッケージ(Tree Star, Inc.)を使用して、蛍光FITCシグナルの定量分析を行った。細胞を、細胞内又は細胞表面で染色した。結果を、図10a及び図10bに示す。これらは、2つの異なる独立した実験を表す。

【0613】

表16：実施例8で用いられるmRNA構築物の概要

【表16】

RNA ID	抗原	UTR 設計	配列番号 RNA	配列番号 タンパク質	参照図面
R6939	F0	-/muag; i-3	475	68	10a, 10b
R6808	F0_DSCav1	-/muag; i-3	1259	898	10a, 10b
R6770	F_DSCav1_mut3	-/muag; i-3	3473	3112	10a
R6771	F_DSCav1_mut1	-/muag; i-3	1997	1636	10a
R6772	F_DSCav1_mut2	-/muag; i-3	2735	2374	10a
R6940	F-del	-/muag; i-3	890	483	10a, 10b
R5453	F-del_DSCav1	-/muag; i-3	1628	1267	10a, 10b
R6775	F-del_DSCav1_mut3	-/muag; i-3	3842	3481	10a
R6774	F-del_DSCav1_mut1	-/muag; i-3	2366	2005	10a
R6773	F-del_DSCav1_mut2	-/muag; i-3	3104	2743	10a
R7454	F_DSCav1_mut0	-/muag; i-3	4211	3850	10b
R7456	F_DSCav1_mut5	-/muag; i-3	5687	5326	10b
R7458	F_DSCav1_mut4	-/muag; i-3	4949	4588	10b
R7455	F-del_DSCav1_mut0	-/muag; i-3	4580	4219	10b
R7457	F-del_DSCav1_mut5	-/muag; i-3	6056	5695	10b
R7459	F-del_DSCav1_mut4	-/muag; i-3	5318	4957	10b

【0614】

結果：

結果は、使用したmRNA構築物が検出可能な細胞内RSV Fタンパク質の発現、及び細胞表面での検出可能なタンパク質の発現をもたらしたことを示す。C末端(F-del)を欠失させたRSV F構築物(例えば、R6940、R5453、R6775、R6774、R6773、R7455、R7457、R7459など)は、F完全長構築物と比較して、細胞表面タンパク質発現の増加を示す。F-del_DSCav1_mut0(R7455)をコードする構築物は、最も高い発現を示す。この結果は、Fタンパク質をコードする本発明mRNA(F0、F-del、F0_DSCav1、F-del_DSCav1、F_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut0、F

__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut1、F__DSCav1__mut2、F-del__DSCav1__mut2、F__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut3、F__DSCav1__mut4、F-del__DSCav1__mut4、F__DSCav1__mut5、F-del__DSCav1__mut5)は細胞内で翻訳され、細胞表面に存在する。これは、mRNAベースのRSVワクチンの前提条件である。

【0615】

実施例9：RSV-FをコードするLNP配合mRNAを用いたコottonラットのワクチン接種及びRSVコottonラット接種試験

本実施例は、各種融合前の安定化RSV-F抗原をコードする本発明に係るLNP配合mRNAが、コottonラットにおいて強力に機能的且つ防御的な免疫応答を誘導することを示す。

【0616】

この実験は、融合前の安定化された各種RSV-Fバリエーション(mut1、mut2、mut3)をコードするmRNA-LNPを、完全長F又はトランケートされたF(F-del)と比較した。mRNA-LNPワクチンは、実施例1にしたがって調製した。コottonラットには、0日目及び28日目に、mRNA-LNPワクチンによる2回の筋肉内ワクチン接種を施した。各用量は、100µgのmRNA-LNPを含有した。対照動物には、0日目に、10⁵ pfuの生RSV/A2ウイルス又はUV不活化RSV/A2ウイルスを1回、又は0日目及び28日目に、ホルマリン不活化RSVウイルス(FI RSV)を筋肉内に2回接種した。別の対照動物には、緩衝液のみを投与した(表17を参照)。

【0617】

表17：実施例9の動物群及びワクチン接種スケジュール

10

20

30

40

50

【表 17】

群	試験項目	RNA ID	配列番号 RNA	配列番号 タンパク質	用量	経路
1	F0 コード mRNA LNP-配合	R6939	475	68	100μg	i.m.
2	F0_DSCav1 コード mRNA LNP-配合	R6808	1259	898	100μg	i.m.
3	F_DSCav1_mut3 コード mRNA LNP-配合	R6770	3473	3112	100μg	i.m.
4	F_DSCav1_mut1 コード mRNA LNP-配合	R6771	1997	1636	100μg	i.m.
5	F_DSCav1_mut2 コード mRNA LNP-配合	R6772	2735	2374	100μg	i.m.
6	F-del コード mRNA LNP-配合	R6940	890	483	100μg	i.m.
7	F-del_DSCav1 コード mRNA LNP-配合	R5453	1628	1267	100μg	i.m.
8	F-del_DSCav1_mut3 コード mRNA LNP-配合	R6775	3842	3481	100μg	i.m.
9	F-del_DSCav1_mut1 コード mRNA LNP-配合	R6774	2366	2005	100μg	i.m.
10	F-del_DSCav1_mut2 コード mRNA LNP-配合	R6773	3104	2743	100μg	i.m.
11	生 RSV/A2 ウィルス				10 ⁵	i.m.
12	UV-inact. RSV/A2				10 ⁵	i.m.
13	FI RSV				1:100	i.m.
14	緩衝液					i.m.
15	未処理/未感染					i.m.

【0618】

ELISAによる抗RSV Fタンパク質抗体の決定：

抗RSV F抗体力価を決定するために、0日目、28日目、49日目、及び63日目に血液サンプルを回収した。ELISAプレートを、RSV/A2感染HEp-2細胞又はメタノール/アセトン固定RSV/B感染HEp-2細胞から抽出した精製Fタンパク質でコーティングした。コーティングしたプレートを、所定の血清希釈液を使用してインキュベートした。Fタンパク質への特異的抗体の結合は、TMB基質を用いた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）と組み合わせたアイソタイプ特異的抗コットンラット抗体を使用して検出した。

【0619】

ウィルス中和力価の決定：

0日目、28日目、49日目、63日目に血清を採取し、ブランク減少中和試験（PRNT）を使用してRSVウィルス中和力価（VNT）を測定した。希釈した血清サンプルをRSV/A2又はRSV/B（25～50PFU）と室温で1時間インキュベートし、24ウェルプレートのコンフルエントなHEp-2単層に2連で接種した。5%CO₂インキュベータにて37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定、染色した。対応する相互中和抗体力価は、ウィルス対照の60%減少エンドポイントで決定した。

【0620】

コットンラット接種試験：

ワクチン接種した動物に、63日目に、100μL中の10⁵ pfuの生RSV/A2ウィルスを鼻腔内接種する。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にする。68日目

に全動物を 殺し、鼻組織及び肺を採取する。

【0621】

接種したコottonラットの鼻組織におけるRSV力価：

動物の肺及び鼻組織を68日目（即ち、 10^5 p f uの生RSV／A2ウイルスによる鼻腔内接種の5日後）に採取した。鼻ホモジネートを肺ホモジネートと同様に遠心分離により清澄化し、EMEMで希釈した。コンフルエントなHEp-2単層に、24ウェルプレート中、希釈ホモジネートで2連で感染させた。5%COインキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定し、0.1%クリスタルバイオレットで1時間染色した後、リンスして風乾した。ブランクをカウントし、ウイルス力価を組織1グラム当たりのブランク形成単位として表した。

10

【0622】

肺組織病理：

肺を解剖し、10%中性緩衝ホルマリンで通常の容量まで膨潤させた後、同一の固定溶液に浸漬した。固定後、肺をパラフィンに包埋し、切片状にし、ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）で染色した。肺の炎症の4つのパラメーターを評価した。即ち、細気管支周囲炎（細気管支周囲の炎症性細胞浸潤）、血管周囲炎（小血管周囲の炎症性細胞浸潤）、間質性肺炎（炎症性細胞浸潤と肺胞壁の肥厚）、及び肺肺炎（肺胞空間内の細胞）。スライドは、0～4の重篤度スケールで盲目的にスコア化した。その後、スコアを0～100%の組織病理学的スケールに変換した。

20

【0623】

結果：

図11は、本発明に係る各種RSV Fタンパク質（F0、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）をコードする試験したLNP配合mRNA構築物はいずれも、RSV-Fタンパク質に対するコottonラットの体液性免疫応答を誘導する。抗体の総IgG力価をELISAで決定した。

【0624】

トランケートしたF（F-del）（F-del、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）をコードするmRNA構築物は、d28の時点で、完全長F配列を有する構築物よりも高く且つ速い応答を誘導し、それ以降の時点では、有意差は検出できない。安定化された構築物（F0_DSCav1、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）は、野生型構築物（F0及びF-del）よりも低いELISA力価を示す。レベルは、それ以降の時点では、有意差を示さない。

30

【0625】

100μgの用量では、安定化されトランケートしたFタンパク質（F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2）をコードする構築物は、初回ワクチン接種後（28日目）に既に、生ウイルスによるワクチン接種と比較して、より高いRSV-F特異的IgG力価を誘導する。追加ワクチン接種後、試験したLNP配合RSV-F mRNAワクチンはいずれも、ELISAで測定される液性免疫応答を誘導し、これは、対照ワクチン接種の応答よりも顕著である。

40

【0626】

図12から分かるように、LNP配合RSV-F（F0、F0_DSCav1、F_DSCav1_mut3、F_DSCav1_mut1、F_DSCav1_mut2、F-del、F-del_DSCav1、F-del_DSCav1_mut3、F-de

50

l__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2) mRNAワクチンがいずれも、高いウイルス中和抗体価によって示されるように、コottonラットにおいてRSV特異的機能的抗体の生成を誘導したことを示した。LNP配合RSV-Fのトランケートされた構築物(F-del、F-del__DSCav1、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)は、F完全長構築物よりも高く且つ速い応答を誘導した。本発明に係る融合前安定化のための構築物(F__DSCav1__mut3、F__DSCav1__mut1、F__DSCav1__mut2、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)は、F0、F0__DSCav1、F-del、F-del__DSCav1よりも高い応答を誘導する。

10

【0627】

図13から分かるように、RSVコottonラット接種試験の肺組織病理学的分析は、各種動物群の様々な病理学スコアを明らかにする。組織病理から、ホルマリン不活化RSVワクチンを使用してワクチン接種した群の場合と同様に、mRNAワクチン接種群のいずれも肺病変の亢進を示さなかったと結論付けることができる。細気管支周囲炎の平均病理スコアは、ホルマリン不活化RSVの群と比較して、mRNAを接種した全ての群で遥かに低くなっている。LNP配合RSV-Fのトランケートされた構築物(F-del、F-del__DSCav1、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)は、一般に、F完全長構築物よりも低い病理スコアを示した。本発明に係る融合前安定化のための構築物(F__DSCav1__mut3、F__DSCav1__mut1、F__DSCav1__mut2、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)は、F0、F0__DSCav1、F-del、F-del__DSCav1よりも良好な応答(低い病理学スコア)をもたらした。

20

【0628】

図14aから分かるように、この実験においては、LNP配合RSV-FmRNAワクチンがいずれも、RSVウイルスを接種したコottonラットの肺ウイルス力価を低下させ、肺のRSV感染を制限した。LNPワクチンに配合されたmRNAでワクチン接種された動物群はいずれも、実施したウイルス滴定の検出レベルを下回るウイルス力価を示した。これらの結果は、肺のウイルス力価の点で、ワクチン接種されたコottonラットの防御を示す。対照的に、ホルマリン不活化ウイルスワクチン(FI RSV)とUV不活化RSV/A2ウイルス対照は、緩衝液対照群と比較して、肺ウイルス力価を最小限に抑えるに留まった。

30

【0629】

図14bから分かるように、LNP配合RSV-FmRNAワクチンは、RSVウイルスを接種したコottonラットの鼻組織のウイルス力価を大きく低下させ、鼻のRSV感染を低減した。mRNAワクチンと比較して、ホルマリン不活化ウイルス(FI RSV)に基づくワクチンとUV不活化RSV/A2ウイルス対照は、鼻のウイルス力価を低下させることはできなかった。鼻の完全な防御は、本発明に係る融合前安定化によってのみ達成された(F__DSCav1__mut3、F__DSCav1__mut1、F__DSCav1__mut2、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)。

40

【0630】

結論として、結果は、RSV-Fトランケートタンパク質(F-del、F-del__DSCav1、F-del__DSCav1__mut3、F-del__DSCav1__mut1、F-del__DSCav1__mut2)をコードするLNP配合RNA構築物が、一般に、完全長Fタンパク質をコードするRNA構築物よりも免疫原性が高いことを示す。Ds-Cav1変異のみを特徴とする構築物(F0__DSCav1及びF-del__DSCav1)は、本発明に係る更に安定化されたFタンパク質をコードする構築物(F__DSCav1__mut3、F__DSCav1__mut1、F__DSCav1__mut2、

50

F-del_DSCav1_mut3、F-del_DSCav1_mut1、F-del_DSCav1_mut2

)と比較してmRNAベースのワクチンとして最適ではない。

【0631】

mRNAベースのワクチンの効率を更に向上させるために、いくつかの代替RSV-F mRNA構築物を、有益なランケットされたF-delタンパク質と組み合わせて、融合前コンフォメーションを安定化させる更なる変異を有するように設計した。これらのmRNA構築物は、以下の実施例に記載するように試験した。

【0632】

実施例10：RSV-FをコードするLNP配合mRNAを用いたコットンラットのワクチン接種及びRSVコットンラット接種試験

本実施例は、各種融合前の安定化RSV-F抗原をコードする本発明に係るLNP配合mRNAが、コットンラットにおいて強力に機能的且つ防御的な免疫応答を誘導することを示す。

【0633】

mRNA-LNPワクチンは、実施例1にしたがって調製した。コットンラットには、0日目又は0日目及び28日目に、mRNA-LNPワクチンによる1回又は2回の筋肉内ワクチン接種を施した。各用量は、100μgのmRNA-LNPを含有した。対照動物には、28日目に、10⁵ pfuの生RSV/A2ウイルス又はホルマリン不活化RSVウイルス(FI RSV)を筋肉内に1回接種した。別の対照動物には、緩衝液のみを投与した(表18を参照)。

【0634】

表18：実施例10の動物群及びワクチン接種スケジュール

【表18】

群	試験項目	RNA ID	配列番号 RNA	配列番号 タンパク質	用量	免疫感作	経路
1	(1) F-del コート mRNA LNP-配合	R6940	890	483	100μg	day 0, day 28	i.m.
2	(2) F-del_DSCav1_mut2 コート mRNA LNP-配合	R6773	3104	2743	100μg	day 0, day 28	i.m.
3	(3) F-del_DSCav1_mut0 コート mRNA LNP-配合	R7455	4580	4219	100μg	day 0, day 28	i.m.
4	(4) F-del_DSCav1_mut5 コート mRNA LNP-配合	R7457	6056	5695	100μg	day 0, day 28	i.m.
5	(5) F-del_DSCav1_mut4 コート mRNA LNP-配合	R7459	5318	4957	100μg	day 0, day 28	i.m.
6	(1) F-del コート mRNA LNP-配合	R6940	890	483	100μg	day 28	i.m.
7	(2) F-del_DSCav1_mut2 コート mRNA LNP-配合	R6773	3104	2743	100μg	day 28	i.m.
8	(3) F-del_DSCav1_mut0 コート mRNA LNP-配合	R7455	4580	4219	100μg	day 28	i.m.
9	(4) F-del_DSCav1_mut5 コート mRNA LNP-配合	R7457	6056	5695	100μg	day 28	i.m.
10	(5) F-del_DSCav1_mut4 コート mRNA LNP-配合	R7459	5318	4957	100μg	day 28	i.m.
11	生 RSV/A2 ウイルス				10 ⁵	day 28	i.m.
12	FI RSV				1:100	day 28	i.m.
13	緩衝液					day 0, day 28	i.m.
14	未処理/未感染						i.m.

10

20

30

40

50

【0635】

ELISA及びウイルス中和力価による抗RSV Fタンパク質抗体の決定

0日目、28日目、49日目、及び63日目に血液サンプルを採取し、前記したように（実施例9を参照）、プラーク減少中和試験（PRNT）を使用して測定される抗RSV F抗体及びRSVウイルス中和力価（VNT）を決定した。

【0636】

コットンラット接種試験：

ワクチン接種した動物に、63日目に、100 uL中の 10^5 pfuの生RSV/A2ウイルスを鼻腔内接種した。1つの対照群は、未処理且つ未感染の状態にした。68日目に全動物を殺し、鼻組織及び肺を採取した。接種したコットンラットの鼻組織におけるRSV力価及び肺組織病理を、上に記載したように分析する（実施例9を参照）。

【0637】

結果：

図15は、本発明に係る各種RSV Fタンパク質（F-del、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）をコードする試験したLNP配合mRNA構築物がいずれも、コットンラットにおいてRSV-Fタンパク質に対する体液性免疫応答を誘導することを示す。抗体の総IgG力価をELISAで決定した。安定化されたFタンパク質（F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）をコードするRNA構築物は、初期においては、トランケートされた野生型Fタンパク質F-delをコードする構築物よりも低いELISA力価を示した。この傾向は、ELISA用により高い血清希釈液を使用することにより、それ以降の時点でも検出可能である（データは示さず）。IgG応答は、2回目の免疫感作によって著しくブーストすることができる。

【0638】

図16から分かるように、LNP配合RSV-F（F-del、F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）mRNAワクチンがいずれも、高いウイルス中和抗体力価によって示されるように、コットンラットにおいてRSV特異的機能性抗体の生成を誘導した。本発明に係る融合前安定化のためのLNP配合構築物（F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）は、F-delよりも高い又は同等の応答を誘導する。融合前安定化タンパク質F-del_DSCav1_mut5をコードするRNA構築物R7457は、最も高いVNTを誘導する（前の実験（実施例9、R6773）において、最も良好な融合前安定化構築物によって誘導された最も良好な結果と同等）。

【0639】

肺組織病理学分析は、ホルマリン不活化RSVワクチンを使用してワクチン接種された群の場合（図17a（細気管支炎及び血管周囲炎の場合）及び図17b（間質性肺炎及び肺肺炎の場合）を参照）と同様に、mRNAワクチン接種群はいずれも、肺病変の亢進を示さなかった。本発明に係る融合前安定化のための構築物（F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）は、F-delよりも良好な応答（より低い病理学スコア）をもたらした。2回のワクチン接種を施された動物は、1回のワクチン接種のみを施した動物と比較して、より低い病理スコアを示した。

【0640】

図18から分かるように、この実験において、試験したLNP配合RSV-F mRNAワクチンはいずれも、RSVウイルスを接種したコットンラットの肺ウイルス力価を低下させ、肺のRSV感染を制限した。これは、ワクチン接種を1回のみ施した群にも当て

10

20

30

40

50

はまる。結果は、ウイルス性肺炎価の点で、ワクチン接種されたコottonラットの防御を示す。対照的に、ホルマリン不活化ウイルスワクチン（F I R S V）は、緩衝液対照群と比較して、肺炎ウイルス価を最小限に抑えるに留まった。

【0641】

図18から分かるように、LNP配合RSV-F mRNAワクチンは、RSVウイルスを接種したコottonラットの鼻組織のウイルス価を大きく低下させ、鼻のRSV感染を低減させた。mRNAワクチンと比較して、ホルマリン不活化ウイルス（F I R S V）に基づくワクチンは、鼻のウイルス価を低下させることができなかった。鼻の完全な防御は、2回のワクチン接種を受けたいくつかの群でのみ達成された（例えば、R7457（F-del_DSCav_mut5）及びR7459（F-del_DSCav_mut4））。

【0642】

結論として、結果は、融合前に安定化されたRSV-Fトランケートタンパク質（F-del_DSCav1_mut2、F-del_DSCav1_mut0、F-del_DSCav1_mut5、F-del_DSCav1_mut4）をコードするLNP配合RNA構築物が、一般に、より高い機能性価をもたらし、野生型トランケートFタンパク質F-delをコードするRNA構築物と比較して、感染に対するより顕著な防御を達成したことを示す。最も良い結果が、F-del_DSCav1_mut2又はF-del_DSCav1_mut5（R6773、R7457）をコードするRNA構築物によって達成された。

【0643】

実施例11：ウサギ網状赤血球溶解物システムを使用した各種RSV T細胞抗原の発現

本発明の第2の態様に係るmRNA構築物（RSV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、及びマトリックスタンパク質M2-1タンパク質をコードするmRNA構築物）のインビトロタンパク質発現を決定するために、未配合RNA（実施例1にしたがって調製）を、製造元のプロトコルにしたがって、Promega Rabbit Reticulocyte Lysate Systemの成分と混合した。溶解物は、タンパク質合成に必要な細胞成分（tRNA、リボソーム、アミノ酸、開始、伸長、終止因子）を含有する。ポジティブコントロールとして、Lysate System KitのルシフェラーゼRNAを使用した。翻訳結果は、SDS-Pageとウエスタンブロット分析（IRDye 800CWストレプトアビジン抗体（1：2000））で分析した。

【0644】

表19：実施例11で用いられるmRNA構築物の概要

【表19】

RNA ID	抗原	UTR 設計	配列番号 RNA	配列番号 タンパク質	予測される kDa
R7595	M	-/muag; i-3	10046	9684	
R7596	P	-/muag; i-3	10999	10637	27.1
R7597	N	-/muag; i-3	10496	10134	43.4
R7598	M2-1	-/muag; i-3	11545	11183	22.1
	Luc				61

【0645】

結果：

結果（図19を参照）は、使用したmRNA構築物が検出可能なタンパク質発現をもたらしたことを示す。これは、mRNAベースのRSVワクチンの前提条件である（ゲル上のRSV P及びM2-1のサイズシフトは、例えば、Richardら、2018又はHardy及びWert z、2000 PMIDs：29489893及び10846068に記載されるようにリン酸化によるものと考えられる）。

【0646】

実施例12：各種RSV T細胞抗原を単独及びRSV F（F-del）と共にコードするLNP配合mRNAによるマウスのワクチン接種

本実施例は、本発明の第2の態様に係る各種RSV T細胞抗原（RSV M、P、N、及びM2-1）をコードするLNP配合mRNAを、単独で、又はトランケートRSV FをコードするLNP配合mRNA（F-del）と組み合わせて分析する。mRNA-LNPワクチンは実施例1にしたがって調製した。Balb/cマウスに、0日目と28日目に、mRNA-LNPワクチンによる2回の筋肉内ワクチン接種を施した。各用量は、5μg、2.5μg、又は2.5μg+2.5μgのmRNA-LNPを含有した（各種抗原をコードするmRNAを投与する群では、LNPを別に配合し、投与前に混合した）。対照動物には緩衝液のみを投与した（表20を参照）。体液性並びに細胞性免疫応答及び中和抗体を、ELISA、FACS、PRNT、及びICSにより分析した。

【0647】

表20：実施例12の動物群及びワクチン接種スケジュール

【表20】

群	試験項目	RNA ID	配列番号 RNA	配列番号 タンパク質	用量	経路
1	NaCl 緩衝液	-	-	-		i.m.
2	M: RSV M コード mRNA LNP-配合	R7595	10046	9684	5μg	i.m.
3	P: RSV P コード mRNA LNP-配合	R7596	10999	10637	5μg	i.m.
4	N: RSV N コード mRNA LNP-配合	R7597	10496	10134	5μg	i.m.
5	M2-1: M2-1 コード mRNA LNP-配合	R7598	11545	11183	5μg	i.m.
6	F: F-del コード mRNA LNP-配合	R6940	890	483	2.5 μg	i.m.
7	F+M: F-del コード mRNA + RSV M コード mRNA LNP-配合	R7595 + R6940	890 + 10046	483+ 9684	2.5 μg + 2.5 μg	i.m.
8	F+P: F-del コード mRNA + RSV P コード mRNA LNP-配合	R7596 + R6940	890+ 10999	483+ 10637	2.5 μg + 2.5 μg	i.m.
9	F+N: F-del コード mRNA + RSV N コード mRNA LNP-配合	R7597 + R6940	890+ 10496	483+ 10134	2.5 μg + 2.5 μg	i.m.
10	F+M2-1: F-del コード mRNA + RSV M2-1 コード mRNA LNP-配合	R7598 + R6940	890+ 11545	483+ 11183	2.5 μg + 2.5 μg	i.m.

【0648】

ELISAによる抗RSV Fタンパク質抗体の決定：

抗RSV F抗体価を決定するために、0日目、14日目、28日目、49日目に血液サンプルを採取した。ELISAプレートを、組換えヒトRSV融合糖タンパク質（hRSV Fタンパク質（A2；His-tag；Sino Biological；Cat：11049-V08B））でコーティングした。コーティングしたプレートを、所定の血清希釈液を使用してインキュベートした。Fタンパク質への特異的抗体の結合は、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）及びAmplex（登録商標）UltraRed Reagent（Invitrogen（参照番号A360

06))と組み合わせたアイソタイプ特異的抗マウスラット抗体を用いて検出した。

【0649】

FACSで測定された抗原特異的な体液性抗体応答の検出

HeLa細胞を、リポフェクタミンを使用して2 μ gのRSV mRNA構築物(R7595、R7596、R7597、R7598)でトランスフェクトした。トランスフェクションの20時間後に細胞を回収し、1ウェルあたり1 $\times$ 10⁵で96ウェルプレートに播種した。細胞を、ワクチン接種したマウスの対応する血清(28日目及び49日目の血清、1:50に希釈)とインキュベートし、続いて、FITCコンジュゲート抗マウスIgG抗体染色を行った。細胞は、DIVAソフトウェアを使用してBD FACS Canto IIで取得し、FlowJoで分析した。結果を、図21a(28日目)及び図21b(49日目)に示す。読み取りには、(生細胞中の)FITC陽性細胞のパーセンテージを使用した。

【0650】

ウイルス中和力価の決定:

49日目に血清を採取し、ブランク減少中和試験(PRNT)を使用して、RSVウイルス中和力価(VNT)を測定した。希釈した血清サンプルを、RSV/A2(25~50PFU)と共に室温で1時間インキュベートし、24ウェルプレートのコンフルエントなHEp-2単層に2連で接種した。5%CO₂インキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした後、ウェルに、0.75%メチルセルロース培地をオーバーレイした。4日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を固定、染色した。対応する相互中和抗体力価は、ウイルス対照の60%減少エンドポイントで決定した。

【0651】

FACSを使用したICSによるマウスの細胞性免疫応答の決定

ワクチン接種したマウス及び対照マウスからの脾細胞及び肺細胞は、標準的なプロトコルにしたがって単離した。簡単に説明すれば、単離された脾臓をセルストレーナーで粉碎し、PBS(1%FCS)で洗浄した。遠心分離後、細胞ペレットを残りの上清で再懸濁し、赤血球溶解バッファーで処理し、PBS(1%FCS)で繰り返し洗浄した。最後に、脾細胞をFCS/10%DMSOに再懸濁し、クライオバイアルに移し、-80℃で保存した。RPMI-1640培地(10%FCS; 2mMグルタミン; 1%Pen/Strep)を使用して肺を灌流し、採取した後、RPMI-1640培地(10%FCS; 2mMグルタミン; 1%Pen/Strep)に4℃で保存し、製造元の指示にしたがって、肺細胞を、Miltenyi BiotecのLung Dissociation Kitマウスを用いて単離した。ICSの場合、丸底プレートに2 $\times$ 10⁶細胞(脾細胞又は肺細胞)を2連で播種し、RSV M2-1特異的(VYNTVISYI、SYIGSINNI、SYIESNRKN、KSIDTLSEI)、RSV F特異的(FYQSTCSAV、TYMLTNSEL、KYKNAVTEL、KIMTSKTDV)、RSF M特異的(KHTATRFAI、AQMP SKFTI、KYIKPQSQF、TYLRSISVR)、RSV P特異的(SPITSNSTI、SYEEINDQT)、又はRSV N特異的(SYKKMLKEM、FYHILNNPK、KYTIQRSTG、GYHVKANGV)ペプチドで刺激した。Golgiブロック(GolgiPlug 1/100)及び細胞内サイトカイン蓄積のためのインキュベーションの後、細胞を、Aqua染料を使用して生死染色に付した。次いで、細胞を、脾細胞用の抗体 α -CD8-APC-H7(1/100)、 α -CD4-BD-Horizon V450(1/200)、 α -Thy1.2-FITC(1/300)、及び α -CD107aPE-Cy7(1/100)及び肺細胞用の α -CD8-APC-H7(1/100)、 α -CD4-BD-Horizon V450(1/200)、 α -Thy1.2-FITC(1/300)、 α -CD69-PE(1/100)、及び α -CD103-PE-Cy7(1/60)を用いて表面染色した。Cytofix/Cytopermで処理した後、肺細胞を、細胞内で α -IFN γ -APC(1/100)で染色し、脾細胞を更に α -TNF α -PE(1/100)で染色した。最後に、DIVAソフトウェアを使用してBD FACS Ca

10

20

30

40

50

nto IIで細胞を取得し、FlowJoで分析した。

【0652】

結果：

マウスにおける免疫原性試験の結果、例えば、体液性免疫応答について、図20に見ることができる（図20a：抗RSV F IgG、図20b：抗RSV F IgG2a）。一般に、いずれの群も、F-del単独群とF-del+T細胞抗原群との間に有意差なしに体液性免疫応答を誘導した。RSV F-delをコードするmRNAワクチンへのT細胞抗原M、P、N、及びM2-1の追加は、RSV Fに対する免疫応答に影響も妨害もしなかった。これらの知見は、T細胞抗原の共発現が、RSV Fによって誘導された抗体反応に影響しないことを示す。免疫応答は、2回目の免疫感作によってブーストすることができた（49日目の応答を参照）。一般に、IgG2aの力価は、IgG1の力価よりも10倍高く、Th1が主であることを示している。Th2バイアス応答が動物モデルで呼吸器疾患（ERD）の亢進に関連付けられているので、Th1バイアス免疫応答は、潜在的なRSVワクチンの重要な前提条件であると考えられる。

【0653】

図21a及び図21bに示すように、免疫感作したマウスの血清中に特異的抗原IgGが検出され、このことは、適用されたmRNA構築物が特異的な体液性免疫応答を誘導するのに適することを示している。更に、結果は、N及びM2-1の抗原特異的抗体応答の誘導が、28日目に既に検出できることを示すが、一方で、M及びP免疫感作の場合には、追加のワクチン接種が必要である。RSV F共免疫感作後の抗原特異的抗体応答の低下は、免疫量の違いによる可能性がある（5 µg対2.5 µg）。

【0654】

図22から分かるように、LNP配合mRNAワクチン（F、M+F、P+F、N+F、M2-1+F）はいずれも、高いウイルス中和抗体価によって示されるように、RSV特異的機能性抗体の生成をマウスに誘導した。RSV/A2に対する血清中和抗体力価アッセイでは、免疫感作群間に有意差は認められなかった。

【0655】

図23（図23a 肺ICS CD8、図23b 脾臓ICS CD8、図23c 脾臓ICS CD4）から分かるように、RSV F、RSV M2-1、又はその両方を含むワクチンはいずれも、驚くべきことに、F又は特にM2-1に特異的なCD8⁺TRM細胞の増加が観察できたことから、筋肉内免疫時に、肺における組織常在性記憶T細胞（TRM）応答を誘導した。肺のTRM細胞（CD69⁺及びCD103⁺）は、RSV感染を防ぐために提案されているので、肺でのTRM細胞応答の誘導は、潜在的なRSVワクチンにとって好ましい可能性がある。脾細胞分析により、RSV F、特にRSV M2-1による免疫感作が、IFNγ及びTNFを分泌する抗原特異的CD8⁺及びCD4⁺T細胞の増加をもたらすことが明らかとなり、このことは、部位特異的応答に加えて、全身性T細胞応答の誘導を示す。

【0656】

結論として、結果は、RSV M2-1が、RSV Fによって誘導される抗体応答に影響を与えることなく、最も有望なT細胞免疫応答を誘導することを示している。したがって、RSV M2-1と共にRSV FをコードするmRNAを含むワクチンは、RSV感染に対する防御効果を高める可能性がある。

【0657】

実施例13：RSV mRNAワクチン組成物の臨床開発：

RSV mRNAワクチン組成物の安全性と有効性を実証するために、臨床試験（フェーズI）が開始される。臨床開発では、GMP条件下（例えば、国際公開第2016/180430号に記載される手順を使用して）生成したRNAが使用される。

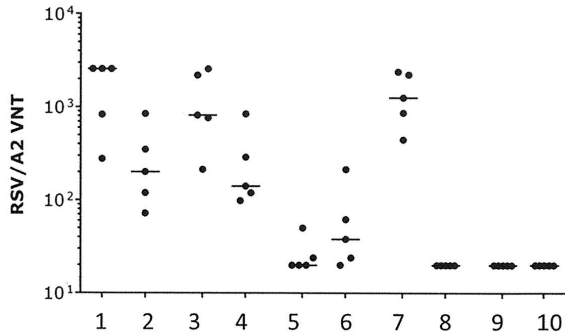
臨床試験では、健康なヒトボランティアのコホートに、好ましいUTRの組合せを含むそれぞれのLNP配合ワクチン組成物を筋肉内注射する。本発明に係るワクチン組成物の安全性プロファイルを評価するために、投与後に対象をモニターする（バイタルシグナル

、ワクチン接種部位の耐容性評価、血液学的分析)。

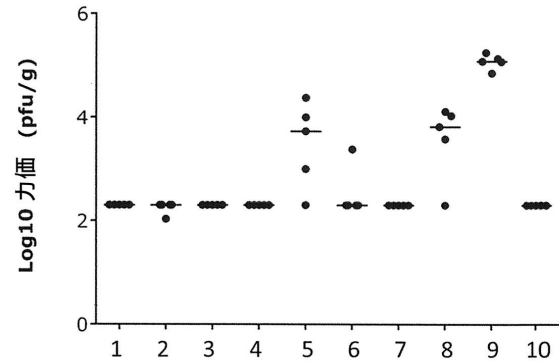
免疫感作の有効性は、ワクチン接種した対象からの血清中のウイルス中和力価 (VNT) の測定によって分析される。血液サンプルは、ベースラインとして0日目と、ワクチン接種が完了後に採取する。血清を、ウイルス中和抗体について分析する。

【図面】

【図 1】

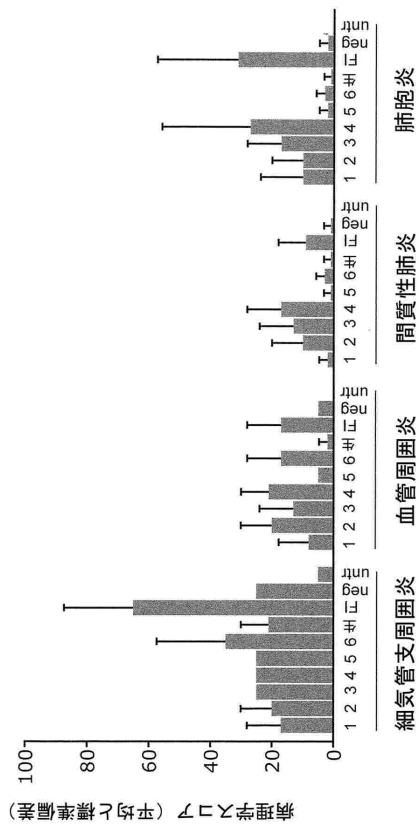


【図 2】

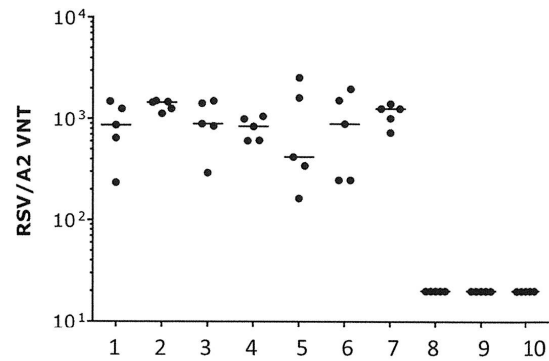


10

【図 3】



【図 4】



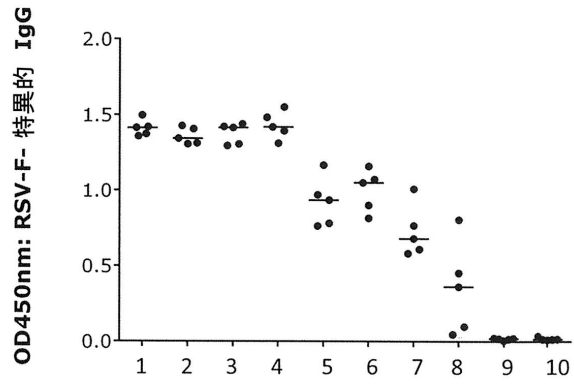
20

30

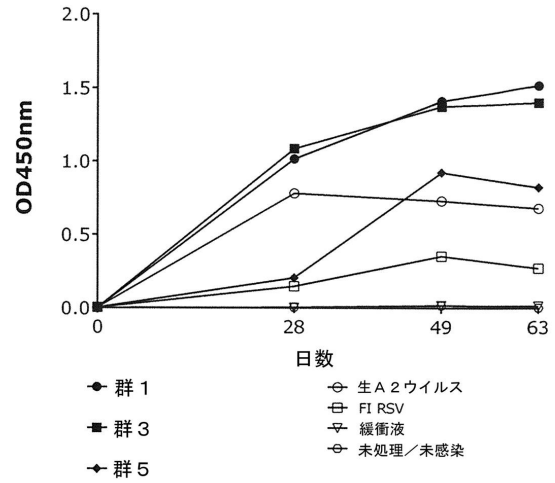
40

50

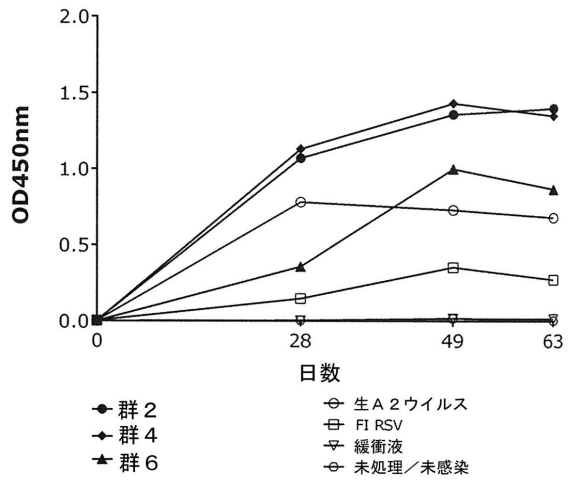
【図 5 a】



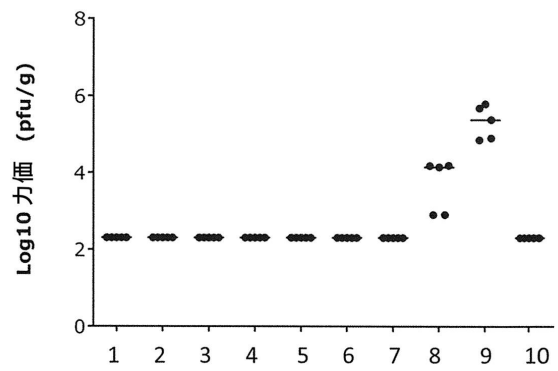
【図 5 b】



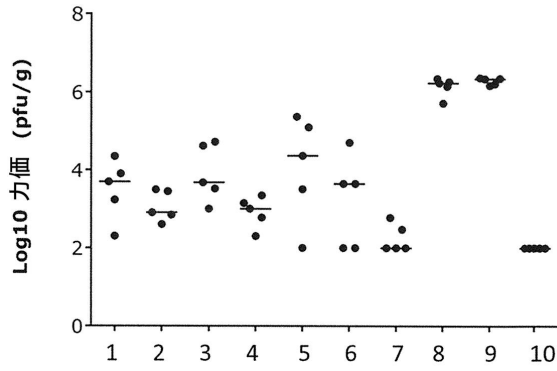
【図 5 c】



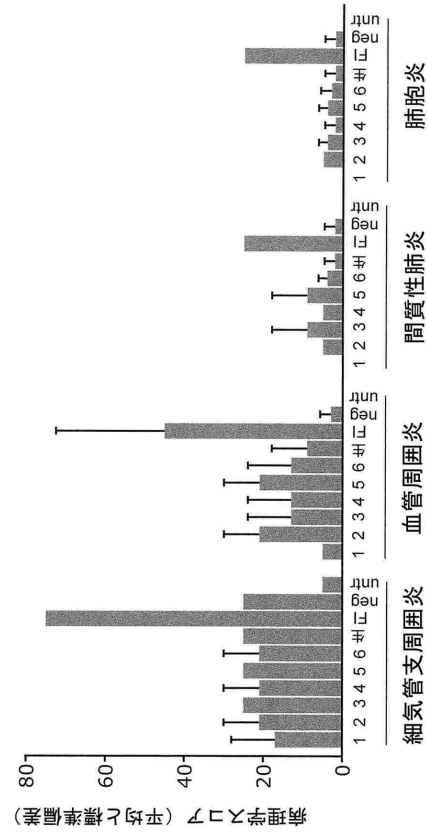
【図 6】



【図 7】



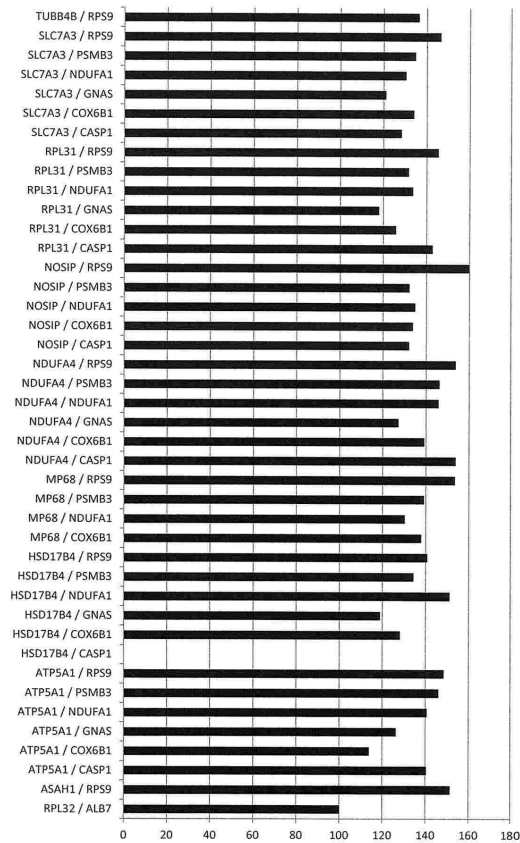
【図 8】



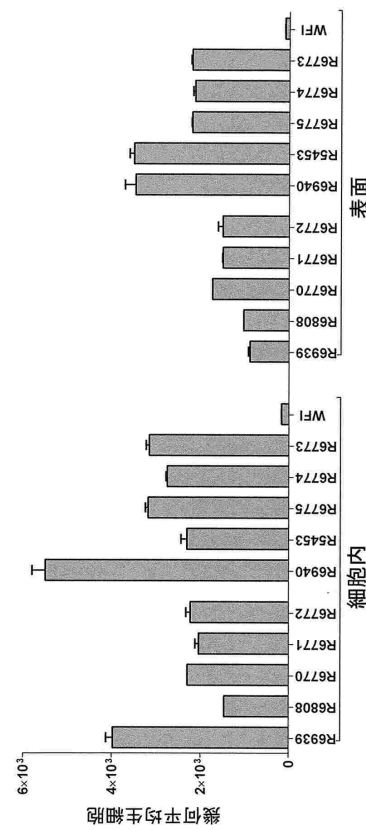
10

20

【図 9】



【図 10 a】

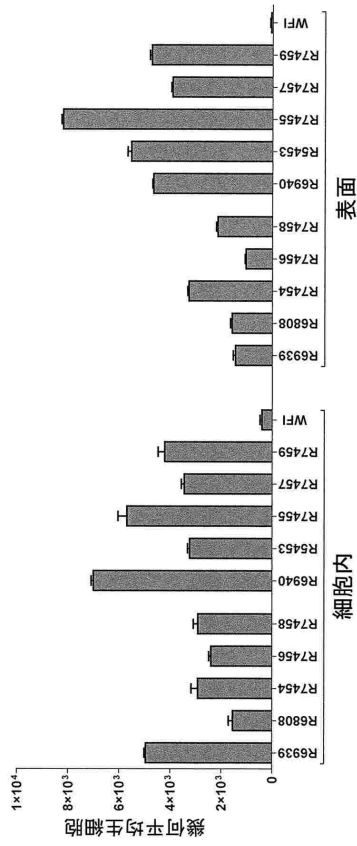


30

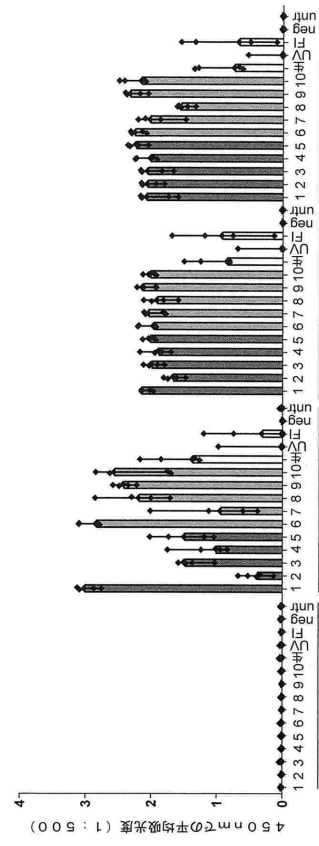
40

50

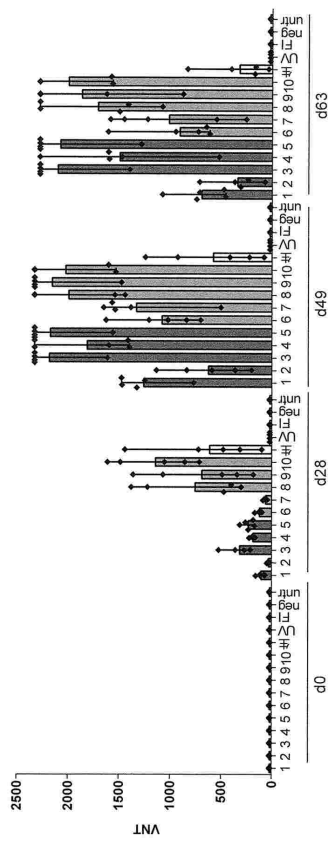
【図 10 b】



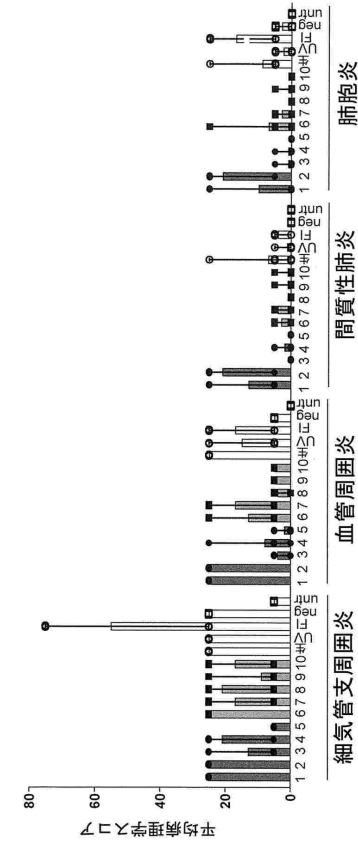
【図 11】



【図 12】



【図 13】



10

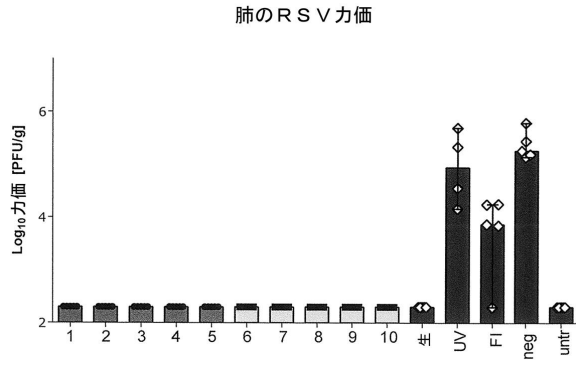
20

30

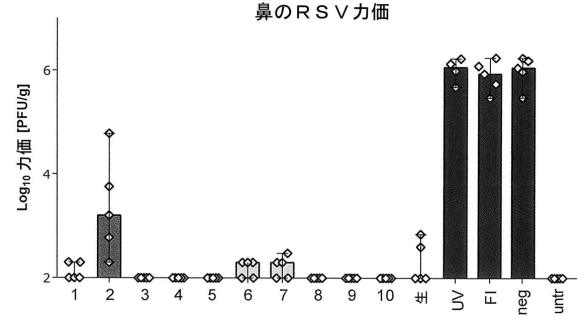
40

50

【図 1 4 a】

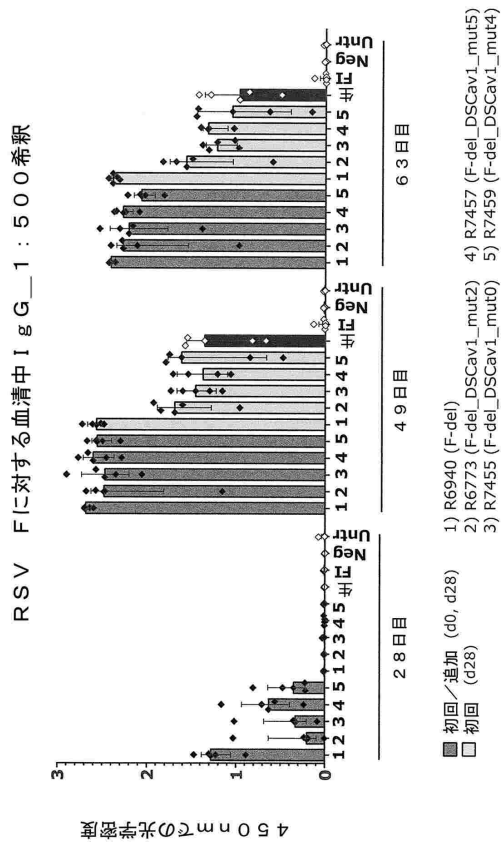


【図 1 4 b】

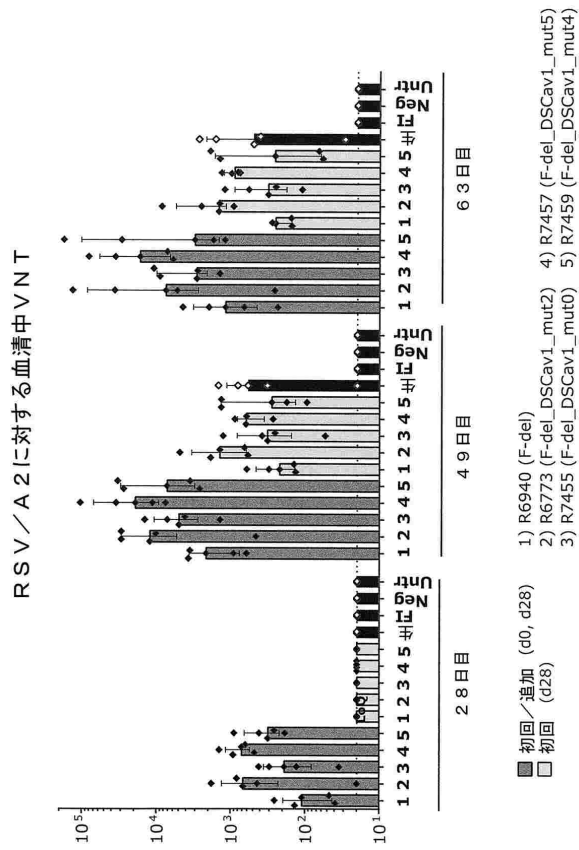


10

【図 1 5】



【図 1 6】



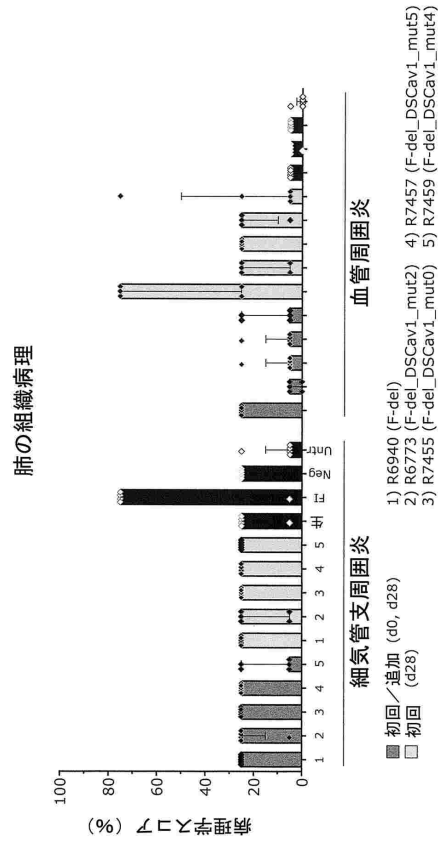
20

30

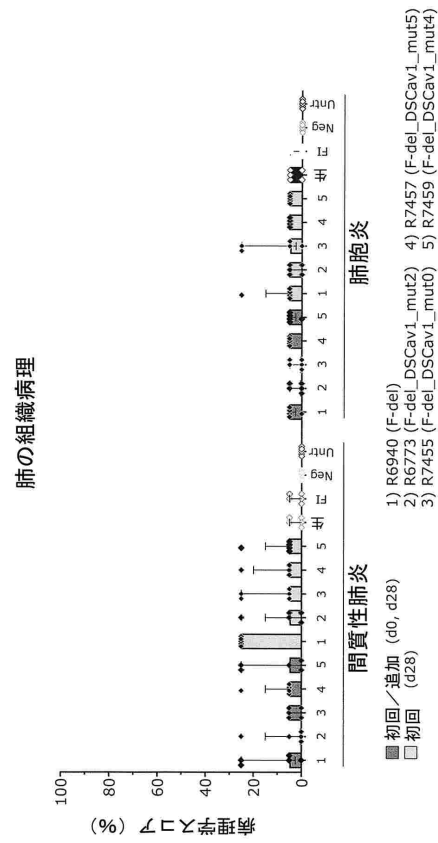
40

50

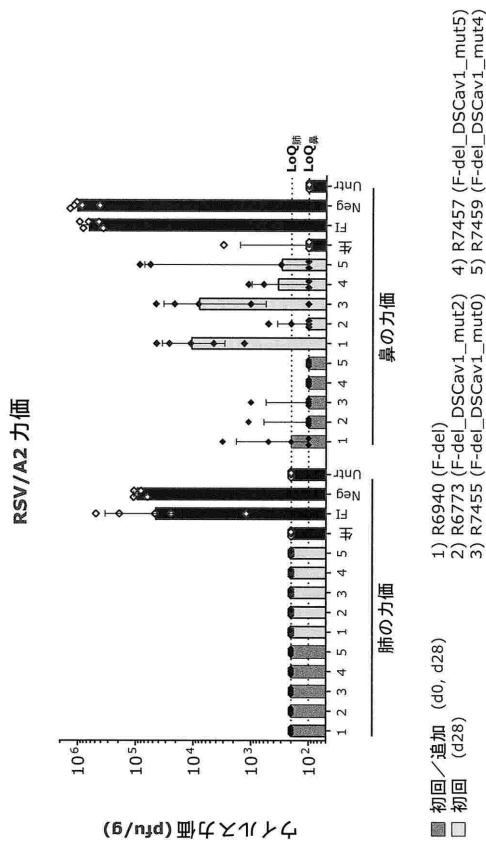
【図 17 a】



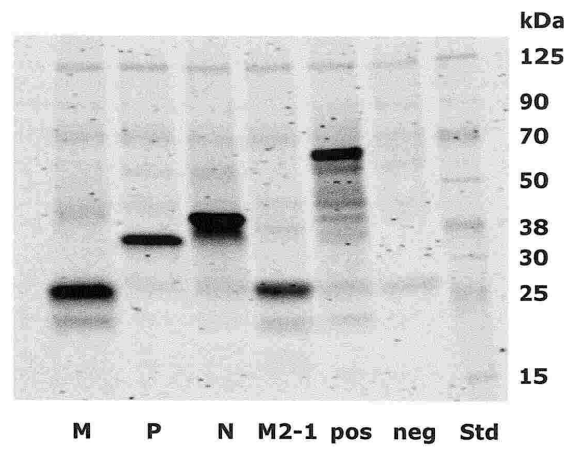
【図 17 b】



【図 18】



【図 19】



10

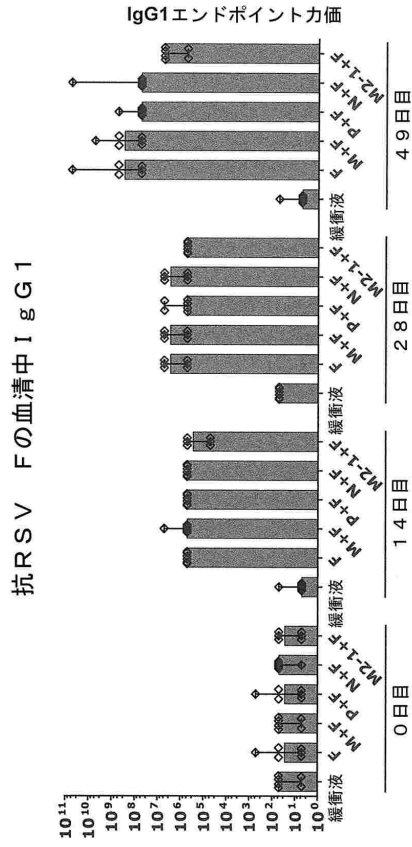
20

30

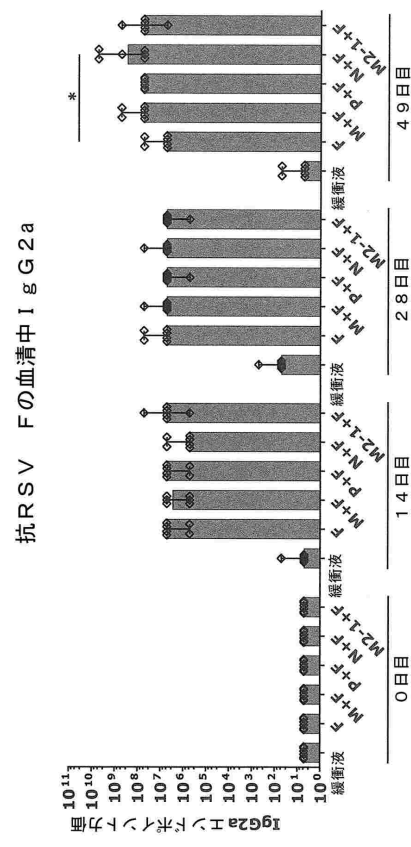
40

50

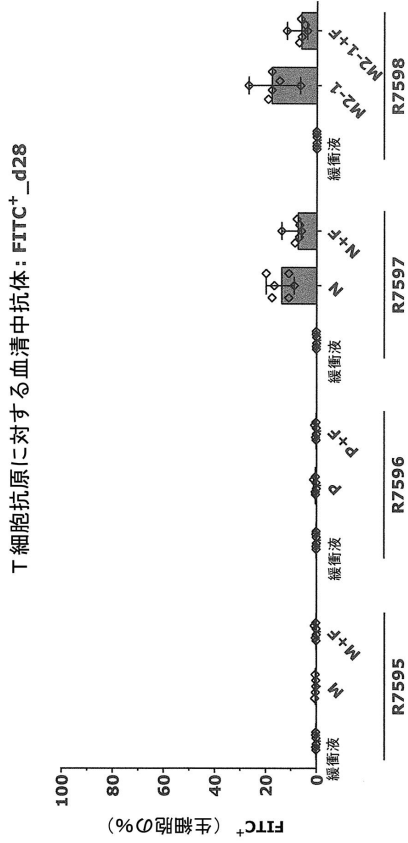
【図 20 a】



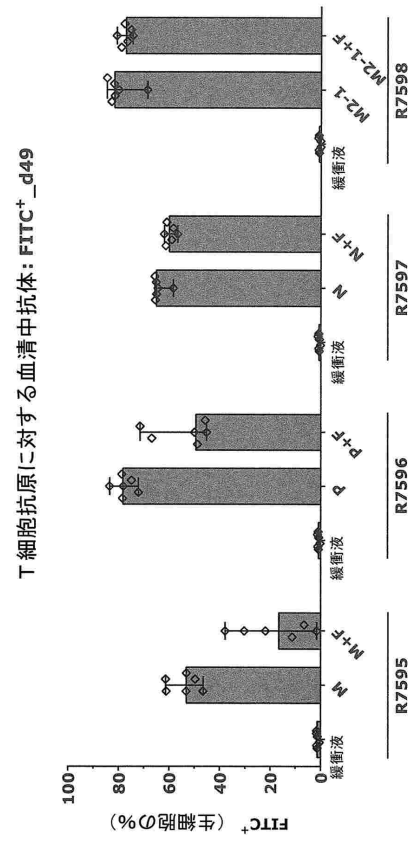
【図 20 b】



【図 21 a】



【図 21 b】



10

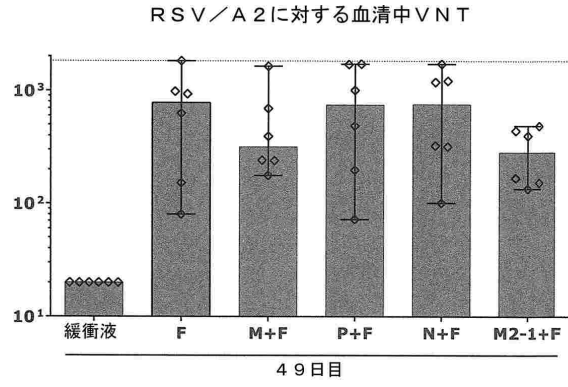
20

30

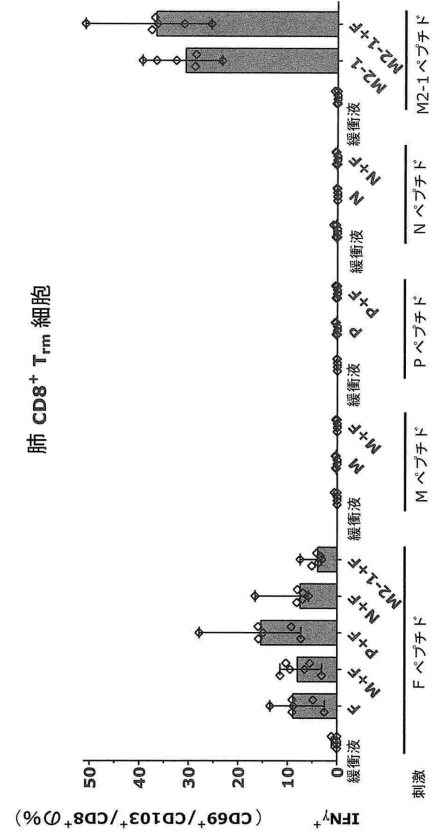
40

50

【図 2 2】



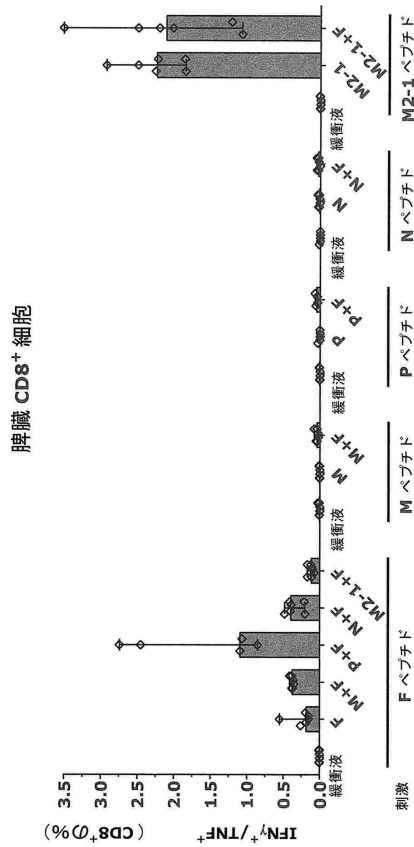
【図 2 3 a】



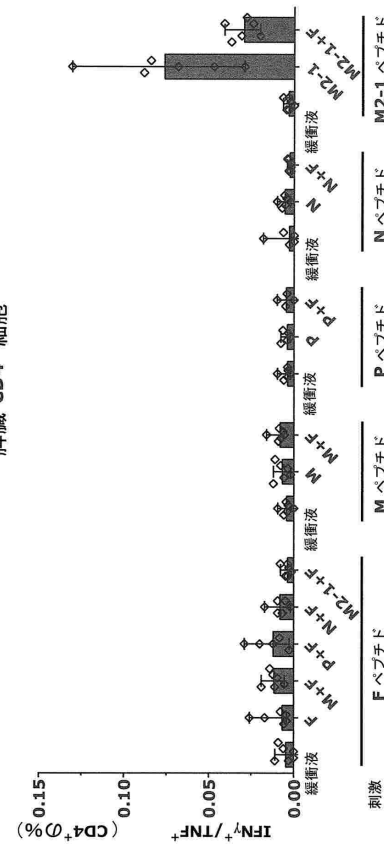
10

20

【図 2 3 b】



【図 2 3 c】



30

40

50

【配列表】
0007613685000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	9/127(2025.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	47/59 (2017.01)	A 6 1 K	47/59	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/295(2006.01)	A 6 1 K	39/295	
C 0 7 K	14/08 (2006.01)	C 0 7 K	14/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 PCT/EP2018/061423

(32)優先日 平成30年5月3日(2018.5.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

前置審査

(72)発明者 ヨハネス・ルッツ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン パウル・エアリッヒ シュトラッセ 15 キュア
バック アーゲー アイピー デパートメント内

(72)発明者 スザンネ・ラウホ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン パウル・エアリッヒ シュトラッセ 15 キュア
バック アーゲー アイピー デパートメント内

(72)発明者 レジーナ・ハイデンライヒ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン パウル・エアリッヒ シュトラッセ 15 キュア
バック アーゲー アイピー デパートメント内

(72)発明者 ベンジャミン・ペトシュ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン パウル・エアリッヒ シュトラッセ 15 キュア
バック アーゲー アイピー デパートメント内

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 特表2016-527909 (JP, A)

国際公開第2018/033254 (WO, A2)

国際公開第2015/024668 (WO, A2)

国際公開第2017/036580 (WO, A1)

国際公開第2013/143700 (WO, A2)

国際公開第2017/212006 (WO, A1)

国際公開第2017/212007 (WO, A1)

国際公開第2017/212008 (WO, A1)

国際公開第2017/212009 (WO, A1)

国際公開第2017/075531 (WO, A1)

国際公開第2015/199952 (WO, A1)

国際公開第2017/062513 (WO, A1)

特表2015-501844 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

C07K

C12Q

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/CAPLUS/REGISTRY (ST

N)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)