(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-542635
(P2024-542635A)
(43)公表日　令和6年11月15日(2024.11.15)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*14/08*	*(2006.01)*	C07K	14/08	ZNA	4B065	
C12N	*15/40*	*(2006.01)*	C12N	15/40		4C086	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C087	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045	
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19			

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全87頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-532179(P2024-532179)
(86)(22)出願日　令和4年11月29日(2022.11.29)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月13日(2024.6.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/080555
(87)国際公開番号　WO2023/102373
(87)国際公開日　令和5年6月8日(2023.6.8)
(31)優先権主張番号　63/284,405
(32)優先日　令和3年11月30日(2021.11.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517055195
サノフィ パスツール インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 １８３７０ ペンシルベニア州 スウィフトウォーター ディスカバリー ドライブ １
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　イヴォン・チャン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヒトメタニューモウイルスワクチン

(57)【要約】
本開示は、抗原性融合前ｈＭＰＶ Ｆポリペプチド、融合前ｈＭＰＶ Ｆポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、ＲＮＡ配列、例えばｍＲＮＡ配列）、抗原性融合前ｈＭＰＶ Ｆポリペプチドを含む組成物、融合前ｈＭＰＶ Ｆポリペプチドをコードする核酸配列を含む組成物、及びｈＭＰＶワクチンを提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子であって、前記融合前Ｆポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位を含む、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子。
【請求項２】
前記融合前Ｆポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換するアミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ$_0$切断部位変異を更に含む、請求項１に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項３】
前記融合前Ｆポリペプチドがシグナルペプチドを含む、請求項１又は２に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項４】
前記融合前Ｆポリペプチドが、任意選択的に８ｘＨｉｓタグ及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグである少なくとも１つのタグ配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項５】
前記融合前Ｆポリペプチドがｆｏｌｄｏｎドメインを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項６】
前記融合前Ｆポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸位置１６０でトレオニンを置換するアミノ酸置換及び配列番号１のアミノ酸位置４６でアスパラギンを置換するアミノ酸置換を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項７】
抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子であって、前記融合前Ｆポリペプチドは膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、
配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ$_0$切断部位変異；
ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位；
異種シグナルペプチド；
８ｘＨｉｓタグ及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグ；並びに
ｆｏｌｄｏｎドメイン
を含む、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子。
【請求項８】
抗原性ヒト融合前メタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子であって、前記融合前Ｆポリペプチドが膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、配列番号１の位置１６０の野生型アミノ酸を置換するアミノ酸置換及び配列番号１の位置４６の野生型アミノ酸を置換するアミノ酸置換を含む、抗原性ヒト融合前メタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子。
【請求項９】
抗原性ヒト融合前メタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子であって、前記融合前Ｆポリペプチドが膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、配列番号１のアミノ酸位置１６０でトレオニンを置換するアミノ酸置換及び配列番号１のアミノ酸位置４６でアスパラギンを置換するアミノ酸置換を含む、抗原性ヒト

融合前メタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子。
【請求項１０】
前記融合前Ｆポリペプチドが、位置１６０のアミノ酸をフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、イソロイシン又はロイシンで置換するアミノ酸置換を含む、請求項８又は９に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１１】
前記融合前Ｆポリペプチドが、位置１６０のアミノ酸をフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換を含む、請求項１０に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１２】
前記融合前Ｆポリペプチドが、位置４６のアミノ酸をバリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン又はプロリンで置換するアミノ酸置換を含む、請求項８～１１のいずれか一項に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１３】
前記融合前Ｆポリペプチドが、位置４６のアミノ酸をバリンで置換するアミノ酸置換を含む、請求項１２に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１４】
前記融合前Ｆポリペプチドが、配列番号７と少なくとも９５％の配列同一性を含む、請求項８に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１５】
前記融合前Ｆポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換するアミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むF_0切断部位変異を更に含む、請求項８～１４のいずれか一項に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１６】
前記融合前Ｆポリペプチドがシグナルペプチドを含む、請求項８～１５のいずれか一項に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１７】
前記融合前Ｆポリペプチドが、任意選択的に８ｘＨｉｓタグ及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグである少なくとも１つのタグ配列を含む、請求項８～１６のいずれか一項に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１８】
前記融合前Ｆポリペプチドがｆｏｌｄｏｎドメインを含む、請求項８～１７のいずれか一項に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド又は核酸分子。
【請求項１９】
抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子であって、前記融合前Ｆポリペプチドは膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、
配列番号１のアミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換Ｔ１６０Ｆ、及び配列番号１のアミノ酸位置４６のアスパラギンをバリンで置換するアミノ酸置換Ｎ４６Ｖ；
配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むF_0切断部位変異；
ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位；
シグナルペプチド；
８ｘＨｉｓタグ及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグ；並びに
ｆｏｌｄｏｎドメイン
を含む、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子。

【請求項２０】
前記ｈＭＰＶがＡ株又はＢ株である、請求項１～１９のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２１】
前記ｈＭＰＶが、Ａ１サブタイプ、Ａ２サブタイプ、Ｂ１サブタイプ、又はＢ２サブタイプである、請求項１～２０のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２２】
前記融合前Ｆポリペプチドが、配列番号３と少なくとも９５％の配列同一性を含むか、又は配列番号３を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２３】
ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はこれをコードする核酸分子であって、前記Ｆポリペプチドが、配列番号７と少なくとも９５％の配列同一性を含む、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はこれをコードする核酸分子。
【請求項２４】
前記Ｆポリペプチドが融合前Ｆポリペプチドである、請求項２３に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２５】
前記Ｆポリペプチドが、抗原性である、請求項２３に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２６】
アミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換Ｔ１６０Ｆ、及びアミノ酸位置４６のアスパラギンをバリンで置換するアミノ酸置換Ｎ４６Ｖを含む、請求項２３に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２７】
前記Ｆポリペプチドが、配列番号７を含む、請求項２３に記載のＦポリペプチド又は核酸分子。
【請求項２８】
請求項２３～２７のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。
【請求項２９】
配列番号８と少なくとも９５％の配列同一性を有するか、又は配列番号８を含む、請求項２８に記載の核酸分子。
【請求項３０】
配列番号１８若しくは配列番号１９と少なくとも９５％の配列同一性を有するか、又は配列番号１８若しくは配列番号１９を含む、請求項２８に記載の核酸分子。
【請求項３１】
請求項２３～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又はそれをコードする核酸分子、又は請求項２８～３０のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、医薬組成物。
【請求項３２】
ワクチンを含む、請求項３１に記載の医薬組成物。
【請求項３３】
請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）。
【請求項３４】
ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド抗原をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であって、前記ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原が、配列番号１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１１のアミノ酸配列からなる、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド抗原をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ

）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）。
【請求項３５】
前記ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原が、融合前Ｆポリペプチドである、請求項３３又は３４に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３６】
前記ＯＲＦがコドン最適化されている、請求項３３～３５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３７】
前記ｍＲＮＡが、少なくとも１つの５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、少なくとも１つの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）及び少なくとも１つのポリアデニル化（ポリ（Ａ））配列を含む、請求項３３～３６のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３８】
前記ｍＲＮＡが、少なくとも１つの化学修飾を含む、請求項３３～３７のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項３９】
前記ｍＲＮＡ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が、化学修飾される、請求項３３～３８のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４０】
前記ＯＲＦ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が、化学修飾される、請求項３３～３９のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４１】
前記化学修飾が、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、２－チオウリジン、４’－チオウリジン、５－メチルシトシン、２－チオ－ｌ－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－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－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、４－チオ－シュードウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、５－メチルウリジン、５－メチルウリジン、５－メトキシウリジン及び２’－Ｏ－メチルウリジンからなる群から選択される、請求項３７～３９のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４２】
前記化学修飾が、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－メチルシトシン、５－メトキシウリジン及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項４１に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４３】
前記化学修飾がＮ１－メチルシュードウリジンである、請求項４１に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４４】
前記ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に製剤化されている、請求項３３～４３のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４５】
前記ＬＮＰが少なくとも一つのカチオン性脂質を含む、請求項４４に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４６】
前記カチオン性脂質が生分解性である、請求項４５に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４７】
前記カチオン性脂質が生分解性ではない、請求項４５に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４８】

前記カチオン性脂質が切断可能である、請求項４５に記載のｍＲＮＡ。
【請求項４９】
前記カチオン性脂質が切断可能でない、請求項４５に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５０】
前記カチオン性脂質が、ＯＦ－０２、ｃＫＫ－Ｅ１０、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１０－ＤＳ－３－Ｅ１８－１、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０及びＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－３－Ｅ１４からなる群から選択される、請求項４５に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５１】
前記カチオン性脂質がｃＫＫ－Ｅ１０である、請求項５０［９］に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５２】
前記カチオン性脂質が、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０である、請求項５０に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５３】
前記ＬＮＰが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲート（ＰＥＧ化）脂質、コレステロール系脂質及びヘルパー脂質を更に含む、請求項４４～５２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５４】
前記ＬＮＰが、
３５％～５５％のモル比のカチオン性脂質、
０．２５％～２．７５％のモル比のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲート（ＰＥＧ化）脂質、
２０％～４５％のモル比のコレステロール系脂質、及び
５％～３５％のモル比のヘルパー脂質
を含み、
前記モル比の全ては、前記ＬＮＰの総脂質含有量に対するものである、請求項４４～５２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５５】
前記ＬＮＰが、
４０％のモル比のカチオン性脂質、
１．５％のモル比のＰＥＧ化脂質、
２８．５％のモル比のコレステロール系脂質、及び
３０％のモル比のヘルパー脂質
を含む、請求項５４に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５６】
前記ＰＥＧ化脂質が、ジミリストイル－ＰＥＧ２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）又は２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド（ＡＬＣ－０１５９）である、請求項５３～５５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５７】
前記コレステロール系脂質がコレステロールである、請求項５３～５５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５８】
前記ヘルパー脂質が、１，２－ジオレオイル－ＳＮ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）又は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、請求項５３～５５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項５９】
前記ＬＮＰが、
４０％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０、
１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、
２８．５％のモル比のコレステロール、及び

３０％のモル比のＤＯＰＥ
を含む、請求項４５～５５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項６０】
前記ＬＮＰが、
４０％のモル比のｃＫＫ－Ｅ１０、
１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、
２８．５％のモル比のコレステロール、及び
３０％のモル比のＤＯＰＥ
を含む、請求項４５～５５のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項６１】
前記ＬＮＰが３０ｎｍ～２００ｎｍの平均直径を有する、請求項４４～６０［９］のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ。
【請求項６２】
前記ＬＮＰが８０ｎｍ～１５０ｎｍの平均直径を有する、請求項６１に記載のｍＲＮＡ。
【請求項６３】
請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡを含む医薬組成物。
【請求項６４】
ワクチンを含む、請求項６３に記載の医薬組成物。
【請求項６５】
請求項３２又は６４に記載のワクチンを対象に投与することを含む、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法。
【請求項６６】
前記対象が、タンパク質ｈＭＰＶワクチンを投与された対象と比較して、前記ワクチンの投与後にｈＭＰＶに対する中和抗体の同等の血清濃度を有する、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記タンパク質ｈＭＰＶワクチンがアジュバントと同時投与される、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記ワクチンが、既存のｈＭＰＶ免疫を有する対象において中和抗体の血清濃度を増加させる、請求項６５に記載の方法。
【請求項６９】
請求項３２又は６４に記載のワクチンを対象に投与することを含む、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発すること、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護することにおいて使用するためのワクチン。
【請求項７０】
ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するため、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するための医薬品の製造における、請求項３２又は６４に記載のワクチンの使用。
【請求項７１】
免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、前記対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量の請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量の請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ、又は予防有効量の請求項３２、６４、及び６９のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法。
【請求項７２】
ｈＭＰＶ感染を予防する、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、前記対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量の請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量の請求

項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡ、又は予防有効量の請求項３２、６４、及び６９のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、ｈＭＰＶ感染を予防する、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法。

【請求項７３】

請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド若しくは核酸分子、請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡの予防有効量、又は請求項３２、６４、及び６９のいずれか一項に記載のワクチンの、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のための、任意選択的に請求項７１又は７２に記載の方法における、使用。

【請求項７４】

治療を必要とする対象を治療する際に、任意選択的に請求項７１又は７２に記載の方法における、使用のための、請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子、請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡの予防有効量、又は請求項３２、６４及び６９のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項７５】

請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡの予防有効量、又は請求項３２、６４若しくは６９のいずれか一項に記載のワクチンを含む容器を含むキットであって、任意選択で、前記容器がバイアル又は充填済シリンジ若しくは注射器である、キット。

【請求項７６】

ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド抗原又はこれをコードする核酸分子を含むワクチンであって、前記Ｆポリペプチドが、配列番号７と少なくとも９５％の同一性を有するか、又は配列番号７のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含む、ワクチン。

【請求項７７】

前記ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドが、融合前Ｆポリペプチドである、請求項７６に記載のワクチン。

【請求項７８】

請求項７６又は７７に記載のワクチンを対象に投与することを含む、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法。

【請求項７９】

前記ワクチンがアジュバントと同時投与される、請求項７７に記載の方法。

【請求項８０】

前記ワクチンが追加のワクチンと組み合わせて投与される、請求項７８又は７９に記載の方法。

【請求項８１】

前記追加のワクチンが呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）ワクチン又はインフルエンザワクチンである、請求項８０に記載の方法。

【請求項８２】

前記対象がヒトである、請求項７８～８１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８３】

前記ヒト対象が乳児、幼児又は高齢成人である、請求項８２に記載の方法。

【請求項８４】

前記ワクチンが中和抗体の血清濃度を増加させ、前記対象が既存のｈＭＰＶ免疫を有する、請求項７８～８３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８５】

請求項７６又は７７に記載のワクチンを対象に投与することを含む、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発すること、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護することにおいて使用するためのワクチン。

【請求項８６】

ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するため、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するための医薬品の製造における、請求項７６又は７７に記載のワクチンの使用。
【請求項８７】
免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、前記対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下又は皮内に、予防有効量の請求項７６又は７７に記載のワクチンを投与することを含む、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法。
【請求項８８】
ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、前記対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量の請求項７６又は７７に記載のワクチンを投与することを含む、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法。
【請求項８９】
任意選択的に請求項８７又は８８に記載の方法において、治療を必要とする対象を治療する際に使用するための医薬品を製造するための、請求項７６又は７７に記載のワクチンの使用。
【請求項９０】
任意選択的に請求項８７又は８８に記載の方法において、治療を必要とする対象の治療に使用するための、請求項７６又は７７に記載のワクチン。
【請求項９１】
請求項７６又は７７に記載のワクチンの単回使用用量又は複数回使用用量を含む容器を含むキットであって、任意選択で、前記容器がバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である、キット。
【請求項９２】
請求項１～２７のいずれか一項に記載のＦポリペプチド若しくは核酸分子、又は請求項３３～６２のいずれか一項に記載のｍＲＮＡをコードする発現ベクター。
【請求項９３】
請求項９２に記載の発現ベクターを含む細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０２１年１１月３０日に出願された米国仮出願第６３／２８４，４０５号の利益を主張し、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれる。
【０００２】
ＣＲＡＤＡ宣言
本発明は、保健福祉省の機関である国立衛生研究所との共同研究開発契約の履行において創出された。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）は、特に小児、免疫無防備状態の患者、及び高齢者における急性呼吸器感染の主な原因である。トリメタニューモウイルスサブタイプＣと密接に関連しているｈＭＰＶは、少なくとも６５年間循環しており、ほぼ全ての子供が５歳までにｈＭＰＶに感染する。しかしながら、免疫は不完全であり、再感染は成人期を通して起こる。症状は、軽度（例えば、咳、鼻漏及び発熱）から重度（例えば、細気管支炎及び肺炎）に及ぶ、他の呼吸器ウイルス感染症の症状と同様である。
【０００４】
現在、高い疾患負荷にもかかわらず、ｈＭＰＶに対する認可されたワクチン又は治療薬はない。利用可能な有効なｈＭＰＶワクチン又は治療薬が不足しているため、ｈＭＰＶ感染の強力な中和のために強い免疫応答を誘発するｈＭＰＶワクチンが必要とされている。

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
一態様では、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子が提供され、当該融合前Ｆポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位を含む。
【０００６】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ０切断部位変異を更に含む。
【０００７】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドはシグナルペプチドを含む。
【０００８】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、ポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグであってもよい少なくとも１つのタグ配列を含む。
【０００９】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、ｆｏｌｄｏｎドメインを含む。
【００１０】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号１の位置１６０の野生型アミノ酸を置換するアミノ酸置換、及び配列番号１の位置４６の野生型アミノ酸を置換するアミノ酸置換を含む。
【００１１】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸位置１６０でトレオニンを置換するアミノ酸置換、及び配列番号１のアミノ酸位置４６でアスパラギンを置換するアミノ酸置換を含む。
【００１２】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、位置１６０のアミノ酸をフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、イソロイシン、又はロイシンで置換するアミノ酸置換を含む。ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、位置１６０のアミノ酸をフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換を含む。
【００１３】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、位置４６のアミノ酸をバリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、又はプロリンで置換するアミノ酸置換を含む。ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、位置４６のアミノ酸をバリンで置換するアミノ酸置換を含む。
【００１４】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ株又はＢ株である。ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ１サブタイプ、Ａ２サブタイプ、Ｂ１サブタイプ又はＢ２サブタイプである。
【００１５】
ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９５％の配列同一性を含むか、又は配列番号３を含む。
【００１６】
ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドをコードするオープンリーディングフ

レーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が提供される。

【００１７】

ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００１８】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００１９】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンの使用は、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のために提供される。

【００２０】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。

【００２１】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンを含む容器を含むキットが提供され、任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。

【００２２】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードする発現ベクターが提供される。

【００２３】

ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。

【００２４】

別の態様では、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子が提供され、当該融合前Ｆポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、及び配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むF_0切断部位変異；ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位；異種シグナルペプチド；ポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグ；並びにｆｏｌｄｏｎドメインを含む。

【００２５】

別の態様では、抗原性ヒト融合前メタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子が提供され、当該融合前Ｆポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、配列番号１のアミノ酸位置１６０のトレオニンを置換するアミノ酸置換及び配列番号１のアミノ酸位置４６のアスパラギンを置換するアミノ酸置換を含む。

【００２６】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、アミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニン、トリプトファン、又はチロシンで置換するアミノ酸置換を含む。ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、アミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換Ｔ１６０Ｆを含む。

【００２７】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、アミノ酸位置４６のアスパラギンをバリン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、又はプロリンで置

換するアミノ酸置換を含む。ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、アミノ酸位置４６のアスパラギンをバリンで置換するアミノ酸置換Ｎ４６Ｖを含む。

【００２８】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号７と少なくとも９５％の配列同一性を含む。

【００２９】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ０切断部位変異を更に含む。

【００３０】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドはシグナルペプチドを含む。

【００３１】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、ポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグであってもよい少なくとも１つのタグ配列を含む。

【００３２】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、ｆｏｌｄｏｎドメインを含む。

【００３３】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ株又はＢ株である。ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ１サブタイプ、Ａ２サブタイプ、Ｂ１サブタイプ又はＢ２サブタイプである。

【００３４】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９５％の配列同一性を含むか、又は配列番号３を含む。

【００３５】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が提供される。

【００３６】

ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００３７】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００３８】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンの使用は、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のために提供される。

【００３９】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。

【００４０】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンを含む容器を含むキットが提供され、

任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。

【００４１】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードする発現ベクターが提供される。

【００４２】

ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。

【００４３】

別の態様では、抗原性ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）融合前Ｆポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子が提供され、当該融合前Ｆポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、配列番号１のアミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニンに置換するアミノ酸置換Ｔ１６０Ｆ、及び配列番号１のアミノ酸位置４６のアスパラギンをバリンに置換するアミノ酸置換Ｎ４６Ｖ；配列番号１のアミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンに置換し、及び配列番号１のアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンに置換する、アミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むF_0切断部位変異；ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位；シグナルペプチド；ポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐＩＩタグ；並びにｆｏｌｄｏｎドメインを含む。

【００４４】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ株又はＢ株である。ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶは、Ａ１サブタイプ、Ａ２サブタイプ、Ｂ１サブタイプ又はＢ２サブタイプである。

【００４５】

ある種の例示的な実施形態では、当該融合前Ｆポリペプチドは、配列番号３と少なくとも９５％の配列同一性を含むか、又は配列番号３を含む。

【００４６】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が提供される。

【００４７】

ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００４８】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【００４９】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンの使用は、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のために提供される。

【００５０】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。

【００５１】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンを含む容器を含むキットが提供され、任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。

【００５２】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードす

る発現ベクターが提供される。

【００５３】

ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。

【００５４】

別の態様では、配列番号７と少なくとも９５％の配列同一性を含む、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド、又はこれをコードする核酸分子が提供される。

【００５５】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドは、融合前Ｆポリペプチドである。

【００５６】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドは抗原性である。

【００５７】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドは、アミノ酸位置１６０のトレオニンをフェニルアラニンで置換するアミノ酸置換Ｔ１６０Ｆ、及びアミノ酸位置４６のアスパラギンをバリンで置換するアミノ酸置換Ｎ４６Ｖを含む。

【００５８】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドは配列番号７を含む。

【００５９】

ある種の例示的な実施形態では、上記態様又は上記実施形態のいずれかのポリペプチドのいずれかをコードする核酸分子が提供される。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は、配列番号８と少なくとも９５％の配列同一性を有する。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は配列番号８を含む。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は、配列番号１８と少なくとも９５％の配列同一性を有する。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は配列番号１８を含む。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は、配列番号１９と少なくとも９５％の配列同一性を有する。ある種の例示的な実施形態では、核酸分子は配列番号１９を含む。

【００６０】

ある種の例示的な実施形態では、上記の実施形態のポリペプチドのいずれか、又はそれをコードする核酸分子のいずれかを含む医薬組成物が提供される。ある種の例示的な実施形態では、医薬組成物はワクチンである。

【００６１】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法であって、ワクチンを対象に投与することを含む方法が提供される。

【００６２】

ある種の例示的な実施形態では、対象は、タンパク質ｈＭＰＶワクチンを投与された対象と比較して、ワクチンの投与後にｈＭＰＶに対する中和抗体の同等の血清濃度を有する。ある種の例示的な実施形態では、タンパク質ｈＭＰＶワクチンは、アジュバントと同時投与される。

【００６３】

ある種の例示的な実施形態では、ワクチンは、既存のｈＭＰＶ免疫を有する対象において中和抗体の血清濃度を増加させる。

【００６４】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するのに使用するためのワクチンが提供され、ワクチンを対象に投与することを含む。

【００６５】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するため、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するための医薬品の製造におけるワクチンの使用が提供される。

【００６６】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチドをコードするオープンリーディングフ

レーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が提供される。
【００６７】
ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。
【００６８】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。
【００６９】
ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンの使用は、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のために提供される。
【００７０】
ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。
【００７１】
ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンを含む容器を含むキットが提供され、任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。
【００７２】
ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードする発現ベクターが提供される。
【００７３】
ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。
【００７４】
別の態様では、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド抗原をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が提供され、ここで、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原は、配列番号１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１１のアミノ酸配列からなる。
【００７５】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原は、融合前Ｆポリペプチドである。
【００７６】
ある種の例示的な実施形態では、ＯＲＦはコドン最適化されている。
【００７７】
ある種の例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、少なくとも１つの５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、少なくとも１つの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）及び少なくとも１つのポリアデニル化（ポリ（Ａ））配列を含む。
【００７８】
ある種の例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、少なくとも１つの化学修飾を含む。
【００７９】
ある種の例示的な実施形態では、ｍＲＮＡ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が化学修飾される。
【００８０】
ある種の例示的な実施形態では、ＯＲＦ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％

、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が化学修飾される。

【００８１】

ある種の例示的な実施形態では、化学修飾は、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、２－チオウリジン、４’－チオウリジン、５－メチルシトシン、２－チオ－ｌ－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－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－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、４－チオ－シュードウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、５－メチルウリジン、５－メチルウリジン、５－メトキシウリジン及び２’－Ｏ－メチルウリジンからなる群から選択される。ある種の例示的な実施形態では、化学修飾は、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－メチルシトシン、５－メトキシウリジン及びそれらの組合せからなる群から選択される。ある種の例示的な実施形態では、化学修飾は、Ｎ１－メチルシュードウリジンである。

【００８２】

ある種の例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に製剤化される。

【００８３】

ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、少なくとも１つのカチオン性脂質を含む。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は生分解性である。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、生分解性ではない。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、切断可能である。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は切断可能ではない。

【００８４】

ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、ＯＦ－０２、ｃＫＫ－Ｅ１０、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１０－ＤＳ－３－Ｅ１８－１、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０及びＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－３－Ｅ１４からなる群から選択される。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、ｃＫＫ－Ｅ１０である。ある種の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０である。

【００８５】

ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲート（ＰＥＧ化）脂質、コレステロール系脂質及びヘルパー脂質を更に含む。

【００８６】

ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のカチオン性脂質；０．２５％～２．７５％のモル比のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲート（ＰＥＧ化）脂質；２０％～４５％のモル比のコレステロール系脂質；及び５％～３５％のモル比のヘルパー脂質を含み、全てのモル比は、ＬＮＰの総脂質含有量に対するものである。

【００８７】

ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のカチオン性脂質、１．５％のモル比のＰＥＧ化脂質、２８．５％のモル比のコレステロール系脂質及び３０％のモル比のヘルパー脂質を含む。

【００８８】

ある種の例示的な実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、ジミリストイル－ＰＥＧ２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）又は２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド（ＡＬＣ－０１５９）である。

【００８９】

ある種の例示的な実施形態では、コレステロール系脂質は、コレステロールである。
【００９０】
ある種の例示的な実施形態では、ヘルパー脂質は、１，２－ジオレオイル－ＳＮ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）又は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。
【００９１】
ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０、１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、２８．５％のモル比のコレステロール及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【００９２】
ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のｃＫＫ－Ｅ１０、１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、２８．５％のモル比のコレステロール及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【００９３】
ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、３０ｎｍ～２００ｎｍの平均直径を有する。ある種の例示的な実施形態では、ＬＮＰは、８０ｎｍ～１５０ｎｍの平均直径を有する。
【００９４】
ある種の例示的な実施形態では、ｍＲＮＡを含む医薬組成物が提供される。ある種の例示的な実施形態では、医薬組成物はワクチンを含む。
【００９５】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法であって、ワクチンを対象に投与することを含む方法が提供される。
【００９６】
ある種の例示的な実施形態では、対象は、タンパク質ｈＭＰＶワクチンを投与された対象と比較して、ワクチンの投与後にｈＭＰＶに対する中和抗体の同等の血清濃度を有する。ある種の例示的な実施形態では、タンパク質ｈＭＰＶワクチンは、アジュバントと同時投与される。
【００９７】
ある種の例示的な実施形態では、ワクチンは、既存のｈＭＰＶ免疫を有する対象において中和抗体の血清濃度を増加させる。
【００９８】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するのに使用するためのワクチンが提供され、ワクチンを対象に投与することを含む。
【００９９】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するため、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するための医薬品の製造におけるワクチンの使用が提供される。
【０１００】
ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。
【０１０１】
ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のＦポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又は予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。
【０１０２】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンの使用は、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品の製造のために提供される。

【０１０３】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。

【０１０４】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド又は核酸分子の単回使用用量又は複数回使用用量、予防有効量のｍＲＮＡ、又はワクチンを含む容器を含むキットが提供され、任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。

【０１０５】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードする発現ベクターが提供される。

【０１０６】

ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。

【０１０７】

別の態様では、ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）Ｆポリペプチド抗原又はこれをコードする核酸分子を含むワクチンが提供され、ここでＦポリペプチドは、配列番号７と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は配列番号７のアミノ酸配列からなる。

【０１０８】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、融合前Ｆポリペプチドである。

【０１０９】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法であって、ワクチンを対象に投与することを含む方法が提供される。

【０１１０】

ある種の例示的な実施形態では、ワクチンはアジュバントと同時投与される。ある種の例示的な実施形態では、ワクチンは、追加のワクチンと組み合わせて投与される。ある種の例示的な実施形態では、追加のワクチンは、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）ワクチン又はインフルエンザワクチンである。

【０１１１】

ある種の例示的な実施形態では、対象はヒトである。ある種の例示的な実施形態では、ヒト対象は、乳児、幼児、又は高齢者である。

【０１１２】

ある種の例示的な実施形態では、ワクチンは中和抗体の血清濃度を増加させ、対象は既存のｈＭＰＶ免疫を有する。

【０１１３】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するか、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するのに使用するためのワクチンが提供され、ワクチンを対象に投与することを含む。

【０１１４】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するため、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するための医薬品の製造におけるワクチンの使用が提供される。

【０１１５】

ある種の例示的な実施形態では、免疫応答の誘発を必要とする対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【０１１６】

ある種の例示的な実施形態では、ｈＭＰＶ感染を予防するか、又はｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減する方法であって、対象に、任意選択的に筋肉内、鼻腔内、静脈内、皮下、又は皮内に、予防有効量のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【０１１７】

ある種の例示的な実施形態では、治療を必要とする対象の治療に使用するための医薬品を製造するためのワクチンの使用が提供される。

【０１１８】

ある種の例示的な実施形態では、ワクチンは、治療を必要とする対象の治療に使用するために提供される。

【０１１９】

ある種の例示的な実施形態では、ワクチンの単回使用用量又は複数回使用用量を含む容器を含むキットが提供され、任意選択的に容器はバイアル又は充填済シリンジ又は注射器である。

【０１２０】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆポリペプチド、核酸分子、又はｍＲＮＡをコードする発現ベクターが提供される。

【０１２１】

ある種の例示的な実施形態では、発現ベクターを含む細胞が提供される。

【０１２２】

本開示の上記及び他の特徴及び利点は、添付の図面と併せて、例示的な実施形態の以下の詳細な説明からより詳細に理解されるであろう。この特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも１つの図面を含む。カラー図面を伴うこの特許又は特許出願公開の写しは、請求及び必要な料金の支払いに応じて特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【０１２３】

【図１】２つの例示的な構築物、Ｄ１８５Ｐ及びＴ１６０＿Ｎ４６Ｖとして示される２１個の候補ｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原のパネルの設計上の考慮事項を示す図である。構築物Ｄ１８５Ｐは、様々な新規構築物の活性を測定するためのベンチマーク参照として使用される。「（ｍｕｔ）」＝網掛けの「ＥＮＰＲＲＲＲ」アミノ酸配列及び網掛けの「Ｐ」、網掛けの「Ｖ」及び網掛けの「Ｆ」単一のアミノ酸；「リンカー」＝太字、下線付きの「ＧＧＧＧＳ」、「ＧＲＳ」及び「Ｇ」アミノ酸配列；「ｆｏｌｄｏｎ」＝下線付き「ＧＹＩＰＥＡＰＲＤＧＱＡＹＶＲＫＤＧＥＷＶＬＬＳＴＦＬ」アミノ酸配列；「８ｘＨＩＳ」＝網掛けの「ＨＨＨＨＨＨＨＨ」アミノ酸配列；「ＳｔｒｅｐＩＩ」＝網掛けの「ＳＡＷＳＨＰＱＦＥＫ」配列。

【図２】０日目、２１日目及び３５日目に測定された４つのｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原タンパク質構築物に対するマウスＩｇＧ抗体価を示す（各時点で左から右に順に列挙したデータ点は以下の通りである）：（１）Ａ２－Ｆ　Ｄ１８５Ｐ、（２）Ａ２－Ｆ　Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ、（３）Ａ２－Ｆ　Ｋ１３８Ｆ、及び（４）Ａ２－Ｆ　Ｇ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆ、並びに対照：ｈＭＰＶ（５）Ａ１－Ｆ　ｐｒｅ－Ｆロット１、（６）Ａ１－Ｆ　ｐｒｅ－Ｆロット２、（７）Ａ１－Ｆ　ｐｏｓｔＦ、及び（８）Ｂ２　ｐｒｅ－Ｆ。

【図３】４つのｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原タンパク質構築物に対して２１日目及び３５日目に測定されたマウスｈＭＰＶマイクロ中和抗体価を示す図である。（１）Ａ２－Ｆ　Ｄ１８５Ｐ、（２）Ａ２－Ｆ　Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ、（３）Ａ２－Ｆ　Ｋ１３８Ｆ、及び（４）Ａ２－Ｆ　Ｇ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆ並びに対照：ｈＭＰＶ（５）Ａ１　ｐｒｅ－Ｆロット１、（６）Ａ１　ｐｒｅ－Ｆロット２、（７）Ａ１　ｐｏｓｔＦ、及び（８）Ｂ２　ｐｒｅ－Ｆ。

【図４】参照Ａ１タンパク質、Ａ１－Ａ１８５Ｐ及びＡ１－ｐｏｓｔＦ並びにＡ２タンパク質抗原候補、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＡ２－Ｄ１８５ＰについてのＳＥＣ－ＭＡＬＳ結果を示す図である。

【図５】ｎａｎｏＤＳＦによって測定されたＡ１－ｐｒｅ－Ｆ及びＡ１－ｐｏｓｔ－Ｆに

ついての［蛍光発光３３０及び３５０ｎｍでの］代表的な融解曲線（上のパネル）、平滑化された一次導関数曲線（中央のパネル）、及び光散乱［ｍＡＵ］（下のパネル）を示す図である。

【図６】ｎａｎｏＤＳＦによって測定された、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物に由来するタンパク質試料についての［蛍光発光３３０及び３５０ｎｍでの］代表的な融解曲線（上のパネル）並びに平滑化された一次導関数曲線（中央のパネル）及び光散乱［ｍＡＵ］（下のパネル）を示す図である。

【図７】０日目、２１日目及び３５日目に測定されたＬＮＰと製剤化されたｈＭＰＶ融合前Ｆ　ｍＲＮＡ構築物、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ又はＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖのいずれかの投与時のマウスｈＭＰＶ　Ｆ抗原ＩｇＧ抗体価を示す図である。

【図８】０日目、２１日目及び３５日目に測定されたＬＮＰと製剤化されたｈＭＰＶ融合前Ｆ　ｍＲＮＡ構築物、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ又はＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖのいずれかの投与時のマウスｈＭＰＶマイクロ中和抗体価を示す図である。

【図９】結合抗原としてＲＳＶ－ｐｒｅ－Ｆタンパク質使用してエンドポイントＥＬＩＳＡによって測定され、ウサギ抗マウスＩｇＧで検出される、（１）ＲＳＶ　Ｆ　ｍＲＮＡ、（２）ＲＳＶ－Ｆ＋ｈＭＰＶ－Ｆ　ｍＲＮＡ；又は（３）ＲＳＶタンパク質をワクチン接種したマウスにおける抗ＲＳＶ－Ｆ抗体価を示す図である。個々の動物（ｎ＝８）からの読み取り値を、平均＋／－９５％信頼区間でｌｏｇ２変換された力価としてＤ３５時点について示す。

【図１０】ｈＭＰＶ－ｐｒｅ－Ｆタンパク質を結合抗原として使用するエンドポイントＥＬＩＳＡによって測定され、ヤギ抗マウスＩｇＧで検出される、（１）ｈＭＰＶ　Ｆ　ｍＲＮＡ、（２）ＲＳＶ－Ｆ＋ｈＭＰＶ－Ｆ　ｍＲＮＡ、又は（３）ｈＭＰＶタンパク質をワクチン接種したマウスにおける抗ｈＭＰＶ－Ｆ抗体価を示す図である。個々の動物（ｎ＝８）からの読み取り値を、平均＋／－９５％信頼区間でｌｏｇ２変換された力価としてＤ３５時点について示す。

【図１１】Ｖｅｒｏ細胞の９６ウェルプレート上でワクチン接種マウスの連続希釈血清と混合したＲＳＶ　Ａ２－ＧＦＰ株を使用するマイクロ中和アッセイによって測定される、（１）ＲＳＶ　Ｆ　ｍＲＮＡ、（２）ＲＳＶ－Ｆ＋ｈＭＰＶ－Ｆ　ｍＲＮＡ、又は（３）ＲＳＶタンパク質をワクチン接種したマウスにおけるＲＳＶ中和抗体価を示す図である。力価を、２４時間のインキュベーション後の蛍光フォーカスの逆減少を計算することによって決定した。個々の動物（ｎ＝８）からの読み取り値を、平均＋／－９５％信頼区間でｌｏｇ２変換された力価としてＤ３５時点について示す。

【図１２】Ｖｅｒｏ細胞の９６ウェルプレート上でワクチン接種マウスの連続希釈血清と混合したｈＭＰＶ　Ａ２－ＧＦＰ株を使用するマイクロ中和アッセイによって測定される、（１）ｈＭＰＶ　Ｆ　ｍＲＮＡ、（２）ＲＳＶ－Ｆ＋ｈＭＰＶ－Ｆ　ｍＲＮＡ、又は（３）ｈＭＰＶタンパク質をワクチン接種したマウスにおけるｈＭＰＶ中和抗体価を示す図である。力価を、２４時間のインキュベーション後の蛍光フォーカスの逆減少を計算することによって決定した。個々の動物（ｎ＝８）からの読み取り値を、平均＋／－９５％信頼区間でｌｏｇ２変換された力価としてＤ３５時点について示す。

【図１３】１μｇのｍＲＮＡでトランスフェクトした３０万細胞／ウェルを使用した、Ｄ１８５Ｐ及びＴ１６０＿Ｎ４６ＶについてのｈＭＰＶ　Ｆタンパク質発現レベルの免疫ブロットを示す図である。

【図１４】ｐｒｅ－Ｆ抗体（パネルＡ）、ｐｏｓｔ－Ｆ抗体（パネルＢ）又はｐｒｅ－Ｆ／ｐｏｓｔ－Ｆ抗体（パネルＣ）を使用して野生型ＨＭＰＶ　Ｆ、Ｄ１８５Ｐ又はＴ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖでトランスフェクトした細胞におけるエピトープ発現を示す図である。パネルＡ、Ｂ及びＣのそれぞれにおいて、上のラインは、ＭＮＲ　ｈＭＰＶ　Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖに対応し、中央のラインは、ＭＮＲ　ｈＭＰＶ　ＣＡＮ９７－８３に対応し、下のラインは、ＭＮＲ　ｈＭＰＶ　Ｄ１８５Ｐに対応する。

【図１５】２４人のドナーにおける２つのｈＭＰＶ候補の免疫原性を評価するためのｈＭＰＶ　ＭＩＭＩＣ設定を示す図である。

【図１６】３つのポリオ株－ポリオ１（パネルＡ）、ポリオ２（パネルＢ）及びポリオ３（パネルＣ）に対して１：５０希釈のＩＰＯＬ（ポリオワクチン）又は未処理対照（処理なし、及び共培養中のヒト骨格筋細胞なし「抗原なし（ＨＳＫを含まない）」）のいずれかで処理したＭＩＭＩＣ共培養物の上清から回収された１４日目に測定されたヒトＩｇＧ抗体価を示す図である。
【図１７】ＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆ（パネルＡ）及びＲＳＶ　ｐｏｓｔ－Ｆ（パネルＣ）に対する５０ｎｇ／ｍｌのＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆ　ＮＰ（フェリチンナノ粒子に融合したＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆタンパク質）処理で処理したＭＩＭＩＣ共培養物の上清から回収した１４日目に測定されたヒトＩｇＧ抗体価を示す図である。パネルＣは、ＲＳＶ中和アッセイで測定した場合に抗体が機能的であるかどうかを示す。
【図１８】ｐｒｅ－Ｆ（パネルＡ）及びｐｏｓｔ－Ｆ（パネルＢ）抗体応答をグラフで示す図である。Ｎ＝２２；データは、幾何平均で９５％Ｃ．Ｉ．として示されている。
【図１９】ｐｒｅ－Ｆ中和抗体価及びｐｏｓｔ－Ｆ中和抗体価をグラフで示す図である。Ｎ＝２２；データは、幾何平均で９５％Ｃ．Ｉ．として示されている。
【図２０】実験群－ｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆタンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ又は５００ｎｇ／ｍｌ）又はｈＭＰＶ　ｐｏｓｔＦ抗原タンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ）又は対照群－ＨＳＫを含まない抗原なし、ＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆ　ＮＰ、又はｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆ（パネルＡ）又はｈＭＰＶ　ｐｏｓｔ－Ｆ抗原に対するＩＰＯＬ（パネルＢ）で処理したＭＩＭＩＣ共培養の上清から回収した１４日目に測定したヒトＩｇＧ抗体価を示す図である。
【図２１】ｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆタンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ又は５００ｎｇ／ｍｌ）、ｈＭＰＶ　ｐｏｓｔＦ抗原タンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ）、又はＨＳＫを含まない抗原なしで処理したＭＩＭＩＣ共培養物の回収上清を使用して１４日目に測定されたｈＭＰＶマイクロ中和抗体価を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【０１２４】
本開示は、とりわけ、抗原性融合前ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド、抗原性融合前ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、ＲＮＡ配列、例えばｍＲＮＡ配列）、抗原性融合前ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを含む組成物、抗原性融合前ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドをコードする核酸配列を含む組成物、及びｈＭＰＶワクチンに関する。
【０１２５】
Ｉ．定義
別途本明細書で定義されない限り、本発明に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。例示的な方法及び材料を下記で説明するが、本明細書で説明されているものと類似の又は均等な方法及び材料も本発明の実施又は試験で使用され得る。不一致の場合、定義を含む、本明細書が優先される。一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、ウイルス学、免疫学、微生物学、遺伝学、分析化学、合成有機化学、医薬品及び医薬化学、タンパク質及び核酸化学並びにハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法及び技術は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。酵素反応及び精製技術は、当技術分野で一般的に遂行されるように又は本明細書で説明されているように、製造者の仕様に従って実施される。更に、特に文脈によって要求されない限り、単数用語は、複数を含むものとし、複数用語は単数を含むものとする。この明細書及び実施形態の全体にわたって、語「有する（ｈａｖｅ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、又は「有する（ｈａｓ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、若しくは「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」等の変形は、述べられる整数又は整数の群の包含を暗示するが、いかなる他の整数又は整数の群の排除も暗示しないことが理解される。本明細書で言及される全ての刊行物及び他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。多数の公文書が本明細書に引用されているが、この引用は、これらの公文書のいずれもが当技術分野における共通の一般知識の部分を形成することの承認を構成しない。
【０１２６】

用語「１つ（ａ）の」又は「１つ（ａｎ）の」存在物は、その存在物の１つ以上を指す；例えば、「ヌクレオチド（ａ　ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）配列」は、１つ以上のヌクレオチド配列を表すことが理解される。したがって、用語「ａ」（又は「ａｎ」）、「１つ以上」、及び「少なくとも１つ」は、本明細書では同じ意味で用いることができる。

【０１２７】

更に、「及び／又は」は、本明細書で用いられる場合、他のものあり又はなしで２つの明記される特徴又は成分のそれぞれの具体的な開示と見なされるべきである。したがって、「Ａ及び／又はＢ」等の語句に用いられるような用語「及び／又は」は、本明細書では、「Ａ及びＢ」、「Ａ又はＢ」、「Ａ」（単独）、並びに「Ｂ」（単独）を含むことを意図する。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／又はＣ」等の語句に用いられるような用語「及び／又は」は、以下の態様：Ａ、Ｂ及びＣ；Ａ、Ｂ又はＣ；Ａ又はＣ；Ａ又はＢ；Ｂ又はＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；並びにＣ（単独）のそれぞれを包含することを意図している。

【０１２８】

態様が言語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」で本明細書において記載される場合はいつでも、さもなければ「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」及び／又は「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語で記載される類似の態様がまた提供されることが理解される。

【０１２９】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。例えばｔｈｅ　Ｃｏｎｃｉｓｅ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｏ，Ｐｅｉ－Ｓｈｏｗ，２ｎｄ　ｅｄ．，２００２，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ；Ｔｈｅ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，３ｒｄ　ｅｄ．，１９９９，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ；及びｔｈｅ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｒｅｖｉｓｅｄ，２０００，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓは、本開示で使用される多くの用語の一般的な辞書を当業者に提供することができる。

【０１３０】

単位、接頭辞及び記号は、国際単位系（ＳＩ）で認められている形式で示されている。数値範囲には、当該範囲を定義する数が含まれる。別段示されない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシへの配向で左から右に表記される。本明細書で提供される見出しは、本開示の様々な態様の限定ではない。したがって、以下ですぐ下に定義される用語は、その全体が本明細書を参照することによってより完全に定義される。

【０１３１】

「およそ」又は「約」という用語は、本明細書では、おおよそ、周囲、又は領域内を意味するために使用される。用語「約」が数値範囲と関連して用いられる場合、それは、示される数値よりも上に及び下に境界を広げることによってその範囲を修正する。一般に、用語「約」は、例えば、１０パーセント、上に又は下に（より高い又はより低い）の、相違だけ、表示値よりも上に又は下に、数値を修正することができる。いくつかの実施形態では、この用語は、示された数値からの±１０％、±５％、±４％、±３％、±２％、±１％、±０．９％、±０．８％、±０．７％、±０．６％、±０．５％、±０．４％、±０．３％、±０．２％、±０．１％、±０．０５％又は±０．０１％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±１０％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±５％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±４％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±３％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±２％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±１％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．９％の

偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．８％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．７％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．６％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．５％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．４％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．３％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．１％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．０５％の偏差を示す。いくつかの実施形態では、「約」は、示された数値から±０．０１％の偏差を示す。

【０１３２】

本明細書で使用される場合、「メッセンジャーＲＮＡ」又は「ｍＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。ｍＲＮＡは、本明細書中で使用される場合、修飾されたＲＮＡ及び修飾されていないＲＮＡの両方を包含する。ｍＲＮＡは、１つ以上のコード領域及び非コード領域を含有し得る。コード領域は、代替的にオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）と呼ばれる。ｍＲＮＡの非コード領域には、５’キャップ、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、３’ＵＴＲ及びポリ（Ａ）尾部が含まれる。ｍＲＮＡは、天然源から精製し、組換え発現系（例えば、インビトロ転写）を使用して産生させ、任意選択的に精製又は化学合成することができる。

【０１３３】

本明細書で使用される場合、「抗原部位φ」又は「部位φエピトープ」という用語は、ｈＭＰＶ　Ｆ三量体の融合前形態に位置する部位を指す。部位φエピトープは、融合前ｈＭＰＶ　Ｆに対する特異性を有する抗体に対する結合部位である。

【０１３４】

本明細書で使用される場合、「抗原部位Ｖ」又は「部位Ｖエピトープ」という用語は、ｈＭＰＶ　Ｆ三量体の融合前形態に位置する部位を指す。部位Ｖエピトープは、融合前ｈＭＰＶ　Ｆに対する特異性を有する抗体に対する結合部位である。

【０１３５】

本明細書で使用される場合、「抗原安定性」という用語は、経時的又は溶液中での抗原の安定性を指す。

【０１３６】

本明細書で使用される場合、「空洞充填置換」という用語は、融合前ｈＭＰＶ　Ｆ三量体に存在する空洞を充填するための操作された疎水性置換を指す。

【０１３７】

本明細書で使用される場合、「Ｆタンパク質」又は「ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質」という用語は、ウイルス侵入中にウイルスエンベロープと宿主細胞膜との融合を媒介することに関与するｈＭＰＶのタンパク質を指す。Ｆタンパク質は、感染細胞と非感染細胞との間の融合を媒介して、多核細胞又は合胞体を形成し得る。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、「ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド」、「Ｆポリペプチド」、又は「Ｆポリペプチド抗原」という用語は、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質の少なくとも１つのエピトープを含むポリペプチドを指す。

【０１３９】

本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」という用語は、ｈＭＰＶビリオンの膜を横断するｈＭＰＶ　Ｆ０／Ｆ１のｃ末端付近の約２３アミノ酸配列を指す。ある種の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１のアミノ酸配列ＧＦＩＩＶＩＩＬＩＡＶＬＧＳＳＭＩＬＶＳＩＦＩＩを含む。

【０１４０】

本明細書中で使用されるとき、用語「細胞質尾部」とは、ビリオンの内側に位置するｈＭＰＶ　Ｆ０／Ｆ１のｃ末端におけるおよそ２５個のアミノ酸配列のことを指す。ある種の実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１のアミノ酸配列ＩＫＫＴＫＫＰＴＧＡＰ

ＰＥＬＳＧＶＴＮＮＧＦＩＰＨＮを含む。
【０１４１】
本明細書で使用される場合、「ｆｏｌｄｏｎドメイン」は、Ｔ４フィブリチンの三量化ドメインを指す。
【０１４２】
本明細書で使用される場合、「シグナルペプチド」又は「シグナル配列」は、小胞体及びゴルジ体内の分泌経路にポリペプチドを移行させるように機能するポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端に存在する約１６～３０アミノ酸長のペプチドを指す。ある種の実施形態では、シグナル配列が、配列番号１、３、５及び７のいずれか１つのアミノ酸１～１８に対応する。
【０１４３】
本明細書で使用される場合、「タグ配列」又は「アフィニティータグ」は、タグ配列を含むポリペプチド又はタンパク質を精製するために使用され得るポリペプチド配列を指す。タグ配列としては、例えば、ポリヒスチジンタグ（例えば、ヘキサヒスチジン（６ｘＨｉｓタグ）、オクタヒスチジン（８ｘＨｉｓタグ）等）、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ＦＬＡＧ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＢＰ）、ｓｔｒｅｐＩＩ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、カルモジュリン結合タンパク質（ＣＢＰ）、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）、ＲＮａｓｅ　ＡのＳタンパク質、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ｃ－Ｍｙｃ等が挙げられる。
【０１４４】
本明細書で使用される場合、「プロトマー内安定化置換」という用語は、ｈＭＰＶ　Ｆ三量体のプロトマー内の相互作用を安定化することにより、融合前立体配座を安定化するｈＭＰＶ　Ｆのアミノ酸置換を指す。
【０１４５】
本明細書で使用される場合、「プロトマー間安定化置換」という用語は、ｈＭＰＶ　Ｆ三量体のプロトマーの相互作用を安定化することにより、融合前立体配座を安定化するｈＭＰＶ　Ｆのアミノ酸置換を指す。
【０１４６】
本明細書で使用される場合、「プロテアーゼ切断」という用語は、ポリペプチド配列のプロテアーゼ切断部位での感受性残基（例えば、リジン又はアルギニン）のタンパク質分解（「クリッピング」と呼ばれることもある）を指す。プロテアーゼ切断部位には、ウイルスプロテアーゼ切断部位、例えば、ｈＭＰＶ　Ｆ０プロテアーゼ切断部位、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）Ｆ０プロテアーゼ切断部位、及びヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位が含まれる。
【０１４７】
本明細書で使用される場合、ｈＭＰＶ　Ｆに関する「融合後」という用語は、ウイルス及び宿主細胞膜の併合後に生じるｈＭＰＶ　Ｆの安定な立体配座を指す。
【０１４８】
本明細書で使用される場合、ｈＭＰＶ　Ｆに関する「融合前」という用語は、ウイルス－細胞相互作用の前に採用されるｈＭＰＶ　Ｆの立体配座を指す。
【０１４９】
本明細書で使用される場合、「プロトマー」という用語は、オリゴマータンパク質の構造単位を指す。ｈＭＰＶ　Ｆの場合、ｈＭＰＶ　Ｆ三量体の個々の単位はプロトマーである。
【０１５０】
本明細書で使用される場合、「免疫応答」という用語は、Ｂ細胞、Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ又は多形核球等の免疫系の細胞の、抗原又はワクチン等の刺激に対する反応を指す。免疫応答は、例えば、インターフェロン又はサイトカインを分泌する上皮細胞を含む、宿主防御反応に関与する身体のあらゆる細胞を含むことができる。免疫応答としては、自然免疫応答及び／又は適応免疫応答が挙げられるが限定されない。

【０１５１】
本明細書で使用される場合、「防御免疫応答」は、対象を感染から保護する（例えば、感染症を予防するか、又は感染症に関連する疾患の発症を予防する）免疫応答を指す。免疫応答を測定する方法には、例えば、リンパ球（Ｂ細胞又はＴ細胞等）の増殖及び／又は活性、サイトカイン又はケモカインの分泌、炎症、抗体産生等を測定することが含まれる。
【０１５２】
本明細書で使用される場合、「抗体応答」は、抗体が産生される免疫応答である。
【０１５３】
本明細書で使用される場合、「抗原」は、生物に曝露又は投与されたとき、免疫応答を誘発する薬剤及び／又はＴ細胞受容体（例えば、ＭＨＣ分子によって提示された場合）若しくは抗体（例えば、Ｂ細胞によって産生された）に結合する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、生物において体液性応答（例えば、抗原特異的抗体の産生を含む）を誘発する。代わりに又は更に、いくつかの実施形態では、抗原は、生物において細胞応答（例えば、その受容体が抗原と特異的に相互作用するＴ細胞が関与する）を誘発する。特定の抗原は、標的生物の１つ又はいくつかのメンバー（例えば、マウス、ウサギ、霊長類、ヒト）において免疫応答を誘発し得るが、標的生物種の全てのメンバーにおいて免疫応答を誘発するわけではない。いくつかの実施形態では、抗原は、標的生物種のメンバーの少なくとも約２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％において免疫応答を誘発する。いくつかの実施形態では、抗原は、抗体及び／又はＴ細胞受容体に結合し、生物において特定の生理学的反応を誘導することもあれば又は誘導しないこともある。いくつかの実施形態では、例えば、抗原はインビトロで抗体及び／又はＴ細胞受容体に結合し得、これは、そのような相互作用がインビボで生じるか否かにかかわらない。いくつかの実施形態では、抗原は、特異的体液性免疫又は細胞性免疫の産物と反応する。抗原には、本明細書に記載のｈＭＰＶポリペプチドが含まれる。
【０１５４】
本明細書で使用される場合、「アジュバント」は、抗原に対する免疫応答を増強する物質又はビヒクルを指す。アジュバントとしては、限定されないが、抗原が吸着されたミネラル（例えば、ミョウバン、水酸化アルミニウム又はリン酸塩）の懸濁液；抗原溶液が鉱油又は水中で乳化されている油中水型又は水中油型エマルション（例えば、フロイントの不完全アジュバント）を挙げることができる。抗原性を更に高めるために、死滅したマイコバクテリアが含まれるときがある（例えば、フロイント完全アジュバント）。免疫刺激性オリゴヌクレオチド（ＣｐＧモチーフを含むもの等）もアジュバントとして使用することができる（例えば、米国特許第６，１９４，３８８号明細書；同第６，２０７，６４６号明細書；同第６，２１４，８０６号明細書；同第６，２１８，３７１号明細書；同第６，２３９，１１６号明細書；同第６，３３９，０６８号明細書；同第６，４０６，７０５号明細書；及び同第６，４２９，１９９号明細書を参照されたい）。アジュバントには、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）アゴニスト及び共刺激分子等の生物学的分子も含まれ得る。
【０１５５】
本明細書で使用される場合、「抗原性ｈＭＰＶポリペプチド」は、分子がｈＭＰＶに対して抗原性であるのに十分な長さのｈＭＰＶアミノ酸配列の全部又は一部を含むポリペプチドを指す。
【０１５６】
本明細書で使用される場合、「対象」は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「対象」は、ヒトを指す。いくつかの実施形態では、「対象」は、非ヒト動物を指す。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類及び／又は蠕虫を含むが、これらに限定されない。ある種の実施形態では、非ヒト対象は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、

ヒツジ、ウシ、霊長類及び／又はブタ）である。いくつかの実施形態では、対象は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物及び／又はクローンであり得る。いくつかの実施形態では、「個体」又は「患者」という用語が使用され、「対象」と交換可能であることが意図される。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、「対象」は、６５歳以上の対象、１８歳～６４歳（１８歳～６５歳未満）の対象、１２歳以上の対象、１２歳～１７歳（１２歳～１８歳未満）の対象、６歳～１１歳（６歳～１２歳未満）の対象、２歳～５歳（２歳～６歳未満）の対象、１歳～４歳（１歳～５歳未満）の対象、２ヶ月～１歳（２ヶ月～２歳未満）の対象及び０ヶ月～２ヶ月（０ヶ月～３ヶ月未満）の対象からなる群から選択される。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、「対象」は、高齢者（例えば、高齢者又は高齢成人）、成人、青年、小児、幼児、及び乳児からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、「対象」は、６０歳以上の高齢者、高齢者（例えば、６５歳以上）、成人（例えば、１８歳～５０歳又は１８歳～６４歳）、１２歳～１７歳の青年（例えば、１２歳～１８歳未満）、６歳～１１歳の子供（例えば、６歳～１２歳未満）、２歳～５歳の子供（例えば、２歳～６歳未満）、１歳～４歳の幼児（例えば、１歳～５歳未満）、２ヶ月～１歳の乳児（例えば、２ヶ月～２歳未満）、新生児（例えば、０～２７日齢）、及び早産児（例えば、３７週未満の在胎期間）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象は、米国ＦＤＡによって定義される小児年齢群に属する。新生児（例えば、出産から１ヶ月未満まで（「ＮＥＯ」）；乳児（例えば、１ヶ月～２歳未満（「ＩＮＦ」））；子供（例えば、２歳～１２歳未満「ＣＨＩ」）；及び青年期（例えば、１２歳～１７歳未満（「ＡＤＯ」））。いくつかの実施形態では、対象は、米国ＦＤＡによって６５歳以上又は７５歳以上として定義される年齢群の高齢成人である。特に例示的な実施形態では、対象は、乳児（例えば、１ヶ月～２歳未満）、幼児（例えば、１歳～５歳未満）又は高齢者（例えば、６０歳以上、６５歳以上、又は７５歳以上）である。

【０１５９】

本明細書で使用される場合、「ワクチン接種」又は「ワクチン接種する」という用語は、例えば疾患を引き起こす作用因子に対する免疫応答を生成することを意図した組成物の投与を指す。ワクチン接種は、疾患を引き起こす作用因子への曝露前、その間及び／若しくはその後並びに／又は１つ以上の症状の発現前、その間及び／若しくは又はその後、いくつかの実施形態では疾患を引き起こす作用因子への曝露前、その間及び／又はその直後に行うことができる。いくつかの実施形態では、ワクチン接種は、ワクチン接種組成物の適切又は適切に間隔を置いた複数回投与を含む。

【０１６０】

本明細書で使用される場合、「治療薬」又は「治療剤」という用語は、ｈＭＰＶ感染の１つ以上の症状を軽減又は排除することを意図した組成物の投与を指す。治療剤は、ｈＭＰＶへの曝露前、曝露中及び／若しくは曝露後、並びに／又は１つ以上の症状の発症前、発症中及び／若しくは発症後に投与することができる。いくつかの実施形態では、治療剤は、ワクチン接種組成物の適切に又は適切に間隔を空けた複数回投与として対象に投与される。

【０１６１】

本開示は、それぞれ所与の核酸配列又はアミノ酸配列に対して（例えば、参照配列に対して）ある程度の同一性を有する核酸配列（例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡ配列）及びアミノ酸配列を記載する。

【０１６２】

「％同一の」、「％同一性」という用語又は類似の用語は特に、比較しようとする配列間の最適なアライメントにおいて同一であるヌクレオチド又はアミノ酸のパーセンテージを指すことが意図される。２つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。２つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間

で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。当該パーセンテージは、純粋に統計的であり、２つの配列間の差異は、比較される配列の全長にわたってランダムに分布し得るが、必ずしもそのように分布している必要はない。２つの配列の比較は通常、対応する配列の局所領域を同定するために、最適なアライメント後に、セグメント又は「比較の窓」に関して、当該配列を比較することによって行われる。比較のための最適なアラインメントは、手動で又はＳｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ａｄｓ Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２，４８２による局所相同性アルゴリズムを用いて、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３による局所相同性アルゴリズムを用いて、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８，２４４４による類似性検索アルゴリズムを用いて又は当該アルゴリズムを使用するコンピュータプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ Ｐ、ＢＬＡＳＴ Ｎ及びＴＦＡＳＴＡ）を用いて行うことができる。

【０１６３】

同一性パーセンテージは、比較しようとする配列が対応する同一の位置の数を決定し、この数を比較する位置の数（例えば、参照配列における位置の数）で除し、この結果に１００を乗ずることによって得られる。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％又は約１００％である領域について与えられる。例えば、参照核酸配列が２００個のヌクレオチドからなる場合、同一性の程度は、少なくとも約１００、少なくとも約１２０、少なくとも約１４０、少なくとも約１６０、少なくとも約１８０又は約２００個のヌクレオチドについて、いくつかの実施形態では連続ヌクレオチドで、与えられる。いくつかの実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長について与えられる。

【０１６５】

それぞれ所与の核酸配列又はアミノ酸配列に対して特定の程度の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、当該所与の配列の少なくとも１つの機能的特性を有し得、例えばいくつかの例では当該所与の配列と機能的に均等である。いくつかの実施形態では、所与の核酸配列又はアミノ酸配列に対して特定の程度の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、当該所与の配列と機能的に均等である。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、「キット」という用語は、１つ以上の化合物又は組成物及び１つ以上の関連材料、例えば溶媒、溶液、緩衝液、使用説明書又は乾燥剤等の関連する成分のパッケージされたセットを指す。

【０１６７】

ＩＩ．ｈＭＰＶ Ｆポリペプチド抗原

ヒトメタニューモウイルス（ｈＭＰＶ）は、パラミクソウイルスファミリー内のニューモウイルスサブファミリーに属するネガティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルスである。ｈＭＰＶは、鼻及び肺の気道上皮細胞に感染し、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）に続いて、小児の下気道感染症の２番目に一般的な原因である。ｈＭＰＶは、ビリオン表面に糖タンパク質（Ｇタンパク質）、低分子疎水性タンパク質（ＳＨタンパク質）及び融合タンパク質（Ｆタンパク質）を有するエンベロープウイルスである。

【０１６８】

ｈＭＰＶはエンベロープウイルスであるため、宿主細胞へのｈＭＰＶの侵入は、ウイルス膜と細胞膜との融合を必要とする。パラミクソウイルス侵入は、通常、２つのウイルス糖タンパク質、融合（Ｆ）及び付着（Ｇ、Ｈ、又はＨＮ）タンパク質を必要とし、検査された全てのパラミクソウイルス糖タンパク質によって促進される膜融合は、１つの可能性

としての例外を除いて、中性ｐＨで起こる（すなわち、ＳＥＲウイルス）。ウイルス－細胞膜融合に加えて、パラミクソウイルス糖タンパク質も細胞－細胞融合を促進する。シンシチウムと呼ばれる多核巨細胞は、様々なパラミクソウイルスに感染した組織に見られ得る。ｈＭＰＶに感染した培養細胞はシンシチウムを形成するが、ｈＭＰＶに感染した初代ヒト気道上皮細胞の検査は、このウイルスによるシンシチウム形成が一般的なインビボ発生ではない可能性があることを示唆している。

【０１６９】

ｈＭＰＶ　Ｆは、融合適格性になるために切断される必要がある不活性前駆体（Ｆ０）として合成されるクラスＩ融合糖タンパク質である。タンパク質分解的切断は、ホモ三量体に集合する２つのジスルフィド結合サブユニット（Ｆ２のＮ末端からＦ１まで）を生成する。切断は、疎水性融合ペプチドのすぐ上流の一塩基性切断部位で起こる。切断は、外因性トリプシンを培地に添加することによって、又はフリン発現プラスミドを添加することによって、組織培養において達成することができる。しかし、インビボでは、ＴＭＰＲＳＳ２等の他のセリンプロテアーゼが切断により関連している可能性が高いと考えられている。Ｆ三量体は、準安定な「融合前」又は「ｐｒｅ－Ｆ」立体配座でウイルス粒子に組み込まれる。膜融合を開始するために、ｈＭＰＶ　Ｆが活性化され、膜融合を駆動し、非常に安定な「融合後」又は「ｐｏｓｔ－Ｆ」立体配座をとるｈＭＰＶ　Ｆをもたらすタンパク質の一連の段階的な立体配座変化を受ける。

【０１７０】

ある種の例示的な実施形態では、Ｆ０のタンパク質分解的切断は、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドをコードするプラスミドとフリンをコードするプラスミドとを４：１の比のｈＭＰＶプラスミド：フリンプラスミドで共トランスフェクションすることによって達成される。

【０１７１】

ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを含む抗原性ｈＭＰＶポリペプチドが本明細書で提供される。ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、ｈＭＰＶ　Ｆの全配列又はｈＭＰＶ　Ｆの一部を含み得る。ある種の実施形態では、一部は外部ドメインである。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、配列番号１、３、５及び７のいずれか１つと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％の同一性を有する配列を含む。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、配列番号１、３、５、及び７のいずれか１つのポリペプチドと少なくとも８０％の同一性を有する修飾ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを含み、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは抗原性である。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、Ｆタンパク質の外部ドメイン部分のみを含む。

【０１７５】

Ａ２－ＣＡＮ９７－８３のＦ０のアミノ酸配列は、以下である。

【化１】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPS
LIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLES
EVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFN
RRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGV
YGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKD
CETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVS
CSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQ
FNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNT**GFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTKKPTGAP**
PELSGVTNNGFIPHN (配列番号 1)

（アクセッション番号ＡＡＮ５２９１０；バージョンＡＡＮ５２９１０．１；ＤＢソースアクセッション番号ＡＹ１４５２９６．１）。膜貫通ドメインは太字で下線が引かれており、細胞質尾部は太字である。

【０１７６】

Ａ２－ＣＡＮ９７－８３のＦ０のヌクレオチド配列は、以下である。

【化２】

ATGTCTTGGAAAGTGGTGATCATTTTTTCATTGCTAATAACACCTCAACACGGTCTTAAAGA
GAGCTACCTAGAAGAATCATGTAGCACTATAACTGAGGGATATCTTAGTGTTCTGAGGACA
GGTTGGTATACCAACGTTTTTACATTAGAGGTGGGTGATGTAGAAAACCTTACATGTTCTGA
TGGACCTAGCCTAATAAAAACAGAATTAGATCTGACCAAAAGTGCACTAAGAGAGCTCAAAA
CAGTCTCTGCTGACCAATTGGCAAGAGAGGAACAAATTGAGAATCCCAGACAATCTAGGTT
TGTTCTAGGAGCAATAGCACTCGGTGTTGCAACAGCAGCTGCAGTCACAGCAGGTGTTGC
AATTGCCAAAACCATCCGGCTTGAGAGTGAAGTCACAGCAATTAAGAATGCCCTCAAAACG
ACCAATGAAGCAGTATCTACATTGGGGAATGGAGTTCGAGTGTTGGCAACTGCAGTGAGAG
AGCTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAATTTAACTCGTGCAATCAACAAAAACAAGTGCGACATT
GATGACCTAAAAATGGCCGTTAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAGGTTTCTAAATGTTGTGCG
GCAATTTTCAGACAATGCTGGAATAACACCAGCAATATCTTTGGACTTAATGACAGATGCTG
AACTAGCCAGGGCCGTTTCTAACATGCCGACATCTGCAGGACAAATAAAATTGATGTTGGA
GAACCGTGCGATGGTGCGAAGAAAGGGGTTCGGAATCCTGATAGGGGTCTACGGGAGCT
CCGTAATTTACATGGTGCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGACACGCCTTGCTGGATAGT
AAAAGCAGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAAGGGAAACTATGCTTGCCTCTTAAGAGAAGAC
CAAGGGTGGTATTGTCAGAATGCAGGGTCAACTGTTTACTACCCAAATGAGAAAGACTGTG
AAACAAGAGGAGACCATGTCTTTTGCGACACAGCAGCGGGAATTAATGTTGCTGAGCAATC
AAAGGAGTGCAACATCAACATATCCACTACAAATTACCCATGCAAAGTCAGCACAGGAAGA
CATCCTATCAGTATGGTTGCACTGTCTCCTCTTGGGGCTCTGGTTGCTTGCTACAAAGGAG
TAAGCTGTTCCATTGGCAGCAACAGAGTAGGGATCATCAAGCAGCTGAACAAGGGTTGCTC
CTATATAACCAACCAAGATGCAGACACAGTGACAATAGACAACACTGTATATCAGCTAAGCA
AAGTTGAGGGTGAACAGCATGTTATAAAAGGCAGACCAGTGTCAAGCAGCTTTGATCCAAT
CAAGTTTCCTGAAGATCAATTCAATGTTGCACTTGACCAAGTTTTTGAGAACATTGAAAACA
GCCAGGCCTTGGTAGATCAATCAAACAGAATCCTAAGCAGTGCAGAGAAAGGGAATACT*G*
GCTTCATCATTGTAATAATTCTAATTGCTGTCCTTGGCTCTAGCATGATCCTAGTGAGCATC
*TTCATTATA*ATCAAGAAAACAAAGAAACCAACGGGAGCACCTCCAGAGCTGAGTGGTGTCA
CAAACAATGGCTTCATACCACATAATTAG（配列番号 2)

【０１７７】

いくつかの実施形態では、ｐｒｅ－Ｆとｐｏｓｔ－Ｆとの間で共有されるｈＭＰＶ Ｆタンパク質のエピトープが遮断される。エピトープの遮断は、抗原性ｈＭＰＶ ＦポリペプチドをコードするＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）が対象に投与される場合、又は抗原性ｈＭＰＶ Ｆポリペプチドが対象に投与される場合、エピトープに対する抗体の生成を低減又は排除する。これにより、融合前立体配座等のＦの特定の立体配座（例えば、部位φ及び／又は部位Ｖを標的とする抗体）に特異的なエピトープを標的とする抗体の割合を増加させることができる。Ｆは、依然として細胞に入っていないウイルスにおいて融合前立体配座を有するため、ｐｒｅ－Ｆを標的とする抗体の割合が増加すると、より大きい中和度を提供することができる（例えば、本明細書中に記載されるような中和対結合比として表される）。

【０１７８】

本明細書に記載のｈＭＰＶ Ｆポリペプチドは、野生型ｈＭＰＶ Ｆタンパク質（例え

ば、配列番号１）と比較して欠失又は置換を有し得る。

【０１７９】

例えば、ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、（ａ）膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位を含む、（ｂ）アミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換し、アミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、配列番号１に対するアミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ$_0$切断部位変異を含む、（ｃ）異種シグナルペプチドを含む、（ｄ）任意選択的にポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグである少なくとも１つのタグ配列を含む、並びに／或いは（ｅ）ｆｏｌｄｏｎドメインを含む。

【０１８０】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、膜貫通ドメインを欠き、細胞質尾部を欠き、アミノ酸位置１００のグルタミンをアルギニンで置換する、及びアミノ酸位置１０１のセリンをアルギニンで置換する、配列番号１に対するアミノ酸置換Ｑ１００Ｒ及びＳ１０１Ｒを含むＦ０切断部位変異；ヒトライノウイルス３Ｃ（ＨＲＶ－３Ｃ）プロテアーゼ切断部位；異種シグナルペプチド；ポリヒスチジンタグ（例えば、６ｘＨｉｓタグ、８ｘＨｉｓタグ等）及び／又はＳｔｒｅｐ　ＩＩタグ；及びｆｏｌｄｏｎドメインを含む。

【０１８１】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号１の位置１８５にバリン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、又はプロリン置換を含む。

【０１８２】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、配列番号１の位置１６０におけるフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、イソロイシン若しくはロイシン置換、及び／又は配列番号１の位置４６におけるバリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン若しくはプロリン置換を含む。

【０１８３】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、ｈＭＰＶポリペプチドの三次及び／又は四次構造を安定化する「安定化置換」である、配列番号１の位置１６０の置換及び配列番号１の位置４６の置換を含む。安定化置換としては、限定されないが、以下の置換が挙げられる。疎水性アミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン及びメチオニン）；親水性アミノ酸（例えば、システイン、セリン、トレオニン、アスパラギン及びグルタミン）；ジスルフィド結合を形成するアミノ酸（例えば、システイン）；水素結合を形成するアミノ酸（例えば、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニン）；荷電アミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジン）等。

【０１８４】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、Ａ株ｈＭＰＶ（例えば、Ａ１サブタイプ又はＡ２サブタイプ）又はＢ株ｈＭＰＶ（例えば、Ｂ１サブタイプ又はＢ２サブタイプ）に由来する。

【０１８５】

ある種の実施形態では、「骨格」Ｆ０ポリペプチド配列を含むアミノ酸配列が提供され、以下のように記載される。

【化３】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPS
LIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESE
VTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNR
RFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVY
GSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDC
ETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSC
SIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQF
NVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpg
hhhhhhhhsawshpqfek (配列番号 3)

【０１８６】

ある種の実施形態では、「骨格」Ｆ０ポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される。

【化４】

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACTGAAAG
AGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCTGAGGA
CAGGCTGGTACACCAATGTGTTCACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTT
CTGATGGACCATCCCTGATTAAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACT
GAAAACAGTGTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGAG
GAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGCAGTGACAGCAG
GAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGGTGACAGCCATCAAGAATGCCCT
GAAAACCACCAATGAGGCTGTGAGCACCCTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCTACAGC
AGTGAGGGAACTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAGAACAA
GTGTGACATCGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGTTCCTG
AATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGGACCTGA
TGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGACAAATCAA
ACTGATGTTGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGT
CTATGGCTCCTCTGTGATTTATATGGTCCAACTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCAT
GTTGGATTGTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCTGCT
GAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACCCAAATGA
GAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTCTGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGT
GGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACATCAGCACCACCAACTACCCATGTAAGGTG
AGCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCTGGTGGCT
TGTTACAAGGGAGTGTCCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAAGCAACTTA
ACAAGGGCTGTTCCTACATCACCAACCAGGATGCTGACACAGTGACCATTGACAACACAGT
CTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTC
CTCCTTTGACCCAATCAAGTTTCCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTT
GAGAACATTGAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCT
GAGAAGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAGGGATGG
ACAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCCTGGGCAGGTC
CTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACACCACCACCACCACCACCACTCTGCCTG
GAGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (配列番号 4)

【０１８７】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、配列番号３として示される「骨格」ｈＭＰＶ配列を含み、任意選択的に１つ以上のアミノ酸置換を含み得る。例えば、ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号３の位置１８５にバリン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、又はプロリン置換を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号３の位置１６０におけるフェニルアラニン、トリプトファン若しくはチロシン置換、及び／又は配列番号３の位置４６におけるバリン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン若しくはプロリン置換を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号３の位置１００及び１０１の一方又は両方にアルギニン置換を含む。

【０１８８】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号３と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有する。

【０１８９】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列を含むアミノ酸配列が提供され、以下のように記載される。

【化５】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPS
LIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESE
VTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIpDLKMAVSFSQFNR
RFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVY
GSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDC
ETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSC
SIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQF
NVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpg
hhhhhhhhsawshpqfek (配列番号 5)

（Ｄ１８５Ｐ）。（小文字のアミノ酸は、リンカー、ｆｏｌｄｏｎモチーフ、リンカー、ＨＲＶ－３Ｃ切断部位、リンカー、８Ｘ－Ｈｉｓ－タグ及びｓｔｒｅｐ－ｔａｇＩＩ領域を示す）。

【０１９０】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される

【化６】

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACT
GAAAGAGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCT
GAGGACAGGCTGGTACACCAATGTGTTCACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGAC
TTGTTCTGATGGACCATCCCTGATTAAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGG
GAACTGAAAACAGTGTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGG
AGGAGGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGCAGTGAC
AGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGGTGACAGCCATCAAGAA
TGCCCTGAAAACCACCAATGAGGCTGTGAGCACCCTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGC
TACAGCAGTGAGGGAACTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAA
GAACAAGTGTGACATCCCTGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGG
TTCCTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGG
ACCTGATGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGAC
AAATCAAACTGATGTTGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGA
TTGGAGTCTATGGCTCCTCTGTGATTTATATGGTCCAACTTCCAATCTTTGGAGTGATTGAC
ACACCATGTTGGATTGTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCT
GTCTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACC
CAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTCTGTGACACAGCAGCAGGCA
TCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACATCAGCACCACCAACTACCCATG
TAAGGTGAGCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCT
GGTGGCTTGTTACAAGGGAGTGTCCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAA
GCAACTTAACAAGGGCTGTTCCTACATCACCAACCAGGATGCTGACACAGTGACCATTGAC
AACACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCT
GTGTCCTCCTCCTTTGACCCAATCAAGTTTCCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACC
AGGTGTTTGAGAACATTGAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGT
CCTCTGCTGAGAAGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAA
GGGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCCTG
GGCAGGTCCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACACCACCACCACCACCACCACCAC
TCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (配列番号 6)

（Ｄ１８５Ｐ）。

【０１９１】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される

【化７】

ATGTCTTGGAAAGTCGTCATCATCTTCTCTCTGCTGATCACCCCACAACACGGCCTGAAGG
AATCTTATCTGGAAGAGTCCTGCTCCACAATCACAGAGGGCTACCTGAGCGTGCTGAGAAC
CGGCTGGTACACCAACGTGTTCACTCTGGAGGTGGGCGACGTGGAGAACCTGACTTGTAG
TGACGGCCCCTCCCTGATCAAGACTGAGCTGGACCTGACAAAGAGTGCACTGAGAGAACT
CAAGACTGTGTCCGCAGACCAGCTGGCCCGCGAGGAGCAGATCGAAAATCCTAGACAGTC
AAGGTTCGTCCTGGGAGCCATTGCTCTGGGAGTTGCTACAGCTGCCGCTGTGACCGCAGG
GGTGGCTATTGCTAAAACCATCAGGCTGGAGTCCGAAGTGACAGCAATCAAGAATGCCCT
GAAGACCACCAACGAGGCAGTCTCCACACTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCAACCG
CCGTGAGGGAGCTGAAGGACTTCGTGTCCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAAAACA
AGTGCGACATCCCCGATCTGAAGATGGCAGTTAGCTTTTCCCAGTTTAACCGGAGATTCCT
GAATGTGGTTAGACAGTTCAGCGACAACGCCGGGATCACCCCAGCTATTTCCCTGGACCT
GATGACTGATGCCGAGCTGGCACGGGCTGTGTCCAATATGCCCACCAGCGCTGGGCAGAT
TAAGCTGATGCTGGAGAATCGGGCAATGGTGAGAAGGAAGGGGTTTGGCATCCTGATCGG
CGTGTACGGGTCCTCCGTGATCTACATGGTGCAGCTGCCTATTTTTGGAGTGATTGATACA
CCCTGCTGGATCGTTAAAGCAGCACCCAGCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCCTGT
CTGCTGCGGGAGGACCAGGGGTGGTACTGCCAGAACGCCGGCTCCACAGTGTATTACCC
CAATGAAAAGGACTGCGAGACAAGGGGAGACCACGTGTTCTGCGACACTGCCGCTGGGAT
TAATGTGGCCGAGCAGAGCAAGGAGTGCAACATCAACATTTCCACCACAAACTACCCCTGC
AAGGTGAGCACCGGCAGGCACCCTATCTCCATGGTGGCCCTGTCTCCCCTGGGAGCTCTG
GTGGCTTGCTACAAGGGAGTGAGCTGTAGCATCGGGTCCAATAGAGTCGGGATTATCAAG
CAGCTGAATAAGGGCTGCAGCTATATTACCAACCAGGATGCCGATACTGTGACTATTGACA
ACACAGTGTATCAGCTGTCAAAGGTGGAAGGCGAACAGCATGTGATCAAAGGACGGCCCG
TCAGCAGCTCCTTTGACCCTATCAAATTCCCCGAAGACCAGTTTAACGTGGCACTGGACCA
GGTTTTCGAAAATATTGAGAATTCTCAGGCCCTGGTGGACCAGTCTAACCGGATCCTCTCC
TCCGCCGAGAAGGGAAATACAGGCTTTATTATCGTGATCATCCTGATCGCAGTGCTGGGAT
CCAGTATGATCCTGGTCTCCATTTTCATCATCATTAAGAAGACCAAGAAACCCACTGGCGCA
CCACCTGAACTGAGCGGCGTGACTAACAATGGCTTTATCCCTCACAATTGA（配列番号17)

（Ｄ１８５Ｐ　ｍＲＮＡ）。

【０１９２】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号５と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、配列番号５を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号６と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号６を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１７と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形

態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１７を含む。

【０１９３】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列を含むアミノ酸配列が提供され、以下のように記載される

【化８】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTvVFTLEVGDVENLTCSDGPSL
IKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEV
TAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLAfAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRR
FLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYG
SSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCE
TRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSI
GSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQFN
VALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpgh
hhhhhhhsawshpqfek (配列番号 7)

（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ）。（小文字のアミノ酸は、リンカー、ｆｏｌｄｏｎモチーフ、リンカー、ＨＲＶ－３Ｃ切断部位、リンカー、８Ｘ－Ｈｉｓ－タグ及びｓｔｒｅｐ－ｔａｇＩＩ領域を示す）。

【０１９４】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される

【化９】

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACTGAAAG
AGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCTGAGGA
CAGGCTGGTACACAGTGGTGTTCACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTT
CTGATGGACCATCCCTGATTAAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACT
GAAAACAGTGTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGAG
GAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGCAGTGACAGCAG
GAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGGTGACAGCCATCAAGAATGCCCT
GAAAACCACCAATGAGGCTGTGAGCACCCTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCTTTTGC
TGTGAGGGAACTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAGAACAAG
TGTGACATTGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGTTCCTGA
ATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGGACCTGAT
GACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAA
CTGATGTTGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTC
TATGGCTCCTCTGTGATTTATATGGTCCAACTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATG
TTGGATTGTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCTGCTG
AGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACCCAAATGAG
AAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTCTGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTG
GCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACATCAGCACCACCAACTACCCATGTAAGGTGA
GCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCTGGTGGCTT
GTTACAAGGGAGTGTCCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAAGCAACTTAA
CAAGGGCTGTTCCTACATCACCAACCAGGATGCTGACACAGTGACCATTGACAACACAGTC
TACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTCC
TCCTTTGACCCAATCAAGTTTCCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTG
AGAACATTGAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTG
AGAAGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAGGGATGGA
CAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCCTGGGCAGGTCC
TTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACACCACCACCACCACCACCACCACTCTGCCTGG
AGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (配列番号 8)

（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ）。

【０１９５】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される

【化１０】

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCACGGCCTGAAGG
AGTCCTACCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGGGTATCTCTCTGTGCTGCGGAC
AGGGTGGTATACAGTGGTGTTCACCCTGGAGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAG
CGATGGCCCTTCTCTGATCAAGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACT
GAAAACCGTGTCCGCCGATCAGCTGGCAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCCACGGCAGA
GCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGCGTGGCCACTGCAGCTGCTGTCACTGCAG
GGGTCGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAGGTGACCGCCATTAAGAATGCCC
TGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCACTCTGGGAAACGGAGTGAGGGTCCTGGCCTTCG
CAGTGAGGGAGCTGAAGGATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCAACAAGAATAA
GTGCGATATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCCAGTTCAACCGGCGCTTTCTG
AATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTATCAGCCTGGACCTCA
TGACCGACGCCGAACTCGCAAGGGCCGTTTCTAACATGCCTACATCCGCTGGACAGATTAA
GCTGATGCTGGAGAATAGAGCAATGGTGAGGAGAAAGGGATTCGGCATCCTGATTGGCGT
GTACGGATCTAGCGTGATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCT
TGTTGGATCGTCAAGGCCGCCCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTTGTCTG
CTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGCCAGAACGCCGGGTCTACAGTGTACTATCCTAAC
GAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGTTTTCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAAT
GTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGCAACATCAATATCTCTACAACCAATTACCCATGTAAGG
TGAGCACTGGACGGCACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGGGCACTGGTG
GCTTGCTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTATCAAGCAG
CTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTGTGACCATCGACAACA
CTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCAGCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCT
CTTCTTCTTTCGATCCCATCAAGTTCCCTGAAGACCAGTTCAATGTTGCCCTGGACCAGGTT
TTCGAGAACATCGAAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCG
CAGAGAAAGGGAACACTGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCTGGGGAGCA
GTATGATTCTGGTGTCCATTTTCATCATCATCAAGAAGACCAAGAAGCCTACAGGAGCACC
CCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACGGCTTTATCCCTCACAACTGA（配列番号　18）

（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ）。

【０１９６】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が提供され、以下のように記載される

【化１１】

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCACGGCCTGAAGG
AGTCCTACCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGGGTATCTCTCTGTGCTGCGGAC
AGGGTGGTATACAGTGGTGTTCACCCTGGAGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAG
CGATGGCCCTTCTCTGATCAAGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACT
GAAAACCGTGTCCGCCGATCAGCTGGCAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCCACGGCAGA
GCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGCGTGGCCACTGCAGCTGCTGTCACTGCAG
GGGTCGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAGGTGACCGCCATTAAGAATGCCC
TGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCACTCTGGGAAACGGAGTGAGGGTCCTGGCCTTCG
CAGTGAGGGAGCTGAAGGATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCAACAAGAATAA
GTGCGATATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCCAGTTCAACCGGCGCTTTCTG
AATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTATCAGCCTGGACCTCA
TGACCGACGCCGAACTCGCAAGGGCCGTTTCTAACATGCCTACATCCGCTGGACAGATTAA
GCTGATGCTGGAGAATAGAGCAATGGTGAGGAGAAAGGGATTCGGCATCCTGATTGGCGT
GTACGGATCTAGCGTGATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCT
TGTTGGATCGTCAAGGCCGCCCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTTGTCTG
CTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGCCAGAACGCCGGGTCTACAGTGTACTATCCTAAC
GAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGTTTTCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAAT
GTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGCAACATCAATATCTCTACAACCAATTACCCATGTAAGG
TGAGCACTGGACGGCACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGGGCACTGGTG
GCTTGCTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTATCAAGCAG
CTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTGTGACCATCGACAACA
CTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCAGCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCT
CTTCTTCTTTCGATCCCATCAAGTTCCCTGAAGACCAGTTCAATGTTGCCCTGGACCAGGTT
TTCGAGAACATCGAAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCG
CAGAGAAAGGGAACACTGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCTGGGGAGCA
GTATGATTCTGGTGTCCATTTTCATCATCATCAAGAAGACCAAGAAGCCTACAGGAGCACC
CCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACGGCTTTATCCCTCACAACTAA（配列番号 19)

（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ）。

【０１９７】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドが、配列番号７と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリペプチドは、配列番号７を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号８と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号８を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１８と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１８を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号８と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、

９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号８を含む。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１９と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶポリヌクレオチドは、配列番号１９を含む。

【０１９８】

一般に、本明細書に記載の構築物中の位置は、例えば標準的なパラメータ（ＥＢＬＯＳＵＭ６２マトリックス、ギャップペナルティ１０、ギャップ拡張ペナルティ０．５）を用いたＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムを使用して、ペアワイズアライメントによって、参照配列、例えば配列番号１の野生型配列又は配列番号３の骨格配列にマッピングすることができる。

【０１９９】

ＩＩＩ．組換えｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原

ある種の実施形態では、本開示のｈＭＰＶワクチンは、少なくとも１つのｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原を含み得る。本開示のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原は、様々な方法によって作製することができる。一実施形態では、真核生物又は原核生物起源であり得る宿主細胞株が、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドの発現のために使用される。一実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドの発現に使用される宿主細胞株は、細菌起源のものである。一実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドの発現に使用される宿主細胞株は、哺乳動物起源のものである。その中で発現される所望の遺伝子産物に最も適した特定の宿主細胞株を決定することができる。例示的な宿主細胞株には、ＤＧ４４及びＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣系統、ＤＨＦＲマイナス）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原を有するＣＶＩの誘導体）、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓株）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）、及び２９３（ヒト腎臓）が含まれるが、これらに限定されない。宿主細胞株は、典型的には、商業サービスのＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）又は公の文献から入手可能である。

【０２００】

ある種の実施形態では、バキュロウイルス細胞を使用して、本明細書に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原を発現させ得る。バキュロウイルスＡｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ　Ｎｕｃｌｅａｒ　Ｐｏｌｙｈｅｄｒｏｓｉｓ　Ｖｉｒｕｓ（ＡｃＮＰＶ）は、例えば、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを発現させるために使用することができる。

【０２０１】

組換えバキュロウイルスは、バキュロウイルスＤＮＡと目的のｈＭＰＶ　Ｆ配列を含むキメラプラスミドとの間の相同組換えによってｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを発現するように構築され得る。組換えウイルスは、それらの異なるプラーク形態によって検出され、均質にプラーク精製され得る。

【０２０２】

組換えｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、限定されないが、鱗翅目（Ｌｅｐｉｄｏｐｔｅｒａｎ）種スポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）に由来する細胞を含む細胞において産生され得る。バキュロウイルスに感染させることができる他の適切な昆虫細胞、例えば、カイコ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）、ガレリア・メラノーマ（Ｇａｌｌｅｒｉａ　ｍｅｌｌａｎｏｍａ）、トリクプルシア・ニィ（Ｔｒｉｃｈｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）又はラマントリア・ディスパル（Ｌａｍａｎｔｈｒｉａ　ｄｉｓｐａｒ）種由来のものもまた、組換えｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを産生するための適切な基質として使用することができる。

【０２０３】

組換えｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドは、他の発現ベクター、例えば、Ｅｎｔｏｍｏｐｏｘウイルス（昆虫のポックスウイルス）、細胞質多角体病ウイルス（ＣＰＶ）、及び組換えｈＭＰＶ　Ｆ遺伝子構成的発現による昆虫細胞の形質転換においても発現され得る。

【０２０４】

組換えタンパク質のバキュロウイルス発現は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，７６２，９１９号明細書に更に記載されている。

【０２０５】

ある種の実施形態では、藻類細胞、例えば微細藻類細胞を使用して、本明細書に記載の組換えｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原を発現させることができる。いくつかの実施形態では、微細藻類宿主細胞は、ヘテロコント又はストラメノパイルである。いくつかの実施形態では、微細藻類宿主細胞は、ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）門のメンバーである。いくつかの実施形態では、ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）宿主細胞は、トラウストキトリレス目又はラビリンチュラ目のメンバーである。

【０２０６】

微細藻類宿主細胞におけるｈＭＰＶポリペプチド抗原の発現に使用される発現系は、微細藻類細胞において活性な調節制御要素を含む。いくつかの実施形態では、発現系は、ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）細胞において活性な調節制御要素を含む。いくつかの実施形態では、発現系は、トラウストキトリにおいて活性な調節制御要素を含む。いくつかの実施形態において、発現系は、スエヒロタケ又はトラウストヒトリウムにおいて活性である調節制御要素を含む。様々なプロモータを含む多くの調節制御要素は、多くの多様な種で活性である。したがって、調節配列は、それらが単離された細胞と同一の細胞型において利用することができ、又はそれらが単離された細胞とは異なる細胞型において利用することができる。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、微細藻類細胞におけるｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド産生のために使用される発現系は、ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）配列に由来する調節要素を含む。いくつかの実施形態では、微細藻類細胞においてｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを産生するために使用される発現系は、非ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）藻類配列に由来する配列を含む、非ラビリンチュラ（Ｌａｂｙｒｉｎｔｈｕｌｏｍｙｃｏｔａ）配列に由来する調節要素を含む。いくつかの実施形態では、発現系は、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリヌクレオチド配列は、微細藻類宿主細胞において機能的である任意のプロモータ配列、任意のターミネータ配列及び／又は任意の他の調節配列と会合する。誘導性又は構成的に活性な配列を使用することができる。ある種の実施形態では、微細藻類宿主細胞におけるｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドの発現のための発現カセット、並びにそれを含む藻類細胞が提供される。

【０２０８】

組換えタンパク質の微細藻類発現は、国際公開第２０１１／０８２１８９号パンフレット及び国際公開第２０１１／０９０７３１号パンフレットに記載され、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０９】

ある種の実施形態では、ＣＨＯ細胞を使用して、本明細書に記載のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチドを発現させることができる。ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆを発現するベクターを含むＣＨＯ細胞株が提供される。ある種の実施形態では、当該ＣＨＯ細胞株は、当該ベクターでトランスフェクトされる（安定に又は一過性にトランスフェクトされる）。ある種の実施形態では、当該ＣＨＯ細胞株は、そのゲノムに組み込まれた当該ベクターを含む。ＣＨＯ細胞株は、工業的なタンパク質生産に一般的に使用されており、多くのＣＨＯ細胞株が公知であり、例えばＡＴＣＣから市販されている。例えば、そのようなＣＨＯ

細胞株としては、例えば、ＣＨＯ－Ｋ１細胞株（ＡＴＣＣ番号：ＣＣＬ－６１）、ＣＨＯＤＰ－１２細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１２４４４及び１２４４５）及びＣＨＯ１－１５細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－９６０６）が挙げられる。

【０２１０】

インビトロ生成により、所望のポリペプチドを大量に得るためのスケールアップが可能になる。組織培養条件下で細胞を培養する技法は、当技術分野において公知であり、この技法としては、例えば、エアリフト反応器若しくは連続撹拌反応器での均質懸濁培養、又は例えば、中空繊維内、マイクロカプセル内、アガロースマイクロビーズ上若しくはセラミックカートリッジ上に固定又は捕捉した細胞の培養が挙げられる。必要及び／又は所望であれば、ポリペプチドの溶液は、慣用的なクロマトグラフィ法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィ、ＤＥＡＥ－セルロースでのクロマトグラフィ、及び／又は（免疫）アフィニティークロマトグラフィを用いて精製することができる。

【０２１１】

ＩＶ．ＲＮＡ

ある種の実施形態では、本開示のｈＭＰＶワクチンは、ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原をコードするＯＲＦを含む少なくとも１つのリボ核酸（ＲＮＡ）を含み得る。ある種の実施形態では、ＲＮＡは、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原をコードするＯＲＦを含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。ある種の実施形態では、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）は、少なくとも１つの５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、ポリ（Ａ）尾部及び／又は５’キャップを更に含む。

【０２１２】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、以下のように記載される

【化１２】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPS
LIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLES
EVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIpDLKMAVSFSQFN
RRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGV
YGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKD
CETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVS
CSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQ
FNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTKKPTGAPP
ELSGVTNNGFIPHN (配列番号 9)

（Ａ２－Ｄ１８５Ｐ）。

【０２１３】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、（配列番号６）として示されるｍＲＮＡ　ＯＲＦによってコードされる（Ａ２－Ｄ１８５Ｐ　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ）。

【０２１４】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、（配列番号１７）（ＡＤ１８５Ｐ　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ）として示されるコドン最適化ｍＲＮＡ　ＯＲＦによってコードされる。

【０２１５】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、以下のように記載される

【化１３】

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTvVFTLEVGDVENLTC
SDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAK
TIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLAfAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVS
FSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGF
GILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYY
PNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVAC
YKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIK
FPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIILIAVLGSSMILVSIFIIIKKTKKP
TGAPPELSGVTNNGFIPHN (配列番号 11)

（Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ）。

【０２１６】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、（配列番号８）（Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ）として示されるｍＲＮＡ　ＯＲＦによってコードされる。

【０２１７】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、（配列番号１８）（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ）として示されるコドン最適化ｍＲＮＡ　ＯＲＦによってコードされる。

【０２１８】

ある種の実施形態では、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原は、（配列番号１９）（Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ）として示されるコドン最適化ｍＲＮＡ　ＯＲＦによってコードされる。

【０２１９】

ＩＩ．Ａ．５’キャップ

ｍＲＮＡの５’キャップは、ほとんどの真核細胞に見られるヌクレアーゼに対する耐性を提供し、翻訳効率を促進することができる。いくつかのタイプの５’キャップが知られている。７－メチルグアノシンキャップ（「ｍ^{7}Ｇ」又は「Ｃａｐ－０」とも呼ばれる）は、５’－５’－三リン酸結合を介して第１の転写されたヌクレオチドに連結されたグアノシンを含む。

【０２２０】

５’キャップは、典型的には以下のように添加される。最初に、ＲＮＡ末端ホスファターゼが５’ヌクレオチドから末端リン酸基の１つを除去し、２つの末端リン酸を残す；次いで、グアノシン三リン酸（ＧＴＰ）が、グアニリルトランスフェラーゼを介して末端リン酸に付加され、５’５’５三リン酸結合を生成する；次いで、グアニンの７－窒素がメチルトランスフェラーゼによってメチル化される。キャップ構造の例には、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ、（５’（Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ及びＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇが含まれるが、これらに限定されない。追加のキャップ構造は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１６／００３２３５６号明細書及び米国特許出願公開第２０１８／０１２５９８９号明細書に記載されている。

【０２２１】

製造業者のプロトコルに従って５’－グアノシンキャップ構造を生成するために、以下の化学的ＲＮＡキャップ類似体を使用してインビトロ転写反応中にポリヌクレオチドの５’－キャッピングを同時に完了させることができる：３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（ＡＲＣＡキャップ）；Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ；Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ；ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ；ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ；ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ

ｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＵ；及びｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ，Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ；ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。改変ＲＮＡの５’キャッピングは、ワクシニアウイルスキャッピング酵素を使用して転写後に完了し、Ｃａｐ０構造を生成することができる。ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ。ワクシニアウイルスキャッピング酵素と２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼの両方を使用してキャップ１構造を生成して、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ－２’－Ｏ－メチルを生成することができる。Ｃａｐ２構造は、Ｃａｐ１構造から生成され、続いて２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを使用して５’－最後から３番目のヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル化が行われ得る。Ｃａｐ３構造は、Ｃａｐ２構造から生成され、続いて２’－Ｏメチル－トランスフェラーゼを使用して５’－最後から４番目のヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル化が行われ得る。

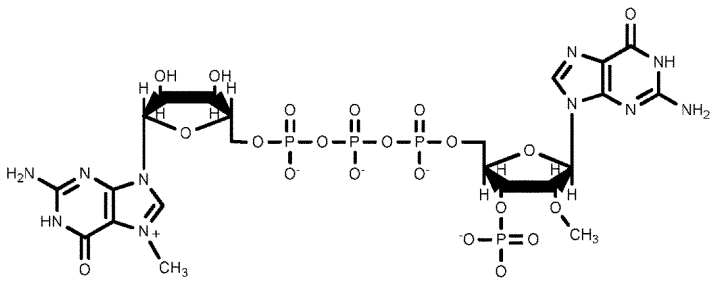
【０２２２】

ある種の実施形態では、本開示のｍＲＮＡは、３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ（ＡＲＣＡキャップ）、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＵ及びｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧからなる群から選択される５’キャップを含む。

【０２２３】

ある種の実施形態では、本開示のｍＲＮＡは、

【化１４】



の５’キャップを含む。

【０２２４】

ＩＩ．Ｂ．非翻訳領域（ＵＴＲ）

いくつかの実施形態では、本開示のｍＲＮＡは、５’及び／又は３’非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。ｍＲＮＡでは、５’ＵＴＲは転写開始部位で始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンを含まない。３’ＵＴＲは終止コドンの直後に始まり、転写終結シグナルまで続く。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの安定性又は翻訳に影響を及ぼす１つ以上の要素を含む５’ＵＴＲを含み得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、約１０～５，０００ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、約５０～５００ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、少なくとも約１０ヌクレオチド長、約２０ヌクレオチド長、約３０ヌクレオチド長、約４０ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、約２５０ヌクレオチド長、約３００ヌクレオチド長、約３５０ヌクレオチド長、約４００ヌクレオチド長、約４５０ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、約５５０ヌクレオチド長、約６００ヌクレオチド長、約６５０ヌクレオチド長、約７００ヌクレオチド長、約７５０ヌクレオチド長、約８００ヌクレオチド長、約８５０ヌクレオチド長、約９００ヌクレオチド長、約９５０ヌクレオ

チド長、約１，０００ヌクレオチド長、約１，５００ヌクレオチド長、約２，０００ヌクレオチド長、約２，５００ヌクレオチド長、約３，０００ヌクレオチド長、約３，５００ヌクレオチド長、約４，０００ヌクレオチド長、約４，５００ヌクレオチド長又は約５，０００ヌクレオチド長である。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、ポリアデニル化シグナル、細胞内でのｍＲＮＡの位置の安定性に影響を及ぼすタンパク質の結合部位又はｍｉＲＮＡの１つ以上の結合部位のうちの１つ以上を含む３’ＵＴＲを含み得る。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、５０～５，０００ヌクレオチド長又はそれより長くてもよい。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、５０～１，０００ヌクレオチド長又はそれより長くてもよい。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、少なくとも約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、約２５０ヌクレオチド長、約３００ヌクレオチド長、約３５０ヌクレオチド長、約４００ヌクレオチド長、約４５０ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、約５５０ヌクレオチド長、約６００ヌクレオチド長、約６５０ヌクレオチド長、約７００ヌクレオチド長、約７５０ヌクレオチド長、約８００ヌクレオチド長、約８５０ヌクレオチド長、約９００ヌクレオチド長、約９５０ヌクレオチド長、約１，０００ヌクレオチド長、約１，５００ヌクレオチド長、約２，０００ヌクレオチド長、約２，５００ヌクレオチド長、約３，０００ヌクレオチド長、約３，５００ヌクレオチド長、約４，０００ヌクレオチド長、約４，５００ヌクレオチド長又は約５，０００ヌクレオチド長である。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ転写物によってコードされる遺伝子と異なる遺伝子（すなわち、ＵＴＲは、異種ＵＴＲである）に由来する５’又は３’ＵＴＲを含み得る。

【０２２８】

ある種の実施形態では、５’及び／又は３’ＵＴＲ配列は、ｍＲＮＡの安定性を高めるために安定である（例えば、グロビン、アクチン、ＧＡＰＤＨ、チューブリン、ヒストン又はクエン酸サイクル酵素）ｍＲＮＡに由来し得る。例えば、５’ＵＴＲ配列は、ヌクレアーゼ耐性を改善し、且つ／又はｍＲＮＡの半減期を改善するために、ＣＭＶ前初期１（ＩＥ１）遺伝子の部分配列又はその断片を含み得る。ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）をコードする配列又はその断片をｍＲＮＡの３’末端又は非翻訳領域に含めることも企図される。一般に、これらの修飾は、修飾されていない対応物と比較してｍＲＮＡの安定性及び／又は薬物動態特性（例えば、半減期）を改善し、例えば、インビボヌクレアーゼ消化に対するそのようなｍＲＮＡ耐性を改善するために行われる修飾を含む。

【０２２９】

例示的な５’ＵＴＲは、ＣＭＶ前初期１（ＩＥ１）遺伝子に由来する配列（米国特許出願公開第２０１４／０２０６７５３号明細書及び同第２０１５／０１５７５６５号明細書（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる））、又は配列ＧＧＧＡＵＣＣＵＡＣＣ（配列番号１６）（米国特許出願公開第２０１６／０１５１４０９号明細書（あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる））を含む。

【０２３０】

様々な実施形態では、５’ＵＴＲは、ＴＯＰ遺伝子の５’ＵＴＲに由来し得る。ＴＯＰ遺伝子は、典型的には、５’末端オリゴピリミジン（ＴＯＰ）域の存在を特徴とする。更に、ほとんどのＴＯＰ遺伝子は、成長関連翻訳調節によって特徴付けられる。しかし、組織特異的翻訳調節を有するＴＯＰ遺伝子も知られている。ある種の実施形態では、ＴＯＰ遺伝子の５’ＵＴＲに由来する５’ＵＴＲは、５’ＴＯＰモチーフ（オリゴピリミジン領域）を欠く（例えば、米国特許出願公開第２０１７／００２９８４７号明細書、同第２０１６／０３０４８８３号明細書、同第２０１６／０２３５８６４号明細書及び同第２０１６／０１６６７１０号明細書（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる））。

【０２３１】

ある種の実施形態では、５’ＵＴＲは、リボソームタンパク質ラージ３２（Ｌ３２）遺伝子（上記の米国特許出願公開第２０１７／００２９８４７号明細書）に由来する。

【０２３２】

ある種の実施形態では、５’ＵＴＲは、ヒドロキシステロイド（１７ｂ）デヒドロゲナーゼ４遺伝子（ＨＳＤ１７Ｂ４）の５’ＵＴＲに由来する（上記の米国特許出願公開第２０１６／０１６６７１０号明細書）。

【０２３３】

ある種の実施形態では、５’ＵＴＲは、ＡＴＰ５Ａ１遺伝子（上記の米国特許出願公開第２０１６／０１６６７１０号明細書）の５’ＵＴＲに由来する。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）が、５’ＵＴＲの代わりに使用される。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、配列番号１３に示される核酸配列を含む：

【化１５】

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGG
ACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCGUGCCAA
GAGUGACUCACCGUCCUUGACACG.

【０２３６】

いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲは、配列番号１４に示される核酸配列を含む：ＣＧＧＧＵＧＧＣＡＵＣＣＣＵＧＵＧＡＣＣＣＣＵＣＣＣＣＡＧＵＧＣＣＵＣＵＣＣＵＧＧＣＣＣＵＧＧＡＡＧＵＵＧＣＣＡＣＵＣＣＡＧＵＧＣＣＣＡＣＣＡＧＣＣＵＵＧＵＣＣＵＡＡＵＡＡＡＡＵＵＡＡＧＵＵＧＣＡＵＣ。５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲは、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１２／０７５０４０号パンフレットに更に詳細に記載されている。

【０２３７】

ＩＩ．Ｃ．ポリアデニル化尾部

本明細書で使用される場合、「ポリ（Ａ）配列」、「ポリ（Ａ）尾部」及び「ポリ（Ａ）領域」という用語は、ｍＲＮＡ分子の３’末端のアデノシンヌクレオチドの配列を指す。ポリ（Ａ）尾部は、ｍＲＮＡに安定性を付与し、ｍＲＮＡをエキソヌクレアーゼ分解から保護し得る。ポリ（Ａ）尾部は翻訳を増強し得る。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、本質的にホモポリマーである。例えば、１００個のアデノシンヌクレオチドのポリ（Ａ）尾部は、本質的に１００個のヌクレオチドの長さを有し得る。ある種の実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、アデノシンヌクレオチドと異なる少なくとも１つのヌクレオチド（例えば、アデノシンヌクレオチドではないヌクレオチド）によって中断され得る。例えば、１００個のアデノシンヌクレオチドのポリ（Ａ）尾部は、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、アデノシンヌクレオチドと異なる少なくとも１つのヌクレオチド又はヌクレオチドのストレッチとを含む）。ある種の実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、配列ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＧＣＡＵＡＵＧＡＣＵＡＡＡ（配列番号１５）を含む。

【０２３８】

本明細書で使用される「ポリ（Ａ）尾部」は、典型的にはＲＮＡに関する。しかしながら、本開示との関連において、この用語は、ＤＮＡ分子中の対応する配列（例えば、「ポリ（Ｔ）配列」）にも同様に関する。

【０２３９】

ポリ（Ａ）尾部は、約１０～約５００個のアデノシンヌクレオチド、約１０～約２００

個のアデノシンヌクレオチド、約４０～約２００個のアデノシンヌクレオチド又は約４０～約１５０個のアデノシンヌクレオチドを含み得る。ポリ（Ａ）尾部の長さは、少なくとも約１０、５０、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０又は５００のアデノシンヌクレオチドであり得る。

【０２４０】

核酸がＲＮＡであるいくつかの実施形態では、核酸のポリ（Ａ）尾部は、ＲＮＡのインビトロ転写中にＤＮＡ鋳型から得られる。ある種の実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、ＤＮＡ鋳型から転写されることなく、一般的な化学合成方法によってインビトロで得られる。様々な実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、市販のポリアデニル化キット及び対応するプロトコルを使用して（ＲＮＡインビトロ転写後に）ＲＮＡの酵素的ポリアデニル化によって、又は代替的に、固定化ポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用することによって、例えば国際公開第２０１６／１７４２７１号パンフレットに記載される方法を使用して、生成される。

【０２４１】

核酸は、酵素的ポリアデニル化によって得られたポリ（Ａ）尾部を含み得、核酸分子の大部分は、約１００（＋／－２０）～約５００（＋／－５０）又は約２５０（＋／－２０）のアデノシンヌクレオチドを含む。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、核酸は、例えば国際公開第２０１６／０９１３９１号パンフレットに記載されているように、鋳型ＤＮＡに由来するポリ（Ａ）尾部を含み得、酵素的ポリアデニル化によって生成された少なくとも１つの更なるポリ（Ａ）尾部を更に含み得る。

【０２４３】

ある種の実施形態では、核酸は、少なくとも１つのポリアデニル化シグナルを含む。

【０２４４】

様々な実施形態では、核酸は、少なくとも１つのポリ（Ｃ）配列を含み得る。

【０２４５】

本明細書で使用される「ポリ（Ｃ）配列」という用語は、最大約２００個のシトシンヌクレオチドの配列であることを意図している。いくつかの実施形態では、ポリ（Ｃ）配列は、約１０～約２００個のシトシンヌクレオチド、約１０～約１００個のシトシンヌクレオチド、約２０～約７０個のシトシンヌクレオチド、約２０～約６０個のシトシンヌクレオチド又は約１０～約４０個のシトシンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ（Ｃ）配列は約３０個のシトシンヌクレオチドを含む。

【０２４６】

ＩＩ．Ｄ．化学修飾

本明細書に開示されるｍＲＮＡは、修飾されていても又はされていなくてもよい。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、少なくとも１つの化学修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、典型的にはＲＮＡ安定性を高める１つ以上の修飾を含み得る。例示的な修飾としては、骨格修飾、糖修飾又は塩基修飾を挙げることができる。いくつかの実施形態では、開示されるｍＲＮＡは、プリン（アデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ））又はピリミジン（チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）及びウラシル（Ｕ））を含むが、これらに限定されない天然に存在するヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体（修飾ヌクレオチド）から合成され得る。ある種の実施形態では、開示のｍＲＮＡは、プリン及びピリミジンの修飾ヌクレオチド類似体又は誘導体、例えば１－メチル－アデニン、２－メチル－アデニン、２－メチルチオ－Ｎ－６－イソペンテニル－アデニン、Ｎ６－メチル－アデニン、Ｎ６－イソペンテニル－アデニン、２－チオ－シトシン、３－メチル－シトシン、４－アセチル－シトシン、５－メチル－シトシン、２，６－ジアミノプリン、１－メチル－グアニン、２－メチル－グアニン、２，２－ジメチル－グアニン、７－メチル－グアニン、イノシン、１－メチル－イノシン、シュードウラシル（５－ウラシル）、ジヒドロ－ウラシル、２－チオ－ウラシル、４－チオ－ウラシル、５－カルボ

キシメチルアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５－（カルボキシヒドロキシメチル）－ウラシル、５－フルオロ－ウラシル、５－ブロモ－ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－ウラシル、５－メチル－２－チオ－ウラシル、５－メチル－ウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、５－メチルアミノメチル－ウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオ－ウラシル、５’－メトキシカルボニルメチル－ウラシル、５－メトキシ－ウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、１－メチル－シュードウラシル、ケオシン、β－Ｄ－マンノシル－ケオシン、ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート、７－デアザグアノシン、５－メチルシトシン及びイノシンから合成され得る。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、開示されるｍＲＮＡは、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、２－チオウリジン、４’－チオウリジン、５－メチルシトシン、２－チオ－ｌ－メチル－１－デアザ－シュードウリジン、２－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、２－チオ－５－アザ－ウリジン、２－チオ－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－シュードウリジン、４－メトキシ－２－チオ－シュードウリジン、４－メトキシ－シュードウリジン、４－チオ－ｌ－メチル－シュードウリジン、４－チオ－シュードウリジン、５－アザ－ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、５－メチルウリジン、５－メチルウリジン、５－メトキシウリジン及び２’－Ｏ－メチルウリジンを含むが、これらに限定されない少なくとも１つの化学修飾を含み得る。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、５－メチルシトシン、５－メトキシウリジン及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含む。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が化学修飾される。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、ＯＲＦ中のウラシルヌクレオチドの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は１００％が化学修飾される。

【０２５２】

そのような類似体の調製は、例えば、米国特許第４，３７３，０７１号明細書、米国特許第４，４０１，７９６号明細書、米国特許第４，４１５，７３２号明細書、米国特許第４，４５８，０６６号明細書、米国特許第４，５００，７０７号明細書、米国特許第４，６６８，７７７号明細書、米国特許第４，９７３，６７９号明細書、米国特許第５，０４７，５２４号明細書、米国特許第５，１３２，４１８号明細書、米国特許第５，１５３，３１９号明細書、米国特許第５，２６２，５３０号明細書、及び米国特許５，７００，６４２号明細書に記載されている。

【０２５３】

ＩＩ．Ｅ．ｍＲＮＡ合成

本明細書に開示されるｍＲＮＡは、様々な方法のいずれかに従って合成され得る。例えば、本開示によるｍＲＮＡは、インビトロ転写（ＩＶＴ）を介して合成され得る。インビトロ転写のためのいくつかの方法は、例えば、Ｇｅａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｓｅｍｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５（２）：１５２－１５９；Ｂｒｕｎｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．５３０：１０１－１４に記載されて

いる。簡潔には、ＩＶＴは、典型的には、プロモータ、リボヌクレオチド三リン酸のプール、ＤＴＴ及びマグネシウムイオンを含み得る緩衝系、適切なＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７又はＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）、ＤＮａｓｅ　Ｉ、ピロホスファターゼ及び／又はＲＮａｓｅ阻害剤を含有する線状又は環状ＤＮＡ鋳型を用いて行われる。正確な条件は、特定の用途に応じて異なり得る。これらの試薬の存在は、一般に、最終ｍＲＮＡ産物において望ましくなく、これらの試薬は、治療的使用に適した清浄な及び／又は均一なｍＲＮＡを提供するために精製又は除去することができる不純物又は夾雑物と考えることができる。いくつかの実施形態では、インビトロ転写反応から提供されるｍＲＮＡが望ましい場合があるが、細菌、真菌、植物及び／又は動物から産生される野生型ｍＲＮＡを含む他のｍＲＮＡ源を本開示に従って使用することができる。

【０２５４】

Ｖ．脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）

本開示のＬＮＰは、以下の４つのカテゴリー：（ｉ）イオン化可能な脂質（例えば、カチオン性脂質）；（ｉｉ）ＰＥＧ化脂質；（ｉｉｉ）コレステロール系脂質（例えば、コレステロール）、及び（ｉｖ）ヘルパー脂質の脂質を含むことができる。

【０２５５】

Ａ．カチオン性脂質

イオン化脂質は、ｍＲＮＡ封入を促進し、カチオン性脂質であり得る。カチオン性脂質は、低ｐＨで正に帯電した環境を与え、負に帯電したｍＲＮＡ原薬の効率的なカプセル化を促進する。例示的なカチオン性脂質を以下の表１に示す。

【０２５６】

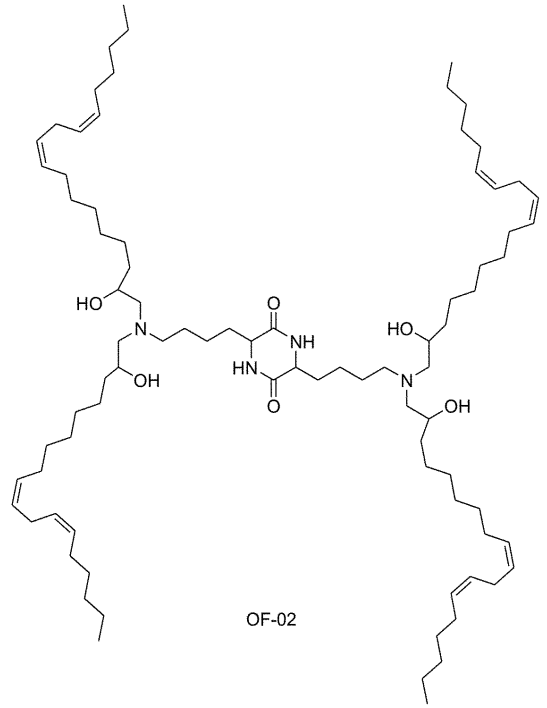
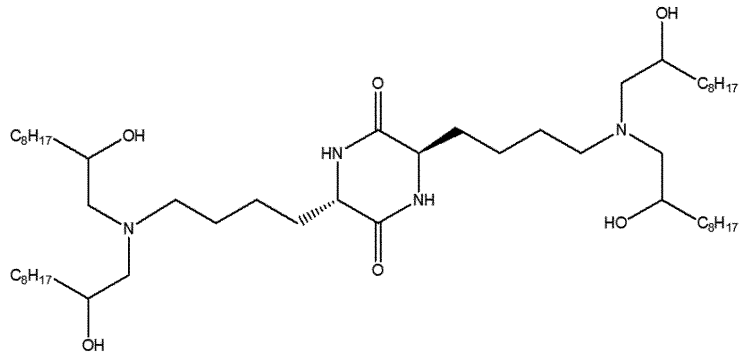
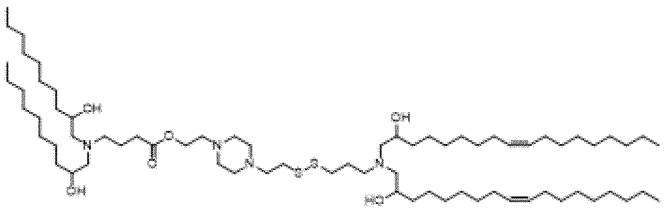
【表１】

表1-イオン化可能な脂質

名称	構造
OF-02 (ML7)	

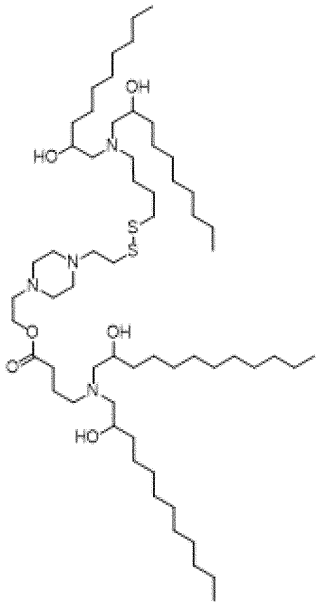
【０２５７】

【表２】

	 OF-02
cKK-E10	
GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 ((2-(4-(2-((3-(ビス((Z)-2-ヒド	

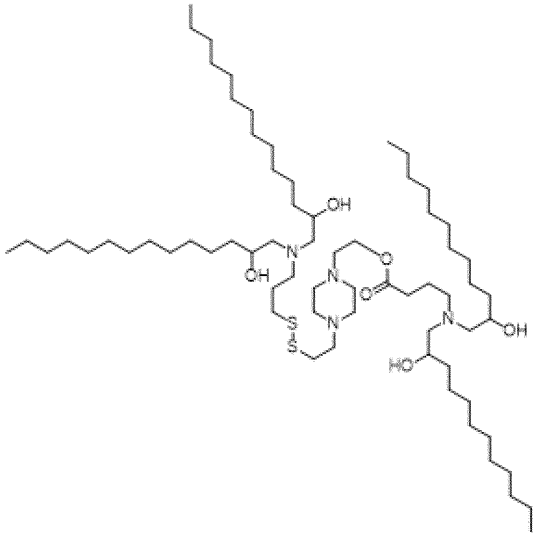
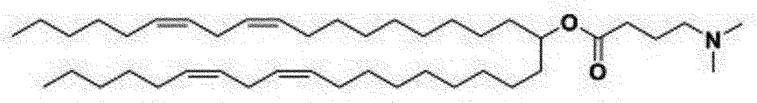
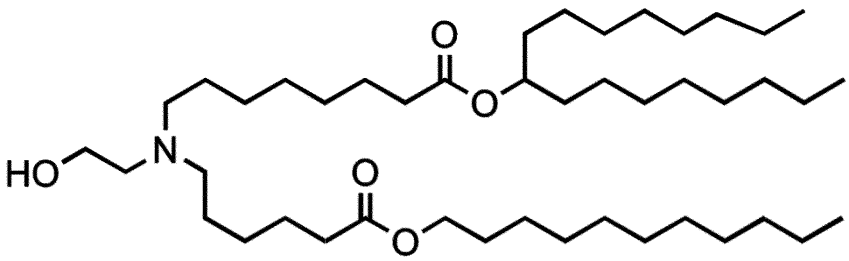
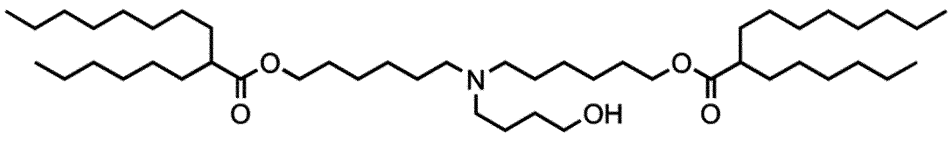
【０２５８】

【表３】

ロキシオクタデカ-9-エン-1-イル)アミノ)プロピル)ジスルファニル)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル4-(ビス(2-ヒドロキシデシル)アミノ)ブタノエート)	
GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (2-(4-(2-((3-(ビス(2-ヒドロキシデシル)アミノ)プチル)ジスルファニル)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル4-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)ブタノエート)	
GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 (2-(4-(2-((3-(ビス(2-ヒドロキシテトラデシル)アミノ)プロピル)ジス	

【０２５９】

【表４】

ルファニル)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル4-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)ブタノエート)	
MC3	
SM-102 (9-ヘプタデカニル8-{(2-ヒドロキシエチル)[6-オキソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル] アミノ}オクタノエート)	
ALC-0315 [(4-ヒドロキシブチル)アザンディル]ジ(ヘキサン-	

【０２６０】
【表５】

6, 1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)	

【０２６１】

カチオン性脂質は、［ｃｋｋＥ１０］／［ＯＦ－０２］、［（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル］４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（Ｄ－Ｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）；２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）；１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）；ジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－（ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）；９－ヘプタデカニル８－｛（２－ヒドロキシエチル）［６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル］アミノ｝オクタノアート（ＳＭ－１０２）；［（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル］ジ（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（ＡＬＣ－０３１５）；［３－（ジメチルアミノ）－２－［（Ｚ）－オクタデカ－９－エノイル］オキシプロピル］（Ｚ）－オクタデカ－９－エノエート（ＤＯＤＡＰ）；２，５－ビス（３－アミノプロピルアミノ）－Ｎ－［２－［ジ（ヘプタデシル）アミノ］－２－オキソエチル］ペンタンアミド（ＤＯＧＳ）；［（３Ｓ，８Ｓ，９Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１４Ｓ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－［（２Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル］－２，３，４，７，８，９，１１，１２，１４，１５，１６，１７－ドデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル］Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］カルバメート（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）；テトラキス（８－メチルノニル）３，３’，３’’，３’’’－（（（メチルアザンジイル）ビス（プロパン－３，１ジイル））ビス（アザントリイル））テトラプロピオン酸（３０６Ｏｉ１０）；デシル（２－（ジオクチルアンモニオ）エチル）ホスフェート（９Ａ１Ｐ９）；エチル５，５－ジ（（Ｚ）－ヘプタデカ－８－エン－１－イル）－１－（３－（ピロリジン－１－イル）プロピル）－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－２－カルボキシレート（Ａ２－イソ５－２ＤＣ１８）；ビス（２－（ドデシルジスルファニル）エチル）３，３’－（（３－メチル－９－オキソ－１０－オキサ－１３，１４－ジチア－３，６－ジアザヘキサコシル）アザンジイル）ジプロピオネート（ＢＡＭＥ－Ｏ１６Ｂ）；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）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）；３，６－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン（ｃＫＫ－Ｅ１２）；ヘキサ（オクタン－３－イル）９，９’，９’’，９’’’，９’’’’，９’’’’’，９’－（（（（ベンゼン－１，３，５－トリカルボニル）イリス（アザンジイル））トリス（プロパン－３，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサノナノエート（ＦＴＴ５）；（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス（エタン－２，１－ジイル）（９Ｚ，９’Ｚ，９’’Ｚ，９’’’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ，１２’’Ｚ，１２’’’Ｚ）－テトラキス（オクタカ－９，１２－ジエノエート）（ＯＦ－Ｄｅｇ－Ｌｉｎ）；ＴＴ３；N^{1}，N^{3}，N^{5}－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）ベンゼン－１，３，５－トリカルボキサミド；Ｎ１－［２－（（１Ｓ）－１－［（３－アミノプロピル）アミノ］－４－［ジ（３－アミノプロピル）アミノ］ブチルカルボキサミド）エチル］－３，４－ジ［オレイルオキシ］－ベンズアミド（ＭＶＬ５）；ヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（８－（ノニルオキシ）－８－オキソオクチル）アミノ）オクタノアート（脂質５）；及びそれらの組合せを含む群から選択され得る。

【０２６２】

ある種の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性である。

【０２６３】

種々の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性ではない。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は切断可能である。

【０２６５】

ある種の実施形態では、カチオン性脂質は切断可能ではない。

【０２６６】
カチオン性脂質は、Ｄｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（ＰＮＡＳ．１１１；１１：３９５５－６０．２０１４）；Ｆｅｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｄｖ　Ｍａｔｅｒ．２８：２９３９．２０１６）；米国特許第９，５１２，０７３号明細書；及び米国特許第１０，２０１，６１８号明細書に更に詳細に記載されており、その各々は参照により本明細書に組み込まれる。
【０２６７】
Ｂ．ＰＥＧ化脂質
ＰＥＧ化脂質成分は、ナノ粒子の粒径及び安定性の制御を提供する。このような成分を添加することにより、複雑な凝集が防止され、循環寿命を延ばし、標的組織への脂質－核酸医薬組成物の送達を増大させる手段を提供し得る（Ｋｌｉｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２６８（１）：２３５－７１９０）。これらの成分は、インビボで医薬組成物から迅速に交換されるように選択され得る（例えば、米国特許第５，８８５，６１３号明細書を参照されたい）。
【０２６８】
企図されるＰＥＧ化脂質としては、誘導体化セラミド（例えば、Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－［スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）］（Ｃ８　ＰＥＧセラミド））等の、Ｃ$_{6}$～Ｃ$_{20}$（例えば、Ｃ$_{8}$、Ｃ$_{10}$、Ｃ$_{12}$、Ｃ$_{14}$、Ｃ$_{16}$又はＣ$_{18}$）長のアルキル鎖を有する脂質に共有結合した、最大５ｋＤａ長のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ）；１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリエチレングリコール（ＤＳＰＥ－ＰＥＧ）；１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ポリエチレングリコール（ＤＬＰＥ－ＰＥＧ）；又は１，２－ジステアロイル－ｒａｃ－グリセロ－ポリエテレングリコール（ＤＳＧ－ＰＥＧ）、ＰＥＧ－ＤＡＧ；ＰＥＧ－ＰＥ；ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ；ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ；ＰＥＧ－ｃｅｒ；ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピルカルバメート；２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド（ＡＬＣ－０１５９）；及びそれらの組合せである。
【０２６９】
ある種の実施形態では、ＰＥＧは、高分子量、例えば２０００～２４００ｇ／ｍｏｌを有する。ある種の実施形態では、ＰＥＧは、ＰＥＧ２０００（又はＰＥＧ－２Ｋ）である。ある種の実施形態では、本明細書のＰＥＧ化脂質は、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＬＰＥ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＧ－ＰＥＧ２０００、Ｃ８ＰＥＧ２０００又はＡＬＣ－０１５９（２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド）である。ある種の実施形態では、本明細書中のＰＥＧ化脂質は、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である。
【０２７０】
Ｃ．コレステロール系脂質
コレステロール成分は、ナノ粒子内の脂質二重層構造に安定性をもたらす。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１つ以上のコレステロール系脂質を含む。適切なコレステロール系脂質としては、例えば、ＤＣ－Ｃｈｏｉ（Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－エチルカルボキサミドコレステロール）、ｌ，４－ビス（３－Ｎ－オレイルアミノ－プロピル）ピペラジン（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍ．（１９９１）１７９：２８０；Ｗｏｌｆ　ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９７）２３：１３９；米国特許第５，７４４，３３５）、イミダゾールコレステロールエステル（「ＩＣＥ」；国際公開第２０１１／０６８８１０号パンフレット）、シトステロール（２２，２３－ジヒドロスチグマステロール）、β－シトステロール、シトスタノール、フコステロール、スチグマステロール（スチグマスタ－５，２２－ジエン－３－オール）、エルゴステロール；デスモステロール（３β－ヒドロキシ－５，２４－コレスタジエ

ン）；ラノステロール（８，２４－ラノスタジエン－３ｂ－オール）；７－デヒドロコレステロール（Δ５，７－コレステロール）；ジヒドロラノステロール（２４，２５－ジヒドロラノステロール）；チモステロール（５α－コレスタ－８，２４－ジエン－３β－オール）；ラソステロール（５α－コレスタ－７－エン－３β－オール）；ジオスゲニン（（３β，２５Ｒ）－スピロスト－５－エン－３－オール）；カンペステロール（カンペスト－５－エン－３β－オール）；カンペスタノール（５ａ－カンペスタン－３ｂ－オール）；２４メチレンコレステロール（５，２４（２８）－コレスタジエン－２４－メチレン－３β－オール）；コレステリルマルガレート（コレスタ－５－エン－３β－イルヘプタデカノエート）；オレイン酸コレステリル；コレステリルステアレート及びコレステロールの他の修飾形態が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰに使用されるコレステロール系脂質は、コレステロールである。

【０２７１】

Ｄ．ヘルパー脂質

ヘルパー脂質は、ＬＮＰの構造的安定性を増強し、エンドソーム脱出におけるＬＮＰを助ける。それは、ｍＲＮＡ薬物ペイロードの取込み及び放出を改善する。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、薬物ペイロードの取込み及び放出を増強するための融合特性を有する双性イオン脂質である。ヘルパー脂質の例は、１，２－ジオレオイル－ＳＮ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－Ｌ－セリンコリン（ＤＯＰＳ）、１，２－ジエライドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）及び１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＯＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ＤＭＰＣ、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）；１，２－ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）及び１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）である。

【０２７２】

他の例示的なヘルパー脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、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）、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）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、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）、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、セラミド、セレブロシド、ガングリオシド、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）又はこれらの組合せである。ある種の実施形態では、ヘルパー脂質は、ＤＯＰＥである。ある種の実施形態では、ヘルパー脂質は、ＤＳＰＣである。

【０２７３】

種々の実施形態では、本ＬＮＰは、（ｉ）ＯＦ－０２、ｃＫＫ－Ｅ１０、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１０－ＤＳ－３－Ｅ１８－１、ＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０又はＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－３－Ｅ１４から選択されるカチオン性脂質；（ｉｉ）ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；（ｉｉｉ）コレステロール；及び（ｉｖ）ＤＯＰＥを含む。

【０２７４】

Ｅ．脂質成分のモル比

上記成分のモル比は、ｍＲＮＡの送達におけるＬＮＰの有効性にとって重要である。カチオン性脂質、ＰＥＧ化脂質、コレステロール系脂質及びヘルパー脂質のモル比は、Ａ：Ｂ：Ｃ：Ｄ（ここで、Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＝１００％）である。いくつかの実施形態では、総脂質に対するＬＮＰ中のカチオン性脂質のモル比（すなわち、Ａ）は、３５～５５％、例

えば３５～５０％（例えば、３８～４２％、例えば４０％又は４５～５０％）である。いくつかの実施形態では、総脂質に対するＰＥＧ化脂質成分のモル比（すなわち、Ｂ）は、０．２５～２．７５％（例えば、１．５％等の１～２％）である。いくつかの実施形態では、総脂質に対するコレステロール系脂質のモル比（すなわち、Ｃ）は、２０～５０％（例えば、２７～３０％、例えば２８．５％又は３８～４３％）である。いくつかの実施形態では、総脂質に対するヘルパー脂質のモル比（すなわち、Ｄ）は、５～３５％（例えば、３０％等の２８～３２％又は１０％等の８～１２％）である。いくつかの実施形態では、（ＰＥＧ化脂質＋コレステロール）成分は、ヘルパー脂質と同じモル量を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ヘルパー脂質に対するカチオン性脂質のモル比は、１超である。

【０２７５】

ある種の実施形態では、本開示のＬＮＰは、

３５％～５５％又は４０％～５０％（例えば、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％又は５５％のモル比のカチオン性脂質）のモル比のカチオン性脂質；

０．２５％～２．７５％又は１．００％～２．００％（例えば、０．２５％、０．５０％、０．７５％、１．００％、１．２５％、１．５０％、１．７５％、２．００％、２．２５％、２．５０％又は２．７５％のモル比のＰＥＧ化脂質）のモル比のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲート（ＰＥＧ化）脂質；

２０％～５０％、２５％～４５％又は２８．５％～４３％のモル比（例えば、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％又は５０％のモル比のコレステロール系脂質）のコレステロール系脂質；及び

５％～３５％、８％～３０％又は１０％～３０％（例えば、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％又は３５％のモル比のヘルパー脂質）のモル比のヘルパー脂質を含み、

モル比の全ては、ＬＮＰの総脂質含有量に対するものである。

【０２７６】

ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のカチオン性脂質、１．５％のモル比のＰＥＧ化脂質、２８．５％のモル比のコレステロール系脂質及び３０％のモル比のヘルパー脂質を含む。

【０２７７】

ある種の実施形態では、ＰＥＧ化脂質は、ジミリストイル－ＰＥＧ２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）である。

【０２７８】

種々の実施形態では、コレステロール系脂質は、コレステロールである。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、１，２－ジオレオイル－ＳＮ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）である。

【０２８０】

ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＯＦ－０２；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＯＰＥを含む。

【０２８１】

ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のｃＫＫ－Ｅ１０；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレス

テロール；及び５％～３５％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８２】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１０－ＤＳ－３－Ｅ１８－１；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８３】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８４】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－３－Ｅ１４；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８５】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＳＭ－１０２；０．２５％～２．７５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＳＰＣを含む。
【０２８６】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３５％～５５％のモル比のＡＬＣ－０３１５；０．２５％～２．７５％のモル比のＡＬＣ－０１５９；２０％～５０％のモル比のコレステロール；及び５％～３５％のモル比のＤＳＰＣを含む。
【０２８７】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のＯＦ－０２；１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２８．５％のモル比のコレステロール；及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８８】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のｃＫＫ－Ｅ１０；１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２８．５％のモル比のコレステロール及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２８９】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１０－ＤＳ－３－Ｅ１８－１；１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２８．５％のモル比のコレステロール及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２９０】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－４－Ｅ１０；１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２８．５％のモル比のコレステロール及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２９１】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４０％のモル比のＧＬ－ＨＥＰＥＳ－Ｅ３－Ｅ１２－ＤＳ－３－Ｅ１４；１．５％のモル比のＤＭＧ－ＰＥＧ２０００；２８．５％のモル比のコレステロール；及び３０％のモル比のＤＯＰＥを含む。
【０２９２】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、５０％のモル比の９－ヘプタデカニル８－｛（２－ヒドロキシエチル）［６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル］アミノ｝オクタノエート（ＳＭ－１０２）；１０％のモル比の１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）；３８．５％のモル比のコレステロール；及び１．５％のモル比の１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリ

コール－２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）を含む。
【０２９３】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４６．３％のモル比の（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル］ジ（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（ＡＬＣ－０３１５）；９．４％のモル比の１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）；４２．７％のモル比のコレステロール；及び１．６％のモル比の２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド（ＡＬＣ－０１５９）を含む。
【０２９４】
ある種の実施形態では、ＬＮＰは、４７．４％のモル比の（４－ヒドロキシブチル）アザンジイル］ジ（ヘキサン－６，１－ジイル）ビス（２－ヘキシルデカノエート）（ＡＬＣ－０３１５）；１０％のモル比の１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）；４０．９％のモル比のコレステロール；及び１．７％のモル比の２－［（ポリエチレングリコール）－２０００］－Ｎ，Ｎ－ジテトラデシルアセトアミド（ＡＬＣ－０１５９）を含む。
【０２９５】
ＬＮＰ製剤中に含まれる各脂質の実際の量を計算するために、まず、カチオン性脂質のモル量を、所望のＮ／Ｐ比（ここで、Ｎは、カチオン性脂質中の窒素原子の数であり、Ｐは、ＬＮＰによって輸送されるｍＲＮＡ中のリン酸基の数である）に基づいて決定する。次に、カチオン性脂質のモル量及び選択したモル比に基づいて、他の脂質のそれぞれのモル量を計算する。次いで、これらのモル量を、各脂質の分子量を用いて重量に変換する。
【０２９６】
Ｆ．緩衝剤及び他の成分
核酸及び／又はＬＮＰを安定化し（例えば、ワクチン製品の貯蔵寿命を延長するために）、ＬＮＰ医薬組成物の投与を容易にし、且つ／又は核酸のインビボ発現を増強するために、核酸及び／又はＬＮＰを１つ以上の担体、標的化リガンド、安定化試薬（例えば、防腐剤及び抗酸化剤）及び／又は他の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて製剤化することができる。そのような賦形剤の例は、パラベン、チメロサール、チオマーサル、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム及びキレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）である。
【０２９７】
本開示のＬＮＰ組成物は、凍結液体形態又は凍結乾燥形態として提供することができる。様々な凍結保護剤、例えば、以下に限定されないが、スクロース、トレハロース、グルコース、マンニトール、マンノース、デキストロース等を使用することができる。凍結保護剤は、ＬＮＰ組成物の５～３０％（ｗ／ｖ）を構成し得る。いくつかの実施形態では、ＬＮＰ組成物は、例えば５～３０％（例えば、１０％）（ｗ／ｖ）のトレハロースを含む。凍結保護剤と共に製剤化されると、ＬＮＰ組成物は、－２０℃～－８０℃で凍結（又は凍結乾燥及び凍結保存）され得る。
【０２９８】
ＬＮＰ組成物は、緩衝水溶液で患者に提供され得る（予め凍結されている場合には解凍されるか、又は予め凍結乾燥されている場合にはベッドサイドにおいて緩衝水溶液で再構成され得る）。緩衝溶液は等張性であり得、例えば筋肉内又は皮内注射に適している。いくつかの実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）である。
【０２９９】
ＶＩ．ＬＮＰワクチンを作製するためのプロセス
本発明のＬＮＰは、様々な技術によって調製することができる。例えば、多重膜小胞（ＭＬＶ）は、脂質を適切な溶媒に溶解することによって適切な容器又は容器の内壁に選択された脂質を堆積させ、次いで溶媒を蒸発させて容器の内側に薄膜を残すことによって又は噴霧乾燥によって等、従来の技術に従って調製され得る。次いで、ＭＬＶの形成をもたらすボルテックス運動で水相を血管に添加することができる。次いで、単層小胞（ＵＬＶ）は、多層小胞の均質化、超音波処理又は押し出しによって形成することができる。更に

、単層小胞は、洗剤除去技術によって形成することができる。

【０３００】

様々な方法が米国特許出願公開第２０１１／０２４４０２６号明細書、米国特許出願公開第２０１６／００３８４３２号明細書、米国特許出願公開第２０１８／０１５３８２２号明細書、米国特許出願公開第２０１８／０１２５９８９号明細書及び米国特許出願公開第２０２１／００４６１９２号明細書に記載されており、ＬＮＰワクチンを作製するために使用することができる。１つの例示的なプロセスは米国特許出願公開第２０１６／００３８４３２号明細書に記載されているように、最初に脂質を脂質ナノ粒子に予備形成することなく、脂質の混合物と混合することによってｍＲＮＡをカプセル化することを伴う。別の例示的なプロセスは、米国特許出願公開第２０１８／０１５３８２２号明細書に記載されているように、予め形成されたＬＮＰをｍＲＮＡと混合することによってｍＲＮＡをカプセル化することを伴う。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡをロードしたＬＮＰを調製するプロセスは、１つ以上の溶液を周囲温度より高い温度に加熱する工程を含み、１つ以上の溶液は、予め形成された脂質ナノ粒子を含む溶液であり、溶液はｍＲＮＡを含み、混合溶液はＬＮＰ封入ｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、プロセスは、混合工程前にｍＲＮＡ溶液及び予め形成されたＬＮＰ溶液の一方又は両方を加熱する工程を含む。いくつかの実施形態では、プロセスは、混合工程中、予め形成されたＬＮＰを含む溶液、ｍＲＮＡを含む溶液及びＬＮＰ封入ｍＲＮＡを含む溶液の１つ以上を加熱することを含む。いくつかの実施形態では、プロセスは、混合工程後にＬＮＰ封入ｍＲＮＡを加熱する工程を含む。いくつかの実施形態では、溶液の１つ以上が加熱される温度は、約３０℃、３７℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃又は７０℃以上である。いくつかの実施形態では、溶液の１つ以上が加熱される温度は、約２５～７０℃、約３０～７０℃、約３５～７０℃、約４０～７０℃、約４５～７０℃、約５０～７０℃又は約６０～７０℃の範囲である。いくつかの実施形態では、温度は、約６５℃である。

【０３０２】

本開示に適したｍＲＮＡ溶液を調製するために、様々な方法が使用され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、本明細書中に記載される緩衝液に直接溶解され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、封入のために脂質溶液と混合する前に、ｍＲＮＡストック溶液を緩衝溶液と混合することによって作製され得る。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ溶液は、封入のために脂質溶液と混合する直前にｍＲＮＡストック溶液を緩衝溶液と混合することによって作製され得る。いくつかの実施形態では、適切なｍＲＮＡストック溶液は、ｍＲＮＡを約０．２ｍｇ／ｍｌ、０．４ｍｇ／ｍｌ、０．５ｍｇ／ｍｌ、０．６ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、１．０ｍｇ／ｍｌ、１．２ｍｇ／ｍｌ、１．４ｍｇ／ｍｌ、１．５ｍｇ／ｍｌ又は１．６ｍｇ／ｍｌ、２．０ｍｇ／ｍｌ、２．５ｍｇ／ｍｌ、３．０ｍｇ／ｍｌ、３．５ｍｇ／ｍｌ、４．０ｍｇ／ｍｌ、４．５ｍｇ／ｍｌ又は５．０ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で水又は緩衝液中に含有し得る。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡストック溶液は、ポンプを使用して緩衝溶液と混合される。例示的なポンプには、ギアポンプ、蠕動ポンプ及び遠心ポンプが含まれるが、これらに限定されない。典型的には、緩衝液は、ｍＲＮＡストック溶液よりも速い速度で混合される。例えば、緩衝液は、ｍＲＮＡストック溶液の速度よりも少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍又は２０倍大きい速度で混合され得る。いくつかの実施形態では、緩衝液は、約１００～６０００ｍｌ／分（例えば、約１００～３００ｍｌ／分、３００～６００ｍｌ／分、６００～１２００ｍｌ／分、１２００～２４００ｍｌ／分、２４００～３６００ｍｌ／分、３６００～４８００ｍｌ／分、４８００～６０００ｍｌ／分又は６０～４２０ｍｌ／分）の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、緩衝溶液は、約６０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、１４０ｍｌ／分、１８０ｍｌ／分、２２０ｍｌ／分、２６０ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、３４０ｍｌ

／分、３８０ｍｌ／分、４２０ｍｌ／分、４８０ｍｌ／分、５４０ｍｌ／分、６００ｍｌ／分、１２００ｍｌ／分、２４００ｍｌ／分、３６００ｍｌ／分、４８００ｍｌ／分又は６０００ｍｌ／分以上の流量で混合される。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡストック溶液は、約１０～６００ｍｌ／分（例えば、約５～５０ｍｌ／分、約１０～３０ｍｌ／分、約３０～６０ｍｌ／分、約６０～１２０ｍｌ／分、約１２０～２４０ｍｌ／分、約２４０～３６０ｍｌ／分、約３６０～４８０ｍｌ／分又は約４８０～６００ｍｌ／分）の範囲の流速で混合される。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡストック溶液は、約５ｍｌ／分、１０ｍｌ／分、１５ｍｌ／分、２０ｍｌ／分、２５ｍｌ／分、３０ｍｌ／分、３５ｍｌ／分、４０ｍｌ／分、４５ｍｌ／分、５０ｍｌ／分、６０ｍｌ／分、８０ｍｌ／分、１００ｍｌ／分、２００ｍｌ／分、３００ｍｌ／分、４００ｍｌ／分、５００ｍｌ／分又は６００ｍｌ／分以上の流速で混合される。

【０３０５】

脂質ナノ粒子に所望のｍＲＮＡを組み込むプロセスは、「負荷」と呼ばれる。例示的な方法は、Ｌａｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．（１９９２）３１２：２５５－８に記載されている。ＬＮＰに組み込まれた核酸は、脂質ナノ粒子の内部空間内、脂質ナノ粒子の二重層膜内又は脂質ナノ粒子膜の外面に完全に又は部分的に位置し得る。脂質ナノ粒子へのｍＲＮＡの組み込みは、本明細書では「カプセル化」とも呼ばれ、核酸は、完全に又は実質的に脂質ナノ粒子の内部空間内に含まれる。

【０３０６】

適切なＬＮＰは、様々なサイズで作製され得る。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子のサイズの減少は、ｍＲＮＡのより効率的な送達に関連する。適切なＬＮＰサイズの選択は、標的細胞又は組織の部位及び脂質ナノ粒子が作製されている用途をある程度考慮に入れることができる。

【０３０７】

脂質ナノ粒子の集団のサイジングのための様々な方法が利用可能である。様々な実施形態では、本明細書の方法は、ＬＮＰ粒径を測定するためにＺｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ）を利用する。一プロトコルでは、１０μｌのＬＮＰ試料を９９０μｌの１０％トレハロースと混合する。この溶液をキュベットに入れ、次いでＺｅｔａｓｉｚｅｒに入れる。ｚ平均直径（ｎｍ）又はキュムラント平均は、試料中のＬＮＰの平均サイズと見なされる。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒマシンは、動的光散乱（ＤＬＳ）及び自己相関関数のキュムラント解析を使用して多分散性指数（ＰＤＩ）を測定するために使用することもできる。平均ＬＮＰ直径は、形成されたＬＮＰの超音波処理によって減少し得る。断続的な超音波処理サイクルを準弾性光散乱（ＱＥＬＳ）評価と交互にして、効率的な脂質ナノ粒子合成を導くことができる。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、精製ＬＮＰの大部分、すなわちＬＮＰの約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％超は、約７０～１５０ｎｍ（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ又は約８０ｎｍ）のサイズを有する。いくつかの実施形態では、精製脂質ナノ粒子の実質的に全て（例えば、８０％又は９０％超）は、約７０～１５０ｎｍ（例えば、約１４５ｎｍ、約１４０ｎｍ、約１３５ｎｍ、約１３０ｎｍ、約１２５ｎｍ、約１２０ｎｍ、約１１５ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１００ｎｍ、約９５ｎｍ、約９０ｎｍ、約８５ｎｍ又は約８０ｎｍ）のサイズを有する。

【０３０９】

ある種の実施形態では、ＬＮＰは、３０～２００ｎｍの平均直径を有する。

【０３１０】

様々な実施形態では、ＬＮＰは、８０～１５０ｎｍの平均直径を有する。

【０３１１】
いくつかの実施形態では、本組成物中のＬＮＰは、１５０ｎｍ未満、１２０ｎｍ未満、１００ｎｍ未満、９０ｎｍ未満、８０ｎｍ未満、７０ｎｍ未満、６０ｎｍ未満、５０ｎｍ未満、３０ｎｍ未満又は２０ｎｍ未満の平均サイズを有する。
【０３１２】
いくつかの実施形態では、本組成物中のＬＮＰの約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％超は、約４０～９０ｎｍ（例えば、約４５～８５ｎｍ、約５０～８０ｎｍ、約５５～７５ｎｍ又は約６０～７０ｎｍ）又は約５０～７０ｎｍ（例えば、約５５～６５ｎｍ）の範囲のサイズを有し、噴霧による肺送達に適している。
【０３１３】
いくつかの実施形態では、本開示によって提供される医薬組成物中のＬＮＰの分散度又は分子サイズの不均一性の尺度（ＰＤＩ）は、約０．５未満である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約０．５未満、約０．４未満、約０．３未満、約０．２８未満、約０．２５未満、約０．２３未満、約０．２０未満、約０．１８未満、約０．１６未満、約０．１４未満、約０．１２未満、約０．１０未満又は約０．０８未満のＰＤＩを有する。ＰＤＩは、上述のようにＺｅｔａｓｉｚｅｒマシンによって測定することができる。
【０３１４】
いくつかの実施形態では、本明細書に提供される医薬組成物中の精製ＬＮＰの約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％超は、それぞれの個々の粒子内にｍＲＮＡを封入する。いくつかの実施形態では、医薬組成物中の精製脂質ナノ粒子の実質的に全て（例えば、８０％又は９０％超）は、個々の粒子内にｍＲＮＡを封入する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、５０％～９９％又は約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９８％若しくは９９％より大きい封入効率を有する。典型的には、本明細書で使用するための脂質ナノ粒子は、少なくとも９０％（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％又は９５％）の封入効率を有する。
【０３１５】
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、１対１０のＮ／Ｐ比を有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、１、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７又は約８を超えるＮ／Ｐ比を有する。ある種の実施形態では、本明細書の典型的なＬＮＰは、４のＮ／Ｐ比を有する。
【０３１６】
いくつかの実施形態では、本開示による医薬組成物は、少なくとも約０．５μｇ、１μｇ、５μｇ、１０μｇ、１００μｇ、５００μｇ又は１０００μｇの封入ｍＲＮＡを含有する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約０．１μｇ～１０００μｇ、少なくとも約０．５μｇ、少なくとも約０．８μｇ、少なくとも約１μｇ、少なくとも約５μｇ、少なくとも約８μｇ、少なくとも約１０μｇ、少なくとも約５０μｇ、少なくとも約１００μｇ、少なくとも約５００μｇ又は少なくとも約１０００μｇの封入ｍＲＮＡを含有する。
【０３１７】
いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型の化学合成又はインビトロ転写（ＩＶＴ）によって作製することができる。このプロセス、ＩＶＴプロセスでは、ｃＤＮＡ鋳型を使用してｍＲＮＡ転写物を生成し、ＤＮＡ鋳型をＤＮａｓｅによって分解する。転写物を深層濾過及び接線流濾過（ＴＦＦ）によって精製する。精製された転写物は、キャップ及び尾部を付加することによって更に修飾され、修飾されたＲＮＡは、深層濾過及びＴＦＦによって再び精製される。
【０３１８】
次いで、ｍＲＮＡを水性緩衝液中で調製し、ＬＮＰの脂質成分を含有する両親媒性溶液と混合する。ＬＮＰの４つの脂質成分を溶解するための両親媒性溶液は、アルコール溶液

であり得る。いくつかの実施形態では、アルコールはエタノールである。水性緩衝液は、例えば、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩又はコハク酸塩緩衝液であり得、約３．０～７．０、例えば、約３．５、約４．０、約４．５、約５．０、約５．５、約６．０又は約６．５のｐＨを有し得る。緩衝剤は、塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩及び／又はカルシウム塩）等の他の成分を含み得る。特定の実施形態では、水性緩衝液は、１ｍＭクエン酸塩、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５を有する。

【０３１９】

ｍＲＮＡ－ＬＮＰ組成物を作製するための例示的で非限定的なプロセスは、緩衝ｍＲＮＡ溶液をエタノール中の脂質の溶液と制御された均一な様式で混合することを含み、脂質：ｍＲＮＡの比率は、混合プロセスを通して維持される。この例示的な実施例では、ｍＲＮＡは、クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム二水和物及び塩化ナトリウムを含有する水性緩衝液中に存在する。ｍＲＮＡ溶液を溶液に添加する（１ｍＭクエン酸緩衝液、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．５）。４つの脂質（例えば、カチオン性脂質、ＰＥＧ化脂質、コレステロール系脂質及びヘルパー脂質）の脂質混合物をエタノールに溶解する。ｍＲＮＡ水溶液とエタノール脂質溶液を、ほぼ「無パルス」ポンプシステムを備えた「Ｔ」ミキサー内で４：１の体積比で混合する。次いで、得られた混合物を下流精製及び緩衝液交換に供する。緩衝液交換は、透析カセット又はＴＦＦシステムを使用して達成され得る。ＴＦＦを使用して、Ｔ混合プロセスによる形成直後に得られた新生ＬＮＰを濃縮及び緩衝液交換することができる。ダイアフィルトレーションプロセスは、透過液流と同じ速度で適切な緩衝液を添加することによって体積を一定に保つ連続操作である。

【０３２０】

ＶＩＩ．ｈＭＰＶワクチンの包装及び使用

本明細書に記載の１つ以上のｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原は、ワクチンとして対象に投与され得る。本明細書に記載のｈＭＰＶワクチンは、非経口（例えば、筋肉内、皮内、又は皮下）投与又は鼻咽頭（例えば、鼻腔内）投与のために製剤化又は包装することができる。様々な実施形態では、ｈＭＰＶワクチンは、肺投与のために製剤化又は包装され得る。様々な実施形態では、ｈＭＰＶワクチンは、静脈内投与のために製剤化又は包装され得る。ワクチン組成物は、即時製剤の形態であり得、組成物は、凍結乾燥され、使用直前に生理学的緩衝液（例えば、ＰＢＳ）で再構成される。ワクチン組成物は、水溶液又は凍結水溶液の形態でも出荷及び提供され得、再構成なしに対象に直接投与され得る（以前に凍結されている場合、解凍後）。

【０３２１】

したがって、本開示は、単一の容器でｈＭＰＶワクチンを提供するか、又は１つの容器（例えば、第１の容器）でｈＭＰＶワクチンを提供し、別の容器（例えば、第２の容器）で再構成するための生理学的緩衝液を提供するキット等の製造品を提供する。容器は、単回使用用量又は複数回使用用量を含有し得る。容器は、前処理されたガラスバイアル又はアンプルであり得る。製品は、使用説明書も含み得る。

【０３２２】

ｈＭＰＶワクチンの投与方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、気管内、硬膜外及び経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物は、任意の好都合な経路によって、例えば注入又はボーラス注射によって、上皮又は皮膚粘膜ライニング（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を介した吸収によって投与され得、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。

【０３２３】

特に例示的な実施形態では、ワクチンは、注射によって筋肉内（ＩＭ）投与される。ｈＭＰＶワクチンは、例えば上腕の三角筋で対象に注射することができる。そのような実施形態では、注射剤は、従来の形態で、すなわち、液体溶液若しくは懸濁液として、注射前に液体の溶液若しくは懸濁液とするのに適した固体形態として、又はエマルションとしてのいずれかで調製される。いくつかの実施形態では、注射溶液及び懸濁液は、滅菌粉末、凍結乾燥粉末、又は顆粒から調製される。

【０３２４】
本明細書に記載の医薬組成物は、標準的な針及び注射器を用いて、例えば、筋肉内、皮下又は静脈内に送達することができ、標準的な針及び注射器は、任意選択的に予め充填されている。更に、ペン送達装置（例えば、注入器（例えば、単室又は多室）又は自動注入器ペン）は、本明細書に記載の医薬組成物を送達する用途を有する。そのようなペン送達装置は、再使用可能又は使い捨て可能であり得る。いくつかの実施形態では、ワクチンは、吸入で使用するために提供され、予め充填されたポンプ、エアロゾル化装置又は吸入器で提供される。ある種の実施形態では、充填済シリンジを鼻腔内送達のための滴下投与に利用することができる。
【０３２５】
ｈＭＰＶワクチンは、それを必要とする対象に、予防有効量、すなわち十分な時間（例えば、１年、２年、５年、１０年又は生涯）にわたって標的病原体に対する十分な免疫防御を提供する量で投与することができる。十分な免疫保護は、例えば、病原体による感染に関連する症状の予防又は緩和であり得る。いくつかの実施形態では、所望の予防効果を達成するために、ワクチンの複数回用量（例えば、２回投与）を、それを必要とする対象に投与する（例えば、注射）。用量（例えば、初回用量及び追加用量）は、少なくとも例えば２週間、３週間、４週間、１ヶ月、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年又は１０年の間隔で分けられ得る。
【０３２６】
ＶＩＩＩ．医薬組成物
本開示に従って精製されたｈＭＰＶポリペプチド抗原は、例えばワクチンとして使用するための医薬組成物中の成分として有用であり得る。これらの組成物は、典型的には、ＲＮＡ又は結合ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む。本開示の医薬組成物は、小分子免疫賦活化剤（例えば、ＴＬＲアゴニスト）等の１つ以上の追加の成分も含み得る。本開示の医薬組成物は、リポソーム、水中油型エマルション又は微粒子等のＲＮＡのための送達系も含み得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む。ある種の実施形態では、組成物は、ＬＮＰ内に封入された抗原コード核酸分子を含む。
【０３２７】
ｈＭＰＶ結合ポリペプチドを患者に投与することを含む方法であって、ｈＭＰＶ結合ポリペプチドアンタゴニストが医薬組成物中に含まれる方法が提供される。本明細書に記載の医薬組成物は、適切な担体、賦形剤、及び適切な移入、送達、耐性等を提供する他の薬剤と共に製剤化される。多数の適切な製剤は、全ての医薬化学者に知られている処方書：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡに見ることができる。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質（カチオン性又はアニオン性）含有小胞（ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（商標）等）、ＤＮＡコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油型及び油中水型エマルション、エマルションカルボワックス（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、及びカルボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ”ＰＤＡ（１９９８）Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌ．５２：２３８－３１１も参照されたい。
【０３２８】
様々な送達系が公知であり、本明細書に記載の医薬組成物を投与するために使用することができ、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、変異ウイルスを発現することができる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスに封入することができる（例えば、Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２）。投与方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、気管内、硬膜外及び経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物は、任意の好都合な経路によ

って、例えば注入又はボーラス注射によって、上皮又は皮膚粘膜ライニング（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を介した吸収によって投与され得、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。

【０３２９】

本明細書に記載の医薬組成物は、標準的な針及びシリンジ（例えば、充填済シリンジ）を用いて皮下又は静脈内に送達することができる。更に、皮下送達に関して、ペン送達装置（例えば、自動注射器ペン）は、本明細書に記載の医薬組成物を送達する際の用途を容易に有する。

【０３３０】

副鼻腔への直接投与のために、本明細書に記載の医薬組成物は、例えば、マイクロカテーテル（例えば、内視鏡及びマイクロカテーテル）、エアロゾル化装置、粉末ディスペンサー、ネブライザー又は吸入器を使用して投与され得る。この方法は、エアロゾル化製剤中のｈＭＰＶ結合ポリペプチドの投与を必要とする対象への投与を含む。エアロゾル化抗体は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，１７８，０９８号明細書に記載されているように調製することができる。

【０３３１】

注射用製剤としては、静脈注射用、皮下注射用、皮内注射用、及び筋肉注射用、点滴用等の剤形が挙げられ得る。これらの注射用製剤は、公知の方法により調製することができる。例えば、注射用製剤は、例えば、注射に従来使用されている滅菌水性媒体又は油性媒体に上記の抗体又はその塩を溶解、懸濁又は乳化することによって調製され得る。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖及びその他の補助剤を含む等張液等が挙げられ、アルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン（５０ｍｏｌ）付加物））等の適当な可溶化剤と組み合わせて使用することができる。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の可溶化剤と組み合わせて使用することができる。このようにして調製された注射剤は、典型的には適当なアンプルに充填される。

【０３３２】

有利には、上記の経口又は非経口使用のための医薬組成物は、活性成分の用量に適合するのに適した単位用量の剤形に調製される。単位用量のそのような剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が挙げられる。

【０３３３】

ＩＸ．ワクチン接種方法

本明細書に開示されるｈＭＰＶワクチンは、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質に対する免疫応答を誘導するために対象に投与することができ、対象の抗抗原抗体価は、本明細書に開示されるｈＭＰＶワクチンを接種していない対象の抗抗原抗体価と比較して又はｈＭＰＶに対する代替ワクチンと比較して、ワクチン接種後に増加する。「抗－抗原抗体」は、抗原に特異的に結合する血清抗体である。

【０３３４】

一態様では、本開示は、本明細書に記載のｈＭＰＶワクチンを対象に投与することを含む、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発する、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護する方法を提供する。本開示はまた、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発することにおいて、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護することにおいて使用するための、本明細書に記載のｈＭＰＶワクチンを提供する。本開示はまた、ｈＭＰＶに対する免疫応答を誘発するための、又はｈＭＰＶ感染から対象を保護するためのワクチンの製造に使用するための、本明細書に記載のｈＭＰＶ　ｍＲＮＡを提供する。

【０３３５】

ある種の実施形態では、対象は、アジュバントと同時投与されるｈＭＰＶタンパク質ワクチンを投与された対象と比較して、ｈＭＰＶワクチンの投与後にｈＭＰＶに対する中和

抗体の同等の血清濃度を有する。
【０３３６】
ある種の実施形態では、ｈＭＰＶワクチンは、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質の部位φへの結合特異性で抗体の血清濃度を増加させる。
【０３３７】
ある種の実施形態では、ｈＭＰＶワクチンは、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質の部位Ｖへの結合特異性で抗体の血清濃度を増加させる。
【０３３８】
ある種の実施形態では、ｈＭＰＶワクチンは、既存のｈＭＰＶ免疫を有する対象における中和抗体の血清濃度を増加させる。
【０３３９】
本発明をよりよく理解するために、以下の実施例を記載する。これらの実施例は、例示のみを目的とし、決して本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。
【実施例】
【０３４０】
特定の実施形態の前述の説明は、本開示の一般的な性質を十分に明らかにするため、他者は、当業者の技術の範囲内で知識を適用することにより、本開示の一般的な概念から逸脱することなく、過度の実験を行うことなく、そのような特定の実施形態を様々な用途に容易に修正及び／又は適合させることができる。したがって、そのような適合形態及び修正形態は、本明細書に提示された教示及びガイダンスに基づいて、開示された実施形態の均等物の意味及び範囲内にあることが意図される。本明細書の表現又は用語は、本明細書の用語又は表現が教示及びガイダンスに照らして当業者によって解釈されるように、限定ではなく説明を目的とするものであることを理解されたい。
【０３４１】
実施例１：融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ糖タンパク質抗原構築物の作製
融合前立体配座の安定性を改善し、精製を強化し、より高い中和抗体価を誘導するために、候補ｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原構築物のパネルを、Ａ２－ＣＡＮ９７－８３（配列番号１）と命名されたカナダ由来のＡ２サブタイプに基づく野生型ｈＭＰＶ－Ｆ抗原における変異を用いて設計した。
【０３４２】
候補ｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原構築物のパネルの設計検討事項のグラフ表示を、２つの例示的構築物、Ｄ１８５Ｐ（配列番号５）及びＴ１６０Ｆ／Ｎ４６Ｖ（配列番号７）について図１に示す。各構築物は、以下の特徴を含んでいた：（１）シグナルペプチド；（２）アミノ酸１００～１０１におけるｐｒｅ－Ｆ切断部位変異（ＱＳからＲＲ）；（３）膜貫通ドメイン及び細胞質尾部の除去；（４）フィブリチンモチーフ（すなわち、ｆｏｌｄｏｎドメイン）の付加；（５）ＨＲＶ－３Ｃ切断部位；（６）８ｘＨｉｓタグ及びＳｔｒｅｐＩＩタグ；並びに（７）項目（４）～（６）に対する適切なリンカー（配列番号３）
【０３４３】
この骨格から、インシリコ分析を行って、充填空洞変異又は界面安定性変異のいずれかを付加することによってｐｒｅ－Ｆ立体配座安定性を増加させるであろう一点又は二点変異を決定した。合計で、候補ｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原のパネルは、表１の列１に示すように２１の異なる構築物で構成されていた。
【０３４４】
実施例２：融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物のタンパク質発現の評価
候補ｈＭＰＶ融合前Ｆ抗原構築物のそれぞれに対する核酸分子を単離し、発現ベクターにクローニングした。Ｅｘｐｉ２９３Ｆヒト細胞を使用した哺乳動物一過性トランスフェクション時の各構築物のタンパク質発現の産生を評価した。構築物のトランスフェクションの２４時間後、細胞溶解物又は上清をウエスタンブロットによる分析のために回収した。
【０３４５】

２１の候補設計のうち、９つのタンパク質抗原が産生された。しかし、１Ｌ培養物からのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって決定したところ、４つのタンパク質抗原のみが９０％以上の純度を有していた。２１個の構築物全てのタンパク質発現特性を表１に示す。高いタンパク質産生及び純度を有する構築物は、以下の変異を有していた：Ｄ１８５Ｐ、Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ、Ｋ１３８Ｆ、及びＧ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆ。

【０３４６】

【表６】

ID #	単一変異又は二重変異	1回目の培養	SDS-PAGEによる純度
1	D185P	高	>95%
2	G366F_K362Y	N/D	
3	K126F_E431A	N/D	
4	D87F_E327F	N/D	
5	R253F_E327F	N/D	
6	Y425F_A116Y	低	>70%
7	Q426F_T119F	低	>75%
8	T160F_N46V	高	>95%
9	K166F_E51F	N/D	
10	E327F_R329F	N/D	
11	R304K_D306W	N/D	
12	T160F_T49Y	N/D	
13	K126A	N/D	
14	K138F	高	>90%
15	T83F_K75F	N/D	
16	K362L_D454E	低	>75%
17	E305F	N/D	
18	A159F	低	>60%
19	G366F_K362F	高	>95%
20	G366D	低	>40%
21	K126F_E431F	N/D	

【０３４７】

実施例３：マウスにおける融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ抗原タンパク質構築物の免疫原性

続いて、表１に記載の純度９０％以上の４つの候補ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物を、Ａ１株由来の参照ｈＭＰＶ－Ｆタンパク質と比較して、マウスにおける免疫原性について評価した。

【０３４８】

表２に示す８匹のＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｎ＝８）の群に、水酸化アルミニウム（Ａｌ（ＯＨ）$_3$）をアジュバントとして添加した０．５μｇ用量のタンパク質抗原を、０日目（Ｄ）及び２１日目（Ｄ）に筋肉内（ＩＭ）注射によって投与した。全てのマウスから採血し、各ワクチン投与前並びに最後のワクチン接種の２週間後（Ｄ３５）に血清を抽出した。次いで、血清を使用して、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）（図２）及びｈＭＰＶマイクロ中和アッセイ（図３）によって測定される循環抗ｈＭＰＶ－Ｆ　ＩｇＧ力価

を決定して、抗体応答の中和活性を決定した。ｐｏｓｔ－Ｆ群の全てのタンパク質が実際にｐｏｓｔ－Ｆ立体配座にあることを確実にするために、タンパク質を投与の準備に先立って１０分間７０℃に加熱した。

【０３４９】

【表７】

表2-マウスにおけるhMPV F抗原ワクチン研究設計

群	マウス数	タンパク質抗原+アジュバント(ミョウバン)	用量(μg)	投与	根拠
1	8	hMPV A2-F D185P	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	試験構築物
2	8	hMPV A2-F T160F_N46V	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	試験構築物
3	8	hMPV A2-F K138F	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	試験構築物
4	8	hMPV A2-F G366F_K362F	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	試験構築物
5	8	hMPV A1 pre-F ロット1	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	A1 pre-F参照
6	8	hMPV A1 pre-F ロット2	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	A1 pre-F参照
7	8	hMPV A1 post-F (熱処理)	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	A1 post-F参照
8	8	hMPV B2 pre-F	0.5	脚あたり50μl(合計100μl)	B2 pre-F参照

【０３５０】

データは、Ａ２－Ｋ１３８Ｆ変異を有する構築物がｈＭＰＶ－Ｆ　ＥＬＩＳＡによって最も高い結合抗体価を誘導し、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ、Ａ２－Ｇ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆ、最後にＡ２－Ｄ１８５Ｐが続くことを示す（図２）。ｈＭＰＶ　Ａ２－ＧＦＰウイルスを用いたマイクロ中和によって評価した場合、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖが最も高い中和力価を有し、Ａ２－Ｋ１３８Ｆ、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｇ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆがこれに続いた（図３）。

【０３５１】

Ａ２－Ｋ１３８Ｆは最も高い結合抗体価及び２番目に高い中和抗体価を有したが、この構築物は溶液中で凝集体を形成することが見出され、不適切なタンパク質フォールディングの可能性を示し、したがって更なる評価から除外された。Ａ２－Ｇ３６６Ｆ＿Ｋ３６２Ｆもまた、２番目に低い結合抗体価及び最も低い中和抗体価を有したので、更なる評価から除外された。したがって、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖは、最高品質の抗体を誘導することが見出され、実施例４に記載されるように純度、サイズ及び熱安定性を評価するための高度分析解析のために選択された。

【０３５２】

実施例４：融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物の物理化学的特徴付け

Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物から産生されたタンパク質の純度、サイズ及び熱安定性を更に特徴付けるために、ＨＰ－ＳＥＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＳＥＣ－ＭＡＬＳ及びｎａｎｏＤＳＦ分析を行った。

【０３５３】

純度及びサイズ

ＨＰ－ＳＥＣ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、及びＳＥＣ－ＭＡＬＳ分析の結果を以下の表３に要

約する。

【０３５４】

【表８】

表3-融合前安定化hMPV F抗原構築物及び対照についてのSEC評価の要約。

	A1 A185P	A1 Post-F	A2 T160F_N46V	A2 D185P
HP-SEC三量体(%)	98.8	100	94.7	97.1
SEC-HPLC MW (kDa)	341.4	337.2	384.0	321.7
SEC-MALS MW (KDa)	224.4	282.5	266.5	224.3

【０３５５】

ＭＡＬＳからの分子量（ＭＷ）を三量体ピークについて決定した。ＳＥＣ－ＨＰＬＣの条件は以下の通りであった：ＴＳＫ　３０００ＳＷｘｌ　ＳＥＣカラム、リン酸緩衝液（０．２ＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、０．１Ｍのアルギニン、１％のＩＰＡ、ｐＨ６．５）、流速０．５ｍｌ／分。ＳＥＣ－ＭＡＬＳの条件は以下の通りであった：１．７μＭ、２００ÅのＢＥＨタンパク質カラム、及びｐＨ７．５の５０ｍＭのＴｒｉｓ緩衝液、流速０．３ｍｌ／分。

【０３５６】

図４は、参照Ａ１タンパク質、Ａ１－Ａ１８５Ｐ及びＡ１－ｐｏｓｔ－Ｆ、並びに以下のＡ２タンパク質抗原候補、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＡ２－Ｄ１８５ＰについてのＳＥＣ－ＭＡＬＳ結果を示す。４つ全てのタンパク質のデータも表３にまとめている。両方のＡ１参照タンパク質は、Ａ１－Ａ１８５Ｐ及びＡ１－ｐｏｓｔ－Ｆについて、それぞれ９８．８％以上の三量体形成並びに２２４及び２８３ｋＤａのＭＷを示す。Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＡ２－Ｄ１８５Ｐ構築物由来のタンパク質は、それぞれ２６７及び２２４ｋＤａのＭＷを有する９７．４％及び９７．１％の三量体で構成されていた。

【０３５７】

熱安定性

タンパク質変性の開始温度（Ｔｏｎｓｅｔ）及び融点（Ｔｍ）を、Ａ１－ｐｒｅ－Ｆ及びＡ１－ｐｏｓｔ－ＦタンパクＡ２候補タンパク質抗原、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＡ２－Ｄ１８５Ｐの大バッチロット及び小バッチロットの両方でナノスケール示差走査蛍光測定（ｎａｎｏＤＳＦ）を使用して決定した。試料を製剤緩衝液で最終濃度０．５ｍｇ／ｍｌに希釈し、二連でｎａｎｏＤＳＦキャピラリーに充填した。全ての測定は、ｎａｎｏＤＳＦ装置を使用して行った。加熱速度は、２０℃から９５℃まで毎分１．５℃であった。データは、ＰＲ．Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｖ１．０１を用いて記録し、分析した。

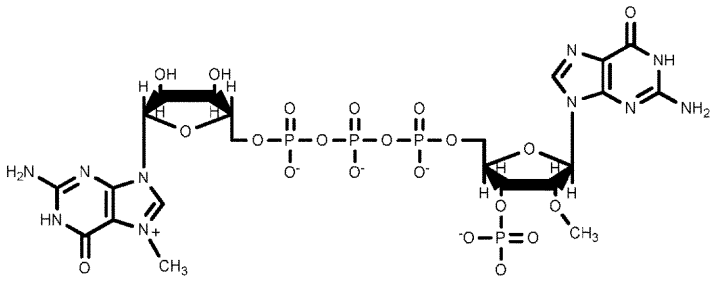
【０３５８】

図５は、Ａ１－ｐｒｅＦ（Ａ１８５Ｐ）及びＡ２－ｐｏｓｔＦ（ｎ＝３）の融解曲線を示し、それぞれ６０．１２℃及び８６．７℃のＴｍ値をもたらす。このデータは、ｎａｎｏＤＳＦがＡ１の融合前抗原と融合後抗原とを区別することができ、融解温度が約２７℃異なることを示している。

【０３５９】

興味深いことに、Ａ２　ｈＭＰＶ－Ｆ候補タンパク質抗原の熱安定性特性を比較すると、図６に見られるように、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物に由来するタンパク質は、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ構築物から産生されるより最小限に操作されたタンパク質よりも熱安定性であり、ほぼ９℃の融点上昇を伴うことが分かった（Ｔｍそれぞれ７０．４℃及び７９．３℃）。

【０３６０】
実施例５：融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物をコードするｍＲＮＡ
ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物の免疫原性を更に改善できるかどうかを決定するために、Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物をｍＲＮＡ系ワクチンでの試験のために選択した。Ａ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号９及び配列番号１１に示す。Ａ２－Ｄ１８５Ｐ構築物及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物のｍＲＮＡ　ＯＲＦを、それぞれ配列番号６及び配列番号８に示す。Ａ２－Ｄ１８５Ｐ構築物及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物のためのコドン最適化ｍＲＮＡ　ＯＲＦを、それぞれ配列番号１７及び配列番号１８に示す。
【０３６１】
本明細書に記載のｍＲＮＡは、ｈＭＰＶ　Ｆタンパク質抗原をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、少なくとも１つの５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、少なくとも１つの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、及び少なくとも１つのポリアデニル化（ポリ（Ａ））配列を含んでいた。ｍＲＮＡは、以下の構造を有する５’キャップを更に含んでいた。
【化１６】



【０３６２】
５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲの核酸配列を、それぞれ配列番号１３及び１４に列挙する。
【０３６３】
実施例６：マウスにおける融合前安定化ｈＭＰＶ　Ｆ抗原ｍＲＮＡ構築物の免疫原性
ｍＲＮＡを発現するＡ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物の相対的な免疫原性を、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と共に製剤化されたｍＲＮＡによるＩＭ注射の前後に循環抗ｈＭＰＶ－Ｆ力価を測定することによってマウスにおいて試験した。各ｍＲＮＡを、４０％のカチオン性脂質ＯＦ－０２、３０％のリン脂質ＤＯＰＥ、１．５％のＰＥＧ化脂質ＤＭＧＰＥＧ２０００及び２８．５％のコレステロールで構成されるＬＮＰにカプセル化した。或いは、ＬＮＰ脂質は、カチオン性脂質：ＰＥＧ化脂質：コレステロール：リン脂質が、４０：１．５：２８．５：３０である比として列挙され得る。
【０３６４】
８匹のＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｎ＝８）の群に、Ｄ０及びＤ２１に１μｇ用量をＩＭ注射によって投与した。全てのマウスから採血し、各ワクチン投与前並びに最後のワクチン接種の２週間後（Ｄ３５）に血清を抽出した。次いで、血清を使用して、ＥＬＩＳＡ（図７）及びｈＭＰＶマイクロ中和アッセイ（図８）によって測定される循環抗ｈＭＰＶ－ＦＩｇＧ力価を決定して、抗体応答の中和活性を決定した。
【０３６５】
ｍＲＮＡを発現するＡ２－Ｄ１８５Ｐ及びＡ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ構築物の両方が、ｈＭＰＶ－Ｆ　ＥＬＩＳＡによって、全ての時点で同様に高力価の結合抗体を誘導した（図７）。Ａ２－ＧＦＰウイルスを用いたマイクロ中和によって評価した場合、同様に強力な中和力価が両構築物によって誘導された（図８）。したがって、ｍＲＮＡ－ＬＮＰを介して発現させた場合、両方の抗原は同様に免疫原性であった。
【０３６６】
実施例７：ｈＭＰＶ及びＲＳＶを対象としたｍＲＮＡ多病原体ワクチンの合理的設計
ＲＳＶ及びｈＭＰＶは、インフルエンザウイルスに次いでヒト集団内で広範な罹患率を

引き起こす呼吸器ウイルスである（Ｃｏｌｌｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１３，Ｆｉｅｌｄｓ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ．６　ｅｄ：Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｋｉｎｓ）。疾患負荷にもかかわらず、両方のウイルスに対するワクチン及び治療戦略は依然として限られている。ｈＭＰＶ表面糖タンパク質とＲＳＶ表面糖タンパク質との間の実質的な相同性、並びに両方のウイルスに対する保護がより少ない注射をもたらし、ワクチンスケジュールを単純化するという実際的な考慮事項を考慮して（Ｌａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０１７，Ｃｌｉｎ　Ｖａｃｃｉｎｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４（１）：ｅ００２９８－１６）、ＲＳＶ及びｈＭＰＶ抗原構築物を含む混合ｍＲＮＡワクチンを設計した。

【０３６７】

したがって、以下の２つのｍＲＮＡ：（１）ＲＳＶ　Ｆ抗原構築物、ＦＤ３；及び（２）ｈＭＰＶ　Ｆ抗原構築物、Ａ２－ＣＡＮ９７－８３を含む混合ワクチンを共製剤化した。

【０３６８】

ｍＲＮＡ　ｈＭＰＶ構築物、並びに使用される５’及び３’ＵＴＲは、実施例６に記載されている。

【０３６９】

使用されるｍＲＮＡ　ＲＳＶ構築物は、米国仮特許出願第６３／２７６，２３３号明細書に記載されており、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３７０】

実施例８：マウスにおけるｈＭＰＶ及びＲＳＶに対するｍＲＮＡ多病原体ワクチンの免疫原性

実施例７に記載のｈＭＰＶ及びＲＳＶに対するｍＲＮＡ多病原体ワクチンの相対免疫原性を、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を配合したｍＲＮＡをＩＭ注射する前後に循環抗ＲＳＶ　ＦＤ３及び抗ｈＭＰＶ－Ｆ力価を測定することによってマウスにおいて評価した。各ｍＲＮＡを、４０％のカチオン性脂質ＯＦ－０２、３０％のリン脂質ＤＯＰＥ、１．５％のＰＥＧ化脂質ＤＭＧＰＥＧ２０００及び２８．５％のコレステロールで構成されるＬＮＰにカプセル化した。或いは、ＬＮＰ脂質は、カチオン性脂質：ＰＥＧ化脂質：コレステロール：リン脂質が、４０：１．５：２８．５：３０である比で列挙され得る。

【０３７１】

５群のＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｎ＝８）を、以下のレジメンに従ってＤ０及びＤ２１のＩＭ注射を介して免疫した：（１）群１－右後肢に投与した総体積５０μＬ中のｃＯｒｎ－ＥＥ１　ＬＮＰと製剤化した１μｇ用量のＲＳＶ　ｍＲＮＡを投与した。（２）群２－右後肢に投与した総体積５０μＬ中のｃＯｒｎ－ＥＥ１　ＬＮＰと製剤化した１μｇ用量のｈＭＰＶ　ｍＲＮＡを投与した。（３）群３－各後肢に５０μＬで送達した、１００μＬの総体積の単一のｃＯｒｎ－ＥＥ１　ＬＮＰ中に１μｇのＲＳＶ及び１μｇのｈＭＰＶ　ｍＲＮＡを含む共製剤を投与した。（４）群４－ＲＳＶ免疫原性対照として右後肢に投与した総体積５０μＬ中にミョウバンをアジュバントとして添加した１μｇのＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆタンパク質ナノ粒子を投与した。（５）群５－ｈＭＰＶ免疫原性対照として右後肢に投与した総体積５０μＬ中にミョウバンをアジュバントとして添加した１μｇのｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆを投与した。

【０３７２】

各ワクチン投与前並びに最後のワクチン接種（Ｄ３５）の２週間後に全てのマウスから採血し、Ｄ３５血清をＥＬＩＳＡで試験して循環抗ＲＳＶ及び抗ｈＭＰＶ－Ｆ力価を決定し、マイクロ中和アッセイで試験してＲＳＶ及びｈＭＰＶ抗体応答の中和活性を決定した。

【０３７３】

ＲＳＶ　ｍＲＮＡは、単独で与えられた場合、又はｈＭＰＶと共製剤化された場合、ＲＳＶ－Ｆ　ＥＬＩＳＡによって同様の力価を誘導した（図９）。同様に、ｈＭＰＶ　ｍＲＮＡは、単独で与えられたとき、又はＲＳＶと共製剤化されたとき、ｈＭＰＶ－Ｆ　ＥＬ

ＩＳＡによって同様の力価を誘導した（図１０）。ＲＳＶ　Ａ２－ＧＦＰウイルスを用いたマイクロ中和によって評価した場合、単独又はｈＭＰＶと組み合わせて送達されたＲＳＶ　ｍＲＮＡによって同様に強力な中和力価が誘導された（図１１）。ｈＭＰＶ　Ａ２－ＧＦＰウイルスを用いたマイクロ中和によって評価した場合、単独又はＲＳＶと組み合わせて送達されたｈＭＰＶ　ｍＲＮＡによって同様に強力な中和力価が誘導された（図１２）。したがって、単一のＬＮＰとして送達されるＲＳＶ及びｈＭＰＶ　ｍＲＮＡの共製剤による免疫化は、単独で送達されるいずれの抗原に対しても同様に免疫原性である。

【０３７４】

実施例９：ｈＭＰＶ　Ｆポリペプチド抗原－抗体結合の分析

ｈＭＰＶ　Ｆ構築物への抗体の結合をオクテットで試験した。全ての試料及び抗体を動的緩衝液（ＦｏｒｔｅＢｉｏ動的緩衝液１Ｘ希釈＋ＰＢＳ）で希釈して、それぞれ５μｇ／ｍＬ及び１μｇ／ｍＬの最終濃度にした。抗体をプロテインＡバイオセンサにロードし、全ての抗原の結合を以下の条件で試験した：初期ベースライン（１２０秒）、抗体の負荷（１８０秒）、第２のベースライン（１２０秒）、抗原の会合（１８０秒）、抗原の解離（１２０秒）。結合結果を、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　１２．０ソフトウェアを使用して分析した。

【０３７５】

表４は、Ａ２－Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＡ２－Ｄ１８５Ｐが、ｍＡｂ　ＭＰＥ８、１０１Ｆ、３３８及びＤＳ７について予想される結合パターンを有したことを示す。

【０３７６】

【表９】

表4-hMPV F抗原性構築物の結合特性

抗体	部位	A1 pre-F(A185P)	A1 post-F*	A2 pre-F(D185P)	A2 pre-F(T160F/N46V)
MPE8	III	+	-	+	+
101F	IV	+	+	+	+
338	II	+	+	+	+
DS7	I	+(低)	+	+(低)	+(低)

【０３７７】

実施例１０：ｈＭＰＶ　Ｆ抗原発現

ＨＥＫ２９３細胞－３０万細胞／ウェル

次に、ＨＥＬＡ細胞を６ウェルプレートに２ｍＬＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ中３０万細胞／ウェルで播種した。翌日、リポフェクタミン２０００を含む１μｇ／ウェルのｈＭＰＶ　ｍＲＮＡ構築物で細胞をトランスフェクトした。翌日、細胞を回収し、５００μＬ／ウェルのＲＩＰＡ＋１ｘＨＡＬＴ＋０．２％Ｏｍｎｉｃｌｅａｖｅに溶解した。溶解物を氷上で１０分間インキュベートした。１５μＬの溶解物を５μＬのＮｕＰＡＧＥ　ＬＤＳ試料緩衝液と合わせた。

【０３７８】

試料を、１８５Ｖで７５分間、８～１６％勾配ＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動した。タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。ブロットを室温で１時間、インターセプトタンパク質非含有ブロッキング緩衝液でブロッキングした。ブロットを、１次抗体であるＮＢＰ２－５０５０５マウス抗ｈＭＰＶ－Ｆ（ｈＭＰＶ２４）（Ｎｏｖｕｓ）により、インターセプトタンパク質非含有ブロッキング緩衝液において４℃で一晩染色した。ブロットをＴＢＳＴにより３ｘ５分間洗浄した。ブロットを、インターセプトブロッキング緩衝液中のロバ抗マウス８００二次抗体により室温で１時間染色した。ブロットをＴＢＳＴで４ｘ５分洗浄し、次いで、Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙでスキャンした。

【０３７９】

結果を図１３に示す。Ｄ１８５Ｐは、６０ｋＤａの予想分子量付近で強い発現を示した

。Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖはタンパク質発現を示したが、シグナルはＤ１８５Ｐより有意に低かった。

【０３８０】

ＨＳＫＭ細胞

ｍＲＮＡを２４ウェルプレート中のヒト骨格筋（ＨＳＫＭ）細胞にトランスフェクトした。２４時間後、フローシトメトリを使用してエピトープ発現を測定した。細胞数／ウェル＝１００ｋ。２４時間のトランスフェクション後、ウェルをＰＢＳで洗浄し、トリプシン（０．２５％）を添加して細胞を分離した。細胞をフローシトメトリのために９６ウェルプレートに分配し、抗体を添加する前に細胞内染色（Ｃｙｔｏｐｅｒｍ）について処理した。二次抗体はヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ－カタログ番号１０９－１１５－０９８）であった。

【０３８１】

ＭＮＲ ｈＭＰＶ Ｄ１８５Ｐ発現レベルは、ＭＮＲ ｈＭＰＶ ＣＡＮ９７－８３と同様であった。ＭＮＲ ｈＭＰＶ Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖは、全てのエピトープについてより高い発現レベルを示した。

【０３８２】

実施例１１：ＭＩＭＩＣシステムにおけるｐｒｅ－及びｐｏｓｔ－安定化ｈＭＰＶ Ｆ抗原タンパク質構築物の免疫原性

序論：

ＭＩＭＩＣ（著作権）（モジュール免疫インビトロ構築物（Ｍｏｄｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｅ Ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ））システムは、インビボでワクチン接種／変曲部位で起こるインビトロでの自然免疫応答及び適応免疫応答を刺激することができる。Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｓａｎｏｆｉ Ｐａｓｔｅｕｒ ｐｏｓｔｅｒ，“Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｌａｓｓ－ｓｗｉｔｃｈｅｄ ＹＦ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｓｅｃｒｅｔｉｎｇ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｎａｉｖｅ Ｂ ｃｅｌｌｓ”。ＭＩＭＩＣシステムを使用すると、ヒト生理学に固有のいくつかの態様、例えばＨＬＡハプロタイプ、年齢、自己免疫像、及び性別を再現することができ、それによって動物モデルで行われる免疫原性研究を補完する。Ｈｉｇｂｅｅ ｅｔ ａｌ．（２００９）ＡＴＬＡ３７：１９－２７。

【０３８３】

この目的のために、ｐｒｅ－及びｐｏｓｔ－ｈＭＰＶ Ｆ抗原タンパク質構築物を、対照と比較して免疫原性応答の質を評価するために、ＭＩＭＩＣシステムで試験した。対照群を含めた：未処理対照（ヒト骨格筋細胞を含まない（ＨＳＫを含まない）抗原なし）、参照抗原－フェリチンナノ粒子に融合したＲＳＶ ｐｒｅ－Ｆタンパク質（ｐｒｅ－ＦＮＰ）及びポリオワクチン（ＩＰＯＬ）。

【０３８４】

材料及び方法

簡潔には、２２人の異なるヒト血液ドナーから磁気ビーズ分離キットを介してＰＢＭＣを採取した。ヒト樹状細胞（ＤＣ）及びそれから選択されるＢ細胞をヒト骨格筋細胞（ＨＳＫＭＣ）に添加して共培養し、ｈＭＰＶ ｐｒｅ－Ｆ抗原タンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ又は５００ｎｇ／ｍｌ）又はｈＭＰＶ ｐｏｓｔ－Ｆ抗原タンパク質（１００ｎｇ／ｍｌ）のいずれかで刺激した。Ｂ細胞応答については、１４日間の共培養の後、上清を回収し、抗体の特異性及び機能について分析した。

【０３８５】

結果：

図１５は、ＭＩＭＩＣ設定を示す。同様のレベルの発現が、Ｔ１６０Ｆ＿Ｎ４６Ｖ及びＤ１８５Ｐについて、７５ｎｇ／ｍｌ及び３７５ｎｇ／ｍｌの用量で、共通のｐｒｅ－Ｆ／ｐｏｓｔ－Ｆエピトープについて観察された（図１４、パネルＡ～Ｃ）。活性化ＭＩＭＩＣ共培養を確認するために、以前に分析したポリオワクチン（ＩＰＯＬ）及び抗原（ＲＳＶ ｐｒｅ－Ｆ－ＮＰ）を陽性対照として使用した。図１６に示すように、パネルＡ～

Ｃ、１：５０希釈でのＩＰＯＬ処理は、未処理対照と比較して、３つのポリオ株（ポリ１、２、及び３）に対する抗体応答を誘発した。同様に、共培養の５０ｎｇ／ｍｌのＲＳＶ ｐｒｅ－Ｆ　ＮＰ処理は、ＲＳＶ　ｐｒｅ－Ｆ（図１７、パネルＡ）及びＲＳＶ　ｐｏｓｔ－Ｆ（図１７、パネルＢ）の両方に対するＩｇＧ特異的抗体応答を誘発した。更に、これらの抗体は、ＲＳＶ中和アッセイ（図１７、パネルＣ）で測定した場合にも機能的であった。

【０３８６】

ｈＭＰＶのｐｒｅ－Ｆ及びｐｏｓｔ－Ｆタンパク質は、高いｐｒｅ－Ｆ及びｐｏｓｔ－Ｆ抗体応答（図１８、パネルＡ及びＢ）及び高い中和抗体価（図１９）を示した。

【０３８７】

実験群、ｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆ抗原タンパク質又はｈＭＰＶ　ｐｏｓｔ－Ｆ抗原タンパク質で処理した共培養物からの上清は、抗原対照なしと比較して、ｈＭＰＶ　ｐｒｅ－Ｆ（図２０、パネルＡ）及びｈＭＰＶ　ｐｏｓｔ－Ｆ抗原（図２０、パネルＢ）の両方に対する堅牢なＩｇＧ抗体応答を誘発した。また、これらの抗体は、ｈＭＰＶ中和アッセイ（図２１）で測定したところ、機能的であった。３つ全ての処理群からの抗体は、ｈＭＰＶ ｐｒｅ－及びｐｏｓｔ－融合Ｆ抗原に結合し、ウイルス感染力を中和し、ｐｒｅ－及びｐｏｓｔ－ｈＭＰＶが中和エピトープを共有するという考えを裏付けている。

【０３８８】

本開示の他の実施形態は、本明細書の考察及び本明細書に開示される開示の実施から当業者に明らかであろう。本明細書及び実施例は、例示としてのみ考慮されることが意図され、本開示の真の範囲及び趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示される。

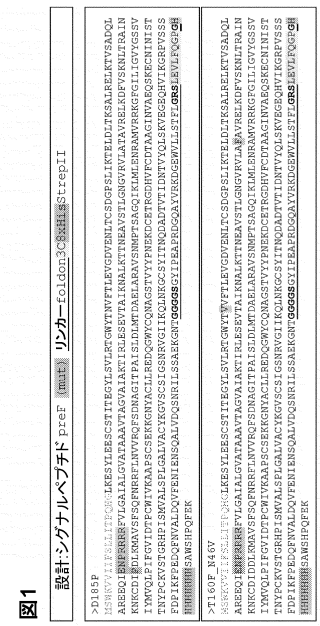
【０３８９】

本明細書で引用される全ての特許及び刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

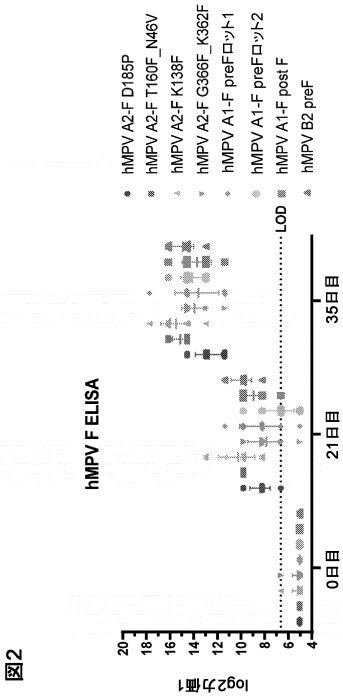
【図１】

図1



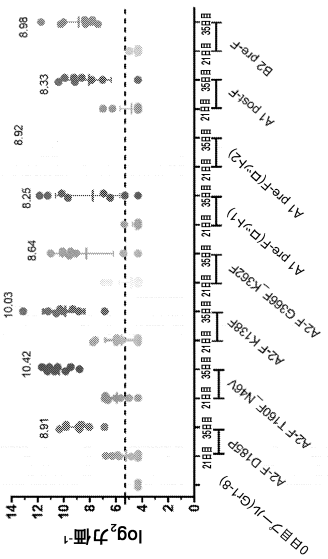
【図２】

図2



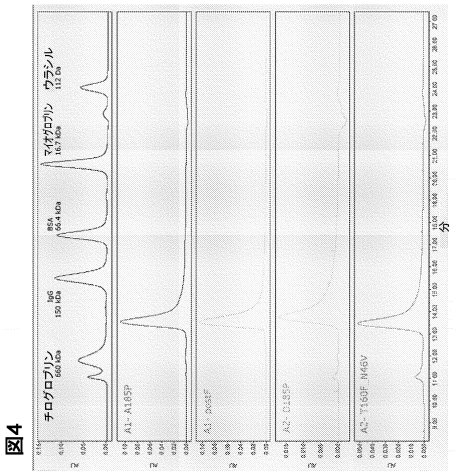
【図３】

図3



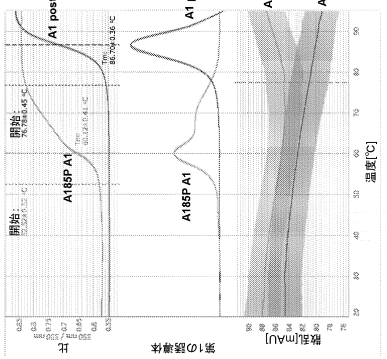
【図４】

図4



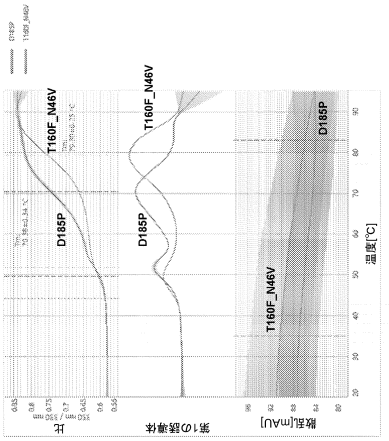
【図５】

図5



【図６】

図6



【図７】

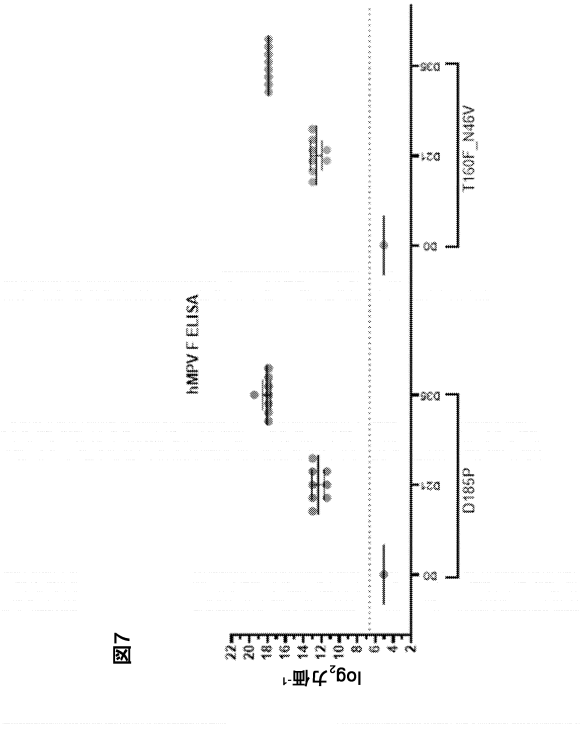


図7

【図８】

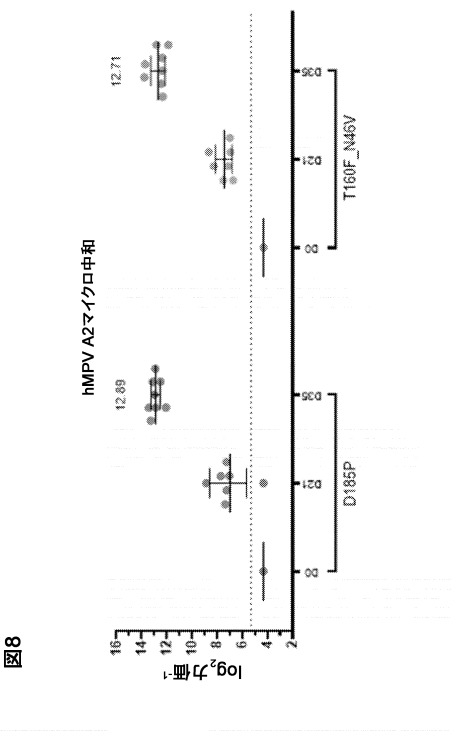


図8

【図９】

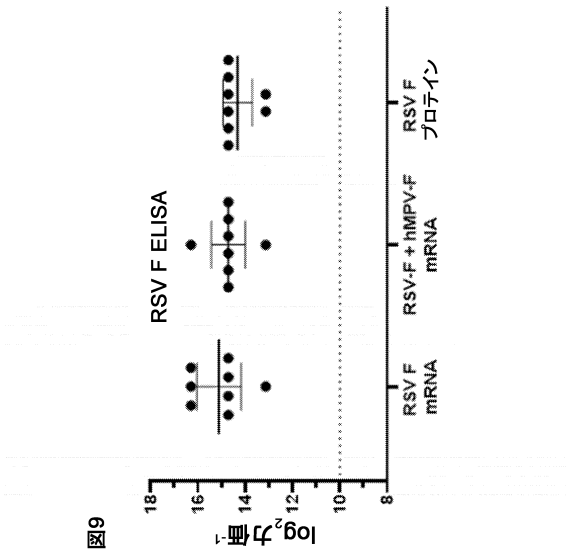


図9

【図１０】

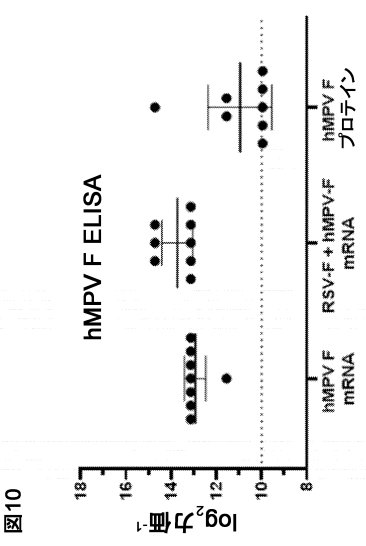


図10

【図１１】

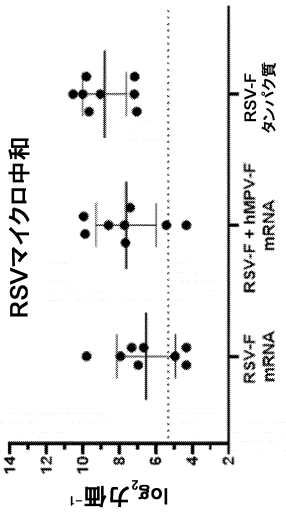


図11

【図１２】

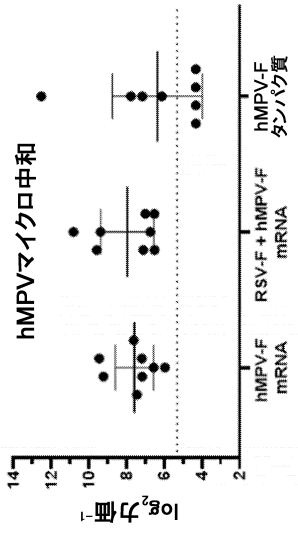


図12

【図１３】

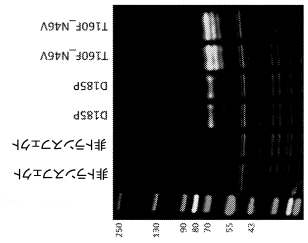


図13

【図１４】

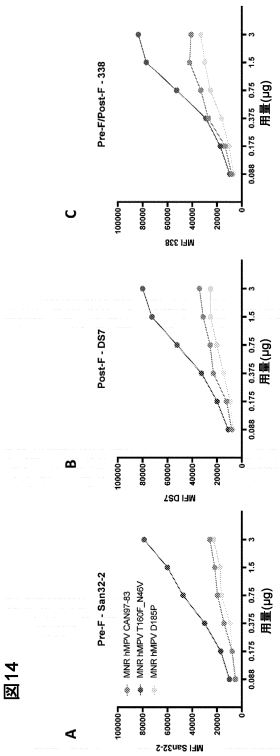


図14

【図１５】

図15

条件	濃度	ADP
HSKMで非処理	-	
HSKMなしで非処理	-	
RSV pre-F NP対照	50 ng/ml	
hMPV preFタンパク質	100 ng/ml	
hMPV preFタンパク質	500 ng/ml	
hMPV postFタンパク質	100 ng/ml	
MNR hMPV D185P	75 ng/ml	OF-02
MNR hMPV D185P	375 ng/ml	OF-02
MNR hMPV T160F_N46V	75 ng/ml	OF-02
MNR hMPV T160F_N46V	375 ng/ml	OF-02
IPOL	1:50	

【図１６】

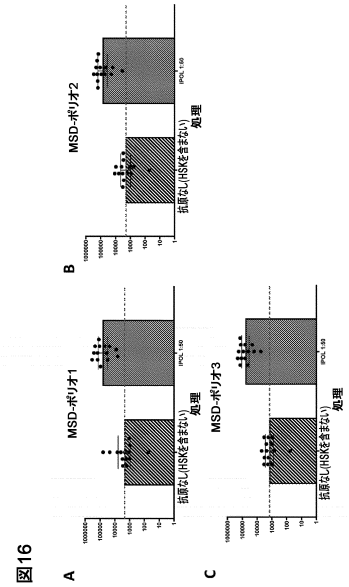


図16

【図１７】

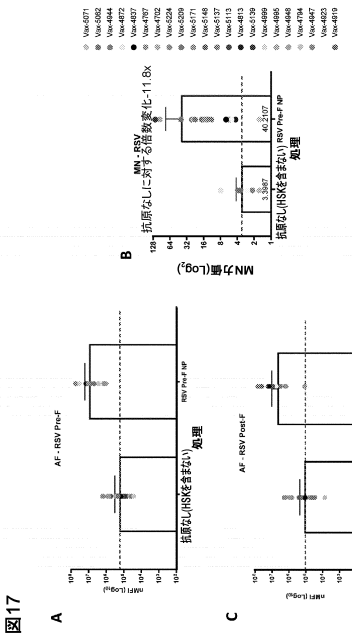


図17

【図１８】

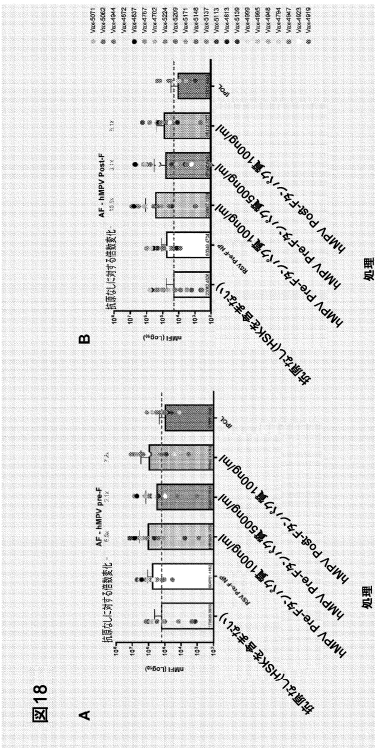


図18

【図１９】

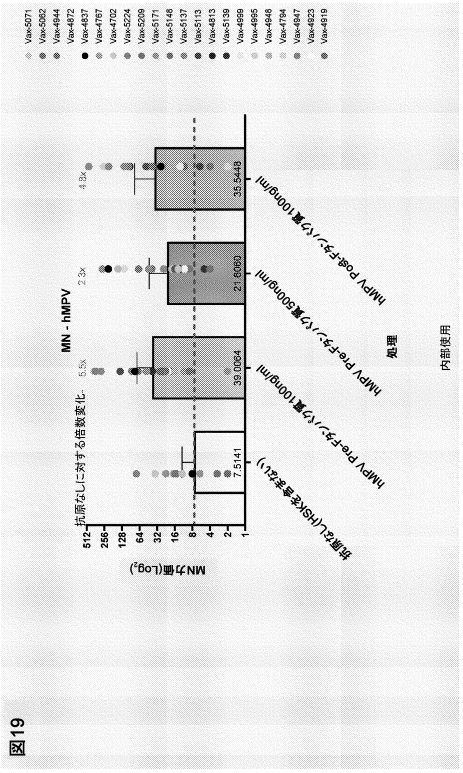


図19

【図２０】

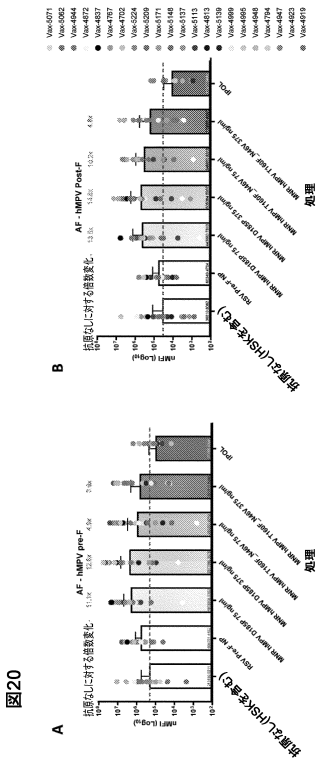


図20

【図２１】

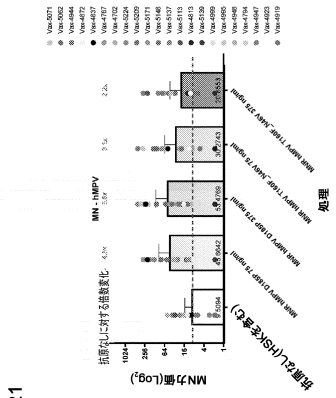


図21

【配列表】

<u>2024542635000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/080555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 A61K39/155 A61P11/00 A61P31/14 C07K14/005
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/149743 A2 (ID BIOMEDICAL CORP QUEBEC [CA]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE] ET AL.) 29 December 2010 (2010-12-29)	1,3-5, 33-35, 37-40, 75,92,93
Y	*** para. 21-23, 58, 75, 77, 79, 85, 160, claims 7, 17, 19, SEQ ID NO: 6 ***	2,6-32, 36, 41-74, 76-91
Y	PILAEV MARTIN ET AL: "Evaluation of pre-and post-fusion Human metapneumovirus F proteins as subunit vaccine candidates in mice", VACCINE, vol. 38, 29 January 2020 (2020-01-29), pages 2122-2127, XP055937929, *** page 2126 right col. ***	2,6-32, 36, 41-74, 76-91

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 February 2023	25/04/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Heder, Andreas

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/080555

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/351048 A1 (RAUCH SUSANNE [DE]) 21 November 2019 (2019-11-21) *** para. 148-150, 166, 227, 343, 351, 372-374, 382, 407-456, 584-586, Table XI *** -----	1-93

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/080555

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

19, 26, 27(completely); 1-18, 20-25, 28-93(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/080555

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 19, 26, 27(completely); 1-18, 20-25, 28-93(partially)

Antigenic hMPV prefusion F polypeptide or nucleic acid encoding it, lacking TM domain and cytoplasmic tail, and comprising HRV-3C protease cleavage site, having amino acid substitutions T160F and N46V relative to SEQ ID NO: 1, compositions comprising the same, and uses

---

2. claims: 1-18, 20-25, 28-93(all partially)

Group of inventions relating to antigenic hMPV prefusion F polypeptides or nucleic acids encoding them, lacking TM domain and cytoplasmic tail, and comprising HRV-3C protease cleavage site, having amino acid substitutions different from invention 1, relative to SEQ ID NO: 1, compositions comprising the same, and uses

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/080555

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

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

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/080555

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010149743 A2	29-12-2010	AU 2010264686 A1	19-01-2012
		CA 2766205 A1	29-12-2010
		CN 102548578 A	04-07-2012
		EA 201270062 A1	28-02-2013
		EP 2445527 A2	02-05-2012
		JP 5796011 B2	21-10-2015
		JP 2012530761 A	06-12-2012
		KR 20120093811 A	23-08-2012
		SG 176807 A1	30-01-2012
		US 2012135028 A1	31-05-2012
		WO 2010149743 A2	29-12-2010
		ZA 201109164 B	26-09-2012
US 2019351048 A1	21-11-2019	EP 3558356 A2	30-10-2019
		US 2019351048 A1	21-11-2019
		US 2021401971 A1	30-12-2021
		WO 2018115527 A2	28-06-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	31/7088	
A61P	*37/04 (2006.01)*	A61P	37/04	
A61P	*31/14 (2006.01)*	A61P	31/14	
A61K	*35/76 (2015.01)*	A61K	35/76	

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

(72)発明者　スカンヤ・サズマル
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　アントニア・ステューブラー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　マイケル・キシュコ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　ソフィア・マンドル
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　リンオン・ジャン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　ジョシュ・ディナポリ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　ジュディス・アラマレス－サピュエイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　ナタリー・アノソヴァ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　スーダ・チヴクラ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　ヒラリー・ダンツ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　トッド・ストラグネル
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス
(72)発明者　レイチェル・グロッポ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９．ケンブリッジ．シドニー・ストリート３８．サノフィ・パスツール・バイオロジックス

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y

Fターム（参考）
AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB33
4H045 AA10 AA11 AA30 BA55 CA01 DA86 EA31 FA74