

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535352
(P2024-535352A)

(43)公表日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全143頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-518362(P2024-518362)		(71)出願人	522375693	
(86)(22)出願日	令和4年1月24日(2022.1.24)			エイチディーティー バイオ コーポレー ション	
(85)翻訳文提出日	令和6年5月21日(2024.5.21)			アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2 , シアトル, イーストレイク アベニ ュー イー 1 6 1 6, ナンバー 2 8 0	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/013513		(74)代理人	100078282	
(87)国際公開番号	WO2023/048759			弁理士 山本 秀策	
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)		(74)代理人	100113413	
(31)優先権主張番号	63/247,169			弁理士 森下 夏樹	
(32)優先日	令和3年9月22日(2021.9.22)		(74)代理人	100181674	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 飯田 貴敏	
(31)優先権主張番号	63/297,397		(74)代理人	100181641	
(32)優先日	令和4年1月7日(2022.1.7)			弁理士 石川 大輔	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	230113332	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			最終頁に続く	
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 SARS-COV-2 RNAワクチン組成物および使用方法

(57)【要約】

本開示は、核酸を対象に送達するための、組成物、処置の方法、ならびに組成物を作製するおよび使用する方法を提供する。本明細書に記載される組成物は、核酸と混合することができる、必要に応じて無機粒子を含む脂質キャリアを含む。コロナウイルス感染症の処置のためのCOVID-19ワクチンとして組成物を使用する方法も提供される。COVID-19は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) によって引き起こされる感染性呼吸器疾患であり、世界中に広がっている。

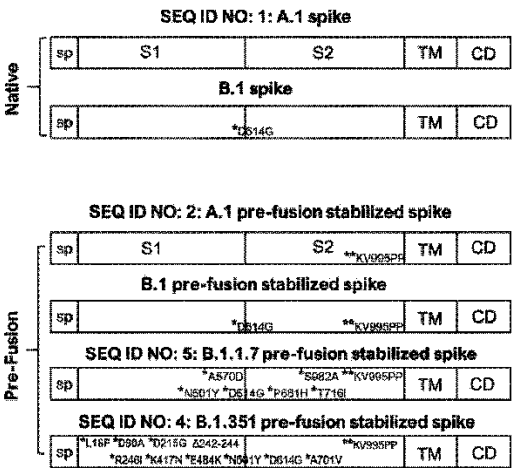


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、
脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、
液状油；および
界面活性剤であって、前記界面活性剤が、
カチオン性脂質；
親水性界面活性剤；および
疎水性界面活性剤

を含む、界面活性剤

を含む、脂質キャリア；ならびに

少なくとも 1 つの核酸であって、前記少なくとも 1 つの核酸が、配列番号 1 ～ 7 と少なくとも 85 % 同一の配列を含む、少なくとも 1 つの核酸を含む組成物。

【請求項 2】

前記核酸が、配列番号 4 の配列と少なくとも 85 % 同一であり、必要に応じて配列番号 27 の配列と少なくとも 85 % 同一である配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記核酸が、配列番号 4、必要に応じて配列番号 27 である配列領域を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 RNA ポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号 20 の核酸配列を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシシグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミン E である、請求項 1 から 7 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3 (トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP)、3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC コレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA)；1, 2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、ジパルミトイル (C16:0) トリメチルアンモニウムプロパン (DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン (DSTAP)、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ) プロピル] N, N, N-トリメチルアンモニウム、クロリド (DOTMA

10

20

30

40

50

40

50

の組成物。

【請求項 1 2】

前記脂質キャリアが、無機粒子を含む、請求項 1 から 1 1 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記無機粒子が、疎水性コア内にある、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記無機粒子が、金属を含む、請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記金属が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、または金属リン酸塩を含む、請求項 1 4 に記載の組成物。 10

【請求項 1 6】

前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、または二酸化ケイ素を含む、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記疎水性界面活性剤が、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、またはソルビタントリオレエートである、請求項 1 から 1 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートである、請求項 1 から 1 7 までのいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 1 9】

組成物であって、

脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、

液状油；および

界面活性剤であって、前記界面活性剤が、

カチオン性脂質；

親水性界面活性剤；および

疎水性界面活性剤

を含む、界面活性剤

を含む、脂質キャリア；ならびに 30

少なくとも 1 つの核酸であって、前記核酸が、SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸

を含む組成物。

【請求項 2 0】

前記 SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原またはその機能的バリエーションが、前記 SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原のステムヘリックスを含む、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記 SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原のステムヘリックスが、配列番号 1 9 と少なくとも 8 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の組成物。 40

【請求項 2 2】

前記 SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原をコードする前記核酸が、配列番号 8 と少なくとも 8 5 % 同一であり、必要に応じて配列番号 3 1 の配列と少なくとも 8 5 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 9 から 2 1 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記 SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質が、配列番号 1 6 50

と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 19 から 22 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 19 から 23 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 19 から 24 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記 RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、請求項 25 に記載の組成物。

10

【請求項 27】

前記 RNA ポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号 20 の核酸配列を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシシグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミン E である、請求項 19 から 27 までのいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 29】

前記トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3 (トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP)、3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC コレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA); 1, 2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、ジス
テアロイルトリメチルアンモニウムプロパン (DSTAP)、N-[1-(2, 3-ジオ
レイルオキシ) プロピル] N, N, N-トリメチルアンモニウム、クロリド (DOTMA)
)、N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1
, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOEPC)、1, 2
-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP)、および 1, 2
-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLindMA)、1, 1'-((
2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシデシル) アミノ) エチル)(2-ヒ
ドロキシデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザンジイル) ビ
ス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メ
チルノニル) 3, 3', 3'', 3''', -(((メチルアザンジイル) ビス(プロパン-3, 40
1-ジイル)) ビス(アザントリイル)) テトラプロピオネート、9A1P9、デシル(
2-(ジオクチルアンモニオ) エチル) ホスフェート; A2-Iso5-2DC18、エ
チル 5, 5-ジ((Z)-ヘプタデカ-8-エン-1-イル)-1-(3-(ピロリジン
-1-イル) プロピル)-2, 5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレー
ト; ALC-0315、((4-ヒドロキシブチル) アザンジイル) ビス(ヘキサン-6
, 1-ジイル) ビス(2-ヘキシルデカノエート); ALC-0159、2-[(ポリエ
チレングリコール)-2000]-N, N-ジテトラデシルアセトアミド; β -シトステ
ロール、(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-((2R, 5
R)-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル)-10, 13-ジメチル-2, 3,
4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ

30

3, 40

50

【請求項 38】

前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートである、請求項 19 から 37 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

組成物であって

脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、

液状油；および

界面活性剤であって、前記界面活性剤が、

カチオン性脂質；

親水性界面活性剤；および

疎水性界面活性剤

を含む、界面活性剤

を含む、脂質キャリア；ならびに

少なくとも 1 つの核酸であって、前記核酸が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原の S2 タンパク質領域、必要に応じてステムヘリックス領域またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸を含む組成物。

【請求項 40】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原が、SARS-CoV-2 のアルファバリエーション、SARS-CoV-2 のベータバリエーション、SARS-CoV-2 のデルタバリエーション、SARS-CoV-2 のガンマバリエーション、SARS-CoV-2 のミューバリエーション、または SARS-CoV-2 のオミクロンバリエーションに由来するものである、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原のステムヘリックスが、配列番号 18 と少なくとも 85 % 同一または配列番号 19 と少なくとも 85 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 39 から 41 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

前記核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 39 から 41 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 44】

前記 RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

前記 RNA ポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号 20 の核酸配列を含む、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミン E である、請求項 39 から 45 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

前記トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 48】

10

20

30

40

50

59

12-ジエノエート) ; PEG 2000-DMG、(R)-2,3-ビス(ミリストイルオキシ)プロピル-1-(メトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバメート ; TT3、またはN1, N3, N5-トリス(3-(ジドデシルアミノ)プロピル)ベンゼン-1,3,5-トリカルボキサミドである、請求項39から47までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項49】

前記脂質キャリアが、疎水性コアを含む、請求項39から48までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項50】

前記脂質キャリアが、無機粒子を含む、請求項39から49までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項51】

前記無機粒子が、前記疎水性コア内にある、請求項50に記載の組成物。

【請求項52】

前記無機粒子が、金属を含む、請求項50または51に記載の組成物。

【請求項53】

前記金属が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、または金属リン酸塩を含む、請求項52に記載の組成物。

【請求項54】

前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、または二酸化ケイ素を含む、請求項53に記載の組成物。

【請求項55】

前記疎水性界面活性剤が、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、またはソルビタントリオレエートである、請求項39から54までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項56】

前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートである、請求項39から55までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項57】

組成物であって、

脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、

液状油；

無機ナノ粒子であって、前記無機ナノ粒子が、約0.2mg/mLの12nmの酸化鉄という量で存在する酸化鉄を含む、無機ナノ粒子；および

界面活性剤であって、前記界面活性剤がカチオン性脂質を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに

少なくとも1つの核酸であって、前記核酸が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む組成物。

【請求項58】

前記脂質キャリアが、

約30mg/mLのDOTAPクロリド；

約37.5mg/mLのスクアレン；

約37mg/mLのソルビタンモノステアレート；

約37mg/mLのポリソルベート80、および

約10mMのクエン酸ナトリウム

をさらに含む、請求項57に記載の組成物。

【請求項59】

前記脂質キャリアが、疎水性コアを含む、請求項57または請求項58に記載の組成物

。

10

20

30

40

50

【請求項 60】

前記酸化鉄が、オレイン酸コーティング酸化鉄を含む、請求項 57 から 59 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 61】

前記オレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子が、前記疎水性コア内にある、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 62】

前記液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシルグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミン E である、請求項 57 から 61 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 63】

前記トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、請求項 62 に記載の組成物。

【請求項 64】

前記カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3 (トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP)、3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA) ; 1, 2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、ジパルミトイル (C16:0) トリメチルアンモニウムプロパン (DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン (DSTAP)、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ) プロピル] N, N, N-トリメチルアンモニウム、クロリド (DOTMA)、N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOEPC)、1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP)、および 1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLindMA)、1, 1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) (2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザンジイル) ビス(ドデカン-2-オール) (C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メチルノニル) 3, 3', 3'', 3'''-((メチルアザンジイル) ビス(プロパン-3, 1-ジイル)) ビス(アザントリイル)) テトラプロピオネート、9A1P9、デシル(2-(ジオクチルアンモニオ) エチル) ホスフェート; A2-iso5-2DC18、エチル 5, 5-ジ((Z)-ヘプタデカ-8-エン-1-イル)-1-(3-(ピロリジン-1-イル) プロピル)-2, 5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート; ALc-0315、((4-ヒドロキシブチル) アザンジイル) ビス(ヘキサン-6, 1-ジイル) ビス(2-ヘキシルデカノエート); ALc-0159、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N, N-ジテトラデシルアセトアミド; β -シトステロール、(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-((2R, 5R)-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル)-10, 13-ジメチル-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-オール; BAME-O16B、ビス(2-(ドデシルジスルファニル) エチル) 3, 3'-((3-メチル-9-オキソ-10-オキサ-13, 14-ジチア-3, 6-ジアザヘキサコシル) アザンジイル) ジプロピオネート; BHEM-コレステロール、2-(((3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-ジメチル-17-((R)-6-メチルヘプタン-2-イル)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イル) オキシ) カルボニル) アミノ)-N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-N-メチルエタン-1

10

20

30

40

50

ーアミニウムブロミド；c K K-E 1 2、3、6-ビス（4-（ビス（2-ヒドロキシド
 デシル）アミノ）ブチル）ピペラジン-2、5-ジオン；D C-コレステロール、3 β-
 [N-（N'，N'-ジメチルアミノエタン）-カルバモイル] コレステロール；D L i n
 -M C 3-D M A、（6 Z，9 Z，2 8 Z，3 1 Z）-ヘプタトリアコンター-6，9，2
 8，3 1-テトラエン-1 9-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタノエート；D O P E、
 1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン；D O S P A、2
 ，3-ジオレイルオキシ-N-〔2-（スベルミンカルボキサミド）エチル〕-N，N-
 ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート；D S P C、1，2-ジステ
 アロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン；e P C、エチルホスファチジルコリン；
 F T T 5、ヘキサ（オクタン-3-イル）9，9'，9''，9'''，9''''，9''''，9''''，9''''，
 （ベンゼン-1，3，5-トリカルボニル）イリス（アザンジイル））トリス（プロパン
 -3，1-ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサノナノエート；リピド H（S M
 -1 0 2）、ヘプタデカン-9-イル-8-（（2-ヒドロキシエチル）（6-オキソ-
 6-（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート；O F-D e g-L i n、
 （（（3，6-ジオキソピペラジン-2，5-ジイル）ビス（ブタン-4，1-ジイル）
 ）ビス（アザントリイル））テトラキス（エタン-2，1-ジイル）（9 Z，9' Z，9''
 Z，9''' Z，1 2 Z，1 2' Z，1 2'' Z，1 2''' Z）-テトラキス（オクタデカ-9，
 1 2-ジエノエート）；P E G 2 0 0 0-D M G、（R）-2，3-ビス（ミリストイル
 オキシ）プロピル-1-（メトキシポリ（エチレングリコール）2 0 0 0）カルバメート
 ；T T 3、またはN 1，N 3，N 5-トリス（3-（ジドデシルアミノ）プロピル）ベン
 ゼン-1，3，5-トリカルボキサミドである、請求項 5 7 から 6 3 までのいずれか一項
 に記載の組成物。

20

【請求項 6 5】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 5 7 から 6 4 までのいずれ
 か一項に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗原が、S A R S-C o V-2 のアルフ
 ァバリヤント、S A R S-C o V-2 のベータバリヤント、S A R S-C o V-2 のデル
 タバリヤント、S A R S-C o V-2 のガンマバリヤント、S A R S-C o V-2 のミュ
 ーバリヤント、または S A R S-C o V-2 のオミクロンバリヤントに由来するものであ
 る、請求項 5 7 から 6 5 までのいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 6 7】

前記 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質が、D 6 1 4 G のアミノ酸置換を含む S
 A R S-C o V-2 のバリエーションに由来するものである、請求項 5 7 から 6 6 までのい
 ずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記核酸が、配列番号 1～8 のうちの 1 つに記載の配列を含む、請求項 5 7 から 6 7 ま
 でのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションが
 、配列番号 9～1 6 のうちの 1 つに記載のアミノ酸配列を有する、請求項 5 7 から 6 8 ま
 でのいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 7 0】

前記核酸が、R N A ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 5 7 から 6 9 までのい
 ずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記 R N A ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（V E E V）R N A ポリメ
 ラーゼである、請求項 7 0 に記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記 R N A ポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号 2 0 の核酸配列を含む、請

50

求項 70 に記載の組成物。

【請求項 73】

組成物であって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、

約 30 mg / mL の DOTAP クロリド；

約 37.5 mg / mL のスクアレン；

約 37 mg / mL のソルビタンモノステアレート；

約 37 mg / mL のポリソルベート 80；

約 10 mM のクエン酸ナトリウム；および

約 0.2 mg Fe / mL の 12 nm のオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子

を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに

b) 少なくとも 1 つの核酸であって、前記少なくとも 1 つの核酸が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸

を含む組成物。

【請求項 74】

スクロースをさらに含み、必要に応じて、前記スクロースが約 50 mg の量で存在する、請求項 73 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 73 または請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 76】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原が、SARS-CoV-2 のアルファバリエーション、SARS-CoV-2 のベータバリエーション、SARS-CoV-2 のデルタバリエーション、SARS-CoV-2 のガンマバリエーション、SARS-CoV-2 のミューバリエーション、または SARS-CoV-2 のオミクロンバリエーションに由来するものである、請求項 73 から 75 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 77】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が、D614G のアミノ酸置換を含む SARS-CoV-2 のバリエーションに由来するものである、請求項 73 から 76 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 78】

前記核酸が、配列番号 1～8 のうちの 1 つに記載の配列を含む、請求項 73 から 77 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 79】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションが、配列番号 9～16 のうちの 1 つに記載のアミノ酸配列を有する、請求項 73 から 78 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 80】

前記核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 73 から 79 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 81】

前記 RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、請求項 80 に記載の組成物。

【請求項 82】

前記 RNA ポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号 20 の核酸配列を含む、請求項 80 に記載の組成物。

【請求項 83】

前記脂質キャリアが、疎水性コアを含む、請求項 73 から 82 までのいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 84】

前記オレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子が、前記疎水性コア内にある、請求項 83 に記載の組成物。

【請求項 85】

組成物であって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、

約 0.75 mg の量で存在する DOTAP クロリド；

約 0.94 mg の量で存在するスクアレン；

約 0.93 mg の量で存在するソルビタンモノステアレート；

約 0.93 mg の量で存在するポリソルベート 80；

約 1.05 mg の量で存在するクエン酸一水和物；および

約 0.005 mg の量で存在するオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子

を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに

b) 少なくとも 1 つの核酸であって、前記少なくとも 1 つの核酸が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸

を含む組成物。

【請求項 86】

前記少なくとも 1 つの核酸配列が、最大で約 100 マイクログラム (μg) の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 87】

前記少なくとも 1 つの核酸配列が、最大で約 25 μg の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 88】

スクロースをさらに含み、必要に応じて、前記スクロースが約 50 ミリグラム (mg) の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 89】

前記核酸が、前記脂質キャリアと複合体化している、請求項 85 から 88 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 90】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原が、SARS-CoV-2 のアルファバリエーション、SARS-CoV-2 のベータバリエーション、SARS-CoV-2 のデルタバリエーション、SARS-CoV-2 のガンマバリエーション、SARS-CoV-2 のミューバリエーション、または SARS-CoV-2 のオミクロンバリエーションに由来するものである、請求項 85 から 89 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 91】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が、D614G のアミノ酸置換を含む SARS-CoV-2 のバリエーションに由来するものである、請求項 85 から 90 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 92】

前記核酸が、配列番号 1～8 のうちの 1 つに記載の配列を含む、請求項 85 から 91 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 93】

前記 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションが、配列番号 9～16 のうちの 1 つに記載のアミノ酸配列を有する、請求項 85 から 92 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 94】

前記核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、請求項 85 から 93 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 95】

前記RNAポリメラーゼが、ベネズエラマ脳炎ウイルス（VEEV）RNAポリメラーゼである、請求項94に記載の組成物。

【請求項96】

前記RNAポリメラーゼをコードする前記核酸が、配列番号20の核酸配列を含む、請求項94に記載の組成物。

【請求項97】

前記脂質キャリアが、疎水性コアを含む、請求項85から96までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項98】

前記オレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子が、前記疎水性コア内にある、請求項97

10

に記載の組成物。

【請求項99】

凍結乾燥されたものである、請求項1から98までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項100】

請求項1から99までのいずれか一項に記載の組成物を含む懸濁液。

【請求項101】

請求項1から99までのいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項102】

対象における免疫応答を生じさせる方法であって、請求項1から99までのいずれか一項に記載の組成物を対象に投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を生じさせるステップを含む、方法。

20

【請求項103】

前記組成物が2回の投薬によって前記対象に投与される、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記2回目の投薬が1回目の投薬の約28日後に投与される、請求項102に記載の方法。

【請求項105】

前記組成物の3回目の投薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項102に記載の方法。

30

【請求項106】

前記組成物5 μ gが前記対象に投与される、請求項102から105までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項107】

前記組成物10 μ gが前記対象に投与される、請求項102から105までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項108】

前記組成物25 μ gが前記対象に投与される、請求項102から105までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項109】

前記組成物が筋肉内または鼻腔内投与される、請求項102から108までのいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項110】

前記対象が、ヒトである、請求項102から109までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項111】

前記対象が、ウイルス感染症を有するまたは有する疑いがある、請求項102から110までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項112】

前記ウイルス感染症が、コロナウイルス感染症である、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

50

前記コロナウイルス感染症が、SARS-CoV-2ウイルスまたはそのバリエーションによって引き起こされるものである、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

前記抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質またはその断片である、請求項102から113までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項115】

前記免疫応答が、前記抗原に対する中和抗体の力価が前記組成物の投与を受けていない対象と比較して増大することを含む、請求項102から114までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項116】

前記免疫応答が、CD4+および／またはCD8+陽性T細胞の量が前記組成物の投与を受けていない対象と比較して増加することを含む、請求項102から115までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項117】

前記対象が、免疫無防備状態であるまたは免疫抑制される、請求項102から116までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項118】

対象における免疫応答を増強する方法であって、請求項1から99までのいずれか一項に記載の組成物を対象に投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を増強するステップを含む、方法。

【請求項119】

コロナウイルス感染症を処置する方法であって、請求項1から99までのいずれか一項に記載の組成物を対象に投与し、それによって、前記コロナウイルス感染症を処置するステップを含む、方法。

【請求項120】

前記コロナウイルス感染症が、SARS-CoV-2ウイルスまたはそのバリエーションによって引き起こされるものである、請求項119に記載の方法。

【請求項121】

前記対象が、ヒトである、請求項119または請求項120に記載の方法。

【請求項122】

前記対象が、免疫無防備状態であるまたは免疫抑制される、請求項119から121までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項123】

前記組成物が筋肉内または鼻腔内投与される、請求項119から122までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項124】

組成物を含むキットであって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア：ならびに、

b) 少なくとも1つの核酸配列であって、前記核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、前記抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む組成物を含むキット。

【請求項125】

1つまたは複数の界面活性剤をさらに含む、請求項124に記載のキット。

【請求項126】

乾燥組成物であって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；

10

20

30

40

50

b) 抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸配列であって、前記抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列；ならびに

c) 少なくとも1つの凍結保護物質を含む乾燥組成物。

【請求項127】

好適な希釈剤中に再構成された請求項126に記載の組成物、および薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物。

【請求項128】

乾燥組成物であって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；

b) 抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸配列であって、必要に応じて、前記抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質またはその機能的バリエーションである、少なくとも1つの核酸；ならびに

c) (i) 乾燥組成物の少なくとも約50重量%、または(ii) 少なくとも約50mgの量で存在する、少なくとも1つの糖を含む乾燥組成物。

【請求項129】

凍結乾燥されたものである、請求項128に記載の組成物。

【請求項130】

摂氏約25度において熱的に安定である、請求項128に記載の組成物。

【請求項131】

摂氏約45度において熱的に安定である、請求項128に記載の組成物。

【請求項132】

摂氏約-20度において熱的に安定である、請求項128に記載の組成物。

【請求項133】

摂氏約2度～摂氏約8度において熱的に安定である、請求項128に記載の組成物。

【請求項134】

少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月にわたって熱的に安定である、請求項128に記載の組成物。

【請求項135】

前記疎水性コアが、油を含む、請求項128に記載の組成物。

【請求項136】

前記油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カプリル／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ／パーム核油由来カプリル酸およびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン(DHIS)、ファルネセンならびにスクアレンのうちの少なくとも1つを含む、請求項135に記載の組成物。

【請求項137】

前記1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項128に記載の組成物。

【請求項138】

前記1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質を含む、請求項137に記載の組成物。

【請求項139】

前記カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)；3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)；ジメチルジオクタデシルアンモニウム

10

20

30

40

50

(DDA) ; 1, 2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、ジパルミトイル (C16:0) トリメチルアンモニウムプロパン (DPTAP) ; ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン (DSTAP) ; N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ) プロピル] -N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) ; N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC) ; 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOEPC) ; 1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP) ; および 1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA) ; 1, 1'-(2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル)(2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザンジイル) ビス(ドデカン-2-オール) (C12-200)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) ; N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド (DDAB) ; 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド) エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA) ; エチルホスファチジルコリン (ePC) ; およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 138 に記載の組成物。

10

【請求項 140】

前記脂質キャリアが、少なくとも 1 つの界面活性剤を含む、請求項 128 に記載の組成物。

20

【請求項 141】

前記少なくとも 1 つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 140 に記載の組成物。

【請求項 142】

前記疎水性界面活性剤が、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、請求項 141 に記載の組成物。

【請求項 143】

前記脂質キャリアが、約 40 nm から約 150 nm までにわたる z 平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約 0.1 から約 0.4 までにわたる、請求項 128 に記載の組成物。

30

【請求項 144】

前記 1 つまたは複数の核酸が、DNA である、請求項 128 に記載の組成物。

【請求項 145】

前記 1 つまたは複数の核酸が、RNA である、請求項 128 に記載の組成物。

【請求項 146】

前記 RNA が、自己複製性 RNA である、請求項 145 に記載の組成物。

【請求項 147】

前記 1 つまたは複数の核酸が、前記脂質キャリアに組み込まれている、または前記脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリア-核酸複合体を形成している、請求項 128 に記載の組成物。

40

【請求項 148】

前記脂質キャリア-核酸複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、請求項 147 に記載の組成物。

【請求項 149】

窒素のホスフェートに対する (N:P) モル比によって特徴付けられる前記脂質キャリアの前記 1 つまたは複数の核酸に対するモル比が、約 1:1 から約 150:1 までにわたる、請求項 128 に記載の組成物。

【請求項 150】

前記少なくとも 1 つの糖が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、

50

グルコース、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 8 から 1 4 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 1】

前記少なくとも 1 つの糖が、少なくとも約 5 0 m g、6 0 m g、7 0 m g、8 0 m g、9 0 m g、1 0 0 m g、1 1 0 m g、1 2 0 m g、1 3 0 m g、1 4 0 m g、1 5 0 m g、1 6 0 m g、1 7 0 m g、1 8 0 m g、1 9 0 m g、2 0 0 m g、2 1 0 m g、2 2 0 m g、2 3 0 m g、2 4 0 m g、2 5 0 m g、2 6 0 m g、2 7 0 m g、2 8 0 m g、2 9 0 m g、3 0 0 m g またはそれよりも多くの量で存在する、請求項 1 2 8 から 1 4 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 2】

前記少なくとも 1 つの糖が、5 0 m g ～ 2 5 0 m g の量で存在する、請求項 1 2 8 に記載の組成物。

【請求項 1 5 3】

前記少なくとも 1 つの糖が、少なくとも約 2 5 0 m g の量で存在する、請求項 1 2 8 に記載の組成物。

【請求項 1 5 4】

前記糖が、前記組成物の少なくとも 5 0 重量%、5 5 重量%、6 0 重量%、6 5 重量%、7 0 重量%、7 5 重量%、8 0 重量%、8 5 重量%、9 0 重量%、9 5 重量% またはそれよりも多くの量で存在する、請求項 1 2 8 から 1 4 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 5】

前記糖が、前記組成物の 8 0 ～ 9 8 重量%、必要に応じて 9 4 ～ 9 6 重量% の量で存在する、請求項 8 5 に記載の組成物。

【請求項 1 5 6】

前記糖が、前記組成物の約 9 5 重量% の量で存在する、請求項 1 2 8 に記載の組成物。

【請求項 1 5 7】

前記少なくとも 1 つの糖が、スクロースを含む、請求項 1 2 8 から 1 5 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 8】

前記疎水性コアが、1 つまたは複数の無機ナノ粒子を含む、請求項 1 2 8 から 1 5 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 9】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 5 8 に記載の組成物。

【請求項 1 6 0】

前記少なくとも 1 つの核酸が、配列番号 1 ～ 8 と少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 2 8 から 1 5 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6 1】

S A R S - C o V - 2 の予防のための組成物であって、

a) ソルビタン脂肪酸エステル；

b) エトキシ化ソルビタンエステル；

c) カチオン性脂質；

d) 免疫賦活薬；および

e) S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質抗原またはその機能的断片をコードする少なくとも 1 つの R N A を含む、組成物。

【請求項 1 6 2】

R N A 依存性 R N A ポリメラーゼをコードする配列を含む第 1 の核酸；および

S A R S - C o V - 2 オミクロン抗原配列をコードする配列を含む第 2 の核酸

10

20

30

40

50

を含む、組成物。

【請求項 1 6 3】

前記第 1 の核酸と前記第 2 の核酸が、共有核酸上に存在する、請求項 1 6 2 に記載の組成物。

【請求項 1 6 4】

前記第 1 の核酸と前記第 2 の核酸が、別々の核酸上に存在する、請求項 1 6 2 に記載の組成物。

【請求項 1 6 5】

前記 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが、VEEV RNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 6 2 に記載の組成物。

10

【請求項 1 6 6】

ナノ粒子キャリアシステムをさらに含む、請求項 1 6 2 から 1 6 5 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6 7】

前記ナノ粒子キャリアシステムが、カチオン性脂質および疎水性コアを含む、請求項 1 6 6 に記載の組成物。

【請求項 1 6 8】

前記疎水性コアが、無機ナノ粒子を含む、請求項 1 6 7 に記載の組成物。

【請求項 1 6 9】

前記第 1 の核酸および／または前記第 2 の核酸が、RNA を含む、請求項 1 6 2 から 1 6 8 までのいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 7 0】

前記第 2 の核酸が、配列番号 8 と少なくとも 8 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 6 2 から 1 6 8 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7 1】

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードする配列を含む第 1 の核酸；および SARS-CoV-2 スパイク S 2 配列領域、必要に応じてステムヘリックス領域をコードする配列を含む第 2 の核酸を含む、組成物。

【請求項 1 7 2】

30

前記第 1 の核酸と前記第 2 の核酸が、共有核酸上に存在する、請求項 1 7 1 に記載の組成物。

【請求項 1 7 3】

前記第 1 の核酸と前記第 2 の核酸が、別々の核酸上に存在する、請求項 1 7 1 に記載の組成物。

【請求項 1 7 4】

前記 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが、VEEV RNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 7 1 に記載の組成物。

【請求項 1 7 5】

ナノ粒子キャリアシステムをさらに含む、請求項 1 7 1 から 1 7 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 1 7 6】

前記ナノ粒子キャリアシステムが、カチオン性脂質および疎水性コアを含む、請求項 1 7 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7 7】

前記疎水性コアが、無機ナノ粒子を含む、請求項 1 7 6 に記載の組成物。

【請求項 1 7 8】

前記第 1 の核酸および／または第 2 の核酸が、RNA を含む、請求項 1 7 1 から 1 7 7 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7 9】

50

前記第2の核酸が、配列番号18と少なくとも85%同一の配列を含む、請求項171から177までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項180】

前記第2の核酸が、配列番号19と少なくとも85%同一の配列を含む、請求項171から177までのいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2021年9月22日出願の米国仮特許出願第63/247,169号、および2022年1月7日出願の米国仮特許出願第63/297,397号に対する優先権の利益を主張するものである。

10

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記載

【0002】

本発明は、National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of Microbiology and Infectious Diseasesから付与された契約第75N93020C00052号および第75N93019C00037号の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に関して一定の権利を有する。

20

配列表

【0003】

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記ASCIIコピーは2021年1月21日に作成されたものであり、名称は201953-713601__SL.txt、サイズは372,976バイトである。

【背景技術】

【0004】

背景

COVID-19は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) によって引き起こされる感染性呼吸器疾患であり、世界中に広がっている。市販のmRNAワクチンにより、SARS-CoV-2に感染した個体がCOVID-19疾患からいくらか保護されるが、当該ウイルスはそれでもなお伝染性が高く、ワクチン接種済の個体が感染した場合にも幅広い症状を引き起こし得る。さらに、SARS-CoV-2は突然変異することが公知であり、SARS-CoV-2の現在のおよび新規のバリエーションに対するワクチンの効果はまだ確認中である。したがって、SARS-CoV-2感染症に対して高度に有効なワクチン組成物の大きな必要性が存在する。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

40

簡潔な概要

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質；親水性界面活性剤；および疎水性界面活性剤を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、少なくとも1つの核酸が、配列番号1～7、必要に応じて配列番号1～8と少なくとも85%同一の配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書において提供される。

【0006】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質；親水性界面活性剤；および疎水性界面活性剤を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、核酸が、SARS

50

ーC o Vー2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0007】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質；親水性界面活性剤；および疎水性界面活性剤を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、核酸が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションのS2領域、必要に応じてステムヘリックス領域をコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

10

【0008】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；無機ナノ粒子であって、無機ナノ粒子が、約0.2 mg/mlの12 nmの酸化鉄という量で存在する酸化鉄を含む、無機ナノ粒子；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、核酸が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0009】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、約30 mg/mLのDOTAPクロリド；約37.5 mg/mLのスクアレン；約37 mg/mLのソルビタンモノステアレート；約37 mg/mLのポリソルベート80；約10 mMのクエン酸ナトリウム；および約0.2 mg Fe/mlの12 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、少なくとも1つの核酸が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

20

【0010】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、約0.75 mgの量で存在するDOTAPクロリド；約0.94 mgの量で存在するスクアレン；約0.93 mgの量で存在するソルビタンモノステアレート；約0.93 mgの量で存在するポリソルベート80；約1.05 mgの量で存在するクエン酸一水和物；約0.005 mgの量で存在するオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を含むナノエマルジョンである脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、少なくとも1つの核酸が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

30

【0011】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原をコードする配列を含み、抗原が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原をコードする配列を含み、抗原が、SARSーC o Vー2 スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含むワクチンが本明細書においてさらに提供される。

40

【0012】

対象における免疫応答を生じさせる方法であって、本明細書において提供される組成物を対象に投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を生じさせるステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

50

【0013】

SARS-CoV-2 感染症の重症度を低下させる方法であって、本明細書において提供される組成物を、感染前に投与するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

【0014】

対象における免疫応答を増強する方法であって、本明細書において提供される組成物を対象に投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を増強するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

【0015】

コロナウイルス感染症を処置する方法であって、本明細書において提供される組成物を対象に投与し、それによって、コロナウイルス感染症を処置するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

10

【0016】

対象を免疫保護する方法であって、本明細書において提供される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

【0017】

対象を免疫保護するための組成物であって、脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原をコードする配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

20

【0018】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原をコードする配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列；ならびに少なくとも1つの凍結保護物質を含む、乾燥組成物が本明細書において提供される。

【0019】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；少なくとも1つの核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

30

【0020】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；少なくとも1つの核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

40

【0021】

凍結乾燥組成物を再構成するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 少なくとも1つの核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステ

50

ップ；（c）製剤を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップ；凍結乾燥組成物を好適な希釈剤中に入れて再構成するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

【0022】

噴霧乾燥組成物を再構成するための方法であって、（a）脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；（b）少なくとも1つの核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；（c）少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；（d）製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに（e）噴霧乾燥組成物を好適な希釈剤中に入れて再構成するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。

10

【0023】

SARS-CoV-2の予防のための組成物であって、（a）ソルビタン脂肪酸エステル；（b）エトキシ化ソルビタンエステル；（c）カチオン性脂質；（d）免疫賦活薬、および（e）少なくとも1つのRNA分子を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0024】

SARS-CoV-2の予防のための組成物であって、（a）ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）；（b）ポリソルベート80（例えば、Tween（登録商標）80）；（c）DOTAP；（d）免疫賦活薬、および（e）少なくとも1つのRNA分子を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

20

【0025】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸であって、必要に応じて抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質またはその機能的バリエーションである、少なくとも1つの核酸；ならびに（i）乾燥組成物の少なくとも約50重量%、または（ii）少なくとも50mgの量で存在する少なくとも1つの糖を含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。

30

【0026】

RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2抗原配列をコードする配列を含む第2の核酸を含む、組成物がさらに提供される。

【0027】

RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2抗原スパイク配列をコードする第2の核酸配列を含む、組成物がさらに提供される。

【0028】

RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2オミクロン抗原配列をコードする配列を含む第2の核酸を含む、組成物がさらに提供される。

40

【0029】

RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2スパイクS2配列領域、必要に応じてステムヘリックス領域をコードする配列を含む第2の核酸を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0030】

本明細書において提供される組成物を含むキットが本明細書においてさらに提供される。

【0031】

50

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲において詳細に記載されている。本発明の原理が利用されている例示的な実施形態が記載されている以下の詳細な説明および付属図を参照することにより、本発明の特徴および利点のよりよい理解が得られよう。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は、本明細書に開示されるrepRNA構築物を示す。SARS-CoV-2スパイクの略図が示され、シグナルペプチド(sp)、S1およびS2ドメイン、膜貫通ドメイン(TM)、および細胞質ドメイン(CD)が示されている。repRNAは、A. 1スパイク、B. 1スパイクをコードする配列番号1、A. 1. 融合前安定化スパイク、B. 1融合前安定化スパイクをコードする配列番号2、B. 1. 1. 7融合前安定化スパイクをコードする配列番号5、およびB. 1. 351融合前安定化スパイクをコードする配列番号4として識別される。突然変異がA. 1株(配列番号1)を基準として示されている。

10

【0033】

【図2】図2は、スパイク改変のマウスにおける結合性抗体応答に対する影響を示す。C57BL/6マウス(n=5/群)を、A. 1系列SARS-CoV-2の全長スパイクの野生型(WT)、融合前安定化改変(PreF)、フューリン切断部位欠失改変(Furmut)、またはPreF改変とFurmut改変の組合せをコードする脂質キャリアで製剤化したrepRNAを用いて免疫化。0日目および28日目にワクチン接種を施行し、14日目、28日目、および38日目に収集した血清を抗スパイク結合性IgGについて酵素結合免疫吸着検定法によってアッセイした。

20

【0034】

【図3-1】図3A~3Cは、例示的なナノ粒子(NP)キャリアの略図を示す。図3Aは、水中油型エマルジョンを示す。図3Bは、ナノ構造化脂質キャリア(NLC)を示す。図3Cは、液状油中に無機ナノ粒子を有するナノ粒子を示す。

【図3-2】同上。

【0035】

【図4A】図4A~4Bは、Miglyol脂質キャリア製剤であるNP-3によって誘導されるタンパク質産生の増加を示す。図4Aは第1のアッセイを示す。図4Bは第2のアッセイを示す。

30

【図4B】同上。

【0036】

【図5A】図5A~5Bは、Miglyol脂質キャリア製剤であるNP-3によって誘導される免疫応答の低減を示す。図5Aは第1のアッセイを示す。図5Bは第2のアッセイを示す。

【図5B】同上。

【0037】

【図6】図6A~6Bは、第1のアッセイおよび第2のアッセイの結果として、NP-3を用いて観察されたタンパク質産生の増強と低TNF(例えば、TNFアルファ)刺激の相関を示す。図6Aは第1のアッセイを示す。図6Bは第2のアッセイを示す。

40

【0038】

【図7-1】図7A~7Fは、本明細書に記載される脂質キャリア製剤の種々の実施形態を筋肉内注射したBALB/cマウスにおけるSEAPレベルを示す。図7Aは、注射後4日目のSEAPレベルを示す。図7Bは、注射後6日目のSEAPレベルを示す。図7Cは、注射後8日目のSEAPレベルを示す。図7Dは、注射後4日目のSEAPレベルを示す。図7Eは、注射後6日目のSEAPレベルを示す。図7Fは、注射後8日目のSEAPレベルを示す。X軸：条件、Y軸：相対光単位(RLU)。

【図7-2】同上。

【図7-3】同上。

【0039】

50

【図 8】図 8 は、条件 1 ～ 1 4 について、Y 軸に Z 平均測定値の測定値および多分散指数 (PDI)、X 軸に群番号が示されている棒グラフである。

【0040】

【図 9】図 9 A ～ 9 B は、条件 1 ～ 1 4 についての抗 D 6 1 4 G IgG レベルを示すドットチャートを示す。図 9 A は、条件 1 ～ 1 4 について、Y 軸に IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$)、X 軸に群番号が示されているドットチャートを示す。14 日目に抗 D 6 1 4 G (1 : 40 希釈) IgG 応答についての測定値を記録した。図 9 B は、条件 1 ～ 1 4 について、Y 軸に IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$)、X 軸に群番号が示されているドットチャートを示す。28 日目に抗 D 6 1 4 G (1 : 200 希釈) IgG 応答についての測定値を記録した。

【0041】

【図 10】図 10 は、28 日目における、Y 軸に抗 D 6 1 4 G (1 : 200 希釈) IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 測定値、X 軸に貯蔵条件の表示が示されているドットチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の詳細な説明

ここに、さまざまな態様を、本明細書の以下でより完全に記載する。そのような態様は、しかしながら、多くの異なる形態で具現化され得、本明細書に示される実施形態に限定されずとして解釈されるべきではなく、むしろ、これらの実施形態は、本開示が徹底的および完全なものであり、その範囲を当業者に完全に伝えるように、提供される。

【0043】

コロナウイルスに対する免疫応答を誘導するための組成物、キット、方法、およびその使用が本明細書において提供される。簡単に述べると、(1) ナノ粒子キャリアシステム；(2) コロナウイルス抗原をコードする核酸および RNA ポリメラーゼをコードする核酸；(3) 組合せ組成物；(4) 熱的に安定な SARS-CoV-2 RNA ワクチン、乾燥 SARS-CoV-2 RNA ワクチン、および凍結乾燥 SARS-CoV-2 RNA ワクチン；(5) 医薬組成物；(6) 投薬；(7) 投与；(8) 治療的適用、および(9) キットが本明細書においてさらに記載される。

定義

【0044】

すべての定義は、本明細書で定義および使用される場合、辞書による定義、参照により組み込まれた文献における定義、および／または定義された用語の通常の意味を制御するものと理解されるべきである。

【0045】

本明細書に開示されるすべての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用される主題に関して参照によって組み込まれ、一部の事例では、文献の全体を包含することがある。特許文献および非特許文献を含む本明細書に開示されるすべての参考文献は、それぞれが個々に組み込まれたかのように、それらの全体が、これにより参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、明白な定義を含有する特許、特許出願、または刊行物が参照により組み込まれる場合、これらの明白な定義は、それらが見出される組み込まれた特許、特許出願、または刊行物に適用され、本出願の本文、特に、本出願の特許請求の範囲に必ずしも適用されず、その場合には、本明細書に提供される定義が優先されることを意味するものとする理解されるべきである。

【0046】

不定冠詞の「a」および「an」は、明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、対照的に明確に指示されない限り、「少なくとも 1 つ」を意味すると理解されるべきである。

【0047】

「および／または」という語句は、明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、そのように結合された要素、すなわち、一部の事例において結合的に存在し、他の事例において分離的に存在する要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解

10

20

30

40

50

されるべきである。「および／または」を用いて列挙された複数の要素は、同じ方式で、すなわち、そのように結合された要素の「1つまたは複数」と解釈されるべきである。他の要素は、具体的に特定された要素に関連するまたは関連しないかどうかにかかわらず、「および／または」節によって具体的に特定される要素以外に、必要に応じて存在していてもよい。そのため、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」への言及は、「含む (comprising)」などのオープンエンドの語と組み合わせて使用される場合、一実施形態では、Aのみ（必要に応じて、B以外の要素を含む）、別の実施形態では、Bのみ（必要に応じて、A以外の要素を含む）、さらに別の実施形態では、AおよびBの両方（必要に応じて、他の要素を含む）などを指すことができる。

【0048】

明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、「または」は、上記で定義された「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分ける場合、「または」または「および／または」は、包括的である、すなわち、要素の数またはリストの少なくとも1つを含むが、2つ以上も含み、必要に応じて、追加の列挙されていない項目を含むとして解釈されるべきである。「の1つのみ」もしくは「の正確に1つ」、または特許請求の範囲で使用される場合に「からなる」などの、明確に逆のことが示されている用語のみが、要素の数またはリストの正確に1つの要素を含むことを指す。一般に、「または」という用語は、本明細書で使用される場合、「いずれか」、「の1つ」、「のただ1つ」、または「の正確に1つ」などの排他的な用語が先行する場合に、排他的代替（すなわち、「どちらか一方であるが、両方ではない」）を示すとして単に解釈されるものとする。「から本質的になる」は、特許請求の範囲で使用される場合、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

【0049】

本明細書で使用される場合、「必要に応じた」または「必要に応じて」は、その後に記載される状況が生じてもよく、または生じなくてもよいことを意味し、その結果、その記載は、状況が生じる例および状況が生じない例を含む。

【0050】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、所与の値の最大±20%の範囲を意味する。あるいは、特に生物系または生物学的過程に関しては、これらの用語は、値の1桁以内、好ましくは2倍以内を意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、別段の指定のない限り、「約」という用語が暗に含まれ、この文脈では特定の値に対する許容される誤差範囲内に入ることを意味する。

【0051】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、所望の効果を実現するまたは少なくとも部分的に実現するために十分である量を指す。

ナノ粒子キャリアシステム

【0052】

1つのナノ粒子または複数のナノ粒子を含む種々の組成物が本明細書において提供される。ナノ粒子はまた、本明細書ではキャリアと称されるまたはNPと省略される。本明細書において提供されるナノ粒子は、直径約1マイクロメートル（ μm ）未満の有機材料、無機材料、または無機材料と有機材料の組合せであり得る。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子を、本明細書において提供される生物活性のある作用剤の送達システムとして使用する。

【0053】

種々のナノ粒子およびナノ粒子の製剤（すなわち、ナノエマルジョン）が使用される。例示的なナノ粒子が図3A～3Cに図示されている。本明細書において提供されるナノ粒子には、これだけに限定されないが、水中油型エマルジョン、ナノ構造化脂質キャリア（NL C）、カチオン性ナノエマルジョン（CNE）、小胞リン脂質ゲル（VPG）、ポリマーナノ粒子、カチオン性脂質ナノ粒子、リポソーム、金ナノ粒子、固体脂質タンパク質ナノ粒子、ポリエチレンイミンナノ粒子（LN PまたはSLN）、混合相コアNL C、イ

10

20

30

40

50

オン化脂質キャリア、磁気キャリア、ポリエチレングリコール（PEG）で機能化されたキャリア、コレステロールで機能化されたキャリア、ポリ乳酸（PLA）で機能化されたキャリア、およびポリ乳酸-α-グリコール酸（PLGA）で機能化された脂質キャリアが含まれ得る。

【0054】

図3A（一定の縮尺ではない）に図示されている水中油型エマルジョンは、水または水相に分散した油滴を含有する安定な不混和性流体である。図3B（一定の縮尺ではない）には、固体有機脂質（例えば、トリミリスチン）と液状油（例えば、スクアレン）の混和物を含み得るナノ構造化脂質キャリア（NLC）が図示されている。NLCでは、固体脂質が液状油中に分散している。ナノ液滴全体が水性（水）相に分散している。一部の実施形態では、図3C（一定の縮尺ではない）に図示されている通り、ナノ粒子は、無機ナノ粒子を、液状油中に分散した固体無機ナノ粒子（例えば、酸化鉄ナノ粒子）として含む。したがって、ナノ液滴全体が水性（水）相中にコロイドとして分散している。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は水溶液中に分散している。水溶液の非限定的な例としては、水（例えば、滅菌水、蒸留水、脱イオン化水、超純水、RNaseを含む水など）、生理食塩水溶液（例えば、Krebs' s生理食塩水、Ascari's生理食塩水、Dent' s生理食塩水、Tet' s生理食塩水）、または水中1%（w/v）ジメチルスルホキシド（DMSO）が挙げられる。

【0055】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、親水性表面を含む。一部の実施形態では、親水性表面は、カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、親水性表面は、イオン化脂質を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、膜を含む。一部の実施形態では、膜は、カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。親水性表面への包含のための例示的なカチオン性脂質としては、限定されないが、1, 2-ジオレオイルオキシ-3（トリメチルアンモニウム）プロパン（DOTAP）、3β-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール（DCコレステロール）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（DDA）；1, 2-ジミリストイル3-トリメチルアンモニウムプロパン（DMTAP）、ジパルミトイル（C16:0）トリメチルアンモニウムプロパン（DPTAP）、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン（DSTAP）、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]N, N, N-トリメチルアンモニウム、クロリド（DOTMA）、N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（DOEPC）、1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DODAP）、および1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLindMA）、1, 1'-（（2-（4-（2-（（2-（ビス（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン-1-イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン-2-オール）（C12-200）、3060i10、テトラキス（8-メチルノニル）3, 3', 3'', 3'''-（（（メチルアザンジイル）ビス（プロパン-3, 1-ジイル））ビス（アザントリイル））テトラプロピオネート、9A1P9、デシル（2-（ジオクチルアンモニオ）エチル）ホスフェート；A2-Iso5-2DC18、エチル5, 5-ジ（（Z）-ヘプタデカ-8-エン-1-イル）-1-（3-（ピロリジン-1-イル）プロピル）-2, 5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート；ALC-0315、（（4-ヒドロキシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン-6, 1-ジイル）ビス（2-ヘキシルデカノエート）；ALC-0159、2-〔（ポリエチレングリコール）-2000〕-N, N-ジテトラデシルアセトアミド；β-シトステロール、（3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R）-17-（（2R, 5R）-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル）-10, 13-ジメチル-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-オール；BAME-O16B、ビス（2-（

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、金属を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、疎水性コア内の金属を含む。金属としては、限定されないが、遷移金属塩などの金属塩、遷移金属酸化物などの金属酸化物、遷移金属水酸化物などの金属水酸化物、遷移金属リン酸塩などの金属リン酸塩、または半金属（例えば、ケイ素およびケイ素系化合物または合金）であり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、酸化アルミニウム（ Al_2O_3 ）、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄（ Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 FeO 、またはそれらの組合せ）、二酸化チタン、二酸化ケイ素（ SiO_2 ）、ヒドロキシリン酸アルミニウム（ $Al(OH)_x(PO_4)_y$ ）、リン酸カルシウム（ $Ca_3(PO_4)_2$ ）、カルシウムヒドロキシアパタイト（ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ）、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む。無機粒子は、1つまたは複数の同じまたは異なる金属（遷移金属を含む任意の金属）から形成されてもよい。一部の実施形態では、無機粒子は、遷移金属酸化物である。一部の実施形態では、遷移金属は、マグネタイト（ Fe_3O_4 ）、マグヘマイト（ $\gamma-Fe_2O_3$ ）、ウスタイト（ FeO ）、またはヘマタイト（アルファ（ α ）- Fe_2O_3 ）である。一部の実施形態では、金属は、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムであり、ホスフェート末端脂質または界面活性剤、例えば、オレイン酸、オレイルアミン、SDS、TOP OまたはDSP Aは、液状油と混合されて、疎水性コアが形成される前に、無機固体ナノ粒子をコーティングするために使用される。一部の実施形態では、金属は、常磁性、超常磁性、フェリ磁性または強磁性化合物を含むことができる。一部の実施形態では、金属は、超常磁性酸化鉄（ Fe_3O_4 ）である。

10

20

【0059】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質；油、および無機粒子を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、DOTAP；スクアレンおよび／またはグリセリルトリミリステート-dynasan；ならびに酸化鉄を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、界面活性剤をさらに含む。したがって、一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質；油、無機粒子、および界面活性剤を含む。

【0060】

界面活性剤は、本明細書において提供されるナノ粒子の2つの液体間または液体成分と固体成分の間の表面張力を低下させる化合物である。界面活性剤は、疎水性、親水性、または両親媒性であり得る。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、疎水性界面活性剤を含む。使用することができる例示的な疎水性界面活性剤としては、これだけに限定されないが、ソルビタンモノラウレート（SPAN（登録商標）20）、ソルビタンモノパルミテート（SPAN（登録商標）40）、ソルビタンモノステアレート（SPAN（登録商標）60）、ソルビタントリステアレート（SPAN（登録商標）65）、ソルビタンモノオレエート（SPAN（登録商標）80）、およびソルビタントリオレエート（SPAN（登録商標）85）が挙げられる。好適な疎水性界面活性剤としては、親水性親油性バランス（HLB）値が10またはそれ未満、例えば、5またはそれ未満、1から5まで、または4から5までのものが挙げられる。例えば、疎水性界面活性剤は、HLB値が1から5まで、または4から5までのソルビタンエステルであってよい。

30

40

【0061】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、乳化剤とも称される親水性界面活性剤を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、ポリソルベートを含む。ポリソルベートは、脂肪酸でエステル化されたエトキシ化ソルビタン（ソルビトールの誘導体）に由来する油性の液体である。使用することができる例示的な親水性界面活性剤として、これだけに限定されないが、ポリソルベート、例えば、TWEEN（登録商標）、Kolliphor、Scattics、Alkest、またはCanarcel；ポリオキシエチレンソルビタンエステル（ポリソルベート）；ポリソルベート80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、またはTWEEN（登録

50

商標) 80) ; ポリソルベート 60 (ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、または T W E E N (登録商標) 60) ; ポリソルベート 40 (ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、または T W E E N (登録商標) 40) ; およびポリソルベート 20 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、または T W E E N (登録商標) 20) が挙げられる。一実施形態では、親水性界面活性剤はポリソルベート 80 である。

【0062】

本明細書において提供されるナノ粒子は、脂質膜 (例えば、D O T A P などのカチオン性脂質) で囲まれた疎水性コアを含む。一部の実施形態では、疎水性コアは、1 つまたは複数の無機粒子 ; リン酸を末端に持つ脂質 ; および界面活性剤を含む。

【0063】

本明細書に記載される無機固体ナノ粒子を、液状油と混合する前に表面改変することができる。例えば、無機固体ナノ粒子の表面が親水性である場合、ナノエマルジョン粒子の「油」相中の無機固体ナノ粒子と液状油の混和を容易にするために、無機固体ナノ粒子を疎水性分子 (または界面活性剤) でコーティングすることができる。一部の実施形態では、無機粒子をキャッピングリガンド、リン酸を末端に持つ脂質、および / または界面活性剤でコーティングする。一部の実施形態では、疎水性コアは、リン酸を末端に持つ脂質を含む。使用することができる例示的なリン酸を末端に持つ脂質としては、これだけに限定されないが、トリオクチルホスフィンオキシド (T O P O) またはジステアリルホスファチジン酸 (D S P A) が挙げられる。一部の実施形態では、疎水性コアは、亜リン酸を末端に持つ界面活性剤、カルボン酸を末端に持つ界面活性剤、硫酸塩を末端に持つ界面活性剤、またはアミンを末端に持つ界面活性剤などの界面活性剤を含む。典型的なカルボン酸を末端に持つ界面活性剤として、オレイン酸が挙げられる。典型的なアミンを末端に持つ界面活性剤として、オレイルアミンが挙げられる。一部の実施形態では、界面活性剤は、ジステアリルホスファチジン酸 (D S P A) 、オレイン酸、オレイルアミンまたはドデシル硫酸ナトリウム (S D S) である。一部の実施形態では、無機固体ナノ粒子は酸化鉄などの金属酸化物であり、無機固体ナノ粒子を液状油と混合して疎水性コアを形成する前に、オレイン酸、オレイルアミン、S D S 、D S P A 、または T O P O などの界面活性剤を使用して無機固体ナノ粒子をコーティングする。

【0064】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてホスフェート末端脂質、リン末端界面活性剤、カルボキシレート末端界面活性剤、サルフェート末端界面活性剤、またはアミン末端界面活性剤でコーティングされた、少なくとも 1 つの金属水酸化物またはオキシ水酸化物粒子を含有する 1 つまたは複数の無機粒子 ; ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油 ; D O T A P を含むカチオン性脂質 ; ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含む疎水性界面活性剤 ; ならびにポリソルベートを含む親水性界面活性剤を含む。

【0065】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じて T O P O でコーティングされた、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子を含有する 1 つまたは複数の無機ナノ粒子、ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油 ; カチオン性脂質 D O T A P ; ソルビタンモノステアレートを含む疎水性界面活性剤 ; およびポリソルベート 80 を含む親水性界面活性剤を含む。

【0066】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてホスフェート末端脂質、リン末端界面活性剤、カルボキシレート末端界面活性剤、サルフェート末端界面活性剤、またはアミン末端界面活性剤でコーティングされた、少なくとも 1 つの金属水酸化物またはオキシ水酸化物粒子を含有する 1 つまたは複数の無機粒子 ; ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油 ; D O T A P を含むカチオン性脂質 ; ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選

10

20

30

40

50

択されるソルビタンエステルを含む疎水性界面活性剤；ならびにポリソルベートを含む親水性界面活性剤からなる。一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてＴＯＰＯでコーティングされた、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子を含有する１つまたは複数の無機ナノ粒子、ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油；カチオン性脂質ＤＯＴＡＰ；ソルビタンモノステアレートを含む疎水性界面活性剤；およびポリソルベート８０を含む親水性界面活性剤からなる。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約０．２％～約４０％ｗ／ｖのスクアレン、約０．００１％～約１０％ｗ／ｖの酸化鉄ナノ粒子、約０．２％～約１０％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約５％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約１０％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約２％～約６％ｗ／ｖのスクアレン、約０．０１％～約１％ｗ／ｖの酸化鉄ナノ粒子、約０．２％～約１％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約１％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約５％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約０．２％～約４０％ｗ／ｖのスクアレン、約０．００１％～約１０％ｗ／ｖの水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子、約０．２％～約１０％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約５％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約１０％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約２％～約６％ｗ／ｖのスクアレン、約０．０１％～約１％ｗ／ｖの水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子、約０．２％～約１％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約１％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約５％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。

10

20

30

40

50

【００６７】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、表１に記載される少なくとも１つのナノ粒子製剤を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ＮＰ－１～ＮＰ－３０のいずれか１つを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ＮＰ－１～ＮＰ－３１のいずれか１つを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、本明細書に提供される核酸と混合される。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ホモジナイゼーションおよび超音波処理技法によって作製される。

【表 1 - 1】

表 1. ナノ粒子製剤。

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v)または mg/ml	追加成分 1%(w/v)、 mg/ml,または mM
NP-1	30 mg/ml の 1,2- ジオ レオイル-3-トリメチルア ンモニウム-プロパン (DOTAP)クロリド	37.5 mg/ml のスクア レン	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート、(2R)- 2-[(2R,3R,4S)-3,4-ジ ヒドロキシオキソラン-2- イル]-2-ヒドロキシエチ ルオクタデセノエート、 C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登 録商標)60) 37 mg/ml のポリオキシ エチレン(20)ソルビタン モノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ ポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	0.2 mg Fe/ml の 12 nm のオレイン酸コー ティング酸化鉄ナノ粒 子 10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-2	30 mg/ml の 1,2- ジオ レオイル-3-トリメチルア ンモニウム-プロパン (DOTAP)クロリド	37.5 mg/ml のスクア レン	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート (2R)- 2-[(2R,3R,4S)-3,4-ジ ヒドロキシオキソラン-2- イル]-2-ヒドロキシエチ ルオクタデセノエート C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリオキシ エチレン(20)ソルビタン モノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	1 mg Fe/ml の 15 nm のオレイン酸コーティ ング酸化鉄ナノ粒子 10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-3	30 mg/ml の 1,2- ジオ レオイル-3-トリメチルア ンモニウム-プロパン (DOTAP)クロリド	37.5 mg/ml の Miglyol 812 N (飽和ココナツ/パーム 核油由来カプリル酸/ カプリン酸脂肪酸と 植物由来グリセロー ルのトリグリセリドエス テル)	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート、(2R)- 2-[(2R,3R,4S)-3,4-ジ ヒドロキシオキソラン-2- イル]-2-ヒドロキシエチ ルオクタデセノエート C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリオキシ エチレン(20)ソルビタン モノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ ポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	0.2 mg Fe/ml の 15 nm のオレイン酸コー ティング酸化鉄ナノ粒 子 10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-4	30 mg/ml の 1,2- ジオ レオイル-3-トリメチルア	37.5 mg/ml の Miglyol 812 N	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート、(2R)- 2-[(2R,3R,4S)-3,4-ジ	1 mg Fe/ml の 15 nm のオレイン酸コーティ ング酸化鉄ナノ粒子

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	ンモニウム-プロパン (DOTAP)クロリド	(飽和ココナツ/パーム 核油由来カプリル酸/ カプリン酸脂肪酸と 植物由来グリセロール のトリグリセリドエス テル)	ヒドロキシオキシラン-2- イル]-2-ヒドロキシエチ ルオクタデセノエート、 C ₂₄ H ₄₆ O ₆) (SPAN(登 録商標)60) 37 mg/ml のポリオキシ エチレン(20)ソルビタン モノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-5	30 mg/ml の DOTAP クロリド	37.5 mg/ml のスクア レン	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	1 mg/ml のトリオクチ ルホスフィンオキシド (TOPO)でコーティング された水酸化アルミニ ウム(Alhydrogel(登 録商標)2%)粒子 10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-6	30 mg/ml の DOTAP クロリド	37.5 mg/ml のソラネ ソール(Cayman chemicals)	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	0.2 mg Fe/ml のオレ イン酸コーティング酸 化鉄ナノ粒子 10 mM のクエン酸ナ トリウム
NP-7	30 mg/ml の DOTAP クロリド	37.5 mg/ml のスクア レン 2.4 mg/ml の Dynasan 114	37 mg/ml のソルビタン モノステアレート (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	10 mM のクエン酸ナ トリウム
NP-8	4 mg/ml の DOTAP ク ロリド	43 mg/ml のスクアレ ン	5 mg/ml のソルビタン トリオレエート(SPAN(登 録商標)85) 5 mg/ml のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	10 mM のクエン酸ナ トリウム
NP-9	7.5 mg/ml の 1,2- ジ オレオイル-3-トリメチル アンモニウム-プロパン (DOTAP)クロリド	9.4 mg/ml のスクアレ ン (((6E,10E,14E,18E)- 2,6,10,15,19,23-ヘ キサメチルテトラコサ- 2,6,10,14,18,22-ヘ キサエン、C ₃₀ H ₅₀) 0.63 mg/ml のグリセ リルトリミステート- dynasan	9.3 mg/ml のソルビタン モノステアレート (2R)- 2-[(2R,3R,4S)-3,4-ジ ヒドロキシオキシラン-2- イル]-2-ヒドロキシエチ ルオクタデセノエート、 C ₂₄ H ₄₆ O ₆) (SPAN(登 録商標)60) 9.3 mg/ml のポリオキシ エチレン(20)ソルビタン	0.05 mg/ml の 15 ナ ノメートルの超常磁 性酸化鉄(Fe ₃ O ₄) 10 mM のクエン酸ナ トリウム二水和物

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

		(DYNASAN 114(登録商標))	モノオレート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソルベ ート 80 (TWEEN(登 録商標)80)	
NP-10	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルト リミリストート- dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.75%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノ ス テアレート (SPAN(登 録商標)60) 0.5%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-11	3.0% DOTAP	0.25%のグリセリルト リミリストート- dynasan(DYNASA N 114(登録商標)) 3.75%のスクアレン	3.7%のソルビタンモノ ス テアレート (SPAN(登 録商標)60) 3.7%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-12	0.4% DOTAP	4.3%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオ レート(SPAN(登録 商標)85) 0.5%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-13	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルト リミリストート- dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	2.0%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-14	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルト リミリストート- dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオ レート(SPAN(登録 商標)85) 2.0%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-15	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルト リミリストート- dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.25%のソルビタントリ オレート(SPAN(登録 商標)85) 2.0%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	
NP-16	0.4% DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオ レート(SPAN(登録 商標)85) 2.0%のポリソルベ ート 80 (TWEEN(登録 商標)80)	

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

NP-17	0.4% DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 2%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	
NP-18	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	2%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	
NP-19	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.75%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 0.5%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-20	3.0% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 3.75%のスクアレン	3.7%のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 3.7%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-21	0.4% DOTAP	4.3%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 0.5%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-22	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%スクアレン	2.0%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-23	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-24	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリルトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標))	0.25%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85)	1%の水酸化アルミニウム

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

		4.08%のスクアレン	2.0%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	
NP-25	0.4% DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-26	0.4% DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 2%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-27	0.4% DOTAP	0.25%のグリセリトリミリステート-dynasan (DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	2%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2%のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-28	0.5-5.0 mg/ml の DOTAP	0.2-10% (v/v)のスクアレン	0.01-2.5% (v/v) ポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	
NP-29	0.4% (w/w) DOTAP	4.3% (w/w)のスクアレン	0.5% (w/w)のソルビタントリオレート (SPAN(登録商標)85) 0.5% (w/w)のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	
NP-30	30 mg/ml の DOTAP クロリド	37.5 mg/ml のスクアレン	37 mg/ml のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	10 mM のクエン酸ナトリウム
NP-31	30 mg/ml の DOTAP クロリド	37.5 mg/ml のスクアレン	37 mg/ml のソルビタンモノステアレート (SPAN(登録商標)60) 37 mg/ml のポリソルベート 80 (TWEEN(登録商標)80)	0.4 mg Fe/ml の 5 nm のオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 10 mM のクエン酸ナトリウム二水和物

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、スクアレンを含み、固体粒子を含まない。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、スクアレン、および酸化鉄粒子を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、免疫刺激物質を含む。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、スクアレンである。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、Miglyol 810またはM

iglyol 812である。Miglyol 810は、飽和カプリルおよびカプリン脂肪酸とグリセロールのトリグリセリドエステルである。Miglyol 812は、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステルである。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を減少させ得るが、本明細書に提供される組成物に対する免疫応答を増加させ得る（例えば、ワクチンとして送達される場合）。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を増加させ得るが、本明細書に提供される組成物に対する免疫応答を減少させ得る。

【0069】

本明細書に提供されるナノ粒子は、さまざまな平均直径のサイズのものであり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約20ナノメートル（nm）～約200nmの範囲の平均直径（z平均流体力学直径、動的光散乱によって測定される）を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約20nm～約150nm、約20nm～約100nm、約20nm～約80nm、約20nm～約60nmの範囲である。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約200nm、約40nm～約150nm、約40nm～約100nm、約40nm～約90nm、約40nm～約80nm、または約40nm～約60nmの範囲である。一実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約80nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約60nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子は、最大で100nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、50～70nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、40～80nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子の疎水性コア内の無機粒子（例えば、酸化鉄）は、約3nm～約50nmの範囲の平均直径（数加重平均直径）であり得る。例えば、無機粒子は、約5nm、約10nm、約15nm、約20nm、約25nm、約30nm、約35nm、約40nm、約45nm、または約50nmの平均直径を有し得る。一部の実施形態では、エステルおよび脂質の比は、30nm～200nmの粒子径を生じさせる。一部の実施形態では、エステルおよび脂質の比は、40nm～70nmの粒子径を生じさせる。

【0070】

本明細書に提供されるナノ粒子は、多分散指数（PDI）によって特徴付けられ得、これは、サイズ分布に関するそれらの品質の指標である。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子の平均多分散指数（PDI）は、約0.1～約0.5の範囲である。一部の実施形態では、ナノ粒子の平均PDIは、約0.2～約0.5、約0.1～約0.4、約0.2～約0.4、約0.2～約0.3、または約0.1～約0.3の範囲であり得る。

【0071】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約20：1、約0.5：1～約12：1、約0.5：1～約9：1、約0.5：1～約5：1、約0.5：1～約3：1、または約0.5：1～約1：1の範囲の油の界面活性剤に対するモル比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約2：1、約0.2：1～約1.5：1、約0.3：1～約1：1、約0.5：1～約1：1、または約0.6：1～約1：1の範囲の親水性界面活性剤の脂質に対する比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約5：1、約0.2：1～約3：1、約0.3：1～約2：1、約0.5：1～約2：1、または約1：1～約2：1の範囲の疎水性界面活性剤の脂質に対する比を含む。

【0072】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.2%～約40%w/vの液状油、約0.001%～約10%w/vの無機固体ナノ粒子、約0.2%～約10%w/vの脂質、約0.25%～約5%w/vの疎水性界面活性剤、および約0.5%～約10%w/vの親水性界面活性剤を含む。一部の実施形態では、脂質はカチオン性脂質を含み、油はスクアレンを含み、および／または疎水性界面活性剤は、ソルビタンエステル

を含む。

【0073】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるナノ粒子は、エステルを、8から11の間の親水性親油性バランスがもたらされる比で含む。

【0074】

一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、本明細書において提供される脂質キャリアに組み込まれて、それに付随して、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成している。脂質キャリアー核酸複合体は、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである。

核酸

10

【0075】

核酸を含む組成物が本明細書において提供される。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子と複合体化している。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子の膜と複合体化している。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子の親水性表面と複合体化している。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子の内部にある。一部の実施形態では、核酸は、疎水性コアの内部にある。

【0076】

一部の実施形態では、核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）である。核酸は、直鎖状であるまたは二次構造（例えば、ヘアピン）を含む。一部の実施形態では、核酸は、改変ヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらの類似体を含むポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドなどの改変ヌクレオチド、およびそれらの類似体を含み得る。ヌクレオチド構造に対する改変が存在する場合、その改変は本明細書において提供される組成物のアセンブリ前になされたものであってもアセンブリ後になされたものであってもよい。改変ヌクレオチドおよびヌクレオチドに組み入れることができ、RNA分子内に存在し得る改変核酸塩基としては、m5C（5-メチルシチジン）、m5U（5-メチルウリジン）、m6A（N6-メチルアデノシン）、s2U（2-チオウリジン）、Um（2'-O-メチルウリジン）、m1A（1-メチルアデノシン）；m2A（2-メチルアデノシン）；Am（2-1-O-メチルアデノシン）；ms2m6A（2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン）；i6A（N6-イソペンテニルアデノシン）；ms2i6A（2-メチルチオ-N6イソペンテニルアデノシン）；io6A（N6-（シス-ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；ms2io6A（2-メチルチオ-N6-（シス-ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）；g6A（N6-グリシニルカルバモイルアデノシン）；t6A（N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）；ms2t6A（2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）；m6t6A（N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）；hn6A（N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；ms2hn6A（2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；Ar(p)（2'-O-リボシルアデノシン（ホスフェート））；I（イノシン）；m1I（1-メチルイノシン）；m'I m（1, 2'-O-ジメチルイノシン）；m3C（3-メチルシチジン）；Cm（2T-O-メチルシチジン）；s2C（2-チオシチジン）；ac4C（N4-アセチルシチジン）；f5C（5-フォンニルシチジン）；m5Cm（5, 2-O-ジメチルシチジン）；ac4Cm（N4-アセチル2T-O-メチルシチジン）；k2C（リシジン）；m1G（1-メチルグアノシン）；m2G（N2-メチルグアノシン）；m7G（7-メチルグアノシン）；Gm（2'-O-メチルグアノシン）；m22G（N2, N2-ジメチルグアノシン）；m2Gm（N2, 2'-O-ジメチルグアノシン）；m22Gm（N2, N2, 2'-O-トリメチルグアノシン）；Gr(p)（2'-O-リボシルグアノシン（ホスフェート））；yW（ワイプトシン）；o2yW（ペルオキシワイプトシン）；OH yW（ヒドロキシワイプトシン）；OH yW*（不完全改変（undermodified）ヒドロキシワイプトシン）；imG（ワイオシン）；mimG（メチルグアノシン）；Q（キューオシン）；oQ（エポキシキューオシン）；galQ（ガ

20

30

40

50

ルタクトシルーキューオシン) ; manQ (マンノシルーキューオシン) ; preQo (7-シアノ-7-デアザグアノシン) ; preQi (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン) ; G* (アルカエオシン) ; D (ジヒドロウリジン) ; m5Um (5, 2'-O-ジメチルウリジン) ; s4U (4-チオウリジン) ; m5s2U (5-メチル-2-チオウリジン) ; s2Um (2-チオ-2'-O-メチルウリジン) ; acp3U (3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン) ; hoSU (5-ヒドロキシウリジン) ; moSU (5-メトキシウリジン) ; cmo5U (ウリジン-5-オキシ酢酸) ; mcmo5U (ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル) ; chm5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン) ; mchm5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル) ; mcm5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン) ; mcm5Um (S-メトキシカルボニルメチル-2-O-メチルウリジン) ; mcm5s2U (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン) ; nm5s2U (5-アミノメチル-2-チオウリジン) ; mnm5U (5-メチルアミノメチルウリジン) ; mnm5s2U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; mnm5se2U (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン) ; ncm5U (5-カルバモイルメチルウリジン) ; ncm5Um (5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; cmnm5U (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; cnmm5Um (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-L-Oメチルウリジン) ; cmnm5s2U (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; m62A (N6, N6-ジメチルアデノシン) ; Tm (2'-O-メチルイノシン) ; m4C (N4-メチルシチジン) ; m4Cm (N4, 2-O-ジメチルシチジン) ; hm5C (5-ヒドロキシメチルシチジン) ; m3U (3-メチルウリジン) ; cm5U (5-カルボキシメチルウリジン) ; m6Am (N6, T-O-ジメチルアデノシン) ; rn62Am (N6, N6, O-2-トリメチルアデノシン) ; m2'7G (N2, 7-ジメチルグアノシン) ; m2'2'7G (N2, N2, 7-トリメチルグアノシン) ; m3Um (3, 2T-O-ジメチルウリジン) ; m5D (5-メチルジヒドロウリジン) ; f5Cm (5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン) ; m1Gm (1, 2'-O-ジメチルグアノシン) ; m'Am (1, 2-O-ジメチルアデノシン) イリノメチルウリジン) ; tm5s2U (S-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; imG-14 (4-デメチルグアノシン) ; imG2 (イソグアノシン) ; ac6A (N6-アセチルアデノシン)、ヒポキサンチン、イノシン、8-オキソアデニン、その7-置換誘導体、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-アミノウラシル、5-(C₁~C₆)-アルキルウラシル、5-メチルウラシル、5-(C₂~C₆)-アルケニルウラシル、5-(C₂~C₆)-アルキニルウラシル、5-(ヒドロキシメチル)ウラシル、5-クロロウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヒドロキシシトシン、5-(C₁~C₆)-アルキルシトシン、5-メチルシトシン、5-(C₂~C₆)-アルケニルシトシン、5-(C₂~C₆)-アルキニルシトシン、5-クロロシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、N²-ジメチルグアニン、7-デアザグアニン、8-アザグアニン、7-デアザ-7-置換グアニン、7-デアザ-7-(C₂~C₆)アルキニルグアニン、7-デアザ-8-置換グアニン、8-ヒドロキシグアニン、6-チオグアニン、8-オキソグアニン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2, 4-ジアミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、8-アザプリン、置換7-デアザプリン、7-デアザ-7-置換プリン、7-デアザ-8-置換プリン、水素(脱塩基残基)、m5C、m5U、m6A、s2U、W、または2'-O-メチル-Uが挙げられる。これらの改変核酸塩基のうちのいずれか1つまたは任意の組合せを本発明の自己複製性RNAに含めることができる。これらの改変核酸塩基およびそれらの対応するリボヌクレオシドの多くが商業的供給者から入手可である。所望であれば、核酸は、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、および/またはメチルホスホネート連結を含有するものであってもよい。例えば、RNAの翻訳有効性および半減期を増大させるために、RNA配列をそのコドン使用に関して改変することができる。RNAの半減期を増大させるために、ポリA尾部(例えば、約30個ま

10

20

30

40

50

たはそれよりも多くのアデノシン残基によるもの)をRNAの3'末端に付着させることができる。RNAの5'末端に、構造m7G(5')ppp(5')N(キャップ0構造)を有する改変リボヌクレオチドまたはその誘導体を用いてキャップ付加することができ、これは、RNA合成の間に組み入れることができる、またはRNA転写後に酵素により工学的に操作することができる(例えば、N7-モノメチル化キャップ0構造の構築を触媒する、mRNAトリホスファターゼ、グアニリル-トランスフェラーゼおよびグアニン-7-メチルトランスフェラーゼからなるワクシニアウイルスキャッピング酵素(VCE)の使用により)。キャップ構造により、RNA分子に安定性および翻訳有効性をもたらすことができる。RNA分子の5'キャップを2'-O-メチルトランスフェラーゼによってさらに改変することができ、それによって、キャップ1構造(m7Gppp[m2'-O]N)の生成がもたらされ、翻訳有効性がさらに増大し得る。キャップ1構造により*in vivo*における効力も増大し得る。

10

【0077】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、1つまたは複数の核酸を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、2つまたはそれよりも多くの核酸を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、少なくとも1つのDNAを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、少なくとも1つのRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、少なくとも1つのDNAおよび少なくとも1つのRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、5ngよりも多く〜約1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、最大で約25ng、50ng、75ng、100ng、150ng、175ngの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、最大で約1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、約0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.5μg、1μg、5μg、10μg、12.5μg、15μg、25μg、40μg、50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.5μg、1μg、5μg、10μg、12.5μg、15μg、25μg、40μg、50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mgの量で存在する。一部の実施形態では、核酸は、少なくとも約200、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、または20,000ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、核酸は、最大で約7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、または20,000ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、核酸は、約7500、10,000、15,000、または20,000ヌクレオチドの長さである。

20

30

40

【0078】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、ウイルス抗原をコードする配列を含む核酸配列を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、ウイルス抗原は、表面タンパク質または膜貫通タンパク質である。一部の実施形態では、ウイルス抗原は、スパイクタンパク質、糖タンパク質、またはエンベロープタンパク質である。一部の実施形態では、ウイルス抗原は、コロナウイルス抗原またはその断片である。一部の実施形態では、抗原は、SARS-CoV抗原、SARS-CoV-2抗原、中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルス抗原、断片またはそのバリエーションである。

SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原

【0079】

50

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) は、COVID-19 (新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019)) と称される感染性疾患を引き起こすウイルスである。SARS-CoV-2 ウイルスのバリエーションとして、アルファバリエーション、ベータバリエーション、デルタバリエーション、ミューバリエーション、およびオミクロンバリエーションが挙げられる。米国において広まっているアルファバリエーション (B. 1. 1. 7)、ベータバリエーション (B. 1. 351、B. 1. 351. 2、B. 1. 351. 3)、デルタバリエーション (B. 1. 617. 2、AY. 1、AY. 2、AY. 3)、オミクロンバリエーション (B. 1. 1. 529)、およびガンマバリエーション (P. 1、P. 1. 1、P. 1. 2) は、懸念されるバリエーションに分類されている。SARS-CoV-2 構造、その成分をバリエーションおよびそれらの種々の特色と共に以下に記載する。

10

【0080】

コロナウイルスは、エンベロープを有する一本鎖RNAウイルスであり、S (スパイク) タンパク質、E (エンベロープ) タンパク質、M (膜) タンパク質、およびN (ヌcleoカプシド) タンパク質として公知の4種の構造タンパク質を有する。Nタンパク質はRNAゲノムを保持し、Sタンパク質、Eタンパク質、およびMタンパク質は一緒になってウイルスエンベロープを創出する。SARS-CoV-2 に関しては、スパイク (S) タンパク質により、宿主細胞の受容体となるアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) を介した宿主細胞の膜とのウイルスの付着および融合が容易になる。Sタンパク質は、ウイルス細胞の宿主細胞への侵入を媒介する。SARS-CoV-2 スパイクの総長は一般に1273アミノ酸であり、N末端に位置するシグナルペプチド (アミノ酸1~13)、S1サブユニット (残基14~685)、およびS2サブユニット (残基686~1273) を含む。最後の2つの領域は、それぞれ受容体結合および膜融合を担う。S1サブユニット内にはN末端ドメイン (14~305残基) および受容体結合性ドメイン (RBD、319~541残基) が存在する。S2サブユニットは融合ペプチド (FP) (788~806残基)、ヘプタペプチドリピート配列1 (HR1) (912~984残基)、HR2 (1163~1213残基)、TMドメイン (1213~1237残基)、および細胞質ドメイン (1237~1273残基) を含む。具体的には、HR1およびHR2はヘプタペプチド: HPPHCP Cの反復で構成され、ここで、Hは疎水性または従来かさのある残基であり、Pは極性または親水性残基であり、Cは別の荷電した残基である。HR1とHR2は、S2タンパク質の「ステムヘリックス」ドメインと称される6-ヘリックス束 (6-HB) を形成する。RBDが宿主細胞膜のACE2に結合すると、FPが標的細胞膜に挿入されることによってS2のコンフォメーションが変化し、HR1ドメインのプレヘアピンコイルドコイルが露出し、HR2ドメインとHR1三量体の相互作用が誘発されて、ステムヘリックス (6-HB) が形成され、したがって、ウイルスエンベロープと細胞膜がウイルスの融合および侵入のために近傍に置かれる。野生型スパイクタンパク質のアミノ酸配列は配列番号17に提示される。ステムヘリックスに対応するアミノ酸配列は配列番号18に提示される。

20

30

【0081】

コロナウイルスは、抗原ドリフトを定期的に受ける。抗原ドリフトは、ウイルスにおける一種の遺伝的バリエーションであり、宿主抗体が認識するウイルス表面タンパク質をコードするウイルス遺伝子の突然変異の蓄積から生じる。いくつかのSARS-CoV-2バリエーションが公衆衛生当局によって同定されており、それらを以下の表2に提示する。

40

【表 2 - 1】

表 2. SARS-CoV-2 バリエント。

WHO ラベル	Pango 系統*	GISAID クレード	Nextstrain クレード	モニタリングされた追加のスパイクアミノ酸変化	最初に確認された試料	指定された日
アルファ	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	N501Y A570D P681H T716I S982A D1118H	イギリス、 2020 年 9 月	2020 年 12 月 18 日
ベータ	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	D80A D215G K417N A701V N501Y E484K	南アフリカ、 2020 年 5 月	2020 年 12 月 18 日
デルタ	B.1.617.2 ^s	G/478K.V1	21A 21I 21J	T19R L452R T478K P681R D950N	インド、 2020 年 10 月	VOI: 2021 年 4 月 4 日 VOC: 2021 年 5 月 11 日
イプシロン	B.1.427, B.1.429	CAL.20C	21C	I4205V D1183Y S13I W152C L452R Q677H	カリフォルニア、 米国、2020 年 5 月	VOC: 2021 年 3 月 19 日 VOI: 2021 年 2 月 26 日
イータ	B.1.525	G/484K.V3	21D	E484K Q677H F888L	複数国、 2020 年 12 月	2021 年 3 月 17 日
ガンマ	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	L18F T20N P26S D138Y R190S K417T E484K N501Y	ブラジル、 2020 年 11 月	2021 年 1 月 11 日

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

WHO ラベル	Pango 系統*	GISAID クレード	Nextstrain クレード	モニタリングされた追加のスパイクアミノ酸変化	最初に確認された試料	指定された日
				H655Y T1027I		
イオタ	B.1.526	GH/253G.V1	21F	L5F T95I D253G E484K D614G A701V	米国、 2020 年 11 月	2021 年 3 月 24 日
カッパ	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	S13I Q57H S84L W152C T205I L452R D614G	インド、 2020 年 10 月	2021 年 4 月 4 日
ラムダ	C.37	GR/452Q.V1	21G	S:Δ247-253 G75V T76I D614G L452Q F490S T859N	ペルー、2020 年 12 月	2021 年 6 月 14 日
ミュー	B.1.621	GH	21H	K417N E484K P681H	コロンビア、 2021 年 1 月	2021 年 8 月 30 日
オミクロン	B.1.1.529	GR/484A	21K 21M 21L	A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, Δ211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K,	2021 年 11 月 南アフリカ、香 港、ベルギー、 イスラエル	VOC: 2021 年 11 月 26 日

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

WHO ラベル	Pango 系統*	GISAID クレード	Nextstrain クレード	モニタリングされた追加のスパイクアミノ酸変化	最初に確認された試料	指定された日
				D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F		

10

* すべての派生系統を含む。Pango 系統の完全なリストはワールドワイドウェブ <cov-lineages.org/lineage_list.html; FAQ については pango.network/faqs/を参照>で入手可能である。

【0082】

コロナウイルスタンパク質抗原を含む組成物が本明細書において提供される。一部の実施形態では、本明細書において提供されるコロナウイルスタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 の懸念されるバリエーション（VOC）に由来するものである。懸念されるバリエーションは、感染・伝播性の増大、より重症の疾患（例えば、入院もしくは死亡の増加）、以前の感染の間にもしくはワクチン接種で生成された抗体による中和の有意な低減、処置もしくはワクチンの効果の低減、または診断的検出ができないことのエビデンスが存在するバリエーションである。懸念されるバリエーションの可能性のある特質としては、注目すべきバリエーションの可能性のある特質に加えて、（i）診断、処置、またはワクチンに対する影響のエビデンス、（ii）診断検査標的への広範にわたる干渉、（iii）1つまたは複数のクラスの治療に対する感受性の実質的な低下のエビデンス、（iv）以前の感染の間にもしくはワクチン接種で生成された抗体による中和の有意な低減のエビデンス、（v）重症疾患からのワクチンにより誘導される保護の低減のエビデンス、（vi）感染・伝播性の増大のエビデンス、および（vii）疾患重症度の増大のエビデンスが挙げられる。

20

【0083】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるコロナウイルスタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 の注目すべきバリエーション（VOI）に由来するものである。注目すべきバリエーションは、受容体結合の変化、以前の感染またはワクチン接種に対して生成された抗体による中和の低減、処置の有効性の低下、診断への潜在的影響、または感染・伝播性または疾患重症度の増大の予測に関連付けられた特定の遺伝子マーカーを有するバリエーションである。注目すべきバリエーションの可能性のある特質としては、（i）伝播、診断、治療薬、または免疫エスケープに影響を及ぼすことが予測される特定の遺伝子マーカー、（ii）割合が高い症例または独特のアウトブレイククラスターの原因であるというエビデンス、および（iii）米国または他の国における有病率または拡大が限定されたものであることが挙げられる。

30

【0084】

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原をコードする核酸を含む組成物が本明細書において提供される。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、表 2 に列挙されている SARS-CoV-2 のバリエーションに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、表 2 に列挙されている 1つまたは複数の突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、受容体結合性ドメイン（RBD）内に 1つまたは複数の突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、HR1 ドメインまたは HR2 ドメイン内に 1つまたは複数の突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-

40

50

2 スパイクタンパク質抗原は、表面糖タンパク質の614位にグリシン残基を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のアルファバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のベータバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のデルタバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のガンマバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のイオタバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のキャッパバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のラムダバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のミューバリエントに由来するものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原は、SARS-CoV-2 のオミクロンバリエントに由来するものである。

10

【0085】

一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、表3に列挙されている抗原またはその断片をコードする。一部の実施形態では、核酸は、表3に列挙されている抗原に特異的に結合する配列に対する少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、表3に列挙されているRNA配列に対する少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列類似性を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、表3に列挙されているRNA配列と相補的なDNA配列を含む。参照配列に対する所与の配列のパーセント(%)配列同一性は、2つの配列をアラインメントし、必要であれば最大でのパーセント配列同一性を実現するためにギャップを導入した後に同定された同一の残基のパーセンテージと定義される。パーセント同一性は、当技術分野で公知のアラインメント方法を使用して算出することができ、例えば、BLAST、Align、ClustalW2などの公的に入手可能なソフトウェアを使用して配列のアラインメントを行うことができる。当業者はアラインメントのための適切なパラメータを決定することができるが、BLASTの初期設定パラメータが具体的に意図されている。例示的なSARS-CoV-2抗原をコードする例示的な核酸配列が表3に列挙されている。

20

30

40

50

【表 3】

表 3. SARS CoV-2 スパイクタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列。

配列番号	名称	バリエーション
配列番号 1	デルタ V5 RNA 配列	A.1
配列番号 2	K995P-V996P RNA 配列	A.1-preF
配列番号 3	D614G RNA 配列	B.1
配列番号 4	B.1.351-PP-D614G RNA 配列	ベータ-preF
配列番号 5	B.1.1.7-PP-D614G RNA 配列	アルファ-preF
配列番号 6	デルタ.AY1-S2P-wtFur RNA 配列	デルタ-preF
配列番号 7	デルタ.AY1-S2P-wtFur-newKozak RNA 配列	デルタ-preF-kozak
配列番号 8	オミクロン- B.1.1.529 RNA 配列	オミクロン
配列番号 9	デルタ V5 アミノ酸配列	A.1
配列番号 10	K995P-V996P アミノ酸配列	A.1-preF
配列番号 11	D614G アミノ酸配列	B.1
配列番号 12	B.1.351-PP-D614G アミノ酸配列	ベータ-preF
配列番号 13	B.1.1.7-PP-D614G アミノ酸配列	アルファ-preF
配列番号 14	デルタ AY1-S2P-wtFur アミノ酸配列	デルタ-preF
配列番号 15	デルタ AY1-S2P-wtFur-newKozak アミノ酸配列	デルタ-preF-kozak
配列番号 16	オミクロン- B.1.1.529 アミノ酸配列	オミクロン
配列番号 17	Wuhan-Hu-1 -全長野生型スパイクタンパク質アミノ酸配列	Wild-type (WT) Spike
配列番号 18	Wuhan-Hu-1 -野生型スパイクタンパク質-ステムヘリックスアミノ酸配列 [残基 913～1213]	Wild-type (WT) Spike
配列番号 19	オミクロン- B.1.1.529 ステムヘリックス(HR1 および HR2)のアミノ酸配列	オミクロン

10

20

30

*Pre-F は安定化された融合前スパイクタンパク質である

【0086】

40

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質またはその断片を含み、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質アミノ酸配列は、本明細書に開示される任意の核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、配列番号 1～8 のいずれか 1 つに記載の RNA 配列を含む。一部の実施形態では、スパイクタンパク質は、配列番号 9～19 のいずれか 1 つに記載の配列のいずれかに対応するアミノ酸配列を有する。

【0087】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、(i) 任意のベクター骨格、および (ii) 配列番号 24～31 に記載の抗原配列のいずれか、または配列番号 24～31 に記載の抗原配列のいずれかと少なくとも 80%、もしくは少なくとも 85%、

50

もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも93%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも97%同一の任意の核酸配列を含む核酸配列を含む。

【0088】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、(i) 配列番号32~38のうちの1つに記載のベクター骨格、および(ii) 任意のSARS-CoV-2スパイクタンパク質を定義するアミノ酸配列をコードする任意の配列、または任意のSARS-CoV-2スパイクタンパク質を定義する配列と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも93%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも97%同一のアミノ酸配列をコードする任意の配列を含む核酸配列を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、配列番号24~38のうちのいずれか1つと相補的なDNA配列を含む。

10

【0089】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、(i) 配列番号32~38のうちの1つに記載のベクター骨格、または配列番号32~38のうちの1つに記載の配列と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも93%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも97%同一の任意の配列、および(ii) 任意のSARS-CoV-2スパイクタンパク質を定義するアミノ酸配列をコードする任意の配列、または任意のSARS-CoV-2スパイクタンパク質を定義する配列と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも93%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも97%同一のアミノ酸配列をコードする任意の配列を含む核酸配列を含む。

20

自己複製性核酸

【0090】

自己複製性核酸を含む組成物が本明細書において提供される。本明細書において提供されるSARS-CoV-2スパイク抗原またはその断片は、自己複製性核酸構築物の一部としてコードされるものであり得る。一部の実施形態では、自己複製性核酸分子は、ウイルスレプリカーゼ、ウイルスプロテアーゼ、ウイルスヘリカーゼおよび他の非構造的ウイルスタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つまたはそれよりも多くの遺伝子を含み、5'末端シス活性複製配列、3'末端シス活性複製配列、およびSARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードする抗原性配列も含む。異種配列(複数可)の発現を方向付けるサブゲノムプロモーターを自己複製性ヌクレオチド配列に含めることができる。所望であれば、異種配列を、自己複製性RNA内の他のコード領域とインフレームで融合することができ、かつ／または、配列内リボソーム進入部位(IRES)の制御下に置くことができる。

30

【0091】

一部の実施形態では、自己複製性ヌクレオチド配列は、自己複製性RNA分子である。自己複製性RNA分子は、自己複製性RNA分子が感染性ウイルス粒子の産生を誘導することができないように設計される。これは、例えば、自己複製性RNA内の、ウイルス粒子の産生のために必要な構造タンパク質をコードする1つまたは複数のウイルス遺伝子を取り除くことによって実現することができる。例えば、自己複製性RNA分子がシンドビスウイルス(SIN)、セムリキ森林ウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE)などのアルファウイルスに基づくものである場合、カプシドおよび／またはエンベロープ糖タンパク質などのウイルス構造タンパク質をコードする1つまたは複数の遺伝子を取り除くことができる。所望であれば、本発明の自己複製性RNA分子を、弱毒化された感染性ウイルス粒子もしくは毒力を有する感染性ウイルス粒子の産生が誘導されるように、またはその後の感染が1回可能なウイルス粒子が産生されるように、設計する。

40

【0092】

自己複製性RNA分子は、動物細胞に送達されると、いかなるタンパク質も伴わない場合であっても、自己複製性RNA分子自体から(または自己複製性RNA分子自体のアンチセンスコピーから)の転写によって複数の娘RNAの産生をもたらす得る。自己複製性

50

R N A は、細胞への送達後に直接翻訳され得、この翻訳により R N A 依存性 R N A ポリメラーゼがもたらされ、それにより今度は送達された R N A の転写物が産生される。したがって、送達された R N A により、多数の娘 R N A の産生がもたらされる。これらの転写物は、送達された R N A に対してアンチセンスであり、それら自体が翻訳されて、コードされる S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質の *i n s i t u* 発現がもたらされ得る、または、送達された R N A と同じセンスのさらなる転写物に転写され得、それらの転写物が翻訳されて、コードされる S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質（複数可）の *i n s i t u* 発現がもたらされる。

【0093】

本明細書において提供される自己複製性 R N A 分子は、1つまたは複数の改変ヌクレオチドを含有し得、したがって、安定性が改善されており、また、*i n v i v o* における分解およびクリアランスに対して抵抗性を持ち、また、他の利点もある。一部の実施形態では、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性 R N A 分子は、自己複製性 R N A が細胞内に送達された際のエンドソームおよび細胞質の免疫受容体の刺激を回避するまたは低減する。これにより、タンパク質の自己複製、増幅および発現がなされることが可能になる。また、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性 R N A では自然免疫系の活性化およびそれに続く望ましくない結果（例えば、注射部位の炎症、注射部位の刺激、疼痛など）が低減するので、改変ヌクレオチドを含有しない自己複製性 R N A と比べて安全性の懸念も減少する。自己複製の結果として産生された R N A 分子は、細胞質の免疫受容体によって外来核酸として認識される。したがって、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性 R N A 分子により、宿主細胞における R N A の効率的な増幅および S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質の発現、ならびにアジュバント効果がもたらされる。

【0094】

一部の実施形態では、本明細書において提供される自己複製性 R N A 分子は、改変ヌクレオチドを少なくとも1つ含有する。5' キャップの一部ではない改変ヌクレオチドを（例えば、5' キャップの一部である改変に加えて）使用することができる。したがって、自己複製性 R N A 分子は、単一の位置に改変ヌクレオチドを含有してもよく、2つまたはそれよりも多くの位置に特定の改変ヌクレオチド（例えば、シュドウリジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン）を含有してもよく、または2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多くの改変ヌクレオチドを含有してもよい（例えば、1つまたは複数の位置のそれぞれに）。自己複製性 R N A 分子は、窒素塩基上または窒素塩基内に改変を含有するが、改変糖またはホスフェート部分は含有しない、改変ヌクレオチドを含むことが好ましい。一部の実施例では、自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの0.001%から99%または100%の間が、改変ヌクレオチドである。例えば、自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの0.001%~25%、0.01%~25%、0.1%~25%、または1%~25%が、改変ヌクレオチドである。他の例では、自己複製性 R N A 分子内の未改変の特定のヌクレオチドの0.001%から99%または100%の間を、改変ヌクレオチドで置き換える。例えば、ウリジンを含有する自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの約1%を、例えば、ウリジンをシュドウリジンで置き換えることによって改変することができる。他の例では、自己複製性 R N A 分子内の2つ、3つ、または4つの特定のヌクレオチド（ウリジン、シチジン、グアノシン、またはアデニンを含有するヌクレオチド）のうちの所望の量（パーセンテージ）が、改変ヌクレオチドである。例えば、特定の自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの0.001%~25%、0.01%~25%、0.1%~25%、または1%~25%が、改変ヌクレオチドである。他の例では、特定の自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの0.001%~20%、0.001%~15%、0.001%~10%、0.01%~20%、0.01%~15%、0.1%~25%、0.01%~10%、1%~20%、1%~15%、1%~10%、または約5%、約10%、約15%、約20%が、改変ヌクレオチドである。自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの100%未満が改変ヌクレオチドであることが好ましい。特定の自己複製性 R N A 分子内のヌクレオチドの100%未

満が改変ヌクレオチドであることも好ましい。したがって、好ましい自己複製性RNA分子は、未改変ヌクレオチドを少なくともいくつか含む。

【0095】

改変ヌクレオチドを少なくとも1つ含む自己複製性RNA分子は、任意の好適な方法を使用して調製することができる。改変ヌクレオチドを含有するRNA分子を作製するためのいくつかの好適な方法が当技術分野で公知である。例えば、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNA分子を、自己複製性RNA分子をコードするDNAを好適なDNA依存性RNAポリメラーゼ、例えば、T7ファージRNAポリメラーゼ、SP6ファージRNAポリメラーゼ、T3ファージRNAポリメラーゼなど、または改変ヌクレオチドのRNA分子への効率的な組み入れを可能にするこれらのポリメラーゼの突然変異体を使用して転写すること（例えば、*in vitro* 転写）によって調製することができる。転写反応は、ヌクレオチドおよび改変ヌクレオチド、ならびに選択されたポリメラーゼ活性を支持する他の成分、例えば、好適な緩衝液、および好適な塩を含有する。ヌクレオチド類似体の自己複製性RNAへの組み入れを、例えば、そのようなRNA分子の安定性が変更されるように、RNAaseに対する抵抗性が増大するように、適切な宿主細胞への導入後の複製（RNAの「感染力」）が確立されるように、および／または、自然免疫応答および適応免疫応答が誘導もしくは低減されるように、工学的に操作することができる。好適な合成方法を単独で、または1つまたは複数の他の方法（例えば、組換えDNAまたはRNA技術）と組み合わせて使用して、1つまたは複数の改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNA分子を作製することができる。

10

20

【0096】

核酸合成は、ポリヌクレオチドおよびそのようなポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および／または発現を含めた、当技術分野で周知であり、慣習的である好適な組換え方法を使用して実施することもできる。遺伝子断片および合成ポリヌクレオチドのランダムな断片化およびPCRによる再アセンブリによるDNAシャッフリングは、ポリヌクレオチド配列を設計し、工学的に操作するために使用することができる公知の技法の例である。部位特異的突然変異誘発を使用して、核酸およびコードされるタンパク質を変更して、例えば、新しい制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変更し、コドン選好を変化させ、スプライスバリエーションを生成し、突然変異を導入することなどができる。

30

【0097】

一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、RNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、ウイルスRNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、本明細書において提供される核酸は、（1）ウイルスRNAポリメラーゼ、および（2）タンパク質またはその機能的断片をコードする。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、ウイルスRNAポリメラーゼをコードする第1の核酸、およびタンパク質またはその機能的断片をコードする第2の核酸を含む。

【0098】

自己複製性RNAを含む組成物が本明細書において提供される。自己複製性RNA（レプリコンとも称される）は、主としてそれ自体による制御下で複製することが可能な任意の遺伝子エレメント、例えば、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージまたはウイルスを包含する。自己複製により、本明細書において提供される核酸の哺乳動物細胞における自己増幅のシステムがもたらされる。一部の実施形態では、自己複製性RNAは一本鎖である。一部の実施形態では、自己複製性RNAは二本鎖である。

40

【0099】

本明細書において提供されるRNAポリメラーゼは、これだけに限定されないが、アルファウイルスRNAポリメラーゼ、東部ウマ脳炎ウイルス（E E E V）RNAポリメラーゼ、西武ウマ脳炎ウイルス（W E E V）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（V E E V）、また、チクングニアウイルス（C H I K V）、セムリキ森林ウイルス（S F V）、またはシ

50

ンドビスウイルス（SINV）を包含し得る。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼは、VEEV RNAポリメラーゼである。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号20の核酸配列に対して少なくとも85%の同一性を含む。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号20の核酸配列に対して少なくとも90%の同一性を含む。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号20の核酸配列に対して少なくとも95%の同一性を含む。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、配列番号20の核酸配列に対して少なくとも99%の同一性を含む。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は配列番号20である。

【0100】

一部の実施形態では、VEEV RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、RELPLVLD SAAFNVECFKKYACNNEYWETFKENPIRLTEENVVNYITKLKGP（配列番号21）、TQMRELPLVLD SAAFNVECFKKYACNNEYWETFKENPIRLTE（配列番号22）、または配列番号23に対して少なくとも85%の同一性を含む。一部の実施形態では、VEEV RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号21、配列番号22、または配列番号23に対して少なくとも90%の同一性を含む。一部の実施形態では、VEEV RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号21、配列番号22、または配列番号23に対して少なくとも95%の同一性を含む。一部の実施形態では、VEEV RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号21、配列番号22、または配列番号23に対して少なくとも99%の同一性を含む。一部の実施形態では、VEEV RNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号21、配列番号22、または配列番号23である。

【0101】

エンベロープを有さないウイルス由来の1つまたは複数の構造タンパク質をコードするレプリコンRNA（repRNA）を含む、組成物および方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、repRNAは、プロテアーゼをコードする。一部の実施形態では、repRNAは、3CDプロテアーゼをコードする。一部の実施形態では、構造タンパク質とプロテアーゼを共発現させる。さらなる実施形態では、repRNAは、1つまたは複数のオープンリーディングフレームを含む。一部の実施形態では、オープンリーディングフレームは、配列内リボソーム進入部位（IRES）によって隔てられている。一部の実施形態では、オープンリーディングフレームは、リボソームスキッピングペプチド配列によって隔てられている。一部の実施形態では、リボソームスキッピングペプチド配列は、Thosea asignaウイルス（T2A）に由来するものである。

組合せ組成物

【0102】

本明細書に記載されるナノ粒子およびコロナウイルス抗原をコードする核酸を含む組成物が本明細書において提供される。本明細書において提供される複数のナノ粒子を含むナノエマルジョンがさらに本明細書において提供される。一部の実施形態では、核酸は、自己複製性RNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、核酸は、自己複製性RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、核酸は、RNAポリメラーゼをさらにコードする。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼは、ウイルスRNAポリメラーゼである。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、タンパク質（例えば、シス）をコードする核酸配列と同じ核酸鎖上にある。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、タンパク質（例えば、トランス）をコードする核酸配列とは異なる核酸鎖である。一部の実施形態では、RNAポリメラーゼをコードする核酸は、DNA分子である。一部の実施形態では、本明細書において提供される抗原をコードする核酸配列は、DNA分子またはRNA分子である。一部の実施形態では、本明細書において提供される抗原は、DNAによってコードされている。封入のためのナノ粒子は、限定することなく、NP-1～NP-30のうちの1つ、またはNP-1～NP-31のうちのいずれか1つを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-

1を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-2を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-3を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-4を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-5を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-6を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-7を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-8を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-9を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-10を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-11を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-12を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-13を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-14を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-15を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-16を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-17を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-18を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-18を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-19を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-20を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-21を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-22を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-23を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-24を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-25を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-26を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-27を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-28を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-28を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-29を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-30を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-31を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、NP-1~NP-31のいずれかおよび凍結保護物質を含む。一部の実施形態では、凍結保護物質は、本明細書に記載される糖である。封入のための核酸は、限定することなく、配列番号1~8および／または配列番号24~31のうちのいずれか1つまたは複数を含む領域を含む。一部の場合では、核酸は、RNAポリメラーゼ、例えば、配列番号20の配列を含む領域をコードする領域をさらに含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号1と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号2と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号3と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号4と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号5と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号6と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号7と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号8と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号24と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号25と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号26と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号27と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号28と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号29と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号30と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号31と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、本明細書に記載される感染性疾患抗原をコードする配列およびRNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む。一部の実施形態では、RNA依存性RNAポリメラーゼは、VEEV RNAポリメラーゼである。一部の実施形態では、エレメントをコードする2つの核酸は別々の核酸内にある。一部の実施形態では、エレメントをコードする2つの核酸は同じ核酸上に存在する。

10

20

30

40

50

【0103】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号1と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号2と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号3と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号4と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号5と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号6と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号7と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号8と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、アミノ酸配列の614位にグリシン(G614)を含むSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、(i)配列番号20、および(ii)SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする領域を含む核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号24と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号25と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号26と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号27と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号28と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号29と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号30と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-1と、配列番号31と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。

10

20

30

40

【0104】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号1と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号2と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号3と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号4と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提

50

供される組成物は、NP-2と、配列番号5と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号6と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号7と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号8と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、アミノ酸配列の614位にグリシン（G614）を含むSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、(i)配列番号20、および(ii)SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする領域を含む核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号24と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号25と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号26と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号27と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号28と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号29と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号30と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-2と、配列番号31と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。

10

20

30

40

50

【0105】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号1と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号2と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号3と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号4と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号5と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号6と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号7と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号8と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、アミノ酸配列の614位にグリシン（G614）を含むSARS-CoV-2ス

スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、(i)配列番号20、および(ii)SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原をコードする領域を含む核酸とを含み、ここで、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原は、配列番号17と比べて突然変異またはアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号24と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号25と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号26と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号27と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号28と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号29と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号30と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物は、NP-30と、配列番号31と少なくとも85%同一である配列またはその機能的断片を含む核酸とを含む。

10

20

30

40

50

【0106】

本明細書に提供される組成物は、窒素：ホスフェート（N：P）のモル比によって特徴付けられ得る。N：Pの比は、窒素を含有するナノ粒子中のカチオン性脂質の量、および負に荷電したホスフェートを含有する組成物中で使用される核酸の量によって決定される。脂質キャリアの核酸に対するモル比は、核酸の送達効率を増加させる、核酸保持ナノエマルジョン組成物が抗原に対する免疫応答を誘発する能力を増加させる、核酸保持ナノエマルジョン組成物が対象において抗原に対する抗体価の生成を誘発する能力を増加させるように選択することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、窒素のホスフェートに対するモル比によって特徴付けられ得る脂質キャリアの核酸に対するモル比を有し、これは、約0.01：1～約1000：1、例えば、約0.2：1～約500：1、約0.5：1～約150：1、約1：1～約150：1、約1：1～約125：1、約1：1～約100：1、約1：1～約50：1、約1：1～約50：1、約5：1～約50：1、約5：1～約25：1、または約10：1～約20：1の範囲であり得る。ある特定の実施形態では、窒素のホスフェートに対する（N：P）モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの核酸に対するモル比は、約1：1～約150：1、約5：1～約25：1、または約10：1～約20：1の範囲である。一実施形態では、ナノエマルジョン組成物のN：Pのモル比は、約15：1である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、膜に共有結合的に付着した本明細書に提供される核酸を含む。

【0107】

本明細書に提供される組成物は、油の界面活性剤に対するモル比によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対する比は、スクアレン：DOTAP、疎水性界面活性剤、および親水性界面活性剤のモル比である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対する比は、スクアレン：DOTAP、ソルビタンモノステアレート、およびポリソルベート80のモル比である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、約0.1：1～約20：1、約0.5：1～約12：1、約0.5：1～約9：1、約0.5：1～約5：1、約0.5：1～約3：1、または約0.5：1～約1：1の範囲である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、少なくとも約0.

1 : 1、少なくとも約 0.2 : 1、少なくとも約 0.3 : 1、少なくとも約 0.4 : 1、少なくとも約 0.5 : 1、少なくとも約 0.6 : 1、少なくとも約 0.7 : 1 である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、少なくとも約 0.4 : 1 から最大で 1 : 1 である。

【0108】

本明細書に提供される組成物は、親水性界面活性剤の脂質（例えば、カチオン性脂質）に対する比によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、親水性界面活性剤の脂質に対する比は、約 0.1 : 1 ~ 約 2 : 1、約 0.2 : 1 ~ 約 1.5 : 1、約 0.3 : 1 ~ 約 1 : 1、約 0.5 : 1 ~ 約 1 : 1、または約 0.6 : 1 ~ 約 1 : 1 の範囲である。本明細書に提供される組成物は、疎水性界面活性剤の脂質（例えば、カチオン性脂質）に対する比の範囲によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、疎水性界面活性剤の脂質に対する比は、約 0.1 : 1 ~ 約 5 : 1、約 0.2 : 1 ~ 約 3 : 1、約 0.3 : 1 ~ 約 2 : 1、約 0.5 : 1 ~ 約 2 : 1、または約 1 : 1 ~ 約 2 : 1 の範囲である。

10

【0109】

ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質、および RNA を含む乾燥組成物が本明細書に提供される。ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート 80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、免疫刺激物質、および RNA を含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。

熱的に安定な SARS-COV-2 RNA ワクチン、乾燥 SARS-COV-2 RNA ワクチン、および凍結乾燥 SARS-COV-2 RNA ワクチン

20

【0110】

乾燥または凍結乾燥組成物およびワクチンが本明細書において提供される。好適な希釈剤中に再構成された本明細書において提供される乾燥または凍結乾燥組成物、および薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態では、希釈剤は水性である。一部の実施形態では、希釈剤は水である。

【0111】

凍結乾燥組成物は、組成物を凍結させ、その後、圧力を低下させ、昇華によって氷を除去することを伴う低温脱水プロセスによって生成される。ある特定の場合では、凍結乾燥には、結合した水分子を脱離プロセスによって除去することも伴う。一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物およびワクチン組成物を噴霧乾燥する。噴霧乾燥は、溶液を噴霧器を通して噴霧を生じさせ、それをその後加熱した気体流に曝露させて迅速な蒸発を促進するプロセスである。十分な質量の液体が蒸発したら、残った液滴中の固体材料が粒子を形成し、次いでそれを気体流から分離する（例えば、フィルターまたはサイクロンを使用して）。乾燥は、本明細書において提供される組成物およびワクチン組成物を既存の mRNA ワクチンの貯蔵に必要な零下温度と比較して高温（例えば、摂氏 4 度を超える温度）で貯蔵することに役立つ。一部の実施形態では、本明細書において提供される乾燥組成物および凍結乾燥組成物は、（a）脂質キャリアであって、（i）疎水性コア；（i i）1 つまたは複数の無機ナノ粒子；（i i i）および 1 つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；（b）1 つまたは複数の核酸；ならびに（c）少なくとも 1 つの凍結保護物質を含む。一部の実施形態では、凍結保護物質は、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。凍結保護物質の追加の例として、これだけに限定されないが、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール、3-O-メチル-D-グルコピラノース（3-OMG）、ポリエチレングリコール（PEG）、1,2-プロパンジオール、アセトアミド、トレハロース、ホルムアミド、糖、タンパク質、および炭水化物が挙げられる。

30

40

【0112】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法は、少なくとも 1 つの凍結保護物質を含む。包含のための例示的な凍結保護物質は、限定されるものではないが、

50

スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、またはグルコース、およびそれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、包含のための追加のまたは代替の凍結保護物質は、ソルビトール、リビトール、エリスリトール (erthritol)、トレイトール、エチレングリコール、またはフルクトースである。一部の実施形態では、包含のための追加のまたは代替の凍結保護物質は、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール、3-O-メチル-D-グルコピラノース (3-OMG)、ポリエチレングリコール (PEG)、1,2-プロパンジオール、アセトアミド、トレハロース、ホルムアミド、糖、タンパク質、および炭水化物である。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 1 % w / v ~ 約 20 % w / v、好ましくは、約 10 % w / v ~ 約 20 % w / v、より好ましくは、約 10 % w / v で存在する。本開示のある特定の態様では、凍結保護物質は、スクロースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、マルトースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、トレハロースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、マンニトールである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、グルコースである。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、450、500 mg またはそれよりも多くの量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 50 ~ 約 500 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 200 ~ 約 300 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 250 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結乾燥組成物の少なくとも約 50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 またはそれよりも多い重量パーセントの量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、凍結乾燥組成物の約 95 重量 % の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、凍結乾燥組成物の 80 ~ 98 %、85 ~ 98 %、90 ~ 98 %、または 94 ~ 96 重量 % の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、糖である。一部の実施形態では、糖は、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、またはグルコースである。一部の実施形態では、糖は、スクロースである。一部の実施形態では、スクロースは、約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、450、500 mg またはそれよりも多くの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、約 50 ~ 約 500 mg の量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、約 200 ~ 約 300 mg の量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、約 250 mg の量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の少なくとも約 50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 またはそれよりも多い重量パーセントの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の約 95 重量 % の量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の 80 ~ 98 %、85 ~ 98 %、90 ~ 98 %、または 94 ~ 96 重量 % の量で存在する。

10

20

30

40

【0113】

一部の実施形態では、凍結保護物質は、スクロースである。一部の実施形態では、凍結保護物質は、少なくとも約 0.1 % w / v の濃度である。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 1 % w / v ~ 約 20 % w / v の濃度である。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 10 % w / v ~ 約 20 % w / v の濃度である。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約 10 % w / v の濃度である。

【0114】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、熱的に安定である。組成物は、組成物が、熱または低温の作用に抵抗し、所与の温度で分解から核酸分子を保護する能力などのその性質を維持する場合に、熱的に安定であると考えられる

50

。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、摂氏約 25 度 (°C) または標準的な室温で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、約 45 °C で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、約 -20 °C で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、約 2 °C ~ 約 8 °C で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、少なくとも約 -80 °C、少なくとも約 -20 °C、少なくとも約 0 °C、少なくとも約 2 °C、少なくとも約 4 °C、少なくとも約 6 °C、少なくとも約 8 °C、少なくとも約 10 °C、少なくとも約 20 °C、少なくとも約 25 °C、少なくとも約 30 °C、少なくとも約 37 °C、最高で 45 °C の温度で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 1 週間、少なくとも約 2 週間、少なくとも約 1 か月間、最大で 3 か月間、熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、少なくとも約 4 °C から最高で 37 °C の温度で、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 1 週間、少なくとも約 2 週間、少なくとも約 1 か月間、最大で 3 か月間、貯蔵される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチン組成物は、少なくとも約 20 °C から最高で 25 °C の温度で、少なくとも約 5 日間、少なくとも約 1 週間、少なくとも約 2 週間、少なくとも約 1 か月間、最大で 3 か月間、貯蔵される。

10

【0115】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む方法も本明細書に提供される。

20

【0116】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む方法が本明細書にさらに提供される。

30

【0117】

凍結乾燥組成物を再構成するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップ；ならびに好適な希釈剤中で凍結乾燥組成物を再構成するステップを含む方法が本明細書にさらに提供される。

40

【0118】

噴霧乾燥組成物を再構成するための方法であって、脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに好適な希釈剤中で噴霧乾燥組成物を再構成するステップを含む方法が本明細書にさらに提供される。

50

医薬組成物

【0119】

本明細書に提供される組成物を含む懸濁液が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に提供される懸濁液は、本明細書に提供される多数のナノ粒子または組成物を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、懸濁液、必要に応じて、均質な懸濁液である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、エマルジョン形態である。

【0120】

本明細書に提供される組成物を含む医薬組成物も本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、薬学的に許容される塩、賦形剤、および／または担体と組み合わせられて、医薬組成物を形成する。薬学的な塩、賦形剤、および担体は、投与の経路、標的組織の場所、および薬物の送達の時間経過に基づいて選択され得る。薬学的に許容される担体または賦形剤としては、医薬品投与に適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられ得る。

【0121】

一部の実施形態では、医薬組成物は、固体、半固体、液体または気体（エアロゾル）の形態である。注射用調製物、例えば、無菌注射用水性または油性懸濁液は、好適な分散剤または湿潤剤、および懸濁化剤を使用して、公知技術に従って製剤化され得る。無菌注射用調製物はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射用溶液、懸濁液、またはエマルジョンであってもよい。中でも、用いられ得る許容される媒体および溶媒は、水、リンゲル液、U.S.P.、および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌の固定油が、溶媒または分散媒として用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意のブランドの固定油を用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射剤の調製において使用される。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、または使用の前に、滅菌水または他の滅菌注射媒体に溶解または分散され得る無菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって、滅菌することができる。

【0122】

経口投与のための固形剤形としては、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が挙げられる。そのような固形剤形において、封入または非封入コンジュゲートは、クエン酸ナトリウムもしくは第二リン酸カルシウムなどの少なくとも1つの不活性な薬学的に許容される賦形剤もしくは担体、ならびに／または（a）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸などのフィラーもしくは増量剤、（b）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、およびアカシアなどの結合剤、（c）グリセロールなどの保水剤、（d）寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、（e）パラフィンなどの溶解抑制剤、（f）第四級アンモニウム化合物などの吸収加速剤、（g）例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなどの湿潤剤、（h）カオリンおよびベントナイトクレイなどの吸収剤、ならびに（i）タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物などの滑沢剤と混合される。カプセル剤、錠剤、および丸剤の事例では、剤形はまた、緩衝剤を含んでいてもよい。

投薬

【0123】

本明細書において提供される組成物を、投与を容易にするためおよび投薬量を均一にするために、単位剤形に製剤化することができる。単位剤形は、処置を受ける対象に適した、本明細書において提供される組成物の物理的に別個の単位である。しかし、本明細書において提供される組成物の総合的な使用は、担当医によって、良好な医学的判断の範囲内で決定されることが理解されよう。本明細書において提供される任意の組成物に関して、

10

20

30

40

50

治療有効用量を、最初に、細胞培養アッセイにおいて、または、マウス、ウサギ、イヌ、ブタ、もしくは非ヒト霊長類などの動物モデルにおいてのいずれかで推定することができる。動物モデルを使用して、望ましい濃度範囲および投与経路を実現することもできる。次いで、そのような情報を使用して、ヒトへの投与のための有用な用量および経路を決定することができる。本明細書において提供される組成物の治療有効性および毒性を、細胞培養物または実験動物において、標準的な薬学的手順によって、例えば、ED₅₀（集団の50%に対して治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%に対して致死的な用量）によって決定することができる。毒性の治療効果に対する用量比は治療指数でありLD₅₀/ED₅₀の比として表すことができる。一部の実施形態では、大きな治療指数を示す医薬組成物が有用であり得る。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを、ヒトへの使用のための投薬量の範囲の策定に使用することができる。

10

投与

【0124】

それを必要とする対象に投与するための組成物および医薬組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に提供される医薬組成物は、本明細書に提供される組成物を対象に投与することを可能にする形態である。

【0125】

一部の実施形態では、投与は、局所投与または全身投与である。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、皮下、皮内、筋肉内、吸入、静脈内、腹腔内、頭蓋内、またはくも膜下腔内経路を介した投与のため／それを介した投与における使用のために製剤化される。一部の実施形態では、投与は、1、2、4、6、8、12、24、36、または48時間ごとである。一部の実施形態では、投与は、毎日、毎週、または毎月である。一部の実施形態では、投与は、少なくとも約28日または56日ごとに繰り返される。

20

【0126】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物の単回の投薬が、対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物または医薬組成物は、2回の投薬によって対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物または医薬組成物の2回目の投薬は、1回目の投薬の約28日後または56日後に投与される。一部の実施形態では、1回目の投薬が投与され、2回目の投薬は、約14日後、または約21日後、または約28日後、または約35日後、または約42日後、または約49日後、または約56日後、または約63日後、または約70日後、または約77日後、または約84日後に投与される。一部の実施形態では、2回目の投薬は、1回目の投薬の投与の約10～90日後、または1回目の投薬の投与の約15～85日後、または1回目の投薬の投与の約20～80日後、または1回目の投薬の投与の約25～75日後、または1回目の投薬の投与の約30～70日後、または1回目の投薬の投与の約35～65日後、または1回目の投薬の投与の約40～60日後に投与される。

30

【0127】

一部の実施形態では、本明細書において提供される組成物または医薬組成物の3回目の投薬が対象に投与される。一部の実施形態では、3回目の投薬が、2回目の投薬の投与の約1か月後、2回目の投薬の投与の約2か月後、2回目の投薬の投与の約3か月後、2回目の投薬の投与の約4か月後、2回目の投薬の投与の約5か月後、2回目の投薬の投与の約6か月後、2回目の投薬の投与の約7か月後、2回目の投薬の投与の約8か月後、2回目の投薬の投与の約9か月後、2回目の投薬の投与の約10か月後、2回目の投薬の投与の約11か月後、2回目の投薬の投与の約12か月後、2回目の投薬の投与の約13か月後、2回目の投薬の投与の約14か月後、2回目の投薬の投与の約15か月後、2回目の投薬の投与の約16か月後、2回目の投薬の投与の約17か月後、または2回目の投薬の投与の約18か月後に投与される。

40

治療への適用

【0128】

対象における疾患を処置または防止する方法が本明細書において提供される。一部の実

50

施形態では、本明細書に記載される組成物を、感染症を処置するために使用する。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物を、呼吸器感染症を処置するために使用する。一部の実施形態では、感染症はウイルス感染症である。一部の実施形態では、ウイルス感染症はコロナウイルス由来である。一部の実施形態では、コロナウイルスはSARS-CoV-2である。一部の実施形態では、コロナウイルスはMERsまたはSARSである。一部の実施形態では、コロナウイルスはSARS-CoV-2バリエーションである。

【0129】

対象を免疫保護するための方法が本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態では、方法により、SARS-CoV-2感染症の重症度が低下する。一部の実施形態では、方法により、対象におけるSARS-CoV-2感染症が防止される。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物を、本明細書において提供されるウイルス抗原またはそのバリエーションに対する対象の免疫応答を増強するために使用する。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物を、対象を免疫化するために使用する。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物を、対象における感染症の重症度を低下させるために使用する。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物により、対象における感染症に付随する症状の重症度または持続時間の低減がもたらされる。

【0130】

一部の実施形態では、対象は、哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、ウイルス感染症を有するまたは有する疑いがある。一部の実施形態では、対象は、コロナウイルス感染症を有するまたは有する疑いがある。一部の実施形態では、対象は、SARS-CoV-2ウイルスまたはそのバリエーションによって引き起こされるCOVID-19を有するまたは有する疑いがある。一部の実施形態では、対象は、SARS-CoV-2のデルタバリエーションによって引き起こされるCOVID-19を有する。一部の実施形態では、対象は、SARS-CoV-2のオミクロンバリエーションによって引き起こされるCOVID-19を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質のステムヘリックス領域をコードする核酸を含む、本明細書において提供される組成物が対象に投与される。一部の実施形態では、対象は、免疫無防備状態である。一部の実施形態では、対象は、投与前に免疫抑制される（例えば、免疫抑制剤によって）。一部の実施形態では、対象は、本明細書において提供される組成物の投与前にSARS-CoV-2ワクチンの投薬を少なくとも1回受けている。一部の実施形態では、対象は、上気道感染症の少なくとも1つの症状を以前に示している。

キット

【0131】

本明細書に提供される組成物、本明細書に提供される医薬組成物；および必要に応じて、対象への投与のための送達システムを含むキットが本明細書に提供される。本明細書に記載されるキットは、凍結乾燥された試薬、および必要に応じて、水和のための試薬を含んでいてもよい。本明細書に記載されるキットはまた、凍結乾燥されていない試薬を含んでいてもよい。一部の実施形態では、キットは、それぞれ、脂質キャリアおよび核酸を含む、2つまたはそれよりも多くの別々のユニットを含む。一部の実施形態では、キットは、脂質キャリアおよび核酸を含むユニットを含む。一部の実施形態では、キットは、乾燥組成物の水和のための試薬を含むユニットをさらに含む。一部の実施形態では、水和のための試薬は、水を含む。

【0132】

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数の界面活性剤をさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物の製剤は、投与のために単一の容器中で調製される。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物の製剤は、ナノ粒子キャリアから核酸を分離して、投与のために2つの容器中で調製される。本明細書で使用される場合、「容器 (container)」としては、容器 (vessel)、バイアル、アンプル、管、カップ、ボックス、ボトル、フラスコ、ジャー、ディッシュ、単一ウェルもしくは複数ウェルの器具のウェル、リザーバー、タンクなど、または本明細書に開示される組

成物が、入れられ、貯蔵され、および／もしくは輸送され得、ならびに内容物を取り出すためにアクセスされ得る他のデバイスが挙げられる。そのような容器の例としては、針および注射器を使用する内容物の抜き取りに適合するゴム栓または他のシール手段を有するものを含む、ガラスおよび／もしくはプラスチックのシールされたまたは再シール可能な管およびアンプルが挙げられる。一部の実行では、容器は、RNAseを含まない。

【0133】

一部の実施形態では、キットは、(a) 脂質キャリアであって、疎水性コア、1つまたは複数の脂質、および1つまたは複数の界面活性剤を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに(b) 抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸配列であって、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む。

10

例示的な実施形態

【0134】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質；親水性界面活性剤；および疎水性界面活性剤を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸配列であって、少なくとも1つの核酸配列が、配列番号1～7、必要に応じて1～8と少なくとも85%同一の配列を含む、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物が本明細書において提供される。核酸配列が、配列番号4の配列と少なくとも85%同一であり、必要に応じて配列番号27の配列と少なくとも85%同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号4である配列領域を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号8の配列と少なくとも85%同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号4と同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号8と同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、脂質キャリアと複合体化している、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、RNAポリメラーゼをさらにコードする、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV) RNAポリメラーゼである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼをコードする核酸配列が、配列番号20の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、ソラネソール、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミンEである、組成物が本明細書においてさらに提供される。トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジ옥タデシルアンモニウム(DDA)；1,2-ジミリスチル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP)、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリメチルアンモニウム、クロリド(DOTMA)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLindMA)、1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メチルノニル)3,

20

30

40

50

40

50

号 19 のアミノ酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質抗原をコードする核酸が、配列番号 8 の配列と少なくとも 85 % 同一であり、必要に応じて配列番号 31 の配列と少なくとも 85 % 同一であるポリヌクレオチド配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質が、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、脂質キャリアと複合体化している、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA ポリメラーゼをコードする核酸が、配列番号 20 の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、ソラネソール、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミン E である、組成物が本明細書においてさらに提供される。トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)、 3β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA); 1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP)、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリメチルアンモニウム、クロリド(DOTMA)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPG)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、および 1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLindMA)、1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メチルノニル)3,3',3'',3'''-(4-(メチルアザンジイル)ビス(プロパン-3,1-ジイル))ビス(アザントリイル))テトラプロピオネート、9A1P9、デシル(2-(ジオクチルアンモニオ)エチル)ホスフェート; A2-ISO5-2DC18、エチル5,5-ジ((Z)-ヘプタデカ-8-エン-1-イル)-1-(3-(ピロリジン-1-イル)プロピル)-2,5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート; ALC-0315、((4-ヒドロキシブチル)アザンジイル)ビス(ヘキサ-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート); ALC-0159、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N,N-ジテトラデシルアセトアミド; β -シトステロール、(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-オール; BAME-O16B、ビス(2-(ドデシルジスルファニル)エチル)3,3'-((3-メチル-9-オキソ-10-オキサ-13,14-ジチア-3,6-ジアザヘキサコシル)アザンジイル)ジプロピオネート; BHEM-コレステロール、2-(((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-ジメチル-17-((R)-6-メチルヘプタン-2-イル)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イル)オキシ)カルボニル)アミ

20

30

50

トリメチルアンモニウムプロパン（DMTAP）、ジバルミトイル（C16：0）トリ
メチルアンモニウムプロパン（DPTAP）、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロ
パン（DSTAP）、N-〔1-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル〕N，N，N-
トリメチルアンモニウム、クロリド（DOTMA）、N，N-ジオレオイル-N，N-ジ
メチルアンモニウムクロリド（DODAC）、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロー
3-エチルホスホコリン（DOEPC）、1，2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニ
ウム-プロパン（DODAP）、および1，2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミ
ノプロパン（DLinDMA）、1，1'-（（2-（4-（2-（（2-（ビス（2-
ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピ
ペラジン-1-イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン-2-オール）（C12- 10
200）、306Oi10、テトラキス（8-メチルノニル）3，3'，3''，3'''-（
（（メチルアザンジイル）ビス（プロパン-3，1-ジイル））ビス（アザントリイル）
）テトラプロピオネート、9A1P9、デシル（2-（ジオクチルアンモニオ）エチル）
ホスフェート；A2-Iso5-2DC18、エチル5，5-ジ（（Z）-ヘプタデカ-
8-エン-1-イル）-1-（3-（ピロリジン-1-イル）プロピル）-2，5-ジヒ
ドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート；ALC-0315、（（4-ヒドロ
キシブチル）アザンジイル）ビス（ヘキサン-6，1-ジイル）ビス（2-ヘキシルデカ
ノエート）；ALC-0159、2-〔（ポリエチレングリコール）-2000]-N，
N-ジテトラデシルアセトアמיד；β-シトステロール、（3S，8S，9S，10R，
13R，14S，17R）-17-（（2R，5R）-5-エチル-6-メチルヘプタン 20
-2-イル）-10，13-ジメチル-2，3，4，7，8，9，10，11，12，1
3，14，15，16，17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナント
レン-3-オール；BAME-O16B、ビス（2-（ドデシルジスルフアニル）エチル
）3，3'-（（3-メチル-9-オキソ-10-オキサ-13，14-ジチア-3，6
-ジアザヘキサコシル）アザンジイル）ジプロピオネート；BHEM-コレステロール、
2-（（（（（3S，8S，9S，10R，13R，14S，17R）-10，13-ジ
メチル-17-（（R）-6-メチルヘプタン-2-イル）-2，3，4，7，8，9，
10，11，12，13，14，15，16，17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペ
ンタ[a]フェナントレン-3-イル）オキシ）カルボンル）アミノ）-N，N-ビス（
2-ヒドロキシエチル）-N-メチルエタン-1-アミニウムブロミド；cKK-E12 30
、3，6-ビス（4-（ビス（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン-
2，5-ジオン；DC-コレステロール、3β-[N-（N'，N'-ジメチルアミノエタ
ン）-カルバモイル]コレステロール；DLin-MC3-DMA、（6Z，9Z，28
Z，31Z）-ヘプタトリアコンター-6，9，28，31-テトラエン-19-イル-4
-（ジメチルアミノ）ブタノエート；DOPE、1，2-ジオレオイル-sn-グリセロー
3-ホスホエタノールアミン；DOSPA、2，3-ジオレイルオキシ-N-〔2-（
スペルミンカルボキサミド）エチル〕-N，N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリ
フルオロアセテート；DSPC、1，2-ジステアロイル-sn-グリセロー3-ホスホ
コリン；ePC、エチルホスファチジルコリン；FTT5、ヘキサ（オクタン-3-イル
）9，9'，9''，9'''，9''''，9'''''，9''''''-（（（（ベンゼン-1，3，5-トリカ
ル）イリス（アザンジイル））トリス（プロパン-3，1-ジイル））トリス（アザント
リイル））ヘキサノナノエート；リピドH（SM-102）、ヘプタデカン-9-イル-
8-（（2-ヒドロキシエチル）（6-オキソ-6-（ウンデシルオキシ）ヘキシル）ア
ミノ）オクタノエート；OF-Deg-Lin、（（（3，6-ジオキソピペラジン-2
，5-ジイル）ビス（ブタン-4，1-ジイル））ビス（アザントリイル））テトラキス
（エタン-2，1-ジイル）（9Z，9'Z，9''Z，9'''Z，12Z，12'Z，12''Z
，12'''Z）-テトラキス（オクタデカ-9，12-ジエノエート）；PEG2000
-DMG、（R）-2，3-ビス（ミリストールオキシ）プロピル-1-（メトキシポリ
（エチレングリコール）2000）カルバメート；TT3、またはN1，N3，N5-トリ
リス（3-（ジドデシルアミノ）プロピル）ベンゼン-1，3，5-トリカルボキサミド 50

である、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0137】

脂質キャリアであって、脂質キャリアが、液状油；無機ナノ粒子であって、無機ナノ粒子が、1ミリリットル当たり約0.2ミリグラム (mg/ml) の12ナノメートル (nm) の酸化鉄の量で存在する酸化鉄を含む、無機ナノ粒子；および界面活性剤であって、界面活性剤が、カチオン性脂質を含む、界面活性剤を含む、脂質キャリア；ならびに、少なくとも1つの核酸であって、核酸が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも1つの核酸を含む、組成物が本明細書において提供される。最大で約200マイクログラム (μg) の量で存在する核酸；最大で約1.5 mg/ml の濃度で存在するカチオン性脂質；最大で約0.01 mg/ml の濃度で存在する酸化鉄；最大で約1.88 mg/ml の濃度で存在するスクアレン；最大で約1.86 mg/ml の濃度で存在するソルビタンモノステアレート；最大で約1.86 mg/ml の濃度で存在するポリソルベート80；最大で約50 mg/ml の濃度で存在するスクロース、および必要に応じて、最大で約2.1 mg/ml の濃度で存在するクエン酸一水和物を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNAまたはDNAである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNAであり、最大で約50 μg の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。液状油が、 α -トコフェロール、ココナツ油、ブドウ種子油、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、鉱物油、モノアシルグリセロール、パーム核油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、プロポリス、スクアレン、スクアラン、ソラネソール、大豆レシチン、大豆油、ヒマワリ油、トリグリセリド、またはビタミンEである、組成物が本明細書においてさらに提供される。トリグリセリドが、カプリン酸トリグリセリド、カプリル酸トリグリセリド、カプリル酸およびカプリン酸トリグリセリド、トリグリセリドエステル、またはミリスチン酸トリグリセリンである、組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルボイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA)；1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP)、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリメチルアンモニウム、クロリド(DOTMA)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPIC)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLindMA)、1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メチルノニル)3,3',3'',3'''-((メチルアザンジイル)ビス(プロパン-3,1-ジイル))ビス(アザントリイル))テトラプロピオネート、9A1P9、デシル(2-(ジオクチルアンモニオ)エチル)ホスフェート；A2-Iso5-2DC18、エチル5,5-ジ((Z)-ヘプタデカ-8-エン-1-イル)-1-(3-(ピロリジン-1-イル)プロピル)-2,5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート；ALC-0315、((4-ヒドロキシブチル)アザンジイル)ビス(ヘキサ-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート)；ALC-0159、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N,N-ジテトラデシルアセトアミド； β -シトステロール、(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-オール；BAME-O16B、ビ

ス（２－（ドデシルジスルファニル）エチル）３，３’－（（３－メチル－９－オキソ－
 １０－オキサ－１３，１４－ジチア－３，６－ジアザヘキサコシル）アザンジイル）ジブ
 ロピオネート；BHEM－コレステロール、２－（（（（（３Ｓ，８Ｓ，９Ｓ，１０Ｒ，
 １３Ｒ，１４Ｓ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタ
 ン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６
 ，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ〔a〕フェナントレン－３－イル）オキ
 シ）カルボニル）アミノ）－N，N－ビス（２－ヒドロキシエチル）－N－メチルエタン
 －１－アミニウムブロミド；cKK－E12、3、6－ビス（４－（ビス（２－ヒドロキ
 シドデシル）アミノ）ブチル）ピペラジン－２，５－ジオン；DC－コレステロール、
 3
 β－〔N－（N’，N’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル〕コレステロール；DL 10
 in－MC3－DMA、（6Z，9Z，28Z，31Z）－ヘプタトリアコンター６，９
 ，28，31－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート；DOP
 E、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン；DOSPA
 、2，3－ジオレイルオキシ－N－〔２－（スペルミンカルボキサミド）エチル〕－N，
 N－ジメチル－１－プロパンアミニウムトリフルオロアセテート；DSPC、1，2－ジ
 ステアロイル－sn－グリセロ－３－ホスホコリン；ePC、エチルホスファチジルコリ
 ン；FTT5、ヘキサ（オクタン－３－イル）9，9’，9”，9’，’，’，9’，’，’，’，9’，’，’，’，
 （（（ベンゼン－１，３，５－トリカルボニル）イリス（アザンジイル））トリス（プロ
 パン－３，１－ジイル））トリス（アザントリイル））ヘキサノナノエート；リピドH（
 SM－102）、ヘプタデカン－９－イル－８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキ
 ソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート；OF－Deg－Li 20
 n、（（（３，６－ジオキソピペラジン－２，５－ジイル）ビス（ブタン－４，１－ジイ
 ル））ビス（アザントリイル））テトラキス（エタン－２，１－ジイル）（9Z，9’Z
 ，9”Z，9’，’，’Z，12Z，12’Z，12”Z，12’，’，’Z）－テトラキス（オクタデカ－
 9，12－ジエノエート）；PEG2000－DMG、（R）－２，３－ビス（ミリスト
 イルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）2000）カルバメ
 ート；TT3、またはN1，N3，N5－トリス（３－（ジドデシルアミノ）プロピル）
 ベンゼン－１，３，５－トリカルボキサミドである、組成物が本明細書においてさらに提
 供される。核酸が、脂質キャリアと複合体化している、組成物が本明細書においてさらに
 提供される。SARS－CoV－2スパイクタンパク質抗原が、SARS－CoV－2の 30
 アルファバリエント、SARS－CoV－2のベータバリエント、SARS－CoV－2
 のデルタバリエント、SARS－CoV－2のガンマバリエント、SARS－CoV－2
 のミューバリエント、またはSARS－CoV－2のオミクロンバリエントに由来するも
 のである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS－CoV－2スパイク
 タンパク質が、D614Gのアミノ酸置換を含むSARS－CoV－2のバリエントに由
 来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号１～
 ８のうちの１つに記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SA
 RS－CoV－2スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエントが、配列番号
 ９～１６のうちの１つに記載のアミノ酸配列を有する、組成物が本明細書においてさら
 に提供される。核酸が、配列番号４の配列と少なくとも８５％同一であり、必要に応じて配
 列番号２７の配列と少なくとも８５％同一である、組成物が本明細書においてさらに提供
 される。核酸が、RNAポリメラーゼをさらにコードする、組成物が本明細書においてさ
 らに提供される。RNAポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）RN
 Aポリメラーゼである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラー
 ゼをコードする核酸が、配列番号２０の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさら
 に提供される。

【0138】

（a）脂質キャリアであって、約30mg/mLのDOTAPクロリド；約37.5mg/mLのスクアレ
 ン；約37mg/mLのソルビタンモノステアレート；約37mg/mLのポリソルベート80；約10mMのクエン酸ナトリウム；および約0.2mg F 50

e / m l の 1 2 n m のオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに (b) 少なくとも 1 つの核酸であって、少なくとも 1 つの核酸が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸を含む、組成物が本明細書において提供される。最大で約 200 μ g の量で存在する核酸；最大で約 1.5 mg / m l の濃度で存在するカチオン性脂質；最大で約 0.01 mg / m l の濃度で存在する酸化鉄；最大で約 1.88 mg / m l の濃度で存在するスクアレン；最大で約 1.86 mg / m l の濃度で存在するソルビタンモノステアレート；最大で約 1.86 mg / m l の濃度で存在するポリソルベート 80；最大で約 50 mg / m l の濃度で存在するスクロース、および必要に応じて、最大で約 2.1 mg / m l の濃度で存在するクエン酸一水和物を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNA または DNA である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNA であり、最大で約 50 μ g の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。スクロースをさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。スクロースが、約 50 mg の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、脂質キャリアと複合体化している、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原が、SARS-CoV-2 のアルファバリエーション、SARS-CoV-2 のベータバリエーション、SARS-CoV-2 のデルタバリエーション、SARS-CoV-2 のガンマバリエーション、SARS-CoV-2 のミューバリエーション、または SARS-CoV-2 のオミクロンバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が、D614G のアミノ酸置換を含む SARS-CoV-2 のバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号 1 ~ 8 のうちの 1 つに記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションが、配列番号 9 ~ 17 のうちの 1 つに記載のアミノ酸配列を有する、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNA ポリメラーゼをさらにコードする、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA ポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) RNA ポリメラーゼである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA ポリメラーゼをコードする核酸が、配列番号 20 に記載の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号 4 の配列と少なくとも 85 % 同一であり、必要に応じて配列番号 27 の配列と少なくとも 85 % 同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0139】

(a) 脂質キャリアであって、約 0.75 mg の量で存在する DOTAP クロリド；約 0.94 mg の量で存在するスクアレン；約 0.93 mg の量で存在するソルビタンモノステアレート；約 0.93 mg の量で存在するポリソルベート 80；約 1.05 mg の量で存在するクエン酸一水和物；および約 0.005 mg の量で存在するオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；ならびに (b) 少なくとも 1 つの核酸であって、少なくとも 1 つの核酸が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションをコードする配列を含む、少なくとも 1 つの核酸を含む、組成物が本明細書において提供される。少なくとも 1 つの核酸配列が、最大で約 100 マイクログラム (μ g) の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの核酸配列が、最大で約 25 μ g の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。スクロースをさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。スクロースが、約 50 ミリグラム (mg) の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、脂質キャリアと複合体化している、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抗原が、SARS-CoV-2 のアルファバリエーション、SARS-CoV-2 のベータバリエーション、SARS-CoV-2 のデルタバリエーション、SARS-CoV-2 のガンマバリエーション、SARS-CoV-2 のミューバリエーション、または SARS-CoV-2 のオミ

クローンバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、D614Gのアミノ酸置換を含むSARS-CoV-2のバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号1～8のうちの1つに記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原配列またはその機能的バリエーションが、配列番号9～19のうちの1つに記載のアミノ酸配列を有する、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、RNAポリメラーゼをさらにコードする、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼが、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）RNAポリメラーゼである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼをコードする核酸が、配列番号20の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥されたものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号4の配列と少なくとも85%同一であり、必要に応じて配列番号27の配列と少なくとも85%同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。

10

【0140】

本明細書において提供される組成物を含む懸濁液が本明細書において提供される。本明細書において提供される組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物がさらに本明細書において提供される。

【0141】

a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物が本明細書において提供される。核酸が、RNAである、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸ポリメラーゼまたは核酸ポリメラーゼを発現させることが可能な配列をコードするさらなる核酸をさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼを発現させることが可能な配列をコードするさらなる核酸をさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号1～8のうちの1つに記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、配列番号9～19のうちの1つに記載のアミノ酸配列を有する、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号1に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号2に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号3に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号4に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号4の配列と少なくとも85%同一であり、必要に応じて配列番号27の配列と少なくとも85%同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号5に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号6に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号7に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号8に記載の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のアルファバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のベータバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のデルタバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のガンマバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のミューバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供さ

20

30

40

50

れる。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、D614Gのアミノ酸置換を含むSARS-CoV-2のバリエーションに由来するものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、およびビタミンE、および中鎖トリグリセリドのうちの少なくとも1つを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、半金属およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP); 3β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール); ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA); 1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP); ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP); N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA); N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC); 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-エチルホスホコリン(DOEPIC); 1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン(DODAP); および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLindMA); 1,1'-(2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、必要に応じて1つまたは複数の界面活性剤を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性界面活性剤が、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレート、およびソルビタントリオレートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、約40nmから約150nmまでにわたるz平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約0.1から約0.4までにわたる、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれている、または脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリア-核酸複合体を形成している、組成物が本明細書においてさらに提供される。複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。窒素のホスフェートに対する(N:P)モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1:1から約150:1までにわたる、組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏2~8度において安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0142】

(a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア; (b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、ワクチン組成物が本明細書において提供される。核酸が、RNAである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸ポリメラーゼ、または核酸ポ

リメラーゼを発現させることが可能な配列をコードするさらなる核酸をさらに含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAポリメラーゼ、またはRNAポリメラーゼを発現させることが可能な配列をコードするさらなる核酸配列をさらに含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号1～8のうちの1つに記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、配列番号9～17のうちの1つに記載のアミノ酸配列を有する、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号4の配列と少なくとも85%同一であり、必要に応じて配列番号27の配列と少なくとも85%同一である、組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号1に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号2に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号3に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号4に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号5に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号6に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸が、配列番号7に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。核酸配列が、配列番号8に記載の配列を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のアルファバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のベータバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のデルタバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のガンマバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のミューバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、SARS-CoV-2のD614Gバリエーションである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、中鎖トリグリセリドのうちの少なくとも1つを含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子は、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、半金属、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP); 3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール); ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA); 1, 2-ジミリスチル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP); ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP); ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP); N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA); N, N-ジオレイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC); 1, 2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C); 1, 2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP); および1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA); 1, 1'-((2-(4-(2-(2-

ー（ビス（2－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（2－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－1－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－2－オール）（C12－200）、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、必要に応じて1つまたは複数の界面活性剤を含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性界面活性剤が、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレート、およびソルビタントリオレートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、約40nmから約150nmまでにわたるz平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約0.1から約0.4までにわたる、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれている、または脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成している、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。窒素のホスフェートに対する（N：P）モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1：1から約150：1までにわたる、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏2～8度において安定である、ワクチン組成物が本明細書においてさらに提供される。

10

20

【0143】

対象における免疫応答を生じさせる方法であって、前記対象に、a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物を投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。組成物が2回の投薬によって対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。2回目の投薬が1回目の投薬の約28日後に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物の3回目の投薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物5マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物10マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物25マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。対象が哺乳動物である、方法が本明細書においてさらに提供される。哺乳動物がヒトである、方法が本明細書においてさらに提供される。組成物が筋肉内投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。

30

【0144】

対象を免疫保護するための組成物であって、a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列、を含む、組成物が本明細書において提供される。

40

【0145】

SARS-CoV-2感染症の重症度を低下させる方法であって、a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列を含む、組成物を感

50

染前に投与するステップを含む、方法が本明細書において提供される。組成物が2回の投薬によって対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。2回目の投薬が1回目の投薬の約28日後に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物の3回目の投薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物5マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物10マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物25マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。対象が哺乳動物である、方法が本明細書においてさらに提供される。哺乳動物がヒトである、方法が本明細書においてさらに提供される。組成物が筋肉内投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。

10

【0146】

対象を免疫保護する方法であって、a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列、を含む、方法が本明細書において提供される。組成物が2回の投薬によって対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。2回目の投薬が1回目の投薬の約28日後に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物の3回目の投薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物5マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物10マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記組成物25マイクログラムが前記対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。対象が哺乳動物である、方法が本明細書においてさらに提供される。哺乳動物がヒトである、方法が本明細書においてさらに提供される。組成物が筋肉内投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。

20

【0147】

(a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；(b) 少なくとも1つの核酸配列であって、核酸配列が、抗原を発現させることが可能な配列を含み、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列、を含むキットが本明細書において提供される。(a) 脂質キャリアであって、疎水性コア、1つまたは複数の脂質、および1つまたは複数の界面活性剤を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；(b) 抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸配列であって、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列、を含むキットが本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の界面活性剤をさらに含む、キットが本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号20に記載のベクター配列を含む配列を含む、キットが本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号1～8のうちの1つに記載の抗原配列を含む配列を含む、キットが本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号24～31のうちの1つに記載の配列を含む配列を含む、キットが本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号32～38のうちの1つに記載のベクター配列を含む配列を含む、キットが本明細書においてさらに提供される。

30

40

【0148】

a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；b) 抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸配列であって、抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質である、少なくとも1つの核酸配列；ならびにc) 少なくとも1つの凍結保護物質を含む乾燥組成物が本明細書において

50

提供される。凍結乾燥されたものである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。噴霧乾燥されたものである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。約 25℃において熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。約 45℃において熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。約 -20℃において熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏約 2 度～摂氏約 8 度において熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、および／または少なくとも 1 か月にわたって熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミン E、中鎖トリグリセリド、ジヒドロイソスクアレン (DHIS)、ファルネセンおよびスクアランのうちの少なくとも 1 つを含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、半金属、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン (DOTAP); 3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール (DCコレステロール); ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA); 1, 2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP)、ジパルミトイル (C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン (DPTAP); ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン (DSTAP); N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA); N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC); 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOEPC); 1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP); および 1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA); 1, 1'-(2-(4-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE); N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド (DDAB); 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA); エチルホスファチジルコリン (ePC)、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、必要に応じて少なくとも 1 つの界面活性剤を含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性界面活性剤が、SPAN (登録商標) 20、SPAN (登録商標) 40、SPAN (登録商標) 60、SPAN (登録商標) 65、SPAN (登録商標) 80 および SPAN (登録商標) 85 からなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、約 40 nm から約 150 nm までにわたる z 平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約 0.1 から約 0.4 までにわたる、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の核酸配列が、RNA である、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA が、自己複製性 R

10

20

30

40

50

NAである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸配列が、抗原をコードする配列を含む、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。抗原が、ウイルスに由来するものである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。ウイルスが、肝炎ウイルス、コロナウイルス、蚊媒介性ウイルス、およびHIVウイルスからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸配列が、脂質キャリアに組み込まれている、または脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成している、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。窒素のホスフェートに対する(N:P)モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1:1から約150:1までにわたる、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質がスクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、スクロースである、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約1%w/v~約20%w/vで存在する、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約10%w/v~約20%w/vで存在する、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約10%w/vで存在する、乾燥組成物が本明細書においてさらに提供される。

10

20

【0149】

好適な希釈剤中に再構成された本明細書において提供される組成物、および薬学的に許容されるキャリアを含む、医薬組成物が本明細書において提供される。希釈剤が水性である、医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。希釈剤が水である、医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0150】

本明細書において提供される医薬組成物、および対象に投与するための送達システムを含むキットが本明細書において提供される。

【0151】

本明細書において提供される医薬組成物、および必要に応じて1つまたは複数のワクチンアジュバントを含むワクチン送達システムが本明細書において提供される。

30

【0152】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、対象に、本明細書において提供される組成物または医薬組成物を投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を生じさせるステップを含む、方法が本明細書において提供される。組成物が2回の投薬によって対象に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。2回目の投薬が1回目の投薬の約28日後に投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記対象に組成物の3回目の投薬を投与するステップをさらに含む、方法が本明細書においてさらに提供される。対象に組成物5μgが投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記対象に組成物10μgが投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。前記対象に組成物25μgが投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。組成物が、筋肉内または鼻腔内投与される、方法が本明細書においてさらに提供される。対象がヒトである、方法が本明細書においてさらに提供される。対象が、ウイルス感染症を有するまたは有する疑いがある、方法が本明細書においてさらに提供される。ウイルス感染症が、コロナウイルス感染症である、方法が本明細書においてさらに提供される。コロナウイルス感染症が、SARS-CoV-2ウイルスまたはそのバリエーションによって引き起こされるものである、方法が本明細書においてさらに提供される。抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質またはその断片である、方法が本明細書においてさらに提供される。免疫応答が、抗原に対する中和抗体の量または力価が組成物の投与を受けていない対象と比較して増大することを含む、方法が本明細書においてさらに提供される

40

50

。免疫応答が、CD4+および／またはCD8+陽性T細胞の量が組成物の投与を受けていない対象と比較して増加することを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。対象が、免疫無防備状態であるまたは免疫抑制される、方法が本明細書においてさらに提供される。

【0153】

対象における免疫応答を増強する方法であって、本明細書において提供される組成物を対象に投与し、それによって、抗原に対する免疫応答を増強するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0154】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、本発明において提供される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0155】

対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングするおよび／または追跡する方法であって、対象に、本明細書において提供される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0156】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；b) 少なくとも1つの核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップであって、核酸が、配列番号1～8、24～31のうちの1つに記載の配列と少なくとも80%同一の抗原配列を含む配列を含む、ステップ；c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびにd) 製剤を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0157】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 少なくとも1つの核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップであって、核酸が、配列番号1～8、24～31のうちの1つに記載の配列と少なくとも80%同一の抗原配列を含む配列を含む、ステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに(d) 製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0158】

凍結乾燥組成物を再構成する方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 少なくとも1つの核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップであって、核酸が、配列番号1～8、24～31のうちの1つに記載の配列と少なくとも80%同一の抗原配列を含む配列を含む、ステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；(d) 製剤を凍結乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成するステップ；ならびに(e) 凍結乾燥組成物を好適な希釈剤中に入れて再構成するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

【0159】

噴霧乾燥組成物を再構成する方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 少なくとも1つの核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップであって、核酸が、配列番号1～8、24～31のうちの1つに記載の配列と少なくとも80%同一の

10

20

30

40

50

抗原配列を含む配列を含む、ステップ；（c）少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；（d）製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに（e）噴霧乾燥組成物を好適な希釈剤中に入れて再構成するステップを含む、方法が本明細書において提供される。希釈剤が水性である、方法が本明細書においてさらに提供される。希釈剤が水である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、最大で約25℃の温度で熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、最大で約45℃の温度で熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、約-20℃に至るまでの温度で熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、約2℃から約8℃までにわたる温度で熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。凍結乾燥組成物が、少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月にわたって熱的に安定である、方法が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、方法が本明細書においてさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、中鎖トリグリセリド、ジヒドロイソスクアレン（DHIS）、ファルネセンおよびスクアレンのうちの少なくとも1つを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、半金属およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、方法が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン（DOTAP）；3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール（DCコレステロール）；ジメチルジオクタデシルアンモニウム（DDA）；1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DMTAP）；ジパルミトイル（C16:0）トリメチルアンモニウムプロパン（DPTAP）；ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン（DSTAP）；N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）；N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（DOEPC）；1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DODAP）；および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-DMA）；1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジール)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）；N-デシル-N,N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド（DDAB）；2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（DOSPA）；エチルホスファチジルコリン（ePC）；およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアーが、必要に応じて1つまたは複数の界面活性剤を含む、方法が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。疎水性界面活性剤が、SPAN（登録商標）20、SPAN（登録商標）40、SPAN（登録商標）60、SPAN（登録商標）65、SPAN 80（登録商標）、およびSPAN（登録商標）85からなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、方法が本明細書に

においてさらに提供される。脂質キャリアが、約 40 nm から約 150 nm までにわたる z 平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約 0.1 から約 0.4 までにわたる、方法が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の核酸が、RNA である、方法が本明細書においてさらに提供される。RNA が、自己複製性 RNA である、方法が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の核酸が、抗原をコードするものであり、抗原が、細菌感染症、細菌性疾患、ウイルス感染症、ウイルス性疾患、原生動物感染症、原生動物疾患、非伝染性疾患、1 種または複数種のがん、または自己免疫疾患に由来するものである、方法が本明細書においてさらに提供される。抗原が、ウイルスに由来するものである、方法が本明細書においてさらに提供される。ウイルスが、肝炎ウイルス、コロナウイルス、蚊媒介性ウイルス、および HIV ウイルスからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。1 つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれている、または脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成している、方法が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、方法が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロースである、方法が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 1 % w / v ~ 約 20 % w / v で存在する、方法が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10 % w / v ~ 約 20 % w / v で存在する、方法が本明細書においてさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10 % w / v で存在する、方法が本明細書においてさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0160】

SARS-CoV-2 の予防のための組成物であって、a) ソルビタン脂肪酸エステル；b) エトキシ化ソルビタンエステル；c) カチオン性脂質；d) 免疫賦活薬；および e) 抗原配列またはその機能的断片をコードする少なくとも 1 つの RNA を含む、組成物が本明細書において提供される。ソルビタン脂肪酸エステルが、ソルビタンモノステアレートである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。エトキシ化ソルビタンエステルが、TWEEN（登録商標）80 である、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、DOTAP である、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、スクアレンである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA が、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質をコードするものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。エステルの比が、8 から 11 の間の親水性親油性バランスがもたらされるものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。エステルの脂質に対する比が、30 ナノメートルから 200 ナノメートルの間の粒子径がもたらされるものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。エステルの脂質に対する比が、40 ナノメートルから 70 ナノメートルの間の粒子径がもたらされるものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、産生されるタンパク質の総量を減少させるが、ワクチンに対する免疫応答は増大させるものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、産生されるタンパク質の総量を増加させるが、ワクチンに対する免疫応答は低減させるものである、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、Miglyol 810 または Miglyol 812 である、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート 80、DOTAP、およびスクアレンをさらに含み、固体粒子を含まない、SARS-CoV-2 の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0161】

SARS-CoV-2の予防のための組成物であって、(a)ソルビタンモノステアレート；(b)ポリソルベート80；(c)DOTAP；(d)免疫賦活薬；および(e)抗原配列またはその機能的断片をコードする少なくとも1つのRNAを含む、組成物が本明細書において提供される。免疫賦活薬が、産生されるタンパク質の総量を減少させるが、ワクチンに対する免疫応答は増大させるものである、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、産生されるタンパク質の総量を増加させるが、ワクチンに対する免疫応答は低減させるものである、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。免疫賦活薬が、Miglyol 810またはMiglyol 812である、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。スクアレンをさらに含み、固体粒子を含まない、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。エステルが、8から11の間の親水性親油性バランスがもたらされるものである、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。粒子径が、30ナノメートルから200ナノメートルの間である、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。NのPに対する比が、5から35の間である、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号9～19のうちの1つに記載のアミノ酸配列をコードするものである、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号1～8のうちの1つに記載の配列を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号24～31のうちの1つに記載の配列を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号20に記載のベクター配列を含む配列を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号1～8、24～31のうちの1つに記載の配列を含む配列を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、配列番号32～38のうちの1つに記載のベクター配列を含む配列を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。アルファウイルスレプリコンを含む核酸を含む、SARS-CoV-2の予防のための組成物が本明細書においてさらに提供される。

【0162】

疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである脂質キャリア；ならびに抗原を発現させることが可能な配列をコードする配列を含む少なくとも1つの核酸であって、必要に応じて抗原が、SARS-CoV-2スパイクタンパク質またはその機能的バリエーションである、少なくとも1つの核酸；ならびに(i)乾燥組成物の少なくとも約50重量%の量で、または(ii)少なくとも50mgの量で存在する少なくとも1つの糖、を含む乾燥組成物が本明細書において提供される。凍結乾燥されたものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏約25度において熱的に安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏約45度において熱的に安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏約-20度において熱的に安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。摂氏約2温度～摂氏約8温度において熱的に安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月にわたって熱的に安定である、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カプリル／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン(DHIS)、ファルネセンならびにスクアレンのうちの少なくとも1

つを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。カチオン性脂質が、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP); 3β-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール); ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA); 1, 2-ジミリスティル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP); ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP); N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA); N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC); 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C); 1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP); および1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-DMA); 1, 1'-(2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE); N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド(DDAB); 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート(DOSP A); エチルホスファチジルコリン(ePC); およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、少なくとも1つの界面活性剤を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性界面活性剤が、ルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み、親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリアが、約40nmから約150nmまでにわたるz平均流体力学直径を有し、平均多分散指数が、約0.1から約0.4までにわたる、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、DNAである、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、RNAである、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNAが、自己複製性RNAである、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、1つまたは複数の無機ナノ粒子を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれている、または脂質キャリアと複合体化して、脂質キャリア-核酸複合体を形成している、組成物が本明細書においてさらに提供される。脂質キャリア-核酸複合体が、非共有結合性相互作用または可逆的な共有結合性相互作用によって形成されたものである、組成物が本明細書においてさらに提供される。窒素のホスフェートに対する(N:P)モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1:1から約150:1までにわたる、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの糖が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの糖が、少なくとも約50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg、210mg、220

10

20

30

40

50

mg、230mg、240mg、250mg、260mg、270mg、280mg、290mg、300mgまたはそれよりも多くの量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの糖が、50mg～250mgの量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの糖が、少なくとも約250mgの量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。糖が、組成物に対して少なくとも約50重量%、55重量%、60重量%、65重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%、95重量%またはそれよりも多くの量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。糖が、組成物に対して80～98重量%、必要に応じて94～96重量%の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。糖が、組成物に対して約95重量%の量で存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。少なくとも1つの糖が、スクロースを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。好適な希釈剤中に再構成された本明細書に開示される乾燥組成物、および薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。希釈剤が水性である、医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。希釈剤が水である、医薬組成物が本明細書においてさらに提供される。本明細書に記載される医薬組成物および対象に投与するための送達システムを含むキットが本明細書においてさらに提供される。対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法がさらに提供される。対象における疾患を処置または防止する方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法がさらに提供される。対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングするおよび／または追跡する方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法が本明細書においてさらに提供される。RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2オミクロン抗原配列をコードする第2の核酸配列を含む、組成物が本明細書において提供される。第1の核酸配列と第2の核酸配列が、共有核酸上に存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。第1の核酸配列と第2の核酸配列が、別々の核酸上に存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA依存性RNAポリメラーゼが、VEEV RNAポリメラーゼを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。ナノ粒子キャリアシステムをさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。ナノ粒子キャリアシステムが、カチオン性脂質および疎水性コアを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、無機ナノ粒子を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第1の核酸および／または第2の核酸が、RNAを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第2の核酸配列が、配列番号8と少なくとも85%同一の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする配列を含む第1の核酸、およびSARS-CoV-2スパイクS2配列領域、必要に応じてステムヘリックス領域をコードする第2の核酸配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第1の核酸と第2の核酸が、共有核酸上に存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。第1の核酸と第2の核酸配列が、別々の核酸上に存在する、組成物が本明細書においてさらに提供される。RNA依存性RNAポリメラーゼが、VEEV RNAポリメラーゼを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。ナノ粒子キャリアシステムをさらに含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。ナノ粒子キャリアシステムが、カチオン性脂質および疎水性コアを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。疎水性コアが、無機ナノ粒子を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第1の核酸および／または第2の核酸が、RNAを含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第2の核酸配列が、配列番号18と少なくとも85%同一の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。第2の核酸配列が、配列番号19と少なくとも85%同一の配列を含む、組成物が本明細書においてさらに提供される。対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、本明細書において提供される医薬組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法が本明細書において提供される。

10

20

30

40

50

【0163】

以下の実施例は、本明細書に開示される実施形態の原理および実施を当業者により明白に例示するために記載され、いずれの特許請求された実施形態の範囲も限定するものと解釈されない。別段の指定のない限り、部分およびパーセンテージはすべて重量に基づく。

【実施例】

【0164】

(実施例1)

マクロファージによる免疫応答

脂質キャリアおよびrepRNAを含む種々の製剤を調製し、分析して、マクロファージによる脂質キャリアに対する自然免疫応答を評価した。THP-1マクロファージにおけるタンパク質発現および腫瘍壊死因子アルファ（例えば、TNF- α ）産生の刺激をアッセイした。

【0165】

最初に、THP-1単球を、ホルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA）を使用してマクロファージに分化させた。次いで、NanoLucシフェラーゼ（NanoLuc）をコードするレプリコンRNAを伴う種々の製剤を細胞にトランスフェクトした。次いで、細胞培養培地をNanoLucおよびTNF α 発現について評価した。

【0166】

このアッセイにおいて使用した製剤およびそれらの特徴、例えば粒子径およびPDIなどを表4に記載する。NanoLucをコードするrepRNAの濃度は1マイクロリットル当たり909ナノグラム（ng/ μ l）とし、摂氏-80度で維持した。本実施例ではMiglyol 812N（カプリル／カプリン酸トリグリセリド）を使用した。

【表4】

表 4. 製剤。

製剤	粒径[直径、nm]	PDI	鉄[mg Fe/ml]	アルミニウム[mg Al/ml]	DOTAP[mg/ml]	スクアレン[mg/ml]	Miglyol[mg/ml]	ソラネソール[mg/ml]
NP-1: Fe-脂質キャリア	59.3	0.23	0.19	n/a	27.9	39.4	n/a	n/a
NP-2: 高 Fe-脂質キャリア	57.5	0.24	0.85	n/a	29.1	40.5	n/a	n/a
NP-3: Fe-脂質キャリア miglyol	48.7	0.2	0.18	n/a	28.3	n/a	測定せず	n/a
NP-4: 高 Fe-脂質キャリア miglyol	62.6	0.28	0.94	n/a	27.7	n/a	測定せず	n/a
NP-5: ミョウバン-脂質キャリア	64.5	0.25	n/a	0.88	27.4	41.2	n/a	n/a
NP-6: Fe-脂質キャリアソラネソール (SLN)	86.1	0.26	0.16	n/a	26.2	n/a	n/a	36
NP-7: NLC	50	0.26	n/a	n/a	26.7	34.1	n/a	n/a
NP-8: CNE	105.4	0.06	n/a	n/a	4.4	47.4	n/a	n/a
NP-30: 脂質キャリア (w/o IO)	54.2	0.22	n/a	n/a	19.3	32.6	n/a	n/a

【0167】

Fe-脂質キャリア製剤-NP-1（100mlスケールで調製）：Fe-脂質キャリア製剤は、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN

(登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID)、0.2mg Fe/mlの12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Biosystems, San Diego, CA, USA) および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物 (Fisher Chemical) を含む。1mlのクロロホルム (Imagion Biosystems、ロット番号95-127) 中の20mg Fe/mlの直径12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN (登録商標) 60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR (登録商標) 200ホモジナイザー (VWR International, Radnor, PA, USA) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1~0.25の多分散指数 (PDI) で、40~80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics, Westwood, MA, USA) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされたNP-1製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2~8度で貯蔵した。鉄濃度を、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-OES) によって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって測定した。

10

20

30

40

50

【0168】

高Fe-脂質キャリア製剤NP-2 (100mlスケールで調製) : 高Fe-脂質キャリア製剤は、37.5mg/mlのスクアレン (SEPPIC)、37mg/mlのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID)、1mg Fe/mlの15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Biosystems) および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物 (Fisher Chemical) を含む。5mlのクロロホルム (Imagion Biosystems、ロット番号95-133) 中の20mg Fe/mlの直径15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN (登録商標) 60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR (登録商標) 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平

均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数(PDI)で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー(Microfluidics)を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン(PES)フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例2)

Fe-脂質キャリアmiglyol製剤NP-3(100mlスケールで調製)
[0169]

Fe-脂質キャリアmiglyol製剤は、37.5mg/mlのMiglyol 812 N(IOI Oleo GmbH)、37mg/mlのSPAN(登録商標)60(Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN(登録商標)80(Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド(LIPOID)、0.2mg Fe/mlの15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子(Imagion Biosystems)および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物(Fisher Chemical)を含む。1mlのクロロホルム(Imagion Biosystems、ロット番号95-127)中の20mg Fe/mlの直径15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム(v/v)溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒(アセトンおよびクロロホルム)を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN(登録商標)60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN(登録商標)80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR(登録商標)200ホモジナイザー(VWR International)を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱(Malvern Zetasizer Nano S)によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数(PDI)で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー(Microfluidics)を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン(PES)フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAP濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例3)

高Fe-脂質キャリアMiglyol製剤NP-4(100mlスケールで調製)
[0170]

高Fe-脂質キャリアMiglyol製剤は、37.5mg/mlのMiglyol 812 N(IOI Oleo GmbH)、37mg/mlのSPAN(登録商標)60(Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN(登録商標)80(Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド(LIPOID)、1mg/mlの15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子(Imagion Bio)および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物(Fisher Chemical)を含む。5mlのクロロホルム(Imagion Bio、ロット番号95-127)中の20mg Fe/mlの直径15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子

を、4：1のアセトン：クロロホルム（v／v）溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒（アセトンおよびクロロホルム）を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR（登録商標）200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数（PDI）で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAP濃度を、RP-HPLCによって測定した。

（実施例4）

ミョウバン-脂質キャリア製剤NP-5（100mlスケールで調製）

【0171】

ミョウバン-脂質キャリア製剤は、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）、1mg Al/mlのTOPOコーティングAlhydrogel（登録商標）（オキシ水酸化アルミニウム）粒子（Croda）および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。10mlのAlhydrogelを、1000rpmで20分間遠心分離することによって、メタノール中で3回洗浄した。3回目の洗浄後、Alhydrogelを10mlのメタノールに分散させ、この分散液に、1mlの250mg/mlのトリオクチルホスフィンオキシド（TOPO）を添加し、オービタルシェーカーで、37℃で終夜インキュベートした。過剰のTOPOを、追加のメタノール洗浄によって除去し、次いで、11mlのメタノールに分散させた。メタノールを、ドラフト中で終夜蒸発させて、TOPO-Alhydrogelの乾燥層が残った。この乾燥TOPO-Alhydrogel層に、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR（登録商標）200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数（PDI）で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで

濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。アルミニウム濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例5)

Fe-脂質キャリアソラネソール製剤NP-6 (100mlスケールで調製)

【0172】

Fe-脂質キャリアソラネソール製剤 (NP-6) は、37.5mg/mlのソラネソール (Cayman chemicals)、37mg/mlのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID)、0.2mg Fe/mlのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Bio) および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。1mlのクロロホルム (Imagion Bio、ロット番号95-133) 中の20mg Fe/mlの直径15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのソラネソール、3.7グラムのSPAN (登録商標) 60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR (登録商標) 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびソラネソール濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例6)

NP-7製剤 (100mlスケールで調製)

【0173】

NP-7製剤は、37.5mg/mlのスクアレン (SEPPIC)、37mg/mlのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID)、2.4mg/mlのDynasan 114 (IOI Oleo GmbH) および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。200mlのビーカーに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN (登録商標) 60、0.24グラムのDynasan 114および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR (登録商標) 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数 (PDI) で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラ

ミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2〜8度で貯蔵した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例7)

NP-8製剤 (100mlスケールで調製)

【0174】

NP-8製剤は、43mg/mlのスクアレン (SEPPIC)、5mg/mlのSPAN (登録商標) 85 (Millipore Sigma)、5mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、4mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID) および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。200mlのビーカーに、4.3グラムのスクアレン、0.5グラムのSPAN (登録商標) 85、および0.4グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に2.6グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。95mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、95mlの水相と混合した。混合物を、VWR (登録商標) 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.05〜0.1の多分散指数 (PDI) で、 100 ± 10 nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2〜8度で貯蔵した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

【0175】

処置群を調製した。8つのこれらの群は、NanoLuc repRNA群であり、ウェルあたり600ng用量を、Fe-脂質キャリア、高Fe-脂質キャリア、Fe-脂質キャリアmiglyol、高Fe-脂質キャリアmiglyol、ミヨウバン-脂質キャリア、Fe-脂質キャリアソラネソール (SLN)、NLC、およびCNE製剤を使用して調製した。未処置群は、NanoLucを有していなかった。

【0176】

さまざまな製剤を、NanoLuc repRNAを2.2mLのRNAseを含まない水に8ng/μLに希釈することによって調製した。脂質キャリア製剤およびRNAマスタミックスを、250μLのそれぞれの希釈された製剤と250μLの希釈されたRNAを添加することによって複合体化し、上下にピペティングすることによって混合した。

【0177】

細胞トランスフェクションを、24ウェルプレートにおいて、ウェルあたり 7×10^5 個のTHP-1sを播種することによって行った。80マイクロモル濃度 (μM) のPMAをそれぞれのウェルに添加し、摂氏37度でインキュベートした。翌日、トランスフェクションの1時間前に、PMA含有培地を除去し、完全RPMI (cRPMI) 培地で置き換えた。次いで、試料を、Opti-MEM (商標) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) に連続希釈して、0.45ng/μLで開始する10点の1.5倍の希釈系列を作製した。次いで、培養培地を、ピペティングによってプレートから除去した。450μLのOpti-MEM (商標) および150μLの複合体化製剤を、二反復で、プレートに添加した。空のウェルには、450

μL のOpti-MEM（商標）のみを入れた。4時間後、試料を、ピペティングによってプレートから除去し、 $500\mu\text{L}$ の増殖培地で置き換えた。次いで、プレートを、摂氏 37 度で終夜インキュベートした。増殖培地を翌日回収し、摂氏 -80 度で貯蔵した。下流のアッセイを実施し、下記に記載した。

【0178】

ルシフェラーゼアッセイを、最初にNano-Glo（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を緩衝液に $1:50$ で希釈することによって行った。 $25\mu\text{L}$ の上清を除去し、 96 ウェルプレートにおいて、 $25\mu\text{L}$ のNano-Glo（登録商標）試薬と混合した。これを、室温で3分間インキュベートした。発光を、発光光度計を使用して読み取った。

10

【0179】

次に、ヒトTNF- α DUOSET（商標）ELISA（R&D Systems）を使用して、製造業者のプロトコールに従って、ELISAアッセイを行って、細胞培養培地におけるTNF- α （ α ）タンパク質レベルを評価した。 96 ウェルマイクロプレートを、抗TNF α 捕捉抗体でコーティングした。プレートをブロッキングし、次いで、培地試料を、希釈なしで直接添加した。ビオチン化検出抗体SA-HRPおよび基質の添加後、吸光度を、SPECTRAMAX（登録商標）i3（Molecular Devices）プレートリーダーにおいて、 450nm で読み取った。

【0180】

本実施例ではすべての試験を2連で実施した。2連の試験からの結果をそれぞれ第1の実験および第2の実験として提示する。図4Aの第1の実験および図4Bの第2の実験に示される通り、脂質キャリアおよびmiglyolを含む製剤により、レプリコンからの高タンパク質産生が誘導された。TNF- α 分泌によって測定される、自然免疫応答の低減が検出された（図5A～5B）。

20

【0181】

図6Aの第1の実験および図6Bの第2の実験に示される通り、miglyol脂質キャリア製剤を用いた場合にタンパク質産生の増強とTNF- α 刺激の低減の相関が観察された。ソラネソール脂質キャリア製剤により誘導されたタンパク質産生はわずかに低かったが、TNF α 産生は高度であった（図6A～6B）。図6Aに示されている第1のアッセイからの相関データは、図4Aおよび図5Aに示されているデータから導き出されたものである。第2のアッセイからの相関データが図6Bに示されており、この相関データは図4Bおよび図5Bに示されているデータから導き出されたものである。

30

（実施例8）

脂質キャリアを作製するための技法および材料

【0182】

脂質-無機ナノ粒子（すなわち、脂質キャリア）の製造に以下の材料を使用した。本明細書に記載される組成物、キットおよび方法は、本明細書に記載される技法または材料に限定されない。

【0183】

クロロホルム中Fe $25\text{mg}/\text{mL}$ の、種々の平均直径（ 5nm 、 10nm 、 15nm 、 20nm 、 25nm および 30nm ）を有する酸化鉄ナノ粒子をOcean Nanotech（San Diego, CA, USA）から購入した。スクアレンおよびSPAN（登録商標）60（ソルビタンモノステアレート）をMillipore Sigmaから購入した。TWEEN（登録商標）80（ポリエチレングリコールソルビタンモノオレート）およびクエン酸ナトリウム二水和物をFisher Chemicalから購入した。カチオン性脂質1，2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAPクロリド）の塩化物塩をCorden Pharmaから購入した。超純水（ $18.2\text{M}\Omega\text{-cm}$ ）抵抗力をMilli-Q water purification system（Millipore Sigma）から入手した。

40

50

【0184】

脂質キャリアは、スクアレン、ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAPクロリド、酸化鉄ナノ粒子およびクエン酸ナトリウム二水和物を含む。一般に、個数基準の加重平均直径が5 nmの酸化鉄ナノ粒子にクロロホルムを添加した。クロロホルムをドラフト内で蒸発させ、酸化鉄ナノ粒子のドライコーティングを残した。酸化鉄ナノ粒子に、SPAN（登録商標）60、スクアレン、およびDOTAPクロリドを添加して、「油」相を調製した。

【0185】

油相を、60℃に予め加熱したウォーターバス中、30分間超音波処理した。それとは別に、1リットルのガラスボトル中、Milli-Q水を用いて調製したクエン酸ナトリウム二水和物溶液にTWEEN（登録商標）80を添加することによって「水」相を調製した。

10

【0186】

水相を30分間攪拌して、TWEEN（登録商標）80を完全に溶解させた。TWEEN（登録商標）80が完全に溶解したら、水相をビーカーに移し、60℃に予め加熱したウォーターバス中でインキュベートした。加熱した油相に、予め加熱した水相を添加した。

【0187】

混合物をすぐに、VWR（登録商標）200ホモジナイザー（VWR International）を使用し、乳様の外観を有する均一なコロイドが生じるまで乳化させた。続いて、コロイドを、流体を、LM10マイクロフルイダイザーのY型インターアクションチャンバーを20,000 psiで通過させることによって処理した。

20

【0188】

動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、多分散指数0.2で59 nmになるまで流体を通過させた。

【0189】

マイクロフルイダイズされた脂質キャリア試料を孔径200 nmのポリエーテルスルホン（PES）シリンジフィルターを用いて最終濾過した。

（実施例9）

30

脂質キャリアを作製するための例示的な技法および材料

【0190】

脂質-無機ナノ粒子（すなわち、脂質キャリア）の製造に以下の材料を使用した。本明細書に記載される組成物、キットおよび方法は、本明細書に記載される技法または材料に限定されない。

【0191】

クロロホルム中Fe 25 mg/mlの、種々の平均直径（5 nm、10 nm、15 nm、20 nm、25 nmおよび30 nm）を有する酸化鉄ナノ粒子をOcean Nanotech（San Diego, CA）から購入した。スクアレンおよびSPAN（登録商標）60（ソルビタンモノステアレート）をMillipore Sigmaから購入した。TWEEN（登録商標）80（ポリエチレングリコールソルビタンモノオレート）およびクエン酸ナトリウム二水和物をFisher Chemicalから購入した。カチオン性脂質1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（DOTAPクロリド）の塩化物塩をCorden Pharmaから購入した。超純水（18.2 MOhm-cmの抵抗力）をMilli-Q water purification system（Millipore Sigma）から入手した。

40

【0192】

37.5 mg/mlのスクアレン、37 mg/mlのSPAN（登録商標）60、37 mg/mlのTWEEN（登録商標）80、30 mg/mlのDOTAPクロリド、0.1 mg/mlの10 nm酸化鉄ナノ粒子および10 mMのクエン酸ナトリウム二水和物を

50

含む脂質キャリアを調製した。

【0193】

以下の手順を使用して脂質キャリアを製造した。200mlのビーカー中に、クロロホルム中Fe 25mg/mlの、個数基準の加重平均直径10nmの酸化鉄ナノ粒子0.4mlを添加した。

【0194】

クロロホルムをドラフト内で蒸発させ、酸化鉄ナノ粒子のドライコーティングを残した。酸化鉄ナノ粒子に、SPAN（登録商標）60 3.7グラム、スクアレン3.75グラム、およびDOTAPクロリド3グラムを添加して、「油」相を調製した。

【0195】

油相を、60℃に予め加熱したウォーターバス中、30分間超音波処理した。それとは別に、1リットルのガラスボトル中、TWEEN（登録商標）80 39グラムを、Milli-Q水を用いて調製した10mMのクエン酸ナトリウム二水和物溶液1,000mlに添加することによって「水」相を調製した。

【0196】

水相を30分間攪拌して、TWEEN（登録商標）80を完全に溶解させた。TWEEN（登録商標）80が完全に溶解したら、水相96mlを200mlのビーカーに移し、60℃に予め加熱したウォーターバス中でインキュベートした。加熱した油相に、予め加熱した水相96mlを添加した。混合物をすぐに、VWR（登録商標）200ホモジナイザー（VWR International）を使用し、乳様の外観を有する均一なコロイドが生じるまで乳化させた。続いて、コロイドを、流体を、LM10マイクロフルイダイザーのY型インターアクションチャンバーを20,000psiで通過させることによって処理した。動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、多分散指数0.2で54nmになるまで流体を通過させた。マイクロフルイダイズされた脂質キャリア試料を孔径200nmのポリエーテルスルホン（PES）シリンジフィルターを用いて最終濾過した。

（実施例10）

本明細書に記載されるナノ粒子を作製するための例示的な技法および材料

【0197】

37.5mg/mlのスクアレン、37mg/mlのSPAN（登録商標）60、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80、30mg/mlのDOTAPクロリド、0.2mg/mlの15nm酸化鉄ナノ粒子、および10Mのクエン酸ナトリウム二水和物を含む脂質キャリアを調製した。実施例9の脂質キャリアを以下の手順を使用して製造した。

【0198】

200mlのビーカー中に、クロロホルム中Fe 25mg/mlの、個数基準の加重平均直径15nmの酸化鉄ナノ粒子0.8mlを添加した。クロロホルムをドラフト内で蒸発させ、酸化鉄ナノ粒子のドライコーティングを残した。酸化鉄ナノ粒子に、SPAN（登録商標）60 3.7グラム、スクアレン3.75グラム、およびDOTAPクロリド3グラムを添加して、「油」相を調製した。

【0199】

油相を、60℃に予め加熱したウォーターバス中、30分間超音波処理した。それとは別に、1リットルのガラスボトル中、TWEEN（登録商標）80 39グラムを、Milli-Q水を用いて調製した10mMのクエン酸ナトリウム二水和物溶液1,000mlに添加することによって「水」相を調製した。水相を30分間攪拌して、TWEEN（登録商標）80を完全に溶解させた。

【0200】

TWEEN（登録商標）80が完全に溶解したら、水相96mlを200mlのビーカーに移し、60℃に予め加熱したウォーターバス中でインキュベートした。加熱した油相に、予め加熱した水相96mlを添加した。混合物をすぐに、VWR（登録商標）200

10

20

30

40

50

ホモジナイザー（VWR International）を使用し、乳様の外観を有する均一なコロイドが生じるまで乳化させた。続いて、コロイドを、流体を、LM10マイクロフルイダイザーのY型インターアクションチャンバーを20,000psiで通過させることによって処理した。

【0201】

動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、多分散指数0.2で52nmになるまで流体を通過させた。マイクロフルイダイズされた脂質キャリア試料を孔径200nmのポリエーテルスルホン（PES）シリンジフィルターを用いて最終濾過した。

（実施例11）

無機コアを伴わない脂質キャリア製剤（100mL規模で調製）

【0202】

37.5mg/mLのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mLのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mLのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mLのDOTAPクロリド（LIPOID）および10mMのクエン酸ナトリウムを含む、無機コア粒子を伴わない脂質キャリア製剤が本明細書に記載される。

【0203】

本組成物を以下の通り調製した：200mLのビーカー中に、スクアレン3.75グラム、SPAN 60（登録商標）3.7グラム、およびDOTAP 3.0グラムを添加して油相を生じさせた。油相を65℃のウォーターバス中、45分間超音波処理した。それとは別に、TWEEN（登録商標）80 19.5グラムを、ヌクレアーゼを含まない水中に調製した10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液500mLに溶解させることによって水相を調製した。水相96mLを別のガラスボトルに移し、摂氏65度で30分間加熱した。温かい油相を温かい水相に添加することによって油相と水相96mLを混合した。

【0204】

次いで、混合物を、VWR（登録商標）200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化させ、得られた粗製エマルジョンを、F12Y 75μmダイヤモンドインターアクションチャンバーおよび補助のH30Z-200μmセラミックインターアクションチャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を30,000psiで動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、多分散指数（PDI）0.1~0.3で40~80nmに達するまで通過させることによって処理した。次いで、マイクロフルイダイズされた脂質キャリア組成物（無機コアを伴わない）製剤を、孔径200nmのポリエーテルスルホン（PES）フィルターを用いて最終濾過し、摂氏2~8度（℃）で貯蔵した。次いで、DOTAPおよびスクアレン濃度をRP-HPLCによって測定した。

（実施例12）

本明細書に記載されるナノ粒子を作製するための例示的な技法および材料

【0205】

マウスアッセイにおいて、C57BL/6マウスに、以下の表6に記載の通り接種を行い、その後、血清中の分泌された胚アルカリホスファターゼ（SEAP）レベルを測定した。本実施例に使用した材料の要約を表5に提示する。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. 材料。

説明	濃度	温度/場所
SEAP をコードする DNA (配列番号 39 に示される DNA 配 列)	5 mg/mL	-20°C
SEAP をコードする repRNA	2217 µg/mL	-80°C
脂質キャリア製剤	30 mg DOTAP/mL	4°C

10

【表 6】

表 6. 処置群。

群	n	製剤	DNA/RNA- SEAP	RNA 用量[µg]	DNA 用 量 [µg]	N:P	注 射 体 積 [µL]
1	5	ネイキッド	DNA-SEAP		20	n/a	50
2	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		10	15	50
3	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		10	7.5	
4	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		20	15	
5	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		20	7.5	
6	5	脂質キャリア	RNA-SEAP	1		15	50
7	5	Miglyol + 脂質 キャリア	RNA-SEAP	1		15	50

20

30

【0206】

7 種の異なる製剤を調製し、7つの処置群（群 1～7）にわたって筋肉内投与した。DNA-SEAP または RNA-SEAP を表 7 に記載の体積に従って希釈して、群 1～7 に対する製剤を調製した。

40

50

【表 7】

表 7. 製剤の調製; RNA/DNA の希釈。

群	DNA-SEAP または RNA-SEAP	DNAまたは RNA [μL]	40%スクロース [μL]	水 [μL]	合計 [μL]
1	DNA-SEAP	40.0	125.0	85.0	250.0
2	DNA-SEAP	20.0	0.0	230.0	250.0
3	DNA-SEAP	20.0	0.0	230.0	250.0
4	DNA-SEAP	40.0	125.0	85.0	250.0
5	DNA-SEAP	40.0	0.0	210.0	250.0
6	RNA-SEAP	4.5	0.0	245.5	250.0
7	RNA-SEAP	4.5	0.0	245.5	250.0

10

【0207】

脂質キャリアと複合体を形成する前の希釈したDNAまたはRNAの濃度は以下の通りであった（NanoDrop分光光度計によって測定した）：群1、群4および群5は約820 μg/mlのDNAを含有し、群2および群3は約480 μg/mlのDNAを含有し、群6および群7は約43 μg/mlのRNAを含有した。

20

【0208】

群1～7に対する製剤を100 mMのクエン酸を用いて以下の表8に記載の通り希釈した。

【表 8】

表 8. 脂質キャリア製剤の希釈。

群	製剤	脂質キャリア [μl]	40%スクロース [μl]	100 mM のクエン酸塩 [μl]	水 [μl]	合計 [μl]
1	ネイキッド	0	0	30	270	300
2	脂質キャリア	120	150	30	0	300
3	脂質キャリア	60	150	30	60	300
4	脂質キャリア	240	0	30	30	300
5	脂質キャリア	120	150	30	0	300
6	脂質キャリア	12	150	30	108	300
7	Miglyol + 脂質キャリア	12	150	30	108	300

30

40

【0209】

上記の製剤を、希釈した脂質キャリア250 μlを希釈したDNAまたはRNA 250 μlに添加することによって複合体化させた。得られた複合体化した製剤を氷上で少なくとも30分間インキュベートした。表9にアッセイの実験スケジュールを記載する。

50

【表 9】

表 9. 実験スケジュール。

日	手順	マウスに関する注釈
0	すべての接種	なし
4	採血	群 4 は、毛皮が逆立ち、1 頭のマウスが衰弱した（収集の間に死亡した）。Hydropaque をケージに設置した。
6	採血	なし
8	採血	なし
11	採血	なし
14	採血	なし

10

【0210】

一定の間隔でマウスから採血し、すぐに血清を調製し、SEAP 活性についての解析を行うまで摂氏 -80 度で貯蔵した。

【0211】

血清中の SEAP レベルを評価するために、すべての血清試料を同時に解凍し、SEAP 検出を行った。図 7A～7F に、種々の反復数の脂質キャリアを用いて製剤化した DNA SEAP を筋肉内注射した BALB/c マウスにおける SEAP レベルを例示する。一定の間隔でマウスから採血し、血清を調製し、SEAP アッセイによる解析を行うまで貯蔵した。データは平均値および SE として示されている（群当たり n = 5）。

20

【0212】

図 7A～7F から見るように、特に注射後 6 日目の後、DNA 単独での送達と比して、脂質キャリア製剤により標的タンパク質産生が補助された。さらに、データから、miglioil を欠く脂質キャリア製剤と比して、miglioil の組み入れにより RNA レプリコンからのタンパク質産生が増強されることが示される。

（実施例 13）

追加のナノ粒子製剤

【0213】

追加のナノ粒子製剤を以下の表（表 10 および表 11）に従って作製する。第 1 の例では、mRNA は、SARS-CoV-2 オミクロンバリエーションスパイクタンパク質 B.1.1.529 をコードする配列と VEEV レプリコン mRNA 骨格を含む（配列番号 31）。第 2 の例では、mRNA は、SARS-CoV-2 スパイク B.1.351-PP-D614G RNA 配列をコードする配列と VEEV レプリコン mRNA 骨格を含む（配列番号 27）。

30

40

50

【表 1 0】

表 10. mRNA ワクチン製剤。

剤形:	IM 投与経路での注射用溶液		
組成:	それぞれの 0.5 ml バイアルが含有:	量	濃度(mg/ml)
	mRNA	25 mcg	0.05
	DOTAP	0.75 mg	1.5
	酸化鉄ナノ粒子	0.005 mg	0.01
	スクアレン	0.94 mg	1.88
	ソルビタンモノステアレート	0.93 mg	1.86
	ポリソルベート 80	0.93 mg	1.86
	スクロース IP	50 mg	100
	クエン酸一水和物	1.05 mg	2.1
	注射用水	0.5 ml にするのに十分な量	

10

20

【表 1 1】

表 11. 凍結乾燥 mRNA ワクチン製剤。

剤形:	凍結乾燥粉末			
組成:	それぞれの、5 回の投薬分のバイアルが含有:	量	濃度 (mg/ml)	およその乾燥重量%
	mRNA	50 mcg	0.02	0.02
	DOTAP	1.5 mg	0.6	0.57
	スクアレン	1.88 mg	0.752	0.72
	ソルビタンモノステアレート	1.86 mg	0.744	0.71
	ポリソルベート 80	1.86 mg	0.744	0.71
	スクロース IP	250 mg	100	95.3
	クエン酸一水和物	5.25 mg	2.1	2
	注射用水(再構成用)	2.5 ml		

30

40

(実施例 1 4)

自己複製性 mRNA 構築物

【0 2 1 4】

T 7 プロモーター、その後にベネズエラウマ脳炎ウイルス (V E E V) T C - 8 3 株の 5 ' および 3 ' U T R ならびに非構造的遺伝子をコードするプラスミドを標準的な DNA 合成およびクローニング方法を使用して生成した。V E E V レプリコン mRNA 骨格が配列番号 2 0 に記載されている。

(実施例 1 5)

50

非ヒト霊長類におけるSARS-CoV-2中和抗体およびT細胞応答のためのアルファウイルス由来レプリコンRNAワクチン

【0215】

NP-1～NP-31とrepRNA-CoV2 Sタンパク質ワクチンの組合せの免疫原性および安全性をブタオザルにおいて評価する。RNAレプリコンを分解から保護するために、疎水性スクアレンコア内の無機超常磁性酸化鉄(SPIO)ナノ粒子からなるNP-1を使用して、製剤の安定性を増強する。レプリコンRNA(配列番号1～8)とNP製剤の複合体を形成する。ブタオザルを使用して、ワクチンに対する応答を試験した。採血をベースライン(-2週目または-1週目)、およびプライムワクチン接種の10日後、14日後、28日後、および42日後に行った。50μgのワクチン接種を受けた動物からブーストの10日後(プライムの38日後)にも採血した。全血から血清および血漿を採取し、PBMCを単離した。動物を、採血またはワクチン接種の前にケタミン(Ketaset(登録商標); Henry Schein)を筋肉内注射(10mg/kg)することにより鎮静させる。0週目および4週目にワクチン50μgを、250μlの注射1回で四頭筋に筋肉内送達する。ワクチン製剤および濃度の一貫性を維持するために、ワクチン250μgを、0週目に、右側四頭筋に2カ所、左側四頭筋に1カ所、および左側三角筋と右側三角筋に1カ所ずつの5カ所の筋肉内注射部位に250μlの注射で接種することによって筋肉内送達する。注射後、すべての注射部位を局所的な反応性のあらゆる徴候についてモニタリングする。抗原特異的抗体応答と併せて血清化学および全血球計算に関する評価を行う。

10

20

【0216】

麻酔したサルから静脈穿刺によって採血する。抗原特異的IgG、IgG1、IgG2a、およびIgG2c応答を、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)により、組換えSARS-CoV-2 Sを捕捉抗原として使用して検出する。SARS-CoV-2中和アッセイも実施して、ワクチン組成物によりSARS-CoV-2感染に対する抗体応答を誘導することができるかどうかを決定する。サルにおける免疫応答をIFN-γ ELISpotアッセイおよび細胞内サイトカイン染色によってモニタリングする。マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用して、ペプチドで刺激したPBMCを使用してT細胞免疫応答を決定する。S特異的CD4+またはCD8+T細胞を免疫化の前後にスクリーニングする。

30

(実施例16)

マウスにおける凍結乾燥COVIDワクチンの評価

【0217】

以下を実施して、凍結乾燥NP-1とSARS-CoV-2スパイク抗原配列をコードするレプリコンRNAの活性、再構成されたワクチンの物理化学特性、効力、および免疫原性をアッセイした。簡単に述べると、表12の材料を使用した。

40

50

【表 1 2】

表 12. 材料。

名称	ストック濃度
NP-1	30 mg/ml(DOTAP 濃度を測定)
NP-7	30 mg/ml(DOTAP 濃度を測定)
repRNA-CoV2-スパイク(野生型) VEE-S-v5 デルタ(「WT-S」)	1687 µg/ml
repRNA-CoV2-スパイク(デルタ) VEE-nCoV19-S-デルタ.AY1-S2P-wtFur (「デルタ-S」)	783 µg/ml
スクロース(EMD, Millipore)	----
クエン酸 Na(Teknova)	1M

10

【0 2 1 8】

20

製剤複合体の調製。以下の表 1 3 に示す通り、本アッセイにおいて脂質ナノ粒子／RNA 複合体組成物を調製した。NP-1 または NP-7 と repRNA を N：P 比を 15 とし
て複合体化させ、それぞれ最終 repRNA 濃度 50 mg/ml または 100 mg/ml
（「2×」材料）、およびスクロース含有量 10% または 20% w/v が得られるよう
に複合体化させた。10% スクロース（50 mg/ml の repRNA）を有する複合体
化した材料は 5 mM のクエン酸ナトリウムを含有し、一方、20% スクロース（100 m
g/ml の repRNA）を有する複合体化した材料は 10 mM のクエン酸塩を含有した
。複合体を、2 ml の発熱物質除去およびベーキング処理された滅菌バイアルに充填した
。10% スクロースを有する複合体はバイアル当たり 0.7 ml で充填し、20% スクロ
ースを有する複合体はバイアル当たり 0.35 ml で充填した。次いで、バイアルを凍結
乾燥させて貯蔵するか、または液体形態で貯蔵した。貯蔵温度は摂氏 25 度または摂氏 4
2 度とし、1 週間貯蔵した。組成物当たりの凍結乾燥バイアルおよび液体バイアルの数量
を表 1 3 に要約する。

30

40

50

【表 1 3】

表 13. 製剤および特徴。

説明	N:P	DOTAP [μg/ml]	RNA [μg/ml]	バイアル当たり の体積 [ml]	凍結乾 燥バイア ル	液体バイアル
10%スクロース中 NP-1 + WT-S	15	1500	50	0.7	8	6
10%スクロース中 NP-1 + デルタ-S	15	1500	50	0.7	2	0
20%スクロース中 NP-1 + WT-S	15	3000	100	0.35	8	0
20%スクロース中 NP-1 + デルタ-S	15	3000	100	0.35	2	0
10%スクロース中 NP-7 + WT-S	15	1500	50	0.7	8	6

10

20

【0 2 1 9】

凍結乾燥サイクル。不活性ガス充填および止め栓能を伴う S P V i r T i s A d v a n t a g e P r o トレーおよびバッチ凍結乾燥器を使用した。凍結乾燥サイクルの要約を以下の表 1 4 に示す。サイクルの終了後、バイアルに窒素を 4 8 トルで充填し戻し、止め栓をした後、室内圧力まで平衡化させた。

【表 1 4】

表 14. 条件。

30

時間 [時間]	温度 [° C]	圧力 [mT]	注釈
0	5	760	棚にて 5°Cまで予備冷却
0.5	5	760	凍結
2	-50	760	
2.5	-50	50	廃棄
3	-30	50	一次乾燥
20.5	-30	50	
22.5	25	50	二次乾燥
24	25	50	

40

【0 2 2 0】

条件群。このアッセイにおいて分析した 1 4 群の要約を以下の表 1 5 に提示する。群 1

50

および群 4 は、貯蔵の列に示されている通り、新たに調製して、ワクチン調製のための標準的なプロトコールと比較するための陽性対照として機能させた。

【表 1 5】

表 15. 条件。

群	製剤	RNA	スクロース [% w/v]	形態	貯蔵 [温度/時間]
1	NP-1	WT-S	10	液体	新たに調製
2	NP-1	WT-S	10	液体	25C/1 週間
3	NP-1	WT-S	10	液体	42C/1 週間
4	NP-7	WT-S	10	液体	新たに調製
5	NP-7	WT-S	10	液体	25C/1 週間
6	NP-7	WT-S	10	液体	42C/1 週間
7	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
8	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間
9	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間
10	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	42C/1 週間
11	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
12	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間
13	NP-1	デルタ-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
14	NP-1	デルタ-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間

【 0 2 2 1】

免疫原性アッセイ。6～8 週齢の雌 C 5 7 B l / 6 マウスにおいて抗スパイク I g G 応答の誘導を評価した。マウス 5 匹の群サイズを使用した。スケジュールを表 1 6 に示す。

【表 1 6】

表 16. 免疫原性スケジュール。

日付	日	手順
8/23/21	-7	凍結乾燥
9/01/21	0	IM 経路による免疫化
9/15/21	14	採血
9/29/21	28	採血
10/8/21	37	マウスを屠殺

【 0 2 2 2】

摂氏 2 5 度または摂氏 4 2 度の安定チャンバー内で 1 週間貯蔵した後、凍結乾燥ナノ粒子 / R N A 複合体を滅菌 m i l l i Q 水 0 . 7 m l 中に再構成し、肉眼で粒子が見えなくなるまで穏やかに旋回させた。複合体の粒子径 (z 平均) および粒度分布 (P D I) を測

定した。それらが図 8 に要約されており、群の指定が表 15 に示されている。新たに調製した NP-1/WT-S 複合体（群 1）の粒子径および PDI はそれぞれ 76.8 nm および 0.223 であった。再構成後、凍結乾燥試料（群 7～14）は平均で 45%（+/-11%）大きくなった。群 1 に対する z 平均の % 変化の要約を表 17 に示す。

【表 17】

表 17. z 平均のパーセント% 変化。

群番号	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
群 1 に対する z 平均の % 変化	2%	0%	15%	-4%	-1%	30%	42%	59%	53%	48%	33%	41%	55%

10

【0223】

フェノールクロロホルムにより抽出した repRNA のアガロースゲル電気泳動。10%スクロースまたは 20%スクロース中 NP-1/repRNA の液体製剤および NP-7+repRNA の液体製剤を NP-1/repRNA および NP-7+repRNA として 1 週間貯蔵したところ、それぞれ repRNA 産物の部分的なまたは完全な分解が生じた（データは示していない）。10%スクロースまたは 20%スクロース中 NP-1/repRNA および NP-7+repRNA の凍結乾燥物を NP-1/repRNA および NP-7+repRNA として 1 週間貯蔵した後には repRNA 完全性が保存されていた（データは示していない）。

20

【0224】

効力アッセイ。10%スクロース中 NP-1/WT-S の凍結乾燥物を摂氏 25 度で 1 週間貯蔵した場合、トランスフェクトした BHK 細胞においてスパイクタンパク質の用量依存的な発現がもたらされた。発現プロファイルは、新たに複合体化させた NP-1/WT-S のものと同様であった。10%スクロース中 NP-1/WT-S の凍結乾燥物を摂氏 42 度で 1 週間貯蔵することにより、in vitro におけるタンパク質発現が有意に低減した。10%スクロース中 NP-1/WT-S の液体を摂氏 25 度または摂氏 42 度で 1 週間貯蔵した場合、BHK 細胞においてスパイクタンパク質は産生されなかった（データは示していない）。

30

【0225】

ELISA による抗 D614G スパイク IgG 応答。血清中抗 D614G スパイク IgG レベルをプライムの 14 日後および 28 日後に評価し、それぞれ図 9A および 9B に示した。マウス血清を、1:40 希釈物（14 日目）または 1:200 希釈物（28 日目）として抗 D614G スパイク ELISA でアッセイした。既知濃度のマウス IgG 標準物から作成した 4 パラメーターロジスティック（4PL）検量線から $\mu\text{g/ml}$ 単位の血清 IgG レベルを内挿した。

【0226】

プライム後 28 日目の抗 D614G IgG 応答。25℃で 1 週間置いた後、10%スクロース中 NP-1/WT-S の液体では、新たに調製した NP-1/WT-S 陽性対照と比較して抗スパイク IgG の統計的に有意な減少がもたらされた。新たに調製した NP-1/WT-S と 25℃で 1 週間貯蔵した 10%スクロース中 NP-1/WT-S の凍結乾燥物の間では平均 IgG レベルに有意差はなかった。

40

【0227】

42℃で 1 週間置いた後、10%スクロース中 NP-1/WT-S の凍結乾燥物では 100%のセロコンバージョンが誘導されたが、平均 IgG レベルは新たに調製した NP-1/WT-S と比較して有意に低下した。免疫化後 28 日目の IgG の濃度データの平均値 +/- 標準偏差の要約を、新たに調製した NP-1/WT-S 陽性対照と比較して通常の一元配置 ANOVA によって決定された p 値を含め、表 18 に示す。P < 0.05 を統計的有意差とみなした。

50

【表 18】

表 18. 1:200 血清希釈での平均 IgG。

群	製剤	RNA	スクロース[% w/v]	状態	貯蔵温度および時間	28 日目の 1:200 血清希 釈での平均 IgG [μg/ml]	SD [μg/ml]	群 1 に 対する P 値
1	NP-1	WT-S	10	液体	新たに調製	30.38	12.29	n/a
2	NP-1	WT-S	10	液体	25C/1 週間	0.17	0.23	0.0014
3	NP-1	WT-S	10	液体	42C/1 週間	0.02	0.02	0.0013
4	NP-7	WT-S	10	液体	新たに調製	25.69	16.45	0.9990
5	NP-7	WT-S	10	液体	25C/1 週間	8.47	15.99	0.0385
6	NP-7	WT-S	10	液体	42C/1 週間	0.00	0.00	0.0013
7	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	27.44	14.68	0.9994
8	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間	7.34	10.63	0.0257
9	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間	9.07	6.41	0.0474
10	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	42C/1 週間	10.56	11.25	0.0777
11	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	27.53	24.96	0.9994
12	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間	5.33	2.68	0.0121
13	NP-1	デルタ-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	25.83	6.66	0.9990
14	NP-1	デルタ-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間	28.25	5.60	0.9996

10

20

【0228】

新たに調製した製剤と凍結乾燥製剤の比較。プライム後 28 日目の血清中の抗 D 6 1 4 G スパイク IgG の濃度が図 10 に示されている。平均 IgG 値の統計学的差異を通常の一元配置 ANOVA とダネットの多重比較検定によって決定した。すべての群を、新たに調製した 10 % スクロース中 NP-1 / RNA と比較した。新たに調製した NP-1 / RNA と摂氏 25 度で 7 日間貯蔵した 10 % スクロース中 NP-1 / RNA の凍結乾燥物の間に有意差は示されなかった。42 °C の場合、10 % または 20 % スクロース中 NP-1 / RNA の凍結乾燥物による抗スパイク IgG の誘導は、新たに調製した NP-1 / RNA と比較して有意に低かった。摂氏 25 度または 42 °C で貯蔵した 20 % スクロース中 NP-1 / RNA の凍結乾燥物による IgG の誘導は、新たに調製した NP-1 / WT-S よりも有意に低かった。25 °C で貯蔵した 10 % または 20 % スクロース中 NP-1 / デルタ-S の凍結乾燥物による平均 IgG の誘導は、新たに調製した NP-1 / WT-S と同様であった（統計学的に有意でない）。

30

配列

【0229】

以下の配列（配列番号 24 ~ 31）は、以下の通りベクター骨格および抗原オープンリーディングフレームが示される形式になっている：小文字は VEEV レプリコン骨格配列を示し、大文字はスパイクオープンリーディングフレームを示し、太字は開始コドンを示し、下線は親 Wuhan スパイク配列と比べて突然変異したコドンを示す。

40

50

【化 1 - 1】

配列番号24ー全長VEEV+デルタV5抗原をコードするRNA配列

auaggcgggcgaugagagaagcccagaccuuuacuuacccaaauggagaaaauuacguugacaucgaggaagac
agcccauuccucagagcuuugcagcgagcuucccgaguuugagguagaagccaagcaggucacugauaauagacca
ugcuauugccagagcguuuucgcaucuggcuucaaacugaucgaaacggagguggacccauccgacacgauccuug
acauuggaagugcgcccgcccgagaauguaauucuaagcacaaguaucuuuguaucuguccgaugagauugcgga
gauccggacagauuguaaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacuguaaaggaaauuggacaa
gaaaaugaaggagcuggccgcccgcgaugagcgacccugaccuggaaaacugagacuaugugccuccacgacgacgagu
cgugucgcuacgaagggaagucgcguuuuaccaggauuaucgcggugagcggaccgacaaagucucuaucaccaa
gccaauaaggaguuagagucgcccacuggaugggcuuugacaccccccuuuuauguuuuaagaacuuaggcuggagc
auauccaucauacucuaaccaacugggcccgcagaaacccguguaacggcucguaacauaggccuauugcagcucugacg
uuauaggagcggucacguagagggauugccauucuuagaaagaaguuuagaaaccaucaaauugucuaucucuc
guuggcugaccaucuaaccaagagaagagggacuacugaggagcuggcaccugccgucuguaauuacuuacuggg
caagcaaaaauacacauugcggugugagacuauaguuauguugcgacggguacgucguuaaaagaauagcuacaguc
caggccuguauggggaagccuucaggcuauugcugcuacgaugcaccgagggauucuuugucugcaagugacagac
acauugaaacggggagaggguucucuuuuccgugugcacguauugccagcuacaauugugugaccaaagacugggcau
acuggcaacagauugcagugcgagcgcgcaaaaacugcugguugggcucaaccagcguaugucgucaacgguc
gcaccagagaaaacaccaauaccaugaaaaauuacuuuugcccgagugggccaggcauuugcuaggugggcaag
gaauuaaagggaagaucaagaagaugaaaggccacuaggacuaagagauagacaguuagucaguggguguuugggc
uuuuaagaaggcacaagauaacaucauuuuuaagcgcccggauacccaaaccuacuaaagugaaacagcgauuucc
acucauucgugcugcccaggauaggcaguaacacauuggagauccggcugagaaacaagaucaggaaaauguuagag
gagcacaaggagccgucaccucuaauuacccgcccaggacguacaagaagcuagugcgagccgaugaggcuaggga
ggugcgugaagccgaggaguuugcgcgagcucuaaccacuuuggcagcugauguugaggagccacucuggaggcag
acgucgacuugauguuacaagaggcuggggcccgcagugggagacaccucguggcuugauaaagguuaccagcuac
gauggcgaggacaagauccggcucuaacgcugugcuuucuccgaggcuguaacuaagagugaaaaauuauucugcau
ccaccucucgcugaaacaagucuauguguaaacacacucuggccgaaaaggcgguuauccguggaaccuaccuag
guaaaaguaguggugccagaggggacugcauaacccguccaggacuuucaagcucugagugaaagugccaccuugug
uacaacgaacgugaguucguaaacagguaccugcaccuauuugccacacauaggaggagcgugaacacugaugaaga
auuuuacaaaacugucaagcccagcgagcacgacggcgaaauacuguaacgacacaggaacagugcguaaga
aagaacuaugucacugggcuagggcuacagggcgagcugguggaucuccuccuuccaugaaauccgcuacgagagucug
agaacacgacccagccgucuccuaccaaaguaccaaccuagggguguauggcgugccaggaucaaggcaagucuggcau
cauuuuuaggcgagucacccaaaaagaucaugugugagcgccaagaaagaaaaacugugcagaaauuaaagggaag
ucaagaaaaugaaaggcgaggacgucaauugccagaacuguggacucagugcucuugaaggauugcaaacaccccgua
gagaccuguaauuugacgaagcuuuugcuugcuaugcagguacucucagagcgcucauagccauuaaagaccuaa
aaaggcagugcucugcggggaucacccaaacagugcgguuuuuuaacaugaugugccugaaagugcauuuaaccacg
agauuugcacacaagucuuaccacaaaagcaucucucgcccguugcacuaaaucugugacuucggucgucuaaccuug

10

20

30

40

【化 1 - 2】

uuuuacgcacaaaaaagagaacgcagaaucgaaagagacuaagauugugauugacacacccggcagucacaaacc
 uaaagcaggacgaucucacuuucacacuuuuucagaggugggugaagcaguugcaaaauagauuacaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucacagggcgacccgaaagguguguaugccguucgguaacaggugaauaaaauccu
 cuguaacgcacccaccucagaaacaugugaacguccuacugacccgcacggaggacccgaucguguggaaaacacuaagc
 cggcgaccccauggauaaaaacacugacugccaaguacccugggaaauuacugccaagauagaggaguggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagagacccggaccuacccgacgucuuccagaauaaggcaaacgugugu
 ugggccaaggcuuuagugccggugcugaagacccguggcuaagacauagaccacugaacaauggaacaacuguggaaua
 uuuugaaaacggacaaagcucacucagcagagauaguauugaaccaacuaugcgugagguucuuuggacucgaucugg
 acuccggucuaauuuucugcaccacuguccguuauccauuaggaaauaauacacugggauaacucccccgucgcuaac
 auguacgggucugaauaaagaagugguccgucagcucucgcagguacccacaacugccucgggcaguuugccacugg
 aagagucuaugacaugaacaacugguacacugcgcaauuauagucccgcauaaaacuaaguaccuguaaacagaagac
 ugccuacugcuuuaguccuccaccuauaagaacacccacagagugacuuuuucuaucugucagcaauuagagggc
 agaacuguccguggggucggggaauuuguccgucacggcaaaauugguagacugguugucagaccggccugaggc
 uaccuucagagcucggcguggaauuaggcaucccaggugaugugcccaauuagacauaauuuuguaauugagagga
 ccccauauaaauaccauacuaucagcagugugaagaccuagccauuagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu
 cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauaggguuauugguacgcugacagggccagcgaaagcaucauugg
 ugcauauagcgcgagcuucaaauuuuccgguaugcaaacggaaauccucacuaagagacgggaagucuguuug
 uauucauuggguacgaucgcaaggcccguaacgacaauccuuaacaagcuuacuaaccuugaccaacauuuuaca
 gguuccagacuccacgaagccggauugcaccucuaaucauugggugcgaggggaauugccacggccaccgaagg
 agugauuauaaauugcugcuaacagcaaaaggacaaccuggcgagggggugugcgagcgcuuauaagaaauucccg
 aaagcuucgaaauuacagccgaucgaaggaaggaagcgcgacuggucaaaggugcagcuaaaauaucauucaugcc
 guaggacccaaacuucaacaaaguuucggaggguagaaggugacaaacaguuggcagaggcuuagaguccaucgcuaa
 gauugucaacgaauaacaauuacaagucagagcgauuuccacuguuuguccaccggcaucuuuuccgggaacaaaguc
 gacuaaccacaucauugaaacauuugcugacagcuuagacacacugaugcagaugagccauuacugcagggac
 aagaaauugggaaauagacucuaaggaagcaguggcuaggagagaagcagugggaggaugcauauccgacgacuc
 uucagugacagaaacugaugcagagcuggugaggugcauccgaagaguucuuuggcuggaagggaaggcuacagca
 caagcgauuggcaaaacuuucuaauuuuggaagggaaccaaguuuacacaggcgggcaaggauauagcagaaauuau
 gccaugugggccguugcaacggaggccaaugagcagguaugcauguaauucccgagagaaagcaugagcaguuuag
 gucgaaauucccgucgaagagucgggaagccuccacaccacuaagcacgcugccuugcuugugcauccaugccauga
 cuccagaaagaguacagcgccuaaaagccuacaguccagaacaaauuacugugugcuaucuuuccauugccgaag
 uauagaauacacugguugcagaagauccauugcucccagccuauuuguuucacccgaaagugccugcguauuuca
 uccaagggaagauucuguggaacacaccacgguaagacgagacuccggagccaucggcagagaaaccauccacagagg
 ggacaccugaaacaaccaccauuauaaccgagggaugagaccaggacuagaacgcugagccgaucacaucaagag
 gaagaagggaugauagcauuaaguuugcugcagauggcccgacccacaggugcugcaagucgaggcagacauuacgg
 gccgcccucuguaucuaugcuaucuccugguccauuccuauugcauccgacuugauguggacaguuuuccauuacuu
 acaccucggaggaggcugacgugacacagcggggcaacgucagccgagacuaacucuaucuuugcgaagaguuaggag
 uuuucugcgcgacgggugccugcgccuagaaacagauuucaggaaacccuccacaucccgucggcgcaagaacacc
 gucacuugcaccacagcagggccugcugagaaacagccuaguuuccaccccgccaggcgugaauaggguagacua
 gagaggagcucgaggcgcuuaccccgucacgacuccuagcagguccgugcugagaaacagccugguccuaccccg
 ccaggcguaauuaggguuauaagagaggguuugaggcgucguagcacaacaacauagcgguuugaugcggg

10

20

30

40

50

10

20

30

40

10

20

30

40

【化 1 - 5】

配列番号25—全長VEEV+K995P—V996P RNA配列抗原をコードするRNA配列

auaggcggcgaugagagaagcccagaccuuuaccccaaaugggagaauguacguugacaucgaggaagac
agccccauuccagagcuuugcagcgagcuucccgaguuugagguaagccaagcaggucacugauaauagacca
ugcuaaugccagagcguuuuucgaucuggcucaaaacugaucgaaacggagguggacccaucgcacacgauccuug
acauuggaagugcgccccgcgagaauguauucuaagcacaguaucuuuguaucuguccgaugagauugcgga
gaucgggacagauuguuaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacuguaaggaauuggacaa
gaaaaugaaggagcugggccgcgcaugagcgacccugaccuggaaacugagacuaugugccuccacgacgacgagu
cgugucgcuacgaagggcaagucgcuuuuacaggauuaucgcgguugacggaccgacaagucucuaucacca
gccaauaagggauguagugcgcucacuggaauaggcuuugacacccccuuuuuauuuuagaacuuugcgaggac
auauccaucauacucuaaccaucggggccgacgaaaccguguaacggcucguaacauaggccuugcagcucugacg
uuuaggagcgguacacguagaggauuccauucuuagaaagaaguauuugaaaccauccaacauguucuaucucuc
guuggcugcaccuacuaaccagagaaggaggacuuacugaggagcugggaccugccgucuguaauuacuuacgugg
caagcaaaaauacacauugcggugagacuaauaguuauguugcgacggguacgucguuaaaagaauagcuacaguc
caggccuguauggggaagccuucaggcuauugcugcuacgaugcacccgagggauucuuugcugcaaaugacagac
acauugaacggggagaggguucuuuuuccgugugcacguauuguccagcuacauugugugacaaaugacuggcau
acugggcaacagauugcagugcgacgacgcaaaaaacugcugguugggcucaaccagcguaugucgucaacgguc
gcacccagagaaaaacccaauaccauagaaaaauuacuuuugcccguaguggcccaggaauugcuaggugggcaaa
gaauuaaggagaagaucaagaagagaaggccacuaggacuaacgagauagacaguauagcagggguuguuugggc
uuuuaaggacacaagaaacaucauuuauaagcgcccguaacccaaaccaucauaaagugaaacagcgauuucc
acucauucgugcugccaggauaggcaguaacacauuggagauccgggcugagaaacagaacaggaaaauguuagag
gagcacaggagccgucaccucuaauaccgcccaggagcuaacagaagcuaagugcgagccgaugaggcuaggga
ggugcgugaagccgaggguugcgcgagcucuaaccuccuuggcagcugauguugaggagccacucuggaggcag
acgucgacuugauguuaacagaggcugggggccggcucaguggagacaccucguggcuugauaaagguaaccagcuac
gauggcgaggacaagaucggcucuaacgucugcuuucuccgagcgugacucaagagugaaaaauuauucugcau
ccacccucucgugaacaaugucauguaaacaacucugggcgaagggcguaugccguggaaccauaccaug
guaaaguagugguccagagggaugcauaacccguccaggacuuuacagcucugagugaaagugccaccauugug
uacaacgaacgugaguucguaaaagguaaccugcaccuauuugccacacauaggaggagcgugaacacugaugaaga
auuuuacaaaacuguaagcccgagcgagcagcggaauaccuguaacgacacaggaacagugcguaaga
aagaacuagucacugggcuagggcucacaggcgagcuggggauccuccuuccaagaauucgcuacgagagucug
agaacacgacccagccgucuccuuaaccaaguacaaaccauagggguguauggcgugccaggauacggcaagucuggcau
cauuaaaaagcgagucacaaaaaagaucaugggugagcgccaagaaagaaaaacugugcagaaauuaagggaag
ucaagaaaaugaaaggcgaggacgucaaugccagaaacuguggacucagugcucuuugauggaugcaaacaccccgua
gagaccuguaauuugacgaagcuuuugcuugcagguacucucagagcgcuauagccauuaaagaccuaa
aaaggcagugcucugcggggauccaaaacagugcgguuuuuuuaacauaugugccugaaagugcauuuuuaccacg
agaauugcacacaagucuuuccaaaaagcaucucucgcccguugcacuaauucugugacuucggugcucuaaccuug
uuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaauugugauugacacuaccggcaguaacaaacc
uaagcaggacgacucuaucucacuuuguuucagagggggugaagcaguugcaaaugauuacaaaggcaacgaaa
uaaugacggcagcugccucuaaggcgagcccguaaagguguguaugccguucgguaacaggugaaugaaaauccu
cuguaacgacccccaccagaaacauugaaacguccuacugacccgcagggagacggcaucgugggaaaaacacuaagc
cgggcagcccauggaauaaaaacacugacugccaaguacccugggaaauuacugccacgaugaggagugggcaagcag

10

20

30

40

50

【化 1 - 6】

agcaugaugccaugagggcacauucuggagagaccggacccuaccgacgucuccagaauaggcaaacgugugu
 ugggccaaggcuuugugccggugcugaagaccguggcagauagacauagaccacugaacaauuggaacaacuguggauua
 uuuugaaaacggacaaagcucacucagcagagauaguauugaaccaacuaugcgugagguucuuuggacucgaucugg
 acuccggucuaauuucugcaccacuguuuccguuauccaauaggaaauaacaucugggaaacucccgucgccuaac
 auguacgggucgaauaaagaagugguccgucagcucucgcagguacccacaaucgccucgggcaguugccaucugg
 aagagucuaugacaugaacaucugguacacucgcgcaauuauagauccgcgcauaaaaccuaguaccuguaaacagaagac
 ugccuacugcuuuguccuccaccauaauggaacaccacagagugacuuuucuucauucgucagcaaaugaagggc
 agaaucuguccggugugcggggaaauguguccguccaggcaaaugguugacugguugucagaccggccugagggc
 uaccuucagagcucggcuggauuaggcauccaggugaugugcccaauaugacauaauuuuguaauugugagga
 ccccauaauaaauaccaucauacagcagugugaagaccuagccauuaagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu
 cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauagguaugguuacgcugacagggccagcgaaagcaucauugg
 ugcuaugcgcggcaguucaaguuuuccggguaugcaaacggaaauccucacuuagaagagacggagguucuguuug
 uauucauuggguacgaucgcaaggcccguaacgcacaaucuuacaagcuuucacuaaccuugaccaacaauuaucac
 gguuccagacuccacgaagccggaugugcaccucuaucuauguggugcgaggggaauuugccacggccaccgaagg
 agugauuaauaauugcugcuaacagcaaaaggacaaccuggcggaaggguugugcgagcguguaaagaaauucccg
 aaagcuucgaaauacagccgaucgaaggaaggaaaagcgcgacuggucaaaggugcagcuaaacauaaucauugcc
 guaggacaaaacuucaacaaaguuucggaggguagaaggugacaaacaguuggcagagggcuuagaguccaucgcuaa
 gauugucaacgaaacaaauacaagucagugcgauuccacuguguccaccggcaucuuuuccgggaacaaagauc
 gacuaaccacaaucuuuagaaaccuuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauauacugcagggac
 aagaaugggaaauagacucuaaggaagcaguggcuaggagagaagcagugggaggaugauugcauuccgacgacuc
 uucagugacagaaaccugaugcagagcugugagggugcauccgaagaguucuuuggcuggaagggaaggguacagca
 caagcgauaggcaaaaacuuucacuaauuuggaagggaaccaaguuaccaggcgcccaaggauuagcagaaauua
 gccauguggcccgugcaacggaggccaaugagcagguaugcauguauaaccucggagaaagcaugagcaguuuag
 gucgaaauugcccgucgaagagucgggaagccuccacaccaccuagcacgcugccuugcuugugcauccaugccauga
 cuccagaaagaguaacagcgccuaaaagccuacgcuccagaacaaauuacugugugcuaucuuuccauugccgaag
 uauagaauacucggugugcagaagauccaugcucccagccuaauuugucacaccgaaagugccugcguaauuucac
 uccaagggaagauucuguggaacaccacccgguagacgagacucgggagccaucggcagagaaaccauccacagagg
 ggacaccugaacaaccaccauuuaaaccgaggaugagaccaggacuaagacgcuagccgaucacuaucgaagag
 gaagaagaggauagcauaaguuugcugucagauggcccgacccacccaggugcugcaagucgagggcagacauucacgg
 gccgcccucuguaucuaugcuaucuccgguccaauuccucaugcauccgacuuuagugggacaguuuuccaauacuu
 aaccccgaggaggagcugagcugacagcggggcaacgucagccgagacuaacucuaucuuugcgaagaguuaggag
 uuuucggcgagccggugccugcgccucgaacagauuucagggaaccuccacaucccgucggcgcaagaacacc
 gucacuugcaccacagcagggccugcugcagaaaccagccuaguuuccaccccgccagggcugaaugggugaucaua
 gagaggagcucgaggcgcuuaccccgucacgcacuccuagcagguccgucgagaaaccagccugucuccaaccgg
 ccaggcguaaaugggugauuacaagagaggguuugaggcguucgucacaaacaaugacgguuugaugcggg
 ugcauacacuuuuucccgacaccggucaagggaauuacaaacaaauacagaaaggcaaacggugcuauccgaag
 ugguguuaggagaggaccgaauuggagauuucguaugcccgccgaccaaagaaagaaauuacuaacgcaag
 aaaaucaguuauaauccacaccugcuaacagaagcagauaccaguccaggaagguggagaaacagaaagccauaac
 agcuagacguaauucgcaaggccuagggcauuuuuagaggcagaaggaaaaggagugcuaaccgaaccugcauc
 cuguuccuuuguaucuaugugagaaaccugccuuuuaagcccaaggucgaguggaagccuguaaccgaug

10

20

30

40

50

【化 1 - 7】

uugaaagagaacuuuccgacuguggcucuuacuguaauuauuccagaguaacgaugccuauuuggacaugguugacgg
 agcuucaugcugcuuagacacugccaguuuuugcccugcaaagcugcgcagcuuuccaagaaacacuccuauuugg
 aaccacaaauacgaucggcagugccuucagcgauccagaacacgcuccagaacgucuccgagcugccacaaaaaga
 aaugcaaugucacgcaaaugagagaaauugcccguauuuggauucggcgccuuuaauguggaaugcuucaagaaaua
 ugcguguaauaauagaauuugggaaacguuuuaagaaaaccccaucagguuacugaagaaacgugguaaaauaca
 uuacaaaauaaaaggaccaaagcugcugcucuuuuugcgaagacacauaaauugaauauguugcaggacauacca
 auggacaggguuuguauggacuuaaagagagacgugaagugacuccaggaaacaaacauacugaagAACGGCCAA
 gguaacaggugauccaggcugccgaucgcgcuagcaacagcguaucugugcggaauccaccgagagcugguuaggagau
 uaaaugcgguccugcuuccgaacauucauacacuguuugauaugucggcugaagacuugacgcuauuauagccgag
 cacuuccagccugggggauguguuucuggaaacugacauccgucgucguuuugauaaaagugaggacgacgccauggcucu
 gaccgcguuaauagaauucuggaagacuagguguggacgcagagcuguuagacgcugaauaggcgguuucggcgaaa
 uuucacuaauacauuugcccacuaaaacuaauuuuuuucggagccaugaugaaucuggaauguuccucacacug
 uuugugaaacacagucuuuaacauuguaauccgaagcagaguguuagagagaacggcuAACCGGAUcaccagugcagc
 auucauugggagagacaaauacuguaaaggagucuaaauccggacaaauuaauggcagacaggugcgccaccugguuga
 auauggaagucagaauuauagaugcugugggggcgagaaagcgccuuauuucuguggaggguuuuuuugugugac
 uccgugacccggcacagcugcgugcgugggcagacccccuaaaaggcuguuuuagcuuggcaaacucugggcagcaga
 cgaugaacaugaugaugacaggagaagggaugcaugaagagucacacgcuggaaccgagugguauucuuucag
 agcugugcaaggcagugaaucaagguuagaaaccguaggaaucuccaucauaguuaggccaugacuacucuaagcu
 agcaguguaauuacauucagcuaccugagaggggccccuaaaccucucuaaggcuAACCCUGAauggacuacgacaua
 gucuagucggccaaag**AUGUUUCUGUCACAAACCAACGCACUAUGUUUGUUUUCUCUGUCUGCCCCUUUGGUAAG**
UUUCUCAGUGUGUAAACUGACAAACGAAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUCAUUACUCGCGGAGUAUAU
AUCCCCGAUAAGGUCUUUAGAAGUAGCGUGUUGCACUCUACACAGGAUCUGUUCUUGCCUUCUUUAGUAACGUUACC
UGGUUUCAGUCAAUACAUUGAGCGGAACAAAUGGAACAAAAGAUUUGACAAUCCAGUGCUUCCAUAUUAUGAUGG
GGUUUACUUUGCCAGUACCGAAAAGUCAAAACUAUACCGGGGGUGGAUCUUUGGAACCAUUGGACUCUAAGACAC
AGUCUCUCCUCAUAGUAAACAACGCCACCAUUGUUGCAUAAAAGUAUGCGAAUUCAGUUUUGCAACGAUCCCUU
CUCGGGGUGUAUUAACCAUAGAUAUAAUAAUCCUGGAUGGAGUCUGAGUUCGGGUUUAUAGUAGUCUAUAAUUG
CACUUUCGAAUACGUGUCCCAACCAUUCUUAUGGACCUUGAGGGCAAACAGGGGAUUUUAAAAACUUGCGCGAAU
UUGUCUUUAAGAAUACGACGGAUACUUUAGAUCUAUAGUAAACACACUCCUAUCAAACCUUGUCGGGAUCUCCCC
CAAGGCUUUUCUGUCUCGAACCCUCGUAGACUUGCCAAUUGGGAUAAAUACACUCGCUUCAAACUUUGCUUGC
CCUCCACAGGAGCUACCUAGACACCGGGGACUCUUUCUUGGUUGGACCGCGCGCGCGCUGCCUAUUAUGUUGGUU
ACCUUCAGCCACGAACAUUCUUGCUCAAGUAUAACGAGAAUGGCACCAUUAACCGACCGGUCGAUUGUGCAUUGGAU
CCCUUGUCUGAAACAAAUGUACCUUGAAGUCCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUAUACAGACUCCAACUCCGAGU
UCAGCCUACAGAAUCCAUUGUGAGAUUUCCCAACAUACAAACCUUGGCCUUUCGGUGAAGUAUUAAUGCUACAC
GCUUCGCUUCAGUCUAUGCCUGGAUAGGAAGCGCAUAUCAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCUCUAUAAUAGC
GCAUCCUUCAGUACUUUCAAGUGCUACGGCGUUUCCCCACCAAACUCAUGAUUCUUGCUUCACCAACGUCUAUGC
UGACAGUUUUGUCAUACGAGGCGACGAAGUACGCCAGAUUGCCCCCGGGCAGACAGGUAAAAUUGCUGAUUUAUAAU
AUAAACUCCAGAUACUUUACUGGAUGCGUCAUAGCCUGGAUUCCAACAACUUGAUUCCAAGGUUGGUGGGAU
UAUAAUUAACUUUAUCGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUGAAACCAUUGAGAGAGACAUUCCACCGAGAUUACCA
GGCAGGCAGUACUCCUUGUAAACGGCGUUGAGGGAUUUAAACUGCUAUUUUCCUUUGCAAUCCUUGGCUUUCAACCAA
CAAACGGGGUUGGCUAUCAACCCUACGAGUGGUUGUCCUGAGCUUUGAACUUUUGCACGCUCGCCGCACAGUCUGC

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【化 1 - 9】

gaucgggacagauuguaaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacuguaaggaaauuggacaa
 gaaaauaaggagcugggccgcucaugagcgacccugacccuggaaacugagacuaugugccuccacgacgagau
 cgugucgcuacgaagggcaagucgcuuuuacaggauaauacggguugacggaccgacaagucucuaucaccaa
 gccaaauaggaguuagagucgcuacuggauaggcuuugacaccccccuuuuauguuaaagaacuuggcuggagc
 auauccaucauacucuaaccaacugggccgacgaaaccguguaaaccgucguaacauaggccuagcagcucugacg
 uuauaggagcggucacguagagggauguccauucuuagaagaaguauuugaaaccuaccaacauguucuaauucuc
 guuggcucgaccaucuaaccacgagaagagggaucuaugagagcugggaccugccgucuguaauuacuuacgug
 caagcaaaauuacacauugcggugugagacuaaguuauguugcgacggguacgucguuaaaagaauagcuaucaguc
 caggccuguaugggaagccuucaggcuauugcucacgaugcacccgagggauucugugcugcaagugacagac
 acauugaaaggaggagaggucucuuuuccgugugcacguauugccagcuacauugugagccaaagacugggcau
 acugggcaacagaugucagugcgacgacgcaaaaaacugcugguugggcucaaccagcguauagcgucaacgguc
 gcaaccagagaaaaaccaauaccaugaaaaauuacuuuugcccguaugggccagcgaauugcuaggugggcaag
 gaauuaaggaaagaucaagaagaugaaggccacuaggacuaagagauagacaguuagucuauggggugugugggc
 uuuuagaaggcacaagauaacaucauuuuuaagcgcccguaacccaaaccaucaaaagugaacagcgauuucc
 acucauucgugcugccaggauaggcaguaacacauuggagauccggcgagagaacaagaucaggaaaauguuagag
 gagcacaaggagccgucaccucucuaucggcgaggacguacaaagcuaagugcgagccgagaggcuaagga
 ggugcgugaagccgaggaguugcgcgagcucuaaccuccuuggcagcugaugugaggagccacucuggaggcag
 acgucgacuugauguuacaagaggcugggcgccgucaguggagacaccucugggcuugauaaagguuacagcuac
 gauggcgaggacaagaucggcucuaacgucugcuuucccgaggcuguaacuaagagugaaaaauaucuugcau
 ccaaccucugcuguaacaagucuauguguaacacacucugggcgaaaaggcguaugccguggaaccuaccaug
 guaaaguaugugugccagagggaugcauaacccgucagggaauuacagcucugagugaaagugccaccauugug
 uacaacgaacgugaguucguaaaacagguaccugcaccauauugccacacauaggaggcgcuacacugaugaaga
 auuuuacaaaacuguaagcccgagcagcagcggaauaccuguaacgacaggaacagugcguaaga
 aagaacuaugcucugggcuaggccuacaggcgagcuguggaucuccuccuuccaagaauucgcuacgagagucug
 agaacacgacaccagccgucuccuuaaccaaguccaaaccauagggguguaugggcgugccaggauaggcaagucuggcau
 cauuuaaaggcgagucacccaaaaagaucaugugugagcgccaaagaaagaaaacugugcagaaauuaaggagc
 ucaagaaaauagaaaggcgagcuaauugccagaacuguggaucagugcucuauggaugcaaacaccccgua
 gagaccuguaauugacgaagcuuugcuugcuaugcagguaucucucagagcgcuauagccauuaaagaccuaa
 aaaggcagugcucugcggggaucacaaacagugcgguuuuuuacauagaugugccugaaagugcauuuaaccacg
 agauuugcacacaagucuccacaaaagcaucucugccguugcacuaaauugugacuuaggugcucuaaccuug
 uuuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaauugugauugacacuaaccggcaguccaaacc
 uaagcaggagcgaucucauucucacuuuuuacagaggugggugaagcaguugcaaaagauuaaaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucuaaggcgagaccgaaagguguguaugccguucgguaacaggugaauaaaauccu
 cuguaacgacccacccagaaacauugaaacguccuacugaccccgacggaggacccgcaucgugugaaaacacuaagc
 cggcgaccccauggaauaaaaacacugacugccaaagacccugggauuuacugccacgaugaggagugggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagacccgacccuaccgacgucuccagaauaaggcaaacgugugu
 ugggccaaggcuuagugccggugcugaagacggcuggaugaacagaccacugaacaauaggaaacacuguggaaua
 uuuugaaaaggcaaaagcucacucagcagagauagaauugaaccaacuaugcgugaggguucuuuggacucgaucug
 acuccggucuaauuucugcaaccaucguuccguuaucuuuaggaaauaaucauggguaacuccccgucgcuac
 auguacgggcuagaauaagaaguguccgucagcucucgcagguaaccacaaacugccucgggaguuugccacug

10

20

30

40

50

【化 1 - 1 0】

aagagucuaugacaugaacacugguacacugcgcaauuaugaucgcgcauaaaacuaaguaccuguaaacagaagac
ugccucaugcuuuaguccuccaccuaauggaacccacagagugacuuuucuaucugucagcaauugaagggc
agaaucuguccggugugcggggaaauguguccguccaggcaaaaugguugacugguugucagaccggccugagggc
uaccuucagagcucggcuggaauuaggcaucccaggugaugugcccaauaugacauaaauuuguaauugugagga
ccccauuaaaauaccaucauucagcagugugaagaccaugccauuaagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu
cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauaggguuauugguuacgucagagggccagcgaaagcaucauugg
ugcuauagcgcgcgagucuaaguuuuccggguaugcaaacgaaauccucacuugaagagacggaauguucuguuug
uauucauuggguaacgaucgcaaggcccguaacgcacaauccuua caagcuuucaucaaccuugaccaacaauuuuaca
gguuccagacuccacgaagccggauugcaccuccauuaucauugugugcgaggggaauuugccacggccaccgaagg
agugauuaaaauugcugcuaacagcaaaaggacaaccuggcgaggggugugcgagcguguaaagaaauuccgg
aaagcuucgaaauuacagccgaucgaaggaagaaagcgcgacuggucaaaggugcagcuaaacauuaucauugcc
guaggaccaaaucuaacaaaguuucggaggguugaaggugacaaacaguuggcagaggcuuugaguccaucgcuaa
gauuguaacgaaacaauuacaagucagugcgauuccacuguguccaccggcaucuuuuccgggaacaaagauc
gacuaacccauauugaaaccuuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauauacugcagggac
aagaaugggaaauagacucuaaggaagcaguggcuaggagagaagcaguggaggagauugcauauccgacgacuc
uucagugacagaaaccugaugcagagcugugagggugcauccgaagaguucuuuggcuggaagggaaggcuacagca
caagcgauuggcaaaacuuucuaauuuggaagggaaccaaguucaccaggcgccaggauuagcagaaauuaa
gccauguggcccgugcaacggaggccaugagcagguaugcauguauuccucggagaaagcaugagcaguaauag
gucgaaauugcccgucgaagagucgggaagccuccacaccaccuagcacgcugccuugcugcauccaugccauga
cuccagaaagaguaacagcgccuaaaagccucacgcuccagaacaaauuacugugucucacuuuccauugccgaag
uauagaauacucggugugcagaagauccaugcuccagccuaauuugucucacccgaaagugccugcguaauuca
uccaaggaaagauucugggaaacaccacccgguagacgagacucggagccaucggcagagaaaccauccacagagg
ggacaccugaaacaaccaccauuuaaaccgaggaugagaccaggacuaagacgcccugagccgaucuaucgaagag
gaagaagaggauagcauaaguuugcugucagauggcccgacccaccaggugcugcaagucgaggcagacauucaagg
gcccgcucuguaucuaugcuaucuccgguccaauucccaugcauccgacuuugauguggacaguuuuccauuauug
acaccucggaggaggcugacgugacccagcggggcaacgucagccgagacuaacucuaucucgcaagagauaggag
uuucugggcgacccggugccugcgccucgaaacaguuuacaggaaaccuccacauuccgucggcgcaagaaacc
guacauugcaccacagcagggccugcugcagaaaccagccuaguuuccaccccgccaggcguaauaggguagacua
gagaggagcucgaggcgcuuaccccgucacgcacuccuagcaggucggucugcagaaaccagccugucuccaaaccg
ccaggcguaaaauaggguaguuacaagagaggaguuugagggcuucguagcacaacaauagacgguuugaugcggg
ugcauacauuuuucccgacaccggucaagggaauuacaacaaaaucaguaaggcaaacggugcuauccgaag
ugguguuaggagaggaccgaauuggagauuucguaugcccgcgccugaccaagaaaaagaaauuacuaagcaag
aaaauacaguuuaauuccacaccugcuaacagaagcagauaccaguccaggaagguggagaaacauaaagccauaac
agcuagacguaauucugcaaggccuagggaauuauuaggaagggaaggaaguggagugcuaaccgaaccugcauc
cuguuuccuuuguaucuaugugugaaccgugccuuuuaagcccaaggucgaguggaagccuguaacgccaug
uugaaagagaaacuuuccgacuguggcuuucuauguaauuuccagagacgaugccuauuuggacauugguagcgg
agcuuacugcugcuuagacacugccaguuuugcccgcaaaagcugcgagcuuuccaaagaaacacuccuauuugg
aaccacaaauacgaucggcagugccuucagcgauccagaacacgcuccagaacgucuccggcagcugccacaaaaga
aaugcaaugucacgcaauagagagaauugcccguauggauucggcgccuuuauguggaauugcuucaaagaaaua
ugcguguaauaaugaauuugggaaacguuuaaagaaaaccccaucaggcuuacugaagaaaaagugguaaaauaca

10

20

30

40

50

auggccaaaauaaaaggaccaaaagcugcugcucuuuuugcggaagacacauaaauugaaauauguugcaggacauacca
 auggacagguuuguaauggacuuuaagagagacgugaaaggugacuccaggaacaaaacauacugaagaacgggcccaa
 gguaacaggugaucaggcugcggcgaucgcgcuagcaacagcguaucugugcggaauccaccgagagcugguuaggagau
 uaaaugcgguccgcuucccgaaacauucauacacuguuugauaugucggcugaagacuuugacgcuaauuagccgag
 cacuuccagcccguggggaauuguguuucuggaaacugacaucgcgucguuuugauaaaagugaggacgacgccauuggcucu
 gaccgcgguuaauggauucuggaagacuuaagguguggacgcagagcuguugacgcgugaauaggcgggcuuucggcgaaa
 uuucacuaacauuugcccacuaaaacuaaaauuaauuucggagcgcaugaugaaucuggaauguuccucacacug
 uuugugaaacacagucuuuacauuguaauucgcaagcagaguguuugagagaacggcuaacgggaucaccaugugcagc
 auucauugggagaugacaauaucgugaaaggagucaaaucggacaaaauaauuggcagacaggugcgccaccugguuga
 uauuggaagucagaauuauagaugcugugggugggcgagaaagcgccuuauuucuguggaggguuuuuuugugugac
 ucccgugacccggcacagcgugccgugugggcagacccccuaaaaaggcuguuuuagcuuggcaaacucugggcagcaga
 cgaugaacaugaugaugacaggagaagggaucaugcaugaagagucaacacgcuggaaccgaguggguaauucuuucag
 agcugugcaaggcagugaaucaagguaugaaaccguaggaaucuccaucuaguuauuggccaugacuacucuaugcu
 agcaguguuuuuacauucagcuaccugagagggggcccuuaacucucuaacggcuuacccugaauggacuacgacaua
 gucuaugucggcccaag**AUGUUUUCGUCACAAACCAAACGCACUAUGUUUUGUUUUCUCGUGCUGCUCUUUUGGUAAG**
UUUCUCAGUGUGUAAACCUGACAACACGAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUCAUUUACUCGCGGAGUAUAUU
 AUCCCCGAUAAGGUCUUUAGAAGUAGCGUGUUGCACUCUACACAGGAUCUGUUCUUGCCCUUCUUUAGUAACGUUACC
 UGGUUUCAUGCAAUACAUGUGAGCGGAACAAAUGGAACAAAAGAUUUGACAAUCCAGUGCUUCCAUUUAUAGUAGG
 GGUUUACUUUGCCAGUACCGAAAAGUCAAAACUAUAAUCCGGGGUGGAUCUUUGGAACCAUUUGGACUCUAAGACAC
 AGUCUCUCCUCAUAGUAAACAACGCCACCAUGUUGUCAUAAAAGUAUGCGAAUUCAGUUUUGCAACGAUCCCUUU
 CUCGGGGUGUAUUACCAUAAGAAUAAUAAAUCCUGGAUGGAGUCUGAGUUCGGGUUUUAUGUAGUGCUAAUAAUUG
 CACUUUCGAUACGUGUCCCAACCAUUCUCUAGGACCUCUGAGGGCAAACAGGGGAUUUUAAAAACUUGCGCGAAU
 UUGUCUUUAAGAAUAUCGACGGAUACUUUAAGAUCAUAAGUAAACACACUCCUAUCAAACUCGUUCGGGAUCUCCCC
 CAAGGCUUUUCUGCUCUCGAACCCUCUGAGACUUGCCAAUUGGGAUAAAUACACUCGCUUUCAAACUUUGCUUGC
 CCUCCACAGGAGCUACCUGACACCCGGCGACUCUUCUUCUGGUUGGACCGCGCGCGCGCUGCCUAUUUAGUUGGUU
 ACCUUCAGCCACGAACAUUCUUGCUCAGUAUAACGAGAAUGGCACCAUUAACCGACGCCGUCGAUUGUGCAUUGGAU
 CCCUUGUCUGAAACAAAAGUACCUUGAAGUCCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUUAACAGACUUCCAACUUCGGAGU
 UCAGGCCACAGAAUCCAUUGUGAGAUUUCCCAACAUACAAACCUCUGCCCUUUCGGUGAAGUAUUUAUUGCUACAC
 GCUUCGCUUCAGUCUAUGCCUGGAAUAGGAAGCGCAUAUCAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCCUUAUAAUAGC
 GCAUCCUUCAGUACUUUCAGUGCUACGGCGUUCCCCCACCAAACUCAAUGAUUCUUUCUUCACCAACGUCUAUGC
 UGACAGUUUUGUCAUACGAGGCGACGAAGUACGCCAGAUUGCCCCCGGGCAGACAGGUAUUUUUGCUGAUUAUAAUU
 AUAAACUCCCAGAUAGACUUUACUGGAUGCGUCAUAGCCUGGAAUUCCAACAAUUCUGAUUCCAAGGUUGGUGGGAAU
 UUAUAAUUAACUUUAUCGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUGAAACCAUUGAGAGAGACAUUACCCAGAGAUUUACCA
 GGCAGGCAGUACUCCUUGUAACGGCGUUGAGGGAUUUUACUGCUAUUUUCCUUUGCAAUCCUAUGGCUUUCAAACAA
 CAAACGGGGUUGGCUAUCAACCCUAUCGAGUGGUUGUCCUGAGCUUUGAACUUUUGCAGGCUCUCCGCCACAGUCUGC
 GGCACAAAAAAGAGUACAAAUUCUUGUCAAGAAUAAGUGCGUAAAUUCAAUUUCAAUGGCCUUAACAGGAACAGGCGU
 GCUUGACUGAGUCAACAAAGAAGUUCUGGCCAUUUCAGCAGUUUGGGCGGGAUUAUAGCAGACACAACUGACGCUGUAC
 GCGAUCCUCAGACUUUGGAGAUUCUUGGACAUACUCCUGUUCUUUCGGAGGGGUUUCUGUCAUACCCCCGGAAU
 AAUACAUCAAUCAGGUCGCUUGUUGUACCAAGAUUGCAACUGCACAGAAGUCCCCGUUGCUUACACGCAGGCCA
 GCUACCCCCACAUUGGCGGGUGUACUCAACUGGCUCAAACGUAUUCAGACACAGAGCUGGGUGCUUGAUUCGGUGCU

40

10

20

30

40

【化 1 - 1 3】

uuauggagcggucacguagagggauuguccauucuuagaaagaaguauuugaaaccauccaacauguucuaauucucu
 guuggcucgaccaucuaaccagagaagagggacuucugagggagcuggcaccugccgucuguaauuacauuacgugg
 caagcaaaaauacacauugcggugugagacuauaguauugcgacggguacgucguuaaaagaauagcuauacaguc
 cagggcuguaugggaagccuucaggcuauugcugcuacgaugcaccgagggauucugugcugcaaaagugacagac
 acauugaacggggagagggucucuuuuccgugugcacguauugccagcuacaauugugaccaaagacuggcau
 acuggcaacagauugcagugcggacgacgacgcaaaaacugcugguugggcucaaccagcguaugucgucaacgguc
 gcacccagagaaaaaccaauaccaugaaaaauaccuuugcccguaugggccaggaauugcuagggggcaaaag
 gaauuaaggaagaucaagaagauaaaaggccacuaggacuacgagauagacaguuagucuauggggugugugggg
 uuuuagaaggcacaagauaacaucauuuuauagcgcccgauacccaaccuacaucaaaagugaaacagcgauuucc
 acucauucgugcugccaggauaggcaguaacacauuggagauccggcgagaaacaagaucaggaaaauguuagag
 gagcacaaggagccgucaccucucauaccgcccagggacguacaagaagcuagugcgagccgagaggcuaggga
 ggugcgugaagccgaggaguugcgcgagcucuaaccacuuuggcagcugauguagaggagccacucugggaggcag
 acgucgacuugauguuacaagaggcugggggcgccgucaguggagacaccucguggcuugauaaagguuacagcuac
 gauggcgaggacaagaucggcucuuacgucugcuuucccgaggcugacucaaagagugaaaaauuacuuugcau
 ccaaccucucgcuagaacaagucuaugugauaacacacucugggcgaaaaggcguaugccguggaaaccauaccuag
 guaaagugaugggccagagggaugcauuaaccguccaggacuuaagcucugagugaaagugccaccauugug
 uacaacgaacgugaguucguaaaacagguaccugcaccuauugccacacauaggaggagcgcuagaacacugaugaga
 auuuuacaaaacuguaagcccgagcgagcagcagcggaauaccuguaagcagacaggaacagugcguaaga
 aagaacugacucugggcuaggccuacagggcagcgaggugauuccccuuccauagaauucgcuacgagagucug
 agaacacgacccagccgucuuuaccuaggaacccauagggguguauggcgugccaggauacggcaagucuggcau
 cauuaaaagcgagucacccaaaaagaucaugggugagcgccaagaaagaaaaacugugcagaaauuaaagggacg
 ucaagaaaaugaaaggcgagcgucaauugccagaacuguggaucacagugcucuuagauggaugcaaacaccccgua
 gagaccuguaauuagcgaagcuuuugcuugcagcagguaucucucagagcgcucauagccauuaaagaccuaa
 aaaggcagugcucugcggggaucccaaacagugcgguuuuuuaacaugaugugccugaaagugcauuuaaccacg
 agauuugcacacaagucuuaccacaaaagcaucucucgcccguugcacuaaaucugugacuucggucgucuaaccuug
 uuuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaauugugauugacacuaccggcaguccaaacc
 uagcaggagcgaucucauucucacuuuguuucagagggggugaagcaguugcaaaugauuaacaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucuaagggcgacccguaaagguguguaugccguucgguaacaggugaauagaaaauccu
 cuguaacgacccaccucagaaacauugaaacguccuacugacccgacggaggacccgcaucguguggaaacacuaagc
 cggcgacccauagguaaaaaacacugacugccaaagacccugggaaauuacugccacgaugaggaguggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagacccggacccuaccgacgucuuaccagaauaaggcaaacgugugu
 uggggcaaggcuuugugcgggugcugaagacggcuggcuaugacacugaccacugaacaauggaacacuguggaaua
 uuuugaaaaggcaaaagcucacucagcagagauaguauugaaccaacuagcgugagguucuuuggacucgaucugg
 acuccggucuaauuucugcaccacugucuccguuauccauuaggaaauaauacugggauaacucccgucgcuuac
 auguacgggcuagaauaaagaugguccgucagcucucgagguacccacaaacugccucgggagauugccacugg
 aagagucuaugacaugaacacugguacacugcgcaauuauagauccgcauaaaaccuaguccuuaaacagaagac
 ugccuacugcuuugauuccaccacuaaagaacacccacagagugacuauuucuaucugcagcaaaugaaggggc
 agaacuguccgugggugcggggaaaaguguccgucacaggcaaaaugguugacugguugucagacggccugaggc
 uaccuucagagcucggcuggaauuaggcauccaggugaugugcccaauaagacauaauuuuguaauugagga
 ccccauuaauuaccuacuaucagcagugugaagaccauuaagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu

10

20

30

40

50

【化 1 - 1 4】

cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauagguuauugguuacgcugacagggccagcgaaagcaucauugg
 ugcuaauagcgcgaguucaaguuuucccgguaugcaaaccgaaauccucacuugaagagacgggaaguucuguuug
 uauucauuggguacgaucgcaagggccguacgcacaaucuuacaagcuuucaucaaccuugaccaacauuuauaca
 gguuccagacuccacgaagccggaugugcaccucuaucuaugugugcgagggggaauugccaaggccaccgaagg
 agugauuauaaaugcugcuaacagcaaggacaaccuggggggugugcgagcguguaaagaaaucccg
 aaagcuucgauuuacagccgaucgaaguaggaaaagcgcgacuggucaaaggugcagcuaaacauaucuucaugcc
 guaggacccaaaauucaacaaaguuucggagguugaaggugacaaacaguuggcagagggcuuagaguccaucgcuaa
 gauugucacaggaacauuacaagucaguagcgauuccacuguuuccaccggcaucuuuuccgggaacaaagauc
 gacuaacccaaucuuugaaccuuugcugacagcuuagacaccacugaugcagauguagccauauacugcagggac
 aagaauggggaaugacucuaaggaagcaguggcuaaggagagaagcagugggaggauaugcauuccgacgcacuc
 uucagugacagaaaccugaugcagagcugugagggugcauccgaagaguucuuugcuggaagggaaggcuacagca
 caagcgauggcaaaucuuucuaauuuggaagggaaccauuuaccaggcgccaaaggauauagcagaaauuau
 gccaugugggccguugcaaaggaggccaaugagcagguaugcauguauuccucggagaaagcaugagcaguauuag
 gucgaaauugccccgucgaagagucgggaagccuccacaccaccuagcacgcugccuugcuugugcauccaugccauga
 cuccagaaagagucacgcgcuaaaagccucacgcuccagaacaaauuacugugugcuaucuuuccauugccgaag
 uauagaauacacugugugcagaagauccaugcucccagccuaauuugucacacgaaagugccugcguauauuca
 uccaagggaugaucucguggaacacccagguagacgagacuccggagccaucggcagagaaccaauccacagagg
 ggacaccugaaacaccaccacuuauaacggaggaugagaccaggacuaagacgcugagccgaucuaucgaagag
 gaagaagaggauagcauaguuugcugucagauggcccgacccaccaggugcugcaagucgaggcagacauuacgg
 gccgcccucuguaucuaucgucacuccuguccauucccuaugcauccgacuuugauguggcaguuuuccauaucuug
 acacccugggaggagcugagcugacagcggggcaacgucagccgagacuaacucuaucucgcaagagauaggag
 uuuucugggcgacccgugccugccucgaaacagauuucaggaaccuccacauuccgucggcgacacagaaacc
 gucacuugcaccacagcagggccugcucgagaaccagccuaguuuccaccccgccagcgugaaugggugaucua
 gagaggagcucgagggcguaaccccgucacgcacuccuagcagguccgucgagaaccagccuggucuccaaaccg
 ccaggcguaauuaggugauuacaagagaggauuugaggcgucgagacacaaacaaugacggguugaugcggg
 ugcauacauuuuucccgacacgggucaagggaauuacaacaaaaucaaguaaggcaaacggugcuaucggaag
 uggugugggagaggaccgaauuggagauuucguaugccccgcccgcgaccaaagaaaagaauuacucgcaag
 aaaaauacaguuaauuccacaccugcuaacagaagcagauaccaguccaggaagguggagaacauaaagccauaac
 agcuagacguauucugcaaggccuagggcauuauuugaaggcagaaggaaaaguggagugcuaaccgaaccugcauc
 cuguuccuuuguaucuaucagugugaaccgugccuuuuaagcccaaggucgaguggaagccuguaaccgcaug
 uugaaagagaacuuuccgacuguggcuuuucuguaauuuccagagucgaugccuauuuggacaugguugacgg
 agcuucaugcugcuuagacacugccaguuuuugcccgcaaaagcugcgagcuuuccaaagaaacacuccuauuugg
 aaccacaaauacgaucggcagugccuucagcgauccagaacacgcuccagaacgucuccggcagcugccacaaaaga
 aauugcaaugucacgcaauagagaaauugcccgauuuggaucggcgccuuuaauuggaaugcuucaagaaaua
 ugcguguaauaauagaaauugggaaacguuuuaagaaaaccccaucaggcuuacugaagaaaaagugguaaauaca
 uuaccaaaauaaaaggaccaaagcugcugcucuuuugcgagacacauaaauugaaauugcaggacauacca
 auggacagguuuguaauaggacuuuaagagagacgugaaagugacuccaggaaacaaacauacugaagacggcccaa
 gguaacaggugauccaggcugccgaucggcuagcaacagcguaucugugcggaauccaccgagagcugguuaggagau
 uaaauugcgguccugcuuccgaacauucauacacuguuugauaugcgcgagaacuuugacgcuauuauagccgag
 cacuuccagccuggggauguguuucuggaacugacaucgcgucguuugauaaaagugaggacgacgccauggcucu

10

20

30

40

50

【化 1 - 15】

gaccgcguuaaугаиucuggaagacuuagguguggacgcagagcuguugacgcugauugaggcgguucggcgaaa
 uuucacuaauacauuugcccacuaaaacuaauuuuuuuuucggagcgcaugaugaaaucuggaauuguccucacacug
 uuugugaaacacagucuaauaacauuguaaucgcaagcagagugugagagaacggcuaacgggaucaccaugugcagc
 auucauuggagauгacaaуaucгугааaggagucaaaucggacaaaуaauggcagacaggugcgccaccugguuga
 auauggaagucagauuuauagugcugugggggcgagaaagcgccuuuuucuguggaggguuuuuuugugugac
 uccгугacccggcacagcgugccгугuggcagacccccuaaaaggcuguuuagcuuggcaaacucuggcagcaga
 cгaугaaсaугaугaугacaggagaaggгcauugcаугaagagucаacacгcuggaaccгaguggguaucuuucag
 agcugugcаaggcагaугaaucаagguaугaaaccгuaгgaacuuuccaуcaуагуuаggccaугacuaсuсaугcu
 agcaguguaaaуcauucagcuaccugagagggggcccuauaacucucuaсggcuaacгauggacuaсгacaua
 gucuaguccgccaagАUGUUUCGUCACACAACCAACGCACUAUGUUUGUUUCCUGUCGUCUCCUUUGGUAAG
UUUCUCAGUGUGUAACUUCACAACACGAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUCAUUUACUCGCGGAGUAUUU
 AUCCCGAUAAGGUCUUUAGAAGUAGCGUGUUGCACUCUACACAGGAUCUGUUCUUGCCCUUCUUUAGUAACGUUACC
 UGGUUUCAUGCAAUACUGUGAGCGGAACAAUUGGAACAAAAGAUUUGCCAAUCCAGUGCUUCCAUUUAAUGAUGG
 GGUUUACUUUGCCAGUACCGAAAAGUCAACAUAAUCCGGGGGUGGAUCUUUGGAACCAUUUGGACUCUAAGACAC
 AGUCUCUCCUCAUAGUAACAACGCCACCAUUGUGUCAUAAAAGUAUGCGAAUUUCAGUUUUGCAACGAUCCCUUU
 CUCGGGGUGUAUUACCAUAAGAAUAAUAAAUCCUGGAUGGAGUCUGAGUUCGGGGUUUAUAGUAGUGCUAAUAAUUG
 CACUUUCGAUACGUGUCCCAACCAUUCUCUAGGACCUUGAGGGCAAACAGGGGAUUUUAAAAACUUGCGCGAAU
 UUGUCUUUAAGAAUACGACGGAUACUUUAAGAUCUAUAGUAAACACACUCCUAUCAACUCGCUUCGGGGCCUUCGCCAA
 GGCUUUUCUGCUCUGCAACCCUCUGUAGACUUGCCAAUUGGGAUAAAUACACUCGCUUCAAACUUGGCAUCAUCAGCUA
 CCUGACACCCGGCGACUCUUUCUUGGUUGGACCGCGCGCGCGCUGCCUAUUAGUUGGUUACCUUCAGCCACGAACAU
 UCUUGCUCAAGUAUACGAGAAUGGCACCAUACCGACGCGCGUGCGAUUGGCAUUGGAUCCCUUGUCUGAAACAAAUGU
 ACCUUGAAGUCCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUUAACGAGACUUCCAACUUCGAGUUCAGCCUACAGAAUCCAUUUGUGAG
 AUUUCCCAACAUCAAAACCUUGCCCUUUCGGUGAAGUAUUUAUAGCUACACGCUUCGCUUCAGUCUAUGCCUGGAUA
 GGAAGCGCAUUAUCAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCUCUAUAAUAGCGCAUCCUUCAGUACUUUACAGUGCUACGGC
 GUUUCCCCCACCAAACUCAAUGAUCUUUGCUUCACCAACGUCUAUGCUGACAGUUUUGUCAUACGAGGCGACGAAGUACG
 CCAGAUUGCCCCCGGGCAGACAGGUAACAUUGCUGAUUAUAAUUAUAAACUCCAGAUACUUUACUGGAUGCGUCAUAG
 CCUGGAUUAUCCAAACAUUCUUGAUUCCAGGUUGGUGGGAAUUAUAAUUAUCCUUUAUCGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUG
 AAACCAUUGAGAGAGACAUUCCACCGAGAUUUACCGGCAGGCAGUACUCCUUGUAACGGCGUUAAGGGAUUUAACUG
 CUUUUUCCUUUGCAAUCCUAUGGCUUUAACCAACAUACGGGGUUGGCUAUCAACCCUAUCGAGUGGUUGUCCUGAGCU
 UUGAACUUUUGCAGCUCCCGCCACAGUCUGCGGACCAAAAAGAGUACAAAUUUUGUCAAGAAUAGUGCGUAAAUUUC
 AAUUUCAUUGGCCUUACAGGAACAGGCGUGCUGACUGAGUCAAAACAAGAUUCCUGCCAUUUCAGCAGUUUGGGCGGGA
 UAUAGCAGACACAACUGACGCGUGUACGCGAUCCUCAGACUUUGGAGAUUUUGGACAUCAUCCUGUUCUUUCGGAGGGG
 UAUUGUCAUACCCCCGGAACUAUUAUCAAUACAGGUCGUGUGUUGUACCAAGGCGUAAACUACAGAGAGUCCCC
 GUUGCUAUACACGCAGACCAGCUCACCCCCACAUGGCGGGUGUACUAAUUGGCUCAAACGUUUAUCCAGACCAGAGCUGG
 GUGCUUGAUUGGUGCUGAACACGUAAACAAUAGCUAUGAAUGCGAUUUCCAUUGGUGCCGGGAUCUGCGCUAGCUAUC
 AGACACAGACCAAUUCCCCCGGCGAGCACGAUCUGUAGCAUCCAGUCUAUUAUUGCCUACACUAUGUCAUUGGGCGUG
 GAGAAUAGCGUCGAUUAUCAAUAAUUCUAUUGCAAUACCCACCAACUUCACAAUUCUCCGUAACUACAGAAAUACUUC
 AGUUUCCAUGACAAAGACAUAGUGGAUUGUACAAUUAUUAUAGCGGAGAUUCCACAGAAUGUCAAUUAUUGCUCUUGC
 AGUACGGCUCUUUCUGCACCCAGCUCACAGGGCCCUACAGGUUAUUGCUGCGAACAGGACAAGAACACACAAGAAGUC
 UUCGCCCAAGUCAACAGAUUAUCAAACUCCUCCCAUAAAGGAUUUUGGCGGCUUACAUUUAGUCAGAUCCUCCAGA

10

20

30

40

50

[illegible]

20

aauagcgcgcgcaugagagaagagccagaccaauuacuuaccccaaaugggagaaaguucacguugacaucagaggaagac
agcccauuccucagagcuuugcagcgagcuucccgaguugagguagaaagccaagcagguucacugauaaugacca
ugcuaaugccagagcguuuucgcaucuggcucaaaacugaucgaaaacggagguggacccauccgacacgauccuug
acaauuggaagugcgcccgcccgagaauguaauucuaagcacaagauacauuguaucuguccgagugagaugugcgga
gauccggacagauuguaaagauugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacuguaaggaaugggacaa
gaaaaugaagggagcuggccgcccugcaugagcgaccugacccuggaacacugagacuaugugccuccacgacgacgagu
cgugucgcuacgaagggcaagucgcuuuuacagggauguaucgoggguagacggacccaagucucuaucaccaa
gccaaauaagggauguagagucgcuacuggaugaggcuuugacaccaccccuuuauguuuaagaacuuuggcuggagc
auauccaucuaucucuaaccaacuggggcgacgaaaacguguuuaacggcucguaaacauaggccuauugcagcucugacg
uuauaggagcggucacguagagggauguccauuccuagaaagaaguaauugaaaccauccaacaauuguucuaauucuc
guuggcucgaccaucuaaccaagagaagagggaauuacugaggagcugggacccugccgucuguaauuacauuacgugg
caagcaaaaauacacaugucggugugagacuaauaguuauugcgacggguacgucguuaaaagaauagcuaucaguc
caggccuguaugggaagccuucaggcuauugcugcuacgaugcaccccgagggauuccuugugcugcaaaugugacagac
acaauugaacggggagaggguucucuuuucccgugugcaguaugugccagcuacauugugugaccaaauagacuggcau
acuggcaacagauucagugcggaacgacgcgcaaaaacugcugguuggggcuacaccagcguaauagucgucaacgguc
gcacccagagaaaacaccaauaccaugaaaaauacuuuugcccguaugggccaggcauuugcuagguggggcaaa

40

【化 1 - 17】

gaauuaaggaagaucaagaagauaaaggccacuaggacuaagagauagacaguuagucaggggugugugggg
 uuuuagaaggcacaagauaacaucuaauuuuaagcgcccggaucaccaaaccuaucaaaagugaacagcgauuucc
 acucauuicgugcugcccggaugagcaguaacacauuggagauccggcgugagaaacagaauaggaaauguuagag
 gagcacaaggagccgucaccucucuuacccgcccagagcguacagaagcuaagugcgagccgaugaggcuaagga
 ggugcgugaagccgaggaugugcgagcucuaaccacuuuggcagcugauguaggagccacucuggaggcag
 acgucgacuugauguuacaagaggcugggggccggcucaguggagacacccugggcuugauaaagguaaccagcuac
 gaugggcaggacaagaucggcucuuacgcugugcuuucccgaggcuguaucuagagugaaaauuuauucugcau
 ccacccucucgugaaacagucaugauaacaacucugggccgaaaaggcguaugccguggaaccuauaccaug
 guaaagugugggccagagggaugcaauuacccguccaggacuuuacagcugagugaaagugccaccauugug
 uacaacgaacgugaguuuguaaacagguuaccugcaccuauuugccacacauaggaggcgugagacacugaugaaga
 auuuuacaaaacuguaagcccgagcagcagcggaauaccuguaagcagacaggaacagugcguaaga
 aagaacugacucugggcuagggcucacaggcgagcugggauccuuccuuccauagaauucgcuacgagagucug
 agaacacgacccgcccucuuaccaaaguccaaccuagggguguaugggcgugccaggauaggcaagucuggcau
 cauuaaaagcgagucaccaaaggaugcugggugagcgccaaagaaagaaaacugugcagaaauuaagggaag
 ucaagaaaauagaaaggcgugagcuaaagccagaaacuguggaucucagugcucuuaggaugcaaacaccccgua
 gagaccuguaauuagcgaagcuuugcuugcagcagguacucucagagcgcuauagccauuaagaccuaa
 aaaggcagugcucugcggggaucacaaacagugcgguuuuuuaacaugaugugccugaaagugcauuuaaccag
 agauuugcacacaagucuuacacaaagcaucucucgcccugugcuaaaucugugacuucggugcucuaaccuug
 uuuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaugugauugacacuaaccggcagaccaaacc
 uagcaggacgucucuuucacuuuguuucagagggggugaagcaguuugcaaaugauuacaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucuaagggcugacccgaaagguguguaugccguucgguaacaggugaaugaaaauccu
 cuguaagcaccaccucagaaacauguaacgucuaagcagccgacggaggacgcaucugugggaaaacacuaagc
 cggcgacccauugauaaaaacacugacugccaaguccggaauuucacugccacgaugaggaguggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagacccgacccuaccgagcucuccagaauaggcaaacgugugu
 ugggccaaggcuuugugccggugcugaagacggcugcauagacacugaaacaauggaacacuguggauua
 uuuugaaaacggacaaagcucacucagcagagauaguuuagaaacaaucuaugcgugagguuucuuugacucgacugg
 acuccggucuaauuucugcaccacacuguuuccguuauccauuaggaauaaucaugggauaacucccgucgcuac
 auguacgggcuagaauaaagagugguuccgucagcucucucgagguacccacaaucgucgaggcaguuugccaugg
 aagagucuaugacaugaacacugguacacugcgcauuuagauccgcgcauaaacuaguaccuguaacagaagac
 ugccuacugcuuuguccaccacauaauagaaacccacagagugacuuuucuucauucgucagcaaaugaaagggc
 agaaucuguccguguguggggaaaaguuuguccgucacaggcaaaagguugacugguugcagaccggccugaggc
 uaccuucagagcucggcuggaauuaggcaucccaggugaugugcccaauaugacauaauuuuguaauugagaggga
 ccccauuaaaauaccuacuaucagcagugugaagaccuagccauuaagcuuagcaugugacaaagaaagcuugu
 cugcaucugaaucccgccggaaccugugcagcauagguuauugguuacgcugacagggccagcgaaagcaucauug
 ugcuaugcgccgaguucaaguuucccgguuugcaaacggaaauccuacuaagagagcggaaguuucuguuug
 uauucauuggguaagcagcaggaagccgucacacauccuuaacagcuuucuaaaccuugaccacauuuuacag
 gguuccagacuccacgaagccggaugugcaccucuaucuaugugugcgagggaauuugccacggccacgaagg
 agugauuaaaaugcugcuaacagcaaaaggaacacccggcgaggggugugcgagcguguaaagaaauuccgg
 aaagcuucgaauuacagccgaucgaaggaagaaagcgagcuggucaaaggugcagcuaaacauuacuucaugcc
 guaggaccaaaccuuaacaaaguuuccggagguuagaggugacaaacaguuggcagaggcuuagaguccaucgcuac

10

20

30

40

50

【化 1 - 18】

gauugucaacgauaacaauuacaagucaguagcgauuccacuguguccaccggcaucuuuuccgggaacaaagauc
 gacuaaccccauauugaaacauuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauauacugcagggac
 aagaaugggaaugacucucaaggaagcaguggcuaggagagaagcaguggaggagauaugcauauccgacgacuc
 uucagugacagaaaccugaugcagagcuggugagggugcauccgaagaguucuuuggcuggaaggaaggcuacagca
 caagcgauaggcaaaacuuucucauauuuggaagggaaccaaguuaccaggcgcccaaggauauagcagaaauuaa
 gccauguggcccgugcaacggaggccaaugagcagguaugcauguaauuccucggagaaagcaugagcaguauuag
 gucgaaaugcccgugcaagagucgggaagccuccacaccaccuagcacgcugccuugcuugugcauccaugccauga
 cuccagaagagauacagcgccuaaaagccucacgcuccagaacaaauuacugugugcucacccuuuccauugccgaag
 uauagaauacugugugcagaagaauccaugcuccagccuauauuugucucacccgaaagugccugcguaauuua
 uccaagggaugauucuguggaacacccacccguagacgagacuccggagccaucggcagagaaaccauccacagagg
 ggacaccugaacaaaccacccuauuaacccgaggaugagaccaggacuaagacgcugagccgaucacucgaagag
 gaagaagaggauagcauaaguuugcugucagauaggcccgacccacccaggugcugcaagucgaggcagacauuacagg
 gccgcccucuguaucucagcucacccuguccauuccucaugcauccgacuuugauguggacaguuuauccauacuug
 aaccccgaggaggagcugagcugacagcggggcaacgucagccgagacuaacucuaucucgcaagagauaggag
 uuuucggcgcgacccggugccugcgccucgaacagauuucagggaacccuccacaucccgucggcgcaagaacacc
 gucacuugcaccacagcagggccugcugcagaaaccagccuaguuuccaccccgccaggcgugaauaggguagacua
 gagaggagcucgagggcguaaccccgucacgcacuccuagcaggucggucgagaaaccagccugucuccaaccgg
 ccaggcguaauuaggguaguuacaagagaggaguuugagggcuucguagcacaacaacagacgguuugaugcggg
 ugcauacacuuuucccgacacccggucaagggaauuuaacaaaaucagaaaggcaaacggugcuauccgaag
 ugguguuaggagaggacccaauuggagauuucguugcccgcgccugaccaagaaaaagaagaauuacucgcaag
 aauuacaguuuaauccacaccugcuaacagaagcagauaccaguccagggaaggugagaaacagaaagccauaac
 agcuagacguaauucugcaaggccuagggcauuauuugaaggcagaaggaaaaguggagugcuaaccgaacccugcuc
 cuguuccuuuguaucacuaugugaaaccgugccuuuucagcccaaggucgaguggaagccuguaacgccaug
 uugaaagagaacuuuccgacuguggcuuuucuguaauuuccagagucgaugccuauuuggacaugguuagcgg
 agcuuacugcugcuuagacacugccaguuuuugcccgcaaacgucgagcuuuccaaagaaacacuccuauuugg
 aaccacaaauacgaucggcagugccuucagcgauccagaacacgcuccagaaacgucggcagcugccacaaaaga
 aauugcaaugucacgcaauagagagaauugcccguauggauucggcgccuuuauguggaauugcuuacagaaaua
 ugcguguaauaauagaauuugggaacguuuuaagaaaaccccaucaggcuuacugaagaaaacgugguaauuaca
 uuacaaaauuaaaggacaaaagcugcugcucuuuugcgagacacauaaauugaauuugucaggacauacca
 auggacagguuuguaauaggacuuuaagagagacgugaagugacuccagggaacaaaacauacugaagaaacggcccaa
 gguacaggugauccaggcugccgaucggcuagcaacagcguaucugugcggaauccaccgagagcugguagggagau
 uaaauugcgguccugcuccgaacauuacuaacuguuugauaugucggcugaagacuuugacgcuauuauagccgag
 cacuuccagccuggggaauugugucuggaacugacaucgcugcuguuugauaaaagugaggacgacgccauggcucu
 gaccgcuuaaugaucuggaagacuuaggugggacgcagagcuguuagcgcugauugaggcgguuccggcgaaa
 uuucacuaauacauuugcccauuaaaacuaauuuuuuucggagccauagaugaaucuggaauuguccacacug
 uuugugaacacagucuaauaacauuguaaucgaagcagagugugagagaacggcuuacccggauacccaugugcagc
 auucauuggagagacaaauacugugaaggagucuuuacggacaaauuauggcagacaggugcgccaccugguuga
 auuagggaugcaagauuauagugcugugggggcgagaaagcgccuauuucugugggagguuuuuuugugugac
 uccgugaacgggacagcgugccgugggcagaccccccuaaaaggcguuuuagcuuggcaaacucugggcagcaga
 cgaugaaacagauaugacaggagaagggaauugcaugaagagucacacgcuggaaccgaguggguauucuuucag

10

20

30

40

50

【化 1 - 19】

agcugugcaaggcaguagaaucaagguaugaaaccguaggaacuuccaucauaguuaggccaugacuacucugcu
agcaguguaaaaucauucagcuaccugagaggggccccuauaacucucucacggcuaaccugaauggacuacgcacua
gucuaugccgccaag**AUGUUUCUGCUCACAACCAAACGCACUAUGUUUGUUUUCCUCGUGCUGCUCUUUGGUAAG**
UUCUCAGUGUGUAAACUGACAACACGAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUCAUUACUCGCGGAGUAUUA
AUCCCCGAUAAGGUCUUUAGAAGUAGCGUGUUGCACUCUACACAGGAUCUGUUCUUGCCCUUUCUUAGUAACGUUACC
UGGUUUCAUGCAAUAAGCGGAACAAUGGAACAAAAGAUUUGACAAUCCAGUGCUUCCAUUUAUUGAUGGGGUUA
CUUUGCCAGUACCGAAAAGUCAAAAUAAUCCGGGGUGGAUCUUUGGAACCACUUUGGACUCUAGACACAGUCUC
UCCUCAUAGUAAACAACGCCACCAUUGUUGUCAUAAAAGUAUGCGAAUUUCAGUUUUGCAACGAUCCCUUUCGCGG
GUGUACCAUAAGAUAUAAAUUCCUGGAUGGAGUCUGAGUUCGGGUUAUAGUAGUGCUAAUAUUGCACUUUCGA
AUACGUGUCCCAACCAUUCUUGGACCUUGAGGGCAAACAGGGGAUUUUAAAACUUGCGCGAAUUUGUCUUUA
AGAAUAUCGACGGAUACUUUAGAUCAUAGUAAACACACUCCUAUACACCUCGUUCGGGAUCUCCCCAAGGCUUU
UCUGCUCUCGAACCCUCGUAGACUUGCCAAUUGGGAUAAAUACACUCGCUUCAAACUUUGCUUGCCCUCCACAG
GAGCUACCUGACACCCGGCGACUCUUCUUGGUUGGACCGCGCGCGCGUGCCUAUUAUGUUGGUUACCUUCAGC
CACGAACAUCUUGCUCAAGUAUACGAGAAUGGCACCAUUAACCGACGCGUGCAUUGUGCAUUGGAUCCCUUGUCU
GAAACAAAUGUACCUUGAAGUCCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUAUACAGACUCCAACUUCGAGUUCAGCCUAC
AGAAUCCAUGUGAGAUUUCCCAACUACAAACCUUGCCCUUUCGGUGAAGUAUUUAUGCUACACGCUUCGCUU
CAGUCUAUGCCUGGAUAGGAAGCGCAUAUCAAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCUUAUAAUAGCGCAUCCUUC
AGUACUUUCAAGUGCUACGGCGUUUCCCCACCAAACUCAUAGAUUUUGCUUACCAACGUCUAGCUGACAGUUU
UGUCAUACGAGGCGACGAAGUACGCCAGAUUGCCCCGGGCAGACAGGUAAAAUUGCUGAUUAUAAUUAUAAACUCC
CAGAUGACUUUACUGGAGCGUCAUAGCCUGGAAUUCACAAUCUUGAUUCCAAGGUUGGUGGGAUUUAUAAUAC
CUUUUACGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUGAAACCAUUGAGAGAGACAUUACCCGAGAUUUACAGGCAGGCAG
UACUCCUUGUAACGGCGUUGAGGGAUUUACUGCUAUUUUCCUUGCAAUCCUAUGGCUUUAACCAACAUACGGGG
UUGGCUAUAACCCUAUCGAGUGGUUGUCCUGAGCUUUGAACUUUUGCACGCUCCCGCCACAGUCUGCGGACCAAAA
AAGAGUACAAAUCUUGUCAAGAAUAGUGCGUAAAUUCAAUUAUUGGCCUUAACAGGAACAGGCGUGGUGACUGA
GUCAAACAAGAAGUUCUGCCAUUUAGCAGUUUGGGCGGGUAUAGACGACACAACUGACGCUUACGCGAUCCUC
AGACUUUGGAGAUUUUGGACAUACUCCUGUUCUUUGGAGGGGUUUCUGUCAUACCCCCGGAACUAUUAUCA
AAUCAGGUCGUGUGUUAACCAAGGCGUACUUGCAGAGAAGUCCCCGUUGCUAUACACGCAUACAGCUCACCCC
CACAUGGCGGGUGUACUACUGGCUCAAACGUUUCAGACCAGAGCUGGGUGCUUGAUCGGUGCUGAACACGUAA
ACAAUAGCUAUGAAUGCGAUUUCUCCAUCCGGUGCCGGGUAUCUGCGCUAGCUAUCAGACACAGACCAAUUCCCAUCCG
CGAGCACGAUCUGUAGCAUCCAGUCUAUUUAUUGCCUACACUAUGUCAUUGGGCGCCGAGAAUAGCGUCGCAUUAUC
AAUAAUUCUAUUGCAAUACCCAUCAACUUCACAACUCCGUAAACUACAGAAUACUUCAGUUUCCAUAGCAAAGA
CAUCAGUGGAUUGUACAAUGUAUUAUUGCGGAGAUUCCACAGAAGUUCAAAUUGCUUUGCAGUACGGCUCCUUC
UGCACCCAGCUCAACAGGGCCCUUACAGGUUUGCUGCGAACAGGACAAGAACACACAAGAGUCUUCGCCCAAGU
CAAACAGAUUAACAAAACUCCUCCAUAAAGGAUUUUGGGCGCUUACCUUUAUGCAGAUCCUCCAGACCCUUCAA
AACCAUCUAAACGAUCAUUAUUGAAGAUUCGUGUUAACAAGGUCACUCUUGCCGAUGCUGGAUUCAUUAAGCAA
UACGGUGACUGCCUUGGUAUUAUGCUGCCGAGAUUGAUCUGUGCCAGAAUUAACGGGUCACUGUACUCCC
UCCACUGCUCACAGACGAAUUGAUUGCAGUACACAAGUGCCUGUUGGCAGGCACAAUCACUAGCGGUGGACCU
UUGGCGCAGGUGCAGCACUCCAAUACCUUUUGCCAUGCAGAUUGCCUAUCGGUUUAUUGGGAUAGGCGUGACUAA
AAUGUCCUCUACGAAAACCAAAGUUGAUAGCUAACCAUUAUUAUAGCAUUCGGGAAGAUACAGGAUUCACUGUC
UAGUACUGCUAGUCCCUUGGUAAGCUGCAGGACGUUGUCAACCAGAAUGCUAAGCUCUGAAUACAUUGGUUAAGC

10

20

30

40

50

[illegible]

20

aauaggcgccgaugagagaagccagaccaaauaacuacccaaaugggagaaaguuacguuagcaucagcggaagac
agcccauuccucagagcuuugcagcgagcuucccgaguuugagguagaagccaagcaggucacugauaaugacca
ugcuauugccagagcguuuucgcaucuggcucaaaacugaucgaaacggagguggacccauccgacacgauccuug
acaauuggaagugcgcccgcccgagaauguaauucuaagcacaagauaucuuguaucuguccgaugagauugcgga
gauccggacagauuguaaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaaacuguaaaggaaauuggacaa
gaaaaugaaggagcuggccgcccugcaugagcgacccugaccuggaaaacugagacuaugugccuccacgacgacgagu
cgugucgcuacgaaggggcaagucgcuguuuaacaggauuaaaccggguagacggacccgaacagucucuaucacca
gccaauaaggaguuagagucgcccuaucuggauaggcuuugacaccacccuuuauguuuaagaaauuggcgaggc
auauccaucauacucuaaccaacuggggcgacgaaaacguguaaaccggcucguaaacauaggccuauagcagcucugacg
uuauuggagcgguacgagaggggauguccauuccuuagaaagaagauuuugaaaccauccaacaauguucuaauucuc
guuggcucgaccaucuaaccacgagaagagggaauuacugaggagcugggcaaccugccgucuguaauuucacuuacuggg
caagcaaaaauacacaugucggugugagacuaaguuaguugcgacggguacgucguuaaaagaaugcuauacaguc
caggccuguaugggaagccuucaggcuauugcugcuacgaugcacccgaggggaauucuuugugcugcaaagugacagac
acaauugaaccggggagaggguucuuucccgugugcacgnaugugccagcuacaauugugugaccaaaugaucuggcau
acugccacacagauugcagugcggaacgacgcgcaaaaaacugguugggcucaaccagcguaugucgucaaccgguc
gcacccagagaaaacccaauaccaugaaaaauaccuuuugcccguaguggcccaggcauuugcuagguggggcaaag
gaaauuaaggagaucaagaagaugaaaggccacuaggacuacgagauagacaguuagucauggggguguguuugggc
uuuuagaaggcaagaauaacuauuuuuuaaggcccggaucaccaaaccaucaucaaaagugaaacagcgauuucc
acucauucgugcugcccaggauaggcgauaacacauugggagaucggggcugagaaacaagaaucaggaaaauuuagag
gagcacaaggagccgucaccucucauuaccgcccaggagcguacaagaagcuaagugcgacgcccgaugagggcuaagga
ggugcgugaagccgaggaguugcgcgagcucuaaccaccuuuggcagcugauguuagaggagcccacucuggaggcag
acgucgaauugauuuuaaagagggcuggggcgccgucaguggagacaccucgugccuuguaaaagguuaaccagcua

40

【化 1 - 2 1】

gauggcgaggacaagauccggcucuuacgcugugcuuucuccgcaggcuguaucucaagagugaaaauuuauucugcau
 ccaccucucgcuguaacaagucuauguguaacacacucugccgaaaaggcgguuagccguggaaccuauaccaug
 guaaagugagugggccagagggaucagcaauacccguccagggaucuucaagcucugagugaaagugccaccauugug
 uacaacgaaacgugagucguaaaacagguaccugcaccuauuugccacacauggaggagcgugaaacugaugaaga
 auuuuacaaaacuguaagcccgagcgagcagcagcggaauaccuguaagcaucgacaggaaacagugcguaaga
 aagaacuaugucacugggcuaggcucacagcgagcuggggaucuccuuccauugaauucgcuacgagagucug
 agaacacgaccagccgucuccuuaaccaaguaccacauagggguguauggcgugccaggauccaggcaagucuggcau
 cauuaaaagcgagucacccaaaaagaucaugggugagcgccaagaaagaaaaucugugcagaaauuaaagggacg
 ucaagaaaauagaaaggcgugacgucuaugccagaaucuguggaucucagugcucugaauggaugcaaacaccccgua
 gagaccuguaauuagcgaagcuuuugcuugucagcagguaucucucagagcgucuaugccauuaaagaccuaa
 aaaggcagugcucugcggggaucaccaacagugcgguuuuuuaacaugaugugccugaaagugcauuuaaccacg
 agauuugcacacaagucuuaccacaaaagcaucucucgcccugugcacuaaauucugugacuucggucgucuaaccuug
 uuuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaauugugauugacacuaaccggcagacccaaacc
 uagcaggacgucucuaucucacuuuguuucagagggggugaagcaguugcaaaugauuaacaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucuaagggcgagaccgaaaagguguguaugccgucgguaacaaggugaauagaaaauccu
 cuguaacgacccccaccagaaacaugugaacgucuaacgacccgacagggagacgcaucugugggaaaacacuagc
 cggcgacccauuguaaaaaacacugacugccaaagacccugggaaauuacugccacgaugaggagugggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuggagagaccggaccuaccgacgucuuaccagaauaaggcaaacgugugu
 ugggccaaaggcuuagugccggugcugaagaccguggaugacauagaccacugaacaauggaacacuguggauua
 uuuugaaaacggacaaagcucacucagcagagauaguauugaaaccauauugcgugagguuucuuuggacucgcaucug
 acuccggucuaauuucugacccccuguuuccguuauccauuaggaauaaucaucgggaaacuccccgucgcuuac
 auguacgggcuagaauaagaaagugguccgucagcucucucgagguacccacaaucgcccgggcaguugccaucgg
 aagagucuaugacaugaacacugguacacugcgcauuuagauccgcgcauaaaccuaguaccuguaaacagaagac
 ugccuacugcuuaguccuccaccuauaagaacacccacagagugacuuuucuucauucgucagcaaaugaaagggc
 agaaucuguccggugugcggggaaaaguuuguccgucacaggcaaaaugguugacugguugucagaccggccugaggc
 uaccuucagagcucggcuggaauuaggcaucccaggugaugugcccaauaugacauaauuuuguaauugugagga
 ccccauuaauaaccuacacuaucagcagugugaagaccuagccauuaagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu
 cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauagguuauugguuacgucgacagggccagcgaaagcaucauug
 ugcuaugcgcggcaguucaaguuucccgguuugcaaacggaaauccuacacuaagagacggaaugucuguuug
 uauucauuggguaacgaucgcaaggcccguaacgacacaaucuuacaagcuuucacuaaccuugaccaacauuuuaca
 gguuccagacuccacgaagcccgauugcaccucuaucuaugugugcgaggggauuugccacggccaccgaagg
 agugauuaauaaugcugcuaacagcaaaaggacaaccuggcgaggggugugcgagcguguaaagaaauuccgg
 aaagcuucgaauuacagccgaucgaaggaagaaagcgagcuggucaaaggugcagcuaaacauaaucauugcc
 guaggaccaaaccuuaacaaaguuucggaggguugaaggugacaaacaguuggcagaggcuuauagaguccaucgcu
 gauugucaacgaaacaaauacaagucagagcgauuccacuguuuccacggcaucuuuuccgggaacaaagauc
 gacuaaccccauauuagaaacauuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauauacugcagggac
 aagaaaugggaaugacucucuaaggaagcaguggcuaaggagagaagcagugggagauaugcauauccgacgacuc
 uucagugacagaaaccuagucagagcugguagggugcauccgaagaguucuuugcggaagggaaggcuacagca
 caagcgauggcaaaaauuucuaauuuggaagggaaccaaguuuacacaggcgccaaaggauuagcagaaauua
 gccauugggcccgugcaacggaggccaaugagcagguaugcauguaauuccucggagaaagcaugagcaguauuag

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 2】

gucgaaaugccccgucgaagagucggaagccuccacaccaccuagcacgcugccuugcuugugcauccaugccauga
 cuccagaaagaguacagcgccuaaaagccuacgcuccagaacaaaucugugugcucuccuuccauugccgaag
 uauagaauacucggugugcagaagaauccauugcuccagccuauuuugucucacccgaaagugccugcguaauuca
 uccaaggaagauucuguggaacacccagguagacgagacucggagccaucggcagagaaccauuccacagagg
 ggacaccugaacaaccaccauuuaaaccgaggaugagaccaggacuagaacgcugagccgaucaucuaggaagag
 gaagaagaggauagcauaguuugcugucagauggcccgaccaccaggugcugcaagucgaggcagacauuacgg
 gccgccucuguaucucagcucuccuguccauuccuauugcaucccgacuuugauguggacaguuuuccauuacug
 aacccugggaggagcugagcugacccagcgggcaacgucagccgagacuaacucuaucucgcaaagaguauaggag
 uuuugggcgagccggugccugcgccucgaaacaguuucaggaaaccuccacaucccgucggcgacaaagacacc
 gucacuugcaccagcagggccugcugcagaaaccagccuaguuuccaccccgccaggcgugaaugggugaucaua
 gagaggagcucgaggcgcuuaccccgucacgcacuccuagcaggucggucugcagaaaccagccugucuccaaccgg
 ccaggcguaauaugggugauuacaagagaggaguuugaggcgucguagcacaacaauagacggguugaugcggg
 ugcuaucacuuuucccgacacccggucaaggggcauuuaacaaaaucaguaaggcaaacggugcuaucggaag
 ugguguugggagaggaccgaauuggagauuucguuugccccgcgcucgaccaagaaaaagaaauuacucgcaag
 aauuacaguuuaauccacacccugcuaacagaagcagauaccaguccaggaaggugggagaaacagaaagccauaac
 agcuagacguaauucgcaaggccuagggcauuuugaaggcagaaggaaaaguggagugcuaaccgaaccugcauc
 cuguuccuuguaaucaucagugugaaaccgugccuuuucagcccaaggucgaguggaagccuguaacgccaug
 uugaaagagaacuuuccgacuguggcuuuucuguaauuuccagagucgaugccuauuuggacauugguagcgg
 agcuuacugcugcuuagacacugccaguuuuugcccgcaaacgucgagcuuuccaaagaaacacuccuauuugg
 aaccacacauacgaucggcagugccuucagcgauccagaacacgcuccagaaacgucuccgagcugccacaaaaga
 aauugcaaugucacgcaaaugagagaaauugcccguauggauucggcgccuuuauguggaaugcucaagaaaua
 ugcguguaauaauagaauuugggaaacguuuuaagaaaaaccccaucaggcuuacugaagaaaacgugguaauuaca
 uuaccaaaauaaaggaccaaaagcugcugcucuuuuugcgagacacauaauuugaaugugcaggacauacca
 auggacagguuuguaauggacuuuaagagagacgugaaagugacuccagggaacaaaacauacugaagaacggcccaa
 gguacaggugauccaggcugccgaucggcuagcaacagcguaucugugcggaauccaccgagagcugguuaggagau
 uaaaugcgguccugcuuccgaacauuacacuguuugauugucggcugaagacuuugacgcuauuauagccgag
 cacuuccagccuggggauguguuucggaacugacaucgcgucguuuugauaaaagugaggacgacgccauggcucu
 gaccgcuuaaugaucuggaagacuuaaggugugagcgcagagcugugacgcugauugaggcgguucggcgaaa
 uuucaucaauacauuugcccauuuaaauuuuuuuuucggagccauugaaucuggaauguuuccacacug
 uuuuguaacacagucuuuaacauuguaauccgaagcagagugugagagaacggcuuaacggauacccaugugcagc
 auucauugggagagacaauaucgugaaggagucuaauccggacaaaauuauuggcagacaggugcgccaccugguuga
 auuaggaaugcaagauuauagugcugggugggcgagaaagcgccuauuucugugggagguuuuuuugugugac
 uccgugacccggcacagcgugccgugugcgagaccccuaaaaaggcuguuuuagcuuggcaaacucugggcagcaga
 cgauaacaugaugagacaggagaagggaauugcaugaagagucacacgcuggaaccgagugguauucuuucag
 agcugugcaaggcagugaaucagguuagaaaccguaggaaucuccauuaguuuaggccaugacuaucucagcu
 agcaguguaaaaaucuuacagcuaaccugagaggggccccuuaacucucuaacggcuuaaccugaauggacuacgacaua
 gucuaguccgccaag**AUGUUUCUGUCACAAACCAACGCACUAUGUUUGUUUCCUCGUGCUGCUCUUUUUGGUAAG**
UUCUCAGUGUGUAAACCUGAGAAACAGAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUCAUUUACUCGCGGAGUAUUU
AUCCCAGUAAGGUCUUUAGAAGUAGCGUUGCACUCUACACAGGAUCUGUUUCUUGCCCUUCUUUAGUAACGUUACC
UGGUUUC AUGCAAUACAUGUGAGCGGAACAAUUGGAACAAAAGAUUU GACAAUCCAGUGCUUCCAUUUAUGAUGG

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 3】

GGUUUACUUUGCCAGUAUCGAAAAGUCAAAACAUAUCCGGGGGUGGAUCUUUGGAACCACUUUGGACUCUAAGACAC
AGUCUCUCCUCAUAGUAAACAACGCCACCAUUGUUGUCAUAAAAGUAUGCGAAUUUCAGUUUUGCAACGAUCCCUUU
CUCGACGUGUAUUACCAUAAGAAUAUAAUCCUGGAUGGAGUCUGGGGUUUUAJAGUAGUGCUAAUAAUUGCACUUU
CGAAUACGUGUCCCAACCAUUCUUGGACCUUGAGGGCAAACAGGGGAUUUUAAAAACUUGCGCGAAUUUGUCU
UUAAGAAUAUCGACGGAUACUUUAAGAUUAJAGUAAACACUCCUAUCAACCUCGUUCGGGAUCUCCCCAAGGC
UUUUCUGCUCUCGAACCCUCGUAGACUUGCCAAUUGGGAAUAAUACACUCGCUUCAAACUUUGCUUGCCCUCCA
CAGGAGCUACCUAGACCCCGGCGACUUCUUCUGGUUUGACCGCCGGCGCCGUGCCUAUUUGUUGGUUACCUUC
AGCCACGAACAUUCUUGCUCAAGUAUAACGAGAAUGGCACCAUUAACCGACGCCGUGCAUUGGCAUUGGAUCCCUUG
UCUGAAACAAAAGUACCUUGAAGUCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUAUACAGACUUCCAACUUCGAGUUCAGCC
UACAGAAUCCAUCGUACGAUUUCCCAACAUACAACCCUCUGCCCUUUCGGUGAAGUAUUAAUGCUACACGCUUCG
CUUCAGUCUAUUGCCUGGAUAGGAAGCGCAUAUCAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCCUAAUAAUAGCGCAUCC
UUCAGUACUUUACAGUCUACGGCGUUUCCCCACCAAACUCAAUGAUCUUUGCUUCACCAACGUCUAGUCUGACAG
UUUUGUCAUACGAGGCGACGAAGUACGCCAGAUUGCCCCGGGCGAGACAGGUAAUUGCUGAUUAAUUAUAAAC
UCCCAAGUACUUUACUGGAUGCGUCAUAGCCUGGAUUAUCAAACUUAAGAUUCCAGGUUGGUGGGAUUAUAAU
UACCGUUAUGGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUGAAACCAUUAUGAGAGACAUUCCACCGAGAUUACCGGCGAGG
CAGUAAGCCUUUAACGGCGUUGAGGGAUUUAACUGCUAUUUUCCUUGCAAUCCUAUGGCUUUAACCAACAAACG
GGGUUGGCUAUCAACCCUAUCGAGUGGUUGUCCUCAGCUUUGAACUUUUGCACGCUCCCGCCACAGUCUGCGGACCA
AAAAAGAGUACAAUUCUUGUCAAGAAUAAGUGCGUAAUUAUCAAUUUCAAUGGCCUUAACAGGAACAGGCGUGCUGAC
UGAGUCAAAACAAGAAUUCUGCCAUUUCAGCAGUUGGGCGGGAUUAAGCAGACACAACUAGCGUGUACGCGAUC
CUCAGACUUGGAGAUUCUUGGACAUACUCCCUUGUUCUUCGGAGGGGAUUCUGUCAUACCCCCGGAACUAAUACA
UCAAAUCAGGUCGUGUGUUGUACCAAGGUGUACAUCGCACAGAAGUCCCCGUUGCUAUACACGCGAGACCAGCUCAC
CCCCACUUGGCGGGUGUACUCAAUGGCUCAAACGUUAUCCAGACCAGAGCUGGGUGCUUAGUACGGUGCUGAACACG
UGAACAAUAGCUAUGAAUGCGAUUAUCCAUUGGUGCCGGGAUCUGCGCUAGCUAUACAGACACAGACCAAUUCCCGC
AGGCGGGCUCGCUUGAGCAUCCAGUCUAUUAUUGCCUACAUUGUCAUUGGGCGCGAGAAUAGCGUCGCAUA
UUCAAUAAUUCUAUUGCAUUAUCCACCAACUUCACAAUUCUCCGUAAUACAGAAUACUUCAGUUCUCCAGACAA
AGACAUACUGGAUUGUACAAUUAUUAUGCGGAGAUUCCACAGAAUGUCAAUUAUUGCUUUGCAGUACGGCUCC
UUCUGCACCCAGCUCACAGGGCACUUAACAGGUUAUUGCUGCGAACAGGACAAGAACAACAAGAAGUCUUCGCCCCA
AGUCAACAGAUUAUACAAACUCCUCCAUAAAGGAUUUUGGGGCUUCAAUUAUAGUCAGAUCCUCCAGACCCUU
CAAAACCAUCUAAACGAUCAUUAUUGAAGAUUCGUGUUAACAAGGUCACUCUUGCCGAUGCUGGAUUAUUAAG
CAAUACGGUGACUGCCUUGGUUAUUGCUGCCCGAGAUUCUGAUCUGGCCAGAAUUAACGGGCUACUGUACU
CCCUCCACUGCUCACAGACGAAUAGAUUGCAGUACACAAGUGCCCUUGUUGGCAGGCACAAUACUAGCGGCUUGGA
CCUUUGGGCGAGGUGCAGCACUCCAAUUAUCCUUGGCAUGCAGAUUGGCCUUAUUGGUUAUUGGGAUAGGCGUGACU
CAAAUUGUCCUACGAAAACCAAAAGUUGAUAGCUAACCAUUAUUAUUCAGCAUUCGGGAAGAUACAGGAUUCACU
GUCUAGUACUGCUAGUGCCCUUGGUAAAGCUGCAGAAGCUUUAACCAAGAUUGCUCAAGCUCUGAAUACAUUGGUUA
AGCAGCUCUCUAGUAAUUAUUGGGGCCAUUCUUCAGUACUUAUUAUUAUUGAGCCGAUUGGACCCACCUGAAGCU
GAAGUACAGAUUCGACAGGCGUAUACAGGCGGCUCCAUUCCUCAAACUACGUGACACAACAACUUAUACGCGC
AGCCGAAUCCGAGCCAGCGCUAACCGGCGUACCAAGAUUGCAGAAUGCGUUCUGGGCCAGAGUAAACGCGUAG
AUUUCUGCGGGAAGGGUACCAACCUUGAUGUCCUUUCCACAAUUGCACCUCACGGGGUGCUUUUUGCAUGUAACA
UACGUACCCGCAAGAGAAGAAUUAUACCGCUCUCCUGCCAUCUGUCAUGACGGGAAGCUCAUUAUCCUGCGGA
AGGUGUGUUGUAUCUAAUGGUACACAUUGGUUUGUCACACAGCGGAUUUCUUAUGAACCCAGAUCAUUAACAACUG

10

20

30

40

50

[illegible]

10

aaggcgcggcgcaugagagaagcccgagaccauuaccuacccaaaugggagaaagucacguugacacugcagggaagac
agcccauucccagagcguuugcagcggagcuucccgaguuugagguagaagccaagcaggucacugauaaugacca
ugcuaaugccagagcguuuuucgcaucuggcucaaaacugaucgaaacggagguggacccauccgacacgauccuug
acaauuggaagugcgcgcccgcgagaauguaauucuaagcacaaguancauuguaucuguccgaugagauugugcggaa
gauccgggacagauuguaaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacuguaaaggaaauuggaca
gaaaaaugaaggagcugggccgcccugcaugagcgcaccugacccuggaaacugagacuaugugccuccacgacgacgagu
cgugucgcuacgaagggcaagucgcguguuaacagggauguaacgcggguagcggaccgacaagucucuaucaccaa
gccaauaagggauguuagagucgccuacuggauaggcuuugacaccacccuuuauguuuuagaaacuuggcuggagc
auauccaucuaucucuaaccaacuggggccgacgaaaccguguuaacgcgcuguaacauaggccuauagcagcucugacg
uuauaggagcggucacguagagggauguccauucuuagaaaagaaguuuugaaaccaucaacaanguucuaauucucu
guuggcugcagcaucuaaccacgagaagagggaauuacugaggagcugggaccugccgucguauuuacacuuacgugg
caagcaaaaauacauugucggugugagacuaauaguuaguuugcgacggguacgucguuaaaagaaugcuauacaguc
caggccguauugggaagccuucaggcuaugcugcuacgaugcaccgcgagggauucuuugucugcaagugacagac
acauugaaacggggagaggguucucuuuucccgugugcacguauugccagcuacauugugugacaaaugaucggcau
acuggcaacagauugcagugcggacgacgcgcaaaaacugcugguugggcuaaccagcguaauagucguacacgguc
gcacccgagagaaacaccaauaccaugaaaaauaccuuuugcccguaugggccaggcauuugcuaggugggcgaag
gaauuaaagggaugaucaagaagauagaaaggccacuaggacuaacgagauagacaguuaugcaugggguguuugggc
uuuuagaaggcacaagauaacaucuaauuuuaagcgcccggaucaccaaaccaucaucaaaagugaaacagcgauuucc
acucauucgugcugcccaggauaggcaguaacacauuggagaucggggcugagaaacaagaaucaggaaauguuagag
gagcacaaggagccgucaccucucuaauaccgcccaggagcguacaagaagcuaagugcgcagccgaugaggcuaaagga
ggugcguagaagccgaggaguuugcgcgcgacucuaaccacuuuggcagcugauguuaggagcccaucucggaggcag
acgucgacuugauguuaacaagggcugggggccggcucaguggagacaccucguggcuuguaaaagguuaccagcuac
gauggcgaggaacgaugcggcucuuacgcugugcuuucccggaaggcuguaucuacaagagugaaaaauuacuuugcau
ccaccucucgcugaaacaagucuaugugauaacaacucucggccgaaaaggggcuuauugccaguggaaccuauaccaug
guaaaagauugugccagaggggacaugcaauacccguccaggacuuucaagcucugagugaaagugccaccuauugug
uacaacgaacgugagauucguaaacagguaaccugcaccuauuugccacacauaggaggagcgcugaaacugaugaaaga
auuuuacaaaaacugucaagcccgcgagcagcagcggcgaaauaccguacgacauccgacaggaaacagugcguaaga
aagaaacuagucacugggcgagggcucacagggcgagcugggggaucuccccuuccaagaauucgccuacgagagucuc

20

30

40

【化 1 - 2 5】

agaacacgaccagccgcuccuuaaccaaguaccaaccuagggguguauggcgugccagggaucaggcaagucuggcau
 cauuaaaagcgagucacccaaaaagaucuaguggugagcgccaagaaagaaaacugugcagaaauuaaggagcg
 ucaagaaaauagaaaggcgaggacgucacauugccagaacuguggaucucagugcucuuaggaugcaaacaccccgua
 gagaccuguaauuagacgaagcuuuugcuugucagucagguaucucucagagcgucacauagccauuaagaccuaa
 aaaggcagugcucugcggggaucacaaaacagugcgguuuuuuaacauagugugccugaaagugcauuuaaccacg
 agauuugcacacaagucuccacaaaagcaucucucgcccguugcacuaaauugugacuucggucgucucaaccuug
 uuuuacgacaaaaaaugagaacgacgaauccgaaagagacuaagaauugauugacacuaaccggcagucacaaacc
 uagcaggagcgaucucacuuucacuuuugucagagggggugaagcaguuugcaaaugauuaacaaaggcaacgaaa
 uaaugacggcagcugccucuaagggcgagaccguaaagguguguaugccguucgguaacaggugaauagaaaauccu
 cuguacgcacccaccucagaaacaugugaacgucucacugacccgcacggaggacccgcaucguguggaaaacacucagc
 cggcgacccauagguaaaaaacacugacugccaaagaccuggggaauuucacugccacgauagaggaguggcaagcag
 agcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagagaccggaccuaccgacgucuccagaauaaggcaaacgugugu
 uggggcaaggcuuagugccggugcugaagaccgugcgaugacacugaccacugaacaauggaacaacuguggauua
 uuuugaaaacggacaaagcucacucagcagagauagauuugaaccaacuaugcgugagguucuuuggacucgaucug
 acuccggucuaauuucugcaccacuguccguuauccauuaggaaauaauacuggggaauacucccgucgcuuac
 auguacgggucgaauaaagaugggucgucagcucucgcagguacccacaaacugccucgggagugccacugg
 aagagucuaugacauagaacacugguacacugcgcaauuagauccgcgcauaaaacuaagaccuguaaaacagaagac
 ugccuacugcuuaguccuccaccuaaagaacacccacagagugacuuuucuucauucgucagcaauugaagggc
 agaaacuguccgggugugcggggaaaauguguccguccaggcaaaaugguugacugguugucagaccggccugaggc
 uaccuucagagcucggcguggaauuaggcaucccaggugaugugcccaauaugacauaauuuuguaauugagagga
 ccccauuaauaaucaucauacagcagugugaagaccaguccauuaagcuuagcauguugaccaagaaagcuugu
 cugcaucugaaucccgcggaaccugugucagcauagguaugguuacgcugacagggccagcgaaagcaucauugg
 ugcuaugcgcgcgaguucaaguuuuccgguaugcaaacggaaaucucacuuagaagagacggaagucuguuug
 uauucauuggguacgaucgcaaggcccguaacgcacaauccuuaacagcuuucacuaaccuugaccaacauuuuacaggu
 uccagacuccacgaagccggauugucacccuacauuacauugggugcgagggggaauuugccacggccaccgaaggagugau
 uauaaaugcugcuaacagcaaaaggacaaccugcgagggggugugcgagcguguaaagaaauucccgaaagcuucg
 auuuacagccgaucgaagaggaagcgcgacuggucaaaaggugcagcuaaacauuacauuacugccgaggaaccaac
 uucaacaaaguuucggagguugaaggugacaaacaguuaggcagaggcuuagaguccaagcuuagcaacgaa
 cauuacaagucagucagcgaauccacuguguccaccggcaucuuuuccgggaacaagaucgacuaaccacaucauga
 accauuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauuacugcagggaacaagaaugggaaugacucuc
 aagggaagcaguggcuaaggagagaagcaguggaggagauaugcauauccgacgacucucagugacagaaccugaugcaga
 gcuggugagggugcauccgaagaguucuuugcguggaagggaaggguacagcacaaagcgauaggcaaacuuucacauuu
 uggaagggaaccaaguuuacacaggcgcccaaggauuagcagaaauuaugccaugugcccgugcaacggaggccaa
 gagcagguaugcauguauuucccgagaaagcaugagcaguuuagguagaaugcccgucgaagagucggaagccuc
 cacaccauccagcagcugccuugcuugugcauccaugccaugacuccagaaagaguacagcgccuaaaagccucacguc
 cagaacaaaauacugugugcuauccuuuccauugccgaagauagaaucacugguugcagagaaguccaaugcuccag
 ccuaauuuguuucacccgaaagugccugcguaauuucacaaagggaugaucucguggaacacacccgguaagacgagac
 uccggagccaucggcagagaaccauuccacagagggaacaccugaaacacaccacuuuaaaccgaggaugagaccagga
 cuagaacgcugagccgaucacucgaagaggaagagaggauagcauaguuugcugucagauggcccgaccaccag
 gugcugcaagucgaggcagacauuacaggggcgccucuguaucagcuaucugguccauuccuacugcauccgacuu

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 6】

ugauguggacaguuuauccauacuugacacccuggagggagcuagcgugaccagcggggcaacgucagccgagacuaacu
 cuuacuucgcaaaagauauggaguucugggcgagccggugccugcgccucgaaagauuucaggaaaccuccacaucucc
 gcuccgcgcaagaacacccgucacuugcaccagcagggccugcugcagagaaccagccuaguuuccaccccgccaggcg
 gaauggggugaucacuagagaggagcugcagggcgcuuaccccgucacgcacuccuagcaggucggucugcagagaaccagcc
 uggucuccaacccgccaggcguaauaggguuauacaagagaggaguuaggcgucgucagacacaacaauagcgg
 uuugaugcgggugcauacauuuucccgacacccgucacagggcauuuacacaaaaucaguaaggcaaacggugcu
 auccgaaggugugugaggagagccgaaugggaguuucgugaugcccgcgccucgaccaagaaaaagaagaaauacuac
 gcaagaaauacaguuauuccacaccugcuacagaaagcagauaccaguccaggaaagguggagaaacauagaaagccaua
 acagcuagacguauucugcaaggccuagggcauuuuuagaggcagaaggaaaaggaggugcuaccgaaccucgcaucu
 guuccuuuguaaucaucuagugugaaccgugccuuuacagcccaaggucgaguggaagccuguaacgcgauguugaa
 agagaacuuuccgacuguggcuucuaucuguaauuuccagagucagaugccuauuuggacauugguagcggagcuucau
 gcugcuuagacacugccaguuuuugcccgcaagcugcgagcuuuccaaagaaacacuccuauuuggaaccacaaaua
 cgauccgagcagugccuucagcgauccagaaacgcuccagaaacgucuccgagcugccacaaaaagaaugcaauguac
 gcaaaugagagaaauugcccguaauuggauucggcgccuuuauguggaugcuucaagaaauaugcguguaauaagaa
 auugggaaacguuuuaagaaaccccaucagggcuuacugaagaaacgugguaauuacauuacaaauuaaaggacca
 aaagcugcugcucuuuuugcgaagacacauauuugaauauguugcaggacauaccaauggacagguuugaauaggacu
 aaagagagacgugaaagugacuccaggaaacaaacauacugaagaaacggcccaagguaacaggugauccaggcugccgac
 cgcuaagcaacagcguaucugugcggaauccacccgagagcugguuaggagauuaauugcgguccugcuuccgaaacauuac
 acacuguuugaauaugcggcugaagacuugaacgcuaauuaugccgagcauuccagccugggggauguguuucuggaaac
 ugacaucgcgucguuuguaaaagugaggacgacgcgauggcucugacccgcuuaugauuucuggaagacuuaaggugugg
 acgcgagcugcuugacgcugauuaggcgccuuucggcgaauuucacauuacauuugcccauaaaacuaauuuuaa
 uucggagccauagaauaauucuggaauuuccuacacuguuuguaacacagucuaauaauuguaauccgcaagcagagu
 guugagagaacggcuacccggaucaccagugcagcauucuuaggagauagcaauaucgugaaaggagucaaaucggaca
 aaauaauuggcagacagggugccaccugguuagaauuaggaagucagaauuagauugcuggguggggagaaaggccu
 uauuucuguggaggguuuauuuugugugacuccgugacccggcacagcgugccguguggcagaccccuaaaaaggcuguu
 uaagcuuggcaaacccucugggcagcagacgaugaaacauagaugacagggagaagggaauugcaugaagagucacacgc
 ggaaaccgaguggguaauucuuacagcugugcaaggcagagaaucaaggaugaaaccgaggaacuuuccauuaguu
 augggcaugacuaucuaugcagcuguuuaaucauucagcuaccugagaggggccccuaauacucucuaacggcuacc
 ugauggacuaacgacauagucuaugcccgccacc**AUGUUUCUGUCACAACCAACGCACUAUGUUUGUUUUCUCUGU**
GCUGUCUUUUUGGUAAGUUUCAGUGUGUAAACCUAGAAACACGAACCCAGUUGCCUCCAGCUUAUACCAACUUAUUA
 CUCGCGGAGUAUUAUUAUCCGAUAAGGUUUUAGAAGUAGCGUUGGCACUCUACACAGGAUCUGUUCUUGCCCUUCUUU
 AGUAACGUUACCUGGUUUCAUGCAAUACAUGUGAGCGGAACAAUUGGAACAAAAGAUUUGACAAUCCAGUGCUUCCA
 UUAUGAUGGGGUUAUUAUUGCCAGUAUCGAAAAGUCAAAAUAAUCCGGGGGUGGAUCUUUGGAACCAUUGGACUCUA
 AGACACAGUCUCUCCUAUAGUAAACACGCCACCAUUGUUGCAUAAAAGUAUGCGAAUUCAGUUUGCAACGAUCCC
 UUUUCUGACGUUAUUAACCAUAGAAUAAUAAUCCUGGAUGGAGUCUGGGGUUUUAUGUAGUGCUAAUAAUUGCACUUU
 CGAAUACGUGUCCCAACCAUUCUUAUGGACCUUGAGGGCAACAGGGGAUUUUAAAAACUUGCGCGAAUUGUCUUUA
 AGAAUUAUCGACGGAUACUUUAAGAUUAUAGUAAACACACUCCUAUACACCUUGUUGGGAUUCUCCCAAGGCUUUUCU
 GCUCUCGAACCCUCGUAAGACUUGCCAAUUGGGAUAAUUAUCACUCGCUUUAACAAUUGCUUGCCCUCCACAGGAGCUA
 CCUGACACCCGGCGACUCUUCUUGGUUUGACCGCCGGCGCGCGCUUAUUAUGUUGGUUACCUUCAGCCACGAACAU
 UCUUGCUAAGUAUACGAGAAUGGCACCAUUAACCGACGCCGCGGAUUGUGCAUUGGAUCCCUUGUCUGAAACAAAUUGU

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 7】

ACCUUGAAGUCCUUUACCGUAGAGAAAGGCAUUAUACAGACUCCAAUCCGAGUUCAGCCUACAGAAUCCAUCGUACG
 AUUUCCCAACAUACAAACCUUGCCCUUUCGGUGAAGUAUUUAAUGCUACACGCUUCGCUUCAGUCUUAUGCCUGGAAUA
 GGAAGCGCAUUAUCAAUUGCGUGGCCGAUUAUUCAGUCCUUAUAAUAGCGCAUCCUUCAGUACUUUCAAGUGCUACGGC
 GUUUCGCCACCAAACUCAAUGAUCUUUGCUUACCAACGCUUAUGCUGACAGUUUUGUCAUACGAGGCGACGAAGUACG
 CCAGAUUGCCCCCGGGCAGACAGGUAAUUAUUGCUGAUUAUAAUUAUAAACUCCAGAUAGCUUUAUGGAUGCGUCAUAG
 CCUGGAUUUCCAACAAUCUAGAUUCCAAGGUUGGUGGGAAUUAUAAUUAACGUUAUCGACUGUUCAGAAAGAGUAACUUG
 AAACCAUUGAGAGAGACAUUCCACCGAGAUUUACCAGGCAGGCAGUAAGCCUUGUAACGGCGUUGAGGGAUUUAACUG
 CUUUUUUCCUUGCAAUCCUAUGGCUUUAACCAACAAACGGGGUUGGCUUAACCCUUAUCGAGUGGUUGUCCUCAGCU
 UUGAACUUUUGCAGCGUCCCGCCACAGUCUGCGGACCAAAAAGAGUACAAAUUUUGUCAAGAAUAGUGCGUAAAUUUC
 AAUUUCAAUGGCCUUAACAGGAACAGGCGUGCGACUGAGUCAAAACAAGAUUUCUGCCAUUUCAGCAGUUGGGCGGGA
 UUAUAGCAGACACAACUGACGCGUACGCGAUCCUCAGACUUUGGAGAUUUUGGACAUCACUCCUGUUCUUCGGAGGGG
 UAUUGUCAUACCCCCGGAACUAAUACAUCAAUACAGGUCGUGUUGUACCAAGGUGUCAAUCGCACAGAAGUCCCC
 GUUGCUUAUACACGACAGCAGCUACCCCCACAUGGCGGGUGUACUAAUUGGCUCAAACGUUAUCCAGACCAGAGCUGG
 GUGCUUGAUCGGUGCUGAACACGUGAACAUAAGCUAUGAAUUGCGAUUUAUCCAUUGGUGCCGGGAUCUGCGCUAGCUAUC
 AGACACAGACCAAUUCCCGCAGGCGGGCUCGCUUGAGCAUCCAGUCUAUUAUUGCCUACACUAUGUCAUUGGGCGCC
 GAGAAUAGCGUCGAUUAUCAAUAAUUAUUAUUGCAUUAACCCACCAACUUCACAAUCUCCGUAACUACAGAAUACUUC
 AGUUUCCAUGACAAAGACAUCAGUGGAUUGUACAAGUAUUAUUGCGGAGAUUCCACAGAAUUAUCAAUUAUUGCUUUGC
 AGUACGGCUCUUCUGCACCCAGCUCACAGGGCACUUAAGGUUAUUGCUUGCGAACAGGACAAGAACACACAAGAAGUC
 UUCGCCAAGUCAACAGAUUAUCAAACUCCUCCCAUAAAGGAUUUUGGCGGCUUCAAUUAUAGUCAGAUCCUCCAGA
 CCCUUCAAAACCAUCUAAACGAUCAUUAUUAAGAUUCUGCUUCAAACAGGUCACUUCUUGCCGAUGCUGGAUUCAUUA
 GCAAUACGGUGACUGCCUUGGUAUUAUUGCUGCCCGAGAUUGAUCUGUGCCAGAAUUAACGGGCUACUGUACUCC
 CUCCACUGCUCACAGACGAAUUAUUGCACAGUACACAAGUGCCUGUUGGCGAGGCACAUCACUAGCGGCGUGGACCUUU
 GGCGCAGGUGCAGCACUCCAAUUAUCCUUGGCAUGCAGAUUGGCCUUAUCGGUUUAUUGGGAUAGGCGUGACUCAAUUGU
 CCUCUACGAAACCAAAGUUGAUAGCUAACCAUUAUUAUUCAGCAUUGGGAAGAUACAGGAUUCACUGUCUAGUACUG
 CUAGUGCCCUUGGUAAGCUGCAGAACCGUUGUCAACCAGAAUGCUCAAGCUUGAAUACAUUGGUUAAGCAGCUCUCUAGU
 AAUUUUUGGGGCCAUUCUUCAGUACUUAUUAUUAUUGAGCCGAUUGGACCCACCUGAAGCUGAAGUACAGAUUCGACAG
 GCUGAUAAACAGGCCGGUCCAAUCCUCCAAACAUACGUGACACAACUUAUACGCGCAGCCGAAUCCGAGCCAGCG
 CUAACCUGGCAGCUACCAAGAUGUCAGAAUGCGUUCUGGGCCAGAGUAAACCGCUAGAUUUCUGCGGGAAGGGUACCAC
 CUGAUGUCCUUAUCCAAUUCGACCCUACGGGGUCGUCUUUUGCAUGUAACAUAACGUACCCGCACAAGAGAAGAAUUU
 UACUACCGCUCUCCGCAUCUGUCAUGACGGGAAAGCUAAUUAUCCUGCGAAGGUGUGUUUGUAUCUAAUUGGUACACAUU
 GGUUUGUCACACAGCGGAUUUUCUAGAACCCAGAUCAUUAACAACUGACAACACUUUUGUUUCCGGGAUUUGAGCGUG
 GUCAUAGGAUUCGUAAUUAACACUGUAUUAUGAUCCCUCCAACAGAGCUGGACUCUUUUAAGAAGAACUGGAUAAUUA
 UUUCAAGAACCACACAAGUCCCGACGUGGACCUUGGGGACAUAAUGGUUAUUAACGCAUCUGUGGUUAACAUAUCAAAGG
 AAAUCGACAGACUCAACGAGGUGGCCAAAACUGAACGAAAGCUUGAUAGAUUCCAGGAGUUGGGCAAGUAUGAACAG
 UACAUUAAUUGGCCAUGGUACAUAUGGCUUGGCUUUAUUGCUGGCCUUAUCGCCAUCGUAAUGGUUACAUAUGCUGUG
 CUGCAUGACCUCCUGCUGUUCUUGUUUGAAAGGGUGUUGUUCUUGGUAUGUUGCAAGUUUGACGAAGAUUAUCCG
 AACCUGUUCUUAAGGGGGUAAAGCUUACAUUAACAUAGUAaaccgcgugucaaaaaaccgcguggacgugguuaacauccc
 ugcugggaggauacagccguaaauuaauuaauuggcuuggugcuggcuacuaauuguggccauuacgugcugaccaaccag
 aaacauaaauugaauacagcagcaauuggcaagcugcuuacauagaacucgcgcgauuggcaugccgcuuaaaaauuuuu
 auuuuauuuuuuuuuuuuuuuuuccgaucggaauuuuguuuuuuauuuuuaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 8】

aaaaaaaaaaaaaaaa

配列番号31—全長VEEV+オミクロン—B. 1. 1. 529抗原をコードするRNA配列

auaggcgcgcaugagagaagcccagaccaauuaccccaaauggagaaaguucacguugacaucgaggaaga
cagcccauuccucagagcuuugcagcgagcuucccgaguuugagguagaagccaagcaggucacugauaaugac
caugcuaaugccagagcguuuucgcaucuggcuucaaacugaucgaaacggagguggacccaucgcacacgauc
uugacauuggaagugcgcccgcccgagaauguauuuaagcacaagaucauuguaucuguccgaugagauugc
ggaagaucggacagauuguaaaguaugcaacuaagcugaagaaaaacuguaaggaaauaacugauaaggaaug
gacaagaaaaugaaggagcugcgcccgcaugagcgacccugaccuggaaacugagacuaugugccuccacgacg
acgagucgugucgcuacgaagggaagucgcuuuuaccaggauguauacgcggugagcggaccgacaagucucua
ucaccaagccaauaagggauguagagucgcuacuggauaggcuuugacaccacccuuuauuguuaagaacuu
gcuggagcauaucccauacucuaaccaacugggcccagcgaacccguguaacggcucguaacauaggccuau
gcucugacguuauaggagcgguacguagagggauugccauucuuagaaagaaguauuugaaaccauaccaau
ucuaauucucugugcgacccaucuaaccacgagaagagggaucuaucugaggagcugggaccugccgucguau
cacuaucguggcaagcaaaauacacaugucggugugagacuaauaguugcgacggguacgucguuaaaagaa
uagcuaucaguccagggccuguaugggaagccuacggcuauugcugcuacgaugcaccgaggggaucuuuguc
caagugacagacacauugaacggggagaggucucuuuucccgugcaguaugugccagcuacaauugugac
caaugacuggcuaucuggcaacagauugcagugcgacgacgcaaaacugcugguugggcucaaccagcgua
uagucgucaacggucgcaccagagaaacaccauacauagaaaaauacuuuugcccguaugggcccaggcau
ugcuaggugggcaaaaggaauuaaggaagaucagaagaaggaagccacuaggacuacgagauagacaguuaguc
augggguguuugggcuuuuagaaggcacagauaacaucauuuaaagcgcccgauacccaaaccaucauca
aagugaacagcgauuuccacuaucugugcuccaggaugaggcaguaacacauuggagauccgggucgagaaca
aauccaggaaaauguuagaggagcacaggagccgucaccucuaauaccgcccaggacguacaagaagcuaaguc
gcagccgaugaggcuaggagugcgugaagccgaggaguuugcgcgagcucuaaccacuuuggcagcugauug
aggagcccacucuggaggcagacgucgacuugauguuaacagaggcuggggcccggcucaguggagacaccucg
cuugauaaagguuaccagcuacgauggcgaggacaagauccgucuaacgucugcuaucuccgagggcugua
aagagugaaaaauuauucugcauccaccucucgcuagaacaagucuaugugauaacacacucugggccgaaa
gguuauccguggaaccauacauuguaaagauugggucagaggacauagcaauaccguccaggaauuacagc
ucugagugaaagugccaccauuguguaacaagacgugaguucguaaacagguaccugcaccuauuugccaca
ggaggagcgcuagaacacugagaagaauuaacaaaacugucaagcccagcgagcacgagggcgaaauaccu
gacgacaggaacagugcguaagaagaacuaagucacugggcuaggggcuacagggcgagcuggggaucucc
cuuccaagaaucgcuacgagagucugagaacacgacccagccgucuuuacaaaguaccaaccuaggggugu
ggcgugccaggauaggaagucugggcaucauuuaaagcgagucacaaaaaagaucaugggugagcgccaaga
aagaaaaacugugcagaaauuaagggaagcucaagaaauagaaagggcuggacgucauugccagaacugug
agugcucuuugauggaugcaaacaccccgagagaccuguaauuugacgaagcuuuugcuugcaugcagguacu
cucagagcgcucauagccauuaaagaccuaaaaaggcagugcucuggggauccecaaacagugcgguuuuu
acaugaugugccugaaagugcauuuaacacgagauuugcacacaagucuccaacaagcaucucgcgcuug
cacuaaauucugugacuucggucgucuaaccuuguuuuacgacaaaaaagagaacgacgaauccgaaagacu
aagauugugauugacacuaccggcaguaaccaaacuaagcaggacgaucuaucacucuguuuacagggggg
ugaagcaguugcaaaugauuacaaaggcaacgaaauaagacggcagcugccucuaagggcugacccguaaagg

10

20

30

40

50

【化 1 - 2 9】

uguguaugccguucgguacaaggguaauggaaauccucuguaacgacccaccucagaacaugugaacguccuacug
 acccgcacggaggaccgcaucgugggaaaaacacuagccggcgacccauggauaaaaacugacugccaaguacc
 cugggaauuucacugccacgauagaggaguggcaagcagagcaugaugccaucaugaggcacaucuuaggagagacc
 ggaccuaccgacgucuuaccagaauaaggcaaacguguguuuggccaaggcuuagugccggugcugaagaccgcu
 ggcauagacaugaccacugaacaauggaacaacugggauuuuuugaaaaggcaaaagcucacucagcagagauag
 uauugaaccaacuagcgugagguucuuuggacucgaucuggaacucgggucuuuuucugcaccacuguuccguu
 auccauuaggaaauacacugggauaacucccgucgcuuaacauguacgggcuuauaaagaagugguccgucag
 cucucucgagguacccacacacugccucggcgaguuuccacuggaagagucuaugacaugaacacugguacacugc
 gcauuuagauaccgcgcauaaaaccuaguaaccuguaaacagaagacugccuacugcuuaguccuccaccuaaaga
 acaccacagagugacuuuucuaucugcagcaauugaaggcgagaaacuguccugguuggucgggaaaaaguuu
 uccgucccaggcaaaaugguugacugguugcagacccggccugaggcuaccuucagagcucggcuggauuaggca
 uccaggugaugugcccaauaugacaauauuuuguaauugagaggaccccauuaauaaccaucacuaucagca
 gugugaagaccaugccauuaagcuuagcauguuagaccaagaagcuugucugcaucugaaucccgcggaaccugu
 gucagcauagguuagguuacgucagacaggcgcaagcagaaagcaucauugugcuaugcgcggcaguucaaguuu
 cccggguaugcaaaccgaaauccucacugaagagacggaaugucuuuguaaucauuggguacgaucgcaaggc
 ccguacgcacaauccuuacaagcuuucacacccuagaccaauuuuacagguuccagacuccacgaaggccgga
 uugcaccuccuaucauugugcgaggggauuugccacggccaccgaaggagugauuauaaugcugcuaaca
 gcaaaggacaaccugcgaggggugugcgaggcguguaaagaaaucccggaagcuucgaauuacagccgau
 cgaagugagaaaagcgcgacuggucaaaaggugcagcuaaacaucauucaugccgaggaaccaacucaaaaa
 guuuccgagguugaaggugacaaaacaguuaggcagaggcuuauagauccaucgcuagaauguaacgaaua
 acaagucaguagcgauuccacuguguccaccggcaucuuuuccgggaacaaagaucgacuaaccacaucauugaa
 ccuuuugcugacagcuuagacaccacugaugcagaugagccauauacugcagggaacagaauagggaauagacu
 cucaagggaagcaguggcuaaggagagaagcaguggaggagauaugcauuccgacgacucucagugacagaaccug
 augcagagcugguagggugcauccgaagaguucuuuggcuggaagggaaggcuacagcacaagcgauaggcaaac
 uuucucauauuuggaagggaaccaaguuuacaccagcgccgaaggauuagcagaaaauuauugccaugggcccggu
 gcaacggaggccaaugagcagguauugcauauucccgagagaaagcaugagcaguuuaggucgaaaugcccg
 ucgaagagucggaagccuccacaccacugacgcugccuugcuugcuaucgaugccaugacuccagaaagagu
 acagcgccuaaaagccucacguccagaacaaauucugugucuaucuuuccauugccgaaguuagaaucacu
 ggugugcagaagaucuaugcuccagccuaauuugucucaccgaaagugccugcguaauuacuaaccaagggaagu
 aucucguggaaaacaccacgguaagcagagacuccggagccaucggcagagaaccaauccacagaggggacaccuga
 acaaccaccacuuauaacggaggaugagaccaggacuagaaacggcugagccgaucacucgaagagggaagagag
 gauagcauaaguuugcugcagauggcccgacccaccaggugcugcaagucgaggcagacauucacggggccgccc
 cuguaucuaugcuaucugguccauuccuacugcauccgacuuugaugggacaguuuauccauacuugacacccu
 ggaggggagcuagcgugacacggggcaacgucagccgagacuaacucuuacuuucgcaaagagauaggaguuucug
 gcgcgacccggugccugcgccuagaaagauuucaggaaccuccacaucccgucucccgcgcaagaacacccgucac
 uugcaccacagcagggccugcucgagaaccagccuaguuuccaccccgccaggcgugaauaggugaucauagaga
 ggagcucgagggcguuaccccgucacgcacuccuagcagguccgucugagaaccagccugguccuaccccgcca
 ggcguaauuaggguuaucaagagaggaguuugaggcgucguagcacaacaacaugaaggguuugaugcgggug
 cauacauuuuucccgacaccggucaagggcauuuacaaacaaauucaguaaggcaaacggugcuaucggaagu
 ggugugggagaggaccgaauuggagauuucguaugcccgcgccucgaccaagaaaaagaagaauuacucgcaag

10

20

30

40

50

10

20

30

40

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】



FIG. 1

【図 2】

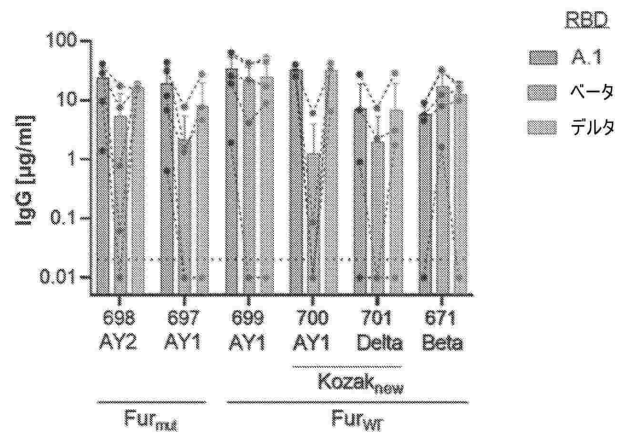


FIG. 2

【図 3 - 1】

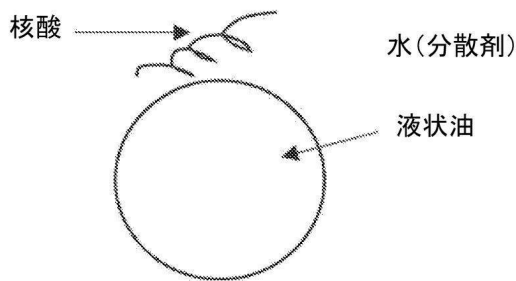


FIG. 3A

【図 3 - 2】

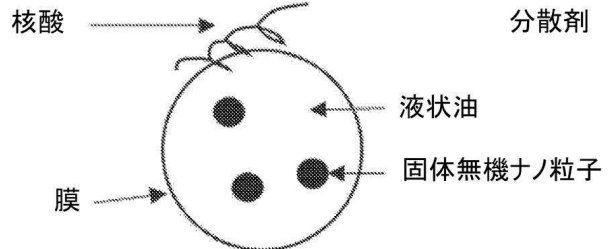


FIG. 3C

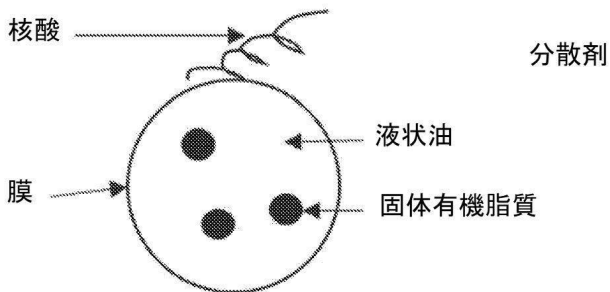


FIG. 3B

10

20

30

40

50

【図 4 A】

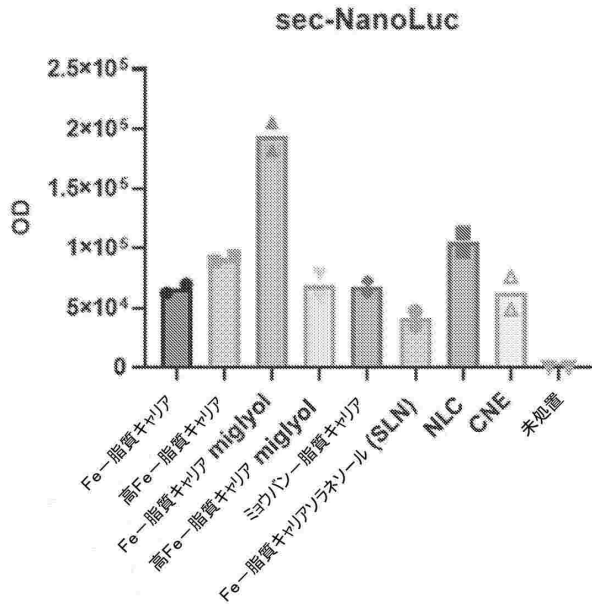


FIG. 4A

【図 4 B】

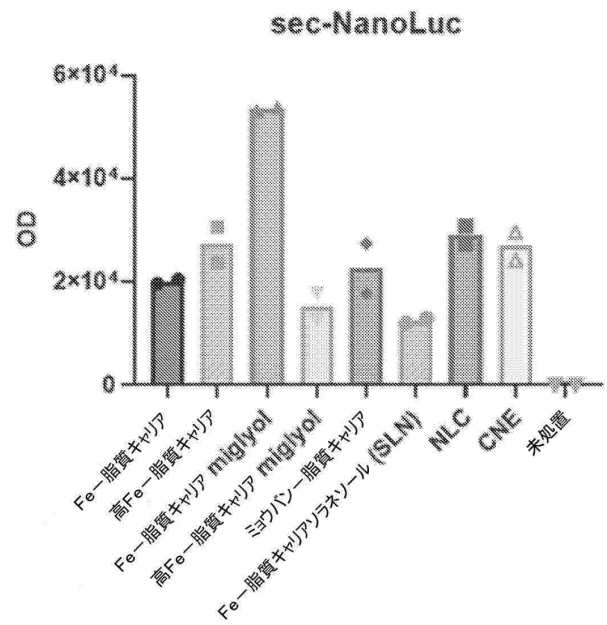


FIG. 4B

【図 5 A】

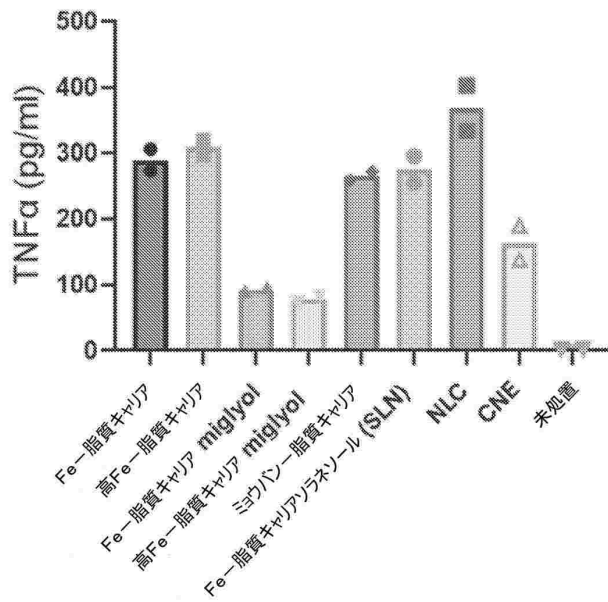


FIG. 5A

【図 5 B】

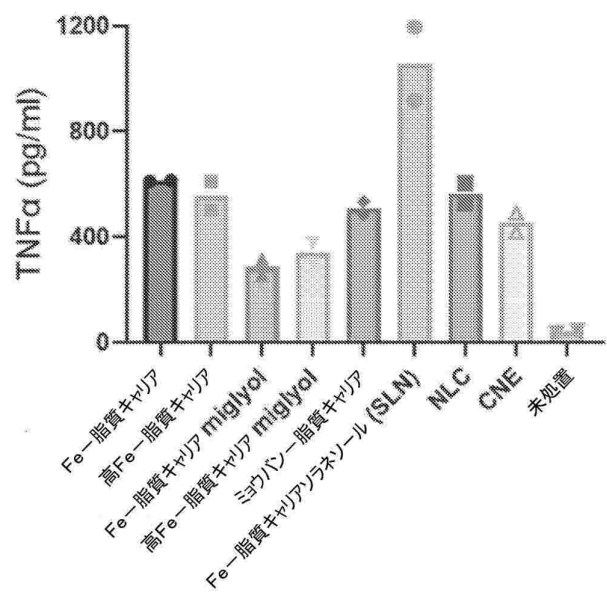


FIG. 5B

10

20

30

40

50

【図 6】

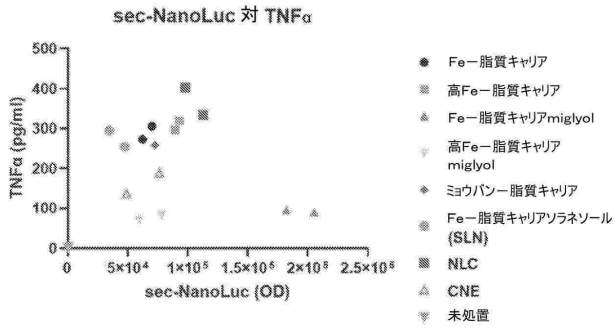


FIG. 6A

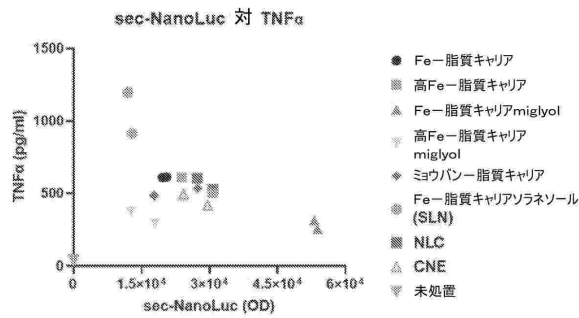


FIG. 6B

【図 7 - 1】

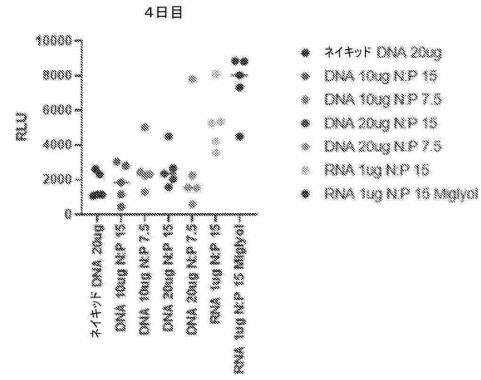


FIG. 7A

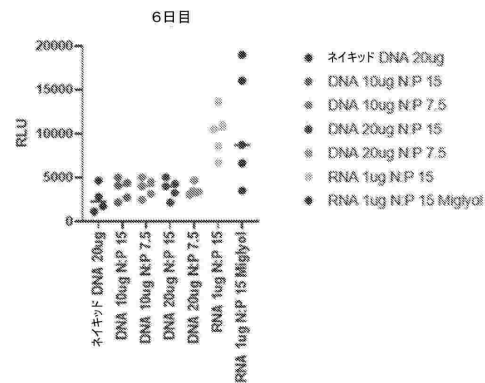


FIG. 7B

【図 7 - 2】

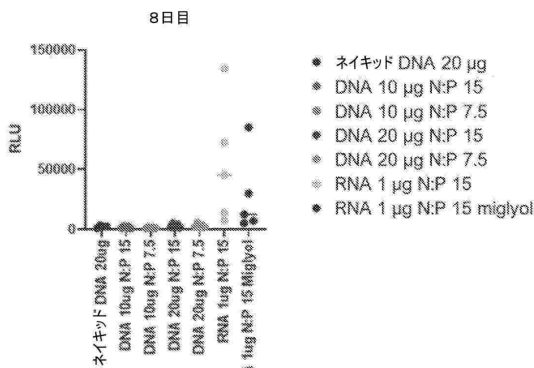


FIG. 7C

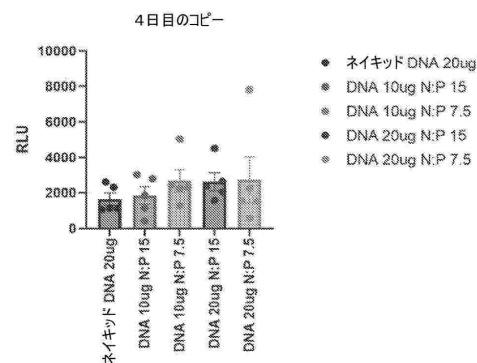


FIG. 7D

【図 7 - 3】

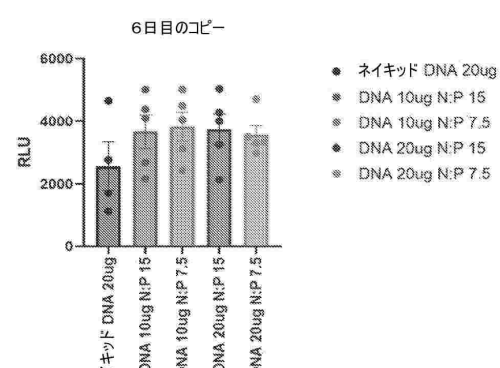


FIG. 7E

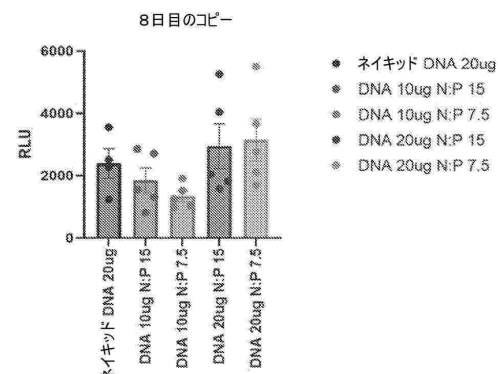


FIG. 7F

10

20

30

40

50

【図 8】

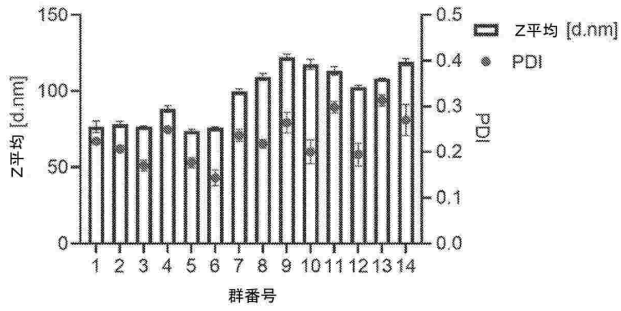


FIG. 8

【図 9】

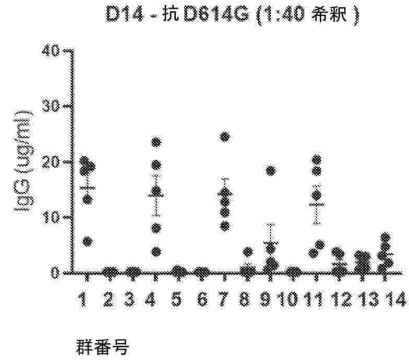


FIG. 9A

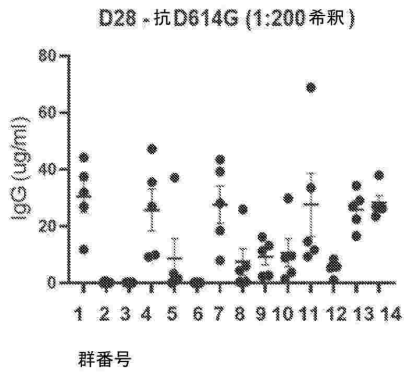


FIG. 9B

【図 10】

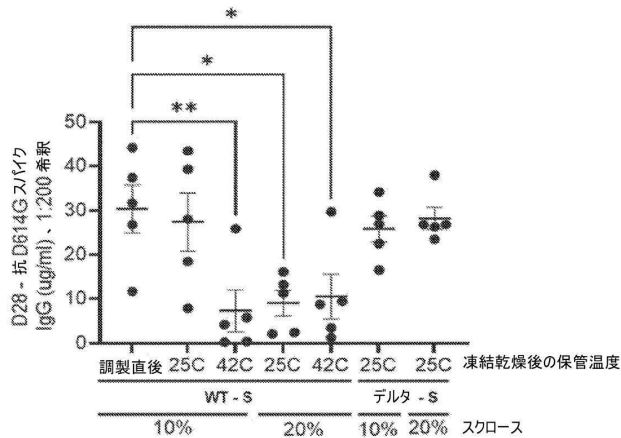


FIG. 10

【配列表】

2024535352000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 14/005; A61K 47/28; A61K 47/10; A61K 47/20; A61P 31/14; C12N 15/86 (2022.01)

CPC - C07K 14/005; A61K 47/28; A61K 47/10; A61K 47/20; A61P 31/14; C12N 15/86

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	US 2020/0230056 A1 Infectious Disease Research Institute; 23 October 2020; abstract; paragraphs [0008], [0010], [0031], [0044], [0046], [0064], [0092], [0099], [0146], [0148], [0200], [0210]-[0212], [0220], [0544], [0554]; claims, 5, 17, 88	39, 40, 42-45, 128-153, 161 --- 1, 4/1, 154, 156
A	WO 2021/178886 A1 Thomas Jefferson University; 10 September 2021; abstract; page 2, lines 1-2; page 15, lines 31-32; page 53, line 14 to page 79, line 8; SEQ ID NO: 4	1, 4/1
Y	US 2020/0297834 A1 George Mason University; 24 September 2020; paragraphs [0039], [0040], [0157], [0166]; SEQ ID NO: 21	45
Y --- A	US 2021/0283242 A1 Heat Biologics, Inc. 16 September 2021; paragraphs [0009], [0030], [0126], [0154], [0298]	39, 40, 42-45, 128-153, 161 --- 154, 156
Y --- A	WO 2017/218704 A1 Modernatx, Inc.; 21 December 2017; paragraphs [0005], [0030], [00104], [00529], [00539], [00545]	128-153 --- 154, 156
Y --- A	US 2018/0153848 A1 Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co., LTD. 07 June 2018; paragraphs [0075], [0089]	153 --- 154, 156

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 May 2022 (23.05.2022)

Date of mailing of the international search report

JUN 06 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13513

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-4, 39-45, 128-154, 156, 161 and SEQ ID NO: 1 (nucleic acid sequence), alpha variant of SARS-CoV-2 (spike protein variant) are directed towards compositions and dried compositions comprising lipid carriers and nucleic acids encoding sequences.

Group II, Claims 19-22, 162-168, and 171-177 are directed towards compositions comprising RNA polymerase and nucleic acid encoding SARS-CoV-2 omicron variant antigen sequences.

Group III, Claims 57-59, 73-75, 85-89, 124-127, and 155 are directed towards compositions, kits, and dried compositions comprising lipid carriers with inorganic nanoparticles.

The inventions listed as Groups I+, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I+ include SEQ ID NO: 1, not present in any of the other Groups; the special technical features of Group II include RNA polymerase, not present in any of the other Groups; the special technical features of Group III include inorganic nanoparticles, not present in any of the other groups.

The compositions and dried compositions of Claims 1 (in-part), 4 (in-part), 39, 40 (in-part), 42-45 (each in-part), 128-154, 156, 161 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary nucleic acid sequence), alpha variant of SARS-CoV-2 (first exemplary spike protein variant).

Applicant is invited to elect additional spike protein variant(s) and nucleic acid sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional spike protein variant(s) and nucleic acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected spike protein variant(s) and nucleic acid sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (nucleic acid sequence) and beta variant of SARS-CoV-2 (spike protein variant).

Groups I+, II, and III share the technical features including: a composition comprising a lipid carrier, wherein the lipid carrier comprises: liquid oil; and surfactants, wherein the surfactants comprise: a cationic lipid; a hydrophilic surfactant; and a hydrophobic surfactant; and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/147710 A1 (DANDI BIOSCIENCE INC.) (hereinafter 'Dandi') in view of WO 2021/183536 A2 (ALTIMUNE, INC.) (hereinafter 'Altimmune').

Dandi discloses a composition comprising a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier comprises: liquid oil (a nanosized oil layer; paragraph [55]); and surfactants (a surfactant and an immunoactivating material where the surfactant is a mix of surfactants; paragraphs [55], [64]-[65]), wherein the surfactants comprise: a cationic lipid (the immunoactivating agent is a cationic lipid; paragraph [66]); a hydrophilic surfactant (the surfactant mixture includes Tween 80 (hydrophilic); paragraph [65]); and a hydrophobic surfactant (the surfactant mixture includes Span 85 (hydrophobic); paragraph [65]).

Dandi does not disclose and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen.

Altimmune discloses at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the composition, as previously disclosed by Dandi, with the nucleic acid encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen, as previously disclosed by Altimmune, for a superior composition which provides the benefit of using the lipid carrier to administer an immunogenic compound which can produce a protective immune response against SARS-CoV-2.

Groups I+ and II share the technical features including: a composition comprising: a lipid carrier, wherein the lipid carrier comprises: liquid oil; and surfactants, wherein the surfactants comprise: a cationic lipid; a hydrophilic surfactant; and a hydrophobic surfactant; and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen; a nucleic acid comprising a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike S2 sequence region.

However, these shared technical features are previously disclosed by Dandi in view of Altimmune.

Dandi discloses a composition comprising a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier comprises: liquid oil (a nanosized oil layer; paragraph [55]); and surfactants (a surfactant and an immunoactivating material where the surfactant is a mix of surfactants; paragraphs [55], [64]-[65]), wherein the surfactants comprise: a cationic lipid (the immunoactivating agent is a cationic lipid; paragraph [66]); a hydrophilic surfactant (the surfactant mixture includes Tween 80 (hydrophilic); paragraph [65]); and a hydrophobic surfactant (the surfactant mixture includes Span 85 (hydrophobic); paragraph [65]).

Dandi does not disclose and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen; a nucleic acid comprising a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike S2 sequence region.

-***-Continued Within the Next Supplemental Box -***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13513

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

Altimmune discloses at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]); a nucleic acid comprising a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike S2 sequence region (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 S2 domain; paragraph [00158]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the composition, as previously disclosed by Dandi, with the nucleic acid encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen, as previously disclosed by Altimmune, for a superior composition which provides the benefit of using the lipid carrier to administer an immunogenic compound which can produce a protective immune response against SARS-CoV-2.

Groups I+ and III share the technical features including: a composition comprising: a lipid carrier, wherein the lipid carrier comprises: liquid oil; and surfactants, wherein the surfactants comprise a cationic lipid; at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen sequence or functional variant thereof; a dried composition comprising: a) a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, and one or more lipids; at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen.

However, these shared technical features are previously disclosed by Dandi in view of Altimmune in further view of WO 2018/044028 A1 (AMOREPACIFIC CORP) (hereinafter 'AmorePacific').

Dandi discloses a composition comprising: a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier comprises: liquid oil (a nanosized oil layer; paragraph [55]); and surfactants (a surfactant and an immunoactivating material where the surfactant is a mix of surfactants; paragraphs [55], [64]-[65]), wherein the surfactants comprise a cationic lipid (the immunoactivating agent is a cationic lipid; paragraph [66]); a composition comprising: a) a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (a nanoemulsion comprising an oil core (hydrophobic); paragraphs [55], [66]; see figure associated with the abstract), and one or more lipids (the nanoemulsion comprising an immunoactivating agent that is a cationic lipid; paragraphs [55], [66]).

Dandi does not disclose at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen sequence or functional variant thereof; a dried composition; at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen.

Altimmune discloses at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen sequence or functional variant thereof (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]); at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]).

AmorePacific discloses a dried composition (a dried liposomal composition; paragraph [98]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the composition, as previously disclosed by Dandi, with the nucleic acid encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen or a sequence capable of expressing an antigen, as previously disclosed by Altimmune, for a superior composition which provides the benefit of using the lipid carrier to administer an immunogenic compound which can produce a protective immune response against SARS-CoV-2. It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the composition, as previously disclosed by Dandi, with a dried composition, as previously disclosed by AmorePacific, for a superior composition which provides the benefit of being shelf stable and easy to formulate into tablets for administration.

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a composition comprising: a lipid carrier, wherein the lipid carrier comprises: liquid oil; and surfactants, wherein the surfactants comprise: a cationic lipid; a hydrophilic surfactant; and a hydrophobic surfactant; and at least one nucleic acid, wherein the at least one nucleic acid comprises a sequence; a composition comprising: a lipid carrier, wherein the lipid carrier comprises: liquid oil; and surfactants, wherein the surfactants comprise: a cationic lipid; a hydrophilic surfactant; and a hydrophobic surfactant; and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a S2 protein region, optionally a stem helix region, of SARS-CoV-2 spike protein antigen or functional variant thereof; a dried composition comprising: a) a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, and one or more lipids; b) at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen, optionally wherein the antigen is a SARS-CoV-2 spike protein or a functional variant thereof; and c) at least one sugar present in amount of I) at least about 50% by weight of the dried composition, or II) present in an amount of least about 50 mg; a composition for prophylaxis of SARS-CoV-2 comprising: a) a sorbitan fatty acid ester; b) an ethoxylated sorbitan ester; c) a cationic lipid; d) an immune stimulant; and e) at least one RNA encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen or functional fragment thereof; these shared technical features are previously disclosed by Dandi in view of Altimmune and further in view of AmorePacific.

Dandi discloses a composition comprising: a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier comprises: liquid oil (a nanosized oil layer; paragraph [55]); and surfactants (a surfactant and an immunoactivating material where the surfactant is a mix of surfactants; paragraphs [55], [64]-[65]), wherein the surfactants comprise: a cationic lipid (the immunoactivating agent is a cationic lipid; paragraph [66]); a hydrophilic surfactant (the surfactant mixture includes Tween 80 (hydrophilic); paragraph [65]); and a hydrophobic surfactant (the surfactant mixture includes Span 85 (hydrophobic); paragraph [65]); a composition comprising: a) a lipid carrier (a nanoemulsion comprising cationic lipids; paragraphs [55], [66]), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (a nanoemulsion comprising an oil core (hydrophobic); paragraphs [55], [66]; see figure associated with the abstract), and one or more lipids (the nanoemulsion comprising an immunoactivating agent that is a cationic lipid; paragraphs [55], [66]); b) at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen, optionally wherein the antigen is a SARS-CoV-2 spike protein or a functional variant thereof; and c) at least one sugar present in amount of I) at least about 50% by weight of the dried composition, or II) present in an amount of least about 50 mg; a composition for prophylaxis of SARS-CoV-2 comprising: a) a sorbitan fatty acid ester (the surfactant mixture includes Span 85 (sorbitan fatty acid ester); paragraph [65]); b) an ethoxylated sorbitan ester (the surfactant mixture includes Tween 80 (ethoxylated sorbitan ester); paragraph [65]); c) a cationic lipid (the immunoactivating agent is a cationic lipid; paragraph [66]); d) an immune stimulant (an imidazoquinoline-based toll-like receptor 7 or 8 agonist; paragraph [55]).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13513

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

Dandi does not disclose and at least one nucleic acid, wherein the at least one nucleic acid comprises a sequence; and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a S2 protein region, optionally a stem helix region, of SARS-CoV-2 spike protein antigen or functional variant thereof; a dried composition; b) at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen, optionally wherein the antigen is a SARS-CoV-2 spike protein or a functional variant thereof; and c) at least one sugar present in amount of i) at least about 50% by weight of the dried composition, or ii) present in an amount of least about 50 mg; a composition for prophylaxis of SARS-CoV-2; and e) at least one RNA encoding for a SARS-Co V-2 spike protein antigen or functional fragment thereof.

Altimmune discloses at least one nucleic acid, wherein the at least one nucleic acid comprises a sequence (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]); and at least one nucleic acid, wherein the nucleic acid comprises a sequence encoding for a S2 protein region (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 S2 domain; paragraph [00158]); at least one nucleic acid that comprises a sequence which encodes a sequence capable of expressing an antigen, optionally wherein the antigen is a SARS-CoV-2 spike protein or a functional variant thereof (an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraph [00158]); a composition for prophylaxis of SARS-CoV-2 (compositions for preventing SARS-CoV-2; paragraph [0016]); at least one RNA encoding for a SARS-CoV-2 spike protein antigen or functional fragment thereof (an RNA immunogenic composition comprising an expression cassette encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen; paragraphs [00158], [00227]).

AmorePacific discloses a dried composition (a dried liposomal composition; paragraph [98]) with at least one sugar present in amount of i) at least about 50% by weight of the dried composition, or ii) present in an amount of least about 50 mg (a dried tablet composition with 140 mg of malt sugar added; paragraph [96]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the compositions, as previously disclosed by Dandi, with nucleic acids encoding an S2 protein or a SARS-CoV-2 spike protein or a composition for prophylaxis of SARS-CoV-2 or an RNA encoding a SARS-CoV-2 spike protein antigen, as previously disclosed by Altimmune, for a superior composition which provides the benefit of using the lipid carrier to administer an immunogenic compound which can produce a protective immune response against SARS-CoV-2. It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the composition, as previously disclosed by Dandi, with a dried composition with at least one sugar in an amount of at least 50 mg, as previously disclosed by AmorePacific, for a superior composition which provides the benefit of drying so that the composition is more shelf stable and including sugar which can produce a pleasant tasting tablet for administering the composition.

Since none of the special technical features of the Groups I+, II, or III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Dandi, Altimmune, and AmorePacific references, unity of invention is lacking.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US22/13513
Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/13513
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☒ Claims Nos.: 5-18, 23-38, 46-56, 60-72, 76-84, 90-123, 157-160, 169-170, 178-180 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: -***Please See Supplemental Page-***		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Groups I+, Claims 1-4, 39-45, 128-154, 156, 161 and SEQ ID NO: 1 (nucleic acid sequence), alpha variant of SARS-CoV-2 (spike protein variant)	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/44	(2017.01)	A 6 1 K	47/44
A 6 1 K	47/06	(2006.01)	A 6 1 K	47/06
A 6 1 K	47/14	(2017.01)	A 6 1 K	47/14
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	39/215	(2006.01)	A 6 1 K	39/215
C 1 2 N	15/88	(2006.01)	C 1 2 N	15/88
C 1 2 N	15/50	(2006.01)	C 1 2 N	15/50
C 1 2 N	15/54	(2006.01)	C 1 2 N	15/54
C 1 2 N	15/40	(2006.01)	C 1 2 N	15/40
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	C 1 2 N	15/85
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10

Z Z N A

Z

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

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リード, スティーブン グレゴリー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 5, ベルビュー, 1 2 2 プレイス エヌイー 2 8 4 3

(72)発明者 カーター, ダリック アルバート

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 7, シアトル, エヌダブリュー 6 4 ティーエイチ スト
リート 8 3 6

(72)発明者 カンダール, アミット プラフル

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 9, イサクア, エスイー 4 3 アールディー プレイス 2
2 3 2 4

(72)発明者 ダシー, マルコルム エス.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 4, サマミッシュ, エヌイー 1 4 ティーエイチ プレイス
2 4 6 2 6

(72)発明者 バーグラント, ラース ピーター アクセル

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 5, シアトル, 4 5 ティーエイチ アベニュー エヌイー
4 5 4 0

(72)発明者 エラスムス, ジェシー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 3 6 6, ポート オーチャード, エスイー ノースウェイ プレ
イス 8 6 5 5

(72)発明者 ベルベ, ブライアン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 9, イサクア, 3 0 ティーエイチ アベニュー エヌイー
2 0 7 2

(72)発明者 アーチャー, ジェイコブ フリーマン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 9 9, シアトル, 3 3 アールディー アベニュー ダブリュー
3 8 1 8, ユニット ビー

F ターム (参考)

4B065 AA94X AA95Y AB01 AC14 BA05 CA24 CA45
4C076 AA22 AA29 BB15 BB25 CC06 CC41 DD09F DD22 DD26 DD29
DD30 DD34 DD46 DD46F DD59 EE23F EE52 EE53 EE59 FF70
4C084 AA13 MA05 MA23 MA44 MA55 MA59 NA13 ZB33
4C085 AA03 BA71 CC08 EE01 EE07 GG01 GG03