202340228

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202340228 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：111145091 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 24 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/04 (2006.01)* *A61K39/12 (2006.01)*
A61P31/22 (2006.01)

(30)優先權：2021/11/24 美國 63/283,047

(71)申請人：美商旗艦先鋒創新有限責任公司 (美國) FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI, LLC (US)
美國

(72)發明人：尼爾森 珍妮佛 A NELSON, JENNIFER A. (US)；卡特 艾瑞克 保羅 CARTER, ERIK PAUL (US)；墨菲 麥可 多納多 MELFI, MICHAEL DONATO (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：12 共 203 頁

(54)名稱

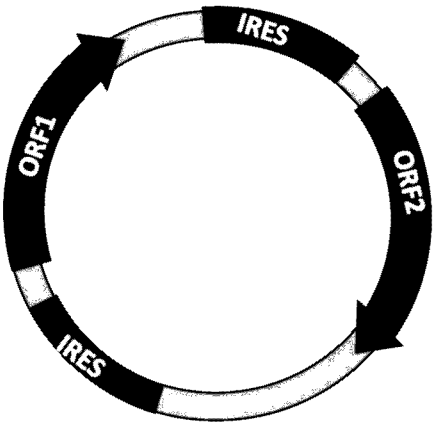
水痘－帶狀皰疹病毒免疫原組成物及其用途

(57)摘要

本揭露提供了涉及編碼水痘-帶狀皰疹病毒免疫原表現的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。

This disclosure provides compositions, pharmaceutical preparations, and methods relating to circular polyribonucleotides encoding the expression of Varicella-Zoster Virus immunogens.

指定代表圖：



實例	ORF1	ORF2	其中
A	免疫原 1	免疫原 2	免疫原1和免疫原2各自是VZV免疫原
B	免疫原 1	免疫原 2	免疫原1係VZV免疫原，並且免疫原2係除VZV免疫原之外的免疫原
C	免疫原	佐劑	ORF1編碼VZV免疫原，並且ORF2編碼多肽佐劑。

【圖 1】

202340228

【發明摘要】

【中文發明名稱】　水痘-帶狀皰疹病毒免疫原組成物及其用途

【英文發明名稱】　VARICELLA-ZOSTER VIRUS IMMUNOGEN

COMPOSITIONS AND THEIR USES

【中文】

本揭露提供了涉及編碼水痘-帶狀皰疹病毒免疫原表現的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。

【英文】

This disclosure provides compositions, pharmaceutical preparations, and methods relating to circular polyribonucleotides encoding the expression of Varicella-Zoster Virus immunogens.

【指定代表圖】　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　水痘-帶狀皰疹病毒免疫原組成物及其用途

【英文發明名稱】　VARICELLA-ZOSTER VIRUS IMMUNOGEN COMPOSITIONS AND THEIR USES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】水痘-帶狀皰疹病毒（Varicella-zoster virus）（VZV）係一種屬於α-皰疹病毒家族的病毒。VZV存在於世界各地並且具有高度傳染性。原發感染導致急性水痘（varicella，也稱為「chickenpox」）。初始感染後，VZV在腦神經和背根神經節中建立終身潛伏期，並可在數年至數十年後重新激活為帶狀皰疹（herpes zoster（HZ），也稱為「shingles」）。VZV還可引起從無菌性腦膜炎到腦炎的多種神經系統病症。VZV感染的其他嚴重併發症包括皰疹後神經痛、Mollaret氏腦膜炎、多發性帶狀皰疹（zoster multiplex）、血小板減少症、心肌炎、關節炎、和導致中風的腦動脈炎症、脊髓炎、眼部皰疹和無疹型帶狀皰疹（zoster sine herpete）。需要對水痘-帶狀皰疹病毒有活性的疫苗和治療劑。

【發明內容】

【0002】本揭露提供了涉及編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。本揭露還提供了使用編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸之方法。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑在投與後可在受試者中誘導免疫響應。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑可用於治療或預防受試者的疾病、障礙或病症（例如，水痘或帶狀皰

疹）。

【0003】在第一方面，本揭露提供了環狀多核糖核苷酸，其包括編碼水痘-帶狀皰疹病毒（VZV）多肽免疫原的開讀框。

【0004】在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV糖蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV糖蛋白選自VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、和gM或其免疫原性片段。

【0005】在一些實施方式中，VZV糖蛋白係VZV gE或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV糖蛋白係相對於野生型VZV gE包括不超過10個胺基酸取代、缺失或插入的VZV gE的突變變體或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。在一些實施方式中，VZV gE多肽係缺少羧基末端尾結構域的截短多肽。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-573和Y569A突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-623和Y569A突變、Y582G突變、或Y569A/Y582G雙突變。

【0006】在一些實施方式中，VZV gE多肽包括與SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的至少50%、60%、70%、80%、

90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

【0007】在一些實施方式中，VZV gE多肽進一步包括訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包括與SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV gE多肽進一步包括訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

【0008】在一些實施方式中，視需要進一步包括訊息序列的VZV gE多肽由與SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包括訊息序列的VZV gE多肽由SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列編碼。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV立即早期蛋白係IE63多肽。在一些實施方式中，VZV IE63多肽包含與SEQ ID NO: 84的胺基酸序列具有至少85%（例

如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV IE63多肽包含SEQ ID NO: 84的胺基酸序列。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由與SEQ ID NO: 85的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85的核酸序列編碼。

【0009】 在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括SEQ ID NO: 39-47中任一項的至少300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1400或1500個核苷酸的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括SEQ ID NO: 39-47中任一項的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的連續段的片段。

【0010】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有至少51%（例如，至少52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%）的GC含量。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至多52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或59%、或60%。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為51%至60%、52%至60%、53%至60%、54%至60%、55%至60%、52%至58%、53%至58%。在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有51%至60%的GC含量。

【0011】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有大於20%的尿苷含量。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量為大於10%（例如，大於11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量為至多30%（例如，至多29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的

尿苷含量為20%至28%、21%至26%、10%至24%、15%至24%、20%至24%、21%至24%、22%至24%、23%至24%、10%至23%、15%至23%、20%至23%、21%至23%或22%至23%。在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有20%至28%的尿苷含量。

【0012】 在一些實施方式中，VZV多肽免疫原進一步包括編碼多聚化結構域的序列。在一些實施方式中，多聚化結構域選自T4 foldon結構域、鐵蛋白結構域、β環肽、AaLS肽、或二氧四氫蝶啶合酶結構域。在一些實施方式中，多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的N端。在一些實施方式中，多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的C端。

【0013】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的開讀框與IRES可操作地連接。

【0014】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的開讀框編碼第二多肽。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原和第二多肽被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點、或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。在一些實施方式中，蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括與第二IRES可操作地連接的編碼第二多肽的第二開讀框。

【0015】 在一些實施方式中，第二多肽係多肽免疫原。在一些實施方式中，第二多肽係VZV多肽免疫原。在一些實施方式中，第二多肽係選自以下的VZV糖蛋白：VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN和gM，VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，第二多肽係VZV gE或其免疫原性片段。在一些實施方式中，第二多肽係VZV IE63或其免疫原性片段。

【0016】 在一些實施方式中，第二多肽係多肽佐劑。在一些實施方式中，佐劑係細胞介素、趨化因子、共刺激分子、先天性免疫刺激因子、傳訊分子、轉

錄激活因子、細胞介素受體、細菌組分或先天性免疫系統的組分。

【0017】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。在一些實施方式中，先天性免疫系統刺激因子選自富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體。

【0018】在一些實施方式中，開讀框編碼多聯體VZV免疫原。在一些實施方式中，開讀框包含直接彼此連接或被連接子隔開的2-100個VZV免疫原。在其他實施方式中，免疫原係由多個肽表位構成的多聯體肽免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2-10種VZV免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100種VZV免疫原。在一些實施方式中，VZV免疫原被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點、或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。在一些實施方式中，蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。

【0019】在另一方面，本揭露提供了免疫原性組成物，其包括本文所述之任何環狀多核糖核苷酸和藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，組成物進一步包括第二環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括編碼第二多肽免疫原的開讀框。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括編碼多肽佐劑的開讀框。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

【0020】在另一方面，本揭露提供了在受試者中誘導針對VZV的免疫響應之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0021】在另一方面，本揭露提供了在受試者中預防VZV感染之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0022】在另一方面，本揭露提供了治療患有或疑似患有VZV感染的受試者之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0023】在一些實施方式中，受試者先前已被診斷患有VZV感染或與VZV感染相關的障礙。在一些實施方式中，VZV感染無症狀，或VZV感染處於潛伏期。在一些實施方式中，受試者已被診斷患有帶狀皰疹。在一些實施方式中，投與環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物降低了與帶狀皰疹相關的症狀的頻率或嚴重程度。在一些實施方式中，受試者係人類受試者。

【0024】在一些實施方式中，方法進一步包括向該受試者投與佐劑。在一些實施方式中，該方法進一步包括向該受試者投與VZV多肽免疫原。

定義

【0025】本揭露將針對特定實施方式並參考某些附圖進行描述，但是本揭露不限於此，而是僅由申請專利範圍來限定。除非另有說明，否則下文陳述的術語通常應以其共識來理解。

【0026】如本文所用，術語「適應性免疫響應」係指體液或細胞介導的免疫響應。為了本揭露之目的，「體液免疫響應」係指由抗體分子介導的免疫響應，而「細胞免疫響應」係由T淋巴球和/或其他白血球介導的免疫響應。

【0027】如本文所用，術語「佐劑」係指增加免疫響應，例如增加針對免疫原的特異性免疫響應的組成物（例如，化合物、多肽、核酸或脂質）。增加免疫響應包括強化或擴大抗體和細胞免疫響應中的任一者或兩者的特異性。

【0028】如本文所用，術語「載劑」意指利於將組成物（例如，多核糖核苷酸）運輸或遞送到受試者、組織或細胞中的化合物、組成物、試劑或分子。載劑之非限制性實例包括碳水化合物載劑（例如，酸酐改性的植物糖原或糖原型材料）、奈米顆粒（例如，封裝或共價連接結合至環狀多核糖核苷酸的奈米顆粒）、

脂質體、融合體、離體分化的網織紅血球、胞泌體、蛋白質載劑（例如，共價連接至多核糖核苷酸的蛋白質）或陽離子載劑（例如，陽離子脂質聚合物或轉染試劑）。

【0029】 如本文所用，術語「circRNA」、「環狀多核糖核苷酸」、「環狀RNA」和「環狀多核糖核苷酸分子」可互換使用，並意指具有沒有游離末端（即，沒有游離3’和/或5’末端）的結構的多核糖核苷酸分子，例如通過共價鍵（例如，共價閉合的）或非共價鍵形成環狀或環形結構的多核糖核苷酸分子。環狀多核糖核苷酸可為共價閉合的多核糖核苷酸。

【0030】 如本文所用，術語「環化效率」係所得環狀多核糖核苷酸相對於其非環狀起始材料的測量。

【0031】 術語「稀釋劑」意指包括本文所述之組成物（例如，包括環狀多核糖核苷酸的組成物）可以稀釋或溶解於其中的非活性溶劑的媒介物。稀釋劑可為RNA增溶劑、緩衝劑、等滲劑或其混合物。稀釋劑可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。液體稀釋劑之非限制性實例包括水或其他溶劑、增溶劑和乳化劑（諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油類（尤其是棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和脫水山梨糖醇的脂肪酸酯以及1,3-丁二醇。固體稀釋劑之非限制性實例包括碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉或糖粉。

【0032】 如本文所用，術語「疾病」、「病症」和「病狀」各自指亞健康狀態，例如，典型地被或將會被醫療專業人員診斷或治療的狀態。

【0033】 如本文所用，術語「表位」係指被抗體或T細胞受體識別、靶向或結合的免疫原的一部分或全部。表位可為線性表位，例如核酸或胺基酸的連續序

列。表位可為構象表位，例如，含有在蛋白質的折疊構象中形成表位的胺基酸的表位。構象表位可以含有來自一級胺基酸序列的非連續胺基酸。再如，構象表位包括基於其二級結構或三級結構在免疫原性序列的折疊構象中形成表位的核酸。

【0034】 如本文所用，術語「表現序列」係編碼產物（例如，肽或多肽（例如，免疫原））的核酸序列或調控核酸。編碼肽或多肽的示例性表現序列可以包括多個核苷酸三聯體，其中每一個都可以編碼胺基酸，並被稱為「密碼子」。

【0035】 如本文所用，關於多肽或核酸序列（例如，多肽免疫原或編碼多肽免疫原的核酸序列）的術語「片段」係指多肽或核酸序列的連續的、少於全部的部分。例如，多肽免疫原或編碼多肽免疫原的核酸序列的片段，係指序列（如本文揭露的序列）的連續的、少於全部的部分（例如，整個長度的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%）。應理解，本揭露之所有內容考慮了本文揭露的所有免疫原的片段（例如，免疫原性片段）。

【0036】 如本文所用，術語「GC含量」係指核酸序列中鳥嘌呤（G）和胞嘧啶（C）的百分比。用於計算GC含量的公式為 (G+C) / (A+G+C+U) × 100%（對於RNA）或 (G+C) / (A+G+C+T) × 100%（對於DNA）。同樣地，術語「尿苷含量」係指核酸序列中尿苷（U）的百分比。用於計算尿苷含量的公式為U / (A+G+C+U) × 100%。同樣地，術語「胸苷含量」係指核酸序列中胸苷（T）的百分比。用於計算胸苷含量的公式為T / (A+G+C+T) × 100%。

【0037】 如本文所用，術語「先天性免疫系統刺激因子」係指部分地藉由誘導參與先天性免疫的一或多個基因的表現來誘導先天性免疫響應的物質，該等基因包括但不限於I型干擾素（例如，IFNα、INFβ和/或IFNγ）、促炎性細胞介素（例如，IL-1、IL-12、IL-18、TNF-α和/或GM-CSF）、視黃酸誘導型基因-I（RIG-I，也稱為DDX58）、黑色素瘤分化相關基因5（MDA5，也稱為IFIH1）、2'-5'寡

腺苷酸合酶1（OAS 1）、OAS樣蛋白（OASL）和/或蛋白激酶R（PKR）。先天性免疫系統刺激因子可充當佐劑，例如當與編碼免疫原的核糖核苷酸組合投與或一起配製時。先天性免疫系統刺激因子可為單獨的分子實體（例如，不是由多核糖核苷酸編碼或作為序列併入多核糖核苷酸中的），例如STING（例如，caSTING）、TLR3、TLR4、TLR9、TLR7、TLR8、TLR7、RIG-I/DDX58和MDA-5/IFIH1或其組成型活性突變體。先天性免疫系統刺激因子可由多核糖核苷酸編碼（例如，由多核糖核苷酸表現）。多核糖核苷酸可以替代性地或進一步包括充當先天性免疫系統刺激因子的核糖核苷酸序列（例如，富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體）。

【0038】 如本文所用，術語「雜質」係存在於組成物中，例如如本文所述之藥物組成物中的不需要的物質。在一些實施方式中，雜質係與製程有關的雜質。在一些實施方式中，雜質係最終組成物中除期望產物之外，例如除如本文所述之活性藥物成分（例如，環狀多核糖核苷酸）之外的產物相關物質。如本文所用，術語「與製程有關的雜質」係在最終的組成物、製劑或產物中，除本文所述之線性多核糖核苷酸以外，在組成物、製劑或產物的製造中使用、存在或生成的不需要的物質。在一些實施方式中，與製程有關的雜質係在多核糖核苷酸的合成或環化中使用的酶。如本文所用，術語「與產物有關的物質」係在組成物、製劑或產物或其任何中間體的合成過程中產生的物質或副產物。在一些實施方式中，與產物有關的物質係去氧核糖核苷酸片段。在一些實施方式中，與產物有關的物質係去氧核糖核苷酸單體。在一些實施方式中，與產物有關的物質係以下的一或多種：本文所述之多核糖核苷酸的衍生物或片段，例如10、9、8、7、6、5或4個核糖核酸、單核糖核酸、二核糖核酸或三核糖核酸的片段。

【0039】 如本文所用，術語「免疫原」係指包括被抗體或T細胞受體識別、靶向或結合的一或多種表位的任何分子或分子結構。特別地，免疫原在受試者中

誘導免疫響應（例如，如本文所定義的那樣具有免疫原性）。免疫原能夠在受試者中誘導免疫響應，其中該免疫響應係指當免疫原遇到免疫系統時誘導的一系列分子、細胞和生物事件。免疫響應可為體液和/或細胞免疫響應。該等可以包括抗體的產生以及B細胞和T細胞的擴增。為了確定是否已經發生免疫響應並跟蹤其進程，可以監測免疫受試者針對特定免疫原的免疫響應物的出現。對大多數免疫原的免疫響應誘導特異性抗體和特異性效應T細胞兩者的產生。在一些實施方式中，免疫原係宿主外源的。在一些實施方式中，免疫原不是宿主外源的。免疫原可以包括多肽、多糖、多核苷酸或脂質的全部或一部分。免疫原也可為混合的多肽、多糖、多核苷酸和/或脂質。例如，免疫原可為經翻譯修飾的多肽。「多肽免疫原」係指包括多肽的免疫原。多肽免疫原還可以包括一或多個翻譯後修飾，和/或可以與一或多個其他分子形成複合物，和/或可以呈三級或四級結構，每種結構可以決定或影響多肽的免疫原性。

【0040】 如本文所用，術語「免疫原性」係指在特定的免疫響應測定中誘導超過預定閾值的對物質的響應的潛力。該測定可為，例如，某些炎性標誌物的表現、抗體的產生或如本文所述之免疫原性的測定。在一些實施方式中，當生物體或某種類型的免疫細胞的免疫系統暴露於免疫原時，可以誘導免疫響應。

【0041】 可以使用總抗體測定法、確認試驗、抗體的滴定和同種型分析以及中和抗體評估來評價受試者血漿或血清中的抗體，從而評估免疫原性響應。總抗體測定法測量在已經投與了免疫原的受試者的血清或血漿中作為免疫響應的一部分而生成的所有抗體。檢測抗體最常用的試驗係ELISA（酶聯免疫吸附測定），檢測受試血清中與目標抗體結合的抗體，包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。可藉由確認測定法進一步評估免疫原性響應。在總抗體評估之後，可以使用確認測定法來確認總抗體測定法的結果。競爭測定法可用於確認抗體與靶標特異性結合，並且篩選測定法中的陽性發現不是試驗血清或檢測試劑與該測定法中其

他物質發生非特異性相互作用的結果。

【0042】 可藉由同種型分析和滴定來評估免疫原性響應。同種型測定可用於僅評估相關抗體的同種型。例如，預期的同種型可為IgM和IgG，它們可以藉由同種型分析和滴定進行特異性檢測和定量，然後與存在的總抗體進行比較。

【0043】 可以藉由中和抗體測定法（nAb）來評估免疫原性響應。中和抗體測定法（nAb）可用於確定響應於免疫原而產生的抗體是否中和免疫原，從而抑制免疫原對靶標產生作用並導致異常的藥物動力學行為。nAb測定法通常是基於細胞的測定法，其中靶細胞與抗體一起孵育。可以使用多種基於細胞的nAb測定法，包括但不限於細胞增殖、活力、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC）、，補體依賴性細胞毒性（CDC）、細胞病變效應抑制（CPE）、凋亡、配體刺激的細胞傳訊、酶活性、報告基因測定、蛋白質分泌、代謝活性、應激和粒線體功能。檢測讀數包括吸光度、螢光、發光、化學發光或流動式細胞測量術讀數。配體結合測定法還可用於體外測量免疫原和抗體的結合親和力，以評價中和功效。

【0044】 此外，可以藉由使用從受試者獲得的T細胞上的細胞標誌物測量受試者中的T細胞活化來評估細胞免疫響應的誘導。可以從受試者收集血液樣本、淋巴結活檢樣本或組織樣本，並評價來自樣本的T細胞中的以下一或多種（例如，2、3、4或更多種）活化標誌物：CD25、CD71、CD26、CD27、CD28、CD30、CD154、CD40L、CD134、CD69、CD62L或CD44。也可以在體內動物模型中使用相同的方法評估T細胞活化。也可以藉由向體外T細胞（例如，從受試者、動物模型、儲庫或商業來源獲得的T細胞）添加免疫原並測量上述標誌物來進行此測定以評估T細胞活化。可以使用類似方法評估對其他免疫細胞（如嗜酸性球（標誌物：CD35、CD11b、CD66、CD69和CD81））、樹突細胞（標誌物：IL-8、MHC II類、CD40、CD80、CD83和CD86）、嗜鹼性球（CD63、CD13、CD4和CD203c）和嗜中性球（CD11b、CD35、CD66b和CD63）的活化的影響。可以使用流動式

細胞測量術、免疫組織化學、原位雜交和其他允許測量細胞標誌物的測定法來評估該等標誌物。免疫原投與前後的比較結果可用於確定其影響。

【0045】 如本文所用，術語「誘導免疫響應」係指引發、放大或維持受試者的免疫響應。誘導免疫響應可以指適應性免疫響應或先天性免疫響應。免疫響應的誘導可以如上所討論的那樣進行測量。

【0046】 如本文所用，術語「線性對應物」係具有與環狀多核糖核苷酸相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，線性對應物（例如，環化前形式）係與環狀多核糖核苷酸具有相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）且具有相同或相似的核酸修飾，並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，線性對應物係與環狀多核糖核苷酸具有相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）且具有不同的核酸修飾或不具有核酸修飾，並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，作為線性對應物的多核糖核苷酸分子的片段係線性對應物多核糖核苷酸分子的比該線性對應物多核糖核苷酸分子短的任何部分。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括5’帽。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括聚腺苷尾。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括3’ UTR。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括5’ UTR。

【0047】 如本文所用，術語「線性RNA」、「線性多核糖核苷酸」和「線性多核糖核苷酸分子」可互換使用並且意指具有5'末端和3’末端的多核糖核苷酸

分子。5'末端和3’末端中的一個或兩個可為游離末端或者可以與另一部分連接。線性RNA包括尚未經歷環化（例如，環化前）的RNA，並且可以用作起始材料通過例如夾板連接或化學、酶促、核酶或剪接催化的環化方法進行環化。

【0048】 如本文所用，術語「經修飾的核糖核苷酸」意指具有至少一個針對糖、核鹼基或核苷間鍵的修飾的核苷酸。

【0049】 如本文所用，術語「裸遞送」意指在不借助載劑並且不對有助於遞送到細胞的部分進行共價修飾的情況下將配製物遞送至細胞。裸遞送配製物不含任何轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。例如，環狀多核糖核苷酸的裸遞送配製物係包括沒有共價修飾的環狀多核糖核苷酸並且不含載劑的配製物。

【0050】 如本文所用，術語「帶切口的RNA」和「帶切口的線性多核糖核苷酸」和「帶切口的線性多核糖核苷酸分子」可以互換使用並且意指由於環狀RNA切口或降解而產生的具有5'末端和3’末端的多核糖核苷酸分子。

【0051】 如本文所用，術語「非環狀RNA」意指總的帶切口的RNA和線性RNA。

【0052】 術語「藥物組成物」旨在還揭露包括在藥物組成物中的環狀多核糖核苷酸可用於藉由療法治療人體或動物體。因此，這意味著等同於「用於在療法中使用的環狀多核糖核苷酸」。

【0053】 如本文所用，術語「多核苷酸」意指包括一或多個核酸亞基或核苷酸的分子，並且可以與「核酸」或「寡核苷酸」互換使用。多核苷酸可以包括一或多個選自腺苷（A）、胞嘧啶（C）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）或其變體的核苷酸。核苷酸可以包括核苷和至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸（PO_3）基團。核苷酸可以包括核鹼基、五碳糖（核糖或去氧核糖）以及一或多個磷酸基團。核糖核苷酸係其中糖為核糖的核苷酸。多核

糖核苷酸或核糖核酸或RNA可以指包括經由磷酸二酯鍵聚合的多個核糖核苷酸的大分子。去氧核糖核苷酸係其中糖係去氧核糖的核苷酸。

【0054】「多去氧核糖核苷酸」、「去氧核糖核酸」和「DNA」意指包括經由磷酸二酯鍵聚合的多個去氧核糖核苷酸的大分子。核苷酸可為核苷一磷酸或核苷多磷酸。核苷酸意指包括可檢測標籤（如發光標籤）或標誌物（例如，螢光團）的去氧核糖核苷多磷酸，如例如去氧核糖核苷三磷酸（dNTP），其可以選自去氧腺苷三磷酸（dATP）、去氧胞苷三磷酸（dCTP）、去氧鳥苷三磷酸（dGTP）、尿苷三磷酸（dUTP）和去氧胸苷三磷酸（dTTP）dNTP。核苷酸可以包括可以摻入正在生長的核酸股中的任何亞基。此類亞基可為A、C、G、T或U，或對一或多個互補A、C、G、T或U有特異性或與嘌呤（即，A或G或其變體）或嘧啶（即C、T或U或其變體）互補的任何其他亞基。在一些實例中，多核苷酸係去氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）或其衍生物或變體。在一些情況下，僅舉數例，多核苷酸係短干擾RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）、質體DNA（pDNA）、短髮夾RNA（shRNA）、小核RNA（snRNA）、信使RNA（mRNA）、先質mRNA（pre-mRNA）、反義RNA（asRNA），並且涵蓋核苷酸序列及其任何結構實施方式，如單股、雙股、三股、螺旋、髮夾等。在一些情況下，多核苷酸分子係環狀的。多核苷酸可以具有各種長度。核酸分子可以具有至少約10個鹼基、20個鹼基、30個鹼基、40個鹼基、50個鹼基、100個鹼基、200個鹼基、300個鹼基、400個鹼基、500個鹼基、1千鹼基（kb）、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、10 kb、50 kb或更大的長度。可以從細胞或組織中分離多核苷酸。如本文所體現的，多核苷酸序列可以包括分離和純化的DNA/RNA分子、合成的DNA/RNA分子和合成的DNA/RNA類似物。

【0055】多核苷酸，例如多核糖核苷酸或多去氧核糖核苷酸，可以包括一或多種核苷酸變體，包括非標準核苷酸、非天然核苷酸、核苷酸類似物和/或經

修飾的核苷酸。經修飾的核苷酸之實例包括但不限於二胺基嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黃嘌呤、黃嘌呤、4-乙醯胞嘧啶、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、β-D-半乳糖基辨苷（galactosylqueosine）、肌苷、N6-異戊烯腺嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、5-甲基胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基辮苷（mannosylqueosine）、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-D46-異戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、懷丁苷（wybutoxosine）、假尿嘧啶、辮苷（queosine）、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-胺基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w、2,6-二胺基嘌呤等。在一些情況下，核苷酸在其磷酸酯部分中可以包括修飾，包括對三磷酸酯部分的修飾。這樣的修飾之非限制性實例包括長度更長的磷酸酯鏈（例如，具有4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸酯部分的磷酸酯鏈）和帶有硫醇部分（例如，α-硫代三磷酸酯和β-硫代三磷酸酯）的修飾。核酸分子還可在鹼基部分處（例如，在典型地可用於與互補核苷酸形成氫鍵的一或多個原子處和/或在典型地不能與互補核苷酸形成氫鍵的一或多個原子處）、糖部分或磷酸骨架處被修飾。核酸分子還可含有胺修飾的基團，如胺基烯丙基1-dUTP（aa-dUTP）和胺基己基丙烯醯胺-dCTP（aha-dCTP），以允許胺反應性部分（如N-羥基琥珀醯亞胺酯（NHS））的共價附接。本揭露之寡核苷酸中標準DNA鹼基對或RNA鹼基對的替代物可以提供更高的密度（以位元/立方毫米計）、更高的安全性（抗天然毒素的偶然或有目的合成）、更容易辨別光程式性聚合酶（photo-programmed polymerases）或較低的二級結構。在Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE,

Marx A. Nat. Chem. Biol. [自然化學生物學] 2012年7月;8(7):612-4中描述了與用於從頭和/或擴增合成的天然和突變體聚合酶相容的這樣的替代性鹼基對，該文獻出於所有目的藉由援引併入本文。

【0056】 如本文所用，「多肽」意指最常藉由肽鍵連接在一起的胺基酸殘基（天然或非天然的）的聚合物。如本文所用，該術語係指任何大小、結構或功能的蛋白質、多肽和肽。多肽可以包括基因產物、天然存在的多肽、合成多肽、同系物、直系同源物、旁系同源物、前述物質的片段和其他等同物、變體和類似物。多肽可為單分子或者可為多分子複合物，諸如二聚體、三聚體或四聚體。它們還可以包括單鏈或多鏈多肽（如抗體或胰島素），並且可為締合的或連接的。最常見的二硫鍵存在於多鏈多肽中。術語多肽也可以適用於胺基酸聚合物，其中一或多個胺基酸殘基係相應的天然存在的胺基酸的人工化學類似物。

【0057】 如本文所用，術語「預防」意指降低發展疾病、障礙或病症的可能性，或者可替代地，意指降低隨後發展的疾病或障礙中症狀的嚴重程度或頻率。可以將治療劑投與於相對於一般群體而言發展疾病或障礙的風險增加的受試者，以便預防疾病或病症的發展或減輕疾病或病症的嚴重程度。可以例如在疾病或障礙的任何症狀或表現發展之前將治療劑作為預防劑投與。

【0058】 如本文中可互換使用的，術語「聚A」和「聚A序列」係指至少5個核苷酸長並由腺苷殘基組成的核酸分子的非翻譯連續區域。在一些實施方式中，聚A序列的長度為至少10個、至少15個、至少20個、至少30個、至少40個或至少50個核苷酸。在一些實施方式中，聚A序列位於開讀框（例如，編碼多肽的開讀框）的3’（例如，下游），並且該聚A序列位於終止元件（例如，終止密碼子）的3’，使得該聚A不被翻譯。在一些實施方式中，聚A序列位於終止元件的3’並且係3’非翻譯區。

【0059】 如本文所用，術語「調控元件」係修飾環狀多核糖核苷酸內表現

序列的表現的部分，諸如核酸序列。

【0060】 如本文所用，術語「複製元件」係可用於複製或者起始環狀多核糖核苷酸轉錄的序列和/或模體。

【0061】 如本文所用，術語「全身遞送」和「全身投與」意指將藥物組成物或其他物質投與到循環系統（例如血液或淋巴系統）中的途徑。全身投與可以包括口服投與、腸胃外投與、鼻內投與、舌下投與、直腸投與、透皮投與或其任何組合。如本文所用，術語「非全身遞送」或「非全身投與」可以指除藥物組成物或其他物質的全身遞送以外的任何其他投與途徑，例如，所遞送的物質不進入受試者身體的循環系統（例如，血液和淋巴系統）。

【0062】 如本文所用，術語「序列同一性」係藉由使用全域或局部比對演算法對兩個肽或兩個核苷酸序列進行比對來確定的。當序列（例如，藉由程式GAP或BESTFIT使用預設參數進行最佳比對時）至少具有某個最小百分比的序列同一性時，則可以將它們稱為「基本上相同」或「基本相似」。GAP使用Needleman和Wunsch全域比對演算法在兩個序列的整個長度上對其進行比對，從而最大程度地增加了匹配數目並最大程度地減少了空位數目。通常，使用GAP默認參數，空位產生罰分 = 50（核苷酸）/8（蛋白質），空位延伸罰分 = 3（核苷酸）/2（蛋白質）。對於核苷酸，使用的默認評分矩陣係nwsgapdna.cmp評分矩陣，而對於蛋白質，默認評分矩陣係Blosum62（Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS [美國國家科學院院刊] 89, 915-919）。序列比對和百分比序列同一性的評分可以使用電腦程式來確定，諸如可從美國92121-3752加州聖地牙哥斯克蘭頓路9685號的阿賽樂德公司（Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA）獲得的GCG Wisconsin套裝軟體10.3版或EmbossWin 2.10.0版（使用程式「needle」）確定。可替代地或另外，可以藉由使用如FASTA、BLAST等的演算法對數據庫進行搜索來確定同一性百分比。序列同一性係指在序列的整個長度上的序列同一性。

【0063】「訊息序列」係指長度例如介於10至45個胺基酸之間的多肽序列，其存在於新生蛋白的多肽序列的N端，將多肽序列靶向分泌途徑。

【0064】如本文所用，術語「治療（treat和treating）」係指對受試者的疾病或障礙（例如，傳染疾病、癌症、毒性或過敏反應）的治療性治療。治療的效果可以包括與沒有治療性治療的情況下，該疾病或病症的狀態和/或狀況相比，逆轉、減輕、降低疾病的嚴重程度，治癒疾病，抑制疾病的進展，降低該疾病、或疾病或障礙的一或多種症狀或表現的復發的可能性，穩定（即不惡化）疾病或病症的狀態，和/或預防疾病或病症的傳播。

【0065】如本文所用，術語「終止元件」係終止環狀多核糖核苷酸中表現序列的翻譯的部分，諸如核酸序列。

【0066】如本文所用，術語「總核糖核苷酸分子」意指藉由核糖核苷酸分子的總質量所測量的任何核糖核苷酸分子的總量，包括線性多核糖核苷酸分子、環狀多核糖核苷酸分子、單體核糖核苷酸、其他多核糖核苷酸分子、其片段及其經修飾的變體。

【0067】如本文所用，術語「翻譯效率」係從核糖核苷酸轉錄物產生蛋白質或肽的速率或量。在一些實施方式中，翻譯效率可以表示為給定量的編碼蛋白質或肽的轉錄物產生的蛋白質或肽的量，例如在給定的時間段內，例如在給定的翻譯系統，例如體外翻譯系統（像兔網織紅血球裂解物）或體內翻譯系統（像真核細胞或原核細胞）中。

【0068】如本文所用，術語「翻譯起始序列」係在環狀多核糖核苷酸中起始表現序列的翻譯的核酸序列。

【圖式簡單說明】

【0069】 [**圖 1**]係包括兩個表現序列的示例性環狀 RNA 之示意圖，每個表現序列與 IRES 可操作地連接，並且其中至少一個表現序列係 VZV 免疫原。

【0070】 [**圖 2**]係包括兩個表現序列的示例性環狀 RNA 之示意圖，這兩個表現序列被切割結構域（例如，2A、弗林蛋白酶位點或弗林蛋白酶-2A）隔開，其中至少一個表現序列係 VZV 免疫原，並且全部表現序列與 IRES 可操作地連接。

【0071】 [**圖 3**]示出了包括編碼 VZV 免疫原的 ORF 和多核苷酸佐劑序列（例如，刺激先天性免疫系統的非編碼核苷酸序列）的環狀 RNA 之示意圖。

【0072】 [**圖 4**]示出了多個環狀 RNA 之示意圖，其中第一環狀 RNA 包括編碼 VZV 免疫原的 ORF，並且第二環狀 RNA 包括編碼第二免疫原或多肽佐劑的 ORF。

【0073】 [**圖 5**]係編碼免疫原（例如，VZV 免疫原）和一或多個多聚化結構域的示例性多核糖核苷酸構建體和示例性相應免疫原複合物之示意圖。

【0074】 [**圖 6**]示出了用編碼 VZV gE 的環狀 RNA 轉染 18 小時後的 HEK293T 細胞的分泌性 gE 的表現。

【0075】 [**圖7**]示出了HEK293T細胞的細胞表面上檢測到的gE表現，該等HEK293T細胞用四種不同環狀RNA中的一種轉染，每種環狀RNA具有不同的VZV跨膜gE核苷酸序列。

【0076】 [**圖 8**]示出了 HEK293T 細胞的細胞表面上檢測到的 gE 表現，該等 HEK293T 細胞用不同的編碼 VZV 跨膜 gE 的環狀 RNA 轉染，每種環狀 RNA 具有不同的 IRES 元件。

【0077】 [**圖 9**]示出了投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性 VZV gE 的環狀 RNA 或 PBS 後 6 小時、2 天或 5 天的小鼠血液中測量的 gE 濃度。

【0078】 [**圖10**]示出了從投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV

gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後14天、35天或42天的小鼠收集的血液樣本中測量的抗gE血清抗體水平。

【0079】 [**圖11**]示出了在投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後42天，用VZV gE庫（分泌性和跨膜gE）刺激的脾細胞中獲得了gE特異性T細胞。

【0080】 [**圖12A**和**圖12B**]示出了在投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後42天，CD8和IFN-γ陽性（圖12A）或CD4和IFNγ陽性（圖12B）的細胞百分比。

【實施方式】

【0081】 本揭露提供了涉及編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。本揭露還提供了使用編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸之方法。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑在投與後可在受試者中誘導免疫響應。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑可用於治療或預防受試者的疾病、障礙或病症（例如，水痘或帶狀皰疹）。

VZV免疫原

【0082】 本文所述之環狀多核糖核苷酸包括編碼VZV免疫原的至少一個表現序列。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括多個表現序列，其中至少一個表現序列編碼VZV免疫原。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括兩或更多個（兩個、三個、四個、五個、六個或更多個）表現序列，其中每個表現序列編碼VZV免疫原。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括編碼VZV免疫原的第一表現序列和編碼佐劑的第二表現序列。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括編碼VZV免

疫原的表現序列和刺激先天性免疫系統的非編碼序列。

【0083】在一些實施方式中，免疫原係VZV糖蛋白。例如，VZV糖蛋白可為VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、或gM或其免疫原性片段或表位。在一些實施方式中，免疫原係VZV gE多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gl多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gB多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gH多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gK多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gL多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gC多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gN多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gM多肽。

【0084】在一些實施方式中，VZV糖蛋白係gE多肽或變體gE多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽係缺少羧基末端尾結構域的截短多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與ER保留相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽在ER和/或高基氏體中的保留減少。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與將gE靶向至高基氏體或反面高基氏網（TGN）相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽對高基氏體或TGN的靶向或定位降低。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與VZV gE的內化或gE的胞吞相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽的胞吞降低。

【0085】在一些實施方式中，VZV gE多肽在一或多個磷酸化酸性模體中具有至少一個突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y582G突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y569A突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y582G突變和Y569A突變。

【0086】在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-524的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-546的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-561的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括視需要具有Y569A突變的胺基酸1-573。在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括視需要具有Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變的胺基酸1-623。

【0087】在一些實施方式中，VZV免疫原係選自表1的序列的gE多肽或其變體。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表1中序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表1中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原包括與表1的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係表1中序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

[表1]. 示例性VZV gE免疫原

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
29	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
30	糖蛋白E， 623個胺基酸	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
31	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
32	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYGAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
33	糖蛋白E， 546個胺基酸	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLA
65	糖蛋白E， 524個胺基酸	MGVTAPRTLILLLSGALALTETWAGSRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVY EPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYN QGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGD

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		VFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGD AAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVN TSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWK GDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFD LLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVAST VYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYF NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIR YAAWTGGLA
66	糖蛋白E， 524個胺基酸	MGRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRK AYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQED LGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEEN HPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDV DCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFH MWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTC LYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAI EERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
67	糖蛋白E， 573個胺基酸 Y569A突變	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
68	糖蛋白E， 623個胺基酸 Y569A突變	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQS MYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

【0088】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼包括訊息序列的VZV免疫原，例如包括選自表2的訊息序列的VZV免疫原。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表2中序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，

VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表2中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原包括與表2的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係表2中序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

[表2]. 包括訊息序列的示例性VZV gE免疫原

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
34	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： SecSP38（帶底線）	MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASV LRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPR NDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTL NGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIY GVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLA EISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIW NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSV GDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLS HMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT TLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQ PPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARV DK
35	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： SecD4（帶底線）	MWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDD FHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDG FLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDR HKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTE TWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQ GKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSD GTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCT FTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDT PESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKP KEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
36	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
37	糖蛋白E，	MASRLTLLTLLLLLLAGDRASSMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLR

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
	546個胺基酸 訊息序列： INHC1（帶底線）	YDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRND YDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNG DDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGV RYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEIS YRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNM RGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGD TFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHM NSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTL KFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPP ATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
38	糖蛋白E， 546個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
69	糖蛋白E， 539個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFH IDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFL ENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHK IVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
70	糖蛋白E， 524個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHA ESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGE RLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPK PQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICL KHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELE LDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPT PAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPI DPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHA DNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVA YTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL A

【0089】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括編碼VZV免疫原（視需要包括訊息序列）的表現序列。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原和視需要訊息序列的多核糖核苷酸序列係表3的序列。在一些實施方式中，編碼VZV免疫

原的多核糖核苷酸序列係包括表3中序列的至少300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1400或1500個核苷酸的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括表3中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列包括與表3的序列具有至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[表3]. 編碼VZV gE免疫原（視需要包括訊息序列）的示例性多核糖核苷酸序列

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
39	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUAGGUCUCACAUGUUCUACGAGGCCCUGAAGGCCGAGCUGGUGUACACC CGGGCUGUGCACGGCUUCCGGCCCCGGGCCAACUGCGUGGUCCUGAGCG ACUACAUCCCCCGGGUGGCCUGCAACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUG GUGGGCGUGCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCA CCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCG ACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGC CUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCU UCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGG CAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGG CGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGAC GUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCG AGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCC UGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAG CACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUUGUGGACGUGGACUGCGCCGAGA ACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAG AAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGA CGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUG CUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGG GCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGG GCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGC GACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCC CUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGC CAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAAC UACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCU GAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGA GCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUCUACUUCAACGGCCACGUGGA GGCCGUGGCCUACACCGUGGUGAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCC AUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCA CUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUUCUGCUGUGCC UGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
40	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， SecSP38訊息序列	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCGGCUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGCUGCU GCUCCUGUGGCCCAUGGUGUGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUG GUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCA CCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCG ACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGC CUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCU UCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGG CAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGG CGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGAC GUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCG AGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCC UGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAG CACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGA ACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAG AAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGA CGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUG CUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGG GCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGG GCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGC GACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCC CUUCGACCUGUUGCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGC CAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAAC UACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCU GAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGA GCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGA GGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCC AUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCA CUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGCUC CGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCC UGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
41	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， SecD4訊息序列	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGCUGCUGCUCCUGUGGCC CAUGGUGUGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGUUGC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGCUCCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
42	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， gLuc訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCUCUGAUUUGUAUUGC CGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
43	糖蛋白E， 623個胺基酸	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCUACCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
44	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA
45	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA
46	糖蛋白E， 546個胺基酸，INHC1訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGCCAGCCGGCUGACCCUGCUCACCCUGCUGUUGCU GCUGCUCGCCGGCGACCGGGCCAGCUCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCC GUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGA UCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUC GACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCAGCUGGGUGAACCGGGGAGAGAGUUCUCGGAAG GCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGG CUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGG GGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCC AGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAAC GGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCG ACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUC GAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCA GCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGC CUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAA GCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAA GAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCG ACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGU GCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGG GGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGG GCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGG GGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGG CGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUUCGACCUGCUGUUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUG CCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCC AGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUG GCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAG AGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGG AGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGC CAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACC ACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAU CCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCUAAAUGAGACCAUA
47	糖蛋白E， 546個胺基酸 gLuc訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCUCUGAUUUGUAUUGC CGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
71	糖蛋白E， 539個胺基酸	AUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCCCUGAUCUGCAUCGCCGUGGCCGAGG CCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGG CAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
	訊息序列： gLuc	UGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGC GUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAA CCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCU GGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCAC GGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCC
72	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGGACAGUUAAUAAACCUGUGGUGGGGGUAUUGAUGGGGUUCGGAA UUAUCACGGGAACGUUGCGUAUAACGAAUCCGGUCAGAGCAUCCGUCUUG CGAUACGAUGAUUUUCACAUCGAUGAAGACAAACUGGAUACAAACUCCGUA UAUGAGCCUUACUACCAUUCAGAUCAUGCGGAGUCUUCAUGGGUAAAUCG GGGAGAGUCUUCGCGAAAAGCGUACGAUCAUAACUCACCUUAUAUAUGGC CACGUAAUGAUUAUGAUGGAUUUUUAGAGAACGCACACGAACACCAUGGG GUGUAUAAUCAGGGCCGUGGUAUCGAUAGCGGGGAACGGUUAAUGCAACC CACACAAAUGUCUGCACAGGAGGAUCUUGGGGACGAUACGGGCAUCCACG UUAUCCCUACGUUAAACGGCGAUGACAGACAUAAAAUUGUAAAUGUGGAC CAACGUCAAUACGGUGACGUGUUUAAAGGAGAUCUUAAUCCAAAACCCCAA GGCCAAAGACUCAUUGAGGUGUCAGUGGAAGAAAAUCACCCGUUUACUUU ACGCGCACCGAUUCAGCGGAUUUAUGGAGUCCGGUACACCGAGACUUGGA GCUUUUUGCCGUCAUUAACCUGUACGGGAGACGCAGCGCCCGCCAUCCAG CAUAUAUGUUUAAAACAUACAACAUGCUUUCAAGACGUGGUGGUGGAUGU GGAUUGCGCGGAAAAUACUAAAGAGGAUCAGUUGGCCGAAAUCAGUUACC GUUUUCAAGGUAAGAAGGAAGCGGACCAACCGUGGAUUGUUGUAAACACG AGCACACUGUUUGAUGAACUCGAAUUAGACCCCCCCGAGAUUGAACCGGG UGUCUUGAAAGUACUUCGGACAGAAAAACAAUACUUGGGUGUGUACAUUU GGAACAUGCGCGGCUCCGAUGGUACGUCUACCUACGCCACGUUUUUGGU

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CACCUGGAAAGGGGAUGAAAAAACAAGAAACCCUACGCCCGCAGUAACUC CUCAACCAAGAGGGGCUGAGUUUCAUAUGUGGAAUUACCACUCGCAUGUA UUUUCAGUUGGUGAUACGUUUAGCUUGGCAAUGCAUCUUCAGUAUAAGAU ACAUGAAGCGCCAUUUGAUUUGCUGUUAGAGUGGUUGUAUGUCCCCAUCG AUCCUACAUGUCAACCAAUGCGGUUAUAUUCUACGUGUUUGUAUCAUCCC AACGCACCCCAAUGCCUCUCUCAUAUGAAUUCCGGUUGUACAUUUACCUC GCCACAUUUAGCCCAGCGUGUUGCAAGCACAGUGUAUCAAAAUUGUGAAC AUGCAGAUAACUACACCGCAUAUUGUCUGGGAAUAUCUCAUAUGGAGCCU AGCUUUGGUCUAAUCUUACACGACGGGGGCACCACGUUAAAGUUUGUAGA UACACCCGAGAGUUUGUCGGGAUUAUACGUUUUUGUGGUGUAUUUUAACG GGCAUGUUGAAGCCGUAGCAUACACUGUUGUAUCCACAGUAGAUCAUUUU GUAAACGCAAUUGAGGAGCGUGGAUUUCCGCCAACGGCCGGUCAGCCACC GGCGACUACUAAACCCAAGGAAAUUACCCCCGUAAACCCCGGAACGUCAC CACUUCUACGAUAUGCCGCAUGGACCGGAGGGCUUGCAGCAGUAGUACUU UUAUGUCUCGUAAUAUUUUUAAUCUGUACGGCUAAACGAAUGAGGGUUAA AGCCGCCAGGGUAGACAAGUGA
73	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
74	糖蛋白E， 524個胺基酸，	AUGGGCGUGACCGCCCCCCGGACCCUGAUCCUGCUCCUGAGCGGCGCCC UGGCCCUGACCGAAACCUGGGCCGGCAGCCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCC
75	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
76	糖蛋白E， 524個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	AUGGGCGUGAAGGUGCUGUUCGCCCUGAUCUGCAUCGCCGUGGCCGAGG CCAAGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGA UUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCU ACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAG CAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACG ACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAAC CAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGA UGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCC CACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGC AGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAG CGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGG CCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUC CUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAU CUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGAC UGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUU CCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGU GCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGG AACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGAC CUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCC AGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUC AGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCA CGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGAC CCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAA CGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUC CCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCA CGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCA GCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGA CACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAAC GGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACU UCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCA GCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
77	糖蛋白E， 524個胺基酸	AUGGGCCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACG AUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCC UACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGA GCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAAC GACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAA CCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAG AUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCC CCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGG CAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA GCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGG GCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUU CCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACA UCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGU UCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGC ACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCG UGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUG GAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCC CAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUU CAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCC ACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGA CCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCA ACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGU CCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGC ACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCC AGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGG ACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAA CGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCAC UUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGC CCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACC AGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC
79	糖蛋白E， 524個胺基酸 Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
80	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		GAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAG AGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACG GCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCGG
81	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAAUCAGCGGCGGAGGAGGGA GUGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAU CAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUG CGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGU GUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACC GGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGG CGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAG CCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCA CGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCC CAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCA CCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAAC CUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCC AUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCA GCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGU GAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCG AGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGU GUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCU UCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCC GUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAG CCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAG UACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGU GCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGU ACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACA UGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGCACCACCCUGAA GUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUG UACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCG UGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGC CGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACC CCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGC CGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAG CGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
82	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAAUCAGCGGCGGAGGAGGGA GUGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAU CAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUG CGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGU GUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACC GGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGG CGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAG CCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCA CGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCC CAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAAC CUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCC AUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCA GCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGU GAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCG AGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGU GUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCU UCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCC GUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAG CCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAG UACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGU GCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGU ACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACA UGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGCACCACCCUGAA GUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUG UACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCG UGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGC CGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACC CCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGC CGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAG CGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAGA GCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAG CACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGAAGCCACGGC GGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCGG
83	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG

【0090】在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係分泌性蛋白。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係非結構蛋白。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV立即早期蛋白係IE63多肽。VZV IE63多肽可具有以下的胺基酸序列：

MFCTSPATRGDSSESKPGASVDVNGKMEYGSAPGPLNGRDTSRGPGAFCTPGWEIHPARLVEDIN

RVFLCIAQSSGRVTRDSRRLRRICLDFYLMGRTRQRPTLACWEELLQLQPTQTQCLRATLMEVSHR

PPRGEDGFIEAPNVPLHRSALECDVSDDGGEDDSDDDGSTPSDVIEFRDSDAESSDGEDFIVEEESE

ESTDSCEPDGVPGDCYRDGDGCNTPSPKRPQRAIERYAGAETAEYTAAKALTALGEGGVDWKRRR

HEAPRRHDIPPPHGV（SEQ ID NO: 84）。

【0091】在一些實施方式中，VZV IE63多肽可以與SEQ ID NO: 84中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性。VZV IE63多肽可包括訊息序列。在一些實施方式中，VZV IE63多肽可由以下核酸序列編碼：

ATGTTCTGCACCAGCCCCGCCACCCGGGGCGACAGCTCCGAGAGCAAGCCCGGCGCCAGCGT

GGACGTGAACGGCAAGATGGAGTACGGCAGCGCCCCCGGCCCCCTGAACGGCCGGGATACCA

GTCGGGGACCCGGAGCCTTCTGCACCCCCGGCTGGGAGATCCACCCCGCCCGGCTGGTGGAG

GACATCAACCGGGTGTTCCTGTGCATCGCCCAGAGCAGCGGCCGGGTGACCCGGGACAGCCG

GAGACTGCGGCGGATCTGCCTGGACTTCTACCTGATGGGCCGGACCCGGCAGCGGCCCACCC

TGGCCTGCTGGGAGGAACTGCTCCAGCTGCAGCCCACCCAGACCCAGTGCCTGCGGGCCACC

CTGATGGAGGTGAGCCACCGGCCCCCTCGGGGCGAGGACGGCTTCATCGAGGCCCCCAACGT

GCCCCTGCACCGGAGCGCCCTGGAGTGCGACGTGAGCGACGACGGCGGAGAGGACGACAGC

GACGACGACGGCAGCACCCCCAGCGACGTGATCGAGTTCCGGGACAGCGACGCCGAGAGCTC

TGACGGCGAGGACTTCATCGTCGAGGAAGAGAGCGAGGAGAGCACCGACAGCTGCGAGCCCG

ACGGCGTGCCCGGCGACTGCTACCGGGACGGCGACGGCTGCAACACCCCCAGCCCCAAGCG

GCCCCAGCGGGCCATCGAGCGGTACGCCGGCGCCGAAACAGCCGAGTACACCGCCGCTAAGG

CCCTGACCGCCCTGGGCGAGGGCGGCGTGGACTGGAAGCGGAGGCGGCACGAGGCCCCCCG

GCGGCACGACATTCCTCCTCCACACGGCGTG（SEQ ID NO: 85）。

【0092】在一些實施方式中，VZV IE63多肽可由與SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列編碼。

【0093】在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2000/043527中提供的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2006094756中提供的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2017070601中描述的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。

【0094】在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至少51%（例如，至少52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至多52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或59%、或60%。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為51%至60%、52%至60%、53%至60%、54%至60%、55%至60%、52%至58%、53%至58%。

【0095】在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為大於10%（例如，大於11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為至多30%（例如，至多29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為20%至28%、21%至26%、10%至24%、15%至24%、20%至24%、21%至24%、22%至24%、23%至24%、10%至23%、15%至23%、20%至23%、21%至23%或22%至23%。

【0096】編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量係指只編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量，而沒有編碼除VZV免疫原之外的肽的其他編碼區。同樣地，編碼VZV免疫原的表現序列的尿苷含量或胸苷係指只編碼VZV免疫原的表現序列的尿苷含量，而沒有編碼除VZV免疫原之外的肽的其他編碼區。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量或尿苷（或者胸苷）含量的計算僅考慮了從編碼VZV免疫原的開讀框起始密碼子的第一個核苷至同一開讀框終止密碼子的最後一個核苷的5’至3’方向開始的連續核酸序列。在其他實施方式中，編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量或尿苷（或者胸苷）含量的計算僅考慮了從編碼VZV免疫原的N末端胺基酸殘基的密碼子的第一個核苷至編碼VZV免疫原的C末端胺基酸殘基的密碼子的最後一個核苷的5’至3’方向開始的連續核酸序列。

【0097】本揭露之環狀多核糖核苷酸可以編碼一或多種免疫原，其中至少一種免疫原係VZV免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼第一VZV免疫原和第二VZV免疫原（例如，選自本文所述之VZV免疫原的每種VZV免疫原）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼第一VZV免疫原和第二免疫原

（例如，選自另一種病毒的第二免疫原）。

【0098】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼1至100、1至50、1至20、1至10、1至5、2至100、2至50、2至20、2至10、2至5種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼2或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼3或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼4或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼5或更多種免疫原。

【0099】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼兩或更多種VZV免疫原，其中每種免疫原係VZV糖蛋白或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gI、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gI和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gI和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gI和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gI和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gI和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gI和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gI和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gI和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gI和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gI和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gN、或

其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gN、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gN、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gM、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gM、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gM、或其片段。

【0100】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼兩或更多種VZV免疫原，其中每種VZV免疫原係VZV gE或其變體或片段（例如，本文揭露的變體VZV gE或其變體或片段中的任一種）。

【0101】在一些實施方式中，多核糖核苷酸可編碼多種免疫原，其中每種免疫原源自皰疹病毒（CMV、EBV或VZV）。多核糖核苷酸可編碼來自以下每種皰疹病毒的免疫原：CMV、EBV或VZV。多核糖核苷酸可編碼多種免疫原，其中每種免疫原源自帶狀皰疹病毒（Singles）或西尼羅河病毒（West Nile Virus）。多核糖核苷酸可編碼來自帶狀皰疹病毒和西尼羅河病毒中的每一種的免疫原。

【0102】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多種免疫原，並且多種免疫原共用至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些實施方式中，多種免疫原也具有小於100%的序列同一性。這可能指示由於遺傳漂變而彼此相關的免疫原，因此，單個環狀多核糖核苷酸組成物或免疫原性組成物可能能夠誘導針對群體中以各種突變狀態存在的靶標的免疫響應，或者可能誘導針對具有相同免疫原的多個靶標的免疫響應，其中該免疫原與遺傳漂變相關。例如，免疫原可以藉由靶病毒（例如，VZV）的遺傳漂移而彼此相關。

【0103】VZV免疫原來自例如病毒，如病毒表面蛋白、病毒膜蛋白、病毒包膜蛋白、病毒衣殼蛋白、病毒核衣殼蛋白、病毒刺突蛋白、病毒進入蛋白、病毒膜融合蛋白、病毒結構蛋白、病毒非結構蛋白、病毒調控蛋白、病毒輔助蛋白、

分泌性病毒蛋白、病毒聚合酶蛋白、病毒DNA聚合酶、病毒RNA聚合酶、病毒蛋白酶、病毒糖蛋白、病毒融合蛋白、病毒螺旋衣殼蛋白、病毒二十面體衣殼蛋白、病毒基質蛋白、病毒複製酶、病毒轉錄因子或病毒酶。

【0104】 本揭露之VZV免疫原可以包括野生型序列。當描述免疫原時，術語「野生型」係指天然存在的且由基因組（例如，病毒基因組）編碼的序列（例如，核酸序列或胺基酸序列）。一個物種（例如，微生物物種）可以具有一個野生型序列，或者具有兩或更多個野生型序列（例如，在參考微生物基因組中存在一個規範的野生型序列，並且存在由突變產生的其他變體的野生型序列）。

【0105】 當描述VZV免疫原時，術語「衍生物」、「源自」或「變體」係指與野生型序列的不同之處在於一或多個核酸或胺基酸，例如相對於野生型序列含有一或多個核酸或胺基酸插入、缺失和/或取代的序列（例如，核酸序列或胺基酸序列）。

【0106】 VZV免疫原衍生物序列係與野生型序列（例如，野生型核酸、蛋白質、免疫原或表位序列）具有至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的序列。

【0107】 在一些實施方式中，VZV免疫原含有影響所編碼的蛋白質的結構的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。在一些實施方式中，免疫原含有影響所編碼的蛋白質的功能的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。在一些實施方式中，免疫原含有影響細胞對所編碼的蛋白質的表現或加工的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。

【0108】 在一些實施方式中，免疫原含有影響所編碼的免疫原性核酸的結構的一或多個核酸插入、缺失、取代或其組合。

【0109】 胺基酸的插入、缺失、取代或其組合可以引入翻譯後修飾的位點（例如，引入糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、

羥基化、硫酸化或脂質化位點，或靶向進行切割的序列）。在一些實施方式中，胺基酸的插入、缺失、取代或其組合去除翻譯後修飾的位點（例如，去除糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、羥基化、硫酸化或脂質化位點，或靶向進行切割的序列）。在一些實施方式中，胺基酸的插入、缺失、取代或其組合修飾翻譯後修飾的位點（例如，修飾位點以改變糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、羥基化、硫酸化或脂質化位點，或切割的效率或特徵）。

【0110】胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。保守性胺基酸取代可為一個胺基酸取代另一個相似生物化學性質（例如，電荷、大小和/或疏水性）的胺基酸。非保守性胺基酸取代可為一個胺基酸被具有不同生物化學特性（例如，電荷、大小和/或疏水性）的另一胺基酸取代。保守性胺基酸變化可為例如對多肽的二級或三級結構影響最小的取代。保守性胺基酸變化可為從一種親水性胺基酸到另一種親水性胺基酸的胺基酸變化。親水性胺基酸可以包括Thr（T）、Ser（S）、His（H）、Glu（E）、Asn（N）、Gln（Q）、Asp（D）、Lys（K）和Arg（R）。保守性胺基酸變化可為從一種疏水性胺基酸到另一種親水性胺基酸的胺基酸變化。疏水性胺基酸可以包括Ile（I）、Phe（F）、Val（V）、Leu（L）、Trp（W）、Met（M）、Ala（A）、Gly（G）、Tyr（Y）和Pro（P）。保守性胺基酸變化可為從一種酸性胺基酸到另一種酸性胺基酸的胺基酸變化。酸性胺基酸可以包括Glu（E）和Asp（D）。保守性胺基酸變化可為從一種鹼性胺基酸到另一種鹼性胺基酸的胺基酸變化。鹼性胺基酸可以包括His（H）、Arg（R）和Lys（K）。保守性胺基酸變化可為從一種極性胺基酸到另一種極性胺基酸的胺基酸變化。極性胺基酸可以包括Asn（N）、Gln（Q）、Ser（S）和Thr（T）。保守性胺基酸變化可為從一種非極性胺基酸到另一種非極性胺基酸的胺基酸變化。非極性胺基酸可以包括Leu（L）、Val（V）、Ile（I）、Met（M）、Gly（G）

和Ala（A）。保守性胺基酸變化可為從一種芳族胺基酸到另一種芳族胺基酸的胺基酸變化。芳族胺基酸可以包括Phe（F）、Tyr（Y）和Trp（W）。保守性胺基酸變化可為從一種脂族胺基酸到另一種脂族胺基酸的胺基酸變化。脂族胺基酸可以包括Ala（A）、Val（V）、Leu（L）和Ile（I）。在一些實施方式中，保守性胺基酸取代係以下各類之一的一個胺基酸到另一胺基酸的胺基酸變化：I類：Ala、Pro、Gly、Gln、Asn、Ser、Thr；II類：Cys、Ser、Tyr、Thr；III類：Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe；IV類：Lys、Arg、His；V類：Phe、Tyr、Trp、His；和VI類：Asp、Glu。

【0111】在一些實施方式中，本揭露之免疫原變體相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括至多1個、至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個、至多10個、至多11個、至多12個、至多13個、至多14個、至多15個、至多16個、至多17個、至多18個、至多19個、至多20個、至多25個、至多30個、至多35個、至多40個、至多45個或至多50個胺基酸取代。在一些實施方式中，本揭露之免疫原衍生物或表位衍生物相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-30、1-40、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、2-15、2-20、2-30、2-40、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-15、3-20、3-30、3-40、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、5-15、5-20、5-30、5-40、10-15、15-20或20-25個胺基酸取代。

【0112】在一些實施方式中，本揭露之免疫原變體相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括至多1個、至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個、至多10個、至多11個、至多12個、至多13個、至多14個、至多15個、至多16個、至多17個、至多18個、至多19個、至多20個、至多25個、至多30個、至多35個、至多40個、至多45個或至多50個胺基酸

缺失。在一些實施方式中，本揭露之免疫原衍生物或表位衍生物相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-30、1-40、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、2-15、2-20、2-30、2-40、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-15、3-20、3-30、3-40、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、5-15、5-20、5-30、5-40、10-15、15-20或20-25個胺基酸缺失。

【0113】該一或多個胺基酸取代或缺失可以位於N端、C端、胺基酸序列內、或其組合。該等胺基酸缺失可為連續的、非連續的或其組合。

【0114】在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括融合蛋白，該融合蛋白包括本文揭露的兩或更多種免疫原。在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括表位。在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括融合蛋白，該融合蛋白包括本文揭露的兩或更多個表位。

【0115】在一些實施方式中，VZV免疫原的長度小於約40,000個胺基酸、小於約35,000個胺基酸、小於約30,000個胺基酸、小於約25,000個胺基酸、小於約20,000個胺基酸、小於約15,000個胺基酸小於約10,000個胺基酸、小於約9,000個胺基酸、小於約8,000個胺基酸、小於約7,000個胺基酸、小於約6,000個胺基酸、小於約5,000個胺基酸、小於約4,000個胺基酸、小於約3,000個胺基酸、小於約2,500個胺基酸、小於約2,000個胺基酸、小於約1,500個胺基酸、小於約1,000個胺基酸、小於約900個胺基酸、小於約800個胺基酸、小於約700個胺基酸、小於約600個胺基酸、小於約500個胺基酸、小於約400個胺基酸、小於約300個胺基酸、小於約250個胺基酸、小於約200個胺基酸、小於約150個胺基酸、小於約140個胺基酸、小於約130個胺基酸、小於約120個胺基酸、小於約110個胺基酸、小於約100個胺基酸、小於約90個胺基酸、小於約80個胺基酸、小於約70個胺基酸、小

於約60個胺基酸、小於約50個胺基酸、小於約40個胺基酸、小於約30個胺基酸、小於約25個胺基酸、小於約20個胺基酸、小於約15個胺基酸、小於約10個胺基酸、小於約5個胺基酸，其之間或更短的任何胺基酸長度都可能是可用的。

【0116】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個VZV免疫原序列並被配置為用於在受試者體內細胞中持續表現。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸被配置為使得該一或多個表現序列在細胞中在較晚的時間點的表現等於或高於較早的時間點的表現。在此類實施方式中，該一或多個免疫原序列的表現可以維持在相對穩定的水平或可以隨時間增加。免疫原序列的表現可以在延長的時間段內相對穩定。免疫原序列的表現可以瞬時相對穩定或僅有限的時間，例如至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天相對穩定。

【0117】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸在受試者中例如瞬時或長期表現一或多種免疫原。在某些實施方式中，免疫原的表現持續至少約1小時至約30天，或至少約2小時、6小時、12小時、18小時、24小時、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或更長時間或介於之間的任何時間。在某些實施方式中，免疫原的表現持續不超過約30分鐘至約7天、或不超過約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、24小時、36小時、48小時、60小時、72小時、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或介於之間的任何時間。

【0118】免疫原表現包括翻譯本文提供的環狀多核糖核苷酸的至少一個

區域。例如，環狀多核糖核苷酸可以在受試者中翻譯以生成包括本揭露之一或多種免疫原的多肽，從而刺激受試者中適應性免疫響應（例如，抗體響應和/或T細胞響應）的產生。在一些實施方式中，本揭露之環狀多核糖核苷酸經翻譯以在人或動物受試者中產生一或多種免疫原，從而刺激人或動物受試者中適應性免疫響應（例如，抗體響應和/或T細胞響應）的產生。

【0119】 在一些實施方式中，用於免疫原表現之方法包括翻譯產物的修飾、折疊或其他翻譯後修飾。在一些實施方式中，用於免疫原表現之方法包括體內翻譯後修飾，例如經由細胞機制。

環狀多核糖核苷酸

【0120】 本文所述之環狀多核糖核苷酸可以包括本文所述之任何一或多種元件和編碼VZV免疫原的表現序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括如國際專利公開案號WO 2019/118919（特此藉由援引以其全文併入）中揭露的任何特徵或特徵的任何組合。

【0121】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為至少約20個核苷酸、至少約30個核苷酸、至少約40個核苷酸、至少約50個核苷酸、至少約75個核苷酸、至少約100個核苷酸、至少約200個核苷酸、至少約300個核苷酸、至少約400個核苷酸、至少約500個核苷酸、至少約1,000個核苷酸、至少約2,000個核苷酸、至少約5,000個核苷酸、至少約6,000個核苷酸、至少約7,000個核苷酸、至少約8,000個核苷酸、至少約9,000個核苷酸、至少約10,000個核苷酸、至少約12,000個核苷酸、至少約14,000個核苷酸、至少約15,000個核苷酸、至少約16,000個核苷酸、至少約17,000個核苷酸、至少約18,000個核苷酸、至少約19,000個核苷酸或至少約20,000個核苷酸。

【0122】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為500個核苷酸至20,000個核苷酸、1,000個核苷酸至20,000個核苷酸、2,000個核苷酸至20,000個核苷酸、或

5,000個核苷酸至20,000個核苷酸。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為500個核苷酸至10,000個核苷酸、1,000個核苷酸至10,000個核苷酸、2,000個核苷酸至10,000個核苷酸、或5,000個核苷酸至10,000個核苷酸。

內部核糖體進入位點

【0123】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸包括一或多個內部核糖體進入位點（IRES）元件。在一些實施方式中，IRES與一或多個表現序列（例如，每個IRES與一或多個表現序列可操作地連接，其中每個表現序列視需要編碼免疫原，如VZV免疫原）可操作地連接。在實施方式中，IRES位於異源啟動子與編碼序列（例如，編碼VZV免疫原的編碼序列）的5'末端之間。

【0124】包括在多核糖核苷酸中的合適的IRES元件包括能夠接合真核核糖體的RNA序列。在一些實施方式中，IRES元件係至少約5 nt、至少約8 nt、至少約9 nt、至少約10 nt、至少約15 nt、至少約20 nt、至少約25 nt、至少約30 nt、至少約40 nt、至少約50 nt、至少約100 nt、至少約200 nt、至少約250 nt、至少約350 nt或至少約500 nt。

【0125】在一些實施方式中，IRES元件源自生物體的DNA，該生物體包括但不限於病毒、哺乳動物和果蠅。這樣的病毒DNA可以源自但不限於小核糖核酸病毒互補DNA（cDNA）、腦心肌炎病毒（EMCV）cDNA和脊髓灰白質病毒cDNA。在一個實施方式中，衍生IRES元件的果蠅DNA包括但不限於來自黑腹果蠅（Drosophila melanogaster）的觸角足基因。

【0126】在一些實施方式中，如果存在，IRES序列係以下病毒的IRES序列：桃拉綜合症（Taura syndrome）病毒、錐鼻蟲屬（Triatoma）病毒、泰勒氏腦脊髓炎病毒（Theiler's encephalomyelitis virus）、猿猴病毒40、入侵紅火蟻（Solenopsis invicta）病毒1、稻麥蚜（Rhopalosiphum padi）病毒、網狀內皮組織增生病毒、福爾曼脊髓灰白質病毒（fuman poliovirus）1、普勞提婭失速腸病毒（Plautia stall

intestine virus）、喀什米爾蜜蜂病毒、人鼻病毒2、假桃病毒葉蟬病毒-1（Homalodisca coagulata virus-1）、人類免疫不全病毒1型、假桃病毒葉蟬病毒-1、Himetobi P病毒、C型肝炎病毒、A型肝炎病毒、GB型肝炎病毒、口蹄疫病毒、人類腸道病毒71、馬鼻炎病毒、茶尺蠖（Ectropis obliqua）、小核糖核酸樣病毒、腦心肌炎病毒（EMCV）、果蠅C病毒、十字花科菸草病毒、蟋蟀麻痺病毒、牛病毒性腹瀉病毒1、黑皇后細胞病毒、蚜蟲致死性麻痺病毒、禽腦脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痺病毒、木槿褪綠環斑病毒（Hibiscus chlorotic ringspot virus）、經典豬瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蠅觸角足、人AQP4、人AT1R、人BAG-1、人BCL2、人BiP、人c-IAP1、人c-myc、人eIF4G、小鼠NDST4L、人LEF1、小鼠HIF1α、人n.myc、小鼠Gtx、人p27kipl、人PDGF2/c-sis、人p53、人Pim-1、小鼠Rbm3、果蠅reaper、犬Scamper、果蠅Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、薩里病毒（Salivirus）、科薩病毒（Cosavirus）、副腸孤病毒（Parechovirus）、果蠅無毛、釀酒酵母（S. cerevisiae）TFIID、釀酒酵母YAP1、人c-src、人FGF-1、猿猴小核糖核酸病毒、蕪菁皺縮病毒（Turnip crinkle virus）、eIF4G適配體、柯薩奇病毒（Coxsackievirus）B3（CVB3）或柯薩奇病毒A（CVB1/2）。在又另一實施方式中，IRES係柯薩奇病毒B3（CVB3）的IRES序列。在另外的實施方式中，IRES係腦心肌炎病毒的IRES序列。在另外的實施方式中，IRES係蒂勒腦脊髓炎病毒的IRES序列。

【0127】與野生型IRES序列相比，IRES序列可具有經修飾的序列。在一些實施方式中，當野生型IRES的最後一個核苷酸不是胞嘧啶核酸殘基時，可以修飾野生型IRES序列的最後一個核苷酸，使得其係胞嘧啶殘基。例如，IRES序列可為CVB3 IRES序列，其中將末端腺苷殘基修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，經修飾的CVB3 IRES可具有以下的核酸序列：

TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACG

GTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGAT

CAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTA

TCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAA

CCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCG

ATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGG

GGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTC

CTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGT

GTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTC

CTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCC

GGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAA

AACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAC（SEQ ID NO: 113）

【0128】在一些實施方式中，IRES序列係腸道病毒71（EV17）IRES。在一些實施方式中，將EV17 IRES序列的末端鳥苷殘基修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，經修飾的EV71 IRES可具有以下的核酸序列：

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCAC

CATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT

CCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG

TTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCC

CCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGC

GGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCA

AGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGG

GGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAAC

CACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATA（SEQ ID NO: 114）。

【0129】在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括側接至少一個（例如，2、

3、4、5或更多個）表現序列的至少一個IRES。在一些實施方式中，IRES側接至少一個（例如2、3、4、5或更多個）表現序列的兩側。在一些實施方式中，多核糖核苷酸在每個表現序列的一側或兩側包括一或多個IRES序列，導致所得的一或多種肽和或一或多種多肽的隔開。例如，本文所述之多核糖核苷酸可包括與第一表現序列（例如，編碼第一免疫原，如第一VZV免疫原）可操作地連接的第一IRES和與第二表現序列（例如，編碼第二免疫原，如第二VZV免疫原）可操作地連接的第二IRES。

【0130】在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括IRES（例如，與編碼區可操作地連接的IRES）。例如，多核糖核苷酸可以包括如在以下中描述的任何IRES：Chen等人 Mol. Cell [分子細胞] 81(20):4300-4318, 2021；Jopling等人 Oncogene [致癌基因] 20:2664-2670, 2001；Baranick等人 PNAS [美國國家科學院院刊]105(12):4733-4738, 2008；Lang等人 Molecular Biology of the Cell [細胞分子生物學] 13(5):1792-1801, 2002；Dorokhov等人 PNAS [美國國家科學院院刊] 99(8):5301-5306, 2002；Wang等人 Nucleic Acids Research [核酸研究] 33(7):2248-2258, 2005；以及Petz等人 Nucleic Acids Research [核酸研究] 35(8):2473-2482, 2007，其各自特此藉由援引以其全文併入。

訊息序列

【0131】在一些實施方式中，可以從本文揭露的環狀多核糖核苷酸表現的示例性免疫原包括分泌性蛋白，例如天然包括訊息序列的蛋白質（例如，免疫原），或者通常不編碼訊息序列但修飾為含有訊息序列的蛋白質。在一些實施方式中，由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原包括分泌訊息。例如，分泌訊息可為分泌性蛋白的天然編碼的分泌訊息。在另一個實例中，分泌訊息可為分泌性蛋白的經修飾的分泌訊息。在其他實施方式中，由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原不包括分泌訊息。

【0132】在一些實施方式中，訊息序列選自SecSP38（MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA；SEQ ID NO: 1）；SecD4（MWWLLLLLLLLWPMVWA；SEQ ID NO: 2）、gLuc（MGVKVLFALICIAVAEAK；SEQ ID NO: 3）；INHC1（MASRLTLLTLLLLLLAGDRASS；SEQ ID NO: 4）；Epo（MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG；SEQ ID NO: 5）；和IL-2（MYRMQLLSCIALSLALVTNS；SEQ ID NO: 6）。

【0133】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼相同免疫原的多個拷貝（例如，一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或更多個）。在一些實施方式中，免疫原的至少一個拷貝包括訊息序列，且免疫原的至少一個拷貝不包括訊息序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多種免疫原（例如，多種不同的免疫原或多種具有小於100%序列同一性的免疫原），其中該多種免疫原中的至少一種包括訊息序列且該多種免疫原中的至少一個拷貝不包括訊息序列。

【0134】在一些實施方式中，訊息序列係野生型訊息序列，其例如當內源性表現時存在於相應野生型免疫原的N端。在一些實施方式中，訊息序列與免疫原異源，例如當野生型免疫原內源性表現時係不存在的。可以修飾編碼免疫原的多核糖核苷酸序列以去除編碼野生型訊息序列的核苷酸序列和/或添加編碼異源訊息序列的序列。

【0135】環狀多核糖核苷酸可進一步包括一或多種佐劑，每種佐劑都具有或沒有訊息序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼至少一種佐劑和至少一種免疫原。在一些實施方式中，至少一種編碼的佐劑包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原不包括訊息序列。在一些實施方式中，至少一種編碼的佐劑包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原包括訊息序列。在一些實施方式中，至少

一種編碼的佐劑不包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原包括訊息序列。在一些實施方式中，編碼的佐劑和編碼的免疫原都不包括訊息序列。

【0136】 在一些實施方式中，訊息序列係野生型訊息序列，其例如當內源性表現時存在於相應野生型佐劑的N端。在一些實施方式中，訊息序列與佐劑異源，例如當野生型佐劑內源性表現時係不存在的。可以修飾編碼佐劑的多核糖核苷酸序列以去除編碼野生型訊息序列的核苷酸序列和/或添加編碼異源訊息序列的序列。

【0137】 由多核糖核苷酸編碼的多肽（例如，由多核糖核苷酸編碼的免疫原或佐劑）可以包括將免疫原或佐劑引導至分泌途徑的訊息序列。在一些實施方式中，訊息序列可以引導免疫原或佐劑駐留在某些細胞器（例如，內質網、高基氏體或內體）中。在一些實施方式中，訊息序列將免疫原或佐劑引導至從細胞中分泌。對於分泌性蛋白，訊息序列可在分泌之後被切割，從而產生成熟蛋白質。在其他實施方式中，訊息序列可以嵌入細胞膜或某些細胞器中，產生跨膜區段，跨膜區段將蛋白錨定至細胞膜、內質網或高基氏體。在某些實施方式中，跨膜蛋白的訊息序列係在多肽N端的短序列。在其他實施方式中，第一跨膜結構域充當第一訊息序列，將蛋白質靶向膜。

【0138】 在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的佐劑包括分泌訊息序列。在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的免疫原包括分泌訊息序列、跨膜插入訊息序列或不包括訊息序列。

調控元件

【0139】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個調控元件，例如，修飾環狀多核糖核苷酸內表現序列的表現的一或多個序列。

【0140】 調控元件可以包括位置與編碼表現產物的表現序列相鄰的序列。調控元件可以可操作地連接至相鄰序列。與不存在調控元件時表現的產物的量

相比，調控元件可以增加表現的產物的量。調控元件可用於增加由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原和/或佐劑的表現。同樣地，調控元件可用於降低由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原和/或佐劑的表現。在一些實施方式中，調控元件可用於增加免疫原和/或佐劑的表現，而另一種調控元件可用於降低同一環狀多核糖核苷酸上另一種免疫原和/或佐劑的表現。此外，一個調控元件可以增加串聯附接的多個表現序列表現的產物（例如，免疫原或佐劑）的量。因此，一個調控元件可以增強一或多個表現序列（例如，免疫原或佐劑）的表現。也可以使用多種調控元件，例如，差異性地調控不同表現序列的表現。

【0141】在一些實施方式中，本文提供的調控元件可以包括選擇性翻譯序列。如本文所用，術語「選擇性翻譯序列」係指選擇性地起始或激活環狀多核糖核苷酸中的表現序列的翻譯的核酸序列，例如某些核糖開關適體酶。調控元件還可以包括選擇性降解序列。如本文所用，術語「選擇性降解序列」係指起始環狀多核糖核苷酸或環狀多核糖核苷酸的表現產物的降解的核酸序列。在一些實施方式中，調控元件係翻譯調節子。翻譯調節子可以調節環狀多核糖核苷酸中表現序列的翻譯。翻譯調節子可為翻譯強化子或翻譯抑制子。在一些實施方式中，翻譯起始序列可以充當調控元件。

【0142】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸產生化學計量比的表現產物。滾環翻譯連續地以基本上相等的比率產生表現產物。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸具有化學計量的翻譯效率，使得表現產物以基本上相等的比率產生。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸具有多種表現產物（例如來自2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多個表現序列的產物）的化學計量翻譯效率。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸產生基本上不同比率的表現產物。例如，多種表現產物的翻譯效率可以具有以下的比率：1：10,000、1：7000、1：5000、1：1000、1：700、1：500、1：100、1：50、1：10、1：5、1：4、1：3或1：

2。在一些實施方式中，可以使用調控元件來修改多個表現產物的比率。

【0143】 國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0154] - [0161]中描述了調控元件的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

切割結構域

【0144】 本揭露之環狀多核糖核苷酸可以包括切割結構域（例如，交錯元件或切割序列）。

【0145】 術語「交錯元件」係指在翻譯期間誘導核糖體暫停的部分，諸如核苷酸序列。在一些實施方式中，交錯元件係具有強α-螺旋傾向的胺基酸的非保守序列，然後是共有序列-D(V/I)ExNPGP，其中x=任何胺基酸（SEQ ID NO: 7）。在一些實施方式中，交錯元件可以包括化學部分，如甘油、非核酸連接部分、化學修飾、經修飾的核酸或其任何組合。

【0146】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與每個表現序列相鄰的交錯元件。在一些實施方式中，交錯元件存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物（例如一或多種免疫原和/或一或多種佐劑）隔開。在一些實施方式中，交錯元件係一或多個表現序列的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列(例如，一或多種免疫原和/或一或多種佐劑)，並且該一或多個表現序列中的每一個被環狀多核糖核苷酸上的交錯元件與後繼的表現序列（例如，一或多種免疫原和/或一或多種佐劑）隔開。在一些實施方式中，交錯元件阻止 (a) 單個表現序列的兩輪翻譯或 (b) 兩或更多個表現序列的一輪或多輪翻譯生成單個多肽。在一些實施方式中，交錯元件係與該一或多個表現序列隔開的序列。在一些實施方式中，交錯元件包括該一或多個表現序列的表現序列的一部分。

【0147】 在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0172]-[0175]中描述

了交錯元件的實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0148】在一些實施方式中，由環狀核糖核苷酸編碼的多種免疫原和/或佐劑可以被每種免疫原之間的IRES隔開（例如，每種免疫原與單獨的IRES可操作地連接）。例如，環狀多核糖核苷酸可以包括與第一表現序列可操作地連接的第一IRES和與第二表現序列可操作地連接的第二IRES。所有免疫原之間的IRES可為相同的IRES。不同免疫原之間的IRES可以不同。

【0149】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被2A自切割肽隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、2A和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。

【0150】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。

【0151】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被2A自切割肽和蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、2A、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。環狀多核糖核苷酸還可以編碼與編碼第一免疫原、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）、2A和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。串聯的2A和弗林蛋白酶切割位點可稱為弗林蛋白酶-2A（其包括以任一方向排列的弗林蛋白酶-2A或2A-弗林蛋白酶）。

【0152】此外，由環狀核糖核苷酸編碼的多種免疫原和/或佐劑可以被IRES和2A序列兩者隔開。例如，IRES可以在一個免疫原和/或佐劑與第二免疫原和/或佐劑之間，而2A肽可以在第二免疫原和/或佐劑與第三免疫原和/或佐劑之間。特定IRES或2A自切割肽的選擇可用於在IRES或2A序列的控制下控制免疫原

和/或佐劑的表現水平。例如，根據所選擇的IRES和/或2A肽，多肽上的表現可以更高或更低。

【0153】 為了避免產生連續表現產物，例如免疫原和/或佐劑，同時保持滾環翻譯，可以包括交錯元件以在翻譯期間誘導核糖體暫停。在一些實施方式中，交錯元件在一或多個表現序列中的至少一個的3'末端。交錯元件可以被配置為在環狀多核糖核苷酸的滾環翻譯期間使核糖體停滯。交錯元件可以包括但不限於2A樣或CHYSEL（SEQ ID NO: 8）（順式作用的水解酶元件）序列。在一些實施方式中，交錯元件編碼具有C末端共有序列為$X_1X_2X_3EX_5NPGP$的序列，其中X_1不存在或G或H，X_2不存在或D或G，X_3係D或V或I或S或M，X_5係任何胺基酸（SEQ ID NO: 9）。在一些實施方式中，此序列包括具有強α-螺旋傾向的胺基酸的非保守序列，然後是共有序列-D(V/I)ExNPGP，其中x = 任何胺基酸（SEQ ID NO: 7）。交錯元件之一些非限制性實例包括GDVESNPGP（SEQ ID NO: 10）、GDIEENPGP（SEQ ID NO: 11）、VEPNPGP（SEQ ID NO: 12）、IETNPGP（SEQ ID NO: 13）、GDIESNPGP（SEQ ID NO: 14）、GDVELNPGP（SEQ ID NO: 15）、GDIETNPGP（SEQ ID NO: 16）、GDVENPGP（SEQ ID NO: 17）、GDVEENPGP（SEQ ID NO: 18）、GDVEQNPGP（SEQ ID NO: 19）、IESNPGP（SEQ ID NO: 20）、GDIELNPGP（SEQ ID NO: 21）、HDIETNPGP（SEQ ID NO: 22）、HDVETNPGP（SEQ ID NO: 23）、HDVEMNPGP（SEQ ID NO: 24）、GDMESNPGP（SEQ ID NO: 25）、GDVETNPGP（SEQ ID NO: 26）、GDIEQNPGP（SEQ ID NO: 27）和DSEFNPGP（SEQ ID NO: 28）。

【0154】 在一些實施方式中，本文所述之交錯元件切割表現產物，諸如在本文所述之共有序列的G和P之間。作為一個非限制性實例，環狀多核糖核苷酸包括至少一個交錯元件以切割表現產物。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與至少一個表現序列相鄰的交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷

酸包括在每個表現序列後的交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括存在於每個表現序列的一側或兩側的交錯元件，導致由每個表現序列翻譯一或多種單獨肽和/或多肽。

【0155】在一些實施方式中，交錯元件包括一或多種在翻譯過程中誘導核糖體暫停的經修飾的核苷酸或非天然核苷酸。非天然核苷酸可以包括肽核酸（PNA）、味啉代和鎖核酸（LNA）、以及乙二醇核酸（GNA）和蘇糖核酸（TNA）。諸如此類的實例藉由改變分子主鏈而不同於天然存在的DNA或RNA。示例性修飾可以包括對糖、核鹼基、核苷間鍵（例如對連接的磷酸酯/對磷酸二酯鍵/對磷酸二酯主鏈）進行的可在翻譯期間誘導核糖體暫停的任何修飾以及其任何組合。本文提供的一些示例性修飾在本文其他處描述。

【0156】在一些實施方式中，交錯元件以其他形式存在於環狀多核糖核苷酸中。例如，在一些示例性環狀多核糖核苷酸中，交錯元件包括環狀多核糖核苷酸中的第一表現序列的終止元件，和將終止元件與第一表現序列後繼表現的第一翻譯起始序列隔開的核苷酸間隔子序列。在一些實例中，第一表現序列的第一交錯元件在環狀多核糖核苷酸中的第一表現序列後繼表現的第一翻譯起始序列的上游（5'）。在一些情況下，第一表現序列和第一表現序列後繼表現序列係環狀多核糖核苷酸中的兩個隔開的表現序列。第一交錯元件和第一翻譯起始序列之間的距離可以使得第一表現序列及其後繼表現序列能夠連續翻譯。在一些實施方式中，第一交錯元件包括終止元件，並將第一表現序列的表現產物與其後繼表現序列的表現產物隔開，從而產生離散的表現產物。在一些情況下，在環狀多核糖核苷酸中後繼序列的第一翻譯起始序列上游包括第一交錯元件的環狀多核糖核苷酸被連續翻譯，而在第二表現序列後繼表現序列的第二翻譯起始序列的上游包括第二表現序列的交錯元件的對應環狀多核糖核苷酸不被連續翻譯。在一些情況下，環狀多核糖核苷酸中僅存在一個表現序列，並且第一表現序列及其

後繼表現序列係相同的表現序列。在一些示例性環狀多核糖核苷酸中，交錯元件包括環狀多核糖核苷酸中第一表現序列的第一終止元件，和將終止元件與下游翻譯起始序列隔開的核苷酸間隔子序列。在一些此類實例中，環狀多核糖核苷酸中第一交錯元件在第一表現序列的第一翻譯起始序列的上游（5'）。在一些情況下，第一交錯元件和第一翻譯起始序列之間的距離使得能夠連續翻譯第一表現序列和任何後繼表現序列。在一些實施方式中，第一交錯元件將第一表現序列的一輪表現產物與第一表現序列的下一輪表現產物分開，從而產生離散的表現產物。在一些情況下，在環狀多核糖核苷酸中的第一序列的第一翻譯起始序列上游包括第一交錯元件的環狀多核糖核苷酸被連續翻譯，而在相應環狀多核糖核苷酸中的第二表現序列的第二翻譯起始序列上游包括交錯元件的相應環狀多核糖核苷酸不被連續翻譯。在一些情況下，相應環狀多核糖核苷酸中第二交錯元件與第二翻譯起始序列之間的距離係環狀多核糖核苷酸中第一交錯元件與第一翻譯起始序列之間的距離的至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍大。在一些情況下，第一交錯元件與第一翻譯起始之間的距離為至少2 nt、3 nt、4 nt、5 nt、6 nt、7 nt、8 nt、9 nt、10 nt、11 nt、12 nt、13 nt、14 nt、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、25 nt、30 nt、35 nt、40 nt、45 nt、50 nt、55 nt、60 nt、65 nt、70 nt、75 nt或更大。在一些實施方式中，第二交錯元件與第二翻譯起始之間的距離為至少2 nt、3 nt、4 nt、5 nt、6 nt、7 nt、8 nt、9 nt、10 nt、11 nt、12 nt、13 nt、14 nt、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、25 nt、30 nt、35 nt、40 nt、45 nt、50 nt、55 nt、60 nt、65 nt、70 nt、75 nt或大於第一交錯元件和第一翻譯起始之間的距離。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括多於一個表現序列。

【0157】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括至少一個切割序列。在一些實施方式中，切割序列與表現序列相鄰。在一些實施方式中，切割序列在

兩個表現序列之間。在一些實施方式中，切割序列包括在表現序列中。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括2至10個切割序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括2至5個切割序列。在一些實施方式中，多個切割序列在多個表現序列之間；例如，環狀多核糖核苷酸可以包括三個表現序列和兩個切割序列，使得在每個表現序列之間存在一個切割序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括切割序列，例如在犧牲型circRNA或可切割的circRNA或自切割的circRNA中。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括兩或更多個切割序列，導致將環狀多核糖核苷酸分離成多個產物，例如miRNA、線性RNA、較小的環狀多核糖核苷酸等。

【0158】在一些實施方式中，切割序列包括核酶RNA序列。核酶（來自核糖核酸酶，也稱為RNA酶或催化性RNA）係催化化學反應的RNA分子。許多天然核酶催化其自身的磷酸二酯鍵之一的水解，或催化其他RNA中的鍵的水解，但也發現天然核酶催化核糖體的胺基轉移酶活性。催化性RNA可以藉由體外方法「進化」。類似於上文討論的核糖開關活性，核酶及其反應產物可以調控基因表現。在一些實施方式中，將催化性RNA或核酶置於較大的非編碼RNA中，這使得核酶以許多拷貝存在於細胞內，用於大體積分子的化學轉化的目的。在一些實施方式中，適配體和核酶都可以在相同的非編碼RNA中編碼。

【0159】在一些實施方式中，切割序列編碼可切割的多肽連接子。例如，多核糖核苷酸可以編碼兩或更多種免疫原，例如，其中該兩或更多種免疫原由單個開讀框（ORF）編碼。例如，兩或更多種免疫原可以由單個開讀框編碼，該開讀框的表現受IRES控制。在一些實施方式中，ORF進一步編碼多肽連接子，例如使得ORF的表現產物編碼兩或更多種免疫原，每種免疫原被編碼多肽連接子（例如，5-200、5至100、5至50、5至20、50至100或50至200個胺基酸的連接子）的序列隔開。多肽連接子可包括切割位點，例如，被蛋白酶（例如，在對受試者投

與多核糖核苷酸之後受試者中的內源性蛋白酶）識別和切割的切割位點。在這樣的實施方式中，包括兩或更多種免疫原的胺基酸序列的單一表現產物在表現時裂解，從而使得該兩或更多種免疫原在表現後分離。示例性的蛋白酶切割位點係熟悉該項技術者已知的，例如，充當被金屬蛋白酶（例如，基質金屬蛋白酶（MMP），如MMP 1-28中的任一或多種）、解聚素（disintegrin）和金屬蛋白酶（ADAM，如ADAM 2、7-12、15、17-23、28-30和33中的任一或多種）、絲胺酸蛋白酶（例如，弗林蛋白酶）、尿激酶型纖溶酶原激活劑、蛋白裂解酶（matriptase）、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶或組織蛋白酶識別的蛋白酶切割位點的胺基酸序列。在一些實施方式中，該蛋白酶係MMP9和/或MMP2。在一些實施方式中，蛋白酶係蛋白裂解酶。

【0160】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸係犧牲型環狀多核糖核苷酸、可切割的環狀多核糖核苷酸或自切割的環狀多核糖核苷酸。環狀多核糖核苷酸可以遞送細胞組分，包括例如，RNA、lncRNA、lincRNA、miRNA、tRNA、rRNA、snoRNA、ncRNA、siRNA或shRNA。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括被以下隔開的miRNA：(i) 可自切割的元件；(ii) 切割募集位點；(iii) 可降解連接子；(iv) 化學連接子；和/或 (v) 間隔子序列。在一些實施方式中，circRNA包括被以下隔開的siRNA：(i) 可自切割的元件；(ii) 切割募集位點（例如，ADAR）；(iii) 可降解連接子（例如，丙三醇）；(iv) 化學連接子；和/或 (v) 間隔子序列。可自切割的元件之非限制性實例包括錘頭結構、剪接元件、髮夾、D型肝炎病毒（HDV）、Varkud衛星（VS）和glmS核酶。

翻譯起始序列

【0161】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原並且包括翻譯起始序列，例如起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列包括科紮克或夏因-達爾加諾（Shine-Dalgarno）序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列包含科

紮克序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括翻譯起始序列，例如，與表現序列相鄰，例如科紮克序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列係非編碼起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列，例如科紮克序列，存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物的隔開。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個翻譯起始序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列為環狀多核糖核苷酸提供構象柔性。在一些實施方式中，翻譯起始序列基本上在環狀多核糖核苷酸的單股區內。在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0163]-[0165]中描述了翻譯起始序列的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0162】環狀多核糖核苷酸可包括多於1個起始密碼子，例如但不限於至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17、至少18個、至少19個、至少20個、至少25個、至少30個、至少35個、至少40個、至少50個、至少60個或多於60個起始密碼子。翻譯可以在第一個起始密碼子上起始或可以在第一個起始密碼子的下游起始。

【0163】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以起始於不是第一起始密碼子（例如AUG）的密碼子。環狀多核糖核苷酸的翻譯可以在替代性的翻譯起始序列處起始，如國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0164]中描述的那些，其藉由援引以其全文併入本文。

【0164】在一些實施方式中，翻譯係藉由用Rocaglates處理真核起始因子4A（eIF4A）來起始的（藉由阻斷43S掃描來阻遏翻譯，導致過早的上游翻譯起始以及攜帶RocA-eIF4A靶序列的轉錄本的蛋白質表現降低，參見例如，www.nature.com/articles/nature17978）。

非翻譯區

【0165】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括非翻譯區（UTR）。包括基因的基因組區域的UTR可以轉錄但不翻譯。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的翻譯起始序列的上游。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的下游。在一些情況下，第一表現序列的一個UTR與第二表現序列的另一個UTR相同或連續或重疊。

【0166】在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0197]-[201]中描述了示例性非翻譯區，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0167】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括聚A序列。在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0202]-[0205]中描述了示例性聚A序列，將其特此藉由援引以其全文併入。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少聚A序列。

【0168】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括內嵌有一段或多段的腺苷和尿苷的UTR。該等AU富集簽名可能會增加表現產物的轉化率。

【0169】富含UTR AU的元件（ARE）的引入、去除或修飾可用於調節環狀多核糖核苷酸的穩定性或免疫原性（例如，免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）。工程化特定的環狀多核糖核苷酸時，可以將ARE的一或多個拷貝引入環狀多核糖核苷酸中，並且ARE的該等拷貝可以調節表現產物的翻譯和/或產生。同樣，可以對ARE進行鑒別和去除或工程化至環狀多核糖核苷酸以調節細胞內穩定性，從而影響所得蛋白質的翻譯和產生。

【0170】應當理解，可以將來自任何基因的任何UTR摻入環狀多核糖核苷酸的相應側翼區中。

【0171】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核

糖核苷酸缺少聚A序列，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少帽，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR、3'-UTR和IRES，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括以下序列中的一或多個：編碼一或多種miRNA的序列、編碼一或多種複製蛋白的序列、編碼外源基因的序列、編碼治療劑的序列、調控元件（例如，翻譯調節子，例如，翻譯強化子或抑制子）、翻譯起始序列、靶向內源基因的一或多種調控核酸（例如，siRNA、lncRNA、shRNA）和編碼治療性mRNA或蛋白的序列。

【0172】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少聚A序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少核酸外切酶的降解易感性。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少降解易感性的事實可以意味著環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解，或僅在核酸外切酶存在下有限程度地降解，例如，與核酸外切酶不存在時相當或相似。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解。在一些實施方式中，當暴露於核酸外切酶時，環狀多核糖核苷酸降解減少。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少與帽結合蛋白的結合。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5’帽。

終止元件

【0173】在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括至少一個終止

元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列可操作地連接的終止元件。在一些實施方式中，多核苷酸缺少終止元件。

【0174】在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可具有或可不具有終止元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得多核糖核苷酸被連續翻譯。終止元件的排除可導致表現產物的滾環翻譯或連續表現。

【0175】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可具有或可不具有終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得環狀多核糖核苷酸被連續翻譯。由於缺少核糖體停滯或脫落，終止元件的排除可導致表現產物（例如肽或多肽）的滾環翻譯或連續表現。在這樣的實施方式中，滾環翻譯通過每個表現序列來表現連續表現產物。在一些其他實施方式中，表現序列的終止元件可為交錯元件的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個表現序列包括終止元件。然而，在環狀多核糖核苷酸中進行滾環翻譯或後繼（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列的表現。在此類情況下，當核糖體遇到終止元件（例如，終止密碼子）並終止翻譯時，表現產物可以從核糖體上脫落。在一些實施方式中，在核糖體例如核糖體的至少一個亞基與環狀多核糖核苷酸保持接觸時翻譯終止。

【0176】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸在一或多個表現序列的末端包括終止元件。在一些實施方式中，一或多個表現序列包括兩或更多個連續的終止元件。在這樣的實施方式中，翻譯終止並且滾環翻譯終止。在一些實施方式中，核糖體與環狀多核糖核苷酸完全脫離。在一些這樣的實施方式中，在環狀多核糖核苷酸中產生隨後的（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列可需要核糖體在翻譯起始之前與環狀多核糖核苷酸重新接合。通常，終止元件包括發出

翻譯終止訊息的框內核苷酸三聯體（例如，UAA、UGA、UAG）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個終止元件

【0177】係框移位的終止元件，如但不限於可終止翻譯的脫框（off-frame）或-1和+1移位的閱讀框（例如，隱藏的終止）。框移位的終止元件包括出現在表現序列的第二閱讀框和第三閱讀框中的核苷酸三聯體，TAA、TAG和TGA。框移位的終止元件可能對防止通常對細胞有害的mRNA誤讀很重要。在一些實施方式中，終止元件係終止密碼子。

【0178】在一些實施方式中，表現序列包括聚A序列（例如，在表現序列的3’末端，例如終止元件的3’）。在一些實施方式中，聚A序列的長度大於10個核苷酸。在一個實施方式中，聚A序列的長度大於15個核苷酸（例如，至少或大於約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、和3,000個核苷酸）。在一些實施方式中，根據國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0202]-[0204]中對聚A序列的描述來設計聚A序列，將其藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，表現序列缺少聚A序列（例如，在表現序列的3’末端）。

【0179】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括聚A、缺少聚A或具有經修飾的聚A以調節環狀多核糖核苷酸的一或多種特徵。在一些實施方式中，缺少聚A或具有經修飾的聚A的環狀多核糖核苷酸改善了一或多種功能特徵，例如免疫原性（例如，免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）、半衰期和/或表現效率。

【0180】國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0169]-[0170]中描述了終止元件的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

間隔子序列

【0181】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸包括間隔子序列。在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個間隔子序列。間隔子係指在兩個相鄰的多核苷酸區域之間提供距離或靈活性的任何連續的核苷酸序列（例如，一或多個核苷酸）。間隔子可以存在於本文所述之任一核酸元件之間。間隔子還可以存在於本文所述核酸元件內。

【0182】間隔子的長度可為例如至少5個（例如，至少10個、至少15個、至少20個）核糖核苷酸。在一些實施方式中，每個間隔子區的長度係至少5個（例如，至少10、至少15、至少20個）核糖核苷酸。每個間隔子區的長度可為例如5至500個（例如，10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500個）核糖核苷酸。第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區可包括聚A序列。第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區可包括聚A-C序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括聚A-G序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括聚A-T序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括隨機序列。

【0183】在一些實施方式中，間隔子序列的長度可為，例如，至少10個核苷酸、至少15個核苷酸、或至少30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係不多於100、90、80、70、60、50、45、40、35或30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係20至50個核苷酸。在某些實施方式中，間隔子序列的長度係10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、

33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸。

【0184】間隔子序列可為聚A序列、聚A-C序列、聚C序列、或聚U序列。

【0185】在一些實施方式中，間隔子序列可為聚A-T、聚A-C、聚A-G或隨機序列。

【0186】在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0293] - [0302]中描述了示例性間隔子序列，將其特此藉由援引以其全文併入。

修飾

【0187】相對於參考序列（尤其是親本多核糖核苷酸），環狀多核糖核苷酸可以包括本揭露範圍內包括的一或多個取代、插入和/或添加、缺失和共價修飾。

【0188】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個轉錄後修飾（例如，加帽、切割、聚腺苷酸化、剪接、聚A序列、甲基化、醯化、磷酸化、離胺酸和精胺酸殘基的甲基化、乙醯化、以及硫醇基團和酪胺酸殘基的亞硝基化等）。該一或多個轉錄後修飾可為任何轉錄後修飾，諸如已經在RNA中鑒定出的多於一百種不同的核苷修飾中的任一種（Rozenski, J, Crain, P和McCloskey, J. (1999).The RNA Modification Database: 1999 update. [RNA修飾資料庫：1999年更新]Nucl Acids Res [核酸研究] 27: 196-197）。在一些實施方式中，第一分離核酸包括信使RNA（mRNA）。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括至少一個選自下組的核苷：如國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0311]中描述的那些，將其藉由援引以其全文併入本文。

【0189】環狀多核糖核苷酸可包括任何有用的修飾，例如針對糖、核鹼基或核苷間鍵（例如針對連接的磷酸酯/針對磷酸二酯鍵/針對磷酸二酯主鏈）。嘧啶核鹼基的一或多個原子可被視需要經取代的胺基、視需要經取代的硫醇、視需

要經取代的烷基（例如，甲基或乙基）或鹵代（例如，氯代或氟代）替代或取代。在某些實施方式中，在每個糖和核苷間鍵中存在修飾（例如，一或多個修飾）。修飾可為對去氧核糖核酸（DNA）、蘇糖核酸（TNA）、乙二醇核酸（GNA）、肽核酸（PNA）、鎖核酸（LNA）或其雜交體的核糖核酸（RNA）修飾。本文描述了其他修飾。

【0190】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括至少一種N(6)甲基腺苷（m6A）修飾以增加翻譯效率。在一些實施方式中，m6A修飾可降低環狀多核糖核苷酸的免疫原性（例如，降低免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）。

【0191】在一些實施方式中，修飾可以包括化學或細胞誘導的修飾。例如，細胞內RNA修飾之一些非限制性實例如Lewis和Pan在「RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions [核糖核酸的修飾和結構共同引導核糖核酸和蛋白的相互作用]」, Nat Reviews Mol Cell Biol [自然評論：分子細胞生物學], 2017, 18:202-210中所述。

【0192】在一些實施方式中，對環狀多核糖核苷酸的核糖核苷酸的化學修飾可以增強免疫逃避。環狀多核糖核苷酸可以藉由本領域眾所周知的方法合成和/或修飾，如「Current protocols in nucleic acid chemistry [核酸化學現行方案]」, Beaucage, S.L等人 (編輯), John Wiley & Sons [約翰·威利父子出版公司], 紐約市, 紐約州, 美國（將其特此藉由援引併入）中描述的那些方法。修飾包括例如末端修飾，如5'末端修飾（磷酸化（單、二和三磷酸化）、軛合、反向連接等）、3'末端修飾（軛合、DNA核苷酸、反向連接等）、鹼基修飾（例如，用穩定的鹼基、不穩定的鹼基或與擴展的配偶體庫鹼基配對的鹼基替代）、鹼基去除（脫鹼基核苷酸）或鹼基軛合。經修飾的核糖核苷酸鹼基還可以包括5-甲基胞苷和假尿苷。在一些實施方式中，舉幾個功能作用，鹼基修飾可以調節環狀多核糖核苷酸的表現、免疫響應、穩定性、亞細胞定位。在一些實施方式中，修飾包括雙正交核苷

酸，例如非天然鹼基。參見例如，Kimoto等人, Chem Commun (Camb) [化學通訊（劍橋）], 2017, 53:12309, DOI: 10.1039/c7cc06661a，將該文獻藉由援引以其全文特此併入。

【0193】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的一或多個核糖核苷酸的糖修飾（例如在2'位置或4'位置）或糖替代以及主鏈修飾可以包括磷酸二酯鍵的修飾或替代。環狀多核糖核苷酸之具體實例包括但不限於包括經修飾的主鏈或非天然核苷間鍵（如核苷間修飾，包括磷酸二酯鍵的修飾或替代）的環狀多核糖核苷酸。具有經修飾的主鏈的環狀多核糖核苷酸尤其包括在主鏈中不具有磷原子的那些。出於本申請之目的，並且如本領域中有時提及的，在其核苷間主鏈中不具有磷原子的經修飾的RNA也可以被認為是寡核苷。在特定實施方式中，環狀多核糖核苷酸將包括在其核苷間主鏈中具有磷原子的核糖核苷酸。

【0194】經修飾的環狀多核糖核苷酸主鏈可以包括，例如，硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯（如3'-伸烷基膦酸酯和手性膦酸酯）、亞膦酸酯、胺基磷酸酯（如3'-胺基胺基磷酸酯和胺基烷基胺基磷酸酯）、硫羰基胺基磷酸酯（thionophosphoramidate）、硫羰烷基膦酸酯、硫羰烷基磷酸三酯、和具有正常3'-5'鍵的硼烷磷酸酯，該等的2'-5'連接的類似物，以及具有相反極性的那些，其中相鄰的核苷單元對3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'連接。也包括各種鹽、混合鹽和游離酸形式。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以帶負電荷或帶正電荷。

【0195】可摻入環狀多核糖核苷酸中的經修飾的核苷酸可在核苷間鍵（例如磷酸酯主鏈）上被修飾。在此，在多核苷酸主鏈的上下文中，短語「磷酸酯」和「磷酸二酯」可互換使用。可以藉由用不同的取代基替代一或多個氧原子來修飾主鏈磷酸酯基團。此外，經修飾的核苷和核苷酸可以包括用如本文所述之另一個核苷間鍵合進行的對未經修飾的磷酸酯部分的整體替代。經修飾的磷酸酯基

團之實例包括但不限於硫代磷酸酯、亞磷酸硒酸酯、硼酸磷酸酯（boranophosphates/boranophosphate esters）、氫膦酸酯、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的兩個非連接氧都被硫替代。也可以藉由用氮（橋連的胺基磷酸酯）、硫（橋連的硫代磷酸酯）和碳（橋連的亞甲基膦酸酯）替代連接氧來修飾磷酸酯連接子。

【0196】 提供a-硫代取代的磷酸酯部分以通過非天然硫代磷酸酯主鏈鍵賦予RNA和DNA聚合物穩定性。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增強的核酸酶抗性，並因此在細胞環境中具有更長的半衰期。與環狀多核糖核苷酸連接的硫代磷酸酯有望通過減弱細胞先天免疫分子的結合/激活來降低先天免疫響應。

【0197】 在特定實施方式中，經修飾的核苷包括α-硫代-核苷（例如，5'-0-(l-硫代磷酸)-腺苷、5'-0-(l-硫代磷酸)-胞苷(a-硫代胞苷)、5'-0-(l-硫代磷酸)-鳥苷、5'-0-(l-硫代磷酸)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸)-假尿苷）。

【0198】 本文描述了可根據本揭露使用的其他核苷間鍵，包括不包含磷原子的核苷間鍵。

【0199】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以包括一或多種細胞毒性核苷。例如，細胞毒性核苷可以被摻入環狀多核糖核苷酸中，如雙功能修飾。細胞毒性核苷可以包括但不限於阿糖腺苷、5-氮雜胞苷、4'-硫代阿糖胞苷、環戊烯基胞嘧啶、克拉屈濱、氯法拉濱、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖胞苷、l-(2-C-氰基-2-去氧-β-D-阿拉伯-戊呋喃糖基)-胞嘧啶、地西他濱、5-氟尿嘧啶、氟達拉濱、氟尿苷、吉西他濱、替加氟和尿嘧啶的組合、替加氟（(RS)-5-氟-l-(四氫呋喃-2-基)嘧啶-2,4(lH,3H)-二酮）、曲沙他濱、替紮西他濱、2'-去氧-2'-亞甲基胞苷（DMDC）和6-巰基嘌呤。其他實例包括氟達拉濱磷酸酯、N4-山嵛醯基-l-β-D-阿拉伯戊呋喃糖基胞嘧啶、N4-十八烷基-1-β-D-阿拉伯戊呋喃糖基胞嘧啶、N4-棕櫚醯基-l-(2-C-氰基-2-去氧-β-D-阿拉伯-戊呋喃糖基)胞嘧啶和P-4055（阿糖胞苷5'-花生酸

酯）。

【0200】 環狀多核糖核苷酸可以沿著分子的整個長度均一地修飾或可以不如此。例如，一或多種或所有類型的核苷酸（例如，天然存在的核苷酸、嘌呤或嘧啶，或A、G、U、C、I、pU中的任一或多種或全部）在環狀多核糖核苷酸中，或在其給定的預定序列區中可以被或可以不被均一地修飾。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括假尿苷。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括肌苷，相對於病毒RNA，肌苷可以說明免疫系統將環狀多核糖核苷酸表徵為內源性。肌苷的摻入還可以介導改善RNA穩定性/減少降解。參見例如Yu, Z等人, (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as 「self」. [藉由ADAR1進行的RNA編輯將dsRNA標記為「自身」]Cell Res [細胞研究]. 25, 1283-1284，其藉由援引以其全文併入本文。

【0201】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸（或其給定序列區域）中的所有核苷酸均被修飾。在一些實施方式中，修飾可以包括可增強表現的m6A；可減弱免疫響應的肌苷；可增加RNA穩定性或翻譯通讀（交錯元件）的假尿苷；可增加穩定性的m5C；以及有助於亞細胞易位（例如，核定位）的2,2,7-三甲基鳥苷。

【0202】 在環狀多核糖核苷酸的各個位置上可以存在不同的糖修飾、核苷酸修飾和/或核苷間鍵合（例如，主鏈結構）。熟悉該項技術者將理解，核苷酸類似物或其他一或多個修飾可以位於環狀多核糖核苷酸的任何一或多個位置，使得環狀多核糖核苷酸的功能基本上不降低。修飾也可為非編碼區域修飾。環狀多核糖核苷酸可包括約1%至約100%的經修飾的核苷酸（相對於總核苷酸含量，或相對於一或多種類型的核苷酸，即A、G、U或C中的任何一或多種）或任何中間百分比（例如，1%至20%>、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%

至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%和95%至100%）。

多聚化

【0203】在某些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可編碼多聚化結構域。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼作為免疫原（例如，VZV免疫原）的第一多肽和作為多聚化結構域的第二多肽。例如，多聚化結構域可以在與免疫原（例如，VZV免疫原）相同的開讀框上編碼，並作為具有免疫原的融合蛋白表現。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可編碼兩或更多種免疫原，並且每種免疫原可視需要與多聚化結構域融合。多聚化結構域可促進免疫原複合物（例如，包括多種免疫原的複合物）的形成。

【0204】編碼的免疫原的多聚化可有利於誘導免疫響應。免疫原與一或多種多聚化元件（例如，二聚化元件、三聚化元件、四聚化元件和寡聚化元件）的融合可導致多聚免疫原複合物（例如，在免疫的受試者中表現後形成多聚免疫原複合物）的形成。在一些實施方式中，多聚免疫原複合物的形成增加了免疫原的免疫原性。例如，多聚免疫原複合物的形成可藉由模擬外源病原體（例如，病毒）的感染來增加免疫原的免疫原性，其中多種潛在免疫原通常位於病原體的包膜處（例如，流感病毒的血球凝集素（HA）免疫原）。在一些實施方式中，多聚化複合物包括至少2、3、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90或100種免疫原。在一些實施方式中，免疫原複合物包括2至10、2至50、2至100、5至10、5至15、5至20、5至50、5至100、10至20、10至30、10至40、10至50、10至60、10至100、20至50、或20至100種免疫原。在一些實施方

式中，免疫原複合物包括6個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-foldon-免疫原融合蛋白）。在一些實施方式中，免疫原複合物包括24個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-鐵蛋白融合蛋白）。在一些實施方式中，免疫原複合物包括60個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-AaLS融合蛋白或編碼免疫原-β環肽）。

【0205】 當在本揭露之上下文中與目的多肽免疫原組合使用時，這樣的多聚化元件可以位於目的多肽的N端或C端。在核酸水平上，這樣的多聚化元件的編碼序列典型地位於目的多肽或蛋白質的編碼序列的相同閱讀框中，5’或3’。

【0206】 多聚化結構域可具有10至500個胺基酸殘基（例如，10至450、10至400、10至350、10至300、10至250、10至200、10至150、10至100、10至50、50至500、100至500、150至500、200至500、250至500、300至500、350至500、400至500和450至500個殘基）。在一些實施方式中，多聚化結構域可包括20至2500個胺基酸殘基（例如，20至250、20至225、20至200、20至175、20至150、20至150、20至125、20至100、20至75、20至50、50至250、75至250、100至250、125至250、150至250、175至250、200至250和225至250個殘基）。

【0207】 在一些實施方式中，與多聚化結構域融合的免疫原比免疫原的免疫原性至少2倍、5倍或10倍（例如，在人類受試者中）。在一些實施方式中，與多聚化結構域融合的免疫原比未與多聚化結構域融合的免疫原的免疫原性至少高20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%（例如，在人類受試者中）。

【0208】 特定的多聚化元件係寡聚化元件、四聚化元件、三聚化元件或二聚化元件。二聚化元件可選自例如，熱休克蛋白的二聚化元件/結構域、免疫球蛋白Fc結構域和白胺酸拉鍊（轉錄因子的鹼性區域白胺酸拉鍊類二聚化結構域）。三聚化和四聚化元件可選自例如工程化的白胺酸拉鍊（採用平行三聚體狀

態的工程化a-螺旋捲曲螺旋肽）、來自腸桿菌屬噬菌體T4的纖維蛋白foldon結構域、GCN4pll、CCN4-pLI和p53。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括T4 foldon結構域。在特定實施方式中，T4 foldon結構域具有與GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL（SEQ ID NO: 48）具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，T4 foldon具有SEQ ID NO: 48的胺基酸序列。在一些實施方式中，多聚化結構域係β環肽（參見Matsuura等人 (2010), Angew.Chem. Int. Ed. [德國應用化學], 49: 9662-9665）。在一些實施方式中，β環肽具有INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS（SEQ ID NO: 49）的胺基酸序列（其中C端絲胺酸殘基視需要存在或不存在），或具有與SEQ ID NO: 49具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括AaLS肽。在特定實施方式中，AaLS肽具有與TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW（SEQ ID NO: 50）具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，AaLS肽具有SEQ ID NO: 50的胺基酸序列。

【0209】寡聚化元件可選自例如，鐵蛋白、界面活性劑D、副黏液病毒磷蛋白的寡聚化結構域、補體抑制劑C4結合蛋白（C4bp）寡聚化結構域、病毒感染性因子（Vif）寡聚化結構域、不育α模體（sterile alpha motif，SAM）結構域和馮威里氏因子D型結構域。

【0210】鐵蛋白形成寡聚體，並且係所有動物、細菌和植物中存在的高度保守的蛋白質。鐵蛋白係自發形成24個相同亞基的奈米顆粒的蛋白質。鐵蛋白-免疫原融合構建體潛在地形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括鐵蛋白結構域。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括具有以下胺基酸序列的鐵蛋白結構域：

DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLT

SISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKI

ELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS（SEQ ID NO: 51）。

【0211】 界面活性劑D蛋白（SPD）係自發自組裝以形成寡聚體的親水性糖蛋白。SPD-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0212】 副黏液病毒（負義RNA病毒）的磷蛋白作為病毒聚合酶的轉錄反式激活因子起作用。磷蛋白的寡聚化對病毒基因組複製至關重要。磷蛋白-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0213】 補體抑制劑C4結合蛋白（C4bp）也可用作融合配偶體來產生寡聚免疫原聚集物。C4bp的C端結構域（人中的57個胺基酸殘基和小鼠中的54個胺基酸殘基）對於C4bp或與其融合的其他多肽的寡聚化係必要且充分的。C4bp-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。病毒感染性因子（Vif）多聚化結構域已顯示在體外和體內均形成寡聚體。Vif的寡聚化涉及映射在C端結構域中殘基1 51至1 64之間的序列，即1 61 PPLP1 64模體（對於人HIV-1：TPKKIKPPLP（SEQ ID NO: 52））。Vif-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0214】 不育α模體（SAM）結構域係存在於參與許多生物過程的多種蛋白質中的蛋白質相互作用模組。在多種真核生物中發現了分佈在約70個殘基上的SAM結構域。SAM結構域已顯示同源和異源寡聚化，形成多個自締合寡聚化結構。SAM-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。馮威里氏因子（vWF）含有幾個D型結構域：D1和D2存在於N端前肽中，而剩餘的D結構域係寡聚化所必需的。vWF結構域存在於多種血漿蛋白中：補體因子B、C2、C 3和CR4；整合素（l-結構域）；VI、VII、XII和XIV型膠原蛋白；和其他細胞外蛋白質。vWF-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0215】在一些實施方式中，多聚化結構域係二氧四氫蝶啶合酶結構域。二氧四氫蝶啶合酶可組裝成包括二氧四氫蝶啶合酶結構域的60個拷貝的複合物，其中每個二氧四氫蝶啶合酶結構域可與一或多個免疫原融合。在一些實施方式中，二氧四氫蝶啶合酶結構域包括SEQ ID NO: 53-63和142中任一項的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 53-63和142中任一項具有至少95%序列同一性的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 53

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLF

KSLR

SEQ ID NO: 54

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGCIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKCWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 55

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 56

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 142

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLF

KSLR

【0216】二氧四氫蝶啶合酶結構域具有一或多個半胱胺酸取代以引入使由自組裝的亞基形成的二氧四氫蝶啶合酶複合物穩定的一或多個非天然二硫鍵。在一些實施方式中，通過以下來引入一或多個非天然二硫鍵：L121C-K131C、L121CG-K131C、L121GC-K131C、K7C-R40C、I3C-L50C、I82C-K131CG、E5C-R52C或E95C-A101C取代或其組合（如I3C-L50C和I82C-K131CG；E5C-R52C和I82C-K131CG；或E95C-A101C和I82C-K131CG）。殘基編號參照如SEQ ID NO: 53所示的二氧四氫蝶啶合酶亞基。非限制性實例包括：

SEQ ID NO: 57（L121C-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 58（L121CG-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCCFEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 59（L121GC-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCFCEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 60（K7C-R40C）

QIYEGCLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVCHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 61（I3C-L50C，I82C-K131CG）

QCYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITCVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMAN

LFKSLR

SEQ ID NO: 62（E5C-R52C，I82C-K131CG）

QIYCGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVCVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 63（E95C-A101C，I82C-K131CG）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLCRGATPHFDYIASCVSKGLCDLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

【0217】 國際公開案號WO 2020/061564，第25頁第1行至第26頁第20行描述了多肽多聚化的各種方法，將其藉由援引併入本文。

【0218】 在一些實施方式中，多聚化結構域係核黃素合酶結構域。例如，核黃素合酶結構域可以具有與TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW（SEQ ID NO: 143）具有至少95%序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，核黃素合酶結構域可具有SEQ ID NO: 143的胺基酸序列。

【0219】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可包括一或多個多聚化結構域。例如，環狀多核糖核苷酸可包括2、3、4、5、6、7、8、9或10個多聚化結構域。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括兩個多聚化結構域。兩或更多個多聚化結構域可以彼此相鄰。可替代地，兩或更多個多聚化結構域可以被一或多個其他元件隔開。例如，兩個多聚化結構域可以被免疫原隔開。在特定實施方

式中，環狀多核糖核苷酸可包括鐵蛋白結構域和T4 foldon結構域。鐵蛋白和T4 foldon結構域可以連接，例如藉由Gly-Ser連接子。在一些實施方式中，與T4 foldon結構域連接的鐵蛋白結構域具有以下的胺基酸序列：

PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLSGRSGGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTH SLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLTSISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS（SEQ ID NO: 64）。

【0220】合適的多聚化結構域可以選自例如根據國際專利申請WO 2017/081082的SEQ ID NO: 1116-1167的胺基酸序列的列表，或者該等序列的片段或變體。

生產方法

【0221】本揭露提供了用於產生環狀多核糖核苷酸之方法，該等方法包括例如，重組技術或化學合成。例如，用於產生RNA環的DNA分子可以包括天然存在的核酸序列的DNA序列、其修飾形式、或編碼通常在自然界中不存在的合成多肽的DNA序列（例如，嵌合分子或融合蛋白）。DNA和RNA分子可以使用多種技術修飾，該等技術包括但不限於經典誘變技術和重組技術，如定點誘變、化學處理核酸分子以誘導突變、限制性酶切割核酸片段、連接核酸片段、聚合酶鏈反應（PCR）擴增或誘變核酸序列的選定區域、合成寡核苷酸混合物以及連接混合物基團以「建造」核酸分子混合物及其組合。

【0222】環狀多核糖核苷酸可以根據任何可用的技術來製備，該技術包括但不限於化學合成和酶促合成。在一些實施方式中，線性初級構建體或線性RNA可以被環化或連接以產生本文所述之circRNA。環化或連接的機制可通過以下方法來發生：如，化學、酶促、夾板連接或核酶催化的方法。新形成的5'-3'鍵聯可為分子內鍵或分子間鍵。例如，夾板連接酶（如SplintR®連接酶）可用於夾板連

接。根據此方法，單股多核苷酸（夾板）（如單股DNA或RNA）可被設計成與線性多核糖核苷酸的兩端雜交，使得在與單股夾板雜交時可以將兩端並列。因此，夾板連接酶可以催化線性多核糖核苷酸並列的兩端連接，產生circRNA。在一些實施方式中，DNA或RNA連接酶可用於環狀多核苷酸的合成。作為一個非限制性實例，連接酶可為circ連接酶或環狀連接酶。

【0223】 在另一個實例中，線性多核糖核苷酸的5’或3’末端可以編碼連接酶核酶序列，使得在體外轉錄期間，所得線性circRNA包括能夠將線性多核糖核苷酸的5’末端與線性多核糖核苷酸的3’末端連接的活性核酶序列。連接酶核酶可以源自第I組內含子、D型肝炎病毒、髮夾核酶，或者可以藉由SELEX（藉由指數富集進行的配體系統進化）進行選擇。

【0224】 在另一個實例中，可藉由使用至少一個非核酸部分將線性多核糖核苷酸環化或連接。例如，至少一個非核酸部分可與線性多核糖核苷酸5’端附近或3’端附近的區域或特徵反應，以環化或連接線性多核糖核苷酸。在另一個實例中，至少一個非核酸部分可以位於或連接至或靠近線性多核糖核苷酸的5’端或3’端。非核酸部分可為同源的或異源的。作為非限制性實例，非核酸部分可為鍵，如疏水鍵、離子鍵、可生物降解的鍵或可切割的鍵。作為另一個非限制性實例，非核酸部分係連接部分。作為又一個非限制性實例，非核酸部分可為寡核苷酸或肽部分，諸如，如本文所述之適配體或非核酸連接子。

【0225】 在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可以藉由自剪接環化或連接。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸可包括自連接的環E序列。在另一個實施方式中，線性多核糖核苷酸可包括自環化內含子（例如，5’和3’剪接連接）或自環化催化內含子，如I型、II型或III型內含子。I型內含子自剪接序列之非限制性實例可包括源自T4噬菌體基因td的自剪接排列內含子-外顯子序列，和鳥類眼原蟲、魚腥藍細菌（cyanobacterium Anabaena）前tRNA-Leu基因或鳥類眼原蟲

前rRNA的間插序列（IVS）rRNA。

【0226】在一些實施方式中，多核糖核苷酸可包括催化內含子片段，如I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半。第一和第二退火區可以位於催化內含子片段內。I型催化內含子係自剪接核酶，該等自剪接核酶通過雙金屬離子磷醯基轉移機制催化其自身從mRNA、tRNA和rRNA先質上切除。重要的是，RNA本身自催化內含子的去除而不需要外源酶，如連接酶。

【0227】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因或鳥類眼原蟲前rRNA。

【0228】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因，並且3’外顯子片段包括第一退火區，並且5’外顯子片段包括第二退火區。第一退火區可包括例如5至50個，例如10至15個（例如，10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如，5至50個，例如10至15個（例如，10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸。

【0229】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自鳥類眼原蟲前rRNA，並且I型催化內含子片段的3’一半包括第一退火區，並且5’外顯子片段包括第二退火區。在一些實施方式中，3’外顯子包括第一退火區，並且I型催化內含子片段的5’一半包括第二退火區。第一退火區可包括例如，6至50個，例如10至16個（例如，10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如6至50個，例如10至16個（例如，10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸。

【0230】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因、鳥類眼原蟲前rRNA基因或T4噬菌體td基因。

【0231】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自T4噬菌體td基因。3’外顯子片段可包括第一退火區，並且I型催化內含子片段的5’部分可包括第二退火區。第一退火區可包括例如2至16個，例如10至16個（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如2至16個，例如10至16個（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸。

【0232】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半係線性多核苷酸的5’端。

【0233】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半係線性多核糖核苷酸的3’端。

【0234】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATG-3’（SEQ ID NO: 124）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0235】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 125）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0236】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 124的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 125的序列。

【0237】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-

CTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCACAGACTAAATGTCGGTCGGGGAAGA
TGTATTCTTCTCATAAGATATAGTCGGACCTCTCCTTAATGGGAGCTAGCG
GATGAAGTGATGCAACACTGGAGCCGCTGGGAACTAATTTGTATGCGAA
AGTATATTGATTAGTTTTGGAGTACTCG-3’（SEQ ID NO: 126）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0238】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AAATAGCAATATTTACCTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGG
TAGCTAGTCTTTAAACCAATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGT
CAAATTGCGGGAAAGGGGTCAACAGCCGTTCAGTACCAAGTCTCAGGGG
AAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATG
GTCCTAACCACGCAGCCAAGTCCTAAGTCAACAGAT-3’（SEQ ID NO: 127）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0239】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 126的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 127的序列。

【0240】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGT
GACTCGAAACGATAGACAACTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGC
TCTGCATGGTGACATGCAGCTGGATATAATTCCGGGGTAAGATTAACGAC
CTTATCTGAACATAATG-3’（SEQ ID NO: 128）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0241】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-TAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACG
GGGAACCTCTCTAGTAGACAATCCCGTGCTAAATTGTAGGACT-3’（SEQ ID

NO: 129）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0242】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 128的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 129的序列。

【0243】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAGGGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGAAAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA-3’（SEQ ID NO: 130）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0244】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC-3’（SEQ ID NO: 131）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0245】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 130的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 131的序列。

【0246】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAAGGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCACCCCC-3’（SEQ ID NO: 132）的序列具有至少80%（例如，至少85%、

90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0247】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGAGATTTGATTTTGGAG-3’（SEQ ID NO: 133）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0248】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 132的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 133的序列。

【0249】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGCAACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCCACCCCC-3’（SEQ ID NO: 134）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0250】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCAAGATTTTATTTT-3’（SEQ ID NO: 135）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0251】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 134的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 135的序列。

【0252】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’（SEQ ID NO: 136）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0253】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’（SEQ ID NO: 137）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0254】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 136的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 137的序列。

【0255】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’（SEQ ID NO: 138）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0256】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGT GGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAAT CCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 139）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0257】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 138的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 139的序列。

【0258】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTC AAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGC GTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’（SEQ ID NO: 140）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0259】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGT GGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAAT CCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 141）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0260】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 140的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 141的序列。

【0261】在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可以由非核酸部分環化或連接，該非核酸部分引起線性多核糖核苷酸的5’和3’末端、附近或與之相連的原子、

分子表面之間的吸引力。可以藉由分子間作用力或分子內作用力來環化或連接一或多個線性多核糖核苷酸。分子間作用力之非限制性實例包括偶極-偶極力、偶極誘導偶極力、誘導偶極誘導偶極力、凡得瓦力和倫敦分散力。分子內作用力之非限制性實例包括共價鍵、金屬鍵、離子鍵、共振鍵、抓氫鍵（agnostic bond）、偶極鍵、軛合、超軛合和反向鍵。

【0262】在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可包含靠近5’端和靠近3’端的核酶RNA序列。當序列暴露於核酶的其餘部分時，核酶RNA序列可以共價地連接至肽。共價連接至5’端和3’端附近的核酶RNA序列的肽可以相互締合，從而導致線性多核糖核苷酸環化或連接。在另一個實例中，在使用本領域已知的各種方法（如但不限於蛋白質連接）進行連接之後，共價連接至5’端和3’端附近的核酶RNA的肽可導致線性初級構建體或線性mRNA環化或連接。用於在本發明之線性初級構建體或線性多核糖核苷酸中使用的核酶之非限制性實例，或者摻入或共價地連接肽之方法的非窮舉列表在美國專利申請案號US 20030082768中描述，將該專利申請的內容藉由援引以其全文併入本文。

【0263】在又另一實例中，環化的化學方法可用於產生環狀多核糖核苷酸。這樣的方法可以包括但不限於點擊化學（例如，基於炔烴和疊氮化物的方法，或可點擊的鹼基）、烯烴複分解、胺基磷酸酯連接、半縮醛胺-亞胺交聯、鹼基修飾、及其任何組合。

【0264】在另一個實例中，可以使用無細胞系統中（例如，藉由體外轉錄）轉錄的去氧核糖核苷酸模板產生線性RNA來產生環狀多核糖核苷酸。線性多核糖核苷酸產生剪接相容的多核糖核苷酸，該多核糖核苷酸可以自剪接以產生環狀多核糖核苷酸。

【0265】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法（例如，在無細胞系統中）：提供線性多核糖核苷酸；以及在適用於

剪接線性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸；從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0266】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸；視需要純化剪接相容的線性多核糖核苷酸；以及在適用於剪接線性多核糖核苷酸的3’和5’剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸，從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0267】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸（其中該轉錄在適用於剪接線性多核糖核苷酸的3’和5’剪接位點的條件下在溶液中發生），從而產生環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5’斷裂內含子和3’斷裂內含子（例如，用於產生環狀多核糖核苷酸的自剪接構建體）。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5'退火區和3'退火區。

【0268】用於體外轉錄和/或自剪接的合適條件可包括在一或多個方面模擬生理條件的任何條件（例如，溶液或緩衝液，如水性緩衝液或溶液）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1-100 mM之間的Mg2+離子或其鹽（例如，1-100 mM、1-50 mM、1-20 mM、5-50 mM、5-20 mM或5-15 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在1-1000 mM之間的K+離子或其鹽，如KCl（例如，1-1000 mM、1-500 mM、1-200 mM、50-500 mM、100-500 mM或100-300 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在1-1000 mM之間的Cl-離子或其鹽，如KCl（例如，1-1000 mM、1-500 mM、1-200 mM、50-500 mM、100-500 mM或100-300 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1-100 mM之間的Mn2+離子或其鹽，如MnCl2（例如，0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-20 mM、0.1-10 mM、0.1-5 mM、

0.1-2 mM、0.5- 50 mM、0.5-20 mM、0.5-15 mM、0.5-5 mM、0.5-2 mM或0.1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括二硫蘇糖醇（DTT）（例如，1-1000 μM、1-500 μM、1-200 μM、50-500 μM、100-500 μM、100-300 μM、0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-20 mM、0.1-10 mM、0.1-5 mM、0.1-2 mM、0.5-50 mM、0.5-20 mM、0.5-15 mM、0.5-5 mM、0.5-2 mM或0.1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1 mM與100 mM之間的核糖核苷三磷酸（NTP）（例如，0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-10 mM、1-100 mM、1-50 mM或1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括4至10的pH（例如，5至9的pH、6至9的pH或6.5至8.5的pH）。在一些實施方式中，合適的條件包括4°C至50°C的溫度（例如，10°C至40°C、15°C至40°C、20°C至40°C、或30°C至40°C）。

【0269】在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸從去氧核糖核酸（例如，本文所述之去氧核糖核酸，如DNA載體、線性化DNA載體、或cDNA）產生。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸藉由在無細胞系統中轉錄（例如，體外轉錄）從去氧核糖核酸進行轉錄。

【0270】在另一個實例中，環狀多核糖核苷酸可以在細胞，例如原核細胞或真核細胞中產生。在一些實施方式中，向細胞提供外源多核糖核苷酸（例如，本文所述之線性多核糖核苷酸或編碼本文所述之線性多核糖核苷酸的轉錄的DNA分子）。線性多核糖核苷酸可以在細胞中從向細胞提供的外源DNA分子轉錄。線性多核糖核苷酸可以在細胞中從向該細胞瞬時提供的外源重組DNA分子轉錄。在一些實施方式中，外源DNA分子不整合到細胞的基因組中。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸在細胞中從整合到細胞基因組中的重組DNA分子轉錄。

【0271】在一些實施方式中，細胞係原核細胞。在一些實施方式中，包括本文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為細菌細胞或古細菌細胞。例如，包括本

文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為大腸桿菌、嗜鹽古細菌（例如，沃氏嗜鹽富饒菌（*Haloferax volcaniii*））、鞘胺醇單胞菌（*Sphingomonas*）、藍細菌（例如，細長聚球藻（*Synechococcus elongatus*）、螺旋藻（*Spirulina*）（節旋藻（*Arthrospira*））屬物種和集胞藻屬物種（Synechocystis spp.））、鏈黴菌屬（*Streptomyces*）、放線菌（例如，野村菌屬（*Nonomuraea*）、北裡孢菌屬（*Kitasatospora*）或高溫雙岐菌屬（*Thermobifida*））、芽孢桿菌屬物種（*Bacillus spp*）（例如，枯草芽孢桿菌（*Bacillus subtilis*）、炭疽芽孢桿菌（*Bacillus anthracis*）、蠟樣芽孢桿菌（*Bacillus cereus*））、β變形桿菌（例如，伯克氏菌菌屬（*Burkholderia*））、α變形桿菌（例如，農桿菌屬（*Agrobacterium*））、假單胞菌屬（*Pseudomonas*）（例如，戀臭假單胞菌（*Pseudomonas putida*））和腸桿菌。原核細胞可以在培養基中生長。原核細胞可以包含在生物反應器中。

【0272】該細胞可為真核細胞。在一些實施方式中，真核細胞係單細胞真核細胞。在一些實施方式中，單細胞真核生物係單細胞真菌細胞，如酵母細胞（例如，釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和其他酵母屬物種（*Saccharomyces spp.*）、酒香酵母屬物種（*Brettanomyces spp*）、裂殖酵母屬物種（*Schizosaccharomyces spp*）、有孢圓酵母屬物種（*Torulaspora spp*）和畢赤酵母屬物種（*Pichia spp*））。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞動物細胞。單細胞動物細胞可為從多細胞動物分離並在培養中生長的細胞，或其子細胞。在一些實施方式中，單細胞動物細胞可以去分化。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞植物細胞。單細胞植物細胞可為從多細胞植物中分離並在培養中生長的細胞，或其子細胞。在一些實施方式中，單細胞植物細胞可以去分化。在一些實施方式中，單細胞植物細胞來自植物愈傷組織。在實施方式中，單細胞細胞係植物細胞原生質體。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞真核藻類細胞，如單細胞綠藻、矽藻、眼蟲、或甲藻。目的單細胞真核藻類之非限

制性實例包括杜氏鹽藻（*Dunaliella salina*）、普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）、食用小球藻（*Chlorella zofingiensis*）、雨生紅球藻（*Haematococcus pluvialis*）、富油新綠藻（*Neochloris oleoabundans*）和其他新綠球藻屬物種（*Neochloris spp*）、原管藻（*Protosiphon botryoides*）、布朗葡萄藻（*Botryococcus braunii*）、隱球菌屬物種（*Botryococcus braunii*）、萊茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）和其他衣藻屬物種（*Chlamydomonas spp*）。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係原生生物細胞。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係原生動物細胞。

【0273】在一些實施方式中，真核細胞係多細胞真核生物的細胞。例如，多細胞真核生物可選自由以下組成之群組：脊椎動物、無脊椎動物、多細胞真菌、多細胞藻類和多細胞植物。在一些實施方式中，真核生物體係人。在一些實施方式中，真核生物體係非人脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物體係無脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物體係多細胞真菌。在一些實施方式中，真核生物體係多細胞植物。在一些實施方式中，真核細胞係人的細胞或非人類哺乳動物的細胞，如非人類靈長類動物（例如，猴子、猿）、有蹄類動物（例如，牛科動物，包括牛、水牛、野牛、綿羊、山羊和麝牛；豬；駱駝科動物，包括駱駝、美洲駝、和羊駝；鹿，羚羊；以及馬科動物，包括馬和驢）、食肉動物（例如，狗、貓）、齧齒動物（例如，大鼠、小鼠、豚鼠、倉鼠、松鼠）或兔類動物（例如，兔、野兔）。在一些實施方式中，真核細胞係鳥的細胞，如以下鳥類分類群的成員：雞形目（例如，雞、火雞、雉雞、鵪鶉）、雁形目（例如，鴨、鵝）、古顎總目（例如，鴕鳥、鴯鶓）、鴿形目（例如，鴿子、野鴿）或鸚形目（例如，鸚鵡）。在一些實施方式中，真核細胞係節肢動物（例如，昆蟲、蛛形綱、甲殼動物）、線蟲、環節動物、蠕蟲或軟體動物的細胞。在實施方式中，真核細胞係多細胞植物的細胞，如被子植物（其可為雙子葉植物或單子葉植物）或裸子植物（例如，針葉樹、蘇鐵、買麻藤類植物、銀杏）、蕨類、馬尾植物、石鬆類、或苔蘚

植物。在實施方式中，真核細胞係真核多細胞藻類的細胞。

【0274】該等真核細胞可以在培養基中生長。該等真核細胞可以包含在生物反應器中。

【0275】生物反應器之實例包括但不限於攪拌罐（例如，充分混合的）生物反應器和管式（例如，活塞流）生物反應器、氣升式生物反應器、膜攪拌罐、旋轉過濾攪拌罐、振動混合器、流化床反應器、和膜生物反應器。操作生物反應器的模式可為間歇的或連續的過程。當試劑和產物流連續地進出系統時，生物反應器係連續的。間歇式生物反應器可以具有連續的再循環流，但沒有連續的試劑進料或產物收穫。本揭露之一些方法涉及大規模生產環狀多核糖核苷酸。對於大規模生產方法，該方法可以在1升（L）至50 L或更多（例如，5 L、10 L、15 L、20 L、25 L、30 L、35 L、40 L、45 L、50 L或更多）的體積中進行。在一些實施方式中，該方法可以在5 L至10 L、5 L至15 L、5 L至20 L、5 L至25 L、5 L至30 L、5 L至35 L、5 L至40 L、5 L至45 L、10 L至15 L、10 L至20 L、10 L至25 L、20 L至30 L、10 L至35 L，10 L至40 L、10 L至45 L、10 L至50 L、15 L至20 L、15 L至25 L、15 L至30 L、15 L至35 L、15 L至40 L、15 L至45 L或15 L至50 L的體積中進行。在一些實施方式中，生物反應器可產生至少1 g的環狀RNA。在一些實施方式中，生物反應器可以產生1-200 g環狀RNA（例如，1-10 g、1-20g、1-50 g、10-50 g、10-100 g、50-100 g、50-200 g環狀RNA）。在一些實施方式中，產生的量係測量值/升（例如，1-200 g/升）、/批或反應（例如，1-200 g/批或反應）、或/單位時間（例如，1-200 g/小時或/天）。在一些實施方式中，可以串聯使用多於一個生物反應器以增加產生能力（例如，可以串聯使用一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、或九個生物反應器）。

【0276】製備本文所述之環狀多核糖核苷酸之方法描述於以下中：例如，Khudyakov和Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications* [人工DNA：方法與

應用], CRC出版社（2002）；Zhao, **Synthetic Biology: *Tools and Applications* [合成生物學：工具和應用]** (第一版), Academic Press [學術出版社] (2013)；和Egli和Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids* [人工核酸的化學與生物學], (第一版), Wiley-VCH [威利-VCH出版社] (2012)。

【0277】 其他地方也描述了合成環狀多核糖核苷酸之各種方法（參見，例如，美國專利案號US 6210931、美國專利案號US 5773244、美國專利案號US 5766903、美國專利案號US 5712128、美國專利案號US 5426180、美國公開案號US 20100137407、國際公開案號W01992001813和國際公開案號W02010084371，以及Petkovic 等人, Nucleic Acids Res [核酸研究]. 43:2454-65 (2015)；將其各自內容藉由援引以其全文併入本文）。

【0278】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸係純化的，例如，去除了游離核糖核酸、線性或帶切口的RNA、DNA、蛋白質等。在一些實施方式中，可以藉由本領域通常使用的任何已知方法純化環狀多核糖核苷酸。純化方法之非限制性實例包括柱層析法、凝膠切除、粒徑排阻等。

免疫接種

【0279】 在一些實施方式中，本揭露之方法包括用包含本文揭露的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物為受試者免疫接種。在一些實施方式中，免疫原由環狀多核糖核苷酸表現。在一些實施方式中，免疫接種在受試者中誘導針對由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原的免疫響應。在一些實施方式中，免疫接種在受試者中誘導免疫響應（例如，誘導與由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原結合的抗體的產生）。在一些實施方式中，免疫接種係為了治療或預防受試者（例如，人類受試者）的疾病、障礙或病症。在一些實施方式中，免疫接種係為了在受試者中產生抗體（例如在非人哺乳動物中產生抗體用於純化）。在一些實施方式中，免疫原性組成物在單一組成物中包含環狀多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、第一佐劑

或其組合。在一些實施方式中，受試者進一步用第二佐劑免疫接種。在一些實施方式中，受試者進一步用第二免疫原性組成物免疫接種。

【0280】 受試者用包含任何數量的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。受試者用例如包含至少1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。受試者用例如包括至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種、至少10種、至少11種、至少12種、至少13種、至少14種、至少15種、至少20種不同的環狀多核糖核苷酸或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含至多1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含約1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含約1-20、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-20、2-15、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-20、4-15、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、4-4、4-3、5-20、5-15、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、5-10、10-15或15-20種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。不同的環狀多核糖核苷酸具有彼此不同的序列。例如，它們可以包括或編碼不同的免疫原、重疊的免疫原、相似的免疫原或相同的免疫原（例如，具有相同或不同的調控元件、起始序列、啟動子、終止元件或本揭露之其他元件）。在受試者用包含兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種的情況下，這兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸可以處於相同或不同的免疫原性組成物中並且同時或在不同時間免疫接種。可以將包含兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於相同的解剖位置或不同的解剖位置。

【0281】 在一些實施方式中，免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和稀

釋劑、載劑、第一佐劑或其組合。在特定實施方式中，免疫原性組成物包含本文所述之環狀多核糖核苷酸和載劑或不含任何載劑的稀釋劑。在一些實施方式中，包含環狀多核糖核苷酸與不含任何載劑的稀釋劑的免疫原性組成物用於將環狀多核糖核苷酸裸遞送至受試者。在另一個特定實施方式中，免疫原性組成物包含本文所述之環狀多核糖核苷酸和第一佐劑。

【0282】在某些實施方式中，進一步向受試者投與第二佐劑。佐劑增強先天免疫響應，繼而增強受試者中的適應性免疫響應。佐劑可為如下所討論的任何佐劑。在某些實施方式中，佐劑作為免疫原性組成物的一部分與環狀多核糖核苷酸一起配製。在某些實施方式中，佐劑不是包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物的一部分。在某些實施方式中，佐劑與包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物分開投與。在這方面，佐劑與包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物共同投與（例如同時投與）或在不同的時間投與於受試者。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與佐劑。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與佐劑。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與佐劑。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與佐劑。將佐劑投

與到與包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物相同的解剖位置或不同的解剖位置。

【0283】在一些實施方式中，受試者用第二藥劑，例如不是環狀多核糖核苷酸的疫苗（如下所述）進一步免疫接種。該疫苗與包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物共同投與（例如同時投與）或在不同的時間投與於受試者。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與該疫苗。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與該疫苗。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與該疫苗。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與該疫苗。

【0284】受試者可以用免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種任何合適的次數，以實現所需的響應。例如，初免-加強免疫接種策略可用於引發全身和/或黏膜免疫。可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者例如，至少1次、至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次或至少15次或更多次。

【0285】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種，至多2次、至多3次、至多4次、至多5次、至多6次、至多7次、至多8次、至多9次、至多10次、至多15次或至多20次或更少次。

【0286】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20次。

【0287】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種一次。在一些實施方式中，可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者兩次。在一些實施方式中，可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者三次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種四次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種五次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種七次。

【0288】可以選擇合適的時間間隔以間隔兩次或更多次免疫接種。該等時間間隔可以適用於用相同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種多次，例如，相同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合可以經由相同的免疫接種途徑或不同的免疫接種途徑以相同的量或不同的量投與。該等時間間隔可以適用於用不同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合進行多次免疫接種，例如，不同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合可以經由相同的免疫接

種途徑或不同的免疫接種途徑以相同的量或不同的量投與。該等時間間隔可適用於用不同藥劑，例如，包含第一環狀多核糖核苷酸的第一免疫原性組成物和包含第二環狀多核糖核苷酸的第二免疫原性組成物進行免疫接種。該等時間間隔可適用於用不同藥劑，例如，包括第一環狀多核糖核苷酸的第一免疫原性組成物和包括蛋白質免疫原（例如，蛋白質亞基）的第二免疫原性組成物進行免疫接種。在一些實例中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、40、48或72小時。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、17、18、20、21、24、28或30天。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7或8週。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7或8個月。

【0289】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少7小時、至少8小時、至少9小時、至少10小時、至少15小時、至少20小時、至少24小時、至少36小時或至少72小時或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多1小時、至多2小時、至多3小時、至多4小時、至多5小時、至多6小時、至多7小時、至多8小時、至多9小時、至多10小時、至多15小時、至多20小時、至多24小時、至多36小時或至多72小時或更少時間。

【0290】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少15天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天、至少26天、至少27天、至少28天、至少29天或至少30天或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2天、至多3天、至多4天、至多5天、至多6天、至多7天、至多8天、至多9天、至多10天、至多15天、至多20天、至多21

天、至多22天、至多23天、至多24天、至多25天、至多26天、至多27天、至多28天、至多29天、至多30天、至多32天、至多34天或至多36天或更少時間。

【0291】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1週、至少2週、至少3週、至少4週、至少5週、至少6週、至少7週或至少8週或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2週、至多3週、至多4週、至多5週、至多6週、至多7週、至多8週或更少時間。

【0292】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少7個月或至少8個月或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2個月、至多3個月、至多4個月、至多5個月、至多6個月、至多7個月、至多8個月、至多9個月、至多10個月、至多11個月或至多12個月或更少時間。

【0293】在一些實施方式中，該方法包括向受試者預投與一種藥劑以改善對包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的免疫原性響應。在一些實施方式中，藥劑係如本文揭露的免疫原（例如，蛋白質免疫原）。例如，該方法包括在投與包含編碼蛋白質免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸前1至7天投與蛋白質免疫原。在一些實施方式中，在投與包括編碼蛋白質免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸前1、2、3、4、5、6或7天投與蛋白質免疫原。蛋白質免疫原可以作為蛋白質製劑投與，在質體（pDNA）中編碼，存在於病毒樣顆粒（VLP）中，以脂質奈米顆粒的形式配製等。

【0294】在一些實施方式中，該方法包括在向受試者投與了包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸之後，向受試者投與一種藥劑以改善對包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的免疫原性響應。在一些實施方式中，藥劑係如本文揭露的免疫原（例如，蛋白質免疫原）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包含編碼蛋白質免疫原的序列。例如，該方法包括在向受試者投與包括編

碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的1年內（例如，在11個月、10個月、9個月、8個月、7個月、6個月、5個月、4個月、3個月、2個月和1個月內）投與蛋白質免疫原。在一些實施方式中，該方法包括向受試者投與本文所述之任一種環狀多核糖核苷酸或本文所述之任一種免疫原性組成物和蛋白質亞基。

【0295】 在一些實施方式中，蛋白質免疫原具有與由環狀多核糖核苷酸編碼的免疫原相同的胺基酸序列。例如，多肽免疫原可對應於由環狀多核糖核苷酸的序列編碼的多肽免疫原（例如，與之具有90%、95%、96%、97%、98%或100%的胺基酸序列同一性）。在一些實施方式中，蛋白質免疫原具有與由環狀多核糖核苷酸編碼的免疫原的胺基酸序列不同的胺基酸序列。例如，多肽免疫原與由環狀多核糖核苷酸的序列編碼的多肽免疫原具有少於90%（例如，80%、70%、30%、20%或10%）的胺基酸序列同一性。

【0296】 受試者可以在任何合適數目的解剖部位用免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種。可以將相同的免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於多個解剖部位，可以將包括相同或不同的環狀多核糖核苷酸的不同免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於不同的解剖部位，可以將包括相同或不同的環狀多核糖核苷酸的不同免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於相同的解剖部位，或其任何組合。例如，可以將包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於兩個不同的解剖部位，和/或可以將包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於一個解剖部位，並且可以將佐劑投與於不同的解剖部位。

【0297】 任兩或更多個解剖途徑的免疫接種可以經由相同的免疫接種途徑（例如，肌內）或藉由兩或更多種免疫接種途徑來進行。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白

質亞基疫苗）或其組合向受試者的至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少6個解剖部位免疫接種。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合向受試者的至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個或至多10個解剖部位或更少解剖部位免疫接種。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物或佐劑免疫接種至受試者的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個解剖部位。

【0298】 免疫接種可以經由任何合適的途徑。免疫接種途徑之非限制性實例包括靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外、胸骨內、腦內、眼內、病灶內、腦室內、腦池內或實質內，例如注射和輸注。在一些情況下，免疫接種可以經由吸入進行。可以藉由相同或不同的途徑進行兩次或更多次免疫接種。

【0299】 可以向本揭露之受試者投與任何適量的環狀多核糖核苷酸。例如，受試者可以用至少約1 ng、至少約10 ng、至少約100 ng、至少約1 μg、至少約10 μg、至少約100 μg、至少約1 mg、至少約10 mg、至少約100 mg或至少約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。在一些實施方式中，受試者可以用至多約1 ng、至多約10 ng、至多約100 ng、至多約1 μg、至多約10 μg、至多約100 μg、至多約1 mg、至多約10 mg、至多約100 mg或至多約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。在一些實施方式中，受試者可以用約1 ng、約10 ng、約100 ng、約1 μg、約10 μg、約100 μg、約1 mg、約10 mg、約100 mg或約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。

【0300】 在一些實施方式中，該方法進一步包括評價受試者對免疫原的抗體響應。在一些實施方式中，評價係在投與包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸之前和/或之後。

抗體的產生和純化

【0301】用本文所述之多核糖核苷酸（例如，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸）免疫接種受試者可在受試者中誘導產生與由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原結合的抗體（例如，產生抗VZV抗體）。在一些實施方式中，免疫接種係為了在受試者（例如，人或非人動物）中產生抗體，該等抗體係從受試者中定量或純化的（例如，用於診斷或治療用途）。因此，本發明之環狀多核糖核苷酸可用於產生多株或單株抗體（例如，多株或單株抗VZV抗體）之方法中。

【0302】例如，本揭露提供了向非人動物（例如，非人哺乳動物，如山羊、豬、兔、大鼠、小鼠、美洲駝、駱駝、馬、驢或牛（奶牛））投與本文所述之環狀多核糖核苷酸（例如，編碼VZV免疫原的）。環狀多核糖核苷酸可以根據本文所述之任何組成物、配製物、途徑或投與、量或給藥方案投與（例如，視需要與佐劑一起，在同一組成物中或作為給藥方案的一部分投與）。在一些實施方式中，非人動物具有人源化免疫系統（例如，具有人源化免疫系統的牛）。

【0303】可以從用環狀多核糖核苷酸免疫接種的受試者中收集包括由包括如本文揭露的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物產生的多株抗體的血漿。可以定量（例如，用於人類受試者的診斷目的）或純化（例如，用於在治療方法中使用或用於單株抗體的開發）該等多株抗體。血漿可以藉由熟悉該項技術者已知的方法，例如經由血漿去除術來收集。可以從同一受試者收集血漿一次或多次，例如，在免疫接種後的給定時間內各自多次、免疫接種後多次、免疫接種之間多次、或其任意組合。

【0304】與VZV免疫原（例如，本文所述之VZV免疫原）特異性結合的抗體或其片段（例如，多株抗體，如人或人源化多株抗體）可藉由本文所述之方法產生。可以藉由熟悉該項技術者已知的方法從血液（例如，從血漿或血清）中純化抗體或其片段。

【0305】 可以使用熟悉該項技術者熟知的技術從血漿中純化多株抗體。例如，將血漿pH調節至4.8（例如，滴加20%乙酸），以1.0的辛酸/總蛋白比率用辛酸進行分級分離，然後離心澄清（例如，在室溫下10,000 g離心20 min）。將含有多株抗體（例如，IgG多株抗體）的上清液用1 M tris中和至pH 7.5，0.22 μM過濾，並用抗人免疫球蛋白特異性柱（例如，抗人IgG輕鏈特異性柱）進行親和力純化。多株抗體藉由特異性結合雜質（例如來自非人動物的非人抗體）的親和柱進一步純化。將多株抗體儲存在合適的緩衝液，例如由10 mM麩胺酸單鈉鹽、262 mM D-山梨糖醇和吐溫（Tween）（0.05 mg/ml）（pH 5.5）組成的無菌過濾緩衝液中。測定純化的多株抗體的量和濃度。進行HPLC粒徑排阻層析法以確定是否存在聚集物或多聚體。在一些實施方式中，人多株抗體從具有人源化免疫系統的非人動物中根據Beigel, JH等人（Lancet Infect.Dis. [柳葉刀感染病學], 18:410-418 (2018)，包括補充附錄）純化，其藉由援引以其全文併入本文。

【0306】 本揭露還提供了在人類受試者中產生抗體，例如用於治療性治療和/或診斷之方法。例如，本揭露提供了在投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物後，定量受試者中抗VZV抗體的水平之方法。可以藉由本領域已知的方法（例如，進行抗體滴度測定）進行定量，例如藉由從受試者獲得血液樣本，並使用標準技術（如酶聯免疫測定（ELISA））定量抗VZV抗體水平。抗體也可以藉由熟悉該項技術者已知的方法純化。

佐劑

【0307】 佐劑會增強在接受佐劑和/或包含該佐劑的免疫原性組成物的受試者中引發的免疫響應（體液和/或細胞免疫響應）。在一些實施方式中，如本文所揭露的，將佐劑投與於受試者。在一些實施方式中，佐劑用於本文所述之方法中以產生如本文所述之免疫響應。在特定實施方式中，佐劑用於促進受試者中針對由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原的免疫響應。在一些實施方式中，佐劑和

多核糖核苷酸在分開的組成物中共同投與。在一些實施方式中，將佐劑與多核糖核苷酸混合或配製為單一組成物，並投與於受試者。在一些實施方式中，佐劑和環狀多核糖核苷酸在分開的組成物中共同投與。在一些實施方式中，將佐劑與環狀多核糖核苷酸混合或配製為單一組成物以獲得免疫原性組成物，將該免疫原性組成物投與於受試者。

【0308】 佐劑可為環狀多核糖核苷酸的組分（例如，多核糖核苷酸序列），可為由多核糖核苷酸的表現序列編碼的多肽佐劑，可為並非由多核糖核苷酸編碼的分子（例如小分子、多肽或核酸分子）。佐劑可以與多核糖核苷酸一起配製在同一藥物組成物中。佐劑可以與多核糖核苷酸組合分開投與（例如，作為單獨的藥物組成物）。

【0309】 在一些實施方式中，佐劑由環狀多核糖核苷酸編碼。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多於一種佐劑。例如，環狀多核糖核苷酸編碼2至100種佐劑。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2至10種佐劑。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2種佐劑。由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種佐劑可包括N端訊息序列，例如，將表現的多肽佐劑引導至分泌途徑的N端訊息序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼3種佐劑。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼4種佐劑。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼5種佐劑。在一些實施方式中，佐劑由編碼一或多種免疫原的同一多核糖核苷酸編碼。佐劑和免疫原可以在同一多核糖核苷酸上共同遞送。在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的佐劑係作為先天性免疫系統刺激因子的序列（例如，多核糖核苷酸序列）。先天性免疫系統刺激因子序列可以包括至少5個、至少10個、至少20個、至少50個、至少100個或至少500個核糖核苷酸。先天性免疫系統刺激因子序列可以包括5至1000個、10至500個、20至500個、10至100個、20至100個、20至50個、100至500個、500至1000個或10至1000個核糖核苷酸。例如，作為先天性免疫系

統刺激因子的序列可以選自富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體。

【0310】 佐劑可為TH1佐劑和/或TH2佐劑。本揭露考慮的其他佐劑包括但不限於以下的一或多種：

含礦物質的組成物。適於在本揭露中用作佐劑的含礦物質的組成物包括礦物鹽，諸如鋁鹽和鈣鹽。本揭露包括礦物鹽，如氫氧化物（例如羥基氧化物）、磷酸鹽（例如羥基磷酸鹽、正磷酸鹽）、硫酸鹽等，或不同礦物化合物的混合物，其中化合物呈任何合適的形式（例如凝膠、結晶、無定形形式等）。鈣鹽包括磷酸鈣（例如，「CAP」）。鋁鹽包括氫氧化物、磷酸鹽、硫酸鹽等。

【0311】 油乳劑組成物。適用於在本揭露中用作佐劑的油乳劑組成物包括角鯊烯-水乳劑，如MF59（5%角鯊烯、0.5%吐溫80和0.5% Span，使用微流化器配製為亞微米顆粒）、AS03（水包油乳劑中的α-生育酚、角鯊烯和聚山梨醇酯80）、Montanide配製物（例如Montanide ISA 51、Montanide ISA 720）、不完全弗氏佐劑（IFA）、完全弗氏佐劑（CFA）和不完全弗氏佐劑（IFA）。

【0312】 小分子。適於在本揭露中用作佐劑的小分子包括咪喹莫特或847、瑞喹莫德或R848和嘎德莫特。

【0313】 聚合物奈米顆粒。適於在本揭露中用作佐劑的聚合物奈米顆粒包括聚(a-羥基酸)、聚羥基丁酸、聚內酯（包括聚己內酯）、聚對二氧環己酮、聚戊內酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚氰基丙烯酸酯、酪胺酸衍生的聚碳酸酯、聚乙烯基吡咯啶酮或聚酯-醯胺及其組合。

【0314】 皂苷（即，糖苷，附接至一條或多條糖側鏈的多環苷元）。適於在本揭露中用作佐劑的皂苷配製物包括純化配製物，諸如QS21，以及脂質配製物，諸如ISCOM和ISCOM基質。QS21作為STIMULON（TM）在市場上銷售。皂苷配製物也可以包含固醇，諸如膽固醇。皂苷和膽固醇的組合可用於形成稱為免

疫刺激複合物（ISCOM）的獨特顆粒。ISCOM典型地還包含磷脂，諸如磷脂醯乙醇胺或磷脂醯膽鹼。任何已知的皂苷都可用於ISCOM中。較佳的是，ISCOM包含QuilA、QHA和QHC中的一或多種。視需要，ISCOM可以不含另外的洗滌劑。

【0315】脂多糖。適於在本揭露中使用的佐劑包括腸細菌脂多糖（LPS）的無毒衍生物。此類衍生物包括單磷醯基脂質A（MPLA）、哌喃葡萄糖基脂質A（GLA）和3-O-去醯化MPL（3dMPL）。3dMPL係3去氧-醯化單磷醯基脂質A與4、5或6條醯化鏈的混合物。其他無毒的LPS衍生物包括單磷醯基脂A模擬物，如胺基烷基葡糖胺磷酸鹽衍生物（例如，RC-529）。

【0316】脂質體。適於在本揭露中用作佐劑的脂質體包括病毒體和CAF01。

【0317】脂質奈米顆粒。適於在本揭露中使用的佐劑包括脂質奈米顆粒（LNP）及其組分。

【0318】脂肽（即，包含一或多個脂肪酸殘基和兩或更多個胺基酸殘基的化合物）。適於在本揭露中用作佐劑的脂肽包括Pam2（Pam2CSK4）和Pam3（Pam3CSK4）。

【0319】糖脂。適於在本揭露中用作佐劑的糖脂包括索狀因子（海藻糖二黴菌酸酯）。

【0320】從革蘭氏陰性細菌或革蘭氏陽性細菌衍生（合成或純化）的肽和肽聚糖，諸如MDP（N-乙醯-胞壁醯-L-丙胺醯-D-異麩醯胺酸）適於在本揭露中用作佐劑。

【0321】適用於用作佐劑的碳水化合物（含碳水化合物）或多糖包括右旋糖酐（例如，支鏈微生物多糖）、硫酸右旋糖酐、香菇多糖、酵母聚糖、β-葡聚糖、deltin、甘露聚糖和幾丁質。

【0322】基於RNA的佐劑。適用於在本揭露中使用的基於RNA的佐劑係聚

IC、聚IC:LC、具有或不具有5’三磷酸的髮夾RNA、病毒序列、含聚U的序列、dsRNA天然或合成RNA序列（例如，聚I:C）和核酸類似物（例如，環狀GMP-AMP或其他環狀二核苷酸，例如，環狀二-GMP、免疫刺激性鹼基類似物，例如，C8-取代和N7,C8-二取代的鳥嘌呤核糖核苷酸）。在一些實施方式中，佐劑係本文所述之環狀多核糖核苷酸的線性多核糖核苷酸對應物。

【0323】 基於DNA的佐劑。適用於在本揭露中使用的基於DNA的佐劑包括CpG（例如，CpG1018）、dsDNA和天然或合成的免疫刺激DNA序列。

【0324】 蛋白質或肽。適於在本揭露中用作佐劑的蛋白質和肽包括鞭毛蛋白融合蛋白、MBL（甘露糖結合凝集素）、細胞介素和趨化因子。

【0325】 病毒顆粒。適於用作佐劑的病毒顆粒包括病毒體（磷脂細胞膜雙層）。

【0326】 在本揭露中使用的佐劑可為細菌來源的，如鞭毛蛋白、LPS或細菌毒素（例如腸毒素（蛋白質），例如熱不穩定毒素或霍亂毒素）。在本揭露中使用的佐劑可為雜交分子，諸如軛合至咪喹莫特的CpG。在本揭露中使用的佐劑可為真菌或與卵菌微生物相關分子模式（MAMP），諸如幾丁質或β-葡聚糖。在一些實施方式中，佐劑係無機奈米顆粒，如金奈米棒或基於二氧化矽的奈米顆粒（例如介孔二氧化矽奈米顆粒（MSN））。在一些實施方式中，佐劑係用糖脂免疫調節劑（海藻糖6,6-二山嵛酸酯（TDB），其可為位於分枝桿菌細胞壁上的索狀因子的合成變體）穩定的多組分佐劑或佐劑體系，如AS01、（AS01B）、AS03、AS04（MLP5 +明礬）、明礬（氫氧化鋁和氫氧化鎂的混合物）、氫氧化鋁、氫氧化鎂、CFA（完全弗氏佐劑：IFA+肽聚糖+海藻糖二黴菌酸酯）、CAF01（陽離子脂質體媒介物的兩組分體系（二甲基雙十八烷基銨（DDA））。

【0327】 細胞介素。佐劑可為編碼細胞介素的部分或全長DNA，該細胞介素如促炎性細胞介素（例如，GM-CSF、IL-1α、IL-1β、TGFβ、TNF-α、TNF-β）、

Th-1誘導細胞介素（例如，IFN-γ、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18）或Th-2誘導細胞介素（例如，IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13）。

【0328】趨化因子。佐劑可為編碼趨化因子（如，MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、Rantes或TCA-3）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0329】佐劑可為編碼共刺激分子的部分或全長DNA，共刺激分子諸如CD80、CD86、CD40-L、CD70或CD27。

【0330】佐劑可為編碼先天性免疫系統刺激因子（部分、全長或突變的）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA），該先天性免疫系統刺激因子如TLR4、TLR3、TLR3、TLR9、TLR7、TLR8、TLR7、RIG-I/DDX58或MDA-5/IFIH1；或組成型活性(ca)先天性免疫刺激因子，諸如caTLR4、caTLR3、caTLR3、caTLR9、caTLR7、caTLR8、caTLR7、caRIG-I/DDX58或caMDA-5/IFIH1。

【0331】佐劑可為編碼銜接子或傳訊分子的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA），該銜接子或傳訊分子如STING（例如caSTING）、TRIF、TRAM、MyD88、IPS1、ASC、MAVS、MAPK、IKK-α、IKK複合物、TBK1、β-連環蛋白和半胱天冬酶1。

【0332】佐劑可為編碼轉錄激活因子，如可以上調免疫響應的轉錄激活因子（例如，AP1、NF-κB、IRF3、IRF7、IRF1或IRF5）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。佐劑可為編碼細胞介素受體諸如IL-2β、IFN-γ或IL-6的部分或全長DNA。

【0333】佐劑可為編碼細菌組分，如鞭毛蛋白或MBL的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0334】佐劑可為編碼先天性免疫系統任何組分的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0335】在一些實施方式中，將編碼一或多種免疫原的環狀多核糖核苷酸與佐劑（例如，作為與環狀多核糖核苷酸分開的分子實體的佐劑，或在分開的環狀多核糖核苷酸上編碼的佐劑）組合投與於受試者。如說明書全篇使用的術語「與.....組合」包括作為治療方案的一部分投與的任何兩種組成物。這可以包括例如配製成單一藥物組成物的多核糖核苷酸和佐劑。這還包括，例如，根據限定的治療或給藥方案，作為分開的組成物投與給受試者的多核糖核苷酸和佐劑。佐劑可以在多核糖核苷酸投與之前、基本上同時或之後投與給受試者。佐劑可以在多核糖核苷酸投與之前或之後的1天、2天、5天、10天、20天、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月或6個月內投與。佐劑可以藉由與多核糖核苷酸相同的投與途徑（例如，皮內、肌內、皮下、靜脈內、腹膜內、局部或口服）或不同的途徑來投與。

遞送

【0336】本文所述之環狀多核糖核苷酸可以包括在含載劑或不含載劑的藥物組成物中。

【0337】本文所述之藥物組成物可為配製的，例如包括載劑（如藥物載劑和/或聚合物載劑，例如脂質體），並藉由已知方法遞送至有需要的受試者（例如人或非人農業動物或家畜，例如牛、狗、貓、馬、家禽）。此類方法包括但不限於轉染（例如，脂質介導的陽離子聚合物、磷酸鈣、樹狀聚合物）；電穿孔或其他破壞膜的方法（例如，核轉染）、病毒遞送（例如，慢病毒、反轉錄病毒、腺病毒、AAV）、顯微注射、微粒轟擊（「基因槍」）、fugene、直接聲波載入、細胞擠壓、光轉染、原生質體融合、刺穿感染、磁轉染、胞泌體介導的轉移、脂質奈米顆粒介導的轉移、及其任何組合。遞送方法也描述於例如Gori等人, Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy [人類基因治療用CRISPR/Cas9基因組編輯技術的傳遞和特異

性].Human Gene Therapy [人類基因治療].2015年7月, 26(7): 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074；和Zuris等人, Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [陽離子脂質介導的蛋白質遞送能夠在體外和體內進行有效的基於蛋白質的基因組編輯].Nat Biotechnol [自然生物技術]. 2014年10月30日;33(1):73-80。

【0338】在一些實施方式中，可以以「裸」遞送配製物遞送環狀多核糖核苷酸。裸遞送配製物將環狀多核糖核苷酸遞送至細胞，無需借助於載劑並且無需對環狀多核糖核苷酸進行共價修飾，也無需對環狀多核糖核苷酸進行部分或完全封裝。

【0339】裸遞送配製物係不含載劑的配製物並且其中環狀多核糖核苷酸沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾，並且環狀多核糖核苷酸沒有部分或完全封裝。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸未與有助於遞送至細胞的部分（如蛋白質、小分子、顆粒、聚合物或生物聚合物）共價結合。在一些實施方式中，可以將環狀多核糖核苷酸與魚精蛋白或魚精蛋白鹽（例如硫酸魚精蛋白）一起在遞送配製物中遞送。

【0340】沒有與有助於遞送至細胞的部分結合的共價修飾的多核糖核苷酸可以不含經修飾的磷酸基團。例如，沒有與有助於遞送至細胞的部分結合的共價修飾的多核糖核苷酸可以不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸鹽、硼代磷酸酯、磷酸氫鹽、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯或磷酸三酯。

【0341】在一些實施方式中，裸遞送配製物可以不含以下任何或全部物質：轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。例如，裸遞送配製物可以不含植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精、酸酐改性的植物糖原β-糊精、脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、

亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、1-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）、人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0342】 裸遞送配製物可以包含非載劑賦形劑。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可以包括不表現出活性細胞穿透作用的非活性成分。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可以包括緩衝劑，例如PBS。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可為溶劑、非水性溶劑、稀釋劑、懸浮助劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑、潤滑劑、或油。

【0343】 在一些實施方式中，裸遞送配製物可以包含稀釋劑，諸如腸胃外可接受的稀釋劑。稀釋劑（例如，腸胃外可接受的稀釋劑）可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。在一些實施方式中，稀釋劑（例如，腸胃外可接受的稀釋劑）可為RNA增溶劑、緩衝劑或等滲劑。RNA增溶劑之實例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲醯胺和2-丙醇。緩衝劑之實例包括2-(N-味啉代)乙磺酸（MES）、Bis-Tris、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸（ADA）、N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸（ACES）、哌啡-N,N′-雙(2-乙磺酸)（PIPES）、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]乙磺酸（TES）、3-(N-味啉代)丙烷磺酸（MOPS）、4-(2-羥乙基)-1-哌啡

乙磺酸（HEPES）、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸鹽。等滲劑之實例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

【0344】在一些實施方式中，配製物包括細胞穿透劑。在一些實施方式中，配製物係局部配製物，並且包括細胞穿透劑。細胞穿透劑可以包括有機化合物，諸如具有一或多個羥基官能基的醇。在一些情況下，細胞穿透劑包括醇，諸如但不限於一元醇、多元醇、不飽和脂族醇和脂環醇。細胞穿透劑可以包括以下的一或多種：甲醇、乙醇、異丙醇、苯氧乙醇、三乙醇胺、苯乙醇、丁醇、戊醇、鯨蠟醇、乙二醇、丙二醇、變性醇、苯甲醇（特別是變性醇）、二醇、硬脂醇、鯨蠟硬脂醇、薄荷醇、聚乙二醇（PEG）-400、乙氧基化脂肪酸或羥乙基纖維素。在某些實施方式中，細胞穿透劑包括乙醇。細胞穿透劑可以包括如WO 2020/180751或WO 2020/180752中所述之任何量或任何配製物中的任何細胞滲透劑，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0345】在一些實施方式中，如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、如本文揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥處於腸胃外核酸遞送系統中。腸胃外核酸遞送系統可以包括如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、所揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥和腸胃外可接受的稀釋劑。在一些實施方式中，腸胃外核酸遞送系統中的如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、如本文揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥不含任何載劑。

【0346】本揭露進一步涉及包括本文所述之環狀多核糖核苷酸的宿主或宿主細胞。在一些實施方式中，宿主或宿主細胞係脊椎動物、哺乳動物（例如人）或其他生物體或細胞。

【0347】在一些實施方式中，與由參考化合物（例如對應於所述環狀多核糖核苷酸的線性多核苷酸）觸發的響應相比，環狀多核糖核苷酸降低或不能產生

宿主免疫系統的不需要的響應。在實施方式中，環狀多核糖核苷酸在宿主中係非免疫原性的。一些免疫響應包括但不限於體液免疫響應（例如，免疫原特異性抗體的產生）和細胞介導的免疫響應（例如，淋巴球增殖）。

【0348】在一些實施方式中，使宿主或宿主細胞接觸（例如，遞送至或投與於）環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，宿主係哺乳動物，諸如人。可以在投與後的任何時間測量宿主中環狀多核糖核苷酸或線性多核糖核苷酸、表現產物或兩者的量。在某些實施方式中，測定培養物中宿主生長的時程。如果在環狀多核糖核苷酸或線性多核糖核苷酸的存在下生長增加或減少，則環狀多核糖核苷酸或表現產物或兩者都被認為在增加或減少宿主的生長方面係有效的。

【0349】將如本文所述之環狀多核糖核苷酸分子遞送至細胞、組織或受試者的方法包括將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥投與於細胞、組織或受試者。

【0350】在一些實施方式中，細胞係真核細胞。在一些實施方式中，細胞係哺乳動物細胞。在一些實施方式中，細胞係有蹄類動物細胞。在一些實施方式中，細胞係動物細胞。在一些實施方式中，細胞係免疫細胞。在一些實施方式中，組織係結締組織、肌肉組織、神經組織或上皮組織。在一些實施方式中，組織係器官（例如，肝、肺、脾、腎等）。

【0351】在一些實施方式中，遞送方法係體內方法。例如，如本文所述之環狀多核糖核苷酸的遞送方法包括向有需要的受試者腸胃外投與，將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經腸胃外投與給有需要的受試者。再如，將環狀多核糖核苷酸遞送至受試者的細胞或組織的方法包括將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥腸胃外投與至該細胞或組織。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的量在受試者中有效地引發生物響應。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的量有效地對受試者的細胞或組織具有生物學作用。

在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥包含載劑。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥包含稀釋劑而不含任何載劑。

【0352】在一些實施方式中，腸胃外投與藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥。在一些實施方式中，藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥通過靜脈內、動脈內、腹膜內、皮內、顱內、鞘內、淋巴內、皮下或肌內投與。在一些實施方式中，腸胃外投與係靜脈內、肌內、眼、皮下、皮內或局部投與。

【0353】在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經肌內投與。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經皮下投與。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥局部投與。在一些實施方式中，該藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經氣管內投與。

【0354】在一些實施方式中，該藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥藉由注射投與。投與可為全身投與或局部投與。在一些實施方式中，如本文所述之任何遞送方法均用載劑進行。在一些實施方式中，無需借助於載劑或細胞穿透劑即可進行如本文所述之任何遞送方法。

【0355】在一些實施方式中，在投與步驟後至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天在細胞、組織或受試者中檢測到環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物。在一些實施方式中，在投與步驟之前評價細胞、組織或受試者中環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物的存在。在一些實施方式中，在投與步驟之後評價細胞、組織或受試者中環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物的存在。

配製物

【0356】在本揭露之一些實施方式中，藉由本文所述之方法製備的多核糖

核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）或其製劑可被配製在組成物中，例如用於遞送到細胞、植物、無脊椎動物、非人脊椎動物或人類受試者的組成物，例如農業、獸用或藥物組成物。在一些實施方式中，多核糖核苷酸被配製在藥物組成物中。在一些實施方式中，組成物包括多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、佐劑或其組合。在特定實施方式中，組成物包括本文所述之多核糖核苷酸和載劑或不含任何載劑的稀釋劑。在一些實施方式中，包括多核糖核苷酸和不含任何載劑的稀釋劑的組成物用於將多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）裸遞送給受試者。

【0357】 藥物組成物可視需要包括一或多種額外活性物質，例如治療和/或預防活性物質。藥物組成物可以視需要包括充當本文所述之組成物（例如，包含環狀多核糖核苷酸的組成物）的媒介物或介質的非活性物質，諸如由美國食品和藥品管理局（United States Food and Drug Administration）（FDA）批准並且在非活性成分數據中列出的任一種非活性成分。本發明之藥物組成物可為無菌的和/或無熱原的。可以在以下中找到藥學配製物的配製和/或生產中的一般考慮：例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明頓：藥學科學與實踐] 第21版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005（藉由援引併入本文）。非活性物質之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水性溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑（例如，磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））、潤滑劑、油、及其混合物。

【0358】 儘管本文提供的藥物組成物的描述主要針對適合於投與於人的藥物組成物，但是熟悉該項技術者應理解，此類組成物通常適合於投與於任何其他動物，例如非人動物，例如非人哺乳動物。為了使組成物適合於投與於各種動物而對適合於投與於人的藥物組成物的修飾係熟知的，並且普通獸醫藥理師可僅通過普通實驗（如果有的話）來設計和/或進行此種修飾。我們設想向其投與

藥物組成物的受試者包括但不限於人和/或其他靈長類動物；哺乳動物，包括商業相關的哺乳動物，如牛、豬、馬、綿羊、貓、狗、小鼠和/或大鼠；和/或鳥類，包括商業相關的鳥類，如家禽、雞、鴨、鵝和/或火雞。

【0359】本文描述的藥物組成物的配製物可以藉由藥理學領域中已知的或以後開發的任何方法來製備。通常，這樣的製備方法包括以下步驟：使活性成分與賦形劑和/或一或多種其他輔助成分結合，然後，如果必要和/或期望的話，將產品分開、成形和/或包裝。

【0360】在一些實施方式中，製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係存在不多於1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、15 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、1 μg/ ml、10 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml、200 g/ml、300 μg/ml、400 μg/ml、500 μg/ml、600 μg/ml、700 μg/ml、800 μg/ml、900 μg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml或2 mg/ml的線性多核糖核苷酸分子。

【0361】在一些實施方式中，關於製劑中存在的環狀多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子至少30%（w/w）、40%（w/w）、50%（w/w）、60%（w/w）、70%（w/w）、80%（w/w）、85%（w/w）、90%（w/w）、91%（w/w）、92%（w/w）、93%（w/w）、94%（w/w）、95%（w/w）、96%（w/w）、97%（w/w）、98%（w/w）、99%（w/w）、99.1%（w/w）、99.2%（w/w）、99.3%（w/w）、99.4%（w/w）、99.5%（w/w）、99.6%（w/w）、99.7%（w/w）、99.8%（w/w）、99.9%（w/w）、或100%（w/w）的分子。

【0362】在一些實施方式中，關於製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、15%（w/w）、20%（w/w）、

25%（w/w）、30%（w/w）、40%（w/w）、50%（w/w）的線性多核糖核苷酸分子。

【0363】在一些實施方式中，關於製劑中存在的帶切口多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、或15%（w/w）的帶切口多核糖核苷酸分子。

【0364】在一些實施方式中，關於製劑中存在的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、15%（w/w）、20%（w/w）、25%（w/w）、30%（w/w）、40%（w/w）、50%（w/w）的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子。在一些實施方式中，藥物製劑係最終環狀多核糖核苷酸成品藥的中間體藥物製劑。在一些實施方式中，藥物製劑係原料藥或活性藥物成分（API）。在一些實施方式中，藥物製劑係用於投與於受試者的成品藥。

【0365】在一些實施方式中，對環狀多核糖核苷酸的製劑（在減少線性RNA之前、期間或之後）進一步處理以基本上去除DNA、蛋白質污染物（例如，細胞蛋白質（如宿主細胞蛋白質）或蛋白質製程雜質）、內毒素、單核苷酸分子、和/或與製程有關的雜質。

【0366】在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物可以包含：(i) 本文揭露的化合物（例如，環狀多核糖核苷酸）；(ii) 緩衝劑；(iii) 非離子型洗滌劑；(iv) 張度劑；和/或 (v) 穩定劑。在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物係穩定的液體藥物配製物。在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物包含魚精蛋白或魚精蛋白鹽（例如，硫酸魚精蛋白）。

【0367】本揭露提供了包括本文所述之環狀多核糖核苷酸的免疫原性組

成物。本揭露之免疫原性組成物可以包含稀釋劑或載劑、佐劑或其任何組合。本揭露之免疫原性組成物還可以包括一或多種免疫調節劑，例如一或多種佐劑。佐劑可以包括下面進一步討論的TH1佐劑和/或TH2佐劑。在一些實施方式中，免疫原性組成物包含不含任何載劑的稀釋劑，並且用於將環狀多核糖核苷酸裸遞送至受試者。

【0368】 本揭露之免疫原性組成物用於在受試者中引起免疫響應。免疫響應較佳的是保護性的，並且較佳的是涉及抗體響應（通常包括IgG）和/或細胞介導的免疫響應。例如，用包括本揭露之環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物使受試者免疫以誘導免疫響應。在另一個實例中，用包括含免疫原的線性多核糖核苷酸的免疫原性組成物使受試者免疫，以刺激與免疫原結合的抗體的產生。藉由該等用途和方法在受試者中引起免疫響應，可以保護受試者免受各種疾病和/或感染，例如免受如上所討論的細菌和/或病毒疾病。在某些實施方式中，免疫原性組成物係疫苗組成物。根據本揭露的疫苗可為預防性的（即預防感染）或治療性的（即治療感染），但是典型地將是預防性的。在一些實施方式中，受試者係哺乳動物。在一些實施方式中，受試者係動物，較佳的是哺乳動物，例如人。在一個實施方式中，受試者係人。在其他實施方式中，受試者係非人哺乳動物，例如選自牛（例如，奶牛和肉牛）、綿羊、山羊、豬、馬、狗或貓。在其他實施方式中，受試者係鳥，例如母雞或公雞、火雞、鸚鵡。在一些實施方式中，動物不是小鼠或兔子或牛。在特定實施方式中，在免疫原性組成物用於預防用途的情況下，人係兒童（例如，幼兒或嬰兒）或青少年。在另一個實施方式中，在免疫原性組成物用於治療用途的情況下，人係青少年或成人。旨在用於兒童的免疫原性組成物也可以投與給成人，例如以評估安全性、劑量、免疫原性等。

【0369】 根據本揭露製備的免疫原性組成物可用於治療兒童和成人。人類受試者可小於1歲、小於5歲、1-5歲、5-15歲、15-55歲或至少55歲。在特定實施

方式中，接受免疫原性組成物的人類受試者係老年人（例如，≥50歲、≥60歲和≥65歲）、年輕人（例如，≤5歲）、住院患者、醫護人員、武裝部隊和軍事人員、孕婦、長期病患者或免疫缺陷患者。然而，免疫原性組成物不僅僅適合於該等群組，並且可以更普遍地用於群體中。

【0370】 在一些實施方式中，受試者進一步用佐劑免疫接種。在一些實施方式中，受試者進一步用疫苗免疫接種。

防腐劑

【0371】 本文提供的組成物或藥物組成物可以包括用於單次投與的材料，或者可以包括用於多次投與的材料（例如，「多劑量」套組（kit））。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。該組成物或藥物組成物可以包含一或多種防腐劑，諸如硫柳汞或2-苯氧基乙醇。防腐劑可用於防止使用過程中的微生物污染。合適的防腐劑包括：殺藻胺、硫柳汞、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯乙醇、依地酸二鈉、山梨酸、Onamer M或熟悉該項技術者已知的其他藥劑。在眼科產品中，例如，此類防腐劑可以以0.004%至0.02%的水平採用。在本文所述之組成物中，防腐劑（例如殺藻胺）可以按重量計以0.001%至小於0.01%，例如0.001%至0.008%，較佳的是約0.005%的水平採用。

【0372】 多核糖核苷酸可易受周圍環境中可能豐富的RNA酶的影響。本文提供的組成物可以包含抑制RNA酶活性的試劑，從而防止多核糖核苷酸降解。在一些情況下，該組成物或藥物組成物包含熟悉該項技術者已知的任何RNA酶抑制劑。可替代地或另外，可以在無RNA酶的環境中製備本文提供的組成物中的多核糖核苷酸和細胞穿透劑和/或藥學上可接受的稀釋劑或載劑、媒介物、賦形劑或其他試劑。該組成物可以在無RNA酶的環境中配製。

【0373】 在一些情況下，本文提供的組成物可為無菌的。可以在本領域已知的合適的媒介物中將組成物配製成無菌溶液或懸浮液。可以藉由常規的已知

滅菌技術對組成物進行滅菌，例如，可以對組成物進行無菌過濾。

鹽

【0374】在一些情況下，本文提供的組成物或藥物組成物包括一或多種鹽。為了控制張度，本文提供的組成物可以包括生理鹽如鈉鹽。其他鹽可以包括氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉和/或氯化鎂等。在一些情況下，該組成物與一或多種藥學上可接受的鹽一起配製。該一或多種藥學上可接受的鹽可以包括無機離子，諸如鈉、鉀、鈣、鎂離子等的那些鹽。此類鹽可以包括與無機酸或有機酸的鹽，該等無機酸或有機酸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、對甲苯磺酸、乙酸、富馬酸、琥珀酸、乳酸、苦杏仁酸、蘋果酸、檸檬酸、酒石酸或馬來酸。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

緩衝劑/pH

【0375】本文提供的組成物或藥物組成物可以包括一或多種緩衝劑，如Tris緩衝劑；硼酸鹽緩衝劑；琥珀酸鹽緩衝劑；組胺酸緩衝劑（例如，含氫氧化鋁佐劑）；或檸檬酸鹽緩衝劑。在一些情況下，包含5-20 mM範圍內的緩衝劑。

【0376】本文提供的組成物或藥物組成物可以具有約5.0至約8.5、約6.0至約8.0、約6.5至約7.5、或約7.0至約7.8的pH。該組成物或藥物組成物可以具有約7的pH。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

洗滌劑/界面活性劑

【0377】根據預期的投與途徑，本文提供的組成物或藥物組成物可以包括一或多種洗滌劑和/或界面活性劑，例如聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯界面活性劑（通常稱為「吐溫（Tween）」），例如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80；以DOWFAX™商標出售的環氧乙烷（EO）、環氧丙烷（PO）和/或環氧丁烷（BO）的共聚物，諸如線性EO/PO嵌段共聚物；重複的乙氧基(氧基-1,2-乙二基)基團的數目可以變化的辛基酚聚醚，例如辛基酚聚醚-9（Triton X-100或三級辛基苯氧基聚乙氧基

乙醇）；(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇（IGEPAL CA-630/NP-40）；磷脂，諸如磷脂醯膽鹼（卵磷脂）；壬基酚聚氧乙烯醚，諸如Tergitol™ NP系列；衍生自月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚（稱為Brij界面活性劑），諸如三乙二醇單月桂基醚（Brij 30）；和脫水山梨糖醇酯（通常稱為「SPAN」），諸如脫水山梨糖醇三油酸酯（Span 85）和脫水山梨糖醇單月桂酸酯、辛基酚聚醚（諸如辛基酚聚醚9（Triton X-100）或三級辛基苯氧基聚乙氧基乙醇）、十六烷基三甲基溴化銨（「CTAB」）或去氧膽酸鈉。該一或多種洗滌劑和/或界面活性劑可僅以痕量存在。在一些情況下，該組成物可以包含小於各1 mg/ml的辛基酚聚醚-10和聚山梨醇酯80。在本文中可使用非離子界面活性劑。界面活性劑可以按其「HLB」（親水/親脂平衡值）進行分類。在一些情況下，界面活性劑的HLB為至少10、至少15和/或至少16。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

稀釋劑

【0378】在一些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和稀釋劑。

【0379】稀釋劑可為非載劑賦形劑。非載劑賦形劑用作組成物（諸如，如本文所述之環狀多核糖核苷酸）的媒介物或介質。非載劑賦形劑之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑（例如，磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））、潤滑劑、油及其混合物。非載劑賦形劑可為經美國食品和藥物管理局（FDA）批准並列在非活性成分數據庫中的不表現出細胞穿透作用的任一種非活性成分。非載劑賦形劑可為適於投與於非人動物（例如，適合獸醫用途）的任何非活性成分。為了使組成物適於向各種動物投與，對適於向人投與的組成物的修飾得到很好的理解，並且普通技術的獸醫藥理師可以僅通過普通的實驗（如果有）來設計

和/或進行此類修飾。

【0380】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以以裸遞送配製物的形式遞送，諸如包含稀釋劑。裸遞送配製物將環狀多核糖核苷酸遞送至細胞，無需借助於載劑並且無需對環狀多核糖核苷酸、加帽的多核糖核苷酸或其複合物進行修飾或部分或完全封裝。

【0381】 裸遞送配製物係不含載劑的配製物並且其中環狀多核糖核苷酸沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾，或者沒有對環狀多核糖核苷酸的部分或完全封裝。在一些實施方式中，沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸係未與蛋白質、小分子、顆粒、聚合物或生物聚合物共價結合的多核糖核苷酸。沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸不含經修飾的磷酸基團。例如，沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸鹽、硼代磷酸酯、磷酸氫鹽、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯或磷酸三酯。

【0382】 在一些實施方式中，裸遞送配製物不含以下任何或全部：轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。在一些實施方式中，裸遞送配製物不含植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精、酸酐改性的植物糖原β-糊精、脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、l,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、l-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-l-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基

乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）、人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0383】在某些實施方式中，裸遞送配製物包括非載劑賦形劑。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括不表現出細胞穿透作用的非活性成分。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括緩衝液，例如PBS。在一些實施方式中，非載劑賦形劑係溶劑、非水溶劑、稀釋劑、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑、潤滑劑或油。

【0384】在一些實施方式中，裸遞送配製物包括稀釋劑。稀釋劑可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。在一些實施方式中，稀釋劑係RNA增溶劑、緩衝劑或等滲劑。RNA增溶劑之實例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲醯胺和2-丙醇。緩衝劑之實例包括2-(N-味啉代)乙磺酸（MES）、Bis-Tris、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸（ADA）、N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸（ACES）、哌啡-N,N′-雙(2-乙磺酸)（PIPES）、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]乙磺酸（TES）、3-(N-味啉代)丙烷磺酸（MOPS）、4-(2-羥乙基)-1-哌啡乙磺酸（HEPES）、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸鹽。等滲劑之實例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

載劑

【0385】在一些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和載劑。

【0386】在某些實施方式中，免疫原性組成物包含在囊泡或其他基於膜的

載劑中的如本文所述之環狀多核糖核苷酸。

【0387】 在其他實施方式中，免疫原性組成物包括在或經由細胞、囊泡或其他基於膜的載劑中的環狀多核糖核苷酸。在一個實施方式中，免疫原性組成物包含在脂質體或其他類似囊泡中的環狀多核糖核苷酸。脂質體係球形囊泡結構，該等球形囊泡結構由圍繞內部水性隔室的單層或多層的脂質雙層和相對不可滲透的外部親脂性磷脂雙層構成。脂質體可為陰離子的、中性的或陽離子的。脂質體具有生物相容性，無毒，可以遞送親水性和親脂性藥物分子，保護其負載物免受血漿酶的降解，並且將其負載轉運穿過生物膜和血腦屏障（BBB）（關於綜述，參見例如，Spuch和Navarro, Journal of Drug Delivery [藥物遞送雜誌], 第2011卷, 文章ID 469679, 第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679）。

【0388】 囊泡可由幾種不同類型的脂質製成；然而，最常使用磷脂生成作為藥物載劑的脂質體。製備多層囊泡脂質之方法係本領域已知的（參見例如美國專利案號6,693,086，其關於多層囊泡脂質製備的傳授內容藉由援引併入文中）。儘管當脂質膜與水溶液混合時，囊泡的形成係自發的，但也可以藉由使用均質器、超音波儀或擠壓裝置以振盪的形式施加力來加快囊泡的形成（關於綜述，參見例如，Spuch和Navarro, Journal of Drug Delivery [藥物遞送雜誌], 第2011卷, 文章ID 469679, 第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679）。可以藉由擠出通過具有減小尺寸的過濾器來製備擠出的脂質，如Templeton等人, Nature Biotech [自然生物技術], 15:647-652, 1997中所述，其涉及擠出脂質製備的教導藉由援引併入本文。

【0389】 在某些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和脂質奈米顆粒，例如本文所述之脂質奈米顆粒。脂質奈米顆粒係為如本文所述之環狀多核糖核苷酸分子提供生物相容性和可生物降解的遞送系統的載劑的另一個實例。奈米結構化的脂質載劑（NLC）係經修飾的固體脂質奈米顆粒

（SLN），其保留了SLN的特性，提高了藥物的穩定性和載藥量，並防止了藥物洩漏。聚合物奈米顆粒（PNP）係藥物遞送的重要組分。該等奈米顆粒可以有效地將藥物遞送引導至特定靶並改善藥物穩定性和受控的藥物釋放。也可以使用脂質聚合物奈米顆粒（PLN），其係一種組合了脂質體和聚合物的新型載劑。該等奈米顆粒具有PNP和脂質體的互補優勢。PLN由核-殼結構構成；聚合物核提供了穩定的結構，磷脂殼提供了良好的生物相容性。這樣，這兩種組分提高了藥物封裝有效率，促進了表面修飾，並防止了水溶性藥物的洩漏。對於綜述，參見，例如，Li等人 2017, Nanomaterials 7 [奈米材料7], 122; doi:10.3390/nano7060122。

【0390】 載劑之另外的非限制性實例包括碳水化合物載劑（例如，酸酐修飾的植物糖原或糖原型材料）、蛋白質載劑（例如，與環狀多核糖核苷酸共價連接的蛋白質）、或陽離子載劑（例如，陽離子脂質聚合物或轉染試劑）。碳水化合物載劑之非限制性實例包括植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精和酸酐修飾的植物糖原β-糊精。陽離子載劑之非限制性實例包括脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷（DOTAP）、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、1-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）和N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）。蛋白質載劑之非限制性實例包括人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、

高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0391】 外來體也可用作本文所述之環狀RNA組成物或製劑的藥物遞送媒介物。對於綜述，參見Ha等人 2016年7月.Acta Pharmaceutica Sinica B [藥學學報英文版] 第6卷, 第4期, 第287-296頁；https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

【0392】 離體分化的紅血球也可以用作本文所述之環狀RNA組成物或製劑的載劑。參見，例如，國際專利公開案號WO 2015/073587；WO 2017/123646；WO 2017/123644；WO 2018/102740；WO 2016/183482；WO 2015/153102；WO 2018/151829；WO 2018/009838；Shi等人 2014.Proc Natl Acad Sci USA [美國國家科學院院刊].111(28): 10131-10136；美國專利9,644,180；Huang等人 2017.Nature Communications [自然通訊] 8: 423；Shi等人 2014.Proc Natl Acad Sci USA [美國國家科學院院刊].111(28): 10131-10136。

【0393】 例如國際專利公開案號WO 2018/208728中所述之融合體組成物也可以用作載劑遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸分子。

【0394】 病毒體和病毒樣顆粒（VLP）也可用作載劑將本文所述之環狀多核糖核苷酸分子遞送至靶向的細胞。

【0395】 例如國際專利公開案號WO 2011/097480、WO 2013/070324、WO 2017/004526或WO 2020/041784中所述之植物奈米囊泡和植物信使包（PMP）也可用作載劑遞送本文所述之環狀RNA組成物或製劑。

【0396】 微泡也可以用作載劑遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸分子。參見，例如，US 7115583；Beeri, R.等人，Circulation. [循環] 2002年10月1日;106(14):1756-1759 ;Bez, M.等人 ,Nat Protoc. [自然實驗手冊] 2019年4月 ;14(4): 1015-1026；Hernot, S.等人，Adv Drug Deliv Rev. [高級藥物遞送綜述] 2008年6月30日; 60(10): 1153-1166；Rychak, J.J.等人，Adv Drug Deliv Rev. [高級藥物遞送綜述] 2014年6月; 72: 82-93。在一些實施方式中，微泡係白蛋白包被的全氟化碳

微泡。

【0397】 包含本文所述之環狀多核糖核苷酸的載劑可以包含多個顆粒。顆粒可具有30至700奈米（例如，30至50、50至100、100至200、200至300、300至400、400至500、500至600、600至700、100至500、50至500或200至700奈米）的中值粒度。可以優化顆粒的大小以有利於包括環狀多核糖核苷酸在內的有效載荷沈積到細胞中。環狀多核糖核苷酸沈積到某些細胞類型中可有利於不同的粒度。例如，可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到抗原呈遞細胞中。可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到樹突細胞中。另外，可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到引流淋巴結細胞中。

脂質奈米顆粒

【0398】 本揭露提供的組成物、方法和遞送系統可以採用本文所述之任何合適的載劑或遞送形式，在某些實施方式中包括脂質奈米顆粒（LNP）。在一些實施方式中，脂質奈米顆粒包括一或多種離子脂質，如非陽離子脂質（例如，中性或陰離子或兩性離子脂質）；一或多種軛合脂質（諸如WO 2019217941的表5中描述的PEG軛合的脂質或軛合至聚合物的脂質；其藉由援引以其全文併入本文）；一或多種固醇（例如，膽固醇）。

【0399】 可用於奈米顆粒形成的脂質（例如，脂質奈米顆粒）包括例如WO 2019217941的表4中描述的那些，其藉由援引併入本文—例如，含脂質的奈米顆粒可包括WO 2019217941的表4中的一或多種脂質。脂質奈米顆粒可以包括另外的要素，諸如聚合物，諸如藉由援引併入的WO 2019217941的表5中描述的聚合物。

【0400】 在一些實施方式中，軛合脂質，當存在時，可以包括以下的一或多種：PEG-二醯基甘油（DAG）（如l-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯甘油（PEG-DMG））、PEG-二烷氧基丙基（DAA）、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺（Cer）、

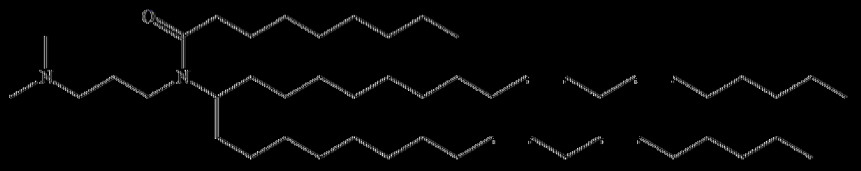
聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺（PEG-PE）、PEG琥珀酸二醯基甘油（PEGS-DAG）（如4-0-(2',3'-二(十四烷醯氧基)丙基-1-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯（PEG-S-DMG））、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1 ,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺鈉鹽，以及在WO 2019051289的表2中描述的那些（藉由援引併入）和前述的組合。

【0401】在一些實施方式中，可摻入脂質奈米顆粒中的固醇包括膽固醇或膽固醇衍生物中的一或多種，諸如藉由援引併入的W0 2009/127060或US 2010/0130588中的那些。另外的示例性固醇包括植物固醇，包括藉由援引併入本文的Eygeris等人(2020)，dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中描述的那些。

【0402】在一些實施方式中，脂質顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質、抑制顆粒聚集的軛合脂質和固醇。該等組分的量可以獨立地變化，以獲得所需特性。例如，在一些實施方式中，脂質奈米顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質、軛合脂質和甾醇，該可電離脂質的量為總脂質的約20 mol%至約90 mol%（在其他實施方式中，該可電離脂質可為脂質奈米顆粒中存在的總脂質的20%-70%（mol）、30%-60%（mol）或40%-50%（mol）；約50 mol%至約90 mol%）；該非陽離子脂質的量為總脂質的約5 mol%至約30 mol%；該軛合脂質的量為總脂質的約0.5 mol%至約20 mol%，該甾醇的量為總脂質的約20 mol%至約50 mol%。總脂質與核酸的比率可以根據需要變化。例如，總脂質與核酸（質量或重量）的比率可為約10 : 1至約30 : 1。

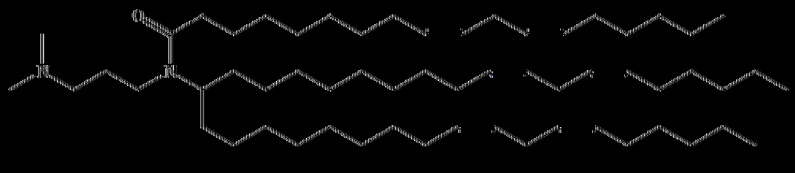
【0403】在一些實施方式中，脂質與核酸的比率（質量/質量比率；w/w比）可處於約1 : 1至約25 : 1、約10 : 1至約14 : 1、約3 : 1至約15 : 1、約4 : 1至約10 : 1、約5 : 1至約9 : 1或約6 : 1至約9 : 1的範圍內。可以調節脂質和核酸的量以提供所需的N/P比，例如3、4、5、6、7、8、9、10或更高的N/P比。通常，脂質奈米顆粒配製物的總脂質含量可在約5 mg/ml至約30 mg/mL的範圍內。

[0404] 可用於（例如，與其他脂質組分組合）形成用於遞送本文所述之組成物，例如本文所述之核酸（例如，RNA（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸））的脂質奈米顆粒的脂質化合物的一些非限制性實例包括：



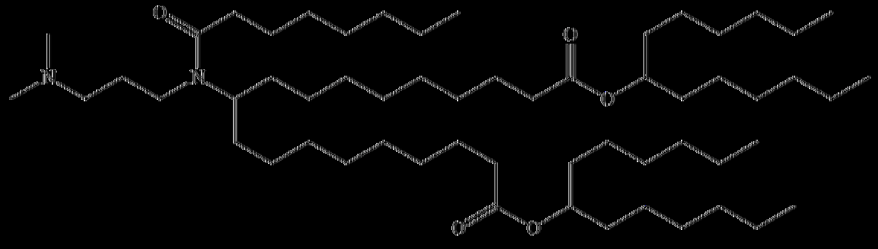
(i)

[0405] 在一些實施方式中，包括式(i)的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



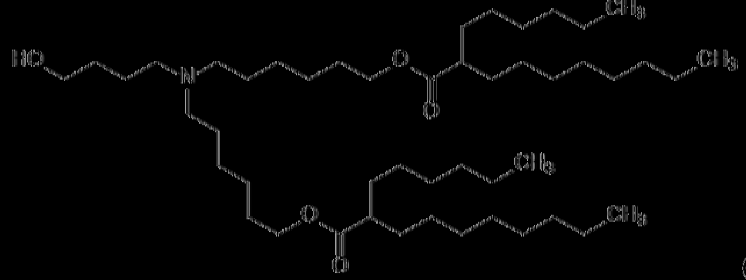
(ii)

[0406] 在一些實施方式中，包括式 (ii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

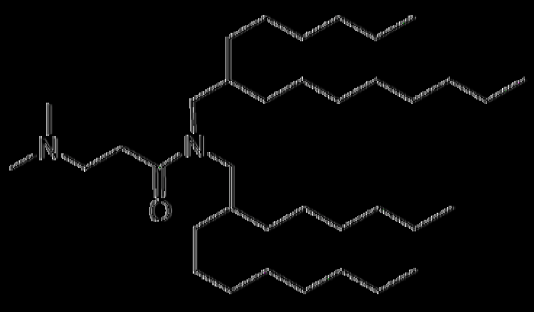


(iii)

[0407] 在一些實施方式中，包括式 (iii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

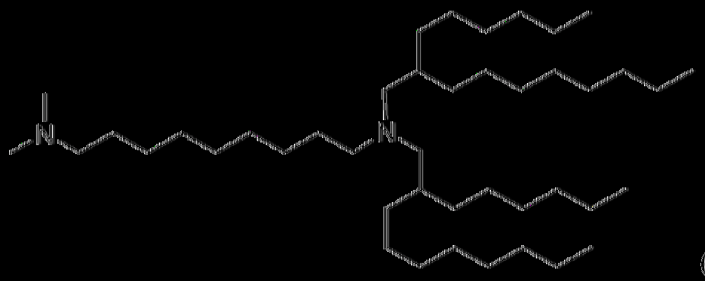


(iv)



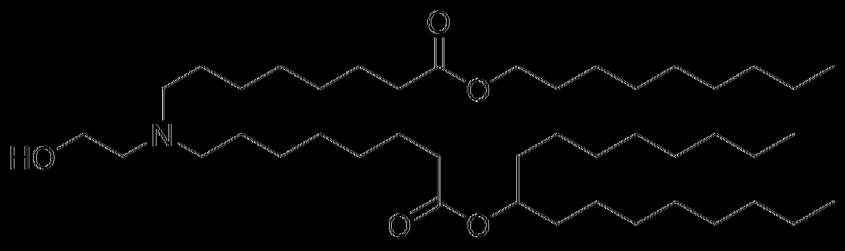
(v)

[0408] 在一典型實施方式中，包括式 (v) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

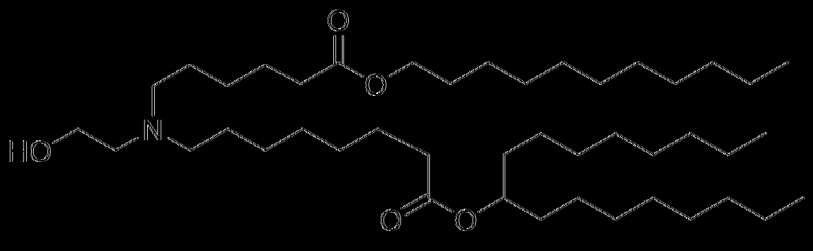


(vi)

[0409] 在一典型實施方式中，包括式 (vi) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

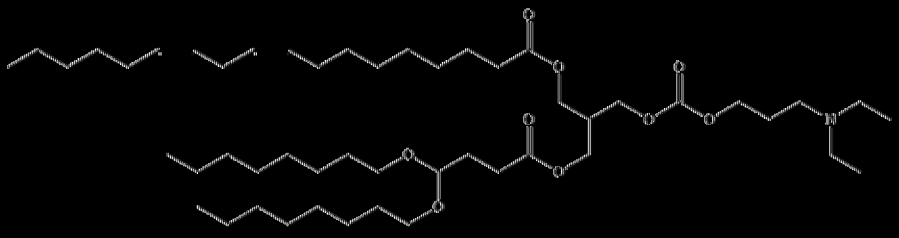


(vii)



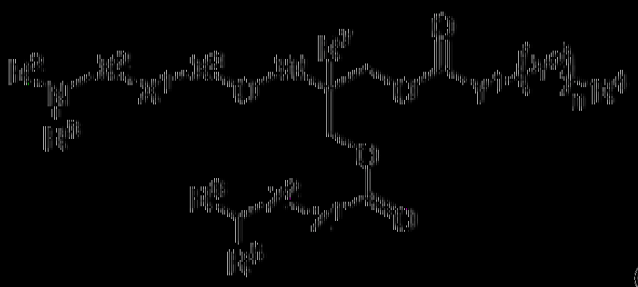
(viii)

[0410] 在一典型實施方式中，包括式 (viii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



(ix)

[0411] 在一典型實施方式中，包括式 (ix) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



(x)

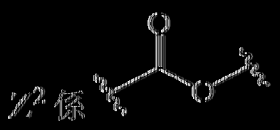
其中

X^1係O、NR^1或直接鍵，X^2係C2-5伸烷基，X^3係C(=O)或直接鍵，R^1係H或Me，R^3係C1-3烷基，R^2係C1-3烷基，或R^2與它所附接的氮原子和X^2的1-3個碳原子一起形成4-員、5-員或6-員環，或X^1係NR^1，R^1和R^2與它們所附接的氮原子一起形成5-員或6-員環，或R^2與R^3和它們所附接的氮原子一起形成5-員、6-員或7-員環，Y^1係C2-12伸烷基，Y^2選自



（在任一取向上），（在任一取向上），（在任一取向上），

n為0至3，R^4為C1-15烷基，Z^1為C1-6伸烷基或直接鍵，



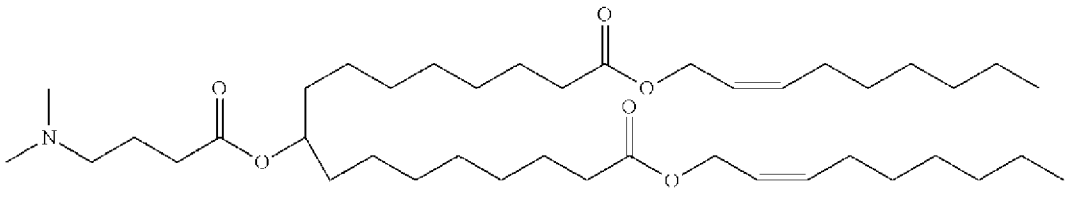
（在任一取向上）或不存在，條件是如果Z^1係直接鍵，則Z^2不存在；

R^5係C5-9烷基或C6-10烯基，R^6係C5-9烷基或C6-10烯基，W係H或其直接鍵，並且R^7係H或Me，或其鹽，條件是如果R^3和R^2係C2烷基，X^1係O，X^2係直鏈C3伸烷基，X^3係C(=O)，Y^1係直鏈C6伸烷基，$(Y^2)_n$-R^4係



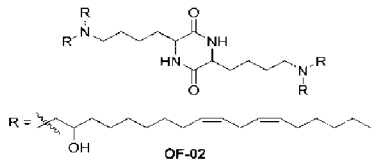
，R^4係直鏈C5烷基，Z^1係C2伸烷基，Z^2不存在，W係H或其，並且R^7係H，則R^5和R^6不是C8烯基。

[0412] 在一些實施方式中，包括式(xii)的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



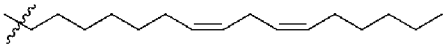
(xi)

【0413】在一些實施方式中，包括式 (xi) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

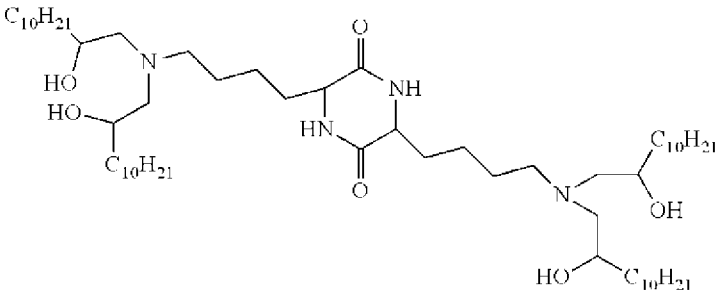


OF-02

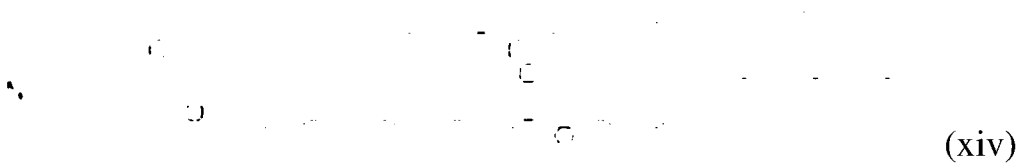
其中R =



(xii)

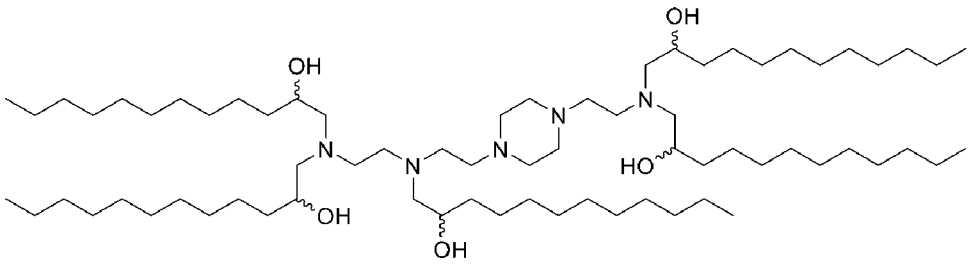


(xiii)



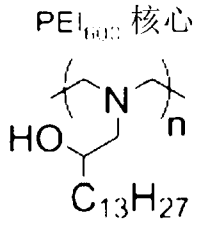
(xiv)

【0414】在一些實施方式中，LNP包括具有式 (xiii) 之化合物和具有式 (xiv) 之化合物。



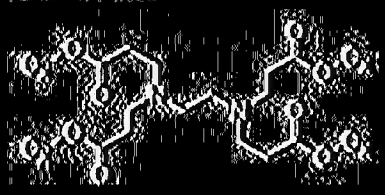
(xv)

【0415】在一些實施方式中，包括式 (xv) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

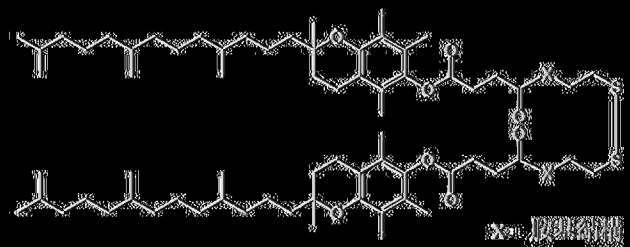


(xvi)

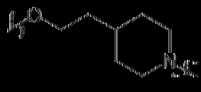
[0416] 在一些實施方式中，包括具有式(xvi)之乳製物的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



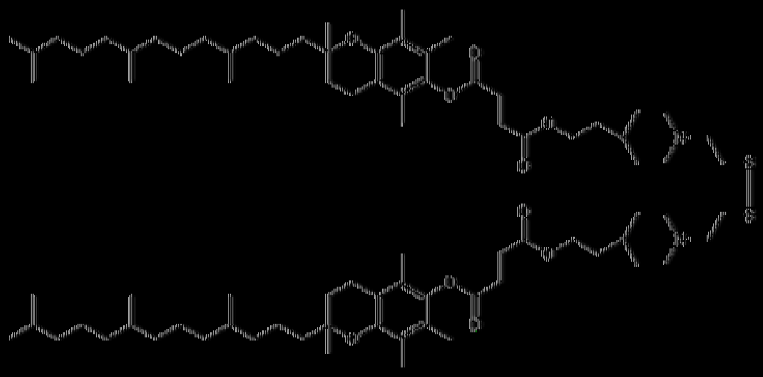
(xvii)



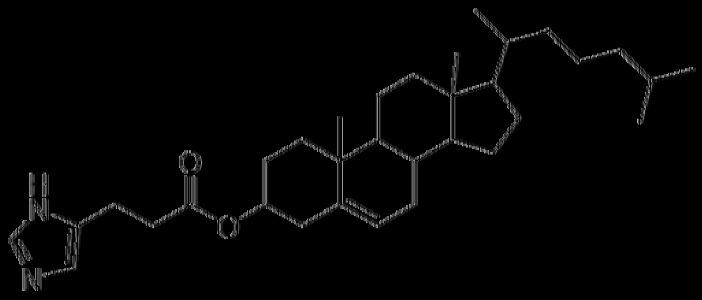
其中X為：



(xviii)(a)

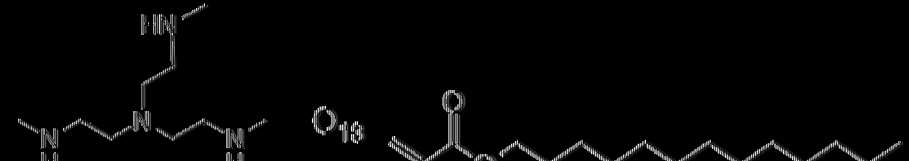


(xviii)(b)

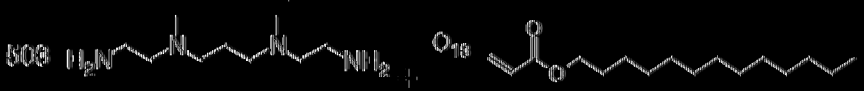


(xix)

[0417] 在一些實施方式中，用於形成用於遞送本文所述之組成物，例如本文所述之核酸（例如，RNA（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸））的脂質奈米顆粒的脂質化合物藉由以下反應之一製成：

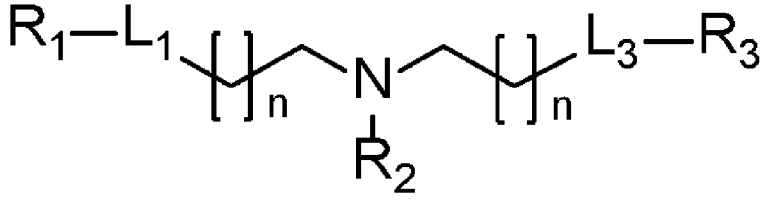


(xx)(a)



(xx)(b)。

【0418】在一些實施方式中，包括式 (xxi) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式 (xxi) 之LNP係藉由WO 2021113777描述的LNP（例如，具有式 (1) 之脂質，如WO 2021113777的表1的脂質）。



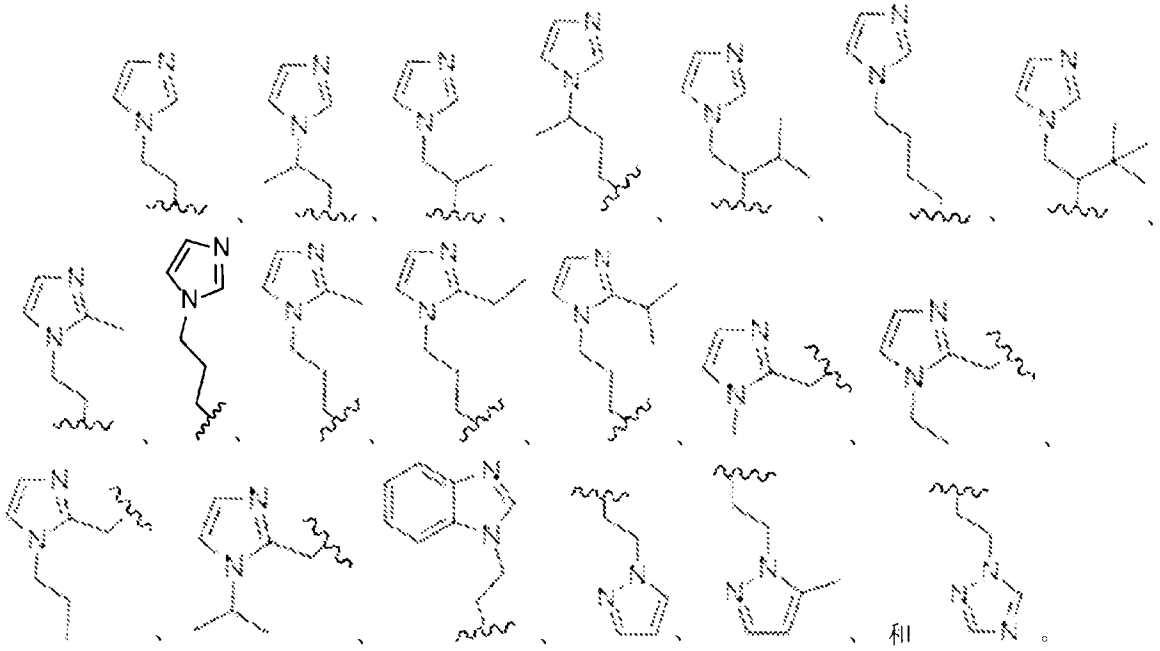
(xxi)

其中

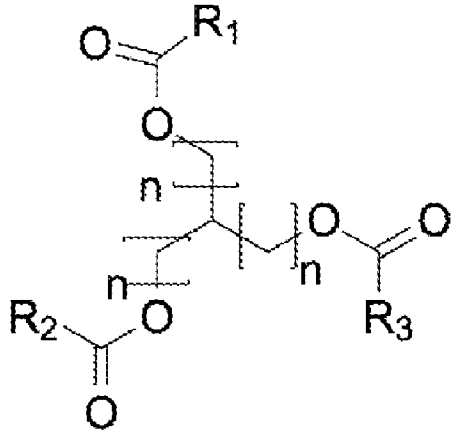
每個n獨立地是2-15的整數；L_1和L_3各自獨立地是-OC(O)-*或-C(O)O-*，其中「*」表示與R_1或R_3的附接點；

R_1和R_3各自獨立地是直鏈或支鏈C_9-C_{20}烷基或C_9-C_{20}烯基，其視需要被選自由以下組成之群組的一或多個取代基取代：側氧基、鹵代、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥基烷基、二羥基烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷基胺基烷基、二烷基胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷基胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷基胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷氧基羰基、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷基胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亞碸、烷基亞碸烷基、烷基磺醯基和烷基碸烷基；以及

R_2選自由以下組成之群組：



【0419】在一些實施方式中，包括式 (xxii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式 (xxii) 之LNP之由WO 2021113777描述的LNP（例如，具有式 (2) 的脂質，如WO 2021113777的表2的脂質）。

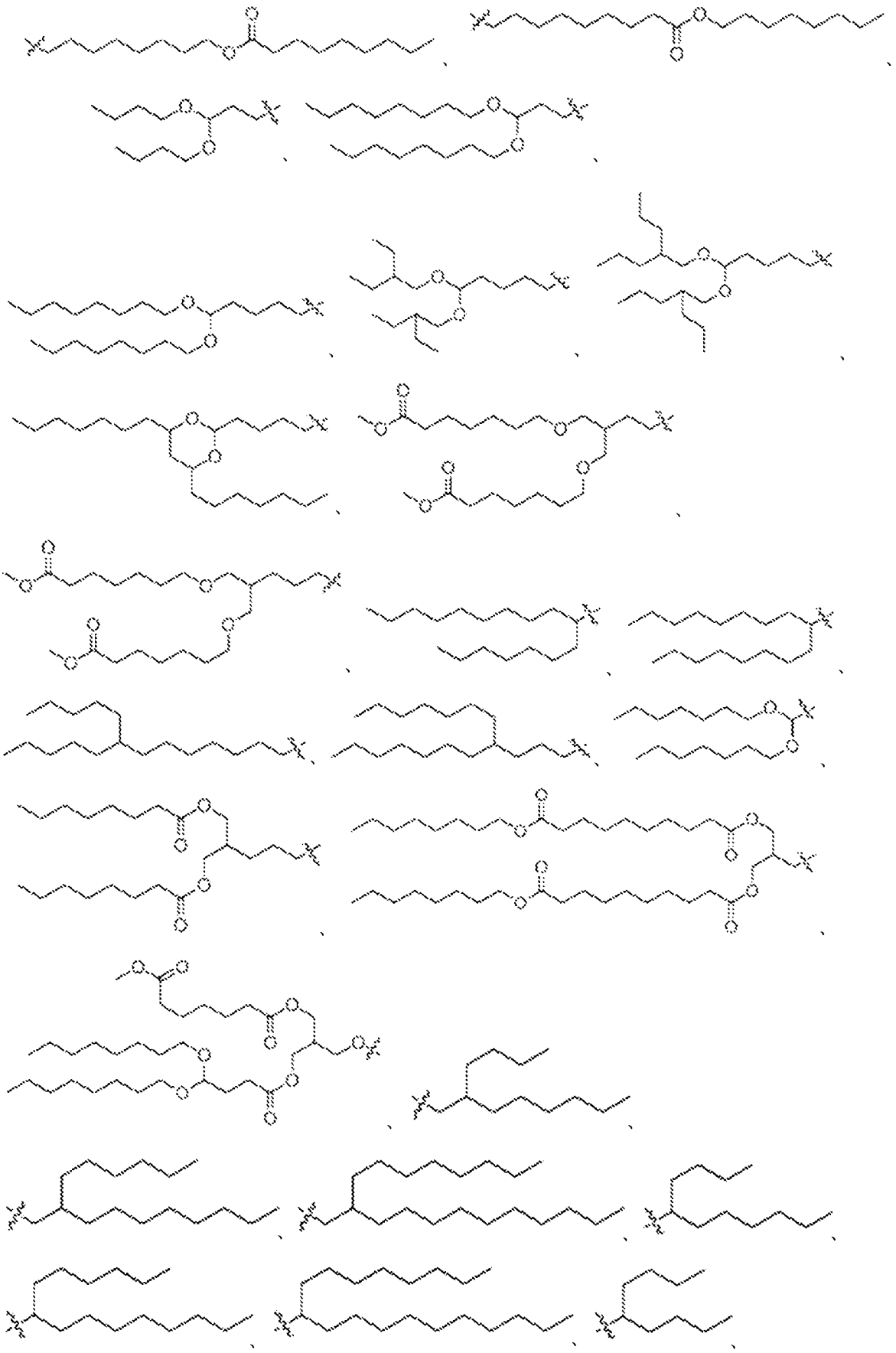


(xxii)

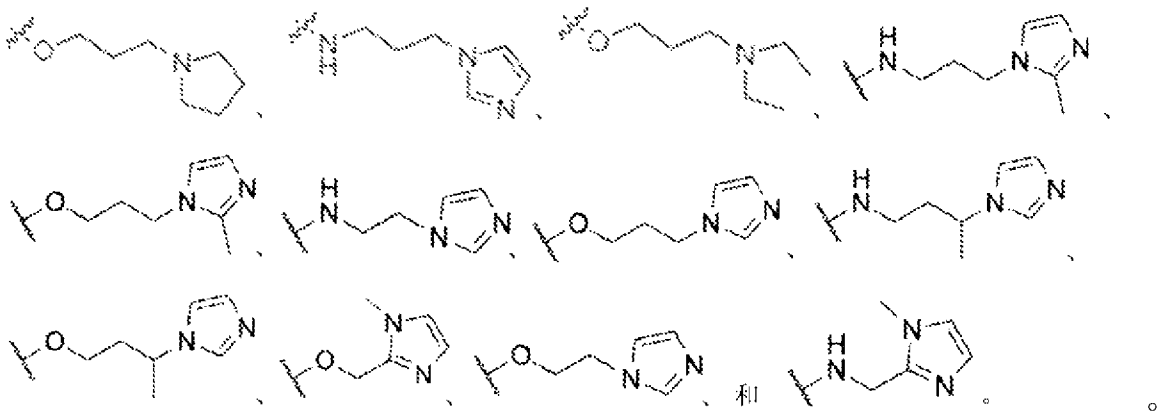
其中

每個n獨立地是1-15的整數；

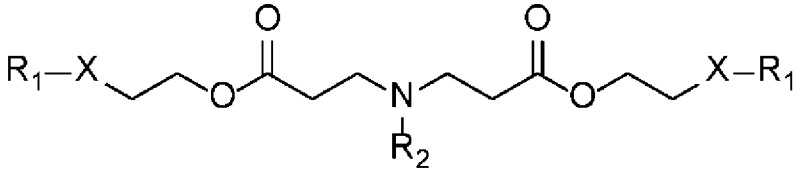
R_1和R_2各自獨立地選自由以下組成之群組：



R_3選自由以下組成之群組：



【0420】在一些實施方式中，包括式 (xxiii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式 (xxiii) 之LNP之由WO 2021113777描述的LNP（例如，具有式 (3) 的脂質，如WO 2021113777的表3的脂質）。

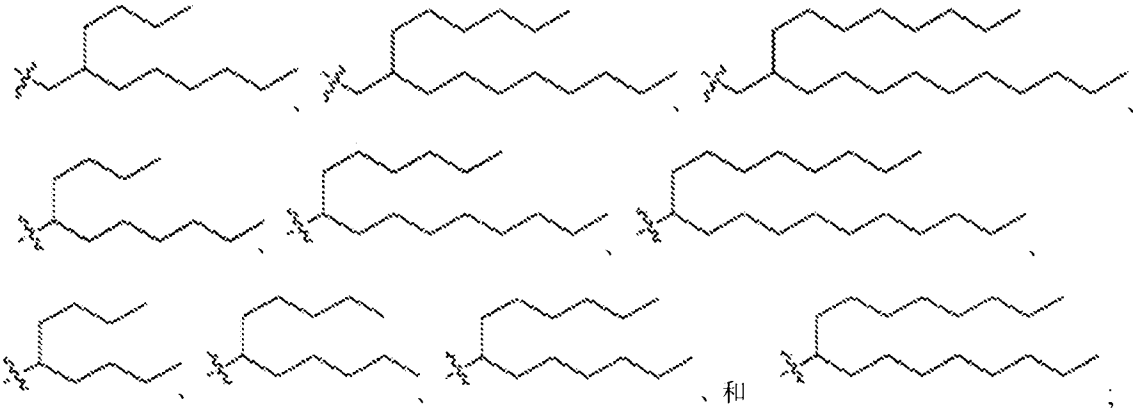


(xxiii)

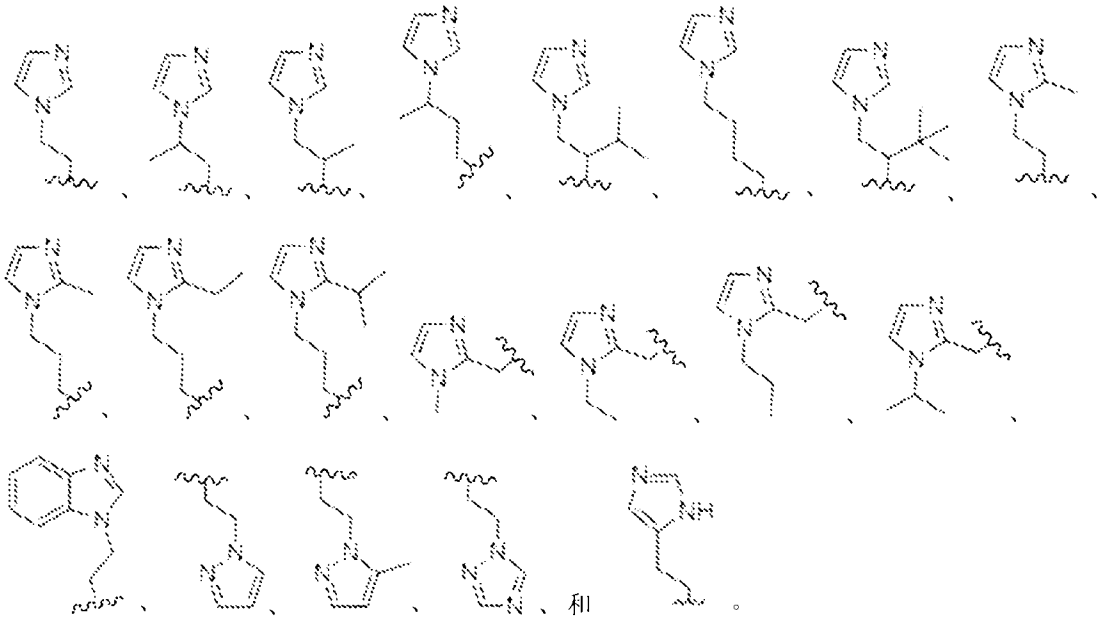
其中

X選自-O-、-S-或-OC(O)-*，其中*表示與R_1的附接點；

R_1選自由以下組成之群組：



且R_2選自由以下組成之群組：



【0421】在一些實施方式中，本文所述之組成物（例如，核酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）或蛋白質）在包括可電離脂質的LNP中提供。在一些實施方式中，可電離脂質之十七烷-9-基8-((2-羥乙基)(6-側氧基-6-(十一烷氧基)己基)胺基)辛酸酯（SM-102）；例如，如US 9,867,888（藉由援引以其全文併入本文）的實例1中所述。在一些實施方式中，可電離脂質之9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八碳-9,12-二烯酸酯（LP01），例如，如WO 2015/095340（藉由援引以其全文併入本文）的實例13中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之9-((4-二甲基胺基)丁醯基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯（L319），例如如US 2012/0027803（藉由援引以其全文併入本文）的實例7、實例8或實例9中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啡-1-基)乙基)氮烷二基)雙(十二烷-2-醇)（C12-200），例如，如WO 2010/053572（藉由援引以其全文併入本文）的實例14和實例16中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之咪唑膽固醇酯（ICE）脂質(3S,10R,13R,17R)-10, 13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17-十四氫-lH-環戊烯并[a]菲-3-基 3-(1H-咪唑-4-基)丙酸酯，例如來自WO 2020/106946（藉由援引以其全文併入本文）的結構 (I)。

【0422】 在一些實施方式中，可電離脂質可為陽離子脂質、可電離陽離子脂質，例如可以根據pH以帶正電荷的形式或中性形式存在的陽離子脂質，或可以容易地質子化的含胺脂質。在一些實施方式中，陽離子脂質係例如在生理條件下能夠帶正電的脂質。示例性的陽離子脂質包括一或多個帶有正電荷的胺基。在一些實施方式中，脂質顆粒包括與中性脂質、可電離含胺脂質、可生物降解的炔脂質、類固醇、包括多不飽和脂質的磷脂、結構脂質（例如固醇）、PEG、膽固醇和聚合物軛合脂質中的一或多種配製的陽離子脂質。在一些實施方式中，陽離子脂質可為可電離的陽離子脂質。如本文所揭露的示例性陽離子脂質可具有超過6.0的有效pKa。在實施方式中，脂質奈米顆粒可包括具有與第一陽離子脂質不同的有效pKa（例如，大於第一有效pKa）的第二陽離子脂質。脂質奈米顆粒可包括40莫耳%至60莫耳%的封裝在脂質奈米顆粒內或與脂質奈米顆粒締合的陽離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物軛合的脂質和治療劑，例如本文所述之核酸（例如RNA（例如環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸））。在一些實施方式中，核酸與陽離子脂質共同配製。核酸可以吸附到LNP（例如包括陽離子脂質的LNP）的表面。在一些實施方式中，核酸可以封裝在LNP（例如包括陽離子脂質的LNP）中。在一些實施方式中，脂質奈米顆粒可包括靶向部分，例如用靶向劑包被的靶向部分。在實施方式中，LNP配製物係生物可降解的。在一些實施方式中，包括一或多種本文所述之脂質（例如式 (i)、(ii)、(ii)、(vii) 和/或 (ix)）的脂質奈米顆粒封裝至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%或100%的RNA分子。

【0423】 可用於脂質奈米顆粒配製物中的示例性可電離脂質包括但不限

於藉由援引併入本文的WO 2019051289的表1中所列的那些。另外的示例性脂質包括但不限於下式中的一或多種：US 2016/0311759的X；US 20150376115或US 2016/0376224中的I；US 20160151284的I、II或III；US 20170210967的I、IA、II或IIA；US 20150140070的I-c；US 2013/0178541的A；US 2013/0303587或US 2013/0123338的I；US 2015/0141678的I；US 2015/0239926的II、III、IV或V；US 2017/0119904的I；WO 2017/117528的I或II；US 2012/0149894的A；US 2015/0057373的A；WO 2013/116126的A；US 2013/0090372的A；US 2013/0274523的A；US 2013/0274504的A；US 2013/0053572的A；W0 2013/016058的A；W02012/162210的A；US 2008/042973的I；US 2012/01287670的I、II、III或IV；US 2014/0200257的I或II；US 2015/0203446的I、II或III；US 2015/0005363的I或III；US 2014/0308304的I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV；US 2013/0338210；W0 2009/132131的I、II、III或IV；US 2012/01011478的A；US 2012/0027796的I或XXXV；US 2012/0058144的XIV或XVII；US 2013/0323269；US 2011/0117125的I；US 2011/0256175的I、II或III；US 2012/0202871的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII；US 2011/0076335的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI；US 2006/008378的I或II；US 2013/0123338的I；US 2015/0064242的I或X-A-Y-Z；US 2013/0022649的XVI、XVII或XVIII；US 2013/0116307的I、II或III；US 2013/0116307的I、II或III；US 2010/0062967的I或II；US 2013/0189351的I-X；US 2014/0039032的I；US 2018/0028664的V；US 2016/0317458的I；US 2013/0195920的I；US 10,221,127的5、6或10；WO 2018/081480的III-3；WO 2020/081938的I-5或I-8；US 9,867,888的18或25；US 2019/0136231的A；WO 2020/219876的II；US 2012/0027803的1；US 2019/0240349的OF-02；US 10,086,013的23；Miao等人(2020)的cKK-E12/A6；WO 2010/053572的C12-200；Dahlman等人(2017)的7C1；Whitehead等人的304-O13或

503-O13；US 9,708,628的TS-P4C2；WO 2020/106946的I；WO 2020/106946的I；和WO 2021/113777的 (1)、(2)、(3) 或 (4)。示例性脂質還包括WO 2021/113777的表1-16中任一個的脂質。

【0424】 在一些實施方式中，可電離脂質係MC3 (6Z,9Z,28Z,3 lZ)-三十七烷-6,9,28,3 l-四烯-l9-基-4-(二甲基胺基)丁酸酯（DLin-MC3-DMA或MC3），例如，如WO 2019051289A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例9中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係脂質ATX-002，例如，如WO 2019051289A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例10中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係(l3Z,l6Z)-A,A-二甲基-3-壬基二十二-l3, l6-二烯-l-胺（化合物32），例如，如WO 2019051289 A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例11中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係化合物6或化合物22，例如，如WO 2019051289 A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例12中所述。

【0425】 示例性非陽離子脂質包括但不限於二硬脂醯-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂醯磷脂醯膽鹼（DSPC）、二油醯磷脂醯膽鹼（DOPC）、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼（DPPC）、二油醯磷脂醯膽鹼（DOPG）、二棕櫚醯磷脂醯甘油（DPPG）、二油醯磷脂醯乙醇胺（DOPE）、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼（POPC）、棕櫚醯油醯磷脂醯乙醇胺（POPE）、二油醯-磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺甲基)-環己烷-1-甲酸酯（DOPE-mal）、二棕櫚醯磷脂醯乙醇胺（DPPE）、二肉豆蔻醯磷酸乙醇胺（DMPE）、二硬脂醯-磷脂醯-乙醇胺（DSPE）、單甲基-磷脂醯乙醇胺（諸如16-O-單甲基PE）、二甲基-磷脂醯乙醇胺（諸如16-O-二甲基PE）、l8-l-反式PE、l-硬脂醯-2-油醯-磷脂醯乙醇胺（SOPE）、氫化大豆磷脂醯膽鹼（HSPC）、卵磷脂醯膽鹼（EPC）、二油醯磷脂醯絲胺酸（DOPS）、神經鞘磷脂（SM）、二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼（DMPC）、二肉豆蔻醯磷脂醯甘油（DMPG）、二硬脂醯磷脂醯甘油（DSPG）、二芥醯基磷脂醯膽鹼（DEPC）、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油

（POPG）、二反油烯醯-磷脂醯乙醇胺（DEPE）、卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂（ESM）、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、雙十六烷基磷酸、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼或其混合物。應當理解，也可以使用其他二醯基磷脂醯膽鹼和二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。該等脂質中的醯基基團較佳的是為源自具有C10-C24碳鏈的脂肪酸的醯基基團，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。在某些實施方式中，另外的示例性脂質包括但不限於藉由援引併入本文的Kim等人(2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386描述的那些。在一些實施方式中，這樣的脂質包括被發現改善mRNA肝轉染的植物脂質（例如，DGTS）。

【0426】適用於脂質奈米顆粒中的非陽離子脂質之其他實例包括但不限於非磷脂質，例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙醯基棕櫚酸酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸鹽、烷基-芳基硫酸鹽、聚乙氧基化脂肪酸醯胺、雙十八烷基二甲基溴化銨、神經醯胺、鞘磷脂等。其他非陽離子脂質在WO 2017/099823或美國專利公開US 2018/0028664中有描述，其內容藉由援引以其全文併入本文。

【0427】在一些實施方式中，非陽離子脂質係油酸或藉由援引以其全文併入的US 2018/0028664的式I、II或IV之化合物。非陽離子脂質可以占例如脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-30%（莫耳）。在一些實施方式中，非陽離子脂質含量係脂質奈米顆粒中存在的總脂質的5%-20%（莫耳）或10%-15%（莫耳）。在實施方式中，可電離脂質與中性脂質的莫耳比為約2：1至約8：1（例如，約2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1或8：1）。

【0428】在一些實施方式中，脂質奈米顆粒不包括任何磷脂。

【0429】在一些方面，脂質奈米顆粒可進一步包括如固醇的組分以提供膜

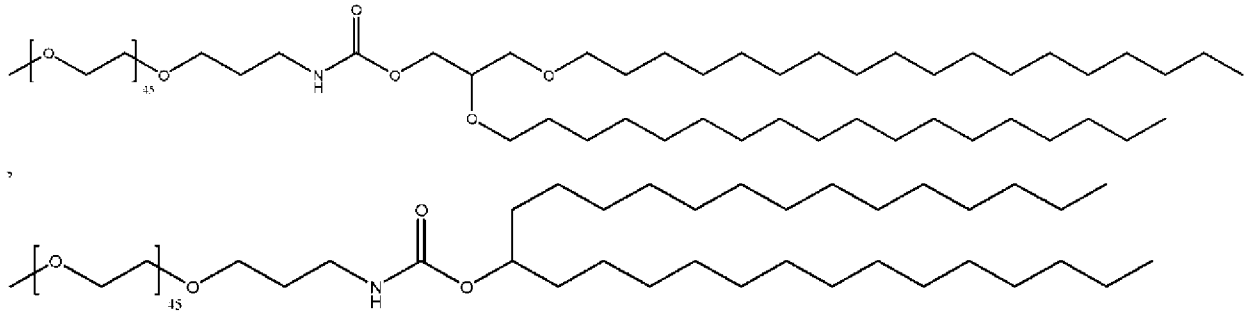
完整性。可用於脂質奈米顆粒中的一種示例性固醇係膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，如5a-膽甾烷醇、53-糞甾烷醇、膽甾醇基-(2'-羥基)-乙基醚、膽甾醇基-(4'-羥基)-丁基醚和6-酮膽甾烷醇；非極性類似物，諸如5a-膽甾烷、膽甾烯酮、5a-膽甾烷酮、5p-膽甾烷酮和膽甾醇癸酸酯；及其混合物。在一些實施方式中，膽固醇衍生物係極性類似物，例如，膽甾醇基-(4'-羥基)-丁基醚。示例性的膽固醇衍生物在PCT公開W0 2009/127060和美國專利公開US 2010/0130588中有描述，其各自藉由援引以其全文併入本文。

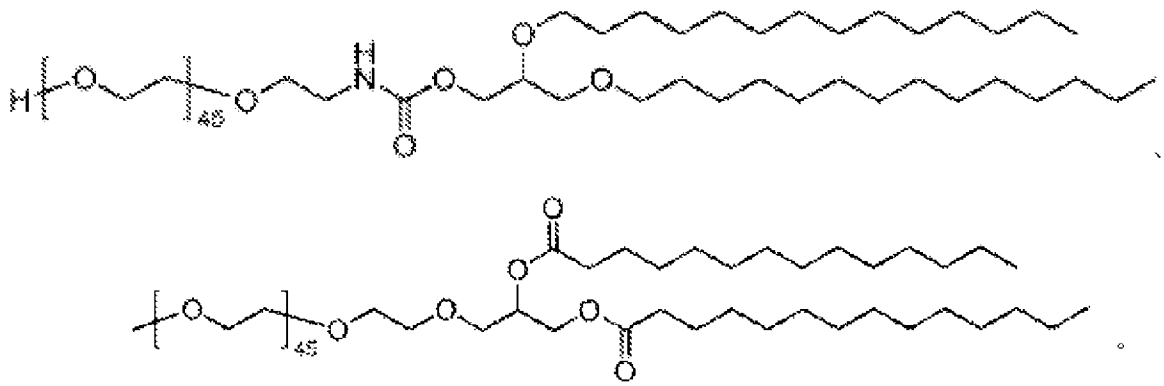
【0430】 在一些實施方式中，提供膜完整性的組分，如固醇，可以包括脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-50%（莫耳）（例如，0%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%或40%-50%）。在一些實施方式中，此類組分係脂質奈米顆粒的總脂質含量的20%-50%（莫耳）、30%-40%（莫耳）。

【0431】 在一些實施方式中，脂質奈米顆粒可包括聚乙二醇（PEG）或軛合的脂質分子。通常，該等用於抑制脂質奈米顆粒的聚集和/或提供空間穩定。示例性的軛合脂質包括但不限於PEG-脂質軛合物、聚噁唑啉（POZ）-脂質軛合物、聚醯胺-脂質軛合物（諸如ATTA-脂質軛合物）、陽離子聚合物脂質（CPL）軛合物及其混合物。在一些實施方式中，軛合脂質分子係PEG-脂質軛合物，例如(甲氧基聚乙二醇)軛合脂質。

【0432】 示例性的PEG-脂質軛合物包括但不限於PEG-二醯基甘油（DAG）（諸如l-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯甘油（PEG-DMG））、PEG-二烷氧基丙基（DAA）、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺（Cer）、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺（PEG-PE）、PEG琥珀酸二醯基甘油（PEGS-DAG）（諸如4-0-(2',3'-二(十四烷醯氧基)丙基-l-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯（PEG-S-DMG））、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-l,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺鈉鹽或其混合物。另外的示例性PEG-脂質軛合物描述於以下中：

例如，US 5,885,613、US 6,287,591、US 2003/0077829、US 2003/0077829、US 2005/0175682、US 2008/0020058、US 2011/0117125、US 2010/0130588、US 2016/0376224、US 2017/0119904、US 2018/0028664和WO 2017/099823，所有該等的內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-脂質係US 2018/0028664的式III、III-a-I、III-a-2、III-b-1、III-b-2或V之化合物，其內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-脂質具有US 20150376115或US 2016/0376224的式II，兩者的內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-DAA軛合物可為例如PEG-二月桂基氧基丙基、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基、PEG-二棕櫚基氧基丙基或PEG-二硬脂基氧基丙基。PEG-脂質可為以下的一或多種：PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕櫚醯甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油脂醯胺、PEG-二肉豆蔻基甘油脂醯胺、PEG-二棕櫚醯甘油脂醯胺、PEG-二硬脂基甘油脂醯胺、PEG-膽固醇（1-[8'-(膽甾-5-烯-3[β]-氧基)甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺基甲醯基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)）、PEG-DMB（3,4-雙十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚）和1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些實施方式中，PEG-脂質包括PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些實施方式中，PEG-脂質包括選自以下的結構：





、和

。

【0433】在一些實施方式中，與PEG以外的分子軛合的脂質也可用於代替PEG-脂質。例如，聚噁唑啉（POZ）-脂質軛合物、聚醯胺-脂質軛合物（諸如ATTA-脂質軛合物）和陽離子聚合物脂質（GPL）軛合物可用於代替PEG-脂質或與PEG-脂質一起使用。

【0434】示例性的軛合脂質（即PEG-脂質、（POZ）-脂質軛合物、ATTA-脂質軛合物和陽離子聚合物-脂質）在WO 2019051289A9的表2中列出的PCT和LIS專利申請（所有該等的內容藉由援引以其全文併入本文）中描述。

【0435】在一些實施方式中，PEG或軛合脂質可包括脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-20%（莫耳）。在一些實施方式中，PEG或軛合脂質的含量為脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0.5%-10%或2%-5%（莫耳）。可電離脂質、非陽離子脂質、固醇和PEG/軛合脂質的莫耳比可以根據需要變化。例如，脂質顆粒可包括按組成物的莫耳或總重量計30%-70%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計0%-60%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計0%-30%的非陽離子脂質和按組成物的莫耳或總重量計1%-10%的軛合脂質。較佳的是，該組成物包括按組成物的莫耳或總重量計30%-40%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計40%-50%的膽固醇，以及按組成物的莫耳或總重量計10%-20%的非陽離子脂質。在一些其他實施方式中，組成物係按組成物的莫耳或總重量計50%-75%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計20%-40%的膽固醇，和按組成物的莫耳或總

重量計5%-10%的非陽離子脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計1%-10%的軛合脂質。該組成物可含有按組成物的莫耳或總重量計60%-70%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計25%-35%的膽固醇，以及按組成物的莫耳或總重量計5%-10%的非陽離子脂質。該組成物還可含有按組成物的莫耳或總重量計至多90%的可電離脂質和按組成物的莫耳或總重量計2%至15%的非陽離子脂質。該配製物也可為脂質奈米顆粒配製物，例如包括按組成物的莫耳或總重量計8%-30%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計5%-30%的非陽離子脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計0%-20%的膽固醇；按組成物的莫耳或總重量計4%-25%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計4%-25%的非陽離子脂質，按組成物的莫耳或總重量計2%至25%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計10%至35%的軛合脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計5%的膽固醇；或按組成物的莫耳或總重量計2%-30%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計2%-30%的非陽離子脂質，按組成物的莫耳或總重量計1%至15%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計2%至35%的軛合脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計1%-20%的膽固醇；或按組成物的莫耳或總重量計甚至高達90%的可電離脂質和按組成物的莫耳或總重量計2%-10%的非陽離子脂質，或按組成物的莫耳或總重量計甚至100%的陽離子脂質。在一些實施方式中，脂質顆粒配製物包括莫耳比為50 : 10 : 38.5 : 1.5的可電離脂質、磷脂、膽固醇和聚乙二醇化脂質。在一些其他實施方式中，脂質顆粒配製物包括莫耳比為60 : 38.5 : 1.5的可電離脂質、膽固醇和聚乙二醇化脂質。

【0436】在一些實施方式中，脂質顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質（例如磷脂）、固醇（例如膽固醇）和聚乙二醇化脂質，其中可電離脂質的脂質莫耳比的範圍為20至70莫耳%，目標為40-60，非陽離子脂質的莫耳百分比的範圍為在0至30，目標為0至15，固醇的莫耳百分比的範圍為20至70，目標為30至50，並

且聚乙二醇化脂質的莫耳百分比的範圍為1至6，目標為2至5。

【0437】在一些實施方式中，脂質顆粒包括莫耳比為50：10：38.5： 1.5的可電離脂質/非陽離子脂質/固醇/軛合脂質。

【0438】在一方面，本揭露提供了包括磷脂、卵磷脂、磷脂醯膽鹼和磷脂醯乙醇胺的脂質奈米顆粒配製物。

【0439】在一些實施方式中，還可以包括一或多種另外的化合物。那些化合物可以單獨投與，或者另外的化合物可以包括在本發明之脂質奈米顆粒中。換言之，除核酸或至少第二核酸之外，脂質奈米顆粒可含有不同於第一核酸的其他化合物。非限制性地，其他另外的化合物可以選自由以下組成之群組：小的或大的有機分子或無機分子、單糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、肽、蛋白質、其肽類似物和衍生物、肽模擬物、核酸、核酸類似物和衍生物、由生物材料製成的提取物，或其任何組合。

【0440】在一些實施方式中，LNP包括可生物降解的、可電離的脂質。在一些實施方式中，LNP包括(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基 十八碳-9,12-二烯酸酯，也稱為3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基 (9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸酯)或另一種可電離脂質。參見，例如WO 2019/067992、WO/2017/173054、WO 2015/095340和WO 2014/136086，以及其中提供的參考文獻的脂質。在一些實施方式中，在LNP脂質的上下文中術語陽離子和可電離係可互換的，例如，其中可電離脂質根據pH係陽離子的。

【0441】在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可以在數十nm和數百nm之間，例如藉由動態光散射（DLS）測量的。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可以為約40 nm至約150 nm，諸如約40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、

105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約50 nm至約100 nm、約50 nm至約90 nm、約50 nm至約80 nm、約50 nm至約70 nm、約50 nm至約60 nm、約60 nm至約100 nm、約60 nm至約90 nm、約60 nm至約80 nm、約60 nm至約70 nm、約70 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、約80 nm至約100 nm、約80 nm至約90 nm或約90 nm至約100 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約70 nm至約100 nm。在特定實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約80 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約100 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑範圍為約l mm至約500 mm、約5 mm至約200 mm、約10 mm至約100 mm、約20 mm至約80 mm、約25 mm至約60 mm、約30 mm至約55 mm、約35 mm至約50 mm，或約38 mm至約42 mm。

【0442】 在一些情況下，LNP可為相對均質的。多分散性指數可用於指示LNP的均質性，例如脂質奈米顆粒的粒度分佈。小的（例如，小於0.3）多分散性指數通常指示窄的粒度分佈。LNP的多分散性指數可為約0至約0.25，如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些實施方式中，LNP的多分散性指數可為約0.10至約0.20。

【0443】 LNP的ζ電位可用於指示組成物的電動電位。在一些實施方式中，ζ電位可以描述LNP的表面電荷。具有相對低電荷（正電荷或負電荷）的脂質奈米顆粒通常是期望的，因為更高電荷的物質可能不理想地與體內的細胞、組織和其他元素相互作用。在一些實施方式中，LNP的ζ電位可為約-10 mV至約+20 mV、約-10 mV至約+15 mV、約-10 mV至約+10 mV、約-10 mV至約+5 mV、約-10 mV至約0 mV、約-10 mV至約-5 mV、約-5 mV至約+20 mV、約-5 mV至約+15 mV、

約-5 mV至約+10 mV、約-5 mV至約+5 mV、約-5 mV至約0 mV、約0 mV至約+20 mV、約0 mV至約+15 mV、約0 mV至約+10 mV、約0 mV至約+5 mV、約+5 mV至約+20 mV、約+5 mV至約+15 mV或約+5 mV至約+10 mV。

【0444】 蛋白質和/或核酸的封裝效率描述了相對於所提供的初始量，在製備後被封裝或以其他方式與LNP締合的蛋白質和/或核酸的量。理想的封裝效率係高的（例如，接近100%）。封裝效率可以例如藉由比較在用一或多種有機溶劑或洗滌劑破碎脂質奈米顆粒之前和之後含有脂質奈米顆粒的溶液中蛋白質或核酸的量來測量。陰離子交換樹脂可用於測量溶液中游離蛋白質或核酸（例如RNA）的量。螢光可用於測量溶液中游離蛋白質和/或核酸（例如RNA）的量。對於本文所述之脂質奈米顆粒，蛋白質和/或核酸的封裝效率可為至少50%，例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少80%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少90%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少95%。

【0445】 LNP可以視需要包括一層或多層包衣。在一些實施方式中，LNP可以配製在具有包衣的膠囊、膜或片劑中。包含本文所述之組成物的膠囊、膜或片劑可具有任何可用的尺寸、拉伸強度、硬度或密度。

【0446】 另外的示例性脂質、配製物、方法和LNP表徵由WO 2020/061457、WO 2021/113777和 WO 2021226597傳授，其各自藉由援引以其全文併入本文。其他示例性脂質、配製物、方法和LNP表徵由Hou等人 Lipid nanoparticles for mRNA delivery [用於mRNA遞送的脂質奈米顆粒].Nat Rev Mater [自然評論材料] (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0傳授，其藉由援引以其全文併入本文（參見例如Hou等人的圖2的示例性脂質和脂質衍生物）。

【0447】 在一些實施方式中，使用Lipofectamine MessengerMax（賽默飛世

爾公司（Thermo Fisher））或TransIT-mRNA轉染試劑（米盧斯生物公司（Mirus Bio））進行體外或離體細胞脂質轉染。在某些實施方式中，使用GenVoy_ILM可電離脂質混合物（精密奈米系統（Precision NanoSystems））配製LNP。在某些實施方式中，使用2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧戊環（DLin-KC2-DMA）或二亞油烯基甲基-4-二甲基胺基丁酸酯（DLin-MC3-DMA或MC3）配製LNP，其配製和體內用途在Jayaraman等人 Angew Chem Int Ed Engl [德國應用化學] 51(34):8529-8533 (2012)中傳授，其藉由援引以其全文併入本文。

【0448】 優化用於遞送CRISPR-Cas系統（例如Cas9-gRNA RNP、gRNA、Cas9 mRNA）的LNP配製物在兩者均藉由援引併入的WO 2019067992和WO 2019067910中有描述，並且可用於遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸和線性多核糖核苷酸。

【0449】 可用於遞送核酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）的另外的特定LNP配製物在兩者均藉由援引併入的US 8158601和US 8168775中有描述，其包括帕替西蘭（patisiran）中使用的以名稱ONPATTRO銷售的配製物。

【0450】 在實施方式中，編碼本文所述之免疫原或多肽的至少一部分（例如抗原部分）的多核糖核苷酸（例如環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）在LNP中配製，其中：(a) LNP包含陽離子脂質、中性脂質、膽固醇和PEG脂質，(b) LNP具有80 nm至160 nm的平均粒度，並且 (c) 多核糖核苷酸包含：(i) 5'-帽結構；(ii) 5'-UTR；(iii) N1-甲基-假尿苷、胞嘧啶、腺嘌呤和鳥嘌呤；(iv) 3'-UTR；以及 (v) 聚-A區域。在實施方式中，配製在LNP中的多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）係疫苗。

【0451】 多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）LNP的示例性給藥可包括約0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10或100 mg/kg（RNA）。在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多

核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）免疫原性組成物的劑量為30-200 mcg，例如，30 mcg、50 mcg、75 mcg、100 mcg、150 mcg或200 mcg。包括多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）的AAV的示例性給藥可包括約10^{11}、10^{12}、10^{13}和10^{14} vg/kg的MOI。

套組

【0452】 在一些方面，本揭露提供了套組。在一些實施方式中，套組包括(a) 本文所述之環狀多核糖核苷酸、免疫原性組成物或藥物組成物，以及視需要(b) 資訊材料。在一些實施方式中，套組進一步包含本文所述之佐劑，該佐劑可以在單獨的組成物中提供，以作為限定給藥方案的一部分與環狀多核糖核苷酸、免疫原性組成物或藥物組成物組合投與。資訊材料可為描述性的、指導性的、行銷性的或係與本文所述方法和/或用於本文所述方法的藥物組成物或環狀多核糖核苷酸的用途相關的其他材料。藥物組成物或環狀多核糖核苷酸可包含用於單次投與（例如，單劑量形式）的材料，或可包含用於多次投與（例如，「多劑量」套組）的材料。

【0453】 套組的資訊材料的形式不受限制。在一個實施方式中，資訊材料可包括關於藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥的生產的資訊，藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥的分子量，濃度，有效期，批次或生產地點資訊等。在一個實施方式中，資訊材料涉及用於投與藥物組成物劑型之方法。在一個實施方式中，資訊材料涉及用於投與環狀多核糖核苷酸劑型之方法。

【0454】 除了本文所述之藥物組成物和環狀多核糖核苷酸的劑型之外，該套組還可包括其他成分，如溶劑或緩衝液、穩定劑、防腐劑、調味劑（例如，苦味拮抗劑或增甜劑）、香料、染料或著色劑（例如用於將套組中的一或多種組分著色或染色）、或其他化妝品成分、和/或用於治療本文所述病症或障礙的第二藥劑。可替代地，套組中可包括其他成分，但在與本文所述藥物組成物或環狀多

核糖核苷酸不同的組成物或容器中。在這樣的實施方式中，套組可包括將本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）和其他成分混合，或者將本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）與其他成分一起使用的說明書。

【0455】 在一些實施方式中，將套組的組分儲存在惰性條件下（例如，在氮氣或另一種惰性氣體諸如氬氣下）。在一些實施方式中，將套組的組分儲存在無水條件下（例如，用乾燥劑）。在一些實施方式中，將組分儲存在遮光容器，如琥珀色小瓶中。

【0456】 本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）的劑型可以以任何形式，例如液體、乾燥或凍乾形式提供。較佳的是本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）係基本上純的和/或無菌的。當在液體溶液中提供本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）時，液體溶液較佳的是為水溶液，其中較佳的是無菌水溶液。當本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）以乾燥形式提供時，通常藉由添加合適的溶劑來重構。套組中可以視需要提供溶劑，例如無菌水或緩衝液。

【0457】 該套組可包括用於含有本文所述劑型的組成物的一或多個容器。在一些實施方式中，套組含有用於組成物和資訊材料的單獨容器、分隔物或隔室。例如，藥物組成物或環狀多核糖核苷酸可以裝在瓶子、小瓶或注射器中，並且資訊材料可以裝在塑膠套管（plastic sleeve）或包中。在其他實施方式中，套組的單獨元件包含在單個未分開的容器中。例如，本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）的劑型包含在瓶、小瓶或注射器中，其上附有標籤形式的資訊材料。在一些實施方式中，套組包括多個（例如，一包）單獨的容器，每個容器含有一或多個單位劑型的本文所述之藥物組成物或環狀多核糖核苷酸。例如，該套組包括多個注射器、安瓿、箔包或泡罩包裝，每個含有單個

單位劑量的本文所述之劑型。

【0458】 套組的容器可為氣密的、防水的（例如，不受水分或蒸發變化的影響）和/或不透光的。

【0459】 該套組視需要包括適用於劑型的使用的裝置，例如注射器、移液管、鑷子、量勺、拭子（例如，棉簽或木簽）或任何這樣的裝置。

【0460】 本發明之套組可包括不同強度的劑型，以向受試者提供適用於本文所述之起始期方案、誘導期方案或維持期方案中的一或多個的劑量。可替代地，套組可包括刻痕片劑，以允許使用者根據需要投與分劑量。

實例

【0461】 提出旨在說明而非限制本揭露之以下實例，以向熟悉該項技術者提供可以如何使用、實現和評價本文所述之組成物和方法的描述。該等實例旨在僅是本揭露之示例，而無意限制發明人視為其發明的內容範圍。

實例1：分泌性VZV免疫原的體外表現

【0462】 此實例證明哺乳動物細胞中由環狀RNA表現分泌性VZV免疫原。

【0463】 將環狀RNA設計為包括內部核糖體進入位點（IRES）和編碼分泌性VZV免疫原的核苷酸序列。在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體設計為包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3 IRES（SEQ ID NO:113）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。ORF包括高斯螢光素酶（Gluc）分泌訊息序列、VZV gE核苷酸序列和編碼HiBiT肽標籤（具有VSGWRLFKKIS（SEQ ID NO: 123）的序列以及GGGGS肽連接子（SEQ ID NO: 112））的核苷酸序列。

【0464】 在此實例中，使用本文所述之方法藉由自剪接來產生環狀RNA。在存在7.5 mM的NTP的情況下，藉由體外轉錄使用T7 RNA聚合酶從包括以上列

出的模體的DNA模板合成未經修飾的線性RNA。藉由用DNA酶處理除去模板DNA。用RNA純化套組（新英格蘭生物學實驗室公司（New England Biolabs），T2050）純化合成的線性RNA。自剪接發生在轉錄期間；不需要另外的反應。藉由尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳（尿素-PAGE）或逆相柱層析法來純化編碼VZV gE的環狀RNA。

【0465】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（2皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔200,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照（空白）。還使用具有插入的分泌性VZV gE核苷酸序列的質體作為對照（Sec gE質體）。在18小時時收集上清液，並使用gE特異性ELISA測量表現。將ELISA板用100 uL包被緩衝液中的5 μg/mL的抗gE抗體包被，並在4°C下孵育過夜。將轉染的細胞上清液裝載到板中，並在室溫下孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次。將生物素化的抗gE單株抗體（9C8）以1 : 1000的稀釋度添加到板中，並在室溫下孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次。將HRP軛合的鏈黴親和素以1 : 10,000的稀釋度添加到板中，並在室溫下孵育30分鐘，隨後用TBS-T洗滌四次

【0466】 **圖6**示出了編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA在體外成功翻譯。

實例2：非分泌性VZV免疫原的體外表現

【0467】 此實例證明哺乳動物細胞中由環狀RNA表現非分泌性VZV免疫原。

【0468】 將環狀RNA設計為包括IRES和編碼跨膜VZV免疫原的核苷酸序列。在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體#1、#2和#3設計成包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3內部核糖體進入位點（IRES）（SEQ ID NO:113）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。將構建體#4設計為包括聚A50作為間隔子元件，以及EV71 IRES（SEQ ID

NO:115）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。將ORF設計為包括VZV跨膜gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子的HiBiT肽標籤的核苷酸序列。在此實例中，產生了四種不同的構建體，如表4中所述之，每種構建體具有不同的VZV跨膜gE核苷酸序列（SEQ ID NO: 124-128）。如實例1中所述產生環狀RNA。

【0469】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（2皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔20,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照。轉染後24小時收穫細胞，將細胞進行活/死染色，並用抗gE抗體（9C8）探測，隨後用PE-抗小鼠抗體探測。在24小時時藉由流動式細胞測量術測量gE表現。

【0470】 **圖7**示出了在HEK293T細胞的細胞表面上檢測到來自所有編碼跨膜gE的環狀RNA的中至高水平的gE表現。

[表4]

SEQ ID NO:	核酸序列
124	atgggcgtcaaggtcctgttcgccctgatctgcatcgccgtggccgaggccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcct gatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcg acgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccgggg cgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcc cacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcc caggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgg accagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtgga ggaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagc ctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgt ggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctg cggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtg acctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtgga actaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccttcgac ctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcc ccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccaga actgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacgg

	cggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggagg ccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagccc ccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctggaccggcgg cctggcc*ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc*
125	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagt*ggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag agcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggagg agttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccgg
126	atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcg ggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacag cgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccc cggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaa cggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccc cagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtg cggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagc acaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctacc ggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccc cctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagc gacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgaccc cccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgca cctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgc

	ggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccac ctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccac atggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgt acgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcg aggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcacc agccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgcca agcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacga cttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcgggagccacggcggcagctcttacacc gtgtacatcgacaagacccgg*ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc*
127	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggaggg*agtggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccacccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaa g
128	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggaggg*agtggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccacccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc

	tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag agcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggagg agttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccgg

實例3：具有不同IRES元件的非分泌性VZV免疫原的體外表現

【0471】此實例證明哺乳動物細胞中由具有不同IRES元件的環狀RNA表現跨膜VZV gE免疫原。

【0472】在此實例中，創建了一組編碼跨膜VZV gE的環狀RNA，每個RNA具有不同的IRES。將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。多核苷酸有效載荷包括IRES和VZV跨膜gE核苷酸序列，以及編碼具有G4S肽連接子的HiBiT肽標籤的核苷酸序列的組合，如表5中提供的。

[表5]：

IRES	IRES核酸序列	VZV Tm gE核酸序列
經修飾的CVB3	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCC CATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTT GTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAAC TTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGG CACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTAC CCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTG AAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCG AAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATG AGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTG GCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATG GGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTAT TGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCG GCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCA GAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCG	ATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGGTAT TGATGGGGTTCGGAATTATCACGGGAACGTTGCG TATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCGAT ACGATGATTTTCACATCGATGAAGACAAACTGGAT ACAAACTCCGTATATGAGCCTTACTACCATTCAGA TCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGGAGAG TCTTCGCGAAAAGCGTACGATCATAACTCACCTTA TATATGGCCACGTAATGATTATGATGGATTTTTAGA GAACGCACACGAACACCATGGGGTGTATAATCAG GGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTTAATGC AACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGG GGACGATACGGGCATCCACGTTATCCCTACGTTA AACGGCGATGACAGACATAAAATTGTAAATGTGGA CCAACGTCAATACGGTGACGTGTTTAAAGGAGATC TTAATCCAAAACCCCAAGGCCAAAGACTCATTGAG

	GAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATT CCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATC GTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGAC TAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATA CCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCA TTGTTAAGTTGAATACAGCAAC（SEQ ID NO: 113）	GTGTCAGTGGAAGAAAATCACCCGTTTACTTTACG CGCACCGATTCAGCGGATTTATGGAGTCCGGTAC ACCGAGACTTGGAGCTTTTTGCCGTCATTAACCTG TACGGGAGACGCAGCGCCCGCCATCCAGCATATA TGTTTAAAACATACAACATGCTTTCAAGACGTGGT GGTGGATGTGGATTGCGCGGAAAATACTAAAGAG GATCAGTTGGCCGAAATCAGTTACCGTTTTCAAGG TAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTA AACACGAGCACACTGTTTGATGAACTCGAATTAGA CCCCCCCGAGATTGAACCGGGTGTCTTGAAAGTA CTTCGGACAGAAAAACAATACTTGGGTGTGTACAT TTGGAACATGCGCGGCTCCGATGGTACGTCTACC TACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATG AAAAAACAAGAAACCCTACGCCCGCAGTAACTCCT CAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATATGTGGAATTA CCACTCGCATGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTA GCTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAGATACATGAA GCGCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTGGTTGTATGT CCCCATCGATCCTACATGTCAACCAATGCGGTTAT ATTCTACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACCCCAA TGCCTCTCTCATATGAATTCCGGTTGTACATTTAC CTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGTTGCAAGCACA GTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACAC CGCATATTGTCTGGGAATATCTCATATGGAGCCTA GCTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGGCACCAC GTTAAAGTTTGTAGATACACCCGAGAGTTTGTCGG GATTATACGTTTTTGTGGTGTATTTTAACGGGCAT GTTGAAGCCGTAGCATACACTGTTGTATCCACAGT AGATCATTTTGTAAACGCAATTGAGGAGCGTGGAT TTCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGGCGACTAC TAAACCCAAGGAAATTACCCCCGTAAACCCCGGA ACGTCACCACTTCTACGATATGCCGCATGGACCG GAGGGCTTGCAGCAGTAGTACTTTTATGTCTCGTA ATATTTTTAATCTGTACGGCTAAACGAATGAGGGT TAAAGCCGCCAGGGTAGACAAGTGA（SEQ ID NO: 121）
EMCV	ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGG TGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCC CCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCG GAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCC AAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGG CACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG	SEQ ID NO: 121

	TGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCA ACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATG CTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAG GCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGA AAAACACGATGATAATA （SEQ ID NO: 114）	
EV71	TTAAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCACCCACA GGGTCCACTGGGCGCTAGTACACTGGTATCTC GGTACCTTTGTACGCCTGTTTTATACCCCCTCC CTGATTTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACCAG ATCAATAGTAGGTGTGACATACCAGTCGCATCT TGATCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCGAGT ATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAA AACGTCCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAA GCCTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTCCCCCCGTGTAGATCAGGTC GATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGT GGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCTATGG GGTAACCCATAGGACGCTCTAATACGGACATG GCGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTC CTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTG CGGAGCACATACCCTTAATCCAAAGGGCAGTG TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGA CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTTATTCTTG TATTGGCTGCTTATGGTGACAATTAAAGAATTG TTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCAGTG TCAAACAGAGCTATTGTATATCTCTTTGTTGGA TTCACACCTCTCACTCTTGAAACGTTACACACC CTCAATTACATTATACTGCTGAACACGAAGCGG CCACC（SEQ D NO: 115）	SEQ ID NO: 121
HRV-2（人鼻病毒89型（HRV89）））	TTAAAACTGGGAGTGGGTTGTTCCCACTCACTC CACCCATGCGGTGTTGTACTCTGTTATTACGGT AACTTTGTACGCCAGTTTTTCCCACCCTTCCCC ATAATGTAACTTAGAAGTTTGTACAATATGACC AATAGGTGACAATCATCCAGACTGTCAAAGGT CAAGCACTTCTGTTTCCCCGGTCAATGAGGAT ATGCTTTACCCAAGGCAAAAACCTTAGAGATCG TTATCCCCACACTGCCTACACAGAGCCCAGTA CCATTTTTGATATAATTGGGTTGGTCGCTCCCT GCAAACCCAGCAGTAGACCTGGCAGATGAGG CTGGACATTCCCCACTGGCGACAGTGGTCCAG	SEQ ID NO: 121

	CCTGCGTGGCTGCCTGCTCACCCTTCTTGGGT GAGAAGCCTAATTATTGACAAGGTGTAAAGAG CCGCGTGTGCTCAGTGTGCTTCCTCCGGCCCC TGAATGTGGCTAACCTTAACCCTGCAGCCGTT GCCCATAATCCAATGGGTTTGCGGTCGTAATG CGTAAGTGCGGGATGGGACCAACTACTTTGGG TGTCCGTGTTTCCTGTTTTTCTTTTGATTGCATT TTATGGTGACAATTTATAGTGTATAGATTGTCAT C（SEQ ID NO: 116）	
AEV	TTTGAAAGAGGCCTCCGGAGTGTCCGGAGGCT CTCTTTCGACCCAACCCATACTGGGGGGTGTG TGGGACCGTACCTGGAGTGCACGGTATATATG CATTCCCGCATGGCAAGGGCGTGCTACCTTGC CCCTTGACGCATGGTATGCGTCATCATTTGCCT TGGTTAAGCCCCATAGAAACGAGGCGTCACGT GCCGAAAATCCCTTTGCGTTTCACAGAACCATC CTAACCATGGGTGTAGTATGGGAATCGTGTAT GGGGATGATTAGGATCTCTCGTAGAGGGATAG GTGTGCCATTCAAATCCAGGGAGTACTCTGGC TCTGACATTGGGACATTTGATGTAACCGGACCT GGTTCAGTATCCGGGTTGTCCTGTATTGTTACG GTGTATCCGTCTTGGCACACTGAAAGGGTATTT TTGGGTAATCCTTTCCTACTGCCTGATAGGGTG GCGTGCCCGGCCACGAGAGATTAAGGGTAGC AATTTAAACGCCACC（SEQ ID NO: 122）	SEQ ID NO: 121
愛知病毒（Aichivirus）	TTTGAAAAGGGGGTGGGGGGGCCTCGGCCCC CTCACCCTCTTTTCCGGTGGTCTGGTCCCGGA CCACCGTTACTCCATTCAGCTTCTTCGGAACCT GTTCGGAGGAATTAAACGGGCACCCATACTCC CCCCACCCCCCTTTTGTAACTAAGTATGTGTGC TCGTGATCTTGACTCCCACGGAACGGACCGAT CCGTTGGTGAACAAACAGCTAGGTCCACATCC TCCCTTCCCCTGGGAGGGCCCCCGCCCTCCC ACATCCTCCCCCCAGCCTGACGTATCACAGGC TGTGTGAAGCCCCCGCGAAAGCTGCTCACGTG GCAATTGTGGGTCCCCCCTTCATCAAGACACC AGGTCTTTCCTCCTTAAGGCTAGCCCCGGCGT GTGAATTCACGTTGGGCAACTAGTGGTGTCAC TGTGCGCTCCCAATCTCGGCCGCGGAGTGCT GTTCCCCAAGCCAAACCCCTGGCCCTTCACTA TGTGCCTGGCAAGCATATCTGAGAAGGTGTTC	SEQ ID NO: 121

	CGCTGTGGCTGCCAACCTGGTGACAGGTGCC CCAGTGTGCGTAACCTTCTTCCGTCTCCGGAC GGTAGTGATTGGTTAAGATTTGGTGTAAGGTTC ATGTGCCAACGCCCTGTGCGGGATGAAACCTC TACTGCCCTAGGAATGCCAGGCAGGTACCCCA CCTCCGGGTGGGATCTGAGCCTGGGCTAATTG TCTACGGGTAGTTTCATTTCCAATCCTTTTATGT CGGAGTCGCCACC（SEQ ID NO: 117）	
克羅病毒（Crohivirus）B	GTATAAGAGACAGGTGTTTGCCTTGTCTTCGGA CTGGCATCTTGGGACCAACCCCCCTTTTCCCC AGCCATGGGTTAAATGGCAATAAAGGACGTAA CAACTTTGTAACCATTAAGCTTTGTAATTTTGTA ACCACTAAGCTTTGTGCACATAATGTAACCATC AAGCTTGTTAGTCCCAGCAGGAGGTTTGCATG CTTGTAGCCGAAATGGGGCTCGACCCCCCATA GTAGGATACTTGATTTTGCATTCCATTGTGGAC CTGCAAACTCTACACATAGAGGCTTTGTCTTGC ATCTAAACACCTGAGTACAGTGTGTACCTAGAC CCTATAGTACGGGAGGACCGTTTGTTTCCTCA ATAACCCTACATAATAGGCTAGGTGGGCATGC CCAATTTGCAAGATCCCAGACTGGGGGTCGGT CTGGGCAGGGTTAGATCCCTGTTAGCTACTGC CTGATAGGGTGGTGCTCAACCATGTGTAGTTT AAATTGAGCTGTTCATATACCGCCACC（SEQ ID NO: 118）	SEQ ID NO: 121
埃可病毒（Echovirus）11	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCCATCCACAG GGCCCACTGGGCGCCAGCACTCTGGTATTGC GGTACCTTAGTGCGCCTGTTTTATATACCCGTC CCCCAAACGTAACTTAGACGCATGTCAACGAA GACCAATAGTAAGCGCAGCACACCAGCTGTGT TCCGGTCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACCGA GTATCAATAAGCTACTCACGTGGCTGAAGGAG AAAACGTTCGTTACCCGACCAATTACTTCAAGA AACCTAGTAACACCATGAAGGTTGCGCAGTGT TTCGCTCCGCACAACCCCAGTGTAGATCAGGT CGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGTGACCG TGGCGGTGGCTGCGCTGGCGGCCTGCCCATG GGGAAACCCATGGGACGCTTCAATACTGACAT GGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAATTGGTAGT CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACT GCGGAGCAGATACCCACACACCAGTGGGCAG	SEQ ID NO: 121

	TCTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACC GACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTCTTTATCC TTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGA TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCG GTGACAAATAGAGCAATTGTGTATTTGTTTGTT GGTTTCGTGCCATTAAATTACAAGGTTCTAAAC ACCCTTAATCTTATTATAGCATTCAACACAACAA AGCCACC（SEQ ID NO: 119）	
經修飾的CVB3	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121

【0473】 如實例1中所述產生環狀RNA。

【0474】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（1.0皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔100,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照。轉染後24小時收穫細胞，並如上所述測量gE表現。

【0475】 **圖8**示出了在HEK293T細胞的細胞表面檢測到來自每個編碼跨膜gE的環狀RNA（除了含有AEV IRES的環狀RNA）的VZV gE免疫原。

實例4：在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0476】 此實例證明在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原。

【0477】 將環狀RNA設計為包括IRES和編碼分泌性VZV免疫原或非分泌性VZV免疫原（例如，跨膜VZV免疫原）的核苷酸序列。

【0478】 在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體設計成包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3內部核糖體進入位點（IRES）（SEQ ID NO:48）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。對於編碼分泌性VZV免疫原的DNA構建體，將ORF設計為包括分泌訊息序列、VZV gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子（SEQ ID NO: 113）的HiBiT肽標籤的核苷酸序列。對於編碼非分泌性VZV免疫原的DNA構建體，將ORF設

計為包括VZV跨膜gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子（SEQ ID NO: 112）的HiBiT肽標籤（SEQ ID NO: 123）的核苷酸序列。

【0479】 在7.5 mM NTP存在下使用T7 RNA聚合酶藉由體外轉錄從DNA模板合成未經修飾的線性RNA。藉由用DNA酶處理20分鐘去除模板DNA。用RNA純化套組（新英格蘭生物學實驗室公司（New England Biolabs），T2050）純化合成的線性RNA。自剪接發生在轉錄期間；不需要另外的反應。藉由尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳（尿素-PAGE）或逆相柱層析法來純化編碼VZV gE的環狀RNA。

【0480】 用脂質奈米顆粒配製純化的環狀RNA以獲得環狀RNA製劑。簡言之，將環狀RNA在pH = 4的25 mM乙酸鹽緩衝液中稀釋（通過0.2 μm過濾器過濾）至0.2 μg/μL的濃度。首先藉由將可電離脂質（例如ALC0315）、膽固醇、DSPC和DMG-PEG2000以50/38.5/10/1.5 mol%的莫耳比溶解在乙醇中（通過0.2 um無菌過濾器過濾）來配製脂質奈米顆粒（LNP）。最終可電離脂質/RNA重量比為6/1 w/w。使用微流體系統將脂質和RNA溶液在微混合器晶片中混合，流速比為3/1緩衝液/乙醇且總流速為1 ml/min。然後將LNP在pH = 7.4的PBS中透析3小時以去除乙醇。根據需要，可使用截止值為100 kDa的Amicon離心過濾器將LNP濃縮至所需的RNA濃度。

【0481】 在第0天（初免）和第28天（加強）經由肌內注射使每組三隻Balb/C小鼠（n = 3）接受10 μg或50 μg劑量的環狀RNA製劑。在第0天和第28天肌內注射PBS（無環狀RNA）的小鼠（n = 3）用作對照。在第0天和第28天肌內注射5 μg的SHINGRIX疫苗的小鼠（n = 3）也用作對照。

【0482】 在初免後6小時、2天和5天，從注射有50 μg劑量的編碼分泌性VZV gE的環狀RNA製劑或PBS的每隻小鼠中收集血清樣本。按照製造商的說明，使用以下測量VZV gE水平：HiBiT標籤；生物發光蛋白檢測測定（Nano-Glo® HiBiT細胞外檢測系統，普洛麥格公司（Promega），目錄號N420）。數據在**圖9**中顯示

為每組三隻動物的平均值。根據HiBiT標準內推gE濃度（ng/mL）。肌內免疫接種編碼分泌性gE的環狀RNA後6小時，在血清中檢測到濃度為約200 g/mL的分泌性gE。

實例5：小鼠模型中來自環狀RNA的VZV免疫原的免疫原性

【0483】 此實例證明編碼VZV免疫原的環狀RNA在小鼠中誘導免疫原特異性響應。

【0484】 如實例4中所述設計、生產和在LNP中配製環狀RNA。

【0485】 在第0天（初免）和第28天（加強）經由肌內注射使每組三隻Balb/C小鼠（n = 3）接受10 μg或50 μg劑量的環狀RNA製劑。肌內注射PBS（無環狀RNA）的小鼠（n = 3）用作對照。肌內注射5 μg的SHINGRIX疫苗的小鼠（n = 3）也用作對照。

【0486】 在第14、35和42天，如實例4中所述，從投與環狀RNA製劑的小鼠中分離血清樣本。測定血清樣本中是否存在VZV特異性IgG。將ELISA板在4°C下用在100 μL的1X包被緩衝液（百進生技公司（Biolegend），421701）中的gE蛋白（金斯瑞公司（Genscript）定製蛋白；100 ng/孔）包被過夜。然後用封閉緩衝液（含2% BSA和0.05%吐溫20的TBS）將板封閉1小時。將血清連續稀釋8次（4倍稀釋，從500至8192000），然後添加到每個孔中的100 μL封閉緩衝液中，並在室溫下孵育1小時。用含Tween®洗滌劑的1X Tris緩衝鹽水（TBS-T）洗滌三次後，將板與抗小鼠IgG HRP檢測抗體（艾博抗公司（Abcam），ab97023）孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次，然後添加四甲基苯（TMB）ELISA底物（賽默飛世爾公司（ThermoFisher），34022）。將板保持20分鐘，然後使用0.2 N硫酸淬滅。在450 nm下測定光密度（O.D.）值。終點滴度定義為吸光度值高於背景4倍的最後一次稀釋。

【0487】 結果顯示，對於分泌性和跨膜gE，在注射後第14天引發抗gE抗體，

並且在加強後滴度繼續增加（**圖10**）。

【0488】 在初免後第42天，將小鼠處死，收穫脾臟，並且根據製造商的方案（邁博太科公司（Mabtech），3321-4HPT-10）藉由ELISpot測定測試VZV-gE T細胞響應。簡言之，收穫脾臟並將其加工成單細胞懸浮液。將脾細胞以每孔0.5 M細胞接種在IFN-γ ELISpot板上。脾細胞不受刺激或用1 μg/mL的gE肽庫（JPT，PM-VZV-gE）刺激。將細胞培養過夜，並在第二天根據製造商的方案將板顯色。**圖11**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發T細胞響應。

【0489】 如上所述，在初免後第42天，將小鼠處死，並將脾臟加工成單細胞懸浮液。將脾細胞以0.5/孔接種在96孔U型底板中。脾細胞不受刺激或用1 μg/mL的gE肽庫（JPT，PM-VZV-gE）刺激。將脾細胞培養1小時，隨後添加細胞內蛋白抑制劑（GolgipPlug™和GolgiStop™蛋白質轉運抑制劑（BD，555028）），然後再培養5小時。根據製造商的方案（BD，555028）對脾細胞進行固定、透化和染色。

【0490】 **圖12A**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發CD8 T細胞響應。**圖12B**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發CD4 T細胞響應。相對於SHINGRIX疫苗，環狀RNA引發顯著更高的CD4 T細胞。

【0491】 該等結果表明，編碼分泌性gE或跨膜gE的環狀RNA在小鼠中誘導gE特異性體液和細胞免疫響應。

實例11：編碼VZV免疫原的環狀RNA的設計、生成和純化

【0492】 此實例描述了編碼VZV免疫原（例如，gE VZV免疫原）的環狀RNA的設計和體外產生及純化。將環狀RNA設計成包括IRES、編碼VZV免疫原

的核酸序列和至少一個間隔子元件。一些編碼環狀RNA的VZV免疫原還編碼天然前導序列或分泌訊息。

【0493】在此實例中，藉由兩種示例性方法之一生成環狀RNA，並再次用RNA純化系統純化。

示例性方法1：DNA夾板連接

【0494】該方法藉由夾板連接產生環狀RNA。使用夾板DNA將RppH處理的線性RNA環化。使用T7 RNA聚合酶藉由體外轉錄從DNA區段合成未經修飾的線性RNA。將轉錄的RNA用RNA純化系統（新英格蘭生物學實驗室公司）純化，用RNA 5'磷酸水解酶（RppH）（新英格蘭生物學實驗室公司，M0356）按照製造商的說明處理。替代性地或另外，RNA在GMP相對於GTP過量的情況下轉錄。

【0495】夾板連接如下進行：藉由使用RNA連接酶處理轉錄的線性RNA和長度介於10至40個核苷酸之間的DNA夾板來生成環狀RNA。為了純化環狀RNA，在4%變性PAGE上解析連接混合物，並切除對應於每個環狀RNA的RNA條帶。碾碎切除的RNA凝膠片段，並用凝膠洗脫緩衝劑（0.5 M乙酸鈉、0.1% SDS、1 mM EDTA）在37°C下洗脫RNA一小時。替代性地或另外，藉由柱層析法純化環狀RNA。收穫上清液，並藉由向碾碎的凝膠中添加凝膠洗脫緩衝劑再次洗脫RNA，並孵育一小時。藉由離心過濾器去除凝膠碎片，並用乙醇沈澱。使用瓊脂糖凝膠電泳作為驗證純度和環化的品質控制測量。

示例性方法2：藉由自剪接內含子進行環化

【0496】該方法藉由自剪接產生環狀RNA。環狀RNA在體外生成。未經修飾的線性RNA從包括以上列出的所有模體的DNA模板體外轉錄。體外轉錄反應包括1 μg模板DNA T7 RNA聚合酶啟動子、10X T7反應緩衝液、7.5 mM ATP、7.5 mM CTP、7.5 mM GTP、7.5 mM UTP、10 mM DTT、40 U RNA酶抑制劑和T7酶。在37°C下轉錄4小時。將轉錄的RNA用1 U的DNA酶I在37°C下DNA酶處理

15分鐘。為了有利於藉由自剪接進行的環化，添加額外的GTP至終濃度2 mM，在55°C下孵育15分鐘。然後將RNA進行柱純化，並藉由UREA-PAGE視覺化。

實例12：VZV免疫原的體外表現

【0497】 此實例描述了在哺乳動物細胞中由環狀RNA表現VZV免疫原。為了測量來自RNA構建體的VZV免疫原的表現，根據本文所述之方法生產和純化編碼VZV免疫原的環狀RNA。使用MessengerMax（英傑公司，LMRNA）將環狀RNA（0.1皮莫耳）轉染到HEK293（96孔板中無血清培養基中，每孔10,000個細胞）中。24小時後收穫細胞上清液。ELISA如下進行：將捕獲抗體於4°C在100 µL PBS中包被到ELISA板（MaxiSorp 442404，96孔）上過夜。用TBS-T洗滌三次後，將板用封閉緩衝液（含2% FBS和0.05%吐溫20的TBS）封閉1小時。然後將上清液稀釋液添加到每個孔的100 µL封閉緩衝液中，並在室溫下孵育1小時。用TBS-T洗滌三次後，將板與HRP檢測抗體在室溫下孵育1小時。將四甲基苯（Pierce 34021）添加到每個孔中，使其反應5-15分鐘，然後用2 N硫酸淬滅。在450 nm下測定光密度（OD）值。

實例13：在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0498】 此實例證明由環狀RNA體內表現VZV免疫原。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。純化後，如下配製環狀RNA：

【0499】 A. 將環狀RNA稀釋於PBS中以獲得環狀RNA製劑（裸的）。

【0500】 B. 用脂質奈米顆粒配製環狀RNA以獲得環狀RNA製劑（LNP配製的）。簡言之，將環狀RNA在25 mM乙酸鹽緩衝液（pH = 4）中稀釋。首先藉由將可電離脂質（例如ALC0315）、膽固醇、DSPC和DMG-PEG2000以50/38.5/10/1.5 mol%的莫耳比溶解在乙醇中來配製脂質奈米顆粒（LNP）。最終可電離脂質/RNA重量比為8/1 w/w。使用微流體系統將脂質和RNA溶液在微混合器晶片中混合。然後將LNP在PBS（pH = 7.4）中透析以去除乙醇。用PBS調節環

狀RNA濃度。

【0501】 C. 與佐劑（如Addavax™佐劑（英傑公司）、MF59®佐劑、AS01/AS01B、AS03、明礬、CpG1018或聚I:C）一起配製環狀RNA以獲得環狀RNA製劑（佐劑配製的）。簡言之，將環狀RNA與佐劑混合。

【0502】 在一種方法中，將環狀RNA製劑（裸的、LNP配製的、佐劑配製的）在第0天皮內或肌內投與於小鼠，4週後進行第二次皮內或肌內投與。在第二種方法中，在第0天，將藉由在PBS中稀釋環狀RNA獲得的環狀RNA製劑（裸的）或藉由在LNP中配製環狀RNA獲得的環狀RNA製劑（LNP配製的）皮內或肌內投與於小鼠，4週後進行第二次皮內或肌內注射。對於第二種方法，將佐劑（如Addavax™佐劑（英傑公司）、MF59®佐劑、AS01/AS01B、AS03、明礬、CpG1018、或聚I:C）在第0天（與環狀RNA製劑同時遞送）或24小時時投與於小鼠。對於這兩種方法，將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。

【0503】 在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0504】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

實例14：在小鼠模型中由與佐劑一起遞送的環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0505】 此實例證明VZV免疫原由藉由與佐劑（如AddaSO3™佐劑，英傑公司）一起遞送而免疫增強的環狀RNA體內表現。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。還藉由與等體積的AddaSO3™佐劑溶液混合來配製環狀RNA。在第0

天向小鼠肌內投與環狀RNA/佐劑製劑，4週後第二次投與。將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0506】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性T細胞。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

實例15：在小鼠模型中由與佐劑一起遞送的環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0507】 此實例證明VZV免疫原由藉由與佐劑（如AddaSO3™佐劑，英傑公司）一起遞送而免疫增強的環狀RNA體內表現。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。還藉由與等體積的AddaSO3™佐劑溶液混合來配製環狀RNA。在第0天向小鼠皮內投與環狀RNA/佐劑製劑，4週後第二次投與。將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0508】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性T細胞。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

其他實施方式

【0509】在不脫離本發明之範圍和精神的情況下，本發明所述之組成物、方法和用途的各種修改和變化對熟悉該項技術者將是顯而易見的。雖已結合具體實施方式描述了本發明，但應當理解，所要求的發明不應當過度地局限於此類具體實施方式。事實上，對於熟悉該項技術者顯而易見的用於進行本發明的所述方式的各種修改旨在落入本發明之範圍內。

【0510】所有出版物、專利和專利申請均藉由援引以其全文併入本文，其程度如同特別且單獨地指出將每個單獨的出版物、專利或專利申請藉由援引以其全文併入一樣。

編號的實施方式

[1]一種環狀多核糖核苷酸，其包含編碼水痘-帶狀皰疹病毒（VZV）多肽免疫原的開讀框。

[2]如實施方式[1]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV糖蛋白或其免疫原性片段。

[3]如實施方式[2]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白選自VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、和gM或其免疫原性片段。

[4]如實施方式[3]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係VZV gE或其免疫原性片段。

[5]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係相對於野生型VZV gE包含不超過10個胺基酸取代、缺失或插入的VZV gE的突變變體或其免疫原性片段。

[6]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。

[7]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少羧

基末端尾結構域的截短多肽。

[8]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。

[9]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變。

[10] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-573和Y569A突變。

[11] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-623和Y569A突變、Y582G突變、或Y569A/Y582G雙突變。

[12] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含與SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[13] 如實施方式[12]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列。

[14] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽進一步包含訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包含與SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[15] 如實施方式[14]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽進一步包含訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包含SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列。

[16] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV gE多肽由與SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

[17] 如實施方式[16]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含

訊息序列的VZV gE多肽由SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列編碼。

[18] 如實施方式[1]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

[19] 如實施方式[18]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV立即早期蛋白係IE63多肽。

[20] 如實施方式[19]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV IE63多肽包含與SEQ ID NO: 84的任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[21] 如實施方式[20]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV IE63多肽包含SEQ ID NO: 84中任一項的胺基酸序列。

[22] 如實施方式[18]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由與SEQ ID NO: 85的任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

[23] 如實施方式[22]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列編碼。

[24] 如實施方式[1]-[23]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有至少51%的GC含量。

[25] 如實施方式[24]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有51%至60%的GC含量。

[26] 如實施方式[1]-[25]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有大於20%的尿苷含量。

[27] 如實施方式[26]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有20%至28%的尿苷含量。

[28] 如實施方式[1]-[27]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV

多肽免疫原進一步包含編碼多聚化結構域的序列。

[29]. 如實施方式[28]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域選自T4 foldon結構域、鐵蛋白結構域、β環肽、AaLS肽、或二氧四氫蝶啶合酶結構域。

[30] 如實施方式[28]或[29]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的N端。

[31] 如實施方式[28]或[29]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的C端。

[32] 如實施方式[1]-[31]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的開讀框與IRES可操作地連接。

[33] 如實施方式[1]-[32]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的開讀框編碼第二多肽。

[34] 如實施方式[33]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原和該第二多肽被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。

[35] 如實施方式[34]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。

[36] 如實施方式[1]-[32]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該環狀多核糖核苷酸進一步包含與第二IRES可操作地連接的編碼第二多肽的第二開讀框。

[37] 如實施方式[33]-[36]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽免疫原。

[38] 如實施方式[37]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV多肽免疫原。

[39] 如實施方式[38]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係選自以

下的VZV糖蛋白：VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN和gM，VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

[40] 如實施方式[39]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV gE或其免疫原性片段。

[41] 如實施方式[33]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV IE63或其免疫原性片段。

[42] 如實施方式[33]-[36]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽佐劑。

[43] 如實施方式[42]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該佐劑係細胞介素、趨化因子、共刺激分子、先天性免疫刺激因子、傳訊分子、轉錄激活因子、細胞介素受體、細菌組分或先天性免疫系統的組分。

[44] 如實施方式[1]-[43]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該環狀多核糖核苷酸進一步包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

[45]. 如實施方式[44]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該先天性免疫系統刺激因子選自富含GU的模體、富含AU的模體、包含dsRNA的結構化區域或適配體。

[46] 一種免疫原性組成物，其包含如實施方式[1]-[45]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸和藥學上可接受的賦形劑。

[47] 如實施方式[46]所述之免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含第二環狀多核糖核苷酸。

[48] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含編碼第二多肽免疫原的開讀框。

[49] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含編碼多肽佐劑的開讀框。

[50] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

[51] 一種在受試者中誘導針對VZV的免疫響應之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[52] 一種在受試者中預防VZV感染之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[53] 一種治療患有或疑似患有VZV感染的受試者之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[54] 如實施方式[53]所述之方法，其中該受試者先前已被診斷患有VZV感染或與VZV感染相關的障礙。

[55] 如實施方式[53]或[54]所述之方法，其中該VZV感染無症狀，或該VZV感染處於潛伏期。

[56] 如實施方式[53]-[55]中任一項所述之方法，其中該受試者已經被診斷患有帶狀皰疹。

[57] 如實施方式[56]所述之方法，其中投與該環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物降低了與帶狀皰疹相關的症狀的頻率或嚴重程度。

[58] 如實施方式[51]-[57]中任一項所述之方法，其中該受試者係人類受試者。

[59] 如實施方式[51]-[58]中任一項所述之方法，該方法進一步包括向該受試者投與佐劑。

[60] 如實施方式[51]-[59]中任一項所述之方法，該方法進一步包括向該受試者投與VZV多肽免疫原。

【符號說明】

【0511】無

【生物材料寄存】

【0512】無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種環狀多核糖核苷酸，其包含編碼水痘-帶狀皰疹病毒（VZV）多肽免疫原的開讀框。

【請求項2】如請求項1所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV糖蛋白或其免疫原性片段。

【請求項3】 如請求項2所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白選自VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、和gM或其免疫原性片段。

【請求項4】如請求項3所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係VZV gE或其免疫原性片段。

【請求項5】如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係相對於野生型VZV gE包含不超過10個胺基酸取代、缺失或插入的VZV gE的突變變體或其免疫原性片段。

【請求項6】 如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。

【請求項7】 如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少羧基末端尾結構域的截短多肽。

【請求項8】 如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。

【請求項9】 如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變。

【請求項10】如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-573和Y569A突變。

【請求項11】如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含

VZV gE的胺基酸1-623和Y569A突變、Y582G突變、或Y569A/Y582G雙突變。

【請求項12】如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含與SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項13】如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽進一步包含訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包含與SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項14】 如請求項4所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV gE多肽由與SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

【請求項15】 如請求項1所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

【請求項16】如請求項15所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV立即早期蛋白係IE63多肽。

【請求項17】如請求項16所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV IE63多肽包含與SEQ ID NO: 84的任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

【請求項18】如請求項16所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由與SEQ ID NO: 85的任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

【請求項19】如請求項1-18中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原進一步包含編碼多聚化結構域的序列。

【請求項20】如請求項1-19中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的開讀框編碼第二多肽。

【請求項21】如請求項20所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原和該第二多肽被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點、或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。

【請求項22】如請求項20或21所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽免疫原。

【請求項23】如請求項22所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV多肽免疫原。

【請求項24】如請求項23所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係選自以下的VZV糖蛋白：VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN和gM，VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

【請求項25】如請求項24所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV gE或其免疫原性片段。

【請求項26】如請求項24所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV IE63或其免疫原性片段。

【請求項27】如請求項20或21所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽佐劑。

【請求項28】如請求項1-27中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該環狀多核糖核苷酸進一步包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

【請求項29】一種免疫原性組成物，其包含如請求項1-28中任一項所述之環狀多核糖核苷酸和藥學上可接受的賦形劑。

【請求項30】如請求項29所述之免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含第二環狀多核糖核苷酸。

【請求項31】如請求項30所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核

苷酸包含編碼第二多肽免疫原的開讀框。

【請求項32】如請求項30所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含編碼多肽佐劑的開讀框。

【請求項33】如請求項30所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

【請求項34】一種在受試者中誘導針對VZV的免疫響應之方法，該方法包括向該受試者投與如請求項1-33中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【請求項35】一種在受試者中預防VZV感染之方法，該方法包括向該受試者投與如請求項1-33中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【請求項36】一種治療患有或疑似患有VZV感染的受試者之方法，該方法包括向該受試者投與如請求項1-33中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

(發明圖式)

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140

圖 2

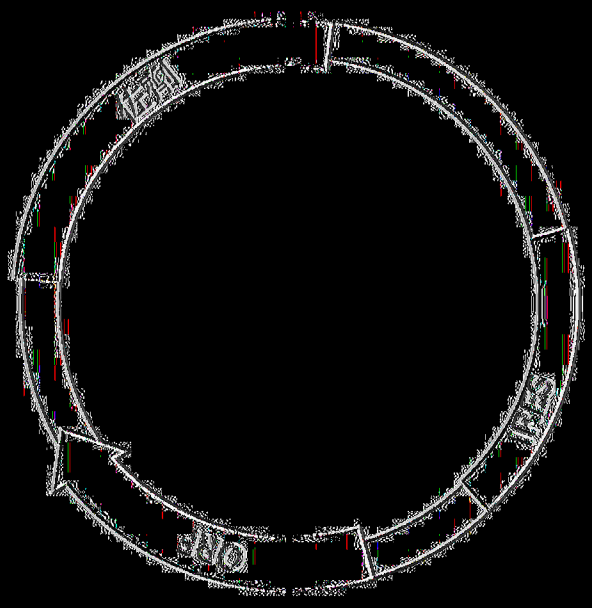
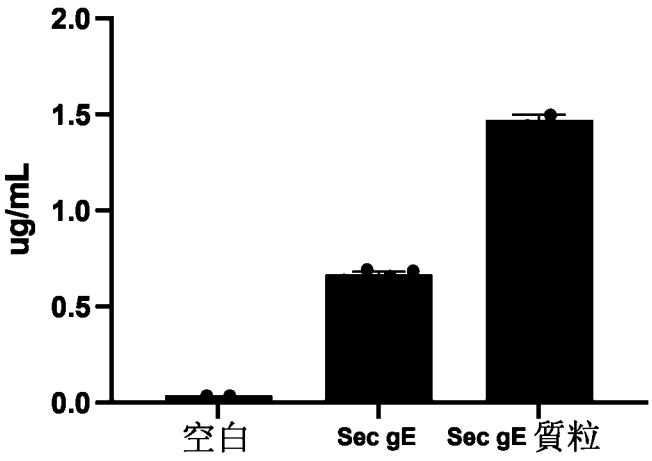
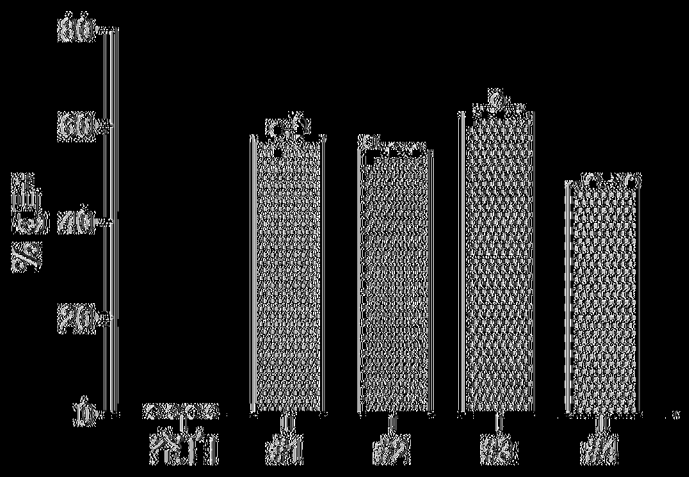


圖 3(b)

圖 4



【圖6】



圖(時)

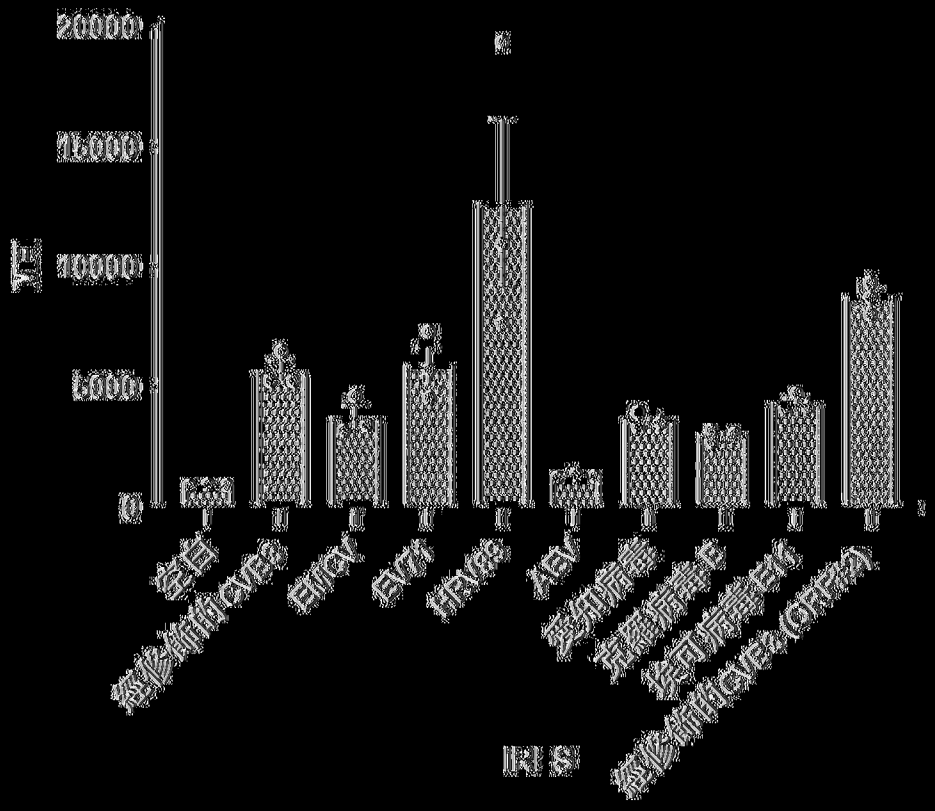
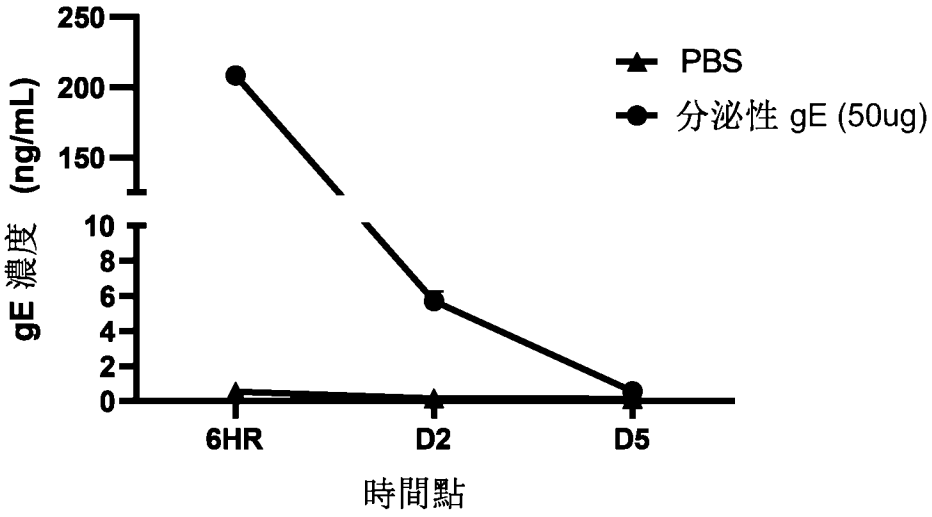


圖8



【圖9】

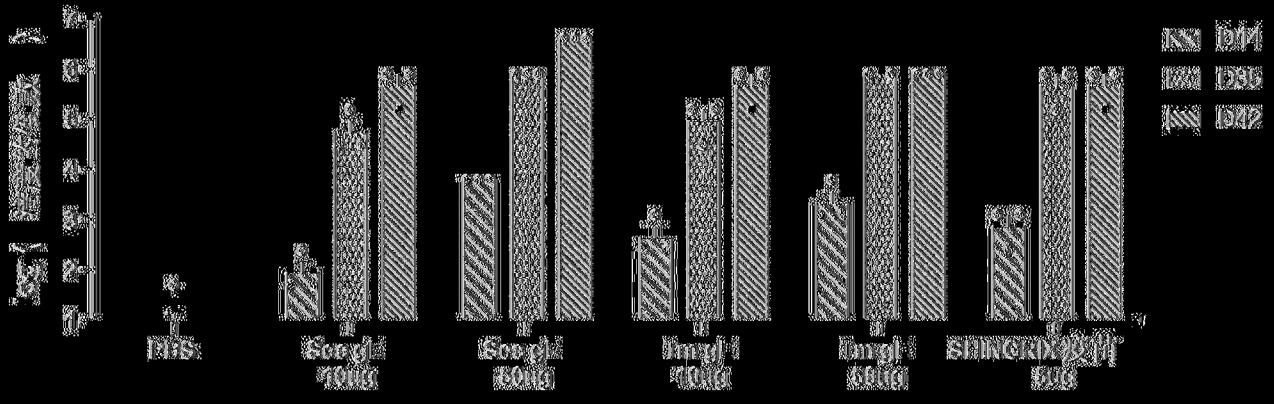
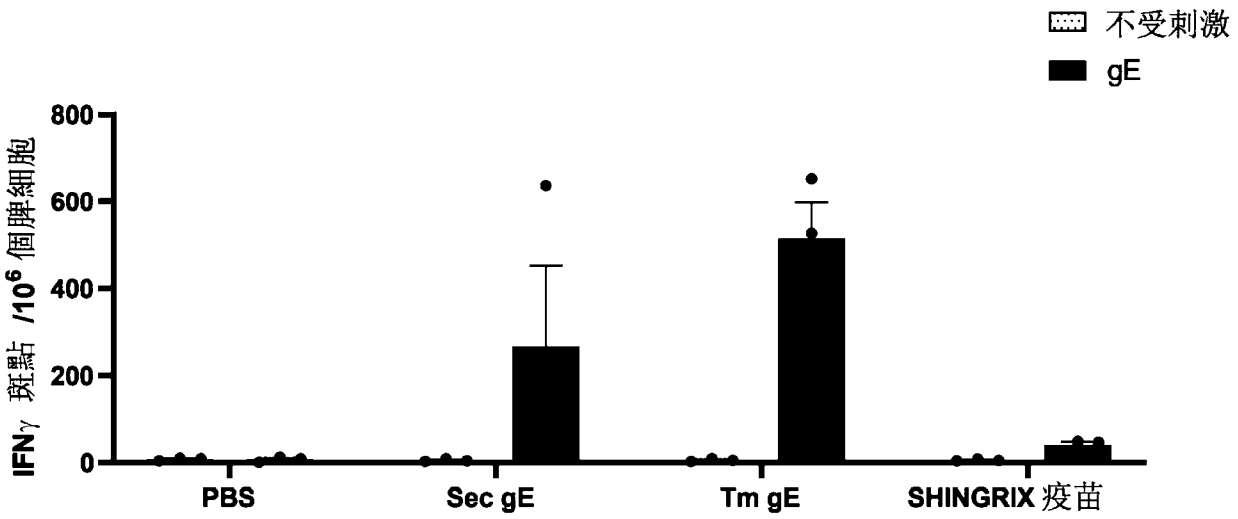
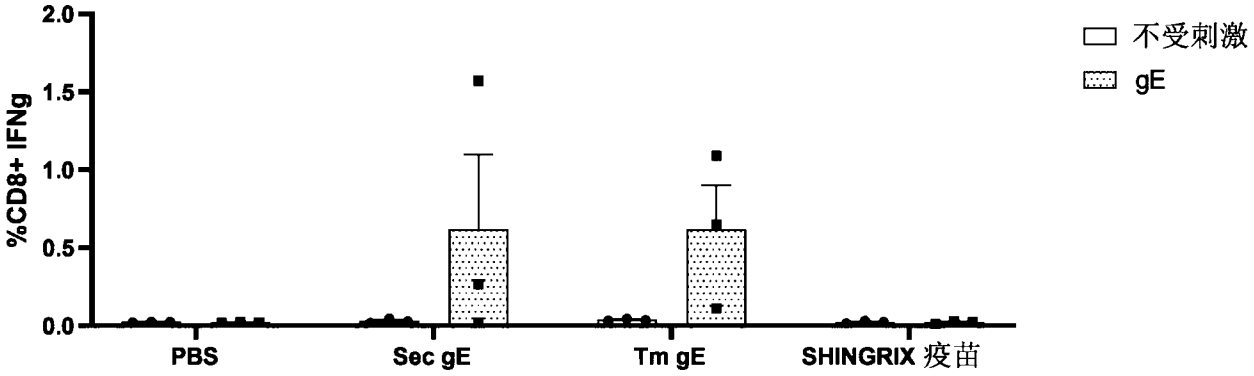


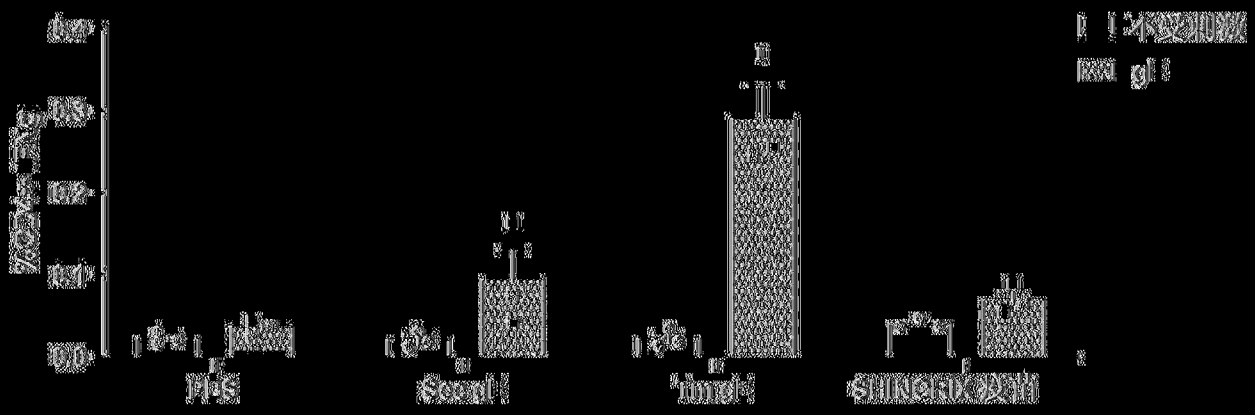
圖10


不受刺激
gE
IFNγ 斑點 /10^6 個脾細胞
800
600
400
200
0
PBS
Sec gE
Tm gE
SHINGRIX 疫苗

【圖11】



【圖12A】



[圖12B]

【發明說明書】

【中文發明名稱】 水痘-帶狀皰疹病毒免疫原組成物及其用途

【英文發明名稱】 VARICELLA-ZOSTER VIRUS IMMUNOGEN COMPOSITIONS AND THEIR USES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 水痘-帶狀皰疹病毒（Varicella-zoster virus）（VZV）係一種屬於α-皰疹病毒家族的病毒。VZV存在於世界各地並且具有高度傳染性。原發感染導致急性水痘（varicella，也稱為「chickenpox」）。初始感染後，VZV在腦神經和背根神經節中建立終身潛伏期，並可在數年至數十年後重新激活為帶狀皰疹（herpes zoster（HZ），也稱為「shingles」）。VZV還可引起從無菌性腦膜炎到腦炎的多種神經系統病症。VZV感染的其他嚴重併發症包括皰疹後神經痛、Mollaret氏腦膜炎、多發性帶狀皰疹（zoster multiplex）、血小板減少症、心肌炎、關節炎、和導致中風的腦動脈炎症、脊髓炎、眼部皰疹和無疹型帶狀皰疹（zoster sine herpete）。需要對水痘-帶狀皰疹病毒有活性的疫苗和治療劑。

【發明內容】

【0002】 本揭露提供了涉及編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。本揭露還提供了使用編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸之方法。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑在投與後可在受試者中誘導免疫響應。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑可用於治療或預防受試者的疾病、障礙或病症（例如，水痘或帶狀皰

疹）。

【0003】在第一方面，本揭露提供了環狀多核糖核苷酸，其包括編碼水痘-帶狀皰疹病毒（VZV）多肽免疫原的開讀框。

【0004】在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV糖蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV糖蛋白選自VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、和gM或其免疫原性片段。

【0005】在一些實施方式中，VZV糖蛋白係VZV gE或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV糖蛋白係相對於野生型VZV gE包括不超過10個胺基酸取代、缺失或插入的VZV gE的突變變體或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。在一些實施方式中，VZV gE多肽係缺少羧基末端尾結構域的截短多肽。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-573和Y569A突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括VZV gE的胺基酸1-623和Y569A突變、Y582G突變、或Y569A/Y582G雙突變。

【0006】在一些實施方式中，VZV gE多肽包括與SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV gE多肽包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的至少50%、60%、70%、80%、

90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

【0007】 在一些實施方式中，VZV gE多肽進一步包括訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包括與SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV gE多肽進一步包括訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

【0008】 在一些實施方式中，視需要進一步包括訊息序列的VZV gE多肽由與SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包括訊息序列的VZV gE多肽由SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列編碼。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV立即早期蛋白係IE63多肽。在一些實施方式中，VZV IE63多肽包含與SEQ ID NO: 84的胺基酸序列具有至少85%（例

如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，VZV IE63多肽包含SEQ ID NO: 84的胺基酸序列。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由與SEQ ID NO: 85的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85的核酸序列編碼。

【0009】 在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括SEQ ID NO: 39-47中任一項的至少300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1400或1500個核苷酸的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括SEQ ID NO: 39-47中任一項的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的連續段的片段。

【0010】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有至少51%（例如，至少52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%）的GC含量。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至多52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或59%、或60%。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為51%至60%、52%至60%、53%至60%、54%至60%、55%至60%、52%至58%、53%至58%。在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有51%至60%的GC含量。

【0011】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有大於20%的尿苷含量。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量為大於10%（例如，大於11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量為至多30%（例如，至多29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的

尿苷含量為20%至28%、21%至26%、10%至24%、15%至24%、20%至24%、21%至24%、22%至24%、23%至24%、10%至23%、15%至23%、20%至23%、21%至23%或22%至23%。在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有20%至28%的尿苷含量。

【0012】 在一些實施方式中，VZV多肽免疫原進一步包括編碼多聚化結構域的序列。在一些實施方式中，多聚化結構域選自T4 foldon結構域、鐵蛋白結構域、β環肽、AaLS肽、或二氧四氫蝶啶合酶結構域。在一些實施方式中，多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的N端。在一些實施方式中，多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的C端。

【0013】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的開讀框與IRES可操作地連接。

【0014】 在一些實施方式中，編碼VZV多肽免疫原的開讀框編碼第二多肽。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原和第二多肽被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點、或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。在一些實施方式中，蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括與第二IRES可操作地連接的編碼第二多肽的第二開讀框。

【0015】 在一些實施方式中，第二多肽係多肽免疫原。在一些實施方式中，第二多肽係VZV多肽免疫原。在一些實施方式中，第二多肽係選自以下的VZV糖蛋白：VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN和gM，VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，第二多肽係VZV gE或其免疫原性片段。在一些實施方式中，第二多肽係VZV IE63或其免疫原性片段。

【0016】 在一些實施方式中，第二多肽係多肽佐劑。在一些實施方式中，佐劑係細胞介素、趨化因子、共刺激分子、先天性免疫刺激因子、傳訊分子、轉

錄激活因子、細胞介素受體、細菌組分或先天性免疫系統的組分。

【0017】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。在一些實施方式中，先天性免疫系統刺激因子選自富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體。

【0018】 在一些實施方式中，開讀框編碼多聯體VZV免疫原。在一些實施方式中，開讀框包含直接彼此連接或被連接子隔開的2-100個VZV免疫原。在其他實施方式中，免疫原係由多個肽表位構成的多聯體肽免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2-10種VZV免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100種VZV免疫原。在一些實施方式中，VZV免疫原被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點、或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。在一些實施方式中，蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。

【0019】 在另一方面，本揭露提供了免疫原性組成物，其包括本文所述之任何環狀多核糖核苷酸和藥學上可接受的賦形劑。在一些實施方式中，組成物進一步包括第二環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括編碼第二多肽免疫原的開讀框。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括編碼多肽佐劑的開讀框。在一些實施方式中，第二環狀多核糖核苷酸包括作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

【0020】 在另一方面，本揭露提供了在受試者中誘導針對VZV的免疫響應之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0021】 在另一方面，本揭露提供了在受試者中預防VZV感染之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0022】在另一方面，本揭露提供了治療患有或疑似患有VZV感染的受試者之方法，該方法包括向該受試者投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

【0023】在一些實施方式中，受試者先前已被診斷患有VZV感染或與VZV感染相關的障礙。在一些實施方式中，VZV感染無症狀，或VZV感染處於潛伏期。在一些實施方式中，受試者已被診斷患有帶狀皰疹。在一些實施方式中，投與環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物降低了與帶狀皰疹相關的症狀的頻率或嚴重程度。在一些實施方式中，受試者係人類受試者。

【0024】在一些實施方式中，方法進一步包括向該受試者投與佐劑。在一些實施方式中，該方法進一步包括向該受試者投與VZV多肽免疫原。

定義

【0025】本揭露將針對特定實施方式並參考某些附圖進行描述，但是本揭露不限於此，而是僅由申請專利範圍來限定。除非另有說明，否則下文陳述的術語通常應以其共識來理解。

【0026】如本文所用，術語「適應性免疫響應」係指體液或細胞介導的免疫響應。為了本揭露之目的，「體液免疫響應」係指由抗體分子介導的免疫響應，而「細胞免疫響應」係由T淋巴球和/或其他白血球介導的免疫響應。

【0027】如本文所用，術語「佐劑」係指增加免疫響應，例如增加針對免疫原的特異性免疫響應的組成物（例如，化合物、多肽、核酸或脂質）。增加免疫響應包括強化或擴大抗體和細胞免疫響應中的任一者或兩者的特異性。

【0028】如本文所用，術語「載劑」意指利於將組成物（例如，多核糖核苷酸）運輸或遞送到受試者、組織或細胞中的化合物、組成物、試劑或分子。載劑之非限制性實例包括碳水化合物載劑（例如，酸酐改性的植物糖原或糖原型材料）、奈米顆粒（例如，封裝或共價連接結合至環狀多核糖核苷酸的奈米顆粒）、

脂質體、融合體、離體分化的網織紅血球、胞泌體、蛋白質載劑（例如，共價連接至多核糖核苷酸的蛋白質）或陽離子載劑（例如，陽離子脂質聚合物或轉染試劑）。

【0029】 如本文所用，術語「circRNA」、「環狀多核糖核苷酸」、「環狀RNA」和「環狀多核糖核苷酸分子」可互換使用，並意指具有沒有游離末端（即，沒有游離3’和/或5’末端）的結構的多核糖核苷酸分子，例如通過共價鍵（例如，共價閉合的）或非共價鍵形成環狀或環形結構的多核糖核苷酸分子。環狀多核糖核苷酸可為共價閉合的多核糖核苷酸。

【0030】 如本文所用，術語「環化效率」係所得環狀多核糖核苷酸相對於其非環狀起始材料的測量。

【0031】 術語「稀釋劑」意指包括本文所述之組成物（例如，包括環狀多核糖核苷酸的組成物）可以稀釋或溶解於其中的非活性溶劑的媒介物。稀釋劑可為RNA增溶劑、緩衝劑、等滲劑或其混合物。稀釋劑可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。液體稀釋劑之非限制性實例包括水或其他溶劑、增溶劑和乳化劑（諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油類（尤其是棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和脫水山梨糖醇的脂肪酸酯以及1,3-丁二醇。固體稀釋劑之非限制性實例包括碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉或糖粉。

【0032】 如本文所用，術語「疾病」、「病症」和「病狀」各自指亞健康狀態，例如，典型地被或將會被醫療專業人員診斷或治療的狀態。

【0033】 如本文所用，術語「表位」係指被抗體或T細胞受體識別、靶向或結合的免疫原的一部分或全部。表位可為線性表位，例如核酸或胺基酸的連續序

列。表位可為構象表位，例如，含有在蛋白質的折疊構象中形成表位的胺基酸的表位。構象表位可以含有來自一級胺基酸序列的非連續胺基酸。再如，構象表位包括基於其二級結構或三級結構在免疫原性序列的折疊構象中形成表位的核酸。

【0034】 如本文所用，術語「表現序列」係編碼產物（例如，肽或多肽（例如，免疫原））的核酸序列或調控核酸。編碼肽或多肽的示例性表現序列可以包括多個核苷酸三聯體，其中每一個都可以編碼胺基酸，並被稱為「密碼子」。

【0035】 如本文所用，關於多肽或核酸序列（例如，多肽免疫原或編碼多肽免疫原的核酸序列）的術語「片段」係指多肽或核酸序列的連續的、少於全部的部分。例如，多肽免疫原或編碼多肽免疫原的核酸序列的片段，係指序列（如本文揭露的序列）的連續的、少於全部的部分（例如，整個長度的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%）。應理解，本揭露之所有內容考慮了本文揭露的所有免疫原的片段（例如，免疫原性片段）。

【0036】 如本文所用，術語「GC含量」係指核酸序列中鳥嘌呤（G）和胞嘧啶（C）的百分比。用於計算GC含量的公式為 (G+C) / (A+G+C+U) × 100%（對於RNA）或 (G+C) / (A+G+C+T) × 100%（對於DNA）。同樣地，術語「尿苷含量」係指核酸序列中尿苷（U）的百分比。用於計算尿苷含量的公式為U / (A+G+C+U) × 100%。同樣地，術語「胸苷含量」係指核酸序列中胸苷（T）的百分比。用於計算胸苷含量的公式為T / (A+G+C+T) × 100%。

【0037】 如本文所用，術語「先天性免疫系統刺激因子」係指部分地藉由誘導參與先天性免疫的一或多個基因的表現來誘導先天性免疫響應的物質，該等基因包括但不限於I型干擾素（例如，IFNα、INFβ和/或IFNγ）、促炎性細胞介素（例如，IL-1、IL-12、IL-18、TNF-α和/或GM-CSF）、視黃酸誘導型基因-I（RIG-I，也稱為DDX58）、黑色素瘤分化相關基因5（MDA5，也稱為IFIH1）、2'-5'寡

腺苷酸合酶1（OAS 1）、OAS樣蛋白（OASL）和/或蛋白激酶R（PKR）。先天性免疫系統刺激因子可充當佐劑，例如當與編碼免疫原的核糖核苷酸組合投與或一起配製時。先天性免疫系統刺激因子可為單獨的分子實體（例如，不是由多核糖核苷酸編碼或作為序列併入多核糖核苷酸中的），例如STING（例如，caSTING）、TLR3、TLR4、TLR9、TLR7、TLR8、TLR7、RIG-I/DDX58和MDA-5/IFIH1或其組成型活性突變體。先天性免疫系統刺激因子可由多核糖核苷酸編碼（例如，由多核糖核苷酸表現）。多核糖核苷酸可以替代性地或進一步包括充當先天性免疫系統刺激因子的核糖核苷酸序列（例如，富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體）。

【0038】 如本文所用，術語「雜質」係存在於組成物中，例如如本文所述之藥物組成物中的不需要的物質。在一些實施方式中，雜質係與製程有關的雜質。在一些實施方式中，雜質係最終組成物中除期望產物之外，例如除如本文所述之活性藥物成分（例如，環狀多核糖核苷酸）之外的產物相關物質。如本文所用，術語「與製程有關的雜質」係在最終的組成物、製劑或產物中，除本文所述之線性多核糖核苷酸以外，在組成物、製劑或產物的製造中使用、存在或生成的不需要的物質。在一些實施方式中，與製程有關的雜質係在多核糖核苷酸的合成或環化中使用的酶。如本文所用，術語「與產物有關的物質」係在組成物、製劑或產物或其任何中間體的合成過程中產生的物質或副產物。在一些實施方式中，與產物有關的物質係去氧核糖核苷酸片段。在一些實施方式中，與產物有關的物質係去氧核糖核苷酸單體。在一些實施方式中，與產物有關的物質係以下的一或多種：本文所述之多核糖核苷酸的衍生物或片段，例如10、9、8、7、6、5或4個核糖核酸、單核糖核酸、二核糖核酸或三核糖核酸的片段。

【0039】 如本文所用，術語「免疫原」係指包括被抗體或T細胞受體識別、靶向或結合的一或多種表位的任何分子或分子結構。特別地，免疫原在受試者中

誘導免疫響應（例如，如本文所定義的那樣具有免疫原性）。免疫原能夠在受試者中誘導免疫響應，其中該免疫響應係指當免疫原遇到免疫系統時誘導的一系列分子、細胞和生物事件。免疫響應可為體液和/或細胞免疫響應。該等可以包括抗體的產生以及B細胞和T細胞的擴增。為了確定是否已經發生免疫響應並跟蹤其進程，可以監測免疫受試者針對特定免疫原的免疫響應物的出現。對大多數免疫原的免疫響應誘導特異性抗體和特異性效應T細胞兩者的產生。在一些實施方式中，免疫原係宿主外源的。在一些實施方式中，免疫原不是宿主外源的。免疫原可以包括多肽、多糖、多核苷酸或脂質的全部或一部分。免疫原也可為混合的多肽、多糖、多核苷酸和/或脂質。例如，免疫原可為經翻譯修飾的多肽。「多肽免疫原」係指包括多肽的免疫原。多肽免疫原還可以包括一或多個翻譯後修飾，和/或可以與一或多個其他分子形成複合物，和/或可以呈三級或四級結構，每種結構可以決定或影響多肽的免疫原性。

【0040】 如本文所用，術語「免疫原性」係指在特定的免疫響應測定中誘導超過預定閾值的對物質的響應的潛力。該測定可為，例如，某些炎性標誌物的表現、抗體的產生或如本文所述之免疫原性的測定。在一些實施方式中，當生物體或某種類型的免疫細胞的免疫系統暴露於免疫原時，可以誘導免疫響應。

【0041】 可以使用總抗體測定法、確認試驗、抗體的滴定和同種型分析以及中和抗體評估來評價受試者血漿或血清中的抗體，從而評估免疫原性響應。總抗體測定法測量在已經投與了免疫原的受試者的血清或血漿中作為免疫響應的一部分而生成的所有抗體。檢測抗體最常用的試驗係ELISA（酶聯免疫吸附測定），檢測受試血清中與目標抗體結合的抗體，包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。可藉由確認測定法進一步評估免疫原性響應。在總抗體評估之後，可以使用確認測定法來確認總抗體測定法的結果。競爭測定法可用於確認抗體與靶標特異性結合，並且篩選測定法中的陽性發現不是試驗血清或檢測試劑與該測定法中其

他物質發生非特異性相互作用的結果。

【0042】 可藉由同種型分析和滴定來評估免疫原性響應。同種型測定可用於僅評估相關抗體的同種型。例如，預期的同種型可為IgM和IgG，它們可以藉由同種型分析和滴定進行特異性檢測和定量，然後與存在的總抗體進行比較。

【0043】 可以藉由中和抗體測定法（nAb）來評估免疫原性響應。中和抗體測定法（nAb）可用於確定響應於免疫原而產生的抗體是否中和免疫原，從而抑制免疫原對靶標產生作用並導致異常的藥物動力學行為。nAb測定法通常是基於細胞的測定法，其中靶細胞與抗體一起孵育。可以使用多種基於細胞的nAb測定法，包括但不限於細胞增殖、活力、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC）、，補體依賴性細胞毒性（CDC）、細胞病變效應抑制（CPE）、凋亡、配體刺激的細胞傳訊、酶活性、報告基因測定、蛋白質分泌、代謝活性、應激和粒線體功能。檢測讀數包括吸光度、螢光、發光、化學發光或流動式細胞測量術讀數。配體結合測定法還可用於體外測量免疫原和抗體的結合親和力，以評價中和功效。

【0044】 此外，可以藉由使用從受試者獲得的T細胞上的細胞標誌物測量受試者中的T細胞活化來評估細胞免疫響應的誘導。可以從受試者收集血液樣本、淋巴結活檢樣本或組織樣本，並評價來自樣本的T細胞中的以下一或多種（例如，2、3、4或更多種）活化標誌物：CD25、CD71、CD26、CD27、CD28、CD30、CD154、CD40L、CD134、CD69、CD62L或CD44。也可以在體內動物模型中使用相同的方法評估T細胞活化。也可以藉由向體外T細胞（例如，從受試者、動物模型、儲庫或商業來源獲得的T細胞）添加免疫原並測量上述標誌物來進行此測定以評估T細胞活化。可以使用類似方法評估對其他免疫細胞（如嗜酸性球（標誌物：CD35、CD11b、CD66、CD69和CD81））、樹突細胞（標誌物：IL-8、MHC II類、CD40、CD80、CD83和CD86）、嗜鹼性球（CD63、CD13、CD4和CD203c）和嗜中性球（CD11b、CD35、CD66b和CD63）的活化的影響。可以使用流動式

細胞測量術、免疫組織化學、原位雜交和其他允許測量細胞標誌物的測定法來評估該等標誌物。免疫原投與前後的比較結果可用於確定其影響。

【0045】 如本文所用，術語「誘導免疫響應」係指引發、放大或維持受試者的免疫響應。誘導免疫響應可以指適應性免疫響應或先天性免疫響應。免疫響應的誘導可以如上所討論的那樣進行測量。

【0046】 如本文所用，術語「線性對應物」係具有與環狀多核糖核苷酸相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，線性對應物（例如，環化前形式）係與環狀多核糖核苷酸具有相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）且具有相同或相似的核酸修飾，並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，線性對應物係與環狀多核糖核苷酸具有相同或相似的核苷酸序列（例如，100%、95%、90%、85%、80%、75%或其間的任何百分比序列同一性）且具有不同的核酸修飾或不具有核酸修飾，並且具有兩個游離末端的多核糖核苷酸分子（及其片段）（即，環狀多核糖核苷酸的未環化形式（及其片段））。在一些實施方式中，作為線性對應物的多核糖核苷酸分子的片段係線性對應物多核糖核苷酸分子的比該線性對應物多核糖核苷酸分子短的任何部分。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括5’帽。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括聚腺苷尾。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括3’ UTR。在一些實施方式中，線性對應物進一步包括5’ UTR。

【0047】 如本文所用，術語「線性RNA」、「線性多核糖核苷酸」和「線性多核糖核苷酸分子」可互換使用並且意指具有5'末端和3’末端的多核糖核苷酸

分子。5'末端和3’末端中的一個或兩個可為游離末端或者可以與另一部分連接。線性RNA包括尚未經歷環化（例如，環化前）的RNA，並且可以用作起始材料通過例如夾板連接或化學、酶促、核酶或剪接催化的環化方法進行環化。

【0048】 如本文所用，術語「經修飾的核糖核苷酸」意指具有至少一個針對糖、核鹼基或核苷間鍵的修飾的核苷酸。

【0049】 如本文所用，術語「裸遞送」意指在不借助載劑並且不對有助於遞送到細胞的部分進行共價修飾的情況下將配製物遞送至細胞。裸遞送配製物不含任何轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。例如，環狀多核糖核苷酸的裸遞送配製物係包括沒有共價修飾的環狀多核糖核苷酸並且不含載劑的配製物。

【0050】 如本文所用，術語「帶切口的RNA」和「帶切口的線性多核糖核苷酸」和「帶切口的線性多核糖核苷酸分子」可以互換使用並且意指由於環狀RNA切口或降解而產生的具有5'末端和3’末端的多核糖核苷酸分子。

【0051】 如本文所用，術語「非環狀RNA」意指總的帶切口的RNA和線性RNA。

【0052】 術語「藥物組成物」旨在還揭露包括在藥物組成物中的環狀多核糖核苷酸可用於藉由療法治療人體或動物體。因此，這意味著等同於「用於在療法中使用的環狀多核糖核苷酸」。

【0053】 如本文所用，術語「多核苷酸」意指包括一或多個核酸亞基或核苷酸的分子，並且可以與「核酸」或「寡核苷酸」互換使用。多核苷酸可以包括一或多個選自腺苷（A）、胞嘧啶（C）、鳥嘌呤（G）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）或其變體的核苷酸。核苷酸可以包括核苷和至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸（PO_3）基團。核苷酸可以包括核鹼基、五碳糖（核糖或去氧核糖）以及一或多個磷酸基團。核糖核苷酸係其中糖為核糖的核苷酸。多核

糖核苷酸或核糖核酸或RNA可以指包括經由磷酸二酯鍵聚合的多個核糖核苷酸的大分子。去氧核糖核苷酸係其中糖係去氧核糖的核苷酸。

【0054】「多去氧核糖核苷酸」、「去氧核糖核酸」和「DNA」意指包括經由磷酸二酯鍵聚合的多個去氧核糖核苷酸的大分子。核苷酸可為核苷一磷酸或核苷多磷酸。核苷酸意指包括可檢測標籤（如發光標籤）或標誌物（例如，螢光團）的去氧核糖核苷多磷酸，如例如去氧核糖核苷三磷酸（dNTP），其可以選自去氧腺苷三磷酸（dATP）、去氧胞苷三磷酸（dCTP）、去氧鳥苷三磷酸（dGTP）、尿苷三磷酸（dUTP）和去氧胸苷三磷酸（dTTP）dNTP。核苷酸可以包括可以摻入正在生長的核酸股中的任何亞基。此類亞基可為A、C、G、T或U，或對一或多個互補A、C、G、T或U有特異性或與嘌呤（即，A或G或其變體）或嘧啶（即C、T或U或其變體）互補的任何其他亞基。在一些實例中，多核苷酸係去氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）或其衍生物或變體。在一些情況下，僅舉數例，多核苷酸係短干擾RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）、質體DNA（pDNA）、短髮夾RNA（shRNA）、小核RNA（snRNA）、信使RNA（mRNA）、先質mRNA（pre-mRNA）、反義RNA（asRNA），並且涵蓋核苷酸序列及其任何結構實施方式，如單股、雙股、三股、螺旋、髮夾等。在一些情況下，多核苷酸分子係環狀的。多核苷酸可以具有各種長度。核酸分子可以具有至少約10個鹼基、20個鹼基、30個鹼基、40個鹼基、50個鹼基、100個鹼基、200個鹼基、300個鹼基、400個鹼基、500個鹼基、1千鹼基（kb）、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、10 kb、50 kb或更大的長度。可以從細胞或組織中分離多核苷酸。如本文所體現的，多核苷酸序列可以包括分離和純化的DNA/RNA分子、合成的DNA/RNA分子和合成的DNA/RNA類似物。

【0055】多核苷酸，例如多核糖核苷酸或多去氧核糖核苷酸，可以包括一或多種核苷酸變體，包括非標準核苷酸、非天然核苷酸、核苷酸類似物和/或經

修飾的核苷酸。經修飾的核苷酸之實例包括但不限於二胺基嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黃嘌呤、黃嘌呤、4-乙醯胞嘧啶、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、β-D-半乳糖基辨苷（galactosylqueosine）、肌苷、N6-異戊烯腺嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、5-甲基胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基辮苷（mannosylqueosine）、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-D46-異戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、懷丁苷（wybutoxosine）、假尿嘧啶、辮苷（queosine）、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸（v）、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-胺基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w、2,6-二胺基嘌呤等。在一些情況下，核苷酸在其磷酸酯部分中可以包括修飾，包括對三磷酸酯部分的修飾。這樣的修飾之非限制性實例包括長度更長的磷酸酯鏈（例如，具有4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸酯部分的磷酸酯鏈）和帶有硫醇部分（例如，α-硫代三磷酸酯和β-硫代三磷酸酯）的修飾。核酸分子還可在鹼基部分處（例如，在典型地可用於與互補核苷酸形成氫鍵的一或多個原子處和/或在典型地不能與互補核苷酸形成氫鍵的一或多個原子處）、糖部分或磷酸骨架處被修飾。核酸分子還可含有胺修飾的基團，如胺基烯丙基1-dUTP（aa-dUTP）和胺基己基丙烯醯胺-dCTP（aha-dCTP），以允許胺反應性部分（如N-羥基琥珀醯亞胺酯（NHS））的共價附接。本揭露之寡核苷酸中標準DNA鹼基對或RNA鹼基對的替代物可以提供更高的密度（以位元/立方毫米計）、更高的安全性（抗天然毒素的偶然或有目的合成）、更容易辨別光程式性聚合酶（photo-programmed polymerases）或較低的二級結構。在Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE,

Marx A. Nat. Chem. Biol. [自然化學生物學] 2012年7月;8(7):612-4中描述了與用於從頭和/或擴增合成的天然和突變體聚合酶相容的這樣的替代性鹼基對，該文獻出於所有目的藉由援引併入本文。

【0056】 如本文所用，「多肽」意指最常藉由肽鍵連接在一起的胺基酸殘基（天然或非天然的）的聚合物。如本文所用，該術語係指任何大小、結構或功能的蛋白質、多肽和肽。多肽可以包括基因產物、天然存在的多肽、合成多肽、同系物、直系同源物、旁系同源物、前述物質的片段和其他等同物、變體和類似物。多肽可為單分子或者可為多分子複合物，諸如二聚體、三聚體或四聚體。它們還可以包括單鏈或多鏈多肽（如抗體或胰島素），並且可為締合的或連接的。最常見的二硫鍵存在於多鏈多肽中。術語多肽也可以適用於胺基酸聚合物，其中一或多個胺基酸殘基係相應的天然存在的胺基酸的人工化學類似物。

【0057】 如本文所用，術語「預防」意指降低發展疾病、障礙或病症的可能性，或者可替代地，意指降低隨後發展的疾病或障礙中症狀的嚴重程度或頻率。可以將治療劑投與於相對於一般群體而言發展疾病或障礙的風險增加的受試者，以便預防疾病或病症的發展或減輕疾病或病症的嚴重程度。可以例如在疾病或障礙的任何症狀或表現發展之前將治療劑作為預防劑投與。

【0058】 如本文中可互換使用的，術語「聚A」和「聚A序列」係指至少5個核苷酸長並由腺苷殘基組成的核酸分子的非翻譯連續區域。在一些實施方式中，聚A序列的長度為至少10個(SEQ ID NO: 144)、至少15個(SEQ ID NO: 145)、至少20個(SEQ ID NO: 146)、至少30個(SEQ ID NO: 147)、至少40個(SEQ ID NO: 148)或至少50個(SEQ ID NO: 149)核苷酸。在一些實施方式中，聚A序列位於開讀框（例如，編碼多肽的開讀框）的3’（例如，下游），並且該聚A序列位於終止元件（例如，終止密碼子）的3’，使得該聚A不被翻譯。在一些實施方式中，聚A序列位於終止元件的3’並且係3’非翻譯區。

【0059】 如本文所用，術語「調控元件」係修飾環狀多核糖核苷酸內表現

序列的表現的部分，諸如核酸序列。

【0060】如本文所用，術語「複製元件」係可用於複製或者起始環狀多核糖核苷酸轉錄的序列和/或模體。

【0061】如本文所用，術語「全身遞送」和「全身投與」意指將藥物組成物或其他物質投與到循環系統（例如血液或淋巴系統）中的途徑。全身投與可以包括口服投與、腸胃外投與、鼻內投與、舌下投與、直腸投與、透皮投與或其任何組合。如本文所用，術語「非全身遞送」或「非全身投與」可以指除藥物組成物或其他物質的全身遞送以外的任何其他投與途徑，例如，所遞送的物質不進入受試者身體的循環系統（例如，血液和淋巴系統）。

【0062】如本文所用，術語「序列同一性」係藉由使用全域或局部比對演算法對兩個肽或兩個核苷酸序列進行比對來確定的。當序列（例如，藉由程式GAP或BESTFIT使用預設參數進行最佳比對時）至少具有某個最小百分比的序列同一性時，則可以將它們稱為「基本上相同」或「基本相似」。GAP使用Needleman和Wunsch全域比對演算法在兩個序列的整個長度上對其進行比對，從而最大程度地增加了匹配數目並最大程度地減少了空位數目。通常，使用GAP默認參數，空位產生罰分 = 50（核苷酸）/8（蛋白質），空位延伸罰分 = 3（核苷酸）/2（蛋白質）。對於核苷酸，使用的默認評分矩陣係nwsgapdna.cmp評分矩陣，而對於蛋白質，默認評分矩陣係Blosum62（Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS [美國國家科學院院刊] 89, 915-919）。序列比對和百分比序列同一性的評分可以使用電腦程式來確定，諸如可從美國92121-3752加州聖地牙哥斯克蘭頓路9685號的阿賽樂德公司（Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA）獲得的GCG Wisconsin套裝軟體10.3版或EmbossWin 2.10.0版（使用程式「needle」）確定。可替代地或另外，可以藉由使用如FASTA、BLAST等的演算法對數據庫進行搜索來確定同一性百分比。序列同一性係指在序列的整個長度上的序列同一性。

【0063】「訊息序列」係指長度例如介於10至45個胺基酸之間的多肽序列，其存在於新生蛋白的多肽序列的N端，將多肽序列靶向分泌途徑。

【0064】如本文所用，術語「治療（treat和treating）」係指對受試者的疾病或障礙（例如，傳染疾病、癌症、毒性或過敏反應）的治療性治療。治療的效果可以包括與沒有治療性治療的情況下，該疾病或病症的狀態和/或狀況相比，逆轉、減輕、降低疾病的嚴重程度，治癒疾病，抑制疾病的進展，降低該疾病、或疾病或障礙的一或多種症狀或表現的復發的可能性，穩定（即不惡化）疾病或病症的狀態，和/或預防疾病或病症的傳播。

【0065】如本文所用，術語「終止元件」係終止環狀多核糖核苷酸中表現序列的翻譯的部分，諸如核酸序列。

【0066】如本文所用，術語「總核糖核苷酸分子」意指藉由核糖核苷酸分子的總質量所測量的任何核糖核苷酸分子的總量，包括線性多核糖核苷酸分子、環狀多核糖核苷酸分子、單體核糖核苷酸、其他多核糖核苷酸分子、其片段及其經修飾的變體。

【0067】如本文所用，術語「翻譯效率」係從核糖核苷酸轉錄物產生蛋白質或肽的速率或量。在一些實施方式中，翻譯效率可以表示為給定量的編碼蛋白質或肽的轉錄物產生的蛋白質或肽的量，例如在給定的時間段內，例如在給定的翻譯系統，例如體外翻譯系統（像兔網織紅血球裂解物）或體內翻譯系統（像真核細胞或原核細胞）中。

【0068】如本文所用，術語「翻譯起始序列」係在環狀多核糖核苷酸中起始表現序列的翻譯的核酸序列。

【圖式簡單說明】

【0069】 [**圖 1**]係包括兩個表現序列的示例性環狀 RNA 之示意圖，每個表現序列與 IRES 可操作地連接，並且其中至少一個表現序列係 VZV 免疫原。

【0070】 [**圖 2**]係包括兩個表現序列的示例性環狀 RNA 之示意圖，這兩個表現序列被切割結構域（例如，2A、弗林蛋白酶位點或弗林蛋白酶-2A）隔開，其中至少一個表現序列係 VZV 免疫原，並且全部表現序列與 IRES 可操作地連接。

【0071】 [**圖 3**]示出了包括編碼 VZV 免疫原的 ORF 和多核苷酸佐劑序列（例如，刺激先天性免疫系統的非編碼核苷酸序列）的環狀 RNA 之示意圖。

【0072】 [**圖 4**]示出了多個環狀 RNA 之示意圖，其中第一環狀 RNA 包括編碼 VZV 免疫原的 ORF，並且第二環狀 RNA 包括編碼第二免疫原或多肽佐劑的 ORF。

【0073】 [**圖 5**]係編碼免疫原（例如，VZV 免疫原）和一或多個多聚化結構域的示例性多核糖核苷酸構建體和示例性相應免疫原複合物之示意圖。

【0074】 [**圖 6**]示出了用編碼 VZV gE 的環狀 RNA 轉染 18 小時後的 HEK293T 細胞的分泌性 gE 的表現。

【0075】 [**圖7**]示出了HEK293T細胞的細胞表面上檢測到的gE表現，該等HEK293T細胞用四種不同環狀RNA中的一種轉染，每種環狀RNA具有不同的VZV跨膜gE核苷酸序列。

【0076】 [**圖 8**]示出了 HEK293T 細胞的細胞表面上檢測到的 gE 表現，該等 HEK293T 細胞用不同的編碼 VZV 跨膜 gE 的環狀 RNA 轉染，每種環狀 RNA 具有不同的 IRES 元件。

【0077】 [**圖 9**]示出了投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性 VZV gE 的環狀 RNA 或 PBS 後 6 小時、2 天或 5 天的小鼠血液中測量的 gE 濃度。

【0078】 [**圖10**]示出了從投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV

gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後14天、35天或42天的小鼠收集的血液樣本中測量的抗gE血清抗體水平。

【0079】 [**圖11**]示出了在投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後42天，用VZV gE庫（分泌性和跨膜gE）刺激的脾細胞中獲得了gE特異性T細胞。

【0080】 [**圖12A**和**圖12B**]示出了在投與初始劑量（初免劑量）的編碼分泌性VZV gE、跨膜VZV gE的環狀RNA或PBS後42天，CD8和IFN-γ陽性（圖12A）或CD4和IFNγ陽性（圖12B）的細胞百分比。

【實施方式】

【0081】 本揭露提供了涉及編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸的組成物、藥物製劑和方法。本揭露還提供了使用編碼一或多種VZV免疫原的環狀多核糖核苷酸之方法。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑在投與後可在受試者中誘導免疫響應。本文所述之環狀多核糖核苷酸的組成物和藥物製劑可用於治療或預防受試者的疾病、障礙或病症（例如，水痘或帶狀皰疹）。

VZV免疫原

【0082】 本文所述之環狀多核糖核苷酸包括編碼VZV免疫原的至少一個表現序列。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括多個表現序列，其中至少一個表現序列編碼VZV免疫原。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括兩或更多個（兩個、三個、四個、五個、六個或更多個）表現序列，其中每個表現序列編碼VZV免疫原。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括編碼VZV免疫原的第一表現序列和編碼佐劑的第二表現序列。本文所述之環狀多核糖核苷酸可包括編碼VZV免

疫原的表現序列和刺激先天性免疫系統的非編碼序列。

【0083】在一些實施方式中，免疫原係VZV糖蛋白。例如，VZV糖蛋白可為VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、或gM或其免疫原性片段或表位。在一些實施方式中，免疫原係VZV gE多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gl多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gB多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gH多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gK多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gL多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gC多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gN多肽。在一些實施方式中，免疫原係VZV gM多肽。

【0084】在一些實施方式中，VZV糖蛋白係gE多肽或變體gE多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽係缺少羧基末端尾結構域的截短多肽。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與ER保留相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽在ER和/或高基氏體中的保留減少。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與將gE靶向至高基氏體或反面高基氏網（TGN）相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽對高基氏體或TGN的靶向或定位降低。在一些實施方式中，變體VZV gE多肽在與VZV gE的內化或gE的胞吞相關的一或多個模體中具有至少一個突變，其中該一或多個模體中的一或多個突變導致VZV gE多肽的胞吞降低。

【0085】在一些實施方式中，VZV gE多肽在一或多個磷酸化酸性模體中具有至少一個突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y582G突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y569A突變。在一些實施方式中，VZV gE多肽具有Y582G突變和Y569A突變。

【0086】在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-524的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-546的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係包括胺基酸1-561的免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括視需要具有Y569A突變的胺基酸1-573。在一些實施方式中，VZV gE多肽係免疫原性片段，該免疫原性片段包括視需要具有Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變的胺基酸1-623。

【0087】在一些實施方式中，VZV免疫原係選自表1的序列的gE多肽或其變體。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表1中序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表1中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原包括與表1的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係表1中序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

[表1]. 示例性VZV gE免疫原

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
29	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
30	糖蛋白E， 623個胺基酸	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
31	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
32	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYGAGLPVDDFEDSE STDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR
33	糖蛋白E， 546個胺基酸	MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYY HSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGR GIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFK GDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAP AIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTST LFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDE KTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLE WLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQ NCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGH VEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAA WTGGLA
65	糖蛋白E， 524個胺基酸	MGVTAPRTLILLLSGALALTETWAGSRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVY EPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYN QGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGD

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		VFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGD AAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVN TSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWK GDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFD LLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVAST VYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYF NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIR YAAWTGGLA
66	糖蛋白E， 524個胺基酸	MGRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRK AYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQED LGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEEN HPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDV DCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVL RTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFH MWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTC LYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHME PSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAI EERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
67	糖蛋白E， 573個胺基酸 Y569A突變	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
68	糖蛋白E， 623個胺基酸 Y569A突變	MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQS MYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKTR

【0088】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼包括訊息序列的VZV免疫原，例如包括選自表2的訊息序列的VZV免疫原。在一些實施方式中，VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表2中序列的至少100、150、200、250、300、350、400、450、500或550個胺基酸的連續段。在一些實施方式中，

VZV免疫原係免疫原性片段，該免疫原性片段包括表2中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的胺基酸的連續段。在一些實施方式中，VZV免疫原包括與表2的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些實施方式中，VZV免疫原係表2中序列的變體，該變體包括不超過一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個突變（例如，點突變、缺失或插入）。

[表2]. 包括訊息序列的示例性VZV gE免疫原

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
34	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： SecSP38（帶底線）	MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASV LRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPR NDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTL NGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIY GVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLA EISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIW NMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSV GDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLS HMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT TLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQ PPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARV DK
35	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： SecD4（帶底線）	MWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDD FHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDG FLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDR HKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTE TWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQ GKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSD GTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCT FTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDT PESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKP KEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
36	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK
37	糖蛋白E，	MASRLTLLTLLLLLLAGDRASSMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLR

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
	546個胺基酸 訊息序列： INHC1（帶底線）	YDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRND YDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNG DDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGV RYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEIS YRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNM RGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGD TFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHM NSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTL KFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPP ATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
38	糖蛋白E， 546個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDF HIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGF LENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRH KIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
69	糖蛋白E， 539個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFH IDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFL ENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHK IVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTET WSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQG KKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDG TSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTF TSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTP ESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPK EITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
70	糖蛋白E， 524個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	MGVKVLFALICIAVAEAKRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHA ESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGE RLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPK PQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICL KHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELE LDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPT PAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPI DPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHA DNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVA YTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGL A

【0089】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括編碼VZV免疫原（視需要包括訊息序列）的表現序列。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原和視需要訊息序列的多核糖核苷酸序列係表3的序列。在一些實施方式中，編碼VZV免疫

原的多核糖核苷酸序列係包括表3中序列的至少300、400、500、600、700、800、900、1,000、1100、1200、1300、1400或1500個核苷酸的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列係包括表3中序列的至少50%、60%、70%、80%、90%或95%的連續段的片段。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的多核糖核苷酸序列包括與表3的序列具有至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[表3]. 編碼VZV gE免疫原（視需要包括訊息序列）的示例性多核糖核苷酸序列

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
39	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUAGGUCUCACAUGUUCUACGAGGCCCUGAAGGCCGAGCUGGUGUACACC CGGGCUGUGCACGGCUUCCGGCCCCGGGCCAACUGCGUGGUCCUGAGCG ACUACAUCCCCCGGGUGGCCUGCAACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUG GUGGGCGUGCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCA CCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCG ACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGC CUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCU UCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGG CAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGG CGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGAC GUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCG AGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCC UGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAG CACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUUGUGGACGUGGACUGCGCCGAGA ACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAG AAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGA CGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUG CUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGG GCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGG GCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGC GACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCC CUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGC CAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAAC UACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCU GAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGA GCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUCUACUUCAACGGCCACGUGGA GGCCGUGGCCUACACCGUGGUGAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCC AUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCA CUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUUCUGCUGUGCC UGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
40	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， SecSP38訊息序列	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCGGCUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGCUGCU GCUCCUGUGGCCCAUGGUGUGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUG GUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCA CCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGA CGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCG ACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGC CUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCU UCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGG CAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAG GAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGG CGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGAC GUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCG AGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAG CGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCC UGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAG CACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGA ACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAG AAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGA CGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUG CUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGG GCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGG CGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGG GCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGC GACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCC CUUCGACCUGUUGCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGC CAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCA GUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGG CCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAAC UACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCU GAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGA GCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGA GGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCC AUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCA CUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGCUC CGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCC UGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGC CCGGGUGGACAAGUAAAUGAGACCAUA
41	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， SecD4訊息序列	AUAGGUCUCACAUGUGGUGGCUGCUGCUGUUGCUGCUGCUCCUGUGGCC CAUGGUGUGGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGUUGC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGCUCCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
42	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變， gLuc訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCUCUGAUUUGUAUUGC CGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
43	糖蛋白E， 623個胺基酸	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCUACCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
44	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACUACGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA
45	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	AUAGGUCUCACAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAU GGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGG GCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGA CACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCU CCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAG CCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCC ACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGA GCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGAC GACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAA GAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGAC CUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGG AAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGA CGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCC AGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCA GCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGC CCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGA CCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAG CAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCA GCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCG GAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUA UGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUG GCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCU GGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUG UACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAU GAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCC AGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUG CCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGAC GGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCC UGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUA CACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGG GGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGA GAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCU GGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCU GAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG AGCCCCUACAACCAGAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUU CGAGGACAGCGAGAGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUC GGCGGGAGCCACGGCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCC GGUAAAUGAGACCAUA
46	糖蛋白E， 546個胺基酸，INHC1訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGCCAGCCGGCUGACCCUGCUCACCCUGCUGUUGCU GCUGCUCGCCGGCGACCGGGCCAGCUCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCC GUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGA UCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUC GACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAG CGACCACGCCGAGAGCAGCUGGGUGAACCGGGGAGAGAGUUCUCGGAAG GCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGG CUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGG GGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCC AGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAAC GGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCG ACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUC GAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCA GCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGC CUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAA GCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAG AACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAA GAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCG ACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGU GCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGG GGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGG GCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGG GGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGG CGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUUCGACCUGCUGUUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUG CCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCC AGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUG GCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAA CUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCC UGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAG AGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGG AGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGC CAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACC ACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAU CCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCCUAAAUGAGACCAUA
47	糖蛋白E， 546個胺基酸 gLuc訊息序列	AUAGGUCUCACAUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCUCUGAUUUGUAUUGC CGUGGCCGAGGCCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUG AUGGGCUUCGGCAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCC UGAUCUGCACCGCCAAGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAA GUAAAUGAGACCAUA
71	糖蛋白E， 539個胺基酸	AUGGGCGUCAAGGUCCUGUUCGCCCUGAUCUGCAUCGCCGUGGCCGAGG CCAUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGG CAUCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
	訊息序列： gLuc	UGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGC GUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAA CCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCU GGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCAC GGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGC AGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCC
72	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGGACAGUUAAUAAACCUGUGGUGGGGGUAUUGAUGGGGUUCGGAA UUAUCACGGGAACGUUGCGUAUAACGAAUCCGGUCAGAGCAUCCGUCUUG CGAUACGAUGAUUUUCACAUCGAUGAAGACAAACUGGAUACAAACUCCGUA UAUGAGCCUUACUACCAUUCAGAUCAUGCGGAGUCUUCAUGGGUAAAUCG GGGAGAGUCUUCGCGAAAAGCGUACGAUCAUAACUCACCUUAUAUAUGGC CACGUAAUGAUUAUGAUGGAUUUUUAGAGAACGCACACGAACACCAUGGG GUGUAUAAUCAGGGCCGUGGUAUCGAUAGCGGGGAACGGUUAAUGCAACC CACACAAAUGUCUGCACAGGAGGAUCUUGGGGACGAUACGGGCAUCCACG UUAUCCCUACGUUAAACGGCGAUGACAGACAUAAAAUUGUAAAUGUGGAC CAACGUCAAUACGGUGACGUGUUUAAAGGAGAUCUUAAUCCAAAACCCCAA GGCCAAAGACUCAUUGAGGUGUCAGUGGAAGAAAAUCACCCGUUUACUUU ACGCGCACCGAUUCAGCGGAUUUAUGGAGUCCGGUACACCGAGACUUGGA GCUUUUUGCCGUCAUUAACCUGUACGGGAGACGCAGCGCCCGCCAUCCAG CAUAUAUGUUUAAAACAUACAACAUGCUUUCAAGACGUGGUGGUGGAUGU GGAUUGCGCGGAAAAUACUAAAGAGGAUCAGUUGGCCGAAAUCAGUUACC GUUUUCAAGGUAAGAAGGAAGCGGACCAACCGUGGAUUGUUGUAAACACG AGCACACUGUUUGAUGAACUCGAAUUAGACCCCCCCGAGAUUGAACCGGG UGUCUUGAAAGUACUUCGGACAGAAAAACAAUACUUGGGUGUGUACAUUU GGAACAUGCGCGGCUCCGAUGGUACGUCUACCUACGCCACGUUUUUGGU

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CACCUGGAAAGGGGAUGAAAAAACAAGAAACCCUACGCCCGCAGUAACUC CUCAACCAAGAGGGGCUGAGUUUCAUAUGUGGAAUUACCACUCGCAUGUA UUUUCAGUUGGUGAUACGUUUAGCUUGGCAAUGCAUCUUCAGUAUAAGAU ACAUGAAGCGCCAUUUGAUUUGCUGUUAGAGUGGUUGUAUGUCCCCAUCG AUCCUACAUGUCAACCAAUGCGGUUAUAUUCUACGUGUUUGUAUCAUCCC AACGCACCCCAAUGCCUCUCUCAUAUGAAUUCCGGUUGUACAUUUACCUC GCCACAUUUAGCCCAGCGUGUUGCAAGCACAGUGUAUCAAAAUUGUGAAC AUGCAGAUAACUACACCGCAUAUUGUCUGGGAAUAUCUCAUAUGGAGCCU AGCUUUGGUCUAAUCUUACACGACGGGGGCACCACGUUAAAGUUUGUAGA UACACCCGAGAGUUUGUCGGGAUUAUACGUUUUUGUGGUGUAUUUUAACG GGCAUGUUGAAGCCGUAGCAUACACUGUUGUAUCCACAGUAGAUCAUUUU GUAAACGCAAUUGAGGAGCGUGGAUUUCCGCCAACGGCCGGUCAGCCACC GGCGACUACUAAACCCAAGGAAAUUACCCCCGUAAACCCCGGAACGUCAC CACUUCUACGAUAUGCCGCAUGGACCGGAGGGCUUGCAGCAGUAGUACUU UUAUGUCUCGUAAUAUUUUUAAUCUGUACGGCUAAACGAAUGAGGGUUAA AGCCGCCAGGGUAGACAAGUGA
73	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
74	糖蛋白E， 524個胺基酸，	AUGGGCGUGACCGCCCCCCGGACCCUGAUCCUGCUCCUGAGCGGCGCCC UGGCCCUGACCGAAACCUGGGCCGGCAGCCGGAUCACCAACCCCGUGCG GGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUG GACACCAACAGCGUGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAG CUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACA GCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCC CACGAGCACCACGGCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCG AGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGA CGACACCGGCAUCCACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACA AGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGA CCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAG GAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGU GCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGC GACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUU CCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGAC CAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCA GCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUG GACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGA AGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCAC CAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCC GGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAU AUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCU GGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCC UGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCU GUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACA UGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGC CAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACU GCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGA CGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGC CUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCU ACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCG GGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGG AGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCC UGGACCGGCGGCCUGGCC
75	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
76	糖蛋白E， 524個胺基酸 訊息序列： gLuc（帶底線）	AUGGGCGUGAAGGUGCUGUUCGCCCUGAUCUGCAUCGCCGUGGCCGAGG CCAAGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACGA UUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCCU ACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGAG CAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAACG ACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAAC CAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAGA UGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCCC CACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGGC AGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCAG CGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGGG CCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUUC CUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACAU CUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGAC UGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGUU CCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGCA CCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCGU GCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUGG AACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGAC CUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCCC AGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUUC AGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCCA CGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGAC CCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCAA CGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGUC CCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGCA CGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCCA GCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGGA CACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAAC GGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCACU UCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGCC CCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACCA GCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
77	糖蛋白E， 524個胺基酸	AUGGGCCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUGCGGUACGACG AUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGUGUACGAGCCC UACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACCGGGGCGAGA GCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGGCCCCGGAAC GACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGGCGUGUACAA CCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAGCCCACCCAG AUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCACGUGAUCC CCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGGACCAGCGG CAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCCCAGGGCCA GCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCACCCUGCGG GCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAACCUGGAGCUU CCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCCAUCCAGCACA UCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGUUGACGUGGA CUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCAGCUACCGGU UCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGUGAACACCAGC ACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCGAGCCCGGCG UGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGUGUACAUCUG GAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCUUCCUGGUGA CCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCCGUGACCCCC CAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAGCCACGUGUU CAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAGUACAAGAUCC ACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGUGCCCAUCGA CCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGUACCACCCCA ACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACCUUUACCAGU CCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAACUGCGAGC ACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACAUGGAGCCC AGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUGAAGUUCGUGG ACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUGUACUUCAA CGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCGUGGACCAC UUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGCCGGCCAGC CCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACCCCGGCACC AGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGCC
79	糖蛋白E， 524個胺基酸 Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
80	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A/Y582G雙突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		GAGCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAG AGCACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGGAGCCACG GCGGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCGG
81	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAAUCAGCGGCGGAGGAGGGA GUGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAU CAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUG CGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGU GUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACC GGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGG CGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAG CCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCA CGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCC CAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCA CCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAAC CUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCC AUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCA GCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGU GAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCG AGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGU GUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCU UCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCC GUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAG CCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAG UACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGU GCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGU ACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACA UGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGCACCACCCUGAA GUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUG UACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCG UGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGC CGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACC CCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGC CGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAG CGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG
82	糖蛋白E， 623個胺基酸， Y569A突變	AUGGUGAGCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAAAUCAGCGGCGGAGGAGGGA GUGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCAU CAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCUG CGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCGU GUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAACC GGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUGG CCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACGG CGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCAG CCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUCCA CGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGUGG ACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAGCCC CAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCUUCA

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		CCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGAAAC CUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCCGCC AUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGUGGU UGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAGAUCA GCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAGGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGUGGU GAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGAUCG AGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGGCGU GUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCACCU UCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCCGCC GUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCACAG CCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUGCAG UACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUACGU GCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCCUGU ACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGCACC UUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCAGAA CUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCCACA UGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGCACCACCCUGAA GUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGGUG UACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCACCG UGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACCGC CGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAACC CCGGCACCAGCCCCCUGAUCCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUGGC CGCAGUGGUGCUGUUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCAAG CGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAGAGCCCCUACAACCAGA GCAUGUACGGCGCCGGCCUGCCCGUGGACGACUUCGAGGACAGCGAGAG CACCGACACCGAGGAGGAGUUCGGCAACGCCAUCGGCGGAAGCCACGGC GGCAGCUCUUACACCGUGUACAUCGACAAGACCCGG
83	糖蛋白E， 573個胺基酸， Y569A突變	AUGGGCACCGUGAACAAGCCCGUGGUGGGCGUCCUGAUGGGCUUCGGCA UCAUUACCGGCACCCUGCGGAUCACCAACCCCGUGCGGGCCAGCGUGCU GCGGUACGACGAUUUCCACAUCGACGAGGACAAGCUGGACACCAACAGCG UGUACGAGCCCUACUAUCACAGCGACCACGCCGAGAGCUCCUGGGUGAAC CGGGGCGAGAGCAGCCGGAAGGCCUACGACCACAACAGCCCCUACAUCUG GCCCCGGAACGACUACGACGGCUUCCUGGAGAACGCCCACGAGCACCACG GCGUGUACAACCAGGGCCGGGGCAUCGACAGCGGCGAGCGGCUGAUGCA GCCCACCCAGAUGAGCGCCCAGGAGGACCUGGGCGACGACACCGGCAUC CACGUGAUCCCCACCCUGAACGGCGACGACCGGCACAAGAUCGUGAACGU GGACCAGCGGCAGUACGGCGACGUGUUCAAGGGCGACCUGAACCCCAAG CCCCAGGGCCAGCGGCUGAUCGAGGUGAGCGUGGAGGAAAACCACCCCU UCACCCUGCGGGCCCCCAUCCAGCGGAUCUACGGCGUGCGGUACACCGA AACCUGGAGCUUCCUGCCCAGCCUGACCUGCACCGGCGACGCCGCUCCC GCCAUCCAGCACAUCUGCCUGAAGCACACCACCUGCUUCCAGGACGUGGU GGUUGACGUGGACUGCGCCGAGAACACCAAGGAGGACCAGCUGGCCGAG AUCAGCUACCGGUUCCAGGGCAAGAAAGAGGCCGACCAGCCCUGGAUCGU GGUGAACACCAGCACCCUGUUCGACGAGCUGGAGCUGGACCCCCCUGAGA UCGAGCCCGGCGUGCUGAAGGUGCUGCGGACCGAGAAGCAGUACCUGGG CGUGUACAUCUGGAACAUGCGGGGCAGCGACGGCACCAGCACCUACGCCA CCUUCCUGGUGACCUGGAAGGGCGACGAGAAGACCCGGAACCCCACCCCC GCCGUGACCCCCCAGCCCCGGGGCGCCGAAUUCCAUAUGUGGAACUACCA CAGCCACGUGUUCAGCGUGGGCGACACCUUCAGCCUGGCCAUGCACCUG CAGUACAAGAUCCACGAGGCCCCCUUCGACCUGCUCCUGGAGUGGCUGUA CGUGCCCAUCGACCCCACCUGCCAGCCCAUGCGGCUGUACAGCACCUGCC

SEQ ID NO:	描述	胺基酸序列
		UGUACCACCCCAACGCCCCCCAGUGCCUGAGCCACAUGAACAGCGGCUGC ACCUUUACCAGUCCCCACCUGGCCCAGCGGGUGGCCAGCACCGUGUACCA GAACUGCGAGCACGCCGACAACUACACCGCCUACUGCCUGGGCAUCAGCC ACAUGGAGCCCAGCUUCGGCCUGAUCCUGCACGACGGCGGAACCACCCUG AAGUUCGUGGACACCCCCGAGAGCCUGAGCGGCCUGUACGUGUUCGUGG UGUACUUCAACGGCCACGUGGAGGCCGUGGCCUACACCGUGGUCAGCAC CGUGGACCACUUCGUGAACGCCAUCGAGGAGCGGGGCUUUCCUCCUACC GCCGGCCAGCCCCCAGCCACCACUAAGCCCAAGGAGAUCACCCCCGUGAA CCCCGGCACCAGCCCCCUGUUGCGGUACGCCGCCUGGACCGGCGGCCUG GCCGCAGUGGUGCUGCUGUGCCUGGUGAUCUUCCUGAUCUGCACCGCCA AGCGGAUGCGGGUGAAGGCCGCCCGGGUGGACAAG

【0090】在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係分泌性蛋白。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係非結構蛋白。在一些實施方式中，VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。在一些實施方式中，VZV立即早期蛋白係IE63多肽。VZV IE63多肽可具有以下的胺基酸序列：

MFCTSPATRGDSSESKPGASVDVNGKMEYGSAPGPLNGRDTSRGPGAFCTPGWEIHPARLVEDIN

RVFLCIAQSSGRVTRDSRRLRRICLDFYLMGRTRQRPTLACWEELLQLQPTQTQCLRATLMEVSHR

PPRGEDGFIEAPNVPLHRSALECDVSDDGGEDDSDDDGSTPSDVIEFRDSDAESSDGEDFIVEEESE

ESTDSCEPDGVPGDCYRDGDGCNTPSPKRPQRAIERYAGAETAEYTAAKALTALGEGGVDWKRRR

HEAPRRHDIPPPHGV（SEQ ID NO: 84）。

【0091】在一些實施方式中，VZV IE63多肽可以與SEQ ID NO: 84中任一項的胺基酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性。VZV IE63多肽可包括訊息序列。在一些實施方式中，VZV IE63多肽可由以下核酸序列編碼：

ATGTTCTGCACCAGCCCCGCCACCCGGGGCGACAGCTCCGAGAGCAAGCCCGGCGCCAGCGT

GGACGTGAACGGCAAGATGGAGTACGGCAGCGCCCCCGGCCCCCTGAACGGCCGGGATACCA

GTCGGGGACCCGGAGCCTTCTGCACCCCCGGCTGGGAGATCCACCCCGCCCGGCTGGTGGAG

GACATCAACCGGGTGTTCCTGTGCATCGCCCAGAGCAGCGGCCGGGTGACCCGGGACAGCCG

GAGACTGCGGCGGATCTGCCTGGACTTCTACCTGATGGGCCGGACCCGGCAGCGGCCCACCC

TGGCCTGCTGGGAGGAACTGCTCCAGCTGCAGCCCACCCAGACCCAGTGCCTGCGGGCCACC

CTGATGGAGGTGAGCCACCGGCCCCCTCGGGGCGAGGACGGCTTCATCGAGGCCCCCAACGT

GCCCCTGCACCGGAGCGCCCTGGAGTGCGACGTGAGCGACGACGGCGGAGAGGACGACAGC

GACGACGACGGCAGCACCCCCAGCGACGTGATCGAGTTCCGGGACAGCGACGCCGAGAGCTC

TGACGGCGAGGACTTCATCGTCGAGGAAGAGAGCGAGGAGAGCACCGACAGCTGCGAGCCCG

ACGGCGTGCCCGGCGACTGCTACCGGGACGGCGACGGCTGCAACACCCCCAGCCCCAAGCG

GCCCCAGCGGGCCATCGAGCGGTACGCCGGCGCCGAAACAGCCGAGTACACCGCCGCTAAGG

CCCTGACCGCCCTGGGCGAGGGCGGCGTGGACTGGAAGCGGAGGCGGCACGAGGCCCCCCG

GCGGCACGACATTCCTCCTCCACACGGCGTG（SEQ ID NO: 85）。

【0092】在一些實施方式中，VZV IE63多肽可由與SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列具有至少85%（例如，至少90%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的核酸序列編碼。在一些實施方式中，視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列編碼。

【0093】在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2000/043527中提供的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2006094756中提供的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。在一些實施方式中，VZV免疫原選自WO 2017070601中描述的VZV免疫原，該申請以其全文併入本文。

【0094】在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至少51%（例如，至少52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為至多52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%或59%、或60%。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的GC含量為51%至60%、52%至60%、53%至60%、54%至60%、55%至60%、52%至58%、53%至58%。

【0095】在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為大於10%（例如，大於11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為至多30%（例如，至多29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%）。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的核酸序列的尿苷含量（對於RNA）或胸苷含量（對於DNA）為20%至28%、21%至26%、10%至24%、15%至24%、20%至24%、21%至24%、22%至24%、23%至24%、10%至23%、15%至23%、20%至23%、21%至23%或22%至23%。

【0096】編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量係指只編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量，而沒有編碼除VZV免疫原之外的肽的其他編碼區。同樣地，編碼VZV免疫原的表現序列的尿苷含量或胸苷係指只編碼VZV免疫原的表現序列的尿苷含量，而沒有編碼除VZV免疫原之外的肽的其他編碼區。在一些實施方式中，編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量或尿苷（或者胸苷）含量的計算僅考慮了從編碼VZV免疫原的開讀框起始密碼子的第一個核苷至同一開讀框終止密碼子的最後一個核苷的5’至3’方向開始的連續核酸序列。在其他實施方式中，編碼VZV免疫原的表現序列的GC含量或尿苷（或者胸苷）含量的計算僅考慮了從編碼VZV免疫原的N末端胺基酸殘基的密碼子的第一個核苷至編碼VZV免疫原的C末端胺基酸殘基的密碼子的最後一個核苷的5’至3’方向開始的連續核酸序列。

【0097】本揭露之環狀多核糖核苷酸可以編碼一或多種免疫原，其中至少一種免疫原係VZV免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼第一VZV免疫原和第二VZV免疫原（例如，選自本文所述之VZV免疫原的每種VZV免疫原）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼第一VZV免疫原和第二免疫原

（例如，選自另一種病毒的第二免疫原）。

【0098】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼1至100、1至50、1至20、1至10、1至5、2至100、2至50、2至20、2至10、2至5種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼2或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼3或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼4或更多種免疫原。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括或編碼5或更多種免疫原。

【0099】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼兩或更多種VZV免疫原，其中每種免疫原係VZV糖蛋白或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gl、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gB、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gH、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gK、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gL、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gC、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gN、或

其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gN、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gN、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE和gM、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gl和gM、或其片段。在一些實施方式中，兩或更多種VZV糖蛋白係gE、gl和gM、或其片段。

【0100】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼兩或更多種VZV免疫原，其中每種VZV免疫原係VZV gE或其變體或片段（例如，本文揭露的變體VZV gE或其變體或片段中的任一種）。

【0101】 在一些實施方式中，多核糖核苷酸可編碼多種免疫原，其中每種免疫原源自皰疹病毒（CMV、EBV或VZV）。多核糖核苷酸可編碼來自以下每種皰疹病毒的免疫原：CMV、EBV或VZV。多核糖核苷酸可編碼多種免疫原，其中每種免疫原源自帶狀皰疹病毒（Singles）或西尼羅河病毒（West Nile Virus）。多核糖核苷酸可編碼來自帶狀皰疹病毒和西尼羅河病毒中的每一種的免疫原。

【0102】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多種免疫原，並且多種免疫原共用至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些實施方式中，多種免疫原也具有小於100%的序列同一性。這可能指示由於遺傳漂變而彼此相關的免疫原，因此，單個環狀多核糖核苷酸組成物或免疫原性組成物可能能夠誘導針對群體中以各種突變狀態存在的靶標的免疫響應，或者可能誘導針對具有相同免疫原的多個靶標的免疫響應，其中該免疫原與遺傳漂變相關。例如，免疫原可以藉由靶病毒（例如，VZV）的遺傳漂移而彼此相關。

【0103】 VZV免疫原來自例如病毒，如病毒表面蛋白、病毒膜蛋白、病毒包膜蛋白、病毒衣殼蛋白、病毒核衣殼蛋白、病毒刺突蛋白、病毒進入蛋白、病毒膜融合蛋白、病毒結構蛋白、病毒非結構蛋白、病毒調控蛋白、病毒輔助蛋白、

分泌性病毒蛋白、病毒聚合酶蛋白、病毒DNA聚合酶、病毒RNA聚合酶、病毒蛋白酶、病毒糖蛋白、病毒融合蛋白、病毒螺旋衣殼蛋白、病毒二十面體衣殼蛋白、病毒基質蛋白、病毒複製酶、病毒轉錄因子或病毒酶。

【0104】 本揭露之VZV免疫原可以包括野生型序列。當描述免疫原時，術語「野生型」係指天然存在的且由基因組（例如，病毒基因組）編碼的序列（例如，核酸序列或胺基酸序列）。一個物種（例如，微生物物種）可以具有一個野生型序列，或者具有兩或更多個野生型序列（例如，在參考微生物基因組中存在一個規範的野生型序列，並且存在由突變產生的其他變體的野生型序列）。

【0105】 當描述VZV免疫原時，術語「衍生物」、「源自」或「變體」係指與野生型序列的不同之處在於一或多個核酸或胺基酸，例如相對於野生型序列含有一或多個核酸或胺基酸插入、缺失和/或取代的序列（例如，核酸序列或胺基酸序列）。

【0106】 VZV免疫原衍生物序列係與野生型序列（例如，野生型核酸、蛋白質、免疫原或表位序列）具有至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的序列。

【0107】 在一些實施方式中，VZV免疫原含有影響所編碼的蛋白質的結構的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。在一些實施方式中，免疫原含有影響所編碼的蛋白質的功能的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。在一些實施方式中，免疫原含有影響細胞對所編碼的蛋白質的表現或加工的一或多個胺基酸插入、缺失、取代或其組合。

【0108】 在一些實施方式中，免疫原含有影響所編碼的免疫原性核酸的結構的一或多個核酸插入、缺失、取代或其組合。

【0109】 胺基酸的插入、缺失、取代或其組合可以引入翻譯後修飾的位點（例如，引入糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、

羥基化、硫酸化或脂質化位點，或靶向進行切割的序列）。在一些實施方式中，胺基酸的插入、缺失、取代或其組合去除翻譯後修飾的位點（例如，去除糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、羥基化、硫酸化或脂質化位點，或靶向進行切割的序列）。在一些實施方式中，胺基酸的插入、缺失、取代或其組合修飾翻譯後修飾的位點（例如，修飾位點以改變糖基化、泛素化、磷酸化、亞硝基化、甲基化、乙醯化、醯胺化、羥基化、硫酸化或脂質化位點，或切割的效率或特徵）。

【0110】胺基酸取代可為保守性或非保守性取代。保守性胺基酸取代可為一個胺基酸取代另一個相似生物化學性質（例如，電荷、大小和/或疏水性）的胺基酸。非保守性胺基酸取代可為一個胺基酸被具有不同生物化學特性（例如，電荷、大小和/或疏水性）的另一胺基酸取代。保守性胺基酸變化可為例如對多肽的二級或三級結構影響最小的取代。保守性胺基酸變化可為從一種親水性胺基酸到另一種親水性胺基酸的胺基酸變化。親水性胺基酸可以包括Thr（T）、Ser（S）、His（H）、Glu（E）、Asn（N）、Gln（Q）、Asp（D）、Lys（K）和Arg（R）。保守性胺基酸變化可為從一種疏水性胺基酸到另一種親水性胺基酸的胺基酸變化。疏水性胺基酸可以包括Ile（I）、Phe（F）、Val（V）、Leu（L）、Trp（W）、Met（M）、Ala（A）、Gly（G）、Tyr（Y）和Pro（P）。保守性胺基酸變化可為從一種酸性胺基酸到另一種酸性胺基酸的胺基酸變化。酸性胺基酸可以包括Glu（E）和Asp（D）。保守性胺基酸變化可為從一種鹼性胺基酸到另一種鹼性胺基酸的胺基酸變化。鹼性胺基酸可以包括His（H）、Arg（R）和Lys（K）。保守性胺基酸變化可為從一種極性胺基酸到另一種極性胺基酸的胺基酸變化。極性胺基酸可以包括Asn（N）、Gln（Q）、Ser（S）和Thr（T）。保守性胺基酸變化可為從一種非極性胺基酸到另一種非極性胺基酸的胺基酸變化。非極性胺基酸可以包括Leu（L）、Val（V）、Ile（I）、Met（M）、Gly（G）

和Ala（A）。保守性胺基酸變化可為從一種芳族胺基酸到另一種芳族胺基酸的胺基酸變化。芳族胺基酸可以包括Phe（F）、Tyr（Y）和Trp（W）。保守性胺基酸變化可為從一種脂族胺基酸到另一種脂族胺基酸的胺基酸變化。脂族胺基酸可以包括Ala（A）、Val（V）、Leu（L）和Ile（I）。在一些實施方式中，保守性胺基酸取代係以下各類之一的一個胺基酸到另一胺基酸的胺基酸變化：I類：Ala、Pro、Gly、Gln、Asn、Ser、Thr；II類：Cys、Ser、Tyr、Thr；III類：Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe；IV類：Lys、Arg、His；V類：Phe、Tyr、Trp、His；和VI類：Asp、Glu。

【0111】在一些實施方式中，本揭露之免疫原變體相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括至多1個、至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個、至多10個、至多11個、至多12個、至多13個、至多14個、至多15個、至多16個、至多17個、至多18個、至多19個、至多20個、至多25個、至多30個、至多35個、至多40個、至多45個或至多50個胺基酸取代。在一些實施方式中，本揭露之免疫原衍生物或表位衍生物相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-30、1-40、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、2-15、2-20、2-30、2-40、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-15、3-20、3-30、3-40、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、5-15、5-20、5-30、5-40、10-15、15-20或20-25個胺基酸取代。

【0112】在一些實施方式中，本揭露之免疫原變體相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括至多1個、至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個、至多10個、至多11個、至多12個、至多13個、至多14個、至多15個、至多16個、至多17個、至多18個、至多19個、至多20個、至多25個、至多30個、至多35個、至多40個、至多45個或至多50個胺基酸

缺失。在一些實施方式中，本揭露之免疫原衍生物或表位衍生物相對於本文揭露的序列（例如，野生型序列）包括1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-15、1-20、1-30、1-40、2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、2-15、2-20、2-30、2-40、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-15、3-20、3-30、3-40、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、5-15、5-20、5-30、5-40、10-15、15-20或20-25個胺基酸缺失。

【0113】該一或多個胺基酸取代或缺失可以位於N端、C端、胺基酸序列內、或其組合。該等胺基酸缺失可為連續的、非連續的或其組合。

【0114】在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括融合蛋白，該融合蛋白包括本文揭露的兩或更多種免疫原。在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括表位。在一些實施方式中，由本揭露之環狀多核糖核苷酸編碼的多肽包括融合蛋白，該融合蛋白包括本文揭露的兩或更多個表位。

【0115】在一些實施方式中，VZV免疫原的長度小於約40,000個胺基酸、小於約35,000個胺基酸、小於約30,000個胺基酸、小於約25,000個胺基酸、小於約20,000個胺基酸、小於約15,000個胺基酸小於約10,000個胺基酸、小於約9,000個胺基酸、小於約8,000個胺基酸、小於約7,000個胺基酸、小於約6,000個胺基酸、小於約5,000個胺基酸、小於約4,000個胺基酸、小於約3,000個胺基酸、小於約2,500個胺基酸、小於約2,000個胺基酸、小於約1,500個胺基酸、小於約1,000個胺基酸、小於約900個胺基酸、小於約800個胺基酸、小於約700個胺基酸、小於約600個胺基酸、小於約500個胺基酸、小於約400個胺基酸、小於約300個胺基酸、小於約250個胺基酸、小於約200個胺基酸、小於約150個胺基酸、小於約140個胺基酸、小於約130個胺基酸、小於約120個胺基酸、小於約110個胺基酸、小於約100個胺基酸、小於約90個胺基酸、小於約80個胺基酸、小於約70個胺基酸、小

於約60個胺基酸、小於約50個胺基酸、小於約40個胺基酸、小於約30個胺基酸、小於約25個胺基酸、小於約20個胺基酸、小於約15個胺基酸、小於約10個胺基酸、小於約5個胺基酸，其之間或更短的任何胺基酸長度都可能是可用的。

【0116】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個VZV免疫原序列並被配置為用於在受試者體內細胞中持續表現。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸被配置為使得該一或多個表現序列在細胞中在較晚的時間點的表現等於或高於較早的時間點的表現。在此類實施方式中，該一或多個免疫原序列的表現可以維持在相對穩定的水平或可以隨時間增加。免疫原序列的表現可以在延長的時間段內相對穩定。免疫原序列的表現可以瞬時相對穩定或僅有限的時間，例如至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天相對穩定。

【0117】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸在受試者中例如瞬時或長期表現一或多種免疫原。在某些實施方式中，免疫原的表現持續至少約1小時至約30天，或至少約2小時、6小時、12小時、18小時、24小時、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或更長時間或介於之間的任何時間。在某些實施方式中，免疫原的表現持續不超過約30分鐘至約7天、或不超過約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、24小時、36小時、48小時、60小時、72小時、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或介於之間的任何時間。

【0118】免疫原表現包括翻譯本文提供的環狀多核糖核苷酸的至少一個

區域。例如，環狀多核糖核苷酸可以在受試者中翻譯以生成包括本揭露之一或多種免疫原的多肽，從而刺激受試者中適應性免疫響應（例如，抗體響應和/或T細胞響應）的產生。在一些實施方式中，本揭露之環狀多核糖核苷酸經翻譯以在人或動物受試者中產生一或多種免疫原，從而刺激人或動物受試者中適應性免疫響應（例如，抗體響應和/或T細胞響應）的產生。

【0119】 在一些實施方式中，用於免疫原表現之方法包括翻譯產物的修飾、折疊或其他翻譯後修飾。在一些實施方式中，用於免疫原表現之方法包括體內翻譯後修飾，例如經由細胞機制。

環狀多核糖核苷酸

【0120】 本文所述之環狀多核糖核苷酸可以包括本文所述之任何一或多種元件和編碼VZV免疫原的表現序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括如國際專利公開案號WO 2019/118919（特此藉由援引以其全文併入）中揭露的任何特徵或特徵的任何組合。

【0121】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為至少約20個核苷酸、至少約30個核苷酸、至少約40個核苷酸、至少約50個核苷酸、至少約75個核苷酸、至少約100個核苷酸、至少約200個核苷酸、至少約300個核苷酸、至少約400個核苷酸、至少約500個核苷酸、至少約1,000個核苷酸、至少約2,000個核苷酸、至少約5,000個核苷酸、至少約6,000個核苷酸、至少約7,000個核苷酸、至少約8,000個核苷酸、至少約9,000個核苷酸、至少約10,000個核苷酸、至少約12,000個核苷酸、至少約14,000個核苷酸、至少約15,000個核苷酸、至少約16,000個核苷酸、至少約17,000個核苷酸、至少約18,000個核苷酸、至少約19,000個核苷酸或至少約20,000個核苷酸。

【0122】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為500個核苷酸至20,000個核苷酸、1,000個核苷酸至20,000個核苷酸、2,000個核苷酸至20,000個核苷酸、或

5,000個核苷酸至20,000個核苷酸。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸為500個核苷酸至10,000個核苷酸、1,000個核苷酸至10,000個核苷酸、2,000個核苷酸至10,000個核苷酸、或5,000個核苷酸至10,000個核苷酸。

內部核糖體進入位點

【0123】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸包括一或多個內部核糖體進入位點（IRES）元件。在一些實施方式中，IRES與一或多個表現序列（例如，每個IRES與一或多個表現序列可操作地連接，其中每個表現序列視需要編碼免疫原，如VZV免疫原）可操作地連接。在實施方式中，IRES位於異源啟動子與編碼序列（例如，編碼VZV免疫原的編碼序列）的5'末端之間。

【0124】包括在多核糖核苷酸中的合適的IRES元件包括能夠接合真核核糖體的RNA序列。在一些實施方式中，IRES元件係至少約5 nt、至少約8 nt、至少約9 nt、至少約10 nt、至少約15 nt、至少約20 nt、至少約25 nt、至少約30 nt、至少約40 nt、至少約50 nt、至少約100 nt、至少約200 nt、至少約250 nt、至少約350 nt或至少約500 nt。

【0125】在一些實施方式中，IRES元件源自生物體的DNA，該生物體包括但不限於病毒、哺乳動物和果蠅。這樣的病毒DNA可以源自但不限於小核糖核酸病毒互補DNA（cDNA）、腦心肌炎病毒（EMCV）cDNA和脊髓灰白質病毒cDNA。在一個實施方式中，衍生IRES元件的果蠅DNA包括但不限於來自黑腹果蠅（Drosophila melanogaster）的觸角足基因。

【0126】在一些實施方式中，如果存在，IRES序列係以下病毒的IRES序列：桃拉綜合症（Taura syndrome）病毒、錐鼻蟲屬（Triatoma）病毒、泰勒氏腦脊髓炎病毒（Theiler's encephalomyelitis virus）、猿猴病毒40、入侵紅火蟻（Solenopsis invicta）病毒1、稻麥蚜（Rhopalosiphum padi）病毒、網狀內皮組織增生病毒、福爾曼脊髓灰白質病毒（fuman poliovirus）1、普勞提婭失速腸病毒（Plautia stall

intestine virus）、喀什米爾蜜蜂病毒、人鼻病毒2、假桃病毒葉蟬病毒-1（Homalodisca coagulata virus-1）、人類免疫不全病毒1型、假桃病毒葉蟬病毒-1、Himetobi P病毒、C型肝炎病毒、A型肝炎病毒、GB型肝炎病毒、口蹄疫病毒、人類腸道病毒71、馬鼻炎病毒、茶尺蠖（Ectropis obliqua）、小核糖核酸樣病毒、腦心肌炎病毒（EMCV）、果蠅C病毒、十字花科菸草病毒、蟋蟀麻痺病毒、牛病毒性腹瀉病毒1、黑皇后細胞病毒、蚜蟲致死性麻痺病毒、禽腦脊髓炎病毒、急性蜜蜂麻痺病毒、木槿褪綠環斑病毒（Hibiscus chlorotic ringspot virus）、經典豬瘟病毒、人FGF2、人SFTPA1、人AML1/RUNX1、果蠅觸角足、人AQP4、人AT1R、人BAG-l、人BCL2、人BiP、人c-IAPl、人c-myc、人eIF4G、小鼠NDST4L、人LEF1、小鼠HIF1α、人n.myc、小鼠Gtx、人p27kipl、人PDGF2/c-sis、人p53、人Pim-l、小鼠Rbm3、果蠅reaper、犬Scamper、果蠅Ubx、人UNR、小鼠UtrA、人VEGF-A、人XIAP、薩里病毒（Salivirus）、科薩病毒（Cosavirus）、副腸孤病毒（Parechovirus）、果蠅無毛、釀酒酵母（S. cerevisiae）TFIID、釀酒酵母YAP1、人c-src、人FGF-l、猿猴小核糖核酸病毒、蕪菁皺縮病毒（Turnip crinkle virus）、eIF4G適配體、柯薩奇病毒（Coxsackievirus）B3（CVB3）或柯薩奇病毒A（CVB1/2）。在又另一實施方式中，IRES係柯薩奇病毒B3（CVB3）的IRES序列。在另外的實施方式中，IRES係腦心肌炎病毒的IRES序列。在另外的實施方式中，IRES係蒂勒腦脊髓炎病毒的IRES序列。

【0127】與野生型IRES序列相比，IRES序列可具有經修飾的序列。在一些實施方式中，當野生型IRES的最後一個核苷酸不是胞嘧啶核酸殘基時，可以修飾野生型IRES序列的最後一個核苷酸，使得其係胞嘧啶殘基。例如，IRES序列可為CVB3 IRES序列，其中將末端腺苷殘基修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，經修飾的CVB3 IRES可具有以下的核酸序列：

TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCCCATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACG

GTACCTTTGTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAACTTAGAAGTAACACACACCGAT

CAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGAGTA

TCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAA

CCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCG

ATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGG

GGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTC

CTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGT

GTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTC

CTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATCGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCC

GGTGACTAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAA

AACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAC（SEQ ID NO: 113）

【0128】在一些實施方式中，IRES序列係腸道病毒71（EV17）IRES。在一些實施方式中，將EV17 IRES序列的末端鳥苷殘基修飾為胞嘧啶殘基。在一些實施方式中，經修飾的EV71 IRES可具有以下的核酸序列：

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCAC

CATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT

CCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG

TTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCC

CCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGC

GGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCA

AGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGG

GGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAAC

CACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATA（SEQ ID NO: 114）。

【0129】在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括側接至少一個（例如，2、

3、4、5或更多個）表現序列的至少一個IRES。在一些實施方式中，IRES側接至少一個（例如2、3、4、5或更多個）表現序列的兩側。在一些實施方式中，多核糖核苷酸在每個表現序列的一側或兩側包括一或多個IRES序列，導致所得的一或多種肽和或一或多種多肽的隔開。例如，本文所述之多核糖核苷酸可包括與第一表現序列（例如，編碼第一免疫原，如第一VZV免疫原）可操作地連接的第一IRES和與第二表現序列（例如，編碼第二免疫原，如第二VZV免疫原）可操作地連接的第二IRES。

【0130】 在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括IRES（例如，與編碼區可操作地連接的IRES）。例如，多核糖核苷酸可以包括如在以下中描述的任何IRES：Chen等人 Mol. Cell [分子細胞] 81(20):4300-4318, 2021；Jopling等人 Oncogene [致癌基因] 20:2664-2670, 2001；Baranick等人 PNAS [美國國家科學院院刊]105(12):4733-4738, 2008；Lang等人 Molecular Biology of the Cell [細胞分子生物學] 13(5):1792-1801, 2002；Dorokhov等人 PNAS [美國國家科學院院刊] 99(8):5301-5306, 2002；Wang等人 Nucleic Acids Research [核酸研究] 33(7):2248-2258, 2005；以及Petz等人 Nucleic Acids Research [核酸研究] 35(8):2473-2482, 2007，其各自特此藉由援引以其全文併入。

訊息序列

【0131】 在一些實施方式中，可以從本文揭露的環狀多核糖核苷酸表現的示例性免疫原包括分泌性蛋白，例如天然包括訊息序列的蛋白質（例如，免疫原），或者通常不編碼訊息序列但修飾為含有訊息序列的蛋白質。在一些實施方式中，由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原包括分泌訊息。例如，分泌訊息可為分泌性蛋白的天然編碼的分泌訊息。在另一個實例中，分泌訊息可為分泌性蛋白的經修飾的分泌訊息。在其他實施方式中，由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原不包括分泌訊息。

【0132】在一些實施方式中，訊息序列選自SecSP38（MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA；SEQ ID NO: 1）；SecD4（MWWLLLLLLLLWPMVWA；SEQ ID NO: 2）、gLuc（MGVKVLFALICIAVAEAK；SEQ ID NO: 3）；INHC1（MASRLTLLTLLLLLLAGDRASS；SEQ ID NO: 4）；Epo（MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG；SEQ ID NO: 5）；和IL-2（MYRMQLLSCIALSLALVTNS；SEQ ID NO: 6）。

【0133】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼相同免疫原的多個拷貝（例如，一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或更多個）。在一些實施方式中，免疫原的至少一個拷貝包括訊息序列，且免疫原的至少一個拷貝不包括訊息序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多種免疫原（例如，多種不同的免疫原或多種具有小於100%序列同一性的免疫原），其中該多種免疫原中的至少一種包括訊息序列且該多種免疫原中的至少一個拷貝不包括訊息序列。

【0134】在一些實施方式中，訊息序列係野生型訊息序列，其例如當內源性表現時存在於相應野生型免疫原的N端。在一些實施方式中，訊息序列與免疫原異源，例如當野生型免疫原內源性表現時係不存在的。可以修飾編碼免疫原的多核糖核苷酸序列以去除編碼野生型訊息序列的核苷酸序列和/或添加編碼異源訊息序列的序列。

【0135】環狀多核糖核苷酸可進一步包括一或多種佐劑，每種佐劑都具有或沒有訊息序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼至少一種佐劑和至少一種免疫原。在一些實施方式中，至少一種編碼的佐劑包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原不包括訊息序列。在一些實施方式中，至少一種編碼的佐劑包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原包括訊息序列。在一些實施方式中，至少

一種編碼的佐劑不包括訊息序列且該至少一種編碼的免疫原包括訊息序列。在一些實施方式中，編碼的佐劑和編碼的免疫原都不包括訊息序列。

【0136】 在一些實施方式中，訊息序列係野生型訊息序列，其例如當內源性表現時存在於相應野生型佐劑的N端。在一些實施方式中，訊息序列與佐劑異源，例如當野生型佐劑內源性表現時係不存在的。可以修飾編碼佐劑的多核糖核苷酸序列以去除編碼野生型訊息序列的核苷酸序列和/或添加編碼異源訊息序列的序列。

【0137】 由多核糖核苷酸編碼的多肽（例如，由多核糖核苷酸編碼的免疫原或佐劑）可以包括將免疫原或佐劑引導至分泌途徑的訊息序列。在一些實施方式中，訊息序列可以引導免疫原或佐劑駐留在某些細胞器（例如，內質網、高基氏體或內體）中。在一些實施方式中，訊息序列將免疫原或佐劑引導至從細胞中分泌。對於分泌性蛋白，訊息序列可在分泌之後被切割，從而產生成熟蛋白質。在其他實施方式中，訊息序列可以嵌入細胞膜或某些細胞器中，產生跨膜區段，跨膜區段將蛋白錨定至細胞膜、內質網或高基氏體。在某些實施方式中，跨膜蛋白的訊息序列係在多肽N端的短序列。在其他實施方式中，第一跨膜結構域充當第一訊息序列，將蛋白質靶向膜。

【0138】 在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的佐劑包括分泌訊息序列。在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的免疫原包括分泌訊息序列、跨膜插入訊息序列或不包括訊息序列。

調控元件

【0139】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個調控元件，例如，修飾環狀多核糖核苷酸內表現序列的表現的一或多個序列。

【0140】 調控元件可以包括位置與編碼表現產物的表現序列相鄰的序列。調控元件可以可操作地連接至相鄰序列。與不存在調控元件時表現的產物的量

相比，調控元件可以增加表現的產物的量。調控元件可用於增加由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原和/或佐劑的表現。同樣地，調控元件可用於降低由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種免疫原和/或佐劑的表現。在一些實施方式中，調控元件可用於增加免疫原和/或佐劑的表現，而另一種調控元件可用於降低同一環狀多核糖核苷酸上另一種免疫原和/或佐劑的表現。此外，一個調控元件可以增加串聯附接的多個表現序列表現的產物（例如，免疫原或佐劑）的量。因此，一個調控元件可以增強一或多個表現序列（例如，免疫原或佐劑）的表現。也可以使用多種調控元件，例如，差異性地調控不同表現序列的表現。

【0141】 在一些實施方式中，本文提供的調控元件可以包括選擇性翻譯序列。如本文所用，術語「選擇性翻譯序列」係指選擇性地起始或激活環狀多核糖核苷酸中的表現序列的翻譯的核酸序列，例如某些核糖開關適體酶。調控元件還可以包括選擇性降解序列。如本文所用，術語「選擇性降解序列」係指起始環狀多核糖核苷酸或環狀多核糖核苷酸的表現產物的降解的核酸序列。在一些實施方式中，調控元件係翻譯調節子。翻譯調節子可以調節環狀多核糖核苷酸中表現序列的翻譯。翻譯調節子可為翻譯強化子或翻譯抑制子。在一些實施方式中，翻譯起始序列可以充當調控元件。

【0142】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸產生化學計量比的表現產物。滾環翻譯連續地以基本上相等的比率產生表現產物。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸具有化學計量的翻譯效率，使得表現產物以基本上相等的比率產生。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸具有多種表現產物（例如來自2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多個表現序列的產物）的化學計量翻譯效率。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸產生基本上不同比率的表現產物。例如，多種表現產物的翻譯效率可以具有以下的比率：1：10,000、1：7000、1：5000、1：1000、1：700、1：500、1：100、1：50、1：10、1：5、1：4、1：3或1：

2。在一些實施方式中，可以使用調控元件來修改多個表現產物的比率。

【0143】 國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0154] - [0161]中描述了調控元件的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

切割結構域

【0144】 本揭露之環狀多核糖核苷酸可以包括切割結構域（例如，交錯元件或切割序列）。

【0145】 術語「交錯元件」係指在翻譯期間誘導核糖體暫停的部分，諸如核苷酸序列。在一些實施方式中，交錯元件係具有強α-螺旋傾向的胺基酸的非保守序列，然後是共有序列-D(V/I)ExNPGP，其中x=任何胺基酸（SEQ ID NO: 7）。在一些實施方式中，交錯元件可以包括化學部分，如甘油、非核酸連接部分、化學修飾、經修飾的核酸或其任何組合。

【0146】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與每個表現序列相鄰的交錯元件。在一些實施方式中，交錯元件存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物（例如一或多種免疫原和/或一或多種佐劑）隔開。在一些實施方式中，交錯元件係一或多個表現序列的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列(例如，一或多種免疫原和/或一或多種佐劑)，並且該一或多個表現序列中的每一個被環狀多核糖核苷酸上的交錯元件與後繼的表現序列（例如，一或多種免疫原和/或一或多種佐劑）隔開。在一些實施方式中，交錯元件阻止 (a) 單個表現序列的兩輪翻譯或 (b) 兩或更多個表現序列的一輪或多輪翻譯生成單個多肽。在一些實施方式中，交錯元件係與該一或多個表現序列隔開的序列。在一些實施方式中，交錯元件包括該一或多個表現序列的表現序列的一部分。

【0147】 在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0172]-[0175]中描述

了交錯元件的實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0148】在一些實施方式中，由環狀核糖核苷酸編碼的多種免疫原和/或佐劑可以被每種免疫原之間的IRES隔開（例如，每種免疫原與單獨的IRES可操作地連接）。例如，環狀多核糖核苷酸可以包括與第一表現序列可操作地連接的第一IRES和與第二表現序列可操作地連接的第二IRES。所有免疫原之間的IRES可為相同的IRES。不同免疫原之間的IRES可以不同。

【0149】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被2A自切割肽隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、2A和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。

【0150】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。

【0151】在一些實施方式中，多種免疫原和/或佐劑可以被2A自切割肽和蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）隔開。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼與編碼第一免疫原、2A、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。環狀多核糖核苷酸還可以編碼與編碼第一免疫原、蛋白酶切割位點（例如，弗林蛋白酶切割位點）、2A和第二免疫原的開讀框可操作地連接的IRES。串聯的2A和弗林蛋白酶切割位點可稱為弗林蛋白酶-2A（其包括以任一方向排列的弗林蛋白酶-2A或2A-弗林蛋白酶）。

【0152】此外，由環狀核糖核苷酸編碼的多種免疫原和/或佐劑可以被IRES和2A序列兩者隔開。例如，IRES可以在一個免疫原和/或佐劑與第二免疫原和/或佐劑之間，而2A肽可以在第二免疫原和/或佐劑與第三免疫原和/或佐劑之間。特定IRES或2A自切割肽的選擇可用於在IRES或2A序列的控制下控制免疫原

和/或佐劑的表現水平。例如，根據所選擇的IRES和/或2A肽，多肽上的表現可以更高或更低。

【0153】 為了避免產生連續表現產物，例如免疫原和/或佐劑，同時保持滾環翻譯，可以包括交錯元件以在翻譯期間誘導核糖體暫停。在一些實施方式中，交錯元件在一或多個表現序列中的至少一個的3'末端。交錯元件可以被配置為在環狀多核糖核苷酸的滾環翻譯期間使核糖體停滯。交錯元件可以包括但不限於2A樣或CHYSEL（SEQ ID NO: 8）（順式作用的水解酶元件）序列。在一些實施方式中，交錯元件編碼具有C末端共有序列為$X_1X_2X_3EX_5NPGP$的序列，其中X_1不存在或G或H，X_2不存在或D或G，X_3係D或V或I或S或M，X_5係任何胺基酸（SEQ ID NO: 9）。在一些實施方式中，此序列包括具有強α-螺旋傾向的胺基酸的非保守序列，然後是共有序列-D(V/I)ExNPGP，其中x＝任何胺基酸（SEQ ID NO: 7）。交錯元件之一些非限制性實例包括GDVESNPGP（SEQ ID NO: 10）、GDIEENPGP（SEQ ID NO: 11）、VEPNPGP（SEQ ID NO: 12）、IETNPGP（SEQ ID NO: 13）、GDIESNPGP（SEQ ID NO: 14）、GDVELNPGP（SEQ ID NO: 15）、GDIETNPGP（SEQ ID NO: 16）、GDVENPGP（SEQ ID NO: 17）、GDVEENPGP（SEQ ID NO: 18）、GDVEQNPGP（SEQ ID NO: 19）、IESNPGP（SEQ ID NO: 20）、GDIELNPGP（SEQ ID NO: 21）、HDIETNPGP（SEQ ID NO: 22）、HDVETNPGP（SEQ ID NO: 23）、HDVEMNPGP（SEQ ID NO: 24）、GDMESNPGP（SEQ ID NO: 25）、GDVETNPGP（SEQ ID NO: 26）、GDIEQNPGP（SEQ ID NO: 27）和DSEFNPGP（SEQ ID NO: 28）。

【0154】 在一些實施方式中，本文所述之交錯元件切割表現產物，諸如在本文所述之共有序列的G和P之間。作為一個非限制性實例，環狀多核糖核苷酸包括至少一個交錯元件以切割表現產物。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與至少一個表現序列相鄰的交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷

酸包括在每個表現序列後的交錯元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括存在於每個表現序列的一側或兩側的交錯元件，導致由每個表現序列翻譯一或多種單獨肽和/或多肽。

【0155】在一些實施方式中，交錯元件包括一或多種在翻譯過程中誘導核糖體暫停的經修飾的核苷酸或非天然核苷酸。非天然核苷酸可以包括肽核酸（PNA）、味啉代和鎖核酸（LNA）、以及乙二醇核酸（GNA）和蘇糖核酸（TNA）。諸如此類的實例藉由改變分子主鏈而不同於天然存在的DNA或RNA。示例性修飾可以包括對糖、核鹼基、核苷間鍵（例如對連接的磷酸酯/對磷酸二酯鍵/對磷酸二酯主鏈）進行的可在翻譯期間誘導核糖體暫停的任何修飾以及其任何組合。本文提供的一些示例性修飾在本文其他處描述。

【0156】在一些實施方式中，交錯元件以其他形式存在於環狀多核糖核苷酸中。例如，在一些示例性環狀多核糖核苷酸中，交錯元件包括環狀多核糖核苷酸中的第一表現序列的終止元件，和將終止元件與第一表現序列後繼表現的第一翻譯起始序列隔開的核苷酸間隔子序列。在一些實例中，第一表現序列的第一交錯元件在環狀多核糖核苷酸中的第一表現序列後繼表現的第一翻譯起始序列的上游（5'）。在一些情況下，第一表現序列和第一表現序列後繼表現序列係環狀多核糖核苷酸中的兩個隔開的表現序列。第一交錯元件和第一翻譯起始序列之間的距離可以使得第一表現序列及其後繼表現序列能夠連續翻譯。在一些實施方式中，第一交錯元件包括終止元件，並將第一表現序列的表現產物與其後繼表現序列的表現產物隔開，從而產生離散的表現產物。在一些情況下，在環狀多核糖核苷酸中後繼序列的第一翻譯起始序列上游包括第一交錯元件的環狀多核糖核苷酸被連續翻譯，而在第二表現序列後繼表現序列的第二翻譯起始序列的上游包括第二表現序列的交錯元件的對應環狀多核糖核苷酸不被連續翻譯。在一些情況下，環狀多核糖核苷酸中僅存在一個表現序列，並且第一表現序列及其

後繼表現序列係相同的表現序列。在一些示例性環狀多核糖核苷酸中，交錯元件包括環狀多核糖核苷酸中第一表現序列的第一終止元件，和將終止元件與下游翻譯起始序列隔開的核苷酸間隔子序列。在一些此類實例中，環狀多核糖核苷酸中第一交錯元件在第一表現序列的第一翻譯起始序列的上游（5'）。在一些情況下，第一交錯元件和第一翻譯起始序列之間的距離使得能夠連續翻譯第一表現序列和任何後繼表現序列。在一些實施方式中，第一交錯元件將第一表現序列的一輪表現產物與第一表現序列的下一輪表現產物分開，從而產生離散的表現產物。在一些情況下，在環狀多核糖核苷酸中的第一序列的第一翻譯起始序列上游包括第一交錯元件的環狀多核糖核苷酸被連續翻譯，而在相應環狀多核糖核苷酸中的第二表現序列的第二翻譯起始序列上游包括交錯元件的相應環狀多核糖核苷酸不被連續翻譯。在一些情況下，相應環狀多核糖核苷酸中第二交錯元件與第二翻譯起始序列之間的距離係環狀多核糖核苷酸中第一交錯元件與第一翻譯起始序列之間的距離的至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍大。在一些情況下，第一交錯元件與第一翻譯起始之間的距離為至少2 nt、3 nt、4 nt、5 nt、6 nt、7 nt、8 nt、9 nt、10 nt、11 nt、12 nt、13 nt、14 nt、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、25 nt、30 nt、35 nt、40 nt、45 nt、50 nt、55 nt、60 nt、65 nt、70 nt、75 nt或更大。在一些實施方式中，第二交錯元件與第二翻譯起始之間的距離為至少2 nt、3 nt、4 nt、5 nt、6 nt、7 nt、8 nt、9 nt、10 nt、11 nt、12 nt、13 nt、14 nt、15 nt、16 nt、17 nt、18 nt、19 nt、20 nt、25 nt、30 nt、35 nt、40 nt、45 nt、50 nt、55 nt、60 nt、65 nt、70 nt、75 nt或大於第一交錯元件和第一翻譯起始之間的距離。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括多於一個表現序列。

【0157】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括至少一個切割序列。在一些實施方式中，切割序列與表現序列相鄰。在一些實施方式中，切割序列在

兩個表現序列之間。在一些實施方式中，切割序列包括在表現序列中。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括2至10個切割序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括2至5個切割序列。在一些實施方式中，多個切割序列在多個表現序列之間；例如，環狀多核糖核苷酸可以包括三個表現序列和兩個切割序列，使得在每個表現序列之間存在一個切割序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括切割序列，例如在犧牲型circRNA或可切割的circRNA或自切割的circRNA中。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括兩或更多個切割序列，導致將環狀多核糖核苷酸分離成多個產物，例如miRNA、線性RNA、較小的環狀多核糖核苷酸等。

【0158】 在一些實施方式中，切割序列包括核酶RNA序列。核酶（來自核糖核酸酶，也稱為RNA酶或催化性RNA）係催化化學反應的RNA分子。許多天然核酶催化其自身的磷酸二酯鍵之一的水解，或催化其他RNA中的鍵的水解，但也發現天然核酶催化核糖體的胺基轉移酶活性。催化性RNA可以藉由體外方法「進化」。類似於上文討論的核糖開關活性，核酶及其反應產物可以調控基因表現。在一些實施方式中，將催化性RNA或核酶置於較大的非編碼RNA中，這使得核酶以許多拷貝存在於細胞內，用於大體積分子的化學轉化的目的。在一些實施方式中，適配體和核酶都可以在相同的非編碼RNA中編碼。

【0159】 在一些實施方式中，切割序列編碼可切割的多肽連接子。例如，多核糖核苷酸可以編碼兩或更多種免疫原，例如，其中該兩或更多種免疫原由單個開讀框（ORF）編碼。例如，兩或更多種免疫原可以由單個開讀框編碼，該開讀框的表現受IRES控制。在一些實施方式中，ORF進一步編碼多肽連接子，例如使得ORF的表現產物編碼兩或更多種免疫原，每種免疫原被編碼多肽連接子（例如，5-200、5至100、5至50、5至20、50至100或50至200個胺基酸的連接子）的序列隔開。多肽連接子可包括切割位點，例如，被蛋白酶（例如，在對受試者投

與多核糖核苷酸之後受試者中的內源性蛋白酶）識別和切割的切割位點。在這樣的實施方式中，包括兩或更多種免疫原的胺基酸序列的單一表現產物在表現時裂解，從而使得該兩或更多種免疫原在表現後分離。示例性的蛋白酶切割位點係熟悉該項技術者已知的，例如，充當被金屬蛋白酶（例如，基質金屬蛋白酶（MMP），如MMP 1-28中的任一或多種）、解聚素（disintegrin）和金屬蛋白酶（ADAM，如ADAM 2、7-12、15、17-23、28-30和33中的任一或多種）、絲胺酸蛋白酶（例如，弗林蛋白酶）、尿激酶型纖溶酶原激活劑、蛋白裂解酶（matriptase）、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶或組織蛋白酶識別的蛋白酶切割位點的胺基酸序列。在一些實施方式中，該蛋白酶係MMP9和/或MMP2。在一些實施方式中，蛋白酶係蛋白裂解酶。

【0160】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸係犧牲型環狀多核糖核苷酸、可切割的環狀多核糖核苷酸或自切割的環狀多核糖核苷酸。環狀多核糖核苷酸可以遞送細胞組分，包括例如，RNA、lncRNA、lincRNA、miRNA、tRNA、rRNA、snoRNA、ncRNA、siRNA或shRNA。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括被以下隔開的miRNA：(i) 可自切割的元件；(ii) 切割募集位點；(iii) 可降解連接子；(iv) 化學連接子；和/或 (v) 間隔子序列。在一些實施方式中，circRNA包括被以下隔開的siRNA：(i) 可自切割的元件；(ii) 切割募集位點（例如，ADAR）；(iii) 可降解連接子（例如，丙三醇）；(iv) 化學連接子；和/或 (v) 間隔子序列。可自切割的元件之非限制性實例包括錘頭結構、剪接元件、髮夾、D型肝炎病毒（HDV）、Varkud衛星（VS）和glmS核酶。

翻譯起始序列

【0161】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原並且包括翻譯起始序列，例如起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列包括科紮克或夏因-達爾加諾（Shine-Dalgarno）序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列包含科

紮克序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括翻譯起始序列，例如，與表現序列相鄰，例如科紮克序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列係非編碼起始密碼子。在一些實施方式中，翻譯起始序列，例如科紮克序列，存在於每個表現序列的一側或兩側，導致表現產物的隔開。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括與表現序列相鄰的至少一個翻譯起始序列。在一些實施方式中，翻譯起始序列為環狀多核糖核苷酸提供構象柔性。在一些實施方式中，翻譯起始序列基本上在環狀多核糖核苷酸的單股區內。在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0163]-[0165]中描述了翻譯起始序列的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0162】 環狀多核糖核苷酸可包括多於1個起始密碼子，例如但不限於至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17、至少18個、至少19個、至少20個、至少25個、至少30個、至少35個、至少40個、至少50個、至少60個或多於60個起始密碼子。翻譯可以在第一個起始密碼子上起始或可以在第一個起始密碼子的下游起始。

【0163】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以起始於不是第一起始密碼子（例如AUG）的密碼子。環狀多核糖核苷酸的翻譯可以在替代性的翻譯起始序列處起始，如國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0164]中描述的那些，其藉由援引以其全文併入本文。

【0164】 在一些實施方式中，翻譯係藉由用Rocaglates處理真核起始因子4A（eIF4A）來起始的（藉由阻斷43S掃描來阻遏翻譯，導致過早的上游翻譯起始以及攜帶RocA-eIF4A靶序列的轉錄本的蛋白質表現降低，參見例如，www.nature.com/articles/nature17978）。

非翻譯區

【0165】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括非翻譯區（UTR）。包括基因的基因組區域的UTR可以轉錄但不翻譯。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的翻譯起始序列的上游。在一些實施方式中，UTR可以被包括在本文所述之表現序列的下游。在一些情況下，第一表現序列的一個UTR與第二表現序列的另一個UTR相同或連續或重疊。

【0166】在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0197]-[201]中描述了示例性非翻譯區，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0167】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括聚A序列。在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0202]-[0205]中描述了示例性聚A序列，將其特此藉由援引以其全文併入。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少聚A序列。

【0168】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括內嵌有一段或多段的腺苷和尿苷的UTR。該等AU富集簽名可能會增加表現產物的轉化率。

【0169】富含UTR AU的元件（ARE）的引入、去除或修飾可用於調節環狀多核糖核苷酸的穩定性或免疫原性（例如，免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）。工程化特定的環狀多核糖核苷酸時，可以將ARE的一或多個拷貝引入環狀多核糖核苷酸中，並且ARE的該等拷貝可以調節表現產物的翻譯和/或產生。同樣，可以對ARE進行鑒別和去除或工程化至環狀多核糖核苷酸以調節細胞內穩定性，從而影響所得蛋白質的翻譯和產生。

【0170】應當理解，可以將來自任何基因的任何UTR摻入環狀多核糖核苷酸的相應側翼區中。

【0171】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核

糖核苷酸缺少聚A序列，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少帽，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR、3'-UTR和IRES，並且能夠從其一或多個表現序列表現蛋白。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸進一步包括以下序列中的一或多個：編碼一或多種miRNA的序列、編碼一或多種複製蛋白的序列、編碼外源基因的序列、編碼治療劑的序列、調控元件（例如，翻譯調節子，例如，翻譯強化子或抑制子）、翻譯起始序列、靶向內源基因的一或多種調控核酸（例如，siRNA、lncRNA、shRNA）和編碼治療性mRNA或蛋白的序列。

【0172】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少3'-UTR。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少聚A序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少內部核糖體進入位點。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少核酸外切酶的降解易感性。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少降解易感性的事實可以意味著環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解，或僅在核酸外切酶存在下有限程度地降解，例如，與核酸外切酶不存在時相當或相似。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸不被核酸外切酶降解。在一些實施方式中，當暴露於核酸外切酶時，環狀多核糖核苷酸降解減少。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少與帽結合蛋白的結合。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸缺少5'帽。

終止元件

【0173】在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括至少一個終止

元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括與表現序列可操作地連接的終止元件。在一些實施方式中，多核苷酸缺少終止元件。

【0174】在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可具有或可不具有終止元件。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得多核糖核苷酸被連續翻譯。終止元件的排除可導致表現產物的滾環翻譯或連續表現。

【0175】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且每個表現序列可具有或可不具有終止元件。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個表現序列，並且表現序列缺少終止元件，使得環狀多核糖核苷酸被連續翻譯。由於缺少核糖體停滯或脫落，終止元件的排除可導致表現產物（例如肽或多肽）的滾環翻譯或連續表現。在這樣的實施方式中，滾環翻譯通過每個表現序列來表現連續表現產物。在一些其他實施方式中，表現序列的終止元件可為交錯元件的一部分。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個表現序列包括終止元件。然而，在環狀多核糖核苷酸中進行滾環翻譯或後繼（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列的表現。在此類情況下，當核糖體遇到終止元件（例如，終止密碼子）並終止翻譯時，表現產物可以從核糖體上脫落。在一些實施方式中，在核糖體例如核糖體的至少一個亞基與環狀多核糖核苷酸保持接觸時翻譯終止。

【0176】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸在一或多個表現序列的末端包括終止元件。在一些實施方式中，一或多個表現序列包括兩或更多個連續的終止元件。在這樣的實施方式中，翻譯終止並且滾環翻譯終止。在一些實施方式中，核糖體與環狀多核糖核苷酸完全脫離。在一些這樣的實施方式中，在環狀多核糖核苷酸中產生隨後的（例如，第二、第三、第四、第五等）表現序列可需要核糖體在翻譯起始之前與環狀多核糖核苷酸重新接合。通常，終止元件包括發出

翻譯終止訊息的框內核苷酸三聯體（例如，UAA、UGA、UAG）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸中的一或多個終止元件

【0177】係框移位的終止元件，如但不限於可終止翻譯的脫框（off-frame）或-1和+1移位的閱讀框（例如，隱藏的終止）。框移位的終止元件包括出現在表現序列的第二閱讀框和第三閱讀框中的核苷酸三聯體，TAA、TAG和TGA。框移位的終止元件可能對防止通常對細胞有害的mRNA誤讀很重要。在一些實施方式中，終止元件係終止密碼子。

【0178】在一些實施方式中，表現序列包括聚A序列（例如，在表現序列的3’末端，例如終止元件的3’）。在一些實施方式中，聚A序列的長度大於10個核苷酸。在一個實施方式中，聚A序列的長度大於15個核苷酸（例如，至少或大於約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、和3,000個核苷酸）。在一些實施方式中，根據國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0202]-[0204]中對聚A序列的描述來設計聚A序列，將其藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，表現序列缺少聚A序列（例如，在表現序列的3’末端）。

【0179】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括聚A、缺少聚A或具有經修飾的聚A以調節環狀多核糖核苷酸的一或多種特徵。在一些實施方式中，缺少聚A或具有經修飾的聚A的環狀多核糖核苷酸改善了一或多種功能特徵，例如免疫原性（例如，免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）、半衰期和/或表現效率。

【0180】國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0169]-[0170]中描述了終止元件的其他實例，將其特此藉由援引以其全文併入。

間隔子序列

【0181】在一些實施方式中，本文所述之環狀多核糖核苷酸包括間隔子序列。在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸包括一或多個間隔子序列。間隔子係指在兩個相鄰的多核苷酸區域之間提供距離或靈活性的任何連續的核苷酸序列（例如，一或多個核苷酸）。間隔子可以存在於本文所述之任一核酸元件之間。間隔子還可以存在於本文所述核酸元件內。

【0182】間隔子的長度可為例如至少5個（例如，至少10個、至少15個、至少20個）核糖核苷酸。在一些實施方式中，每個間隔子區的長度係至少5個（例如，至少10、至少15、至少20個）核糖核苷酸。每個間隔子區的長度可為例如5至500個（例如，10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500個）核糖核苷酸。第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區可包括聚A序列。第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區可包括聚A-C序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括聚A-G序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括聚A-T序列。在一些實施方式中，第一間隔子區、第二間隔子區、或第一間隔子區和第二間隔子區包括隨機序列。

【0183】在一些實施方式中，間隔子序列的長度可為，例如，至少10個核苷酸、至少15個核苷酸、或至少30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係不多於100、90、80、70、60、50、45、40、35或30個核苷酸。在一些實施方式中，間隔子序列的長度係20至50個核苷酸。在某些實施方式中，間隔子序列的長度係10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、

33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50個核苷酸。

【0184】間隔子序列可為聚A序列、聚A-C序列、聚C序列、或聚U序列。

【0185】在一些實施方式中，間隔子序列可為聚A-T、聚A-C、聚A-G或隨機序列。

【0186】在國際專利公開案號WO 2019/118919的段落[0293] - [0302]中描述了示例性間隔子序列，將其特此藉由援引以其全文併入。

修飾

【0187】相對於參考序列（尤其是親本多核糖核苷酸），環狀多核糖核苷酸可以包括本揭露範圍內包括的一或多個取代、插入和/或添加、缺失和共價修飾。

【0188】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括一或多個轉錄後修飾（例如，加帽、切割、聚腺苷酸化、剪接、聚A序列、甲基化、醯化、磷酸化、離胺酸和精胺酸殘基的甲基化、乙醯化、以及硫醇基團和酪胺酸殘基的亞硝基化等）。該一或多個轉錄後修飾可為任何轉錄後修飾，諸如已經在RNA中鑒定出的多於一百種不同的核苷修飾中的任一種（Rozenski, J, Crain, P和McCloskey, J. (1999).The RNA Modification Database: 1999 update. [RNA修飾資料庫：1999年更新]Nucl Acids Res [核酸研究] 27: 196-197）。在一些實施方式中，第一分離核酸包括信使RNA（mRNA）。在一些實施方式中，多核糖核苷酸包括至少一個選自下組的核苷：如國際專利公開案號WO 2019/118919 A1的[0311]中描述的那些，將其藉由援引以其全文併入本文。

【0189】環狀多核糖核苷酸可包括任何有用的修飾，例如針對糖、核鹼基或核苷間鍵（例如針對連接的磷酸酯/針對磷酸二酯鍵/針對磷酸二酯主鏈）。嘧啶核鹼基的一或多個原子可被視需要經取代的胺基、視需要經取代的硫醇、視需

要經取代的烷基（例如，甲基或乙基）或鹵代（例如，氯代或氟代）替代或取代。在某些實施方式中，在每個糖和核苷間鍵中存在修飾（例如，一或多個修飾）。修飾可為對去氧核糖核酸（DNA）、蘇糖核酸（TNA）、乙二醇核酸（GNA）、肽核酸（PNA）、鎖核酸（LNA）或其雜交體的核糖核酸（RNA）修飾。本文描述了其他修飾。

【0190】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括至少一種N(6)甲基腺苷（m6A）修飾以增加翻譯效率。在一些實施方式中，m6A修飾可降低環狀多核糖核苷酸的免疫原性（例如，降低免疫或炎性響應的一或多種標誌物的水平）。

【0191】在一些實施方式中，修飾可以包括化學或細胞誘導的修飾。例如，細胞內RNA修飾之一些非限制性實例如Lewis和Pan在「RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions [核糖核酸的修飾和結構共同引導核糖核酸和蛋白的相互作用]」, Nat Reviews Mol Cell Biol [自然評論：分子細胞生物學], 2017, 18:202-210中所述。

【0192】在一些實施方式中，對環狀多核糖核苷酸的核糖核苷酸的化學修飾可以增強免疫逃避。環狀多核糖核苷酸可以藉由本領域眾所周知的方法合成和/或修飾，如「Current protocols in nucleic acid chemistry [核酸化學現行方案]」, Beaucage, S.L等人 (編輯), John Wiley & Sons [約翰·威利父子出版公司], 紐約市, 紐約州, 美國（將其特此藉由援引併入）中描述的那些方法。修飾包括例如末端修飾，如5'末端修飾（磷酸化（單、二和三磷酸化）、軛合、反向連接等）、3'末端修飾（軛合、DNA核苷酸、反向連接等）、鹼基修飾（例如，用穩定的鹼基、不穩定的鹼基或與擴展的配偶體庫鹼基配對的鹼基替代）、鹼基去除（脫鹼基核苷酸）或鹼基軛合。經修飾的核糖核苷酸鹼基還可以包括5-甲基胞苷和假尿苷。在一些實施方式中，舉幾個功能作用，鹼基修飾可以調節環狀多核糖核苷酸的表現、免疫響應、穩定性、亞細胞定位。在一些實施方式中，修飾包括雙正交核苷

酸，例如非天然鹼基。參見例如，Kimoto等人, Chem Commun (Camb) [化學通訊（劍橋）], 2017, 53:12309, DOI: 10.1039/c7cc06661a，將該文獻藉由援引以其全文特此併入。

【0193】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的一或多個核糖核苷酸的糖修飾（例如在2'位置或4'位置）或糖替代以及主鏈修飾可以包括磷酸二酯鍵的修飾或替代。環狀多核糖核苷酸之具體實例包括但不限於包括經修飾的主鏈或非天然核苷間鍵（如核苷間修飾，包括磷酸二酯鍵的修飾或替代）的環狀多核糖核苷酸。具有經修飾的主鏈的環狀多核糖核苷酸尤其包括在主鏈中不具有磷原子的那些。出於本申請之目的，並且如本領域中有時提及的，在其核苷間主鏈中不具有磷原子的經修飾的RNA也可以被認為是寡核苷。在特定實施方式中，環狀多核糖核苷酸將包括在其核苷間主鏈中具有磷原子的核糖核苷酸。

【0194】經修飾的環狀多核糖核苷酸主鏈可以包括，例如，硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯（如3'-伸烷基膦酸酯和手性膦酸酯）、亞膦酸酯、胺基磷酸酯（如3'-胺基胺基磷酸酯和胺基烷基胺基磷酸酯）、硫羰基胺基磷酸酯（thionophosphoramidate）、硫羰烷基膦酸酯、硫羰烷基磷酸三酯、和具有正常3'-5'鍵的硼烷磷酸酯，該等的2'-5'連接的類似物，以及具有相反極性的那些，其中相鄰的核苷單元對3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'連接。也包括各種鹽、混合鹽和游離酸形式。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以帶負電荷或帶正電荷。

【0195】可摻入環狀多核糖核苷酸中的經修飾的核苷酸可在核苷間鍵（例如磷酸酯主鏈）上被修飾。在此，在多核苷酸主鏈的上下文中，短語「磷酸酯」和「磷酸二酯」可互換使用。可以藉由用不同的取代基替代一或多個氧原子來修飾主鏈磷酸酯基團。此外，經修飾的核苷和核苷酸可以包括用如本文所述之另一個核苷間鍵合進行的對未經修飾的磷酸酯部分的整體替代。經修飾的磷酸酯基

團之實例包括但不限於硫代磷酸酯、亞磷酸硒酸酯、硼酸磷酸酯（boranophosphates/boranophosphate esters）、氫膦酸酯、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的兩個非連接氧都被硫替代。也可以藉由用氮（橋連的胺基磷酸酯）、硫（橋連的硫代磷酸酯）和碳（橋連的亞甲基膦酸酯）替代連接氧來修飾磷酸酯連接子。

【0196】 提供a-硫代取代的磷酸酯部分以通過非天然硫代磷酸酯主鏈鍵賦予RNA和DNA聚合物穩定性。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增強的核酸酶抗性，並因此在細胞環境中具有更長的半衰期。與環狀多核糖核苷酸連接的硫代磷酸酯有望通過減弱細胞先天免疫分子的結合/激活來降低先天免疫響應。

【0197】 在特定實施方式中，經修飾的核苷包括α-硫代-核苷（例如，5'-0-(l-硫代磷酸)-腺苷、5'-0-(l-硫代磷酸)-胞苷(a-硫代胞苷)、5'-0-(l-硫代磷酸)-鳥苷、5'-0-(l-硫代磷酸)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸)-假尿苷）。

【0198】 本文描述了可根據本揭露使用的其他核苷間鍵，包括不包含磷原子的核苷間鍵。

【0199】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以包括一或多種細胞毒性核苷。例如，細胞毒性核苷可以被摻入環狀多核糖核苷酸中，如雙功能修飾。細胞毒性核苷可以包括但不限於阿糖腺苷、5-氮雜胞苷、4'-硫代阿糖胞苷、環戊烯基胞嘧啶、克拉屈濱、氯法拉濱、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖胞苷、l-(2-C-氰基-2-去氧-β-D-阿拉伯-戊呋喃糖基)-胞嘧啶、地西他濱、5-氟尿嘧啶、氟達拉濱、氟尿苷、吉西他濱、替加氟和尿嘧啶的組合、替加氟（(RS)-5-氟-l-(四氫呋喃-2-基)嘧啶-2,4(lH,3H)-二酮）、曲沙他濱、替紮西他濱、2'-去氧-2'-亞甲基胞苷（DMDC）和6-巰基嘌呤。其他實例包括氟達拉濱磷酸酯、N4-山嵛醯基-l-β-D-阿拉伯戊呋喃糖基胞嘧啶、N4-十八烷基-1-β-D-阿拉伯戊呋喃糖基胞嘧啶、N4-棕櫚醯基-l-(2-C-氰基-2-去氧-β-D-阿拉伯-戊呋喃糖基)胞嘧啶和P-4055（阿糖胞苷5'-花生酸

酯）。

【0200】 環狀多核糖核苷酸可以沿著分子的整個長度均一地修飾或可以不如此。例如，一或多種或所有類型的核苷酸（例如，天然存在的核苷酸、嘌呤或嘧啶，或A、G、U、C、I、pU中的任一或多種或全部）在環狀多核糖核苷酸中，或在其給定的預定序列區中可以被或可以不被均一地修飾。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括假尿苷。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括肌苷，相對於病毒RNA，肌苷可以說明免疫系統將環狀多核糖核苷酸表徵為內源性。肌苷的摻入還可以介導改善RNA穩定性/減少降解。參見例如Yu, Z等人, (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as「self」. [藉由ADAR1進行的RNA編輯將dsRNA標記為「自身」]Cell Res [細胞研究]. 25, 1283-1284，其藉由援引以其全文併入本文。

【0201】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸（或其給定序列區域）中的所有核苷酸均被修飾。在一些實施方式中，修飾可以包括可增強表現的m6A；可減弱免疫響應的肌苷；可增加RNA穩定性或翻譯通讀（交錯元件）的假尿苷；可增加穩定性的m5C；以及有助於亞細胞易位（例如，核定位）的2,2,7-三甲基鳥苷。

【0202】 在環狀多核糖核苷酸的各個位置上可以存在不同的糖修飾、核苷酸修飾和/或核苷間鍵合（例如，主鏈結構）。熟悉該項技術者將理解，核苷酸類似物或其他一或多個修飾可以位於環狀多核糖核苷酸的任何一或多個位置，使得環狀多核糖核苷酸的功能基本上不降低。修飾也可為非編碼區域修飾。環狀多核糖核苷酸可包括約1%至約100%的經修飾的核苷酸（相對於總核苷酸含量，或相對於一或多種類型的核苷酸，即A、G、U或C中的任何一或多種）或任何中間百分比（例如，1%至20%>、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%

至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%和95%至100%）。

多聚化

【0203】在某些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可編碼多聚化結構域。例如，環狀多核糖核苷酸可編碼作為免疫原（例如，VZV免疫原）的第一多肽和作為多聚化結構域的第二多肽。例如，多聚化結構域可以在與免疫原（例如，VZV免疫原）相同的開讀框上編碼，並作為具有免疫原的融合蛋白表現。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可編碼兩或更多種免疫原，並且每種免疫原可視需要與多聚化結構域融合。多聚化結構域可促進免疫原複合物（例如，包括多種免疫原的複合物）的形成。

【0204】編碼的免疫原的多聚化可有利於誘導免疫響應。免疫原與一或多種多聚化元件（例如，二聚化元件、三聚化元件、四聚化元件和寡聚化元件）的融合可導致多聚免疫原複合物（例如，在免疫的受試者中表現後形成多聚免疫原複合物）的形成。在一些實施方式中，多聚免疫原複合物的形成增加了免疫原的免疫原性。例如，多聚免疫原複合物的形成可藉由模擬外源病原體（例如，病毒）的感染來增加免疫原的免疫原性，其中多種潛在免疫原通常位於病原體的包膜處（例如，流感病毒的血球凝集素（HA）免疫原）。在一些實施方式中，多聚化複合物包括至少2、3、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90或100種免疫原。在一些實施方式中，免疫原複合物包括2至10、2至50、2至100、5至10、5至15、5至20、5至50、5至100、10至20、10至30、10至40、10至50、10至60、10至100、20至50、或20至100種免疫原。在一些實施方

式中，免疫原複合物包括6個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-foldon-免疫原融合蛋白）。在一些實施方式中，免疫原複合物包括24個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-鐵蛋白融合蛋白）。在一些實施方式中，免疫原複合物包括60個拷貝的免疫原（例如，環狀多核糖核苷酸編碼免疫原-AaLS融合蛋白或編碼免疫原-β環肽）。

【0205】 當在本揭露之上下文中與目的多肽免疫原組合使用時，這樣的多聚化元件可以位於目的多肽的N端或C端。在核酸水平上，這樣的多聚化元件的編碼序列典型地位於目的多肽或蛋白質的編碼序列的相同閱讀框中，5’或3’。

【0206】 多聚化結構域可具有10至500個胺基酸殘基（例如，10至450、10至400、10至350、10至300、10至250、10至200、10至150、10至100、10至50、50至500、100至500、150至500、200至500、250至500、300至500、350至500、400至500和450至500個殘基）。在一些實施方式中，多聚化結構域可包括20至2500個胺基酸殘基（例如，20至250、20至225、20至200、20至175、20至150、20至150、20至125、20至100、20至75、20至50、50至250、75至250、100至250、125至250、150至250、175至250、200至250和225至250個殘基）。

【0207】 在一些實施方式中，與多聚化結構域融合的免疫原比免疫原的免疫原性至少2倍、5倍或10倍（例如，在人類受試者中）。在一些實施方式中，與多聚化結構域融合的免疫原比未與多聚化結構域融合的免疫原的免疫原性至少高20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%（例如，在人類受試者中）。

【0208】 特定的多聚化元件係寡聚化元件、四聚化元件、三聚化元件或二聚化元件。二聚化元件可選自例如，熱休克蛋白的二聚化元件/結構域、免疫球蛋白Fc結構域和白胺酸拉鍊（轉錄因子的鹼性區域白胺酸拉鍊類二聚化結構域）。三聚化和四聚化元件可選自例如工程化的白胺酸拉鍊（採用平行三聚體狀

態的工程化a-螺旋捲曲螺旋肽）、來自腸桿菌屬噬菌體T4的纖維蛋白foldon結構域、GCN4pll、CCN4-pLI和p53。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括T4 foldon結構域。在特定實施方式中，T4 foldon結構域具有與GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL（SEQ ID NO: 48）具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，T4 foldon具有SEQ ID NO: 48的胺基酸序列。在一些實施方式中，多聚化結構域係β環肽（參見Matsuura等人 (2010), Angew.Chem. Int. Ed. [德國應用化學], 49: 9662-9665）。在一些實施方式中，β環肽具有INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS（SEQ ID NO: 49）的胺基酸序列（其中C端絲胺酸殘基視需要存在或不存在），或具有與SEQ ID NO: 49具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括AaLS肽。在特定實施方式中，AaLS肽具有與TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW（SEQ ID NO: 50）具有至少95%同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，AaLS肽具有SEQ ID NO: 50的胺基酸序列。

【0209】寡聚化元件可選自例如，鐵蛋白、界面活性劑D、副黏液病毒磷蛋白的寡聚化結構域、補體抑制劑C4結合蛋白（C4bp）寡聚化結構域、病毒感染性因子（Vif）寡聚化結構域、不育α模體（sterile alpha motif，SAM）結構域和馮威里氏因子D型結構域。

【0210】鐵蛋白形成寡聚體，並且係所有動物、細菌和植物中存在的高度保守的蛋白質。鐵蛋白係自發形成24個相同亞基的奈米顆粒的蛋白質。鐵蛋白-免疫原融合構建體潛在地形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括鐵蛋白結構域。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括具有以下胺基酸序列的鐵蛋白結構域：

DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLT

SISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKI

ELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS（SEQ ID NO: 51）。

【0211】界面活性劑D蛋白（SPD）係自發自組裝以形成寡聚體的親水性糖蛋白。SPD-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0212】副黏液病毒（負義RNA病毒）的磷蛋白作為病毒聚合酶的轉錄反式激活因子起作用。磷蛋白的寡聚化對病毒基因組複製至關重要。磷蛋白-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0213】補體抑制劑C4結合蛋白（C4bp）也可用作融合配偶體來產生寡聚免疫原聚集物。C4bp的C端結構域（人中的57個胺基酸殘基和小鼠中的54個胺基酸殘基）對於C4bp或與其融合的其他多肽的寡聚化係必要且充分的。C4bp-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。病毒感染性因子（Vif）多聚化結構域已顯示在體外和體內均形成寡聚體。Vif的寡聚化涉及映射在C端結構域中殘基1 51至1 64之間的序列，即1 61 PPLP1 64模體(SEQ ID NO: 150)（對於人HIV-1：TPKKIKPPLP（SEQ ID NO: 52））。Vif-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0214】不育α模體（SAM）結構域係存在於參與許多生物過程的多種蛋白質中的蛋白質相互作用模組。在多種真核生物中發現了分佈在約70個殘基上的SAM結構域。SAM結構域已顯示同源和異源寡聚化，形成多個自締合寡聚化結構。SAM-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。馮威里氏因子（vWF）含有幾個D型結構域：D1和D2存在於N端前肽中，而剩餘的D結構域係寡聚化所必需的。vWF結構域存在於多種血漿蛋白中：補體因子B、C2、C 3和CR4；整合素（l-結構域）；VI、VII、XII和XIV型膠原蛋白；和其他細胞外蛋白質。vWF-免疫原融合構建體可形成可增強免疫響應的免疫原的寡聚聚集物或「簇」。

【0215】在一些實施方式中，多聚化結構域係二氧四氫蝶啶合酶結構域。

二氧四氫蝶啶合酶可組裝成包括二氧四氫蝶啶合酶結構域的60個拷貝的複合物，其中每個二氧四氫蝶啶合酶結構域可與一或多個免疫原融合。在一些實施方式中，二氧四氫蝶啶合酶結構域包括SEQ ID NO: 53-63和142中任一項的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 53-63和142中任一項具有至少95%序列同一性的胺基酸序列。

SEQ ID NO: 53

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLF

KSLR

SEQ ID NO: 54

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGCIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKCWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 55

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 56

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 142

MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLF

KSLR

【0216】二氧四氫蝶啶合酶結構域具有一或多個半胱胺酸取代以引入使由自組裝的亞基形成的二氧四氫蝶啶合酶複合物穩定的一或多個非天然二硫鍵。在一些實施方式中，通過以下來引入一或多個非天然二硫鍵：L121C-K131C、L121CG-K131C、L121GC-K131C、K7C-R40C、I3C-L50C、I82C-K131CG、E5C-R52C或E95C-A101C取代或其組合（如I3C-L50C和I82C-K131CG；E5C-R52C和I82C-K131CG；或E95C-A101C和I82C-K131CG）。殘基編號參照如SEQ ID NO: 53所示的二氧四氫蝶啶合酶亞基。非限制性實例包括：

SEQ ID NO: 57（L121C-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 58（L121CG-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCCFEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 59（L121GC-K131C）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCFCEQAIERAGTCHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 60（K7C-R40C）

QIYEGCLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVCHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKENISAVI

AIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEMANLFK

SLR

SEQ ID NO: 61（I3C-L50C，I82C-K131CG）

QCYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITCVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDA

VIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMAN

LFKSLR

SEQ ID NO: 62（E5C-R52C，I82C-K131CG）

QIYCGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVCVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

SEQ ID NO: 63（E95C-A101C，I82C-K131CG）

QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDIDAVI

AIGVLCRGATPHFDYIASCVSKGLCDLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALSAIEMANL

FKSLR

【0217】國際公開案號WO 2020/061564，第25頁第1行至第26頁第20行描述了多肽多聚化的各種方法，將其藉由援引併入本文。

【0218】在一些實施方式中，多聚化結構域係核黃素合酶結構域。例如，核黃素合酶結構域可以具有與TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW（SEQ ID NO: 143）具有至少95%序列同一性的胺基酸序列。在一些實施方式中，核黃素合酶結構域可具有SEQ ID NO: 143的胺基酸序列。

【0219】在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可包括一或多個多聚化結構域。例如，環狀多核糖核苷酸可包括2、3、4、5、6、7、8、9或10個多聚化結構域。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包括兩個多聚化結構域。兩或更多個多聚化結構域可以彼此相鄰。可替代地，兩或更多個多聚化結構域可以被一或多個其他元件隔開。例如，兩個多聚化結構域可以被免疫原隔開。在特定實施方式中，環狀多核糖核苷酸可包括鐵蛋白結構域和T4 foldon結構域。鐵蛋白和T4

foldon結構域可以連接，例如藉由Gly-Ser連接子。在一些實施方式中，與T4 foldon結構域連接的纖蛋白結構域具有以下的胺基酸序列：

PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLSGRSGGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTH SLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLTSISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNI VDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS（SEQ ID NO: 64）。

【0220】合適的多聚化結構域可以選自例如根據國際專利申請WO 2017/081082的SEQ ID NO: 1116-1167的胺基酸序列的列表，或者該等序列的片段或變體。

生產方法

【0221】本揭露提供了用於產生環狀多核糖核苷酸之方法，該等方法包括例如，重組技術或化學合成。例如，用於產生RNA環的DNA分子可以包括天然存在的核酸序列的DNA序列、其修飾形式、或編碼通常在自然界中不存在的合成多肽的DNA序列（例如，嵌合分子或融合蛋白）。DNA和RNA分子可以使用多種技術修飾，該等技術包括但不限於經典誘變技術和重組技術，如定點誘變、化學處理核酸分子以誘導突變、限制性酶切割核酸片段、連接核酸片段、聚合酶鏈反應（PCR）擴增或誘變核酸序列的選定區域、合成寡核苷酸混合物以及連接混合物基團以「建造」核酸分子混合物及其組合。

【0222】環狀多核糖核苷酸可以根據任何可用的技術來製備，該技術包括但不限於化學合成和酶促合成。在一些實施方式中，線性初級構建體或線性RNA可以被環化或連接以產生本文所述之circRNA。環化或連接的機制可通過以下方法來發生：如，化學、酶促、夾板連接或核酶催化的方法。新形成的5'-3'鍵聯可為分子內鍵或分子間鍵。例如，夾板連接酶（如SplintR®連接酶）可用於夾板連接。根據此方法，單股多核苷酸（夾板）（如單股DNA或RNA）可被設計成與線

性多核糖核苷酸的兩端雜交，使得在與單股夾板雜交時可以將兩端並列。因此，夾板連接酶可以催化線性多核糖核苷酸並列的兩端連接，產生circRNA。在一些實施方式中，DNA或RNA連接酶可用於環狀多核苷酸的合成。作為一個非限制性實例，連接酶可為circ連接酶或環狀連接酶。

【0223】 在另一個實例中，線性多核糖核苷酸的5’或3’末端可以編碼連接酶核酶序列，使得在體外轉錄期間，所得線性circRNA包括能夠將線性多核糖核苷酸的5’末端與線性多核糖核苷酸的3’末端連接的活性核酶序列。連接酶核酶可以源自第I組內含子、D型肝炎病毒、髮夾核酶，或者可以藉由SELEX（藉由指數富集進行的配體系統進化）進行選擇。

【0224】 在另一個實例中，可藉由使用至少一個非核酸部分將線性多核糖核苷酸環化或連接。例如，至少一個非核酸部分可與線性多核糖核苷酸5’端附近或3’端附近的區域或特徵反應，以環化或連接線性多核糖核苷酸。在另一個實例中，至少一個非核酸部分可以位於或連接至或靠近線性多核糖核苷酸的5’端或3’端。非核酸部分可為同源的或異源的。作為非限制性實例，非核酸部分可為鍵，如疏水鍵、離子鍵、可生物降解的鍵或可切割的鍵。作為另一個非限制性實例，非核酸部分係連接部分。作為又一個非限制性實例，非核酸部分可為寡核苷酸或肽部分，諸如，如本文所述之適配體或非核酸連接子。

【0225】 在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可以藉由自剪接環化或連接。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸可包括自連接的環E序列。在另一個實施方式中，線性多核糖核苷酸可包括自環化內含子（例如，5’和3’剪接連接）或自環化催化內含子，如I型、II型或III型內含子。I型內含子自剪接序列之非限制性實例可包括源自T4噬菌體基因td的自剪接排列內含子-外顯子序列，和鳥類眼原蟲、魚腥藍細菌（cyanobacterium Anabaena）前tRNA-Leu基因或鳥類眼原蟲前rRNA的間插序列（IVS）rRNA。

【0226】在一些實施方式中，多核糖核苷酸可包括催化內含子片段，如I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半。第一和第二退火區可以位於催化內含子片段內。I型催化內含子係自剪接核酶，該等自剪接核酶通過雙金屬離子磷醯基轉移機制催化其自身從mRNA、tRNA和rRNA先質上切除。重要的是，RNA本身自催化內含子的去除而不需要外源酶，如連接酶。

【0227】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因或鳥類眼原蟲前rRNA。

【0228】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因，並且3’外顯子片段包括第一退火區，並且5’外顯子片段包括第二退火區。第一退火區可包括例如5至50個，例如10至15個（例如，10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如，5至50個，例如10至15個（例如，10、11、12、13、14或15個）核糖核苷酸。

【0229】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自鳥類眼原蟲前rRNA，並且I型催化內含子片段的3’一半包括第一退火區，並且5’外顯子片段包括第二退火區。在一些實施方式中，3’外顯子包括第一退火區，並且I型催化內含子片段的5’一半包括第二退火區。第一退火區可包括例如，6至50個，例如10至16個（例如，10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如6至50個，例如10至16個（例如，10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸。

【0230】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含子片段的5’一半來自魚腥藍細菌前tRNA-Leu基因、鳥類眼原蟲前rRNA基因或T4噬菌體td基因。

【0231】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半和I型催化內含

子片段的5’一半來自T4噬菌體td基因。3’外顯子片段可包括第一退火區，並且I型催化內含子片段的5’部分可包括第二退火區。第一退火區可包括例如2至16個，例如10至16個（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸，並且第二退火區可包括例如2至16個，例如10至16個（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個）核糖核苷酸。

【0232】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半係線性多核苷酸的5’端。

【0233】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半係線性多核糖核苷酸的3’端。

【0234】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATG-3’（SEQ ID NO: 151）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0235】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 152）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0236】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 151的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 152的序列。

【0237】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-CTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCACAGACTAAATGTCGGTCGGGGAAGA

TGTATTCTTCTCATAAGATATAGTCGGACCTCTCCTTAATGGGAGCTAGCG GATGAAGTGATGCAACACTGGAGCCGCTGGGAACTAATTTGTATGCGAA AGTATATTGATTAGTTTTGGAGTACTCG-3’（SEQ ID NO: 153）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0238】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AAATAGCAATATTTACCTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGG TAGCTAGTCTTTAAACCAATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGT CAAATTGCGGGAAAGGGGTCAACAGCCGTTCAGTACCAAGTCTCAGGGG AAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATG GTCCTAACCACGCAGCCAAGTCCTAAGTCAACAGAT-3’（SEQ ID NO: 154）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0239】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 126的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 154的序列。

【0240】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGT GACTCGAAACGATAGACAACTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGC TCTGCATGGTGACATGCAGCTGGATATAATTCCGGGGTAAGATTAACGAC CTTATCTGAACATAATG-3’（SEQ ID NO: 155）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0241】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-TAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACG GGGAACCTCTCTAGTAGACAATCCCGTGCTAAATTGTAGGACT-3’（SEQ ID NO: 129）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0242】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 155的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 129的序列。

【0243】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAGGGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGAAAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA-3’（SEQ ID NO: 130）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0244】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC-3’（SEQ ID NO: 131）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0245】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 130的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 131的序列。

【0246】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAAGGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCACCCCC-3’（SEQ ID NO: 132）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0247】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTT TAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATG GCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGAGATTTGATTTTGGA G-3’（SEQ ID NO: 133）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0248】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 132的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 133的序列。

【0249】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAA TTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGCAACAGTGAAAGCTGTG GAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGGTTCAAGTCCCC CCACCCCC-3’（SEQ ID NO: 134）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0250】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTT CAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATG GCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCAAGATTTTATTTT-3’（SEQ ID NO: 135）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0251】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 134的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 135的序列。

【0252】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAA

GGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAG CGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCC ACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’（SEQ ID NO: 136）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0253】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAA GGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAG CGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCC ACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’（SEQ ID NO: 137）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0254】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 136的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 137的序列。

【0255】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTC TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTA GCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’（SEQ ID NO: 138）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0256】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGT GGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAAT

CCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 139）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0257】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 138的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 139的序列。

【0258】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半與5’-AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’（SEQ ID NO: 140）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0259】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的5’一半與5’-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3’（SEQ ID NO: 141）的序列具有至少80%（例如，至少85%、90%、95%、97%、99%或100%）的序列同一性。

【0260】在一些實施方式中，I型催化內含子片段的3’一半具有SEQ ID NO: 140的序列，並且I型催化內含子片段的5’一半具有SEQ ID NO: 141的序列。

【0261】在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可以由非核酸部分環化或連接，該非核酸部分引起線性多核糖核苷酸的5’和3’末端、附近或與之相連的原子、分子表面之間的吸引力。可以藉由分子間作用力或分子內作用力來環化或連接一或多個線性多核糖核苷酸。分子間作用力之非限制性實例包括偶極-偶極力、

偶極誘導偶極力、誘導偶極誘導偶極力、凡得瓦力和倫敦分散力。分子內作用力之非限制性實例包括共價鍵、金屬鍵、離子鍵、共振鍵、抓氫鍵（agnostic bond）、偶極鍵、軛合、超軛合和反向鍵。

【0262】在另一個實例中，線性多核糖核苷酸可包含靠近5’端和靠近3’端的核酶RNA序列。當序列暴露於核酶的其餘部分時，核酶RNA序列可以共價地連接至肽。共價連接至5’端和3’端附近的核酶RNA序列的肽可以相互締合，從而導致線性多核糖核苷酸環化或連接。在另一個實例中，在使用本領域已知的各種方法（如但不限於蛋白質連接）進行連接之後，共價連接至5’端和3’端附近的核酶RNA的肽可導致線性初級構建體或線性mRNA環化或連接。用於在本發明之線性初級構建體或線性多核糖核苷酸中使用的核酶之非限制性實例，或者摻入或共價地連接肽之方法的非窮舉列表在美國專利申請案號US 20030082768中描述，將該專利申請的內容藉由援引以其全文併入本文。

【0263】在又另一實例中，環化的化學方法可用於產生環狀多核糖核苷酸。這樣的方法可以包括但不限於點擊化學（例如，基於炔烴和疊氮化物的方法，或可點擊的鹼基）、烯烴複分解、胺基磷酸酯連接、半縮醛胺-亞胺交聯、鹼基修飾、及其任何組合。

【0264】在另一個實例中，可以使用無細胞系統中（例如，藉由體外轉錄）轉錄的去氧核糖核苷酸模板產生線性RNA來產生環狀多核糖核苷酸。線性多核糖核苷酸產生剪接相容的多核糖核苷酸，該多核糖核苷酸可以自剪接以產生環狀多核糖核苷酸。

【0265】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法（例如，在無細胞系統中）：提供線性多核糖核苷酸；以及在適用於剪接線性多核糖核苷酸的3'和5'剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸；從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0266】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸；視需要純化剪接相容的線性多核糖核苷酸；以及在適用於剪接線性多核糖核苷酸的3’和5’剪接位點的條件下自剪接線性多核糖核苷酸，從而產生環狀多核糖核苷酸。

【0267】在一些實施方式中，本揭露提供了藉由以下來產生環狀多核糖核苷酸之方法：提供編碼線性多核糖核苷酸的去氧核糖核苷酸；在無細胞系統中轉錄去氧核糖核苷酸以產生線性多核糖核苷酸（其中該轉錄在適用於剪接線性多核糖核苷酸的3’和5’剪接位點的條件下在溶液中發生），從而產生環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5’斷裂內含子和3’斷裂內含子（例如，用於產生環狀多核糖核苷酸的自剪接構建體）。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸包含5'退火區和3'退火區。

【0268】用於體外轉錄和/或自剪接的合適條件可包括在一或多個方面模擬生理條件的任何條件（例如，溶液或緩衝液，如水性緩衝液或溶液）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1-100 mM之間的Mg2+離子或其鹽（例如，1-100 mM、1-50 mM、1-20 mM、5-50 mM、5-20 mM或5-15 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在1-1000 mM之間的K+離子或其鹽，如KCl（例如，1-1000 mM、1-500 mM、1-200 mM、50-500 mM、100-500 mM或100-300 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在1-1000 mM之間的Cl-離子或其鹽，如KCl（例如，1-1000 mM、1-500 mM、1-200 mM、50-500 mM、100-500 mM或100-300 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1-100 mM之間的Mn2+離子或其鹽，如MnCl2（例如，0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-20 mM、0.1-10 mM、0.1-5 mM、0.1-2 mM、0.5- 50 mM、0.5-20 mM、0.5-15 mM、0.5-5 mM、0.5-2 mM或0.1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括二硫蘇糖醇（DTT）（例如，1-1000

μM、1-500 μM、1-200 μM、50-500 μM、100-500 μM、100-300 μM、0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-20 mM、0.1-10 mM、0.1-5 mM、0.1-2 mM、0.5-50 mM、0.5-20 mM、0.5-15 mM、0.5-5 mM、0.5-2 mM或0.1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括在0.1 mM與100 mM之間的核糖核苷三磷酸（NTP）（例如，0.1-100 mM、0.1-50 mM、0.1-10 mM、1-100 mM、1-50 mM或1-10 mM）。在一些實施方式中，合適的條件包括4至10的pH（例如，5至9的pH、6至9的pH或6.5至8.5的pH）。在一些實施方式中，合適的條件包括4°C至50°C的溫度（例如，10°C至40°C、15°C至40°C、20°C至40°C、或30°C至40°C）。

【0269】 在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸從去氧核糖核酸（例如，本文所述之去氧核糖核酸，如DNA載體、線性化DNA載體、或cDNA）產生。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸藉由在無細胞系統中轉錄（例如，體外轉錄）從去氧核糖核酸進行轉錄。

【0270】 在另一個實例中，環狀多核糖核苷酸可以在細胞，例如原核細胞或真核細胞中產生。在一些實施方式中，向細胞提供外源多核糖核苷酸（例如，本文所述之線性多核糖核苷酸或編碼本文所述之線性多核糖核苷酸的轉錄的DNA分子）。線性多核糖核苷酸可以在細胞中從向細胞提供的外源DNA分子轉錄。線性多核糖核苷酸可以在細胞中從向該細胞瞬時提供的外源重組DNA分子轉錄。在一些實施方式中，外源DNA分子不整合到細胞的基因組中。在一些實施方式中，線性多核糖核苷酸在細胞中從整合到細胞基因組中的重組DNA分子轉錄。

【0271】 在一些實施方式中，細胞係原核細胞。在一些實施方式中，包括本文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為細菌細胞或古細菌細胞。例如，包括本文所述之多核糖核苷酸的原核細胞可為大腸桿菌、嗜鹽古細菌（例如，沃氏嗜鹽富饒菌（*Haloferax volcaniii*））、鞘胺醇單胞菌（*Sphingomonas*）、藍細菌（例

如，細長聚球藻（*Synechococcus elongatus*）、螺旋藻（*Spirulina*）（節旋藻（*Arthrospira*））屬物種和集胞藻屬物種（Synechocystis spp.））、鏈黴菌屬（*Streptomyces*）、放線菌（例如，野村菌屬（*Nonomuraea*）、北裡孢菌屬（*Kitasatospora*）或高溫雙岐菌屬（*Thermobifida*））、芽孢桿菌屬物種（*Bacillus spp*）（例如，枯草芽孢桿菌（*Bacillus subtilis*）、炭疽芽孢桿菌（*Bacillus anthracis*）、蠟樣芽孢桿菌（*Bacillus cereus*））、β變形桿菌（例如，伯克氏菌菌屬（*Burkholderia*））、α變形桿菌（例如，農桿菌屬（*Agrobacterium*））、假單胞菌屬（*Pseudomonas*）（例如，戀臭假單胞菌（*Pseudomonas putida*））和腸桿菌。原核細胞可以在培養基中生長。原核細胞可以包含在生物反應器中。

【0272】該細胞可為真核細胞。在一些實施方式中，真核細胞係單細胞真核細胞。在一些實施方式中，單細胞真核生物係單細胞真菌細胞，如酵母細胞（例如，釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和其他酵母屬物種（*Saccharomyces spp.*）、酒香酵母屬物種（*Brettanomyces spp*）、裂殖酵母屬物種（*Schizosaccharomyces spp*）、有孢圓酵母屬物種（*Torulaspora spp*）和畢赤酵母屬物種（*Pichia spp*））。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞動物細胞。單細胞動物細胞可為從多細胞動物分離並在培養中生長的細胞，或其子細胞。在一些實施方式中，單細胞動物細胞可以去分化。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞植物細胞。單細胞植物細胞可為從多細胞植物中分離並在培養中生長的細胞，或其子細胞。在一些實施方式中，單細胞植物細胞可以去分化。在一些實施方式中，單細胞植物細胞來自植物愈傷組織。在實施方式中，單細胞細胞係植物細胞原生質體。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係單細胞真核藻類細胞，如單細胞綠藻、矽藻、眼蟲、或甲藻。目的單細胞真核藻類之非限制性實例包括杜氏鹽藻（*Dunaliella salina*）、普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）、食用小球藻（*Chlorella zofingiensis*）、雨生紅球藻（*Haematococcus pluvialis*）、

富油新綠藻（*Neochloris oleoabundans*）和其他新綠球藻屬物種（*Neochloris spp*）、原管藻（*Protosiphon botryoides*）、布朗葡萄藻（*Botryococcus braunii*）、隱球菌屬物種（*Botryococcus braunii*）、萊茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）和其他衣藻屬物種（*Chlamydomonas spp*）。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係原生生物細胞。在一些實施方式中，單細胞真核細胞係原生動物細胞。

【0273】在一些實施方式中，真核細胞係多細胞真核生物的細胞。例如，多細胞真核生物可選自由以下組成之群組：脊椎動物、無脊椎動物、多細胞真菌、多細胞藻類和多細胞植物。在一些實施方式中，真核生物體係人。在一些實施方式中，真核生物體係非人脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物體係無脊椎動物。在一些實施方式中，真核生物體係多細胞真菌。在一些實施方式中，真核生物體係多細胞植物。在一些實施方式中，真核細胞係人的細胞或非人類哺乳動物的細胞，如非人類靈長類動物（例如，猴子、猿）、有蹄類動物（例如，牛科動物，包括牛、水牛、野牛、綿羊、山羊和麝牛；豬；駱駝科動物，包括駱駝、美洲駝、和羊駝；鹿，羚羊；以及馬科動物，包括馬和驢）、食肉動物（例如，狗、貓）、齧齒動物（例如，大鼠、小鼠、豚鼠、倉鼠、松鼠）或兔類動物（例如，兔、野兔）。在一些實施方式中，真核細胞係鳥的細胞，如以下鳥類分類群的成員：雞形目（例如，雞、火雞、雉雞、鵪鶉）、雁形目（例如，鴨、鵝）、古顎總目（例如，鴕鳥、鴯鶓）、鴿形目（例如，鴿子、野鴿）或鸚形目（例如，鸚鵡）。在一些實施方式中，真核細胞係節肢動物（例如，昆蟲、蛛形綱、甲殼動物）、線蟲、環節動物、蠕蟲或軟體動物的細胞。在實施方式中，真核細胞係多細胞植物的細胞，如被子植物（其可為雙子葉植物或單子葉植物）或裸子植物（例如，針葉樹、蘇鐵、買麻藤類植物、銀杏）、蕨類、馬尾植物、石鬆類、或苔蘚植物。在實施方式中，真核細胞係真核多細胞藻類的細胞。

【0274】該等真核細胞可以在培養基中生長。該等真核細胞可以包含在生

物反應器中。

【0275】生物反應器之實例包括但不限於攪拌罐（例如，充分混合的）生物反應器和管式（例如，活塞流）生物反應器、氣升式生物反應器、膜攪拌罐、旋轉過濾攪拌罐、振動混合器、流化床反應器、和膜生物反應器。操作生物反應器的模式可為間歇的或連續的過程。當試劑和產物流連續地進出系統時，生物反應器係連續的。間歇式生物反應器可以具有連續的再循環流，但沒有連續的試劑進料或產物收穫。本揭露之一些方法涉及大規模生產環狀多核糖核苷酸。對於大規模生產方法，該方法可以在1升（L）至50 L或更多（例如，5 L、10 L、15 L、20 L、25 L、30 L、35 L、40 L、45 L、50 L或更多）的體積中進行。在一些實施方式中，該方法可以在5 L至10 L、5 L至15 L、5 L至20 L、5 L至25 L、5 L至30 L、5 L至35 L、5 L至40 L、5 L至45 L、10 L至15 L、10 L至20 L、10 L至25 L、20 L至30 L、10 L至35 L，10 L至40 L、10 L至45 L、10 L至50 L、15 L至20 L、15 L至25 L、15 L至30 L、15 L至35 L、15 L至40 L、15 L至45 L或15 L至50 L的體積中進行。在一些實施方式中，生物反應器可產生至少1 g的環狀RNA。在一些實施方式中，生物反應器可以產生1-200 g環狀RNA（例如，1-10 g、1-20g、1-50 g、10-50 g、10-100 g、50-100 g、50-200 g環狀RNA）。在一些實施方式中，產生的量係測量值/升（例如，1-200 g/升）、/批或反應（例如，1-200 g/批或反應）、或/單位時間（例如，1-200 g/小時或/天）。在一些實施方式中，可以串聯使用多於一個生物反應器以增加產生能力（例如，可以串聯使用一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、或九個生物反應器）。

【0276】製備本文所述之環狀多核糖核苷酸之方法描述於以下中：例如，Khudyakov和Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications* [人工DNA：方法與應用], CRC出版社（2002）；Zhao, **Synthetic Biology: *Tools and Applications* [合成生物學：工具和應用]** (第一版), Academic Press [學術出版社] (2013)；和Egli和

Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids* [人工核酸的化學與生物學], (第一版), Wiley-VCH [威利-VCH出版社] (2012)。

【0277】 其他地方也描述了合成環狀多核糖核苷酸之各種方法（參見，例如，美國專利案號US 6210931、美國專利案號US 5773244、美國專利案號US 5766903、美國專利案號US 5712128、美國專利案號US 5426180、美國公開案號US 20100137407、國際公開案號W01992001813和國際公開案號W02010084371，以及Petkovic 等人, Nucleic Acids Res [核酸研究]. 43:2454-65 (2015)；將其各自內容藉由援引以其全文併入本文）。

【0278】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸係純化的，例如，去除了游離核糖核酸、線性或帶切口的RNA、DNA、蛋白質等。在一些實施方式中，可以藉由本領域通常使用的任何已知方法純化環狀多核糖核苷酸。純化方法之非限制性實例包括柱層析法、凝膠切除、粒徑排阻等。

免疫接種

【0279】 在一些實施方式中，本揭露之方法包括用包含本文揭露的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物為受試者免疫接種。在一些實施方式中，免疫原由環狀多核糖核苷酸表現。在一些實施方式中，免疫接種在受試者中誘導針對由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原的免疫響應。在一些實施方式中，免疫接種在受試者中誘導免疫響應（例如，誘導與由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原結合的抗體的產生）。在一些實施方式中，免疫接種係為了治療或預防受試者（例如，人類受試者）的疾病、障礙或病症。在一些實施方式中，免疫接種係為了在受試者中產生抗體（例如在非人哺乳動物中產生抗體用於純化）。在一些實施方式中，免疫原性組成物在單一組成物中包含環狀多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、第一佐劑或其組合。在一些實施方式中，受試者進一步用第二佐劑免疫接種。在一些實施方式中，受試者進一步用第二免疫原性組成物免疫接種。

【0280】受試者用包含任何數量的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。受試者用例如包含至少1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。受試者用例如包括至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種、至少10種、至少11種、至少12種、至少13種、至少14種、至少15種、至少20種不同的環狀多核糖核苷酸或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含至多1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含約1種環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。在一些實施方式中，受試者用包含約1-20、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-20、2-15、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-20、3-15、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-20、4-15、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、4-4、4-3、5-20、5-15、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、5-10、10-15或15-20種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種。不同的環狀多核糖核苷酸具有彼此不同的序列。例如，它們可以包括或編碼不同的免疫原、重疊的免疫原、相似的免疫原或相同的免疫原（例如，具有相同或不同的調控元件、起始序列、啟動子、終止元件或本揭露之其他元件）。在受試者用包含兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的一或多種免疫原性組成物免疫接種的情況下，這兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸可以處於相同或不同的免疫原性組成物中並且同時或在不同時間免疫接種。可以將包含兩或更多種不同的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於相同的解剖位置或不同的解剖位置。

【0281】在一些實施方式中，免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、第一佐劑或其組合。在特定實施方式中，免疫原性組成物包含本文所述之環狀多核糖核苷酸和載劑或不含任何載劑的稀釋劑。在一些實施方式中，

包含環狀多核糖核苷酸與不含任何載劑的稀釋劑的免疫原性組成物用於將環狀多核糖核苷酸裸遞送至受試者。在另一個特定實施方式中，免疫原性組成物包含本文所述之環狀多核糖核苷酸和第一佐劑。

【0282】 在某些實施方式中，進一步向受試者投與第二佐劑。佐劑增強先天免疫響應，繼而增強受試者中的適應性免疫響應。佐劑可為如下所討論的任何佐劑。在某些實施方式中，佐劑作為免疫原性組成物的一部分與環狀多核糖核苷酸一起配製。在某些實施方式中，佐劑不是包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物的一部分。在某些實施方式中，佐劑與包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物分開投與。在這方面，佐劑與包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物共同投與（例如同時投與）或在不同的時間投與於受試者。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與佐劑。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與佐劑。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與佐劑。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與佐劑。將佐劑投與到與包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物相同的解剖位置或不同的解剖位置。

【0283】在一些實施方式中，受試者用第二藥劑，例如不是環狀多核糖核苷酸的疫苗（如下所述）進一步免疫接種。該疫苗與包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物共同投與（例如同時投與）或在不同的時間投與於受試者。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與該疫苗。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時，或介於之間的任何分鐘數或小時數，投與該疫苗。例如，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之後1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與該疫苗。在一些實施方式中，在包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物之前1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77或84天，或介於之間的任何天數，投與該疫苗。

【0284】受試者可以用免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種任何合適的次數，以實現所需的響應。例如，初免-加強免疫接種策略可用於引發全身和/或黏膜免疫。可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者例如，至少1次、至少2次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次或至少15次或更多次。

【0285】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種，至多2次、至多3次、至

多4次、至多5次、至多6次、至多7次、至多8次、至多9次、至多10次、至多15次或至多20次或更少次。

【0286】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20次。

【0287】在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種一次。在一些實施方式中，可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者兩次。在一些實施方式中，可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種受試者三次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種四次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種五次。在一些實施方式中，受試者可以用本揭露之免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種七次。

【0288】可以選擇合適的時間間隔以間隔兩次或更多次免疫接種。該等時間間隔可以適用於用相同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種多次，例如，相同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合可以經由相同的免疫接種途徑或不同的免疫接種途徑以相同的量或不同的量投與。該等時間間隔可以適用於用不同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合進行多次免疫接種，例如，不同免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如蛋白質亞基疫苗）或其組合可以經由相同的免疫接種途徑或不同的免疫接種途徑以相同的量或不同的量投與。該等時間間隔可適用於用不同藥劑，例如，包含第一環狀多核糖核苷酸的第一免疫原性組成物和包

含第二環狀多核糖核苷酸的第二免疫原性組成物進行免疫接種。該等時間間隔可適用於用不同藥劑，例如，包括第一環狀多核糖核苷酸的第一免疫原性組成物和包括蛋白質免疫原（例如，蛋白質亞基）的第二免疫原性組成物進行免疫接種。在一些實例中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、40、48或72小時。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、17、18、20、21、24、28或30天。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7或8週。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過約1、2、3、4、5、6、7或8個月。

【0289】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1小時、至少2小時、至少3小時、至少4小時、至少5小時、至少6小時、至少7小時、至少8小時、至少9小時、至少10小時、至少15小時、至少20小時、至少24小時、至少36小時或至少72小時或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多1小時、至多2小時、至多3小時、至多4小時、至多5小時、至多6小時、至多7小時、至多8小時、至多9小時、至多10小時、至多15小時、至多20小時、至多24小時、至多36小時或至多72小時或更少時間。

【0290】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少15天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天、至少25天、至少26天、至少27天、至少28天、至少29天或至少30天或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2天、至多3天、至多4天、至多5天、至多6天、至多7天、至多8天、至多9天、至多10天、至多15天、至多20天、至多21天、至多22天、至多23天、至多24天、至多25天、至多26天、至多27天、至多28天、至多29天、至多30天、至多32天、至多34天或至多36天或更少時間。

【0291】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1週、至少2週、至少3週、至少4週、至少5週、至少6週、至少7週或至少8週或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2週、至多3週、至多4週、至多5週、至多6週、至多7週、至多8週或更少時間。

【0292】在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少7個月或至少8個月或更長時間。在一些實施方式中，兩次免疫接種之間經過至多2個月、至多3個月、至多4個月、至多5個月、至多6個月、至多7個月、至多8個月、至多9個月、至多10個月、至多11個月或至多12個月或更少時間。

【0293】在一些實施方式中，該方法包括向受試者預投與一種藥劑以改善對包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的免疫原性響應。在一些實施方式中，藥劑係如本文揭露的免疫原（例如，蛋白質免疫原）。例如，該方法包括在投與包含編碼蛋白質免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸前1至7天投與蛋白質免疫原。在一些實施方式中，在投與包括編碼蛋白質免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸前1、2、3、4、5、6或7天投與蛋白質免疫原。蛋白質免疫原可以作為蛋白質製劑投與，在質體（pDNA）中編碼，存在於病毒樣顆粒（VLP）中，以脂質奈米顆粒的形式配製等。

【0294】在一些實施方式中，該方法包括在向受試者投與了包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸之後，向受試者投與一種藥劑以改善對包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的免疫原性響應。在一些實施方式中，藥劑係如本文揭露的免疫原（例如，蛋白質免疫原）。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸包含編碼蛋白質免疫原的序列。例如，該方法包括在向受試者投與包括編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸的1年內（例如，在11個月、10個月、9個月、8個月、7個月、6個月、5個月、4個月、3個月、2個月和1個月內）投與蛋白質免

疫原。在一些實施方式中，該方法包括向受試者投與本文所述之任一種環狀多核糖核苷酸或本文所述之任一種免疫原性組成物和蛋白質亞基。

【0295】 在一些實施方式中，蛋白質免疫原具有與由環狀多核糖核苷酸編碼的免疫原相同的胺基酸序列。例如，多肽免疫原可對應於由環狀多核糖核苷酸的序列編碼的多肽免疫原（例如，與之具有90%、95%、96%、97%、98%或100%的胺基酸序列同一性）。在一些實施方式中，蛋白質免疫原具有與由環狀多核糖核苷酸編碼的免疫原的胺基酸序列不同的胺基酸序列。例如，多肽免疫原與由環狀多核糖核苷酸的序列編碼的多肽免疫原具有少於90%（例如，80%、70%、30%、20%或10%）的胺基酸序列同一性。

【0296】 受試者可以在任何合適數目的解剖部位用免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合免疫接種。可以將相同的免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於多個解剖部位，可以將包括相同或不同的環狀多核糖核苷酸的不同免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於不同的解剖部位，可以將包括相同或不同的環狀多核糖核苷酸的不同免疫原性組成物、佐劑、疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合投與於相同的解剖部位，或其任何組合。例如，可以將包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於兩個不同的解剖部位，和/或可以將包含環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物投與於一個解剖部位，並且可以將佐劑投與於不同的解剖部位。

【0297】 任兩或更多個解剖途徑的免疫接種可以經由相同的免疫接種途徑（例如，肌內）或藉由兩或更多種免疫接種途徑來進行。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合向受試者的至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少6個解剖部位免疫接種。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核

糖核苷酸的免疫原性組成物、佐劑或疫苗（例如，蛋白質亞基疫苗）或其組合向受試者的至多2個、至多3個、至多4個、至多5個、至多6個、至多7個、至多8個、至多9個或至多10個解剖部位或更少解剖部位免疫接種。在一些實施方式中，將本揭露之包括環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物或佐劑免疫接種至受試者的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個解剖部位。

【0298】 免疫接種可以經由任何合適的途徑。免疫接種途徑之非限制性實例包括靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外、胸骨內、腦內、眼內、病灶內、腦室內、腦池內或實質內，例如注射和輸注。在一些情況下，免疫接種可以經由吸入進行。可以藉由相同或不同的途徑進行兩次或更多次免疫接種。

【0299】 可以向本揭露之受試者投與任何適量的環狀多核糖核苷酸。例如，受試者可以用至少約1 ng、至少約10 ng、至少約100 ng、至少約1 μg、至少約10 μg、至少約100 μg、至少約1 mg、至少約10 mg、至少約100 mg或至少約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。在一些實施方式中，受試者可以用至多約1 ng、至多約10 ng、至多約100 ng、至多約1 μg、至多約10 μg、至多約100 μg、至多約1 mg、至多約10 mg、至多約100 mg或至多約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。在一些實施方式中，受試者可以用約1 ng、約10 ng、約100 ng、約1 μg、約10 μg、約100 μg、約1 mg、約10 mg、約100 mg或約1 g的環狀多核糖核苷酸免疫接種。

【0300】 在一些實施方式中，該方法進一步包括評價受試者對免疫原的抗體響應。在一些實施方式中，評價係在投與包含編碼免疫原的序列的環狀多核糖核苷酸之前和/或之後。

抗體的產生和純化

【0301】 用本文所述之多核糖核苷酸（例如，編碼VZV免疫原的多核糖核

苷酸）免疫接種受試者可在受試者中誘導產生與由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原結合的抗體（例如，產生抗VZV抗體）。在一些實施方式中，免疫接種係為了在受試者（例如，人或非人動物）中產生抗體，該等抗體係從受試者中定量或純化的（例如，用於診斷或治療用途）。因此，本發明之環狀多核糖核苷酸可用於產生多株或單株抗體（例如，多株或單株抗VZV抗體）之方法中。

【0302】 例如，本揭露提供了向非人動物（例如，非人哺乳動物，如山羊、豬、兔、大鼠、小鼠、美洲駝、駱駝、馬、驢或牛（奶牛））投與本文所述之環狀多核糖核苷酸（例如，編碼VZV免疫原的）。環狀多核糖核苷酸可以根據本文所述之任何組成物、配製物、途徑或投與、量或給藥方案投與（例如，視需要與佐劑一起，在同一組成物中或作為給藥方案的一部分投與）。在一些實施方式中，非人動物具有人源化免疫系統（例如，具有人源化免疫系統的牛）。

【0303】 可以從用環狀多核糖核苷酸免疫接種的受試者中收集包括由包括如本文揭露的環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物產生的多株抗體的血漿。可以定量（例如，用於人類受試者的診斷目的）或純化（例如，用於在治療方法中使用或用於單株抗體的開發）該等多株抗體。血漿可以藉由熟悉該項技術者已知的方法，例如經由血漿去除術來收集。可以從同一受試者收集血漿一次或多次，例如，在免疫接種後的給定時間內各自多次、免疫接種後多次、免疫接種之間多次、或其任意組合。

【0304】 與VZV免疫原（例如，本文所述之VZV免疫原）特異性結合的抗體或其片段（例如，多株抗體，如人或人源化多株抗體）可藉由本文所述之方法產生。可以藉由熟悉該項技術者已知的方法從血液（例如，從血漿或血清）中純化抗體或其片段。

【0305】 可以使用熟悉該項技術者熟知的技術從血漿中純化多株抗體。例如，將血漿pH調節至4.8（例如，滴加20%乙酸），以1.0的辛酸/總蛋白比率用辛

酸進行分級分離，然後離心澄清（例如，在室溫下10,000 g離心20 min）。將含有多株抗體（例如，IgG多株抗體）的上清液用1 M tris中和至pH 7.5，0.22 μM過濾，並用抗人免疫球蛋白特異性柱（例如，抗人IgG輕鏈特異性柱）進行親和力純化。多株抗體藉由特異性結合雜質（例如來自非人動物的非人抗體）的親和柱進一步純化。將多株抗體儲存在合適的緩衝液，例如由10 mM麩胺酸單鈉鹽、262 mM D-山梨糖醇和吐溫（Tween）（0.05 mg/ml）（pH 5.5）組成的無菌過濾緩衝液中。測定純化的多株抗體的量和濃度。進行HPLC粒徑排阻層析法以確定是否存在聚集物或多聚體。在一些實施方式中，人多株抗體從具有人源化免疫系統的非人動物中根據Beigel, JH等人（Lancet Infect.Dis. [柳葉刀感染病學], 18:410-418 (2018)，包括補充附錄）純化，其藉由援引以其全文併入本文。

【0306】 本揭露還提供了在人類受試者中產生抗體，例如用於治療性治療和/或診斷之方法。例如，本揭露提供了在投與本文所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物後，定量受試者中抗VZV抗體的水平之方法。可以藉由本領域已知的方法（例如，進行抗體滴度測定）進行定量，例如藉由從受試者獲得血液樣本，並使用標準技術（如酶聯免疫測定（ELISA））定量抗VZV抗體水平。抗體也可以藉由熟悉該項技術者已知的方法純化。

佐劑

【0307】 佐劑會增強在接受佐劑和/或包含該佐劑的免疫原性組成物的受試者中引發的免疫響應（體液和/或細胞免疫響應）。在一些實施方式中，如本文所揭露的，將佐劑投與於受試者。在一些實施方式中，佐劑用於本文所述之方法中以產生如本文所述之免疫響應。在特定實施方式中，佐劑用於促進受試者中針對由環狀多核糖核苷酸表現的免疫原的免疫響應。在一些實施方式中，佐劑和多核糖核苷酸在分開的組成物中共同投與。在一些實施方式中，將佐劑與多核糖核苷酸混合或配製為單一組成物，並投與於受試者。在一些實施方式中，佐劑和

環狀多核糖核苷酸在分開的組成物中共同投與。在一些實施方式中，將佐劑與環狀多核糖核苷酸混合或配製為單一組成物以獲得免疫原性組成物，將該免疫原性組成物投與於受試者。

【0308】 佐劑可為環狀多核糖核苷酸的組分（例如，多核糖核苷酸序列），可為由多核糖核苷酸的表現序列編碼的多肽佐劑，可為並非由多核糖核苷酸編碼的分子（例如小分子、多肽或核酸分子）。佐劑可以與多核糖核苷酸一起配製在同一藥物組成物中。佐劑可以與多核糖核苷酸組合分開投與（例如，作為單獨的藥物組成物）。

【0309】 在一些實施方式中，佐劑由環狀多核糖核苷酸編碼。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼多於一種佐劑。例如，環狀多核糖核苷酸編碼2至100種佐劑。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2至10種佐劑。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸編碼2種佐劑。由環狀多核糖核苷酸編碼的一或多種佐劑可包括N端訊息序列，例如，將表現的多肽佐劑引導至分泌途徑的N端訊息序列。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼3種佐劑。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼4種佐劑。在一些實施方式中，多核糖核苷酸編碼5種佐劑。在一些實施方式中，佐劑由編碼一或多種免疫原的同一多核糖核苷酸編碼。佐劑和免疫原可以在同一多核糖核苷酸上共同遞送。在一些實施方式中，由多核糖核苷酸編碼的佐劑係作為先天性免疫系統刺激因子的序列（例如，多核糖核苷酸序列）。先天性免疫系統刺激因子序列可以包括至少5個、至少10個、至少20個、至少50個、至少100個或至少500個核糖核苷酸。先天性免疫系統刺激因子序列可以包括5至1000個、10至500個、20至500個、10至100個、20至100個、20至50個、100至500個、500至1000個或10至1000個核糖核苷酸。例如，作為先天性免疫系統刺激因子的序列可以選自富含GU的模體、富含AU的模體、包括dsRNA的結構化區域、或適配體。

【0310】佐劑可為TH1佐劑和/或TH2佐劑。本揭露考慮的其他佐劑包括但不限於以下的一或多種：

含礦物質的組成物。適於在本揭露中用作佐劑的含礦物質的組成物包括礦物鹽，諸如鋁鹽和鈣鹽。本揭露包括礦物鹽，如氫氧化物（例如羥基氧化物）、磷酸鹽（例如羥基磷酸鹽、正磷酸鹽）、硫酸鹽等，或不同礦物化合物的混合物，其中化合物呈任何合適的形式（例如凝膠、結晶、無定形形式等）。鈣鹽包括磷酸鈣（例如，「CAP」）。鋁鹽包括氫氧化物、磷酸鹽、硫酸鹽等。

【0311】油乳劑組成物。適用於在本揭露中用作佐劑的油乳劑組成物包括角鯊烯-水乳劑，如MF59（5%角鯊烯、0.5%吐溫80和0.5% Span，使用微流化器配製為亞微米顆粒）、AS03（水包油乳劑中的α-生育酚、角鯊烯和聚山梨醇酯80）、Montanide配製物（例如Montanide ISA 51、Montanide ISA 720）、不完全弗氏佐劑（IFA）、完全弗氏佐劑（CFA）和不完全弗氏佐劑（IFA）。

【0312】小分子。適於在本揭露中用作佐劑的小分子包括咪喹莫特或847、瑞喹莫德或R848和嘎德莫特。

【0313】聚合物奈米顆粒。適於在本揭露中用作佐劑的聚合物奈米顆粒包括聚(a-羥基酸)、聚羥基丁酸、聚內酯（包括聚己內酯）、聚對二氧環己酮、聚戊內酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚氰基丙烯酸酯、酪胺酸衍生的聚碳酸酯、聚乙烯基吡咯啶酮或聚酯-醯胺及其組合。

【0314】皂苷（即，糖苷，附接至一條或多條糖側鏈的多環苷元）。適於在本揭露中用作佐劑的皂苷配製物包括純化配製物，諸如QS21，以及脂質配製物，諸如ISCOM和ISCOM基質。QS21作為STIMULON（TM）在市場上銷售。皂苷配製物也可以包含固醇，諸如膽固醇。皂苷和膽固醇的組合可用於形成稱為免疫刺激複合物（ISCOM）的獨特顆粒。ISCOM典型地還包含磷脂，諸如磷脂醯乙醇胺或磷脂醯膽鹼。任何已知的皂苷都可用於ISCOM中。較佳的是，ISCOM

包含QuilA、QHA和QHC中的一或多種。視需要，ISCOM可以不含另外的洗滌劑。

【0315】 脂多糖。適於在本揭露中使用的佐劑包括腸細菌脂多糖（LPS）的無毒衍生物。此類衍生物包括單磷醯基脂質A（MPLA）、哌喃葡萄糖基脂質A（GLA）和3-O-去醯化MPL（3dMPL）。3dMPL係3去氧-醯化單磷醯基脂質A與4、5或6條醯化鏈的混合物。其他無毒的LPS衍生物包括單磷醯基脂A模擬物，如胺基烷基葡糖胺磷酸鹽衍生物（例如，RC-529）。

【0316】 脂質體。適於在本揭露中用作佐劑的脂質體包括病毒體和CAF01。

【0317】 脂質奈米顆粒。適於在本揭露中使用的佐劑包括脂質奈米顆粒（LNP）及其組分。

【0318】 脂肽（即，包含一或多個脂肪酸殘基和兩或更多個胺基酸殘基的化合物）。適於在本揭露中用作佐劑的脂肽包括Pam2（Pam2CSK4）和Pam3（Pam3CSK4）。

【0319】 糖脂。適於在本揭露中用作佐劑的糖脂包括索狀因子（海藻糖二黴菌酸酯）。

【0320】 從革蘭氏陰性細菌或革蘭氏陽性細菌衍生（合成或純化）的肽和肽聚糖，諸如MDP（N-乙醯-胞壁醯-L-丙胺醯-D-異麩醯胺酸）適於在本揭露中用作佐劑。

【0321】 適用於用作佐劑的碳水化合物（含碳水化合物）或多糖包括右旋糖酐（例如，支鏈微生物多糖）、硫酸右旋糖酐、香菇多糖、酵母聚糖、β-葡聚糖、deltin、甘露聚糖和幾丁質。

【0322】 基於RNA的佐劑。適用於在本揭露中使用的基於RNA的佐劑係聚IC、聚IC:LC、具有或不具有5’三磷酸的髮夾RNA、病毒序列、含聚U的序列、dsRNA天然或合成RNA序列（例如，聚I:C）和核酸類似物（例如，環狀GMP-AMP

或其他環狀二核苷酸，例如，環狀二-GMP、免疫刺激性鹼基類似物，例如，C8-取代和N7,C8-二取代的鳥嘌呤核糖核苷酸）。在一些實施方式中，佐劑係本文所述之環狀多核糖核苷酸的線性多核糖核苷酸對應物。

【0323】 基於DNA的佐劑。適用於在本揭露中使用的基於DNA的佐劑包括CpG（例如，CpG1018）、dsDNA和天然或合成的免疫刺激DNA序列。

【0324】 蛋白質或肽。適於在本揭露中用作佐劑的蛋白質和肽包括鞭毛蛋白融合蛋白、MBL（甘露糖結合凝集素）、細胞介素和趨化因子。

【0325】 病毒顆粒。適於用作佐劑的病毒顆粒包括病毒體（磷脂細胞膜雙層）。

【0326】 在本揭露中使用的佐劑可為細菌來源的，如鞭毛蛋白、LPS或細菌毒素（例如腸毒素（蛋白質），例如熱不穩定毒素或霍亂毒素）。在本揭露中使用的佐劑可為雜交分子，諸如軛合至咪喹莫特的CpG。在本揭露中使用的佐劑可為真菌或與卵菌微生物相關分子模式（MAMP），諸如幾丁質或β-葡聚糖。在一些實施方式中，佐劑係無機奈米顆粒，如金奈米棒或基於二氧化矽的奈米顆粒（例如介孔二氧化矽奈米顆粒（MSN））。在一些實施方式中，佐劑係用糖脂免疫調節劑（海藻糖6,6-二山嵛酸酯（TDB），其可為位於分枝桿菌細胞壁上的索狀因子的合成變體）穩定的多組分佐劑或佐劑體系，如AS01、（AS01B）、AS03、AS04（MLP5 +明礬）、明礬（氫氧化鋁和氫氧化鎂的混合物）、氫氧化鋁、氫氧化鎂、CFA（完全弗氏佐劑：IFA+肽聚糖+海藻糖二黴菌酸酯）、CAF01（陽離子脂質體媒介物的兩組分體系（二甲基雙十八烷基銨（DDA））。

【0327】 細胞介素。佐劑可為編碼細胞介素的部分或全長DNA，該細胞介素如促炎性細胞介素（例如，GM-CSF、IL-1α、IL-1β、TGFβ、TNF-α、TNF-β）、Th-1誘導細胞介素（例如，IFN-γ、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18）或Th-2誘導細胞介素（例如，IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13）。

【0328】趨化因子。佐劑可為編碼趨化因子（如，MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、Rantes或TCA-3）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0329】佐劑可為編碼共刺激分子的部分或全長DNA，共刺激分子諸如CD80、CD86、CD40-L、CD70或CD27。

【0330】佐劑可為編碼先天性免疫系統刺激因子（部分、全長或突變的）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA），該先天性免疫系統刺激因子如TLR4、TLR3、TLR3、TLR9、TLR7、TLR8、TLR7、RIG-I/DDX58或MDA-5/IFIH1；或組成型活性(ca)先天性免疫刺激因子，諸如caTLR4、caTLR3、caTLR3、caTLR9、caTLR7、caTLR8、caTLR7、caRIG-I/DDX58或caMDA-5/IFIH1。

【0331】佐劑可為編碼銜接子或傳訊分子的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA），該銜接子或傳訊分子如STING（例如caSTING）、TRIF、TRAM、MyD88、IPS1、ASC、MAVS、MAPK、IKK-α、IKK複合物、TBK1、β-連環蛋白和半胱天冬酶1。

【0332】佐劑可為編碼轉錄激活因子，如可以上調免疫響應的轉錄激活因子（例如，AP1、NF-κB、IRF3、IRF7、IRF1或IRF5）的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。佐劑可為編碼細胞介素受體諸如IL-2β、IFN-γ或IL-6的部分或全長DNA。

【0333】佐劑可為編碼細菌組分，如鞭毛蛋白或MBL的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0334】佐劑可為編碼先天性免疫系統任何組分的部分或全長DNA或RNA（例如，環狀多核糖核苷酸或mRNA）。

【0335】在一些實施方式中，將編碼一或多種免疫原的環狀多核糖核苷酸與佐劑（例如，作為與環狀多核糖核苷酸分開的分子實體的佐劑，或在分開的環

狀多核糖核苷酸上編碼的佐劑）組合投與於受試者。如說明書全篇使用的術語「與.....組合」包括作為治療方案的一部分投與的任何兩種組成物。這可以包括例如配製成單一藥物組成物的多核糖核苷酸和佐劑。這還包括，例如，根據限定的治療或給藥方案，作為分開的組成物投與給受試者的多核糖核苷酸和佐劑。佐劑可以在多核糖核苷酸投與之前、基本上同時或之後投與給受試者。佐劑可以在多核糖核苷酸投與之前或之後的1天、2天、5天、10天、20天、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月或6個月內投與。佐劑可以藉由與多核糖核苷酸相同的投與途徑（例如，皮內、肌內、皮下、靜脈內、腹膜內、局部或口服）或不同的途徑來投與。

遞送

【0336】本文所述之環狀多核糖核苷酸可以包括在含載劑或不含載劑的藥物組成物中。

【0337】本文所述之藥物組成物可為配製的，例如包括載劑（如藥物載劑和/或聚合物載劑，例如脂質體），並藉由已知方法遞送至有需要的受試者（例如人或非人農業動物或家畜，例如牛、狗、貓、馬、家禽）。此類方法包括但不限於轉染（例如，脂質介導的陽離子聚合物、磷酸鈣、樹狀聚合物）；電穿孔或其他破壞膜的方法（例如，核轉染）、病毒遞送（例如，慢病毒、反轉錄病毒、腺病毒、AAV）、顯微注射、微粒轟擊（「基因槍」）、fugene、直接聲波載入、細胞擠壓、光轉染、原生質體融合、刺穿感染、磁轉染、胞泌體介導的轉移、脂質奈米顆粒介導的轉移、及其任何組合。遞送方法也描述於例如Gori等人, Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy [人類基因治療用CRISPR/Cas9基因組編輯技術的傳遞和特異性].Human Gene Therapy [人類基因治療].2015年7月, 26(7): 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074；和Zuris等人, Cationic lipid-mediated delivery of proteins

enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [陽離子脂質介導的蛋白質遞送能夠在體外和體內進行有效的基於蛋白質的基因組編輯].Nat Biotechnol [自然生物技術]. 2014年10月30日;33(1):73-80。

【0338】在一些實施方式中，可以以「裸」遞送配製物遞送環狀多核糖核苷酸。裸遞送配製物將環狀多核糖核苷酸遞送至細胞，無需借助於載劑並且無需對環狀多核糖核苷酸進行共價修飾，也無需對環狀多核糖核苷酸進行部分或完全封裝。

【0339】裸遞送配製物係不含載劑的配製物並且其中環狀多核糖核苷酸沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾，並且環狀多核糖核苷酸沒有部分或完全封裝。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸未與有助於遞送至細胞的部分（如蛋白質、小分子、顆粒、聚合物或生物聚合物）共價結合。在一些實施方式中，可以將環狀多核糖核苷酸與魚精蛋白或魚精蛋白鹽（例如硫酸魚精蛋白）一起在遞送配製物中遞送。

【0340】沒有與有助於遞送至細胞的部分結合的共價修飾的多核糖核苷酸可以不含經修飾的磷酸基團。例如，沒有與有助於遞送至細胞的部分結合的共價修飾的多核糖核苷酸可以不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸鹽、硼代磷酸酯、磷酸氫鹽、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯或磷酸三酯。

【0341】在一些實施方式中，裸遞送配製物可以不含以下任何或全部物質：轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。例如，裸遞送配製物可以不含植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精、酸酐改性的植物糖原β-糊精、脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷（DOTAP）、

N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、l-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-l-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(l,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）、人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0342】 裸遞送配製物可以包含非載劑賦形劑。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可以包括不表現出活性細胞穿透作用的非活性成分。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可以包括緩衝劑，例如PBS。在一些實施方式中，非載劑賦形劑可為溶劑、非水性溶劑、稀釋劑、懸浮助劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑、潤滑劑、或油。

【0343】 在一些實施方式中，裸遞送配製物可以包含稀釋劑，諸如腸胃外可接受的稀釋劑。稀釋劑（例如，腸胃外可接受的稀釋劑）可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。在一些實施方式中，稀釋劑（例如，腸胃外可接受的稀釋劑）可為RNA增溶劑、緩衝劑或等滲劑。RNA增溶劑之實例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲醯胺和2-丙醇。緩衝劑之實例包括2-(N-味啉代)乙磺酸（MES）、Bis-Tris、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸（ADA）、N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸（ACES）、哌啡-N,N′-雙(2-乙磺酸)（PIPES）、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]乙磺酸（TES）、3-(N-味啉代)丙烷磺酸（MOPS）、4-(2-羥乙基)-1-哌啡乙磺酸（HEPES）、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸鹽。等滲劑之實例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

【0344】在一些實施方式中，配製物包括細胞穿透劑。在一些實施方式中，配製物係局部配製物，並且包括細胞穿透劑。細胞穿透劑可以包括有機化合物，諸如具有一或多個羥基官能基的醇。在一些情況下，細胞穿透劑包括醇，諸如但不限於一元醇、多元醇、不飽和脂族醇和脂環醇。細胞穿透劑可以包括以下的一或多種：甲醇、乙醇、異丙醇、苯氧乙醇、三乙醇胺、苯乙醇、丁醇、戊醇、鯨蠟醇、乙二醇、丙二醇、變性醇、苯甲醇（特別是變性醇）、二醇、硬脂醇、鯨蠟硬脂醇、薄荷醇、聚乙二醇（PEG）-400、乙氧基化脂肪酸或羥乙基纖維素。在某些實施方式中，細胞穿透劑包括乙醇。細胞穿透劑可以包括如WO 2020/180751或WO 2020/180752中所述之任何量或任何配製物中的任何細胞滲透劑，將其特此藉由援引以其全文併入。

【0345】在一些實施方式中，如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、如本文揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥處於腸胃外核酸遞送系統中。腸胃外核酸遞送系統可以包括如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、所揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥和腸胃外可接受的稀釋劑。在一些實施方式中，腸胃外核酸遞送系統中的如本文揭露的藥物製劑、如本文揭露的藥物組成物、如本文揭露的藥物原料藥或如本文揭露的藥物成品藥不含任何載劑。

【0346】本揭露進一步涉及包括本文所述之環狀多核糖核苷酸的宿主或宿主細胞。在一些實施方式中，宿主或宿主細胞係脊椎動物、哺乳動物（例如人）或其他生物體或細胞。

【0347】在一些實施方式中，與由參考化合物（例如對應於所述環狀多核糖核苷酸的線性多核苷酸）觸發的響應相比，環狀多核糖核苷酸降低或不能產生宿主免疫系統的不需要的響應。在實施方式中，環狀多核糖核苷酸在宿主中係非免疫原性的。一些免疫響應包括但不限於體液免疫響應（例如，免疫原特異性抗

體的產生）和細胞介導的免疫響應（例如，淋巴球增殖）。

【0348】在一些實施方式中，使宿主或宿主細胞接觸（例如，遞送至或投與於）環狀多核糖核苷酸。在一些實施方式中，宿主係哺乳動物，諸如人。可以在投與後的任何時間測量宿主中環狀多核糖核苷酸或線性多核糖核苷酸、表現產物或兩者的量。在某些實施方式中，測定培養物中宿主生長的時程。如果在環狀多核糖核苷酸或線性多核糖核苷酸的存在下生長增加或減少，則環狀多核糖核苷酸或表現產物或兩者都被認為在增加或減少宿主的生長方面係有效的。

【0349】將如本文所述之環狀多核糖核苷酸分子遞送至細胞、組織或受試者的方法包括將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥投與於細胞、組織或受試者。

【0350】在一些實施方式中，細胞係真核細胞。在一些實施方式中，細胞係哺乳動物細胞。在一些實施方式中，細胞係有蹄類動物細胞。在一些實施方式中，細胞係動物細胞。在一些實施方式中，細胞係免疫細胞。在一些實施方式中，組織係結締組織、肌肉組織、神經組織或上皮組織。在一些實施方式中，組織係器官（例如，肝、肺、脾、腎等）。

【0351】在一些實施方式中，遞送方法係體內方法。例如，如本文所述之環狀多核糖核苷酸的遞送方法包括向有需要的受試者腸胃外投與，將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經腸胃外投與給有需要的受試者。再如，將環狀多核糖核苷酸遞送至受試者的細胞或組織的方法包括將如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥腸胃外投與至該細胞或組織。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的量在受試者中有效地引發生物響應。在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸的量有效地對受試者的細胞或組織具有生物學作用。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥包含載劑。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥包

含稀釋劑而不含任何載劑。

【0352】在一些實施方式中，腸胃外投與藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥。在一些實施方式中，藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥通過靜脈內、動脈內、腹膜內、皮內、顱內、鞘內、淋巴內、皮下或肌內投與。在一些實施方式中，腸胃外投與係靜脈內、肌內、眼、皮下、皮內或局部投與。

【0353】在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經肌內投與。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經皮下投與。在一些實施方式中，如本文所述之藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥局部投與。在一些實施方式中，該藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥經氣管內投與。

【0354】在一些實施方式中，該藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥藉由注射投與。投與可為全身投與或局部投與。在一些實施方式中，如本文所述之任何遞送方法均用載劑進行。在一些實施方式中，無需借助於載劑或細胞穿透劑即可進行如本文所述之任何遞送方法。

【0355】在一些實施方式中，在投與步驟後至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天在細胞、組織或受試者中檢測到環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物。在一些實施方式中，在投與步驟之前評價細胞、組織或受試者中環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物的存在。在一些實施方式中，在投與步驟之後評價細胞、組織或受試者中環狀多核糖核苷酸或從該環狀多核糖核苷酸翻譯的產物的存在。

配製物

【0356】在本揭露之一些實施方式中，藉由本文所述之方法製備的多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）或其製劑可被配製在組成物中，例如用於遞送到細胞、植物、無脊椎動物、非人脊椎動物或人類受試者的組成物，例如農業、

獸用或藥物組成物。在一些實施方式中，多核糖核苷酸被配製在藥物組成物中。在一些實施方式中，組成物包括多核糖核苷酸和稀釋劑、載劑、佐劑或其組合。在特定實施方式中，組成物包括本文所述之多核糖核苷酸和載劑或不含任何載劑的稀釋劑。在一些實施方式中，包括多核糖核苷酸和不含任何載劑的稀釋劑的組成物用於將多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸）裸遞送給受試者。

【0357】 藥物組成物可視需要包括一或多種額外活性物質，例如治療和/或預防活性物質。藥物組成物可以視需要包括充當本文所述之組成物（例如，包含環狀多核糖核苷酸的組成物）的媒介物或介質的非活性物質，諸如由美國食品和藥品管理局（United States Food and Drug Administration）（FDA）批准並且在非活性成分數據中列出的任一種非活性成分。本發明之藥物組成物可為無菌的和/或無熱原的。可以在以下中找到藥學配製物的配製和/或生產中的一般考慮：例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明頓：藥學科學與實踐] 第21版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005（藉由援引併入本文）。非活性物質之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水性溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、懸浮助劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑（例如，磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））、潤滑劑、油、及其混合物。

【0358】 儘管本文提供的藥物組成物的描述主要針對適合於投與於人的藥物組成物，但是熟悉該項技術者應理解，此類組成物通常適合於投與於任何其他動物，例如非人動物，例如非人哺乳動物。為了使組成物適合於投與於各種動物而對適合於投與於人的藥物組成物的修飾係熟知的，並且普通獸醫藥理師可僅通過普通實驗（如果有的話）來設計和/或進行此種修飾。我們設想向其投與藥物組成物的受試者包括但不限於人和/或其他靈長類動物；哺乳動物，包括商業相關的哺乳動物，如牛、豬、馬、綿羊、貓、狗、小鼠和/或大鼠；和/或鳥類，

包括商業相關的鳥類，如家禽、雞、鴨、鵝和/或火雞。

【0359】本文描述的藥物組成物的配製物可以藉由藥理學領域中已知的或以後開發的任何方法來製備。通常，這樣的製備方法包括以下步驟：使活性成分與賦形劑和/或一或多種其他輔助成分結合，然後，如果必要和/或期望的話，將產品分開、成形和/或包裝。

【0360】在一些實施方式中，製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係存在不多於1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、15 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、1 μg/ ml、10 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml、200 g/ml、300 μg/ml、400 μg/ml、500 μg/ml、600 μg/ml、700 μg/ml、800 μg/ml、900 μg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml或2 mg/ml的線性多核糖核苷酸分子。

【0361】在一些實施方式中，關於製劑中存在的環狀多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子至少30%(w/w)、40%(w/w)、50%（w/w）、60%（w/w）、70%（w/w）、80%（w/w）、85%（w/w）、90%（w/w）、91%(w/w)、92%(w/w)、93%(w/w)、94%(w/w)、95%(w/w)、96%(w/w)、97%(w/w)、98%(w/w)、99%(w/w)、99.1%(w/w)、99.2%(w/w)、99.3%(w/w)、99.4%(w/w)、99.5%(w/w)、99.6%(w/w)、99.7%(w/w)、99.8%（w/w）、99.9%（w/w）、或100%（w/w）的分子。

【0362】在一些實施方式中，關於製劑中存在的線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、15%（w/w）、20%(w/w)、25%（w/w）、30%（w/w）、40%（w/w）、50%（w/w）的線性多核糖核苷酸分子。

【0363】在一些實施方式中，關於製劑中存在的帶切口多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、或15%（w/w）的帶切口多核糖核苷酸分子。

【0364】在一些實施方式中，關於製劑中存在的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子的量的參考標準係占藥物製劑中的總核糖核苷酸分子不超過0.5%（w/w）、1%（w/w）、2%（w/w）、5%（w/w）、10%（w/w）、15%（w/w）、20%（w/w）、25%（w/w）、30%（w/w）、40%（w/w）、50%（w/w）的組合的帶切口和線性多核糖核苷酸分子。在一些實施方式中，藥物製劑係最終環狀多核糖核苷酸成品藥的中間體藥物製劑。在一些實施方式中，藥物製劑係原料藥或活性藥物成分（API）。在一些實施方式中，藥物製劑係用於投與於受試者的成品藥。

【0365】在一些實施方式中，對環狀多核糖核苷酸的製劑（在減少線性RNA之前、期間或之後）進一步處理以基本上去除DNA、蛋白質污染物（例如，細胞蛋白質（如宿主細胞蛋白質）或蛋白質製程雜質）、內毒素、單核苷酸分子、和/或與製程有關的雜質。

【0366】在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物可以包含：(i) 本文揭露的化合物（例如，環狀多核糖核苷酸）；(ii) 緩衝劑；(iii) 非離子型洗滌劑；(iv) 張度劑；和/或 (v) 穩定劑。在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物係穩定的液體藥物配製物。在一些實施方式中，本文揭露的藥物配製物包含魚精蛋白或魚精蛋白鹽（例如，硫酸魚精蛋白）。

【0367】本揭露提供了包括本文所述之環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物。本揭露之免疫原性組成物可以包含稀釋劑或載劑、佐劑或其任何組合。本揭露之免疫原性組成物還可以包括一或多種免疫調節劑，例如一或多種佐劑。佐

劑可以包括下面進一步討論的TH1佐劑和/或TH2佐劑。在一些實施方式中，免疫原性組成物包含不含任何載劑的稀釋劑，並且用於將環狀多核糖核苷酸裸遞送至受試者。

【0368】本揭露之免疫原性組成物用於在受試者中引起免疫響應。免疫響應較佳的是保護性的，並且較佳的是涉及抗體響應（通常包括IgG）和/或細胞介導的免疫響應。例如，用包括本揭露之環狀多核糖核苷酸的免疫原性組成物使受試者免疫以誘導免疫響應。在另一個實例中，用包括含免疫原的線性多核糖核苷酸的免疫原性組成物使受試者免疫，以刺激與免疫原結合的抗體的產生。藉由該等用途和方法在受試者中引起免疫響應，可以保護受試者免受各種疾病和/或感染，例如免受如上所討論的細菌和/或病毒疾病。在某些實施方式中，免疫原性組成物係疫苗組成物。根據本揭露的疫苗可為預防性的（即預防感染）或治療性的（即治療感染），但是典型地將是預防性的。在一些實施方式中，受試者係哺乳動物。在一些實施方式中，受試者係動物，較佳的是哺乳動物，例如人。在一個實施方式中，受試者係人。在其他實施方式中，受試者係非人哺乳動物，例如選自牛（例如，奶牛和肉牛）、綿羊、山羊、豬、馬、狗或貓。在其他實施方式中，受試者係鳥，例如母雞或公雞、火雞、鸚鵡。在一些實施方式中，動物不是小鼠或兔子或牛。在特定實施方式中，在免疫原性組成物用於預防用途的情況下，人係兒童（例如，幼兒或嬰兒）或青少年。在另一個實施方式中，在免疫原性組成物用於治療用途的情況下，人係青少年或成人。旨在用於兒童的免疫原性組成物也可以投與給成人，例如以評估安全性、劑量、免疫原性等。

【0369】根據本揭露製備的免疫原性組成物可用於治療兒童和成人。人類受試者可小於1歲、小於5歲、1-5歲、5-15歲、15-55歲或至少55歲。在特定實施方式中，接受免疫原性組成物的人類受試者係老年人（例如，≥50歲、≥60歲和≥65歲）、年輕人（例如，≤5歲）、住院患者、醫護人員、武裝部隊和軍事人員、

孕婦、長期病患者或免疫缺陷患者。然而，免疫原性組成物不僅僅適合於該等群組，並且可以更普遍地用於群體中。

【0370】 在一些實施方式中，受試者進一步用佐劑免疫接種。在一些實施方式中，受試者進一步用疫苗免疫接種。

防腐劑

【0371】 本文提供的組成物或藥物組成物可以包括用於單次投與的材料，或者可以包括用於多次投與的材料（例如，「多劑量」套組（kit））。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。該組成物或藥物組成物可以包含一或多種防腐劑，諸如硫柳汞或2-苯氧基乙醇。防腐劑可用於防止使用過程中的微生物污染。合適的防腐劑包括：殺藻胺、硫柳汞、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯乙醇、依地酸二鈉、山梨酸、Onamer M或熟悉該項技術者已知的其他藥劑。在眼科產品中，例如，此類防腐劑可以以0.004%至0.02%的水平採用。在本文所述之組成物中，防腐劑（例如殺藻胺）可以按重量計以0.001%至小於0.01%，例如0.001%至0.008%，較佳的是約0.005%的水平採用。

【0372】 多核糖核苷酸可易受周圍環境中可能豐富的RNA酶的影響。本文提供的組成物可以包含抑制RNA酶活性的試劑，從而防止多核糖核苷酸降解。在一些情況下，該組成物或藥物組成物包含熟悉該項技術者已知的任何RNA酶抑制劑。可替代地或另外，可以在無RNA酶的環境中製備本文提供的組成物中的多核糖核苷酸和細胞穿透劑和/或藥學上可接受的稀釋劑或載劑、媒介物、賦形劑或其他試劑。該組成物可以在無RNA酶的環境中配製。

【0373】 在一些情況下，本文提供的組成物可為無菌的。可以在本領域已知的合適的媒介物中將組成物配製成無菌溶液或懸浮液。可以藉由常規的已知滅菌技術對組成物進行滅菌，例如，可以對組成物進行無菌過濾。

鹽

【0374】在一些情況下，本文提供的組成物或藥物組成物包括一或多種鹽。為了控制張度，本文提供的組成物可以包括生理鹽如鈉鹽。其他鹽可以包括氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉和/或氯化鎂等。在一些情況下，該組成物與一或多種藥學上可接受的鹽一起配製。該一或多種藥學上可接受的鹽可以包括無機離子，諸如鈉、鉀、鈣、鎂離子等的那些鹽。此類鹽可以包括與無機酸或有機酸的鹽，該等無機酸或有機酸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、對甲苯磺酸、乙酸、富馬酸、琥珀酸、乳酸、苦杏仁酸、蘋果酸、檸檬酸、酒石酸或馬來酸。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

緩衝劑/pH

【0375】本文提供的組成物或藥物組成物可以包括一或多種緩衝劑，如Tris緩衝劑；硼酸鹽緩衝劑；琥珀酸鹽緩衝劑；組胺酸緩衝劑（例如，含氫氧化鋁佐劑）；或檸檬酸鹽緩衝劑。在一些情況下，包含5-20 mM範圍內的緩衝劑。

【0376】本文提供的組成物或藥物組成物可以具有約5.0至約8.5、約6.0至約8.0、約6.5至約7.5、或約7.0至約7.8的pH。該組成物或藥物組成物可以具有約7的pH。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

洗滌劑/界面活性劑

【0377】根據預期的投與途徑，本文提供的組成物或藥物組成物可以包括一或多種洗滌劑和/或界面活性劑，例如聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯界面活性劑(通常稱為「吐溫（Tween）」)，例如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80；以DOWFAX™商標出售的環氧乙烷（EO）、環氧丙烷（PO）和/或環氧丁烷（BO）的共聚物，諸如線性EO/PO嵌段共聚物；重複的乙氧基(氧基-1,2-乙二基)基團的數目可以變化的辛基酚聚醚，例如辛基酚聚醚-9（Triton X-100或三級辛基苯氧基聚乙氧基乙醇）；(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇（IGEPAL CA-630/NP-40）；磷脂，諸如磷脂醯膽鹼（卵磷脂）；壬基酚聚氧乙烯醚，諸如Tergitol™ NP系列；衍生自月桂

醇、鯨蠟醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚（稱為Brij界面活性劑），諸如三乙二醇單月桂基醚（Brij 30）；和脫水山梨糖醇酯（通常稱為「SPAN」），諸如脫水山梨糖醇三油酸酯（Span 85）和脫水山梨糖醇單月桂酸酯、辛基酚聚醚（諸如辛基酚聚醚9（Triton X-100）或三級辛基苯氧基聚乙氧基乙醇）、十六烷基三甲基溴化銨（「CTAB」）或去氧膽酸鈉。該一或多種洗滌劑和/或界面活性劑可僅以痕量存在。在一些情況下，該組成物可以包含小於各1 mg/ml的辛基酚聚醚-10和聚山梨醇酯80。在本文中可使用非離子界面活性劑。界面活性劑可以按其「HLB」（親水/親脂平衡值）進行分類。在一些情況下，界面活性劑的HLB為至少10、至少15和/或至少16。多核糖核苷酸可以線性或環狀形式存在。

稀釋劑

【0378】 在一些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和稀釋劑。

【0379】 稀釋劑可為非載劑賦形劑。非載劑賦形劑用作組成物（諸如，如本文所述之環狀多核糖核苷酸）的媒介物或介質。非載劑賦形劑之非限制性實例包括溶劑、水性溶劑、非水溶劑、分散介質、稀釋劑、分散體、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑（例如，磷酸鹽緩衝鹽水（PBS））、潤滑劑、油及其混合物。非載劑賦形劑可為經美國食品和藥物管理局（FDA）批准並列在非活性成分數據庫中的不表現出細胞穿透作用的任一種非活性成分。非載劑賦形劑可為適於投與於非人動物（例如，適合獸醫用途）的任何非活性成分。為了使組成物適於向各種動物投與，對適於向人投與的組成物的修飾得到很好的理解，並且普通技術的獸醫藥理師可以僅通過普通的實驗（如果有）來設計和/或進行此類修飾。

【0380】 在一些實施方式中，環狀多核糖核苷酸可以以裸遞送配製物的形

式遞送，諸如包含稀釋劑。裸遞送配製物將環狀多核糖核苷酸遞送至細胞，無需借助於載劑並且無需對環狀多核糖核苷酸、加帽的多核糖核苷酸或其複合物進行修飾或部分或完全封裝。

【0381】裸遞送配製物係不含載劑的配製物並且其中環狀多核糖核苷酸沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾，或者沒有對環狀多核糖核苷酸的部分或完全封裝。在一些實施方式中，沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸係未與蛋白質、小分子、顆粒、聚合物或生物聚合物共價結合的多核糖核苷酸。沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸不含經修飾的磷酸基團。例如，沒有結合有助於遞送至細胞的部分的共價修飾的環狀多核糖核苷酸不含硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸鹽、硼代磷酸酯、磷酸氫鹽、胺基磷酸酯、二胺基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯或磷酸三酯。

【0382】在一些實施方式中，裸遞送配製物不含以下任何或全部：轉染試劑、陽離子載劑、碳水化合物載劑、奈米顆粒載劑或蛋白質載劑。在一些實施方式中，裸遞送配製物不含植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精、酸酐改性的植物糖原β-糊精、脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、l,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷（DOTAP）、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、l-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-l-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(l,2-二肉

豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）、人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0383】在某些實施方式中，裸遞送配製物包括非載劑賦形劑。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括不表現出細胞穿透作用的非活性成分。在一些實施方式中，非載劑賦形劑包括緩衝液，例如PBS。在一些實施方式中，非載劑賦形劑係溶劑、非水溶劑、稀釋劑、助懸劑、界面活性劑、等滲劑、增稠劑、乳化劑、防腐劑、聚合物、肽、蛋白質、細胞、透明質酸酶、分散劑、製粒劑、崩散劑、黏合劑、緩衝劑、潤滑劑或油。

【0384】在一些實施方式中，裸遞送配製物包括稀釋劑。稀釋劑可為液體稀釋劑或固體稀釋劑。在一些實施方式中，稀釋劑係RNA增溶劑、緩衝劑或等滲劑。RNA增溶劑之實例包括水、乙醇、甲醇、丙酮、甲醯胺和2-丙醇。緩衝劑之實例包括2-(N-味啉代)乙磺酸（MES）、Bis-Tris、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸（ADA）、N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙烷磺酸（ACES）、哌啡-N,N′-雙(2-乙磺酸)（PIPES）、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]乙磺酸（TES）、3-(N-味啉代)丙烷磺酸（MOPS）、4-(2-羥乙基)-1-哌啡乙磺酸（HEPES）、Tris、Tricine、Gly-Gly、Bicine或磷酸鹽。等滲劑之實例包括甘油、甘露醇、聚乙二醇、丙二醇、海藻糖或蔗糖。

載劑

【0385】在一些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和載劑。

【0386】在某些實施方式中，免疫原性組成物包含在囊泡或其他基於膜的載劑中的如本文所述之環狀多核糖核苷酸。

【0387】在其他實施方式中，免疫原性組成物包括在或經由細胞、囊泡或

其他基於膜的載劑中的環狀多核糖核苷酸。在一個實施方式中，免疫原性組成物包含在脂質體或其他類似囊泡中的環狀多核糖核苷酸。脂質體係球形囊泡結構，該等球形囊泡結構由圍繞內部水性隔室的單層或多層的脂質雙層和相對不可滲透的外部親脂性磷脂雙層構成。脂質體可為陰離子的、中性的或陽離子的。脂質體具有生物相容性，無毒，可以遞送親水性和親脂性藥物分子，保護其負載物免受血漿酶的降解，並且將其負載轉運穿過生物膜和血腦屏障（BBB）（關於綜述，參見例如，Spuch和Navarro, Journal of Drug Delivery [藥物遞送雜誌], 第2011卷, 文章ID 469679, 第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679）。

【0388】 囊泡可由幾種不同類型的脂質製成；然而，最常使用磷脂生成作為藥物載劑的脂質體。製備多層囊泡脂質之方法係本領域已知的（參見例如美國專利案號6,693,086，其關於多層囊泡脂質製備的傳授內容藉由援引併入文中）。儘管當脂質膜與水溶液混合時，囊泡的形成係自發的，但也可以藉由使用均質器、超音波儀或擠壓裝置以振盪的形式施加力來加快囊泡的形成（關於綜述，參見例如，Spuch和Navarro, Journal of Drug Delivery [藥物遞送雜誌], 第2011卷, 文章ID 469679, 第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679）。可以藉由擠出通過具有減小尺寸的過濾器來製備擠出的脂質，如Templeton等人, Nature Biotech [自然生物技術], 15:647-652, 1997中所述，其涉及擠出脂質製備的教導藉由援引併入本文。

【0389】 在某些實施方式中，本揭露之免疫原性組成物包含環狀多核糖核苷酸和脂質奈米顆粒，例如本文所述之脂質奈米顆粒。脂質奈米顆粒係為如本文所述之環狀多核糖核苷酸分子提供生物相容性和可生物降解的遞送系統的載劑的另一個實例。奈米結構化的脂質載劑（NLC）係經修飾的固體脂質奈米顆粒（SLN），其保留了SLN的特性，提高了藥物的穩定性和載藥量，並防止了藥物洩漏。聚合物奈米顆粒（PNP）係藥物遞送的重要組分。該等奈米顆粒可以有效

地將藥物遞送引導至特定靶並改善藥物穩定性和受控的藥物釋放。也可以使用脂質聚合物奈米顆粒（PLN），其係一種組合了脂質體和聚合物的新型載劑。該等奈米顆粒具有PNP和脂質體的互補優勢。PLN由核-殼結構構成；聚合物核提供了穩定的結構，磷脂殼提供了良好的生物相容性。這樣，這兩種組分提高了藥物封裝有效率，促進了表面修飾，並防止了水溶性藥物的洩漏。對於綜述，參見，例如，Li等人 2017, Nanomaterials 7 [奈米材料7], 122; doi:10.3390/nano7060122。

【0390】 載劑之另外的非限制性實例包括碳水化合物載劑（例如，酸酐修飾的植物糖原或糖原型材料）、蛋白質載劑（例如，與環狀多核糖核苷酸共價連接的蛋白質）、或陽離子載劑（例如，陽離子脂質聚合物或轉染試劑）。碳水化合物載劑之非限制性實例包括植物糖原辛烯基琥珀酸酯、植物糖原β-糊精和酸酐修飾的植物糖原β-糊精。陽離子載劑之非限制性實例包括脂轉染胺（lipofectamine）、聚乙烯亞胺、聚(三甲基亞胺)、聚(四甲基亞胺)、聚丙烯亞胺、胺基糖苷-聚胺、雙去氧-二胺基-b-環糊精、精胺、亞精胺、聚甲基丙烯酸(2-二甲基胺基)乙酯、聚(離胺酸)、聚(組胺酸)、聚(精胺酸)、陽離子明膠、樹狀聚合物、殼聚糖、l,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷（DOTAP）、N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨（DOTMA）、l-[2-(油醯氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)咪唑鎓氯化物（DOTIM）、2,3-二油醯氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-l-三氟乙酸丙銨（DOSPA）、3B-[N-(N\N'-二甲胺基乙烷)-胺基甲醯基]膽固醇鹽酸鹽（DC-膽固醇鹽酸鹽）、二-十七烷基胺基甘胺醯基亞精胺（DOGS）、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨（DDAB）、N-(l,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨（DMRIE）和N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨（DODAC）。蛋白質載劑之非限制性實例包括人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）或球蛋白。

【0391】 外來體也可用作本文所述之環狀RNA組成物或製劑的藥物遞送

媒介物。對於綜述，參見Ha等人 2016年7月.Acta Pharmaceutica Sinica B [藥學學報英文版] 第6卷, 第4期, 第287-296頁；https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

【0392】 離體分化的紅血球也可以用作本文所述之環狀RNA組成物或製劑的載劑。參見，例如，國際專利公開案號WO 2015/073587；WO 2017/123646；WO 2017/123644；WO 2018/102740；WO 2016/183482；WO 2015/153102；WO 2018/151829；WO 2018/009838；Shi等人 2014.Proc Natl Acad Sci USA [美國國家科學院院刊].111(28): 10131-10136；美國專利9,644,180；Huang等人 2017.Nature Communications [自然通訊] 8: 423；Shi等人 2014.Proc Natl Acad Sci USA [美國國家科學院院刊].111(28): 10131-10136。

【0393】 例如國際專利公開案號WO 2018/208728中所述之融合體組成物也可以用作載劑遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸分子。

【0394】 病毒體和病毒樣顆粒（VLP）也可用作載劑將本文所述之環狀多核糖核苷酸分子遞送至靶向的細胞。

【0395】 例如國際專利公開案號WO 2011/097480、WO 2013/070324、WO 2017/004526或WO 2020/041784中所述之植物奈米囊泡和植物信使包（PMP）也可用作載劑遞送本文所述之環狀RNA組成物或製劑。

【0396】 微泡也可以用作載劑遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸分子。參見，例如，US 7115583；Beeri, R.等人，Circulation. [循環] 2002年10月1日;106(14):1756-1759；Bez, M.等人，Nat Protoc. [自然實驗手冊] 2019年4月；14(4): 1015-1026；Hernot, S.等人，Adv Drug Deliv Rev. [高級藥物遞送綜述] 2008年6月30日; 60(10): 1153-1166；Rychak, J.J.等人，Adv Drug Deliv Rev. [高級藥物遞送綜述] 2014年6月; 72: 82-93。在一些實施方式中，微泡係白蛋白包被的全氟化碳微泡。

【0397】 包含本文所述之環狀多核糖核苷酸的載劑可以包含多個顆粒。顆

粒可具有30至700奈米（例如，30至50、50至100、100至200、200至300、300至400、400至500、500至600、600至700、100至500、50至500或200至700奈米）的中值粒度。可以優化顆粒的大小以有利於包括環狀多核糖核苷酸在內的有效載荷沈積到細胞中。環狀多核糖核苷酸沈積到某些細胞類型中可有利於不同的粒度。例如，可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到抗原呈遞細胞中。可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到樹突細胞中。另外，可以優化粒度以使環狀多核糖核苷酸沈積到引流淋巴結細胞中。

脂質奈米顆粒

【0398】 本揭露提供的組成物、方法和遞送系統可以採用本文所述之任何合適的載劑或遞送形式，在某些實施方式中包括脂質奈米顆粒（LNP）。在一些實施方式中，脂質奈米顆粒包括一或多種離子脂質，如非陽離子脂質（例如，中性或陰離子或兩性離子脂質）；一或多種軛合脂質（諸如WO 2019217941的表5中描述的PEG軛合的脂質或軛合至聚合物的脂質；其藉由援引以其全文併入本文）；一或多種固醇（例如，膽固醇）。

【0399】 可用於奈米顆粒形成的脂質（例如，脂質奈米顆粒）包括例如WO 2019217941的表4中描述的那些，其藉由援引併入本文—例如，含脂質的奈米顆粒可包括WO 2019217941的表4中的一或多種脂質。脂質奈米顆粒可以包括另外的要素，諸如聚合物，諸如藉由援引併入的WO 2019217941的表5中描述的聚合物。

【0400】 在一些實施方式中，軛合脂質，當存在時，可以包括以下的一或多種：PEG-二醯基甘油（DAG）（如l-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯甘油（PEG-DMG））、PEG-二烷氧基丙基（DAA）、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺（Cer）、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺（PEG-PE）、PEG琥珀酸二醯基甘油（PEGS-DAG）（如4-0-(2',3'-二(十四烷醯氧基)丙基-l-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯

（PEG-S-DMG））、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1 ,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺鈉鹽，以及在WO 2019051289的表2中描述的那些（藉由援引併入）和前述的組合。

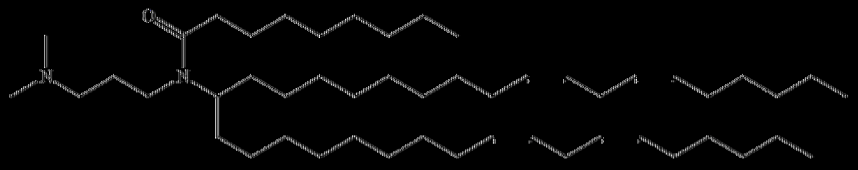
【0401】在一些實施方式中，可摻入脂質奈米顆粒中的固醇包括膽固醇或膽固醇衍生物中的一或多種，諸如藉由援引併入的W0 2009/127060或US 2010/0130588中的那些。另外的示例性固醇包括植物固醇，包括藉由援引併入本文的Eygeris等人(2020)，dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中描述的那些。

【0402】在一些實施方式中，脂質顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質、抑制顆粒聚集的軛合脂質和固醇。該等組分的量可以獨立地變化，以獲得所需特性。例如，在一些實施方式中，脂質奈米顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質、軛合脂質和甾醇，該可電離脂質的量為總脂質的約20 mol%至約90 mol%（在其他實施方式中，該可電離脂質可為脂質奈米顆粒中存在的總脂質的20%-70%（mol）、30%-60%（mol）或40%-50%（mol）；約50 mol%至約90 mol%）；該非陽離子脂質的量為總脂質的約5 mol%至約30 mol%；該軛合脂質的量為總脂質的約0.5 mol%至約20 mol%，該甾醇的量為總脂質的約20 mol%至約50 mol%。總脂質與核酸的比率可以根據需要變化。例如，總脂質與核酸（質量或重量）的比率可為約10 : 1至約30 : 1。

【0403】在一些實施方式中，脂質與核酸的比率（質量/質量比率；w/w比）可處於約1 : 1至約25 : 1、約10 : 1至約14 : 1、約3 : 1至約15 : 1、約4 : 1至約10 : 1、約5 : 1至約9 : 1或約6 : 1至約9 : 1的範圍內。可以調節脂質和核酸的量以提供所需的N/P比，例如3、4、5、6、7、8、9、10或更高的N/P比。通常，脂質奈米顆粒配製物的總脂質含量可在約5 mg/ml至約30 mg/mL的範圍內。

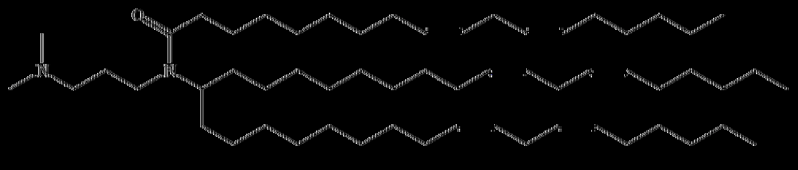
【0404】可用於（例如，與其他脂質組分組合）形成用於遞送本文所述之組成物，例如本文所述之核酸（例如，RNA（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多

核糖核苷酸））的脂質奈米顆粒的脂質化合物的一些非限制性實例包括：



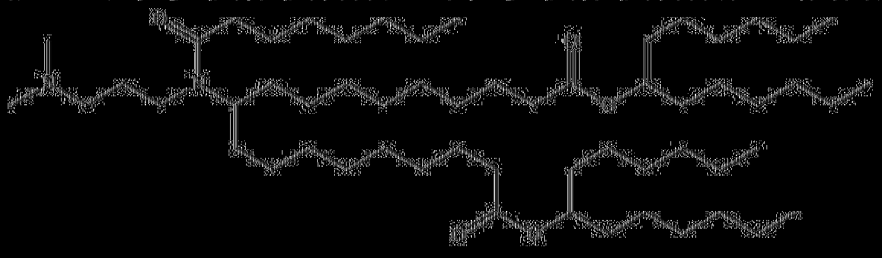
(i)

[0405] 在一些實施方式中，包括式(i)的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



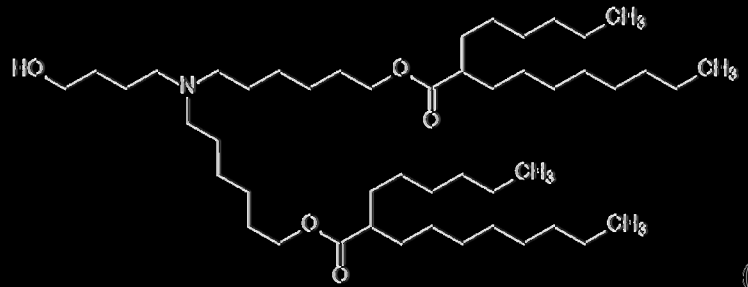
(ii)

[0406] 在一些實施方式中，包括式 (ii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

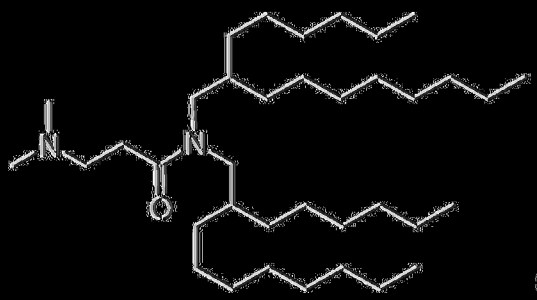


(iii)

[0407] 在一些實施方式中，包括式 (iii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

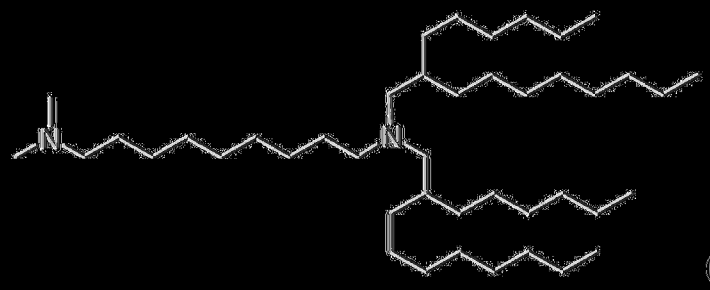


(iv)



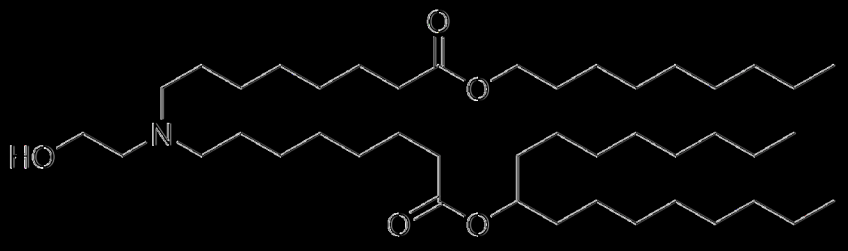
(v)

[0408] 在一些實施方式中，包括式 (v) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

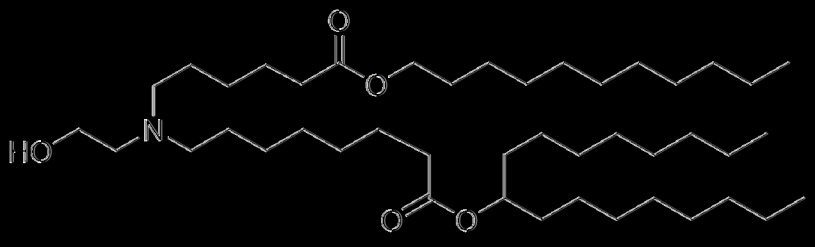


(vi)

[0409] 在一些實施方式中，包括式 (vi) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

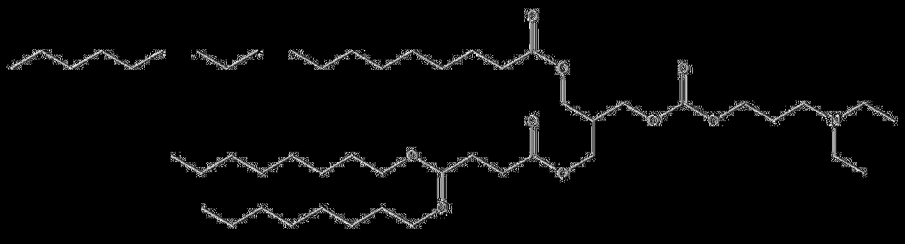


(vii)



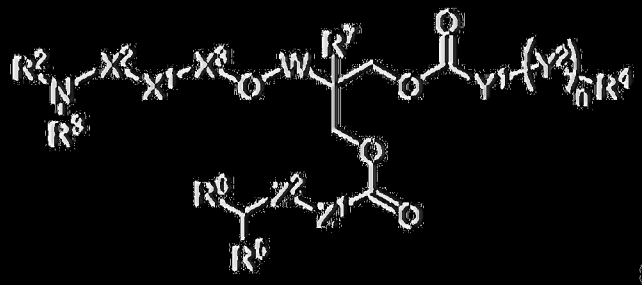
(viii)

[0410] 在一些實施方式中，包括式 (viii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



(ix)

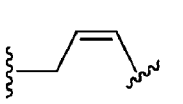
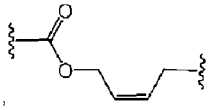
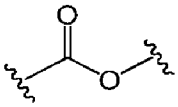
[0411] 在一些實施方式中，包括式 (ix) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



(x)

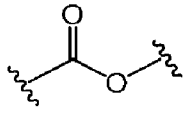
其中

X^1係O、NR^1或直接鍵，X^2係C2-5伸烷基，X^3係C(=O)或直接鍵，R^1係H或Me，R^3係C1-3烷基，R^2係C1-3烷基，或R^2與它所附接的氮原子和X^2的1-3個碳原子一起形成4-員、5-員或6-員環，或X^1係NR^1，R^1和R^2與它們所附接的氮原子一起形成5-員或6-員環，或R^2與R^3和它們所附接的氮原子一起形成5-員、6-員或7-員環，Y^1係C2-12伸烷基，Y^2選自

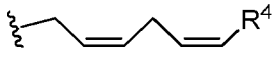
（在任一取向上），（在任一取向上），（在任一取向上），

n為0至3，R^4為C1-15烷基，Z^1為C1-6伸烷基或直接鍵，

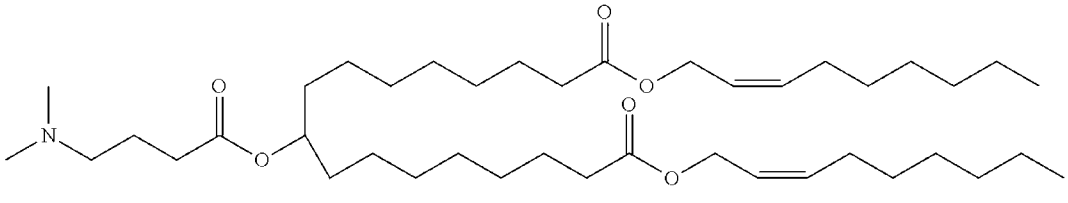
Z^2係 

（在任一取向上）或不存在，條件是如果Z^1係直接鍵，則Z^2不存在；

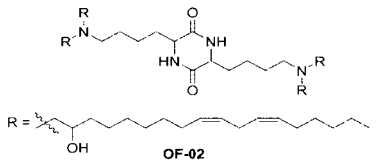
R^5係C5-9烷基或C6-10烷氧基，R^6係C5-9烷基或C6-10烷氧基，W係亞甲基或直接鍵，並且R^7係H或Me，或其鹽，條件是如果R^3和R^2係C2烷基，X^1係O，X^2係直鏈C3伸烷基，X^3係C(=0)，Y^1係直鏈Ce伸烷基，$(Y^2)n-R^4$係

；  ，R^4係直鏈C5烷基，Z^1係C2伸烷基，Z^2不存在，W係亞甲基，並且R^7係H，則R^5和R^6不是Cx烷氧基。

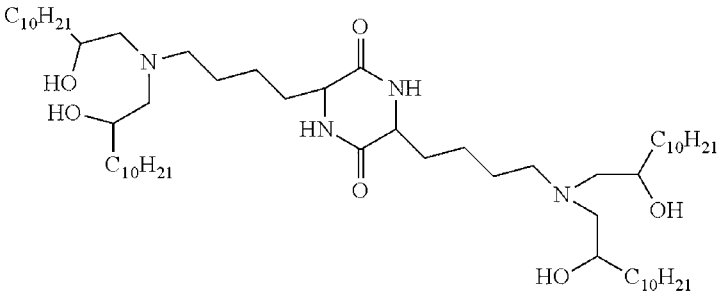
【0412】在一些實施方式中，包括式 (xii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。


(xi)

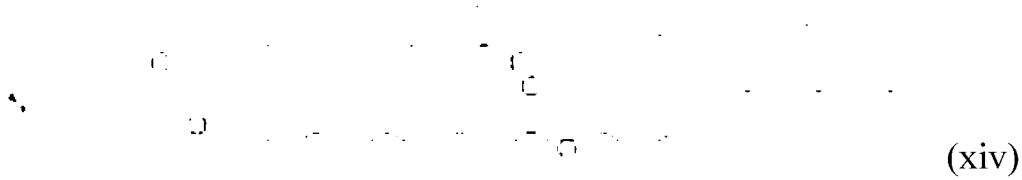
【0413】在一些實施方式中，包括式 (xi) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。



其中R =  (xii)

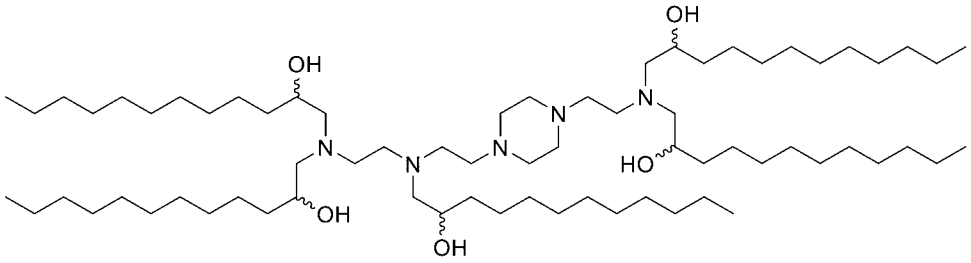


(xiii)



(xiv)

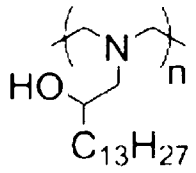
【0414】在一些實施方式中，LNP包括具有式(xiii)之化合物和具有式(xiv)之化合物。



(xv)

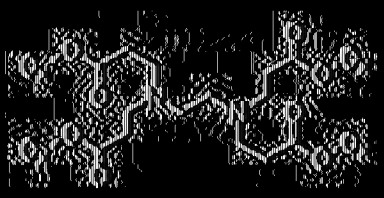
【0415】在一些實施方式中，包括式(xv)的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

PEI_{600} 核心

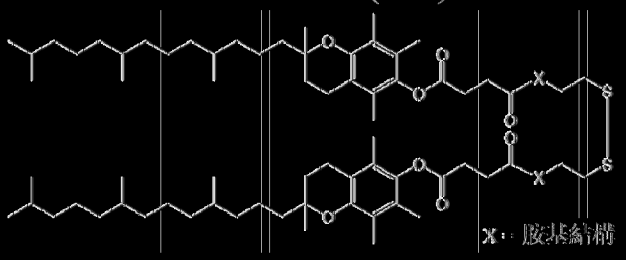


(xvi)

【0416】在一些實施方式中，包括具有式(xvi)之配製物的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。

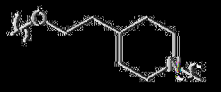


(xvii)

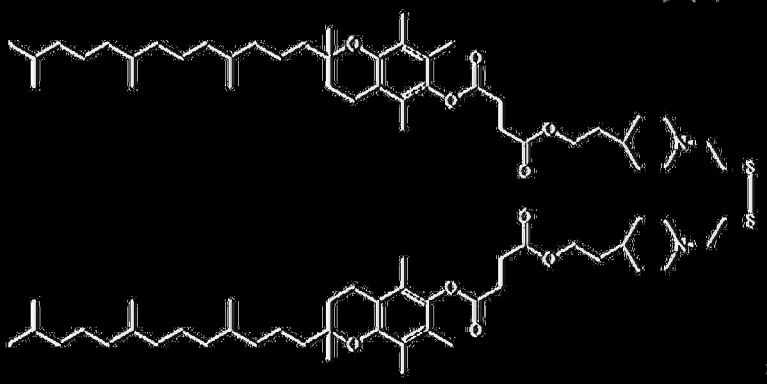


X：胺基結構

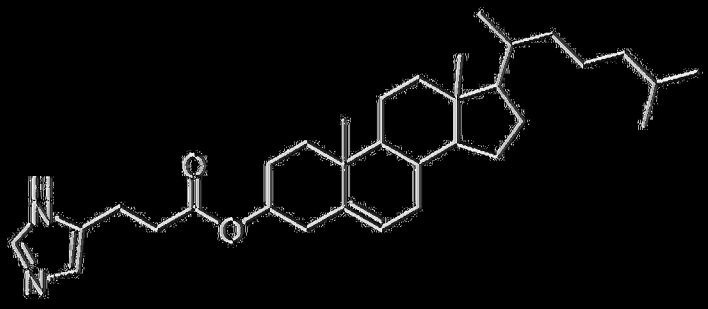
其中X：



(xviii)(a)

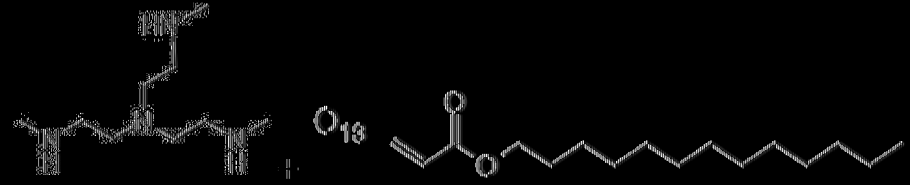


(xviii)(b)

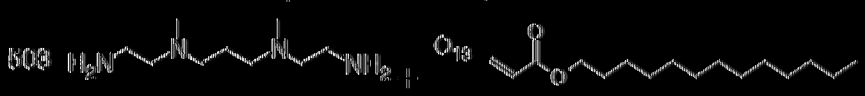


(xix)

[0417] 在一些實施方式中，用於形成用於遞送本文所述之組成物，例如本文所述之核酸（例如，RNA（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸））的脂質奈米顆粒的脂質化合物藉由以下反應之一製成：



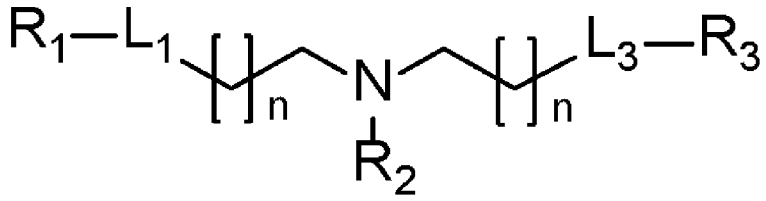
(xx)(a)



(xx)(b)。

[0418] 在一些實施方式中，包括式(xxi)的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式(xxi)之LNP係藉由WO 2021113777描述的LNP（例如，

具有式 (1) 之脂質，如WO 2021113777的表1的脂質）。



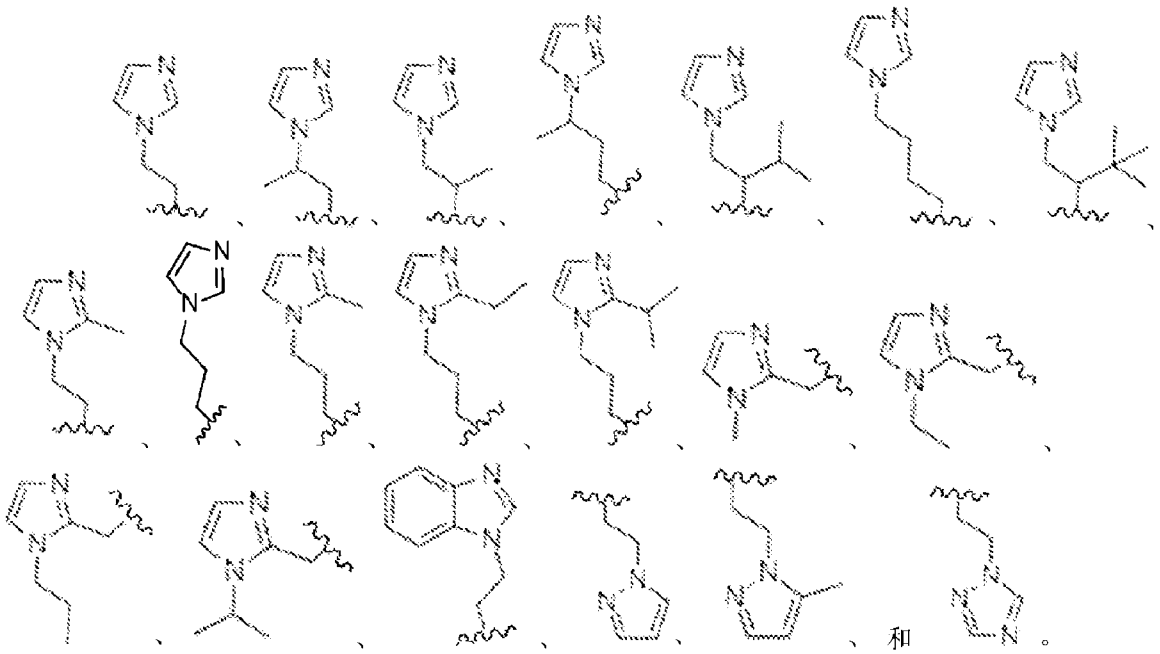
(xxi)

其中

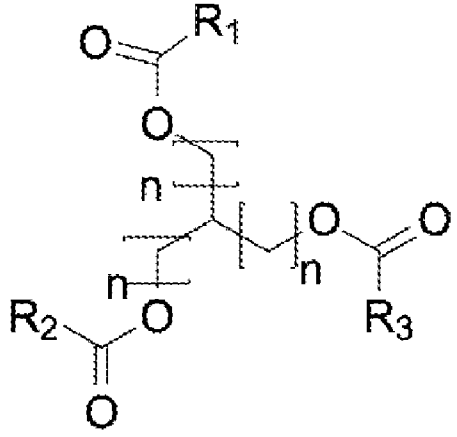
每個n獨立地是2-15的整數；L_1和L_3各自獨立地是-OC(O)-*或-C(O)O-*，其中「*」表示與R_1或R_3的附接點；

R_1和R_3各自獨立地是直鏈或支鏈C_9-C_{20}烷基或C_9-C_{20}烯基，其視需要被選自由以下組成之群組的一或多個取代基取代：側氧基、鹵代、羥基、氰基、烷基、烯基、醛、雜環基烷基、羥基烷基、二羥基烷基、羥基烷基胺基烷基、胺基烷基、烷基胺基烷基、二烷基胺基烷基、(雜環基)(烷基)胺基烷基、雜環基、雜芳基、烷基雜芳基、炔基、烷氧基、胺基、二烷基胺基、胺基烷基羰基胺基、胺基羰基烷基胺基、(胺基羰基烷基)(烷基)胺基、烯基羰基胺基、羥基羰基、烷氧基羰基、胺基羰基、胺基烷基胺基羰基、烷基胺基烷基胺基羰基、二烷基胺基烷基胺基羰基、雜環基烷基胺基羰基、(烷基胺基烷基)(烷基)胺基羰基、烷基胺基烷基羰基、二烷基胺基烷基羰基、雜環基羰基、烯基羰基、炔基羰基、烷基亞碸、烷基亞碸烷基、烷基磺醯基和烷基碸烷基；以及

R_2選自由以下組成之群組：



【0419】在一些實施方式中，包括式 (xxii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式 (xxii) 之LNP之由WO 2021113777描述的LNP（例如，具有式 (2) 的脂質，如WO 2021113777的表2的脂質）。

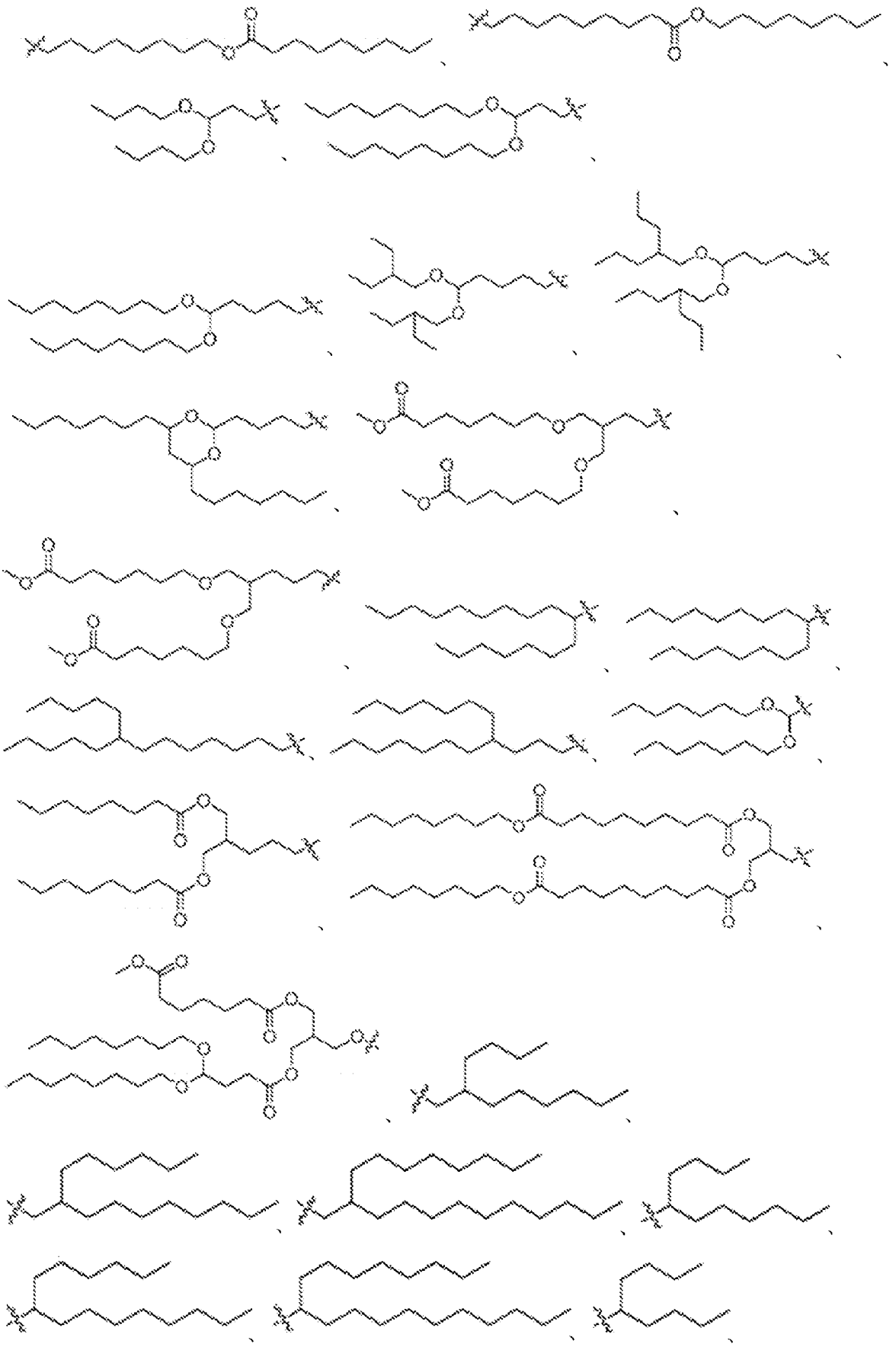


(xxii)

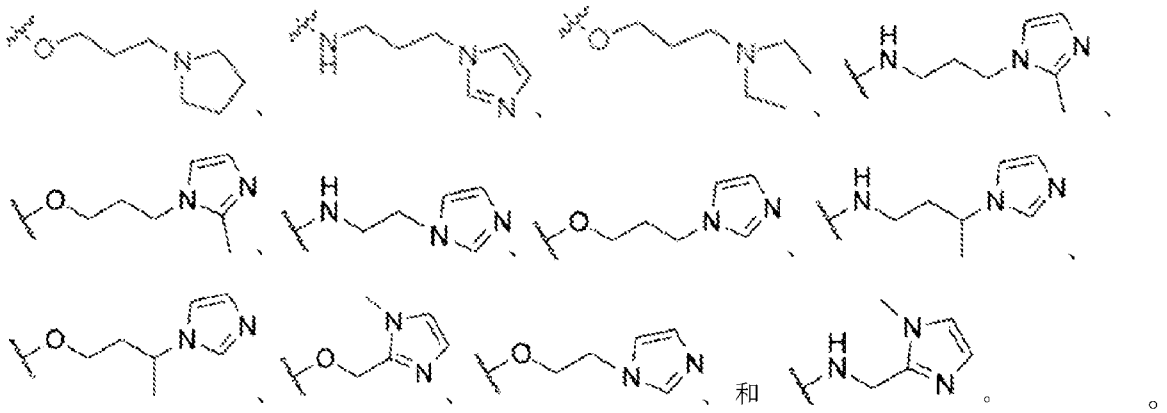
其中

每個n獨立地是1-15的整數；

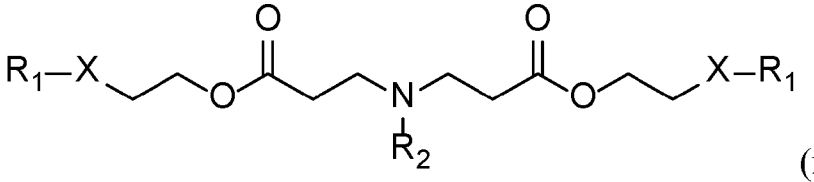
R_1和R_2各自獨立地選自由以下組成之群組：



R_3選自由以下組成之群組：



【0420】在一些實施方式中，包括式 (xxiii) 的LNP用於將本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）組成物遞送至細胞。在一些實施方式中，具有式 (xxiii) 之LNP之由WO 2021113777描述的LNP（例如，具有式 (3) 的脂質，如WO 2021113777的表3的脂質）。

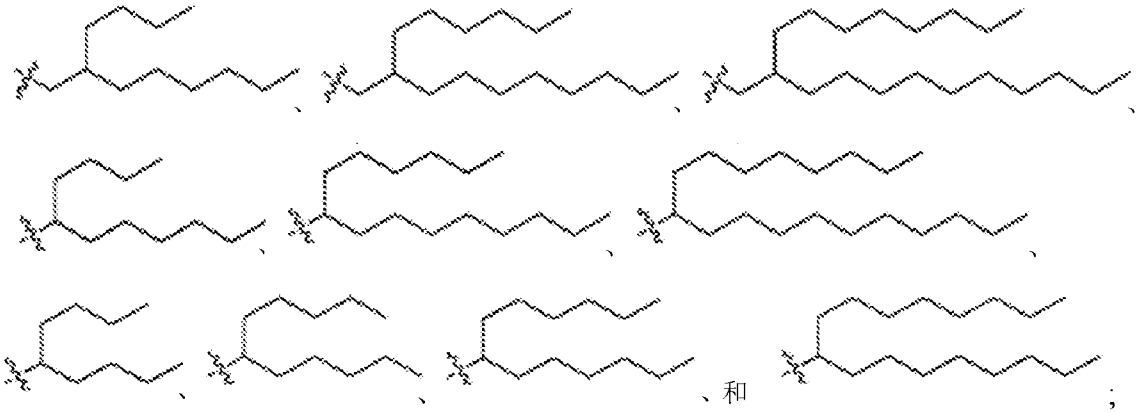


(xxiii)

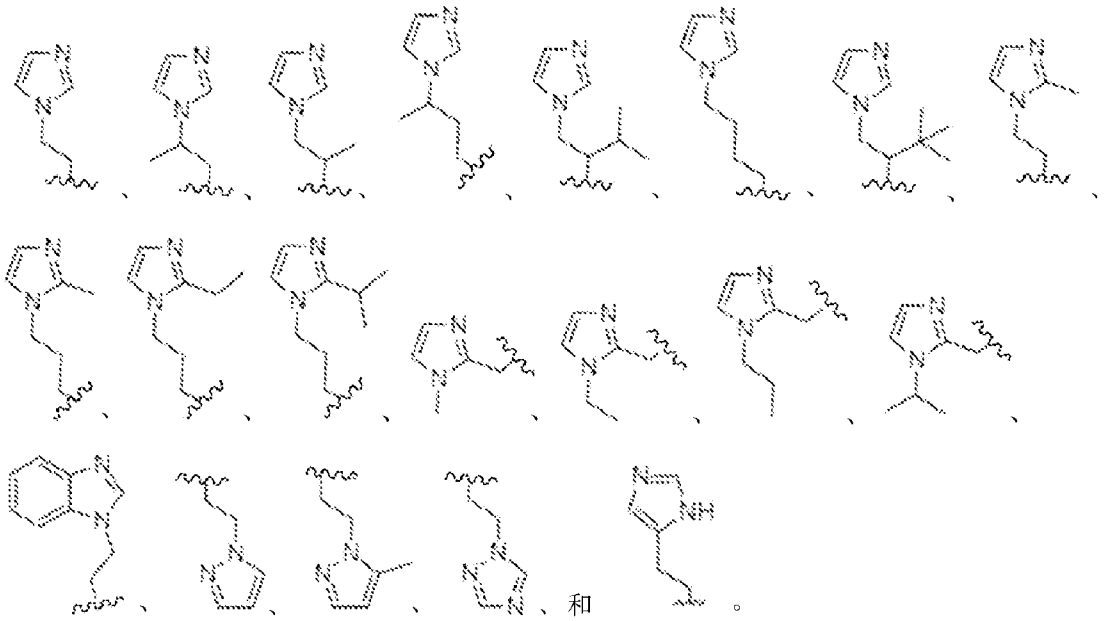
其中

X選自-O-、-S-或-OC(O)-*，其中*表示與R_1的附接點；

R_1選自由以下組成之群組：



且R_2選自由以下組成之群組：



【0421】在一些實施方式中，本文所述之組成物（例如，核酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）或蛋白質）在包括可電離脂質的LNP中提供。在一些實施方式中，可電離脂質之十七烷-9-基8-((2-羥乙基)(6-側氧基-6-(十一烷氧基)己基)胺基)辛酸酯（SM-102）；例如，如US 9,867,888（藉由援引以其全文併入本文）的實例1中所述。在一些實施方式中，可電離脂質之9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八碳-9,12-二烯酸酯（LP01），例如，如WO 2015/095340（藉由援引以其全文併入本文）的實例13中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之9-((4-二甲基胺基)丁醯基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯（L319），例如如US 2012/0027803（藉由援引以其全文併入本文）的實例7、實例8或實例9中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啡-1-基)乙基)氮烷二基)雙(十二烷-2-醇)（C12-200），例如，如WO 2010/053572（藉由援引以其全文併入本文）的實例14和實例16中合成的。在一些實施方式中，可電離脂質之咪唑膽固醇酯（ICE）脂質(3S,10R,13R,17R)-10, 13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17-十四氫-lH-環戊烯并[a]菲-3-基 3-(1H-咪唑-4-基)丙酸酯，例如來自WO 2020/106946（藉由援引以其全文併入本文）的結構 (I)。

【0422】 在一些實施方式中，可電離脂質可為陽離子脂質、可電離陽離子脂質，例如可以根據pH以帶正電荷的形式或中性形式存在的陽離子脂質，或可以容易地質子化的含胺脂質。在一些實施方式中，陽離子脂質係例如在生理條件下能夠帶正電的脂質。示例性的陽離子脂質包括一或多個帶有正電荷的胺基。在一些實施方式中，脂質顆粒包括與中性脂質、可電離含胺脂質、可生物降解的炔脂質、類固醇、包括多不飽和脂質的磷脂、結構脂質（例如固醇）、PEG、膽固醇和聚合物軛合脂質中的一或多種配製的陽離子脂質。在一些實施方式中，陽離子脂質可為可電離的陽離子脂質。如本文所揭露的示例性陽離子脂質可具有超過6.0的有效pKa。在實施方式中，脂質奈米顆粒可包括具有與第一陽離子脂質不同的有效pKa（例如，大於第一有效pKa）的第二陽離子脂質。脂質奈米顆粒可包括40莫耳%至60莫耳%的封裝在脂質奈米顆粒內或與脂質奈米顆粒締合的陽離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物軛合的脂質和治療劑，例如本文所述之核酸（例如RNA（例如環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸））。在一些實施方式中，核酸與陽離子脂質共同配製。核酸可以吸附到LNP（例如包括陽離子脂質的LNP）的表面。在一些實施方式中，核酸可以封裝在LNP（例如包括陽離子脂質的LNP）中。在一些實施方式中，脂質奈米顆粒可包括靶向部分，例如用靶向劑包被的靶向部分。在實施方式中，LNP配製物係生物可降解的。在一些實施方式中，包括一或多種本文所述之脂質（例如式 (i)、(ii)、(ii)、(vii) 和/或 (ix)）的脂質奈米顆粒封裝至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%或100%的RNA分子。

【0423】 可用於脂質奈米顆粒配製物中的示例性可電離脂質包括但不限

於藉由援引併入本文的WO 2019051289的表1中所列的那些。另外的示例性脂質包括但不限於下式中的一或多種：US 2016/0311759的X；US 20150376115或US 2016/0376224中的I；US 20160151284的I、II或III；US 20170210967的I、IA、II或IIA；US 20150140070的I-c；US 2013/0178541的A；US 2013/0303587或US 2013/0123338的I；US 2015/0141678的I；US 2015/0239926的II、III、IV或V；US 2017/0119904的I；WO 2017/117528的I或II；US 2012/0149894的A；US 2015/0057373的A；WO 2013/116126的A；US 2013/0090372的A；US 2013/0274523的A；US 2013/0274504的A；US 2013/0053572的A；W0 2013/016058的A；W02012/162210的A；US 2008/042973的I；US 2012/01287670的I、II、III或IV；US 2014/0200257的I或II；US 2015/0203446的I、II或III；US 2015/0005363的I或III；US 2014/0308304的I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV；US 2013/0338210；W0 2009/132131的I、II、III或IV；US 2012/01011478的A；US 2012/0027796的I或XXXV；US 2012/0058144的XIV或XVII；US 2013/0323269；US 2011/0117125的I；US 2011/0256175的I、II或III；US 2012/0202871的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII；US 2011/0076335的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI；US 2006/008378的I或II；US 2013/0123338的I；US 2015/0064242的I或X-A-Y-Z；US 2013/0022649的XVI、XVII或XVIII；US 2013/0116307的I、II或III；US 2013/0116307的I、II或III；US 2010/0062967的I或II；US 2013/0189351的I-X；US 2014/0039032的I；US 2018/0028664的V；US 2016/0317458的I；US 2013/0195920的I；US 10,221,127的5、6或10；WO 2018/081480的III-3；WO 2020/081938的I-5或I-8；US 9,867,888的18或25；US 2019/0136231的A；WO 2020/219876的II；US 2012/0027803的1；US 2019/0240349的OF-02；US 10,086,013的23；Miao等人(2020)的cKK-E12/A6；WO 2010/053572的C12-200；Dahlman等人(2017)的7C1；Whitehead等人的304-O13或

503-O13；US 9,708,628的TS-P4C2；WO 2020/106946的I；WO 2020/106946的I；和WO 2021/113777的 (1)、(2)、(3) 或 (4)。示例性脂質還包括WO 2021/113777的表1-16中任一個的脂質。

【0424】 在一些實施方式中，可電離脂質係MC3 (6Z,9Z,28Z,3 lZ)-三十七烷-6,9,28,3 l-四烯-l9-基-4-(二甲基胺基)丁酸酯（DLin-MC3-DMA或MC3），例如，如WO 2019051289A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例9中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係脂質ATX-002，例如，如WO 2019051289A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例10中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係(l3Z,l6Z)-A,A-二甲基-3-壬基二十二-l3, l6-二烯-l-胺（化合物32），例如，如WO 2019051289 A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例11中所述。在一些實施方式中，可電離脂質係化合物6或化合物22，例如，如WO 2019051289 A9（藉由援引以其全文併入本文）的實例12中所述。

【0425】 示例性非陽離子脂質包括但不限於二硬脂醯-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂醯磷脂醯膽鹼（DSPC）、二油醯磷脂醯膽鹼（DOPC）、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼（DPPC）、二油醯磷脂醯膽鹼（DOPG）、二棕櫚醯磷脂醯甘油（DPPG）、二油醯磷脂醯乙醇胺（DOPE）、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼（POPC）、棕櫚醯油醯磷脂醯乙醇胺（POPE）、二油醯-磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺甲基)-環己烷-1-甲酸酯（DOPE-mal）、二棕櫚醯磷脂醯乙醇胺（DPPE）、二肉豆蔻醯磷酸乙醇胺（DMPE）、二硬脂醯-磷脂醯-乙醇胺（DSPE）、單甲基-磷脂醯乙醇胺（諸如16-O-單甲基PE）、二甲基-磷脂醯乙醇胺（諸如16-O-二甲基PE）、l8-l-反式PE、l-硬脂醯-2-油醯-磷脂醯乙醇胺（SOPE）、氫化大豆磷脂醯膽鹼（HSPC）、卵磷脂醯膽鹼（EPC）、二油醯磷脂醯絲胺酸（DOPS）、神經鞘磷脂（SM）、二肉豆蔻醯磷脂醯膽鹼（DMPC）、二肉豆蔻醯磷脂醯甘油（DMPG）、二硬脂醯磷脂醯甘油（DSPG）、二芥醯基磷脂醯膽鹼（DEPC）、棕櫚醯油醯磷脂醯甘油

（POPG）、二反油烯醯-磷脂醯乙醇胺（DEPE）、卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂（ESM）、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、雙十六烷基磷酸、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼或其混合物。應當理解，也可以使用其他二醯基磷脂醯膽鹼和二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。該等脂質中的醯基基團較佳的是為源自具有C10-C24碳鏈的脂肪酸的醯基基團，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。在某些實施方式中，另外的示例性脂質包括但不限於藉由援引併入本文的Kim等人(2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386描述的那些。在一些實施方式中，這樣的脂質包括被發現改善mRNA肝轉染的植物脂質（例如，DGTS）。

【0426】適用於脂質奈米顆粒中的非陽離子脂質之其他實例包括但不限於非磷脂質，例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙醯基棕櫚酸酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸鹽、烷基-芳基硫酸鹽、聚乙氧基化脂肪酸醯胺、雙十八烷基二甲基溴化銨、神經醯胺、鞘磷脂等。其他非陽離子脂質在WO 2017/099823或美國專利公開US 2018/0028664中有描述，其內容藉由援引以其全文併入本文。

【0427】在一些實施方式中，非陽離子脂質係油酸或藉由援引以其全文併入的US 2018/0028664的式I、II或IV之化合物。非陽離子脂質可以占例如脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-30%（莫耳）。在一些實施方式中，非陽離子脂質含量係脂質奈米顆粒中存在的總脂質的5%-20%（莫耳）或10%-15%（莫耳）。在實施方式中，可電離脂質與中性脂質的莫耳比為約2：1至約8：1（例如，約2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1或8：1）。

【0428】在一些實施方式中，脂質奈米顆粒不包括任何磷脂。

【0429】在一些方面，脂質奈米顆粒可進一步包括如固醇的組分以提供膜

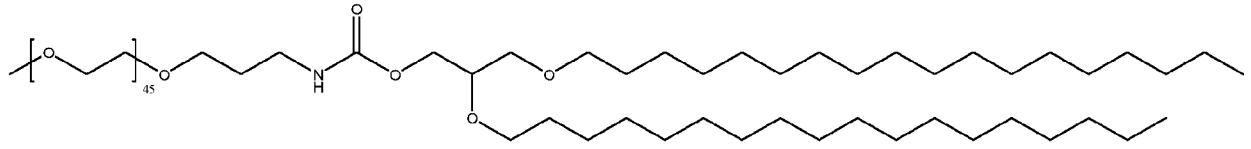
完整性。可用於脂質奈米顆粒中的一種示例性固醇係膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，如5a-膽甾烷醇、53-糞甾烷醇、膽甾醇基-(2'-羥基)-乙基醚、膽甾醇基-(4'-羥基)-丁基醚和6-酮膽甾烷醇；非極性類似物，諸如5a-膽甾烷、膽甾烯酮、5a-膽甾烷酮、5p-膽甾烷酮和膽甾醇癸酸酯；及其混合物。在一些實施方式中，膽固醇衍生物係極性類似物，例如，膽甾醇基-(4'-羥基)-丁基醚。示例性的膽固醇衍生物在PCT公開W0 2009/127060和美國專利公開US 2010/0130588中有描述，其各自藉由援引以其全文併入本文。

【0430】 在一些實施方式中，提供膜完整性的組分，如固醇，可以包括脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-50%（莫耳）（例如，0%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%或40%-50%）。在一些實施方式中，此類組分係脂質奈米顆粒的總脂質含量的20%-50%（莫耳）、30%-40%（莫耳）。

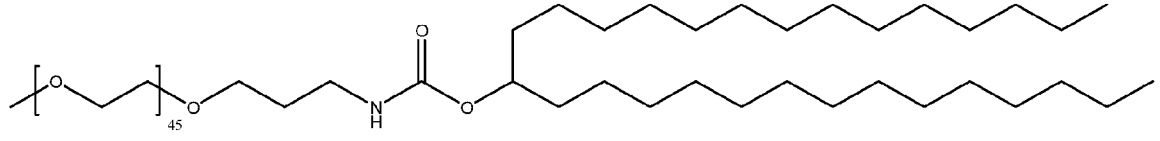
【0431】 在一些實施方式中，脂質奈米顆粒可包括聚乙二醇（PEG）或軛合的脂質分子。通常，該等用於抑制脂質奈米顆粒的聚集和/或提供空間穩定。示例性的軛合脂質包括但不限於PEG-脂質軛合物、聚噁唑啉（POZ）-脂質軛合物、聚醯胺-脂質軛合物（諸如ATTA-脂質軛合物）、陽離子聚合物脂質（CPL）軛合物及其混合物。在一些實施方式中，軛合脂質分子係PEG-脂質軛合物，例如(甲氧基聚乙二醇)軛合脂質。

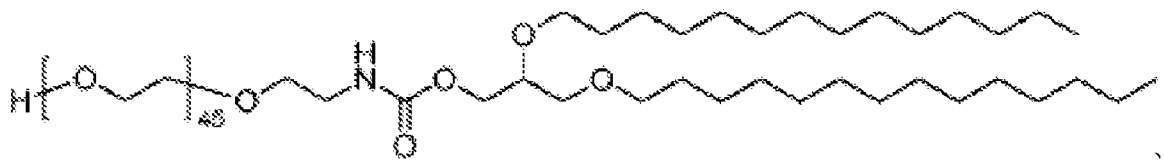
【0432】 示例性的PEG-脂質軛合物包括但不限於PEG-二醯基甘油（DAG）（諸如l-(單甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻醯甘油（PEG-DMG））、PEG-二烷氧基丙基（DAA）、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺（Cer）、聚乙二醇化磷脂醯乙醇胺（PEG-PE）、PEG琥珀酸二醯基甘油（PEGS-DAG）（諸如4-0-(2',3'-二(十四烷醯氧基)丙基-l-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯（PEG-S-DMG））、PEG二烷氧基丙基胺基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-l,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺鈉鹽或其混合物。另外的示例性PEG-脂質軛合物描述於以下中：

例如，US 5,885,613、US 6,287,591、US 2003/0077829、US 2003/0077829、US 2005/0175682、US 2008/0020058、US 2011/0117125、US 2010/0130588、US 2016/0376224、US 2017/0119904、US 2018/0028664和WO 2017/099823，所有該等的內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-脂質係US 2018/0028664的式III、III-a-I、III-a-2、III-b-1、III-b-2或V之化合物，其內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-脂質具有US 20150376115或US 2016/0376224的式II，兩者的內容藉由援引以其全文併入本文。在一些實施方式中，PEG-DAA軛合物可為例如PEG-二月桂基氧基丙基、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基、PEG-二棕櫚基氧基丙基或PEG-二硬脂基氧基丙基。PEG-脂質可為以下的一或多種：PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕櫚醯甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油脂醯胺、PEG-二肉豆蔻基甘油脂醯胺、PEG-二棕櫚醯甘油脂醯胺、PEG-二硬脂基甘油脂醯胺、PEG-膽固醇（l-[8'-(膽甾-5-烯-3[β]-氧基)甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺基甲醯基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)）、PEG-DMB（3,4-雙十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚）和1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些實施方式中，PEG-脂質包括PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些實施方式中，PEG-脂質包括選自以下的結構：

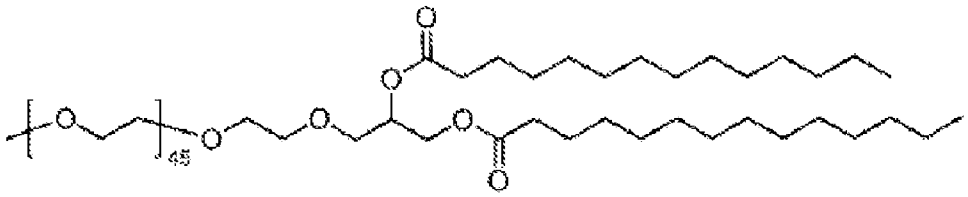


，





、和



。

【0433】在一些實施方式中，與PEG以外的分子軛合的脂質也可用於代替PEG-脂質。例如，聚噁唑啉（POZ）-脂質軛合物、聚醯胺-脂質軛合物（諸如ATTA-脂質軛合物）和陽離子聚合物脂質（GPL）軛合物可用於代替PEG-脂質或與PEG-脂質一起使用。

【0434】示例性的軛合脂質（即PEG-脂質、（POZ）-脂質軛合物、ATTA-脂質軛合物和陽離子聚合物-脂質）在WO 2019051289A9的表2中列出的PCT和LIS專利申請（所有該等的內容藉由援引以其全文併入本文）中描述。

【0435】在一些實施方式中，PEG或軛合脂質可包括脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0%-20%（莫耳）。在一些實施方式中，PEG或軛合脂質的含量為脂質奈米顆粒中存在的總脂質的0.5%-10%或2%-5%（莫耳）。可電離脂質、非陽離子脂質、固醇和PEG/軛合脂質的莫耳比可以根據需要變化。例如，脂質顆粒可包括按組成物的莫耳或總重量計30%-70%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計0%-60%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計0%-30%的非陽離子脂質和按組成物的莫耳或總重量計1%-10%的軛合脂質。較佳的是，該組成物包括按組成物的莫耳或總重量計30%-40%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計40%-50%的膽固醇，以及按組成物的莫耳或總重量計10%-20%的非陽離子脂質。在一些其他實施方式中，組成物係按組成物的莫耳或總重量計50%-75%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計20%-40%的膽固醇，和按組成物的莫耳或總

重量計5%-10%的非陽離子脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計1%-10%的軛合脂質。該組成物可含有按組成物的莫耳或總重量計60%-70%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計25%-35%的膽固醇，以及按組成物的莫耳或總重量計5%-10%的非陽離子脂質。該組成物還可含有按組成物的莫耳或總重量計至多90%的可電離脂質和按組成物的莫耳或總重量計2%至15%的非陽離子脂質。該配製物也可為脂質奈米顆粒配製物，例如包括按組成物的莫耳或總重量計8%-30%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計5%-30%的非陽離子脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計0%-20%的膽固醇；按組成物的莫耳或總重量計4%-25%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計4%-25%的非陽離子脂質，按組成物的莫耳或總重量計2%至25%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計10%至35%的軛合脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計5%的膽固醇；或按組成物的莫耳或總重量計2%-30%的可電離脂質，按組成物的莫耳或總重量計2%-30%的非陽離子脂質，按組成物的莫耳或總重量計1%至15%的膽固醇，按組成物的莫耳或總重量計2%至35%的軛合脂質，以及按組成物的莫耳或總重量計1%-20%的膽固醇；或按組成物的莫耳或總重量計甚至高達90%的可電離脂質和按組成物的莫耳或總重量計2%-10%的非陽離子脂質，或按組成物的莫耳或總重量計甚至100%的陽離子脂質。在一些實施方式中，脂質顆粒配製物包括莫耳比為50 : 10 : 38.5 : 1.5的可電離脂質、磷脂、膽固醇和聚乙二醇化脂質。在一些其他實施方式中，脂質顆粒配製物包括莫耳比為60 : 38.5 : 1.5的可電離脂質、膽固醇和聚乙二醇化脂質。

【0436】在一些實施方式中，脂質顆粒包括可電離脂質、非陽離子脂質（例如磷脂）、固醇（例如膽固醇）和聚乙二醇化脂質，其中可電離脂質的脂質莫耳比的範圍為20至70莫耳%，目標為40-60，非陽離子脂質的莫耳百分比的範圍為在0至30，目標為0至15，固醇的莫耳百分比的範圍為20至70，目標為30至50，並

且聚乙二醇化脂質的莫耳百分比的範圍為1至6，目標為2至5。

【0437】在一些實施方式中，脂質顆粒包括莫耳比為50：10：38.5： 1.5的可電離脂質/非陽離子脂質/固醇/軛合脂質。

【0438】在一方面，本揭露提供了包括磷脂、卵磷脂、磷脂醯膽鹼和磷脂醯乙醇胺的脂質奈米顆粒配製物。

【0439】在一些實施方式中，還可以包括一或多種另外的化合物。那些化合物可以單獨投與，或者另外的化合物可以包括在本發明之脂質奈米顆粒中。換言之，除核酸或至少第二核酸之外，脂質奈米顆粒可含有不同於第一核酸的其他化合物。非限制性地，其他另外的化合物可以選自由以下組成之群組：小的或大的有機分子或無機分子、單糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、肽、蛋白質、其肽類似物和衍生物、肽模擬物、核酸、核酸類似物和衍生物、由生物材料製成的提取物，或其任何組合。

【0440】在一些實施方式中，LNP包括可生物降解的、可電離的脂質。在一些實施方式中，LNP包括(9Z,l2Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基 十八碳-9,l2-二烯酸酯，也稱為3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基 (9Z,l2Z)-十八碳-9,l2-二烯酸酯)或另一種可電離脂質。參見，例如WO 2019/067992、WO/2017/173054、WO 2015/095340和WO 2014/136086，以及其中提供的參考文獻的脂質。在一些實施方式中，在LNP脂質的上下文中術語陽離子和可電離係可互換的，例如，其中可電離脂質根據pH係陽離子的。

【0441】在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可以在數十nm和數百nm之間，例如藉由動態光散射（DLS）測量的。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可以為約40 nm至約150 nm，諸如約40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、

105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約50 nm至約100 nm、約50 nm至約90 nm、約50 nm至約80 nm、約50 nm至約70 nm、約50 nm至約60 nm、約60 nm至約100 nm、約60 nm至約90 nm、約60 nm至約80 nm、約60 nm至約70 nm、約70 nm至約100 nm、約70 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、約80 nm至約100 nm、約80 nm至約90 nm或約90 nm至約100 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約70 nm至約100 nm。在特定實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約80 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑可為約100 nm。在一些實施方式中，LNP配製物的平均LNP直徑範圍為約l mm至約500 mm、約5 mm至約200 mm、約10 mm至約100 mm、約20 mm至約80 mm、約25 mm至約60 mm、約30 mm至約55 mm、約35 mm至約50 mm，或約38 mm至約42 mm。

【0442】 在一些情況下，LNP可為相對均質的。多分散性指數可用於指示LNP的均質性，例如脂質奈米顆粒的粒度分佈。小的（例如，小於0.3）多分散性指數通常指示窄的粒度分佈。LNP的多分散性指數可為約0至約0.25，如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些實施方式中，LNP的多分散性指數可為約0.10至約0.20。

【0443】 LNP的ζ電位可用於指示組成物的電動電位。在一些實施方式中，ζ電位可以描述LNP的表面電荷。具有相對低電荷（正電荷或負電荷）的脂質奈米顆粒通常是期望的，因為更高電荷的物質可能不理想地與體內的細胞、組織和其他元素相互作用。在一些實施方式中，LNP的ζ電位可為約-10 mV至約+20 mV、約-10 mV至約+15 mV、約-10 mV至約+10 mV、約-10 mV至約+5 mV、約-10 mV至約0 mV、約-10 mV至約-5 mV、約-5 mV至約+20 mV、約-5 mV至約+15 mV、

約-5 mV至約+10 mV、約-5 mV至約+5 mV、約-5 mV至約0 mV、約0 mV至約+20 mV、約0 mV至約+15 mV、約0 mV至約+10 mV、約0 mV至約+5 mV、約+5 mV至約+20 mV、約+5 mV至約+15 mV或約+5 mV至約+10 mV。

【0444】 蛋白質和/或核酸的封裝效率描述了相對於所提供的初始量，在製備後被封裝或以其他方式與LNP締合的蛋白質和/或核酸的量。理想的封裝效率係高的（例如，接近100%）。封裝效率可以例如藉由比較在用一或多種有機溶劑或洗滌劑破碎脂質奈米顆粒之前和之後含有脂質奈米顆粒的溶液中蛋白質或核酸的量來測量。陰離子交換樹脂可用於測量溶液中游離蛋白質或核酸（例如RNA）的量。螢光可用於測量溶液中游離蛋白質和/或核酸（例如RNA）的量。對於本文所述之脂質奈米顆粒，蛋白質和/或核酸的封裝效率可為至少50%，例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少80%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少90%。在一些實施方式中，封裝效率可為至少95%。

【0445】 LNP可以視需要包括一層或多層包衣。在一些實施方式中，LNP可以配製在具有包衣的膠囊、膜或片劑中。包含本文所述之組成物的膠囊、膜或片劑可具有任何可用的尺寸、拉伸強度、硬度或密度。

【0446】 另外的示例性脂質、配製物、方法和LNP表徵由WO 2020/061457、WO 2021/113777和 WO 2021226597傳授，其各自藉由援引以其全文併入本文。其他示例性脂質、配製物、方法和LNP表徵由Hou等人 Lipid nanoparticles for mRNA delivery [用於mRNA遞送的脂質奈米顆粒].Nat Rev Mater [自然評論材料] (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0傳授，其藉由援引以其全文併入本文（參見例如Hou等人的圖2的示例性脂質和脂質衍生物）。

【0447】 在一些實施方式中，使用Lipofectamine MessengerMax（賽默飛世

爾公司（Thermo Fisher））或TransIT-mRNA轉染試劑（米盧斯生物公司（Mirus Bio））進行體外或離體細胞脂質轉染。在某些實施方式中，使用GenVoy_ILM可電離脂質混合物（精密奈米系統（Precision NanoSystems））配製LNP。在某些實施方式中，使用2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧戊環（DLin-KC2-DMA）或二亞油烯基甲基-4-二甲基胺基丁酸酯（DLin-MC3-DMA或MC3）配製LNP，其配製和體內用途在Jayaraman等人 Angew Chem Int Ed Engl [德國應用化學] 51(34):8529-8533 (2012)中傳授，其藉由援引以其全文併入本文。

【0448】 優化用於遞送CRISPR-Cas系統（例如Cas9-gRNA RNP、gRNA、Cas9 mRNA）的LNP配製物在兩者均藉由援引併入的WO 2019067992和WO 2019067910中有描述，並且可用於遞送本文所述之環狀多核糖核苷酸和線性多核糖核苷酸。

【0449】 可用於遞送核酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）的另外的特定LNP配製物在兩者均藉由援引併入的US 8158601和US 8168775中有描述，其包括帕替西蘭（patisiran）中使用的以名稱ONPATTRO銷售的配製物。

【0450】 在實施方式中，編碼本文所述之免疫原或多肽的至少一部分（例如抗原部分）的多核糖核苷酸（例如環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）在LNP中配製，其中：(a) LNP包含陽離子脂質、中性脂質、膽固醇和PEG脂質，(b) LNP具有80 nm至160 nm的平均粒度，並且 (c) 多核糖核苷酸包含：(i) 5'-帽結構；(ii) 5'-UTR；(iii) N1-甲基-假尿苷、胞嘧啶、腺嘌呤和鳥嘌呤；(iv) 3'-UTR；以及 (v) 聚-A區域。在實施方式中，配製在LNP中的多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）係疫苗。

【0451】 多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）LNP的示例性給藥可包括約0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10或100 mg/kg（RNA）。在一些實施方式中，本文所述之多核糖核苷酸（例如，環狀多

核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）免疫原性組成物的劑量為30-200 mcg，例如，30 mcg、50 mcg、75 mcg、100 mcg、150 mcg或200 mcg。包括多核糖核苷酸（例如，環狀多核糖核苷酸、線性多核糖核苷酸）的AAV的示例性給藥可包括約10^{11}、10^{12}、10^{13}和10^{14} vg/kg的MOI。

套組

【0452】 在一些方面，本揭露提供了套組。在一些實施方式中，套組包括(a) 本文所述之環狀多核糖核苷酸、免疫原性組成物或藥物組成物，以及視需要(b) 資訊材料。在一些實施方式中，套組進一步包含本文所述之佐劑，該佐劑可以在單獨的組成物中提供，以作為限定給藥方案的一部分與環狀多核糖核苷酸、免疫原性組成物或藥物組成物組合投與。資訊材料可為描述性的、指導性的、行銷性的或係與本文所述方法和/或用於本文所述方法的藥物組成物或環狀多核糖核苷酸的用途相關的其他材料。藥物組成物或環狀多核糖核苷酸可包含用於單次投與（例如，單劑量形式）的材料，或可包含用於多次投與（例如，「多劑量」套組）的材料。

【0453】 套組的資訊材料的形式不受限制。在一個實施方式中，資訊材料可包括關於藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥的生產的資訊，藥物組成物、藥物原料藥或藥物成品藥的分子量，濃度，有效期，批次或生產地點資訊等。在一個實施方式中，資訊材料涉及用於投與藥物組成物劑型之方法。在一個實施方式中，資訊材料涉及用於投與環狀多核糖核苷酸劑型之方法。

【0454】 除了本文所述之藥物組成物和環狀多核糖核苷酸的劑型之外，該套組還可包括其他成分，如溶劑或緩衝液、穩定劑、防腐劑、調味劑（例如，苦味拮抗劑或增甜劑）、香料、染料或著色劑（例如用於將套組中的一或多種組分著色或染色）、或其他化妝品成分、和/或用於治療本文所述病症或障礙的第二藥劑。可替代地，套組中可包括其他成分，但在與本文所述藥物組成物或環狀多

核糖核苷酸不同的組成物或容器中。在這樣的實施方式中，套組可包括將本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）和其他成分混合，或者將本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）與其他成分一起使用的說明書。

【0455】 在一些實施方式中，將套組的組分儲存在惰性條件下（例如，在氮氣或另一種惰性氣體諸如氬氣下）。在一些實施方式中，將套組的組分儲存在無水條件下（例如，用乾燥劑）。在一些實施方式中，將組分儲存在遮光容器，如琥珀色小瓶中。

【0456】 本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）的劑型可以以任何形式，例如液體、乾燥或凍乾形式提供。較佳的是本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）係基本上純的和/或無菌的。當在液體溶液中提供本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）時，液體溶液較佳的是為水溶液，其中較佳的是無菌水溶液。當本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）以乾燥形式提供時，通常藉由添加合適的溶劑來重構。套組中可以視需要提供溶劑，例如無菌水或緩衝液。

【0457】 該套組可包括用於含有本文所述劑型的組成物的一或多個容器。在一些實施方式中，套組含有用於組成物和資訊材料的單獨容器、分隔物或隔室。例如，藥物組成物或環狀多核糖核苷酸可以裝在瓶子、小瓶或注射器中，並且資訊材料可以裝在塑膠套管（plastic sleeve）或包中。在其他實施方式中，套組的單獨元件包含在單個未分開的容器中。例如，本文所述之藥物組成物或核酸分子（例如，環狀多核糖核苷酸）的劑型包含在瓶、小瓶或注射器中，其上附有標籤形式的資訊材料。在一些實施方式中，套組包括多個（例如，一包）單獨的容器，每個容器含有一或多個單位劑型的本文所述之藥物組成物或環狀多核糖核苷酸。例如，該套組包括多個注射器、安瓿、箔包或泡罩包裝，每個含有單個

單位劑量的本文所述之劑型。

【0458】 套組的容器可為氣密的、防水的（例如，不受水分或蒸發變化的影響）和/或不透光的。

【0459】 該套組視需要包括適用於劑型的使用的裝置，例如注射器、移液管、鑷子、量勺、拭子（例如，棉簽或木簽）或任何這樣的裝置。

【0460】 本發明之套組可包括不同強度的劑型，以向受試者提供適用於本文所述之起始期方案、誘導期方案或維持期方案中的一或多個的劑量。可替代地，套組可包括刻痕片劑，以允許使用者根據需要投與分劑量。

實例

【0461】 提出旨在說明而非限制本揭露之以下實例，以向熟悉該項技術者提供可以如何使用、實現和評價本文所述之組成物和方法的描述。該等實例旨在僅是本揭露之示例，而無意限制發明人視為其發明的內容範圍。

實例1：分泌性VZV免疫原的體外表現

【0462】 此實例證明哺乳動物細胞中由環狀RNA表現分泌性VZV免疫原。

【0463】 將環狀RNA設計為包括內部核糖體進入位點（IRES）和編碼分泌性VZV免疫原的核苷酸序列。在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體設計為包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3 IRES（SEQ ID NO:113）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。ORF包括高斯螢光素酶（Gluc）分泌訊息序列、VZV gE核苷酸序列和編碼HiBiT肽標籤（具有VSGWRLFKKIS（SEQ ID NO: 123）的序列以及GGGGS肽連接子（SEQ ID NO: 112））的核苷酸序列。

【0464】 在此實例中，使用本文所述之方法藉由自剪接來產生環狀RNA。在存在7.5 mM的NTP的情況下，藉由體外轉錄使用T7 RNA聚合酶從包括以上列

出的模體的DNA模板合成未經修飾的線性RNA。藉由用DNA酶處理除去模板DNA。用RNA純化套組（新英格蘭生物學實驗室公司（New England Biolabs），T2050）純化合成的線性RNA。自剪接發生在轉錄期間；不需要另外的反應。藉由尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳（尿素-PAGE）或逆相柱層析法來純化編碼VZV gE的環狀RNA。

【0465】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（2皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔200,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照（空白）。還使用具有插入的分泌性VZV gE核苷酸序列的質體作為對照（Sec gE質體）。在18小時時收集上清液，並使用gE特異性ELISA測量表現。將ELISA板用100 uL包被緩衝液中的5 μg/mL的抗gE抗體包被，並在4°C下孵育過夜。將轉染的細胞上清液裝載到板中，並在室溫下孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次。將生物素化的抗gE單株抗體（9C8）以1 : 1000的稀釋度添加到板中，並在室溫下孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次。將HRP軛合的鏈黴親和素以1 : 10,000的稀釋度添加到板中，並在室溫下孵育30分鐘，隨後用TBS-T洗滌四次

【0466】 **圖6**示出了編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA在體外成功翻譯。

實例2：非分泌性VZV免疫原的體外表現

【0467】 此實例證明哺乳動物細胞中由環狀RNA表現非分泌性VZV免疫原。

【0468】 將環狀RNA設計為包括IRES和編碼跨膜VZV免疫原的核苷酸序列。在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體#1、#2和#3設計成包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3內部核糖體進入位點（IRES）（SEQ ID NO:113）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。將構建體#4設計為包括聚A50作為間隔子元件，以及EV71 IRES（SEQ ID

NO:115）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。將ORF設計為包括VZV跨膜gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子(「G4S」揭示為SEQ ID NO: 112)的HiBiT肽標籤的核苷酸序列。在此實例中，產生了四種不同的構建體，如表4中所述之，每種構建體具有不同的VZV跨膜gE核苷酸序列（SEQ ID NO: 124-128）。如實例1中所述產生環狀RNA。

【0469】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（2皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔20,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照。轉染後24小時收穫細胞，將細胞進行活/死染色，並用抗gE抗體（9C8）探測，隨後用PE-抗小鼠抗體探測。在24小時時藉由流動式細胞測量術測量gE表現。

【0470】 **圖7**示出了在HEK293T細胞的細胞表面上檢測到來自所有編碼跨膜gE的環狀RNA的中至高水平的gE表現。

[表4]

SEQ ID NO:	核酸序列
124	atgggcgtcaaggtcctgttcgccctgatctgcatcgccgtggccgaggccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccaccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgactgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacgg

	cggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggagg ccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagccc ccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctggaccggcgg cctggcc*ggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc*
125	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagt*ggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag agcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggagg agttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccgg
126	atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcg ggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacag cgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccc cggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaa cggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccc cagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtg cggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagc acaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctacc ggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccc cctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagc gacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgaccc cccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgca cctgcagtacaagatccacgaggccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgc

	ggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccac ctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccac atggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgt acgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcg aggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcacc agcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgcca agcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacga cttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcgggagccacggcggcagctcttacacc gtgtacatcgacaagacccgg*gggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc*
127	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggaggg*agtggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccaccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaa g
128	atg*gtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggaggg*agtggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctg atgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggc gagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgccc acgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgccc aggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtgga ccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag gaaaaccaccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcc tgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccc

	tggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtga cctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccccttcgacc tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccc cccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaa ctgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc ggcaccaccctgaagttcgtggacaccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggc cgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccc cagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggc ctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag agcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggagg agttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccgg

實例3：具有不同IRES元件的非分泌性VZV免疫原的體外表現

【0471】此實例證明哺乳動物細胞中由具有不同IRES元件的環狀RNA表現跨膜VZV gE免疫原。

【0472】在此實例中，創建了一組編碼跨膜VZV gE的環狀RNA，每個RNA具有不同的IRES。將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。多核苷酸有效載荷包括IRES和VZV跨膜gE核苷酸序列，以及編碼具有G4S肽連接子的HiBiT肽標籤的核苷酸序列的組合，如表5中提供的。

[表5]：

IRES	IRES核酸序列	VZV Tm gE核酸序列
經修飾的CVB3	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGATCCCACCCACAGGCC CATTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTT GTGCGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAACTGTAAC TTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGG CACACCAGCCACGTTTTGATCAAGCACTTCTGTTAC CCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTG AAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTCG AAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTACCCCAGTGTAGATCAGGTCGATG AGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTG GCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGAAACCCATG GGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTAT TGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCG GCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCA GAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCG	ATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGGTAT TGATGGGGTTCGGAATTATCACGGGAACGTTGCG TATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCGAT ACGATGATTTTCACATCGATGAAGACAAACTGGAT ACAAACTCCGTATATGAGCCTTACTACCATTCAGA TCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGGAGAG TCTTCGCGAAAAGCGTACGATCATAACTCACCTTA TATATGGCCACGTAATGATTATGATGGATTTTTAGA GAACGCACACGAACACCATGGGGTGTATAATCAG GGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTTAATGC AACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGG GGACGATACGGGCATCCACGTTATCCCTACGTTA AACGGCGATGACAGACATAAAATTGTAAATGTGGA CCAACGTCAATACGGTGACGTGTTTAAAGGAGATC TTAATCCAAAACCCCAAGGCCAAAGACTCATTGAG

	GAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATT CCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATC GTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGAC TAATAGAGCTATTATATATCCCTTTGTTGGGTTTATA CCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAAACATTACAATTCA TTGTTAAGTTGAATACAGCAAC（SEQ ID NO: 113）	GTGTCAGTGGAAGAAAATCACCCGTTTACTTTACG CGCACCGATTCAGCGGATTTATGGAGTCCGGTAC ACCGAGACTTGGAGCTTTTTGCCGTCATTAACCTG TACGGGAGACGCAGCGCCCGCCATCCAGCATATA TGTTTAAAACATACAACATGCTTTCAAGACGTGGT GGTGGATGTGGATTGCGCGGAAAATACTAAAGAG GATCAGTTGGCCGAAATCAGTTACCGTTTTCAAGG TAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTA AACACGAGCACACTGTTTGATGAACTCGAATTAGA CCCCCCCGAGATTGAACCGGGTGTCTTGAAAGTA CTTCGGACAGAAAAACAATACTTGGGTGTGTACAT TTGGAACATGCGCGGCTCCGATGGTACGTCTACC TACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATG AAAAAACAAGAAACCCTACGCCCGCAGTAACTCCT CAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATATGTGGAATTA CCACTCGCATGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTA GCTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAGATACATGAA GCGCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTGGTTGTATGT CCCCATCGATCCTACATGTCAACCAATGCGGTTAT ATTCTACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACCCCAA TGCCTCTCTCATATGAATTCCGGTTGTACATTTAC CTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGTTGCAAGCACA GTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACAC CGCATATTGTCTGGGAATATCTCATATGGAGCCTA GCTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGGCACCAC GTTAAAGTTTGTAGATACACCCGAGAGTTTGTCGG GATTATACGTTTTTGTGGTGTATTTTAACGGGCAT GTTGAAGCCGTAGCATACACTGTTGTATCCACAGT AGATCATTTTGTAAACGCAATTGAGGAGCGTGGAT TTCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGGCGACTAC TAAACCCAAGGAAATTACCCCCGTAAACCCCGGA ACGTCACCACTTCTACGATATGCCGCATGGACCG GAGGGCTTGCAGCAGTAGTACTTTTATGTCTCGTA ATATTTTTAATCTGTACGGCTAAACGAATGAGGGT TAAAGCCGCCAGGGTAGACAAGTGA（SEQ ID NO: 121）
EMCV	ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGG TGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCC CCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCG GAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCC AAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGG CACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG	SEQ ID NO: 121

	TGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCA ACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATG CTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAG GCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGA AAAACACGATGATAATA （SEQ ID NO: 114）	
EV71	TTAAAACAGCTGTGGGTTGTCACCCACCCACA GGGTCCACTGGGCGCTAGTACACTGGTATCTC GGTACCTTTGTACGCCTGTTTTATACCCCCTCC CTGATTTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACCAG ATCAATAGTAGGTGTGACATACCAGTCGCATCT TGATCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCGAGT ATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAA AACGTCCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAA GCCTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTT TCGCTCAGCACTCCCCCCGTGTAGATCAGGTC GATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGT GGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCTATGG GGTAACCCATAGGACGCTCTAATACGGACATG GCGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTC CTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTG CGGAGCACATACCCTTAATCCAAAGGGCAGTG TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGA CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTTATTCTTG TATTGGCTGCTTATGGTGACAATTAAAGAATTG TTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCAGTG TCAAACAGAGCTATTGTATATCTCTTTGTTGGA TTCACACCTCTCACTCTTGAAACGTTACACACC CTCAATTACATTATACTGCTGAACACGAAGCGG CCACC（SEQ D NO: 115）	SEQ ID NO: 121
HRV-2（人鼻病毒89型（HRV89））	TTAAAACTGGGAGTGGGTTGTTCCCACTCACTC CACCCATGCGGTGTTGTACTCTGTTATTACGGT AACTTTGTACGCCAGTTTTTCCCACCCTTCCCC ATAATGTAACTTAGAAGTTTGTACAATATGACC AATAGGTGACAATCATCCAGACTGTCAAAGGT CAAGCACTTCTGTTTCCCCGGTCAATGAGGAT ATGCTTTACCCAAGGCAAAAACCTTAGAGATCG TTATCCCCACACTGCCTACACAGAGCCCAGTA CCATTTTTGATATAATTGGGTTGGTCGCTCCCT GCAAACCCAGCAGTAGACCTGGCAGATGAGG CTGGACATTCCCCACTGGCGACAGTGGTCCAG	SEQ ID NO: 121

	CCTGCGTGGCTGCCTGCTCACCCTTCTTGGGT GAGAAGCCTAATTATTGACAAGGTGTAAAGAG CCGCGTGTGCTCAGTGTGCTTCCTCCGGCCCC TGAATGTGGCTAACCTTAACCCTGCAGCCGTT GCCCATAATCCAATGGGTTTGCGGTCGTAATG CGTAAGTGCGGGATGGGACCAACTACTTTGGG TGTCCGTGTTTCCTGTTTTTCTTTTGATTGCATT TTATGGTGACAATTTATAGTGTATAGATTGTCAT C（SEQ ID NO: 116）	
AEV	TTTGAAAGAGGCCTCCGGAGTGTCCGGAGGCT CTCTTTCGACCCAACCCATACTGGGGGGTGTG TGGGACCGTACCTGGAGTGCACGGTATATATG CATTCCCGCATGGCAAGGGCGTGCTACCTTGC CCCTTGACGCATGGTATGCGTCATCATTTGCCT TGGTTAAGCCCCATAGAAACGAGGCGTCACGT GCCGAAAATCCCTTTGCGTTTCACAGAACCATC CTAACCATGGGTGTAGTATGGGAATCGTGTAT GGGGATGATTAGGATCTCTCGTAGAGGGATAG GTGTGCCATTCAAATCCAGGGAGTACTCTGGC TCTGACATTGGGACATTTGATGTAACCGGACCT GGTTCAGTATCCGGGTTGTCCTGTATTGTTACG GTGTATCCGTCTTGGCACACTGAAAGGGTATTT TTGGGTAATCCTTTCCTACTGCCTGATAGGGTG GCGTGCCCGGCCACGAGAGATTAAGGGTAGC AATTTAAACGCCACC（SEQ ID NO: 122）	SEQ ID NO: 121
愛知病毒（Aichivirus）	TTTGAAAAGGGGGTGGGGGGGCCTCGGCCCC CTCACCCTCTTTTCCGGTGGTCTGGTCCCGGA CCACCGTTACTCCATTCAGCTTCTTCGGAACCT GTTCGGAGGAATTAAACGGGCACCCATACTCC CCCCACCCCCCTTTTGTAACTAAGTATGTGTGC TCGTGATCTTGACTCCCACGGAACGGACCGAT CCGTTGGTGAACAAACAGCTAGGTCCACATCC TCCCTTCCCCTGGGAGGGCCCCCGCCCTCCC ACATCCTCCCCCCAGCCTGACGTATCACAGGC TGTGTGAAGCCCCCGCGAAAGCTGCTCACGTG GCAATTGTGGGTCCCCCCTTCATCAAGACACC AGGTCTTTCCTCCTTAAGGCTAGCCCCGGCGT GTGAATTCACGTTGGGCAACTAGTGGTGTCAC TGTGCGCTCCCAATCTCGGCCGCGGAGTGCT GTTCCCCAAGCCAAACCCCTGGCCCTTCACTA TGTGCCTGGCAAGCATATCTGAGAAGGTGTTC	SEQ ID NO: 121

	CGCTGTGGCTGCCAACCTGGTGACAGGTGCC CCAGTGTGCGTAACCTTCTTCCGTCTCCGGAC GGTAGTGATTGGTTAAGATTTGGTGTAAGGTTC ATGTGCCAACGCCCTGTGCGGGATGAAACCTC TACTGCCCTAGGAATGCCAGGCAGGTACCCCA CCTCCGGGTGGGATCTGAGCCTGGGCTAATTG TCTACGGGTAGTTTCATTTCCAATCCTTTTATGT CGGAGTCGCCACC（SEQ ID NO: 117）	
克羅病毒（Crohivirus）B	GTATAAGAGACAGGTGTTTGCCTTGTCTTCGGA CTGGCATCTTGGGACCAACCCCCCTTTTCCCC AGCCATGGGTTAAATGGCAATAAAGGACGTAA CAACTTTGTAACCATTAAGCTTTGTAATTTTGTA ACCACTAAGCTTTGTGCACATAATGTAACCATC AAGCTTGTTAGTCCCAGCAGGAGGTTTGCATG CTTGTAGCCGAAATGGGGCTCGACCCCCCATA GTAGGATACTTGATTTTGCATTCCATTGTGGAC CTGCAAACTCTACACATAGAGGCTTTGTCTTGC ATCTAAACACCTGAGTACAGTGTGTACCTAGAC CCTATAGTACGGGAGGACCGTTTGTTTCCTCA ATAACCCTACATAATAGGCTAGGTGGGCATGC CCAATTTGCAAGATCCCAGACTGGGGGTCGGT CTGGGCAGGGTTAGATCCCTGTTAGCTACTGC CTGATAGGGTGGTGCTCAACCATGTGTAGTTT AAATTGAGCTGTTCATATACCGCCACC（SEQ ID NO: 118）	SEQ ID NO: 121
埃可病毒（Echovirus）11	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCCATCCACAG GGCCCACTGGGCGCCAGCACTCTGGTATTGC GGTACCTTAGTGCGCCTGTTTTATATACCCGTC CCCCAAACGTAACTTAGACGCATGTCAACGAA GACCAATAGTAAGCGCAGCACACCAGCTGTGT TCCGGTCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACCGA GTATCAATAAGCTACTCACGTGGCTGAAGGAG AAAACGTTCGTTACCCGACCAATTACTTCAAGA AACCTAGTAACACCATGAAGGTTGCGCAGTGT TTCGCTCCGCACAACCCCAGTGTAGATCAGGT CGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGTGACCG TGGCGGTGGCTGCGCTGGCGGCCTGCCCATG GGGAAACCCATGGGACGCTTCAATACTGACAT GGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAATTGGTAGT CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACT GCGGAGCAGATACCCACACACCAGTGGGCAG	SEQ ID NO: 121

	TCTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACC GACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTCTTTATCC TTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGA TTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCG GTGACAAATAGAGCAATTGTGTATTTGTTTGTT GGTTTCGTGCCATTAAATTACAAGGTTCTAAAC ACCCTTAATCTTATTATAGCATTCAACACAACAA AGCCACC（SEQ ID NO: 119）	
經修飾的CVB3	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121

【0473】 如實例1中所述產生環狀RNA。

【0474】 根據製造商的說明，使用Lipofectamine MessengerMax（英傑公司（Invitrogen），LMRNA015）將環狀RNA（1.0皮莫耳）轉染到HEK293T細胞（96孔板中無血清培養基中，每孔100,000個細胞）中。使用單獨的MessengerMax作為對照。轉染後24小時收穫細胞，並如上所述測量gE表現。

【0475】 **圖8**示出了在HEK293T細胞的細胞表面檢測到來自每個編碼跨膜gE的環狀RNA（除了含有AEV IRES的環狀RNA）的VZV gE免疫原。

實例4：在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0476】 此實例證明在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原。

【0477】 將環狀RNA設計為包括IRES和編碼分泌性VZV免疫原或非分泌性VZV免疫原（例如，跨膜VZV免疫原）的核苷酸序列。

【0478】 在此實例中，將DNA構建體設計為包括IRES、多核苷酸負載物和間隔子元件。將構建體設計成包括聚A50作為間隔子元件，以及經修飾的CVB3內部核糖體進入位點（IRES）（SEQ ID NO:48）和ORF的組合作為多核苷酸負載物。對於編碼分泌性VZV免疫原的DNA構建體，將ORF設計為包括分泌訊息序列、VZV gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子（SEQ ID NO: 113）的HiBiT肽標籤的核苷酸序列。對於編碼非分泌性VZV免疫原的DNA構建體，將ORF設

計為包括VZV跨膜gE核苷酸序列和編碼具有G4S肽連接子（SEQ ID NO: 112）的HiBiT肽標籤（SEQ ID NO: 123）的核苷酸序列。

【0479】 在7.5 mM NTP存在下使用T7 RNA聚合酶藉由體外轉錄從DNA模板合成未經修飾的線性RNA。藉由用DNA酶處理20分鐘去除模板DNA。用RNA純化套組（新英格蘭生物學實驗室公司（New England Biolabs），T2050）純化合成的線性RNA。自剪接發生在轉錄期間；不需要另外的反應。藉由尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳（尿素-PAGE）或逆相柱層析法來純化編碼VZV gE的環狀RNA。

【0480】 用脂質奈米顆粒配製純化的環狀RNA以獲得環狀RNA製劑。簡言之，將環狀RNA在pH＝4的25 mM乙酸鹽緩衝液中稀釋（通過0.2 μm過濾器過濾）至0.2 μg/μL的濃度。首先藉由將可電離脂質（例如ALC0315）、膽固醇、DSPC和DMG-PEG2000以50/38.5/10/1.5 mol%的莫耳比溶解在乙醇中（通過0.2 um無菌過濾器過濾）來配製脂質奈米顆粒（LNP）。最終可電離脂質/RNA重量比為6/1 w/w。使用微流體系統將脂質和RNA溶液在微混合器晶片中混合，流速比為3/1緩衝液/乙醇且總流速為1 ml/min。然後將LNP在pH＝7.4的PBS中透析3小時以去除乙醇。根據需要，可使用截止值為100 kDa的Amicon離心過濾器將LNP濃縮至所需的RNA濃度。

【0481】 在第0天（初免）和第28天（加強）經由肌內注射使每組三隻Balb/C小鼠（n＝3）接受10 μg或50 μg劑量的環狀RNA製劑。在第0天和第28天肌內注射PBS（無環狀RNA）的小鼠（n＝3）用作對照。在第0天和第28天肌內注射5 μg的SHINGRIX疫苗的小鼠（n＝3）也用作對照。

【0482】 在初免後6小時、2天和5天，從注射有50 μg劑量的編碼分泌性VZV gE的環狀RNA製劑或PBS的每隻小鼠中收集血清樣本。按照製造商的說明，使用以下測量VZV gE水平：HiBiT標籤；生物發光蛋白檢測測定（Nano-Glo® HiBiT細胞外檢測系統，普洛麥格公司（Promega），目錄號N420）。數據在**圖9**中顯示

為每組三隻動物的平均值。根據HiBiT標準內推gE濃度（ng/mL）。肌內免疫接種編碼分泌性gE的環狀RNA後6小時，在血清中檢測到濃度為約200 g/mL的分泌性gE。

實例5：小鼠模型中來自環狀RNA的VZV免疫原的免疫原性

【0483】 此實例證明編碼VZV免疫原的環狀RNA在小鼠中誘導免疫原特異性響應。

【0484】 如實例4中所述設計、生產和在LNP中配製環狀RNA。

【0485】 在第0天（初免）和第28天（加強）經由肌內注射使每組三隻Balb/C小鼠（n＝3）接受10 μg或50 μg劑量的環狀RNA製劑。肌內注射PBS（無環狀RNA）的小鼠（n＝3）用作對照。肌內注射5 μg的SHINGRIX疫苗的小鼠（n＝3）也用作對照。

【0486】 在第14、35和42天，如實例4中所述，從投與環狀RNA製劑的小鼠中分離血清樣本。測定血清樣本中是否存在VZV特異性IgG。將ELISA板在4°C下用在100 μL的1X包被緩衝液（百進生技公司（Biolegend），421701）中的gE蛋白（金斯瑞公司（Genscript）定製蛋白；100 ng/孔）包被過夜。然後用封閉緩衝液（含2% BSA和0.05%吐溫20的TBS）將板封閉1小時。將血清連續稀釋8次（4倍稀釋，從500至8192000），然後添加到每個孔中的100 μL封閉緩衝液中，並在室溫下孵育1小時。用含Tween®洗滌劑的1X Tris緩衝鹽水（TBS-T）洗滌三次後，將板與抗小鼠IgG HRP檢測抗體（艾博抗公司（Abcam），ab97023）孵育1小時，隨後用TBS-T洗滌三次，然後添加四甲基苯（TMB）ELISA底物（賽默飛世爾公司（ThermoFisher），34022）。將板保持20分鐘，然後使用0.2 N硫酸淬滅。在450 nm下測定光密度（O.D.）值。終點滴度定義為吸光度值高於背景4倍的最後一次稀釋。

【0487】 結果顯示，對於分泌性和跨膜gE，在注射後第14天引發抗gE抗體，

並且在加強後滴度繼續增加（**圖10**）。

【0488】 在初免後第42天，將小鼠處死，收穫脾臟，並且根據製造商的方案（邁博太科公司（Mabtech），3321-4HPT-10）藉由ELISpot測定測試VZV-gE T細胞響應。簡言之，收穫脾臟並將其加工成單細胞懸浮液。將脾細胞以每孔0.5 M細胞接種在IFN-γ ELISpot板上。脾細胞不受刺激或用1 μg/mL的gE肽庫（JPT，PM-VZV-gE）刺激。將細胞培養過夜，並在第二天根據製造商的方案將板顯色。**圖11**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發T細胞響應。

【0489】 如上所述，在初免後第42天，將小鼠處死，並將脾臟加工成單細胞懸浮液。將脾細胞以0.5/孔接種在96孔U型底板中。脾細胞不受刺激或用1 μg/mL的gE肽庫（JPT，PM-VZV-gE）刺激。將脾細胞培養1小時，隨後添加細胞內蛋白抑制劑（GolgipPlug™和GolgiStop™蛋白質轉運抑制劑（BD，555028）），然後再培養5小時。根據製造商的方案（BD，555028）對脾細胞進行固定、透化和染色。

【0490】 **圖12A**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發CD8 T細胞響應。**圖12B**示出了在用10 μg劑量免疫接種後，編碼分泌性gE（Sec gE）的環狀RNA和編碼跨膜gE（Tm gE）的環狀RNA引發CD4 T細胞響應。相對於SHINGRIX疫苗，環狀RNA引發顯著更高的CD4 T細胞。

【0491】 該等結果表明，編碼分泌性gE或跨膜gE的環狀RNA在小鼠中誘導gE特異性體液和細胞免疫響應。

實例11：編碼VZV免疫原的環狀RNA的設計、生成和純化

【0492】 此實例描述了編碼VZV免疫原（例如，gE VZV免疫原）的環狀RNA的設計和體外產生及純化。將環狀RNA設計成包括IRES、編碼VZV免疫原

的核酸序列和至少一個間隔子元件。一些編碼環狀RNA的VZV免疫原還編碼天然前導序列或分泌訊息。

【0493】 在此實例中，藉由兩種示例性方法之一生成環狀RNA，並再次用RNA純化系統純化。

示例性方法1：DNA夾板連接

【0494】 該方法藉由夾板連接產生環狀RNA。使用夾板DNA將RppH處理的線性RNA環化。使用T7 RNA聚合酶藉由體外轉錄從DNA區段合成未經修飾的線性RNA。將轉錄的RNA用RNA純化系統（新英格蘭生物學實驗室公司）純化，用RNA 5'磷酸水解酶（RppH）（新英格蘭生物學實驗室公司，M0356）按照製造商的說明處理。替代性地或另外，RNA在GMP相對於GTP過量的情況下轉錄。

【0495】 夾板連接如下進行：藉由使用RNA連接酶處理轉錄的線性RNA和長度介於10至40個核苷酸之間的DNA夾板來生成環狀RNA。為了純化環狀RNA，在4%變性PAGE上解析連接混合物，並切除對應於每個環狀RNA的RNA條帶。碾碎切除的RNA凝膠片段，並用凝膠洗脫緩衝劑（0.5 M乙酸鈉、0.1% SDS、1 mM EDTA）在37°C下洗脫RNA一小時。替代性地或另外，藉由柱層析法純化環狀RNA。收穫上清液，並藉由向碾碎的凝膠中添加凝膠洗脫緩衝劑再次洗脫RNA，並孵育一小時。藉由離心過濾器去除凝膠碎片，並用乙醇沈澱。使用瓊脂糖凝膠電泳作為驗證純度和環化的品質控制測量。

示例性方法2：藉由自剪接內含子進行環化

【0496】 該方法藉由自剪接產生環狀RNA。環狀RNA在體外生成。未經修飾的線性RNA從包括以上列出的所有模體的DNA模板體外轉錄。體外轉錄反應包括1 μg模板DNA T7 RNA聚合酶啟動子、10X T7反應緩衝液、7.5 mM ATP、7.5 mM CTP、7.5 mM GTP、7.5 mM UTP、10 mM DTT、40 U RNA酶抑制劑和T7酶。在37°C下轉錄4小時。將轉錄的RNA用1 U的DNA酶I在37°C下DNA酶處理

15分鐘。為了有利於藉由自剪接進行的環化，添加額外的GTP至終濃度2 mM，在55°C下孵育15分鐘。然後將RNA進行柱純化，並藉由UREA-PAGE視覺化。

實例12：VZV免疫原的體外表現

【0497】 此實例描述了在哺乳動物細胞中由環狀RNA表現VZV免疫原。為了測量來自RNA構建體的VZV免疫原的表現，根據本文所述之方法生產和純化編碼VZV免疫原的環狀RNA。使用MessengerMax（英傑公司，LMRNA）將環狀RNA（0.1皮莫耳）轉染到HEK293（96孔板中無血清培養基中，每孔10,000個細胞）中。24小時後收穫細胞上清液。ELISA如下進行：將捕獲抗體於4°C在100 µL PBS中包被到ELISA板（MaxiSorp 442404，96孔）上過夜。用TBS-T洗滌三次後，將板用封閉緩衝液（含2% FBS和0.05%吐溫20的TBS）封閉1小時。然後將上清液稀釋液添加到每個孔的100 µL封閉緩衝液中，並在室溫下孵育1小時。用TBS-T洗滌三次後，將板與HRP檢測抗體在室溫下孵育1小時。將四甲基苯（Pierce 34021）添加到每個孔中，使其反應5-15分鐘，然後用2 N硫酸淬滅。在450 nm下測定光密度（OD）值。

實例13：在小鼠模型中由環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0498】 此實例證明由環狀RNA體內表現VZV免疫原。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。純化後，如下配製環狀RNA：

【0499】 A. 將環狀RNA稀釋於PBS中以獲得環狀RNA製劑（裸的）。

【0500】 B. 用脂質奈米顆粒配製環狀RNA以獲得環狀RNA製劑（LNP配製的）。簡言之，將環狀RNA在25 mM乙酸鹽緩衝液（pH＝4）中稀釋。首先藉由將可電離脂質（例如ALC0315）、膽固醇、DSPC和DMG-PEG2000以50/38.5/10/1.5 mol%的莫耳比溶解在乙醇中來配製脂質奈米顆粒（LNP）。最終可電離脂質/RNA重量比為8/1 w/w。使用微流體系統將脂質和RNA溶液在微混合器晶片中混合。然後將LNP在PBS（pH＝7.4）中透析以去除乙醇。用PBS調節環

狀RNA濃度。

【0501】 C. 與佐劑（如Addavax™佐劑（英傑公司）、MF59®佐劑、AS01/AS01B、AS03、明礬、CpG1018或聚I:C）一起配製環狀RNA以獲得環狀RNA製劑（佐劑配製的）。簡言之，將環狀RNA與佐劑混合。

【0502】 在一種方法中，將環狀RNA製劑（裸的、LNP配製的、佐劑配製的）在第0天皮內或肌內投與於小鼠，4週後進行第二次皮內或肌內投與。在第二種方法中，在第0天，將藉由在PBS中稀釋環狀RNA獲得的環狀RNA製劑（裸的）或藉由在LNP中配製環狀RNA獲得的環狀RNA製劑（LNP配製的）皮內或肌內投與於小鼠，4週後進行第二次皮內或肌內注射。對於第二種方法，將佐劑（如Addavax™佐劑（英傑公司）、MF59®佐劑、AS01/AS01B、AS03、明礬、CpG1018、或聚I:C）在第0天（與環狀RNA製劑同時遞送）或24小時時投與於小鼠。對於這兩種方法，將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。

【0503】 在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0504】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

實例14：在小鼠模型中由與佐劑一起遞送的環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0505】 此實例證明VZV免疫原由藉由與佐劑（如AddaSO3™佐劑，英傑公司）一起遞送而免疫增強的環狀RNA體內表現。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。還藉由與等體積的AddaSO3™佐劑溶液混合來配製環狀RNA。在第0

天向小鼠肌內投與環狀RNA/佐劑製劑，4週後第二次投與。將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0506】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性T細胞。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

實例15：在小鼠模型中由與佐劑一起遞送的環狀RNA體內表現VZV免疫原

【0507】 此實例證明VZV免疫原由藉由與佐劑（如AddaSO3™佐劑，英傑公司）一起遞送而免疫增強的環狀RNA體內表現。如實例11中所述設計和產生環狀RNA。還藉由與等體積的AddaSO3™佐劑溶液混合來配製環狀RNA。在第0天向小鼠皮內投與環狀RNA/佐劑製劑，4週後第二次投與。將對照組小鼠用媒介物和非環狀RNA進行處理。可以包括含有環狀RNA但不含佐劑的其他對照組。在整個時間過程中採集血樣，以藉由ELISA監測血清中gE特異性抗體滴度。在給藥後1天、2天、3天和7天，以及然後每週（持續9週）收集每隻小鼠的尾靜脈血液（35 μl）到乾燥的試管中。藉由在4°C下以1,300 g離心25分鐘來收集血清，並按照製造商的說明藉由ELISA來測量VZV免疫原水平。

【0508】 將小鼠在終點時間點處死。收穫脾臟和淋巴結，並藉由流動式細胞測量術和ELISpot測試gE免疫原特異性T細胞。在感染抑制測定中測試收集的血清，以確定血清抗體的中和能力。

其他實施方式

【0509】在不脫離本發明之範圍和精神的情況下，本發明所述之組成物、方法和用途的各種修改和變化對熟悉該項技術者將是顯而易見的。雖已結合具體實施方式描述了本發明，但應當理解，所要求的發明不應當過度地局限於此類具體實施方式。事實上，對於熟悉該項技術者顯而易見的用於進行本發明的所述方式的各種修改旨在落入本發明之範圍內。

【0510】所有出版物、專利和專利申請均藉由援引以其全文併入本文，其程度如同特別且單獨地指出將每個單獨的出版物、專利或專利申請藉由援引以其全文併入一樣。

編號的實施方式

[1]一種環狀多核糖核苷酸，其包含編碼水痘-帶狀皰疹病毒（VZV）多肽免疫原的開讀框。

[2]如實施方式[1]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV糖蛋白或其免疫原性片段。

[3]如實施方式[2]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白選自VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN、和gM或其免疫原性片段。

[4]如實施方式[3]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係VZV gE或其免疫原性片段。

[5]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV糖蛋白係相對於野生型VZV gE包含不超過10個胺基酸取代、缺失或插入的VZV gE的突變變體或其免疫原性片段。

[6]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少錨定結構域（ER保留結構域）的截短多肽。

[7]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽係缺少羧

基末端尾結構域的截短多肽。

[8]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-524、1-546、1-561、1-573或1-623。

[9]如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含Y569A突變、Y582G突變或Y569A/Y582G雙突變。

[10] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-573和Y569A突變。

[11] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含VZV gE的胺基酸1-623和Y569A突變、Y582G突變、或Y569A/Y582G雙突變。

[12] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含與SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[13] 如實施方式[12]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽包含SEQ ID NO: 29-33和65-68中任一項的胺基酸序列。

[14] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽進一步包含訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包含與SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[15] 如實施方式[14]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV gE多肽進一步包含訊息序列，並且該VZV gE多肽和訊息序列一起包含SEQ ID NO: 34-38和69-70中任一項的胺基酸序列。

[16] 如實施方式[4]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV gE多肽由與SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

[17] 如實施方式[16]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含

訊息序列的VZV gE多肽由SEQ ID NO: 39-47和71-83中任一項的核酸序列編碼。

[18] 如實施方式[1]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原係VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

[19] 如實施方式[18]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV立即早期蛋白係IE63多肽。

[20] 如實施方式[19]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV IE63多肽包含與SEQ ID NO: 84的任一項的胺基酸序列具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。

[21] 如實施方式[20]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV IE63多肽包含SEQ ID NO: 84中任一項的胺基酸序列。

[22] 如實施方式[18]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由與SEQ ID NO: 85的任一項的核酸序列具有至少85%序列同一性的核酸序列編碼。

[23] 如實施方式[22]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該視需要進一步包含訊息序列的VZV IE63多肽由SEQ ID NO: 85中任一項的核酸序列編碼。

[24] 如實施方式[1]-[23]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有至少51%的GC含量。

[25] 如實施方式[24]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有51%至60%的GC含量。

[26] 如實施方式[1]-[25]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有大於20%的尿苷含量。

[27] 如實施方式[26]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的核酸序列具有20%至28%的尿苷含量。

[28] 如實施方式[1]-[27]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV

多肽免疫原進一步包含編碼多聚化結構域的序列。

[29]. 如實施方式[28]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域選自T4 foldon結構域、鐵蛋白結構域、β環肽、AaLS肽、或二氧四氫蝶啶合酶結構域。

[30] 如實施方式[28]或[29]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的N端。

[31] 如實施方式[28]或[29]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該多聚化結構域位於VZV多肽免疫原的C端。

[32] 如實施方式[1]-[31]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的開讀框與IRES可操作地連接。

[33] 如實施方式[1]-[32]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該編碼VZV多肽免疫原的開讀框編碼第二多肽。

[34] 如實施方式[33]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該VZV多肽免疫原和該第二多肽被以下隔開：多肽連接子、2A自切割肽、蛋白酶切割位點或與蛋白酶切割位點串聯的2A自切割肽。

[35] 如實施方式[34]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該蛋白酶切割位點係弗林蛋白酶切割位點。

[36] 如實施方式[1]-[32]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該環狀多核糖核苷酸進一步包含與第二IRES可操作地連接的編碼第二多肽的第二開讀框。

[37] 如實施方式[33]-[36]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽免疫原。

[38] 如實施方式[37]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV多肽免疫原。

[39] 如實施方式[38]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係選自以

下的VZV糖蛋白：VZV gE、gl、gB、gH、gK、gL、gC、gN和gM，VZV立即早期蛋白或其免疫原性片段。

[40] 如實施方式[39]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV gE或其免疫原性片段。

[41] 如實施方式[33]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係VZV IE63或其免疫原性片段。

[42] 如實施方式[33]-[36]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該第二多肽係多肽佐劑。

[43] 如實施方式[42]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該佐劑係細胞介素、趨化因子、共刺激分子、先天性免疫刺激因子、傳訊分子、轉錄激活因子、細胞介素受體、細菌組分或先天性免疫系統的組分。

[44] 如實施方式[1]-[43]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸，其中該環狀多核糖核苷酸進一步包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

[45]. 如實施方式[44]所述之環狀多核糖核苷酸，其中該先天性免疫系統刺激因子選自富含GU的模體、富含AU的模體、包含dsRNA的結構化區域或適配體。

[46] 一種免疫原性組成物，其包含如實施方式[1]-[45]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸和藥學上可接受的賦形劑。

[47] 如實施方式[46]所述之免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含第二環狀多核糖核苷酸。

[48] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含編碼第二多肽免疫原的開讀框。

[49] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含編碼多肽佐劑的開讀框。

[50] 如實施方式[47]所述之免疫原性組成物，其中該第二環狀多核糖核苷酸包含作為先天性免疫系統刺激因子的非編碼核糖核酸序列。

[51] 一種在受試者中誘導針對VZV的免疫響應之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[52] 一種在受試者中預防VZV感染之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[53] 一種治療患有或疑似患有VZV感染的受試者之方法，該方法包括向該受試者投與如實施方式[1]-[50]中任一項所述之環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物。

[54] 如實施方式[53]所述之方法，其中該受試者先前已被診斷患有VZV感染或與VZV感染相關的障礙。

[55] 如實施方式[53]或[54]所述之方法，其中該VZV感染無症狀，或該VZV感染處於潛伏期。

[56] 如實施方式[53]-[55]中任一項所述之方法，其中該受試者已經被診斷患有帶狀皰疹。

[57] 如實施方式[56]所述之方法，其中投與該環狀多核糖核苷酸或免疫原性組成物降低了與帶狀皰疹相關的症狀的頻率或嚴重程度。

[58] 如實施方式[51]-[57]中任一項所述之方法，其中該受試者係人類受試者。

[59] 如實施方式[51]-[58]中任一項所述之方法，該方法進一步包括向該受試者投與佐劑。

[60] 如實施方式[51]-[59]中任一項所述之方法，該方法進一步包括向該受試者投與VZV多肽免疫原。

【符號說明】

【0511】無

【生物材料寄存】

【0512】無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="C252126SEQA20230606.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-06-
06">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>111145091</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-11-24</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>51509-064WO2</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/283,047</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2021-11-24</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">美商旗艦先鋒創新有限責任公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI,
LLC</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">珍妮佛 A 尼爾森</InventorName>
 <InventorNameLatin>NELSON, JENNIFER A.</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">水痘-帶狀皰疹病毒免疫原組成物及其用途
</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="en">VARICELLA-ZOSTER VIRUS IMMUNOGEN COMPOSITIONS
AND THEIR USES</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>155</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q1">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MWWLLLLLLLLWPMVWA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q3">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MGVKVLFALICIAVAEAK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q4">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MASRLTLLTLLLLLLAGDRASS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q5">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MYRMQLLSCIALSLALVTNS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="7">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q7">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q8">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>V or I</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q9">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Any amino acid</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DXEXNPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>CHYSEL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q11">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q12">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>G, H, or absent</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q13">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>D, G, or absent</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>D, V, I, S, or M</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q15">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Any amino acid</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>XXXEXNPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
```

```
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q16">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q17">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDIEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q18">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>VEPNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q19">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IETNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDIESNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q21">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GDVELNPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q22">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>GDIETNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q23">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDVENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q25">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDVEQNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q26">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IESNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q27">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDIELNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q28">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HDIETNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
```

```
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q29">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HDVETNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q30">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HDVEMNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q31">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDMESNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q32">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDVETNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDIEQNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DSEFNPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>573</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..573</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q35">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAES
SWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK
HTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWN
MRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVP
IDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT
LKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLRYAAWT
GGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>623</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..623</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q36">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Human alphaherpesvirus 3</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAES
SWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK
HTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWN
MRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVP
IDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT
LKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWT
GGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAYRVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKT
R</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>623</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..623</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q37">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAES
SWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK
HTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWN
MRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVP
IDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT
LKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWT
GGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYYAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKT
R</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>623</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..623</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q38">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAES
SWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK
HTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWN
MRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVP
IDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT
LKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWT
GGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAIGGSHGGSSYTVYIDKT
R</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>546</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..546</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q39">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Human alphaherpesvirus 3</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAES
SWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDD
RHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLK
HTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWN
MRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVP
IDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTT
LKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWT
GGLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>594</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..594</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHID
EDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMS
AQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWS
FLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEI
EPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAM
HLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAY
CLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTK
PKEITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>590</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..590</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q41">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MWWLLLLLLLLWPMVWAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKL
DTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQED
LGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPS
LTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGV
LKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQY
KIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGI
SHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEI
TPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>591</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..591</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q42">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDK
LDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQE
DLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLP
SLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPG
VLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQ
YKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLG
ISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKE
ITPVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="37">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>568</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..568</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q43">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MASRLTLLTLLLLLLAGDRASSMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHI
DEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQM
SAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETW
SFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPE
IEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLA
MHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTA
YCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATT
KPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>564</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..564</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q44">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGVKVLFALICIAVAEAKMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDK
LDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQE
DLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLP
SLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPG
VLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQ
YKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLG
ISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKE
ITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1858</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1858</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q45">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgttctacgaggccctgaaggccgagctggtgtacacccgggctgtgcac
ggcttccggccccgggccaactgcgtggtcctgagcgactacatcccccgggtggcctgcaacatgggcaccgtgaacaa
```

gcccgtggtgggcgtgctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgc
tgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccac
gccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaa
cgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagc
ggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacctgaac
ggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagcc
ccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacg
gcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatc
tgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggttgtggacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggc
cgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacg
agctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtac
atctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccg
gaaccccaccccgccgtgacccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcg
tgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccttcgacctgctcctggagtggctg
tacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcct
gagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcg
agcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggc
ggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtctacttcaacggccacgt
ggaggccgtggcctacaccgtggtgagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccg
ccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtacgcc
gcctggaccggcggcctggccgcagtggttctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggt
gaaggccgcccgggtggacaagtaaatgagaccata</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="40">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1807</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1807</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q46">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgtggtggcggctgtggtggctgctgctgttgctgctgctcctgtggccc
atggtgtgggccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcg
gatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcg
tgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgac
cacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaa
ccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgaca
ccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgac
gtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcac
cctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccg
gcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgc
gccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggat
cgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgc
ggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctg
gtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatat
gtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgagg
ccccccttcgacctgttgctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgc
ctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcg
ggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagc
ccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtac
gtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgc
catcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaacc
ccggcaccagcccccctgctccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttc
ctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagtaaatgagaccata</INSDSeq_seque
nce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1795</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1795</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q47">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgtggtggctgctgctgttgctgctgctcctgtggcccatggtgtgggcc
atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccc
cgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccct
actatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccc
tacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggg
catcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacg
tgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggc
gacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctcaccctgcgggcccc
catccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctc
ccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacacc
aaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacac
cagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagc
agtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaag
ggcgacgagaagacccggaaccccaccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactacca
cagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacc
tgttgctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccacccc
aacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcac
cgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcc
tgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtg
tacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcg
gggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcc
ccctgctccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcacc
gccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagtaaatgagaccata</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="42">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1795</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1795</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q48">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgggcgtcaaggtcctgttcgctctgatttgtattgccgtggccgaggcc
atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccc
cgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccct
actatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccc
tacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggg
catcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacg
tgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggc
gacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccc
catccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctc
ccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacacc
aaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacac
cagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagc
agtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaag
ggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactacca
cagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacc
tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccacccc
aacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcac
cgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcc
tgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtg

tacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcg
gggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcc
ccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcacc
gccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagtaaatgagaccata</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1894</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1894</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q49">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatc
attaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaa
gctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagca
gccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgag
caccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccagga
ggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggacc
agcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag
gaaaaccacccctcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcc
cagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtgg
tggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagag
gccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccgg
cgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagca
cctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccgg

ggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgca
gtacaagatccacgaggccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgc
ggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagt
ccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctggg
catcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgaga
gcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtg
gaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaagga
gatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgt
tgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggcctaccgggtggacaagagcccctacaac
cagagcatgtactacgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaa
cgccatcggcgggagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccggtaaatgagaccata
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1894</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1894</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q50">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatc
attaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaa
gctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagca
gccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgag
caccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccagga

ggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggacc
agcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag
gaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcc
cagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtgg
tggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagag
gccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccgg
cgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagca
cctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccgg
ggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgca
gtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgc
ggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagt
ccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctggg
catcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgaga
gcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtg
gaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaagga
gatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgt
tgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaac
cagagcatgtactacgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaa
cgccatcggcgggagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccggtaaatgagaccata
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1894</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1894</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q51">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatc
attaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaa
gctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagca
gccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgag
caccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccagga
ggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggacc
agcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggag
gaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcc
cagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtgg
tggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagag
gccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccgg
cgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagca
cctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccgg
ggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgca
gtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgc
ggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagt
ccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctggg
catcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgaga
gcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtg
gaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaagga
gatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgt
tgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaac
cagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaa
cgccatcggcgggagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccggtaaatgagaccata</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1729</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

<INSDFeature_location>1..1729</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q52">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatggccagccggctgaccctgctcaccctgctgttgctgctgctcgccggc
gaccgggccagctccatgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccct
gcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaaca
gcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagcagctgggtgaaccggggagagagttctcggaaggcctac
gaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgta
caaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacg
acaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggc
gacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccctt
caccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgca
ccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggac
tgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctg
gatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgc
tgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttc
ctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattcca
tatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacg
aggccccccttcgacctgctgttggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacc
tgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggccca
gcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatgg
agcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctg
tacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaa
cgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtga
accccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggcctaaatgagaccata</INSDSeq_seq
uence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">

<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1795</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1795</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q53">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ataggtctcacatgggcgtcaaggtcctgttcgctctgatttgtattgccgtggccgaggcc
atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccc
cgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccct
actatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccc
tacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccgggg
catcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacg
tgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggc
gacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccc
catccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctc
ccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacacc
aaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacac
cagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagc
agtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaag
ggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactacca
cagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacc
tgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccacccc
aacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcac
cgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcc
tgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtg
tacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcg

gggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcc
ccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcacc
gccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagtaaatgagaccata</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q54">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q55">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q56">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>May be absent</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q57">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="51">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>163</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..163</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNV
PVQLTSISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKGKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGN
ENHGLYLADQYVKGIAKSRKS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="52">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q59">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TPKKIKPPLP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>154</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..154</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q60">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVA
AGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALS
AIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q61">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGCIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKCWEAALSA
IEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q62">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSA
IEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="56">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q63">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSA
IEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="57">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q64">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCEQAIERAGTCHGNKGWEAALSA
IEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="58">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>155</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..155</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q65">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCCFEQAIERAGTCHGNKGWEAAL
SAIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="59">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>155</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..155</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q66">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTCFCEQAIERAGTCHGNKGWEAAL
SAIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="60">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q67">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGCLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDAIVCHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKENISAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSA
IEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="61">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>154</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..154</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q68">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QCYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITCVRVPGSWEIPVAA
GELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALS
AIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="62">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>154</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..154</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q69">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYCGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVCVPGSWEIPVAA
GELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASEVSKGLADLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALS
AIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="63">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>154</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..154</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAA
GELARKEDIDAVIAIGVLCRGATPHFDYIASCVSKGLCDLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTCGHGNKGWEAALS
AIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="64">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>199</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..199</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q71">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLSGRSGGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSW
CYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLTSISAPEHKFESLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIK
GKDHATFNFLQWYVSEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="65">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>550</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..550</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q72">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Human alphaherpesvirus 3</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGVTAPRTLILLLSGALALTETWAGSRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSD
HAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTL
NGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQH
ICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGV
YIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEW
LYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHD
GGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRY
AAWTGGLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="66">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>526</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..526</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q73">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Human alphaherpesvirus 3</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYI
WPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDL
NPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKE
DQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGD
EKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNA
PQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYF
NGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA</INSDSeq_sequen
```

ce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>589</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..589</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q74">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLD
TNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDL
GDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSL
TCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVL
KVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYK
IHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGIS
HMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEIT
PVNPGTSPLLRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>639</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..639</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q75">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MVSGWRLFKKISGGGGSGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLD
TNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDL
GDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSL
TCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVL
KVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYK
IHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGIS
HMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEIT
PVNPGTSPLIRYAAWTGGLAAVVLLCLVIFLICTAKRMRVKAARVDKSPYNQSMYGAGLPVDDFEDSESTDTEEEFGNAI
GGSHGGSSYTVYIDKTR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="69">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>563</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..563</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q76">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGVKVLFALICIAVAEAMGTVNKPVVGVLMGFGIITGTLRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKL
DTNSVYEPYYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQED
LGDDTGIHVIPTLNGDDRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPS
LTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGV
LKVLRTEKQYLGVYIWNMRGSDGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQY
KIHEAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGI
SHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEI
TPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="70">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>542</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..542</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q77">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGVKVLFALICIAVAEAKRITNPVRASVLRYDDFHIDEDKLDTNSVYEPYYHSDHAESSWVN
RGESSRKAYDHNSPYIWPRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGDDRHKI
VNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETWSFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTC
FQDVVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGKKEADQPWIVVNTSTLFDELELDPPEIEPGVLKVLRTEKQYLGVYIWNMRGS
DGTSTYATFLVTWKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLLEWLYVPIDPT
CQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFV
DTPESLSGLYVFVVYFNGHVEAVAYTVVSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLIRYAAWTGGLA
</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="71">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1689</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1689</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q78">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgtcaaggtcctgttcgccctgatctgcatcgccgtggccgaggccatgggcaccgt
gaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggcca
gcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagc
gaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggcc
ccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcg
gcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacc
ctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccc
caagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcgga
```

tctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccag
cacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggacca
gctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgt
tcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggc
gtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaa
gacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgt
tcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggag
tggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccca
gtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccaga
actgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcac
gacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacgg
ccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctc
ctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccgg
tacgccgcctggaccggcggcctggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1722</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1722</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q79">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggggacagttaataaacctgtggtgggggtattgatggggttcggaattatcacgggaac
gttgcgtataacgaatccggtcagagcatccgtcttgcgatacgatgattttcacatcgatgaagacaaactggatacaa
actccgtatatgagccttactaccattcagatcatgcggagtcttcatgggtaaatcggggagagtcttcgcgaaaagcg

tacgatcataactcaccttatatatggccacgtaatgattatgatggattttagagaacgcacacgaacaccatggggt
gtataatcagggccgtggtatcgatagcggggaacggttaatgcaacccacacaaatgtctgcacaggaggatcttgggg
acgatacgggcatccacgttatccctacgttaaacggcgatgacagacataaaattgtaaatgtggaccaacgtcaatac
ggtgacgtgtttaaaggagatcttaatccaaaaccccaaggccaaagactcattgaggtgtcagtggaagaaaatcaccc
gtttactttacgcgcaccgattcagcggatttatggagtccggtacaccgagacttggagctttttgccgtcattaacct
gtacgggagacgcagcgcccgccatccagcatatatgtttaaaacatacaacatgctttcaagacgtggtggtggatgtg
gattgcgcggaaaatactaaagaggatcagttggccgaaatcagttaccgttttcaaggtaagaaggaagcggaccaacc
gtggattgttgtaaacacgagcacactgtttgatgaactcgaattagacccccccgagattgaaccgggtgtcttgaaag
tacttcggacagaaaaacaatacttgggtgtgtacatttggaacatgcgcggctccgatggtacgtctacctacgccacg
ttttggtcacctggaaaggggatgaaaaaacaagaaaccctacgcccgcagtaactcctcaaccaagaggggctgagtt
tcatatgtggaattaccactcgcatgtattttcagttggtgatacgtttagcttggcaatgcatcttcagtataagatac
atgaagcgccatttgatttgctgttagagtggttgtatgtccccatcgatcctacatgtcaaccaatgcggttatattct
acgtgtttgtatcatcccaacgcaccccaatgcctctctcatatgaattccggttgtacatttacctcgccacatttagc
ccagcgtgttgcaagcacagtgtatcaaaattgtgaacatgcagataactacaccgcatattgtctgggaatatctcata
tggagcctagctttggtctaatcttacacgacgggggcaccacgttaaagtttgtagatacacccgagagtttgtcggga
ttatacgtttttgtggtgtattttaacgggcatgttgaagccgtagcatacactgttgtatccacagtagatcattttgt
aaacgcaattgaggagcgtggatttccgccaacggccggtcagccaccggcgactactaaacccaaggaaattacccccg
taaaccccggaacgtcaccacttctacgatatgccgcatggaccggagggcttgcagcagtagtacttttatgtctcgta
atatttttaatctgtacggctaaacgaatgagggttaaagccgccagggtagacaagtga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="73">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1719</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1719</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q80">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc
tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc
acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="74">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1650</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1650</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q81">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgtgaccgccccccggaccctgatcctgctcctgagcggcgccctggccctgaccga
aacctgggccggcagccggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggaca
agctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagc
agccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacga
gcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccagg
aggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggac
cagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtgga
ggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgc
ccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtg
gtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaaga
ggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccg
gcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagc
acctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccg
gggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgc
agtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatg
cggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccag
tccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgg
gcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgag
agcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgt
ggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaagg
agatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggcc</INSDSeq_se
quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1719</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1719</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q82">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc
tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc
acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="76">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1626</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1626</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q83">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgtgaaggtgctgttcgccctgatctgcatcgccgtggccgaggccaagcggatcac
caaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacg
agccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaac
agcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccaggg
ccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggca
tccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttc
aagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcg
ggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaaccctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacg
ccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgag
aacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggt
gaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccg
agaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacc
tggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaa
ctaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccct
tcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtac
caccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggc
cagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagct
tcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttc
gtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcga

ggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggca
ccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1578</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1578</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q84">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggccggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcga
cgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggg
gcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaac
gcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgag
cgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtga
acgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtg
agcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggag
cttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttcc
aggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggc
aagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagat
cgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacg
gcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccc
cagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccat
gcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgcc
agcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacc

tttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgccta
ctgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggaca
cccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtc
agcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaa
gcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggcc</IN
SDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="79">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1719</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1719</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q85">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc

tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc
acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="80">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1869</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1869</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q86">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>

</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc
tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc
acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgta
cggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcg
ggagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="81">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1767</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1767</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q87">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagtggcaccgtgaa
caagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcg
tgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgac
cacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccg
gaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg
agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctg
aacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaa
gccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatct
acggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcac
atctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagct
ggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcg
acgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtg
tacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagac
ccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttca
gcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtgg
ctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtg
cctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaact
gcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgac
ggcggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggcca
cgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctccta
ccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgttgcggtac
gccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcg
ggtgaaggccgcccgggtggacaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="82">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1917</INSDSeq_length>
```

<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1917</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q88">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagtggcaccgtgaa
caagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcg
tgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgac
cacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccg
gaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg
agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctg
aacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaa
gccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatct
acggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcac
atctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagct
ggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcg
acgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtg
tacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagac
ccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttca
gcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtgg
ctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtg
cctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaact
gcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgac
ggcggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggcca
cgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctccta
ccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtac
gccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcg

ggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgagg
acagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtac
atcgacaagacccgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="83">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1719</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1719</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q89">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc
tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccaccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc

acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>278</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..278</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q90">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Human alphaherpesvirus 3</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MFCTSPATRGDSSESKPGASVDVNGKMEYGSAPGPLNGRDTSRGPGAFCTPGWEIHPARLVE
DINRVFLCIAQSSGRVTRDSRRLRRICLDFYLMGRTRQRPTLACWEELLQLQPTQTQCLRATLMEVSHRPPRGEDGFIEA
PNVPLHRSALECDVSDDGGEDDSDDDGSTPSDVIEFRDSDAESSDGEDFIVEEESEESTDSCEPDGVPGDCYRDGDGCNT
PSPKRPQRAIERYAGAETAEYTAAKALTALGEGGVDWKRRRHEAPRRHDIPPPHGV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="85">
<INSDSeq>

<INSDSeq_length>834</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..834</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q91">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgttctgcaccagccccgccacccggggcgacagctccgagagcaagcccggcgccagcgt
ggacgtgaacggcaagatggagtacggcagcgcccccggccccctgaacggccgggataccagtcggggacccggagcct
tctgcacccccggctgggagatccaccccgcccggctggtggaggacatcaaccgggtgttcctgtgcatcgcccagagc
agcggccgggtgacccgggacagccggagactgcggcggatctgcctggacttctacctgatgggccggacccggcagcg
gcccaccctggcctgctgggaggaactgctccagctgcagcccacccagacccagtgcctgcgggccaccctgatggagg
tgagccaccggcccccctcggggcgaggacggcttcatcgaggcccccaacgtgcccctgcaccggagcgccctggagtgc
gacgtgagcgacgacggcggagaggacgacagcgacgacgacggcagcacccccagcgacgtgatcgagttccgggacag
cgacgccgagagctctgacggcgaggacttcatcgtcgaggaagagagcgaggagagcaccgacagctgcgagcccgacg
gcgtgcccggcgactgctaccgggacggcgacggctgcaacacccccagccccaagcggccccagcgggccatcgagcgg
tacgccggcgccgaaacagccgagtacaccgccgctaaggccctgaccgccctgggcgagggcggcgtggactggaagcg
gaggcggcacgaggcccccccggcggcacgacattcctcctccacacggcgtg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="86">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="87">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="88">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="89">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="90">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="91">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="92">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="93">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="94">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="95">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="96">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
```

```
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="97">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="98">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="99">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="100">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="101">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
```

```
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="102">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="103">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="104">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="105">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="106">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
```

```
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="107">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="108">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="109">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="110">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="111">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="112">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q92">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGGGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="113">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>741</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..741</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q93">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaaaacagcctgtgggttgatcccacccacaggcccattgggcgctagcactctggtatca
cggtacctttgtgcgcctgttttatacccctcccccaactgtaacttagaagtaacacacaccgatcaacagtcagcgt
ggcacaccagccacgttttgatcaagcacttctgttaccccggactgagtatcaatagactgctcacgcggttgaaggag
aaagcgttcgttatccggccaactacttcgaaaaacctagtaacaccgtggaagttgcagagtgtttcgctcagcactac
cccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgcccatg
gggaaacccatgggacgctctaatacagacatggtgcgaagagtctattgagctagttggtagtcctccggcccctgaat
gcggctaatcctaactgcggagcacacaccctcaagccagagggcagtgtgtcgtaacgggcaactctgcagcggaaccg
actactttgggtgtccgtgtttcattttattcctatactggctgcttatggtgacaattgagagatcgttaccatatagc
tattggattggccatccggtgactaatagagctattatatatcccctttgttgggtttataccacttagcttgaaagaggt
taaaacattacaattcattgttaagttgaatacagcaac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="114">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>552</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..552</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q94">
```

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttcc
accatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttc
ccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaa
cgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataa
gatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctc
aagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacat
gctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacac
gatgataata</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="115">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>749</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..749</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q95">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaaaacagctgtgggttgtcacccacccacagggtccactgggcgctagtacactggtatc
tcggtacctttgtacgcctgttttatacccctccctgatttgcaacttagaagcaacgcaaaccagatcaatagtaggt
gtgacataccagtcgcatcttgatcaagcacttctgtatccccggaccgagtatcaatagactgtgcacacggttgaagg

agaaaacgtccgttacccggctaactacttcgagaagcctagtaacgccattgaagttgcagagtgtttcgctcagcact
ccccccgtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggcgaccgtggcggtggctgcgttggcggcctgccta
tggggtaacccataggacgctctaatacggacatggcgtgaagagtctattgagctagttagtagtcctccggcccctga
atgcggctaatcctaactgcggagcacatacccttaatccaaagggcagtgtgtcgtaacgggcaactctgcagcggaac
cgactactttgggtgtccgtgtttctttttattcttgtattggctgcttatggtgacaattaaagaattgttaccatata
gctattggattggccatccagtgtcaaacagagctattgtatatctctttgttggattcacacctctcactcttgaaacg
ttacacaccctcaattacattatactgctgaacacgaagcggccacc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="116">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>618</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..618</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q96">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaaaactgggagtgggttgttcccactcactccacccatgcggtgttgtactctgttatta
cggtaactttgtacgccagtttttcccacccttccccataatgtaacttagaagtttgtacaatatgaccaataggtgac
aatcatccagactgtcaaaggtcaagcacttctgtttccccggtcaatgaggatatgctttacccaaggcaaaaaccttа
gagatcgttatccccacactgcctacacagagcccagtaccatttttgatataattgggttggtcgctccctgcaaaccc
agcagtagacctggcagatgaggctggacattccccactggcgacagtggtccagcctgcgtggctgcctgctcacccтt
cttgggtgagaagcctaattattgacaaggtgtaaagagccgcgtgtgctcagtgtgcttcctccggcccctgaatgtgg
ctaaccttaaccctgcagccgttgcccataatccaatgggtttgcggtcgtaatgcgtaagtgcgggatgggaccaacta
ctttgggtgtccgtgtttcctgtttttcttttgattgcattttatggtgacaatttatagtgtatagattgtcatc</IN
SDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="117">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>750</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..750</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q97">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tttgaaaaggggtgggggggcctcggccccctcaccctcttttccggtggtctggtcccgg
accaccgttactccattcagcttcttcggaacctgttcggaggaattaaacgggcacccatactccccccaccccccttt
tgtaactaagtatgtgtgctcgtgatcttgactcccacggaacggaccgatccgttggtgaacaaacagctaggtccaca
tcctcccttcccctgggagggcccccgccctcccacatcctcccccccagcctgacgtatcacaggctgtgtgaagccccc
gcgaaagctgctcacgtggcaattgtgggtcccccccttcatcaagacaccaggtctttcctccttaaggctagccccggc
gtgtgaattcacgttgggcaactagtggtgtcactgtgcgctcccaatctcggccgcggagtgctgttccccaagccaaa
cccctggcccttcactatgtgcctggcaagcatatctgagaaggtgttccgctgtggctgccaacctggtgacaggtgcc
ccagtgtgcgtaaccttcttccgtctccggacggtagtgattggttaagatttggtgtaaggttcatgtgccaacgccct
gtgcgggatgaaacctctactgccctaggaatgccaggcaggtaccccacctccgggtgggatctgagcctgggctaatt
gtctacgggtagtttcatttccaatccttttatgtcggagtcgccacc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="118">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>514</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..514</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q98">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtataagagacaggtgtttgccttgtcttcggactggcatcttgggaccaaccccccttttc
cccagccatgggttaaatggcaataaaggacgtaacaactttgtaaccattaagctttgtaattttgtaaccactaagct
ttgtgcacataatgtaaccatcaagcttgttagtcccagcaggaggtttgcatgcttgtagccgaaatggggctcgaccc
cccatagtaggatacttgattttgcattccattgtggacctgcaaactctacacatagaggctttgtcttgcatctaaac
acctgagtacagtgtgtacctagaccctatagtacgggaggaccgtttgtttcctcaataaccctacataataggctagg
tgggcatgcccaatttgcaagatcccagactgggggtcggtctgggcagggttagatccctgttagctactgcctgatag
ggtggtgctcaaccatgtgtagtttaaattgagctgttcatataccgccacc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="119">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>750</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..750</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q99">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaaaacagcctgtgggttgttcccatccacagggcccactgggcgccagcactctggtatt
gcggtaccttagtgcgcctgttttatatacccgtccccccaaacgtaacttagacgcatgtcaacgaagaccaatagtaag
cgcagcacaccagctgtgttccggtcaagcacttctgttaccccggaccgagtatcaataagctactcacgtggctgaag
gagaaaacgttcgttacccgaccaattacttcaagaaacctagtaacaccatgaaggttgcgcagtgtttcgctccgcac
aaccccagtgtagatcaggtcgatgagtcaccgcattccccacgggtgaccgtggcggtggctgcgctggcggcctgccc
atggggaaacccatgggacgcttcaatactgacatggtgcgaagagtctattgagctaattggtagtcctccggcccctg
aatgcggctaatcctaactgcggagcagatacccacacaccagtgggcagtctgtcgtaacgggcaactctgcagcggaa
ccgactactttgggtgtccgtgtttctctttatccttatactggctgcttatggtgacaattgagagattgttaccatat
agctattggattggccatccggtgacaaatagagcaattgtgtatttgtttgttggtttcgtgccattaaattacaaggt
tctaaacacccttaatcttattatagcattcaacacaacaaagccacc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="120">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length/>
   <INSDSeq_moltype/>
   <INSDSeq_division/>
   <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="121">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1722</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1722</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q100">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggggacagttaataaacctgtggtgggggtattgatggggttcggaattatcacgggaac
gttgcgtataacgaatccggtcagagcatccgtcttgcgatacgatgattttcacatcgatgaagacaaactggatacaa
actccgtatatgagccttactaccattcagatcatgcggagtcttcatgggtaaatcggggagagtcttcgcgaaaagcg
tacgatcataactcaccttatatatggccacgtaatgattatgatggatttttagagaacgcacacgaacaccatggggt
gtataatcagggccgtggtatcgatagcggggaacggttaatgcaacccacacaaatgtctgcacaggaggatcttgggg
acgatacgggcatccacgttatccctacgttaaacggcgatgacagacataaaattgtaaatgtggaccaacgtcaatac
ggtgacgtgtttaaaggagatcttaatccaaaaccccaaggccaaagactcattgaggtgtcagtggaagaaaatcaccc
gtttactttacgcgcaccgattcagcggatttatggagtccggtacaccgagacttggagcttttgccgtcattaacct
gtacgggagacgcagcgcccgccatccagcatatatgtttaaaacatacaacatgctttcaagacgtggtggtggatgtg
gattgcgcggaaaatactaaagaggatcagttggccgaaatcagttaccgttttcaaggtaagaaggaagcggaccaacc
gtggattgttgtaaacacgagcacactgtttgatgaactcgaattagacccccccgagattgaaccgggtgtcttgaaag
tacttcggacagaaaaacaatacttgggtgtgtacatttggaacatgcgcggctccgatggtacgtctacctacgccacg
tttttggtcacctggaaaggggatgaaaaaacaagaaaccctacgcccgcagtaactcctcaaccaagaggggctgagtt
tcatatgtggaattaccactcgcatgtattttcagttggtgatacgtttagcttggcaatgcatcttcagtataagatac
atgaagcgccatttgatttgctgttagagtggttgtatgtccccatcgatcctacatgtcaaccaatgcggttatattct
acgtgtttgtatcatcccaacgcaccccaatgcctctctcatatgaattccggttgtacatttacctcgccacatttagc
ccagcgtgttgcaagcacagtgtatcaaaattgtgaacatgcagataactacaccgcatattgtctgggaatatctcata
tggagcctagctttggtctaatcttacacgacgggggcaccacgttaaagtttgtagatacacccgagagtttgtcggga
ttatacgtttttgtggtgtattttaacgggcatgttgaagccgtagcatacactgttgtatccacagtagatcattttgt
aaacgcaattgaggagcgtggatttccgccaacggccggtcagccaccggcgactactaaacccaaggaaattacccccg
taaaccccggaacgtcaccacttctacgatatgccgcatggaccggagggcttgcagcagtagtacttttatgtctcgta
atatttttaatctgtacggctaaacgaatgagggttaaagccgccagggtagacaagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="122">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>500</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..500</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q101">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tttgaaagaggcctccggagtgtccggaggctctctttcgacccaacccatactgggggtg
tgtgggaccgtacctggagtgcacggtatatatgcattcccgcatggcaagggcgtgctaccttgccccttgacgcatgg
tatgcgtcatcatttgccttggttaagccccatagaaacgaggcgtcacgtgccgaaaatccctttgcgtttcacagaac
catcctaaccatgggtgtagtatgggaatcgtgtatggggatgattaggatctctcgtagagggataggtgtgccattca
aatccagggagtactctggctctgacattgggacatttgatgtaaccggacctggttcagtatccgggttgtcctgtatt
gttacggtgtatccgtcttggcacactgaaagggtatttttgggtaatcctttcctactgcctgatagggtggcgtgccc
ggccacgagagattaagggtagcaatttaaacgccacc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="123">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q102">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>VSGWRLFKKIS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="124">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1737</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1737</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q103">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgtcaaggtcctgttcgccctgatctgcatcgccgtggccgaggccatgggcaccgt
gaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggcca
gcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagc
gaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggcc
ccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcg
gcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacc
ctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccc
caagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcgga
tctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccag
```

cacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggacca
gctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgt
tcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggc
gtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaa
gacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgt
tcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggag
tggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccca
gtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccaga
actgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcac
gacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacgg
ccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctc
ctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccgg
tacgccgcctggaccggcggcctggccggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctgttcaagaagatcagc</INS
DSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="125">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1917</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1917</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q104">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagtggcaccgtgaa
caagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcg
tgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgac

cacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccg
gaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg
agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccaccctg
aacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaa
gccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatct
acggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcac
atctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagct
ggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcg
acgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtg
tacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagac
ccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttca
gcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccttcgacctgctcctggagtgg
ctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtg
cctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaact
gcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgac
ggcggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggcca
cgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctccta
ccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgatccggtac
gccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcg
ggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgagg
acagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtac
atcgacaagacccgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="126">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1917</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1917</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q105">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcaccgtgaacaagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcac
cctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcgtgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacacca
acagcgtgtacgagccctactatcacagcgaccacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcc
tacgaccacaacagcccctacatctggccccggaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgt
gtacaaccagggccggggcatcgacagcggcgagcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcg
acgacaccggcatccacgtgatccccacccctgaacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtac
ggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaagccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccaccc
cttcaccctgcgggcccccatccagcggatctacggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacct
gcaccggcgacgccgctcccgccatccagcacatctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtg
gactgcgccgagaacaccaaggaggaccagctggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaagaggccgaccagcc
ctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcgacgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaagg
tgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtgtacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccacc
ttcctggtgacctggaagggcgacgagaagacccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaatt
ccatatgtggaactaccacagccacgtgttcagcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatcc
acgaggcccccttcgacctgctcctggagtggctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagc
acctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtgcctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggc
ccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaactgcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccaca
tggagcccagcttcggcctgatcctgcacgacggcggaaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggc
ctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggccacgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgt
gaacgccatcgaggagcggggctttcctcctaccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccg
tgaaccccggcaccagcccccctgatccggtacgccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtg
atcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcgggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgta
cggcgccggcctgcccgtggacgacttcgaggacagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcg
ggagccacggcggcagctcttacaccgtgtacatcgacaagacccggggaggaggaggaagcgtcagcggctggcggctg
ttcaagaagatcagc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="127">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1767</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1767</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q106">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagtggcaccgtgaa
caagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcg
tgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgac
cacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccg
gaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg
agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacccctg
aacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaa
gccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatct
acggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcac
atctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagct
ggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcg
acgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtg
tacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagac
ccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttca
gcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggccccccttcgacctgctcctggagtgg
ctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgccccccagtg
cctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaact
gcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgac
ggcggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggcca
cgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctccta
ccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagcccccctgttgcggtac
gccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgctgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcg
ggtgaaggccgcccgggtggacaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="128">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1917</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1917</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q107">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtgagcggctggcggctgttcaagaaaatcagcggcggaggagggagtggcaccgtgaa
caagcccgtggtgggcgtcctgatgggcttcggcatcattaccggcaccctgcggatcaccaaccccgtgcgggccagcg
tgctgcggtacgacgatttccacatcgacgaggacaagctggacaccaacagcgtgtacgagccctactatcacagcgac
cacgccgagagctcctgggtgaaccggggcgagagcagccggaaggcctacgaccacaacagcccctacatctggccccg
gaacgactacgacggcttcctggagaacgcccacgagcaccacggcgtgtacaaccagggccggggcatcgacagcggcg
agcggctgatgcagcccacccagatgagcgcccaggaggacctgggcgacgacaccggcatccacgtgatccccacccctg
aacggcgacgaccggcacaagatcgtgaacgtggaccagcggcagtacggcgacgtgttcaagggcgacctgaaccccaa
gccccagggccagcggctgatcgaggtgagcgtggaggaaaaccacccccttcaccctgcgggcccccatccagcggatct
acggcgtgcggtacaccgaaacctggagcttcctgcccagcctgacctgcaccggcgacgccgctcccgccatccagcac
atctgcctgaagcacaccacctgcttccaggacgtggtggttgacgtggactgcgccgagaacaccaaggaggaccagct
ggccgagatcagctaccggttccagggcaagaaggaggccgaccagccctggatcgtggtgaacaccagcaccctgttcg
acgagctggagctggacccccctgagatcgagcccggcgtgctgaaggtgctgcggaccgagaagcagtacctgggcgtg
tacatctggaacatgcggggcagcgacggcaccagcacctacgccaccttcctggtgacctggaagggcgacgagaagac
ccggaaccccacccccgccgtgacccccccagccccggggcgccgaattccatatgtggaactaccacagccacgtgttca
gcgtgggcgacaccttcagcctggccatgcacctgcagtacaagatccacgaggcccccttcgacctgctcctggagtgg
ctgtacgtgcccatcgaccccacctgccagcccatgcggctgtacagcacctgcctgtaccaccccaacgcccccccagtg
cctgagccacatgaacagcggctgcacctttaccagtccccacctggcccagcgggtggccagcaccgtgtaccagaact
gcgagcacgccgacaactacaccgcctactgcctgggcatcagccacatggagcccagcttcggcctgatcctgcacgac
```

ggcggcaccaccctgaagttcgtggacacccccgagagcctgagcggcctgtacgtgttcgtggtgtacttcaacggcca
cgtggaggccgtggcctacaccgtggtcagcaccgtggaccacttcgtgaacgccatcgaggagcggggctttcctccta
ccgccggccagcccccagccaccactaagcccaaggagatcacccccgtgaaccccggcaccagccccctgatccggtac
gccgcctggaccggcggcctggccgcagtggtgctgttgtgcctggtgatcttcctgatctgcaccgccaagcggatgcg
ggtgaaggccgcccgggtggacaagagcccctacaaccagagcatgtacggcgccggcctgcccgtggacgacttcgagg
acagcgagagcaccgacaccgaggaggagttcggcaacgccatcggcggaagccacggcggcagctcttacaccgtgtac
atcgacaagacccgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="129">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>93</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..93</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q108">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>taattgaggcctgagtataaggtgacttatacttgtaatctatctaaacggggaacctctct
agtagacaatcccgtgctaaattgtaggact</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="130">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>182</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..182</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q109">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>taaacaactaacagctttagaaggtgcagagactagacgggagctaccctaacggattcagc
cgagggtaaagggatagtccaattctcaacatcgcgattgttgatggcagcgaaagttgcagagagaatgaaaatccgct
gactgtaaaggtcgtgagggttcgagtccctccgcccccca</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="131">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>128</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..128</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q110">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acggtagacgcagcggacttagaaaactgggcctcgatcgcgaaagggatcgagtggcagct
ctcaaactcagggaaacctaaaactttaaacattmaagtcatggcaatcctgagccaagctaaagc</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="132">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>210</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..210</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q111">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaaactcaaaatttaaaatcccaaattcaaaattccgggaaggtgcagagactcgacggga
gctaccctaacgtaaagccgagggtaaagggagagtccaattctcaaagcctgaagttgctgaagcaacaaggcagtagt
gaaagctgcgagagaatgaaaatccgttgactgtaaaaagtcgtgggggttcaagtccccccaccccc</INSDSeq_se
quence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="133">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>151</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..151</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q112">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtagacgctacggacttagaaaactgagccttgatagagaaatcttttaagtggaagct
ctcaaattcagggaaacctaaatctgaatacagatatggcaatcctgagccaagcccagaaaatttagacttgagatttg
attttggag</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="134">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>207</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..207</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q113">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggctttcaatttgaaatcagaaattcaaaattcagggaaggtgcagagactcgacgggagct
accctaacgtaaaggcgagggtaaagggagagtccaattcttaaagcctgaagttgtgcaagcaacaaggcaacagtgaa
agctgtggaagaatgaaaatccgttgaccttaaacggtcgtgggggttcaagtccccccaccccc</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="135">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>147</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..147</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q114">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggtagacgctacggacttagaaaactgagccttgatagagaaatctttcaagtggaagct
ctcaaattcagggaaacctaaatctgaatacagatatggcaatcctgagccaagcccggaaattttagaatcaagatttt
atttt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="136">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>178</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..178</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q115">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agaaatggagaaggtgtagagactggaaggcaggcaccctaacgttaaaggcgagggtgaag
gacagtccagaccacaaaccagtaaatctgggcagcgaaagctgtagatggtaagcataacccgaaggtcagtggttca
aatccacttcccgccaccaaattaaaaaaacaataa</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="137">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>178</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..178</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q116">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agaaatggagaaggtgtagagactggaaggcaggcaccctaacgttaaaggcgagggtgaag
gacagtccagaccacaaaccagtaaatctgggcagcgaaagctgtagatggtaagcataacccgaaggtcagtggttca
aatccacttcccgccaccaaattaaaaaaacaataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="138">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>189</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..189</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q117">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>acaacagataacttactaacttacagctagtcggaaggtgcagagactcgacgggagctacc
ctaacgtcaagacgagggtaaagagagagtccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaaa
tccgtagcgtctaaacggtcgtgtgggttcaagtccctccaccccca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="139">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>

```
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q118">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agacgctacggacttaaataattgagccttagagaagaaattctttaagtggatgctctcaa
actcagggaaacctaaatctagctatagacaaggcaatcctgagccaagccgaagtagtaattagtaagttagtaagtt<
/INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="140">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>186</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..186</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q119">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aacaacagataacttactagttactagtcggaaggtgcagagactcgacgggagctacccta
acgtcaagacgagggtaaagagagagtccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaaatcc
gtagcgtctaaacggtcgtgtgggttcaagtccctccaccccca</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="141">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q120">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agacgctacggacttaaataattgagccttagagaagaaattctttaagtggatgctctcaa
actcagggaaacctaaatctagctatagacaaggcaatcctgagccaagccgaagtagtaattagtaagtt</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="142">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>154</INSDSeq_length>
```

<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..154</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q121">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVA
AGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSLELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALS
AIEMANLFKSLR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="143">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q122">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TDILGKYVINYLNKLKKKEDIFKEFLKW</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="144">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q123">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="145">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q124">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="146">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q125">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="147">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q126">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="148">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>40</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..40</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q127">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="149">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>50</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..50</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q128">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="150">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>4</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..4</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q129">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>PPLP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="151">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>131</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..131</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q130">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aacaacagataacttacagctagtcggaaggtgcagagactcgacgggagctaccctaacgt
caagacgagggtaaagagagagtccaattctcaaagccaataggcagtagcgaaagctgcgggagaatg</INSDSeq_s
equence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="152">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q131">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aaataattgagccttagagaagaaattctttaagtggatgctctcaaactcagggaaaccta
aatctagctatagacaaggcaatcctgagccaagccgaagtagtaattagtaagtt</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="153">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>178</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..178</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q132">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cttctgttgatatggatgcagttcacagactaaatgtcggtcggggaagatgtattcttctc
ataagatatagtcggacctctccttaatgggagctagcggatgaagtgatgcaacactggagccgctgggaactaatttg
tatgcgaaagtatattgattagttttggagtactcg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="154">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>235</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..235</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q133">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aaatagcaatatttacctttggagggaaaagttatcaggcatgcacctggtagctagtcttt
aaaccaatagattgcatcggtttaaaaggcaagaccgtcaaattgcgggaaaggggtcaacagccgttcagtaccaagtc
tcaggggaaactttgagatggccttgcaaagggtatggtaataagctgacggacatggtcctaaccacgcagccaagtcc
taagtcaacagat</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="155">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>167</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..167</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q134">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggttctacataaatgcctaacgactatccctttggggagtagggtcaagtgactcgaaacga
tagacaacttgctttaacaagttggagatatagtctgctctgcatggtgacatgcagctggatataattccggggtaaga
ttaacgaccttatctgaacataatg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```