

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-528418
(P2024-528418A)

(43)公表日 令和6年7月30日(2024.7.30)

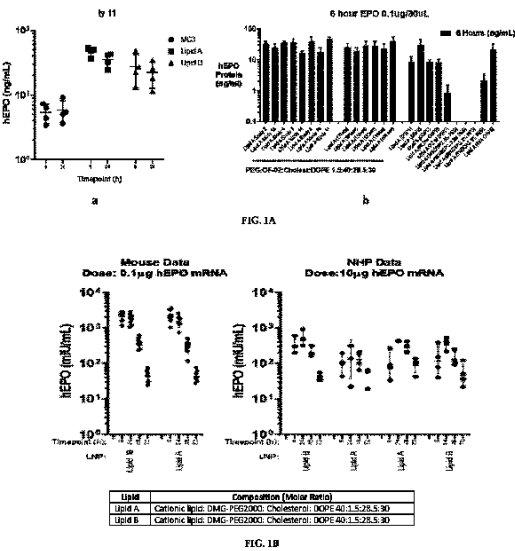
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/145 (2006.01)	A 6 1 K	39/145	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16		4 C 0 8 5
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7115		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全96頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-577590(P2023-577590)	(71)出願人	504456798		
(86)(22)出願日	令和4年6月17日(2022.6.17)		サノフィ		
(85)翻訳文提出日	令和6年2月8日(2024.2.8)		S A N O F I		
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/055655		フランス国7 5 0 1 7パリ. アヴェニ		
(87)国際公開番号	WO2022/264109		ユ・ドゥ・ラ・グランデ・アルメ4 6		
(87)国際公開日	令和4年12月22日(2022.12.22)	(74)代理人	100127926		
(31)優先権主張番号	63/212,523		弁理士 結田 純次		
(32)優先日	令和3年6月18日(2021.6.18)	(74)代理人	100140132		
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 竹林 則幸		
	米国(US)	(74)代理人	100216105		
(31)優先権主張番号	21315198.8		弁理士 守安 智		
(32)優先日	令和3年10月13日(2021.10.13)	(72)発明者	スーダ・チヴクラ		
(33)優先権主張国・地域又は機関			アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2		
	欧州特許庁(EP)		1 4 2. ケンブリッジ. ビニー・ストリ		
(31)優先権主張番号	63/276,243		ート5 0. サノフィ. パテント・デパー		
		最終頁に続く	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 多価インフルエンザワクチン

(57)【要約】

8つのメッセンジャーRNA (mRNA) を含み、それぞれのmRNAが異なるインフルエンザ抗原をコードするオープンリーディングフレームを含む八価のインフルエンザワクチンが提供される。前記mRNAを送達するための脂質ナノ粒子 (LNP) も提供される。

【選択図】 図1 A、図1 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

8つのメッセンジャーRNA（mRNA）を含み、それぞれのmRNAが異なるインフルエンザ抗原をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含むインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 2】

（i）1つもしくはそれ以上のヘマグルチニン（HA）抗原、（ii）1つもしくはそれ以上のノイラミニダーゼ（NA）抗原、または（iii）少なくとも1つのHA抗原および少なくとも1つのNA抗原をコードする8つのmRNAを含む、請求項1に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 3】

インフルエンザA、Bおよび／またはCウイルスの抗原をコードする1つまたはそれ以上のmRNAを含み、抗原はインフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスのHAおよび／またはNA抗原である、請求項1または2に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 4】

抗原が、インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスのHAおよび／またはNA抗原である、請求項1～3のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 5】

インフルエンザAウイルスのHA抗原は、サブタイプH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、およびH18から選択される、請求項3または4に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 6】

インフルエンザAウイルスのNA抗原が、サブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10、およびN11から選択される、請求項3～5のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 7】

インフルエンザBウイルスのHAおよびNA抗原が、インフルエンザB／Yamagata系統またはインフルエンザB／Victoria系統由来である、請求項3～6のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 8】

HA抗原およびNA抗原が、H1N1、H3N2、H2N2、H5N1、H7N9、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H5N2、およびH10N7サブタイプならびに／またはB／YamagataおよびB／Victoria系統からなる群から選択される、請求項2～7のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 9】

H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB／Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB／Victoria由来のHA抗原をコードする1つのmRNAを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 10】

H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、N2 NA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、N1 NA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB／Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB／Yamagata系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB／Victoria系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB／Victoria系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNAを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

ORF はコドン最適化されている、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 1 2】

mRNA 分子は、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)、および少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列を含む、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 1 3】

mRNA は、少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

10

【請求項 1 4】

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%、または 100% が化学修飾されている、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 1 5】

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%、または 100% が化学修飾されている、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

20

【請求項 1 6】

化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、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-1-メチル-1-デアザプソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-5-アザウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン、および 2'-O-メチルウリジンからなる群から選択される、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

30

【請求項 1 7】

化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、5-メチルシトシン、5-メトキシウリジン、およびその組合せからなる群から選択される、請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 1 8】

化学修飾は N1-メチルプソイドウリジンである、請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 1 9】

mRNA が脂質ナノ粒子 (LNP) に製剤化されている、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

40

【請求項 2 0】

LNP が、少なくとも 1 つのカチオン性脂質を含む、請求項 1 9 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 2 1】

カチオン性脂質が生分解性である、請求項 2 0 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 2 2】

カチオン性脂質が生分解性ではない、請求項 2 0 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 2 3】

50

カチオン性脂質が切断可能である、請求項 20 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 24】

カチオン性脂質が切断可能ではない、請求項 20 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 25】

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、および GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 からなる群から選択される、請求項 20 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

10

【請求項 26】

LNP が、ポリエチレングリコール (PEG) コンジュゲート (ペグ化) 脂質、コレステロール系脂質、およびヘルパー脂質をさらに含む、請求項 19 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 27】

LNP が、
カチオン性脂質を 35 % ~ 55 % のモル比で；
ポリエチレングリコール (PEG) コンジュゲート (ペグ化) 脂質を 0.25 % ~ 2.75 % のモル比で；
コレステロール系脂質を 20 % ~ 45 % のモル比で；および
ヘルパー脂質を 5 % ~ 35 % のモル比で
含む、モル比はすべて LNP の総脂質含有量に対するモル比である、請求項 19 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

20

【請求項 28】

LNP が、
カチオン性脂質を 40 % のモル比で；
ペグ化脂質を 1.5 % のモル比で；
コレステロール系脂質を 28.5 % のモル比で；および
ヘルパー脂質を 30 % のモル比で
含む、請求項 27 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

30

【請求項 29】

ペグ化脂質が、ジミリストイル-PEG2000 (DMG-PEG2000) または 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 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 30】

コレステロール系脂質がコレステロールである、請求項 26 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 31】

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) または 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) である、請求項 26 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

40

【請求項 32】

LNP が、
OF-02、cKK-E10、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、および GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 からなる群から選択されるカチオン性脂質を 40 % のモル比で；
DMG-PEG2000 を 1.5 % のモル比で；

50

コレステロールを 28.5% のモル比で；ならびに
D O P E を 30% のモル比で

含む、請求項 19～31 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 33】

L N P が、30 nm～200 nm の平均直径を有する、請求項 19～32 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 34】

L N P が、80 nm～150 nm の平均直径を有する、請求項 33 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 35】

1 mg / mL～10 mg / mL の L N P を含む、請求項 19～34 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 36】

L N P が 1 つ～20 の m R N A 分子を含む、請求項 19～35 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 37】

L N P が、5 つ～10 または 6 つ～8 つの m R N A 分子を含む、請求項 19～35 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 38】

L N P が 2 つまたはそれ以上の m R N A を含み、それぞれの m R N A が異なるインフルエンザ抗原をコードする、請求項 19～37 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 39】

組成物が 8 つの L N P を含み、それぞれの L N P が、異なるインフルエンザ抗原をコードする m R N A を含む、請求項 19～37 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 40】

筋肉内注射用に製剤化されている、請求項 1～39 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 41】

リン酸緩衝食塩水を含む、請求項 40 に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項 42】

免疫応答を誘発すること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、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物の予防有効量を対象に、場合により、筋肉内に、鼻腔内に、静脈内に、皮下に、または皮内に投与することを含む方法。

【請求項 43】

インフルエンザ感染症を予防するまたはインフルエンザ感染症の 1 つもしくはそれ以上の症状を低減させる方法であって、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザワクチン組成物の予防有効量を対象に、場合により、筋肉内に、鼻腔内に、静脈内に、皮下に、または皮内に投与することを含む方法。

【請求項 44】

インフルエンザワクチン組成物は、1 つまたはそれ以上の季節性および／またはパンデミックインフルエンザ株に対して免疫応答を誘発する、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

それぞれの用量が約 1 μ g～約 250 μ g の m R N A を含む、1 つまたはそれ以上の用量のインフルエンザワクチン組成物を対象に投与することを含む、請求項 42～44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

それぞれの用量が約 2.5、5、15、45、または 135 μ g の m R N A を含む、イ

10

20

30

40

50

ンフルエンザワクチン組成物の1つまたはそれ以上の用量を対象に投与することを含む、請求項42～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

インフルエンザワクチン組成物の2用量を、2～6週間、場合により、4週間の間隔で対象に投与することを含む、請求項42～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

処置を必要とする対象を処置するのに使用するための薬物の製造のための請求項1～41のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物の使用。

【請求項49】

処置を必要とする対象を処置するのに使用するための請求項1～41のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【請求項50】

場合により、容器はバイアルまたはプレフィルド注射器もしくはインジェクタである、請求項1～41のいずれか1項に記載の組成物の単回使用または複数回使用投薬量を含む容器を含むキット。

【請求項51】

インフルエンザ抗原は、機械学習モデルから同定されるまたは設計される分子配列を有するインフルエンザウイルスHA抗原および／またはインフルエンザウイルスNA抗原を含む、請求項1～41のいずれか1項に記載のインフルエンザワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は2021年6月18日提出の米国特許仮出願第63／212,523号；2021年11月5日提出の米国特許仮出願第63／276,243号；2021年11月5日提出の国際出願PCT／US2021／058250；および2021年10月13日提出の欧州特許出願公開第21315198.8号の利益を主張するものであり、前記特許文献のそれぞれの内容は参照によりその全体をあらゆる目的のために組み入れる。

【背景技術】

【0002】

メッセンジャーRNA（mRNA）ベースのワクチンは、病原体由来の抗原タンパク質を含有する伝統的なサブユニットワクチンに対する有望な代替物を提供する。抗原タンパク質は、通常組換え的に作製され、細菌発酵および／または細胞培養、ならびに複雑な精製を必要とする。mRNAに基づくワクチンは、ワクチン接種した対象中の複合抗原の新規発現を可能にし、これにより今度は、適切な翻訳後修飾およびその天然の形態での抗原の提示が可能になる。伝統的な技術と違って、mRNAワクチンの製造は、複雑で費用のかかる細菌発酵、組織培養、および精製方法を必要としない。さらに、確立した後は、mRNAワクチン用の製造方法は種々の抗原について使用可能であり、mRNAワクチンの迅速な開発および配布が可能になる。さらに、mRNAワクチンは、抗原を一過性にしか発現せず、宿主ゲノム中に組み込まれることがないので本質的に安全な送達ベクターである。mRNAによりコードされる抗原はワクチン接種を受けた個人において*in vivo*で産生されるために、mRNAワクチンは液性免疫とT細胞媒介免疫の両方を誘発するのに特に効果的である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

現行の承認を受けたインフルエンザワクチンは、生減弱インフルエンザワクチンまたは不活性インフルエンザワクチンであり、細胞培養または卵で製造されることが多い。さらに、複数のインフルエンザ株が毎年集団の内部で循環している可能性があり、単一のインフルエンザワクチンが複数株に対してロバストな防御を提供することが困難になっている

10

20

30

40

50

。したがって、複数のインフルエンザ株を標的にする多価mRNAベースのインフルエンザワクチンを含む、mRNAベースのインフルエンザワクチンに対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は8つのメッセンジャーRNA (mRNA) を含み、それぞれのmRNAが異なるインフルエンザ抗原をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を含むインフルエンザワクチン組成物を提供する。

【0005】

ある特定の実施形態では、組成物は、(i) 1つもしくは複数のヘマグルチニン (HA) 抗原、(ii) 1つもしくは複数のノイラミニダーゼ (NA) 抗原、または (iii) 少なくとも1つのHA抗原および少なくとも1つのNA抗原をコードする8つのmRNAを含む。

【0006】

ある特定の実施形態では、組成物は、インフルエンザA、Bおよび／またはCウイルスの抗原をコードする1つまたは複数のmRNAを含む。

【0007】

ある特定の実施形態では、抗原は、インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスのHAおよび／またはNA抗原である。

【0008】

ある特定の実施形態では、インフルエンザAウイルスのNA抗原は、サブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10、およびN11から選択される。

【0009】

ある特定の実施形態では、インフルエンザBウイルスのHAおよびNA抗原は、インフルエンザB/Yamagata系統またはインフルエンザB/Victoria系統由来である。

【0010】

ある特定の実施形態では、HA抗原およびNA抗原は、H1N1、H3N2、H2N2、H5N1、H7N9、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H5N2、およびH10N7サブタイプならびに／またはB/YamagataおよびB/Victoria系統からなる群から選択される。

【0011】

ある特定の実施形態では、組成物は、H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB/Victoria系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNAを含む。

【0012】

ある特定の実施形態では、組成物は、H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、N2 NA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、N1 NA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Victoria系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB/Victoria系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNAを含む。

【0013】

ある特定の実施形態では、ORFはコドン最適化されている。

【0014】

ある特定の実施形態では、mRNA分子は、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)、および少なくとも1つのポリアダ

10

20

30

40

50

ニル化（ポリ（A））配列を含む。

【0015】

ある特定の実施形態では、mRNAは、少なくとも1つの化学修飾を含む。

【0016】

ある特定の実施形態では、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%、または100%は化学的に修飾されている。

【0017】

ある特定の実施形態では、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%、または100%は化学的に修飾されている。

10

【0018】

ある特定の実施形態では、化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、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-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン、および2'-O-メチルウリジンからなる群から選択される。

20

【0019】

ある特定の実施形態では、化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、5-メチルシトシン、5-メトキシウリジン、およびその組合せからなる群から選択される。

【0020】

ある特定の実施形態では、化学修飾は、N1-メチルプソイドウリジンである。

【0021】

ある特定の実施形態では、mRNAは脂質ナノ粒子（LNP）に製剤化されている。

30

【0022】

ある特定の実施形態では、LNPは、少なくとも1つのカチオン性脂質を含む。

【0023】

ある特定の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性である。ある特定の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性ではない。

【0024】

ある特定の実施形態では、カチオン性脂質は切断可能である。ある特定の実施形態では、カチオン性脂質は切断可能ではない。

【0025】

ある特定の実施形態では、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、およびGL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14からなる群から選択される。

40

【0026】

ある特定の実施形態では、LNPは、ポリエチレングリコール（PEG）コンジュゲート（ペグ化）脂質、コレステロール系脂質、およびヘルパー脂質をさらに含む。

【0027】

ある特定の実施形態では、LNPは、カチオン性脂質を35%～55%のモル比で；

50

ポリエチレングリコール（PEG）コンジュゲート（ペグ化）脂質を0.25%～2.75%のモル比で；

コレステロール系脂質を20%～45%のモル比で；および

ヘルパー脂質を5%～35%のモル比で

含み、モル比はすべてLNPの総脂質含有量に対するモル比である。

【0028】

ある特定の実施形態では、LNPは、

カチオン性脂質を40%のモル比で；

ペグ化脂質を1.5%のモル比で；

コレステロール系脂質を28.5%のモル比で；および

ヘルパー脂質を30%のモル比で

含む。

【0029】

ある特定の実施形態では、ペグ化された脂質は、ジミリストイル-PEG2000（DMG-PEG2000）または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。

【0030】

ある特定の実施形態では、コレステロール系脂質はコレステロールである。

【0031】

ある特定の実施形態では、ヘルパー脂質は、1，2-ジオレオイル-SN-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）または1，2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DSPC）である。

【0032】

ある特定の実施形態では、LNPは、

OF-02、cKK-E10、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、およびGL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14からなる群から選択されるカチオン性脂質を40%のモル比で；

DMG-PEG2000を1.5%のモル比で；

コレステロールを28.5%のモル比で；ならびに

DOPEを30%のモル比で

含む。

【0033】

ある特定の実施形態では、LNPは30nm～200nmの平均直径を有する。ある特定の実施形態では、LNPは80nm～150nmの平均直径を有する。

【0034】

ある特定の実施形態では、インフルエンザワクチン組成物は、1mg/mL～10mg/mLのLNPを含む。

【0035】

ある特定の実施形態では、LNPは1つ～20のmRNA分子を含む。ある特定の実施形態では、LNPは、5つ～10または6～8つのmRNA分子を含む。

【0036】

ある特定の実施形態では、LNPは2つまたはそれ以上のmRNAを含み、それぞれのmRNAは異なるインフルエンザ抗原をコードする。

【0037】

ある特定の実施形態では、組成物は8つのLNPを含み、それぞれのLNPは、異なるインフルエンザ抗原をコードするmRNAを含む。

【0038】

ある特定の実施形態では、組成物は筋肉内注射用に製剤化されている。

【0039】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、組成物はリン酸緩衝食塩水を含む。

【0040】

一態様では、本開示は、免疫応答を誘発する必要があ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、場合により、筋肉内に、鼻腔内に、静脈内に、皮下に、または皮内に、上記の予防有効量のインフルエンザワクチン組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0041】

一態様では、本開示は、インフルエンザ感染を予防するまたはインフルエンザ感染症の1つもしくは複数の症状を低減させる方法であって、対象に、場合により、筋肉内に、鼻腔内に、静脈内に、皮下に、または皮内に、上記の予防有効量のインフルエンザワクチン組成物を投与することを含む方法を提供する。

10

【0042】

ある特定の実施形態では、インフルエンザワクチン組成物は、1つまたは複数の季節性および／または新型インフルエンザ株に対する免疫応答を誘発する。

【0043】

ある特定の実施形態では、方法は、それぞれの用量が約1 μ g～約250 μ gのmRNAを含む、インフルエンザワクチン組成物の1つまたは複数用量を対象に投与することを含む。

【0044】

ある特定の実施形態では、方法は、それぞれの用量が約2.5、5、15、45、または135 μ gのmRNAを含む、インフルエンザワクチン組成物の1つまたはそれ以上の用量を対象に投与することを含む。

20

【0045】

ある特定の実施形態では、方法は、インフルエンザワクチン組成物の2用量を、2～6週間、場合により、4週間の間隔で対象に投与することを含む。

【0046】

別の態様では、本開示は、処置を必要とする対象を処置するのに使用するための薬物の製造のための上記インフルエンザワクチン組成物の使用を提供する。

【0047】

ある特定の実施形態では、インフルエンザワクチン組成物は、処置を必要とする対象を処置するのに使用することを目的とする。

30

【0048】

別の態様では、本開示は、上記組成物の単回使用または複数回使用投薬量を含む容器を含むキットを提供し、場合により、容器はバイアルまたはプレフィルド注射器もしくはインジェクタである。

【0049】

ある特定の実施形態では、インフルエンザ抗原は、機械学習モデルから同定されたまたは設計された分子配列を有するインフルエンザウイルスHA抗原および／またはインフルエンザウイルスNA抗原を含む。

【図面の簡単な説明】

40

【0050】

【図1A】図1Aは、ヒトエリスロポエチン(hEPO)mRNAの種々のLNP製剤で処置したマウスにおけるhEPOの発現を示す一対のグラフである。パネルa)：MC3と比べたLNP製剤「脂質A」および「脂質B」。バーは平均および標準偏差を表す。パネルb)：カチオン性脂質OF-02で作られた製剤。PEG：DMG-PEG2000。Cholest：コレステロール。「脂質A」：別段指示されなければ、OF-02、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEをこの順番にモル比40：1.5：28.5：30で含有するLNP組成物。「脂質B」：cKK-E10、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEをこの順番にモル比40：1.5：28.5：30で含有するLNP組成物。

50

【図 1 B】図 1 B は、LNP 製剤脂質 A および脂質 B を使用するマウスおよび非ヒト霊長類（NHP）における hEPO の発現を示す一対のグラフである。

【図 2 A】図 2 A および 2 B は、株 A / California / 7 / 2009 (H1N1) (CA09) のヘマグルチニン (HA) をコードする mRNA を有する脂質 A および脂質 B LNP 製剤が口バストな機能的抗体を誘導し (図 2 A)、インフルエンザウイルスの広域流行株をチャレンジされた場合、死亡または羸瘦 (20% を超える) からマウスを保護した (図 2 B) ことを示す一対のグラフである。ヘマグルチニン抑制 (HAI) 力価は、試験日 0、14、28、42、56、92、および 107 に採取した血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。バーは、幾何平均および幾何標準偏差である。1 日の体重は、4LD₅₀ の A / Belgium / 2009 (H1N1) (Belgium09) を用いた鼻腔内チャレンジ (93 日目) 後に測定した。体重は、チャレンジの日からの体重減少のパーセンテージとして提示される。その開始体重の 20% を超える減少をしたマウスで、および感染 14 日後 (107 日目) のすべてのマウスで安楽死を生じた。rHA: 組換えヘマグルチニン。AF03: 水中油型乳剤アジュバンド。希釈液 = PBS。LLOQ = 定量下限。1/40 = 1/40 最小目標、これは、健康な成人でのインフルエンザ感染または疾患のリスクの 50% 低減に関連する HAI 抗体価のことである (Couderville ら、BMC Med Res Methodol. (2010) 10:18)。図 2 B 中の破線 = チャレンジの日の体重に関して切り取られた 20% 体重減少。

【図 2 B】図 2 A および 2 B は、株 A / California / 7 / 2009 (H1N1) (CA09) のヘマグルチニン (HA) をコードする mRNA を有する脂質 A および脂質 B LNP 製剤が口バストな機能的抗体を誘導し (図 2 A)、インフルエンザウイルスの広域流行株をチャレンジされた場合、死亡または羸瘦 (20% を超える) からマウスを保護した (図 2 B) ことを示す一対のグラフである。ヘマグルチニン抑制 (HAI) 力価は、試験日 0、14、28、42、56、92、および 107 に採取した血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。バーは、幾何平均および幾何標準偏差である。1 日の体重は、4LD₅₀ の A / Belgium / 2009 (H1N1) (Belgium09) を用いた鼻腔内チャレンジ (93 日目) 後に測定した。体重は、チャレンジの日からの体重減少のパーセンテージとして提示される。その開始体重の 20% を超える減少をしたマウスで、および感染 14 日後 (107 日目) のすべてのマウスで安楽死を生じた。rHA: 組換えヘマグルチニン。AF03: 水中油型乳剤アジュバンド。希釈液 = PBS。LLOQ = 定量下限。1/40 = 1/40 最小目標、これは、健康な成人でのインフルエンザ感染または疾患のリスクの 50% 低減に関連する HAI 抗体価のことである (Couderville ら、BMC Med Res Methodol. (2010) 10:18)。図 2 B 中の破線 = チャレンジの日の体重に関して切り取られた 20% 体重減少。

【図 3 A】図 3 A および 3 B は、脂質 A LNP を用いて製剤化された A / Michigan / 45 / 2015 (Mich15) ノイラミニダーゼ (NA) mRNA が、口バストな機能的抗体を誘導し (図 3 A)、インフルエンザウイルスの広域流行株をチャレンジされた場合、体重減少および死亡からマウスを保護した (図 3 B) ことを示す一対のグラフである。ノイラミニダーゼ抑制 (NAI) 力価は、試験日 14、28、42、56、88、および 114 に採取した血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。1 日の体重は、4LD₅₀ の Belgium09 を用いた鼻腔内チャレンジ (1 回投与群では 89 日目または 2 回投与群では 117 日目) 後に測定した。体重は、チャレンジ日からの体重減少のパーセンテージとして提示される。その開始体重の 20% を超える減少をしたマウスで、および感染 14 日後 (1 回投与群では 103 日目または 2 回投与群では 131 日目) のすべてのマウスで安楽死を生じた。バーは、平均および標準偏差である。図 3 A 中の上の破線 = 定量上限。図 3 A 中の下の破線 = 定量下限。図 3 B 中の破線 = チャレンジの日の体重に関して切り取られた 20% 体重減少。投与された mRNA: Mich15 NA をコードする 0.4 または 0.016 μ g の mRNA。対照: hEPO をコードする 0.6 μ g の mRNA または希釈液 (PBS)。

【図 3 B】図 3 A および 3 B は、脂質 A LNP を用いて製剤化された A / Michigan

a n / 4 5 / 2 0 1 5 (M i c h 1 5) ノイラミニダーゼ (N A) m R N A が、ロバストな機能的抗体を誘導し (図 3 A)、インフルエンザウイルスの広域流行株をチャレンジされた場合、体重減少および死亡からマウスを保護した (図 3 B) ことを示す一対のグラフである。ノイラミニダーゼ抑制 (N A I) 力価は、試験日 1 4、2 8、4 2、5 6、8 8、および 1 1 4 に採取した血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。1 日の体重は、4 L D 5 0 の B e l g i u m 0 9 を用いた鼻腔内チャレンジ (1 回投与群では 8 9 日目または 2 回投与群では 1 1 7 日目) 後に測定した。体重は、チャレンジ日からの体重減少のパーセンテージとして提示される。その開始体重の 2 0 % を超える減少をしたマウスで、および感染 1 4 日後 (1 回投与群では 1 0 3 日目または 2 回投与群では 1 3 1 日目) のすべてのマウスで安楽死を生じた。バーは、平均および標準偏差である。図 3 A 中の上の破線 = 定量上限。図 3 A 中の下の破線 = 定量下限。図 3 B 中の破線 = チャレンジの日の体重に関して切り取られた 2 0 % 体重減少。投与された m R N A : M i c h 1 5 N A をコードする 0 . 4 または 0 . 0 1 6 μ g の m R N A。対照 : h E P O をコードする 0 . 6 μ g の m R N A または希釈液 (P B S)。

10

【図 4】図 4 は、C A 0 9 H A m R N A を有する脂質 A および脂質 B L N P 製剤 (1 0 μ g) がカニクイマカクザルにおいてロバストな機能的抗体を誘導したことを示すグラフである。H A I 力価は、試験日 0、1 4、2 8、4 2、および 5 6 に採取した血清試料について $\log_2$ として報告されている。

【図 5 A - 1】図 5 A ~ C は、インフルエンザウイルス A / S i n g a p o r e / I N F I M H 1 6 0 0 1 9 / 2 0 1 6 (S i n g 1 6 ; H 3 N 2) H A ヘマグルチニンをコードする M R T 1 4 0 0 m R N A を示す。図 5 A : H A 抗原についての野生型 (W T) 遺伝子とコドン最適化遺伝子 (M R T 1 0 2 7 9) の整列化。図 5 B : m R N A の構造。図 5 C : m R N A の配列。

20

【図 5 A - 2】図 5 A - 1 の続き。

【図 5 A - 3】図 5 A - 2 の続き。

【図 5 B】図 5 A ~ C は、インフルエンザウイルス A / S i n g a p o r e / I N F I M H 1 6 0 0 1 9 / 2 0 1 6 (S i n g 1 6 ; H 3 N 2) H A ヘマグルチニンをコードする M R T 1 4 0 0 m R N A を示す。図 5 A : H A 抗原についての野生型 (W T) 遺伝子とコドン最適化遺伝子 (M R T 1 0 2 7 9) の整列化。図 5 B : m R N A の構造。図 5 C : m R N A の配列。

30

【図 5 C】図 5 A ~ C は、インフルエンザウイルス A / S i n g a p o r e / I N F I M H 1 6 0 0 1 9 / 2 0 1 6 (S i n g 1 6 ; H 3 N 2) H A ヘマグルチニンをコードする M R T 1 4 0 0 m R N A を示す。図 5 A : H A 抗原についての野生型 (W T) 遺伝子とコドン最適化遺伝子 (M R T 1 0 2 7 9) の整列化。図 5 B : m R N A の構造。図 5 C : m R N A の配列。

【図 6】図 6 は、M R T 1 4 0 0 または N A m R N A を有する脂質 A および脂質 B L N P 製剤がマウスにおいてロバストな機能的抗体を誘導したことを示す一対のグラフである。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 2 8 に与えられた。左パネル : H A I 力価は試験日 1 4、2 8、4 2、および 5 6 に採取された血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。右パネル : N A I 力価は試験日 1 4、2 8、4 2、および 5 6 に採取された血清試料について $\log_{10}$ として報告されている。バーは、幾何平均および幾何標準偏差である。破線 = 定量下限。

40

【図 7 A】図 7 A は、M R T 1 4 0 0 を有する脂質 A および脂質 B L N P 製剤が N H P においてロバストな機能的抗体を誘導したことを示すグラフである。H A I 力価は試験日 0、1 4、2 8、4 2、および 5 6 に採取された血清試料について $\log_2$ として報告されている。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 2 8 に与えられた。バーは、平均および標準偏差である。上の破線 = 1 / 4 0 最小目標。下の破線 = 検出下限。

【図 7 B】図 7 B および 7 C は、M R T 1 4 0 0 m R N A を含有する脂質 A L N P 製剤 (M R T 5 4 0 0) が、カニクイマカクザルにおいて m R N A の 4 つの用量レベル : 1 5、4 5、1 3 5 および 2 5 0 μ g で機能的抗体 (図 7 B) およびロバストな E L I S A

50

力価（図 7 C）を誘導したことを示す一対の図である。H A I および E L I S A 力価は、試験日 0、14、28、42、および 56 に採取された血清試料について $\log 2$ として報告されている。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 28 に与えられた。バーは、平均および標準偏差である。破線 = $1 / 40$ 最小目標。

【図 7 C】図 7 B および 7 C は、M R T 1 4 0 0 mRNA を含有する脂質 A L N P 製剤（M R T 5 4 0 0）が、カニクイマカクザルにおいて mRNA の 4 つの用量レベル：15、45、135 および 250 μg で機能的抗体（図 7 B）およびロバストな E L I S A 力価（図 7 C）を誘導したことを示す一対の図である。H A I および E L I S A 力価は、試験日 0、14、28、42、および 56 に採取された血清試料について $\log 2$ として報告されている。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 28 に与えられた。バーは、平均および標準偏差である。破線 = $1 / 40$ 最小目標。

10

【図 8 A】図 8 A および 8 B は、3 つの用量レベル群（250 μg 、135 μg 、および 45 μg の mRNA）での脂質 A L N P 製剤 M R T 5 4 0 0 を用いた第 2 のワクチン接種後のカニクイマカクの T 細胞サイトカイン応答を示すグラフのパネルである。組換え H A（r H A）タンパク質（左パネル）またはプールされたペプチド（右パネル）での再刺激により誘導された I F N - γ および I L - 13 は、E L I S P O T アッセイにより 42 日目に末梢血単核球（P M B C）において評価した。P B M C 分泌 I F N - γ （図 8 A）または I L - 13（図 8 B）の発生頻度は、P B M C 100 万個当たりの斑点形成細胞（S F C）として計算した。それぞれの記号は、個々の試料を表し、バーは標準偏差を表す。

20

【図 8 B】図 8 A および 8 B は、3 つの用量レベル群（250 μg 、135 μg 、および 45 μg の mRNA）での脂質 A L N P 製剤 M R T 5 4 0 0 を用いた第 2 のワクチン接種後のカニクイマカクの T 細胞サイトカイン応答を示すグラフのパネルである。組換え H A（r H A）タンパク質（左パネル）またはプールされたペプチド（右パネル）での再刺激により誘導された I F N - γ および I L - 13 は、E L I S P O T アッセイにより 42 日目に末梢血単核球（P M B C）において評価した。P B M C 分泌 I F N - γ （図 8 A）または I L - 13（図 8 B）の発生頻度は、P B M C 100 万個当たりの斑点形成細胞（S F C）として計算した。それぞれの記号は、個々の試料を表し、バーは標準偏差を表す。

【図 9 A】図 9 A は、修飾および非修飾 C A 09 H A mRNA を含有する脂質 A L N P 製剤が、ワクチン接種されたマウスにおいて H A I 力価により示されるのに匹敵したことを示す一対のグラフである。H A I 力価は、試験日 14、28、42、および 56 に採取された血清試料について $\log 2$ として報告されている。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 28 に与えられた。バーは、平均および標準偏差である。上の破線 = $1 / 40$ 最小目標。下の破線 = 定量下限。

30

【図 9 B】図 9 B は、修飾および非修飾 C A 09 H A mRNA を含有する脂質 A L N P 製剤が、マウスにおいて E L I S A 力価により示されるのに匹敵したことを示す一対のグラフである。全 I g G E L I S A 力価は、試験日 14、28、42、および 56 に採取された血清試料について $\log 10$ として報告されている。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 28 に与えられた。破線 = 定量下限。

40

【図 10】図 10 A および 10 B は、C A 09 H A mRNA および S i n g 16 H A mRNA を有する二価脂質 A L N P 製剤が、全 mRNA 0.4 μg の用量で B a l b / c マウスにおいて H A I 力価（C A 09（図 10 A）および S i n g 16（図 10 B））により評価した場合、ロバストな機能的抗体を誘導したことを示す一対のグラフである。mRNA 0.4 μg は共カプセル化 mRNA - L N P 製剤として投与された、またはそれぞれの H A mRNA は別々に投与され、0.2 μg がそれぞれの下肢中に入った。それぞれの H A mRNA も、全 mRNA が L N P 中に詰め込まれるように制御するための非コード mRNA と一緒に製剤中に共カプセル化された。希釈群は mRNA - L N P 希釈バッファーを受けた。H A I 力価は、試験日 - 2（基準線）、14、28、および 42 に採取された血清試料について報告されている。図 10 B は、試験日 - 2（プールされた

50

血清からの基準線) および 42 のみを示す。第 1 の注射は試験日 0 に与えられ、第 2 の注射は試験日 28 に与えられた。バーは、幾何平均および幾何標準偏差である。破線 = 定量下限。

【図 11】図 11 は、mRNA-LNP 製剤の機能検証を示す。パネル (a) は、BALB/c マウスでのホタル (FF) ルシフェラーゼの発現を示すグラフである：単回用量のルシフェラーゼ FF mRNA-LNP (5、1、0.1、0.05 μ g) を IM 経路によりマウス (n=4) に注射した。ルシフェリン (3 mg) は、生物発光強度を記録する IVIS Spectrum、Perkin Elmer 社を使用して全身動物撮像時に注射した。全身動物平均光輝の画像は、注射後 6、24、48 および 72 時間後に撮った。Luc mRNA-LNP の 1、0.5、0.1 および 0.05 μ g 用量投与について記録された光輝はグラフに示されている。パネル (b) は、6~72 時間目での発光の全流束を示す全身動物画像を示している。0.1 μ g 用量の FF-LNP を受けるマウス (n=4) の群での発光の全流束が示されている。パネル (c) は、BALB/c マウスでの hEPO の発現を示す。単回用量の hEPO mRNA-LNP (0.1 μ g) は BALB/c マウスにおいて IM 経路により注射された。hEPO 発現は、投与後 6 時間目および 24 時間目に ELISA を使用して血清中で定量化された。バーは、平均および標準偏差を表す。パネル (d) は、NHP での hEPO の発現を示す。単回用量の hEPO mRNA-LNP (10 μ g) はカニクイマカクにおいて IM 経路により注射された。hEPO 発現は、投与後 6、24、48、72、および 96 時間目に ELISA を使用して血清中で定量化された。バーは、平均および標準偏差を表す。

【図 12】図 12 は、マウスでの HA mRNA-LNP ワクチンの血清学的評価を示す。BALB/c マウス (群当たり n=8) は、4 週間間隔を開けて、CA09 HA mRNA-LNP または Sing16 HA mRNA-LNP 2、0.4、0.08、および 0.016 μ g で IM に 2 度免疫された。CA09 (CA09) H1N1 インフルエンザウイルス組換え HA (左パネル) および Sing16 H3N2 インフルエンザウイルス組換え HA (右パネル) に対して 14、28、42、56 日目に収集された血清について記録された ELISA 力価が示されている。

【図 13】図 13 は、マウスでの HA mRNA-LNP ワクチンの血清学的評価を示す。BALB/c マウス (群当たり n=8) は、4 週間間隔を開けて、CA09 HA mRNA-LNP または Sing16 HA mRNA-LNP 2、0.4、0.08、および 0.016 μ g で IM に 2 度免疫された。CA09 H1N1 インフルエンザウイルス (左パネル) および Sing16 H3N2 インフルエンザウイルス (右パネル) に対して記録された Log₁₀ HAI 力価が示されている。

【図 14】図 14 は、マウスでの NA mRNA-LNP ワクチンの血清学的評価を示す。BALB/c マウス (群当たり n=8) は、4 週間間隔を開けて、Mich15 NA mRNA-LNP または Sing16 NA mRNA-LNP 2、0.4、0.08、および 0.016 μ g で IM に 2 度免疫された。Mich15 N1 インフルエンザウイルス組換え NA (左パネル) および Sing16 N2 インフルエンザウイルス組換え NA (右パネル) に対して 0、14、28、42、56 日目に収集された血清について記録された全 IgG 力価が示されている。

【図 15】図 15 は、マウスでの NA mRNA-LNP ワクチンの血清学的評価を示す。BALB/c マウス (群当たり n=8) は、4 週間間隔を開けて、Mich15 NA mRNA-LNP または Sing16 NA mRNA-LNP 2、0.4、0.08、および 0.016 μ g で IM に 2 度免疫された。Mich2015 (N1) : A/Mallard/Sweden/2002 (H6) キメラインフルエンザウイルス (左パネル) および Sing16 (N2) : A/Mallard/Sweden/2002 (H6) キメラウイルス (右パネル) に対する血清について記録された Log₁₀ NA I (ELISA) 力価が示されている。

【図 16】図 16 A および 16 B は、致死 A/Belgium/2009 H1N1 ウイルスチャレンジ後のマウスでの CA09 HA mRNA-LNP ワクチンの保護効率を

示す。マウス ($n=8$) は、0日目および28日目にCA09 HA mRNA-LNPの2度IM投与(それぞれ $0.4\mu\text{g}$)を受けた。対照動物は0日目および28日目に希釈液の2度IM投与を受けた。図16Aは、試験日0、14、28、42、56、92、および107に採取された血清試料について Log_{10} として報告されたHA I力価を示す。図16Bは、4LD₅₀のA/Belgium/2009 H1N1株を用いた93日目の鼻腔内チャレンジ後の毎日の体重を示す。体重はチャレンジの日からの体重減少のパーセンテージとして提示されている。個々の線はそれぞれの動物を表す。

【図17】図17A~Bは、致死A/Belgium/2009 H1N1ウイルスチャレンジ後のマウスでの単回投与の非修飾Mich15 NA mRNA-LNPの保護効率を示す。マウス ($n=16$) は、Mich15 NA mRNA-LNP $0.4\mu\text{g}$ または $0.016\mu\text{g}$ をIM経路により注射された。マウスの半数は試験日0に1回注射(1用量)のみを受け、その他の半数(2用量)は試験日0および試験日28に与えられる2回注射を受けた。対照動物は、0日目および28日目にhEPO mRNA-LNPの2回IM投与($0.6\mu\text{g}$)を受けた。図17Aは、NA I力価が、試験日0、14、28、42、56、88、および114に採取された血清試料について Log_{10} として報告されることを示す。図17Bは、単回投与群では89日目のおよび2回投与群では117日目の4LD₅₀のBelgium09 H1N1を用いた鼻腔内チャレンジ後の毎日の体重変化を示す。体重はチャレンジの日からの体重減少のパーセンテージとして提示されている。個々の線はそれぞれの動物を表す。

【図18】図18は、NHPでのHA Sing16 HA mRNA-LNPワクチンの血清学的評価を示す。カニクイマカク(群当たり $n=6$)は、4週間間隔を開けて、Sing16 HA mRNA-LNP 15、45または $135\mu\text{g}$ でIM経路により2回注射された。血清試料は、-6、14、28、42、および56日目に収集した。Sing16ウイルスの組換えHAタンパク質に対する Log_{10} IgG力価が示されている。

【図19】図19Aおよび19Bは、NHPでのHA Sing16 HA mRNA-LNPワクチンの血清学的評価を示す。カニクイマカク(群当たり $n=6$)は、4週間間隔を開けて、Sing16 HA mRNA-LNP 15、45または $135\mu\text{g}$ でIM経路により2回注射された。血清試料は、0、14、28、42、および56日目に収集した。Sing16ウイルスに対する Log_{10} HA I力価(図19A) および Log_{10} マイクロ中和(MN) 価(図19B) が示されている。

【図20】図20Aおよび20Bは、Sing16 HA mRNA-LNPワクチンを用いてワクチン接種されたNHPでのT細胞応答を示す。カニクイマカク(群当たり $n=6$)は、4週間間隔を開けて、Sing16 HA mRNA-LNP 45、135、または $250\mu\text{g}$ でIM経路により2回注射された。T細胞は、全HAオープンリーディングフレームを表すペプチドプールを用いて*in vitro*で刺激されたPBMCにおいて42日目にELISPOTにより判定された。PBMC 100万個当たりの斑点形成細胞(SFC)として計算されたIFN- γ (図20A) またはIL-13(図20B)を分泌するPBMCの応答が示されている。それぞれの記号は、個々の試料を表し、バーは群についての幾何平均を表す。

【図21】図21は、Sing16 HA mRNA-LNPワクチンを用いてワクチン接種されたNHPでの180日目の記憶B細胞によるSing16 H3特異的IgGの分泌を示す。カニクイマカク(群当たり $n=6$)は、4週間間隔を開けて、Sing16 HA mRNA-LNP 15または $45\mu\text{g}$ でIM経路により2回注射された。ヒトIgG単色記憶B細胞ELISPOTキット(CAT# NC1911372、CTL)を使用してSing16/H3特異的および全IgG⁺抗体分泌細胞(ASC)を測定した。キットにより提供される刺激カクテルを使用することにより180日目に収集したPBMCにおいてASCへのMBCの分化を実施した。IgG⁺の数およびSing16/H3特異的ASCの数は、それぞれの動物についてPBMC 100万個当たりで計算し、抗原特異的ASCの出現頻度が示されている。

10

20

30

40

50

【図22-1】図22は、マウスでのインフルエンザワクチンの二価組合せの送達を示す。BALB/cマウス（群当たりn=8）は、4週間間隔を開けて、二価組合せ共カプセル化mRNA転写物（1:1 wt/wt、それぞれの脚当たり半量）全部で0.4 µgまたは別々に製剤化され異なる脚に免疫されたそれぞれの一価の0.2 µgでIMに2度免疫された。H1H3コンボを構成するCA09 HA mRNA-LNP、Sing16 HA mRNA-LNP；H3N2コンボのSing16 HA mRNA-LNPおよびSing16 NA mRNA-LNPならびにN1N2コンボのMich15 NA mRNA-LNPおよびPerth09 NA mRNA-LNPを0、14、28、42日目に収集した血清中で対応するウイルスに対して試験した。パネル（a）は、CA09 H1N1インフルエンザウイルスおよびSing2016 H3N2に対して記録されたHAI力価を示す。パネル（b）は、それぞれSing2016 H3N2およびA/Mallard/Sweden/2002（H6）キメラインフルエンザウイルスならびにH6N2 A/Perth/09ウイルスF1919D（N2）ウイルスに対して記録されたHAIおよびNAI力価を示す。パネル（c）は、Mich15（N1）：A/Mallard/Sweden/2002（H6）キメラインフルエンザウイルスおよびH6N2 A/Perth/09ウイルスF1919D（N2）ウイルスに対して記録されたNAI力価を示す。

10

【図22-2】図22-1の続き。

【図23】図23は、NHPでのインフルエンザワクチンの四価組合せの送達を示す。カニクイマカク（群当たりn=6）は、4週間間隔を開けて、共カプセル化mRNA転写物の四価組合せ（1:1:1:1 wt/wt）全部で10 µgでIMに2度免疫された。CA09 HA mRNA、Sing16 HA mRNA、Mich15 NA mRNA、およびPerth09 NA mRNAからなるH2H3N1N2コンボ。CA09 HA mRNA、Sing16 HA mRNAおよび2×非コードmRNA（nc mRNA）からなるH1H3コンボ；Sing16 HA mRNAおよびPerth09 NA mRNAならびに2×非コードmRNAのH3N2コンボ。Mich15 NA mRNA、Perth09 NA mRNA-LNP、および2×非コードmRNAのN1N2コンボ。CA09 HA mRNAおよび3×非コードmRNAからなるH1。Sing16 HA mRNAおよび3×非コードmRNAからなるH3。Mich15 NA mRNAおよび3×非コードmRNAからなるN1。Perth09 NA mRNAおよび3×非コードmRNAからなるN2。阻害力価は、0、14、28、42日目に収集した血清において対応するウイルスに対して試験した。パネル（a）は、CA09 H1N1インフルエンザウイルスおよびSing16 H3N2に対して記録されたHAI力価を示す。パネル（b）は、Mich15（N1）：A/Mallard/Sweden/2002（H6）キメラインフルエンザウイルスおよびH6N2 Perth/09ウイルスF1919D（N2）ウイルスに対して記録されたNAI力価を示す。

20

30

【図24】図24は、ヒトエリスロポエチン（hEPO）mRNAの種々のLNP製剤で処置されたマウスでのhEPOの発現を示すグラフを描いている。LNP製剤「脂質A」、「脂質B」、「脂質C」、「脂質D」、および「脂質E」が示されている。バーは、平均および標準偏差を表す。LNP組成物は、カチオン性脂質、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEを、この順番に、40:1.5:28.5:30のモル比で含有する。

40

【図25】図25は、hEPO mRNAの種々のLNP製剤で処置された非ヒト霊長類（NHP）でのhEPOの発現を示すグラフを描いている。LNP製剤「脂質A」、「脂質B」、「脂質C」、「脂質D」、および「脂質E」が示されている。バーは、平均および標準偏差を表す。LNP組成物は、カチオン性脂質、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEを、この順番に、40:1.5:28.5:30のモル比で含有する。

【図26】図26は、HA mRNAの種々のLNP製剤の注射後28日目および42日目のHAI力価を示すグラフを描いている。LNP製剤「脂質A」、「脂質B」、「脂質

50

C」、「脂質D」、および「脂質E」が示されている。バーは、平均および標準偏差を表す。LNP組成物は、カチオン性脂質、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEを、この順番に、40:1.5:28.5:30のモル比で含有する。

【図27】図27は、HA mRNAの種々のLNP製剤の注射後28日目および42日目のCa109 H1 HAI力価を示すグラフを描いている。LNP製剤「脂質A」、「脂質B」、「脂質C」、「脂質D」、および「脂質E」が示されている。バーは、平均および標準偏差を表す。LNP組成物は、カチオン性脂質、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEを、この順番に、40:1.5:28.5:30のモル比で含有する。

【図28】図28は、HA mRNAの種々のLNP製剤の注射後28日目および42日目のSing16 H3 HAI力価を示すグラフを描いている。LNP製剤「脂質A」、「脂質B」、「脂質C」、「脂質D」、および「脂質E」が示されている。バーは、平均および標準偏差を表す。LNP組成物は、カチオン性脂質、DMG-PEG2000、コレステロール、およびDOPEを、この順番に、40:1.5:28.5:30のモル比で含有する。

【図29】図29は、4つの異なるインフルエンザ株に対してマウスに投与された四価および八価のmRNA-LNPワクチンについてのHAI力価を描いている。

【図30】図30は、4つの異なるインフルエンザ株に対してフェレットに投与された四価および八価のmRNA-LNPワクチンについてのHINT値を描いている。

【図31】図31は、4つの異なるインフルエンザ株に対してマウスに投与された四価および八価のmRNA-LNPワクチンについてのNAI力価を描いている。

【図32】図32は、4つの異なるインフルエンザ株に対してフェレットに投与された四価および八価のmRNA-LNPワクチンについてのNAI力価を描いている。試料は、ワクチンの第2の投与後20日目(D20)に得られた。

【図33】図33は、4つの異なるインフルエンザ株に対してフェレットに投与された四価および八価のmRNA-LNPワクチンについてのNAI力価を描いている。試料は、ワクチンの第2の投与後42日目(D42)に得られた。

【発明を実施するための形態】

【0051】

本開示は、mRNAワクチンをin vivoで送達するための新規の脂質ナノ粒子(LNP)製剤およびワクチンを作製するための方法を提供する。LNPは、4種の脂質：カチオン性脂質、ポリエチレングリコール(PEG)コンジュゲート脂質、コレステロール系脂質、およびヘルパー脂質の混合物で作られている。LNPはmRNA分子をカプセル化する。カプセル化されたmRNA分子は、天然に存在するリボヌクレオチド、化学修飾されたヌクレオチド、またはその組合せを含むことができ、それぞれがまたは全体として1つまたはそれ以上のタンパク質をコードすることができる。

【0052】

本発明者らは、脂質成分のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることを通じて本製剤を発見した。本LNPは、mRNAペイロードをカプセル化して分解から保護し、カプセル化されたmRNAの細胞内取込みを促進する。本明細書に記載されるLNPは、文献に記載される産業上の製剤と比べた場合、in vivoおよびin vitroでの増強された発現により実証されるように、導入効率を増強し、mRNAのエンドソーム脱出を促進し、その結果、有効性を改善した。例えば、本明細書で開示されるLNPは既知のLNP、例えば、ヘプタトリアコンター6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタン酸(aka DLin-MC3-DMAまたはMC3; Sempleら、Nat Biotechnol. (2010) 28:172~6頁)またはジ((Z)-ノン-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(aka L319; Maierら、Mol Ther. (2013) 21(8):1570~8頁)と比べて優れた安定性および/または有効性プロファイルを有する。下にさらに記載されるように、hEPOをコードする

mRNAをカプセル化する本製剤は、*in vivo*で送達される場合、6時間および24時間で血液中を循環する高レベルのエリスロポエチンをもたらし、工業標準、MC3LNP製剤と比べて最大で12倍の増加であった。同様に、マウスと非ヒト霊長類モデルの両方で、インフルエンザ抗原をコードするmRNAのような他のmRNAで高い有効性が見出された。

【0053】

本明細書で製剤化されるmRNAワクチンを使用すれば、細胞性免疫と体液性免疫の両方を含む均衡のとれた免疫応答を誘導することができる。本LNP製剤の利点は配列特異的ではないので、これらの製剤を使用すれば、様々な抗原をコードするmRNAを送達することができ、エビデミック状況またはパンデミック状況で迅速な展開が可能になる。さらに、本LNP製剤化mRNAワクチンは、高度に免疫原性であり、したがって、著しい用量節約可能性が得られる。

【0054】

I. 脂質ナノ粒子 (LNP)

本開示のLNPは、脂質の4つの範疇：(i) イオン化脂質（例えば、カチオン性脂質）；(ii) ペグ化脂質；(iii) コレステロール系脂質、および(iv) ヘルパー脂質を含む。

【0055】

A. イオン化可能脂質

イオン化可能脂質は、mRNAカプセル化を促進し、カチオン性脂質でもよい。カチオン性脂質は、低pHで正電荷環境を与えて、負電荷mRNA薬物物質の効率的なカプセル化を促進する。

【0056】

一部の実施形態では、カチオン性脂質はOF-02である。

10

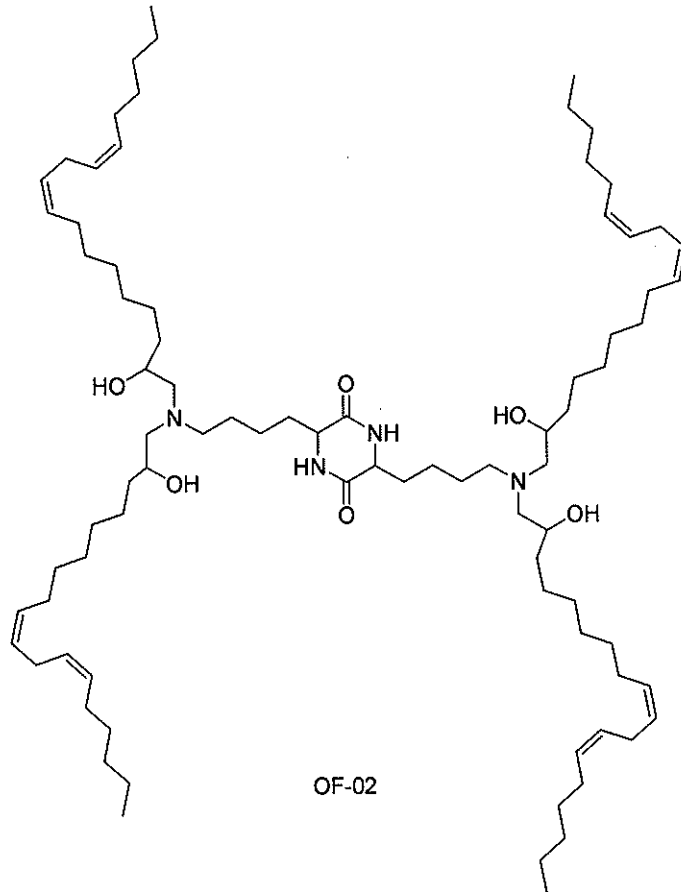
20

30

40

50

【化 1】



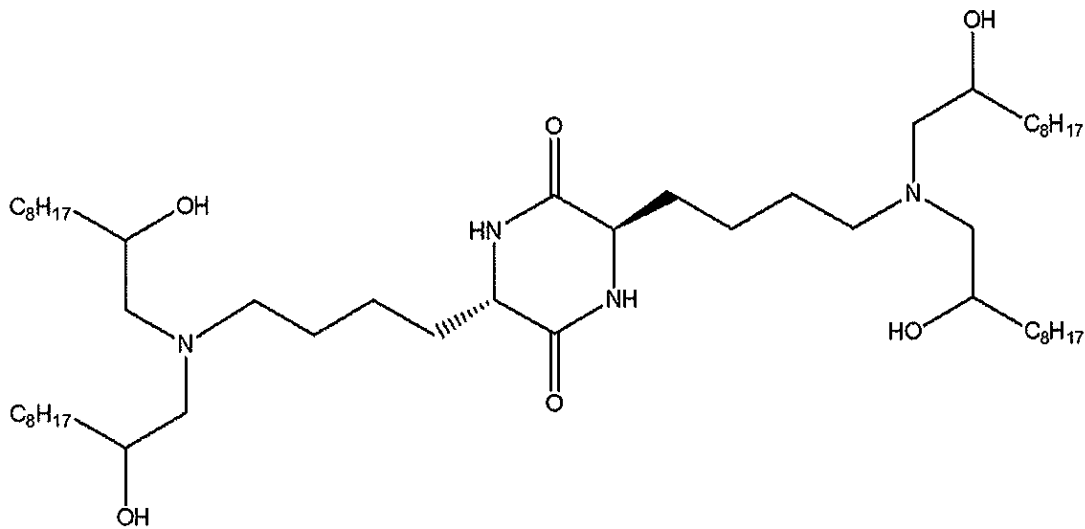
式 (I)

OF-02は、OF-Deg-Linの非分解性構造類似物である。OF-Deg-Linは、ジケトピペラジンコアおよび二重不飽和テールに結合するための分解可能なエステル結合を含有しており、OF-02は、同じジケトピペラジンコアおよび二重不飽和テールに結合するための非分解性1,2-アミノアルコール結合を含有する（Fentonら、Adv Mater. (2016) 28:2939；米国特許第10,201,618号）。本明細書の例示的LNP製剤、脂質AはOF-2を含有する。

【0057】

一部の実施形態では、カチオン性脂質はcKK-E10である（Dongら、PNAS (2014) 111(11):3955～60頁；米国特許第9,512,073号）。

【化 2】



cKK-E10

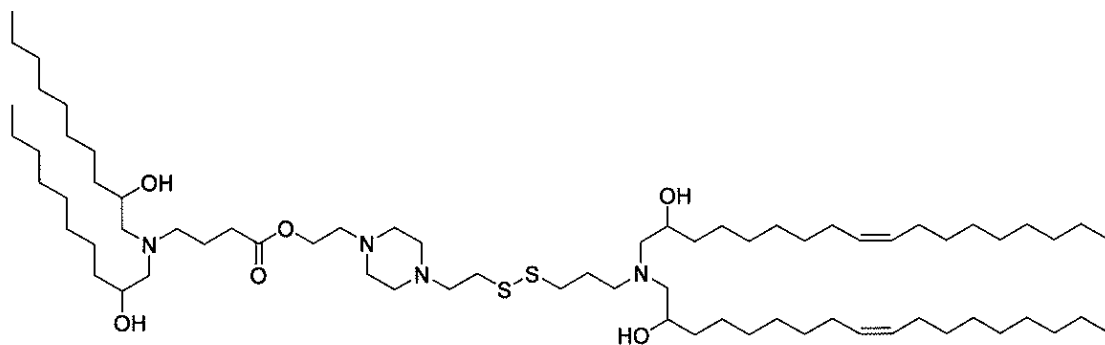
式 (II)

本明細書の例示的 LNP 製剤、脂質 B は c K K - E 1 0 を含有する。

【 0 0 5 8】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、G L - H E P E S - E 3 - E 1 0 - D S - 3 - E 1 8 - 1 (2 - (4 - (2 - ((3 - (ビス ((Z) - 2 - ヒドロキシオクタデカ - 9 - エン - 1 - イル) アミノ) プロピル) ジスルファニール) 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) ブタン酸であり、これは、ピペラジンコアを有する H E P E S ベースのジスルフィドカチオン性脂質であり、式 (I I I) を有する。

【化 3】



式 (III)

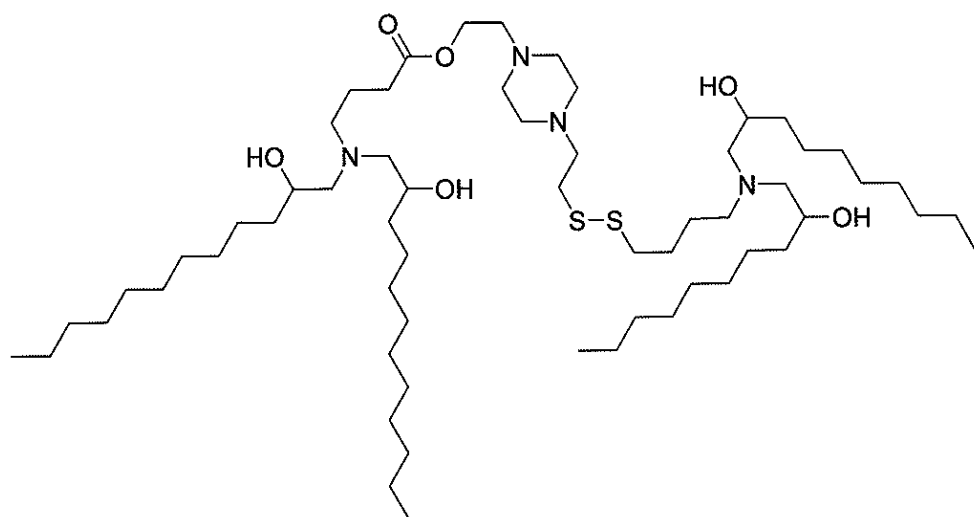
本明細書の例示的 LNP 製剤、脂質 C は G L - H E P E S - E 3 - E 1 0 - D S - 3 - E 1 8 - 1 を含有する。脂質 C は、カチオン性脂質の違いを別にすれば、脂質 A または脂質 B と同じ組成を有する。

【 0 0 5 9】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、G L - H E P E S - E 3 - E 1 2 - D S - 4 - E 1 0 (2 - (4 - (2 - ((4 - (ビス (2 - ヒドロキシデシル) アミノ) ブチル) ジスルファニール) 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) ブタン酸であり、これは、ピペラジンコアを有する H E P E S ベース

のジスルフィドカチオン性脂質であり、式 (IV) を有する。

【化 4】



10

式 (IV)

本明細書の例示的 LNP 製剤、脂質 D は GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 を含有する。脂質 D は、カチオン性脂質の違いを別にすれば、脂質 A または脂質 B と同じ組成を有する。

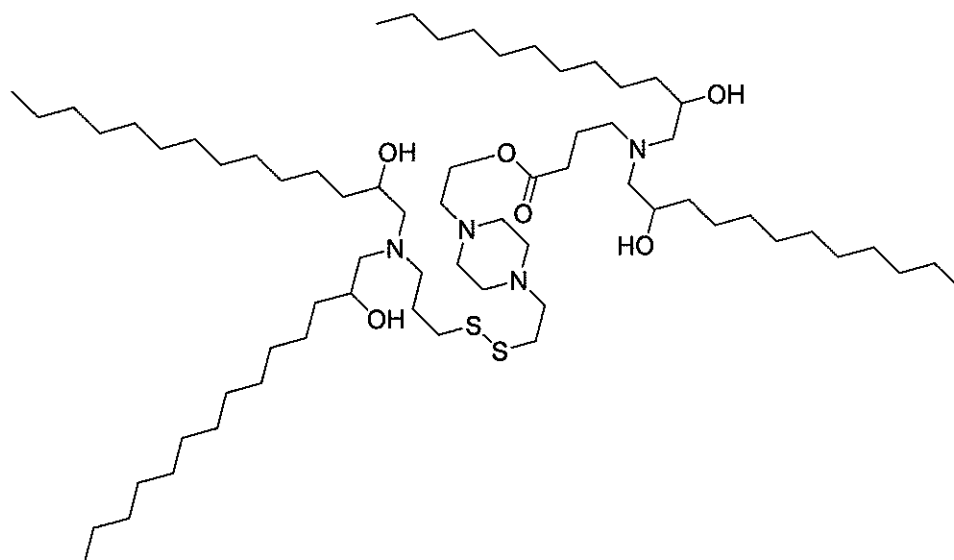
20

【0060】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、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)ジスルファニール)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)ブタン酸であり、これは、ピペラジンコアを有する HEPES ベースのジスルフィドカチオン性脂質であり、式 (V) を有する。

【化 5】

30



40

式 (V)

本明細書の例示的 LNP 製剤、脂質 E は GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 を含有する。脂質 E は、カチオン性脂質の違いを別にすれば、脂質 A または脂質 B と

50

同じ組成を有する。

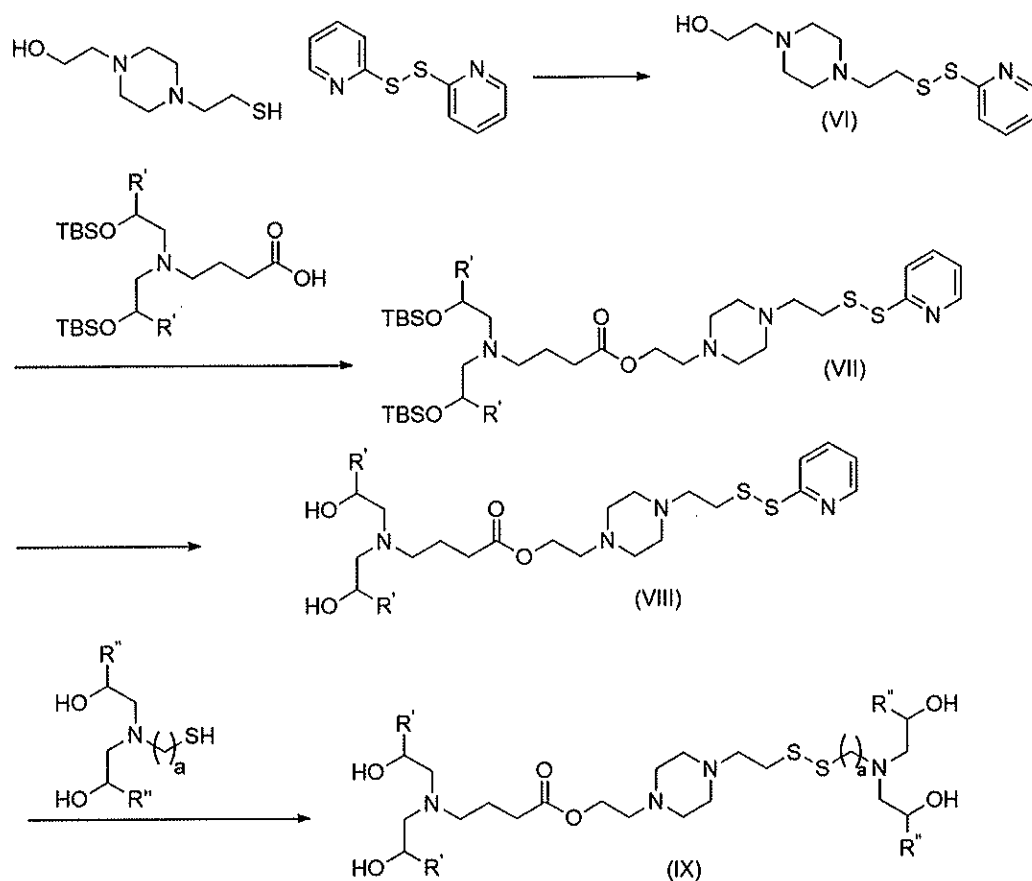
【0061】

カチオン性脂質 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 (III)、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (IV)、および GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 (V) は、図式 1 に提示される一般的手順に従って合成することができる。

【0062】

図式 1：式 (III)、(IV)、および (V) の脂質についての一般的合成図式

【化 6】



【0063】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は MC3 であり、式 VI を有する：

【化 7】



式 (VI)

【0064】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、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} オクタン酸) であり、式 VII を有する：

10

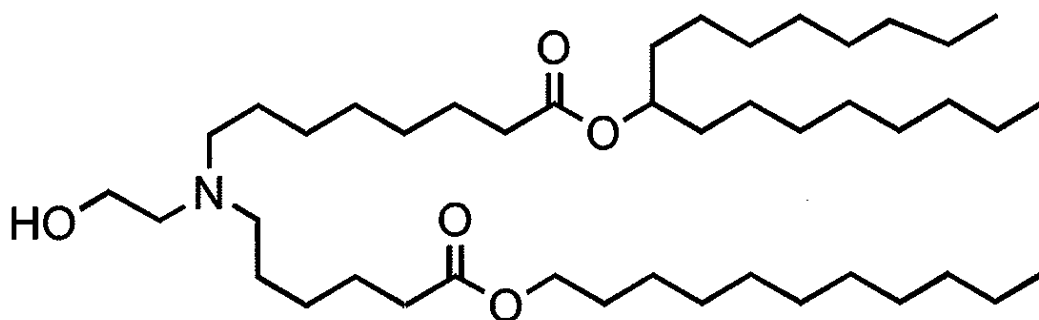
20

30

40

50

【化 8】



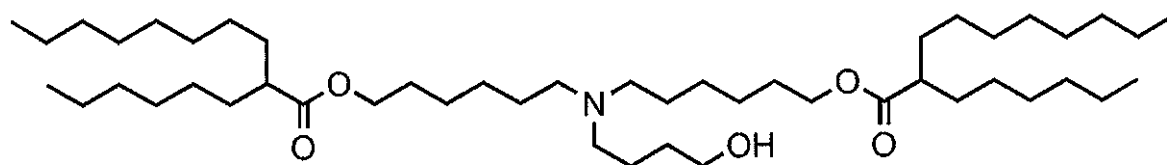
式 (VII)

10

【0065】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、ALC-0315 [(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-ヘキシルデカン酸)であり、式VIIIを有する：

【化 9】



式 (VIII)

20

【0066】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、[ckkE10] / [OF-02]、[(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンター-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル]4-(ジメチルアミノ)ブタン酸(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)-ノン-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}オクタン酸(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-ヘキシルデカン酸)(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-エン酸(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)テトラプロピオネート(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

30

40

50

- (3 - (ピロリジン-1-イル) プロピル) - 2 , 5 - ジヒドロ-1 H - イミダゾール
 - 2 - カルボキシレート ($A_{2-Iso} 5-2DC18$) ; 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'
 '' , '' " - (((ベンゼン-1 , 3 , 5 - トリカルボンル) イリス(アザンジイル)) トリス(
 ス(プロパン-3 , 1 - ギル)) トリス(アザントリイル)) ヘキサノナノエート ($F
TT5$) ; (((3 , 6 - ジオキソピペラジン-2 , 5 - ギル) ビス(ブタン-4 , 1
 - ギル)) ビス(アザントリイル)) テトラキス(エタン-2 , 1 - ギル) (9Z ,
 9' Z , 9'' Z , 9''' Z , 12Z , 12' Z , 12'' Z , 12''' Z) - テトラキス(オクタ
 デカ-9 , 12 - ジエン酸) ($O F-Deg-Lin$) ; TT3 ; N¹, N³, N⁵-ト
 リス(3-(ジドデシリアミノ) プロピル) ベンゼン-1 , 3 , 5 - トリカルボキシアミ
 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] ブチルカルボキシアמיד) エチル]-3 , 4 - ジ[オレイルオ
 キシ]-ペンズアミド(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) オクタン酸(Lipid
 d 5); およびその組合せを含む群から選択しうる。

20

【 0 0 6 7 】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性である。

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は生分解性ではない。

【 0 0 6 9 】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は切断可能である。

【 0 0 7 0 】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は切断可能ではない。

【 0 0 7 1 】

カチオン性脂質は、Dongら（PNAS. 111（11）：3955～60頁 2014年）；Fentonら（Adv Mater. 28：2939頁 2016年）；米国特許第9,512,073号；および米国特許第10,201,618号にさらに詳細に記載されている。前記文献のそれぞれは参照により本明細書に組み入れる。

【 0 0 7 2 】

B. ペグ化脂質

ペグ化脂質成分は、ナノ粒子の粒子サイズおよび安定性を制御する。そのような成分を添加すれば、複雑な凝集を予防し、循環寿命を増やし標的組織への脂質-核酸医薬組成物の送達を増やすための手段が提供されうる (Klibanovら、FEB S Letters 268 (1): 235~7頁、1990年)。これらの成分は、in vivoで医薬組成物から迅速に交換するように選択しうる (例えば、米国特許第5,885,613号参照)。

【 0 0 7 3 】

意図されるペグ化脂質は、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-[サクシニル（メトキシポリエチレングリコール）]（C8 PEGセラミド））のようなC₆~C₂₀（例えば、C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₄、C₁₆、またはC₁₈）のアルキル鎖（複数可）を有する脂質に共有結合している長さが最大5 kDaのポリエチレングリコール（PEG）を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、ペグ化脂質は、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) ; または 1, 2-ジステアロイル-rac-グリセロ-ポリエチレングリコール (DSG-PEG)、PEG-DAG ; PEG-PE ; PEG-S-DAG ; PEG-S-DMG ; PEG-cer ; PEG-ジアルコ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) ; およびその組合せである。

【0074】

一部の実施形態では、PEGは高分子量、例えば、2000~2400 g/molを有する。ある特定の実施形態では、PEGはPEG2000 (またはPEG-2K) である。ある特定の実施形態では、本明細書のペグ化脂質は、DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DLPE-PEG2000、DSG-PEG2000、C8-PEG2000、または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。ある特定の実施形態では、本明細書のペグ化脂質はDMG-PEG2000である。

10

【0075】

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与える。一部の実施形態では、LNPは1つまたは複数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は、例えば、DC-Choi (N, N-ジメチル-N-エチルカルボキシアミドコレステロール)、1, 4-ビス (3-N-オレイルアミノ-プロピル) ピペラジン (Gaora, Biochem Biophys Res Comm. (1991) 179:280頁; Wolfら、BioTechniques (1997) 23:139頁; 米国特許第5, 744, 335号)、イミダゾールコレステロールエステル (「ICE」; WO2011/068810)、シトステロール (22, 23-ジヒドロステグマステロール)、β-シトステロール、シトスタノール、フコステロール、ステグマステロール (ステグマスター-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-3β-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-コレスター-8, 24-ジエン-3β-オール); ラソステロール (5α-コレスト-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 (カンペスター-5-エン-3β-オール); カンペスタノール (5α-カンペスタン-3β-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テ (コレスター-5-エン-3β-イルヘプタデカン酸); オレイン酸コレステリル; ステアリン酸コレステリルおよびコレステロールの他の修飾形を含む。一部の実施形態では、LNPにおいて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。

20

30

【0076】

D. ヘルパー脂質

ヘルパー脂質はLNPの構造安定性を増強し、LNPのエンドソーム脱出を助ける。ヘルパー脂質は、mRNA薬物ペイロードの取込みおよび放出を改善する。一部の実施形態では、ヘルパー脂質は、双性イオン脂質であり、これは薬物ペイロードの取込みおよび放出を増強するための膜融合特性を有する。ヘルパー脂質の例は、1, 2-ジオレオイル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPE) ; 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (DOPS) ; 1, 2-ジオライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DEPE) ; および 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) ;

40

50

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)、および 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。

【0077】

他の例示的ヘルパー脂質は、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)、またはその組合せである。ある特定の実施形態では、ヘルパー脂質はDOPEである。ある特定の実施形態では、ある特定の実施形態ではDSPCである。

10

【0078】

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、または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；および(iv) DOPEを含む。

20

【0079】

E. 脂質成分のモル比

上記成分のモル比はmRNAを送達する際のLNPの有効性にとって重要である。カチオン性脂質、ペグ化脂質、コレステロール系脂質、およびヘルパー脂質のモル比はA:B:C:Dで、 $A+B+C+D=100\%$ である。一部の実施形態では、全脂質と比べたLNP中のカチオン性脂質のモル比（すなわち、A）は、35~50%のような35~55%（例えば、40%のような38~42%、または45~50%）である。一部の実施形態では、全脂質と比べたペグ化脂質成分のモル比（すなわち、B）は、0.25~2.75%（例えば、1.5%のような1~2%）である。一部の実施形態では、全脂質と比べた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、28.5%のような27~30%、または38~43%）である。一部の実施形態では、全脂質と比べたヘルパー脂質のモル比（すなわち、D）は、5~35%（例えば、30%のような28~32%、または10%のような8~12%）である。一部の実施形態では、（ペグ化脂質+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。一部の実施形態では、LNPは、1よりも多いカチオン性脂質対ヘルパー脂質のモル比を含有する。

30

【0080】

ある特定の実施形態では、本開示のLNPは、カチオン性脂質を、35%~55%または40%~50%のモル比で（例えば、カチオン性脂質を35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、または55%のモル比で）；ポリエチレングリコール (PEG) コンジュゲート（ペグ化された）脂質を、0.25%~2.75%または1.00%~2.00%のモル比で（例えば、ペグ化脂質を0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%、1.75%、2.00%、2.25%、2.50%、または2.75%のモル比で）；コレステロール系脂質を、20%~50%、25%~45%、または28.5%~43%のモル比で（例えば、コレステロール系脂質を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%

40

50

、45%、46%、47%、48%、49%、または50%のモル比で) ; およびヘルパー脂質を、5%~35%、8%~30%、または10~30%のモル比で(例えば、ヘルパー脂質を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%、または35%のモル比で)

含み、

モル比のすべてがLNPの総脂質含有量に対するモル比である。

【0081】

ある特定の実施形態では、LNPは、カチオン性脂質を40%のモル比で ; ペグ化脂質を1.5%のモル比で ; コレステロール系脂質を28.5%のモル比で ; およびヘルパー脂質を30%のモル比で含む。

10

【0082】

ある特定の実施形態では、ペグ化脂質は、ジミリストイル-PEG2000(DMG-PEG2000)である。

【0083】

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。

【0084】

一部の実施形態では、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。

20

【0085】

ある特定の実施形態では、LNPは、OF-02を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDOPEを5%~35%のモル比で含む。

【0086】

ある特定の実施形態では、LNPは、cKK-E10を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDOPEを5%~35%のモル比で含む。

【0087】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDOPEを5%~35%のモル比で含む。

30

【0088】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDOPEを5%~35%のモル比で含む。

【0089】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDOPEを5%~35%のモル比で含む。

40

【0090】

ある特定の実施形態では、LNPは、SM-102を35%~55%のモル比で ; DMG-PEG2000を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50%のモル比で ; およびDSPCを5%~35%のモル比で含む。

【0091】

ある特定の実施形態では、LNPは、ALC-0315を35%~55%のモル比で ; ALC-0159を0.25%~2.75%のモル比で ; コレステロールを20%~50

50

%のモル比で；およびDSPCを5%～35%のモル比で含む。

【0092】

ある特定の実施形態では、LNPは、OF-02を40%のモル比で；DMG-PEG 2000を1.5%のモル比で；コレステロールを28.5%のモル比で；およびDOPEを30%のモル比で含む。このLNP製剤は本明細書では「脂質A」と呼ばれる。

【0093】

ある特定の実施形態では、LNPは、cKK-E10を40%のモル比で；DMG-PEG 2000を1.5%のモル比で；コレステロールを28.5%のモル比で；およびDOPEを30%のモル比で含む。このLNP製剤は本明細書では「脂質B」と呼ばれる。

【0094】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1を40%のモル比で；DMG-PEG 2000を1.5%のモル比で；コレステロールを28.5%のモル比で；およびDOPEを30%のモル比で含む。このLNP製剤は本明細書では「脂質C」と呼ばれる。

【0095】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10を40%のモル比で；DMG-PEG 2000を1.5%のモル比で；コレステロールを28.5%のモル比で；およびDOPEを30%のモル比で含む。このLNP製剤は本明細書では「脂質D」と呼ばれる。

【0096】

ある特定の実施形態では、LNPは、GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14を40%のモル比で；DMG-PEG 2000を1.5%のモル比で；コレステロールを28.5%のモル比で；およびDOPEを30%のモル比で含む。このLNP製剤は本明細書では「脂質E」と呼ばれる。

【0097】

ある特定の実施形態では、LNPは、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}オクタン酸(SM-102)を50%のモル比で、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)を10%のモル比で、コレステロールを38.5%のモル比で；および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-PEG 2000)を1.5%のモル比で含む。

【0098】

ある特定の実施形態では、LNPは、(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-ヘキシルデカン酸)(ALC-0315)を46.3%のモル比で；1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)を9.4%のモル比で；コレステロールを42.7%のモル比で；および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1.6%のモル比で含む。

【0099】

ある特定の実施形態では、LNPは、[(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-ヘキシルデカン酸)(ALC-0315)を47.4%のモル比で；1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)を10%のモル比で、コレステロールを40.9%のモル比で；および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1.7%のモル比で含む。

【0100】

LNP製剤中に入れるそれぞれの脂質の実際量を計算するためには、カチオン性脂質のモル量は、所望のN/P比に基づいてまず決定され、Nはカチオン性脂質中の窒素原子の数であり、PはLNPにより輸送されるmRNA中のリン酸基の数である。次に、その他の脂質のそれぞれのモル量は、カチオン性脂質のモル量および選択されたモル比に基づい

10

20

30

40

50

て計算される。次に、これらのモル量は、それぞれの脂質の分子量を使用して重量に変換される。

【0101】

F. LNPの活性成分

本LNPワクチン組成物の活性成分は、インフルエンザ抗原をコードするmRNAである。

【0102】

望まれる場合は、LNPは多価でもよい。一部の実施形態では、LNPは、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのインフルエンザ抗原のような1つよりも多いインフルエンザ抗原をコードするmRNAを保有していてもよい。例えば、LNPは、それぞれが異なるインフルエンザ抗原をコードする複数のmRNAを保有する；または1つよりも多いインフルエンザ抗原に翻訳されることが可能なポリシストロニックなmRNA（例えば、それぞれの抗原コード配列が、2Aペプチドのような自己切断ペプチドをコードするヌクレオチドリンカーにより分離されている）を保有していてもよい。異なるmRNAを保有するLNPは、典型的には、それぞれのmRNAの複数のコピーを含む（カプセル化する）。例えば、2つの異なるmRNAを保有するまたはカプセル化するLNPは、典型的には、2つの異なるmRNAのそれぞれの複数のコピーを保有する。

【0103】

一部の実施形態では、単一のLNP製剤は、それぞれの種類が異なるmRNAを保有する、複数の種類（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上）のLNPを含んでいてもよい。

【0104】

一部の実施形態では、多価LNPワクチンは、ヘマグルチニン（例えば、ヘマグルチニン1（HA1）およびヘマグルチニン2（HA2））、ノイラミニダーゼ（NA）、核タンパク質（NP）、マトリックスタンパク質1（M1）、マトリックスタンパク質2（M2）、非構造タンパク質1（NS1）、および非構造タンパク質2（NS2）から選択される8つのインフルエンザウイルスタンパク質に由来するポリペプチドをコードするmRNA分子を含有する。さらなる実施形態では、多価LNPワクチンは、HAタンパク質由来の、NAタンパク質由来の、およびHAとNAタンパク質の両方由来の抗原性ポリペプチドをコードする8つのmRNAを含有する。一部の実施形態では、抗原性ポリペプチドをコードするmRNAは異なるインフルエンザ株由来である。

【0105】

ある特定の実施形態では、組成物は、インフルエンザA、BおよびCウイルスの抗原をコードする1つまたはそれ以上のmRNAを含んでもよい。一実施形態では、組成物は、インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスのHAおよび／またはNA抗原をコードする1つまたはそれ以上のmRNAを含んでもよい。一実施形態では、インフルエンザAウイルスのHA抗原は、サブタイプH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、およびH18から選択される。一実施形態では、インフルエンザAウイルスのNA抗原は、サブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10、およびN11から選択される。一実施形態では、インフルエンザBウイルスのHAおよびNA抗原は、インフルエンザB／Yamagata系統由来である。一実施形態では、インフルエンザBウイルスのHAおよびNA抗原は、インフルエンザB／Victoria系統由来である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のHAおよびNA抗原は、世界保健機構（WHO）によりインフルエンザワクチン製剤の年間推奨で推奨されるインフルエンザウイルス株由来である。

【0106】

ある特定の実施形態では、1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルスタンパク質のうちの少なくとも1つは、機械学習モデルから同定されるまたは設計される分子配列を有するインフルエンザウイルスHAタンパク質および／またはインフルエンザウイルスNA

10

20

30

40

50

タンパク質を含み、1つまたはそれ以上のリボ核酸分子のうちの少なくとも1つは、機械学習モデルから同定されるまたは設計される分子配列を有する1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルスタンパク質をコードする。

【0107】

一実施形態では、組成物は、H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB/Victoria由来のHA抗原をコードする1つのmRNAを含む。

【0108】

一実施形態では、組成物は、H3 HA抗原をコードする1つのmRNA、N2 NA抗原をコードする1つのmRNA、H1 HA抗原をコードする1つのmRNA、N1 NA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Yamagata系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNA、インフルエンザB/Victoria系統由来のHA抗原をコードする1つのmRNA、およびインフルエンザB/Victoria系統由来のNA抗原をコードする1つのmRNAを含む。

【0109】

実施形態では、組成物は、機械学習モデルから同定されるまたは設計される分子配列を有する機械学習インフルエンザウイルスHAをコードする1つまたはそれ以上のmRNAをさらに含み、1つまたはそれ以上の機械学習インフルエンザウイルスHAは、H1 HA、H3 HA、B/Victoria系列由来のHA、B/Yamagata系列由来のHA、またはその組合せから選択してもよい。

【0110】

1つまたはそれ以上の機械学習インフルエンザウイルスHAを選択する場合、いかなる機械学習アルゴリズムを使用してもよい。例えば、ワクチンを設計するためのシステムおよび方法という表題のPCT出願国際公開第2021/080990号、ならびに生物学的応答を予測するためのシステムおよび方法という表題のPCT出願国際公開第2021/080999号に開示される機械学習アルゴリズムおよび方法のいずれかが本明細書で想定されており、前記特許文献の両方は参照によってその全体を本明細書に組み入れる。

【0111】

mRNAは修飾されない（すなわち、リン酸ジエステル結合により連結された天然のリボヌクレオチドA、U、C、および／またはGだけを含む）、または化学的に修飾されてもよい（例えば、プソイドウリジン（例えば、N-1-メチルプソイドウリジン）、2'-フルオロリボヌクレオチド、および2'-メトキシリボヌクレオチドのようなヌクレオチド類似物、ならびに／またはホスホロチオエート結合を含む）。mRNA分子は、5'キャップおよびポリAテールを含んでもよい。

【0112】

G. バッファーおよび他の成分

核酸および／もしくはLNPを安定化させるため（例えば、ワクチン製品の貯蔵寿命を延ばすため）、LNP医薬組成物の投与を促進するため、ならびに／または核酸のin vivo発現を増強するため、核酸および／またはLNPは、1つまたはそれ以上の担体、ターゲティングリガンド、安定化試薬（例えば、保存剤および抗酸化剤）および／また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、チメロサル、チオメルサル、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム、およびキレート剤（例えば、EDTA）である。

【0113】

本開示のLNP組成物は、凍結液体形態または凍結乾燥形態として提供できる。サクロース、トレハロース、グルコース、マンニトール、マンノース、ブドウ糖、および同類のものを含むが、これらに限定されない、種々の凍結保護物質を使用しうる。凍結保護物質は、LNP組成物の5〜30%（w/v）を構成してよい。一部の実施形態では、L

10

20

30

40

50

N P 組成物はトレハロースを、例えば、5 ～ 30 %（例えば、10 %）（w / v）で含む。凍結保護物質を用いて製剤化された後は、L N P 組成物を -20 °C ～ -80 °C で凍結してもよい（または凍結乾燥され、凍結保存される）。

【0114】

L N P 組成物は、水性緩衝溶液で患者に与えてもよく、予め凍結されている場合は、または予め凍結乾燥されている場合は解凍され、枕元において水性緩衝溶液で再構成される。緩衝液は、好ましくは等張性であり、例えば、筋肉内または皮内注射に適している。一部の実施形態では、緩衝溶液はリン酸緩衝食塩水（P B S）である。

【0115】

II. RNA

本開示の本 L N P ワクチン組成物は、目的の抗原をコードする RNA 分子（例えば、m RNA）を含む場合がある。本開示の RNA 分子は、目的の抗原をコードする O R F を含む少なくとも1つのリボ核酸（RNA）を含む場合がある。ある特定の実施形態では、RNA は、目的の抗原をコードする O R F を含むメッセンジャー RNA（m RNA）である。ある特定の実施形態では、RNA（例えば、m RNA）は、少なくとも1つの 5' U T R、3' U T R、ポリ（A）テール、および／または 5' キャップをさらに含む。

【0116】

II. A. 5' キャップ

m RNA 5' キャップは、大半の真核細胞に見出されるヌクレアーゼに対する抵抗性を与え、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（「m⁷G」または「キャップ-0」とも呼ばれる）は、5'-5' 三リン酸結合を通じて第1の転写されたヌクレオチドに連結されているグアノシンを含む。

【0117】

5' キャップは典型的には以下の通りに付加される：まず、RNA 末端ホスファターゼは 5' ヌクレオチドから末端リン酸基の1つを取り除き、2つの末端リン酸塩を残し；次にグアノシン三リン酸（G T P）がグアニリルトランスフェラーゼにより末端リン酸塩に付加され、5' 5' 5' 三リン酸結合を生成し；次にグアニンの 7-窒素がメチルトランスフェラーゼによりメチル化される。キャップ構造の例は、m⁷G（5'）p p p、（5'（A、G（5'）p p p（5'）A、および G（5'）p p p（5'）Gを含むがこれらに限定されない。追加のキャップ構造は、米国特許出願公開第 2016 / 0032356 号および米国特許出願公開第 2018 / 0125989 号に記載されており、前記特許文献は参照によって本明細書に組み入れる。

【0118】

ポリヌクレオチドの 5'-キャッピングは、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み出す以下の化学的 RNA キャップ類似物：3'-O-Me-m⁷G（5'）p p p（5'）G（A R C A キャップ）；G（5'）p p p（5'）A；G（5'）p p p（5'）G；m⁷G（5'）p p p（5'）A；m⁷G（5'）p p p（5'）G；m⁷G（5'）p p p（5'）（2'-OMeA）p G；m⁷G（5'）p p p（5'）（2'-OMeA）p U；m⁷G（5'）p p p（5'）（2'-OMeG）p G（New England Bio Labs、Ipswich、MA；TriLink Biotechnologies）を使用して *in vitro* 転写反応中に同時に完了させてもよい。修飾された RNA の 5'-キャッピングは、キャップ 0 構造：m⁷G（5'）p p p（5'）G を生み出す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させてもよい。キャップ 1 構造は、ワクシニアウイルスキャッピング酵素と m⁷G（5'）p p p（5'）G-2'-O-メチルを生み出す 2'-O-メチルトランスフェラーゼの両方を使用して生み出してもよい。キャップ 2 構造は、キャップ 1 構造から生み出されてもよく、続いて 2'-O-メチルトランスフェラーゼを使用して 5'-アンテペナルティメート（antepenultimate）ヌクレオチドが 2'-O-メチル化される。キャップ 3 構造は、キャップ 2 構造から生み出されてもよく、続いて 2'-O-メチルトランスフェラーゼを使用して 5'-

10

20

30

40

50

プレアンテペナルティメート (preantepenultimate) ヌクレオチドが 2'-Oメチル化される。

【0119】

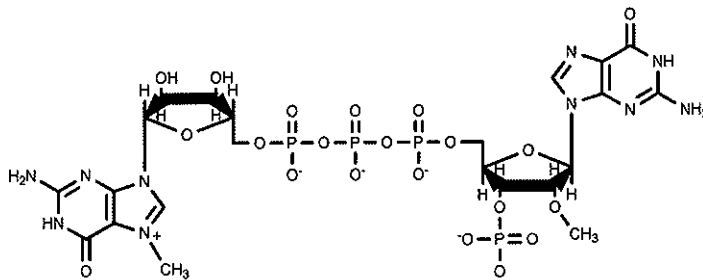
ある特定の実施形態では、本開示の mRNA は、3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G(ARCAキャップ)、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')A、m7G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU、および m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG からなる群から選択される 5'キャップを含む。

【0120】

10

ある特定の実施形態では、本開示の mRNA は、

【化10】



20

の 5'キャップを含む。

【0121】

II. B. 非翻訳領域 (UTR)

一部の実施形態では、本開示の mRNA は、5' および / または 3' 非翻訳領域 (UTR) を含む。mRNA では、5' UTR は転写開始部位で開始して開始コドンまで続くが開始コドンは含まない。3' UTR は終止コドンに続いてすぐに開始し、転写終止シグナルまで続く。

【0122】

30

一部の実施形態では、本明細書で開示される mRNA は、mRNA の安定性または翻訳に影響を及ぼす 1 つまたはそれ以上のエレメントを含む 5' UTR を含む場合がある。一部の実施形態では、5' UTR は約 10 ~ 5,000 ヌクレオチド長である場合がある。一部の実施形態では、5' UTR は約 50 ~ 500 ヌクレオチド長である場合がある。一部の実施形態では、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、または 5,000 ヌクレオチド長である。

40

【0123】

一部の実施形態では、本明細書で開示される mRNA は、ポリアデニル化シグナルの 1 つまたはそれ以上、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に対する結合部位、または miRNA に対する 1 つまたはそれ以上の結合部位を含む 3' UTR を含む場合がある。一部の実施形態では、3' UTR は約 50 ~ 5,000 ヌクレオチド

50

長またはそれよりも長い場合がある。一部の実施形態では、3' UTRは約50～1,000ヌクレオチド長またはそれよりも長い場合がある。一部の実施形態では、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、または5,000ヌクレオチド長である。

10

【0124】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるmRNAは、mRNA転写物によりコードされる遺伝子とは異なる遺伝子に由来する5'または3' UTRを含む場合がある（すなわち、UTRは異種UTRである）。

【0125】

ある特定の実施形態では、5'および／または3' UTR配列は、mRNAの安定性を増やすために安定したmRNA（例えば、グロビン、アクチン、GAPDH、チューブリン、ヒストン、またはクエン酸回路酵素）から引き出すことができる。例えば、5' UTR配列は、ヌクレアーゼ抵抗性を改善するおよび／またはmRNAの半減期を改善するためにCMV最初期1（IE1）遺伝子の部分的配列、またはその断片を含んでもよい。mRNAの3'末端または非翻訳領域にヒト成長ホルモン（hGH）をコードする配列またはその断片を含むことも意図されている。一般的には、これらの改変は、その非改変対応物と比べてmRNAの安定性および／または薬物動態特性（例えば、半減期）を改善し、例えば、in vivoヌクレアーゼ消化に対するそのようなmRNA抵抗性を改善するために加えられる改変を含む。

20

【0126】

例示的5' UTRは、CMV最初期1（IE1）遺伝子由来の配列（米国特許出願公開第2014/0206753号および米国特許出願公開第2015/0157565号、前記特許文献のそれぞれは参照によって本明細書に組み入れる）、または配列GGGAUCCUACC（配列番号22）（米国特許出願公開第2016/0151409号、参照によって本明細書に組み入れる）を含む。

30

【0127】

種々の実施形態では、5' UTRは、TOP遺伝子の5' UTR由来でもよい。TOP遺伝子は典型的には5'末端オリゴピリミジン（TOP）トラクトの存在を特徴とする。さらに、大半のTOP遺伝子は成長関連翻訳調節を特徴とする。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。ある特定の実施形態では、TOP遺伝子の5' UTR由来の5' UTRは5' TOPモチーフ（オリゴピリミジントラクト）を欠く（例えば、米国特許出願公開第2017/0029847号、米国特許出願公開第2016/0304883号、米国特許出願公開第2016/0235864号、および米国特許出願公開第2016/0166710号、前記特許文献のそれぞれは参照によって本明細書に組み入れる）。

40

【0128】

ある特定の実施形態では、5' UTRは、リボソームタンパク質ラージ32（L32）遺伝子に由来する（米国特許出願公開第2017/0029847号、上記参照）。

【0129】

ある特定の実施形態では、5' UTRは、水酸化ステロイド（17- β ）デヒドロゲナーゼ4遺伝子（HSD17B4）の5' UTRに由来する（米国特許出願公開第2016/0166710号、上記参照）。

50

【0130】

ある特定の実施形態では、5'UTRは、ATP5A1遺伝子の5'UTRに由来する（米国特許出願公開第2016/0166710号、上記参照）。

一部の実施形態では、配列内リボソーム進入部位（IRES）は5'UTRの代わりに使用される。

【0131】

一部の実施形態では、5'UTRは、配列番号19に示され下に再生される核酸配列を含む。

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCCAUCCACGCGUGUUUUGACC
UCCAUAAGAAGACACCGGGACCGAUAUCCAGCCUCCGCGGCCG
GGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCUCCCGUGCCAAGAGU
GACUCACCGUCCUUGACACG（配列番号19）

【0132】

一部の実施形態では、3'UTRは、配列番号20に示され下に再生される核酸配列を含む。

CGGGUGGCAUCCCCUGUGACCCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUG
GCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCCACCAAGCCUUGUCC
UAAUAAAAAUUAAGUUGCAUC（配列番号20）

【0133】

5'UTRおよび3'UTRは、WO2012/075040にさらに詳細に記載され、参照によって本明細書に組み入れる。

【0134】

II.C. ポリアデニル化テール

本明細書で使用される場合、用語「ポリ（A）配列」、「ポリ（A）テール」、および「ポリ（A）領域」とは、mRNA分子の3'末端のアデノシンヌクレオチドの配列のことである。ポリ（A）テールは、mRNAに安定性を与え、エキソヌクレアーゼ分解からmRNAを保護しうる。ポリ（A）テールは翻訳を増強しうる。一部の実施形態では、ポリ（A）テールは本質的にホモポリマーである。例えば、100アデノシンヌクレオチドのポリ（A）テールは、本質的に100ヌクレオチドの長さを有しうる。ある特定の実施形態では、ポリ（A）テールは、アデノシンヌクレオチドとは異なる少なくとも1つのヌクレオチド（例えば、アデノシンヌクレオチドではないヌクレオチド）により中断されている場合がある。例えば、100アデノシンヌクレオチドのポリ（A）テールは、100ヌクレオチドを超える長さを有する場合がある（100アデノシンヌクレオチドおよびアデノシンヌクレオチドとは異なる少なくとも1つのヌクレオチド、または一続きのヌクレオチドを含む）。ある特定の実施形態では、ポリ（A）テールは、配列AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAA（配列番号23）を含む。

【0135】

「ポリ（A）テール」は、本明細書で使用される場合、典型的にはRNAに関する。しかし、本開示の文脈では、本用語は、DNA分子中の対応する配列（例えば、「ポリ（T）配列」）にも同様に關する。

【0136】

ポリ（A）テールは、約10～約500アデノシンヌクレオチド、約10～約200アデノシンヌクレオチド、約40～約200アデノシンヌクレオチド、または約40～約150アデノシンヌクレオチドを含んでもよい。ポリ（A）テールの長さは、少なくとも約10、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、または500アデノシンヌクレオチドでもよい。

【0137】

核酸がRNAである一部の実施形態では、核酸のポリ（A）テールは、RNA in

10

20

30

40

50

v i t r o 転写中にDNA鋳型から得られる。ある特定の実施形態では、ポリ(A)テールは、DNA鋳型から転写されずに化学合成の一般的方法により得られる。種々の実施形態では、ポリ(A)テールは、市販のポリアデニル化キットおよび対応するプロトコルを使用してRNAの酵素的ポリアデニル化により、または代わりに、固定されたポリ(A)ポリメラーゼを使用する、例えば、WO2016/174271に記載される方法および手段を使用することにより生み出される。

【0138】

核酸は、酵素的ポリアデニル化により得られるポリ(A)テールを含む場合があり、大多数の核酸分子は約100(+/-20)~約500(+/-50)または約250(+/-20)アデノシンヌクレオチドを含む。

10

【0139】

一部の実施形態では、核酸は鋳型DNA由来のポリ(A)テールを含む場合があり、例えば、WO2016/091391に記載されるように、酵素的ポリアデニル化により生み出される少なくとも1つの追加のポリ(A)テールをさらに含む場合がある。

【0140】

ある特定の実施形態では、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。

【0141】

種々の実施形態では、核酸は少なくとも1つのポリ(C)配列を含む場合がある。

【0142】

用語「ポリ(C)配列」は、本明細書で使用される場合、約200シトシンヌクレオチドまでのシトシンヌクレオチドの配列であることが意図されている。一部の実施形態では、ポリ(C)配列は、約10~約200シトシンヌクレオチド、約10~約100シトシンヌクレオチド、約20~約70シトシンヌクレオチド、約20~約60シトシンヌクレオチド、または約10~約40シトシンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリ(C)配列は、約30シトシンヌクレオチドを含む。

20

【0143】

II. D. 化学修飾

本明細書で開示されるmRNAは修飾されても非修飾でもよい。一部の実施形態では、mRNAは少なくとも1つの化学修飾を含んでいてよい。一部の実施形態では、本明細書で開示されるmRNAは、典型的にはRNA安定性を増強する1つまたはそれ以上の修飾を含有してよい。例示的な修飾は、骨格修飾、糖修飾、または塩基修飾を含むことができる。一部の実施形態では、開示されたmRNAは、プリン(アデニン(A)およびグアニン(G))またはピリミジン(チミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U))を含むがこれらの限定されない天然に存在するヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似物(修飾ヌクレオチド)から合成しうる。ある特定の実施形態では、開示されたmRNAは、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、プソイドウラシル(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-プロモ-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'-メトシキカルボニルメチル-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-プソイドウラシル、キューオシン、β-D-マンノシル-キューオシン、ホスホロアミド酸、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホン酸、7-デアザグアニン、5-メチルシトシン

30

40

50

、およびイノシンのようなプリンおよびピリミジンの修飾ヌクレオチド類似物または誘導体から合成しうる。

【0144】

一部の実施形態では、開示されたmRNAは、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、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-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン、および2'-O-メチルウリジンを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの化学修飾を含んでいてよい。

10

【0145】

一部の実施形態では、化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、5-メチルシトシン、5-メトキシウリジン、およびその組合せからなる群から選択される。

【0146】

一部の実施形態では、化学修飾はN1-メチルプソイドウリジンを含む。

【0147】

一部の実施形態では、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%、または100%が化学修飾されている。

20

【0148】

一部の実施形態では、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%、または100%が化学修飾されている。

【0149】

そのような類似物の製造は、例えば、米国特許第4,373,071号、米国特許第4,401,796号、米国特許第4,415,732号、米国特許第4,458,066号、米国特許第4,500,707号、米国特許第4,668,777号、米国特許第4,973,679号、米国特許第5,047,524号、米国特許第5,132,418号、米国特許第5,153,319号、米国特許第5,262,530号、および米国特許第5,700,642号に記載されている。

30

【0150】

II. E. mRNA合成

本明細書で開示されるmRNAは、多種多様な方法のうちのいずれに従って合成してもよい。例えば、本開示に従ったmRNAは、*in vitro*転写(IVT)により合成しうる。*in vitro*転写のためのいくつかの方法は、例えば、Geallら、(2013) *Semin. Immunol.* 25(2):152~159頁; Brunelleら、(2013) *Methods Enzymol.* 530:101~14頁に記載されている。手短かに言えば、IVTは、典型的には、プロモーターを含有する直鎖状もしくは環状DNA鋳型、リボヌクレオチド三リン酸のプール、DTTおよびマグネシウムイオンを含む場合があるバッファー系、適切なRNAポリメラーゼ(例えば、T3、T7、またはSP6 RNAポリメラーゼ)、DNアーゼI、ピロホスファターゼ、ならびに/またはRNアーゼ阻害剤を用いて実施される。正確な条件は、特定の適用に従って変動しうる。これらの試薬の存在は最終mRNA製品中では一般に好ましくなく、これらの試薬は、治療使用に適しているクリーンなおよび/または均質なmRNAを提供するために精製するまたは取り除くことができる不純物または汚染物質と見なすことができる。*in v*

40

50

i t r o 転写反応から提供されるmRNAは一部の実施形態では望ましい場合があるが、細菌、真菌、植物、および／または動物から産生される野生型mRNAを含むmRNAの他の供給源を本開示に従って使用することが可能である。

【0151】

III. 本LNPワクチンを作製するための方法

本LNPは当技術分野で現在知られている種々の技法により製造することができる。例えば、多重膜ベシクル（MLV）は、脂質を適切な溶媒に溶解し、次に溶媒を蒸発させて器の内側に薄膜を残すことによりまたは噴霧乾燥により適切な容器または器の内壁に選択された脂質を沈着させることにより、のような従来の技法に従って製造してもよい。次に、水相を渦運動する器に添加してMLVを形成してもよい。次に、多重膜ベシクルの均質化、超音波処理または押し出し加工により単層膜リポソーム（ULV）を形成することができる。さらに、単層膜リポソームは、洗剤除去技法により形成することができる。

【0152】

種々の方法が、US2011/0244026、US2016/0038432、US2018/0153822、US2018/0125989、およびPCT/US2020/043223（2020年7月23日提出）に記載されており、本発明を実行するのに使用することができる。1つの例示的方法は、US2016/0038432に記載される通りに、まず脂質を前もって脂質ナノ粒子に形成することなく、mRNAを脂質の混合物と混ぜ合わせるによりmRNAをカプセル化することを必要とする。別の例示的方法は、US2018/0153822に記載される通りに、前もって形成されたLNPをmRNAと混ぜ合わせるによりmRNAをカプセル化することを必要とする。

【0153】

一部の実施形態では、mRNA負荷LNPを製造する方法は、溶液の1つまたはそれ以上を環境温度よりも高い温度まで加熱する工程であって、1つまたはそれ以上の溶液は予め形成された脂質ナノ粒子を含む溶液、mRNAを含む溶液およびLNPカプセル化mRNAを含む混合溶液である、工程を含む。一部の実施形態では、方法は、混合工程に先立って、mRNA溶液と予め形成されたLNP溶液のうちの1つまたは両方を加熱する工程を含む。一部の実施形態では、方法は、混合工程中に、予め形成されたLNPを含む溶液、mRNAを含む溶液、およびLNPカプセル化されたmRNAを含む溶液のうちの1つまたはそれ以上を加熱することを含む。一部の実施形態では、方法は、混合工程後に、LNPカプセル化mRNAを加熱する工程を含む。一部の実施形態では、溶液のうちの1つまたはそれ以上を加熱する温度は、約30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、もしくは70℃である、またはこれよりも高い。一部の実施形態では、溶液のうちの1つまたはそれ以上を加熱する温度は、約25～70℃、約30～70℃、約35～70℃、約40～70℃、約45～70℃、約50～70℃、または約60～70℃の範囲である。一部の実施形態では、温度は約65℃である。

【0154】

種々の方法を使用して本発明に適したmRNA溶液を製造してもよい。一部の実施形態では、mRNAは、本明細書に記載されるバッファー溶液に直接溶解してもよい。一部の実施形態では、mRNA溶液は、カプセル化のために脂質溶液と混合する前にmRNAストック液をバッファー溶液と混合することにより作製してもよい。一部の実施形態では、mRNA溶液は、カプセル化のために脂質溶液と混合する直前にmRNAストック液をバッファー溶液と混合することにより作製してもよい。一部の実施形態では、適切なmRNAストック液は、水またはバッファー中に約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、または1.6mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml、3.5mg/ml、4.0mg/ml、4.5mg/ml、または5.0mg/mlの濃度でまたはこれよりも高い濃度でmRNAを含有してもよい。

【0155】

一部の実施形態では、mRNAストック液は、ポンプを使用してバッファー溶液と混合される。例示的なポンプは、歯車ポンプ、蠕動ポンプ、および遠心ポンプを含むがこれらに限定されない。典型的には、バッファー溶液は、mRNAストック液の速度よりも大きな速度で混合される。例えば、バッファー溶液は、mRNAストック液の速度の少なくとも1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、15×、または20×の速度で混合してもよい。一部の実施形態では、バッファー溶液は、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、または60～420ml/分）の範囲の流量で混合される。一部の実施形態では、バッファー溶液は、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、または6000ml/分の流量、またはそれよりも大きな流量で混合される。

10

【0156】

一部の実施形態では、mRNAストック液は、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、または約480～600ml/分）の範囲の流量で混合される。一部の実施形態では、mRNAストック液は、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、または600ml/分の流量またはそれよりも大きな流量で混合される。

20

【0157】

所望のmRNAを脂質ナノ粒子中に取り込む方法は、「負荷」と呼ばれる。例示的な方法は、Lasicaら、FEBS Lett. (1992) 312:255～8頁に記載されている。LNP取込み核酸は、脂質ナノ粒子の内部空間に完全にもしくは部分的に位置している、脂質ナノ粒子の二重膜内にある、または脂質ナノ粒子膜の外面に会合しているもよい。脂質ナノ粒子中へのmRNAの取込みは、核酸が脂質ナノ粒子の内部空間内に完全にまたは実質的に含有される「カプセル化」とも本明細書では呼ばれる。

30

【0158】

適切なLNPを種々のサイズで作製しうる。一部の実施形態では、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サイズを選択には、標的細胞または組織の部位およびある程度は脂質ナノ粒子が作製される目的となる適用を考慮に入れてもよい。

【0159】

当技術分野で知られている多種多様の方法が、脂質ナノ粒子の集団のサイズ分類に利用可能である。本明細書で好ましい方法は、ゼータサイザーナノZS (Malvern Panalytical) を利用してLNP粒子サイズを測定する。一プロトコルでは、LNP試料10μlが10%トレハロース990μlと混合される。この溶液はキュベット中に負荷され、次にゼータサイザー機中に置かれる。z平均直径(nm)、またはキュムラント平均は、試料中のLNPについての平均サイズと見なされる。ゼータサイザー機を使用すれば、動的光散乱(DLS)および自己相関関数のキュムラント分析を使用することにより多分散性指数(PDI)を測定することもできる。平均LNP直径は、形成されたLNPの超音波処理により減少させうる。断続的超音波処理サイクルを、準弾性光散乱(QELS)評価と交互に繰り返して、効率的な脂質ナノ粒子合成を導いてもよい。

40

【0160】

一部の実施形態では、精製されたLNPの大多数、すなわち、LNPの約50%、55

50

%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%よりも多い、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、または約80nm）のサイズを有する。一部の実施形態では、精製された脂質ナノ粒子の実質的にすべて（例えば、80%または90%よりも多い）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、または約80nm）のサイズを有する。

【0161】

一部の実施形態では、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、または20nm未満の平均サイズを有する。

【0162】

一部の実施形態では、本組成物中のLNPの約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%よりも多くは、約40～90nm（例えば、約45～85nm、約50～80nm、約55～75nm、約60～70nm）、または吸入投与による肺送達に特に適している約50～70nm（例えば、55～65nm）の範囲のサイズを有する。

【0163】

一部の実施形態では、本発明により提供される医薬組成物中のLNPの分散度、または分子サイズの不均質性の尺度（PDI）は、約0.5未満である。一部の実施形態では、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、または約0.08未満のPDIを有する。PDIは、上に記載されるゼータサイザー機により測定しうる。

【0164】

一部の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物中の精製されたLNPの約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%よりも多くは、mRNAをそれぞれ個々の粒子内にカプセル化している。一部の実施形態では、医薬組成物中の精製された脂質ナノ粒子の実質的にすべて（例えば、80%または90%よりも多い）は、mRNAをそれぞれ個々の粒子内にカプセル化している。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は50%～90%、または約60、65、70、75、80、85、90、92、95、98、または99%よりも多いカプセル化効率を有する。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、または95%）のカプセル化効率を有する。

【0165】

一部の実施形態では、LNPは1～10のN/P比を有する。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、N/P比1より上、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、または約8を有する。さらなる実施形態では、本明細書の典型的なLNPは4のN/P比を有する。

【0166】

一部の実施形態では、本発明に従った医薬組成物は、少なくとも約0.5μg、1μg、5μg、10μg、100μg、500μg、または1000μgのカプセル化mRNAを含有する。一部の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約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、または少なくとも約1000μgのカプセル化mRNAを含有する。

【0167】

一部の実施形態では、mRNAは、化学合成によりまたはDNA鋳型のin vitro転写（IVT）により作製することができる。mRNAを作製し精製するための例示的な方法は実施例1に記載されている。この方法では、IVT方法では、cDNA鋳型を使用してmRNA転写物を作製し、DNA鋳型はDNアーゼにより分解される。転写物は、深層濾過およびタンジェント流濾過（TFF）により精製される。精製された転写物は、キャップおよびテールを付加することによりさらに修飾され、修飾されたRNAは再び深層濾過およびTFFにより精製される。

【0168】

次に、mRNAは水性バッファー中で製造され、LNPの脂質成分を含有する両親媒性溶液と混合される。LNPの4種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もよい。一部の実施形態では、アルコールはエタノールである。水性バッファーは、例えば、クエン酸、リン酸、酢酸、またはコハク酸バッファーでもよく、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、または約6.5のpHを有してよい。バッファーは塩（例えば、ナトリウム、カリウム、および／またはカルシウム塩）のような他の成分を含有してよい。特定の実施形態では、水性バッファーは、1mMのクエン酸、150mMのNaCl、pH4.5を有する。

【0169】

mRNA-LNP組成物を作製するための例示的な非限定的方法は実施例1に記載されている。方法は、制御され均質な仕方で緩衝mRNA溶液をエタノール中の脂質の溶液と混合することを含み、脂質対mRNAの比は混合方法の間ずっと維持される。この実例では、mRNAは、クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム二水和物、および塩化ナトリウムを含有する水性バッファー中で提示される。mRNA溶液は溶液（1mMのクエン酸バッファー、150mMのNaCl、pH4.5）に添加される。4種の脂質（例えば、カチオン性脂質、ペグ化脂質、コレステロール系脂質、およびヘルパー脂質）の脂質混合物はエタノール中に溶解される。水性mRNA溶液およびエタノール脂質溶液は、ほぼ「パルスレス」ポンプ系を有する「T」ミキサー中4：1の容積比で混合される。次に、得られた混合液は下流精製およびバッファー交換を受ける。バッファー交換は、透析カセットまたはTFFシステムを使用して達成してもよい。TFFは、T-混合方法による形成直後に得られた初期のLNPを濃縮しバッファー交換するのに使用してもよい。透析濾過方法は連続操作であり、透過流と同じ速度で適切なバッファーを添加することにより容積を一定に保つ。

【0170】

IV. mRNA-LNPワクチンのパッケージングおよび使用

mRNA-LNPワクチンは、非経口（例えば、筋肉内、皮内または皮下）投与または鼻咽頭（例えば、鼻腔内）投与用に包装することができる。ワクチン組成物は即時製剤の形態でもよく、LNP組成物は凍結乾燥され、使用直前に生理的バッファー（例えば、PBS）で再構成される。ワクチン組成物は、水溶液または凍結水溶液の形態で輸送し提供してもよく、再構成せずに（前もって凍結されている場合は解凍後）直接対象に投与することができる。

【0171】

したがって、本開示は、単一容器でmRNA-LNPワクチンを提供するキットのような製品を提供する、または1つの容器でmRNA-LNPワクチンを、別の容器で再構成用の生理的バッファーを提供する。容器（複数可）は、単回使用投薬量または複数回使用投薬量を含有していてもよい。容器は、前処理されたガラス製バイアルまたはアンプルでもよい。製品は使用説明書を同様に含んでもよい。

【0172】

ある特定の実施形態では、mRNA-LNPワクチンは筋肉内（IM）注射で使用するために提供される。ワクチンは、対象の、例えば、上腕の三角筋に注射することができる。一部の実施形態では、ワクチンは、プレフィルド注射器またはインジェクタ（例えば、単室型または複室型）で提供される。一部の実施形態では、ワクチンは、吸入に使用する

ために提供され、プレフィルドポンプ、気管内噴霧スプレー、または吸入器で提供される。

【0173】

mRNA-LNPワクチンは、それを必要とする対象に、予防的有効量、すなわち、標的病原体に対する十分な免疫防御を十分な時間（例えば、1年、2年、5年、10年、または生涯）与える量で投与することができる。十分な免疫防御は、例えば、病原体による感染に関連する症状の予防または軽減でもよい。一部の実施形態では、複数用量（例えば、2回用量）のワクチンは、それを必要とする対象に注射されて、所望の予防効果を達成する。投与（例えば、プライムおよびブースター投与）は、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、1年、2年、5年、または10年の間隔により隔てられてもよい。

10

【0174】

一部の実施形態では、単回用量のmRNA-LNPワクチンは、mRNA 1～50 μg（例えば、一価または多価）を含有する。例えば、単回用量は、筋肉内（IM）注射用にmRNA約2.5 μg、約5 μg、約7.5 μg、10約μg、約12.5 μg、または約15 μgを含有してよい。さらなる実施形態では、多価単回用量のLNPワクチンは、異なる抗原についてそれぞれ、複数（例えば、2、3、または4）種類のLNPを含有し、それぞれの種類のLNPは、例えば、mRNA量 約2.5 μg、約5 μg、約7.5 μg、10約μg、約12.5 μg、または約15 μgを有する。

【0175】

別の態様では、本発明は、対象において1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルスに対して対象を免疫する方法を提供する。本発明は、対象において1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を誘発する方法をさらに提供する。一部の実施形態では、本方法は、対象に本明細書に記載される有効量の組成物を投与することを含む。

20

【0176】

種々の実施形態では、本明細書で提供される免疫する方法は、1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルス内の複数のエピトープに対して広い防御免疫応答を誘発する。種々の実施形態では、本明細書で提供される免疫する方法は、1つまたはそれ以上のインフルエンザウイルスに対して広い中和免疫応答を誘発する。一部の実施形態では、免疫応答は抗体応答を含む。したがって、種々の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、異なるタイプのインフルエンザウイルスに対して広い交差防御を与えることができる。一部の実施形態では、組成物は、トリ、ブタ、季節性、および／またはパンデミックインフルエンザウイルスに対して交差防御を与える。一部の実施形態では、組成物は、1つまたはそれ以上のインフルエンザA、B、またはCサブタイプに対して交差防御を与える。一部の実施形態では、組成物は、インフルエンザA H1サブタイプウイルス（例えば、H1N1）、インフルエンザA H3サブタイプウイルス（例えば、H3N2）、インフルエンザA H5サブタイプウイルス（例えば、H5N1）、および／またはインフルエンザBウイルス（例えば、Yamagata系統、Victoria系統）の複数の株に対して交差防御を与える。

30

40

【0177】

一部の実施形態では、本発明の方法は、1つまたはそれ以上の季節性インフルエンザ株に対して改善された免疫応答を誘発することができる。例示的な季節性株は、A/Puerto Rico/8/1934、A/Fort Monmouth/1/1947、A/Chile/1/1983、A/Texas/36/1991、A/Singapore/6/1986、A/Beijing/32/1992、A/New Caledonia/20/1999、A/Solomon Islands/03/2006、A/Brisbane/59/2007、細胞伝播プロトタイプウイルスA/Victoria/361/2011に抗原的に類似するA（H3N2）ウイルス、A/Beijing/262/95（H1N1）様ウイルス、A/Brisbane/02/2018（H1N1）

50

1) pdm09様ウイルス、A/Brisbane/10/2007(H3N2)様ウイルス、A/California/7/2004(H3N2)様ウイルス、A/California/7/2009(H1N1)様ウイルス、A/California/7/2009(H1N1)pdm09様ウイルス、A/Cambodia/e0826360/2020(H3N2)様ウイルス、A/Fujian/411/2002(H3N2)様ウイルス、A/Fujian/411/2002(H3N2)様ウイルス、A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(H1N1)pdm09様ウイルス様ウイルス、A/Hawaii/70/2019(H1N1)pdm09様ウイルス様ウイルス、A/Hong Kong/2671/2019(H3N2)様ウイルス、A/Hong Kong/45/2019(H3N2)様ウイルス、A/Hong Kong/4801/2014(H3N2)様ウイルス、A/Kansas/14/2017(H3N2)様ウイルス、A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09様ウイルス様ウイルス、A/Moscow/10/99(H3N2)様ウイルス、A/New Caledonia/20/99(H1N1)様ウイルス、A/Perth/16/2009(H3N2)様ウイルス、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016(H3N2)様ウイルス、A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)様ウイルス、A/South Australia/34/2019(H3N2)様ウイルス、A/Switzerland/8060/2017(H3N2)様ウイルス、A/Switzerland/9715293/2013(H3N2)様ウイルス、A/Sydney/5/97(H3N2)様ウイルス、A/Texas/50/2012(H3N2)様ウイルス、A/Victoria/2570/2019(H1N1)pdm09様ウイルス、A/Victoria/2570/2019(H1N1)pdm09様ウイルス様ウイルス、A/Victoria/361/2011(H3N2)様ウイルス、A/Wellington/1/2004(H3N2)様ウイルス、A/Wisconsin/588/2019(H1N1)pdm09様ウイルス、A/Wisconsin/588/2019(H1N1)pdm09様ウイルス様ウイルス、A/Wisconsin/67/2005(H3N2)様ウイルス、B/Beijing/184/93様ウイルス、B/Brisbane/60/2008様ウイルス、B/Colorado/06/2017様ウイルス(B/Victoria/2/87系統)、B/Florida/4/2006様ウイルス、B/Hong Kong/330/2001様ウイルス、B/Malaysia/2506/2004様ウイルス、B/Massachusetts/2/2012様ウイルス、B/Phuket/3073/2013(B/Yamagata系統)様ウイルス、B/Phuket/3073/2013様ウイルス、B/Phuket/3073/2013様ウイルス(B/Yamagata/16/88系統)、B/Shangdong/7/97様ウイルス、B/Shanghai/361/2002様ウイルス、B/Sichuan/379/99様ウイルス、B/Washington/02/2019(B/Victoria系統)様ウイルス、B/Washington/02/2019様(B/Victoria系統)ウイルス、およびB/Wisconsin/1/2010様ウイルスを限定せずに含む。一部の実施形態では、本発明の方法は、1つまたはそれ以上のパンデミックインフルエンザ株に対して改善された免疫応答を誘発することができる。例示的なパンデミック株は、A/California/07/2009、A/California/04/2009、A/Belgium/145/2009、A/South Carolina/01/1918、およびA/New Jersey/1976を限定せずに含む。パンデミックサブタイプは、特に、H1N1、H5N1、H2N2、H3N2、H9N2、H7N7、H7N3、H7N9およびH10N7サブタイプを含む。一部の実施形態では、本発明の方法は、1つまたはそれ以上のブタインフルエンザ株に対して改善された免疫応答を誘発することができる。例示的なブタ株は、A/New Jersey/1976分離株およびA/California/07/2009を限定せずに含む。一部の実施形態では、本発明の方法は、1つまたはそれ以上のトリインフルエンザ株に対して改善された免疫応答を誘発することが

10

20

30

40

50

できる。例示的なトリ株は、H5N1、H7N3、H7N7、H7N9、およびH9N2を限定せずに含む。追加のインフルエンザパンデミック、季節性、トリおよび／またはブタ株は当技術分野では公知である。

【0178】

一部の実施形態では、本発明は、本発明の組成物をそれを必要とする対象に投与することによってインフルエンザ感染症を予防するまたは処置する方法を提供する。一部の実施形態では、対象はインフルエンザ感染症に罹っているまたは罹りやすい。一部の実施形態では、対象は、インフルエンザ感染に一般に関連している1つまたはそれ以上の症状を示している場合は、インフルエンザ感染症に罹っていると見なされる。一部の実施形態では、対象は、インフルエンザウイルスに曝露されたことがあると分かっているまたは考えられる。一部の実施形態では、対象は、インフルエンザウイルスに曝露されていると分かっているまたは考えられる場合には、インフルエンザ感染しやすいと見なされる。一部の実施形態では、対象が、インフルエンザウイルスに感染していると分かっているもしくは疑われる他の個人と接触している場合および／または対象が、インフルエンザ感染が流行していることが分かっているもしくは考えられる位置にいるもしくはいたことがある場合、対象はインフルエンザウイルスに曝露されていると分かっているもしくは考えられる。

10

【0179】

種々の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、インフルエンザ感染の1つまたはそれ以上の症状の発症に先立ってまたはその後で投与してもよい。一部の実施形態では、組成物は予防薬として投与される。そのような実施形態では、本発明の方法は、インフルエンザウイルス感染を予防するまたはそれから対象を防御するのに効果的である。一部の実施形態では、本発明の組成物は、季節性および／もしくはパンデミックインフルエンザワクチンの成分としてまたは持続性（マルチシーズン）の防御を提供するように意図されたインフルエンザワクチン接種レジメンの一部として使用される。一部の実施形態では、本発明の組成物は、インフルエンザ感染の症状を処置するために使用される。

20

【0180】

一部の実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は家畜またはペット（例えば、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、および／またはブタ）である。一部の実施形態では、対象は非ヒト霊長類である。一部の実施形態では、対象はトリ（例えば、ニワトリ）である。

30

【0181】

一部の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は成人、青年、または乳幼児である。一部の実施形態では、ヒト対象は生後6カ月よりも若い。一部の実施形態では、ヒト対象は、生後6カ月もしくはそれよりも年上、生後6カ月から35カ月、生後36カ月から8歳、または9歳もしくはそれよりも年上である。一部の実施形態では、ヒト対象は、60歳もしくはそれよりも高齢、または65歳もしくはそれよりも高齢のような年配の55歳またはそれよりも高齢である。子宮内での組成物の投与および／または処置方法の実行も本明細書により意図されている。

【0182】

本明細書で別段定義されなければ、本明細書に関連して使用される科学用語および専門用語は、当業者により一般に理解されている意味と同じ意味を有するものとする。例示的な方法および材料が下に記載されているが、本明細書に記載される方法および材料に類似するまたは等価である方法および材料も本発明の実行または試験で使用する事が可能である。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。一般に、本明細書に記載される、細胞および組織培養、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、医薬品および製薬化学、ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、およびそれらの技法は、当技術分野で周知であり一般に使用されるものである。酵素反応および精製技法は、当技術分野で一般に成し遂げられる通りにまたは本明細書に記載される通りに、製造業者の仕様書に従って実施される。さらに、文脈によって別段要求されなければ、単数形の用語は複数形を含む

40

50

ものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。本明細書および実施形態全体を通じて、単語「有する (have)」および「含む (comprise)」または「有する (has)」、「有する (having)」、「含む (comprises)」、もしくは「含む (comprising)」のような変形は、明言された整数または整数の群を含むことを意味するが、他のいかなる整数または整数の群も排除することを意味しないと理解される。本明細書で言及されるすべての刊行物および他の参考文献は参照によってその全体を組み入れる。いくつかの文書が本明細書で引用されているが、この引用は、これらの文書のいずれかが当技術分野の普遍的かつ一般的な知識の一部を形成することを認めたことにはならない。本明細書で使用される場合、目的の1つまたはそれ以上の値に適用される用語「おおよそ (approximately)」または「約 (about)」とは、言明される参照値に類似している値のことである。ある特定の実施形態では、この用語は、別段言明されなければまたは文脈から別段明白でなければ、言明された参照値のいずれかの方向（大きいほうまたは小さいほう）に10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれよりも少ない値内に収まる一定範囲の値のことである。

10

【0183】

V. ベクター

一態様では、本明細書で開示されるmRNA組成物を含むベクターが本明細書で開示される。目的のタンパク質をコードするRNA配列（例えば、インフルエンザタンパク質をコードするmRNA）はいくつかのタイプのベクター中にクローニングすることができる。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス、およびコスミドを含むがこれらに限定されないベクター中にクローニングすることができる。特定の目的のベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ生成ベクター、シーケンシングベクター、およびインビトロ転写用に最適化されたベクターを含むことができる。

20

【0184】

ある特定の実施形態では、ベクターを使用して宿主細胞においてmRNAを発現することができる。種々の実施形態では、ベクターはIVT用の鋳型として使用できる。治療的使用に適している最適に翻訳されたIVT mRNAの構築は、Sahinら（2014）. Nat. Rev. Drug Discov. 13、759～780頁；Weissman（2015）. Expert Rev. Vaccines 14、265～281頁に詳細に開示されている。

30

【0185】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるベクターは、少なくとも以下のもの、5'から3'に向けて：RNAポリメラーゼプロモーター、5' UTRをコードするポリヌクレオチド配列；ORFをコードするポリヌクレオチド配列；3' UTRをコードするポリヌクレオチド配列；および少なくとも1つのRNAアプタマーをコードするポリヌクレオチド配列を含むことができる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるベクターは、ポリ(A)配列および／またはポリアデニル化シグナルをコードするポリヌクレオチド配列を含んでよい。

【0186】

様々なRNAポリメラーゼプロモーターが知られている。一部の実施形態では、プロモーターはT7 RNAポリメラーゼプロモーターであることが可能である。他の有用なプロモーターは、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含むことができるがこれらに限定されない。T7、T3、およびSP6プロモーターについてのコンセンサスヌクレオチド配列は公知である。

40

【0187】

本明細書で開示されたベクターまたはRNA組成物を含む宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）も本明細書で開示される。

【0188】

ポリヌクレオチドは、いくつかの異なる方法のいずれか、例えば、電気穿孔（Amax

50

a Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) または the Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg, Germany)、リポフェクションを使用するカチオン性リポソーム媒介トランスフェクション、ポリマーカプセル化、ペプチド媒介トランスフェクション、「遺伝子銃」などのバイオリスティック粒子送達システム (例えば、Nishikawa ら (2001). Hum Gene Ther. 12 (8): 861~70 頁参照)、または the TransIT-RNA トランスフェクションキット (Mirus, Madison, WI) を含むがこれらに限定されない市販の方法を使用して標的細胞中に導入することができる。

10

【0189】

ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入するための化学的手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系ならびに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質系のシステムを含む。in vitro および in vivo で送達媒体として使用するための例示的コロイド系はリポソーム (例えば、人工膜小胞) である。

【0190】

宿主細胞中に外来性核酸を導入する、または代わりに細胞を本開示の阻害剤に曝露するのに使用される方法とは無関係に、宿主細胞中の mRNA 配列の存在を確認するため、様々なアッセイを実施しうる。

20

【0191】

VI. 自己複製 RNA およびトランス複製 RNA

自己複製 RNA

一態様では、インフルエンザタンパク質をコードする自己複製 RNA が本明細書で開示される。

【0192】

自己複製 RNA は、例えば、アルファウイルス由来の複製エレメントを使用し、構造ウイスタンパク質を目的のタンパク質 (例えば、インフルエンザタンパク質) をコードするヌクレオチド配列で置き換えることにより製造することができる。自己複製 RNA は、典型的には、細胞への送達後すぐに翻訳することができるプラス鎖分子であり、この翻訳は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを提供し、このポリメラーゼはその後送達された RNA からアンチセンス転写物とセンス転写物の両方を産生する。したがって、送達された RNA は複数の娘 RNA を産生する。これらの娘 RNA、ならびにコリニアサブゲノム転写物は、それ自体が翻訳されてコードされた抗原 (すなわち、インフルエンザタンパク質抗原) の in situ 発現をもたらす場合もあれば、転写されて、翻訳されて抗原の in situ 発現をもたらす送達される RNA と同じセンスを有するさらなる転写物をもたらす場合もある。転写のこの順序の全体としての結果は、導入されたレプリコン RNA の数の大きな増幅であり、したがって、コードされた抗原は細胞の主要なポリペプチド産物になる。

30

40

【0193】

このようにして自己複製を達成するための 1 つの適切なシステムは、アルファウイルスベースのレプリコンを使用することである。これらのレプリコンは、細胞への送達後にレプリカーゼ (またはレプリカーゼ-転写酵素) の翻訳をもたらすプラス鎖 (プラスセンス鎖) RNA である。レプリカーゼは、自己切断してプラス鎖送達 RNA のゲノム鎖コピーを作り出す複製複合体を提供するポリタンパク質として翻訳される。これらのマイナス (-) 鎖転写物はそれ自体が転写されてプラス鎖親 RNA のさらなるコピーを与え、抗原をコードするサブゲノム転写物も与える。したがって、サブゲノム転写物の翻訳により感染した細胞による抗原の in situ 発現をもたらされる。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズ

50

エラウマ脳炎ウイルス、等を使用することができる。突然変異または野生型ウイルス配列を使用することができ、例えば、VEEVの減弱TC83突然変異体はレプリコンで使用されてきた。以下の参考文献：WO2005/113782を参照されたい。前記文献は参照により本明細書に組み入れる。

【0194】

一実施形態では、本明細書に記載されるそれぞれの自己複製RNAは、(i) 自己複製RNA分子からRNAを転写できるRNA依存性RNAポリメラーゼおよび(ii) インフルエンザタンパク質抗原をコードする。ポリメラーゼは、例えば、アルファウイルスタンパク質nsP1、nsP2、nsP3、およびnsP4のうちの1つまたは複数を含むアルファウイルスレプリカーゼであることが可能である。天然のアルファウイルスゲノムは非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えて構造ビリオンタンパク質をコードするが、ある特定の実施形態では、自己複製RNA分子はアルファウイルス構造タンパク質をコードしない。したがって、自己複製RNAは、細胞中で自己のゲノムRNAコピーを産生することができるが、RNA含有ビリオンを産生することはできない。これらのビリオンを産生できないことは、野生型アルファウイルスとは違って、自己複製RNA分子は感染性の形態では永続できないことを意味する。サブゲノム転写物が構造アルファウイルスビリオンタンパク質よりもむしろ免疫原をコードするように、野生型ウイルスの永続化に必要であるアルファウイルス構造タンパク質は、本開示の自己複製RNAには不在であり、その場所は目的の免疫原をコードする遺伝子(複数可)により占められている。自己複製RNAはWO2011005799にさらに詳細に記載されており、前記文献は参照により本明細書に組み入れる。

10

20

【0195】

トランス複製RNA

一態様では、インフルエンザタンパク質をコードするトランス複製RNAが本明細書で開示される。

【0196】

トランス複製RNAは、上記の自己複製RNAと類似するエレメントを有する。しかし、トランス複製RNAの場合、2つの別々のRNA分子が使用される。第1のRNA分子は上記のRNAレプリカーゼ(例えば、アルファウイルスレプリカーゼ)をコードし、第2のRNA分子は目的のタンパク質(例えば、インフルエンザタンパク質抗原)をコードする。RNAレプリカーゼは、第1と第2のRNA分子のうちの1つまたは両方を複製し、それによって目的のタンパク質をコードするRNA分子のコピー数を大幅に増加させる。トランス複製RNAは、WO2017162265にさらに詳細に記載されており、前記文献は参照により本明細書に組み入れる。

30

【0197】

VII. 医薬組成物

本開示に従って精製されたRNA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ることが可能である。これらの組成物は、典型的には、RNAおよ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、小分子免疫賦活剤(例えば、TLRアゴニスト)などの1つまたは複数の追加の成分も含むことができる。本開示の医薬組成物は、リポソーム、水中油乳剤、またはマイクロ粒子などのRNA用の送達系も含むことができる。一部の実施形態では、医薬組成物は、脂質ナノ粒子(LNP)を含む。ある特定の実施形態では、組成物は、LNP内にカプセル化された抗原コード核酸分子を含む。

40

【0198】

VIII. ワクチン接種の方法

本明細書で開示されるインフルエンザワクチンは、1つまたは複数のインフルエンザタンパク質に向けられた免疫応答を誘導するために対象に投与されてよく、対象における抗原抗体力価は、本明細書で開示されるインフルエンザワクチンでワクチン接種されていない対象における抗抗原抗体力価と比べて、またはインフルエンザに対する別のワクチン

50

と比べて、ワクチン接種に続いて増加する。「抗抗原抗体」は、抗原に特異的に結合する血清抗体である。

【0199】

一態様では、本開示は、インフルエンザに対して免疫応答を誘発するまたはインフルエンザ感染から対象を防御する方法であって、対象に本明細書に記載されるインフルエンザワクチンを投与することを含む方法を提供する。本開示は、インフルエンザに対して免疫応答を誘発するのにまたはインフルエンザ感染から対象を防御するのに使用するための本明細書に記載されるインフルエンザワクチンも提供する。本開示は、インフルエンザに対して免疫応答を誘発するためのまたはインフルエンザ感染から対象を防御するためのワクチンの製造において使用するための本明細書に記載されるインフルエンザmRNAも提供する。

10

【0200】

本発明がもっとよく理解されるように、以下の実施例が示される。これらの実施例は、説明のみを目的とし、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1】

【0201】

LNP製剤の最適化

本実施例は、mRNAワクチン用の一連のLNP製剤を、種々の成分のコンビナトリアルライブラリーから製造した研究を記載する。合理的に設計された新規のカチオン性脂質を合成した。全部で、150を超える脂質および430を超える製剤を試験した。ヒトエリスロポエチン(hEPO)mRNAをテストmRNAとして使用した。下に記載される主要製剤では、mRNAは、カチオン性脂質と、ヘルパー脂質；コレステロール系脂質；およびペグ化脂質の3種の他の脂質との組合せを、種々の順列の組合せで使用してLNPに製剤化される。

20

【0202】

LNP製剤は、イオン化可能脂質、ヘルパー脂質DOPE、コレステロール、およびペグ化脂質DMG-PEG-2Kの4種の脂質成分からなる。ペグ化脂質モル分率は1.5%で一定に保たれ、イオン化可能脂質および異なるヘルパー脂質およびそのモル比は、hEPOスクリーニング研究に基づいて最適化比を確認するために評価された。

【0203】

クエン酸バッファー(1mMのクエン酸、150mMのNaCl、pH4.5)は、LNP製剤の製造に使用された。クエン酸バッファーに添加されたmRNA溶液は、製剤方法中エタノール溶液中の脂質と混合された。バッファーのpHおよび濃度は、LNP製剤中への高率でのmRNAカプセル化を達成するように選択された。

30

【0204】

LNP製剤方法は、ポンプ方式を使用して「T」ミキサーにおいて脂質エタノール溶液とmRNAクエン酸溶液を混合することを含んでいた。次に、得られた溶液は、TFF／透析チューブを使用するバッファー交換を受けた。10%(w/v)トレハロース中の最終製剤の濃度は、投与要求に基づいて調整された。

【0205】

hEPOタンパク質のマウスin vivo発現は、in vivoでmRNAを送達するLNPの効力を測定する代替物として使用された。本研究では、成分の種々の組合せ由来のLNP中において製剤化されたhEPO mRNAの単回用量(0.1μg)はマウスの筋肉内(IM)に注射された。投与後6時間目および24時間目に収集された血清は、ELISAを使用してhEPOレベルについて検査した。業界ベンチマークであるMC3製剤を、hEPO発現の増加倍率の計算のための参照として使用した(Angew, Chem Int Ed. (2012) 51: 8529~33頁)。

40

【0206】

それぞれのLNP製剤について見られるhEPO発現のレベルは、細胞中にmRNAを送達する製剤の能力を示していた。最初の製剤は、2-ジオレオイル-sn-グリセロー

50

3-ホスホエタノールアミン（DOPE；ヘルパー脂質）、DMG-PEG2000、およびコレステロールを、カチオン性脂質：DMG-PEG2000：コレステロール：DOPEの40：1.5：28.5：30のモル比で含んでいた。これらの製剤は、MC3製剤と比べてロバストな効力を有することが見出された。

【0207】

さらに製剤が試験された。最適化された製剤脂質A LNPおよび脂質B LNPは表1に示されている。これらの製剤中のmRNAは修飾することができるまたは非修飾でも可能であり、インフルエンザ由来の抗原をコードしうる。

【0208】

【表1】

10

表 1. 例示的 LNP 製剤の組成

成分		機能	記述
mRNA		活性物質	mRNA 構築物
脂質ナノ粒子(LNP)	カチオン性脂質 OF-02 (A)または cKK-E10 (B)	送達	イオン化脂質、mRNA カプセル封入を促進する
	DOPE		双極イオン性脂質、薬物ペイロードの取込みおよび放出を増強する
	コレステロール		脂質二重層に安定性を与える
	DMG-PEG-2K		脂質二重層に制御および安定性を与える
トレハロース		賦形剤	抗凍結剤
注射用水(WFI)		希釈液	N/A

20

表1では、ヒトワクチン用の最終投与は、意図された単回ヒト用量に基づいてリン酸緩衝食塩水（PBS）中の上記最終バルク製品の希釈になると考えられる。WFI量は、名目上の最終製剤に基づいて計算される。製剤中のトレハロース含量は、10%（100mg/mL）トレハロース二水和物に相当し、無水トレハロースとトレハロース二水和物の分子量値の比を使用して無水成分に換算される。

30

【0209】

2種の最適化製剤、脂質Aおよび脂質B LNP製剤中の脂質成分のモル比は表2に示されている（CL：カチオン性脂質）。

【0210】

【表2】

表 2. 例示的 LNP 中の脂質成分のモル比

CL	LNP コード	CL のモル比: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE
OF-02	脂質 A	40: 1.5: 28.5: 30
cKK-E10	脂質 B	40: 1.5: 28.5: 30

40

【0211】

表3および図1Aに示されるように、MC3と比べた脂質Aおよび脂質BでのhEPO発現の増加倍率は、mRNAの送達ではMC3よりもこれらのLNPのほうが優れていることを示している。下の表では、「P2」はPEG2000を意味し；「Times MC3」はMC3に対する増加の倍率を意味し；「Std Dev」は標準偏差を意味する。

【0212】

50

【表 3 - 1】

表 3.マウスにおける hEPO mRNA の in vivo 送達

研究 番号	カチオン 性脂質	製剤組成	Times MC3	Std Dev
1	OF-02 (P2 低 DOPE)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:3:27:30	1.74	0.97
	OF-02 (P2 w/ DSPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DSPC 50:1.5:38.5:10	0.18	0.17
2	OF-02	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	5.04	1.79
3	OF-02 (高 DOPE)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:13.5:45	7.35	3.90
4	OF-02	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	16.19	7.86
5	OF-02	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	12.13	6.56
6	cKK-E10	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	5.41	3.46
7	cKK-E10 (DEPE)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DEPE 40:1.5:28.5:30	5.77	2.09
8	OF-02 (177 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	6.59	2.50
	OF-02 (161 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	4.94	1.75
	OF-02 (153 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	7.40	3.54
	OF-02 (133 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	7.15	3.86
	OF-02 (115 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	5.91	2.79
	OF-02 (118 nm)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	10.54	4.38
9	OF-02 (DSPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DSPC 40:5:25:30	0.00	0.00
	OF-02 (DSPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DSPC 40:3.5:26.5:30	0.00	0.00
	OF-02 (DSPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DSPC 40:2:28:30	0.00	0.00
	OF-02 (DSPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DSPC 40:2:53:5	0.99	0.70

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

研究 番号	カチオン 性脂質	製剤組成	Times MC3	Std Dev
10	OF-02 (DOPS)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPS 40:1.5:28.5:30	3.26	1.97
	OF-02 (DEPE)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DEPE 40:1.5:28.5:30	11.83	6.89
	OF-02 (DOPC)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPC 40:1.5:28.5:30	3.32	1.20
	OF-02	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	7.14	3.37
11	cKK-E10	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	5.58	2.01
	OF-02 (PD lot)	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	8.81	3.22
	cKK-E10	カチオン性脂質: DMG-PEG2000: コレステロール: DOPE 40:1.5:28.5:30	5.16	3.25

【0213】

図1Bは、LNP 脂質Aおよび脂質Bを使用してのマウスおよび非ヒト霊長類（NHP）でのhEPO発現を示す。脂質Aまたは脂質Bを用いて製剤化されたhEPO mRNAの単回用量（マウスでは0.1 μg、NHPでは10 μg）を筋肉内に注射した。血清hEPOレベルは、ELISAを使用して投与後6、24、48、および72時間目に定量化した。データは、マウスおよびNHPにおいて4日間を超えてもin vivoでの長期のhEPOタンパク質発現を示す。

【0214】

最適化中に特定された重要なプロセスパラメータの1つは、最初の混合工程中の流量である。異なる最終LNPサイズ（108～177 nmの幅がある）を有する製剤は、混合中これらの流量を変化させることにより製造し、方法および製品属性に対する追加の制御を可能にする。流量が大きくなるにしたがって、粒子サイズはそれだけ小さくなる。流量が375 ml／分に達し、平均LNPサイズ108 nMを作製すると、効力が著しく増加した。LNPの効力に対するサイズの影響は、表4のMC3に対するhEPO発現の増加倍率の尺度として注目した。

【0215】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. LNP サイズ最適化

製剤 Lot 番号	全流速 (ml/min)	サイズ (nm)	PDI	カプセル化 (%)	カチオン性 脂質	Times MC3
1	250	108	0.077	99	MC3	1.00
2	62.5	177	0.086	94	OF-02	6.59
3	75	161	0.075	95	OF-02	4.94
2-88	87.5	152	0.116	97	OF-02	7.40
2-89	125	133	0.089	97	OF-02	7.15
2-90	250	115	0.076	98	OF-02	5.91
2-91	375	108	0.042	98	OF-02	10.54

*PDI: 多分散指数

【0216】

上記スクリーニングデータは、ヘルパー脂質 D O P E がタンパク質発現を促進するのに効果的であったことを示す。データは、4 種の脂質の有望なモル組成の決定（O F - 0 2 または c K K - E 1 0 : D M G - P E G - 2 K : コレステロール : D O P E = 4 0 : 1 . 5 : 2 8 . 5 : 3 0）ももたらした。10%トレハロース中の L N P 製剤は、粒子サイズ、P D I、m R N A カプセル化、および m R N A 完全性を含むすべてのパラメータについて特徴付けられた。試験されたバッチすべてが、所望の特徴および凍結／解凍サイクルの安定性を示した。10%（w／v）トレハロース中、−80℃での製剤の長期安定性を評価した。脂質 A および脂質 B 製剤は高度に安定していることが明らかにされた。

【実施例 2】

【0217】

インフルエンザ H I N 1 L N P ワクチン製剤

新規のインフルエンザウイルスがヒト集団中に現れるとインフルエンザパンデミックが起こることがある。そのようなパンデミックは公衆衛生にとって依然として大きな脅威であり、油断のない注意およびウイルスのヒトからヒトへの長引く感染の場合に使用される防御手段を備えた準備が必要である。本実施例に記載される実験では、2009 年のインフルエンザパンデミックの原因であった、高度に病原性の H I N 1 株 A / C a l i f o r n i a / 7 / 2 0 0 9 (C A 0 9) 由来のヘマグルチニン (H A) をプロトタイプの抗原として使用して、脂質 A および脂質 B の L N P 製剤で製造した m R N A ワクチンの効力を評価した。

【0218】

H A m R N A は上記の通りに製造された。クエン酸バッファー（クエン酸 1 m M、N a C l 1 5 0 m M、p H 4 . 5）を L N P 組成物の製造に使用した。m R N A を含有するクエン酸バッファーは、製剤過程中エタノール溶液中脂質と混合された。バッファーの p H および濃度は、L N P 製剤中の m R N A の高いカプセル化率を達成するように選択した。2 種の溶液（クエン酸バッファー中の m R N A およびエタノール溶液中の脂質）はポンプシステムを使用して「T」ミキサーにおいて混合して、均質なパルスレスフローを得て、脂質と m R N A は方法全体を通じて一定比率で混合した。これは、所望のサイズおよび、より均質なサイズ分布の指標である低 P D I を有する均質な製剤を達成するのに極めて重要であった。この方法は高い m R N A カプセル化をもたらし、この高いカプセル化は高い効力を達成するためには極めて重要である。次に、こうして得られた溶液は、T F F / 透析チューブを使用するバッファー交換を受けた。

【0219】

マウス研究では、脂質 A および脂質 B C A 0 9 H A 製剤の効能は、M C 3 L N P 製剤ならびに組換え H A (r H A) の突き合わせ比較で評価した。異なるカチオン性脂質

を用いて製剤化されたCA09 (H1) HA mRNA (0.4 µg) を、0日目 (D0) および28日目 (D28) にBalb/Cマウス (n=8) の筋肉内に注射した。ワクチンの免疫原性は、HA阻害 (HAI) 力価により示されるが、図2Aに示されている。データは、0日目 (D0) および28日目 (D28) の脂質Aまたは脂質Bの2種の免疫化が高いHAI力価を誘発し、相同なウイルスチャレンジ (Belgium09 H1N1ウイルス) からの動物の完全な防御を可能にしたことを示す (図2B)。14日間のチャレンジ後観察の間、病的状態の明白な徴候 (体重減少) は脂質Aおよび脂質B処置群内では観察されず、組換えタンパク質対照群内の少数の動物が病的状態を示した (図2B)。

【0220】

同様に、Mich15インフルエンザ株 (Mich15 N1) 由来のノイラミニダーゼ (NA) をコードするmRNAは、脂質Aを用いて製剤化し、その効果を評価した。脂質Aを用いて製剤化したNA mRNAの2つの用量 (0.4または0.016 µg) をBalb/cマウス (n=8) の筋肉内に注射した。対照群 (n=8) には、hEPO mRNA 0.6 µgまたは希釈液を注射した。マウスの半数が研究0日目に1回の注射 (1用量) のみを受け、その他の半数は研究0日目および28日目に与えた2回の注射 (2用量) を受けた。データは、NA阻害 (NAI) 力価により示されるように、このN1脂質A製剤がロバストな免疫応答を誘発したことを示す (図3A)。データは、1用量または2用量のワクチンで処置されたマウスは、Belgium09 H1N1による致死性のウイルスチャレンジから防御されたことをさらに示す (図3B)。防御のレベルは、ワクチン処置群対負の対照群 (hEPOおよび希釈液) のNAI力価と相関していた。

【0221】

本LNPを用いて製剤化されたCA09 H1 mRNAもNHPモデルで試験された。mRNA (10 µg) は、脂質Aおよび脂質Bを用いて製剤化され、研究0日目および28日目にカニクイマカクザル (n=6) の筋肉内に注射された。すべてのLNPについて14日までの検出可能なHAIプライミングおよび28日までのHAI力価の有意なブーストが観察された (図4、右パネル)。ELISAデータも、試験されたすべての用量について14日目までにベースラインより上の有意なプライミングを示し、ロバストなブーストがブーストの2週間後に検出された (図4、左パネル)。結果により、HAIおよびエンドポイントELISA力価により示されるように、本H1 mRNA製剤がロバストな免疫応答を生じたことが示される。

【実施例3】

【0222】

インフルエンザH3N2 LNPワクチン製剤

本実施例は、インフルエンザ株Sing16 (H3N2) に対するmRNA-LNPワクチン製剤が効果について評価される実験を説明している。これらの実験で使用されるmRNAの1つはMRT1400である。MRT1400は、in vitro転写により製造される生合成コドン最適化HA-H3 (インフルエンザウイルスヘマグルチニン、H3サブタイプ) メッセンジャーRNA (CO-HA-H3 mRNA) である。

【0223】

インフルエンザウイルスヘマグルチニン、H3サブタイプのタンパク質配列は下に示されている。

MKTIIALSYI LCLVFAQKIP GNDNSTATLC LGHHAVP
NGT IVKTTITNDRI EVTNATELVQ NSSIGEICDS PHQ
ILDGENC TLIDALLGDP QCDGFQNKKW DLFVERSKAY
SNCYPYDVPD YASLRSLVAS SGTLEFKNES FNWTGVT
QNG TSSACIRGSS SSFFSRLNWL THLNYTYPAL NVT
MPNKEQF DKLYIWGVHH PGTDKDQIFL YAQSSGRITV
STKRSQQAVI PNIGSRPRIR DIPSRISIW TIVKPGD
ILL INSTGNLIAP RGYFKIRSGK SSIMRSDAPI GK C

K S E C I T P N G S I P N D K P F Q N V N R I T Y G A C P R Y V K H S T L
K L A T G M R N V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y
G F R H Q N S E G R G Q A A D L K S T Q A A I D Q I N G K L N R L I G K
T N E K F H Q I E K E F S E V E G R V Q D L E K Y V E D T K I D L W S Y N
A E L L V A L E N Q H T I D L T D S E M N K L F E K T K K Q L R E N A E D
M G N G C F K I Y H K C D N A C I E S I R N E T Y D H N V Y R D E A L N
N R F Q I K G V E L K S G Y K D W I L W I S F A I S C F L L C V A L L G F
I M W A C Q K G N I R C N I C I * (配列番号 1)

【0224】

このタンパク質のコード配列はコドン最適化されていた。タンパク質をコードするコドン最適化配列は図5A（配列番号2）に示されており、野生型配列は配列番号3として示されている。mRNA構造および配列は、それぞれ図5Bおよび5Cに示されている。図に示されるように、HA-H3 mRNAコード配列は、それぞれ140および100ヌクレオチドの5'および3'非翻訳領域（UTR）が隣接している。生合成HA-H3 mRNAは、反転5'-5'三リン酸架橋を介して5'UTRの第1のヌクレオシドに連結されている7-メチルグアノシン（m⁷G）残基からなる5'キャップ構造も含有し、この第1のヌクレオシドはそれ自体が2'-O-リボースメチル化により修飾されている。5'キャップは、リボソームによる翻訳の開始に不可欠である。全直鎖状構造は、3'末端でおよそ100~500アデノシンヌクレオシドのトラクト（ポリA）により終結する。ポリA領域はmRNAに安定性を与え、翻訳を増強するとも考えられている。これらの構造要素のすべてが、HA-H3 mRNAの効率的な翻訳を促進するのに使用される天然に存在する成分である。

【0225】

*in vitro*転写によりコドン最適化mRNA配列を産生するためのDNAプラスミドを構築した。*in vitro*転写（IVT）反応は、RNAポリメラーゼを使用して実行した。反応混合物を沈殿させた。沈殿RNA試料を個々の深層濾過カセット上に負荷し、80%エタノールで洗浄し、再循環H₂Oで再溶解させた。第2のアリコートのH₂Oを第1の工程に類似する方法で送り出した。この工程はもう1度繰り返された。プールされた溶出液は、50kD中空ファイバーTFFカセットを使用して限外濾過／ダイアフィルトレーションを受けた。次に、それぞれのIVT TFFプールはキャップおよびテール反応に備えて希釈された。キャップ-テール反応は沈殿させ、反応由来のRNAは、上記の通りに精製し収集した。濾過されたmRNAは使用まで-20℃で貯蔵した。

【0226】

これらの実験では、Sing16 NA（N2）またはSing16 HA（H3；MRT1400 mRNA）抗原をコードするmRNAは、脂質Aまたは脂質Bを用いて製剤化され、0日目および28日目に用量当たりmRNA 0.4 μgでBalb/cマウス（n=8）の筋肉内に注射した。比較のため、組換えSing16 H3またはSing16 N2タンパク質1 μgを水中油型乳剤アジュバント（AF03）と一緒にBalb/cマウス（n=8）中に筋肉内経路により注射した。免疫応答はNAIおよびHAIAッセイにより測定した。

【0227】

データは、NA（N2）mRNAで免疫された動物が14日目までに検出可能なNAIプライミングを、28日目までにNAI力価の有意なブーストを実証したことを示す（図6、右パネル）。データは、HA Sing16脂質Aおよび脂質B製剤が28日目のブースト後に口バストなHA I応答を誘発したことも示す（図6、左パネル）。

【0228】

同様に、Sing16 HA mRNA脂質Aおよび脂質Bワクチンは、非ヒト霊長類（NHP）のカニクイマカクザル（n=6）において評価された。脂質Aまたは脂質Bを用いて製剤化されたHA Sing16 mRNA（50 μg）は、筋肉内経路によりサルに注射された。第1の注射は研究日0に与えられ、第2の注射は研究日28に与えられ

た。データは、ワクチンが28日目にブーストされたロバストな免疫機能的応答を誘発したことを示す(図7A)。

【0229】

さらに、脂質Aを用いて製剤化されたHA Sing16 mRNA(すなわち、MRT5400ワクチン)の4つの用量レベル、15、45、135および250 μ gをNHPで評価した。第1の免疫化は研究日0に、第2の免疫化は研究日28に与えられた。すべてのNHPは、試験したすべての用量についてIgG結合およびHAI力価を示し、42日目の第2の注射後2週間目に試験した種々の用量の間で免疫応答に差はなかった(図7Bおよび7C)。

【0230】

Sing16 HA mRNA脂質Aワクチンは、第2のワクチン接種後NHPにおいてT細胞応答についても評価した。末梢血単核球(PBMC)は42日目に収集し、Sing16 H3組換えタンパク質または全HAオープンリーディングフレームを表すペプチドプールと一緒に一晚インキュベートした。再刺激により誘導されたサイトカインはELISPOTアッセイで評価した。IFN- γ 、Th1サイトカイン(図8A)、またはIL-13、Th2サイトカイン(図8B)を分泌するPBMCの出現頻度は、PBMC100万個当たりのスポット形成細胞(SFC)として計算した。試験した3つの用量レベル群(250 μ g、135 μ g、および45 μ g)の動物の大部分が、高出現頻度のIFN- γ 分泌細胞の存在を示し、PBMC100万個当たり100SFCを超えていた(図8A)。低い用量レベル群と高い用量レベル群の動物はIFN- γ 分泌細胞の匹敵する出現頻度を示したので、用量応答は観察されなかった。これとは対照的に、IL-13サイトカイン分泌細胞の存在は、試験した群のいずれにおいても、いずれの用量レベルでも検出されなかった(図8B)。これらのデータは、NHPにおいてワクチン接種に続くHA抗原に対するTh1偏向細胞応答およびTh2応答の欠如という明白な証拠を提示した。

【実施例4】

【0231】

修飾されたmRNAを有するインフルエンザLNPワクチン製剤

本実施例は、非修飾(非修飾非複製または「UNR」と修飾(修飾非複製または「MNR」)mRNAを含有するワクチンの効力を比較する実験を説明している。UNR CA09 HA mRNAおよびMNR CA09 HA mRNAを、*in vitro*転写により製造した。MNRでは、すべてのウリジンがプソイドウリジンで置き換えられた。

【0232】

脂質Aを用いて製剤化したCA09 HA mRNA(修飾されたまたは非修飾の)の5つの異なる用量(0.016、0.08、0.4、2、および10 μ g)を筋肉内経路によりBalb/cマウス(n=15)中に注射した。データは、LNP製剤が裸のmRNA(UNR)の安定性および送達効率を増加したことを示す。これは、HAI力価により示した場合、UNRおよびMNR mRNAの間の効力は匹敵していたからであった(図9A)。Balb/cマウスについてのELISAデータは、試験したすべての用量について14日目までに基準線よりも有意なプライミングも示しており(UNRとMNR mRNAの両方)、ブーストの2週間後にロバストなブーストが検出された。データは、UNRとMNR mRNAがELISA力価を誘発するのに匹敵していたことも示す(図9B)。

【0233】

結論として、本用量滴定研究は、脂質Aを用いて製剤化された非修飾および修飾されたCA09 HA mRNAが、HAIによりまたはエンドポイントELISAアッセイにより示される通り、Balb/cマウスにおいて統計的に区別がつかない免疫応答を誘発したことを実証した。4つのもっと高い用量のUNRおよびMNR mRNAで免疫されたBalb/cマウスは、すべての用量について、14日目までに検出可能なHAIプラ

10

20

30

40

50

イミングを、42日目までにHAI力価の有意なブーストを示す。これらの14日目プライミング力価は、125倍の範囲を超える検出可能な力価を生み出す用量効果と用量節約可能性の両方を表す。同じ用量範囲での第2の注射力価により、このmRNA-LNP製剤に対する免疫応答のロバストさが確認される。類似の結果が非ヒト霊長類でも観察された。

【実施例5】

【0234】

多価インフルエンザワクチンLNP製剤

本実施例は、CA09 HAをコードするmRNA（実施例2に記載される）およびSing16 HAをコードするmRNA（実施例3に記載される）を含有する脂質AベースのLNPワクチンを使用する研究を説明する。

【0235】

より具体的には、脂質Aに共カプセル化されたCA09 HA mRNAおよびSing16 HA mRNAをBalb/cマウス（n=8）において評価した。mRNA-LNPは共カプセル化された2つのmRNAとして投与したまたは単一にカプセル化されたmRNAとして別々に投与した。両方のアプローチでは、全部でLNP製剤0.4μgを筋肉内注射によりマウスに注射した。第1の注射は研究日0に与えられ、第2の注射は研究日28に与えられた。データは、ワクチンがロバストな免疫機能的応答を誘発したことを示す。2つの投与アプローチ間にはいかなる差もないように思われた。これらのデータは、共カプセル化が2つのmRNA間に妨害も干渉も引き起こさなかったことを示す。

【実施例6】

【0236】

多価インフルエンザワクチンLNP製剤に関するさらなる研究

CA09 HA、Sing16 HA、Sing16 NA、Mich15 NA、A/Pertth/16/2009インフルエンザウイルス（Pertth09 NA）ならびにホタルルシフェラーゼ（FF）およびhEPOのレポーター抗原をコードする非修飾mRNAのパネルを準備した。次に、HAおよびNA mRNA-LNP調合剤用のLNP製剤を、in vitroでの発現、動物における免疫応答について、および臨床前モデルでの効力について試験した。本実施例での研究では、LNP製剤はすべて脂質A製剤であった。

【0237】

材料および方法

mRNA-LNP調合剤

hEPO、FF、CA09 HA、Sing16 HA、Mich15 NA、およびSing16 NAをコードするmRNA転写物は、非修飾ヌクレオチドを使用して所望の遺伝子をコードするプラスミドDNA鋳型と一緒にRNAポリメラーゼを用いてin vitro転写により合成した。こうして得られた精製mRNA前駆体を、5'キャップ構造（キャップ1）ならびにゲル電気泳動により決定し精製したおおよそ200ヌクレオチド長の3'ポリ（A）テールの酵素的付加によりさらに反応させた。すべてのmRNA調合剤は、-20℃での貯蔵前に、純度、完全性、およびキャップ1のパーセンテージについて分析した。mRNA/脂質ナノ粒子（LNP）製剤の製造は上に記載された。手短に言えば、固定された脂質とmRNA比の脂質の混合物（イオン化可能脂質、ホスファチジルエタノールアミン、コレステロールおよびポリエチレングリコール-脂質）のエタノール溶液を、制御条件下、酸性pHで標的mRNAの水性緩衝溶液と組み合わせ、均一なLNPの懸濁液を得た。適切な希釈剤系に限界濾過しダイアフィルトレーションして、得られたナノ粒子懸濁液を最終濃度まで希釈し、濾過し、使用まで-80℃で凍結保存した。mRNA-LNP製剤は、動的光散乱、パーセンテージカプセル化によりサイズについて特徴付け、適切なバッファーを用いた希釈によりさらなる使用まで1mg/mL、-80℃で保存した。hEPO-LNPおよびFF-LNPを利用して、in vivoでの標的タンパク質の発現のレベルを調べた。

【0238】

HeLa細胞で発現されるS-タンパク質の可視化

インフルエンザNAおよびHAタンパク質の免疫細胞化学-免疫蛍光分析を、以前記載された方法(Kalninら、npj Vaccines (2021) 6:61頁)を使用して二価H3N2(Sing16 HAおよびPerth09 NA)mRNA LNP)をトランスフェクトしたHeLa細胞において実施した。細胞は4%パラホルムアルデヒドに固定し、HA(GeneTex GTX40258)、NA、およびERマーカーCalnexin(Abcam ab22595)についての対象となる抗体染色を実施した。画像は共焦点顕微鏡上で撮り、続いてERへのHAおよびNA共局在の定量化、平均シグナル強度、および細胞面積のパーセントについて画像解析した。

10

【0239】

フローサイトメトリー

ヒト骨格筋細胞(HskMCs、Lonza)を、GlutaMAX(Life Technologies)、ストレプトマイシン、ペニシリン(Gibco)、および20%熱失活FBS(VWR)を補充したM199(Life Technologies)において37℃、5%CO₂で培養した。細胞はトリプシン処理により収穫し、PBSで洗浄し、製造業者の電気穿孔プログラムD-033に従って、10⁶細胞当たりmRNA 12mgを用いてNucleofector 2b(Lonza)上でヒト一次筋肉細胞トランスフェクションキットを使用して電気穿孔した。24時間後収穫細胞を固定し、Cytofix(商標)/Perm(BD)で透過処理し、CA09 HA(Immune Tech)、Sing16 HA(30-2F11-F7-A5、GeneTex)、Mich15 NA(6G6、Immune Tech)およびSing16 NA(40017-RP01、Sino Biologicals)特異的Abで、続いてPEコンジュゲートヤギ抗マウスIgG二次Ab(Southern Biotech)またはAF647コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(Life Technologies)で染色した。次に、抗体標識細胞をFortessa(BD)により獲得し、それぞれのタンパク質の発現はFlowJo(商標)(TreeStar)により分析した。

20

【0240】

低温透過型電子顕微鏡

PELCO easiGlow(商標)装置を使用して、LNP試料適用に先立ってグリッドをプラズマ洗浄し、チャンバーが100%湿度および18℃に保たれたVitrobot Mark IVシステム(ThermoFisher)をプランジ凍結用に使用した。LNP試料3.0μl液滴を、カーボンフィルムおよび金のバー付の300メッシュR2/1 QUANTIFOIL(登録商標)グリッド上に分注した。グリッドは4秒間ブロットし、現位置に10秒間保ち、次に貯蔵のために液体エタンに直ちにプランジ凍結し、Krios顕微鏡に移した。露光は、BioQuantumエネルギーフィルターおよび計数モードで作動するK3直接電子検出器(Gatan)を備えたTitan Krios透過型電子顕微鏡(ThermoFisher)を使用して収集した。検出器での校正された物理的画素サイズは1.38Åであり、64,000倍率に対応していた。合計3,141個の69フレームムービー露光は、デフォーカスが-0.5~-1.7μmで、フレーム当たりの用量1.045 e/Å²で収集された。それぞれのムービー露光について、パッチベースの動き補正、超解像度画素のビニング、およびフレーム重み付けを、RELION-3.1.34を使用して実施した。補正された画像から、700を超える候補粒子座標が抽出された。それに続くデータ解析は、画像加工ツールボックス付きのMATLAB R2019aを用いて行った。

30

40

【0241】

発現研究のためのマウスおよびNHPの免疫化

4頭のカニクイマカク(NHP)(オスとメス)および4~8匹のオスBALB/cマウスの群に、用量10μg(NHP)または1、0.5、0.1および0.05μg(マウス)のいずれかで、HA/NA mRNA-LNP製剤用に使

50

ていた比と同じ比で製造された h E P O - L N P と一緒に筋肉内に投与した。血液試料は、投与前、ならびに投与後 6 時間、24 時間、48 時間、72 時間、および 96 時間目に採取して、R および D システムを使用する E L I S A、Q u a n t i k i n e（登録商標）I V D（登録商標）E L I S A、ヒトエリスロポエチン免疫アッセイキットによって製造業者のプロトコル通りに血清 h E P O 発現についてモニターし、m I U / m l および n g / m l の最終値として報告した。手短に言えば、E P O に特異的なマウスモノクローナル抗体でプレコートしたマイクロプレートウェルを、標本または標準と一緒にインキュベートした。過剰な標本または標準を取り除いた後、ウェルは、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたウサギ抗 E P O ポリクローナル抗体とインキュベートした。第 2 のインキュベーション中、抗体酵素コンジュゲートは固定された E P O に結合した。過剰なコンジュゲートは洗浄により取り除いた。色素源をウェルに添加し、色素源は酵素反応により酸化されて、青色複合体を形成した。反応は酸を添加することにより停止させ、これにより青色は黄色に変わった。生み出された色の量は、E P O 抗体複合体に結合したコンジュゲートの量に正比例しており、E P O 抗体複合体は今度は標本または標準中の E P O の量に正比例していた。この複合体の吸光度を測定し、吸光度対 E P O 標準の濃度をプロットすることにより標準曲線を作成した。未知の標本の E P O 濃度は、標本の光学密度を標準曲線と比較することにより決定した。このアッセイで使用した標準は、第二の国際参照品（67 / 343）に対して較正された組換え h E P O、尿由来型のヒトエリスロポエチンであった。

10

20

【0242】

免疫原性研究のためのマウスおよび N H P の免疫化

処置群に従って B a l b / c マウス（ハツカネズミ（M u s m u s c u l u s））の群を、四頭筋において I M 経路により、0 日目は 1 つの後肢に、28 日目には反対側の肢に、イソフルラン麻酔下、用量 0.05 mL の指名されたワクチン製剤または希釈液で免疫した。その最初の体重の 20 % を超えて失い、重大な臨床徴候を示したマウスは、動物の健康の獣医評価後、研究終了に先立って安楽死させた。

30

【0243】

ナイーブオスおよびメスモーリシャス島起源のカニクイマカク（M a c a c a f a s c i c u l a r i s）を研究のために選択した。研究開始時、動物の体重は > 2 k g、年齢は > 2 歳であった。研究用に選択された動物は、研究への割り当てに先立って広範囲な身体検査を受けた。健康状態の割り当て前評価は、実地獣医検査および N I R C S O P により適用できる C B C 分析用の血液試料収集を含んだ。動物は一般にペアで収容され、研究開始に先立って少なくとも 3 日間順応させた。群は、処置群につき最大 6 動物からなっていた。すべての動物は、ケタミン H C l（10 m g / k g、I M）またはテラゾール（4 ~ 8 m g / k g、I M）鎮静作用下で、研究日 0 に、三角筋を標的にして、それぞれの動物の一本の前肢に、I M 経路によりそれぞれのワクチン製剤または希釈液の用量 0.5 mL で免疫した。第 1 の免疫化が行われた 28 日後、第 2 の免疫化が動物の反対側の肢に与えられた。

40

【0244】

チャレンジ研究のためのマウスおよび N H P の免疫化

マウスは、最後の免疫化のおおよそ 9 ~ 12 週間後にチャレンジ株を接種された。ストックウイルスのバイアルを解凍し、氷冷無菌 P B S に適切な濃度まで希釈した。すべてのマウスは、4 L D₅₀ に等しい P B S 中 10^{5.54} T C I D₅₀ の B e l g i u m 09 ウイルスを含有する全容積 50 μ l でチャレンジした。ウイルスチャレンジは、拡張された A B S L 2 実験室において安全キャビネット内部で実施した。マウスは、ケタミン / キシラジン溶液（ケタミン 50 m g / k g およびキシラジン 5 m g / k g）の I P 注射でまず麻酔をかけられ、次にマイクロピペットを使用してインフルエンザウイルスの全容積 50 μ l で I N（両鼻孔中に液滴；鼻腔当たり 25 μ l）にチャレンジした。チャレンジ手順に続いて、マウスを背臥位で寝かせき、麻酔から回復するまで観察した。毎日の体重は H 1 N 1 チャレンジに続いて量った。> 20 % の体重減少が 1 回でも観察されたいかな

50

る個々の動物でも安楽死させた。体重測定は、安楽死までチャレンジ後毎日、オンラインデータベース、Pristima（登録商標）（Version 7.5.0 Build 8）に記録される、または研究特定作業用シートに記帳された。

【0245】

血液収集

マウスでは、血液は、鎮静作用下でのすべての動物からの、顎下または眼窩静脈叢出血（生前出血、研究前ならびに研究日14、28、および42および200 μ l）および心臓穿刺（末端出血、56日目）により収集した。マウスは研究前に出血させて基準線の免疫前血清試料をプレスクリーニング目的で得た。血清の加工、血液試料はSSTチューブに収集し、室温で30分間～1時間凝固させておいた。次に、試料は、プレーキオフで5～10分間、1000～1300 gで遠心分離した。血清は、P200ピペッタを使用して収集し、2個の0.5 mlクライオバイアルに分割し、 -20°C で貯蔵した。すべての出血は、検体採取および処理ログに記述し、試料収集の時刻および手順を実施する担当技術者を示した。血清試料の一部は、抗体価についてHAIまたはELLAおよびELISAアッセイにおいて評価した。

10

【0246】

NHPは、ケタミン10 mg/kg / アセプロマジン1 mg/kgを使用して筋肉内に投与される麻酔下で、血清分離のために出血させた（日目-4、2、7、14、28、30、35、42、56、90、および180）。採血量は、体重のパーセンテージおよび動物の健康状態に関して確立した指針を超えなかった。血液は、Vacutainer 21 ga x 1" 血液収集針またはBD Vacutainer（登録商標）SST（商標）ゲルチューブに取り付けられたAbbott Butterfly 23 ga x 3/4" チュービングを使用する大腿静脈穿刺を使用して麻酔したNHPから採取した。血清は、室温で1200 x gの速度で10分間チューブを回転させることにより分離した。次に、血清は標識されたクライオバイアル（1 ml / バイアル）に等分し、 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。血清試料の一部は、抗体価についてHAIまたはELLAおよびELISAアッセイにおいて評価した。PBMCでは、NHPはワクチン接種前におおよそ第1の注射のおおよそ42～63日後に再び前出血させた。この目的のため、血液は、ヘパリン抗凝固剤を含有するBD Vacutainer（登録商標）チューブ中に収集した。手短に言えば、抗血液凝固性血液試料をPBSに希釈し、Histopaque（登録商標）分離液（Sigma）を使用して400 x gで30分間、勾配密度遠心分離にかけた。次に、単核細胞を含有する不透明なインターフェイスを収集し、低速度（250 x g）遠心分離を使用してPBSで3回洗浄し、最後の遠心分離で血小板の数を減らした。生対死PBMCは、Nexcelom Cellometer K2を使用して数え上げた。PBMCは、Mr. Frosty（登録商標）凍結ボックスを使用して10% DMSOを有するFBSに凍結保存した。ボックスは直ちに -80°C 冷凍機に24時間置き、次に、貯蔵のために液体窒素タンクに移した。

20

30

【0247】

ELISA

抗体ELISAは、組換え的に産生されたSing16 NAタンパク質、Sing16 HAタンパク質、またはCA09 HAタンパク質を使用して実施した。タンパク質は、炭酸-重炭酸塩バッファ中、濃度2 μ g/mlで、96ウェル高結合ポリスチレンプレート上で捕捉した。プレートを回収し、2～8 $^{\circ}\text{C}$ で一晩（16 $\pm$ 4時間）インキュベートした。一晩インキュベーション後、抗原被覆プレートは洗浄バッファ（PBS、0.5% Tween 20）で5回洗浄し、室温で60 $\pm$ 30分間ブロッキング溶液（PBS中10% BSA）でブロックした。試験試料、ナイーブ対照、および参照試料は、試料希釈液（PBS 10% BSA 0.5% Tween 20）に希釈し、ウェルに2通り添加し、続いて室温で90分間インキュベートした。プレートは洗浄バッファで5回洗浄し、マウス血清にはヤギ抗マウスHRPをNHP血清にはヤギ抗サルHRPを希釈度1:10,000で添加した。次に、プレートは、室温で30分間インキュベートし、過剰なH

40

50

R P - I g G は洗浄バッファーで洗浄した。S u r e - B l u e T M B 基質をそれぞれのプレートに添加し、反応は約 10 分後 T M B 停止液で停止させた。次に、プレートは、T h e r m o L a b s y s t e m s M u l t i s k a n (商標) 分光光度計を用いて 450 nm で読み取った。抗抗原 (H A または N A) 特異的抗体価は、 > 0.3 の吸光度を有する最も高い血清希釈度の逆数として表された。

【0248】

H A I アッセイ

H A I アッセイは、S i n g 16 H 3 N 2 および C A 09 H 1 N 1 ウイルスストック (B I O Q U A L、I n c.) を使用して実施した。血清は、1 部の血清を 3 部の酵素で希釈することによりレセプター破壊酵素 (R D E) で処理し、37℃水浴中一晚インキュベートした。酵素は、56℃での 30 分間インキュベーション期間により不活化し、続いて 6 部の P B S を添加して最終希釈度 1 / 10 とした。H A I アッセイは、4 赤血球凝集単位 (H A U) のウイルスおよび 0.5 % シチメンチョウ R B C を使用して V 字型底 96 ウェルプレートにおいて実施した。それぞれの株についての参照血清はすべてのアッセイプレート上で陽性対照として含まれた。それぞれのプレートは、抗原用量 (4 H A U / 25 μ l) を確かめるための逆滴定ならびに陰性対照試料 (P B S またはナイーブ対照血清) も含んだ。H A I 力価は赤血球凝集の完全な阻害をもたらす血清の最も高い希釈度として決定した。結果は、適切な逆滴定結果 (4 H A U / 25 μ l 添加を立証する) および予想される力価の 2 倍以内の参照血清力価を有するプレートについてのみ有効であった。

【0249】

N A I アッセイ

酵素結合レクチンアッセイ (E L L A) のための方法を使用してノイラミニダーゼ阻害 (N A I) 抗体価を決定した。抗原の供給源 (ウイルス N A) を滴定し、標準量を血清の段階希釈とのインキュベーションのために選択した。血清の滴定は、血清 (56℃で 1 時間熱失活した) の段階希釈を用いて実施し、標準量のウイルスをフェチュイン被覆プレートのウェルに 2 通り添加した。次に、この混合物は一晚 (16 ~ 18 時間) インキュベートし；次の日、H R P コンジュゲートビーナッツアグルチニン P N A (2.5 μ g / ml まで希釈) を洗浄したプレートに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。基質 (クエン酸ナトリウム中の O D P) を添加して 10 分間インキュベートして、色を発現させた。さらに次に、停止バッファー (硫酸 1 N) を添加して反応を停止させた。プレートは、O D 490 nm での吸光度についてスキャンした。ウイルス対照と比べて色が減少しているまたは色がなくことは、N A 特異的抗体の存在のせいで N A 活性が阻害されていることを示していた。N A I 力価 (I C 50 値) は O D 読取り値から計算し、結果は G r a p h P a d P r i s m にグラフで示した。E L L A 滴定曲線が信頼性のある I C 50 値を決定するのに良好な適合度を与えなかった場合、試料は、50 % エンドポイントに到達する異なる希釈計画を使用して再試験した。

【0250】

T 細胞 E L I S P O T アッセイ

完全培地 (D M E M 1640 + 10 % 熱失活 F C S) を 37℃水浴中で予熱した。P B M C を 37℃水浴中で急速解凍し、予熱した培地と一緒にコニカルチューブに液滴で移した。チューブは 1,500 rpm で 5 分間遠心分離し、細胞は再懸濁して、G u a v a 細胞カウンターを使用して数え上げた。サル I F N - γ E L I S P O T キット (M a b t e c h 3421M - 4 A P W) および I L - 13 E L I S P O T キット (M a b t e c h 3470M - 4 A P W) を使用した。キットが提供する予め被覆されたプレートは無菌 P B S で 4 回洗浄し、37℃インキュベーターにおいて少なくとも 30 分間、200 μ l の完全培地でブロックした。S i n g 16 H 3 ペプチドプール (G e n s c r i p t C u s t o m O r d e r) (それぞれのペプチドを 1 μ g / ml で) アッセイにおいてリコール抗原として使用した。C o n A (S i g m a C A T # C 5275) 2 μ g / ml を陽性対照として使用した。リコール抗原 50 μ l および 50 μ l 中 300, 000 個の P B M C を刺激のためにそれぞれのウェルに添加した。プレートは、37℃、5 %

10

20

30

40

50

CO₂加湿インキュベーターに48時間置いた。

【0251】

インキュベーション後、細胞を取り除き、プレートはPBSで5回洗浄して、1 μg/mlのビオチン化抗IFN-γまたは抗IL-13検出抗体100 μlをプレートのそれぞれのウェルに添加した。2時間インキュベーション後、プレートはPBSで5回洗浄し、室温で1時間それぞれのウェルで1:1000希釈度のストレプトアビジンの100 μlと一緒にインキュベートした。プレートは、スポットが現れるまでBCIP/NBT基質溶液の100 μlで展開した。プレートは、水道水でゆすぎ、風乾し、スキャンして、CTL ImmunoSpot (登録商標) 読取り機 (Cellular Technology Ltd.) を使用して数え上げた。データは、PBMC100万個当たりのスポット形成細胞 (SFC) として報告した。

10

【0252】

メモリーB細胞 (MBC) ELISPOTアッセイ

ヒトIgG Single-ColorメモリーB細胞ELISPOTキット (CAT #NC1911372、CTL) を製造業者の説明書によって使用して、Sing16 H3 特異的および全IgG⁺抗体分泌細胞 (ASC) を測定した。MBCのASCへの分化は、キットにより提供される刺激カクテルを使用してPBMCにおいて実施した。手短に言えば、凍結PBMCを37℃水浴中で急速解凍し、DNアーゼI (CAT #90083、Fisher Scientific) と混合して、10%FCS (CAT #SH30073.03、HyClone (商標)) を含有する予熱した完全培地 (CM) (RPMI 1640、(CAT #22400-089、Gibco)、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (CAT #P4333、Sigma) を含有するチューブに移し、1,500 rpmで5分間遠心分離した。細胞ペレットは、5 mlの完全培地に1 ml当たり2 × 10⁶細胞で再懸濁し、37℃、5%CO₂インキュベーター中1時間T25フラスコに移した。次に、細胞懸濁液の容積は6 mlに調整し、B-Poly-Sを1:1000希釈度で添加した。細胞は、4日間の刺激のためにCO₂インキュベーター中に残した。キットが供給するPVDFマイクロプレートは、70%エタノールでプリウエットし、ゆすぎ、キットが提供する抗ヒトIgG捕捉AbまたはSing16/H3組換えタンパク質4 μg/mlを80 μl/ウェルで一晩被覆した。

20

【0253】

細胞は刺激の4日後に収穫し、洗浄し、計数して、CM中指示された濃度に調整した。被覆マイクロプレートはPBSで洗浄し、CMで1時間ブロックし、中身に移した。100 μl/ウェルの細胞懸濁系をプレートに添加し、37℃で18時間、CO₂インキュベーターでインキュベートした。洗浄後、80 μl/ウェルの1:400希釈抗ヒトIgGビオチン検出抗体をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。洗浄に続いて、1:1000希釈度のストレプトアビジン-APを80 μl/ウェルで1時間プレートに添加した。新たに調製した基質溶液を添加し、室温で18分間インキュベートした。プレートは、水道水によりすすぎ、風乾し、スキャンして、CTL ImmunoSpot (登録商標) 読取り機 (Cellular Technology Ltd.) を使用して数え上げた。それぞれ個々の動物では、IgG⁺の数およびSing16/H3特異的ASCの数は、PBMC100万個当たりで計算した。抗原特異的ASCの出現頻度は、全IgG⁺ASCに対する抗原特異的ASCの%として計算した。アッセイバックグラウンドを評価するため、すべてのプレート上の陰性対照ウェルはPBSで被覆した (バックグラウンドは検出されなかった)。

30

40

【0254】

統計解析

光輝のT_{max}を見積もるため、ノンパラメトリック法を使用して、観察されたデータに基づいて個々の対象のT_{max}を見積もった。光輝の半減期を見積もるため、最大値に到達した後の光輝についての指数関数的崩壊モデルを想定して、線形モデルは、最大光輝から基準線までの崩壊の時間経過中対象ごとに対数変換データに適合していた (我々は、

50

生理食塩水群での光輝の平均を使用して基準線を見積もる)。半減期は、対数光輝が最大と基準線値の間の中点に到達した時点として見積もった。幾何平均としてまとめられた結果を用いた異なる読み出し情報の解析では、S Eモデルベースの幾何平均およびS Eは、応答が対数変換読取り情報であり、ワクチン接種が固定効果であり、時間が反復測定である場合には反復測定についての混合効果モデルから見積もり；次に、モデルからの対数ベース平均およびS E見積もりは変換により元に戻して、幾何平均およびS Eを得た。体重変化では、オーバー記述的統計解析を使用した。基準線（0日目）からの経時的な最大%体重減少のそれぞれの群の中央値および範囲はもっと悪いシナリオを評価するために報告され；最後の観察時の基準線からの%体重変化のそれぞれの群の中央値および範囲は、体重回復を評価するために報告された。

10

【0255】

抗原配列

ここで使用されたPerth09 N2抗原の配列は、

MNPNQKIITIGSVSLTISTICFFMQIAILITTVTLHFQKY
EFNSPPNNQVMLCEPTIIERNITEIVYLTNTTIEKEICPK
LAEYRNWSKPKQCDITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTRP
YVSCDPDKCYQFALGQGTTLNNVHSNNTVRDRTPYRTLML
NELGVPFHLGTKQVCIAWSSSSCHDGGKAWLHVCITGDDKN
ATASFIIYNGRLVDSVVSWSKEILRTQESECVCINGTCTVV
MTDGSASGKADTKILFIEEGKIVHTSTLSGSAQHVEECSC
YPRYPGVRVCVRDNWKGSNRPIVIDINIKDHSIVSSSYVCSG
LVGDTPRKNDSSSSSHCLDPNNEEGGHGVKGWAFDDGNDV
WMGRTISEKSRLGYETFKVIEGWSNPKSKLQINRQVIVDR
GNRSGYSGIFSVGKSCINRCFYVELIRGRKEETEVLWTS
NSIVVFCGTSGTYGTGSWPDGADINLMPI*（配列番号4）

20

である。

【0256】

ここで使用されたMich15 N1抗原の配列は、

MNPNQKIITIGSICMTIGMANLILQIGNIISIWVSHSIQI
GNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNISSNTNFAAGQSV
VSVKLAGNSSSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVFVIREP
FISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMS
CPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDS
GAVAVLKYNIGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFT
IMTDGPGSDGQASYKIFRIEKGGKIKSVEMKAPNYHYEECS
CYPDSSEITCVCVRDNWHGSNRPWVSFNQNL EYQMGYICSG
VFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGF SFKYGNGVWIG
RTKSISSSRKGFEMIWDPNGWTGTDNKF SIKQDIVGINEWS
GYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPEENTIWTSG
SSISFCGVNSD TVGWSWPDGAELPFTIDK*（配列番号5）

30

40

である。

【0257】

ここで使用されたSing16 H3抗原の配列は、

MKTIIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGT
IVKTITNDRIEVTNATELVQNSSSIGEICDSPHQILDGENC
TLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPD
YASLRSLVASSGTLEFKNESFNWTGVTQNGTSSACIRGSS
SSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNKEQFDKLYIWGVHH
PGTDKDKQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGSRPRIR
DIPSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGK

50

SSIMRSDAPIGKCKSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGA
CPRYVKHSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENTGWE
GMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRL
IGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRVQDLEKYVEDTKIDLWSYN
AELLVALENQHTIDLTDSSEMNKLFECTKKQLRENAEDMGN
GCFKIYHKCDNACIESIRNETYDHNVYRDEALNNRFQIKG
VELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIR
CNICII* (配列番号6)

である。

【0258】

ここで使用されたSing16 N2抗原の配列は、

MNPNQKIITIGSVSLTISTICFFMQIAILITTVTLHFQKY
EFNSPPNNQVMLCEPTIERNITEIVYLTNTTIEKEICPK
PAEYRNWSKPQCGITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREP
YVSCDPDKCYQFALGQGTTLNNVHSNNTVRDRTPYRTLML
NELGVPFHLGTKQVCIAWSSSSSCHDGGKAWLHVCITGDDKN
ATASFIIYNGRLIDSVVSWSKDILRTQESSECVCTINGTCTVV
MTDGNATGKADTKILFIEEGKIVHTSKLSGSAQHVEECSC
YPRYPGVRVCVRDNWKGSNRPIVIDINIKDHSIVSSYVCSG
LVGDTPRKNDSSSSSSHCLNPNNEEGGHGVKGWAFDDGNDV
WMGRTINETSRLLGYETFKVVEGWSNPKSKLQINRQVIVDR
GDRSGYSGIFSVGKSCINRCFYVELIRGRKEETEVLWTS
NSIVVFCGTSGTYGTGSWPDGADLNLMHII* (配列番号7)

である。

【0259】

ここで使用されたCA09 H1抗原の配列は、

MKAILVLLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKN
VTVTHSVNLLLEDKHNGKLCCLRGVAPLHLGKCNIAGWILG
NPECESLSTASSWSYIVETPSSSDNGTCYPGDFIDYEELRE
QLSSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKS
FYKNLIWLVKKGNSSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHP
TSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDR
EGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGS
GIIISDTPVHDCNTTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKC
PKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTG
MVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI
EKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNA
ELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNG
CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGV
KLESTRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSL
QCRIICI* (配列番号24)

である。

【0260】

ここで使用されたHA株A／California／7／2009 (H1N1) (CA09) 抗原mRNAオープンリーディングフレーム (ORF) の配列は、

AUGAAAGCUAUCCUGGUCGUCUUGCUGUAUACUUUCGCCA
CUGCCAACGCCGACACCCUGUGUAUCGGGUUACCACGCGAA
CAACUCCACCGACACUGUGGACACCGUGCUCGAAAAGAAC
GUGACCGUGACUCAUUCUGUGAAUCUGCUCGAGGACAAGC
ACAACGGAAAGUUGUGCAAGCUGCGCGGAGUGGCACCGCU

10

20

30

40

50

G C A C C U U G G A A A G U G C A A C A U U G C C G G A U G G A U C C U G G G A
A A C C C G G A G U G C G A A A G C C U G A G C A C C G C G U C C U C A U G G U
C C U A C A U C G U G G A A A C C C C G U C C U C U G A C A A C G G C A C C U G
U U A C C C C G G C G A U U U C A U C G A C U A C G A A G A A C U G C G G G A G
C A G C U G U C C U C C G U G U C C U C G U U U G A A C G C U U C G A G A U U U
U C C C U A A G A C C U C C A G C U G G C C U A A U C A C G A U A G C A A C A A
G G G C G U G A C G G C A G C C U G C C C G C A C G C C G G A G C A A A G U C A
U U C U A C A A G A A U C U G A U U U G G C U C G U G A A G A A A G G G A A C U
C A U A C C C C A A G C U G U C C A A G U C G U A C A U C A A C G A C A A G G G
A A A G G A A G U G C U C G U G C U C U G G G G G A U C C A C C A C C C A U C C
A C C U C C G C C G A C C A G C A G A G C C U G U A C C A G A A C G C C G A U G
C U U A C G U G U U U G U G G G U U C C A G C C G G U A C U C C A A G A A G U U
C A A G C C U G A A A U C G C G A U C A G G C C U A A A G U C C G G G A C C G C
G A G G G C C G C A U G A A C U A C U A C U G G A C U C U C G U G G A G C C U G
G A G A C A A G A U C A C C U U C G A G G C C A C C G G A A A U C U C G U G G U
G C C A C G C U A C G C U U U C G C C A U G G A A C G G A A C G C C G G A A G C
G G C A U C A U C A U U A G C G A U A C U C C U G U G C A U G A C U G U A A C A
C C A C G U G C C A G A C A C C C A A G G G C G C C A U C A A C A C C A G C C U
G C C G U U U C A A A A C A U C C A U C C C A U U A C C A U U G G G A A G U G C
C C C A A A U A C G U C A A G U C C A C C C A A G C U G A G G C U G G C G A C C G
G A C U G C G G A A C A U U C C G A G C A U C C A G U C G A G A G G C C U G U U
C G G U G C C A U C G C G G G A U U C A U C G A G G G C G G C U G G A C U G G A
A U G G U G G A C G G U U G G U A C G G G U A U C A C C A C C C A A A A C G A A C
A G G G A U C A G G C U A C G C G G C C G A U U U G A A G U C C A C C C A G A A
C G C C A U U G A U G A A A U C A C C C A A C A A G G U C A A C U C C G U G A U U
G A G A A G A U G A A U A C U C A A U U C A C C G C C G U G G G C A A A G A A U
U C A A U C A C C U G G A G A A G A G A A U A G A G A A C C U G A A C A A G A A
G G U C G A C G A C G G G U U C C U C G A C A U C U G G A C C U A U A A C G C C
G A G U U G C U C G U G C U G C U G G A A A A C G A A C G G A C C C U G G A C U
A U C A C G A C U C G A A C G U G A A G A A C C U G U A C G A G A A A G U C C G
C U C G C A A C U G A A G A A C A A C G C C A A G G A A A U C G G A A A U G G U
U G C U U C G A G U U C U A C C A U A A G U G C G A C A A C A C U U G C A U G G
A G U C C G U G A A G A A C G G C A C U U A C G A U U A C C C C A A G U A C U C
C G A A G A G G C U A A A C U U A A C C G G G A A G A G A U C G A U G G C G U G
A A G C U C G A G U C C A C C A G A A U C U A C C A G A U U C U C G C C A U C U
A C U C G A C U G U G G C A U C G A G C C U C G U C C U U G U C G U G U C C C U
G G G G G C C A U U U C A U U C U G G A U G U G C U C C A A C G G G U C C C U G
C A G U G C C G G A U U U G C A U C U A A (配列番号 8)

である。

【0261】

ここで使用された A / M i c h i g a n / 4 5 / 2 0 1 5 (M i c h 1 5) ノイラミニ
ダーゼ (N A) 抗原 m R N A オープンリーディングフレーム (O R F) の配列は、

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

GAUUGGUAGCAAGGGCGACGUUUUCGUGAUCCGCGAACC
UUCAUAUCAUGCUCCCCGCGUCGAAUGUCGCACGUUCUUC
UGACCCCAAGGCGCCUGCUGAACGACAAAGCACUCCA AUGG
CACUAUCAAGGAUCCGGAGCCCUUACCGGACCUUGAUUGUC
UGCCCUAUUGGAGAAAGUGCCUUCACCAUAUAACUCGCGCU
UUGAAAGCGUGGCUUGGUCAGCCUCCGCGCCUGCCAUGACGG
GAUUAACUGGCGUGACCAUUGGCAUAAGCGGGCCCCGAUUC
GGCGCCGUGGCGGUCUGAAGUAACAACGGGAUCAUACCCG
ACACCAUUAAGUCCUGGCGGCAACAACAUCUUGAGGGACCCA
GGAGUCCGAGUGCGCGUGCGUGAACGGGUCCUGCUUUACC
AUCAUGACCGACGGACCGUCCGACGGUCAAGCCUCGUACA
AGAUCUUCCGGAUCGAGAAAGGAAGGAUCAUCAAGAGCGU
GGAGAUGAAGGCCCCCGAACUACCACUACGAGGAAUGUUCA
UGCUAUCCCGACUCGUCGAGAUUAACUUGCGUGUGCCGCG
ACAAUUGGCACGGGAUCCAACAGGCCCGUGGGUCAGCUUCA
CCAGAACCUCUGAAUAACCAGAUUGGGAUAACA UUGCAGCGGA
GUGUUCGGGGACAACCCUCGCCCGAACGACACAAGACCGGAU
CGUGUGGGGCCCGUGUCCUCCAACGGCGGCAAAACGGCGUCA
GGGAUUUUUCUUCAAAUACGGGAACGGGGUCUGGAUCGGA
CGGACCAAGAGCAUUUCAAGCAGAAAGGGGAUUCGAGAUGA
UUUGGGACCCCGAACGGCGUGGACUGGUACC CGAUAAACA AUU
CAGCAUCAAGCAGGACAUCGUGGGA AUUAACGAGUGGUCC
GGUUAUCUCCGGGAGCUUCGUGCAGCAUCCCGAACUCACUG
GACUGGACUGCAUUCGGCCGUGCUUUUGGGUGGA AUUGAU
CCGGGGGACAGACCUGAGGAGAAACACGAUUUGGACCUC CGG
UCCUCGAUCUCGUUCUGCGGAGUGAACUCCGACACCGUGG
GAUGGUCCUGGCCCCGACGGUGCAGAGCUGCCCCUUCACCAU
UGAUAAAGUAA (配列番号9)

10

20

である。

【0262】

30

ここで使用されたA／Singapore．INFIMH160019／2016 (S
ing16；H3N2) HAヘマグルチニン抗原mRNAオープンリーディングフレーム
(ORF)の配列は、

AUGAAAACCAUAUAUCGCGCUCUCAUAACAUAACUUUGCCUGG
UCUUUGCCCAAAAAGAUCCUGGCAACGACAAACUCAACCCGC
GACCCUUUGCCUCGGCCAUCACGCCGUGCCGAAACGGGCACU
AUCGUCAAGACCAUACAAACGACCGCAUCGAAGUGACCA
ACGCGACUGAGCUAGUGCAGAAACUCCAGCAUUGGAGAGAU
UUGCGAUUCUCCACACCAAAUCCUGGACGGAGAGAAUUGU
ACCUUGAUUCGACGCGCGUGCUGGGGGGAUCCGCGAGUGCGACG
GAUUC CAGAACAAAGAAAUUGGGACCUUUUCGUGGAACGGAG
CAAGGCAUACUCGA AUUGCUACCCCUACGAUGUGCCCGAC
UACGCCUCGCGUGCGGUCCUUGGUUCGCUUCUCCGGGACCC
UGGA AUUCAAAAACGAGAGCUUUA AUUGGACCGGAGUGAC
CCAGAAUUGGCACCUCGAGCGCCUGCAUUCGGGGGCUCCUC
UCGAGCUUCUUCAGCCGCCUGAACUGGCUACUCACCUCA
ACUACACCUACCCGGGCACUGAACGUGACCAUGCCGAAACA
GGAACA AUUCGACAAGCUCUACA AUUGGGGGGUGCAUCAC
CCGGGUACCGAUAAAGGACCAAGAUUCUUCUACGCCCAAU
CCUCGGGGCCGGAUACCCGUGUCCACUAAGCGCUCGCGAGCA

40

50

GGCCGUGAUC CCGAACA UUGGAAGCAGAC CCGCAUUCGC
GACAUUCCAUCGAGGAUCUCGAUCUACUGGACGAUUGUCA
AGCCUGGC GACAUC CUCUCAUUAACUCCACCGGGAAACCU
CAUCGCC CUCGGGGUUAUUUCAAGAUC CCGCAGCGGGGAAG
UCCUCCAUCAUGAGGAAGCGAUG CCCCCAUUGGAAAGUGCA
AGUCCGAGUGUAUCACACC UAACGGGAAGCAUUC CCA AUGA
CAAGCCA UUC CAGAACGUGAACAAGAAUUAACCUACGGAGCU
UGCCCUCGCUACGUC AACAUAUCGAC C CUC AAGUUGGCGA
CUGGA AUUGCGCAACGUG CCGGAGAAAGCAAAC CCGGGGAU
CUUCGGGGCUAUUCGCGGGGAUUC AUUGGAAUGGGAA 10
GGAAUGGUUCGAUGGUUGGUACGGGUUUCAGACACCAGAACU
CCGAGGGGGCGGGGGCCAGGCCCGCAGAC CUGAAGUCCACUCA
GGCCGCGAUUGACCAGAUCAACGGGAAGCUC AACAGACUC
AUUGGAAAGACCAACGAAAGAUUCCACCAA AUUCGAAAGG
AAUUCUCCGAAGUGGAGGGGCCGGGUGCAAGAC CUGGAGAA
GUACGUGGAGGACACUAAGAUCGACCUUUGGAGCUAU AAC
GCAGAAACUCCUUGUGGCC CUGGAA AAC CAGCACCAUCG
ACCUGAC CGAUUCAGAGAUGAACAAGCUCUUGAGGAA AAC
UAGAAGCAACUCCGGGAA AACCGCUGAGGACAUGGGGAAAU
GGAUGCUUUAAGAUCUACCAACAAGUGCGACAACGCCUGCA 20
UUGAGUCCAUAACGGAACGAAACUUAACGACCAUAACGUCUA
CCGGGAUGAAGCC CUGAACAAACAGAUUCCAGAUCAAGGGC
GUGGAGCUGAAGUCCGGCUACAAGAUAUGGAUCCUGUGGA
UUUCCUUCGCGAUUUC AUUCUUGCUCUGCGUGGCCCU
CCUGGGAUUCAUA AUGUGGGCCUGUCAGAAAGGGCAACAUA
AGGUGCAACAUAUGCAUAUA A (配列番号10)

である。

【0263】

ここで使用されたPerth／16／2009 (H3N2) NA抗原mRNAオープンリーディングフレーム (ORF) の配列は、

AUGAACCCUAAC CAGAAAGAUCAUCACAAUUGGAAAGCGUGU
CCCUGACCAUUCGACGAUUUGCUUCUUC AUUGCAA AUUCGC
GAUCUUGAUUAAC CACCGUCACCCUGCAUUAUCAAGCAAUAC
GAAUUC AACUCC CCGCCAAACAACCAAGUCAUGCUCUGCG
AGCCCACCAUCAUCGAACGCAACAUCACCGAGAU CGUGUA
CCUUAACCAACAACUAACCAUCGAAAGGAGAUUUGCCCCAAG
UUGGCCGAAUACCGGAACUGGAGCAAGCCCCAGUGUGACA
UACGCGGAUUUGCGCCAUUCAGCAAGGAUAACUCGAUCAG
ACUUUC CCGCCGGGGGCGACA UUUGGGUCACUCGGGAGCCU
UACGUGAGCUGCGAC CCGGACAAGUGCUACCAAUUCGCAC 40
UCGGACAGGGUAAC CACCUGAACAAACGUCCAUAGCAAACA
CACCGUGCGCGAUAGAACC CCGUACCGCACCCUCCUCAUG
AACGAACUGGGAGUGCCGUUC CACUUGGGAAACCAAACAAG
UCUGCAUUGCAUGGUCCUCCUCCUCCUGCCACGACGGCAA
AGCCUGGCUUCAAGUUUGCAUACCGGCGACGACAAGAAU
GCGACGGCCUCCUUC AUUAACA AUGGUAGACUCGUGGAUA
GCGUGGUUGUCAUGGUCCAAGGAAAUUCUACGGACUCAGGA
GUCAGAGUGCGUGUGCAUCAACGGGACUUGCACUGUCGUG
AUGACC GACGGAUCGGGCCUCCGGGAAGGGCCGACACUAAGA
UCCUCUUC AUUCGAGGAGGGAAAGAUCGUGCACACUUCUAAC 50

10

20

30

40

50

CCUGAGCGGCGUCGGCUCAGCAUGUCGAAGAGUGCUCGUGC
UACCCCGGUUAUCCCGGGGUCGCGUGUGCCGGGACA
AUUGGAAAGGCUCAAACCGCCCCAUCGUGGACAUAACAUA
CAAGGACCAUCUCCAUCGUGAGCUCUACGU AUGCAGCGGG
CUGGUCGGGGAUAACCCCGCGGGAAGAAACGAUUCCUCGUCU
CCUCCCAUCUGCCUGGACCCUAACAACGAAGAGGGAGGCCA
CGGAGUGAAGGGGAUGGGCUUUUGACGAUGGCAACGACGUG
UGGAUGGGGCAGGACUAUUUCCGAAAAGUCCCGGCGUGGGAU
ACGAAAACCUUCAAGGUCAUCGAGGGGCGUGGUCCAACCCGAA
GUCAAAGCUC CAGAUCAAACCGCCAGGUCAUCGUGGAUAGG
GGCAAUAAGAUC CGGCUACUCCGGGAUCUUCAGCGUGGGAAG
GGAAGUCCUGCAUUAACCGAUGCUUCUACGUGGGAACUCAU
UCGGGGUCGGAAGGAGGAAACCGAAGUGCUGUGGACUUCG
AACUCAAUUCGUGGUGUUUUGUGGGACCCUCCGGAACUUAACG
GAACUGGGUCCUGGCCUGACGGUGCCGACAUCAACCCUUAU
GCCGAUCUAA (配列番号11)

である。

【0264】

ここで使用されたA/Wisconsin/588/2019抗原mRNAオープンリーディングフレーム(ORF)の配列は、

AUGAAAGCCAUCCUUGUUGUCAUGCUGUACACAUAUCCACA
CCGCAAAUGCGGAUACCCUGUGUAUCGGCUACCAACGCAAA
UAAUUC CACCGACACCGUUGAUACCGUCCUGGAAAGAAAC
GUGACAGUGACUACAAGCGUCAAUUCUCCUUGAGGGAUAAAC
AUAAUGGCAAGCUGUGCAAGCUGAGAGGCGUGGGCUCCCU
GCAUCUGGGAAAGUGCAACAUCGCGUGGUUGGAUCCUCGGG
AACCCAGAGUGUGAGUCCCUUCAACCGCACGGUCUUGGU
CAUACAUCGUGGAGACUAGCAAUUCAGACAACGGGCACAUG
CUACCCCGGUGACUUAUAUAACUAACGAGGAGCUGAGAGAA
CAGCUGAGUUC CGUGUCAUCCUUCGAGAGAUUCGAAAUUCU
UCCCCA AAACCUCCUCCUGGCCCAAUCAUGACUCCGACAA
UGGAGUGACAGCCGCUUGUCCCAACGCCGGUGCCAAGAGU
UUCUAUAAGAACCUCAUUCUGGCUGGUGGAAAAAGGGCAAGU
CCUAUCCCAA AAUAUAAC CAGACCUACAUAUAACGAUAAGGG
GAAAGAAAGUCCUGGUCCUGUGGGGGGAUACACCACCCCCCU
ACCAUCGCCGACCAAGCAGUCUCUGUAUCAGAACGCCGACG
CCUACGUGUUCGUGGGUAAC CAGCCGUUAUAGUAAAAAGUU
CAAGCCAGAAAUUGCCAC CAGACCUAAGGUGCGCGAC CAG
GAGGGCCGCAUGAAACUAACUACUGGACCCUGGUGGAACCUG
GCGACAAGAUUAACAUAUCGAGGCCACUGGGGAACCUGGUGGC
ACCCAGAUACGCCUUAUAACAUGGAACGGGGAUGCUGGGGAGC
GGAAUCAUAUAUCUCCGAUAACCCUGUCCACGACUGCAUA
CUACCUUGUCAGACCC CAGAAAGGCGCUAUCAUAACCUUCU
GCCUUUCCAA AAACGUGCACCCUAUACAUAUCGGGAAAUUGU
CCCAAAGUAUGUGAA AAAGCACCAAACUGCGCCUGGCAACCG
GUCUGAGAAAUUGUGCCCUCCAUC CAGUCCCGCGGCUUGUU
CGGUGCAAUUCGCGUGGCUUUAUCGAGGGGUGGCUGGACUGGA
AUGGUUCGAUGGCUGGUACGGCUACCAUACAAC CAGAACGAGC
AGGGGUC CGGGUAUGCUGCCGACCUGA AAAAGCACUCAGAA
CGCCAUCGAUAAAUAACAUAACAAGGUGAACUCCGUGAUC

10

20

30

40

50

G A A A A G A U G A A U A C A C A G U U C A C A G C A G U U G G C A A G G A G U
U C A A C C A C C U G G A A A A A C G G A U A G A G A A C C U G A A U A A G A A
A G U C G A U G A U G G C U U U C U G G A C A U C U G G A C U U A C A A U G C C
G A G C U G C U G G U G C U C C U G G A A A A C G A G C G G A C A C U G G A U U
A U C A C G A C U C A A A A C G U G A A G A A C C U G U A U G A A A A G G U G C G
U A A C C A G C U G A A A A A C A A C G C C A A G G A A A U C G G C A A U G G C
U G U U U C G A A U U U U A C C A C A A G U G U G A U A A U A C C U G U A U G G
A G A G C G U U A A G A A C G G G A C U U A C G A C U A C C C A A A A U A C A G
C G A G G A G G C C A A G C U G A A C C G G G A G A A G A U C G A C G G C G U C
A A A C U C G A C U C C A C U A G A A U A U A C C A G A U U C U C G C C A U C U
A U A G C A C A G U G G C A U C A A G U C U C G U C C U G G U G G U G U C A C U
G G G A G C C A U C A G C U U U U G G A U G U G C A G C A A U G G A U C C C U C
C A G U G U A G G A U C U G C A U C U A A (配列番号12)

10

である。

【0265】

ここで使用されたA／Tasmania／503／2020抗原mRNAオープンリー
ディングフレーム(ORF)の配列は、

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

20

30

40

50

G C A G A G C U G C U C G U U G C C C U G G A A A A U C A G C A C A C A A U U G
A C C U U A C A G A C U C C G A A A U G A A U A A G C U C U U U G A A A A G A C
C A A G A A G C A G C U G C G C G A G A A C G C C G A G G A U A U G G G G A A C
G G U U G U U U U A A G A U C U A C C A C A A G U G U G A C A A C G C C U G C A
U U G G G U C C A U C C G A A A U G A A A C A U A C G A C C A C A A C G U G U A
U A G A G A U G A G G C C C U G A A C A A C C G A U U C C A G A U U A A G G G A
G U C G A G C U G A A G A G U G G C U A U A A G G A C U G G A U C C U G U G G A
U C U C A U U C G C C A U G U C A U G C U U C C U U C U G U G U A U U G C U C U
G C U C G G C U U C A U C A U G U G G G C U U G C C A G A A A G G C A A U A U C
C G G U G C A A C A U C U G C A U C U A A (配列番号13)

10

である。

【0266】

ここで使用されたB／Washington／02／2019抗原mRNAオープンリーディングフレーム(ORF)の配列は、

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

20

30

40

50

CUGAAGAAGAUUGCUCGGGCCCUAGCGCAGUUGAGAUUCGGAA
ACGGCUGCUUCGAAACCAAGCACAAAGUGCAACCAGACCUG
CCUGGACAGGAUCGCGGCAGGAACAUAUCGACGCUGGGGAA
UUCAGCCUCCCCACCUUCGACAGCCUGAACAUCACAGCCG
CCAGUCUGAAUGAUGACGGACUGGAUAACCAUAACCAUCCU
GCUGUACUACUCUACCGCUGCUUCCUCCCUUGGCCGUGACA
UUGAUGAUCGCAAUUCUUUGUGGUUUAUAUGGUGAGCCGAG
ACAACGUCAGUUGCAGUAUUCUGCCUUUAA (配列番号14)

である。

【0267】

ここで使用されたB／Phuket／3073／2013抗原mRNAオープンリーディングフレーム(ORF)の配列は、

AUGAAAGCCAUCAUUGUGCUGCUGAUGGUUGUUACAAGCA
ACGCCGACCGCAUCUGCACCCGGGAUUACAAGCAGCAAUAG
CCCUACAGUGGUGAAGACAGCAACACAGGGAGAGGUGAAC
GUGACCGGCGUGAUUCCACUGACAACCACCCCAACUAAAU
CUUACUUUGCAAACCUGAAAGGGACACGGACCAGAGGAAA
GCUGUGCCCUGAUUGCCUGAAUUGCACACAGACCUGGACGUG
GCCCUUGGGCAGACCAAUUGUGCGUGGGCACUACACCAAGCG
CCAAGGCCUCCAUCUCCAUGAGGUGCGGCCCGUGACUUC
UGGAUGUUUCCCCAUUAUGCACGACAGAACCAAGAUUAGA
CAGCUGCCAAACCUGCUCCGCGGCUACGAGAAAAUUCGCC
UGUCUACACAGAAUGUGAUCGACGCCGAGAAAGGCUCCAGG
AGGACCAUACAGACUGGGGGACUUCUGGCAGCUGCCCUAAC
GCCACCUCUAAGAUUCGGGUUCUUCGCAACC CAUGGCUUGGG
CCGUGCCUAAAGACA AUUAACAAGAAUGCCACCAAUCCACU
GACUGUCGAGGUGCCAUAUAUUUGCACAGAGGGGGAGGAC
CAGAUACACUGUGUGGGGCUUUCAUAGCGAUAAUAAGACUC
AGAUGAAGUCUCUCUACGGCGACUCUAACCCUCAGAAAGUU
CACCUCCUCUGCCAACGGGGUGACAACACACUACGUGUCC
CAGAUUCGGGGACUUUCCUGACCAGACCAGGAUGGAGGAC
UGCCUCAGUCUGGACGCAUCGUGGUGGACUAUAUGAUGCA
GAAGCCUGGGAAGACCGGCCACUAUCGUGUAACCAGAGGGGC
GUGCUGCUGCCCCCAAAGGUGUGGUGUGCCUCCGGAAAGAA
GCAAAGUGAUUAAGGGAUCCCUUGCCUCUGAUUGGGGGAGGC
CGAUUGCCUGCAUGAAGAGUAUGGAGGGGUGAACAAGUCC
AAGCCAUAACUAUACAGGAAAGCACGCAAAAGCCAUCGGCA
ACUGUCCCAUCUGGGGUCAA AACUCCUCUGAAGCUGGCCCAA
CGGCACCAA AUACCGCCCUCCAGCCAAGCUGCUGAAAGAA
CGCGGAUUUCUUCGGCGCCA UUGCAGGGUUUCUGGAAGGAG
GCUGGGAGGGCAUGAUUGCUGGAUGGCACGGGAUAUAACCU
UCACGGCGCUCACGGGGUGGGCCGUGGGCCGCCGUAUCUGAAG
UCCACACAGGAGGGCAAUUAACAAGAUACCAAGAAUCUGA
AUUCACUGUCCGAGCUCGAAGUGA AAAACCUGCAGCGCCU
GUCCGGCGCCAUGGACGAGCUGCACAAUGA AAUCCUGGAG
CUGGACGAGAAAGGUGGACGACCUGCGGGCUGACACUAUCA
GCAGCCAGAUUCGAGCUGGCAGUGCUGCUGAGCA AUGAGGG
CAUCAUCAACUCAGAAAGACGAACACCUCUCCUGGCACUGGAA
AGGAAACUCAAGAAAGAUUCUGGGCCCCUCCGCGAGUGGACA
UUGGGAACGGCGUGUUUCGAAACC CAAGCAUAAGUGUAACCA

10

20

30

40

50

G A C U U G U C U G G A U A G G A U C G C A G C A G G A A C C U U C A A C G C C
G G C G A A U U U U C U C U G C C A A C A U U U G A C U C C C U G A A C A U C A
C A G C U G C A U C C C U G A A C G A C G A C G G A C U G G A C A A U C A C A C
C A U C C U G C U G U A C U A C U C U A C U G C C G C U A G C U C C C U G G C C
G U G A C C C U G A U G C U G G C C A U C U U C A U C G U G U A C A U G G U U U
C C A G G G A U A A C G U G U C U U G U A G C A U U U G C C U G U A A (配列番号
15)

である。
【0268】

結果

mRNA抗原製造、特徴付け、および発現

種々のインフルエンザ株についての完全長コドン最適化HAおよびNAをコードするmRNAは、非修飾リボヌクレオチドを使用して酵素的に合成した。すべてのmRNA製剤は>95%の5'Cap1を有し、キャピラリー電気泳動上で単一の均質なピークを示した。mRNA-LNP製剤は、制御された条件下、固定された比で種々の脂質成分をmRNAと混合することにより製造した。表5に示されるように、すべてのmRNA-LNPは、>95%カプセル化を示し、均一な流体力学半径は95~105nmの範囲に及び、多分散指数(PDI)は0.060~0.136であった(表5)。

【0269】
【表5】

表5. マウス臨床前試験において使用されるLNP製剤の属性

LNP	サイズ(nm)	PDI	% カプセル封入
CA09 HA	97.54	0.117	95.2
Sing16 HA	103.2	0.068	97.3
Sing16 NA	105.8	0.128	96.5
Mich15 NA	103.3	0.136	97.4

【0270】

クライオ電子顕微鏡(クライオTEM)のCA09 HA mRNA-LNP画像は、多層状内部コア構造を有する均一な球状粒子を示した。フーリエ変換でさらに分析される固体コア構造の層状性は、層間に3.7nmの周期性を示した。顕微鏡写真で見られる粒子の均一な形態は、LNPが適切に集合している均質なLNP製剤であることを示している。

【0271】

抗原発現は、ヒト骨格筋細胞(Hs kMC)にCA09 HA、Sing16 HA、Sing16 NA、またはMich15 NAの非カプセル化mRNA構築物を一過性にトランスフェクトすることによりフローサイトメトリーで確かめ、分析のためにタンパク質特異的抗体で染色した。Hs kMCからの高レベルのHAおよびNA発現が観察され、筋肉細胞での発現による天然型のHA三量体およびNA四量体の適切な集合および輸送が確かめられた。発現されたHAおよびNAタンパク質の細胞内局在を研究するため、HeLa細胞に二価H3N2 LNPをトランスフェクトし、タンパク質を免疫染色および共焦点顕微鏡により可視化した。透過処理した細胞を対応するタンパク質および小胞体(ER)マーカーであるカルネキシンに対する抗体で染色すると、NAシグナルはERにおいて強い共局在(約90%)を示したが、HAはERと中程度に共局在している(25%)ことが分かった。これは初期のNAおよびHAタンパク質が集合のためにERに移動されているという理解(Douら、Front Immunol. (2018) 9:1581頁)と一致している。

【0272】

LNPによるmRNA送達の効率および最適製剤化パラメータの選択は、レポーターmRNA発現を使用して評価した(Thessら、Molecular Therapy (2015) 23(1): S55)。非修飾FF-LNP製剤の0.05、0.1、1、5 μ gいずれかの単回用量をマウスの筋肉内(IM)に投与した。ルシフェラーゼ活性は、平均生物発光により測定されるが、すべての用量で注射後6時間目にピークに達し72時間を過ぎても検出可能であるmRNA構築物からの持続する発現を示していた(図11、パネル(a))。高レベルのmRNA媒介タンパク質発現は、マウスで0.1 μ gおよび非ヒト霊長類(NHP)で10 μ gの単回用量でhEPOを用いてさらに検証した。研究は、標準LNP Dlin-MC3-DMA25製剤を対照として使用して、LNPを比較することを意図していた。ELISAにより定量化される血清hEPOは、6時間目に最大の発現を示し、hEPO-LNPを用いて発現されたエリスロポエチンはhEPO-MC3と比べておよそ12倍であった(図11、パネル(c))。hEPO-LNPとhEPO-MC3の両方がNHPにおいて類似する発現動態を示し、6時間目~72時間目で検出可能であった(図11、パネル(d))。この結果により、in vitroとin vivoの両方での発現のためのmRNAの効率的送達に本LNP製剤が有用であることが確かめられた。

10

【0273】

マウスにおけるHA(H1、H3)およびNA(N1、N2)mRNA-LNPの免疫原性

博物誌およびワクチン研究は、インフルエンザHAおよびNAに対する抗体が抗ウイルス機能を有し、両抗原が効果的なインフルエンザワクチンにとって重要であると見なされることを示してきた(Krammerら、Nat Rev Immunol. (2019) 19(6): 383~97頁)。非修飾CA09 HA-LNPおよびSing16 HA-LNP mRNAワクチンをBALB/cマウス(n=8)において、mRNA-LNP 2、0.4、0.08、または0.016 μ gが4週間開けたスケジュールで投与される2回投与レジメンで評価した。同じ株の組換えHA(rHA)抗原を使用して、ELISAにおいて全IgG応答を評価した。HA特異的抗体は1回投与後すべての群で検出されたが、力価は2回目の投与後の42日目にピークに達した(図12)。機能的抗体を測定するため、相同株のCA09とSing16に対して赤血球凝集抑制(HAI)応答を評価した。1回目の投与後のHAI力価は、2 μ g用量のCA09-LNPおよびSing16-LNP処置群について観察でき、28日目にそれぞれGMT160およびGMT70であったけれども、HAI力価のより重大な増加は2回目の投与後に観察された。42日目、GMT力価は、CA09-HA-LNPでは0.016 μ gおよび0.4 μ g群でそれぞれ80および2200であり、Sing16 HA-LNP群では0.016 μ gおよび0.4 μ g群でそれぞれ14および100であった(図13)。

20

30

【0274】

同様に、抗NA応答の試験では、マウスを、2、0.4、0.08、または0.016 μ gのSing16 NA-LNPまたはMich15 NA-LNPで免疫した。組換えNA抗原を用いたELISAを行って、Mich15 NA-LNPまたはSing16 NA-LNP製剤により誘導される全IgG応答を評価した。動物は1回投与後高い抗体結合応答を展開し、2回目の投与後42日目のNA結合抗体が著しく増加した(図14)。酵素結合レクチンアッセイ(ELLA)は、H6N1またはH6N2キメラウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害(NAI)活性についての機能的抗体価の代用物として使用した。ワクチンの2回投与は1回投与と比べた場合、機能的抗体応答を実質的に増やしたが、0.016 μ gのMich15 NA-LNPおよびSing16 NA-LNPという低用量でもそれぞれGMT800およびGMT60を有する力強いNAI力価が1回投与後28日目に記録された。42日目、Sing16 NA-LNP群では、0.4 μ gと0.016 μ gの間のGMT力価はそれぞれ900および10200であり、用量依存性応答を示しており、Mich15 NA-LNPの場合、力価はULOQを超えていた(図15)。

40

50

【0275】

マウスでのウイルスチャレンジからの防御

マウスインフルエンザウイルスチャレンジモデルでのmRNAワクチンの効能を試験するため、我々は、0週目と4週目にCA09 HA-LNP 0.4 µgを2回投与のLNP希釈バッファーでの陰性対照群と一緒にBALB/cマウスにIM接種した。研究日0、14、28、42、56、92、および107のワクチン群血清試料のHAI力価は、56日目および92日目にそれぞれ1660および1:830のGMTを有するロバストな免疫応答を示した(図16A)。93日目、すべてのマウスに、CA09に相同なBelgium09ウイルスを、50%致死結果を引き起こすことができる4倍用量(4×LD₅₀)で鼻腔内にチャレンジした。ワクチン群マウスすべてがチャレンジを生き残り、死亡率はなく、5%未満の一時的体重減少を特徴とするある軽い病的症状があった(図16B)。しかし、希釈対照群のマウスは有意な急速な体重減少を被り、これにより9日目までに高い死亡率(90%)をもたらした。これらの結果により、致死マウスインフルエンザチャレンジモデルでのHAベースのMRT製剤の高い効能が実証された。

10

【0276】

NAベースのMRTワクチンの防御的効能を評価するため、我々は、BALB/cマウスにおいて類似のチャレンジ実験を行った。Mich15 NA-LNPワクチンはナイーブマウスにおいて1回免疫化後ロバストなNAI力価を誘発したので(図16A)、我々は、4週間の間隔にわたりMich15 NA-LNP 0.4または0.016 µgを投与する1回または2回の投与レジメンを評価した。対照群は同じレジメンでワクチン接種され、HEPO-LNP 0.6 µgまたは希釈バッファーを受けた。1回投与後にロバストなNAI力価が観察され、Mich15 NA-LNPの0.4 µgで14,000 NAI、0.016 µgで1,800 NAIのGMTが28日目に記録された(図17A)。42日目の2回目の免疫化後、NAI力価は4 µgで108,000 NAI、0.016 µg群で37,000 NAIまで上昇した。ワクチン接種レジメン後12週間を超えた後、すべての群に4×LD₅₀のBelgium09 H1N1ウイルスでチャレンジした。処置群による基準線からの経時的な個々の体重変化は図17Bにグラフで示されている。2つの対照群のマウスはすべて有意な病的状態を被り、すべての動物は、感染の8日後までに>20%の体重減少のせいで安楽死させなければならなかった。注目すべきことに、ワクチン群の1頭を除くすべての動物が1回投与0.016 µg群においてチャレンジを生き延び、わずか0.016 µgのMich15 NA-LNPの1回投与後でも、死亡に対する高い防御的効能を示していた。もっと高い用量(0.4 µg)は、全体的な高い防御を示したが、HA免疫化とは対照的に、NAワクチン接種は体重減少を防御するには十分ではなかった。なぜならば、ワクチン接種された動物は最初の体重の10%の中位な体重減少を示したからであり、これは他のNAワクチンについて報告された知見と一致していた。体重回復はワクチン接種された群について観察され、基準線と比べて低用量で2.7%、もっと高い用量で4.8%の体重増の平均最終体重変化を生じた。全体では、結果により、1回低用量MRT NA-LNPワクチン接種が、インフルエンザNA活性をブロックするために測定可能でありマウスにおいて致死チャレンジに対して防御するのに十分な機能的抗体を誘発できることが実証された。

20

30

40

【0277】

NHPにおけるHA(H3)mRNA-LNPの免疫原性

NHPにおいてmRNA-LNPの免疫原性を評価するため、15、45、135、および250 µgのSing16 HA-LNPを取り扱う用量範囲研究をNHPで実施した。1回目の免疫化後、ワクチン接種されたNHPはすべてELISAに言及されている通り、組換えHAタンパク質に反応性の抗体を発現させた(図18)。力価のさらなるブーストが2回目の投与後に観察された。驚くべきことに、15 µg用量が誘導したELISA力価は、135 µg用量レベルの1/1.8に過ぎず(95%CI 1.0、3.6)、用量飽和が15 µgレベルに近いことを示唆していた。ロバストなHAI抗体は42日目にすべての用量群において誘導され、記録されたGMTは、15 µgでは400、4

50

5 μg では700、135 μg では900、および250 μg では570であった。42日目、95%CIを有するGMT力価の増加倍率は、135 μg ~15 μg で2.2倍(1.0; 5.0)であり、135 μg ~45 μg 処置群で1.3倍(0.6; 2.8)であり、用量が増えるとともに力価も高くなる傾向が観察されたにもかかわらず、群間の差は極小であることを示していた(図19A)。マイクロ中和(MN)アッセイにより評価される中和力(図19B)は、より用量効果に向かう傾向を示し、28日目に15 μg では40、45 μg では180、135 μg では300のGMTであった。

【0278】

動物モデルにおいてT細胞が、ウイルス負荷を減らし疾患重症度を制限するのに効果的であることが明らかにされているので(Rimmelzwaanら、Vaccine (2008) 26(4): D41~D44; Sridharら、Nat Med. (2013) 19(10): 1305~12頁; Sridharら、Front Immunol. (2016) 7: 195頁)、我々は、Sing16 HA-LNP45、135、250 μg をまたは組換えHA45 μg をワクチン接種されたNHPにおいてリコールT細胞を評価した。42日目に収集されたPBMCは、Sing16 HAの全配列に及ぶプールされたオーバーラッピングペプチドでのリコール刺激を用いた、IFN- γ (Th1サイトカイン) およびIL-13 (Th2サイトカイン) ELISPOTアッセイにおいて評価した。250 μg 群の1頭を除くすべてのワクチン接種された動物がIFN- γ 分泌細胞を発現し、PBMC100万個当たり28~1328個のスポット形成細胞(SFC)の範囲に及んだ(図20A)。注目すべきことに、用量応答は観察されず、動物の低いほうと高いほうの用量レベル群はIFN- γ 分泌細胞の匹敵する出現頻度を示した。これとは対照的に、組換えSing16 HAタンパク質で免疫された対照群のすべての動物は、IFN- γ 産生細胞が存在しないことを示した。IL-13サイトカイン分泌細胞の存在は、試験したすべての群において検出されなかったまたは非常に低かった(図20B)。データは、Sing16 HA-LNPがNHPにおいて強力なTh1偏向細胞応答を誘導したことを示唆しており、これは、現在開発中のSARS-CoV-2ワクチン、MRT5500を用いて見られる細胞応答に匹敵する(Kalninら、上記)。

【0279】

Sing16 HA-LNPを用いた免疫化後にNHPにおいてメモリーB細胞(MBC)の出現頻度を調べるため、体液性免疫記憶の読み出し情報として抗原特異的MBCを定量化するELISPOTアッセイが開発された。180日目、PBMCは、Sing16 HA mRNA-LNP45 μg もしくは15 μg の製剤を用いてまたは45 μg 用量でのコンプレータとしての組換えHAを用いて免疫されたNHPから収集された。メモリーB細胞を抗体分泌細胞(ASC)まで動かすように最適化されているPBMCの4日ポリクロナル刺激を実施し、刺激されたPBMCを抗原特異的ELISPOTに蒔き、そこでは抗原特異的ASCの出現頻度を決定することができた。次に、抗原特異的メモリーB細胞は全IgG+メモリーB細胞のパーセンテージとして定量化した。抗原特異的メモリーB細胞はすべての動物で検出され、その出現頻度は、45 μg 用量群では1~5%、15 μg 用量群では0.3~1.5%の範囲に及んだ。rHA免疫化動物では、メモリーB細胞応答は著しく低いと思われた。なぜならば、抗原特異的メモリーB細胞は6頭の動物のうち5頭で検出不能であったからである(図21)。本発明者らは、Sing16 HA-LNPは、他のmRNAワクチン同様に、集団の免疫を延ばす見込みがある抗HA特異的メモリーB細胞の集団を誘発すると結論付けた(Lindgrenら、Front Immunol. (2019) 10: 614頁)。

【0280】

多価インフルエンザウイルス抗原

mRNA-LNPプラットフォームの利点は、複数のmRNA抗原構築物に対するLNPカプセル化の柔軟性である。しかし、抗原性干渉という懸念に取り組むためには、この潜在力は試験する必要がある。インフルエンザ抗原の組合せを調べるため、H3H1、H3N2、またはN1N2組合せでそれぞれのmRNAを0.2 μg 含有する二価製剤として

、またはそれぞれの対応する抗原 0.2 μ g を含有する一価で、共カプセル化された H A と N A mRNA を L N P に製剤化した。これらの製剤をマウスに投与して、個々の抗原の機能的力価を二価対一価製剤で比較することにより、免疫原性に対する任意の抗原干渉を判定した（図 22、パネル（a）～（c）および表 6）。

【0281】

【表 6】

表 6. H3 mRNA-LNP ワクチンをワクチン接種された NHP における抗原特異的メモリー B 細胞の頻度

動物群	動物 ID	Ag-特異的 IgG の PBMC/ ウェル	Ag-特異的 IgG/100 万 PBMC の スポット数	全 IgG の PBMC/ ウェル	全 IgG/100 万 PBMC の スポット数	全 IgG に対する Ag-特異的 IgG の %
H3 mRNA-LNP (45 μ g)	1	3×10^5	1082	5×10^3	21700	5.0
	2	3×10^5	232	5×10^3	6100	3.8
	3	3×10^5	282	5×10^3	11700	2.4
	4	3×10^5	2	5×10^3	100	2.0
	5	3×10^5	283	5×10^3	8700	3.3
	6	3×10^5	225	5×10^3	22800	1.0
H3 mRNA-LNP (15 μ g)	1	3×10^5	63	5×10^3	21600	0.3
	2	3×10^5	58	5×10^3	11300	0.5
	3	3×10^5	253	5×10^3	17300	1.5
	4	3×10^5	173	5×10^3	17300	1.0
	5	3×10^5	63	5×10^3	9300	0.7
	6	3×10^5	107	5×10^3	19300	0.6
rHA (45 μ g)	1	3×10^5	2	5×10^3	19800	0.0
	2	3×10^5	28	5×10^3	14300	0.2
	3	3×10^5	2	5×10^3	17000	0.0
	4	3×10^5	0	5×10^3	7900	0.0
	5	3×10^5	0	5×10^3	21600	0.0
	6	3×10^5	0	5×10^3	14600	0.0
希釈液	1	3×10^5	0	5×10^3	30900	0.0

【0282】

H1H3 コンボでは、共カプセル化ワクチンと別々に投与されるワクチンの間では、H A I 力価については時点に関わらず統計的有意差（ $p = 0.2584$ ）は見られず、H3 力価については 42 日目に有意差（ $p = 0.8389$ ）は見られなかった。H3N2 コンボでは、ワクチンの N A 成分は H A 成分と組み合わせて高い中和抗体を誘発し、H A 優勢がないことを実証した。共カプセル化ワクチンと別々に投与されるワクチンの間では、H3 力価については時点に関わらず統計的有意差（ $p = 0.2960$ ）は見られず、N2 力価については 42 日目に有意差（ $p = 0.0904$ ）は見られなかった。同様に、N1N2 コンボでは N2 について統計的有意差（ $p = 0.3899$ ）はなかった。共カプセル化ワクチンと別々に投与されるワクチンについての 42 日目の N1 力価は、定量限界を超えていた。したがって、N2N1、H3H1、または H3N2 の組合せは、別々に製剤化された個々の L N P に等価な抗体価を生み出した。

【0283】

本発明者らは、共カプセル化 H1、N1、H3、および／または N2 mRNA の四価製剤をさらに調べた。これらの製剤は、それぞれのインフルエンザ抗原 mRNA 2.5 μ

g および組合せで必要な場合は非コード mRNA (nc mRNA) の充填量で構成される全部で 10 μg で NHP において試験し、四価 (H1N1H3N2)、二価 (H1N1 または H3N2)、または一価 (H1、H3、N1、または N2) LNP を生じた (表 7)。

【0284】
【表 7】

表 7. マウス研究におけるインフルエンザウイルスの二価組合せ

群	N	mRNA1	mRNA2	LNP	mRNA 用量 (μg)	記述	CA09 HAI	Sing16 HAI	Mich15 NAI	Perth09 NAI
1	8	Sing16 H3	Perth09 N2	Yes	0.2, 0.2	合剤		x		x
2	8					別々		x		x
3	8	CA09 H1	Sing16 H3			合剤	x	x		
4	8					別々	x	x		
5	8	Mich15 N1	Perth09 N2			合剤			x	x
6	8					別々			x	x
7	8	希釈液	-	-	0	単一	x	x	x	x

10

【0285】

20

H1 もしくは H3 に対する HAI 力価、または N1 もしくは N2 に対する NAI 力価を、一価製剤対二価または四価製剤の間で比較した (図 23)。42 日目、四価群の H1 に対する HAI 力価は、H1 一価群 (p = 0.9054、t-検定、独立検定、両側検定) または H1N1 二価群 (p = 0.8002) の力価と分析した場合、匹敵していた。同様に、四価群の H3 HAI 力価は、H3 一価群 (p = 0.2504) または H3N2 二価群 (p = 0.5894) と分析した場合、匹敵していた。N1 に対する NAI 力価は、N1 一価 mRNA または H1N1 二価 mRNA または四価 H1N1H3N2 mRNA 製剤をワクチン接種された動物の群ではほとんど同一であった。同様に、N2 一価 mRNA (p = 0.8485) または H3N2 二価 mRNA (0.4545) と四価 H1N1H3N2 mRNA 製剤の間で N2 NAI 力価に差はなかった。

30

【0286】

全体では、これらの知見は、この用量レベルでの HA/NA mRNA-LNP の共カプセル化ワクチンまたは組合せ多価ワクチンが、抗原干渉の懸念もなく 4 種の抗原すべてを送達でき、すべての抗原が、これらの抗原が単独で送達された場合の製剤中と同じくらい免疫原性であったことを示している。

【実施例 7】
【0287】

追加の LNP 製剤

mRNA ワクチン用の追加の LNP 製剤を製造し、脂質 C (カチオン性脂質 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 を含有する)、脂質 D (カチオン性脂質 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 を含有する)、および脂質 E (カチオン性脂質 GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 を含有する) と名付けた。ヒトエリスロポエチン (hEPO) mRNA はテスト mRNA として使用した。hEPO の発現は、LNP を注射したマウスから採取した試料から ELISA により測定した。試料は、注射の 6 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間後に採取した。図 24 に示されるように、hEPO 発現は、カチオン性脂質 MC3 を含有する対照 LNP 製剤と比べて、LNP 製剤脂質 A、脂質 B、脂質 C、脂質 D、および脂質 E ではすべての時点で、一貫して高かった。

40

【0288】

下の表 8 は、MC3 カチオン性脂質を含有する対照 LNP と比べた結果をまとめている

50

。
【0289】
【表8】

表8. MC3 と比べた LNP 製剤脂質 A～E からの hEPO のレベル

LNP 製剤	6 時間目の hEPO の倍率 (MC3 と比べて)	STDEV
脂質 A	10.35	4.15
脂質 B	5.62	1.34
脂質 D	7.78	2.79
脂質 E	6.17	1.57

10

【0290】

次に、同じ hEPO mRNA-LNP 製剤を非ヒト霊長類 (NHP) で試験した。試料は、注射後の 6 時間、48 時間、および 96 時間目に採取した。図 25 に示されるように、それぞれの LNP 製剤は、MC3 対照製剤に匹敵するレベルの hEPO を産生した。

【0291】

インフルエンザ HA コード mRNA-LNP 製剤も NHP で試験した。NHP は筋肉内注射により 10 μg で LNP 製剤を投与し、試料は注射後 28 日および 42 日目に採取した。HA I 力価は上記の通りに測定した。図 26 に示されるように、それぞれの LNP 製剤は、MC3 対照製剤に匹敵するまたはそれよりも高い HA I 力価を生じた。

20

【0292】

図 26 に示されるのと同じ実験を実施し、HA I 力価を Cal09 H1 インフルエンザ抗原を用いて測定した。図 27 に示されるように、それぞれの LNP 製剤は、MC3 対照製剤に匹敵するまたはそれよりも高い HA I 力価を生じた。

【0293】

図 28 に示されるように、Sing16 H3 抗原を用いた HA I 力価は、LNP 製剤脂質 C および脂質 D では上昇していた。

30

【実施例 8】

【0294】

四価または八価インフルエンザワクチン LNP 製剤に関するさらなる研究

種々の多価 LNP-インフルエンザ mRNA ワクチンを投与されたマウスから HA I 力価および NA I 力価を測定した。HA I 力価は、インフルエンザ株 A/Michigan/45/2015、A/SINGAPORE/INFIMH160019/2016、B/Maryland/15/2016 BX69A、および B/Phuket/3073/2013 に対して測定した。NA I 力価は、インフルエンザ株 A/Michigan/45/2015、A/SINGAPORE/INFIMH160019/2016、B/Colorado/06/201、および B/Phuket/3073/2013 に対して測定した。

40

【0295】

HA I 力価および NA I 力価は、一価または四価 HA または NA mRNA ワクチンを受けるマウスに対して比較した。

【0296】

マウスに、0 日目にプライムワクチンおよび 21 日目に同じ投与量のブースターワクチンを注射した。1、20、22、および 35 日目に血液を採取した。HA または NA 抗原をコードする mRNA を含有する一価組成物では以下のそれぞれをコードする mRNA を個々に使用した：B/Victoria 系統由来の H1、H3、HA、および B/Yamagata 系統由来の HA (具体的には、株 A/Michigan/45/2015；A

50

／Singapore／Infimh160019／2016；B／Maryland／15／2016；およびB／Phuket／3037／2013由来の）。B／Victoria系統由来のN1、N2、NAのそれぞれおよびB／Yamagata系統由来のNA、ならびにB／Victoria系統由来のH1、H3、HAのそれぞれ、およびB／Yamagata系統由来のHA（具体的には、株A／Michigan／45／2015；A／Singapore／Infimh160019／2016；B／Colorado／06／2017；およびB／Phuket／3037／2013由来の）をコードするmRNAを含有する四価ワクチン組成物も準備した。最後に、B／Victoria系統由来のH1、H3、HAのそれぞれ、B／Yamagata系統由来のHA、B／Victoria系統由来のN1、N2、NAのそれぞれおよびB／Yamagata系統由来のNA（具体的には、株A／Michigan／45／2015；A／Singapore／Infimh160019／2016；B／Colorado／06／2017；およびB／Phuket／3037／2013由来の）をコードするmRNAを含有する八価ワクチン組成物を準備し、八価ワクチンとして投与した。すべての組成物についてそれぞれのmRNAは、0.4 μg／株の量で添加した。それぞれの群で、n = 6マウス。

10

【0297】

それぞれの実験群の概要は下の表9に列挙している。

【0298】

【表9】

20

表9. マウスにおける多価インフルエンザワクチンについての実験群の概要

群番号	N	プライム(D0)/ブースト(D21) - NA mRNA	用量 mRNA NA (株当たり μg)	プライム(D0)/ブースト(D21) - HA (NA と一緒に)	用量 rHA (株当たり μg)	アジュバント (rHA)
1	6	LNP 希釈液	-	-	-	-
3	6	NA mRNA-LNP (N2 Perth)	0.4	-	-	-
4	6	NA mRNA-LNP (N1)	0.4	-	-	-
5	6	NA mRNA-LNP (N2)	0.4	-	-	-
6	6	NA mRNA-LNP (NV)	0.4	-	-	-
7	6	NA mRNA-LNP (NY)	0.4	-	-	-
8	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	0.4	-	-	-
9	6	-	-	HA mRNA-LNP (H1)	0.4	-
10	6	-	-	HA mRNA-LNP (H3)	0.4	-
11	6	-	-	HA mRNA-LNP (BV)	0.4	-
12	6	-	-	HA mRNA-LNP (BY)	0.4	-
13	6	-	-	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	0.4	-
14	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	0.4	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	0.4	-

30

40

【0299】

図29に示されるように、八価mRNA-LNP製剤は、4種のインフルエンザ株のうちの3種について四価の4倍以内のHAI力価をもたらした。

【0300】

50

上記群のそれぞれについてのNAI力価結果の概要は図31に示されている。八価mRNA-LNP製剤は、四価mRNA-LNP製剤に匹敵するNAI力価を生じた。

【0301】

このように、データは、八価ワクチンがロバストなHAおよびNA免疫応答を誘導できたこと、および4種の異なるインフルエンザ株由来の免疫優性HAの存在が抗NA免疫応答を抑制するまたは妨害するとは思われないことを実証する。

【0302】

HAおよびNAI力価についてのハイコンテンツイメージングベースの中和試験（HINT）力価は、種々の多価LNP-インフルエンザmRNAワクチンを投与されたフェレットからさらに測定した。HINTアッセイは、Jorqueraら（Scientific Reports, 9:2676頁, 2019年）にさらに詳細に記載されており、前記文献は参照によって本明細書に組み入れる。HINT力価は、インフルエンザ株A/Michigan/45/2015、A/SINGAPORE/INFIMH160019/2016、B/IOWA/06/2017、およびB/Phuket/3073/2013に対して測定された。NAI力価は、インフルエンザ株A/Michigan/45/2015、A/SINGAPORE/INFIMH160019/2016、B/Colorado/06/2017、およびB/Phuket/3073/2013に対して測定された。

10

【0303】

多価ワクチン免疫原性を評価するために使用されたフェレットは、下の表12に示されるように、（1）NA抗原をコードする4種のmRNA（N1、N2、BvNA、およびByNA）の混合物、（2）HA抗原をコードする4種のmRNA（H1、H3、BvHA、およびByHA）の混合物、または（3）NA抗原をコードする4種のmRNA（N1、N2、BvNA、およびByNA）およびHA抗原をコードする4種のmRNA（H1、H3、BvHA、およびByHA）の混合物で21日間隔を開けて2回ワクチン接種された。それぞれのHAは、以下の4種の株：A/Michigan/45/2015（H1）；A/Singapore/Infimh-16-0019/2016（H3）；B/Iowa/06/2017（B/Victoria系統）；およびB/Phuket/3073/2013（B/Yamagata系統）のうちの1つに由来するHAを含む。抗原はすべて1：1比で投与された。

20

30

【0304】

それぞれの実験群の概要は下の表10に列挙されている。

【0305】

フェレットはすべて、要求される通り、基準線時に、ブースター1日前または直前に、ブースター接種時に、およびチャレンジ2週間後に、鎮静下（イソフルラン）で出血させた。血清試料（必要とされるまで-20℃で貯蔵）をELLAにより試験してNAI活性を評価した。さらに、赤血球凝集抑制アッセイ（HAI）に着手して、多価ワクチン接種に続く赤血球凝集素抗原に対する抗体応答を評価した。

【0306】

40

【表 10】

表 10. フェレットにおける多価インフルエンザワクチンについての実験群の概要

群 番号	N	プライム(D0)/ブースト (D21) - NA	プライム(D0)/ブースト (D21) - HA	用量(株当たり μg)	アジュバント
1	6	PBS	PBS	0	-
11	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	-	1	-
12	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	-	15	-
13	6	-	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	1	-
14	6	-	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	15	-
15	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	1	-
16	6	NA mRNA-LNP (N1, N2, BV, BY)	HA mRNA-LNP (H1, H3, BV, BY)	15	-

10

【0307】

20

上記群のそれぞれについてのHINT結果の概要は図30に示されている。八価mRNA-LNP製剤は、四価mRNA-LNP製剤に匹敵するHINT力価を生じた。

【0308】

上記群のそれぞれについてのNAI力価結果の概要は、図32(20日目)および図33(42日目)に示されている。八価mRNA-LNP製剤は、四価mRNA-LNP製剤に匹敵するNAI力価を生じた。これは、20日目から42日目試料に当てはまった。

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

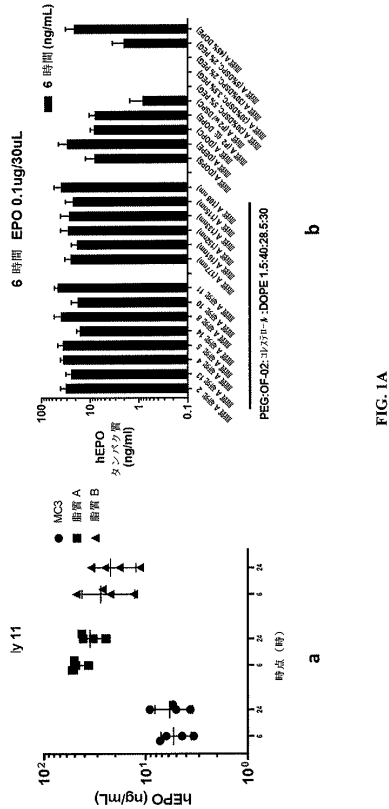


FIG. 1A

【図 1 B】

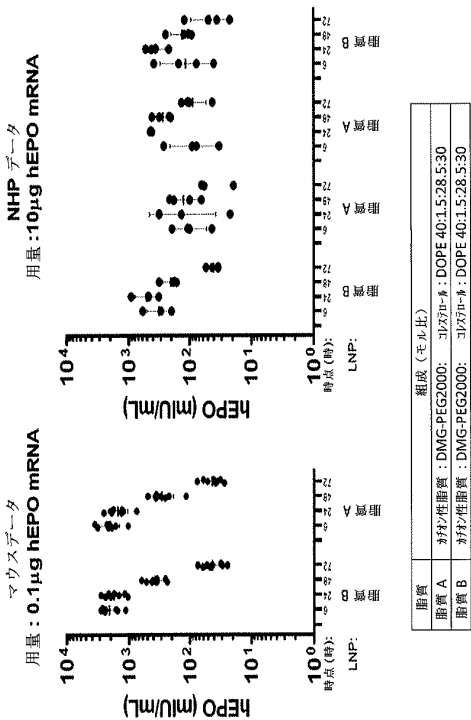


FIG. 1B

【図 2 A】

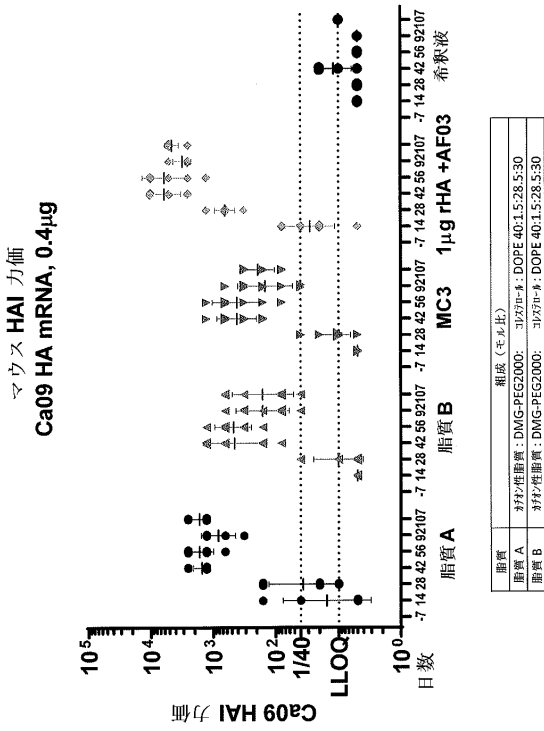


FIG. 2A

【図 2 B】

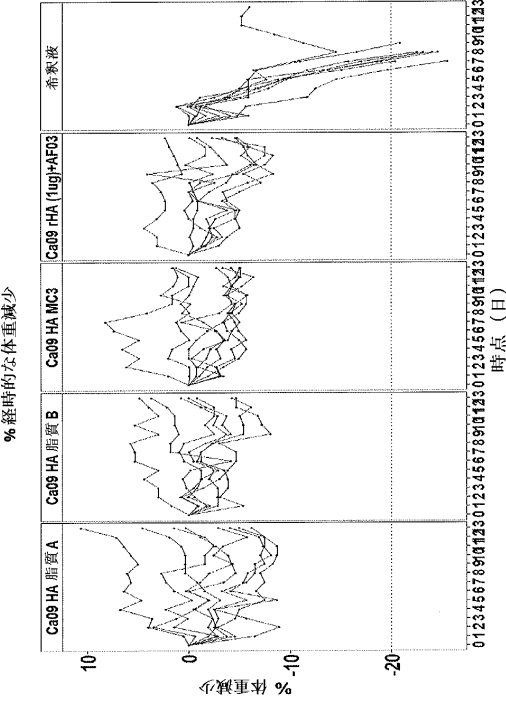


FIG. 2B

10

20

30

40

50

【図 3 A】

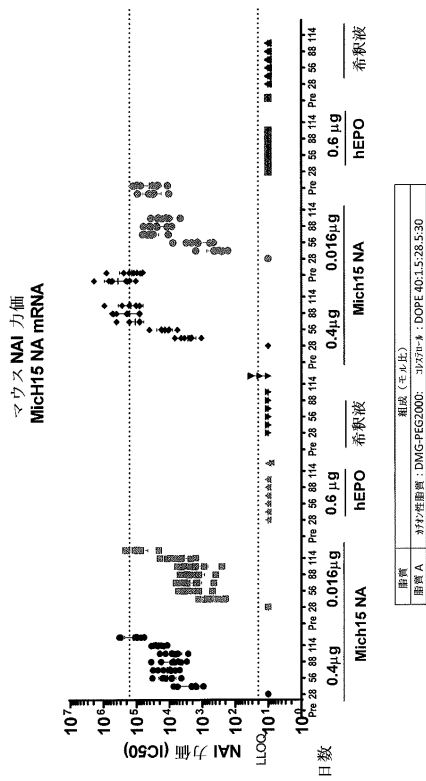


FIG. 3A

【図 3 B】

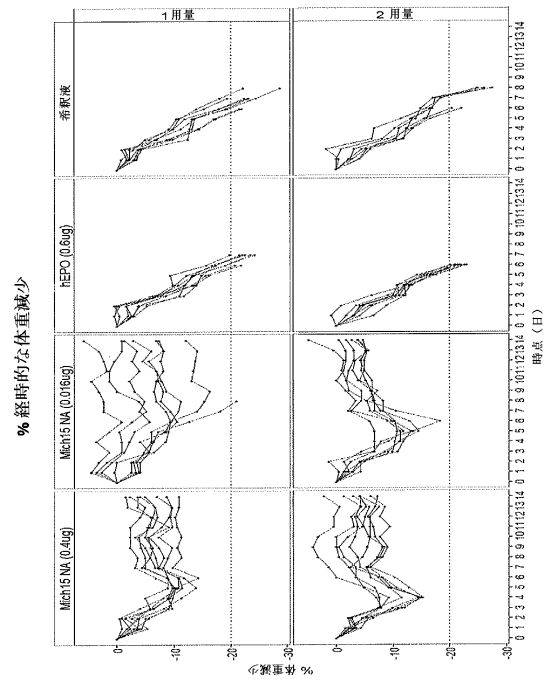


FIG. 3B

【圖 4】

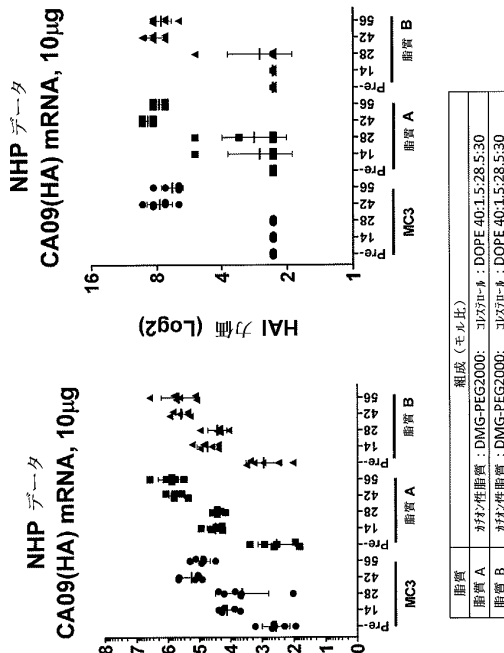


FIG. 4

【図 5 A - 1】

[illegible][illegible]

FIG. 5A

【図 5 A - 2】

[illegible]

【図 5 B】

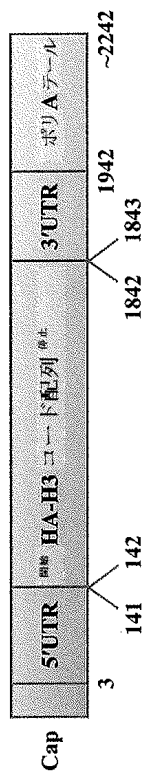


FIG. 5B

【圖 5 A - 3】

[illegible]

FIG. 5A (続き)

【図 5 C】

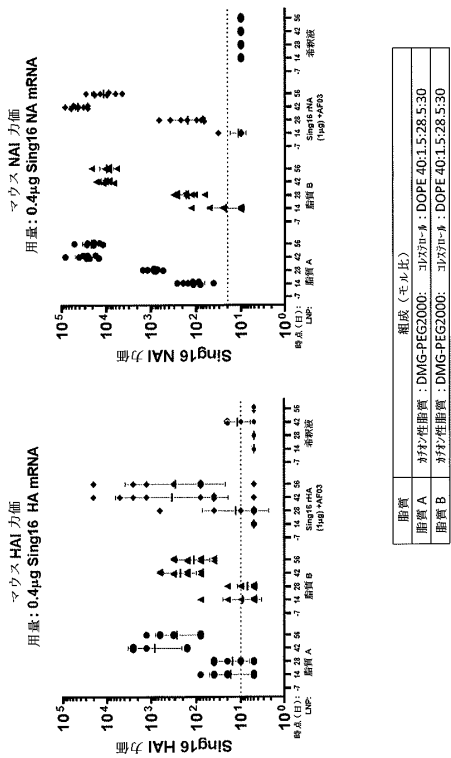
[illegible]

CGGAGGCACCCGCCGGAGACCCTTCCATGTCGTGCACTCCTGTTTGCGATTGAATTAAGAATGATGTC
+ホリ A デール
(参照番号 4)

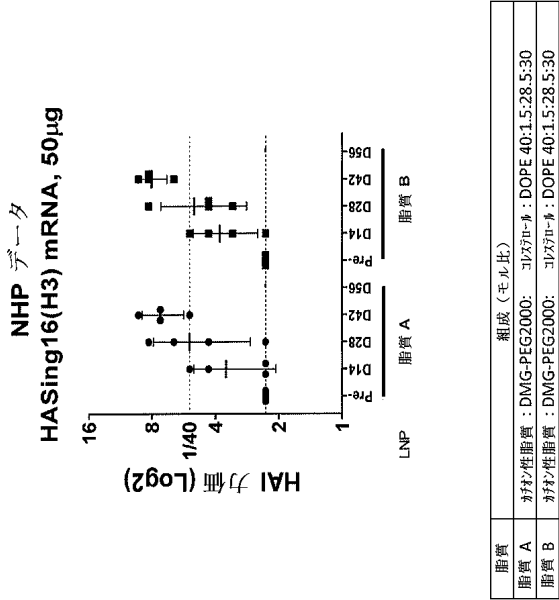
3' UTR

FIG. 5C

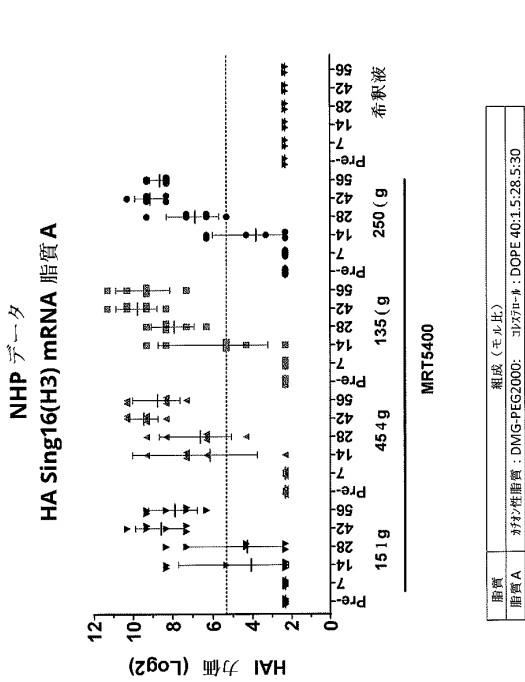
【図 6】



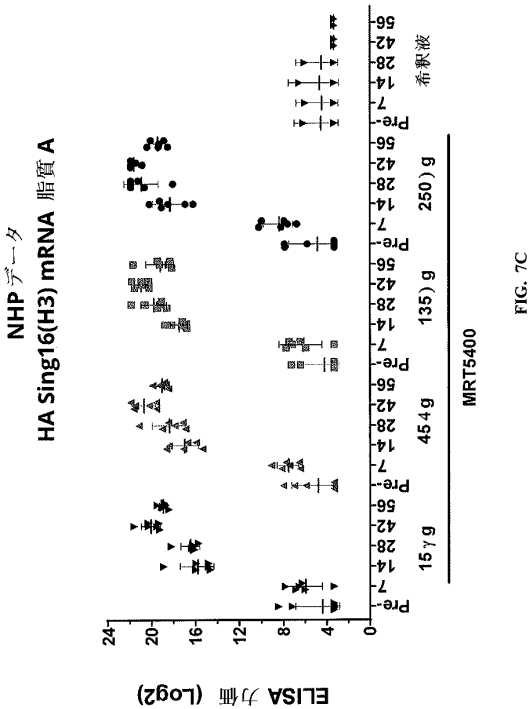
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】



10

20

30

40

50

【図 8 A】

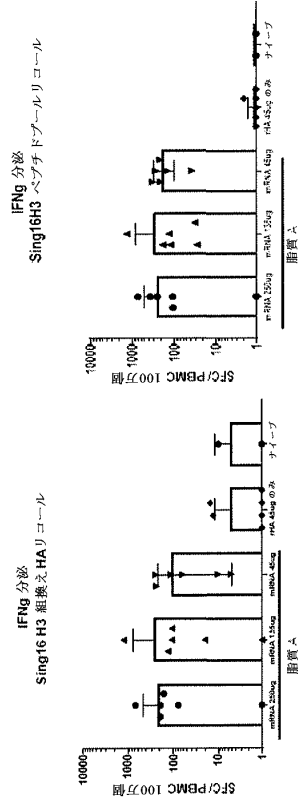


FIG. 8A

脂質	組成 (モル比)
脂質 A	DMG-PEG2000: DOPE 40:1.5:28.5:30

【図 8 B】

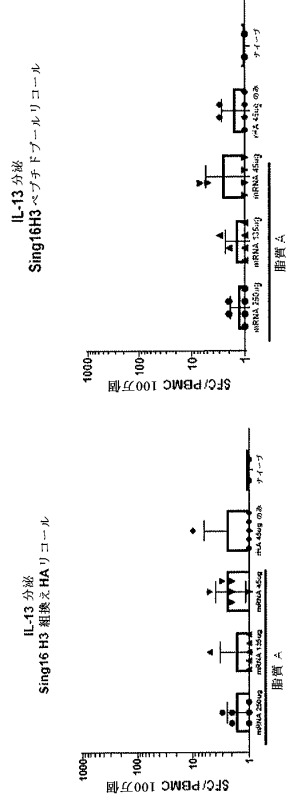


FIG. 8B

脂質	組成 (モル比)
脂質 A	DMG-PEG2000: DOPE 40:1.5:28.5:30

【図 9 A】

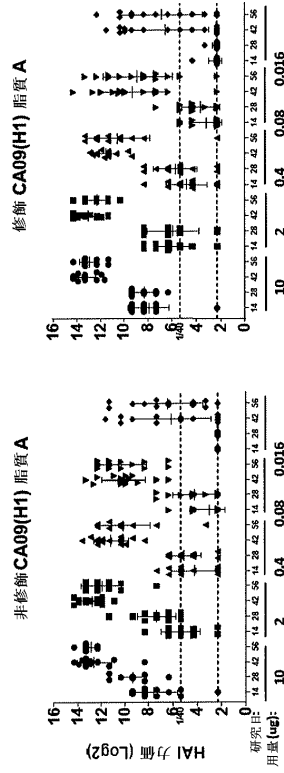


FIG. 9A

脂質	組成 (モル比)
脂質 A	DMG-PEG2000: DOPE 40:1.5:28.5:30

【図 9 B】

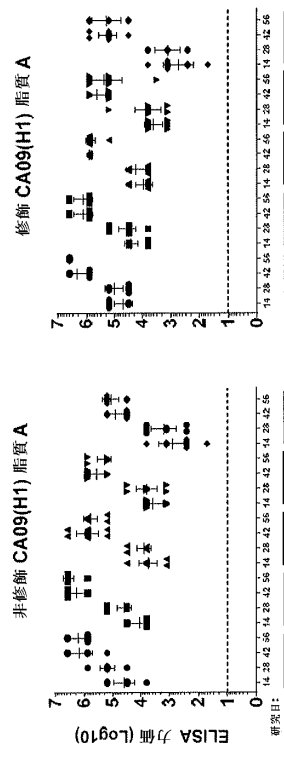


FIG. 9B

脂質	組成 (モル比)
脂質 A	DMG-PEG2000: DOPE 40:1.5:28.5:30

【図 1 0】

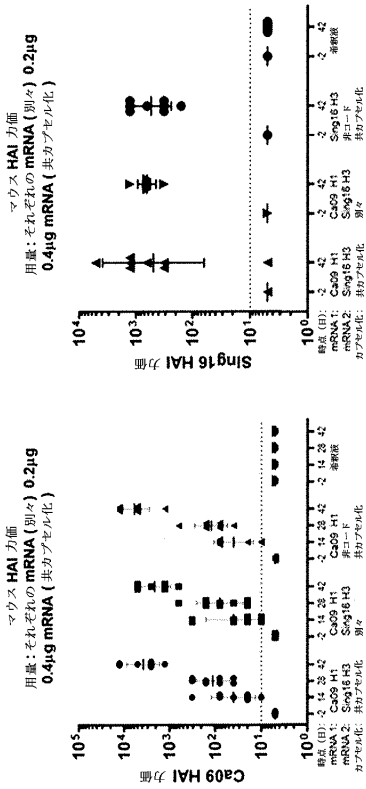


FIG. 10B

FIG. 10A

【図 1 2】

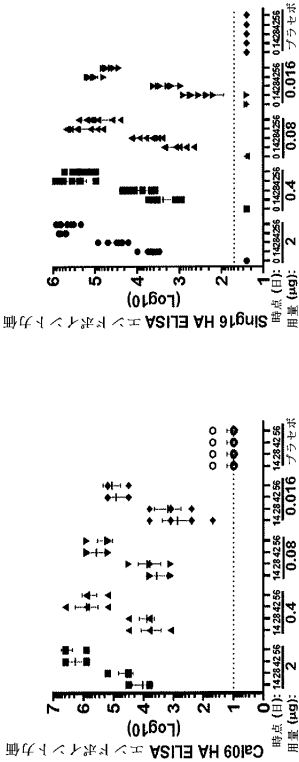


FIG. 12

【図 1 1】

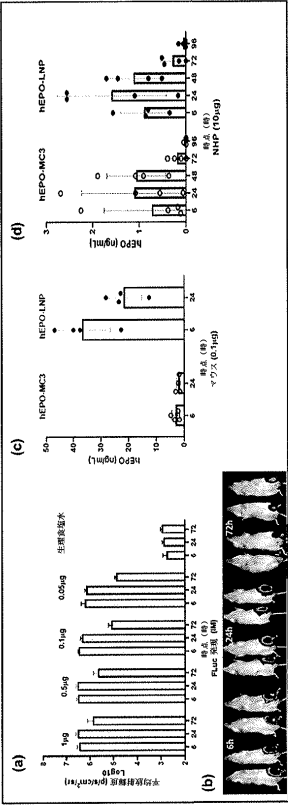


FIG. 11

【図 1 3】

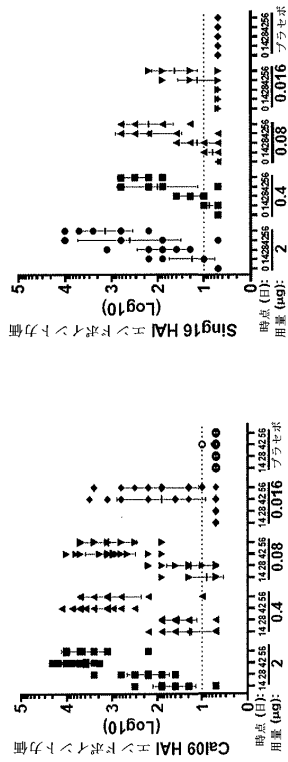


FIG. 13

10

20

30

40

50

【図 1 4】

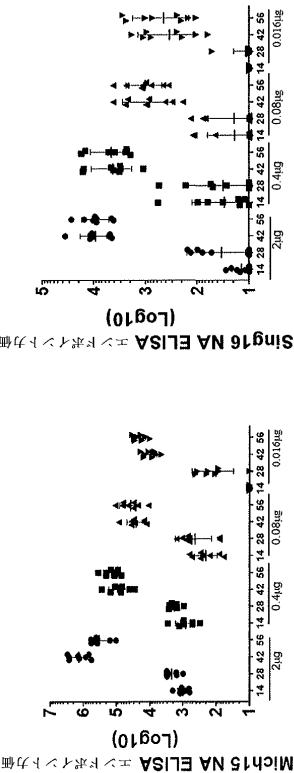


FIG. 14

【図 1 5】

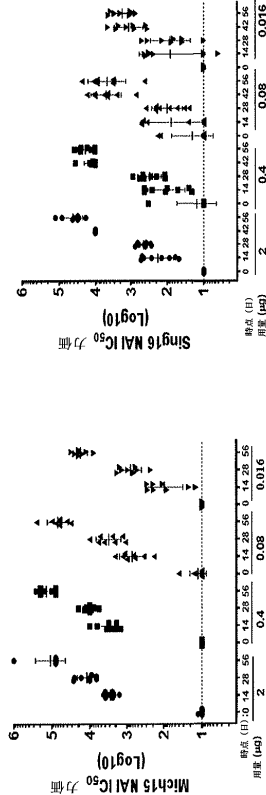


FIG. 15

【図 1 6】

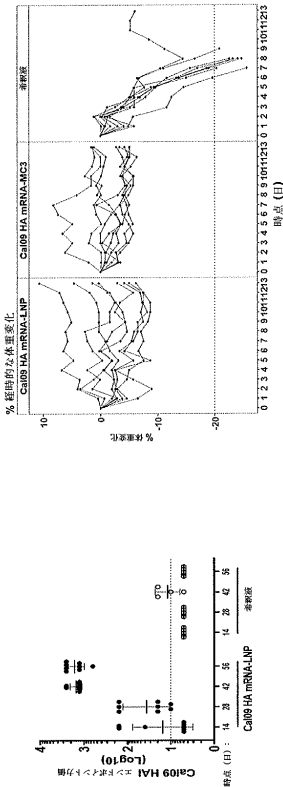


FIG. 16A

FIG. 16B

【図 1 7】

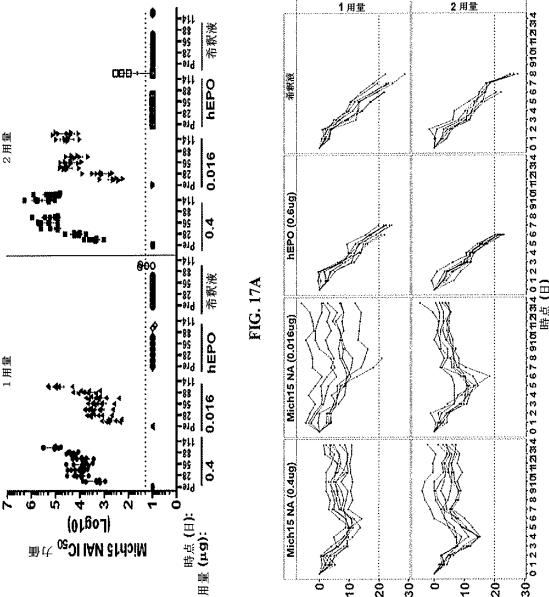


FIG. 17A

FIG. 17B

10

20

30

40

50

【図 18】

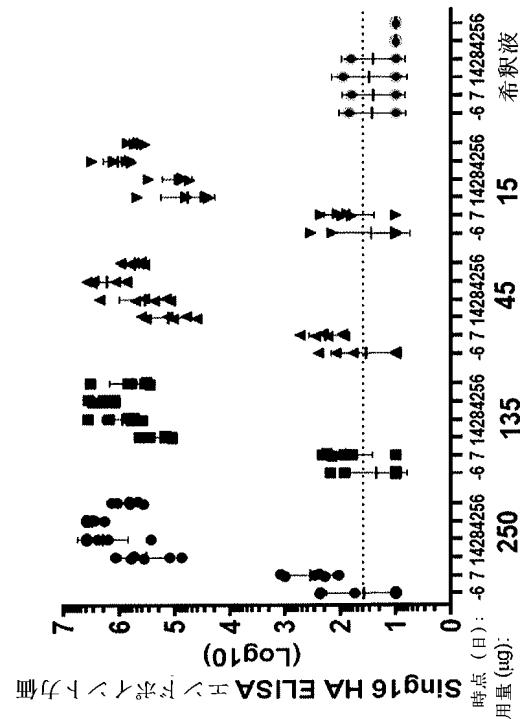


FIG. 18

【図 19】

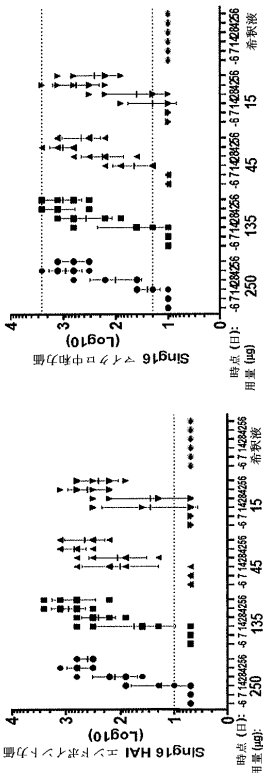


FIG. 19B

FIG. 19A

【図 20】

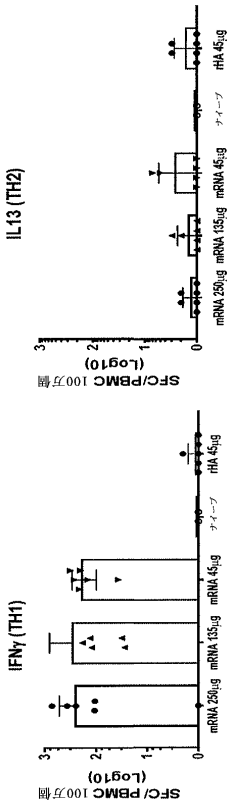


FIG. 20A

FIG. 20B

【図 21】

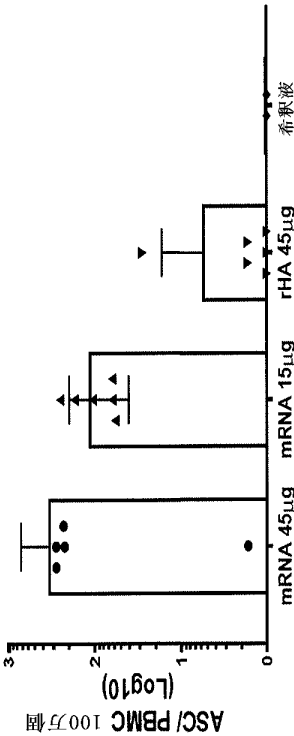


FIG. 21

10

20

30

40

50

【図 2 2 - 1】

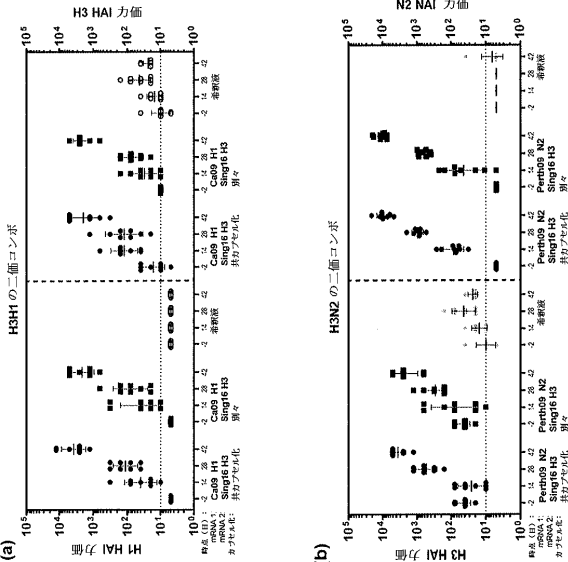


FIG. 22

【図 2 2 - 2】

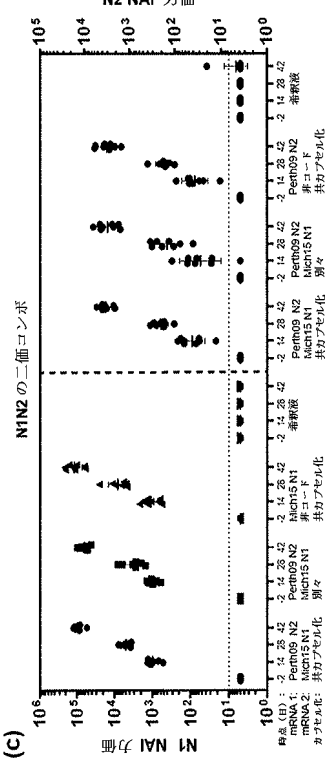


FIG. 22 (続き)

【図 2 3】

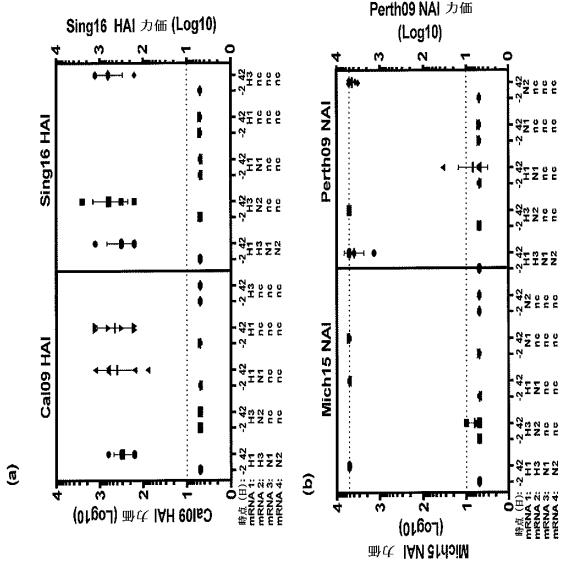


FIG. 23

【図 2 4】

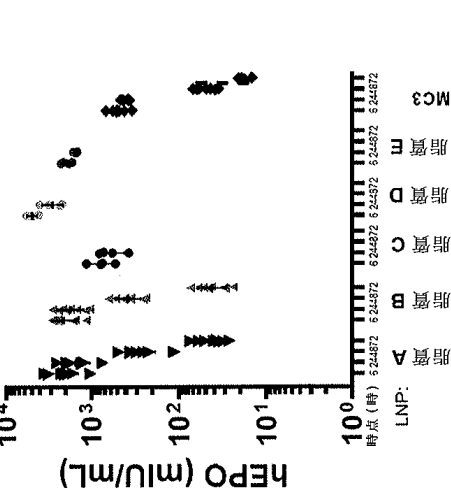


FIG. 24

10

20

30

40

50

【図 2 5】

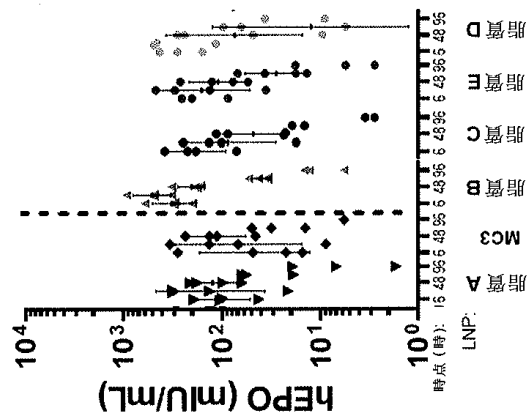


FIG. 25

【図 2 6】

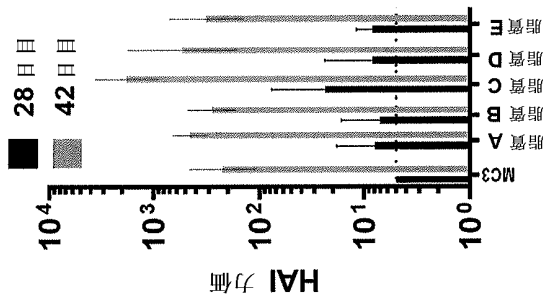


FIG. 26

【図 2 7】

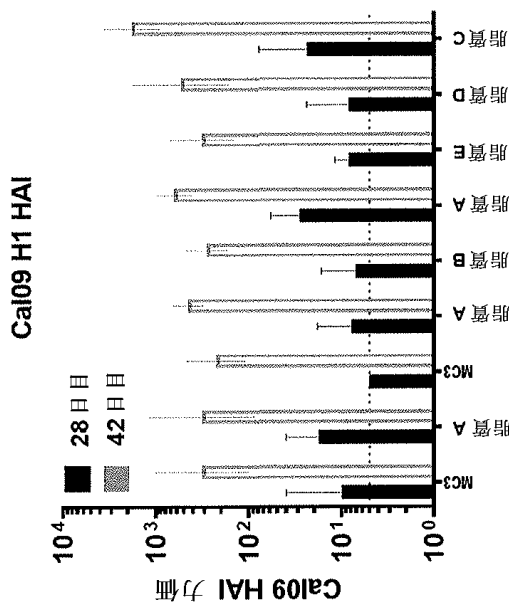


FIG. 27

【図 2 8】

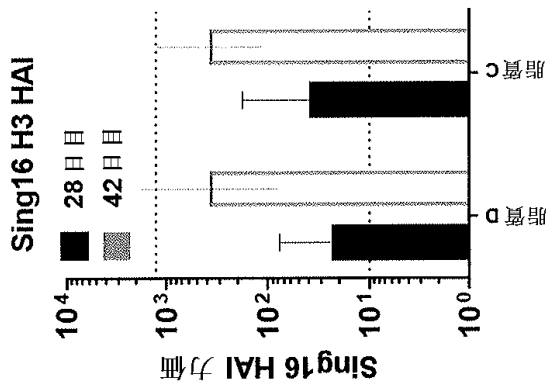


FIG. 28

10

20

30

40

50

【図 29】

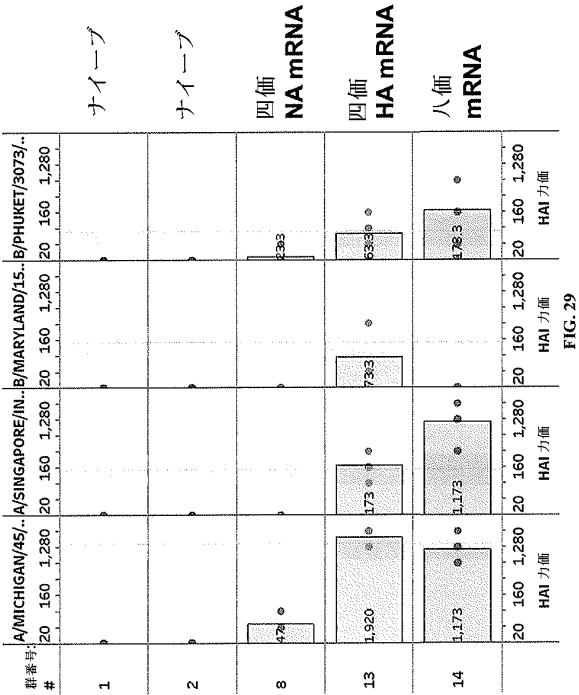


FIG. 29

【図 30】

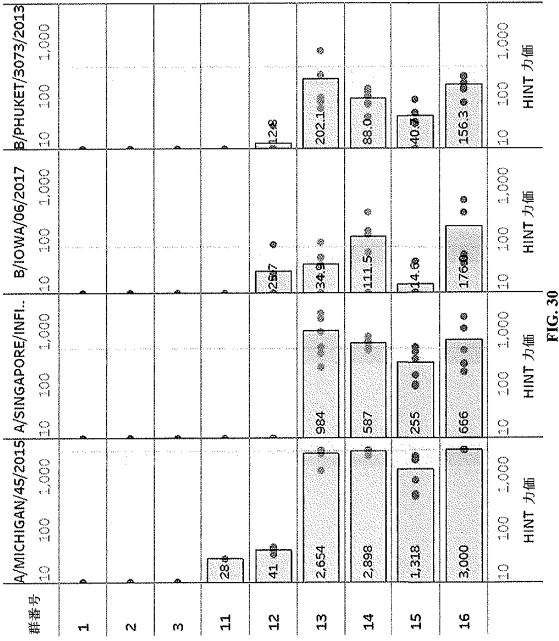


FIG. 30

【図 31】

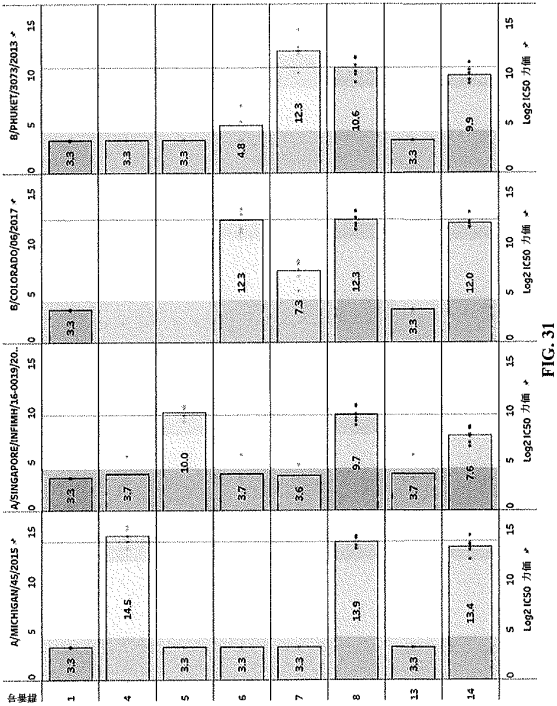


FIG. 31

【図 32】

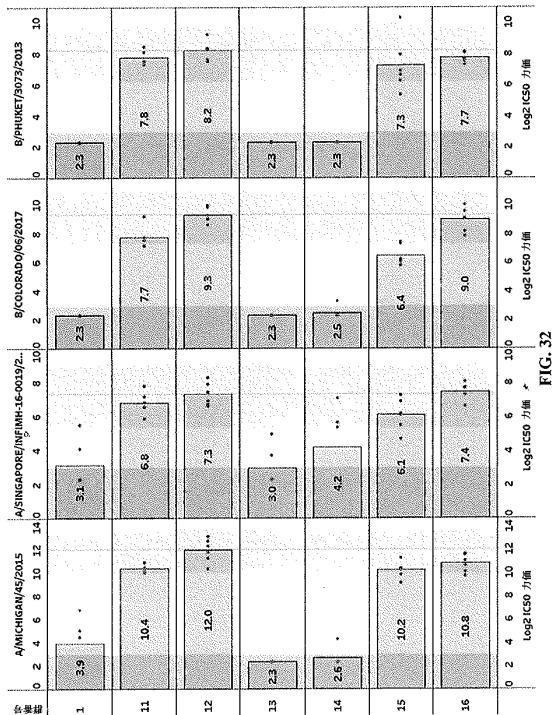


FIG. 32

10

20

30

40

50

【図 33】

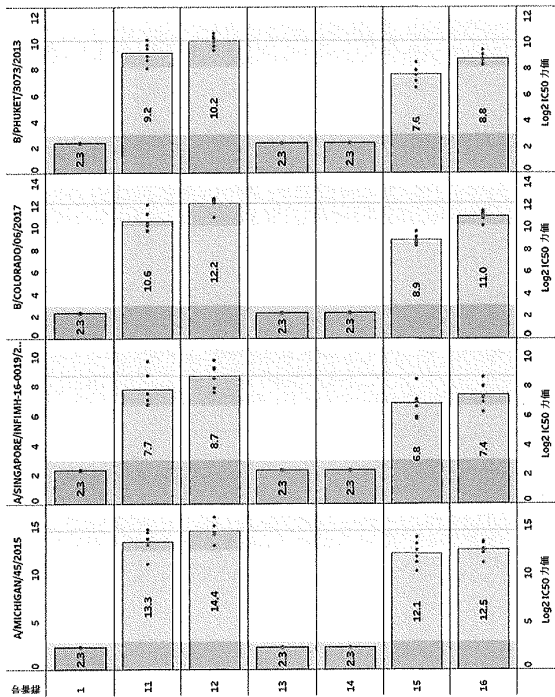


FIG. 33

【配列表】

2024528418000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/055655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/51 A61K47/02 A61K47/26 A61P31/16 A61P37/04
A61K39/145 A61K39/00 A61K39/12

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS 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 2017/070620 A2 (MODERNATX INC [US]) 27 April 2017 (2017-04-27)	1-24, 26-31, 33-51
Y	page 2 - page 25; claim all; table all page 23, line 10 - page 40, line 30 page 47, line 4 - page 89, line 27 page 112, line 31 - page 122, line 8 claims 1-66 -----	10, 25, 32
Y	US 10 201 618 B2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 12 February 2019 (2019-02-12) example all ----- -/-	10, 25, 32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 2022

Date of mailing of the international search report

29/09/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fellows, Edward

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/055655

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/056294 A1 (TRANSLATE BIO INC [US]) 19 March 2020 (2020-03-19) page 3, paragraph 14 - page 7, paragraph 38 page 27, paragraph 110 - page 84, paragraph 252 page 96, paragraph 291 claims 1-91 -----	10, 25, 32
Y	NORBERT PARDI ET AL: "Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 22 August 2018 (2018-08-22), page 3361, XP055684007, DOI: 10.1038/s41467-018-05482-0 abstract; example all page 9, left-hand column, last paragraph - page 9, right-hand column, paragraph 2 -----	10, 25, 32
Y	OWEN S. FENTON ET AL: "Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery", ADVANCED MATERIALS, vol. 28, no. 15, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 2939-2943, XP055679419, DE ISSN: 0935-9648, DOI: 10.1002/adma.201505822 example all -& OWEN S. FENTON ET AL: "Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery - Supporting Information", ADVANCED MATERIALS, vol. 28, no. 15, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 1-10, XP055297252, DOI: 10.1002/adma.201505822 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5245883/#SD1 [retrieved on 2022-09-19] example all -----	10, 25, 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2022/055655
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:	
	☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.	
	☐ on paper or in the form of an image file.	
b.	☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.	
c.	☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:	
	☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).	
	☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/055655

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017070620 A2	27-04-2017	AU 2016342048 A1	07-06-2018
		BR 112018008078 A2	13-11-2018
		CA 3003103 A1	27-04-2017
		CN 109310751 A	05-02-2019
		EP 3365007 A2	29-08-2018
		JP 2018537521 A	20-12-2018
		JP 2022031942 A	22-02-2022
		KR 20180096591 A	29-08-2018
		MA 46023 A	03-07-2019
		RU 2018118337 A	25-11-2019
		US 2018311336 A1	01-11-2018
		WO 2017070620 A2	27-04-2017
US 10201618 B2	12-02-2019	AU 2016278970 A1	18-01-2018
		AU 2021200199 A1	18-03-2021
		CA 2990172 A1	22-12-2016
		CN 107848988 A	27-03-2018
		CN 113968823 A	25-01-2022
		EP 3310764 A1	25-04-2018
		HK 1251901 A1	26-04-2019
		JP 6800410 B2	16-12-2020
		JP 2018519285 A	19-07-2018
		US 2016367686 A1	22-12-2016
		US 2019240349 A1	08-08-2019
		US 2020353099 A1	12-11-2020
WO 2020056294 A1	19-03-2020	EP 3849617 A1	21-07-2021
		WO 2020056294 A1	19-03-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
C 1 2 N 15/44 (2006.01)	C 1 2 N 15/44	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00	

(32)優先日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US2021/058250

(32)優先日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,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,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. M A T L A B

2. T W E E N

トメント

(72)発明者 ティモシー・アレファンティス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02142・ケンブリッジ・ビニー・ストリート50・サノフィ・パテント・デパートメント

Fターム (参考) 4C076 AA65 BB11 BB15 BB16 DD26 DD49 DD63 DD70 EE23
4C084 AA13 MA38 MA66 NA13 ZB33
4C085 AA03 BA55 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA38 MA66 NA13 ZB33