

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-530047
(P2024-530047A)

(43)公表日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/165 (2006.01)	C 0 7 K	14/165	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/50 (2006.01)	C 1 2 N	15/50		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全94頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-508334(P2024-508334)	(71)出願人	510332958
(86)(22)出願日	令和4年8月11日(2022.8.11)		マクファーレン バーネット インスティ
(85)翻訳文提出日	令和6年3月28日(2024.3.28)		テュート フォー メディカル リサーチ
(86)国際出願番号	PCT/AU2022/050880		アンド パブリック ヘルス リミテッド
(87)国際公開番号	WO2023/015352		MACFARLANE BURNET I
(87)国際公開日	令和5年2月16日(2023.2.16)		NSTITUTE FOR MEDICA
(31)優先権主張番号	2021902500		L RESEARCH AND PUBL
(32)優先日	令和3年8月11日(2021.8.11)		IC HEALTH LTD
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)		オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア
(31)優先権主張番号	2021902530	(74)代理人	100092783
(32)優先日	令和3年8月13日(2021.8.13)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)	(74)代理人	100120134
(31)優先権主張番号	PCT/AU2022/050429		弁理士 大森 規雄
	最終頁に続く	(72)発明者	ボウムボーリオス, パンテリス
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ワクチン抗原

(57)【要約】

本明細書の分野は、全般的には、SARS-CoV-2ワクチンスパイクタンパク質抗原並びにこれらの抗原を使用及び製造する方法に関する。本発明はまた、SARS-CoV-2ワクチン抗原をコードするベクター及びポリヌクレオチド、並びにコロナウイルスワクチン抗原を含むワクチン、キット、デバイス、及びストリップに関する。SARS-CoV-2からのスパイクタンパク質は、986位、987位で置換されたプロリン（2P又はS-2P）、並びにA1016位及びA1020位で追加のアラニン空洞充填変異を有する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コロナウイルス（C o V）S タンパク質トリマーを含む C o V ワクチン抗原であって、前記 S タンパク質トリマーが、前記 S タンパク質トリマーのコイルドコイル領域内のアラニン空洞のサイズを低減させる構造的改変を含むように改変され、前記 S タンパク質トリマーが、中和抗体応答を誘発する、C o V ワクチン抗原。

【請求項 2】

前記構造的改変が、前記コイルドコイル内である、請求項 1 に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 3】

前記構造的改変が、前記アラニン空洞に人工疎水性コアを作製する、請求項 1 又は 2 に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 4】

前記構造的改変が、アミノ酸置換、ジスルフィド結合、水素結合、パイスタッキング（ π - π スタッキング）、塩橋、ファンデルワールス相互作用、又はプロリン安定化、のうちの 1 つ以上である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 5】

1 つ又は前記：

i) 前記 S タンパク質トリマーの熱安定性が、前記構造的改変を伴わない S タンパク質トリマーと比較して増加する、及び

i i) 変性剤安定性が、前記構造的改変を伴わない S タンパク質トリマーと比較して増加する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 6】

前記 S タンパク質トリマーの A C E 2 受容体結合ドメイン（R B D）が、下向き（非 A C E 2 結合準備）方向にある、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 7】

前記 S タンパク質トリマーの S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域内の少なくとも 1 つのアミノ酸が、より疎水性のアミノ酸で置換されている、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 8】

前記 S タンパク質トリマーの S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域内の少なくとも 2 つのアミノ酸が、より疎水性のアミノ酸で置換されている、請求項 7 に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのアミノ酸又は少なくとも 2 つのアミノ酸が、前記 S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域の 7 残基反復（h e p t a d r e p e a t）モチーフの位置 a 及び／又は d にある、請求項 7 又は 8 に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 10】

前記より疎水性のアミノ酸が、以下の特性：

i) アラニンよりも高い疎水性、

i i) アラニンよりも大きい疎水性アミノ酸である、

i i i) 2 の p H で 4.7 を超える疎水性、

i v) 7 の p H で 4.1 を超える疎水性、並びに

v) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンから選択される、のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 11】

前記 S タンパク質トリマーにおける前記 S タンパク質モノマーが、S A R S - C o V - 2 S タンパク質モノマーである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン

10

20

30

40

50

ン抗原。

【請求項 12】

前記 S タンパク質トリマーにおける前記 S タンパク質モノマーが、

i) VOC / VOI 変異: S13I、L18F、T19R、T20N、P26S、A67V、delH69-V70、D80A、T95I、D138Y、G142D、delY144、W152C、E154K、E156del、F157del、R158G、R190S、D215G、del242-245、D253G、R246I、K417N / T、N439K、L452R / Q、Y453F、S477N、T478K、E484K / Q、N501Y、F565L、A570D、D614G、H655Y、Q677H、P681H / R、I692V、A701V、T716I、F888L、D950N、S982A、T1027I、Q1071H、D1118H、A67V、del69-70、T95I、del142-144、Y145D、del211、L212I、ins214EPE、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493R、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969K、及び L981F、

ii) 配列番号 1 ~ 配列番号 3、配列番号 6、及び配列番号 08、又はそれらと少なくとも 90% 同一の配列のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列、

iii) iii) に列挙される変異のうちの 1 つ以上を含む、配列番号 1 ~ 配列番号 3、配列番号 6、及び配列番号 8 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列、

iv) SARS-CoV-2 懸念されるバリエーションの S タンパク質残基 1 ~ 1208、

v) SARS-CoV-2 注目すべきバリエーションの S タンパク質残基 1 ~ 1208、

vi) S タンパク質残基 1 ~ 1208 SARS-CoV-2 甚大な被害が想定されるバリエーション、並びに

vii) 配列番号 25 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列、

viii) iii) に列挙される前記変異のうちの 1 つ以上を含む、配列番号 25 の前記アミノ酸配列、のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 13】

前記 ワクチン抗原が、膜貫通ドメイン及び三量体化配列の一方又は両方を欠いている、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 14】

前記 ワクチン抗原が、膜貫通ドメイン及び三量体化配列の両方のうちの 1 つを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 15】

S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域における前記少なくとも 1 つのアミノ酸が、A1016 である、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 16】

A1016 が、バリンで置換されている、請求項 15 に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 17】

S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域における前記少なくとも 1 つのアミノ酸が、A1020 である、請求項 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 18】

A1020 が、イソロイシンで置換されている、請求項 17 に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 19】

S タンパク質モノマーの前記コイルドコイル領域における前記少なくとも 1 つのアミノ酸が、バリンで置換された A1016 であり、A1020 が、置換したイソロイシンである、請求項 8 ~ 18 のいずれか一項に記載の CoV ワクチン抗原。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記 S タンパク質トリマーが、前記中和抗体応答：

- a) 前記 R B D に指向された中和抗体、
- b) N 末端ドメイン (N T D) に指向された中和抗体、並びに
- c) 前記 R B D 及び N T D の外側の S 1 における未定義のエピトープでの中和抗体、のうちの 1 つ以上を誘発する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 2 1】

前記抗原が、前記 R B D の外側のエピトープ（例えば、配列番号 1 のアミノ酸 1 6 ～ 3 2 9 及び 5 2 2 ～ 1 2 0 8、又は配列番号 1 のアミノ酸 1 6 ～ 3 2 9）に対する広範囲に中和する抗体応答を生じる、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

10

【請求項 2 2】

前記抗原が、可溶性抗原である、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 2 3】

前記抗原が、融合前立体構造で安定化されている、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 2 4】

前記抗原が、安定性及び／又は免疫原性を増強する 1 つ以上の更なる改変領域を含む、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

20

【請求項 2 5】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス (C o V) ワクチン抗原の前記 S タンパク質モノマーをコードする、ベクター又はポリヌクレオチド。

【請求項 2 6】

本明細書に記載のポリヌクレオチド配列を含むか、あるいは本明細書に記載の前記ポリヌクレオチド配列内の天然に存在する塩基に対して最適化されたコドン又はそれらに対する類似体若しくは改変を含む、請求項 2 5 に記載のベクター又はポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

前記ベクター又はポリヌクレオチドが、リボ核酸である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載のベクター又はポリヌクレオチド。

30

【請求項 2 8】

請求項 2 5 ～ 2 7 のいずれか一項に記載のベクター又はポリヌクレオチドを含む、脂質ナノ粒子。

【請求項 2 9】

請求項 2 5 又は 2 7 に記載のベクター又はポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項 3 0】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス (C o V) ワクチン抗原を産生する方法であって、請求項 2 9 に記載の宿主細胞を培養培地で培養することを含む、方法。

【請求項 3 1】

前記細胞及び／又は細胞培養培地から C o V ワクチン抗原、S タンパク質、ベクター、又はポリヌクレオチドを単離することを更に含む、請求項 3 0 に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス (C o V) ワクチン抗原を含む、タンパク質ナノ粒子。

【請求項 3 3】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス (C o V) ワクチン抗原を含む、ウイルス様粒子。

【請求項 3 4】

請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス (C o V) ワクチン抗原、又は

50

請求項 25～27 のいずれか一項に記載のコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原の前記 S タンパク質モノマーをコードする前記ベクター若しくはポリヌクレオチド、又は請求項 32 に記載のタンパク質ナノ粒子、又は請求項 33 に記載のウイルス様粒子を含む、ワクチン。

【請求項 35】

前記ワクチンが、ブースターワクチンである、請求項 34 に記載のワクチン。

【請求項 36】

前記ブースターワクチンが、C o V：V O C、V O I、及び V H C のうちの 1 つ以上に対する防護を提供する、請求項 35 に記載のワクチン。

【請求項 37】

前記ワクチンが、S A R S－C o V－2 に対する防護を提供する、請求項 34～36 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 38】

前記ワクチンが、a) m R N A ベースのワクチン、b) D N A ベースのワクチン、c) ウイルスベクターワクチン、d) 不活化ワクチン、e) 弱毒化生ワクチン、及び f) タンパク質サブユニットワクチンから選択される、請求項 34～37 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 39】

前記ワクチンが、少なくとも 1 つの更なる C o V ワクチン抗原、又は C o V ワクチン抗原をコードして、発現することができる更なるベクター若しくはポリヌクレオチドを更に含む、請求項 34～38 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 40】

前記ワクチンが、アジュバントを含む、請求項 34～39 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 41】

前記アジュバントが、アルミニウム塩ベースのアジュバント、エマルジョンアジュバント、及び T L R アゴニストのうちの 1 つ以上から選択される、請求項 40 に記載のワクチン。

【請求項 42】

前記ワクチンが、脂質ナノ粒子を含む、請求項 34～41 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 43】

対象におけるコロナウイルス（C o V）に対する免疫応答を誘導する方法であって、前記方法が、請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 44】

対象におけるコロナウイルス（C o V）に対する前記免疫応答を増強する方法であって、前記方法が、対象に請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 45】

対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の可能性を予防又は低減する方法であって、前記方法が、対象に請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 46】

対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の可能性又はその症状の重症度を予防、又は低減する方法であって、前記方法が、対象に請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 47】

対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の重症度及び／又は持続期間を低減する方法であって、前記方法が、対象に請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投

10

20

30

40

50

与することを含む、方法。

【請求項 48】

コロナウイルス（C o V）に感染したヒト個体におけるウイルス排出を予防又は低減する方法であって、前記方法が、対象に請求項 34～42 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 49】

前記 C o V が、S A R S - C o V - 2 である、請求項 43～48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記対象が、過去の C o V 感染を有した、請求項 43～49 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 51】

前記ワクチンが、対象が一次 C o V ワクチンレジメンを受けた後に投与される、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記ワクチンが、筋肉内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、舌下、扁桃、経口、肺、局所、又は他の非経口及び粘膜の経路で投与される、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

i) 対象における C o V 感染の可能性を予防又は低減すること、 20
i i) 対象における C o V 症状の重症度の可能性を予防又は低減すること、
i i i) 対象における C o V 感染の重症度及び／又は持続期間を低減すること、
i v) 対象におけるウイルス排出を予防又は低減すること、並びに
v) 対象における C o V 感染を治療すること、のうちの 1 つ以上における使用のための、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の C o V ワクチン抗原。

【請求項 54】

請求項 1～24 のいずれか一項に記載のコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原を含む、キット、デバイス、表面、又はストリップ。

【請求項 55】

i) 対象における C o V 感染の可能性を予防又は低減すること、 30
i i) 対象における C o V 症状の重症度の可能性を予防又は低減すること、
i i i) 対象における C o V 感染の重症度及び／又は持続期間を低減すること、
i v) 対象におけるウイルス排出を予防又は低減すること、並びに
v) 対象における C o V 感染を治療すること、のうちの 1 つ以上のための医薬品の製造における、請求項 1～24 のいずれか一項に記載のコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原の、使用。

【請求項 56】

集団におけるコロナウイルス（C o V）感染に関連する治療予防又は検査するための調製物の製造における、前記抗原又はコード配列の、使用。

【請求項 57】

異種三量体化配列を欠いている可溶性 S タンパク質トリマーを産生する方法であって、前記 S タンパク質トリマーが、前記 S タンパク質トリマーの前記コイルドコイル領域内の前記アラニン空洞のサイズを低減させる構造的改変を含むように改変され、前記 S タンパク質トリマーが、中和抗体応答を誘発する、方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書の分野は、全般的には、コロナウイルスワクチン抗原並びにコロナウイルスワクチン抗原を使用及び製造する方法に関する。本発明はまた、コロナウイルスワクチン抗原をコードするベクター及びポリヌクレオチド、並びにコロナウイルスワクチン抗原を含 50

むワクチン、キット、デバイス、及びストリップに関する。

【背景技術】

【0002】

対象明細書における参考文献の書誌詳細は、明細書の最後にも列挙されている。

【0003】

本明細書におけるいずれかの従来技術への言及は、この従来技術が任意の国における共通の一般的知識の一部を形成するという承認又はいずれかの形態の示唆として解釈されるべきではない。

【0004】

SARS-CoV-2は、世界中で400万人以上の人々を死なせており、強い年齢依存性の感染死亡率を有した。インビボでの発現及び中和抗体(NAb)誘導のために祖先SARS-CoV-2由来のウイルス性スパイク糖タンパク質(S)配列を送達する第1世代ワクチンは、症候性及び重度のCOVID-19を予防することに非常に有効であることが証明されており、世界中に展開されている。非常に有効なSワクチンプラットフォームとしては、(Pfizer-BioNTech, BNT162b2、Moderna mRNA-1273)(Baden et al., 2021、Polack et al., 2020)、アデノウイルス26及びアデノウイルス5 (Ad26、Ad5)(Sputnik V、Janssen COVID-19)(Logunov et al., 2021、Sadoff et al., 2021)、及びチンパンジーアデノウイルス(Astrazeneca/Oxford, ChAdOx1 nCoV-19)(Emary et al., 2021、Madhi et al., 2021、Voysey et al., 2021)が挙げられる。S内の中和抗体(NAb)に対する脆弱性の部位が、COVID-19患者からのモノクローナルNAbの単離によって明らかにされている。SのACE2受容体結合ドメイン(RBD)は、自然感染における免疫優性抗体標的であり、RBDに対して指向された非常に強力なNAbは、ACE2受容体模倣(例えば、B38)を介して、又はACE2結合の立体遮断(例えば、H4)を介して、又は2つのRBDモノマー(例えば、2-43)によって形成される四元エピトープ(quaternary epitope)に結合することによって、感染をブロックすることができる。S1のN末端ドメイン(NTD)は、攻撃を受けやすいスーパーサイトとして特定されており、複数の抗原性部位を含む(Andreano et al., 2020、Cerutti et al., 2021、Liu, et al., 2020、McCallum et al., 2021)。この領域は、抗体を回避するために、欠失、挿入、及びグリカン付加を獲得する高度の適応性を示す。未定義の中和エピトープもまた、S1及びS2内に観察されている(Brouwer et al., 2020、Jennewein et al., 2021)。

【0005】

SARS-CoV-2に対する自然獲得免疫は、回復期及びワクチン誘導免疫血清並びにヒトモノクローナルNAbの中和能力を低減させるRBD及びNTDにおける変異を伴う懸念されるバリエーション(VOC)の出現を促進すると考えられる(Plante et al., 2021)。VOCのRBDに観察される主要な変異には、K417T/N、N439K、L452R、Y453F、S477N、T478K、E484K/Q、及びN501Yが含まれるが、NTDでは、アミノ酸69~70、156~157、及び242~245の欠失が観察されている。ワクチンの有効性はまた、ウイルスS配列及びワクチンモダリティに応じてVOCで異なり得る。したがって、ChAdOx1-nCoV-19ワクチン有効性は、アルファ/B.1.1.7単離株の場合に81.5%から70.4%に低減した(Emary et al., 2021)が、有効性は、ベータ/B.1.351単離株では10.4%に低減した(Madhi et al., 2021)。これらのVOCに対するChAdOx1-nCoV-19の低減した有効性は、VOCに対するワクチン血清の低減したインビトロでの中和能力と相関するように思われる(Dejirattisai et al., 2021、Supasa et al., 2021)

10

20

30

40

50

）。mRNAワクチン接種者血清の中和能力は、VOCについても低減される（Alter et al., 2021、Dejnirattisai et al., 2021、Garcia-Beltran et al., 2021、Liu et al., 2021、Supasa et al., 2021、Tada et al., 2021）。しかしながら、BNT162b2による完全なワクチン接種は、アルファ及びベータバリエーションによって引き起こされた感染及び疾患に対する高レベルの防護を提供する（Abu-Raddad et al., 2021）が、ブレークスルー感染が発生している場合、これらはVOCと関連していることが見出されている（Kustin et al., 2021）。現在のワクチンは、これまでのところ、ほとんどのVOCに対して実質的な有効性を保持しているが、部分的に免疫のあるヒト集団の環境でパンデミックが進行するにつれて、出現するウイルスバリエーションに対する免疫を維持するために、VOC適合したワクチンでブーストすることが必要とされ得る。

10

【0006】

したがって、コロナウイルスに対する免疫応答を誘発するための改善された抗原が必要とされている。特に、コロナウイルスVOCに対する免疫応答を誘発するための改善された抗原が必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

「及び／又は」という用語、例えば「X及び／又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味するものと理解され、両方の意味又はいずれかの意味の明示的な支持を提供するものと理解される必要がある。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、逆に述べられない限り、指定された値の+/-10%、より好ましくは+/-5%、更により好ましくは+/-1%を指す。

20

【0008】

本明細書全体を通して、「含む（comprise）」、又は「含む（comprises）」若しくは「含む（comprising）」などのバリエーションは、記載された要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群の包含を意味するが、任意の他の要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群の除外を意味するものではないことが理解されるであろう。

【0009】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、単数及び複数の指示対象を含む。本明細書における各実施形態は、別途明記されない限り、他の全ての実施形態に準用される。

30

【0010】

ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、配列識別子番号（配列番号）によって言及される。配列番号は、配列識別子<400>1（配列番号1）、<400>2（配列番号2）などに数値的に対応する。配列表が請求項の後に提供される。

【0011】

態様では、本発明は、コロナウイルスSタンパク質トリマーを含むコロナウイルスワクチン抗原を提供し、Sタンパク質トリマーは、Sタンパク質トリマーのコイルドコイル領域内のアラニン空洞のサイズを低少させる構造的改変を含むように改変されており、Sタンパク質トリマーは、中和抗体応答を誘発する。

40

【0012】

態様では、本発明は、コロナウイルスSタンパク質トリマーを含むコロナウイルスワクチン抗原を提供し、Sタンパク質トリマーのコイルドコイルを形成するSタンパク質モノマーの領域内の少なくとも1つのアミノ酸は、より疎水性のアミノ酸で置換されている。

【0013】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（CoV）ワクチン抗原のSタンパク質モノマーをコードするベクター又はポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞又はワクチンレシピエント細胞における発現の

50

ためにコドン最適化される。

【0014】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原のSタンパク質モノマーをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド相補体を提供する。

【0015】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるベクター又はポリヌクレオチドを含む、宿主細胞を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、ワクチンレシピエント細胞ではない、インビトロ発現のための宿主細胞である。

【0016】

態様では、本発明は、本明細書に記載される宿主細胞を培地で培養することを含む、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原を産生する方法を提供する。

【0017】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原を含む、タンパク質ナノ粒子を提供する。

【0018】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原を含む、ウイルス様粒子を提供する。

【0019】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるベクター若しくはポリヌクレオチド、抗原、タンパク質ナノ粒子、又はVLPを含有するバイアル又は固体若しくは半固体表面を提供する。

【0020】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原、又は本明細書に記載されるベクター若しくはポリヌクレオチド、又は本明細書に記載されるタンパク質ナノ粒子、又は本明細書に記載されるウイルス様粒子を含むワクチンを提供する。

【0021】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス（C o V）に対する免疫応答を誘導する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0022】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス（C o V）に対する免疫応答を増強する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0023】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の可能性を予防又は低減する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0024】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の可能性又はその症状の重症度を予防又は低減する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0025】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス（C o V）感染の重症度及び／又は持続期間を低減する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0026】

態様では、本発明は、コロナウイルス（C o V）に感染したヒト個体におけるウイルス排出を予防又は低減する方法を提供し、方法は、本明細書に記載のワクチンを投与することを含む。

【0027】

態様では、本発明は、i) 対象におけるC o V感染の可能性を予防又は低減すること、

10

20

30

40

50

i i) 対象におけるC o V症状の重症度の可能性を予防又は低減すること、i i i) 対象におけるC o V感染の重症度及び／又は持続期間を低減すること、i v) 対象におけるウイルス排出を予防又は低減すること、並びにv) 対象におけるC o V感染を治療すること、のうちの1つ以上で使用するために本明細書に記載されるC o Vワクチン抗原又は本明細書に記載されるワクチンを提供する。

【0028】

態様では、本発明は、本明細書に記載されるコロナウイルス（C o V）ワクチン抗原を含むキット、デバイス、表面、又はストリップを提供する。

【0029】

態様では、本発明は、i) 対象におけるC o V感染の可能性を予防又は低減すること、i i) 対象におけるC o V症状の重症度の可能性を予防又は低減すること、i i i) 対象におけるC o V感染の重症度及び／又は持続期間を低減すること、i v) 対象におけるウイルス排出を予防又は低減すること、並びにv) 対象におけるC o V感染を治療すること、のうちの1つ以上のための医薬品の製造における、コロナウイルス（C o V）ワクチン抗原の使用を提供する。

【0030】

態様では、本発明は、集団におけるコロナウイルス（C o V）感染に関連して治療、予防、又は検査するための調製物の製造における、抗原又はコード配列の使用を提供する。一実施形態では、本明細書に記載される安定したトリマーSタンパク質を使用して、中和抗体を調製する。

【0031】

態様では、本発明は、異種三量体化配列を欠いている、可溶性Sタンパク質トリマーを提供し、Sタンパク質トリマーは、Sタンパク質トリマーのコイルドコイル領域内のアラニン空洞のサイズを低減させる構造的改変を含むように改変されており、Sタンパク質トリマーは、中和抗体応答を誘発する。

【0032】

態様では、本説明は、以下の特性：

(i) 非ジスルフィド結合トリマーとして形成する、

(i i) 安定した非ジスルフィド結合トリマーとして形成する、

(i i i) 約58℃で熱的に安定であるトリマーを形成する、

(i v) 25℃でB2MEの有無にかかわらず、0.8% w/v SDSを用いた処理による破壊に対して対照（例えば、S2P-FHA）よりも耐性であるトリマーを形成する、

(v) B2ME無しで0.8% w/v SDSを用いて沸騰させることによって、破壊に対して適切な対照（例えば、S2P-FHA）よりも耐性であるトリマーを形成する、及び

(v i) 異種三量体化モジュール無しで安定した可溶性トリマーを形成する、のうちの1つ、又は2つ以上を特徴とするコロナウイルスSタンパク質ワクチン抗原トリマーを提供する。

【0033】

一実施形態では、本明細書に記載の改変コロナウイルスS抗原は、改変コイルドコイル領域によって誘導される構造的変化がトリマー安定性を増強し、発現されたトリマーを安定化する異種三量体化ドメインの使用を不要にするため、低減されたオフターゲット反応性を示すことが企図される。

【0034】

態様では、本説明は、少なくとも本明細書に記載される改変されたコロナウイルスSタンパク質抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含み、レシピエント細胞で発現することができる、ポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、改変抗原は、適切な対照と比較して、単離株依存的手段で広範囲に中和するエピトープの増強した曝露を示す。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0035】

【図1-1】図1A) コーディネートPDB ID 6VSBで描かれたSARS-CoV-2 S外部ドメインの3次元構造を表す(Walls et al., 2020)。RBMは、構造の上部に灰色で球として示される受容体相互作用アミノ酸を有するACE2受容体結合モチーフであり、RBDは、太い矢印として示されるベータ鎖を有する構造の上部における黒色での受容体結合ドメインであり、NTDは、太い矢印として表されるベータシートを有する灰色でのN末端ドメインである。S2の中央コイルドコイルは、明灰色で強調されたAla空洞を有する暗灰色での3つの垂直ヘリックスとして示される。

【図1-2】図1B) 3つのベータコロナウイルスのコイルドコイル配列内の7残基反復(heptad repeat)モチーフ。

10

【図1-3】図1C) 融合前(PDB ID 6VSB(Walls et al., 2020)及び融合後(PDB 6XRA(Cai et al., 2020)立体構造における中央コイルドコイルの比較。右側構造において白色で示されるHR1ヘリックスは、融合後立体構造において細胞膜に向かって上方に突出するコイルドコイルの伸張の基部を形成する(Cai et al., 2020)。

【図1-4】図1D) 融合前SのAla空洞が、疎水性アミノ酸による置換後にどのように補充され得るかの図解。

【図2】図2は、S2P-FHAの発現、結合特性、及び安定性を示す。A) 精製したS2P-FHAトリマーのSuperose 6サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)。B) 精製したS2P-FHAの還元条件下でのSDS-PAGE。C) ELISAにおけるACE2-Fc及び様々なヒトモノクローナル抗体とのアビジン捕捉ビオチン化S2P-FHAトリマーの結合。D) SYPRO Orangeを使用して行った精製したS2P-FHAタンパク質の示差走査蛍光測定。温度の関数としての経時的な蛍光の変化速度 $[-d(RFU)/dt]$ を示す。

20

【図3-1】図3は、Ala空洞変異体の発現及び安定性スクリーニングを示す。A) TALON二価カチオンアフィニティー樹脂を用いて培養上清から精製したS2P-FHA変異体の還元条件下でのSDS-PAGE。10%ポリアクリルアミドゲルをクーマシーブルーで染色した。

【図3-2】(図3の続き) B) SYPRO Orangeを使用して行った精製したSタンパク質の示差走査蛍光測定。温度の関数としての経時的な蛍光の変化速度 $[-d(RFU)/dt]$ を示す。

30

【図3-3】(図3の続き) B) SYPRO Orangeを使用して行った精製したSタンパク質の示差走査蛍光測定。温度の関数としての経時的な蛍光の変化速度 $[-d(RFU)/dt]$ を示す。

【図4-1】図4は、選択したAla空洞変異体の精製及び特性評価を示す。A) TALON樹脂からの溶離後、S2P-FHA及び選択したAla空洞変異体のSuperose 6 SEC。較正基準は、サイログロブリン(669 kDa)、フェリチン(440 kDa)、及びIgG(150 kDa)である。B) 凍結(-80℃)-融解サイクル後に精製したトリマーのSuperose 6 SEC。C) SYPRO Orangeを使用して行った精製したSタンパク質の示差走査蛍光測定。温度の関数としての経時的な蛍光の変化速度 $[-d(RFU)/dt]$ を示す。少なくとも2つの独立した実験の代表。

40

【図4-2】(図4の続き) D) 精製したS2P-FHAバリエーショントリマーの非還元(上部)及び還元(下部)条件下でのSDS-PAGE。10%ポリアクリルアミドゲルをクーマシーブルーで染色した。

【図5-1】図5は、ACE2-Fc及びAla空洞変異体に結合するヒトモノクローナル抗S2IgGのバイオレイヤー干渉測定を示す。A) 抗ヒトIgG捕捉バイオセンサーに固定化されたSリガンドとのS2P-FHA、1016L、及び1016/20VI分析物の結合。会合が300秒間、続いて解離が300秒間だった。S2P=S2P-FHA。

50

【図5-2】（図5の続き）A）抗ヒトIgG捕捉バイオセンサーに固定化されたSリガンドとのS2P-FHA、1016L、及び1016/20VI分析物の結合。会合が300秒間、続いて解離が300秒間だった。S2P=S2P-FHA。

【図5-3】（図5の続き）B）ヒートマップとして示される240秒の会合後の様々なリガンドとの300nMのS2P-FHA分析物の相対結合。

【図6-1】図6は、Ala空洞変異体の免疫原性を示す。A）免疫化プロトコル。B）RBD、S1モノマー、及びS2P-FHAトリマーが結合したプレートに対する最終採血したワクチン血清のELISA力価。免疫原群は、グラフの下に示される。エンドポイントは、一次抗体の非存在下で得られたバックグラウンドODの10倍のとして決定した。バーは、幾何平均である。S2P=S2P-FHA

【図6-2】（図6の続き）C）16週目のワクチン血清の偽ウイルス中和ID₅₀。S-HIV偽型アッセイで使用するS遺伝子型を、グラフの下に示す。ウィルコクソン符号順位検定を使用して、群間で観察されたID₅₀における差が有意か決定した：nsは有意でない、*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.01。B.1.351対Hu-1偽型の幾何平均中和ID₅₀及び平均中和の倍率減少をグラフの下に示す。S2P=S2P-FHA。D）Hu-1 RBD及びRBD-NKY（N417N/E484K/N501Y）変異体に対する血清の結合力価。エンドポイントは、一次抗体の非存在下で得られたバックグラウンドODの10倍のとして決定した。バーは幾何平均である。ns：有意でない。クラスカル・ワリス検定。S2P=S2P-FHA

【図7】図7は、ワクチン血清の祖先Hu-1 S-偽ウイルス中和ID₅₀を示す。ns：有意でない。**はP<0.01、クラスカル・ワリス検定。

【図8】図8は、変異体S偽型における16週目ワクチン血清の偽ウイルス中和ID₅₀を示す。S-HIV偽型アッセイで使したS遺伝子型を、グラフの下に示す。フリードマン検定を使用して、群間で観察されたID₅₀における差が有意か決定した：nsは有意でない、*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.001、****はP<0.0001。Hu-1=祖先Hu-1。

【図9-1】図9は、競合ELISAによって評価した誘発された抗体の特異性を示す。A）ワクチン血清の競合ID₅₀。0.5log₁₀連続希釈した最終採血ワクチン血清を、一定量のACE2-Fc及びヒトモノクローナル抗S IgGと混合してから、アビジン捕捉ビオチン化S2P-FHA及びAla空洞変異体とともにインキュベーションした。免疫原群が、グラフの下に示される。A）クラスカル・ワリス検定を使用して、群間で観察されたID₅₀の差が有意か決定した：nsは有意でない、**はP<0.01。

【図9-2】（図9の続き）B）S2P-FHAトリマーにおける抗体エпитオプの位置。S2P=S2P-FHA。B）SトリマーにおけるACE2-Fc及びヒトモノクローナル抗S IgG結合部位（エピトプ）の位置

【図10】図10は、配列番号1のアミノ酸配列を示す。

【図11】図11は、S2P（配列番号2）及びS2P-FHA（配列番号3）のアミノ酸配列を示す。

【図12】図12は、S2P（配列番号4）のヌクレオチド配列を示す。

【図13】図13は、S2P-FHAのヌクレオチド配列（配列番号5）を示す。

【図14】図14は、対象変異体S抗原が、野生型ウイルスをコードする現在の従来のワクチンよりも、野生型（Hu-1）ウイルスに対するより強い免疫応答、及び高い耐性バリエーション（ベータ）に対するより強い免疫応答を誘発することを示す。従来のワクチンを使用してヒトで生成されたワクチン応答と比較した、変異S偽型における16週目のワクチン血清の偽ウイルス中和ID₅₀。S-HIV偽型アッセイで使したS遺伝子型が、グラフの下に示される。データは、ヒトにおける2用量の従来のワクチン（右側に例示的な従来のワクチン（ヒトに与えられた2用量のmRNA又はアデノウイルスワクチン）の3～5週間後に得られた血清と比較した、1016/20VI（左側のBurnett VIs p i k e）を含有するS2P-FHAタンパク質トリマーでワクチン接種したモルモットからの一致したWT（Hu-1）ウイルス及び懸念される高耐性バリエーション（ベ-

10

20

30

40

50

タバリアント) に対する中和抗体応答を示す。ウィルコクソン符合順位検定を使用して、群間で観察されたID50における差が有意か決定した: nsは有意でない、 $P \geq 0.05$ 、**** $P < 0.0001$ 。

【図15】図15は、ワクチン血清のELISA結合力価を示す。A) アビジンコーティングELISAプレートに捕捉されたHu-1、デルタ、及びオミクロンBA.1バリアント(x軸に示される)に対応するビオチン化RBDモノマーに対するワクチン血清のELISA結合力価。免疫原群が、バリアント名の下に示される。エンドポイントは、一次抗体の非存在下で得られたバックグラウンドODの5倍のとして決定した。水平バーは、各免疫原群における幾何平均結合力価である。B) ELISAプレートに結合したHu-1、デルタ、及びオミクロンBA.1バリアント(x軸に示される)に対応するS2P-FHAに対するワクチン血清のELISA結合力価。免疫原群が、バリアント名の下に示される。エンドポイントは、一次抗体の非存在下で得られたバックグラウンドODの5倍のとして決定した。水平バーは、各免疫原群における幾何平均結合力価である。*、クラスカル・ワリス検定で決定されたHu-1糖タンパク質と比較して $P < 0.05$ 。P値が示されない場合、力価の差は、統計的に有意ではない。

10

【図16-1】図16は、中和アッセイの結果を示す。A) ワクチン血清の偽ウイルス中和ID50 (ID50 = 50%中和を引き起こす血清の逆数希釈)。S-HIV偽型アッセイで使用したSバリアント遺伝子型が、x軸の下に示される。血清が得られた免疫原群が、グラフの上に示される。個々の動物からの血清で得られたID50中和力価が、様々な記号で示される。バーは、各免疫原群における幾何平均ID50である。クラスカル・ワリス検定を使用して、群間で観察されたID50の差が有意か決定した: nsは有意でない。

20

【図16-2】(図16の続き) B) マイクロ中和アッセイにおいて、Hu-1、デルタ、オミクロンBA.1、及びベータ真正感染性SARS-CoV-2ウイルスを使用して、HAT-24細胞を用いてハイスループット方式で行った中和アッセイ。使用したSARS-CoV-2バリアントが、x軸の下に示される。血清が得られた免疫原群が、グラフの上に示される。個々の動物からの血清で得られたID50中和力価が、様々な記号で示される。水平バーは、各免疫原群の幾何平均ID50である。クラスカル・ワリス検定を使用して、バリアント間で観察されたID50における差が有意か決定した: nsは有意でない、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、****は $P < 0.0001$ 。

30

【図17】図17は、図15及び16に提示されるデータから、Hu-1と比較した、ビオチン-RBD及びS2P-FHA ELISA結合力価の幾何平均、中和ID50、並びに糖タンパク質及びウイルスバリアントでの平均力価における平均倍率の低減を示す。

【図18-1】図18は、SARS-CoV-2オミクロンBA.1懸念されるバリアントに由来するS2P-FHA (ここではS2P.オミクロン-FHAと称される) への1016/20VI (VI) 変異の導入が、糖タンパク質トリマーに超安定性を付与することを示す。A) TALONアフィニティークロマトグラフィーによる精製後、Exp-293F細胞で発現されたS2P.オミクロン-FHA、S2P.オミクロン.VI-FHA、及び293FS細胞で発現されたS2P-FHA (Hu-1由来) のSuperose6 SECプロファイル。分子量マーカであるサイログロブリン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、及びアルドラーゼ(158kDa)の溶離位置が、グラフの上に矢印で示される。破線枠は、B.に示される純粋なトリマーを得るためにプールした画分を示す。B) Aに示される実験から得られた推定S2P.オミクロン-FHA、S2P.オミクロン.VI-FHA、及びS2P-FHAトリマーのSuperose6 SECプロファイル。Aにおける破線枠は、Bを得るSuperose6における再溶離前に濃縮し、凍結(-80°C) - 融解サイクルに供した画分を示す。分子量マーカであるサイログロブリン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、及びアルドラーゼ(158kDa)の溶離位置は、グラフの上に矢印で示される。C) 熱アンフォルディングの温度を決定するための、SYPRO Orangeを使用して行われた精製S2P-

40

50

FHAタンパク質の示差走査蛍光測定。少なくとも2つの独立した実験の代表。

【図18-2】(図18の続き) D) 非還元及び還元(1% v/v ベータメルカプトエタノール)下での、S2P・オミクロン-FHA及びS2P・オミクロン・VIE-FHAトリマーのSDS-PAGE。この実験では、試料は電気泳動の前に沸騰させなかった。mはマーカー。E) 非還元及び還元(1% v/v ベータメルカプトエタノール)条件下での、S2P・オミクロン-FHA及びS2P・オミクロン・VIE-FHAトリマーのSDS-PAGE。試料は、電気泳動の前に5分間沸騰させた。様々な条件下でのS2P・オミクロン・VIE-FHA主バンドの位置が、矢印で示される。mはマーカー。F) 非還元(左のゲル)及び還元(1% v/v ベータメルカプトエタノール)(右のゲル)条件下での、S2P・オミクロン-FHA、S2P・オミクロン・VIE-FHA、及びS2P-FHAトリマーのSDS-PAGE。SDS含有試料緩衝液を、1% ベータメルカプトエタノールの添加及び無添加で試料に加え、試料を電気泳動前に、室温(25℃)で放置するか、又は3分間沸騰(100℃)させた。1mMビス(スルホスクシンイミジル)スベレートと化学的に架橋されているサイログロブリンを含めて、S2P・オミクロン・VIE-FHAトリマーの予想される位置(669kDa)を示した。推定されるS2P・オミクロン・VIE-FHAトリマーバンドが、矢印で示される。S2P・オミクロン・VIE-FHAは、ベータメルカプトエタノール及びSDSの存在下で沸騰した後にのみその単量体分子量に破壊されることに留意されたい。

10

【図19】図19は、ELISAにおける、ストレプトアビジン捕捉ビオチン化S2P・オミクロン-FHA(パネル左)及びビオチン化S2P・オミクロン・VIE-FHA(パネル右)トリマーとのヒト中和モノクローナル抗体の結合を示す。モノクローナルの特異性は、凡例の隣に示される。

20

【図20-1】図20は、1016/20VI(VI)変異は、T4フォルドン(foldon)三量体化タグの非存在下で、融合前安定化S外部ドメイン(残基16~1208)の三量体化を可能にすることを示す。A) 可溶化全長Sから得られた融合前Sトリマー外部ドメインのクライオEM構造(Cai et al., 2020)。受容体結合ドメインが黒色で示され、アラニン空洞を有する灰色のS2の中央コイルドコイル(1016/20VI変異が導入された)が濃い灰色で強調される。トリマーの下部にある3つのヘリックスは、クライオEM構造で可視化されるステムの一部である。破線の長方形は、クライオEM構造では可視化されないステムの一部を示す。単離で解明されたフォルドンドメインの結晶構造(Guthe et al., 2004)は、例示的な目的のために追加されている。核磁気共鳴によって解明された脂質バイセルにおけるS2膜貫通ドメイン(TMD)の残基1217~1237の構造(Fu and Chou, 2021)も、例示的な目的のために示される。垂直線は、パネルB~Dにおいて、それぞれ、SEC、熱蛍光(thermofluor)アッセイ、及びSDS-PAGEによって分析された構築物の範囲を示す。

30

【図20-2】(図20の続き) B) S2P-FHA、S2P-1208・H6、及びS2P・VIE-1208・H6のサイズ排除クロマトグラフィー。第1のパネル：TALONアフィニティークロマトグラフィーによって293FS細胞から精製されたS2P-FHAのSuperose6溶離プロファイル。矢印は、分子量標準：サイログロブリン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、及びアルドラーゼ(158kDa)の溶離位置を示す。第2のパネル：TALONアフィニティークロマトグラフィーによって293FS細胞から精製されたS2P-1208・H6(フォルドンドメインを欠いている)のSuperose6溶離プロファイル。第3のパネル：TALONアフィニティークロマトグラフィーによって293FS細胞から精製されたS2P・VIE-1208・H6(1016/20VI変異を含有し、フォルドンドメインを欠いている)のSuperose6溶離プロファイル。第4のパネル：hiTRAPアフィニティークロマトグラフィーによってExp1293F細胞から精製されたS2P・VIE-1208・H6(1016/20VI変異を含有し、フォルドンドメインを欠いている)のSuperose6溶離プロファイル。C) 熱アンフォルディングの温度を決定するために、SYPRO Or

40

50

angeを使用して行われた凍結（−80℃）－融解サイクル後の精製ストリマーの示差走査蛍光測定。少なくとも2つの独立した実験の代表。D）非還元及び還元条件下での精製タンパク質のSDS-PAGE。mはマーカー。

【図21-1】図21A）S2P-1273、S2P-FHA、及びS2P-1208、H6構築物の概略を示す。Lは天然リーダーペプチド、NTDはS1のN末端ドメイン、RBDは受容体結合ドメイン、（P）GSASは変異切断ヒューリン部位、tPALは組織プラスミノゲン活性化因子リーダーペプチド、TMDは膜貫通ドメイン、FHAはフォルドン-His8-avitag配列。

【図21-2】（図21の続き）B）293T細胞で発現されたHu-1、デルタ、並びにオミクロンBA.1S2P-1273、及びS2P.VI-1273糖タンパク質のSDS-PAGE-ウェスタンブロットを示す。Sタンパク質は、ウサギ抗S1ポリクローナル抗体で検出した。左のゲルは、10%ポリアクリルアミドゲルである。右のゲルは、4～12%ポリアクリルアミド勾配ゲルである。

【図22】図22は、FACSによって決定される、トランスフェクトした293T細胞の表面に発現されたS2P-1273糖タンパク質とのACE2-Fc及びヒトモノクローナルNAbの結合を示す。トランスフェクトした細胞を培養プレートから穏やかに脱離させ、インタクト細胞を、ACE2-Fc及び様々なヒトモノクローナルNAb、並びにAlexaFluorコンジュゲート化抗ヒト免疫グロブリンで染色した。細胞をヨウ化プロピジウムで対染色して、分析から死細胞を除外することを可能にした。HC33.1は、HCV特異的NAbであり、アイソタイプ（IgG1）対照として使用される。

【図23-1】図23A）非染色（nil）、中度（lo）の蛍光及び高度（hi）の蛍光S2P-1273発現細胞のゲーティング。

【図23-2】（図23の続き）B）グラフィカル形式でnil、lo、及びhiゲート内のACE2-Fc及びSにおける様々なエピトープに対して指向された5つのNAbで染色されたS2P-1273発現細胞の分布を示す代表的なデータ。

【図24】図24は、S2P.オミクロン-FHAのアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

【図25】図25は、S2P.オミクロン-FHAのDNA配列（配列番号7）を示す。

【図26】図26は、S2P-1208.H6のアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

【図27】図27は、S2P-1208.H6のDNA配列（配列番号9）を示す。

【図28】図28は、S2P-1273のタンパク質配列（配列番号10）を示す。

【図29】図29は、S2P-1273のDNA配列（配列番号11）を示す。

【図30】図30は、S2P.デルタ-1273のタンパク質配列（配列番号12）を示す。

【図31】図31は、S2P.デルタ-1273のDNA配列（配列番号13）を示す。

【図32】図32は、S2P.オミクロン-1273のタンパク質配列（配列番号14）を示す。

【図33】図33は、S2P.オミクロン-1273のDNA配列（配列番号15）を示す。

【図34】図34は、S2P-1208オープンリーディングフレームをコードするmRNAワクチン配列の例（配列番号16）を示す。この配列における「U」は、シュードウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを示す。

【図35】図35は、S2P.VI-1273オープンリーディングフレームをコードするmRNAワクチン配列の例（配列番号17）を示す。この配列における「U」は、シュードウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを示す。

【図36】図36は、S2P.デルタ.VI-1273オープンリーディングフレームをコードするmRNAワクチン配列の例（配列番号18）を示す。この配列における「U」は、シュードウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを示す。

【図37】図37は、S2P.オミクロン.VI-1273オープンリーディングフレームをコードするmRNAワクチン配列の例（配列番号19）を示す。この配列における「

10

20

30

40

50

U」は、シュードウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを示す。

【図38】図38は、トランスフェクトした293T細胞溶解物に由来するS2P-1273及びS2P.オミクロン-1273のSDS-PAGE/ウェスタンブロット分析を、1.2% (w/v) SDS及び0.25% (v/v) ベータメルカプトエタノールの存在下での様々な熱処理後に示す。AA：アミノ酸1016位及び1020位にAlaを含有する構築物、VI：アミノ酸1016位及び1020位にそれぞれVal及びIleを含有する構築物。0.67% SDSを用いて室温で5分間処理した精製S2P.オミクロン-FHAトリマーのAA及びVI型を含めて、それぞれ、Sモノマー及びトリマーの位置を示した。試料を、5% SDS-PAGEゲルで電気泳動し、ニトロセルロースに移し、ウサギ抗S1及び抗ウサギIRDye800でブロットした。ブロットをLICOR Odyssey装置でスキャンした。

【図39】図39は、1016/20VI (VI) 変異は、T4フォルドン三量体化タグの非存在下で、融合前安定化オミクロンBA.1S外部ドメイン (残基16~1208) の三量体化を安定化することを示す。A) hitRAPアフィニティークロマトグラフィーによってExp1293F細胞から精製されたS2P.オミクロン. BA.1-1208. H6 (上) 及びS2P.オミクロン. BA.1. VI-1208. H6 (下) のSuperose6サイズ排除クロマトグラフィー。B) Aで精製したS2P.オミクロン. BA.1-1208. H6 (上) 及びS2P.オミクロン. BA.1. VI-1208. H6 (上) トリマーの凍結 (-80℃) -融解サイクル後のSuperose6サイズ除外クロマトグラフィー。C) 熱アンフォルディングの温度を決定するために、SYPRO Orangeを使用して行った凍結 (-80℃) -融解サイクル後の精製Sトリマーの示差走査蛍光測定。D) 精製タンパク質の非還元条件下でのSDS-PAGE及びクーマシーブルー染色。WT：アミノ位置1016及び1020でAla、VI：アミノ位置1016及び1020でそれぞれVal及びIle。

【図40】図40は、ACE2-Fc及びAla空洞変異体に結合するヒトモノクローナル抗S IgGのバイオレイヤー干渉測定を示す。A) Hu-1配列に由来するS2P-FHA及びS2P. VI-FHA分析物と、抗ヒトIgG捕捉バイオセンサーに固定されたSリガンドとの結合。B) オミクロン. BA.1配列に由来するS2P-FHA及びS2P. VI-FHA分析物と、抗ヒトIgG捕捉バイオセンサーに固定されたSリガンドとの結合。会合が300秒間、続いて解離が300秒間だった。

【図41】図41は、S2P.オミクロン-1208のタンパク質配列 (配列番号25) 。

【図42】図42は、S2P.オミクロン-1208のDNA配列のタンパク質配列 (配列番号26) 。

【0036】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

配列表への鍵

配列番号 1	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 表面糖タンパク質	アミノ酸配列
配列番号 2	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P	アミノ酸配列
配列番号 3	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-FHA	アミノ酸配列
配列番号 4	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P	ヌクレオチド配列
配列番号 5	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-FHA	ヌクレオチド配列
配列番号 6	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P オミクロン-FHA	アミノ酸配列
配列番号 7	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P オミクロン-FHA	ヌクレオチド配列
配列番号 8	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-1208.H6	アミノ酸配列
配列番号 9	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-1208.H6	ヌクレオチド配列
配列番号 10	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-1273	アミノ酸配列
配列番号 11	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-1273	ヌクレオチド配列
配列番号 12	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.デルタ.1273	アミノ酸配列
配列番号 13	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.デルタ.1273	ヌクレオチド配列
配列番号 14	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.オミクロン-1273	アミノ酸配列
配列番号 15	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.オミクロン-1273	ヌクレオチド配列
配列番号 16	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P-1208 オープンリーディングフレーム	ヌクレオチド配列
配列番号 17	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.VI-1273 オープンリーディングフレ ーム	ヌクレオチド配列
配列番号 18	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.デルタ.VI-1273 オープンリーディ ングフレーム	ヌクレオチド配列
配列番号 19	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 S2P.オミクロン.VI-1273 オープンリー ディングフレーム	ヌクレオチド配列
配列番号 20	フォルドン	アミノ酸配列
配列番号 21	FHA タグ	アミノ酸配列

10

20

30

40

【表 1 - 2】

配列番号 22	リンカー	アミノ酸配列
配列番号 23	リンカー	アミノ酸配列
配列番号 24	制限部位下流配列	ヌクレオチド配列
配列番号 25	S2P.オミクロン-1208 のアミノ酸配列	アミノ酸配列
配列番号 26	S2P.オミクロン-1208 の DNA 配列	アミノ酸配列

実施形態の考察

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は同等のあらゆる材料及び方法を使用して、本開示を実践又は試験することができる。実践者は、特に、当該技術分野の定義及び用語並びに当業者に既知の他の方法について、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supplement 47, John Wiley & Sons, New York, 1999、Colowick and Kaplan, eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir and Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications, 1986、Kontermann and Dubel (Ed), Antibody Engineering, Vol 1-2, Ed., Springer Press, 2010) に指示されている。

10

【0038】

祖先Hu-1株からのコロナウイルススパイク(S)タンパク質の配列は、Wu, F., et al Nature 579 (7798), 265-269 (2020) によって、及びNCBI参照配列: YP_009724390.1に記載されている。この株はまた、本明細書において、「野生型」、「祖先」、及び「親」株と称され得る。

20

【0039】

本明細書で使用される場合、「抗原」とは、免疫応答を刺激することができる物質を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、「防護」とは、コロナウイルス感染に対する免疫又は部分的免疫を指す。

【0041】

「アラニン空洞」又は「空洞」は、本明細書において、アラニン又は芳香族残基よりもかさのある非極性側鎖を有するアミノ酸の非存在に起因する、SARS-CoV Sタンパク質のコイルドコイル内におけるトリマー構造のモノマー間の観察された領域及び低減した相互作用を指す。一実施形態では、アラニン空洞は、配列番号1～配列番号3のうちのいずれか1つに示されるA1016及びA1020を含む。

30

【0042】

本明細書で使用される場合、本発明の例示的な実施形態を参照して、S2Pの言及は、具体的に指定されない限り、FHA配列を伴うか又は伴わない実施形態を含む。

【0043】

本明細書で使用される場合、「三量体化配列」は、Sタンパク質トリマーの三量体化を促進するSタンパク質モノマーのC末端領域に見出される配列を指す。いくつかの実施形態では、三量体化ドメインは、コロナウイルス内に見出されない異種配列である。一実施形態では、三量体化配列は、SARS-CoV2内に見出されない異種配列である。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、バクテリオファージT4フィブリチンのトリマーフォールドドメイン又はその改変型である(図20A)。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、コイルドコイル、人工コイルドコイル、又は改変コイルドコイルである。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、新規に設計され、いくつかの実施形態では、三量体化配列は、バクテリオファージT4フィブリチンのトリマーフォールドドメイン又はその改変型である。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、天然CoV三量体化配列である(いくつかの実施形態では、これは、天然膜貫通ドメインである)。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、Sタンパク質モノマーの残基1209～1256を含むか、又はそれらからなる。いくつかの実施形態では、三量体化配列は、Sタンパク質モノマーの残基1217～1237を含むか、又はそれらからなる。

40

50

【0044】

コロナウイルス

「コロナウイルス科」という用語は、エンベロープ化したプラスの一本鎖RNAウイルスである「コロナウイルス」又は「CoV」の一般名で知られているウイルスを指す。コロナウイルス科の2つのサブファミリーである、レトウイルス亜科及びオルトコロナウイルス亜科がある。一実施形態では、CoVは、アルファコロナウイルス属（アルファCoV）、ベータコロナウイルス属（ベータCoV）、ガンマコロナウイルス属（ガンマCoV）、及びデルタコロナウイルス属（デルタCoV）から選択される。一実施形態では、アルファCoVは、コロナウイルス229E（HCoV-229E）、ヒトコロナウイルスNL63（HCoV-NL63）、伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）、ブタ流行性下痢ウイルス（PEDV）、ネコ感染性腹膜炎ウイルス（FIPV）、及びイヌコロナウイルス（CCoV）から選択される。一実施形態では、ベータCoVは、ヒトコロナウイルスHKU1（HCoV-HKU1）、ヒトコロナウイルスOC43（HCoV-OC43）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（SARS-CoV）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス-2（SARS-CoV-2）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（MERS-CoV）、マウス肝炎ウイルス（MHV）、及び／又はウシコロナウイルス（BCoV）から選択される。一実施形態では、CoVは、ヒトに感染することができる。一実施形態では、ヒトに感染することができるCoVは、SARS-CoV-2、HCoV-OC43、HCoV-HKU1、HCoV-229E、HCoV-NL63、SARS-CoV、及びMERS-CoV、又はそのサブタイプ若しくはバリエーションから選択される。

10

20

【0045】

一実施形態では、CoVは、SARS-CoV-2又はそのサブタイプ若しくはバリエーションである。一実施形態では、SARS-CoV-2は、SARS-CoV-2 hCoV-19/Australia/VIC01/2020である。一実施形態では、SARS-CoV-2は、NCBI参照配列：NC_045512.2に記載される配列を含む。一実施形態では、SARS-CoV-2は、Gen Bank：MN908947.3に記載される配列、又はそのバリエーションを含む。SARS-CoV-2バリエーションの例は、例えば、Shen et al., 2020、Tang et al., 2020、Phan et al., 2020、Khan et al., 2020、Foster et al., 2020、Vasireddy et al., 2021、Winger et al., 2021、及びSanyaolu et al., 2021に記載されている。

30

【0046】

一実施形態では、CoVバリエーションは、親配列と少なくとも90%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも92%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも93%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも94%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも95%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも96%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも97%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも98%同一である。一実施形態では、バリエーションは、親配列と少なくとも99%同一である。一実施形態では、親株（祖先株とも呼ばれる）は、Hu-1株であり、Wu, F., et al Nature 579 (7798), 265-269 (2020)によって報告されている。いくつかの実施形態では、親株は、SARS-CoV-2 hCoV-19/Australia/VIC01/2020である。いくつかの実施形態では、親株は、BetaCoV/Ancstral/WIV04/2019である。

40

【0047】

一実施形態では、CoVは、「VOI」とも称される「注目すべきバリエーション」である。本明細書で使用される場合、VOIは、伝播性、疾患重症度、免疫逃避、診断逃避、又

50

は治療逃避などのウイルス特性に影響を与えることが予測されるか、又は既知の遺伝子変化に関連するコロナウイルスのバリエーションであり、経時的に増加する症例数とともに増加する相対的有病率、又は世界的な公衆衛生に出現するリスクを示唆する明らかな他の疫学的影響を有する複数の国で、重大な市中感染又は複数の疾患クラスター（SARS-CoV-2 COVID-19クラスターの場合）を引き起こすことが特定されている。

【0048】

一実施形態では、CoVは、「VOC」とも称される「懸念されるバリエーション」である。本明細書で使用される場合、VOCは、世界的な公衆衛生上の重要度で以下の変化：伝播性における増加若しくは疫学での有害な変化（SARS-CoV-2の場合、有害な変化はCOVID-19疫学にある）、毒性における増加若しくは臨床的疾患症状における変化、又は公衆衛生及び社会的措置若しくは利用可能な診断、ワクチン、療法の有効性における低減、のうちの1つ以上に関連するコロナウイルスのバリエーションである。

【0049】

実施形態では、CoVは、Vasireddy et al (2021)、Winger et al (2021)、又はSanyaolu et al (2021)で報告されているVOC又はVOIである。実施形態では、CoVは、保健規制機関、例えば、世界保健機関（World Health Organisation）（WHO）、米国疾病管理センター（United States Center of Disease Control）（CDC）、欧州疾病予防管理センター（European Centre for Disease Prevention and Control）（ECDC）、又は特定の管轄区域内の同等の地方自治体保健規制機関によって、VOC、VOI、又はVHCとして分類される。実施形態では、コロナウイルスは、WHOによってVOC又はVOIに分類される。実施形態では、コロナウイルスは、CDCによってVOC、VOI、又はVHCとして分類される。実施形態では、コロナウイルスは、ECDCによってVOC又はVOIに分類される。

【0050】

実施形態では、CoVは、「VHC」とも称される「甚大な被害が想定されるバリエーション」である。実施形態では、予防措置又は医学的対策が、以前に流行しているバリエーションと比較して有効性を著しく低減させているという明確な証拠としてのVHC。VOCの特性に加えて、VHCは、医学的対策に以下の影響：診断検査標的の実証された不成功、ワクチン有効性における著しい低減を示唆する証拠、ワクチンのブレイクスルー症例の不釣り合いに高い数、又は疾患に対する非常に低いワクチン誘導性防護、複数の緊急使用許可又は承認された治療薬に対する著しく低減した感受性、並びにより重度な臨床疾患及び増加した入院、のうち1つ以上の影響を有し得る。

【0051】

実施形態では、CoVがSARS-CoV-2 VOCである場合、VOCは、以下の変異：69del、70del、144del、E484K/Q、S494P、N501Y、A570D、D614G、P681H、T716I、S982A、D1118H、K1191N、D80A、D215G、241del、242del、243del、K417N、E484K、N501Y、D614G、A701V、T19R、V70F、T95I、G142D、E156-、F157-、R158G、A222V*、W258L*、K417N/T*、L452R、T478K、D614G、P681H/R、D950N、L18F、T20N、P26S、D138Y、R190S、K417T、E484K、N501Y、D614G、H655Y、T1027I、E484K、H655Y A67V、del69-70、T95I、del142-144、Y145D、del211、L212I、ins214EPE、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493R、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969K、及びL981Fのうちの1つ以上を含む。

【0052】

実施形態では、C o VがSARS-C o V-2 V O Cである場合、V O Cは、以下のRBD変異：K417T、N439K、L452R、Y453F、S477N、T478K／Q、及びN501Yのうちの1つ以上を含む。実施形態では、V O Cは、以下のNTD変異：70del、156～157del、及び242～245delのうちの1つ以上を含む。

【0053】

実施形態では、V O Cは、B.1.1.7又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、B.1.351又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、B.1.351.2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、B.1.351.3又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、P1又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、P1.1又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、P1.2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、B.1.617.2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、AY.1又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、AY.2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、AY.3又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、B.1.1.529又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、BA.1又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、BA.2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、BA.3又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、BA.4又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Cは、BA.5又はそのバリエーションである。

【0054】

実施形態では、C o VがSARS-C o V-2 V O Iである場合、V O Iは、以下の変異：L452R、D614G、S13I、W152C、A67V、69del、70del、144del、E484K、Q677H、F888L、L5F、D80G、T95I、Y144、F157S、D253G、L452R、S477N、E484K、A701V、T859N、D950H及びQ957R、N501Y、P681R、P681H、E484Q、P681R、S477N、L452Q、及びF490Sのうちの1つ以上を含む。実施形態では、V O Iは、B.1.525又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.526又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.617.1又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、C37又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.427又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.429又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、P2又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.525又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、P3又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.620又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、B.1.621又はそのバリエーションである。実施形態では、V O Iは、C.37又はそのバリエーションである。

【0055】

C o V感染は、ラクダ、ウシ、ネコ、及びコウモリを含む異なる動物種において、呼吸器疾患、腸疾患、肝疾患、及び神経疾患を引き起こすことができる。C o Vは、ウイルス飛沫と粘膜との接触を介して、ある個体から別の個体に伝播することができる。典型的には、ウイルス飛沫は、空気浮遊し、鼻気道を含む呼吸器を介して吸入される。典型的には、個体は、ヒト個体である。いくつかの実施形態では、個体は、家畜又は愛玩動物である。典型的には、感染期間中、C o Vは、上気道、例えば、鼻腔に見出すことができる。いくつかの例では、C o Vは、下気道、例えば、気管支及び／又は肺胞に見出すことができる。

【0056】

実施形態では、C o V感染は、発熱、咳、咽喉痛、息切れ、ウイルス排出呼吸不全、鼻水、鼻づまり、倦怠感、気管支炎、頭痛、筋肉痛、呼吸困難、中度の肺炎、重度の肺炎、

急性呼吸窮迫症候群（ARDS）のうちの1つ以上から選択される1つ以上の症状を引き起こす。実施形態では、ARDSは、軽度ARDS（ $200\text{ mmHg} < \text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300\text{ mmHg}$ として定義される）、中度ARDS（ $100\text{ mmHg} < \text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 200\text{ mmHg}$ として定義される）、及び重度ARDS（ $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 100\text{ mmHg}$ として定義される）から選択される。実施形態では、SARS-CoV-2感染は、発熱、咳、咽喉痛、息切れ、ウイルス排出呼吸不全、鼻水、鼻づまり、倦怠感、気管支炎、頭痛、筋肉痛、呼吸困難、中度の肺炎、重度の肺炎、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）のうちの1つ以上から選択される1つ以上の症状を引き起こし得る。実施形態では、CoV感染は、無症候性である。

【0057】

SARS-CoV-2

実施形態では、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原は、SARS-CoV-2に対する免疫応答を誘発する。実施形態では、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原は、SARS-CoV-2 Sタンパク質トリマーを含む。

【0058】

SARS-CoV-2は、4つの主要な構造的タンパク質：スパイク（S）、膜（M）、及びエンベロープ（E）タンパク質、並びにヌクレオカプシド（N）タンパク質を有する。S、M、及びEは、ウイルス表面エンベロープに埋め込まれ、Nは、リボ核タンパク質内に位置する。Sタンパク質は、ウイルス侵入を開始するために宿主細胞受容体を認識する。

【0059】

ウイルスS糖タンパク質は、受容体付着及びウイルス細胞膜融合を媒介し、NAbの標的である（Duan et al., 2020、Finkelstein et al., 2021、Walls et al., 2020、Hoffmann et al., 2020）。成熟スパイクは、それがゴルジを通過する際のオリゴ塩基モチーフのフリント切断によって、ポリタンパク質前駆体であるSに由来する2つの機能的サブユニットS1及びS2を含む。ACE2受容体付着は、大型サブユニットであるS1内のRBDによって媒介されるが、一方、膜融合は、融合ペプチドを含有する小型サブユニットであるS2によって媒介される。S1及びS2は、非共有結合相互作用を介してヘテロ二量体を形成し、S2のコイルドコイル形成 α ヘリックス（アミノ酸986～1033、CHと称される）は、トリマーのコアを形成する（Wrapp et al., 2020）（図1A）。S2のC末端における膜貫通配列は、トリマーを安定化し、それをウイルス又は細胞膜に固定する（Fu et al., 2021）。ACE2 RBDは、S1糖タンパク質トリマーの上に位置し、「上向き」でACE2結合準備方向、及び「下向き」で不活性方向を示す（Ke et al., 2020）。受容体付着後、S2は、細胞表面でTMPRSS2プロテアーゼによって切断され、融合ペプチド及び全融合活性化を解放する。S糖タンパク質は、クラスIメカニズムを介して膜融合を媒介し、それによって活性化トリガー（S1によるACE2結合、S2のTMPRSS2切断）は、準安定な融合前トリマーのS2サブユニットをヘアピンの安定なトリマーにリフォルディングし、N末端融合ペプチド及びC末端膜貫通配列を、それらの会合した膜が融合するように一緒にさせる（Cai et al., 2020）。

【0060】

ベータコロナウイルスのS、レトロウイルスのEnv、オルトミキソウイルスのHAなどのクラスIウイルス融合糖タンパク質は、中央コイルドコイルを含有し、これは、膜融合プロセスに必要な立体構造変化のための足場として機能する（Bullough et al., 1994、Cai et al., 2020、Chan et al., 1997、Julien et al., 2013、Walls et al., 2017、Walls et al., 2020、Weissenhorn et al., 1997、Wilson et al., 1981、Wrapp et al., 2020）（図1A）。SARS-CoV-2の場合、融合前、コイルドコイルは、配列番号1（NCB

10

20

30

40

50

I 参照配列 Y P _ 0 0 9 7 2 4 3 9 0 . 1) に示されるアミノ酸アミノ酸 9 8 8 ~ 1 0 3 1 を含む。例示的な S A R S - C o V - 2 株のこの領域が図 1 B に示される。融合後、コイルドコイル配列は、伸張され、配列番号 1 (N C B I 参照配列 Y P _ 0 0 9 7 2 4 3 9 0 . 1) に示されるアミノ酸 9 1 3 ~ 1 0 3 1 を含む。いくつかの実施形態では、残基 9 8 6 及び 9 8 7 は、プロリンに改変される (K 9 8 6 P 、 V 9 8 7 P) 。

【 0 0 6 1 】

コイルドコイルの内面の位置は、通常、疎水性残基によって 3 ~ 4 反復で占められている。S A R S - C o V 及び S A R S - C o V - 2 S の場合、これらの位置は、ほとんどが、融合前トリマーにおいてほとんどヘリカル間接触を媒介しない極性残基によって占められている (図 1 B) 。融合後トリマーでは、コイルドコイルの N 末端 2 / 3 は、コイルドコイルを N 末端方向に 1 1 0 Å 伸張する H R 1 ヘリックスのパッキングによってまとめられる。この立体構造では、内面残基は、水素結合を形成するために十分近接している (図 1 C) 。I l e 1 0 1 3 は、I 1 0 1 3 及び L 1 0 1 2 とのヘリカル間接触によって、小さな疎水性コアを形成する。これらの相互作用は、コイルドコイルの中心位置を占める A 1 0 1 6 及び A 1 0 2 0 によって形成される空洞の上に疎水性の天井を形成する (図 1 A ~ D) 。

【 0 0 6 2 】

ワクチン抗原

態様では、本発明は、C o V S タンパク質トリマーを含むコロナウイルスワクチン抗原を提供し、S タンパク質トリマーは、S タンパク質トリマーのコイルドコイル内のアラニン空洞のサイズを低減する構造的改変を含むように改変されており、S タンパク質トリマーは、中和抗体応答を誘発する。

【 0 0 6 3 】

態様では、構造的改変は、S タンパク質トリマーを安定化する。本明細書で使用される場合、「安定化した」とは、熱安定性、寿命、免疫原性及び産生安定性、S タンパク質トリマーの収率又は均一性、並びに変性安定性のうちの 1 つ以上を増加することを指す。実施形態では、安定性は、インビトロ及び／又はインビボ安定性が増加する。実施形態では、インビボ安定性が増加する (対象に投与されたとき、又は対象における組み立て時、例えば、m R N A ワクチンなどの核酸からの翻訳後) 。実施形態では、安定性は、インビトロ (例えば、産生プロセス中) で増加する。

【 0 0 6 4 】

実施形態では、構造的改変は、コイルドコイルにおけるアラニン空洞のサイズを低減することによって、S タンパク質トリマーを安定化する。実施形態では、アラニン空洞は、部分的に補充されるか、又は完全に補充される。実施形態では、アラニン空洞は、立体構造的に変更される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 5 % 、又は少なくとも 1 0 % 、又は少なくとも 2 0 % 、又は少なくとも 3 0 % 、又は少なくとも 4 0 % 、又は少なくとも 5 0 % 、又は少なくとも 6 0 % 、又は少なくとも 7 0 % 、又は少なくとも 8 0 % 、又は少なくとも 9 0 % 、又は 1 0 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 5 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 1 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 2 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 3 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 4 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 5 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 6 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 7 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 8 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、少なくとも 9 0 % 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、1 0 0 % 減少される。

【 0 0 6 5 】

実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 1 0 % ~ 1 0 0 % 、又は約 1 0 % ~ 約 9 0 % 、又は約 2 0 % ~ 約 9 0 % 、又は約 2 0 % ~ 約 8 0 % 、又は約 3 0 % ~ 約 8 0 % 、又は

約 40%～約 80%、又は約 50%～約 80% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 10%～100% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 10%～90% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 20%～90% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 20%～80% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 30%～80% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 40%～80% 低減される。実施形態では、アラニン空洞のサイズは、約 50%～80% 低減される。

【0066】

実施形態では、構造的変化は、構造的変化を欠いている S タンパク質トリマーと比較して、S タンパク質トリマーの安定性を増加する。

10

【0067】

実施形態では、構造的変化は、構造的変化を欠いている S タンパク質トリマーと比較して、S タンパク質トリマーが分解する温度を上昇させる。実施形態では、分解する、又は分解は、S タンパク質トリマーのコアにおける疎水性残基の曝露を指す。

【0068】

実施形態では、構造的変化は、構造的変化を欠いている S タンパク質トリマーと比較して、S タンパク質トリマーの融解温度を上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの熱安定性を増加する。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 5℃～約 25℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 5℃～約 23℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 5℃～約 23℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 10℃～約 23℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 10℃～約 20℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 5℃～約 15℃ 上昇させる。実施形態では、構造的変化は、S タンパク質トリマーの融解温度を約 5℃～約 10℃ 上昇させる。

20

【0069】

実施形態では、構造的変化は、変性条件に対する S タンパク質トリマーの安定性を増加する。変性条件としては、例えば、デタージェント（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）の存在下で沸騰させること、又は室温で 2 ベータメルカプトエタノールの添加及び無添加でデタージェント（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）を用いて処理することが挙げられる。

30

【0070】

一実施形態では、本明細書は、コロナウイルス S 抗原の安定性及び／又は発現を改善する方法を可能にする。

【0071】

実施形態では、C o V ワクチン抗原は、可溶性である。実施形態では、本明細書に記載される C o V ワクチン抗原は、F H A 配列を含まない。実施形態では、C o V ワクチン抗原は、融合前 S タンパク質トリマー確認において安定化される。実施形態では、S タンパク質トリマーの A C E 2 受容体結合ドメイン（R B D）は、下向き（非 A C E 2 結合準備）方向にある。実施形態では、R B D 下向き方向では、R B D 上向き指向性中和抗体に加えて、R B D 下向き立体構造で S トリマーを認識する中和抗体が生成される。

40

【0072】

実施形態では、C o V ワクチン抗原は、三量体化配列を欠いている。実施形態では、C o V ワクチン抗原は、膜貫通ドメインを欠いている。実施形態では、C o V ワクチン抗原は、フォルドン配列／ドメインを欠いている。

【0073】

実施形態では、R B D が下向き方向にあるとき、他の非 R B D エピトープは、追加の非 R B D 中和抗体を生成するために好都合な位置にある。

【0074】

50

実施形態では、構造的改変は、コイルドコイル領域内にある。実施形態では、構造的改変は、コイルドコイル領域を安定化する。

【0075】

実施形態では、S2におけるコイルドコイルでの構造的改変は、本明細書に記載されるCoVバリエーションに対する免疫応答を増強するS1の免疫原性に対してアロステリック効果を有する。

【0076】

実施形態では、CoVワクチン抗原は、皮内投与に好適である。実施形態では、CoVワクチン抗原は、経口投与に好適である。実施形態では、CoVワクチン抗原は、肺投与に好適である。実施形態では、CoVワクチン抗原は、鼻腔投与に好適である。

【0077】

コロナウイルスワクチン抗原のSタンパク質モノマー

実施形態では、Sタンパク質トリマーにおけるSタンパク質モノマーは、本明細書に記載される祖先SARS-CoV-2配列（例えば、NCBI参照配列：YP_009724390.1）であることができるか、又は本明細書に記載されるVOC、VOI、若しくはVHC（例えば、デルタ、ベータ、オミクロン）などのより最近のバリエーションであることができる。実施形態では、Sタンパク質モノマーは、本明細書に記載されるVOC、VOI、又はVHCに存在する1つ以上の変異を含むように改変された祖先SARS-CoV-2配列である。実施形態では、改変は、1つ又はS13I、L18F、T19R、T20N、P26S、A67V、delH69-V70、D80A、T95I、D138Y、G142D、delY144、W152C、E154K、E156del、F157del、R158G、R190S、D215G、del242-245、D253G、R246I、K417N/T、N439K、L452R/Q、Y453F、S477N、T478K、E484K/Q、N501Y、F565L、A570D、D614G、H655Y、Q677H、P681H/R、I692V、A701V、T716I、F888L、D950N、S982A、T1027I、Q1071H、及びD1118Hから選択される。

【0078】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、アミノ酸配列の配列番号1の残基1～1208、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。実施形態では、Sタンパク質モノマーは、アミノ酸配列の配列番号2の残基1～1208、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。実施形態では、Sタンパク質モノマーは、アミノ酸配列の配列番号3の残基1～1208、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0079】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号1の残基1～1237アミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0080】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号3のアミノ酸配列の残基1～1237、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0081】

一実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号1の残基1～1256アミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0082】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号3のアミノ酸配列の残基1～1256、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0083】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号6のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも90%同一の配列を含む。

【0084】

実施形態では、Sタンパク質モノマーは、配列番号8のアミノ酸配列、又はそれと少な

10

20

30

40

50

くとも 90% 同一の配列を含む。

【0085】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、配列番号 25 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。

【0086】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、配列番号 26 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。

【0087】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、コロナウイルスの膜貫通ドメインをコードする配列を含む。実施形態では、S タンパク質モノマーは、SARS-CoV-2 の膜貫通ドメインをコードする配列を含む。実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸配列の残基 1217~1237、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列の残基 1217~1237、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸配列の残基 1209~1256、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列の残基 1209~1256、又はそれと少なくとも 90% 同一の配列を含む。

【0088】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、コロナウイルスの膜貫通ドメインをコードする配列を含まない。

【0089】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、本明細書に記載される 2P 変異を含む。実施形態では、S タンパク質モノマーは、本明細書に記載される 2P 変異を含まない。

実施形態では、S タンパク質モノマーは、本明細書に記載される VOC 及び／又は VOI 変異のうちの 1 つ以上のアミノ酸配列を含む。

【0090】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、SARS-CoV-2 VOC の S タンパク質残基 1~1208 を含む。実施形態では、S タンパク質モノマーは、SARS-CoV-2 VOI の S タンパク質残基 1~1208 を含む。実施形態では、S タンパク質モノマーは、SARS-CoV-2 VHC の S タンパク質残基 1~1208 を含む。

【0091】

実施形態では、S タンパク質モノマーは、三量体化配列を含まない。実施形態では、S タンパク質モノマーは、膜貫通ドメイン配列を含まない。実施形態では、S タンパク質モノマーは、フォルドン配列を含まない。実施形態では、S タンパク質モノマーは、FHA を含まない。

【0092】

構造的改変

アラニン空洞に対する構造的改変は、S タンパク質内のアミノ酸置換ジスルフィド結合、水素結合、パイスタッキング (π - π スタッキング)、塩橋、ファンデルワールス相互作用、疎水性残基置換若しくは付加の使用、又はプロリン安定化のうちの 1 つ以上を使用してもたらされる。一実施形態では、アラニン空洞に対する構造的改変は、アラニン空洞を形成する 1 つ以上のアミノ酸のアミノ酸置換によってもたらされる。実施形態では、構造的改変は、1 つ以上のアミノ酸の、より疎水性のアミノ酸への置換である。実施形態では、構造的改変は、コイルドコイル状領域内の 1 つ以上のアミノ酸のより疎水性のアミノ酸への置換である。

【0093】

実施形態では、S タンパク質トリマーにおける S タンパク質モノマーの 1 つ又は 2 つ又は 3 つは、コイルドコイル状領域中の 1 つ以上のアミノ酸の、より疎水性のアミノ酸への置換を含む。実施形態では、S タンパク質トリマーにおける S タンパク質モノマーの 1 つは、コイルドコイル領域中の 1 つ以上のアミノ酸の、より疎水性のアミノ酸への置換を含

10

20

30

40

50

む。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおけるSタンパク質モノマーの2つは、コイルドコイル領域中の1つ以上のアミノ酸の、より疎水性のアミノ酸への置換を含む。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおけるSタンパク質モノマーの3つは、コイルドコイル領域中の1つ以上のアミノ酸の、より疎水性のアミノ酸への置換を含む。

【0094】

アラニン空洞におけるアミノ酸の置換

実施形態では、構造的改変は、コイルドコイル領域に人工疎水性コアを作製する。実施形態では、構造的改変は、アラニン空洞の残基を含む人工疎水性コアを作製する。実施形態では、構造的改変は、アラニン空洞に人工疎水性コアを作製する。実施形態では、1016位及び1020位のアミノ酸は、人工疎水性コアの形成に寄与する。

10

【0095】

実施形態では、人工疎水性コアは、コイルドコイル領域内のアミノ酸を、より疎水性のアミノ酸で置換することによって作製される。一実施形態では、極性残基は、よりかさのある疎水性残基で置き換えられる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「より疎水性のアミノ酸」は、置換されているコロナウイルス株の位置に存在するアミノ酸よりも疎水性のアミノ酸を指す。例えば、改変／置換されているアミノ酸がアラニンである場合、それは、より疎水性のアミノ酸、例えば、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンで置換され得る。

20

【0097】

疎水性指数は、相対疎水性、又はアミノ酸が水にどの程度可溶性であるかの尺度であり、例えば、Sereda et al (1994) 及び Monera et al., (1995) に記載されている。最も疎水性の残基がグリシン(0値)に対して100の値で与えられるように、pH2及びpH7で正規化された異なるアミノ酸の疎水性が以下の表に提供される。

30

40

50

【表 2】

アミノ酸疎水性

At pH 2		At pH 7	
非常に疎水性			
Leu	100	Phe	100
Ile	100	Ile	99
Phe	92	Trp	97
Trp	84	Leu	97
Val	79	Val	76
Met	74	Met	74
疎水性			
Cys	52	Tyr	63
Tyr	49	Cys	49
Ala	47	Ala	41
中性			
Thr	13	Thr	13
Glu	8	His	8
Gly	0	Gly	0
Ser	-7	Ser	-5
Gln	-18	Gln	-10
Asp	-18		
親水性			
Arg	-26	Arg	-14
Lys	-37	Lys	-23
Asn	-41	Asn	-28
His	-42	Glu	-31
Pro	-46	Asp	-55

【0098】

実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、疎水性アミノ酸である。実施形態では、疎水性アミノ酸は、脂肪族疎水性アミノ酸である。実施形態では、疎水性アミノ酸は、芳香族疎水性アミノ酸である。

【0099】

実施形態では、Sタンパク質トリマーにおけるSタンパク質モノマーのコイルドコイル領域内の少なくとも1つのアミノ酸は、より疎水性のアミノ酸で置換されている。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける少なくとも1つのSタンパク質モノマーは、置換を含む。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける少なくとも2つのSタンパク質モ

ノマーは、置換を含む。一実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける3つのSタンパク質モノマーは、置換を含む。

【0100】

実施形態では、Sタンパク質トリマーにおけるSタンパク質モノマーのコイルドコイル領域内の少なくとも2つのアミノ酸は、より疎水性のアミノ酸で置換されている。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける少なくとも1つのSタンパク質モノマーは、置換（複数）を含む。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける少なくとも2つのSタンパク質モノマーは、置換（複数）を含む。実施形態では、Sタンパク質トリマーにおける3つのSタンパク質モノマーは、置換（複数）を含む。

【0101】

実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸は、Sタンパク質モノマーのコイルドコイル領域の7残基反復モチーフの位置a及び／又はdにある。7残基反復モチーフ中の位置a及びdの場所が、図1Bに示される。SARS-COV-2の場合、位置a及び位置dは、配列番号1のアミノ酸988、991、995、998、1002、1005、1009、1013、1016、1020、1023、1027、1031に対応する。実施形態では、より疎水性のアミノ酸による置換は、1016位で生じる。実施形態では、より疎水性のアミノ酸による置換は、1020位で生じる。実施形態では、より疎水性のアミノ酸による置換は、1016位及び1020位で生じる。実施形態では、A1016又はA1020は、ロイシン、バリン、イソロイシン、又はフェニルアラニンで置換されている。実施形態では、A1016は、ロイシン（A1016L）、バリン（A1016V）、又はイソロイシン（A1016I）で置換されている。実施形態では、A1020は、イソロイシン（A1020I）で置換されている。実施形態では、A1016は、ロイシン（A1016L）又はバリン（A1016V）で置換されており、A1020は、イソロイシン（A1020I）で置換されている。実施形態では、A1016は、ロイシン（A1016L）で置換されている。実施形態では、A1016は、バリン（A1016V）で置換されている。実施形態では、A1020は、イソロイシン（A1020I）で置換されている。実施形態では、A1020は、トリプトファン（W）で置換されていない。実施形態では、A1016は、バリンで置換されており、A1020は、イソロイシンで置換されている（本明細書において「A1016V／A1020I」又は「1016／20VI」又は「VI」と称される）。

【0102】

実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、以下の特性：i) アラニンよりも高い疎水性、ii) アラニンよりも大きい疎水性アミノ酸、iii) 2のpHで47を超える疎水性、iiii) 7のpHで41を超える疎水性、並びにiv) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンから選択される、のうちの1つ以上を含む。実施形態では、アミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、バリンから選択される。実施形態では、アミノ酸は、イソロイシンである。実施形態では、アミノ酸は、ロイシンである。実施形態では、アミノ酸は、バリンである。実施形態では、アミノ酸は、メチオニンである。実施形態では、アミノ酸は、フェニルアラニンである。実施形態では、アミノ酸は、チロシンである。実施形態では、アミノ酸は、トリプトファンである。

【0103】

実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、アラニンよりも高い疎水性を含む。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、アラニンよりも大きい。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、2のpHで47を超える疎水性を含む。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、7のpHで41を超える疎水性を含む。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンから選択される。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、イソロイシンである。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、ロイシンである。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、メチオニンである。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、バリンであ

10

20

30

40

50

る。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、フェニルアラニンである。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、チロシンである。実施形態では、より疎水性のアミノ酸は、トリプトファンである。

【0104】

疑いを避けるために、最適な疎水性がアラニン空洞のアミノ酸置換によって達成されている場合（A1016及びA1020を含む）、本明細書に記載されるスパイクタンパク質の望ましい性能に影響を与えることなく、更なる保存的アミノ酸変異を領域に行うことができる。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野で既知である。

【0105】

更なる改変／更なる安定化改変

実施形態では、本明細書に記載されるCoVワクチンは、Sタンパク質トリマーの安定性、免疫原性、発現、及び精製のうちの1つ以上を増強するために1つ以上の更なる改変を含む。ワクチンがポリヌクレオチドベースのワクチンである場合、Sタンパク質コード配列又はその可溶性形態を含むポリヌクレオチドのインビボでの安定性及び発現を増強する更なる改変。

【0106】

実施形態では、抗原又はそのコード分子に対する更なる改変は、プロリン安定化、フリン切断部位、三量体化配列、反復若しくはスペーサー、又はそれをコードするヌクレオチド配列から選択される。

【0107】

実施形態では、プロリン安定化改変は、986P及び／又は987Pである。Sタンパク質トリマーにおける986P及び987Pの両方の存在は、「2P」改変と称される。

【0108】

実施形態では、更なる改変は、フリン切断部位の挿入である。実施形態では、変異PG682SASは、フリン切断部位を挿入するために導入される（例えば、PG682SASは、デルタでRR682RARを置き換え、PG682SASは、オミクロンでHR682RARを置き換える）。実施形態では、更なる改変は、FHAの付加である。実施形態では、更なる改変は、精製タグの付加である。

【0109】

抗原組み合わせ

実施形態では、対象改変S抗原は、それが由来する株、及びコミュニティ内で流行している1つ以上の他の株に対して広く中和する免疫応答を誘発する。別の態様では、抗原又は抗原若しくはコード配列を含むワクチンは、対象に注目すべき1つ以上の抗原を送達し、例えば、T細胞応答及び抗体応答を含む同種又は異種株に対する効果的な機能的及び多機能的免疫応答を誘導する。一実施形態では、1種以上の株に由来するコロナウイルス抗原は、スパイク、ヌクレオカプシド、膜、及びエンベロープタンパク質のうちの1つ又は2つ又は3つ又は4つから選択される。一実施形態では、N、M、E、及びSのうちの2つ、3つ、又は4つのSARS-CoVタンパク質をコードするアミノ酸及び／又はヌクレオチド配列が用いられる。例示的な実施形態では、N、M、E、及びSが用いられる。実施形態では、1つ又は2つ又は複数の異なるSARS-CoVのバリエントが組み合わせられる。実施形態では、複数のバリエント及び複数の抗原が用いられる。一実施形態では、抗原、又は抗原若しくはコード配列を含むワクチンは、1つ以上のB細胞及び／又はT細胞エピトープとともに投与される。

【0110】

本明細書に開示される改変S抗原を、N、M、E抗原、又はそれらのコード配列のうちの1つ以上と一緒に発現することができる細胞株が、本明細書に企図される。

【0111】

1つ又は2つ又は複数の注目すべき／懸念されるバリエントのためのN、M、E抗原、又はそれらのコード配列のうちの1つ以上と一緒に対象抗原を組み合わせた投与は、同時に、又は間隔をあけて、同じ又は異なる組成物であり得、任意選択的に、同時、又は連続

10

20

30

40

50

した、タンパク質及び核酸投与プロトコルの組み合わせた使用を伴う。

【0112】

スパイクRBDのみのワクチン抗原（例えば、319～545）もまた、タンパク質又は核酸ワクチン方式で企図される。一実施形態では、本改変S抗原の投与は、タンパク質又は核酸形態（例えば、mRNA）のコロナウイルスのRBDのみの部分を表す抗原と組み合わせられる。RBDドメインは、単量体、二量体、又は多量体形態で投与することができ、ヒトIgGのFc断片などの免疫増強エレメントを含み得る。

【0113】

別の実施形態では、本発明の改変S抗原トリマーの改変RBDは、好適なワクチン方式でRBDのみの抗原として産生又は投与される。具体的には、S2のコイルドコイルへの構造的改変は、S1 RBD領域の構造及び免疫原性を有益に変化させ、したがって、対象改変S抗原によって産生されるRBD形態に基づいたRBD形態の産生又は投与が企図される。

10

【0114】

別の実施形態では、本発明の改変S抗原トリマーの改変S1は、好適なワクチン方式でS1のみの抗原として産生又は投与される。具体的には、S2のコイルドコイルへの構造的改変は、S1領域の構造及び免疫原性を変化させ、したがって、対象改変S抗原によって産生された形態に基づいたS1形態の産生又は投与が企図される。一実施形態では、RBDが存在しないS1領域の一部が産生又は投与される。S1ドメイン、又はS1からRBDドメインを減じたドメインは、単量体、二量体、又は多量体形態で投与することができ、ヒトIgGのFc断片などの免疫増強エレメントを含み得る。

20

【0115】

抗体応答

Sタンパク質は、COVID-19ワクチンにおける標的抗原として使用される主なタンパク質である。理論的には、抗体は、Sタンパク質を標的として、ウイルス侵入プロセス中の複数の段階でウイルス感染を阻害することができる。RBDは、ウイルス受容体結合に干渉する中和抗体（NAb）の主な標的である。今日まで、SARS-CoV-2に対するNAbのほとんどは、RBDを標的としている。加えて、N末端ドメインを標的とするNAbは、SARS-CoV-2及びMERS-CoV感染において報告されており、それをワクチンに含めるための別の潜在的な標的としている。S2サブユニットはまた、Sタンパク質の構造的再配列及びウイルス宿主膜融合に必要な融合タンパク質の挿入に干渉する中和抗体のための潜在的な標的である。

30

【0116】

本明細書で使用される場合、「広範に中和する抗体」は、少なくとも1つの、好ましくは複数のコロナウイルスバリエーション（例えば、複数のSARS-CoV-2バリエーション）に対して交差防護を提供する抗体を指す。実施形態では、バリエーションのうちの少なくとも1つは、VOC又はVOI又はVHCである。

【0117】

NAbは、それらが機能的抗ウイルス効果を有するため、機能的抗体と呼ばれる。

【0118】

相同株又は出現する懸念されるバリエーションに対するNAb又は有効な免疫応答を誘発するワクチンの能力は、SARS-CoV-2に対するワクチンプログラムの成功した展開に影響を及ぼす主要な要因である。

40

【0119】

相同及び異種株又は出現する懸念されるバリエーションに対するNAb又は有効な免疫応答を誘発するワクチンの能力は、SARS-CoV-2に対するワクチンプログラムの成功する展開に影響を及ぼす主要な要因である。本出願は、本明細書に記載されるコロナウイルスS抗原変異体の産生及び使用を可能にし、これは、祖先並びに天然に存在及び出現する懸念されるバリエーションを含むより広範なバリエーションに対する増強した免疫原性を誘発する。

50

【0120】

懸念されるバリエーションに対する減少したワクチン有効性が観察されており、例えば、ワクチン免疫した対象におけるウイルスのNAbを、ウイルスの1つ以上の株又はバリエーションに対してスクリーニングすることによって評価することができる。本明細書で決定されるように、一実施形態では、本明細書で可能になる構造的改変抗原は、対象において、相同株に対するものと少なくとも同じように優れている、懸念されるバリエーションを含む異種株に対する機能的抗体応答又は中和抗体力価を生成することができる。

【0121】

一実施形態では、本明細書に定義される抗原は、1つ以上の非バリエーション株に対して生成されたのと同じ又は類似のレベルにあるVOCに対する中和抗体力価を誘発する。

10

【0122】

相同抗体力価の少なくとも100%。一実施形態では、力価は、対応する相同力価の70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%超である。

【0123】

コロナウイルスワクチン抗原を産生する方法

本明細書に記載される抗原は、当該技術分野で既知の組換え経路又は合成経路によって産生され得る。

20

【0124】

一実施形態では、CPV又は他の好適なウイルスからのポリヘドリン標的化ペプチドに融合した本明細書に記載される抗原を含むナノ粒子が提供される。他のナノ粒子が当該技術分野で既知であり、SOR粒子、ルミナジンシンターゼ粒子、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ粒子が含まれる。

【0125】

抗原は、増加した免疫原性のために、担体又はナノ粒子に連結され得る。好適な担体は、当該技術分野で既知である。

【0126】

ウイルス様粒子は、抗原にウイルス表面タンパク質の構造的複雑性／利点のいくつかを提供し、任意の好適なウイルスに由来し得る。本明細書で使用される場合、「ウイルス様粒子」は、ウイルス表面タンパク質を含むが、ウイルスゲノム及び1つ以上の構造的タンパク質を欠いているワクチンを指す。ヒト及びヘパドナウイルスHBVが良い例である。抗原を含むVLPは、例えば、タンパク質の組換え発現時に自発的に形成され得、従来の技術を使用して特性評価され得る。

30

【0127】

リボソームの形態におけるワクチンが包含される。本明細書において「リボソーム」という用語は、水性内部を囲む単一又は多層脂質構造を指す。リボソームを形成することができる脂質には、脂肪又は脂肪様の特性を有する全ての物質が含まれる。動的レーザー光散乱は、当業者に周知のリボソームのサイズを測定するために使用される方法である。アジュバントの詳細な説明は、Cox and Coulter, "Advances in Adjuvant Technology and Application", in Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology, Chapter 4, Ed. Young, W. K., CRC Press 1992, and in Cox and Coulter, Vaccine 15 (3) : 248-256, 1997に見出すことができる。

40

【0128】

抗原は、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターの形態で送達され得る。本明細書で使用される「ベクター」という用語は、抗原コード配列が少なくとも挿入される任意の送達部分を含み、これには、プラスミドベクター、コスミドベクター、ラムダファージなど

50

のファージベクター、ウイルス様粒子、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アルファウイルス、フラビウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、麻疹ウイルス、CMV、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、ボックスウイルス、及びピコルナウイルスなどのウイルスベクター若しくはバキュロウイルスベクター、又は細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、若しくはPI人工染色体（PAC）などの人工染色体ベクターが含まれる。ベクターは、発現ベクター及びクローニングベクターを含む。実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、ウイルスベクターワクチンである。本明細書で使用される場合、「ウイルスベクターワクチン」は、ウイルス骨格を使用して、SARS-CoV-2 遺伝子又はその一部を宿主生物に挿入する。これらのワクチンは、標的細胞に遺伝子を伝達し、そこで遺伝子が発現され、発現された遺伝子が免疫応答を不正にすることができる。一実施形態では、ベクターは、複製ベクターである。実施形態では、ベクターは、非複製ベクター（宿主細胞に組み込まれないベクター）である。実施形態では、ベクターは、アデノウイルス、ボックスウイルス、麻疹ウイルス、及び水疱性口内炎ウイルスから選択される。

10

20

30

40

50

【0129】

発現ベクターは、プラスミド及びウイルスベクターを含み、概して、所望のコード配列及び特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫、又は哺乳動物）又はインビトロ発現系において作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切なNA配列を含有する。クローニングベクターは、概して、特定の所望のNA断片を操作及び増幅するために使用され、所望のDNA断片の発現に必要な機能的配列を欠いていてもよい。

【0130】

一実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターである。ベクターとして有用であるウイルスとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルス、並びにそれらの弱毒化形態が挙げられるが、これらに限定されず、それらの各々は、当該技術分野で既知の独自の利点及び欠点を有する。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター及びボックスウイルスベクターが特に挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、ウイルスベクターの場合、約 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^{12}$ 個のウイルス粒子、典型的には、約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個のウイルス粒子が投与される。

【0131】

抗原コード配列は、任意の好適なベクターに挿入され得る。ベクターの目的は、少なくとも一実施形態では、コード核酸を宿主環境に送達し、タンパク質発現及び宿主免疫応答への提示を促進することである。ベクターは、複製であり得るか、又は非複製であり得る。

【0132】

発現ベクターは、概して、抗原をコードする核酸分子に作動可能に連結された転写及び翻訳調節核酸を含む。この文脈における「作動可能に連結された」とは、転写及び翻訳調節DNAが、転写が開始されるような様式で、抗原のコード配列に対して位置付けられることを意味する。概して、これは、プロモーター及び転写開始又は開始配列がタンパク質コード領域に対して5'に配置されることを意味する。転写及び翻訳調節核酸は、概して、外来タンパク質を発現するために使用される細胞に適切であり、例えば、哺乳動物細胞、特にヒト由来の転写及び翻訳調節核酸配列は、好ましくは、哺乳動物及びヒトにおいてタンパク質を発現するために使用される。多数の種類の適切な発現ベクター、及び好適な制御配列が当該技術分野で既知である。

【0133】

ウイルスベクターは、Copenhagen vacciniaベクター又は改変Vaccinia Ankara (MVA)に基づく合成改変ベクターなどのワクシニアベクターを含み得る。ウイルスベクターは、プライムブーストレジームにおいてワクチンブーストとして使用される場合、当該技術分野で既知のMVA又はコペンハーゲン誘導体を含

み得る。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）又はレンチウイルスを含み得る。ウイルスベクターは、弱毒化ウイルスベクターであり得る。例えば、複製のための必須遺伝子が欠失され、免疫調節分子が挿入され得る。

【0134】

ウイルスベクターは、操作の容易さのためにBAC中に維持され得、抗原をコードするDNAは、線状又は環状であり得る。

【0135】

非ウイルスベクター又は付着／コンジュゲートには、脂質、炭水化物、タンパク質、ペプチド、ナノ粒子、リポソーム、ウイルス様粒子、ビロソーム、エマルジョンが含まれる。脂質などの両親媒性薬剤は、水溶液中のミセル、不溶性単層、液晶又はラメラ層として凝集体で存在し得る。

10

【0136】

抗原は、そのコード核酸の形態で投与され得る。本明細書に記載される核酸分子は、インビトロ転写されたRNA若しくは合成RNA、mRNA若しくはPNA、又はそれらの混合物を含む、DNA、cDNA、ゲノムDNA、又はRNAなどの任意の形態にあり得る。核酸には、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換えによって産生され、化学的に合成された分子、及びそれらの修飾形態が含まれる。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、直鎖又は環を形成するように共有結合で閉じられていてもよい。実施形態では、核酸は、RNAである。RNAは、安定化配列、キャッピング、及びポリアデニル化によって修飾され得る。RNA又はDNAであり、かつ抗原を発現し、免疫応答を誘導するためのプラスミドとして送達され得る。RNAは、脂質ナノ粒子を介した送達を増強するように改変され得る。RNAは、RNA分子の安定性を増加させるように改変され得る。本発明のRNAの例は、図35～37に提供される。RNAベースのアプローチが、概して好ましく、これらは増幅又は非自己増幅構築物を含み得る。核酸分子は、通常、長さが少なくとも10塩基であり、一本鎖又は二本鎖であり得る。「cDNA」は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態で、mRNAに相補的又は同一であるDNAを指す。「コードする」は、他のポリヌクレオチド又はポリペプチドの合成のためのテンプレートとして機能する、遺伝子、cDNA、又はmRNAなどのポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。

20

【0137】

いくつかの実施形態では、抗原をコードするRNAが投与される。いくつかの実施形態では、RNAは、本明細書に記載されるコロナウイルス膜貫通ドメインを含む抗原をコードする。いくつかの実施形態では、RNAは、本明細書に記載されるコロナウイルス膜貫通ドメインを欠いている抗原をコードする。いくつかの実施形態では、RNAは、本明細書に記載される三量体化ドメインを含む抗原をコードする。いくつかの実施形態では、RNAは、本明細書に記載される三量体化ドメインを欠いている抗原をコードする。

30

【0138】

いくつかの実施形態では、一過性インビボトランスフェクションによって投与されるポリヌクレオチドは、化学修飾されたRNAであり、それは少なくとも1つの種類のヌクレオチド、例えば、シトシンの割合（例えば、10%、30%、50%、又は100%）がインビボでその安定性を増加させるように化学修飾されている。例えば、いくつかの場合では、修飾されたシトシンは、5-メチルシトシンである。かかるポリヌクレオチドは、特にトランスフェクション／送達剤と組み合わせた場合に、インビボで細胞への送達／トランスフェクションに特に有用である。いくつかの場合では、化学修飾されたRNAは、シトシンの大部分（例えば、全て）が5-メチルシトシンであり、ウラシルの大部分（例えば、全て）がブソイドウラシルである化学修飾されたRNAである。いくつかの実施形態では、非天然システインは、ジスルフィド結合を作製するように操作される（例えば、組換え遺伝子技術を介して）。かかる修飾RNAの合成及び使用は、例えば、WO2011/130624に記載されている。DNA及びRNAポリヌクレオチドのインビボトランスフェクションのための方法は、例えば、Liu et al (2015) 及びYou

40

50

n e t a l (2 0 1 5) に要約されているように、当該技術分野で既知である。

【 0 1 3 9 】

「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含み、好ましくは、完全に又は実質的にリボヌクレオチド残基からなる分子に関する。「リボヌクレオチド」は、 β -D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関する。この用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的に精製されたRNAなどの単離されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換えにより産生されたRNA、並びに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変更によって天然に存在するRNAとは異なる修飾されたRNAを含む。かかる変更は、RNAの末端、又は内部、例えば、RNAの1つ以上のヌクレオチドなどでの非ヌクレオチド材料の付加を含み得る。RNA分子中のヌクレオチドはまた、天然に存在しないヌクレオチド又は化学的に合成されたヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドなどの非標準的なヌクレオチドを含み得る。これらの変更されたRNAは、天然に存在するRNAの類似体又は類似体と称され得る。

10

【 0 1 4 0 】

したがって、一実施形態では、核酸コード領域のコード領域のG/C含量は、その特定の野生型コード配列、すなわち、修飾されていないmRNAのコード領域のG/C含量と比較して、修飾され、特に増加する。mRNAのコードされたアミノ酸配列は、特定の野生型mRNAのコードされたアミノ酸配列と比較して修飾されないことが好ましい。

【 0 1 4 1 】

最適化したmRNAベースの組成物は、当該技術分野で既知のように翻訳効率及び細胞内安定性を最適化する5'及び3'非翻訳領域(5'-UTR、3'-UTR)、並びにSタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み得る。一実施形態では、キャップされていない5'-トリホスフェートの除去は、RNAをホスファターゼで処理することによって達成され得る。RNAは、その安定性を増加させ、及び／又は細胞傷害性を低減させるために、修飾されたリボヌクレオチドを有し得る。例えば、一実施形態では、RNAにおいて、5-メチルシチジンが、シチジンと部分的又は完全に置換される。代替的又は追加的に、プソイドウリジンが、ウリジンと部分的又は完全、好ましくは完全に置換される。これらの修飾はまた、RNAの翻訳を妨げ得る無差別な免疫不活性化を低減し得る。一実施形態では、「修飾」という用語は、5'キャップ又は5'キャップ類似体を有するRNAを提供することに関する。「5'キャップ」という用語は、mRNA分子の5'末端に見出されるキャップ構造を指し、概して、普通にはない5'から5'へのトリホスフェート連結を介してmRNAに接続したグアノシンヌクレオチドからなる。一実施形態では、このグアノシンは、7位でメチル化されている。「従来の5'キャップ」という用語は、天然に存在するRNA 5'キャップ、好ましくは7-メチルグアノシンキャップを指す。「5'キャップ」という用語は、RNAキャップ構造に似ており、RNAを安定化し、及び／又はRNAの翻訳を増強する能力を有するように修飾される5'キャップ類似体を含む。5'キャップ又は5'キャップ類似体を有するRNAの提供は、当該5'キャップ又は5'キャップ類似体の存在下でのDNAテンプレートのインビトロ転写によって達成され得、当該5'キャップは、生成されたRNA鎖に同時転写的に組み込まれるか、又はRNAは、例えば、インビトロ転写によって生成され得、5'キャップは、例えば、ワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して、転写後のRNAに結合され得る。

20

30

40

【 0 1 4 2 】

RNAの更なる修飾は、X領域尾部などの天然に存在するUTRの伸長若しくは切断、又は当該RNAのコード領域に関連しないUTRの導入などの5'若しくは3'非翻訳領域(UTR)の変更、例えば、アルファ2-グロビン、アルファ-グロビン、ベータ-グロビンなどのグロビン遺伝子に由来する1つ以上、好ましくは2つのコピーの3'-UTRとの既存の3'-UTRの交換又は挿入であり得る。マスクされていないポリA配列を有するRNAは、マスクされたポリA配列を有するRNAよりも効率的に翻訳される。

【 0 1 4 3 】

「ポリ(A)尾部」又は「ポリA配列」という用語は、RNA分子の3'末端に位置し

50

得るアデニル（Ａ）残基の配列に関するものであり、「マスクされていないポリＡ配列」とは、ＲＮＡ分子の３’末端のポリＡ配列がポリＡ配列のＡで終わり、ポリＡ配列の３’末端、すなわち下流に位置するＡ以外のヌクレオチドが続かないことを意味する。更に、約１２０塩基対の長いポリＡ配列は、ＲＮＡの最適な転写安定性及び翻訳効率をもたらす。

【０１４４】

したがって、ＲＮＡの安定性及び／又は発現を増加させるために、好ましくは１０～５００、より好ましくは３０～３００、更により好ましくは６５～２００、及び特に１００～１５０のアデノシン残基の長さを有する異種ポリＡ配列と併せて存在するように修飾され得る。特に好ましい実施形態では、ポリＡ配列は、約１２０個のアデノシン残基の長さを有する。本発明に従って使用されるＲＮＡの安定性及び／又は発現を更に増加させるために、ポリＡ配列は、マスクされなくてもよい。

10

【０１４５】

加えて、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）をＲＮＡ分子の３’非翻訳領域に組み込むことにより、翻訳効率の向上がもたらされ得る。相乗効果は、かかる３’非翻訳領域のうちの２つ以上を組み込むことによって達成され得る。３’非翻訳領域は、それらが導入されるＲＮＡに対して自己又は異種であり得る。特定の一実施形態では、３’非翻訳領域は、ヒトβーグロビン遺伝子に由来する。

【０１４６】

上述の修飾の組み合わせ、すなわち、任意選択的に、ポリＡ配列の組み込み、ポリＡ配列のマスキング無し、及び１つ以上の３’非翻訳領域の組み込みは、ＲＮＡの安定性及び翻訳効率の増加に相乗的に影響する。

20

【０１４７】

ＲＮＡの発現を増加させるために、ＧＣ含有量を増加させて、ｍＲＮＡ安定性を増加させ、コドン最適化を行い、したがって、細胞内の翻訳を向上させるために、コード領域内を修飾し得る。修飾されたｍＲＮＡは、酵素的に合成され、脂質ナノ粒子などのナノ粒子にパッケージ化され、例えば、筋肉内で投与され得る。自己複製ＲＮＡ又はプロタミン複合体化ＲＮＡアプローチはまた、ウイルス感染に対する免疫応答を生成することが示されている。

【０１４８】

核酸分子は、例えば、コアセルベーション技法によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、マイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）、又はマクロエマルジョンに封入され得る。かかる技法は当該技術分野で既知であり、Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Remington, J., ed. (2000)に開示されている。

30

【０１４９】

ナノ粒子又はコロイド系としての核酸の全身投与のための様々なアプローチが既知である。非ウイルスアプローチでは、カチオン性リポソームを使用して、ＤＮＡ／ＲＮＡ凝縮を誘導し、細胞の取り込みを促進する。カチオン性リポソームは、通常、ＤＯＴＡＰのようなカチオン性脂質、及びＤＯＰＥのような１つ以上のヘルパー脂質からなる。いわゆる「リポプレックス」は、カチオン性（正に帯電した）リポソーム及びアニオン性（負に帯電した）核酸から形成することができる。最も単純な場合、リポプレックスは、特定の混合プロトコルで核酸とリポソームとを混合することによって自発的に形成されるが、様々な他のプロトコルが適用されてもよい。一実施形態では、ＲＮＡリポプレックスなどのナノ粒子ＲＮＡ製剤は、定義された粒子サイズで産生され、粒子の正味電荷はゼロ又は負に近い。例えば、ＲＮＡ及びリポソームからの電氣的に中性又は負に荷電したリポプレックスは、ＷＯ２０１３／１４３６８３に開示されているように、全身投与後に脾臓又は免疫細胞において実質的なＲＮＡ発現をもたらす。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも１つの脂質を含む。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも１つのカチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、モノカチオン性又はポリカチオン性であり得る。任意のカチオン

40

50

性両親媒性分子、例えば、少なくとも1つの親水性及び親油性部分を含む分子は、本発明の意味の範囲内のカチオン性脂質である。一実施形態では、正電荷は、少なくとも1つのカチオン性脂質によって寄与され、負電荷は、RNAによって寄与される。一実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも1つのヘルパー脂質を含む。ヘルパー脂質は、中性又は陰イオン性脂質であり得る。ヘルパー脂質は、リン脂質若しくは天然脂質の類似体などの天然脂質、又は天然脂質との類似性を有さない完全に合成された脂質若しくは脂質様分子であり得る。一実施形態では、カチオン性脂質及び／又はヘルパー脂質は、二重層形成脂質である。

【0150】

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

【0151】

一実施形態では、少なくとも1つのヘルパー脂質は、1, 2-ジ(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) 若しくはその類似体若しくは誘導体、コレステロール (Choi) 若しくはその類似体若しくは誘導体、及び／又は1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) 若しくはその類似体若しくは誘導体を含む。

【0152】

一実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質と少なくとも1つのヘルパー脂質とのモル比は、10:0~3:7、好ましくは9:1~3:7、4:1~1:2、4:1~2:3、7:3~1:1、又は2:1~1:1、好ましくは約1:1である。一実施形態では、この比率において、カチオン性脂質のモル量は、カチオン性脂質のモル量にカチオン性脂質内の正電荷の数に乗じて得られる。本明細書に記載のナノ粒子において、脂質は、RNAと複合体を形成し得、及び／又はRNAを封入し得る。一実施形態では、ナノ粒子は、リボプレックス又はリボソームを含む。一実施形態では、脂質は、当該RNAを封入する小胞に含まれる。小胞は、多層小胞、単層小胞、又はそれらの混合物であり得る。小胞は、リボソームであり得る。

【0153】

脂質ナノ粒子 (LNP) は、一般に、異なる脂質の組み合わせから構成されるナノサイズ化粒子として知られている (水性体積は、両親媒性脂質二重層、例えば、単一、単層又は複数層、多層によって封入される)。多くの異なるタイプの脂質が、LNPに含まれる。いくつかの実施形態では、脂質は、イオン化可能な脂質、リン脂質、構造的脂質、中性脂質、及びPEG脂質のうちの1つ以上であり得る。例えば、mRNAは、LNPに封入される。別の例では、mRNAは、LNPに結合される。例えば、mRNAは、LNPに吸収される。

【0154】

LNPを調製する方法は、当業者に既知であり、例えば、Huang et al (2021) 及び Schoenmaker et al (2021) に記載されている。本明細書で使用される場合、「イオン化可能な脂質」又は「イオン可能な脂質 (複数)」という用語は、少なくとも1つのプロトン性又は脱プロトン性基を有する脂質を指すものとする。例えば、脂質は、生理学的pH (例えば、pH 7.4) 以下のpHで正に荷電され、第2のpH (例えば、生理学的pH以上) で中性である。実施形態では、脂質ナノ粒子は、Schoenmaker et al (2021) の表1に記載されるようなイオン化可能な脂質を含む。

【0155】

好適なイオン化可能な脂質は、アニオン性、カチオン性、又は双性イオン性親水性頭部基を有することができる。本開示における使用のための例示的なリン脂質 (アニオン性又は双性イオン性) としては、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジル

10

20

30

40

50

コリン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルグリセロールが挙げられる。一例では、脂質は、カチオン性脂質である。例示的なカチオン性脂質としては、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、1，2-ジステアリルオキシ-N，N-ジメチル-3-アミノプロパン（DSDMA）、1，2-ジオレイルオキシ-N，N-ジメチル-3-アミノプロパン（DODMA）、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（DLiNDMA）、2，5-ビス（（9z，12z）-オクタデカ-9，12，ジエン-1-イルオキシ）ベンジル-4-（ジメチルアミノ）ブタノエート（LKY750）が挙げられるが、これらに限定されない。一例では、リン脂質は、2，5-ビス（（9z，12z）-オクタデカ-9，12，ジエン-1-イルオキシ）ベンジル-4-（ジメチルアミノ）ブタノエート（LKY750）である。例示的な双性イオン性脂質としては、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、及びドデシルホスホコリンなどのアシル双性イオン性脂質及びエーテル双性イオン性脂質が挙げられるが、これらに限定されない。脂質は、飽和又は不飽和であることができる。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含まない。

10

20

30

40

50

【0156】

当業者であれば、PEG化脂質とは、ポリエチレングリコールで修飾されている脂質であることを理解するであろう。例示的なPEG化脂質としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、及びPEG修飾ジアルキルグリセロールが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、PEG脂質としては、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、PEG-DSPE脂質、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【0157】

本開示での使用に好適な中性又は両性イオン性脂質は当業者には明らかであり、例えば、1，2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1，2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DLP C）、1，2-ジミリスチル-sn-グリセロ-ホスホコリン（DMP C）、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1，2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、1，2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-ホスホコリン（DUPC）、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POP C）、1，2-ジオ-オクタデセニル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（18：0ジエーテルPC）、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（OChemSPC）、1-ヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（C16LysPC）、1，2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1，2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1，2-ジドコサヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1，2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（ME16.0PE）、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、1，2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1，2-ジリノレノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1，2-ジアラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1，2-ジドコヘキサエノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-（1-グリセロール）ナトリウム塩（DOPG）、及びスフィンゴミエリンが挙げられる。脂質は、飽和又は不飽和であることができる。

【0158】

例示的な構造的脂質としては、コレステロールフェコステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、及びアルファートコフェロールが挙げられるが、これら

に限定されない。実施形態では、構造的脂質は、ステロールである。実施形態では、構造的脂質は、コレステロールである。一実施形態では、構造的脂質は、カンペステロールである。

【0159】

組成物、投与経路、及び用量

当業者であれば、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原、又は本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原をコードするベクター若しくはポリヌクレオチドが、薬学的組成物に製剤化され得ることを理解するであろう。実施形態では、薬学的組成物は、ワクチン組成物である。

【0160】

態様では、本明細書は、コロナウイルスSタンパク質トリマー抗原をコードするヌクレオチドの配列を含むポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を提供し、Sタンパク質トリマーは、本明細書に記載されるSタンパク質トリマーのコイルドコイル領域内のアラニン空洞のサイズを低減する構造的変化を含むように変更されている。

【0161】

態様では、本明細書は、コロナウイルスSタンパク質トリマー抗原をコードするヌクレオチドの配列を含むポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を提供し、Sタンパク質トリマーのコイルドコイルを形成するSタンパク質モノマーの領域内の少なくとも1つのアミノ酸は、本明細書に記載されるように、より疎水性のアミノ酸で置換されている。

【0162】

かかる組成物は、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原、ベクター、又はポリヌクレオチドと、1つ以上の薬学的に許容される担体と、を含み得る。E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th Edition, 1995によるRemington's Pharmaceutical Sciencesは、本開示の免疫原の薬学的送達に好適な組成物及び製剤を記載している。一般に、担体の性質は、用いられる特定の投与様式に依存するであろう。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡化塩溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学的及び生理学的に許容される担体を含む、注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉末、ピル、錠剤、又はカプセル形態）では、従来の非毒性固体担体は、例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、又はステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される薬学的組成物（免疫原性組成物など）は、湿潤剤又は乳化剤、保存剤、及びpH緩衝剤などの少量の非毒性補助物質、例えば酢酸ナトリウム又はモノラウリン酸ソルビタンを含有し得る。特定の実施形態では、対象に投与するのに好適な担体は、滅菌、及び／又は懸濁され得、又はそれ以外の場合、所望の免疫応答を誘導するのに好適な組成物の1つ以上の測定した用量を含有する単位投与形態に含有され得る。また、治療目的でのその使用のための薬剤を伴い得る。単位投与形態は、例えば、無菌内容物を含有する密封したバイアル、若しくは対象への注射のための注射器中に、又はその後の可溶化及び投与のために凍結乾燥されるか、又は固体若しくは制御放出投与であり得る。

【0163】

実施形態では、組成物は、本明細書に記載されるワクチン抗原を含む。実施形態では、組成物は、本明細書に記載されるベクターを含む。一実施形態では、組成物は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む。実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAである。実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAである。実施形態では、ポリヌクレオチドは、mRNAである。

【0164】

実施形態では、組成物は、脂質ナノ粒子を含む。実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを封入する。

【0165】

実施形態では、組成物がワクチン組成物である場合、それは、免疫応答を誘発するため

10

20

30

40

50

の1つ以上の他のエピトープ、例えば、B細胞及び／又はT細胞エピトープを含み得る。

【0166】

実施形態では、組成物は、その意図された投与経路、例えば、局所的又は全身的な投与経路と適合性であるように製剤化される。投与経路の例としては、皮内、皮下、静脈内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、舌下、扁桃、経口、肺、局所、又は他の非経口及び粘膜の経路が挙げられる。

【0167】

実施形態では、組成物は、冷蔵庫の温度で安定であるように製剤化される。実施形態では、組成物は、冷蔵庫の温度での輸送及び／又は保存に好適であるように製剤化される。実施形態では、冷蔵庫の温度は、約3℃～約17℃、又は約4℃～約10℃、又は約4℃である。実施形態では、組成物は、室温で安定であるように製剤化される。実施形態では、室温は、約18℃～約24℃、又は約20℃～約23℃、又は約23℃である。実施形態では、組成物は、非コールドチェーン輸送及び／又は保存に好適であるように製剤化される。実施形態では、組成物は、室温の保存及び／又は蒸散に好適であるように製剤化される。実施形態では、組成物は、室温よりも高い温度、例えば、約25℃～40℃での輸送及び／又は保存に好適であるように製剤化される（コールドチェーン並びに低温保存及び輸送列車が利用できない国のため）。

【0168】

経口、経鼻、及び肺投与には、上記部位に送達される吸入及びスプレーを介した投与が含まれる。非経口、皮内、又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は、以下の成分：滅菌希釈剤、例えば、注射用水、食塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば、酢酸、クエン酸、又はリン酸、及び張度の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウム又はデキストロースを含むことができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基を用いて調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラス若しくはプラスチック製の複数用量バイアルに封入することができる。

【0169】

注射可能な使用に好適な組成物には、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、非水溶液、及び無菌注射可能溶液又は分散液の即時調製のための無菌粉末が含まれる。静脈内投与では、好適な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（BASF, Parsippany, N. J.）又はリン酸緩衝化食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易に注射できる程度までに流体であるべきである。製造及び保存の条件下で安定しており、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物作用の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの様々な抗細菌剤及び抗真菌剤によって達成することができる。等張剤、例えば、糖、マンニトールなどの多価アルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムもまた、組成物に含めることができる。注射可能組成物の長期吸収は、組成物中にモノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含めることによってもたすことができる。

【0170】

無菌注射可能溶液は、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原、ベクター、又はポリヌクレオチドを必要な量で上に列挙される成分の1つ又は組み合わせを有する適切な溶媒又は緩衝液に組み込み、必要に応じて、続いて濾過滅菌によって調製することが

できる。一般に、分散液は、ポリヌクレオチドを無菌ビヒクルに組み込むことによって調製され、基礎分散媒、及び上に列挙されるものから必要とされる他の成分を含有する。無菌注射可能溶液を調製するための無菌粉末の場合、好適な調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥を含み、予め無菌濾過したその溶液から活性成分プラス任意の追加の所望の成分の粉末を得る。

【0171】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤又は食用担体を含む。経口治療投与の目的のために、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原、ベクター、又はポリヌクレオチドは、賦形剤とともに組み込まれ、スプレー、錠剤、トローチ、又はカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、洗口剤としての使用のための流体担体を使用して調製することができる。薬学的に適合性の結合剤、及び／又はアジュバント材料を、組成物の一部として含めることができる。スプレー、錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、以下の成分：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカンスガム、若しくはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプン又はラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、PRIMOGE L、トウモロコシデンプン；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム若しくはステロート；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば、スクロース若しくはサッカリン；又は風味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、若しくはオレンジ風味、あるいは同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる。

【0172】

鼻孔吸入による投与に好適な製剤としては、担体が固体である場合、例えば、約1～約500ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗い粉末が挙げられ、これは、スプレー、ネブライザー、吸入器、又は吸い込みを介した手段で投与される。担体がネブライザーによる投与のための液体である好適な製剤は、薬剤の水性又は油性溶液を含む。吸入による投与では、薬剤はまた、好適な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧容器若しくはディスペンサー、又はネブライザーからの液滴若しくはエアゾールスプレーの形態で送達することができる。かかる方法は、U. S. 6, 468, 798に記載されるものを含む。

【0173】

経口吸入による投与に好適な製剤には、担体が固体である場合、微粒子サイズを、例えば、約20～約500ミクロンの範囲に有する粗い粉末が含まれ、これは、口に近接して保持された粉末を保有する容器からの経口吸入によって投与されるか、又は担体がネブライザーによる投与のための液体である場合、これは、薬剤の水性又は油性溶液を含むことができる。

【0174】

全身投与はまた、経粘膜的又は経皮的手段によるものであり得る。経粘膜又は経皮投与では、浸透すべき障壁に適した浸透剤が製剤に使用される。かかる浸透剤は、当該技術分野で一般に既知であり、これらには、例えば、経粘膜投与のでは、デタージェント、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔スプレー、液滴、又は坐剤の使用を通して達成され得る。経皮投与では、本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原、ベクター、又はポリヌクレオチドは、当該技術分野で一般に既知の、軟膏、膏薬、ゲル、又はクリームに製剤化される。

【0175】

針又は無針アプローチによるワクチンの皮内送達は、投与の容易さの点で利点を提供し、免疫能のある細胞を効果的に標的とする皮内投与アプローチが企図される。液体製剤は、プレフィルドシリンジ若しくは非プレフィルドシリンジで提供され得るか、又はかかる使い捨てシリンジジェットインジェクタ、シリンジに取り付けられた中空の微小針、及び皮内送達に適合された針を必要とする。単一ID針を備えたプレフィルドシリンジが市販されている。代替的に、パッチ又は他のミニニードル／スパイクデバイスなどのワクチンでコーティング若しくは含浸されたか、又はワクチンで構成された、固体又は生分解性の

マイクロニードルが用いられ得る。これらは、ワクチンコーティングが溶解するか、又は微小針自体が所定の位置に溶解するいずれかで皮膚の皮層に挿入される。ワクチン抗原は、液体若しくは半液体製剤として、又は固体若しくは粉末製剤として提供され得る。ジェットインジェクタは、液体ワクチン製剤をより深い皮膚層にフラッシュする高圧流を生成することによって動作する。しかしながら、固体形態でワクチンを送達するアプローチも有望であることが証明され得る。1つのかかる方法は、弾道アプローチであり、固体ワクチン粒子又はワクチンコーティング金粒子が、無針デバイスによって皮膚に向かって加速され、その結果、粒子は、皮膚の表皮及び皮層に堆積される。

【0176】

筋肉内投与は、例えば、筋肉内注射を含む、当業者によって既知の任意の筋肉内方法を介して行うことができる。

【0177】

組成物はまた、坐剤（例えば、カカオバター及び他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを有する）又は直腸送達のための保持浣腸剤の形態で調製することができる。

【0178】

組成物は、アジュバントを含み得る。1つ以上のアジュバントとの混合物として投与する場合、抗原に対する免疫応答を増強することができる。免疫アジュバントは、典型的には、以下の方法のうちの1つ以上で機能する：（1）免疫調節（2）増強された提示（3）CTL産生（4）標的化、及び／又は（5）デポ生成。

【0179】

含んでもよく、又は含まなくてもよい例示的なアジュバントとしては、粒子状又は非粒子状アジュバント、完全フロイントアジュバント（CFA）、アルミニウム塩ベースのアジュバント、エマルジョンベースのアジュバント、TLRアゴニスト、ISCOMS、MPLなどのLPS誘導体、及び3D-MPL、GLA、及びAGPなどのそれらの誘導体、ムラミルジペプチド又はムラミルトリペプチドなどのマイコバクテリア由来タンパク質、QS21、QS7、及びISCOMPREP（商標）サポニンなどのQuilA saponaria由来の特定のサポニン、ISCOMATRIX（商標）アジュバント、並びにサイモシナルファ1などのペプチドが挙げられる。サポニン構成要素に加えて、アジュバントは、ベータシトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロール、及びコレステロールなどのステロールを含み得る。いくつかの実施形態では、アジュバントは、例えば、スクアレン、アルファートコフェロール、及び界面活性剤を含む水中油エマルジョンの形態で、又はリポソームの形態で提示される。Ad d a V a xは、インフルエンザワクチンに有用であることが見出されているMF-59の製剤に基づいたスクアレン系水中油ナノエマルジョンである。アジュバントAS03、MF59、及びCpG1018は、すでに認可されたワクチンに使用されている。他の好適なアジュバントとしては、レシチン及びカロマーホモポリマー、Matrix M、AS01、ALFQが挙げられる。CpGモフィット及びTLRアゴニスト、B7、OX-40L、G-CSFを含む共刺激分子が企図される。アジュバントは、Liang et al Front. Immunol. 6 November 2020で考察されている。

【0180】

実施形態では、組成物は、アルミニウム塩ベースのアジュバント、エマルジョンアジュバント、又はTLRアゴニストのうちの1つ以上から選択されるアジュバントを含む。かかるアジュバントの例は、例えば、Liang et al (2020)に記載されている。

【0181】

ウイルスベクターの静脈内投与に好適な投薬量範囲は、例えば、概して、約0.001~10マイクログラムの核酸である。鼻腔内投与に好適な投薬量範囲は、概して、約0.01pg/kg体重~10mg/kg体重である。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験系に由来する用量応答曲線から推定することができる。坐剤は、概して、0.5重量%~10重量%の範囲の活性成分を含有し、経口組成物は、好ましくは、10%~95

10

20

30

40

50

%の活性成分を含有する。

【0182】

対象は、1用量の組成物又は2若しくは3用量の組成物をスケジュールされた間隔で受け得る。

【0183】

対象抗原に対して生成された抗体は、治療において、又はスクリーニングのために使用され得る。抗体としては、抗原若しくはその抗原性断片、又は抗原のダイマー若しくは多量体に特異的に結合して認識する免疫グロブリン、その抗原結合断片、又は誘導体が挙げられる。「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重（及び二重）特異的抗体、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子（例えば、scFv）、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体断片としては、抗体全体の改変によって産生されるか、又は組換えDNA方法論を使用して初めから合成される抗原結合断片のいずれかが挙げられる（Kontermann and Dubel (Ed), Antibody Engineering, Vol 1-2, Ed., Springer Press, 2010が参照になり得る）。

【0184】

エピトープという用語は、抗原性である分子上の特定のペプチド配列を指し、それによって特定の免疫応答を誘発する。エピトープは、B細胞及び／又はT細胞が応答する抗原の領域である。抗体は、連続したアミノ酸又は非連続のアミノ酸の両方から形成され得る特定の抗原エピトープに結合することができる。

【0185】

防止及び／又は治療の方法

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス感染を防止及び／又は治療する方法を提供する。

【0186】

本明細書で使用される場合、「予防」又は「予防法」という用語は、感染又はその症状に罹患するか、又はそれを発症する可能性を低減することを指す。予防は完全である必要はなく、対象が最終的に感染若しくはその症状に罹患しないか、又は発症しないことを意味するものではない。

【0187】

本明細書で使用される場合、「治療すること」又は「治療」という用語は、所望される治療転帰を少なくとも部分的に得ることを指す。実施形態では、治療は、CoV感染の1つ以上の症状の出現を予防又は遅延させることを含む。実施形態では、治療は、CoV感染の1つ以上の症状の発症を阻止又は低減することを含む。

【0188】

「対象 (subject)」又は「対象 (subjects)」への言及は、コロナウイルス感染に罹患し易いか、又はコロナウイルスへの曝露のリスクがある対象を含む。対象は、感染又は非感染であり得、無症状又は治療を必要とし得ない。実施形態では、対象は、SARS-CoV-2感染に罹患し易いか、又はその曝露のリスクがある。例えば、対象は、哺乳動物、鳥類、節足動物、脊索動物、両生類、又は爬虫類であることができる。例示的な対象としては、ヒト、霊長類、家畜（例えば、ヒツジ、ウシ、ニワトリ、ウマ、ロバ、ブタ）、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）、捕獲野生動物（例えば、キツネ、シカ）、動物園動物（例えば、ライオン、トラ、クマ）、病原体保有動物（例えば、コウモリ、ラクダ、センザンコウ）が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、対象は、哺乳動物である。実施形態では、対象は、ヒトである。実施形態では、ヒトは、胎児、乳児、小児、早期成人、及び成人である。実施形態では、成人は、高齢成人である。実施形態で

は、成人は、年齢が60歳超、年齢が65歳超、年齢が70歳超、年齢が75歳超、年齢が80歳超、年齢が85歳超、年齢が90歳超のうちの1つ以上である。実施形態では、対象は、過去のコロナウイルス感染を有していた。実施形態では、対象は、過去のSARS-CoV-2感染を有していた。実施形態では、対象は、本明細書に記載される一次コロナウイルス治療レジメンを受けている。実施形態では、対象は、一次及び二次コロナウイルス治療レジメンを受けている。実施形態では、対象は、一次コロナウイルス治療レジメン、二次コロナウイルス治療レジメン、及び三次コロナウイルス治療レジメンを受けている。実施形態では、対象は、免疫無防備状態である。実施形態では、対象は、呼吸器状態を有する。

【0189】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルスに対する免疫応答を誘導する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルスに対する免疫応答を増強する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0190】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス感染の可能性を予防又は低減する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0191】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス感染の可能性又はその症状の重症度を予防又は低減する方法を提供し、方法は、対象に、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。

【0192】

態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス感染の重症度及び／又は持続期間を低減する方法を提供し、方法は、対象に、本明細書に記載されるワクチンを投与することを含む。本明細書で使用される場合、「感染の重症度を低減すること」という語句又は同様の語句は、個体における以下：ウイルスの力価、ウイルス感染の持続期間、対象におけるコロナウイルス感染の1つ以上の症状の厳しさ又は持続期間、のうちの1つ以上を低減することを含む。本明細書で使用される場合、「コロナウイルス感染の持続期間」という語句は、個体がCoV感染又はCoV感染によって引き起こされる症状を有する期間を指す。

【0193】

態様では、本発明は、コロナウイルスに感染したヒト個体におけるウイルス排出を予防又は低減する方法を提供し、方法は、対象に、本明細書に記載のワクチンを投与することを含む。

【0194】

実施形態では、本発明は、一次ワクチンレジメンであるワクチンを提供する。本明細書で使用される場合、「一次ワクチンレジメン」は、特定の病原体に対する応答を生じるために対象に投与される第1のワクチンレジメンである。SARS-CoV-2の文脈において、一次ワクチンは、祖先株及び／又はそのバリエーションに対する免疫応答を生じるために対象に投与される第1のワクチンレジメンである。

【0195】

実施形態では、本発明は、一次コロナウイルスワクチンレジメンのためのブースターワクチンを提供する。実施形態では、本発明は、対象が2つ以上の過去のコロナウイルスワクチンレジメンを受けている場合のためにブースターワクチンを提供する。実施形態では、ブースターは、一次ワクチンレジメンによって誘発された免疫応答を増強することによって作用する。実施形態では、ブースターは、一次ワクチンレジメンによって、防御免疫応答がより少なく生成されるか、ほとんど、又はまったく生成されないVOC又はVOI又はVHCに対する免疫応答を増強することによって作用する。実施形態では、ブースターは、一次ワクチンレジメンの少なくとも6ヶ月、又は少なくとも12ヶ月、又は少なくとも18ヶ月、又は少なくとも2年、又は少なくとも3年、又は少なくとも5年、又は少

10

20

30

40

50

なくとも6年、又は少なくとも7年後に投与される。実施形態では、ブースターは、連続的に、又は1つ以上の他のブースターワクチンと組み合わせて投与される。

【0196】

一次ワクチンレジメン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるワクチンは、対象が一次コロナウイルスワクチンレジメンを受けている後に投与される。当業者は、一次コロナウイルスワクチンレジメンが、コロナウイルス感染に対する突起を提供する任意のコロナウイルスワクチンレジメンであり得ることを理解するであろう。実施形態では、コロナウイルスワクチンは、SARS-CoV-2コロナウイルスワクチンである。

【0197】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、a) 単回用量ワクチンレジメン、b) 2回用量ワクチンレジメン、c) 2回用量ワクチンレジメンの単回用量、又はd) それらの組み合わせから選択される。

【0198】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、a) RNAベースのワクチン、b) DNAベースのワクチン、c) ウイルスベクターワクチン、d) 不活化ワクチン、e) 弱毒化生ワクチン、及びf) タンパク質サブユニットワクチンから選択される。

【0199】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、RNAベースのワクチンである。本明細書で使用される場合、「RNAベースのワクチン」は、mRNAなどのRNA分子を介して、ヒト細胞内でコロナウイルス抗原、例えば、Sタンパク質又はその一部の発現のための指示を伝達する。

【0200】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、DNAベースのワクチンである。本明細書で使用される場合、「DNAベースのワクチン」は、DNA分子を介して、ヒト細胞内でコロナウイルス抗原、例えば、Sタンパク質又はその一部の発現のための指示を伝達する。

【0201】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、ウイルスベクターワクチンである。実施形態では、ベクターは、アデノウイルス、ポックスウイルス、麻疹ウイルス、及び水疱性口内炎ウイルスから選択される。

【0202】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、不活化ウイルスワクチンである。不活化ワクチンは、ウイルスがもはや伝播可能でないように、例えば、化学的UV光及び／又は熱でウイルスを不活性化することによって作製される。かかるワクチンは、それらが免疫認識及び免疫応答の生成のためのいくつかのエピトープを提示するため、しばしば望ましい。

【0203】

実施形態では、一次コロナウイルスワクチンレジメンは、弱毒化生コロナウイルスである。本明細書で使用される場合、「弱毒化生」は、指す。

【0204】

実施形態では、ワクチンは、タンパク質ベースのワクチン、例えば、タンパク質サブユニットワクチン又はウイルス様物品である。本明細書で使用される場合、「タンパク質サブユニットワクチン」は、宿主免疫応答を刺激することができる免疫原性抗原を含む。コロナウイルスがSARS-CoV-2である場合、タンパク質サブユニットワクチンは、S1タンパク質又はその一部、RBDドメイン、S2タンパク質又はその一部を含み得る。実施形態では、タンパク質ベースのワクチンは、ウイルス様粒子又はナノ粒子である。

【0205】

併用治療

本明細書に記載されるコロナウイルスワクチン抗原又はワクチンは、対象に、1つ以上

10

20

30

40

50

の更なるワクチン抗原又はワクチンと組み合わせて投与され得る。更なるワクチン抗原又はワクチンは、インフルエンザ、SARS-CoV-2、又はそれらの特定のVOC、VOI、若しくはVHCなどの感染性病原性生物に対する免疫応答を生じ得る。投与は、併用（同時に）、又はいずれかの順序で連続的であり得る。

【0206】

キット、デバイス、表面、又はストリップ

対象コロナウイルス抗原は、疫学的、診断的、精製、薬物スクリーニング、ワクチンスクリーニング適用などを含む、アッセイ目的のために固体又は半固体表面に捕捉される。抗原を表面に固定する多くのかかる適用及び方法は、当該技術分野で既知であり、包含される。

10

【0207】

本明細書で使用される場合、「相補体」又は「相補的」という用語は、その平易な通常の意味に従って使用され、相補的なヌクレオチド又はヌクレオチドの配列と塩基対形成することができるヌクレオチド（例えば、RNAヌクレオチド又はDNAヌクレオチド）又はヌクレオチドの配列を指す。本明細書に記載され、当該技術分野で一般に既知であるように、アデノシンの相補的（マッチング）ヌクレオチドは、DNAにおけるチミジンであり、又は代替的にRNAではアデノシンの相補的（マッチング）ヌクレオチドは、ウラシルであり、グアノシンの相補的（マッチング）ヌクレオチドは、シトシンである。ヌクレオチドはまた、非天然に存在するか又は改変された塩基であることができる。したがって、相補体は、第2の核酸配列の対応する相補的ヌクレオチドと塩基対形成するヌクレオチドの配列を含み得る。相補体のヌクレオチドは、第2の核酸配列のヌクレオチドと部分的に又は完全に一致し得る。相補体のヌクレオチドが第2の核酸配列の各ヌクレオチドと完全に一致する場合、相補体は、第2の核酸配列の各ヌクレオチドと塩基対を形成する。相補体のヌクレオチドが第2の核酸配列のヌクレオチドと部分的に一致する場合、相補体のヌクレオチドのうちのいくつかのみが、第2の核酸配列のヌクレオチドと塩基対を形成する。相補的配列の例としては、コード配列及び非コード配列が挙げられ、非コード配列は、コード配列に相補的なヌクレオチドを含有し、したがって、コード配列の相補体を形成する。相補的配列の更なる例は、センス及びアンチセンス配列であり、センス配列は、アンチセンス配列に相補的なヌクレオチドを含有し、したがって、アンチセンス配列の相補体を形成する。プリン含有ヌクレオチド（例えば、A又はG）とピリミジン含有ヌクレオチド（例えば、T又はC）との対形成は、相補体とみなされる。A-T及びC-G対形成は、相補的塩基でアミン基とカルボニル基との間で二重又は三重の水素結合を形成するように機能する。配列の相補性は、核酸のうちのいくつかのみが塩基対形成に従って一致する部分的なものであり得、又は全ての核酸が塩基対形成に従って一致する完全なものであり得る。したがって、互いに相補的である2つの配列は、互いに相補体である特定のパーセンテージのヌクレオチドを有し得る（例えば、特定の領域にわたって約60%、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はより高い相補性）。一実施形態では、2つの配列は、それらが完全に相補的であるときに相補的であり、100%の相補性を有する。一実施形態では、2つの配列は、それらが機能的に相補的であるとき、相補的であり、すなわち、適切な条件下で首尾よくアニーリングし、少なくとも80%～99%、又は少なくとも70%～95%の塩基対形成を有する。

20

30

40

【実施例】

【0208】

実施例1－材料

材料実施例1～9

組換えタンパク質。Wrapp et al., 2020によって報告されたS2Pタンパク質に対応するSARS-CoV-2 (Hu-1単離株) S外部ドメインをコードする合成遺伝子を、GeneART-ThermoFisher Scientificから得た。遺伝子は、S残基16～1208、フリン切断部位変異、R⁶⁸²RAR→G⁶

50

8² S A S、並びに986位及び987位のジP r o置換をコードする。S 2 PのC末端に、各々G S G Sリンカーによって分離されたフォルドン (Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L) (配列番号20)、オクターH i s、及びa v i t a g (G L N D I F E A Q K I E W H E) 配列 (F H A又はF H Aタグ配列番号21と総称される) を付加した。合成S 2 P遺伝子を、p c D N A 3 (I n v i t r o g e n) 内で、N h e Iを介して組織プラスミノゲンアクチベーターリーダーをコードするDNA配列の下流にライゲーションした。GeneART-ThermoFisher Scientificによって産生された変異S 2 Pサブ断片をコードする合成遺伝子を使用して、S 2 P発現ベクターに変異を導入した。S 1サブユニット (アミノ酸16~682) 及び受容体結合ドメイン (RBD、アミノ酸332~532) をコードする合成遺伝子をGeneART-ThermoFisher Scientificによって得、p c D N A 3におけるN h e Iを介して組織プラスミノゲンアクチベーターリーダーにライゲーションした。両方のタンパク質は、C末端6H i sタグ及びA v i t a g配列をコードする。h A C E 2-F cは、G S リンカーを介してヒトI g G 1のF cドメインに連結されたヒトA C E 2外部ドメインのアミノ酸19~615を含む組換え融合タンパク質である。h A C E 2-F cをコードする合成遺伝子をGeneART-ThermoFisher Scientificから得、p c D N A 3におけるN h e Iを介して組織プラスミノゲンアクチベーターリーダーの下流にライゲーションした。S及びh A C E 2クローンのDNA配列を、蛍光サンガー配列決定 (B i g D y e, A B I) によって検証した。

10

20

30

40

50

【0209】

組換えタンパク質の発現及び精製。293fectinを製造業者 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) によって推奨されるように使用して、S 2 P発現ベクターを293Freestyle細胞にトランスフェクトした。細胞を34℃で5日間培養し、その後、トランスフェクション上清を遠心分離及び0.45µmニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。次に、S 2 Pタンパク質を、T A L O N樹脂 (M e r c k) を使用した二価カチオンアフィニティークロマトグラフィー、続いてA K T A p u r e装置 (C y t i v a) に連結されたS u p e r o s e 6 I n c r e a s e 10/300カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によって精製した。S 1及びRBDタンパク質は、E x p i f e c t a m i n eを製造業者の説明書 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) に従って使用して、適切な発現ベクターを用いたE x p i 293細胞のトランスフェクションによって産生した。34℃で4日間培養した後、トランスフェクション上清を遠心分離及び0.45µmニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。S 1及びR B Sタンパク質を、T A L O N樹脂 (M e r c k) を使用した二価カチオンアフィニティークロマトグラフィー、続いてA K T A p u r e装置 (C y t i v a) に連結されたS u p e r d e x 200 16/600カラムを使用したS E Cによって精製した。h A C E 2-F cを、S 1及びRBDのようにE x p i 293細胞で産生し、プロテインG-アガロース (G e n s c r i p t) を使用して、澄清化した培養上清から精製した。h A C E 2-F cを、A K T A p u r e装置 (C y t i v a) に連結されたS u p e r d e x 200 16/600カラムでS E Cによって更に精製した。タンパク質は全て、A m i c o n遠心フィルターユニットを使用して濃縮した。タンパク質溶液は、0.45µmニトロセルロースフィルターを使用して濾過滅菌し、タンパク質小分けを-80℃で保存した。タンパク質純度を、S D S-PAGE及びS E Cによって評価した。

【0210】

組換えモノクローナル抗体 (mAb)。S A R S-CoV-2指向性mAb C R 3022 (M u e l e n, P l o S M e d 2006)、C B 6 (S h i, N a t u r e 2020)、H 4及びB 38 (W u e t a l., 2020)、2-51 (L i u, e t a l., 2020)、C O V A 2-15、C O V A 2-33、C O V A 1-25、C O V A 1-22、C O V A 2-14 (B r o u w e r e t a l., 2020) の可変領域を含有する、p C D N A 3ベースのI g G 1重鎖及び軽鎖発現ベクター (C e n t e

r et al. 2020) を、GeneART-ThermoFisher Scientificによって産生されたmAb重鎖及び軽鎖可変領域をコードする合成遺伝子断片を使用して、施設内で生成した。mAbは、Expifectamineを製造業者の説明書(ThermoFisher Scientific)に従って使用して、等量の適合した重鎖及び軽鎖ベクターを用いたExp293細胞のトランスフェクションによって産生した。37℃で5日間培養した後、トランスフェクション上清を遠心分離及び0.45 µmニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。IgGを、ブロテインG-アガロース(Genscript)を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、PBSに交換した。抗体は、Amicon遠心フィルターユニットを使用して濃縮した。IgG溶液は、0.45 µmニトロセルロースフィルターを使用して濾過滅菌し、小分けを-80℃で保存した。

10

【0211】

示差走査蛍光測定。示差走査蛍光測定を使用して、タンパク質熱安定性を評価した(Niesen Nature Protocols 2007)。10 µgのタンパク質を、5×濃度のSYPRO Orangeタンパク質ゲル染色(Sigma Aldrich)を用いて25 µLに二重測定で希釈した。次いで、試料をMx3005P qPCRシステムで、25℃から95℃まで0.5℃ずつの増加で、増加当たり1分間加熱した。各増加の終わりに、蛍光の3回測定を行った。励起は492 nmであり、発光は610 nmだった。融解温度は、融解曲線の負の一次導関数の最小値であると決定した。

20

【0212】

バイオレイヤー干渉法。OctetRED System(ForteBio, Fremont CA)を使用して、BLIベースの測定(BLI)を決定した。抗体を動態緩衝液で10 µg/mlに希釈し、抗ヒトIgG Fcキャプチャバイオセンサー(AHC, ForteBio)に固定化した。動態アッセイを、1,000 rpmの試料プレート振盪速度で標準動態獲得速度設定(5.0 Hz、20で平均化)を使用して、30℃で実行した。動態実験は、5つのステップ：(a)ベースライン(180秒)、(b)抗体負荷(300秒)、(c)第2のベースライン(180秒)、(d)抗原の会合(300秒)、及び(e)抗原の解離(300秒)を含んだ。1:1の結合モデルを使用したForteBio Data Analysis 10.0ソフトウェアを使用してフィッティング曲線を構築し、補正のために二重参照減算を使用した。

30

【0213】

免疫化。性別、体重、及び齢について一致したモルモット(近交系トリコロール)を、PBS中の30 µgのS2Pタンパク質と(v/v)AddaVaxアジュバント(InvivoGen, San Diego, CA)との1:1混合物を用いて同時に、0週目、4週目、及び14週目に皮下免疫した。陰性対照群は、PBSとアジュバントとの1:1(v/v)混合物を用いて上記のように免疫した。血液は、第2の用量の2週間後に伏在静脈を介して、第3の用量の2週間後に最終心臓穿刺によって収集し、血清調製のために凝固させた。血清を-80℃で保存し、56℃で30分間熱不活化した後、免疫学的アッセイに使用した。動物を飼育し、処置は全て、South Australian Health and Medical Research Institute(Gilles Plains, Australia)のPreclinical, Imaging, and Research Laboratoriesで行われた。動物実験は全て、科学的目的のための動物のケア及び使用に関するオーストラリア規範(Australian Code for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes)の第8版に従って行われ、SAHMRI動物倫理委員会(Animal Ethics Committee)、プロジェクト番号SAM-20-030によって承認された。

40

【0214】

ELISA。Nunc maxisorp 96ウェルプレートにS2P、S1、及びRBDタンパク質溶液(2 µg/ml、PBS)を用いて4℃で一晩コーティングした。

50

プレートにPBSで洗浄し、BSA (10 µg/ml、PBS) を用いて室温で1時間ブロッキングした。プレートを再度洗浄し、次いで、連続希釈した血清試料とともに室温で2～4時間インキュベートした。抗体結合を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ウサギ抗モルモット抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) 及び3,3',5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) テトラメチルベンジジンジヒドロクロリド (TMB) を使用して検出した。異なる抗原との抗体結合を、Prismバージョン9ソフトウェアを使用して非線形回帰を用いたフィッティング曲線によって比較し、BSAとの結合によって定義されるバックグラウンドの10倍を超える光学密度 (OD) 値の補間によって力価を得た。

【0215】

偽型ウイルス産生。Jackson et al., 2020の方法に従って、S-偽型HIVルシフェラーゼレポーターウイルスを調製した。S-HIV偽粒子の産生のためのプラスミドは、NIH Vaccine Research CentreのDoria-Rose教授の厚意により寄贈され、コドン最適化全長Sを有するWH-Human1__EPI__402119発現プラスミド (Genbank No. MN908947.3)、パッケージングプラスミドpCMVΔR8.2及びルシフェラーゼレポータープラスミドpHR' CMV Luc (Naldini PNAS 1996; 93: 11382)、並びにTMPRSS2プラスミド (Botchker JVI 2006, 80: 9869) を含む。4つのプラスミドをHEK293T細胞に共トランスフェクションし、18時間のインキュベーション後、培地を、10%ウシ胎仔血清 (DMF10) を含有する新鮮なダルベッコ改変の最小必須培地に置き換え、更に3日間培養した。レトロウイルス偽型ウイルスを含有する澄清化した上清を、0.45 µm膜フィルターに通して濾過した。懸念されるバリエーションに観察される変異を、重複伸長ポリメラーゼ連鎖反応によって、WH-Human1__EPI__402119におけるSオープンリーディングフレームに導入した。

【0216】

中和アッセイ。中和は、Jackson et al., 2020の方法に従って行われた。熱不活化血清 (56℃で30分間) をDMF10で連続希釈し、各希釈液を等体積のS-偽型HIVルシフェラーゼレポーターウイルスと混合し、37℃で1時間、三重測定でインキュベートした。ウイルス血清混合物を、前日にポリ-L-リジンコーティング96ウェルプレートに細胞5,000個/ウェルで結合した293T-ACE2細胞単層に添加し、37℃で2時間インキュベートしてから、等体積のDMF10を添加した。3日後、組織培養液を除去し、単層をPBSで1回洗浄し、細胞培養溶解試薬 (Promega) で溶解し、Claristarプレートリーダー (BMG Lab Technologies) でルシフェラーゼ基質 (Promega) を使用してルシフェラーゼを測定した。侵入の平均パーセンテージを、(RLU血漿+ウイルス) / (RLU培地+ウイルス) × 100として計算した。侵入パーセンテージを、Prism v8.3.1で血漿の逆数希釈に対してプロットし、曲線を一部特異的結合Hillプロットにフィッティングさせた。50%のウイルス侵入を防止するために必要な血漿の逆数希釈を、非線形回帰直線から計算した (ID50)。検出可能な中和抗体の最低量は、200の力価である。50%中和に達しなかった全ての試料に、100の任意値を割り当てた。

【0217】

血清-mAb交差-競合ELISA。ビオチン化S2Pタンパク質を293Exp1-BirA細胞 (BirAを安定的に発現する293Exp1細胞) で産生させ、S2Pについて上述したように精製した。競合ELISAでは、Nunc maxisorp 96ウェルプレートをストレプトアビジン (Sigma) (50 mM炭酸緩衝液中に5 µg/ml) を用いて4℃で一晩コーティングし、その後、それらをBSA (PBS中の10 mg/ml) を用いて室温で1時間ブロックした。2回の洗浄後、プレートは、ビオチン化S2Pトリマー (0.05% Tween 20を含有する5 mg/mlのBSA/PBS中の2 µg/ml) とともに、室温で1時間インキュベートした。連続希釈したワクチン

血清を、飽和以下の量の hACE2-Fc 及び抗 SARS-CoV-2 S mAb と混合し、室温で更に 2 時間、ストレプトアビジン-ビオチン化 S2P コーティングプレートとともにインキュベートした。mAb 結合は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ (ThermoFisher-Scientific)、又は hACE2-Fc ではホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA、IgG、IgM (Dako, Glostrup, Denmark) を使用して検出した。基質は TMB だった。色調反応は、Multiskan Ascent プレートリーダー (Thermo Electron, Waltham, MA) を用いて測定した。異なる抗原に結合する抗体を、Prism バージョン 9 ソフトウェアを使用して非線形回帰を用いて曲線をフィッティングさせることによって比較し、ID50 を補間によって得た。

【0218】

10

統計的方法。データは、Prism 9 におけるダン多重比較を用いたノンパラメトリッククラスカル・ワリス検定を使用して統計的に比較した。中和アッセイでは、フリードマン検定を使用して対になった試料を比較した。

【0219】

材料実施例 10～11

組換えタンパク質。SARS-CoV-2 Hu-1、デルタ (B.1.617.2) 及びオミクロン BA.1 (B.1.1.529) 受容体結合ドメイン (Hu-1 付番システムによる S 残基 332～532) をコードする合成遺伝子は、GeneART-ThermoFisher Scientific から得た。RBD の C 末端に、GGSGS-オクタHis-GSGS-avitag (GLNDIFEAQKIEWHE) 配列を付加した。GGSGS = 配列番号 22、GSGS = 配列番号 23。合成 RBD-His8-avitag 遺伝子を、pcDNA3 (Invitrogen) 内で、NheI を介して組織プラスミノーゲンアクチベーターリーダーをコードする DNA 配列の下流にライゲーションした。Wrapp et al., 2020 によって報告された S2P タンパク質に対応する SARS-CoV-2 デルタ 及び オミクロン BA.1 単離株 S 外部ドメインをコードする合成遺伝子は、GeneART-ThermoFisher Scientific から得た。遺伝子は、S 残基 16～1208 (Hu-1 付番システムによる)、フリン切断部位変異、デルタでは R681RRAR→P681GSAS、及びオミクロン BA.1 では H681RRAR→P681GSAS、並びに 986 位及び 987 位のジPro'2P'置換をコードする。S2P の C 末端は、フォルドン (YIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL: 配列番号 20)、オクターHis、及び avitag (GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号 21) 配列 (FHA 又は FHA タグと総称される) が付加され、各々 GSGS リンカーによって分離される。Hu-1 単離株の S 残基 16～1208、フリン切断部位変異、R682RAR→G682SAS、及び 986 位及び 987 位のジPro 置換をコードする合成遺伝子に、GSGS リンカーをコードする合成 DNA 配列及び 6His タグが 3' 末端を付加し、S2P-1208-H6 を得た。合成 S2P 遺伝子を、pcDNA3 (Invitrogen) 内で、NheI を介して組織プラスミノーゲンアクチベーターリーダーをコードする DNA 配列の下流にライゲーションした。GeneART-ThermoFisher Scientific によって産生された変異 S2P サブ断片をコードする合成遺伝子を使用して、S2P 発現ベクターに変異を導入した。

20

30

40

【0220】

組換えタンパク質の発現及び精製。ビオチン化 RBD 及び S2P-FHA タンパク質は、Expifectamine を製造業者の説明書 (ThermoFisher Scientific) に従って使用して、適切な発現ベクターを用いた Exp293-BiRA 細胞のトランスフェクションによって産生した。34℃で4日間培養した後、トランスフェクション上清は、遠心分離及び 0.45m ニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。RBD 及び S2P-FHA タンパク質を、TALON 樹脂 (Merck) を使用した二価カチオンアフィニティークロマトグラフィー、続いて、それ

50

それAKTApure装置 (Cytiva) に連結されたSuperdex 200 16 / 600又はSuperose 6カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。非ビオチン化S2P-FHA及びS2P-1208、H6タンパク質を、293Fectin又はExpifectamineをそれぞれ製造業者の説明書 (ThermoFisher Scientific) に従って使用する適切な発現ベクターを用いて、FreeStyle (商標) 293細胞 (293Freestyle) 細胞又はExp293F (商標) (Exp293F) 細胞のいずれかのトランスフェクションによって産生した。細胞を34℃で5日間培養し、その後、トランスフェクション上清は、遠心分離及び0.45 µmニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。次に、S2Pタンパク質を、TALON樹脂 (Merck) を使用したニ価カチオンアフィニティークロマトグラフィー、続いてAKTApure装置 (Cytiva) に連結されたSuperose 6 Increase 10 / 300カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。必要な場合、TALONアフィニティークロマトグラフィーステップは、AKTApure装置 (Cytiva) に連結されたHiTrapキレート化HP固定化金属アフィニティークラム (Cytiva) を使用したクロマトグラフィーステップに置き換えた。この場合、S2Pタンパク質は、イミダゾール濃度勾配を使用して溶離した。

10

【0221】

組換えモノクローナル抗体 (mAb)。SARS-CoV-2 指向性mAb COVOX222 (Dejnirattisai et al. 2021)、S2H97及びS2E12 (Starr et al. 2021)、CV3-25 (Jennewein et al. 2021)、並びに対照HCV-指向性mAbであるHC33.1 (Center et al. 2020) の可変領域を含有する、pCDNA3ベースのIgG1重鎖及び軽鎖発現ベクターを、GeneART-ThermoFisher Scientificによって産生されたmAb重鎖及び軽鎖可変領域をコードする合成遺伝子断片を使用して、施設内で生成した。mAbは、Expifectamineを製造業者の説明書 (ThermoFisher Scientific) に従って使用して、等量の適合した重鎖及び軽鎖ベクターを用いてExp293F細胞のトランスフェクションによって産生した。37℃で5日間培養した後、トランスフェクション上清は、遠心分離及び0.45 µmニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。IgGを、プロテインG-アガロース (Genscript) を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、PBSに交換した。抗体は、Amicon遠心フィルターユニットを使用して濃縮した。IgG溶液は、0.45 µmニトロセルロースフィルターを使用して濾過滅菌し、小分けを-80℃で保存した。

20

30

【0222】

アビジン捕捉ELISA。Nunc maxisorp 96ウェルプレートのアビジン (Rockland) (50mM炭酸緩衝液中に5 µg/ml) を用いて4℃で一晩コーティングし、その後、それらをBSA (PBS中の10 mg/ml) を用いて室温で1時間ブロックした。4回の洗浄後、プレートをビオチン化RBDタンパク質 (0.05 % Tween 20を含有する5 mg/mlのBSA/PBS中の2 µg/ml) とともに室温で1時間インキュベートした。連続希釈したワクチン血清を、アビジン-ビオチン化RBDコーティングプレートとともに室温で更に2時間インキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ウサギ抗モルモットIgG (DAKO) を使用して、抗体結合を検出した。基質は、TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) だった。色調反応は、Multiskan Ascentプレートリーダー (Thermo Electron, Waltham, MA) を用いて測定した。異なる抗原との抗体結合は、Prismバージョン9ソフトウェアを使用して非線形回帰を用いて曲線をフィッティングすることによって比較し、エンドポイント力価は、一次抗体の非存在下で得られたバックグラウンドODの5倍として決定された。

40

【0223】

50

ストレプトアビジン捕捉ELISA。Nunc maxisorp 96ウェルプレート

トを、ストレプトアビジン

【0224】
(Sigma) (50mM炭酸緩衝液中に5 μ g/ml)を用いて4℃で一晩コーティングし、その後、それらをBSA (PBS中の10mg/ml)を用いて室温で1時間ブロックした。2回の洗浄の後、プレートは、ビオチン化S2P-FHAトリマー (0.05%のTween 20を含有する5mg/mlのBSA/PBS中の2 μ g/ml)とともに、室温で1時間インキュベートした。連続希釈したヒトmAbを、ストレプトアビジン-ビオチン化S2P-FHAコーティングプレートとともに室温で更に2時間インキュベートした。mAb結合を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂ (ThermoFisher-Scientific)を使用して検出した。基質は、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)だった。色調反応は、Multiskan Ascentプレートリーダー (Thermo Electron, Waltham, MA)を用いて測定した。

【0225】

生ウイルス中和アッセイ。Aggarwal et al. 2021によって開発されたHAT-24細胞を用いた高速高含量SARS-CoV-2マイクロ中和アッセイ (R-20アッセイ) プラットフォームを使用して、ワクチン血清の生ウイルス中和ID₅₀値を決定した。HAT-24細胞をトリプシン処理し、5% v/vでHoechst-33342生核色素 (Invitrogen, R37605)を含むDMEM-5%ウシ胎児血清培地中に再懸濁させ、384ウェルプレート (Corning, CLS3985)に細胞1.6 $\times$ 10⁴個/ウェルで播種した。モルモット血清を、DMEM-5%FBSで連続希釈 (2倍) し、致死用量中央値の2倍 (2 $\times$ LD₅₀)で等体積のSARS-CoV-2ウイルス溶液と二重測定で混合した。37℃でのウイルス-血清インキュベーションの1時間後、40 μ Lを等体積の播種前細胞に加えた。次いで、細胞プレートを20時間インキュベートした後、InCell Analyzer HS2500高含量蛍光顕微鏡システム (Cytiva)で直接撮像した。細胞核数をIN Carta自動画像分析ソフトウェア (Cytiva)で得、ウイルス中和のパーセンテージを式: $N\% = (D - (1 - Q)) \times 100 / D$ で計算した。式中、「Q」は、感染していない対照 (100%の中和を有すると定義される) で除したウェルの核数であり、陽性感染対照 (0%の中和を有すると定義される) の平均数ではD = 1 - Qである。希釈した血清試料の中和エンドポイント力価を決定するためのカットオフは、技術的重複の平均について $\geq 50\%$ の中和に達する最後の連続希釈に設定した。

【0226】

化学架橋。サイログロブリン (PBS中の0.5mg/ml、Cytiva)を、PBS中の1mMビス (スルホスクシンイミジル) スペレート (Thermo Fisher)を用いて氷上で1時間、化学架橋した。反応をPBS中の30mMグリシン (pH 7.2)を用いて氷上で30分間クエンチした。

【0227】

S2P-1273発現ベクターの構築。Hu-1、デルタ、及びオミクロンBA.1バリエーションのS残基1~1273をコードする合成遺伝子を、GeneART-ThermoFisherによって産生した。遺伝子は、5'末端にKpnI制限部位、続いてTATCGCCACC (配列番号24) 配列 (ATG開始コドンの前)、及び3'末端にXbaI部位 (TAA停止コドンの後)を含有した。合成遺伝子は、フリン切断部位変異、Hu-1ではR682RAR→G682SAS、デルタではR681RRAR→P681GSAS、及びオミクロンBA.1ではH681RRAR→P681GSAS、並びに986位及び987位のジ-Pro'2P'置換をコードした。合成遺伝子を、CMVプロモーター駆動発現ベクターpSHUTTLE (Agilent)のKpnI-EcoRV部位にクローニングした。

【0228】

10

20

30

40

50

293T細胞で発現されたS2P-1273糖タンパク質のウェスタンブロッティング。293T細胞を、FUGENE HD (Promega) を製造業者の説明書に従って使用して、S2P-1273発現ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、10,000rpmで90秒間遠心分離し、ペレットを溶解緩衝液(1mMエチレンジアミン四酢酸を含有するPBS中の1% Triton X100)に氷上で30分間溶解した。溶解物を4℃、10,000rpmで10分間の遠心分離によって澄清化し、3%ベータメルカプトエタノールの存在下でSDS-PAGEに供した。タンパク質をiBLOT2システム(Thermo Fisher)を使用してニトロセルロースに移し、膜をPBS中の5%脱脂粉乳でブロックした。フィルターをウサギ抗S1ポリクローナル抗体(Sino Biological)及び抗ウサギIRDye 800CW (Odyssey)で探査した。次いで、フィルターをLICOREイメージャでスキャンした。

10

【0229】

フローサイトメトリー。293T細胞を、FUGENE 6 (Promega) を製造業者の説明書に従って使用して、S2P-1273発現ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、付着した細胞をPBSで洗浄し、次いで、バーゼン液を使用して脱離した。細胞を、800µlのFACS緩衝液(2mMエチレンジアミン四酢酸を含有するPBS中の5% v/v ウシ胎仔血清)中に再懸濁させた。細胞をu底96ウェル培養プレートに添加し、FACS緩衝液中の5µg/mlのヒトmAbとともに室温で1時間インキュベートした。細胞を、氷冷FACS緩衝液中で、400×gで5分間遠心分離することによって2回洗浄した。次いで、細胞を、Alexa Fluor 647ヤギ抗ヒト(H+L) (Invitrogen)とともに、暗所において室温で30分間インキュベートした。細胞を、氷冷FACS緩衝液中で、400×gで5分間の遠心分離によって2回洗浄した。細胞を100µlのFACS緩衝液に再懸濁させた。各フローサイトメトリーの実行前に、ヨウ化プロピジウムを2.5µg/mlの最終濃度に添加して、分析中の死細胞の除外を可能にした。細胞を、ヨウ化プロピジウムを添加した直後に、Canto IIフローサイトメーターにアプライした。各抗体-S2P-1273タンパク質の組み合わせについて10,000の事象を捕捉した。FlowJoソフトウェアをデータ分析のために使用した。

20

【0230】

30

材料実施例12

293T細胞で発現されたS2P-1273及びS2P.オミクロン.BA.1-1273糖タンパク質の様々な温度での処理後のウェスタンブロッティング。293T細胞を、FUGENE HD (Promega) を製造業者の説明書に従って使用して、S2P-1273及びS2P.オミクロン-1273発現ベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、10,000rpmで90秒間遠心分離し、ペレットを溶解緩衝液(1mMエチレンジアミン四酢酸を含有するPBS中の1% Triton X100)に氷上で30分間溶解した。溶解物を4℃、10,000rpmで10分間の遠心分離によって澄清化した。澄清化した溶解物を等体積に分け、1.2%(w/v) SDS及び0.25%(v/v) ベータメルカプトエタノールの最終濃度を含有するように調整した。試料を様々な温度で5分間処理し、5%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEに供した。タンパク質をiBLOT2システム(Thermo Fisher)を使用してニトロセルロースに移し、膜をPBS中の5%脱脂粉乳でブロックした。フィルターをウサギ抗S1ポリクローナル抗体(Sino Biological)及び抗ウサギIRDye 800CW (Odyssey)で探査した。次いで、フィルターをLICOREイメージャでスキャンした。

40

【0231】

組換えS2P.オミクロン-1208.H6タンパク質。オミクロンBA.1単離株のS残基16~1208(Hu-1付番システム)、フリン切断部位変異、H681RRAR→P681GSAS、並びに986位及び987位のジ-P_{ro}置換をコードする合成

50

遺伝子を、G S G S リンカー及び6 H i s タグをコードする合成DNA配列を用いて3'末端に付加して、S 2 P. オミクロン-1208. H6を得た。合成遺伝子は、Gene ART ThermoFisher Scientificから得た。S 2 P 遺伝子を、p c D N A 3 (I n v i t r o g e n) 内で、N h e I を介して組織プラスミノーゲンアクチベーターリーダーをコードするDNA配列の下流にライゲーションした。Gene ART ThermoFisher Scientificによって産生された変異S 2 P サブ断片をコードする合成遺伝子を使用して、S 2 P 発現ベクターに変異を導入した。

【0232】

S 2 P. オミクロン-1208. H6タンパク質の発現及び精製。S 2 P. オミクロン-1208. H6タンパク質は、Expifectamineを製造業者の説明書(ThermoFisher Scientific)に従って使用して、適切な発現ベクターを用いたExp i 2 9 3 F (E x p i 2 9 3 F) 細胞のトランスフェクションによって産生した。細胞を34℃で7日間培養し、その後、トランスフェクション上清を遠心分離及び0.45 µm ニトロセルロースフィルターに通す濾過によって細胞を取り除いた。次いで、S 2 P. オミクロン-1208タンパク質を、AKTApure装置(Cytiva)に連結されたHiTrap キレート化HP固定化金属アフィニティークラム(Cytiva)を使用して、二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。S 2 Pタンパク質は、イミダゾール濃度勾配を使用して溶離された。S 2 P. オミクロン-1208トリマーを、AKTApure装置(Cytiva)に連結されたSuperdex 200 16/600又はSuperose 6カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【0233】

実施例2-S 2 Pの特性評価

CMVプロモーター駆動発現ベクターを使用して、S残基16~1208、フリン切断部位変異、R⁶⁸²RAR->G⁶⁸²SAS、986位及び987位のジープロ置換を含む、S 2 P (W r a p p e t a l . , 2020) として知られているS糖タンパク質の可溶性形態を産生した。フォルドン、オクターHis、及びavitag配列をC末端に付加して、S 2 P-FHAを得た。二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによる部分精製後、S 2 P-FHAタンパク質のSECは、SEC及びSDS-PAGE (図2A及びB) によって示されるように、均質タンパク質として収集された、サイログロブリン(669 kDa)との主要なピーク共溶離を示した。精製S 2 P-FHAのビオチン化形態は、ELISAにおいて、hACE2-Fc (ヒトIgG1のFcドメインに結合したヒトACE2残基19~615) 及び様々なヒトmAbとの結合活性を示した(図2C)。熱蛍光アッセイは、S 2 Pタンパク質が比較的低い熱安定性を有し、43.6℃の融解温度を表すことを示した(図2D)。

【0234】

実施例3-熱安定性に対するAla空洞置換の効果

Ala1016/1020をよりかさのある疎水性残基(Val、Leu、Ile、Phe)に置き換えることの効果を、SARS-CoV-2 Sトリマーの安定性及び抗原性構造について評価した。(2つの実施例が図1Dに示される)。S 2 P-FHA及び二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによって部分的に精製した293F発現糖タンパク質において、アラニン1016及びA1020を、Val、Ile、Leu、及びPheによって単独で、及び二重で置換した。SDS-PAGEは、収率の範囲：S 2 P-FHA、1016V、1020V、1020I>1016/20VV、1016I、1020I、1016L、1020L、1016/20VI>1016/20II、1016/20LL、1016/20VL、1016/20VF、1016/20IF>1016/20FFを示した(図3A)。熱蛍光アッセイを使用して、S 2 P-FHA及び変異体の熱安定性を調べた。S 2 P-FHAは、43.6℃の融解温度を有する主な種、及び58℃の融解温度を有するより安定した少数の種を含んだ(図3B)。1016位への疎水性残基の置換は、A1016Lで58℃の種の割合を増加させ、最も安定化する変異で

ある。対照的に、 A^{1020} の置換で優勢な形態は、 43.6°C の種のままだった。二重置換は、 $1016/20VV$ を除いて、全て安定な形態に関連付けられた。

【0235】

代表的な変異体を均質にまで精製し、熱蛍光アッセイで再分析した（図4A～C）。部分的に純粋なタンパク質で得られた熱蛍光データは、精製したトリマーでほとんど再現された。変異体について、 43.6°C 形態と比較して、 58°C 形態の割合を増加することが、以下の変異体： $1016/20VI=1016/20II>1016L>1016V>S2P-FHA$ で観察された（図4C）。興味深いことに、この安定性の階層は、トリマー収率と逆相関していた（図4B）。図4Dは、非還元及び還元条件下でSDS-PAGEによって評価したときの精製したトリマーの純度を確認する。

10

【0236】

実施例4-A la 空洞変異体の抗原性特性

$1016L$ 及び $1016/20VI$ 変異体は、好都合な熱特性を示し、妥当な収率で精製することができる。したがって、それらの抗原性特性を、バイオレイヤー干渉法（BLI）でhACE2-Fc及び組換えヒト抗Sモノクローナル抗体（mAb）との結合を調べることによって、S2Pのものと比較した。hACE2-Fc及びmAbは、S2Pタンパク質が分析物相にある間、抗ヒトIgG Fc捕捉（AHC）バイオセンサーに結合された。測定可能なオフレートは、おそらく親和性効果に起因して、Sリガンドの大部分について明らかではなく、KD値を得ることを妨げた（図5A）。センソグラムの比較は、hACE2-Fc、並びにH4、B38、及びCB6などのS-ACE2相互作用を妨げるmAbにおいてS2P-FHAと比較して、 $1016L$ 及び $1016/20VI$ に対する全体的な結合能力に一連の低減を示した。この結合パターンはまた、RBDが「上向き」方向にあるときに曝露されるRBDの基部でのエピトープに対して指向されたmAbであるCR3022についても観察された。対照的に、結合における一連の増加が、RBDの外部にあるSにおけるエピトープに対して指向されたCOVA1-25に対して、それぞれ $1016L$ 及び $1016/20VI$ について観察された（図5A）。データは、30nMの分析物との会合の240秒後に観察された波長における変化を示すヒートマップ（図5B）に要約される。これらのデータは、 $1016L$ 及び $1016/20VI$ が、S内ではあるがRBDの外側にエピトープを曝露しながら、S2P-FHAトリマー内のRBD下向き立体構造を促進することを示唆する。

20

30

【0237】

実施例5-A la 空洞変異体の免疫原性

モルモットを使用して、A la 空洞変異がS2P-FHAトリマーに対する抗体応答の大きさ及び特異性に影響を及ぼすことができるか調べた。近交系モルモットをAddavaxアジュバント中の $30\mu\text{g}$ のS2P-FHA、 $1016L$ 、及び $1016/20VI$ で、0、4、及び14週目に免疫し、6及び16週目に採血を行った（図6A）。RBD、S1、及びS2P-FHA（Hu-1配列）タンパク質に対する抗体結合力価を、ELISAで16週目の血清について決定した。免疫原群間で有意差のないことが観察され、幾何平均結合力価は、 $1.3 \times 10^5 \sim 9.5 \times 10^5$ の範囲だった（図6B）。

【0238】

ワクチン血清における中和活性は、Jackson et al., 2020によって報告されているように、S-偽型HIVルシフェラーゼレポーターウイルス及び293-ACE2標的細胞を使用して決定された。S2P-FHA免疫原一致したS糖タンパク質（Hu-1）単離株を含有する偽型を使用した6週目及び16週目血清（それぞれ、第1及び第2のブースト後2週目に採血）の比較は、S2P-FHA-、 $1016L$ -、及び $1016/20VI$ -免疫血清における強力な中和活性を、6週目の血清では1,700～1,900、16週目の血清では6,000～9,100の範囲にある平均ID₅₀で示した。これらのデータは、第2のブースト後に平均中和ID₅₀の約3～5.4倍の増加に相当するが、S2P-FHA及び $1016/20VI$ -免疫血清では統計的有意性に達しなかった（図7）。次に、ベータ（B.1.351）VOC Sタンパク質を含有す

40

50

る偽型（Jackson, 2020 No. 20）に対する中和活性を評価した。S2P-FHA-及び1016L-免疫血清の平均中和能力は、ワクチン株（Hu-1）と比較して、ベータS偽型に対してそれぞれ3.7倍及び2.8倍低減したが、1016/20VI血清で観察されたわずか1.8倍の低減は統計的に有意でなかった。これらのデータは、1016/20VI免疫原が、ベータバリエーション変異の影響を受けないNAb特異性を誘発することを示唆する。ELISAを使用して、Hu-1及びベータバリエーションRBDとの血清の結合を比較し、後者は、K417N、E484K、及びN501Y（「NKY」）変異を含有した（図6C）。2つの抗原に対して結合能力に有意差が観察されず、S2P-FHA及び1016L血清による減少したベータバリエーション中和は、RBDにおけるNKY変異に対する感受性によって単純には説明できないことを示した。

10

【0239】

N439K、S477N、E484K、及びN501Yを含む、主な懸念されるバリエーション（VOC及びVOI）に観察された個々の変異を有するS偽型に対するワクチン血清の中和活性を次に評価した。これらの変異は、パンデミック分離株の大多数に存在するD614Gと組み合わせられ、血清は、D614Gに対する中和能力の全体的な増加を示し、1016/20VIではN439K、S477N、及びN501Yの付加で大部分が保持された（図8）。興味深いことに、変異体に対する中和能力の減少は、Hu-1 S偽型と比較して明らかではなかった。したがって、S2P-FHA及び1016L血清で観察されたベータバリエーション偽型に対する中和能力における低減は、このバリエーションに存在する個々の成分変異に帰することができなかった。

20

【0240】

実施例6-抗体応答の特異性

ワクチン接種した動物における抗体応答の特異性の理解を得るために、血清モノクローナル抗体交差-競合アッセイを用いた。ストレプトアビジンコーティングELISAプレート上に捕捉されたビオチン化S2P-FHAを、飽和量以下のヒトモノクローナル抗体及び希釈系列の血清を含む混合物とともにインキュベートした。アッセイは、抗ヒトF(ab')₂-HRP及びTMBを用いて開発された。データ（図9A及びB）は、S2P-FHA、S2P-1016L-FHA、及びS2P-1016/20VI-FHAが、ACE2結合部位（CB6、B38、及びCOVA2-15）に対して指向されたACE2-Fc及びNAb、NTDに対して指向されたNAb（COVA1-22）、並びにSにおける非RBD、非NTDエピトープに結合するCOVA1-25によって、S2P-FHA結合をブロックすることができる抗体特異性を誘発するほぼ同等の能力を有したことを示す。3つの免疫原群からの血清はまた、RBD下向き立体構造で隠されるRBDの基部に対して指向された非中和抗体であるCR3022に対してブロック活性を示した。データは、3つの免疫原が、ACE2結合部位、NTD、並びにRBD及びNTDの外側のSにおける未定義のエピトープに対して、中和抗体を誘発する類似の能力を有することを示す。これらのデータはまた、3つの免疫原が、ACE2bと重複するエピトープに対して指向された抗体を誘導する類似の能力を有することを、この部位が1016L及び1016L/20VIで少なく曝露されるとみなされるBLI実験での結果にもかかわらず示す。

30

40

【0241】

実施例7-前臨床評価

安定化スパイクブースターmRNAワクチンの前臨床評価は、モルモットで行われる。1群当たり10匹のモルモットの3群は、mRNAスパイクワクチンレジメンを模倣するために、最初に2用量の祖先スパイクをコードするmRNAが3週間隔で与えられる。代替的に、1群当たり10匹のモルモットの3群は、AstraZenecaワクチンレジメンを模倣するために、2用量の祖先スパイクをコードするアデノウイルス5を12週間隔で受ける。モルモットは、1) 祖先スパイク、2) 新規安定化スパイク、又は3) プラセボをコードするmRNAでブーストされる。血清中和及びスパイクタンパク質結合（RBD及びスパイクトリマー）は、ブースト後14及び28日で決定される。血清中和アッ

50

セイは、スパイク-HIVシフェラーゼレポーターシステム (Jackson et al., 2020) を用いて行われ、VOCに由来するスパイクタンパク質を含む。スパイク結合をELISAで決定し、VOCに由来するスパイクタンパク質を分析に含める。
【0242】

実施例8—ユニバーサルブースターmRNAワクチンの第I相安全性及び免疫原性治験

第I相臨床試験を行って、ブースターワクチン候補 (mRNA及びアデノウイルスベクター) の安全性及び有効性を評価する。各ワクチン候補は、ランダム化、二重盲検プラセボ対照臨床試験によって試験される。治験参加者は、募集時点の少なくとも6ヶ月前に、現在の2用量Pfizer (mRNAワクチン) 又はAstraZeneca (アデノウイルスベクターワクチン) の全過程をすでに受けている18~85歳である。mRNA安定化スパイクブースター治験における参加者は、4つの群: プラセボ、及び30ugのmRNA安定化スパイクワクチン (現在のBioNTech-Pfizerワクチン化レジメンに基づく用量) に割り当てられる。目的は、プラセボ群に10人、ブースターワクチン群に少なくとも20人 (合計で少なくとも60人) を有することである。主要評価項目は、1) ブースターワクチン又はプラセボを受けた後7日以内に生じた局所反応、全身事象、及び解熱剤又は鎮痛剤の使用、2) ブースターワクチンを受けた後6ヶ月までに評価された望ましくない有害事象及び重篤な有害事象、3) ブースターワクチンを受けた1日後及び7日後に評価された臨床検査異常、4) ベースラインとワクチン投与1日後及び7日後との間の検査評価における等級変動である。治験実施計画書に指定された安全停止規則は、全ての参加者に対して有効となる。副次的評価項目は、ブースト後7、14、28、180、及び365日に決定される血清中和及びスパイクタンパク質結合 (RBD及びスパイクトリマー) である。血清中和アッセイは、Spike-HIVシフェラーゼレポーターシステム (Jackson et al., 2020) を用いて行われ、VOCに由来するスパイクタンパク質を含む。スパイク結合をELISAで決定し、VOCに由来するスパイクタンパク質を分析に含める。

【0243】

実施例9—S2P-FHAは、従来のmRNA及びアデノウイルスワクチンと比較して、祖先株 (祖先株Hu-1) 及びベータバリエント (B. 1. 351) に対する増強した応答を有する

偽ウイルス中和ID50試験を行って、S2P-FHA1016/20VIスパイクタンパク質に対して生成されたワクチン応答と、従来のワクチンを使用してヒトにおいて生成されたワクチン応答とを比較した。モルモットにおける3用量のS2P-FHA1016/20VIタンパク質ワクチンを、ヒトに与えた2回用量のmRNA又はアデノウイルスワクチンと比較した。S-HIV偽型アッセイで使用したS遺伝子型を、グラフの下に示す。データは、ヒトにおける2用量の従来のワクチン (右側に例示的な従来のワクチン (従来のワクチン) の3~5週間後に得られた血清と比較して、1016/20VI (左側のBurnet VIspike) を含有するS2P-FHAタンパク質トリマーでワクチン接種したモルモットからの一致したWTウイルス及び高耐性の懸念されるバリエント (ベータバリエント) に対する中和抗体応答を示す。ウィルコクソン符号順位検定を使用して、群間で観察されたID50における差が有意か決定した: nsは有意でない、 $P \geq 0.05$ 、****は $P < 0.0001$ 。図14に示されるように、S2P-FHA1016/20VIは、祖先株及びベータVOCの両方に対して従来のmRNA及びアデノウイルスワクチンよりも高い中和抗体応答を生じる。S2P-FHA1016/20VI抗原は、一次ワクチンレジメン (SARS-CoV-2に対する対象における免疫応答を生じるために使用される第1のワクチンレジメン) 及びブースターワクチンレジメンの両方に望ましい中和抗体プロファイルを生じる。ブースターワクチンは、例えば、祖先株に対する応答、祖先株に対する低い応答、VOCに対する低い免疫応答、及びベータVOCに対する低い免疫応答のうちの1つ以上を生じている、一次ワクチンレジメンを受けている対象において使用され得る。

【0244】

実施例 10－実験動物における S2P-FHA、S2P.1016L-FHA、及び S2P.1016/20VI-FHA トリマー免疫原によって誘発される血清抗体の特性

ビオチン化 Hu-1、デルタ、及びオミクロン BA.1 RBD を捕捉するためにプレート結合アビジンを用いる捕捉 ELISA 方式を使用して、ワクチン血清の RBD 結合力価を決定した。デルタ (B.1.617.2) VOC は、2020 年 10 月に出現し、支配的な世界的バリエーションになった。RBD には、L452R 及び E484Q という 2 つの顕著な変異が存在する。南アフリカ及びボツワナで最初に特定されたオミクロン (B.1.1.529) (2021 年 11 月) は、ほとんどの国でデルタバリエーションに取って代わっている。オミクロンは、2021 年に出現した少なくとも 3 つの遺伝子的に異なる亜系統 (BA.1、BA.2、及び BA.3) からなる。当初、BA.1 が最も一般的な流行型であったが、より感染性の高い BA.2 バリエーションが現在優勢になってきている。スパイクに 30 個の変異が、RBD に 15 個、NTD に 8 個を含めて生じ、これらは中和の主要な部位を含有する。図 15A は、 $3.5 \times 10^5 \sim 1.36 \times 10^5$ の範囲の幾何平均結合力価を有する免疫原群間に有意差のないことを示す。3 つの免疫原群について、オミクロン BA.1 RBD では小さい (約 3 倍) が有意な結合力価の低減が観察された。ELISA プレートに直接結合した Hu-1、デルタ、及びオミクロン BA.1 S2P-FHA スパイクタンパク質トリマーとの血清結合力価を次に決定した。図 15B は、3 つの免疫原群について、3 つの S2P-FHA トリマーバリエーションとの結合力価に有意差がないことを明らかにする。S2P-FHA 結合力価は、 $3.0 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ の範囲だった。これらの結果は、全ての免疫原が、S2P-FHA スパイクトリマーに結合することができる類似の抗体力価を生成したことを示唆する。

10

20

【0245】

ワクチン血清における中和活性は、次に Jackson et al. 2020 によって報告されているように、S-偽型 HIV ルシフェラーゼレポーターウイルス及び 293-ACE2 標的細胞を使用して決定された。S2P 免疫原一致した Hu-1 スパイク糖タンパク質又はデルタのものを含む偽ウイルスは、S2P-FHA、1016L、及び 1016/20VI 免疫血清における強力な中和活性を示し、 $3,900 \sim 5,100$ の範囲にある平均 ID₅₀ を有した (図 16A)。オミクロン BA.1 又はベータスパイクを含む偽ウイルスに対する血清中和活性は、Hu-1 及びデルタ偽ウイルス中和と比較して有意な差はなかったが、オミクロン BA.1 偽ウイルスに対する IC₅₀ は下方傾向があり、3 つの群で観察された平均力価の < 3 倍の低減を有した。

30

【0246】

次に、Aggarwal et al. 2021 によって開発された R-20 マイクロ中和アッセイにおいて、HAT-24 細胞を使用して、Hu-1、デルタ、オミクロン BA.1、及びベータ SARS-CoV-2 の真正な感染性ウイルスに対する中和活性を試験した。Hu-1 及びデルタウイルスは、3 つの免疫原群からの血清によって強力に中和されたが、オミクロン BA.1 及びベータウイルス中和は、約 $1 \log_{10}$ だけわずかに低減した (図 16B)。図 17 は、ELISA (RBD 及びスパイクトリマー)、偽型ウイルス中和、及びマイクロ中和アッセイにおいて得られた全ての幾何平均力価の要約を示す。全体として、データは、3 用量の S2P-FHA、S2P.1016L-FHA、及び S2P.1016/20VI-FHA が、一致した祖先 Hu-1 スパイクを含む HIV 偽ウイルス、並びにデルタ、オミクロン BA.1、及びベータ VOC からのスパイクを担持する偽ウイルスを強力に中和することができる、RBD 及び S トリマーに対する高力価抗体を誘発することを示す。高い中和力価はまた、真正の感染性 SARS-CoV-2 でも観察されたが、ID₅₀ における中度の約 $1 \log_{10}$ の低減がオミクロン BA.1 及びベータバリエーションで観察された。

40

【0247】

実施例 11－アラニン空洞における変異が、高度に分岐した SARS-CoV-2 配列に由来するスパイクトリマーに導入されたときに、全般的な安定化効果を有するかの評価

Hu-1 の祖先配列と比較した場合、オミクロン BA.1 スパイクに 30 個の変異が生

50

じ、N末端ドメイン（NTD）に8個、RBDに15個有する（Jung et al. 2022）。NTD及びRBDは、主な中和エпитープを含有し、これら2つのドメインにおける複数の変異の存在と一致し、mRNA二重ワクチン接種した個体から得られた血清は、インビトロでオミクロンBA.1ウイルスに対する非常に低い中和活性を保持し（Tada et al. 2022）、オミクロン感染に対する低いワクチン有効性に対応する（Andrews et al. 2022）。

【0248】

オミクロンBA.1スパイクに存在する変異（祖先Hu-1と比較して）は、以下である：

NTD：A67V；H69-V70の欠失；T95I；G142D；delV143-Y145；211の欠失；L212I；残基214の後のEPEの挿入；

RBD：G339D；S371L；S373P；S375F；K417N；N440K；G446S；S477N；T478K；E484A；Q493R；G496S；Q498R；N501Y；Y505H；

S1のC末端領域：T547K；D614G；H655Y；N679K；P681H；

S2：N764K；D796Y；N856K；Q954H；N969K；L981F

【0249】

アラニン空洞における変異が、高度に分岐したVOC配列に由来するスパイクトリマーに導入されたときに全般的な安定化効果を有するか決定するために、S2P-FHA及びS2P.1016/20VI-FHA構築物のオミクロンBA.1型を調製し（図24、25における配列）、ここではそれぞれS2P.オミクロン-FHA及びS2P.オミクロン.VI-FHAと称される。S2P.オミクロン-FHA配列は、S残基16~1208の上流にある組織プラスミノゲンアクチベーターリーダー配列、フリン切断部位変異、H681RRAR→P681GSAS、986位及び987位のジPro置換を含む。フォルドン、オクターHis、及びavitag配列をC末端に付加した。DNA配列をCMVプロモーター駆動発現ベクターにクローニングし、タンパク質をトランスフェクションによってExp i293F細胞に発現させた。

【0250】

タンパク質を、二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から抽出し、Superose6 SECによって更に精製した。S2P.オミクロン-FHAは、サイログロブリン（669kDa）の位置に近い主ピークとして溶離され（図18A、上）、Hu-1分離株に由来するS2P-FHAのプロファイルとほぼ同じプロファイルを有した（図18A、下）。分析SECによって示されるように、トリマーを均質タンパク質として収集した（図18B）。4つの種として溶離されたS2P.オミクロン.VI-FHAは、しかしながら、顕著な推定されたトリマーピークが観察された（図18A、中央の破線枠によって示される）。トリマーに対応する画分（図18Aの破線枠）をプールし、濃縮し、Superose6カラムで再クロマトグラフィーして、トリマーに対応する大部分均質な種を明らかにした（図18B、図18C、上）。

【0251】

熱蛍光アッセイは、S2P.オミクロン-FHAトリマーが、61℃の融解温度で比較的高い熱安定性を有することを示した（図18C、上）。Hu-1に由来するS2P-FHAは、43℃の融解温度を有し（図18C、下）、図4Cと一致した。S2P.オミクロン.VI-FHAでは、熱アンフォルディングは観察されなかった（図18C、中央）。

【0252】

精製したS2P.オミクロン-FHA及びS2P.オミクロン.VI-FHAトリマーを、非還元及び試料沸騰を伴わない還元（1%ベータメルカプトエタノール）条件下で、SDS-PAGEによって更に分析した（図18D）。S2P.オミクロン-FHAトリマーは、還元剤の存在及び非存在の両方で、約160kDaの予想されたモノマー分子量

に大部分が分解された。対照的に、主要な S 2 P・オミクロン・V I - F H A 種（矢印で示される）は、ゲルの上部に近接して移動する高分子量種として保持され、少ない種もモノマー位置で観察された。図 1 8 E は、電気泳動の前に試料を 5 ' のために沸騰させた反復実験を示す。非還元条件下で、図 1 8 D に示される結果は、再度観察された高分子量の主要な S 2 P・オミクロン・V I - F H A 種で大部分再現された。しかし、還元剤の存在下で沸騰させると、この種はそのモノマー分子量に分解された。データ（図 1 8 E）は、S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマーが、2 5 ° C で 1 % のベータメルカプトエタノールの添加及び無添加で、0 . 8 % w / v ドデシル硫酸ナトリウム変性剤による破壊に耐えることを示唆する。データは更に、S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマーが、沸騰後の 0 . 8 % w / v ドデシル硫酸ナトリウム変性剤による破壊に耐えることを示唆する。S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマーは、0 . 8 % w / v ドデシル硫酸ナトリウム変性剤及び 1 % ベータメルカプトエタノールの両方の存在下で沸騰した後にのみ、モノマーに分解される。データは、S 2 のアラニン空洞への V I 変異の付加が、S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマーに超安定性を付与し、トリマー構造がより大きな変性力に耐えることを可能にすることを示唆する。

10

【 0 2 5 3 】

サイログロブリンをビス（スルホスクシンイミジル）スプレートと共有結合させて、S トリマーのものに近い、6 6 9 k D a の理論上の m o l . w t を有する S D S - P A G E マーカーを得た。図 1 8 F は、架橋されたサイログロブリンが、電気泳動前に、0 . 8 % S D S を用いて 2 5 ° C 若しくは 1 0 0 ° C で 3 分間、又は 0 . 8 % S D S + 1 % ベータメルカプトエタノールを用いて 2 5 ° C で 3 分間処理した後、S D S / ベータメルカプトエタノール耐性高分子量形態の S 2 P・オミクロン・V I - F H A と共移動したことを示す。再度、S 2 P・オミクロン・V I - F H A は、0 . 8 % S D S + 1 % ベータメルカプトエタノール中で沸騰した後、モノマーとして分解された。S 2 P・オミクロン・F H A 及び S 2 P - F H A タンパク質は、1 % S D S を用いて 2 5 ° C で処理した後、いくつかの残留トリマー S 2 P - F H A を除き、全ての処理後にモノマーとして移動した。

20

【 0 2 5 4 】

ビオチン化 S 2 P・オミクロン・F H A 又はビオチン化 S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマー（図 1 9、それぞれ左パネル及び右パネル）を捕捉するためにプレート結合したストレプトアビジンを用いる捕捉 E L I S A を使用して、これらのタンパク質が立体構造依存性 N A b によって認識され得るか決定した。データは、R B D 指向性 N A b である C O V O X 2 2 2、S 2 H 9 7、及びより少ない程度ではあるが、S 2 E 1 2 及び C O V A 2 - 1 7 が、同様の活性を有する 2 つのタンパク質に結合したことを示す。結合はまた、S 2 に対する N A b である C V 3 - 2 5、N T D に対する C O V A 1 - 2 1、及び非 R B D 指向性 N A b である C O V A 1 - 2 5 及び C O V A 1 - 2 2 によって観察された。H C 3 3 . 1 は、陰性対照として機能する C 型肝炎ウイルス N A b である。データは、S 2 P・オミクロン・V I - F H A トリマーが、S 2 P・オミクロン・F H A でも観察される立体構造依存性 N A b エピトープを保持することを示す。

30

【 0 2 5 5 】

祖先 H u - 1 S A R S - C o V - 2 配列及びここで操作された懸念されるバリエーションの配列を使用して操作された S 2 P - F H A は、文献（W r a p p e t a l . 2 0 2 0）に報告されている可溶性 S トリマーと同じように、トリマー構造を安定化する C 末端三量体化モジュールを含有する。このモジュールは、通常、バクテリオファージ T 4 フィブリチンのトリマーフォールドドメインである（図 2 0 A）。N M R 試験によって、天然膜貫通ドメインが、脂質二重層に埋め込まれた三本鎖コイルドコイルである可能性が高いことが示されている。三量体化タグの非存在下での H u - 1 S 外部ドメインのオリゴマー化状態を決定するために、H u - 1 S 2 P を外部ドメインの最後の残基 Q 1 2 0 8 で切断して、S 2 P - 1 2 0 8 . H 6 を得た（図 2 0 A、配列については図 2 6 及び 2 7 を参照）。対応する 1 0 1 6 / 2 0 V I 変異体である S 2 P . V I - 1 2 0 8 . H 6 も調製した。両方のタンパク質は、精製を容易にするために C 末端に 6 H i s タグを有し、H 6

40

50

で示される。タンパク質を293FS細胞に発現させ、次いで、二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによって上清から抽出した。Superose6 SECは、Hu-1 S2P-1208・H6が、S2P-FHAのトリマー構造とは対照的にダイマーとして溶離されたことを明らかにした(図20B、上部2パネル)。対照的に、Hu-1 S2P・VI-1208・H6では、トリマー及びダイマーがおおよそ等しい量で観察された(図20B、第3のパネル)。S2P・VI-1208・H6トリマーの精製を可能にするために、タンパク質をExp293F細胞に発現させ、HiTrap二価カチオン装填カラムからイミダゾール勾配で溶離した。Superose6 SECは、S2P・VI-1208-H6について顕著なトリマーピークを示した(図20B、第4のパネル)。

10

【0256】

熱蛍光アッセイは、Hu-1 S2P-FHAトリマー及びS2P-1208・H6ダイマーが43℃の融解温度を有し、一方、S2P・VI-1208・H6が、それぞれ43℃及び58℃の融解温度を有する2つの種を含んだことを示した(図20C)。非還元及び還元条件下のSDS-PAGEは、タンパク質調製物が高純度であり、0.8% SDS並びに1%ベータメルカプトノールの添加及び無添加での沸騰でモノマーに変性され、それらが非ジスルフィド結合トリマーであることを示した(図20D)。これらのデータは、1016/20VI変異がS2Pトリマーに十分な安定性を付与し、三量体化タグの必要性を排除し、精製S2Pオリゴマーに熱安定性を付与することを示す。

20

【0257】

天然膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を含有する全長S2Pの状況における1016/20VI変異の効果を調べた。Hu-1、デルタ、及びオミクロンBA.1に由来するS糖タンパク質の残基1~1273をコードするコドン最適化遺伝子を含有するCMV駆動発現ベクターを調製した。フリン部位におけるR/H681RRAR→P681GSAS変異並びに986位及び987位のジ-Pro「2P」置換も含まれた。S2P-1273の概略図について図21Aを参照し、タンパク質及びDNA配列について、図28-33を参照されたい。

【0258】

Hu-1、デルタ、及びオミクロンBA.1 S2P-1273糖タンパク質及びその1016/20VI変異体(S2P・VI-1273)の発現を実証するために、DNAベクターを293T細胞にトランスフェクトした。細胞を溶解し、溶解物をSDS-PAGE及びウサギ抗S1ポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティングに供した。図21Bは、各構築物について単一の約180kDaのタンパク質バンドを示し、未切断Sモノマーについて予想されるものと一致する。空ベクター(pcDNA3)によるトランスフェクションは、かかるバンドを生じさせなかった。

30

【0259】

フローサイトメトリーを使用して、Hu-1、デルタ、並びにオミクロンBA.1 S2P・1273及びS2P・VI-1273糖タンパク質が細胞表面で発現され、重要な中和エピトープに対して指向されたヒトモノクローナル抗体によって認識されることを実証した。293T細胞を様々なS2P-1273発現ベクターでトランスフェクトし、インタクト細胞を様々なヒトモノクローナルNAb及びAlexaFluorコンジュゲート化抗ヒト免疫グロブリンで染色した。細胞をヨウ化プロピジウムで対染色して、分析から死細胞を除外することを可能にした。図22におけるヒストグラムは、発現された全てのS2P-1273糖タンパク質が、同様のレベルでACE2-Fcに、また試験されたモノクローナルNAbの大部分に結合することを示す。アイソタイプ対照HCV特異的抗体(HC33.1)は、結合しないことを示した。例外はCB6であり、オミクロンスパイクに結合しなかったが、COVA1-03は、デルタスパイクに最小限の結合を示した。これらのデータは、S2P-1273糖タンパク質が細胞表面で発現され、それらはACE2受容体に結合する能力があり、多様なNAbエピトープを保持することができることを示す。

40

50

【0260】

図22に示されるデータは、ゲーティングを使用して更に分析して、非蛍光性（n i l）、中度（l o）蛍光性、及び高度（h i）蛍光性の細胞集団を区別した（図23A）。S2P-1273の状況におけるV I変異の導入は、A C E 2受容体結合能力も、C O V O X 222によって認識されるR B Dにおける広く中和するエピトープ、若しくはC V 3-25によって認識されるS2内のエピトープの曝露も変化させなかった（図23B）。しかしながら、V Iは、H u - 1祖先、デルタ、及びオミクロンB A . 1単離株に由来するS2P-1273における、広範囲に中和する抗体S2H97、C O V A 2-17、及びC O V A 1-21によって認識されるエピトープの曝露を増加させた。したがって、1016 / 20 V I変異は、単離株依存的手段でb N A bエピトープの曝露を選択的に増強する。

10

【0261】

実施例12-H u - 1及びオミクロンB A . 1に由来する全長S2P-1273及びS2P-1208の安定性における1016 / 20 V I変異の効果

H u - 1及びオミクロンB A . 1（それぞれ、S2P-1273及びS2P-オミクロン-1273）に由来し、293T細胞で発現された全長S2P-1273（天然膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を含有する）の安定性における1016 / 20 V I変異の効果を調べた。細胞溶解物を、1.2%（w / v）S D S及び0.25%（v / v）ベータメルカプトエタノールの最終濃度を含有するように調整し、S D S-P A G E及びウサギ抗S1ポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティングの前に、示される温度で処理した。モノマー及びトリマーの位置をそれぞれ示すために、電気泳動の前に、0.67% S D Sを用いて室温で5分間処理した精製S2P-オミクロン-F H AトリマーのA A及びV I型（図18Fと同様に）を含めた。図38は、それぞれ、レーン2及び3における顕著なS2P-オミクロン-F H Aモノマー及び推定されるS2P-オミクロン、V I-F H Aトリマーバンドを明らかにする。S2P-1273の場合（図38、左パネル）、1016 / 20 V I変異が存在するとき、55℃、70℃、及び85℃での処理後に推定されたトリマーが観察されるが、このバンドは、1016位及び1020位にA l aを含有するS2P-1273には存在しない。トリマーバンドは、100℃で処理した後には存在せず、解離を示唆している。S2P-オミクロン-1273トリマーは、1016 / 20 V Iが存在するかどうかにかかわらず、55℃、70℃及び85℃の処置に耐性であるようにみえたが、1016 / 20 V Iではわずかに多いトリマーが観察された（図38、右パネル）。これらのデータは、H u - 1に由来するS2P-F H Aと比較して、S2P-オミクロン-F H Aについて観察されたより高い全体的な熱安定性と一致する。データは、V I変異が、可溶性S2P-F H Aトリマーで観察したように、S2P-1273トリマーに安定性を付与することを示唆する。データはまた、オミクロンB A . 1に由来するS2Pトリマーが、H u - 1 Sトリマーよりも全体的により高い安定性を表すことを示す。

20

30

【0262】

次に、フォルドン三量体化ドメインを欠いているオミクロンB A . 1配列に由来するS2P-1208、H6の三量体化及び安定性におけるV Iの効果。外部ドメインの最後の残基であるQ1208で切断されたS2P-オミクロンをC末端でG S G S-H6に付加して、S2P-オミクロン-1208、H6を得て調べた。対応する1016 / 20 V I変異体であるS2P-オミクロン、V I-1208、H6も調製した。タンパク質をE x p i 293F細胞で発現させ、次いで、二価カチオンアフィニティークロマトグラフィーによって上清から抽出した。S u p e r o s e 6 S E Cは、両方のタンパク質が主にトリマーとして溶離されたことを明らかにした（図39A）。精製したトリマーを、凍結（-80℃）-融解サイクルの後にS u p e r o s e 6 S E Cによって再分析し、約15%のS2P-オミクロン-1208、H6タンパク質が二量体に解離していたことを明らかにした。対照的に、S2P-オミクロン、V I-1208、H6のトリマー構造は保持された（図39B）。熱蛍光アッセイは、精製したS2P-オミクロン-1208、H6

40

50

の大部分が 41℃の融解温度を有し、一方、S2P・オミクロン・V1-1208・H6 トリマーの融解温度は、64℃ではるかに高かったことを示した（図39C）。SDS-PAGE / クーマシーブルー染色は、S2P・オミクロン-1208・H6 タンパク質の純度が100%に近づいたことを示した（図39D）。これらのデータは、オミクロンBA・1外部ドメインの状況におけるV1変異が、非常に安定した可溶性トリマーを得ることを可能にし、それによって、トリマー構造を維持するための外因性三量体化ドメインの必要性を排除することを示した。

【0263】

実施例13・Hu-1及びオミクロンBA・1に由来するS2P-FHAトリマーにおける、広範に中和するヒトmAb及びACE2-Fcによって認識されるエピトープの曝露に対するV1の効果

次に、バイオレイヤー干渉法を使用して、Hu-1及びオミクロンBA・1に由来するS2P-FHAトリマーにおける、広範に中和するヒトmAb及びACE2-Fcによって認識されるエピトープの曝露に対するV1の効果を比較した。ACE2-Fc及びmAbを、S2Pトリマーが分析物相にある間、抗ヒトIgG Fc捕捉バイオセンサーに付着させた。センソグラムの比較は、S2P-FHAと比較して、Hu-1由来のS2P・V1-FHAによるRBD指向性リガンド（ACE2-Fc、S2E12、S2H97、及びCOVOX222）との全体的に減少した結合を示した（図40A）。対照的に、RBDリガンドとの結合におけるこのV1依存的減少は、S2P・オミクロン-FHAについては明らかではなかった（図40B）。Hu-1及びオミクロンBA・1由来のS2P-FHAタンパク質は、V1の有り及び無しでCOVA1-25に同じ程度に結合し、RBDの外側のエピトープを認識する。CV3-25は、S2ステム領域内のエピトープに結合し、他のタンパク質と比較してS2P・V1-FHAとの減少した結合を示し、V1がHu-1の状況においてエピトープを部分的に妨げるが、オミクロンBA・1は妨げないことを示す。これらのデータは、1016/20V1が、Hu-1 S2P-FHAトリマーにおけるRBD下向き立体構造を促進するが、オミクロンBA・1-FHAトリマーでは促進しないことを示唆する。したがって、V1は、RBD内の主要な広範な中和エピトープの曝露も維持するS2P・オミクロントリマーを安定化する。オミクロン株変異は、出現株において広く表される可能性が高いため、結果は、出現株に効果的な免疫を提供する本明細書に開示される改変抗原の使用を支持する。

【0264】

例14-結果要約

SARS-CoV-2及びSARS-CoV融合前トリマーの中心にあるコイルドコイルは、Leu1012と一緒に内向きのIle1013によって媒介される接触点から互いに離れて拡張する3つの弓状ヘリックスによって形成される。3~4反復の残分は、わずかなヘリックス間接触を媒介する極性残基で主に構成される。本発明者らは、この極性トポロジーが、融合前トリマーの比較的低い熱安定性に関与する可能性があると考えた（本明細書に記載の試験では、43.6℃まで観察された）。SARS-CoVは呼吸器病原体であり、20.5~35.5℃の範囲のこれらの複製部位における低体温は、スパイクトリマーがその構造及び機能を持続的手段で維持することを可能にし得る。しかしながら、筋肉内ワクチン接種を用いる場合のように、より高い体温への曝露は、経時的にトリマースパイクの不安定化及び立体構造の喪失につながり、免疫原性を損なう可能性がある。

【0265】

クラスI融合タンパク質のそれらの融合前状態における固有の不安定性を構造ベースの設計を通して克服する取り組みは、HIV-1、エボラ、呼吸器合胞体ウイルス、ラッサウイルス、ヒトメタニューモウイルス、コロナウイルスに広く採用されている。以前の試験では、中央コイルドコイル形成ヘリックスCH1と7残基反復1との間のヒンジループ内の2つのプロリン残基の導入が、SARS-CoV及び中東呼吸器症候群ウイルス（MERS）のSタンパク質を安定化し、受容体結合又は抗原性を失うことなく、融合前ト

リマー立体構造を安定化したことが見出された。SARS-CoV-2スパイクの場合、融合前安定化は、S2-P変異の導入及びArg682ArgAlaArgフリント切断部位の消失(Wrapp et al., 2020)によって達成され、後者はSARS-CoVにもMERSスパイクにも存在していない。現在のヒトSARS-CoV-2ワクチンは、親S配列(Oxford/AstraZeneca(Watanabe et al., 2021))又はS-2P/フリント変異体(BioNTech/Pfizer, Johnson and Johnson(Bos et al. 2020, Vogel et al., 2021))又はインタクトフリント部位を有するS2P(Moderna(Jackson et al., 2020))のいずれかを含有する。本明細書に記載の実験は、S2Pトリマーが、CH1ヘリックスのS2コイルドコイルの中心に人工疎水性コアを作製することによって、更に安定化され、増強した安定性及び抗原性機能を示すことができることを実証する。一実施形態では、人工疎水性コアは、Ala1016及びAla1020をよりかさのある疎水性残基で置き換えて、これらの残基に関連する空洞を補充することによって生成することができる。Ala1016の変異誘発(残基をより疎水性の残基で置き換える)、A1016Lを用いた43.6℃から58℃の種にシフトした融解温度は、最も高い割合の58℃の種を与える。対照的に、43.6℃の種は、Ala1020の置換で優勢な形態のままだった。二重置換は、1016/20VVを除いて、全てより安定な形態に関連付けられた。興味深いことに、増加した熱安定性は、時には減少した可溶性S2P-FHA発現に関連付けられ、最低収率は、1016/20II、1016/20LL、1016/20VF、1016/20IF、及び1016/20FFで得られた。1016L及び1016/20VI変異体は、空洞を補充するために選択された側鎖のかさ及び/又は形状がS2Pトリマーのフォルディングに影響を与えることができ、いくつかの側鎖はフォルディングにより好都合な効果を有することを示唆する高い収率を生じた。オミクロンBA.1 VOCの場合、1016/20VI変異は、0.8% SDSの存在下での沸騰、又は0.8% SDS+還元剤ベータメルカプトエタノールへの周囲温度での曝露などの厳しい変性条件に対してS2P-FHAトリマーを安定化し、超安定なS2Pトリマーと一致した。データは、S2のCHコイルドコイルの中心における人工疎水性コアの作製が、安定性及び発現を改善することを示す。これらの変異は、既知の安定化変異、例えば、S-2P及びフリント部位の変異と組み合わせて、コロナウイルスのスパイクタンパク質ワクチンの生物物理学的特性を増強することができる。

10

20

30

【0266】

安定化する1016L及び1016/20VIは、Hu-1 SARS-CoV-2スパイクトリマーの抗原性に測定可能な効果を有した。バイオレイヤー干渉法によって、ACE2細胞外ドメイン及びRBD-ACE2相互作用をブロックするモノクローナル抗体は、1016L及び1016/20VI S2Pトリマーとの低減した結合を有したことが明らかになり、RBD下向き立体構造が誘導されていたことを示唆した。逆に、RBDの外部であるSのエピトープに対して指向されたCOVA1-25は、1016L及び1016/20VI S2Pトリマーとの改善した結合を示し、Sにおけるこのドメインの増強した曝露を示唆した。RBD方向における安定化変異のこれらの効果は、アロステリック性を介して生じる可能性が高く、それによってコイルドコイルの形状又は立体構造に対する変化がトリマー構造を介して遠隔のRBDに伝達される。S2Pトリマーの状況におけるRBD方向に対するこれらの変化は、ここで検討された3つの免疫原によって誘導されたRBD、S1、又はS2Pトリマー指向性抗体力価における差にならなかった。更に、S2P-FHA、1016L、及び1016/20VIトリマーは、2回のワクチン接種後に、株の一致したHu-1スパイクとともにパッケージングされた偽型に対して匹敵する高いNAb力価を生成し、これは、3回のワクチン接種によって更に増強された。しかしながら、変化した抗原性ランドスケープと一致して、1016/20VI免疫血清は、ベータ/B.1.351 Sバリエント偽型に対する中和能力を保持したが、この活性は、S2P-FHA及び1016L誘発血清では有意に減少した。1016/20Lのこれらのデータは、BioNTech/Pfizer、Moderna、又はOxford

40

50

d / AstraZeneca ワクチンでワクチン接種されたヒトからのヒトワクチン血清で得られたものと比較して、ベータ / B. 1. 351 に対する中和力価が 7. 6 ~ 42 倍減少することを示す (Dejnirattisai et al., 2021, Garcia-Beltran et al., 2021)。ベータバリエントは、アルファ / B. 1. 1. 7、ガンマ / P. 1、及びデルタ / B. 1. 617 を含む他の VOC と比較したとき、自然感染又はワクチン接種によって誘発される NAb に対して最大の耐性を表すことが示されている (Dejnirattisai et al., 2021, Garcia-Beltran et al., 2021, 18, 21, Hoffmann et al., 2021)。S2P-FHA、1016L、及び 1016 / 20VI で観察されたベータ / B. 1. 351 バリエント中和能力における差は、Hu-1 RBD 又はベータ / B. 1. 351 変異 K417N、E484K、N501Y を含有する RBD-NKY との結合における差には反映されなかった。これらのデータは、S2P ワクチンが、ベータ / B. 1. 351 VOC で変異した主要残基を含有するエピトープを標的としない、RBD 指向性抗体特異性を誘発することを示す。更に、血清中和能力は、VOC に存在する選択された個々の変異によって影響されず、再度、これらの抗体が、VOC で変異された RBD 内の残基以外のものを標的とすることを示唆した。この観察は、ACE2、及び RBD に対して指向された NAb (CB6、B38、COVA2-15)、NTD に対して指向された COVA1-22、並びに RBD 及び NTD の外側にある S1 エピトープに対して指向された COVA1-25 による結合をブロックすることができる血清抗体の高い力価を示す血清-NAb 交差-競合アッセイで得られたデータと一致する。したがって、3 つの免疫原は全て、ストリマーに対するポリクローナル応答を誘発し、これは、血清がベータ / B. 1. 351 バリエントに対して少なくともいくつかの能力を保持する理由を説明し得る。1016 / 20VI 免疫血清がベータ / B. 1. 351 バリエントに対する中和能力を保持するメカニズムが、血清-NAb 競合アッセイによって説明されなかったことは、ヒト IgG 分子の S2P 三量体との結合を立体的にブロックする血清中に存在する大きな IgG 分子に対するこのアッセイの信頼性に起因し得る。全体として、3 つの抗原は、ACE2 結合部位及び NTD と重複するエピトープに対して指向された抗体を誘導する類似の能力を有するように見えるが、競合 ELISA は、抗体結合モードにおける微妙な差異を測定するには感度が不十分である。したがって、1016 / 20VI における RBD 下向き立体構造の傾向は、NAb を誘発する能力に悪影響を及ぼさず、中和抵抗性 VOC に対する優れた NAb 活性と相関しているように思われた。

10

20

30

40

50

【0267】

現在の SARS-CoV-2 ワクチンは、起源の Hu-1 単離株に由来する「祖先の」スパイク配列を送達し、ワクチン受容者の細胞をプログラムして、抗体応答を誘発するスパイクタンパク質を産生する。世界人口のワクチン接種成功は、ワクチン未接種人口における高い伝播率によって複雑化されており、VOC の進化及び拡散を可能にしている。ワクチン接種した個体における VOC によるブレークスルー感染は、SARS-CoV-2 が複製、進化、及び拡散を続けるにつれて、ワクチン誘発免疫を克服する可能性があるという主要な懸念を提起している。アルファ (英国起源)、ベータ (南アフリカ起源)、ガンマ (ブラジル起源)、デルタ (インド起源) の 5 つの主要な VOC が人口に広がってきている。アルファ及びデルタバリエントの増強された伝播特性は、それらが祖先 Hu-1 由来のウイルス系統に取って代わり、世界中に広がることを可能にした。オミクロン (B. 1. 1. 529) はデルタよりも伝播性が更に高く、現在ほとんどの国で支配的な VOC である。当初、BA. 1 が最も一般的な流行型だったが、より感染性の高い BA. 2 サブバリエントが現在優勢になってきている。BA. 4、BA. 5、及び BA. 2. 12. 1 などの他のサブバリエントが出現し続けている。最近の刊行物は、AstraZeneca 及び Pfizer-BioNTech ワクチンの有効性が、Hu-1 系統と比較してアルファ及びデルタバリエントに対してわずかに低減されることを示しており、これらのワクチンによって誘発された免疫がこれらの VOC に対する有効性を保持していることを示している (Emary et al., 2021, Lopez et al., 2021

）。アルファ及びデルタとは対照的に、ベータ及びガンマバリエントは、分布においてより局在化されているが、ワクチン誘導性免疫をより効果的でないものにする特性を示す。例えば、南アフリカにおける試験は、ベータVOCに対するAstraZenecaワクチンの有効性はわずか10.4%であることを明らかにした(Madhiet al., 2021)。この所見は、高い伝播性とワクチン回避特性を組み合わせるバリエントの理論的出現が、ワクチン接種した集団がCOVID-19の感染を受け易くするとき、特に憂慮すべきものである。オミクロンスパイクの主要な中和部位における極端な変化は、祖先配列に用いる2用量接種レジメンの有効性を大幅に低減させており、防御免疫応答を戻すためにブースターの使用を必要とする(Andrews et al., 2022, Magen et al., 2022)。ここに提示されるデータは、安定化したS2P-FHAタンパク質に対して上昇したワクチン血清の中和能力が、ベータ及びオミクロンVOCに対してわずかに低減するだけだが、祖先配列に基づく従来のワクチンに、オミクロンなどの分岐したVOCに由来する安定したスパイクを付加することは、出現するVOCに対する防護のための免疫を広げる可能性があることを示す。VOCに対して免疫を広げるブースターワクチンは、それらが必然的に人口に流行するようになるとき、COVID-19の長期的な制御に不可欠である。1016/20Vスパイクは、RBDに加えて、RBDの外側に位置する高度に保存された領域に対する抗体応答に焦点を当てたユニバーサルSブースターワクチンを開発するための戦略を提供する。

10

【0268】

1016/20VIなどのSベースのワクチンにおけるRBD下向き立体構造の傾向は、誘発されている中和性及び感染増強性の抗体のバランスに関しても重要であり得る。SARS-CoVワクチンの開発を複雑にすることは、S指向性抗体がウイルス侵入を増強し、Fcエフェクター媒介性機構を介して急性肺損傷を促進し得ることを示唆する証拠である。感染の抗体依存性増強は、NAbがRBDに結合し、ストリマーを融合活性化のためにプライミングする受容体模倣を通して生じ得る。ウイルス内在化は、ウイルス融合及び侵入をもたらす細胞表面Fcガンマ受容体相互作用を介して生じる。COVID-19患者から単離されたモノクローナルIgGの試験は、RBDエピトープの1つの群に対する抗体が、Fcガンマ受容体依存性メカニズムを介してADEを媒介することができることを明らかにしている。代替的に、NTDに対する抗体は、上向きRBD立体構造を誘導することができ、ACE2結合及び感染性を高める。別の試験は、選択したRBD NAb及び非中和性NTD抗体は、インビトロでのウイルス感染のFcガンマ受容体媒介性増強を示したが、両タイプの抗体が、サル及びマウスにおいてSARS-CoV-2複製を防御したことを見出した。これらのデータは、インビトロでのADEの観察が、インビボでのこのプロセスを必ずしも予測しないことを意味する。それにもかかわらず、1016/20VIなどのトリマースパイクワクチンの下向き立体構造でRBDをロックすることは、ADE-抗体特異性を超えて中和性RBD指向性抗体の生成に好都合であり得る。

20

30

【0269】

SARS-CoV-2 S2などのSARS-CoV株の中央における異常なアラニン空洞は、本明細書に示されるように、アミノ酸1016位及び1020位での疎水性残基の置換によって補充することができるが、CHコイルドコイルにおける追加的又は代替的なa及びd残基を変異させて、構造誘導した変異誘発を介して追加の安定化変異を生成することが可能である。コイルドコイルを安定させることは、熱安定性を増加させ、感染増強する抗体特異性の潜在的な生成を防止するために下向きRBDをロックすることによって、既存のジプロリン及びフリン変異誘発アプローチを超える複数の利点を有する。更に、SARS-CoV-2では、本明細書において、1016/20VIなどのアラニン空洞変異を含むスパイクトリマーが、改善した中和の幅、強度、及び寿命を誘発することが示される。本明細書に記載される1016/20VIなどの変異の導入は、新たなVOCを重要なこととして含むSARS-CoVの株に対するNAb応答の性質、耐久性、及び堅牢性を、SARS-CoV-2のために将来耐えられるワクチンに改善するための戦略を提供する。実際、結果は、オミクロンVOCへの1016/20VIの導入が、三量

40

50

体化タグの必要性を排除するS2Pトリマーへの安定化効果を有し、精製したS2Pオリゴマーに熱安定性を付与することを示す。熱及び変性の安定性は、世界的なワクチンサプライチェーンのニーズを満たすために不可欠であり、同時にインビトロ及びインビボでの利益を提供する。一実施形態では、改変抗原は、オフターゲット反応性のリスクを低減する異種三量体化タグの必要性を排除する。

【0270】

当業者は、広く説明されている本発明の主旨又は範囲から逸脱することなく、特定の実施形態に示されるように、本発明に多数の変形及び／又は修正が行われ得ることを理解されたい。したがって、本実施形態は、全ての点で例示的であり、限定的ではないとみなされるべきである。

【0271】

本出願は、2021年8月11日に提出された「Vaccine Antigen」と題されたオーストラリア仮出願第2021902500号、2021年8月13日に提出された「Vaccine Antigen」と題されたオーストラリア仮出願第2021902530号、及び2022年5月6日に提出された「Vaccine Antigen」と題されたPCT出願第PCT/AU2022/050429号の優先権を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0272】

本明細書で考察及び／又は参照される全ての刊行物は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0273】

本明細書に含まれている文書、行為、材料、デバイス、物品などのいずれの説明も、本発明の文脈を提供することのみを目的とする。これらの事項のいずれか又は全てが先行技術の基礎の一部を形成すること、又は本発明に関連する分野に共通な一般的知識であったことは、それが本出願の各請求項の優先日の前に存在したように認めるものとはみなされない。

【0274】

参考文献

- Abu-Raddad et al. 2021. N Engl J Med doi:10.1056/NEJMc2104974.
- Aggarwal et al. 2021. doi:10.21203/rs.3.rs-1210846/v1.
- Alter et al. 2021. Nature doi:10.1038/s41586-021-03681-2.
- Andrews et al. 2022. doi:10.1056/NEJMoA2119451
- Andreano et al. 2020. bioRxiv doi:10.1101/2020.12.28.424451.
- Baden et al. 2021. N Engl J Med 384:403-416.
- Bos et al. 2020. NPJ Vaccines 5:91.
- Brouwer et al. 2020. Science 369:643-650.
- Bullough et al. 1994. Nature 371:37-43.
- Cai et al. 2020. Science 369:1586-1592.
- Center et al. 2020. J Biol Chem 2020, 295, (21), 7179-7192.
- Cerutti et al. 2021. Cell Host Microbe doi:10.1016/j.chom.2021.03.005.
- Chan et al. 1997. Cell 89:263-73.
- Dejnirattisai et al. 2021. Cell doi:10.1016/j.cell.2021.03.055.

10

20

30

40

50

- Duan et al. 2020. *Immunol* 11:576622.
- Emary et al. 2021. *Lancet* doi:10.1016/S0140-6736(21)00628-0.
- Finkelstein et al. 2021. *Structural Analysis of Neutralizing Epitopes of the SARS-CoV-2 Spike to Guide Therapy and Vaccine Design Strategies*. *Viruses* 13.
- Fou et al. 2021. *J Am Chem Soc* 143:8543-6; doi:10.1021/jacs.1c02394.
- Fu and Chou 2021. *J Am Chem Soc* 143:8543-8546. 10
- Garcia-Beltran et al. 2021. *Cell* doi:10.1016/j.cell.2021.03.013.
- Guthe et al. 2004. *J Mol Biol* 337:905-15; doi:10.1016/j.jmb.2004.02.020.
- Hoffmann et al. 2021. *Cell Rep* 36:109415.
- Hoffmann et al. 2020. *Mol Cell* 78:779-784 e5.
- Huang et al. 2021. *Curr Opin Coll & Inter Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101468>. 20
- Jackson et al. 2020. *N Engl J Med* 383:1920-1931.
- Jennewein et al. 2021. *bioRxiv* doi:10.1101/2021.03.23.436684.
- Julien et al. 2013. *Science* 342:1477-83.
- Jung et al. 2022. doi:10.1128/jvi.02077-21.
- Ke et al. 2020. *Nature* 588:498-502.
- Kustin et al. 2021. *Nat Med* doi:10.1038/s41591-021-01413-7. 30
- Liang et al. 2020. Nov 6;11:589833. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589833>.
- Liu et al. 2020. *Nature* 584:450-456.
- Liu et al. 2021. *N Engl J Med* doi:10.1056/NEJMc2102017.
- Logunov et al. 2021. *Lancet* 397:671-681.
- Lopez et al. 2021. *N Engl J Med* doi:10.1056/NEJMoa2108891.
- Madhi et al. 2021. *N Engl J Med* doi:10.1056/NEJMoa2102214. 40
- Magen et al. 2022. *N Engl J Med* doi:10.1056/NEJMoa2201688.
- McCallum et al. 2021. *Cell* doi:10.1016/j.cell.2021.03.028.
- Naldini et al. 1996. *Science* 272(5259):263-7.
- Niesen et al. 2007. *Nat Protoc* 2, (9), 2212-21.
- Piccoli et al. 2020. *Cell* 183:1024-1042 e21.
- Plante et al. 2021. *Cell Host Microbe* doi 50

: 10.1016/j.chom.2021.02.020.
Polack et al. 2020. N Engl J Med 383:2603–2615.
Sadoff et al. 2021. N Engl J Med 384:2187–2201.
Sanyaolu et al. 2021. Ther Adv Infect Dis. 8:20499361211024372. doi:10.1177/20499361211024372.
Schoenmaker et al. 2021. Int J Pharm doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586
Shi et al. 2020. Nature 584: (7819) :120–124.
Starr et al. 2021. Nature 597:97–102 doi: 10.1038/s41586-021-03807-6.
Supasa et al. 2021. Cell 184:2201–2211 e7.
Tada et al. 2021. bioRxiv doi:10.1101/2021.02.05.430003.
Vasireddy et al. 2021. J Clin Med Res. 13 (6) :317–325. doi:10.14740/jocmr4518
Vogel et al. 2021. Nature 592:283–289.
Voysey et al. 2021. Lancet 397:99–111.
Walls et al. 2020. Cell 183:1735.
Walls AC et al. 2017. Proc Natl Acad Sci 114:11157–11162.
Watanabe et al. 2021. ACS Cent Sci 7:594–602.
Weissenhorn et al. 1997. Nature 387:426–30.
Wilson 1981. Nature 289:366–73.
Wrapp et al. 2020. Science 367:1260–1263.
Wu et al. 2020. Science 368:1274–1278.

10

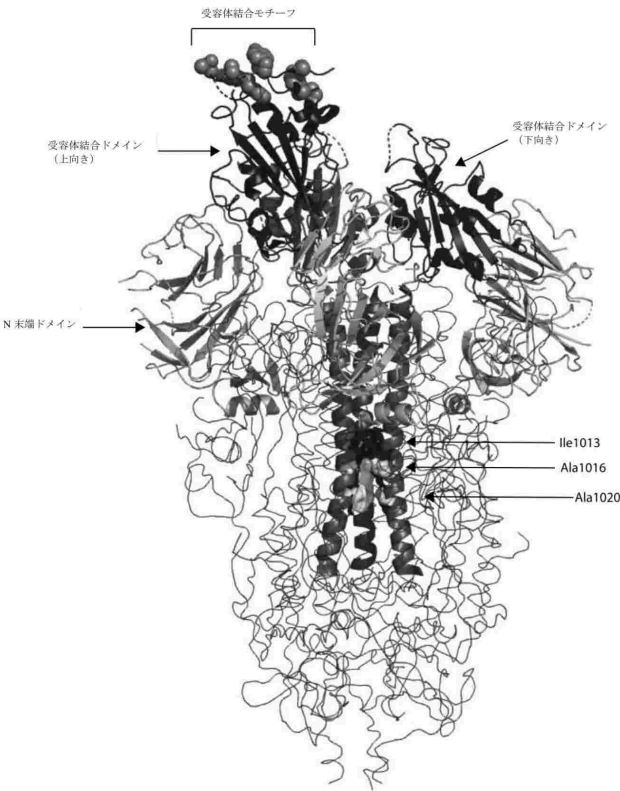
20

30

40

50

【図面】
【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

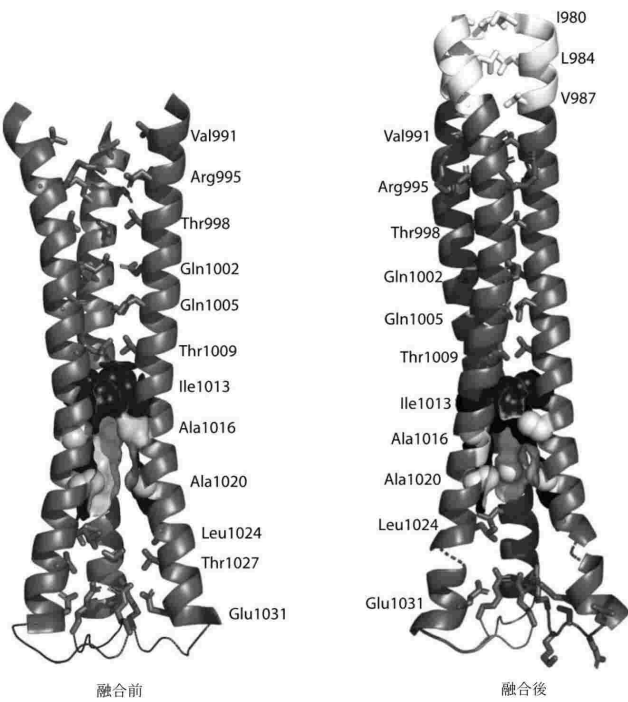
	988	995	1002	1013	1016	1020	1031
SARS_Cov2_Hu1	EAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE						
SARS_Cov_HHS2004	EAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE						
RaTG13	EAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE						
7 残基反復	abdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefg						

SARS_CoV2 (ベータ)	EAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE
SARS_CoV (ベータ)	EAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE
MERS (ベータ)	EQDAQIDRLINGRLTTLNFAVQAQLVRSESAALSAQLAKDKVNE
OC43 (ベータ)	EAEQIDRLINGRLTALNAYVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVNE
HKU1 (ベータ)	EAQVQIDRLINGRLTALNAYVSQQLSDITLIKAGASRAIEKVNE
229E (アルファ)	QADQQVDRLITGRLAALNVFVSHLTLYKTEVRASRQLAQQKVNE
NL63 (アルファ)	QADQQVDRLITGRLAALNFAVSVQLNKYTEVRSSRRLAQQKVNE

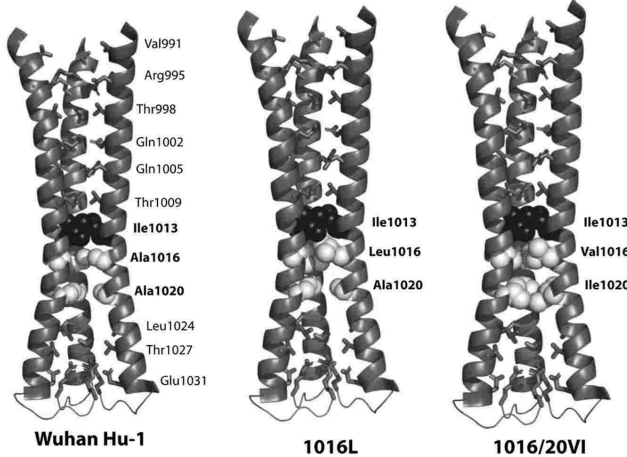
10

20

【図 1 - 3】



【図 1 - 4】

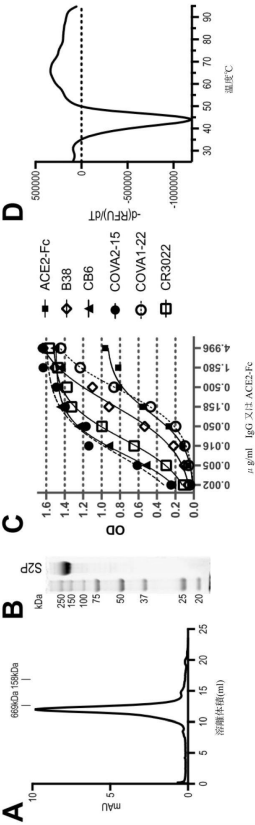


30

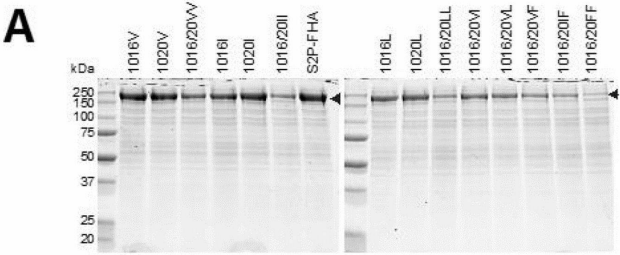
40

50

【図 2】



【図 3 - 1】

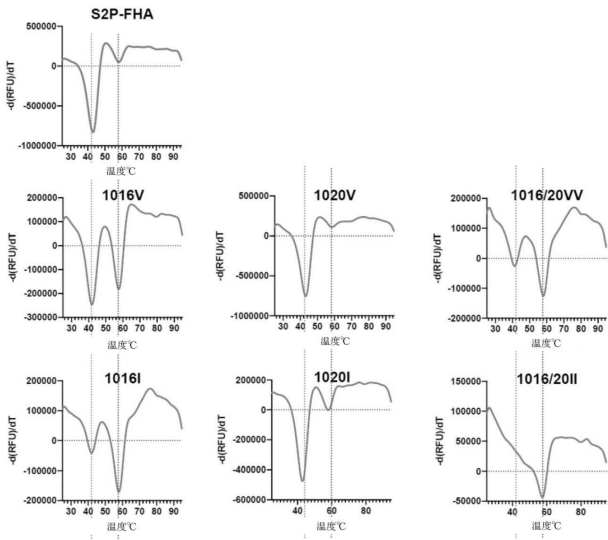


10

20

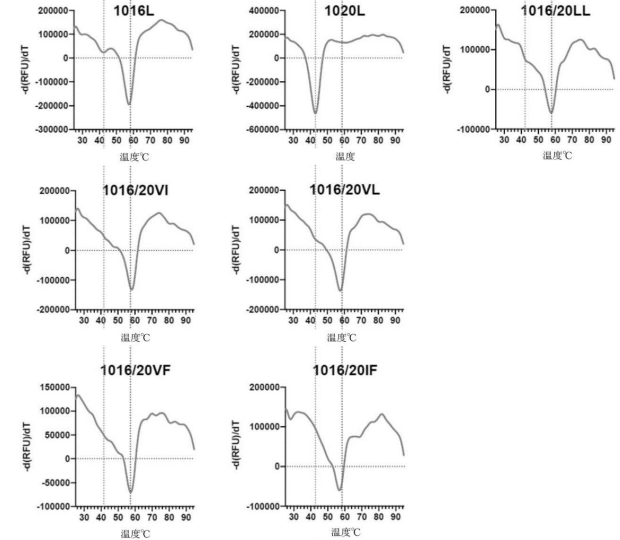
【図 3 - 2】

B



【図 3 - 3】

B

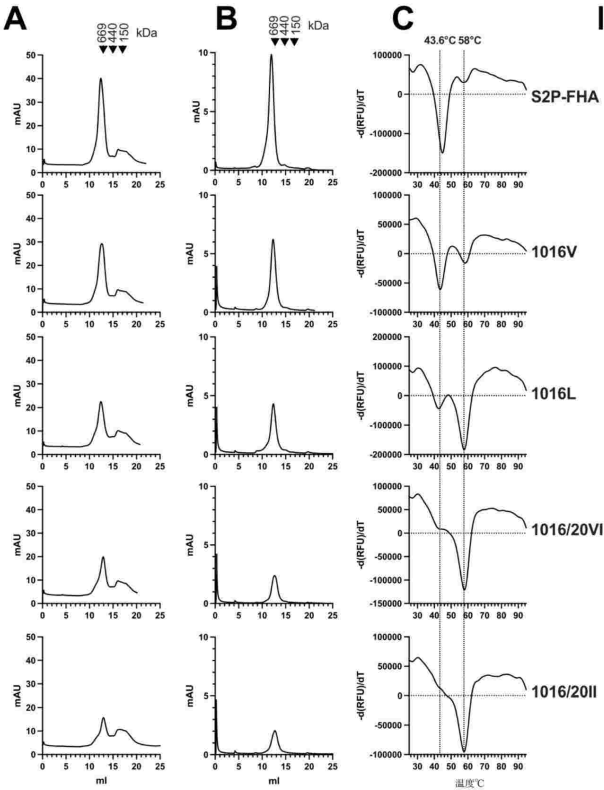


30

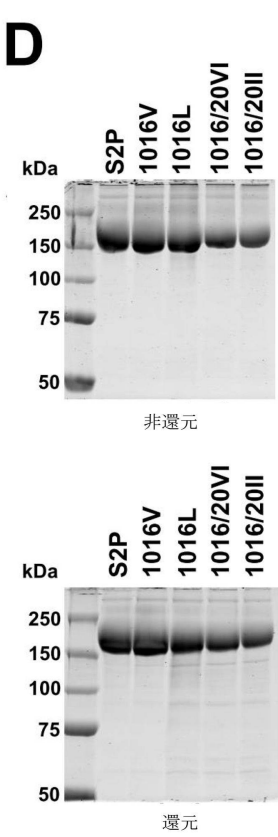
40

50

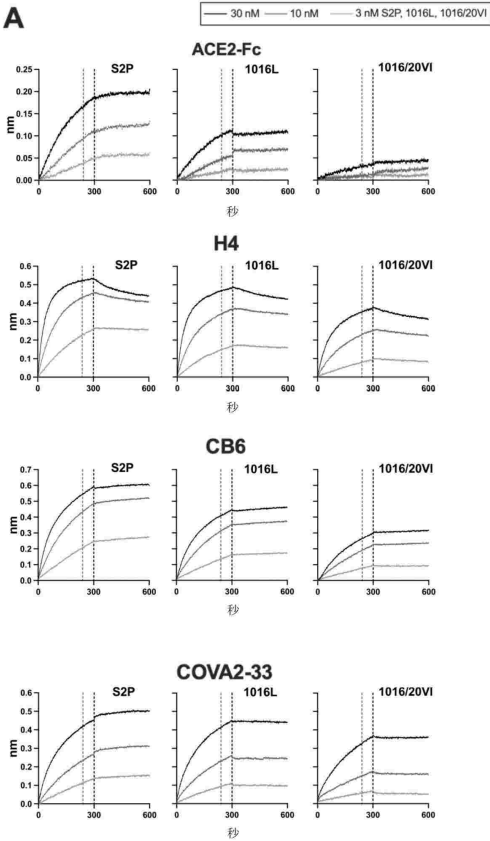
【図 4 - 1】



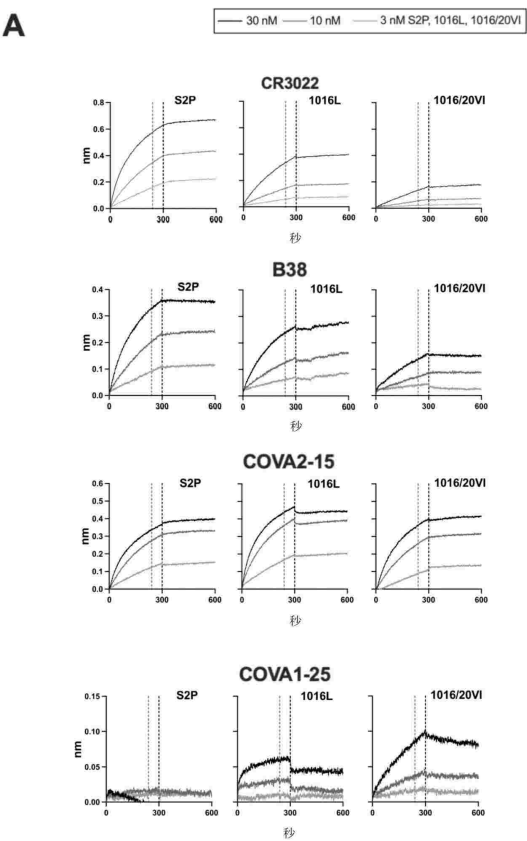
【図 4 - 2】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



10

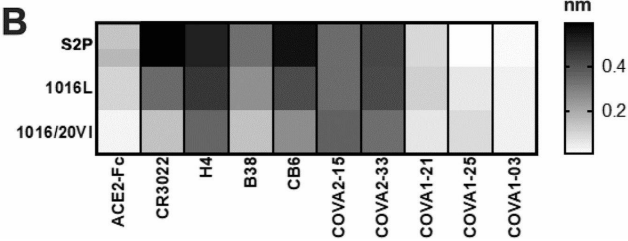
20

30

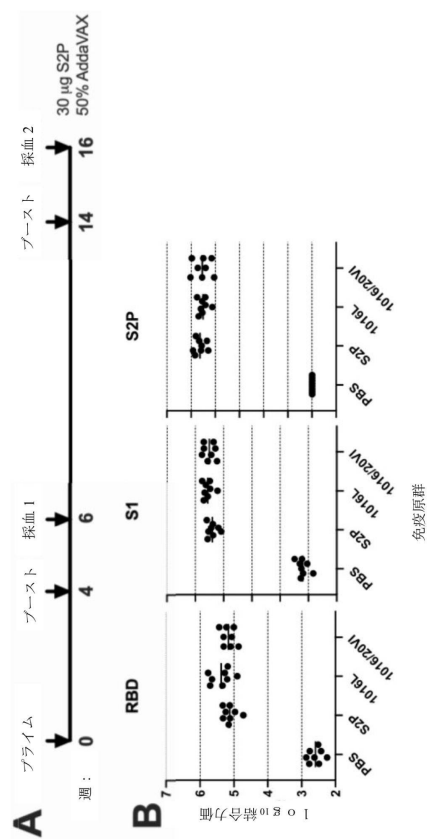
40

50

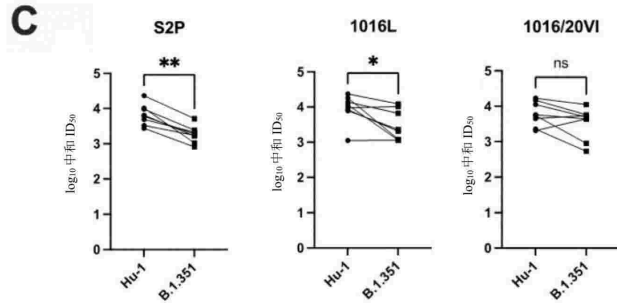
【図 5 - 3】



【図 6 - 1】



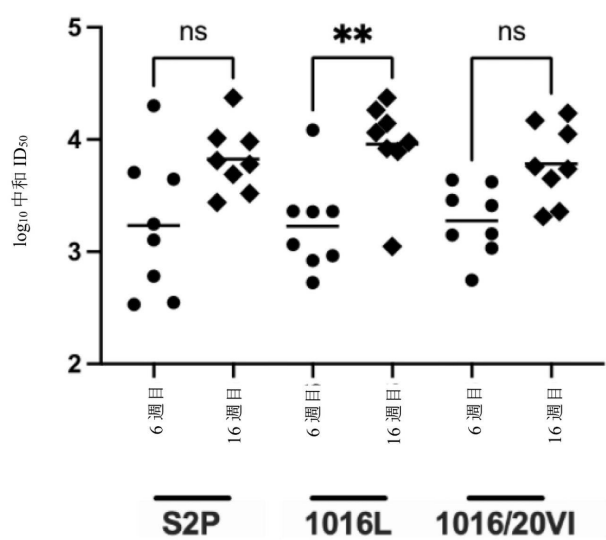
【図 6 - 2】



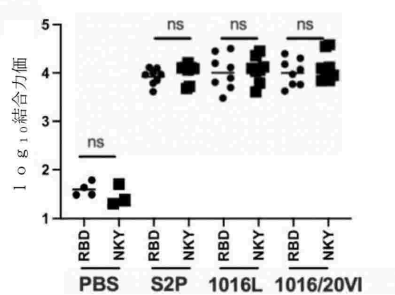
	S2P ^a	1016L	1016/20VI
Hu-1 ^b	6,691 ^c	8,270	5,455
B.1.351	1,824 (3.7) ^d	2,968 (2.8)	3,348 (1.8)

^a 免疫原、^b スパイク遺伝子型、^c 中和 ID₅₀ 幾何平均、^d Hu-1 に対する中和 ID₅₀ 幾何平均の倍率変化。

【図 7】



D



10

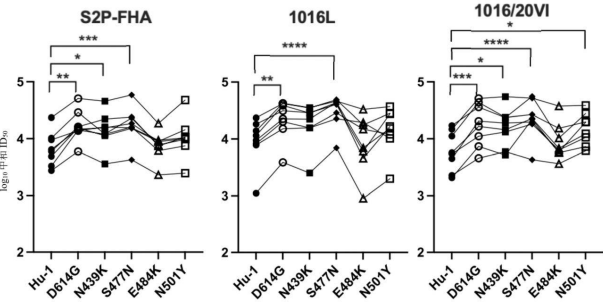
20

30

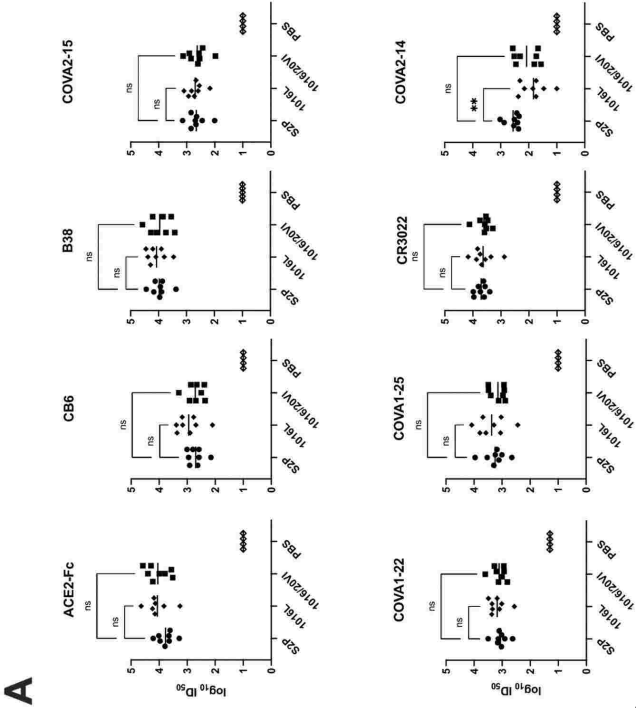
40

50

【図 8】

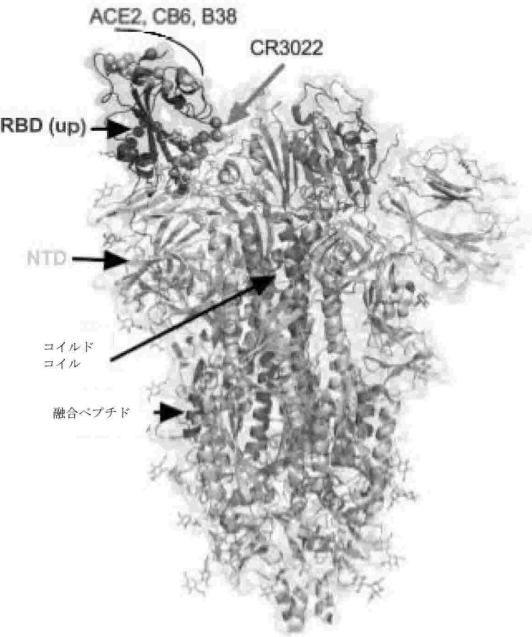


【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

B



【図 10】

配列番号 1
>YP_009724390.1
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVIVKVEFQPCNDPF
LGYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFILMDLEGKQGNFKNREFVFNKIDGYFKIYKHTPI
NLVRDLPGQSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYN
ENGTITDAVDCALDPLSEKTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGVEFNATRFASV
YAWNRRKISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRFIAPGQTGKIAD
YNYKLPPDDFTGCVIAWNSNLDKVGNGYNYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDITPCSFGGVSIVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLT
PTWRVYSTGNSNVFQTRAGCLIGAETHVNSYECDIPIGAGICASYQTQNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG
AENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMRTKTSVDCTMYICGDESTCSNLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGD
LGDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLTDEMQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQAMAYRFNGIG
VTQNVLYENQKLIANQFNLSAIGKIQDSLSSTASALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSNFNGAIISSVLNDI
LSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLM
SFPQSAHPGVVFLHVTYVPAQEKNFHTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWFTQRTNFYEPQIITDNT
FVSGNCDVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNNIQKEIDRLNEVA
KNLNEIDLQELQKYEQYIKWFWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDD
SEPVLGKGVKLHY

10

20

30

40

50

【図 1 1】

配列番号 2
>S2P

[illegible]

配列番号 3

>S2P-FHA

DMDMRKGLVLLCCGAVSFASVNLVTLPTATYNSFTRGVYVQKFRVSSVHSTQDLFFFFSVYHKAHNSWGNTG
 KRFNDPLVNDGVGVYFASKEKSNIRIGWFTGDLDSQTLKLVNNATVNVKCEVQDFGVYVHNNHWSMESFEPR
 YSSANCKTGVYEQSPDLMLGEGKQNNVGLDGYFKISKTHPLVRLDPGGSFALEPLVDLPGINIRFQTLILL
 LHRSYLTDPGSSSSSGTAGAAAYVGVYQRTFLKYNENGTIDVADALDPLESTCKVEKGIYVTSNFRVQPT
 IVRPFNTLCPGPEFVNATFASVYAKNKRISNCVDAFVYLSNASFSTKFKKNSVPTKLDNLTCTVNDVSEFVGR
 QIAPGTQGLIADNYKLPDFDTGSJWANNLNSDKVGNVYLLFRTKKNLKKPFRDIISYIYQAGSTPGAGSVCY
 LQSGVQPTNGVGVQPVRYVISELLHAPATVCGPKKNSLTKVKNCVNFNFNGLTGVTLVNSKKNFLPGQD
 IADTAVRDPDLTLIDTPCGSFVSTYPTGTSNQAVALYQDVNCTEVPVAJHAGLTVYVTSNFGVQTRAGCLGA
 EAHVNSYBCDIPIGACISYQTSNPGSASFASYSIAATMSLGAEMSVYNSNISIAPNTFISVTTELLPVMSKTS
 VDCMTIYCGDSTESCNLLQSGFCTQLRNLATGLIAVEDQNTQVEFAQVQKTLPIKDFGNNSLIPDPSKFSR
 FIEDLFLNKVYLDALQVQKDCGLDIALDLCAQKFNGLVPLPLTDEMAQYTSALLACTLQSGFGAGALQIPAMQ
 NYVAGTNGVLYENKRLANFQNSIAQGLQDLSLTAALQKQVDVNGAENLTVQLSNSGTFASVNLSDIRL
 DPFEAENQVTLDRGLRGLQVPTVQTLRAEIRASNLAKMTSECVLQSGDFRCGKGVHLMSPAGHVFLHVT
 YVQPEKFNITDAPILCKGHAKHPRGGYVSNTHGVYQRNFYQPTITDNTVSGNVDVYIVNNTVYDVLDS
 FEELKYLKFNHTSPVDVLGDSISNAGVNTVLEDRNLVAKMLESILDLQELQVGGSGYIPEAPRDQAVYVRKDG
 EWVLLSTFLGSGSHHHHHHGGSGGLNLTPEAKIEWHE

【圖 13】

配列番号 S

>S2P-FHA

[illegible]

【図 12】

配列番号 4
>S2P

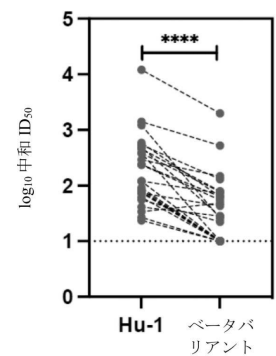
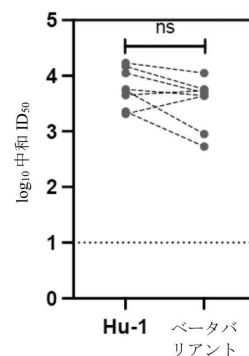
[illegible]

10

【圖 14】

Burnet VI スパイク

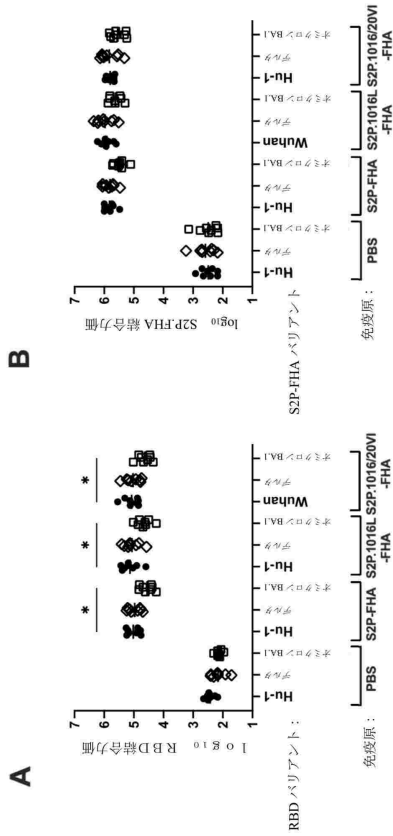
従来のワクチン



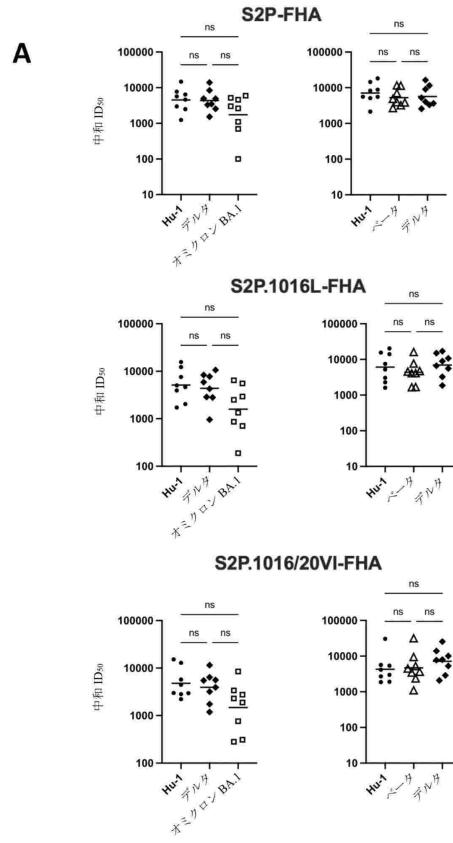
30

40

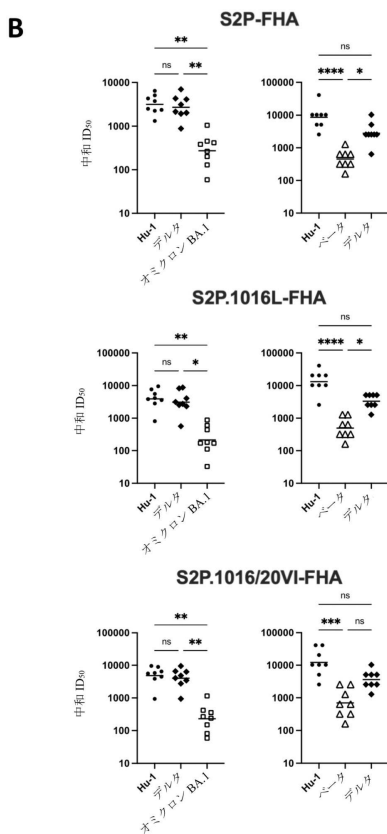
【図 15】



【図 16-1】



【図 16-2】



【圖 17】

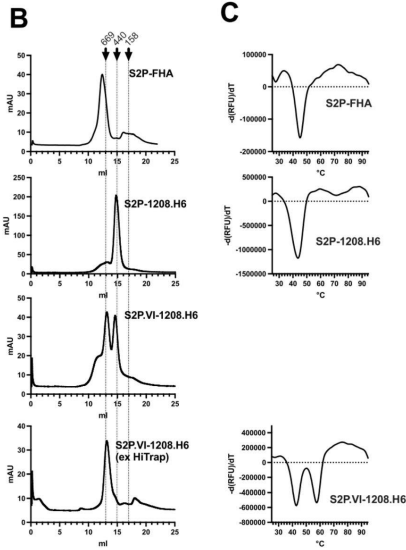
ヒオチン-RBD ELISA 結合力価 (幾何平均)					
バリアント	結合力価	倍率減少	結合力価	倍率減少	倍率減少
Wuhan	105925.0	136304.0	119702.0		
デルタ	96483.0	117143.0	107949.0	1.1	
オミクロン B.1.1	35972.0	47008.0	43458.0	2.9	2.8

S 2 P-FHA ELISA 結合力価 (幾何平均)					
バリアント	結合力価	倍率減少	結合力価	倍率減少	倍率減少
Wuhan	650933.0	835478.0	637467.0		
デルタ	55092.0	1.0	944204.0	0.9	0.9
オミクロン B.1.1	50171.0	2.2	423979.0	2.0	1.8

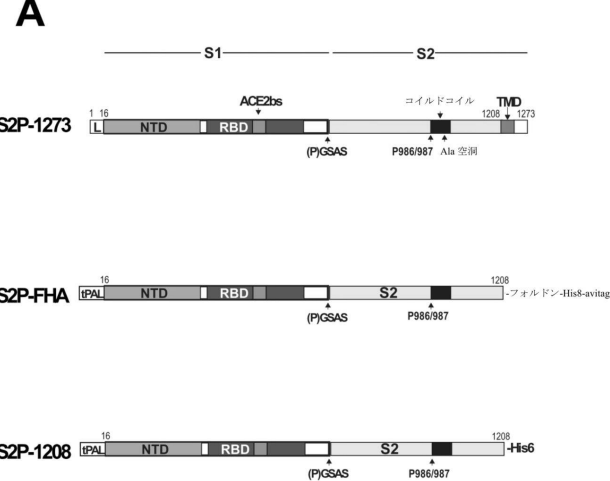
中和 ID50 (幾何平均)					
バリアント	S 2 P-FHA 中和 ID50	S 2 P-VI-FHA 中和 ID50	S 2 P-VI-FHA 中和 ID50	倍率減少	倍率減少
実験 2 Wuhan	4534.0	5110.0	4797.0		
	3131.0	3583.0	4830.0		
デルタ	4353.0	4371.0	3947.0	1.2	1.2
	2704.0	3095.0	4035.0	1.2	1.2
オミクロン B.1.1	1744.0	1587.0	1477.0	3.2	3.2
	273.0	213.0	230.0	16.8	21.0

実験 1					
バリアント	結合力価	倍率減少	結合力価	倍率減少	倍率減少
Wuhan	7116.0	6113.0	4279.0		
	8610.0	13279.0	12177.0		
ベータ	5278.0	4341.0	4682.0	1.4	0.9
	452.0	493.0	697.0	26.9	17.5
デルタ	5708.0	6967.0	7187.0	0.9	0.6
	2791.0	3315.0	3620.0	4.0	3.4

【図 20 - 2】

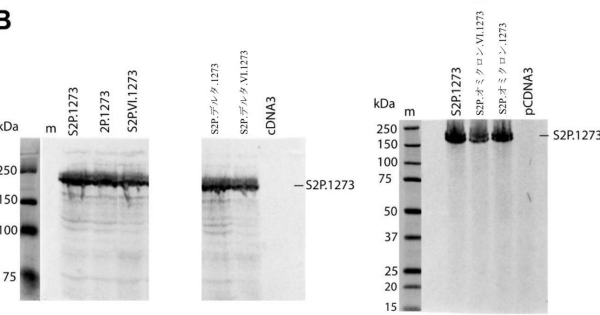


【図 21 - 1】

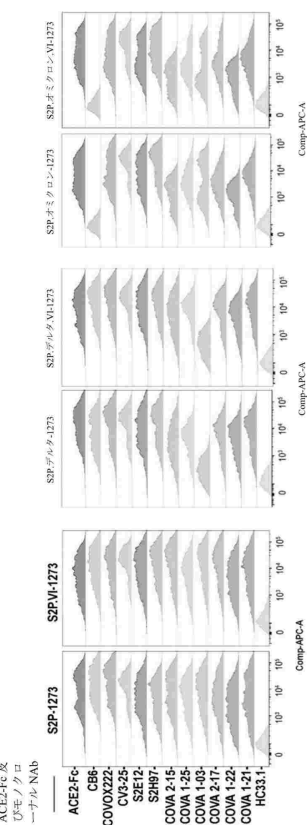


10

【図 21 - 2】



【図 22】



20

30

40

50

【圖 26】

配列番号 8

>S2P-1208.H6

[illegible]

【圖 27】

配列番号 9

>S2P-1208.H6

[illegible]

10

20

【圖 28】

配列番号 10

>S2P-1273

TKRVDLPLVSDGCVNLTQLTPPAYTSTRTGVVYDPKVFSSVLSHTQDLPLFFSNVTFWHAHVSGTNG
 HTRVDLPLVSDGVYFASTEKSNIRGMI FTGTLDSQTLNNVNAHVYKVFCEFOGNDPLFVGYHKNKN
 SMWSEFVRVYSANOTTEFVYSPFLMDLKGQKNGVAFVFKMI DGFKYI XKHPHTNLVRLDPQGSFALEP
 LMDLPIGINITRQTL LALHRSYLPCDGGSSSGTAGAAAYVGLPTI LKYNENGTITDAVDALDLPSETT
 CILKSTGVKGIYQTSNFRVOPTESIVRPNILMLCPCEGVENATFASVYAWNRKISNCVADYSVLVNSASF
 TFKCYGVSTPKLNDCTNMVADSVFVRGDEVRQIAPOQTKGIADVYNKLPDLDTGCVIADVNSNNLSDGVMYIN
 YLRLKRSNKLFFERDISTEYIQAGSTPCNGVEGFCVFLPSQSGVTPNGVGOYPRRVVLSFELHAFATVC
 GPKTNSNLVNKKCVNFMNFGTLTGVLITSENKFLPLFQOGRDIATDAVRDQTLDLITLTPCSGGSVSTVY
 TSNQNAQVLYQDVNCEFEVPAHVLDTWKRYSTSGSNVPTQRAGLIGAHVNNSYECDDPIGAGICASYQ
 TQTPGSSASTVNSQI IAYTMSGAENSVAYNSNAITAPYITSVTEILPVSMTKTSVDMTYICGDSFEST
 NLLQYSGQCLQNALRTIGAEVQDKNTQFVQAKVLYKPTPIKDFGGNFSPILPPDSKPSKSTIEDLLENK
 VTADAGATIKQYGCGLDCAIARDLICAKRFNGILVLPPLTDEMIAGYTSALLAGTITSGWTFGAGAALIPFAM
 QYMRVNGINPVYENQRLANQNSAFAGIKLQBSLSTASGLKGVLDVNOQAALNTVLQSLNSFGATIS
 VILNLSLRDLPEAEVQYTLDRITGRLOQSYVYVQTLRIAREANALAMTSMCEVLQSGKSRVDFCGKGVHNM
 SPFQSAHGUVLHVTVYPAEKENRTEATPAICHGKHAHFREGVYSGNTHFWTORNFYEQPIITDNTDGVSL
 CDVYIGVNNTVYDPLQELSDFKFELDKYFKNHTSPDVLGDJGCSINAGSVNTQKEIDRLNEAVNNSLIDL
 QELQYGVQIKWFIWPLQFETAGLAIJAMVMTILCMCTSCGKCLGGCCSGCKCEDEDSFVLKGVKLEYT

【圖 29】

配列番号 11

>S2P-1273

[illegible]

30

40

50

【図 3 0】

配列番号 12

>S2P.デルタ-1273

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFNDPV
LPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSDKTQSLILVNNATNVVIRKCEFPQNDPFLDVYHKNNKSWMESGVYSSANNCTF
EYVSQPFIMDLGKQGNFKNLREVFKNIDGYFKIYKSHPTINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTP
GDSSSGWTAGAAAYYGYLQPRFTLLKYENGTITDAVDICALDPLSETKTCLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNL
LCPFEVFNATRFASVYAWNRRLSNVCADYSVLVNGASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADGFSVIRGDEVQRIAPQGTGK
IADYNYKLDDPFTGCVIAWNSNMLDSKVGWNYVRYLRFKSNLKPFRERDISTEIQAGSKPCNCGVGPNCFYPLQSYGFQPT
NGVGQPYRVVVLSELLHAPATVCGPKKSNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPQQFGRDIADTDAVRDPTLE
ILDITPCSPGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEVYNNSEYCDPI
GAGICASYQTQTSNPSGASSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCTMYICGDSLTC
SNLLLYQGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGFGNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVLADAGF
FIKQYGDCLGDIAAARDLICAQRFNGLTVLPPLLTDEMIAYQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAQIIPFAMQMYAFRNGIQTQNV
LYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQNVNHNQAQNLTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPEAPEVQIDRLIT
GRLOSLQTYVTQQLIRAAERIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGHYLMSFPQSAHGVVFLHVTYVPAQEKNFPTAPAI
CHDGKAHFFREGVFSVNGTHWFVTQRNFYEQIITTDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV
LDGDISGINASVNNIQKIDRLNEVARNLINESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGTIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCSCLKGC
CSCSGCKCFDEDDSEPLVKGVLHXYT

【図 3 1】

配列番号 13

>S2P.デルタ-1273

ATGTTCTGTTCTTCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTGAGCTCCCACTGCGTGAACTGACCAACGAAGGCCAGCTGCCCTGCCTA
TACCAATTCCTTACACGGGGGCGTGACTATCCGACAAAGGTTGTAGAAAGACGGGTGCTGCACCTCCACACAGGATCTGTTTC
TGCTTTCTTTCTTAAGCTGACCTGGTTCACGGCCATCCATGTGAGCGGCACCAATGGCAAGAGCGGTTTCGACCACTCAAGTG
CTGCCTTTACAGAGCTGCTGACTTCGCTTCCACAGAGCTTAACATCATAGAGGCTTGATCTTGGCACACACATCTGGAC
CAGCAAGACACAGCTCCTGTGATCGTGAACAAATGCCAACAGCTGCTCATAGATTCGCGAATTCGACATCTGCAAGAC
CCTTCTCGGACCTTACTACCAAGAACAAACAGAGCTGGATGGAAGCGGCTGTACTTCAGCGCCACAACTGCACCTCT
GAGTACGTGCTCCCAAGCTTCTCTGATGGAAGCTGGAAGGCAAGCAGGCACTTCAAGAACTCGCGGAGTCTGTGTTCAAGAA
CATCGACGGCTACTTAAGATCTACAGCAAGCAACCCCTATCAACTCTGTCGGGATCTGCTCAAGGCTTCTCTGCTCTCG
AGCCCTCGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTCGACAGAGCTACTGGAACCT
GGCATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGGGCGGCTACTATGTTGGGTACTGCAGCTCTGGACCTTCTGCTGAAGTA
CAAGCAGAACCGGCACCATCACCGACGGCTGGATTGTGCGCTTGATCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCTGAAGTCTTCA
CCGTGGAAAAGGCGCATCTACAGACAGCAACCTTCGGGTGACGCCACCGAATCCATCTGCGGGTTCGCCAATATACCAAT
CTGTGCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACAGATTGCGCTGTGTACGCTGGAAACCGGAAGCGGATAGCAATTTGCTG
GGCGCACTACTCGTGTGTATAACAGCGCCAGCTTCAGACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCTACCAAGCTGAACGAC
TGCTGCTTCAACAAGCTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGAGATGAAGTCGGCGAGATTGCCCTGGACAGACAGGAAG
ATCGCGCACTACAACCTACAAGCTGCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCTGGAAAGCAACAACCTGCCACTCAAAAT
AATGGCTGGGCTACGAGCTTACAGAGTGGTGGTGTCTGCTGTGAGCTGCTGCATCTGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCTTAA
GAAAGACCAACATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAATCTCAACTTCAACGGCTGACCGGACCGGGCTGTGACAGAGAGCA
ACAAGAAGTTCTCGCCATTCCAGCAGTTCCGGCGGGGACATTGCCGATACACAGACGCCGTTAGAGATCCCGACAGCTGGAA
ATCTGGACATACACCTTTCGAGCTTCGGCGGAGTGTGTGTATCACCCCTGGACCAACACAGCAATCAGGTGGACAGTGTCT
GTACAGGCGCTGACAGCTGACCGAGTGCCTGGCCATTCAGCGGACGATCAGCTGACACCTACTTGGACAGTGTACTTACCG
GCACAAATGTGTGTACACAGAGAGCGCGGCTGTGTGATCGGAGCTGACAGCTGAACAATAGCTACGAGTGCAGATCCCTCATC
GGCCTGGCATCTGTGCGAGCTACCGACACAGACAAACAGCCCGCGAGCGCAGCTGTGTGCGCAGCAGACGATCTTG
TACACAATGCTCTGGGCGCCGAGAACAGCTGGCTACTTCAACAACCTCTATCGTATCCCAACCACTTCAACATCAAGC
TGACACACAGATCTCGCTGTGTCTCATGCAAGACAGCAGCGGTGACGTGTACAATGTATATCTCGCGGAGTTTCCAGCGAGTGC
TCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGCCCTGACAGGGATGCCCTGACAGACAGGCAAGAA
CACCAAGAGGTGTTGCCCAAGTGAAGCGAGTCTACAGACCCCTCTCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTCTCAGCAGCA
TTCTCGCGCGACTCTGAAGACCCAGCAAGCGGAGTTCATCGAGGACTGCTGCTTCAACAAGTGACACTGGCCAGCGCGGCG
TTTACTCAAGCAGTATGGCGATTGCTCGGGCGATATTGCCGCCAGGAGTCTGATCTGGCGCGCAGAGTTTAAACGGAGTGACAT
GCTGCCTCTCTGCTGACCGATGAGATGATGCCCAGTACACAAGCGCTCTGCTGGCGCGCACAACTACAGCGGCTGAGAT
TTGGAGCTGGCGACGCCCTGCAGATCCCTTTGCTATGACAGTAGGCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGACAGTG
CTGTACGAGAAGCAGAAGCTGATGCCAACCAAGTTCAACTCGCCATCGGCAAGATCAGGACAGCTTGAGCAGACAGCAAG
CGACTGGGAAGCTGCGAGAAGCTGTCACCAAGAAATGCCACGGCATGAACACCTGCTTCAAGCAGCTCTGTACAGACTTTGG
CGCGCATCAGCTTCTGCTGAATGATATCTGTCAGACTTGACCTCTGAGGCGGAGATTAGCGGCTCTGCCAATGACAGATGATCA
GGCAGCTGCGAGAGCTTCAGACATACGTGACCCAGCAGCTGATCAGGCGCGAGATTAGCGGCTCTGCCAATGCTGCCGCG
CACCAAGATCTGTAGTGTGTGCTGGCGCAGGACAGAGAGTGGACTTTTGGCGGAGGCTTACACCTGATGAGCTTCTCCT
AGCTGCTCTCGCCAGCGGTGGTGTCTTCGACAGTGACCTACGTGCGCGCTCAAGAGAGAAATTCACACCGGCTTCAGCGCAT
TGCTCAGCGGCAAGGCCACTTCTCTAGAGAAGGGGTGTGCTGTGCTCAAGCGGACCCATTTGGTTGGTGAACACAGGCAATCT
CTACGAGCCCCAGCATCATCACACCGACCAACCTTCTGTGCTGCGCACTGCGAGCTGTGATTCGGCATTTGTGAACAATACCG
GTACCGACCTCTGCGACCGGAGCTTGCAGCTTCAAGAGGATCTGACAGAGTACTTTAAGACAGCAACAGGCCGCGAGCTG
GACTTGGGACACTTCCGGAAATCAATGCCAGCTGCTCAAGTCTCAGAAAGAGATGACCGGTCAGGACAGAGCTGGCCAGAG
CTCTGAACGAGGCTGTACACCTGCGAAGAGCTGGGAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGGCTGTGATCACTTGTGCTGGCT
TTATCGCGGAGACTGTGCGCATCGTGTAGTGCCATCATCTGCTGTCATAGCGCTGTGACTGCTCCTGCAAGGCGGTG

10

20

【図 3 2】

配列番号 14

>S2P.オミクロン-1273

MEVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHIVSGTNGTKRFNDPV
FNDGVYFASIEKSNIRGWIFGTTLDSDKTQSLILVNNATNVVIRKCEFPQNDPFLDHRNNKSWMESGERVYSSANNCTFEV
SQPFIMDLGKQGNFKNLREVFKNIDGYFKIYKSHPTIIVREDELDPQFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPG
DSSSGWTAGAAAYYGYLQPRFTLLKYENGTITDAVDICALDPLSETKTCLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNL
CPFEVFNATRFASVYAWNRRLSNVCADYSVLVNGASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADGFSVIRGDEVQRIAPQGTGK
IADYNYKLDDPFTGCVIAWNSNMLDSKVGWNYVRYLRFKSNLKPFRERDISTEIQAGNKCPCNGVAFGNCFFPLRSYSFRPFTY
GVGHQPYRVVVLSELLHAPATVCGPKKSNLVKNKCVNFNENGLKGTGVLTESNKKFLPQQFGRDIADTDAVRDPTLEI
LDITPCSPGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEVYNNSEYCDPI
GAGICASYQTQTSNPSGASSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCTMYICGDSLTC
SNLLLYQGSFCTQLKRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYFGGPNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVLADAGF
IKQYGDCLGDIAAARDLICAQRFKGLTVLPPLLTDEMIAYQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAQIIPFAMQMYAFRNGIQTQNV
LYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVHNHQAQNLTLVKQLSSNFKGAISSVLNDIFSRLDPEAPEVQIDRLIT
RLQSLQTYVTQQLIRAAERIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGHYLMSFPQSAHGVVFLHVTYVPAQEKNFPTAPAI
HDGKAHFFREGVFSVNGTHWFVTQRNFYEQIITTDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV
LDGDISGINASVNNIQKIDRLNEVARNLINESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGTIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCSCLKGC
SCSGCKCFDEDDSEPLVKGVLHXYT

【図 3 3】

配列番号 15

>S2P.オミクロン-1273

ATGTTCTGTTCTTCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTGAGCTCCCACTGCGTGAACTGACCAACGAAGGCCAGCTGCCCTGCCTA
TACCAATTCCTTACACGGGGGCGTGACTATCCGACAAAGGTTGTAGAAAGACGGGTGCTGCACCTCCACACAGGATCTGTTTC
TGCTTTCTTTCTTAAGCTGACCTGGTTCACGGCCATCCATGTGAGCGGCACCAATGGCAAGAGCGGTTTCGACCACTCAAGTG
CTGCCTTTCTTTCTTAAGCTGACCTGGTTCACGCTACTCACGGGACCAATGGCAAGAGCGGTTGCACAATCCAGTCTGCC
TTCATAGACTGGGCTGACTTCGCTTCCATCGAGAAGTCTAACATCATCAGAGGCTGGATCTTGGCACACACATGGACAGCA
GACACAGCTCCTGCTGATCTGGAACAATGCGCACCAACGTGTCATCAAGGTGTGGCAATTCGAATCTGTCAAGCAGCCCTTCC
TGCCACCAAGAACCAAGAGGCTGGATGGAAGGCGAGTTCGGGTGTACTTCAGCGGCCAACACTGTGACCTCTCGATACGTG
TCCAGCCTTCTCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGCGACTTCAAGAGCTGCGCGGAGTCTGTTTCAAGAACATCGAGG
CTACTTCAAGATCTACAGCAAGCAACCCCTATCATCTGTCGGGGAAGCCGAAGATCTGCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGAGG
CCCTGGTGGATCTCGGCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGTGCGGCCGTCGACAGAGAGTACTGACACTGGC
GATAGCAGCTCTGTGATGGACAGCTGGCGGCGGCGGCTACTATGTGTGCTACTCTGAGCGCTCGGACCTTCTGCTGTGAAGTACA
TGGAAGAGGGGCACTTACAGACAGCAGCACTTCGGGTGACGCGCAGCAATCCATCTGTCGGGTTCGCCAATATCACCAATCT
TGCCCCCTTGCAGAGGTTTCAATGCCACAGATTGCGCTTGTGTGAGCTGGAAAGCGGAGGATGACAGATTCAGAACTGCGGCG
CGACTACTCTCGTGTGATTAACCTGGCCCGCTTCTTCACTTCAAGTGTCTACGGGCTGTCCCTTACCAAGCTGAAGCAGCTGT
GCTTCAACAAGCTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGGGCGAGATTGCCCTTGGACAGCAGGCAATCT
GCCGACTACAACTACAGCTGCCCGGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCTGGACAGCAGCAAGCTGGAGCTCAAAATCTC
CGCACACTCAAAATAGCTTACCGGCTGTGGGAGCTCAAAATGTAAAGCTTTCGAGCGGAGCACTTCCACCGGAGCACTGATC
AGCCCGGCAAGCAAGCTTGAAGCGGCTGCGGCTTACTTCCAGCTGGAGCTGCGATCTGCTTCTTGGGCGCATGACAGG
GCGCTGGGCGCACAGCTTACAGAGTGGTGGTGTCTTCTGACAGCTGTCGATGCTCTGCCACAGTGTGCGGCGCTTAAGAA
AAGCAACAATCTGTGAAGAACAAATCGTGAATCTCAACTTCAACGGCTTGAAGGGAACCGGCTGCTGACAGAGAGCAACA
AGAAGTCTTCTGCCATTCAGCAGTGTGGCGGGACATTGCCGATACACAGAGCGGCTTAGAGATCCCGACAGATCGAAATC
TGGCACTCACCCCTTGCAGCTTGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGCGACCAACACCAAGTGAAGTGGAGCTGCTGTA
CAGGCGGCTGAATGTGACGAAGTGGCGGTGGCCATTACGCGGATCAGCTGACACCTACTTGAAGAGTGTACTTACCGGCA
GCAATGTGTTTCAGACAGAGCGGCTGTCTGATCGGAGCTGATGACTGTGAACAATAGTACGAGTGACATCCCTCACCGGCG
GCTGGCATCTGTGCGAGCTACAGACACAGACAAGAGCCCGGCGAGCGGCTGCTGTGGCGCAGCAGCAAGTCAATGGCTTA
CACAATGTCTTGGGCGCGGAGAACAGCGTGGCTACTTCAACAACCTTATCGCTATCCCAACCAACTTCAACATCAGCTGTA
CCACAGAGATCTGCTGTGTCCATGACCAAGCAGAGCTGGAGTGAACAATGATATCTGCGGGGATTCACACGAGTGTCTG
AACTGCTGTGCGAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAAGAGAGCCCTGACAGGAGTGGCTGGACAGGACAGAACAC
CCAAGAGGTGTTGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCTATCAAGTACTTCGGCGGCTTCAATTTACGACAGCAGT
TGCCCCGATCTAGCAAGCCAGCAAGCGGAGCTTCATCAGGAGCTGCTGTTCAACAAGATGACACTGGCCAGCGCGGCTTC
ATCAAGCAGTATGGCAGTGTGCTGGCGGATATTGCCCGCAGGAGTGTGATCTGCGGCCAGAAGTTTAAAGGACTGACAGTGT
GCTCTCTCTGTGACCGATGAGATGATGCCCGAGTACACAAGCGCTCTGCTGGCGGCAACAATCAAGCGGCTGGACATTTG
GAGTGGGCGAGCCTCGAGATCCCTTTGCTATGCGAGATGGCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGAACCGAGAAGTGTCTG
TACGGAAGCAAGAGAGTGTATGGCCAACCAAGTCAACTCGGCATCGGCAAGATCCAGGACAGCTGTGACAGCAGCAGAGCGC
CTTGGAAAGCTGTGACGAGCTGTCAACCACTTGAAGCTTGAACACCTGTGTACAGCAGCTGTGATGCAAGATGTGACAG
CATCAGCTCTGTCTGATGATATCTTTCAGACTGGAGCTTCCGAGGAGCTGCGATGTCGACAGCTGATCAACAGCTGATCA
GAGCTGCAAGAGCTTCCAGACATAGCTGACCGCAGCAGTGTATCGAGCGGCGAGATTAGAGGCTTGTCCAACTGTGCGGCCAC
CAAAGTGTCTGAGTGTGCTGTGGGCGAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGGCGCAAGGGCTTACCACTGTAGCTGTCTCTCAAT
CTGTCTCTCACGGGCTGGTGTGTTCTGCACTGACCTACGTGCGGCTCAAGAGAGAATTTCAACACCGCTCCAGCAGTCTGC
CACAGCGCCAAAGCCCACTTTCTTAGAGAAGGGGTGTGCTGTGCTCAAGCAAGCAACCTTGGTGTGACACAGCGGAGCTTCTA
CGAGCGCCAGCTTCCAGCACCAGCAACACTTCTGTGCTTGGCACTGACGCGATCGGATGCTGCGGATGTGTAAGATCTG
ACGACGCTTCTGCGAGCCTGGACAGCTTCAAAGAGGAATGGACAGTACTTTAAGAACCCACAGACCGCCGACGAGCTG
CTGGGACATCTCCGAATCAATGCCAGCTGGTCAACATCCAGAAAGAGATTCACCGGCTGACAGAGGTGGCGAGAACTG
GAACGAGAGGCTGATCGACTGCAAGAGCTGGGGAAGTACAGCAGTATCATCAAGTGGCCTGTGATCTGCTGGGCTTTA
TCCGCGGAGTGTGATGCGCATGTGGTCAACAATCATGCTGTGCTGATGACACAGCTGCTGTGATGAGGCGGTGTGT
AGCTGTGGCAGCTGTGCAAGTTCAGCAGGAGGATTTGAGCCGCTGTGAGGCGCTGAAGCTGCATATACTTAA

30

40

50

【图 3 4】

配列番号 16

S2P.VI.1208 mRNAワクチンコード領域予測例

>S2P.VI-1208

UUGGACCGAUGAAGCCAGGCGUGUGUGUUGUUCUUCUUGGGGAGUGUGUUGUUGAUGUGUGUGAUGAUGCAGCA
UUGGACCGACCCCCCGGAGUUAAGCAACUGUUCUUCUGGGGGGUUUUAUUAUGGUAAGUGUUUCUGGAGUUGUGU
UUGAUAACGACGAGGACCUUUCUCCUGGUGUUCUUCGAGCGUGUAGUGUGUUGUUCACGGAUACAGUUUUGGCAAGC
ACGAGAGUGUGUACCAACCGGUGUUCUCCUUAACGACGGGGUUAUUCUGCCUGCAAGGAGAGAGGACCAUAUUCU
UGUGAUUCUUGCGACGACAUUAAGGUAUAAAGCAGCGUCCUGUAGUGUAUAUUGCCACCAACAGUUUGUAUACAGGUU
UGUGAUGUCCAUUGUGUAUAGACCCUUCUUGGGUGUUCUUAACCAAGCAAGCAAAUUCUUGUGAGGAGAGCGAGUUU
UGUGUACUGUGAGUUCUACACGUCUUAUCUGAUGACUAGCGCCGUGUUCUUGAUGUUGUUGAGGAGUAGCGGUAUUA
UUAAGAACCGCGGGAGUUGUGUGUAAGAACAGUACGCGGUGUUUUUAAGUAUUUCUUAACGAGUAACCCCAUAUUUCU
GGGACUACCCGAGGAGGUGUUCUGGCCUUCGCGGCGGUGGUGUUCUCCGUAAGGAGAACCAUUAACCCGUGUUAUGACG
UUGUGCGUUCACCGAGGUAUUUUGACCGCGGGAGUAUUAACGCGGUGUACGCGCGGAGCGGAGUUCUAUUGAUGUU
CUGGACAGGAGGACCUUUCUUCUAAGUAACAGGAGAAAGCAUUAACGAGUACGAGUGGUCUGUGUUGUUGAUCUUGU
CGAGAGAGAGGAGACCUUUCUUCAGUUUUUAACAGUAGAGGAGCAUUAACGAGACCUUUCUGUGUUGCGGACGAGCA
ACGAUUUGUGGAGUUGUAUUAUUAACCAACUUGUUGUGGAGAGAGUACGUAUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
UUGGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU
ACCGGUGGAGAGGAGCAAGUUAUUUGUUCUUAACAGAAUUAACGACGUGUUGUUGGAGGUGUUGUUGGCGGAGGAG
AGACGAUUUCCGCGGCGUACAGCGGAGAUUUGUUAUUAUUAACUUAACGUGUAUUAACGUGUUGUUGUUGUUGU
UGUGAUUUUACCAACAAUGUUAUUAAGUUGGGGAGAAUUAACGUGUUAUUAACGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU
UUGGACCGGGGACUAACGACGAGAUUUGUUGGACGCGGGGUCACCCCGUAGUUGGAGUAGAUUUUAUUUUGUUCU
CCAUUCUUGUGUUGUUGUUGUUGUACGAGCAAGUAGGUGGGUACACAGUUUUCUGUUGUUGGUGUUGUUGUUGUUGU
GCACCGCCCGGUGUUGUGUGUGGCGGAGAGAGUGGACGACAAUUAAGGUAAGAAAGUGUCUUAACUUCUACCAACGG
UACCGGUGUUGCGGGUUGUUAACGAGAAUUAAGAAAGAAUUUCUUAUUCGAGUUGGAGGAGGUGUUGGCGUAGACG
GACGGUGUGGAGGAGCGUCCGACGCGUGUAUUCUUAACAGUACGCCUGUUGUGUGGUGGUGUUGUGUGUUGAUCACG
UACCAACAGCAACUAGCGGUGUAGUUGUUGGACGAGUAGUAGGAGUUAAGAAGUAGGAGUUGGUGUUGUUGGAGGAG
UACGCGGACGUGUGGUGUUGGUGUUGGACGCGGAGCAUUGUUGUUGACUUGGCCCGGUGUUGUUGUUGGUGUUGUUG
AACAACAGGUGGUGGUGGAGUACCGCAAGCGGGGAGUUUAUUGCAGGAGUUAUUAAGAAGUAGGAGUUGUUGGAGGAG
GAGGUGCGUGCGGUGUUGUUGUUGUAGCAUAUUAUUAUUAUUGUUGUGGCGGGGAGAAUUGUUGUUGGUAACGACA
UUGCCUACCAAGCAUUAUUGGACAUUAUUGUACGACAGAUUAUUGGAGUUAUUGGAGUAGGAGUAGGAGUUGUUG
AUGUACAUUAUGUGUUAAGUAGCGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
UAGAAGUUUUCUGUAGAGGAGCAAGAAUUAUCGAGGAGUUGUGCGAGGUGUUGUUGGAGUUAUUGUUGCGGGAUUUA
UAGAUUUGUGGGGUGUUAACUUGUUGCAAAUUAUUGUUGUUGUUGUUGUUGGAGGCGUAGAGGAGUUGUUGUUGGAG
UUAUUAACAAGUUAUUCUGGUGGAGUGGCGGUGUUAUUAAGAGUAGCGGUGUUGUGGCGGAGUUAUUGUUGCGGGAUUUA
UUGCGCGAGGAUUAACCGGUGUUAACGUCUGUGUUGUUGUUGUUGGAGGACGAGUAGUUGUUGGAGUACGAGGCGUUA
UUGCGUGUUAUUAUCGAGGCGGUGGAGUUGUUGGUGGCGGCGGUGUUGAUGUUUCGCAUUAUUAUCGAGUUGUUAU
UUAACCGGAUUCGUGUUGUACCGAAGUUGUUGUUGUUGAAGUAGGAUUGAGGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU
AAUUAACGAGUACUGUGUUGUAGCGGUGUUGGUGGUGGACGUGUUGGAGGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
UUGGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
GACAGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
CGAAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
GGAAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
GAGAGAAUUAUUAACGCGGCGCCUUAUUGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
GACGUAUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
UAUUGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU
UAUUUUUAAGGACACAGCUCUUGUUGGAGUGGUGUUGUUGGAGUUGUUGGAGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
GAUUAACGCGGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG
UAUUAACGCGGUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUG

【图 3 6】

配列番号 18

S2P,delta,VI,1273 mRNAワクチンコード領域予測例

>S2P,デルタ.VI-1273

[illegible]

【图 3 5】

配列番号 17

S2P.VL1273 mRNAワクチンコード領域予測例

>S2P.VI.1273

[illegible]

10

【图 3 7】

配列番号: 19

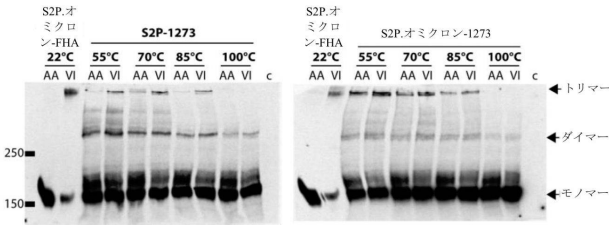
S2P.オミクロン.VL1273 mRNAワクチンコード領域予測係

>S2P オミクロン VI-1273

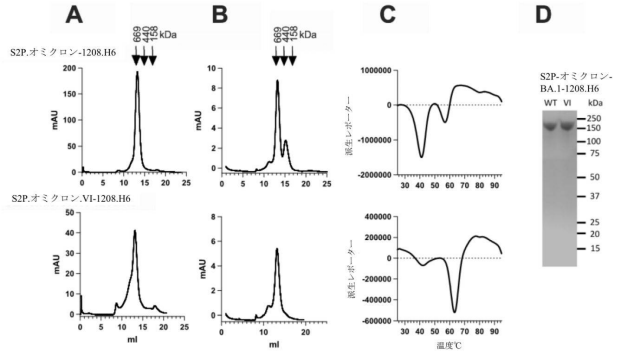
[illegible]

40

【図 38】

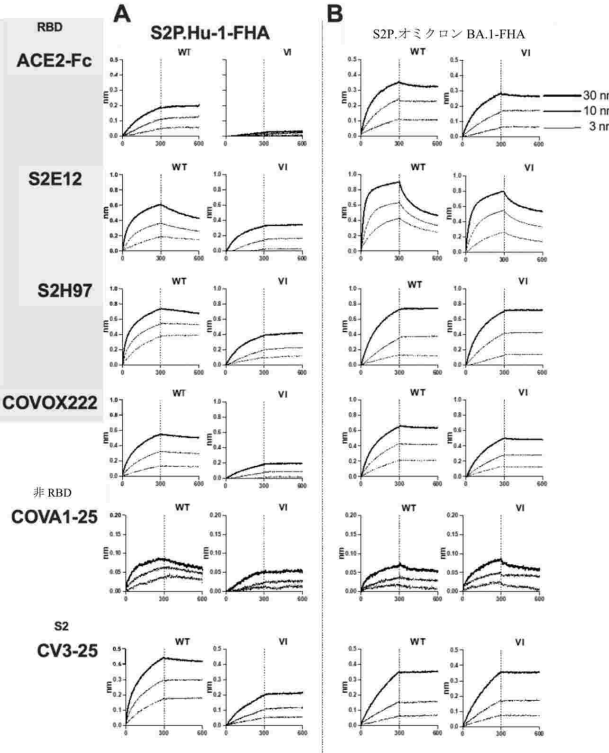


【図 39】



10

【図 40】



【図 41】



20

30

40

50

【図 4 2】

配列番号 25

S2P.オミタロン-1208 の DNA 配列

>S2P.オミタロン-1208

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGGCTAGCGTGAAC
CTGACCAACGAGAACACAGCTGCCCTCCAGCCCTACCAACACAGCTTCACGAGAGCGGTGACTACCCCGACAAGGTG
TTCAGATCCAGCGTGTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTCGACCTGGTTCCACGTG
ATCTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCCGAACCCCGTGTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGC
ATCGAGAAGTCCAACTCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCTGCTGATC
GTGAACAACGCCACCAACGTGGTCACTAAAGTGTGCGAATTCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGACCACAAG
AACAAACAGAGCTGGATGGAAGCGAGTTCGGGTGTACTCCAGGCCCAACAACCTGCACCTTCGAGTACGTGTCC
CAGCCTTCTCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCACTTCAAGAACTGCGCGAGTTCGTGTTCAGAACATC
GACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGACACCCCTATCATCGTCGGGGAACCGGAGATCTGCCTCAGGGCTTC
TCTGCTCTCGAGCCCTGTGGATCTGCCCATCGGATCAACATCACCCGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCAC
AGAACTACTGACACCTGGCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCGGCCGCTACTATGTTGGCTACCTG
CAGCCTCGGACCTTCTCTGCTGAAGTACAAAGAGAACGGCACCATCACGACGCGGTGGATTGTGCCCTTGATCCT
CTGAGCGAGCAAGTGCACCTGAACTCCTTACCCTGGAAGGGCATCTACGAGACGCAACTTCGGGTG
CAGGCCACCGAATCCATCGTGGGGTTCCCAATATCACCAATCTGTGCCCTTCGACGAGGTGTTCAATGCCACC
AGATTCCGCTCTGTGTAGGCTGGAAACCGGAAGCGGATCAGCAATTCGCTGGCGGACTACTCGGTGTGTATAAC
CTGGCCCTTCTTCACTTCAAGTGTCTACGGCGTTCCTTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCAAACTGTG
TAGCCCGACAGCTTCTGTATCCGGGAGATTGAAGTGGGAGATTGCGCCTTGACAGACAGGCAACATCGCGAC
TACAACCTACAAGCTCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCTGGAACGCAAGCTGGACTCCAAATC
TCCGGCACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTTCCGAAGTCCAATCTTAAGCCCTTCGAGCGGACATCTCCACC
GAGATCTATCAGGCGGCAACAGCTGTGAACGGCTGGCGGCTTCACTGTACTTCCACCTGCGGTCTTAC
TCTTTTCGGCCACATACGGCGTGGGCCACCAAGCTTACAGAGTGTGGTGTCTCTTTCGAGCTGCTGATGCT
CCTGCCACAGTGTGGCGCCTTAAGAAAAGCAACAATCTCGTAAGAACAAATGCTGAATTCACACTTCAACGGC
CTGAAGGGCACGGCGTGTGACAGAGAGCAACAAGATTCTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGACATTGCC
GATACCAACAGACGCGCTTAGAGATCCCGACACTGGAATCTTGCATCACCCCTTGCAGCTTGGCGGAGTG
TCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAAGCAATCAGTGGCAGTGTGTACAGGGCGTGAATCTACCGAAGTG
CCCGTGGCACTCAGCCGATCAGTGAACCTACTTGGAGTGTACTTACCGGACGAATGTGTTTCAGACC
AGAGCCGCTGTCTGATCGGAGTGAAGTGAACAATAGTACGAGTGGGACATCCCATCGGCGTGGCATC
TGTGCCAGTACCAAGACAGACAAGAGCCCGGACGCGCAGCTGTGTGGCAGCCAGAGCATCTTGCCTAC
ACAATGTCTTGGGCGCGAGAACAGCGTGGCTACTTCCAACACTCTATCGCTATCCCCACCACTTCAACATC
AGCGTGACCAAGAGATCCTGCTGTGTCCATGACCAAGACAGCTGGAGTGTACAATGTATATCTGCGGGAT
TCCACCGAGTGTCCAACCTGCTGCTGAGTACGGCAGCTTCTGCAACCGCTGAAGAGCGCTGACAGGGATC
GCGCTGGAACAGGACAAGAACCCCAAGAGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCTATCAAG
TACTTCGGCGGCTTCAATTTACGCCAGATTCTGCCCGATCTAGCAAGCCAGCAAGCGGAGCTTCACTGAGGAC
CTGCTGTTCAACAAGTGACACTGGCCGACCGCGCTTCAACAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGATATTGCC
GCCAGGAGTCTGATCTGGCCCGAGAAGTTTAAAGGACTGACAGTGTGCTCTCTCTGCTGACCGATGAGATGATC
GCCAGTACACAAGCGCTGTGCTGGCCCGCAACAACAGCGGTGGACATTTGAGCTGGCGCAGCCCTGACAG
ATCCCTTTGCTAGTACAGTGGCTTACCGGCTTCAACGCGATCGAGTGAACGAGACCTGTGACAGAACAG
AGCTGATCGCAACCACTTCAACTCCGCACTCGGCAAGATCCAGCAAGCTTGAAGCAGCAGCAGCAGCGCCTG
GGAAAGCTCGAGAGCTGGTCAACCAATGCCAGGCACTGAACACCTGCTCAAGCAGCTGTCTAGCAAGTTT
GGGCGCATCAGCTCTGTGCTGAATGATATCTTTTCAAGACTGGACCTCTGAGGCGGAGTGCAGATCGACAGA
CTGATCACAGGCAAGTGCAGAGCTCCAGACATACGTGACCGCAGCAGTGTAGAGCGCGCGAGATTAGAGCC
TCTGCAATCTGGCGCGCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCAAGAGCAAGAGTGGACTTTTGGCGCAAG
GGCTACCACTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCTCTCACGGCGTGTGTTTCTGCAGCTGACCTACGTCGCCGT
CAAGAGAGAAATTTACCAACCGCTCCAGCATCTGCCACGACGGCAAGCCACTTCTAGAGAGGCGGTGTT
GTGTCACAGGCAACCATTTGGTCTGTGACAGCGGAATTTCTAGAGGCCAGATCATCACACCGCAACACCT
TTCGTGTCTGGCACTGCGAGCTGTGATCGGCTTGTGAACAATACCGTGTAGACCCCTCTGAGCCGAGCTG
GACAGCTTCAAGAGGAAGTGGCAAGTACTTTAAGAACCAACAGCCCGACGTGGACCTGGGAGACATCTCC
GGAATCAATGCTCCGTGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGCTGAACGAGTGGCCAAGATCTGAACGAG
AGCCTGATGACCTGCAAGAACTGGGGAAGTACGAGCAAGGCAGCGGATCCACCACTATCATCACCAT

【配列表】

2024530047000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2022/050880			
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01) C07K 14/165 (2006.01)					
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)					
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)					
Databases: PATENW, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS, REGISTRY, PubMed, Google, GenomeQuest and Applicant and inventor search in internal databases provided by IP Australia. Keywords: COVID-19 terms, stabilized/prefusion spike protein, A1016 and A1020 mutations, alanine cavity, mutations and hydrophobic modifications, vaccine, antigen, hexaprop, omicron and similar terms and synonyms, sequence motif search (see SIS for more info).					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
Documents are listed in the continuation of Box C					
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex					
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 </td> <td style="width: 10%; vertical-align: top; text-align: center;"> "T" "X" "Y" "&" </td> <td style="width: 60%; vertical-align: top;"> 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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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" "X" "Y" "&"	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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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" "X" "Y" "&"	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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 10 October 2022		Date of mailing of the international search report 10 October 2022			
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Srgjan Chivchiristov AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 3104			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2022/050880
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/156267 A1 (CUREVAC AG) 12 August 2021 Abstract; pages 26-28, 30-37, 57, 84, 107, 113, 115, 118-20, 135, 178, 188, 202, 267, 269; SEQ ID NOs: 163, 408; RNA ID R9641; Tables 4, 6-8, 10-17, 19-25, A; Examples 1-3, 5-19; claims 12-18, 22-28, 76-82, 167, 186, 194, 232; Figures 2-3, 5-21; page 22, lines 23-41; SEQ ID NO: 31; Table 1	12-25, 27-56
Y	whole document	15-19
X	HSIEH, C.L. et al., 'Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes', Science. 2020, Vol. 369, No. 6510, pages 1501-1505 & Supplementary Information Abstract; Figure 3D; page 4, col 1, para 3; Figure S4; Figure 2G; Tables S1- S2; page 4, col 1, para 2; page 4, col 2, para 1; Figure 3E; page 4, col 3; Figure 4B and Supplementary Materials and Methods	1-25, 27-57
Y	whole document	15-19
X	COSTELLO, S.M. et al., 'The SARS-CoV-2 spike reversibly samples an open trimer conformation exposing novel epitopes', bioRxiv preprint posted online 11 July, 2021, pages 1-25. doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.11.451855 Abstract; page 2; Figure 2, Table 1; page 6, last two paras; page 8, last two paras to page 9, para 1; Figure 4; page 11, Methods; page 7, para 1-2; page 3, para 2; page 9, para 2	1-25, 27-57
Y	whole document	15-19
X	BANGARU, S. et al., 'Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate', Science. 2020, Vol. 370, No. 6520, pages 1089-1094 & Supplementary Information page 1089, col 1-2; Figure 1A; Supplementary Materials and Methods; page 1082, col 2; Figure 2 and Figure S1C; page 1094, col 1	1-25, 27-57
Y	whole document	15-19
X	WU, K. et al., 'Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice', bioRxiv preprint posted online 13 April, 2021, pages 1-28. doi: https://doi.org/10.1101/2021.04.13.439482 Abstract; page 4, last para to page 5 first para; Figure 1; Methods; page 5-8; Results; Figures 2-6; Table 1; Figure 3; Figure 6	1-25, 27-57
Y	whole document	15-19
Y	MORET, M.A. et al., 'Why and How Coronavirus Has Evolved to Be Uniquely Contagious, with Uniquely Successful Stable Vaccines', arXiv.org e-Print archive. Published online 19 July, 2021 as per Wayback Machine, pages 1-8. Retrieved from the internet on 13 September 2021. https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/2107/2107.07047.pdf Abstract; page 5, para 4; page 5, para 5; page 6, para 1	15-19
X	MANNAR, D. et al., 'SARS-CoV-2 Omicron Variant: ACE2 Binding, Cryo-EM Structure of Spike Protein-ACE2 Complex and Antibody Evasion', bioRxiv preprint posted online 21 December 2021, pages 1-28. Retrieved from the internet on 04 July 2022. https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473380 page 2, para 2; page 3, para 1, Figure 1A; page 16, Expression and Purification of Omicron Recombinant Spike Protein Constructs; page 16, Pseudovirus Neutralization Assay; Figure S4; page 9, para 1; Table S2; Figure 4; Electron Microscopy Sample Preparation and Data Collection; Figure S1	12-25, 27-56
Y	whole document	15-19
	FANG, Z. et al., 'Omicron-specific mRNA vaccination alone and as a heterologous booster against SARS-CoV-2', bioRxiv preprint posted online 28 February 2022, pages 1-38 and supplementary figures. Retrieved from the internet on 04 July 2022. https://doi.org/10.1101/2022.02.14.480449	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/AU2022/050880
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	page 4, lines 129-132; page 5, para 1; Figure 1A-B; lines 163-180; Figure 1G; Figure S1A; lines 171-180; Figure 1J-K; page 8, last para; Figure 2C; Figure S2C; page 9, para 1; Figure 2C; lines 275-279; Figure 2D; Molecular cloning, lines 737-747; page 27, lines 776-785; page 5, lines 150-161; Figure 1F	12-25, 27-56
Y	whole document	15-19
A	CAI, Y. et al., 'Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein', Science. 2020, Vol. 369, No. 6511, pages 1586-1592 Figures 1-5	1-25, 27-57
A	NISHIMA, W. & KULIK, M., 'Full-Length Computational Model of the SARS-CoV-2 Spike Protein and Its Implications for a Viral Membrane Fusion Mechanism', Viruses. 11 June 2021, Vol. 13, No. 1126, pages 1-19 Figure 1-5	1-25, 27-57
L	NOVAVAX, 'PREVENT-19 Phase 3 Trial Data Factsheet', pages 1-2, published online 14 June 2021. Retrieved from the internet on 14 September 2021 from https://www.novavax.com/sites/default/files/2021-06/Novavax-PREVENT-19-Trial-Data-Factsheet-2021-06-14-FINAL-EN.pdf D11 relates to clinical trials data for the Novavax vaccine mentioned in D4 and therefore the two documents are read as a single disclosure	
L	NOVAVAX, 'Announcement of UK and South Africa Trial Results', pages 1-27, published online 28 January 2021. Retrieved from the internet on 15 September 2021 from https://www.novavax.com/sites/default/files/2021-01/UK-SouthAfrica-Trial-Results-FINAL.pdf D12 relates to clinical trials data for the Novavax vaccine mentioned in D4 and therefore the two documents are read as a single disclosure	
X	WO 2021/239880 A1 (CUREVAC AG) 02 December 2021 pages 26, 29, 31, 35, 60-61, 150-153, 157-161, 164, 175, 181, 189; claims 12-18; Example 1-4; Table A; Tables 17-20; Figures 1-8	12-25, 27-56
Y	whole document	15-19
P,X	WO 2021/156267 A1 (CUREVAC AG) 12 August 2022 Abstract; pages 26-28, 30-37, 57, 84, 107, 113, 115, 118-20, 135, 178, 188, 202, 267, 269; SEQ ID NOs: 163, 408; RNA ID R9641; Tables 4, 6-8, 10-17, 19-25, A; Examples 1-3, 5-19; claims 12-18, 22-28, 76-82, 167, 186, 194, 232; Figures 2-3, 5-21; page 22, lines 23-41; SEQ ID NO: 31; Table 1	1-25, 27-57
P,X	WO 2021/239880 A1 (CUREVAC AG) 02 December 2021 pages 26, 29, 31, 35, 60-61, 150-153, 157-161, 164, 175, 181, 189; claims 12-18; Example 1-4; Table A; Tables 17-20; Figures 1-8	1-25, 27-57
P,X	US 2022/0218815 A1 (CUREVAC AG) 14 July 2022 para 49, 71, 278, 289-295, 305-306, 330-333, 351-355, 388, 394, 834-915, 938, 998-1000, 1020, 1097, 1193, 1502, 1532, 1570, 1821; Examples 1-19; Tables A, 1, 4, 6-8, 10-17, 19-24, 25; Section 1.4; Figures 2-3, 5-24; RNA ID R9641 and RNA ID R9515; 252-253	1-25, 27-57
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2022/050880

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:
- SEQ ID NOs: 1-26 were not searched. A motif search of S protein amino acids 1013-1020 was performed (please see SIS for additional details).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2022/050880

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☒ Claims Nos.: 26
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Box
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2022/050880
Supplemental Box	
Continuation of Box II Claim 26 does not comply with Rule 6.2(a) because it relies on references to the description and/or drawings by stating "the polynucleotide sequences described herein".	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2022/050880	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2021/156267 A1	12 August 2021	WO 2021156267 A1	12 Aug 2021
		AR 122374 A1	07 Sep 2022
		AU 2021216658 A1	23 Jun 2022
		BR 112022014627 A2	27 Sep 2022
		CA 3160511 A1	12 Aug 2021
		EP 3886897 A1	06 Oct 2021
		IL 293571 A	01 Aug 2022
		TW 202140518 A	01 Nov 2021
		US 2021379181 A1	09 Dec 2021
		US 11241493 B2	08 Feb 2022
		US 2022193226 A1	23 Jun 2022
		US 2022202930 A1	30 Jun 2022
		US 2022218815 A1	14 Jul 2022
		WO 2022137133 A1	30 Jun 2022

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2022/050880	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2021/156267 A1	12 August 2022	EP 3993828 A1	11 May 2022
		US 2022211838 A1	07 Jul 2022
		US 2022211841 A1	07 Jul 2022
		US 2022249654 A1	11 Aug 2022
		WO 2021156267 A1	12 Aug 2021
		AR 122374 A1	07 Sep 2022
		AU 2021216658 A1	23 Jun 2022
		BR 112022014627 A2	27 Sep 2022
		CA 3160511 A1	12 Aug 2021
		EP 3886897 A1	06 Oct 2021
		IL 293571 A	01 Aug 2022
		TW 202140518 A	01 Nov 2021
		US 2021379181 A1	09 Dec 2021
		US 11241493 B2	08 Feb 2022
		US 2022193226 A1	23 Jun 2022
		US 202202930 A1	30 Jun 2022
WO 2021/239880 A1	02 December 2021	US 202218815 A1	14 Jul 2022
		WO 2021239880 A1	02 Dec 2021
		EP 3993828 A1	11 May 2022
		US 2022211838 A1	07 Jul 2022
		US 2022211841 A1	07 Jul 2022
US 2022/0218815 A1	14 July 2022	US 2022249654 A1	11 Aug 2022
		US 202218815 A1	14 Jul 2022
		AR 122374 A1	07 Sep 2022
		AU 2021216658 A1	23 Jun 2022
		BR 112022014627 A2	27 Sep 2022
		CA 3160511 A1	12 Aug 2021
		EP 3886897 A1	06 Oct 2021
		IL 293571 A	01 Aug 2022
		TW 202140518 A	01 Nov 2021
		US 2021379181 A1	09 Dec 2021
		US 11241493 B2	08 Feb 2022
		US 2022193226 A1	23 Jun 2022
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2022/050880	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 2022202930 A1	30 Jun 2022
		WO 2021156267 A1	12 Aug 2021
		WO 2022137133 A1	30 Jun 2022
End of Annex			

10

20

30

40

50

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)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)	A 6 1 K 39/215	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

(32)優先日 令和4年5月6日(2022.5.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

オーストラリア(AU)

(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,CV,CZ,D E,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクファーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッド内

(72)発明者 ドラマー, ハイジ

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクファーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45
 4C084 AA13 MA05 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA66 NA14 ZB091
 ZB211 ZB331
 4C085 AA03 AA38 BA71 CC08 DD62 DD86 EE01 EE06 FF01 FF11
 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA08 CA12 MA05 MA52 MA55 MA56
 MA57 MA59 MA66 NA14 ZB09 ZB21 ZB33
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA31 FA72 FA74