



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202346593 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：111142195

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 04 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/13 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C07K16/08 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2021/11/05

美國

63/276,233

2022/03/16

歐洲專利局

22315065.7

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：卡西米羅 丹尼洛 CASIMIRO, DANILO (FR)；高帕尼 哈迪普 GOPANI, HARDIP

RAJESHBHAI (US)；迪納波利 喬書亞 DINAPOLI, JOSHUA (US)；張 立農

ZHANG, LINONG (US)；帕靈頓 馬克 PARRINGTON, MARK (US)；高曼 瑞貝

卡 GOLDMAN, REBECCA (US)；奇烏庫拉 蘇達 CHIVUKULA, SUDHA (US)；

伽力山 威廉 GALLICHAN, WILLIAM SCOTT (CA)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：11 共 109 頁

(54)名稱

呼吸道融合病毒 RNA 疫苗

(57)摘要

本揭露提供了一種呼吸道融合病毒 (RSV) 疫苗，其包含傳訊 RNA (mRNA)，所述傳訊 RNA 包含編碼 RSV F 蛋白抗原的開放閱讀框 (ORF)；以及藉由投予所述疫苗引發免疫反應的方法。

The present disclosure provides a respiratory syncytial virus (RSV) vaccine comprising a messenger RNA (mRNA) comprising an open reading frame (ORF) encoding an RSV F protein antigen, and methods of eliciting an immune response by administering said vaccine.

指定代表圖：

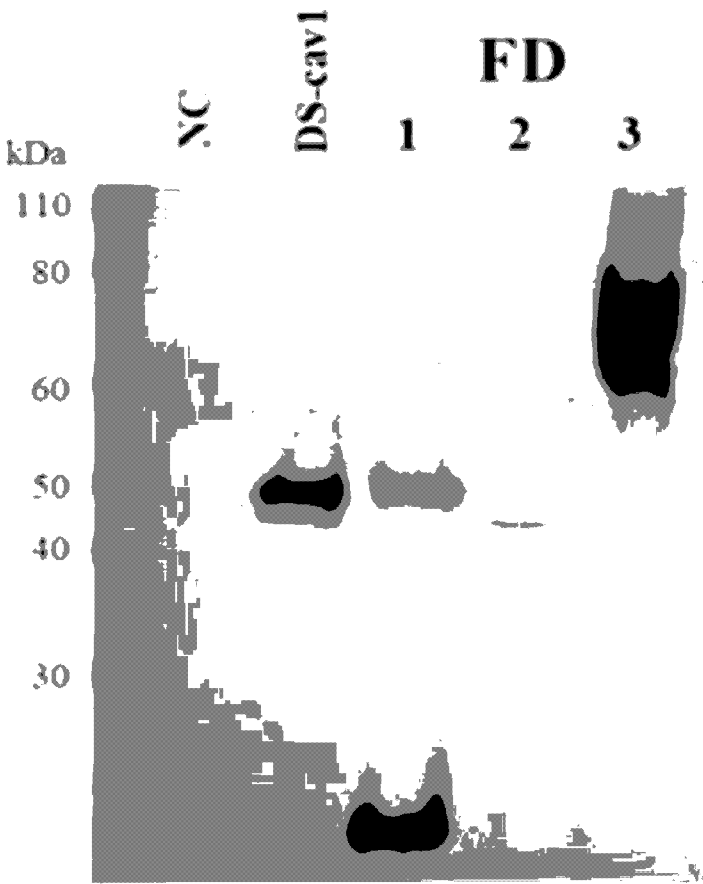


圖1A

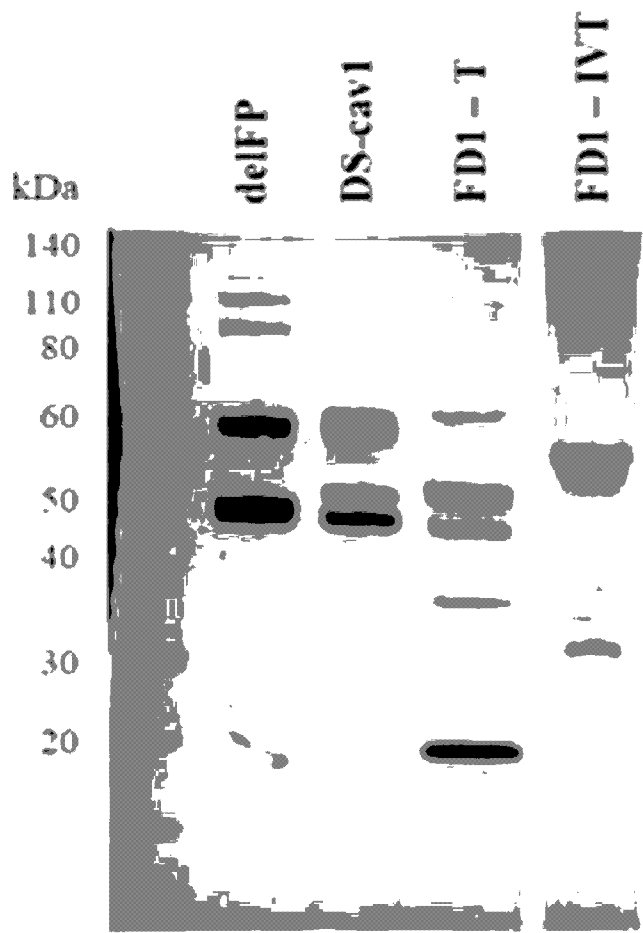


圖1b

【發明摘要】

【中文發明名稱】呼吸道融合病毒RNA疫苗

【英文發明名稱】 RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS RNA VACCINE

【中文】

本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF）；以及藉由投予所述疫苗引發免疫反應的方法。

【英文】

The present disclosure provides a respiratory syncytial virus (RSV) vaccine comprising a messenger RNA (mRNA) comprising an open reading frame (ORF) encoding an RSV F protein antigen, and methods of eliciting an immune response by administering said vaccine.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】呼吸道融合病毒RNA疫苗

【英文發明名稱】RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS RNA VACCINE

【技術領域】

【0001】 本揭露提供了一種呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，其包含傳訊RNA (mRNA)，所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框(ORF)；以及藉由投予所述疫苗引發免疫反應的方法。

【先前技術】

【0002】 呼吸道融合病毒(RSV)是嬰兒的嚴重呼吸系統疾病的主要原因，並且是老年人的呼吸系統疾病的主要原因。儘管進行了數十年的研究，但RSV仍未滿足疫苗需求。最近，使用處於其融合後構形的RSV F抗原進行的臨床項目未能在成人中引發足夠的功效。參見，Faloon等人(2017) JID 216: 1362-1370。然而，在融合前構形穩定化的RSV F抗原可引發的中和反應優於已在臨床上失敗的融合後抗原所引發的中和反應。

【0003】 基於RNA的疫苗(例如，mRNA疫苗)最近成為對抗嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒2型(SARS-CoV-2)的有效疫苗類型。冠狀病毒疾病2019 (COVID-19) mRNA疫苗已經展現出快速、安全且具有成本效益的生產過程。通常與遞送載體諸如脂質奈米顆粒(LNP)組合，COVID-19 mRNA疫苗可以達到高的功效。在缺乏可用的有效RSV疫苗的情況下，需要基於RNA的RSV疫苗，所述疫苗引發針對RSV融合前F蛋白的強免疫反應，用於有效中和RSV感染。

【發明內容】

【0004】 在一態樣，本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），其中所述RSV F蛋白抗原包含與SEQ ID NO: 3具有至少98%同一性（例如，98%、99%或100%同一性）的胺基酸序列或由SEQ ID NO: 3的胺基酸序列組成。

【0005】 在某些實施例中，所述RSV F蛋白抗原是融合前蛋白。

【0006】 在某些實施例中，所述ORF是經密碼子優化的。

【0007】 在某些實施例中，所述mRNA包含至少一個5'非轉譯區（5' UTR）、至少一個3'非轉譯區（3' UTR）和至少一個多腺苷酸化（聚(A)）序列。

【0008】 在某些實施例中，所述mRNA包含至少一個化學修飾。

【0009】 在某些實施例中，所述mRNA中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【0010】 在某些實施例中，所述ORF中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【0011】 在某些實施例中，所述化學修飾選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿

苷、4-硫代-假尿苷、5-氮雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

【0012】在某些實施例中，所述化學修飾選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲氧基尿苷及其組合。

【0013】在某些實施例中，所述化學修飾是N1-甲基假尿苷。

【0014】在某些實施例中，所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中。

【0015】在某些實施例中，所述LNP包含至少一種陽離子脂質。

【0016】在某些實施例中，所述陽離子脂質是可生物降解的。在某些實施例中，所述陽離子脂質不是可生物降解的。

【0017】在某些實施例中，所述陽離子脂質是可裂解的。在某些實施例中，所述陽離子脂質不是可裂解的。

【0018】在某些實施例中，所述陽離子脂質選自OF-02、cKK-E10、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10和GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14。

【0019】在某些實施例中，所述陽離子脂質是cKK-E10。

【0020】在某些實施例中，所述陽離子脂質是GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10。

【0021】在某些實施例中，所述LNP進一步包含聚乙二醇（PEG）接合的（PEG化的）脂質、基於膽固醇的脂質、和輔助脂質。

【0022】在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的陽離子脂質；莫耳比為0.25%至2.75%的聚乙二醇（PEG）接合的（PEG化的）脂質；莫耳比為20%至45%的基於膽固醇的脂質；和莫耳比為5%至35%的輔助脂質，其中所有莫耳比均相對於所述LNP的總脂質含量。

【0023】在某些實施例中，所述LNP包含莫耳比為40%的陽離子脂質、莫耳比為1.5%的PEG化的脂質、莫耳比為28.5%的基於膽固醇的脂質和莫耳比為30%的輔助脂質。

【0024】在某些實施例中，所述PEG化脂質是二肉豆蔻醯-PEG2000 (DMG-PEG2000) 或2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺 (ALC-0159)。

【0025】在某些實施例中，所述基於膽固醇的脂質是膽固醇。

【0026】在某些實施例中，所述輔助脂質是1,2-二油醯基-SN-甘油-3-磷醯乙醇胺 (DOPE) 或1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷醯膽鹼 (DSPC)。

【0027】在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000、莫耳比為28.5%的膽固醇、和莫耳比為30%的DOPE。

【0028】在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的cKK-E10、莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000、莫耳比為28.5%的膽固醇和莫耳比為30%的DOPE。

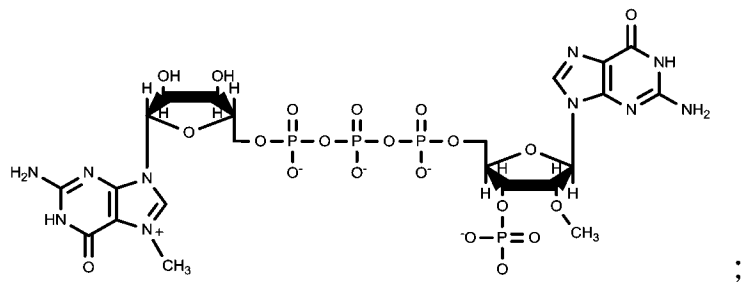
【0029】在某些實施例中，所述LNP的平均直徑為30 nm至200 nm。在某些實施例中，所述LNP的平均直徑為80 nm至150 nm。

【0030】在某些實施例中，所述mRNA包含與SEQ ID NO: 6所示的核酸序列具有至少80%同一性的核酸序列。

【0031】在某些實施例中，所述mRNA包含與SEQ ID NO: 14所示的核酸序列具有至少80%同一性的核酸序列。

【0032】在某些實施例中，其中所述mRNA包含以下結構元件：

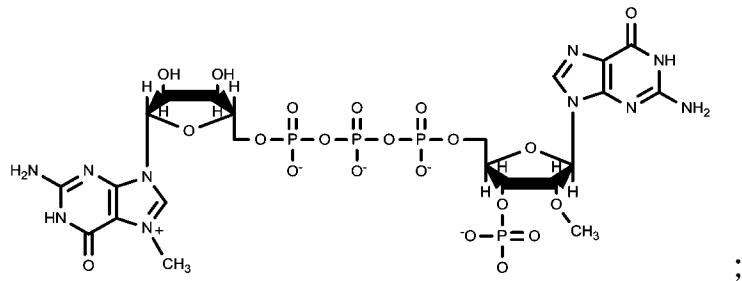
(i) 具有以下結構的5'帽：



- (ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；
- (iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；
- (iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和
- (v) 聚(A)尾。

【0033】 在一態樣，本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，所述疫苗包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），其中所述mRNA包含以下結構元件：

- (i) 具有以下結構的5'帽：

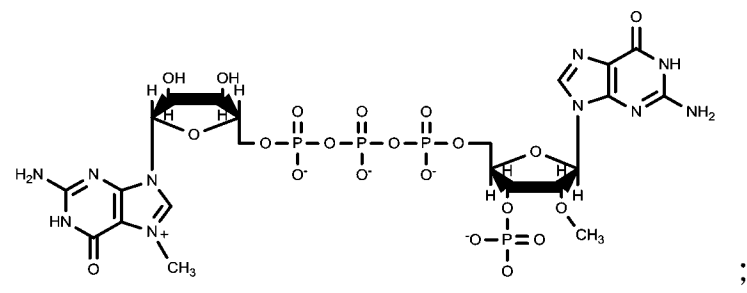


- (ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；
- (iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；
- (iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和
- (v) 聚(A)尾；

其中所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中，其包含：莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000、莫耳比為28.5%的膽固醇和莫耳比為30%的DOPE。

【0034】 在一態樣，本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），其中所述mRNA包含以下結構元件：

(i) 具有以下結構的5'帽：



- (ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；
- (iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；
- (iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和
- (v) 聚(A)尾；

其中所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中，所述脂質奈米顆粒包含：莫耳比為40%的cKK-E10、莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000、莫耳比為28.5%的膽固醇和莫耳比為30%的DOPE。

【0035】 在另一態樣，本揭露提供了一種引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的方法，所述方法包括向個體投予以上所述RSV疫苗。

【0036】 在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 1的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更高的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【0037】 在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予蛋白RSV疫苗的個體具有相當的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【0038】在某些實施例中，所述蛋白RSV疫苗與佐劑共同投予。

【0039】在某些實施例中，所述RSV疫苗增加對所述RSV F蛋白的Ø位點具有結合特異性的抗體的血清濃度。

【0040】在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 2的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更低的對所述RSV F蛋白的位點I或位點II具有結合特異性的抗體的血清濃度。

【0041】在某些實施例中，所述RSV疫苗增加預先存在RSV免疫的個體的中和抗體的血清濃度。

【0042】在另一態樣，本揭露提供了一種用於引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的RSV疫苗，其包括向個體投予上述RSV疫苗。

【0043】在某些實施例中，上述RSV疫苗用於製造用於引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的藥劑。

【圖式簡單說明】

【0044】根據以下說明性實施例的詳細描述結合附圖，將更充分地理解本揭露的前述和其他特徵和優點。

【0045】圖1A-圖1B描繪了來自轉染細胞的FD1、FD2和FD3蛋白的蛋白質印跡圖像。使用MIRUS套組用3 µg mRNA轉染接種在6孔板中的HEK293FT細胞，並且在轉染後24小時回收細胞裂解物（FD1和FD3）或細胞上清液（FD2）（圖1A）。藉由無細胞手段使用體外轉錄（IVT）套組產生蛋白質並且與來自FD1 mRNA轉染細胞的蛋白質進行比較來評價FD1 mRNA。將回收的樣品運行蛋白質印跡分析，並且將膜用5353C75單株抗體染色（圖1B）。

【0046】 圖2A-圖2B描繪了轉染HEK與核轉染HskMC的蛋白質印跡。使用MIRUS套組用5 µg mRNA轉染接種在6孔板中的HEK293FT細胞，在轉染後24小時回收細胞裂解物（FD1和FD3）或細胞上清液（FD2）（圖2A）。使用Amaxa鹼性核轉染套組將HskM細胞用5 µg mRNA核轉染，並且在核轉染後24小時回收細胞裂解物（FD1和FD3）或細胞上清液（FD2）（圖2B）。將回收的樣品運行蛋白質印跡分析，並且將膜用5353C75單株抗體染色。

【0047】 圖3描繪了轉染HEK細胞的免疫染色。使用MIRUS套組細胞用5 µg mRNA轉染接種在24孔板中的HEK293FT細胞。轉染後24小時，將單株抗體D25和Synagis添加到具有帶螢光標籤的二抗的板中，並且使用Celigo成像。

【0048】 圖4A-圖4B描繪了所選RSV抗原在幼稚非人靈長類動物（NHP）中的免疫原性。對每種抗原組合物在第0、28和56天測量RSV F蛋白抗體力價（圖4A）和RSV微中和力價（圖4B）。

【0049】 圖5描繪了用NHP的血清進行的競爭性ELISA的結果，所述NHP是用針對三種已知RSV F蛋白抗體D25、Synagis（帕利珠單抗）和131-2a的選定RSV抗原免疫的。

【0050】 圖6A-圖6B描繪了藉由RSV F ELISA和RSV微中和測定得出的在食蟹猴中的免疫前加強效果。藉由終點ELISA使用DS-Cav1 Pre-F蛋白作為結合抗原測量加強猴中的抗RSV-F抗體力價，並且用山羊抗人IgG檢測。示出了D0、D14和D28時間點的單獨動物（n=6）的讀數，其中GMT +/- 95%置信區間（高於各自的值 = GMT）。使用雙因素方差分析與用於多重比較的圖基事後檢定（Tukey's post-hoc test）進行統計分析（圖6A）。在Vero細胞的96孔板中，使用與經免疫接種的猴的序列稀釋血清混合的WT A2-GFP RSV毒株，藉由微中和測定來測量

RSV中和抗體力價。藉由計算24小時培育後螢光焦點的反向減少來確定力價。示出了D0、D14和D28時間點的單獨動物（n=6）的讀數，其中GMT +/- 95%置信區間（高於各自的值 = GMT）。使用雙因素方差分析與用於多重比較的圖基事後檢定進行統計分析（圖6B）。

【0051】圖7描繪了在用表現FD3 F蛋白的mRNA免疫的NHP中的RSV F蛋白抗體力價。用含有幾種陽離子脂質之一的脂質奈米顆粒（LNP）遞送mRNA。在第0、21和35天測量每種抗原組合物的抗體力價。

【0052】圖8描繪了在用表現FD3 F蛋白的mRNA免疫的NHP中的RSV中和力價。用含有幾種陽離子脂質之一的脂質奈米顆粒（LNP）遞送mRNA。在第0、21和35天測量每種抗原組合物的抗體力價。

【0053】圖9A-圖9B描繪了所選RSV抗原在幼稚小鼠中的免疫原性。對每種抗原組合物在第0、21和35天測量RSV F蛋白抗體力價（圖9A）和RSV微中和力價（圖9B）。

【0054】圖10A-圖10B描繪了在模組化免疫體外構建體（MIMIC®）系統中用選定RSV抗原的Pre-F IgG力價（圖10A）和Pre-F/Post-F結合比（圖10B）。

【0055】圖11描繪了MIMIC®系統中的抗RSV中和力價，所述MIMIC®系統源自具有預先存在的RSV免疫的供體。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0056】本申請要求2021年11月5日提交的美國臨時申請號63/276,233和2022年3月16日提交的歐洲臨時申請號22315065.7的權益，出於所有目的將它們各自藉由引用以其整體併入本文。

【0057】本揭露尤其涉及編碼RSV F蛋白的新型RNA（例如，mRNA）組合物以及用其進行疫苗接種的方法。特別地，本揭露涉及配製在脂質奈米顆粒（LNP）中的編碼RSV Pre-F蛋白的mRNA。

I. 定義

【0058】除非本文另有規定，否則與本發明結合使用的科學和技術術語應當具有本領域普通技術人員通常理解的含義。儘管與本文所述的那些類似或等同的方法和材料也可以用於本發明的實踐或測試，但是下文描述了例示性方法和材料。在發生衝突的情況下，應以包括定義在內的本說明書為準。通常，本文所述的結合細胞和組織培養、分子生物學、病毒學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、合成有機化學、醫學和藥物化學、蛋白質和核酸化學和雜交使用的命名法以及其技術是本領域熟知且常用的那些。根據製造商的說明書如本領域通常所實現的或如本文所述的那樣進行酶促反應和純化技術。進一步地，除非上下文另有要求，否則單數術語應當包括複數，並且複數術語應當包括單數。在整個本說明書和實施例中，詞語“具有（have）”和“包含（comprise）”或變型諸如“具有（has）”、“具有（having）”、“包含（comprises）”或“包含（comprising）”應被理解為暗示包括所陳述的整數或整數組，但是不排除任何其他整數或整數組。將本文提及的所有出版物和其他參考文獻均藉由引用以其整體併入。儘管本文引用了許多文件，但此引用並不意味著承認這些文件中的任一個構成本領域公知常識的一部分。

【0059】應注意，術語“一個/種（a）”或“一個/種（an）”實體是指一個/種或多個/種所述實體：例如，“一個核苷酸序列”應理解為代表一個或多個核苷酸序列。因此，術語“一個/種（a或an）”、“一個/種或多個/種（one or more）”以及“至少一個/種（at least one）”在本文中可以互換使用。

【0060】此外，在本文中使用時將“和/或”視為對兩個指定特徵或組分中的每一個具有或不具有另一者的具體公開內容。因此，如在本文中以短語諸如“A和/或B”使用的術語“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”（單獨）和“B”（單獨）。同樣，如以短語諸如“A、B和/或C”使用的術語“和/或”旨在涵蓋以下態樣中的每一個：A、B和C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A和C；A和B；B和C；A（單獨）；B（單獨）；以及C（單獨）。

【0061】應理解，無論在本文中將多態樣用語言“包含”來描述的情況如何，還提供以“由……組成”和/或“基本上由……組成”措辭描述的其他類似態樣。

【0062】除非另外定義，否則本文所使用的所有技術和科學術語均具有與本揭露所涉及領域的普通技術人員通常所理解的相同的含義。例如，Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei- Show, 第2版, 2002, CRC Press；The Dictionary Of Cell And Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press；以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修訂版, 2000, Oxford University Press可以為技術人員提供本揭露中所用的許多術語的通用詞典。

【0063】單位、首碼和符號均以其國際單位制（SI）可接受的形式表示。數值範圍包括限定範圍的數字。除非另有指示，否則胺基酸序列以胺基到羧基的

方向從左到右書寫。本文提供的標題不是對本揭露的各個態樣的限制。因此，藉由從整體上參考說明書，可以更全面地定義下文緊接著定義的術語。

【0064】 術語“大約”或“約”在本文中用於意指大約、大致、大概或在……左右。當術語“約”結合數值範圍使用時，它藉由擴展所述數值上下的邊界來修改該範圍。通常，術語“約”可以藉由方差（例如，10%、向上或向下）將數值修飾為高於和低於所述值（更高或更低）。在一些實施例中，所述術語指示與指示數值偏差 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 或 $\pm 0.01\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 10\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 5\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 4\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 3\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 2\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 1\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.9\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.8\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.7\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.6\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.5\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.4\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.3\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.1\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.05\%$ 。在一些實施例中，“約”指示與指示數值偏差 $\pm 0.01\%$ 。

【0065】 如本文所用，術語“傳訊RNA”或“mRNA”指編碼至少一種多肽的多核苷酸。如本文所用，mRNA包括經修飾的RNA和經未修飾的RNA兩者。mRNA可以含有一個或多個編碼區和非編碼區。編碼區可替代地稱為開放閱讀框

(ORF)。mRNA中的非編碼區包括5'帽、5'非轉譯區(UTR)、3' UTR和聚(A)尾。mRNA可以從天然來源純化，使用重組表現系統(例如，體外轉錄)產生，以及任選地純化或化學合成。

【0066】如本文所用，術語“抗原位點Ø”或“位點Ø表位”是指位於融合前RSV F三聚體頂點的位點，其包含野生型RSV F (SEQ ID NO: 1)的胺基酸殘基62-69和196-209。位點Ø表位是對融合前RSV F具有特異性的抗體(諸如D25和AM14)的結合位點，並且抗體與位點Ø表位的結合阻斷了RSV的細胞表面附接(參見例如，McLellan等人, Science 340(6136):1113-1117, 2013)。重組人抗RSV抗體D25 (Creative Biolabs®; 目錄號: PABL-322)和重組人抗RSV抗體AM14 (Creative Biolabs®; 目錄號: PABL-321)各自是可商購的。

【0067】如本文所用，術語“抗原穩定性”是指抗原隨時間或在溶液中的穩定性。

【0068】如本文所用，術語“空腔填充取代”是指用於填充存在於融合前RSV F三聚體中的空腔的工程化疏水性取代。

【0069】如本文所用，術語“F蛋白”或“RSV F蛋白”是指在病毒進入期間負責驅動病毒包膜與宿主細胞膜的融合的RSV蛋白。

【0070】如本文所用，術語“RSV F多肽”或“F多肽”是指包含F蛋白的至少一個表位的多肽。

【0071】如本文所用，術語“聚糖添加”是指引入野生型RSV F中不存在的糖基化位點的突變的添加，其可以被工程化以增加構建體表現、增加構建體穩定性或阻斷融合前構形與融合後構形之間共用的表位。包含聚糖添加的經修飾蛋

白將具有更多的醣基化，因此具有更高的分子量。聚糖添加可以降低RSV F多肽引發針對RSV F的融合後構形的抗體的程度。

【0072】如本文所用，術語“原體內穩定化取代”是指RSV F中的胺基酸取代，其藉由穩定化RSV F三聚體的原體內的相互作用來穩定化融合前構形。

【0073】如本文所用，術語“原體間穩定化取代”是指RSV F中的胺基酸取代，其藉由穩定化RSV F三聚體的原體彼此的相互作用來穩定化融合前構形。

【0074】如本文所用，術語“蛋白酶切割”是指多肽序列中易感殘基（例如，離胺酸或精胺酸）的蛋白水解（有時也稱為“剪切”）。

【0075】如本文所用，關於RSV F的術語“融合後”是指RSV F的在病毒和細胞膜融合之後出現的穩定構形。

【0076】如本文所用，關於RSV F的術語“融合前”是指RSV F的在病毒-細胞相互作用之前所採取的構形。

【0077】如本文所用，術語“原體”是指寡聚蛋白質的結構單位。在RSV F的情況下，RSV F三聚體的單獨單元是原體。

【0078】如本文所用，術語“N-聚糖”是指在蛋白質的N（天門冬醯胺酸）殘基的醯胺氮處附接至蛋白質的糖鏈。這樣，藉由N-醣基化過程形成N-聚糖。此聚糖可以是多糖。

【0079】如本文所用，術語“醣基化”是指向蛋白質添加糖單元。

【0080】如本文所用，術語“免疫反應”是指免疫系統的細胞（諸如B細胞、T細胞、樹突細胞、巨噬細胞或多形核細胞）對刺激物（諸如抗原或疫苗）的反應。免疫反應可以包括身體的參與宿主防禦反應的任何細胞，包括例如分泌干

擾素或細胞激素的上皮細胞。免疫反應包括但不限於先天性和/或適應性免疫反應。

【0081】如本文所用，“保護性免疫反應”是指保護個體免受感染（例如，預防感染或預防與感染相關的疾病的發生）的免疫反應。測量免疫反應的方法包括測量例如淋巴細胞（諸如B或T細胞）的增殖和/或活性、細胞激素或趨化因子的分泌、發炎、抗體產生等。

【0082】如本文所用，“抗體反應”是產生抗體的免疫反應。

【0083】如本文所用，“抗原”是指引發免疫反應的因子；和/或當暴露或投予於生物體時由T細胞受體結合的因子（例如，當由MHC分子呈遞時）或與抗體（例如，由B細胞產生）結合的因子。在一些實施例中，抗原在生物體中引發體液反應（例如，包括抗原特異性抗體的產生）。可替代地或另外，在一些實施例中，抗原在生物體中引發細胞反應（例如，涉及其受體與抗原特異性相互作用的T細胞）。特定抗原可以在靶生物體（例如，小鼠、兔、靈長類動物、人）的一個或幾個成員中引發免疫反應，但是不能在靶生物體物種的所有成員中引發免疫反應。在一些實施例中，抗原在靶生物體物種的至少約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的成員中引發免疫反應。在一些實施例中，抗原與抗體和/或T細胞受體結合，並且在生物體中可能誘導或可能不誘導特定生理反應。在一些實施例中，例如，抗原可以在體外與抗體和/或T細胞受體結合，無論在體內是否發生這種相互作用。在一些實施例中，抗原與特定體液或細胞免疫的產物反應。抗原包括由如本文所述mRNA編碼的RSV多肽。

【0084】如本文所用，“佐劑”是指增強對抗原的免疫反應的物質或媒劑。佐劑可以包括但不限於其上吸附有抗原的礦物質（例如，明礬、氫氧化鋁或磷酸鹽）的懸浮液；抗原溶液乳化在礦物油中或水中的油包水或水包油乳劑（例如，弗氏不完全佐劑）。有時包括殺死的分枝桿菌（例如，弗氏完全佐劑）以進一步增強抗原性。免疫刺激寡核苷酸（例如，CpG模體）也可以用作佐劑（例如，參見美國專利號6,194,388；6,207,646；6,214,806；6,218,371；6,239,116；6,339,068；6,406,705；和6,429,199）。佐劑還可以包括生物分子，諸如Toll樣受體（TLR）激動劑和共刺激分子。

【0085】如本文所用，“抗原RSV多肽”是指包含全部或部分RSV胺基酸序列的多肽，所述RSV胺基酸序列的長度足以使所述分子具有關於RSV的抗原性。

【0086】如本文所用，“個體”是指動物界的任何成員。在一些實施例中，“個體”是指人。在一些實施例中，“個體”是指非人動物。在一些實施例中，個體包括但不限於哺乳動物、鳥、爬行動物、兩棲動物、魚、昆蟲和/或蠕蟲。在某些實施例中，所述非人類個體是哺乳動物（例如，齧齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、貓、綿羊、牛、靈長類動物和/或豬）。在一些實施例中，個體可以是轉基因動物、基因工程化動物和/或選殖株。在某些實施例中，個體是成年人、青少年或嬰兒。在一些實施例中，術語“個人”或“患者”被使用並且旨在與“個體”可互換。在某些例示性實施例中，個體是早產新生兒（例如，小於37週的胎齡）、新生兒（例如，0-27天的年齡）、嬰兒或幼兒（例如，28天至23個月的年齡）、兒童（例如，2至11歲的年齡）、青少年（例如，12至17歲的年齡）、成人（例如，18至50歲或18至64歲的年齡）或老年人（例如，65歲或以上的年齡）。在

例示性實施例中，個體是18至50歲的年齡。在其他例示性實施例中，個體是老年成人（例如，年齡60歲或以上的成人）。

【0087】如本文所用，術語“疫苗接種（vaccination）”或“疫苗接種（vaccinate）”是指投予旨在例如對致病因子產生免疫反應的組合物。疫苗接種可以在暴露於致病因子和/或發生一種或多種症狀之前、期間和/或之後投予，並且在一些實施例中，在暴露於致病因子之前、期間和/或之後不久投予。在一些實施例中，疫苗接種包括間隔適當時間多次投予疫苗接種組合物。

【0088】本揭露描述了分別與給定核酸序列或胺基酸序列（參考序列）具有一定同一性程度的核酸序列（例如，DNA和RNA序列）和胺基酸序列。

【0089】兩個核酸序列之間的“序列同一性”指示序列之間相同的核苷酸的百分比。兩個胺基酸序列之間的“序列同一性”指示序列之間相同的胺基酸的百分比。

【0090】術語“相同%”、“同一性%”或類似術語旨在具體是指在待比較的序列之間的最佳比對中相同的核苷酸或胺基酸的百分比。所述百分比是純粹統計學的，並且兩個序列之間的差異可以但不一定隨機分佈在待比較的序列的整個長度上。兩個序列的比較通常藉由以下方式進行：在最佳比對之後，關於區段或“比較視窗”比較所述序列，以鑒定相應序列的局部區域。用於比較的最佳比對可以手動進行，或者借助Smith和Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482的局部同源性演算法、借助Needleman和Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443的局部同源性演算法、借助Pearson和Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444的相似性搜索演算法或借助使用所述演算法的電腦程式（Wisconsin Genetics Software

Package中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.) 進行。

【0091】藉由以下方式獲得同一性百分比：確定待比較的序列對應的相同位置的數目，用此數目除以比較的位置的數目（例如，參考序列中的位置的數目），並且將此結果乘以100。

【0092】在一些實施例中，同一性程度是針對區域給出的，所述區域是參考序列的整個長度的至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%或約100%。例如，如果參考核酸序列由200個核苷酸組成，則針對至少約100、至少約120、至少約140、至少約160、至少約180或約200個核苷酸（在一些實施例中為連續核苷酸）給出同一性程度。在一些實施例中，針對參考序列的整個長度給出同一性程度。

【0093】分別與給定核酸序列或胺基酸序列具有特定同一性程度的核酸序列或胺基酸序列可以具有所述給定序列的至少一種功能特性，例如並且在一些情況下，在功能上等同於所述給定序列。在一些實施例中，與給定核酸序列或胺基酸序列具有特定同一性程度的核酸序列或胺基酸序列在功能上等同於所述給定序列。

【0094】如本文所用，術語“套組”是指一組經包裝的相關組分，諸如一種或多種化合物或組合物和一種或多種相關材料，諸如溶劑、溶液、緩衝液、說明書或乾燥劑。

II. RNA

【0095】本揭露的RSV疫苗可以包含至少一種核糖核酸（RNA），其包含編碼RSV F蛋白抗原的ORF。在某些實施例中，所述RNA是包含編碼RSV F蛋白

抗原的ORF的傳訊RNA (mRNA)。在某些實施例中，所述RNA (例如，mRNA) 進一步包含至少一個5' UTR、3' UTR、聚(A)尾和/或5'帽。

II.A. 5'帽

【0096】 mRNA 5'帽可以提供對大多數真核細胞中發現的核酸酶的抗性，並且促進轉譯效率。已知幾種類型的5'帽。7-甲基鳥苷帽 (也稱為“m⁷G”或“帽-0”) 包含鳥苷，其藉由5' - 5'三磷酸鍵與第一轉錄核苷酸連接。

【0097】 典型地如下添加5'帽：首先，RNA末端磷酸酶從5'核苷酸中除去一個末端磷酸基團，留下兩個末端磷酸；然後，經由鳥苷鹽基轉移酶向末端磷酸中添加鳥苷三磷酸 (GTP)，產生5'5'5三磷酸鍵聯；然後，藉由甲基轉移酶甲基化鳥嘌呤的7-氮。帽結構的例子包括但不限於m⁷G(5')ppp·(5'(A,G(5')ppp(5')A和G(5')ppp(5')G。美國公開號US 2016/0032356和美國公開號US 2018/0125989中描述了另外的帽結構，將其藉由引用併入本文。

【0098】 多核苷酸的5'加帽可以根據製造商的方案使用以下化學RNA帽類似物在體外轉錄反應期間伴隨完成，以產生5'-鳥苷帽結構：

3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G (ARCA帽) ； G(5')ppp(5')A ； G(5')ppp(5')G ；

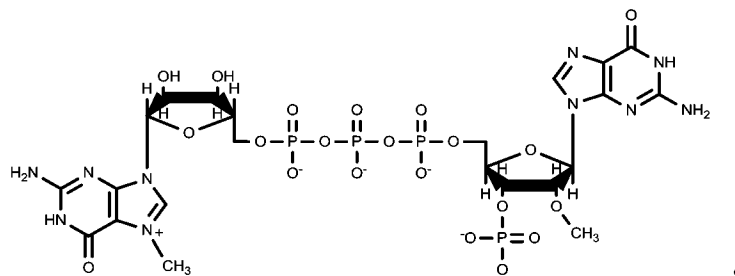
m⁷G(5')ppp(5')A ； m⁷G(5')ppp(5')G ； m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG ；

m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU ； m⁷G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG (New England BioLabs, Ipswich, MA; TriLink Biotechnologies)。經修飾RNA的5'-加帽可以在轉錄後使用痘苗病毒加帽酶產生帽0結構m⁷G(5')ppp(5')G來完成。帽1結構可以使用痘苗病毒加帽酶和2'-O甲基-轉移酶兩者產生m⁷G(5')ppp(5')G-2'-O-甲基來產生。可以從帽1結構產生帽2結構，然後使用2'-O甲基-轉移酶對5'倒數第三個核苷酸進

行2'-O-甲基化。可以從帽2結構產生帽3結構，然後使用2'-O甲基-轉移酶對5'倒數第四個核苷酸進行2'-O-甲基化。

【0099】 在某些實施例中，本揭露的mRNA包含選自以下的5'帽：
3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (ARCA帽)、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、
m7G(5')ppp(5')A、m7G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG、
m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU和m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG。

【0100】 在某些實施例中，本揭露的mRNA包含5'帽：



II.B.非轉譯區 (UTR)

【0101】 在一些實施例中，本揭露的mRNA包含5'和/或3'非轉譯區 (UTR)。在mRNA中，5' UTR在轉錄起始位點處開始並且繼續到起始密碼子，但是不包括起始密碼子。3' UTR緊接終止密碼子之後開始並且繼續直到轉錄終止信號。

【0102】 在一些實施例中，本文公開的mRNA可以包含5' UTR，其包括影響mRNA的穩定性或轉譯的一種或多種元件。在一些實施例中，5' UTR可以具有約10至5,000個核苷酸的長度。在一些實施例中，5' UTR可以具有約50至500個核苷酸的長度。在一些實施例中，5' UTR具有至少約10個核苷酸的長度、約20個核苷酸的長度、約30個核苷酸的長度、約40個核苷酸的長度、約50個核苷酸的長度、約100個核苷酸的長度、約150個核苷酸的長度、約200個核苷酸的長度、約250個核苷酸的長度、約300個核苷酸的長度、約350個核苷酸的長度、約400

個核苷酸的長度、約450個核苷酸的長度、約500個核苷酸的長度、約550個核苷酸的長度、約600個核苷酸的長度、約650個核苷酸的長度、約700個核苷酸的長度、約750個核苷酸的長度、約800個核苷酸的長度、約850個核苷酸的長度、約900個核苷酸的長度、約950個核苷酸的長度、約1,000個核苷酸的長度、約1,500個核苷酸的長度、約2,000個核苷酸的長度、約2,500個核苷酸的長度、約3,000個核苷酸的長度、約3,500個核苷酸的長度、約4,000個核苷酸的長度、約4,500個核苷酸的長度或約5,000個核苷酸的長度。

【0103】 在一些實施例中，本文公開的mRNA可以包含3' UTR，其包含以下中的一種或多種：多腺苷酸化信號、影響mRNA在細胞中的位置的穩定性的蛋白質的結合位點、或miRNA的一個或多個結合位點。在一些實施例中，3' UTR可以具有50至5,000個核苷酸或更長的長度。在一些實施例中，3' UTR可以具有50至1,000個核苷酸或更長的長度。在一些實施例中，3' UTR具有至少約50個核苷酸的長度、約100個核苷酸的長度、約150個核苷酸的長度、約200個核苷酸的長度、約250個核苷酸的長度、約300個核苷酸的長度、約350個核苷酸的長度、約400個核苷酸的長度、約450個核苷酸的長度、約500個核苷酸的長度、約550個核苷酸的長度、約600個核苷酸的長度、約650個核苷酸的長度、約700個核苷酸的長度、約750個核苷酸的長度、約800個核苷酸的長度、約850個核苷酸的長度、約900個核苷酸的長度、約950個核苷酸的長度、約1,000個核苷酸的長度、約1,500個核苷酸的長度、約2,000個核苷酸的長度、約2,500個核苷酸的長度、約3,000個核苷酸的長度、約3,500個核苷酸的長度、約4,000個核苷酸的長度、約4,500個核苷酸的長度或約5,000個核苷酸的長度。

【0104】 在一些實施例中，本文公開的mRNA可以包含5'或3' UTR，其源自與由mRNA轉錄物編碼的基因不同的基因（即，UTR是異源UTR）。

【0105】 在某些實施例中，5'和/或3' UTR序列可以源自穩定的mRNA（例如，珠蛋白、肌動蛋白、GAPDH、微管蛋白、組蛋白或檸檬酸循環酶），以增加mRNA的穩定性。例如，5' UTR序列可以包括部分序列的CMV立即早期1(IE1)基因或其片段，以改善mRNA的核酸酶抗性和/或改善mRNA的半衰期。還考慮了將編碼人生長激素(hGH)的序列或其片段包含到mRNA的3'端或非轉譯區。通常，相對於其未經修飾的對應物，這些修飾可以改善mRNA的穩定性和/或藥動學特性（例如，半衰期），並且包括例如為改善mRNA對體內核酸酶消化的這種抗性而進行的修飾。

【0106】 例示性5' UTR包括源自CMV立即早期1(IE1)基因的序列（美國公開號2014/0206753和2015/0157565，將其中的每一個藉由引用併入本文）或序列GGGAUCCUACC（SEQ ID NO: 18）（美國公開號2016/0151409，藉由引用併入本文）。

【0107】 在各種實施例中，5' UTR可以源自TOP基因的5' UTR。TOP基因的特徵典型地在於5'-末端寡嘧啶（TOP）束的存在。此外，大多數TOP基因的特徵在於生長相關的轉譯調節。然而，具有組織特異性轉譯調節的TOP基因也是已知的。在某些實施例中，源自TOP基因的5' UTR的5' UTR缺乏5' TOP模體（寡嘧啶束）（例如，美國公開號2017/0029847、2016/0304883、2016/0235864和2016/0166710，將其中的每一個藉由引用併入本文）。

【0108】 在某些實施例中，5' UTR源自核糖體蛋白大32(L32)基因（美國公開號2017/0029847，同上）。

【0109】在某些實施例中，5' UTR源自羥基類固醇（17-b）脫氫酶4基因（HSD17B4）的5' UTR（美國公開號2016/0166710，同上）。

【0110】在某些實施例中，5' UTR源自ATP5A1基因的5' UTR（美國公開號2016/0166710，同上）。

【0111】在一些實施例中，使用內部核糖體進入位點（IRES）代替5' UTR。

【0112】在一些實施例中，5'UTR包含SEQ ID NO: 10所示的核酸序列。在一些實施例中，3'UTR包含SEQ ID NO: 11所示的核酸序列。5' UTR和3' UTR進一步詳細描述於WO2012/075040（藉由引用併入本文）中。

II.C. 多腺苷酸化尾

【0113】如本文所用，術語“聚(A)序列”、“聚(A)尾”和“聚(A)區”是指mRNA分子的3'端處的腺苷核苷酸序列。聚(A)尾可以為mRNA賦予穩定性，並且保護其免於外切核酸酶降解。聚(A)尾可以增強轉譯。在一些實施例中，聚(A)尾實質上是同聚物的。例如，100個腺苷核苷酸的聚(A)尾實質上可以具有100個核苷酸的長度。在某些實施例中，聚(A)尾可以被與腺苷核苷酸不同的至少一個核苷酸（例如，不是腺苷核苷酸的核苷酸）中斷。例如，100個腺苷核苷酸的聚(A)尾可以具有超過100個核苷酸的長度（包含100個腺苷核苷酸和與腺苷核苷酸不同的至少一個核苷酸或一段核苷酸）。在某些實施例中，聚(A)尾包含序列

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAA
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA（SEQ ID NO: 19）。

【0114】如本文所用，“聚(A)尾”典型地涉及RNA。然而，在本揭露的上下文中，所述術語同樣涉及DNA分子中的相應序列（例如，“聚(T)序列”）。

【0115】聚(A)尾可以包含約10至約500個腺苷核苷酸、約10至約200個腺苷核苷酸、約40至約200個腺苷核苷酸、或約40至約150個腺苷核苷酸。聚(A)尾的長度可以是至少約10、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450或500個腺苷核苷酸。

【0116】在核酸是RNA的一些實施例中，在RNA體外轉錄期間從DNA模板獲得核酸的聚(A)尾。在某些實施例中，藉由常用的化學合成方法在體外獲得聚(A)尾，而無需從DNA模板轉錄。在各種實施例中，使用可商購獲得的多腺苷酸化套組和相應的方案藉由對RNA進行酶促多腺苷酸化（在RNA體外轉錄後），或者可替代地，藉由使用固定化的聚(A)聚合酶，例如使用如WO2016/174271中所述的方法和手段，產生聚(A)尾。

【0117】核酸可以包含藉由酶促多腺苷酸化獲得的聚(A)尾，其中大部分核酸分子包含約100（+/-20）至約500（+/-50）或約250（+/-20）個腺苷核苷酸。

【0118】在一些實施例中，核酸可以包含源自模板DNA的聚(A)尾，並且可以另外包含藉由酶促多腺苷酸化產生的至少一個另外的聚(A)尾，例如如WO2016/091391中所述。

【0119】在某些實施例中，核酸包含至少一個多腺苷酸化信號。

【0120】在各種實施例中，核酸可以包含至少一個聚(C)序列。

【0121】如本文所用，術語“聚(C)序列”旨在是多達約200個胞嘧啶核苷酸的胞嘧啶核苷酸序列。在一些實施例中，聚(C)序列包含約10至約200個胞嘧啶核苷酸、約10至約100個胞嘧啶核苷酸、約20至約70個胞嘧啶核苷酸、約20至約60個胞嘧啶核苷酸或約10至約40個胞嘧啶核苷酸。在一些實施例中，聚(C)序列包含約30個胞嘧啶核苷酸。

II.D. 化學修飾

【0122】 本文公開的mRNA可以是經修飾的或未經修飾的。在一些實施例中，mRNA可以包含至少一個化學修飾。在一些實施例中，本文公開的mRNA可以含有一個或多個典型地增強RNA穩定性的修飾。例示性修飾可以包括骨架修飾、糖修飾或鹼基修飾。在一些實施例中，所公開的mRNA可以由天然存在的核苷酸和/或核苷酸類似物（經修飾的核苷酸）（包括但不限於嘌呤（腺嘌呤（A）和鳥嘌呤（G））或嘧啶（胸腺嘧啶（T）、胞嘧啶（C）和尿嘧啶（U）））合成。在某些實施例中，所公開的mRNA可以由嘌呤和嘧啶的經修飾的核苷酸類似物或衍生物合成，所述類似物或衍生物例如像1-甲基-腺嘌呤、2-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-異戊烯基-腺嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、N6-異戊烯基-腺嘌呤、2-硫代-胞嘧啶、3-甲基-胞嘧啶、4-乙醯基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、2,6-二胺基嘌呤、1-甲基-鳥嘌呤、2-甲基-鳥嘌呤、2,2-二甲基-鳥嘌呤、7-甲基-鳥嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、假尿嘧啶（5-尿嘧啶）、二氫-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-(羧基羥基甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-甲基-尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、5-甲基胺基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸 (v)、1-甲基-假尿嘧啶、腺苷、 β -D-甘露糖基-腺苷、胺基磷酸酯、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基磷酸酯、7-去氮鳥苷、5-甲基胞嘧啶和肌苷。

【0123】 在一些實施例中，所公開的mRNA可以包含至少一個化學修飾，包括但不限於假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、

2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

【0124】 在一些實施例中，所述化學修飾選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲氧基尿苷及其組合。

【0125】 在一些實施例中，化學修飾包含N1-甲基假尿苷。

【0126】 在一些實施例中，所述mRNA中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【0127】 在一些實施例中，所述ORF中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【0128】 此類類似物的製備描述在例如美國專利號4,373,071、美國專利號4,401,796、美國專利號4,415,732、美國專利號4,458,066、美國專利號4,500,707、美國專利號4,668,777、美國專利號4,973,679、美國專利號5,047,524、美國專利號5,132,418、美國專利號5,153,319、美國專利號5,262,530和美國專利號5,700,642。

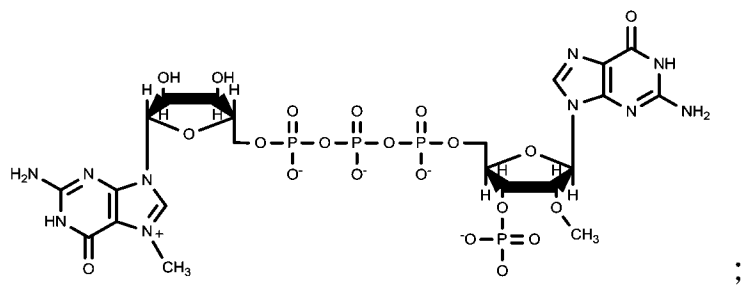
II.E. mRNA合成

【0129】 本文公開的mRNA可以根據多種方法中的任一種合成。例如，根據本揭露的mRNA可以經由體外轉錄（IVT）合成。一些用於體外轉錄的方法描述在例如Geall等人 (2013) Semin. Immunol. 25(2): 152-159; Brunelle等人 (2013)

Methods Enzymol. 530:101-14中。簡而言之，典型地用以下進行IVT：含有啟動子的線性或環狀DNA模板、核糖核苷三磷酸庫、可以包括DTT和鎂離子的緩衝系統、適當的RNA聚合酶（例如，T3、T7或SP6 RNA聚合酶）、DNA酶I、焦磷酸酶和/或RNA酶抑制劑。確切的條件可以根據具體應用而變化。這些試劑的存在通常在最終mRNA產物中是不希望的，並且這些試劑可以被認為是可以純化或除去的雜質或污染物，以提供適用於治療用途的無污染的和/或同質的mRNA。雖然在一些實施例中可能需要從體外轉錄反應提供的mRNA，但根據本揭露可以使用其他來源的mRNA，包括由細菌、真菌、植物和/或動物產生的野生型mRNA。

【0130】在某個實施例中，所述mRNA包含以下結構元件：

(i) 具有以下結構的5'帽：



(ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；

(iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；

(iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和

(v) 聚(A)尾。

【0131】在某些實施例中，聚(A)尾的長度為約10至約500個腺苷核苷酸。

III. RSV F蛋白

【0132】 呼吸道融合病毒（RSV）是屬於肺泡病毒科（*Pneumoviridae*）的反義單股RNA病毒。RSV可能引起呼吸道感染。RSV是在表面上具有糖蛋白（G蛋白）、小疏水蛋白（SH蛋白）和融合蛋白（F蛋白）的包膜病毒。

【0133】 RSV F蛋白負責病毒和宿主細胞膜的融合，並且具有至少三種構形（融合前、中間和融合後構形）。在處於融合前構形（融合前，Pre-F）時，F蛋白以三聚體形式存在，其中主要抗原位點Ø暴露。位點Ø用作由RSV感染個體產生的中和抗體的主要標靶（參見，Coultas等人, *Thorax*. 74: 986-993. 2019；McLellan等人, *Science*. 340(6136): 1113-7. 2013）。在宿主細胞表面上與其標靶結合之後，Pre-F經歷構形變化，在此期間位點Ø不再暴露。Pre-F過渡到暫態中間構形，使得F蛋白能夠插入宿主細胞膜中，導致病毒和宿主細胞膜的融合。最終的構形轉變導致更穩定和細長的蛋白質形式（融合後，Post-F）。F蛋白的位點II和位點IV是Post-F所特有的，而位點I存在於Pre-F和Post-F構形兩者中（McLellan等人, *J. Virol*. 85(15): 7788-7796. 2011）。

【0134】 本文提供了編碼抗原RSV F多肽的RNA（例如，mRNA）。

【0135】 在一態樣，本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），其中所述RSV F蛋白抗原包含與SEQ ID NO: 3具有至少98%同一性的胺基酸序列或由SEQ ID NO: 3的胺基酸序列組成。

【0136】 在一些實施例中，所述ORF是經密碼子優化的。如本文所用，“經密碼子優化的”或“密碼子優化”是指引入某些密碼子（以交換編碼相同胺基酸的相應野生型密碼子），這可能更有利於RNA的穩定性和/或個體的密碼子使用。

【0137】 在一些實施例中，Pre-F與Post-F之間共用的RSV F蛋白的表位被阻斷。當將編碼抗原RSV F多肽的RNA（例如，mRNA）投予於個體時，阻斷表位減少或消除了針對表位的抗體的產生。這可以增加靶向F的特定構形（諸如融合前構形）特有的表位的抗體（例如，靶位點Ø的抗體）的比例。因為F在尚未進入細胞的病毒中具有融合前構形，所以靶向Pre-F的抗體的比例增加可以提供更大的中和度（例如，如本文所述，表示為中和與結合比率）。可以藉由在共用表位附近工程化大體積部分（諸如N-聚糖）來實現阻斷。例如，可以例如藉由將適當的殘基突變為天門冬醯胺酸來添加野生型F中不存在的N-醯基化位點。在一些實施例中，阻斷的表位是RSV F的抗原位點I的表位。在一些實施例中，pre-F與post-F之間共用的兩個或更多個表位被阻斷。在一些實施例中，RSV F的抗原位點I的兩個或更多個表位被阻斷。在一些實施例中，與被阻斷的表位在拓撲上重疊的一個或多個、或全部表位也被阻斷，任選地其中被阻斷的表位是RSV F的抗原位點I的表位。

【0138】 在一些實施例中，RSV F多肽在對應於SEQ ID NO: 1的位置328、348或507的一個或多個位置包含天門冬醯胺酸取代（即，E328N、S348N或R507N）。在一些實施例中，RSV F多肽在對應於SEQ ID NO: 1的位置328、348或507的兩個或更多個位置處包含天門冬醯胺酸取代（即，E328N、S348N或R507N）。在一些實施例中，RSV F多肽在SEQ ID NO: 1的位置328、348和507處包含天門冬醯胺酸取代（即，E328N、S348N和R507N）。

【0139】 如前所示，已經發現此類天門冬醯胺酸可以充當醯基化位點（參見WO2019/195291，藉由引用併入本文）。此外，不希望受任何特定理論的束縛，當將編碼抗原RSV F多肽的RNA（例如，mRNA）投予於個體時，這些位點處的

聚糖可以抑制針對附近表位的抗體的產生，所述附近表位包括融合前和融合後RSV F蛋白共用的表位。在一些實施例中，對應於SEQ ID NO: 1的位置328、348或507的天門冬醯胺酸的糖基化阻斷融合前RSV F與融合後RSV F之間共用的至少一個表位，諸如抗原位點1的表位。抑制針對融合前和融合後RSV F蛋白共有的表位的抗體的產生可能是有益的，因為它可以引導針對融合前RSV F蛋白所特有的表位（諸如位點Ø表位）的抗體產生，所述抗體產生可能比針對其他RSV F表位的抗體具有更有效的中和活性。位點Ø表位涉及SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基62-69和196-209。因此，在一些實施例中，RSV F多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基62-69或196-209。

【0140】 本文所述RSV F多肽可以具有相對於野生型RSV F的不同長度的缺失或取代。例如，在SEQ ID NO: 1的RSV F多肽中，野生型序列（SEQ ID NO: 1）的位置98-144被GSGNVGL（SEQ ID NO: 15）替代，導致淨去除40個胺基酸，使得SEQ ID NO: 1的328、348或507對應於SEQ ID NO: 3的位置288、308和467。替代地，在SEQ ID NO: 3的RSV F多肽中，野生型序列（SEQ ID NO: 1）的位置98-146被GSGNVGLGG（SEQ ID NO: 16，SEQ ID NO: 3的位置98-106）替代，導致淨去除40個胺基酸，使得SEQ ID NO: 1的位置328、348或507對應於SEQ ID NO: 3的位置290、310和469。

【0141】 通常，本文所述構建體中的位置可以藉由成對比對，例如使用具有標準參數（EBLOSUM62矩陣，空位罰分10，空位延伸罰分0.5）的Needleman-Wunsch演算法映射到SEQ ID NO: 1的野生型序列上。還參見作為用於鑒定相應位置的替代性方法的如本文提供的結構比對的討論。

【0142】 在一些實施例中，RSV F多肽包含突變，所述突變為添加聚糖以阻斷融合前抗原上的在結構上與融合後RSV F表面上的那些表位相似的表位。在一些實施例中，添加聚糖以特異性地阻斷可能存在於RSV F的融合後構形中的表位。在一些實施例中，添加聚糖，其阻斷可能存在於RSV F的融合後構形中的表位，但不影響存在於RSV F的融合前構形上的一個或多個表位（諸如位點Ø表位）。

【0143】 在一些實施例中，RSV F多肽包含與SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

【0144】 在一些實施例中，RSV F多肽包含與SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

【0145】 在一些實施例中，RSV F多肽包含DS-CAV1胺基酸取代（如例如McLellan等人, Science, 342(6158): 592-598, 2013中所述），其中進行了進一步的修飾，包括上述的至少一個、兩個或三個天門冬醯胺酸。相對於SEQ ID NO: 1，CAV1突變是S190F和V207L。相對於SEQ ID NO: 1，DS突變是S155C和S290C。

【0146】 在一些實施例中，胺基酸取代或胺基酸取代對是一個或多個原體間穩定化取代。可以是原體間穩定化的例示性取代是V207L；N228F；I217V和E218F；I221L和E222M；或Q224A和Q225L（使用SEQ ID NO: 1的位置編號）。

【0147】 在一些實施例中，胺基酸取代或胺基酸取代對是原體內穩定化的。可以是原體內穩定化的例示性取代是V220I；和A74L和Q81L（使用SEQ ID NO: 1的位置編號）。

【0148】 在一些實施例中，胺基酸取代是螺旋穩定化的，即被預測為其穩定化RSV F的螺旋結構域。螺旋結構域的穩定化通常可以有助於位點Ø表位和RSV

F的融合前構形的穩定性。可以是螺旋穩定化的例示性取代是N216P或I217P（使用SEQ ID NO: 1的位置編號）。SEQ ID NO: 1中的位置217對應於SEQ ID NO: 3中的位置177。

【0149】 在一些實施例中，胺基酸取代是螺旋加帽。在一些實施例中，胺基酸取代是螺旋PRO加帽。螺旋加帽是基於以下的生物物理觀察結果：雖然 α 螺旋中的脯胺酸殘基突變放置可能破壞螺旋的形成，但螺旋區N末端處的脯胺酸可以藉由穩定化PHI/PSI鍵角來幫助誘導螺旋形成。可以是螺旋加帽的例示性取代是N216P或I217P（使用SEQ ID NO: 1的位置編號）。

【0150】 在一些實施例中，胺基酸取代替代DS-CAV1的二硫化物突變。在一些實施例中，將DS-CAV1的工程化二硫化物回復為DS-CAV1的野生型（C69S和/或C212S突變）（使用SEQ ID NO: 1的位置編號）。在一些實施例中，DS-CAV1的一個或多個C殘基被S殘基替代以消除二硫鍵。在一些實施例中，使用SEQ ID NO: 1的位置編號的C69S或C212S取代消除了二硫鍵。在一些實施例中，RSV F多肽包含使用SEQ ID NO: 1的位置編號的C69S和C212S兩者。在一些實施例中，替代此類半胱胺酸並且由此消除二硫鍵阻止了RSV F多肽的還原（即，接受來自還原劑的電子）。在一些實施例中，在抗原中包含使用SEQ ID NO: 1的位置編號的I217P取代而不是在C69和/或C212處的取代。

【0151】 在一些實施例中，胺基酸取代防止胰蛋白酶或胰蛋白酶樣蛋白酶的蛋白水解。在一些實施例中，阻止此類蛋白水解的胺基酸取代係位於RSV F的七肽重複區B（HRB）的區域。

【0152】 與包含野生型HRB區的RSV F多肽的蛋白水解一致的片段的出現表明此區域中的離胺酸或精胺酸是蛋白水解的標靶。用以去除K或R殘基的胺基

酸取代可以稱為剔除（KO）。在一些實施例中，K或R取代L或Q。在一些實施例中，K取代L或Q。在一些實施例中，RSV F多肽包含使用SEQ ID NO: 1的位置編號的K498L和/或K508Q。SEQ ID NO: 3中的相應位置分別是458和468。在一些實施例中，RSV F多肽包含K498L和K508Q兩者。

【0153】 在一些實施例中，胺基酸取代添加了聚糖。在一些實施例中，胺基酸取代藉由向RSV F多肽添加聚糖來增加醣基化。與天然醣基化（沒有附加的聚糖）相比，用以添加聚糖的取代也可以稱為工程化醣基化。

【0154】 在一些實施例中，用於添加聚糖的胺基酸取代是被N取代。在一些實施例中，被N取代胺基酸允許N-連接的醣基化。在一些實施例中，被N取代伴隨著被在N的C末端的第二個胺基酸位置處的T或S取代，從而形成NxT/S醣基化模體。在一些實施例中，N是表面暴露的。

【0155】 在WO 2019/195291中更詳細地描述了RSV F多肽中的上面列舉的每一個取代和突變，將其藉由引用併入本文。

【0156】 在一態樣，本揭露提供了一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），其中相對於SEQ ID NO: 1中所示的胺基酸序列，所述RSV F蛋白抗原包含以下取代中的一個或多個：

【0157】 1) SEQ ID NO: 1的胺基酸位置98-146被胺基酸序列GSGNVGLGG（SEQ ID NO: 16）替代；

【0158】 2) 胺基酸取代S190F和V207L；

【0159】 3) 胺基酸取代I217P；

【0160】 4) 胺基酸取代E328N、S348N和R507N；

【0161】 5) 胺基酸取代L373R；

【0162】 6) 胺基酸取代K498L；和

【0163】 7) 胺基酸取代K508Q。

【0164】 在另一態樣，本揭露提供了一種RSV疫苗，其包含mRNA，所述mRNA包含編碼RSV F蛋白抗原的ORF，其中相對於SEQ ID NO: 1中所示的胺基酸序列，所述RSV F蛋白抗原包含以下取代中的每個：

【0165】 1) SEQ ID NO: 1的胺基酸位置98-146被胺基酸序列GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 16) 替代；

【0166】 2) 胺基酸取代S190F和V207L；

【0167】 3) 胺基酸取代I217P；

【0168】 4) 胺基酸取代E328N、S348N和R507N；

【0169】 5) 胺基酸取代L373R；

【0170】 6) 胺基酸取代K498L；和

【0171】 7) 胺基酸取代K508Q。

【0172】 在某些實施例中，RSV F蛋白抗原包含跨膜結構域和胞質尾胺基酸序列IMITTHIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 17)。

【0173】 在一些實施例中，所述mRNA包含與SEQ ID NO: 4-6中任一項所示的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

【0174】 在一些實施例中，所述mRNA包含與SEQ ID NO: 12-14中任一項所示的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的核酸序列。

IV. 脂質奈米顆粒 (LNP)

【0175】 本揭露的LNP可以包含四類脂質：(i) 可電離脂質（例如，陽離子脂質）；(ii) PEG化脂質；(iii) 基於膽固醇的脂質（例如，膽固醇）；和 (iv) 輔助脂質。

A. 陽離子脂質

【0176】 可電離脂質促進mRNA包封，並且可以是陽離子脂質。陽離子脂質在低pH下提供帶正電荷的環境，以促進帶負電荷的mRNA藥物物質的有效包封。例示性陽離子脂質示出在下表1中。

【0177】 表1 - 可電離脂質

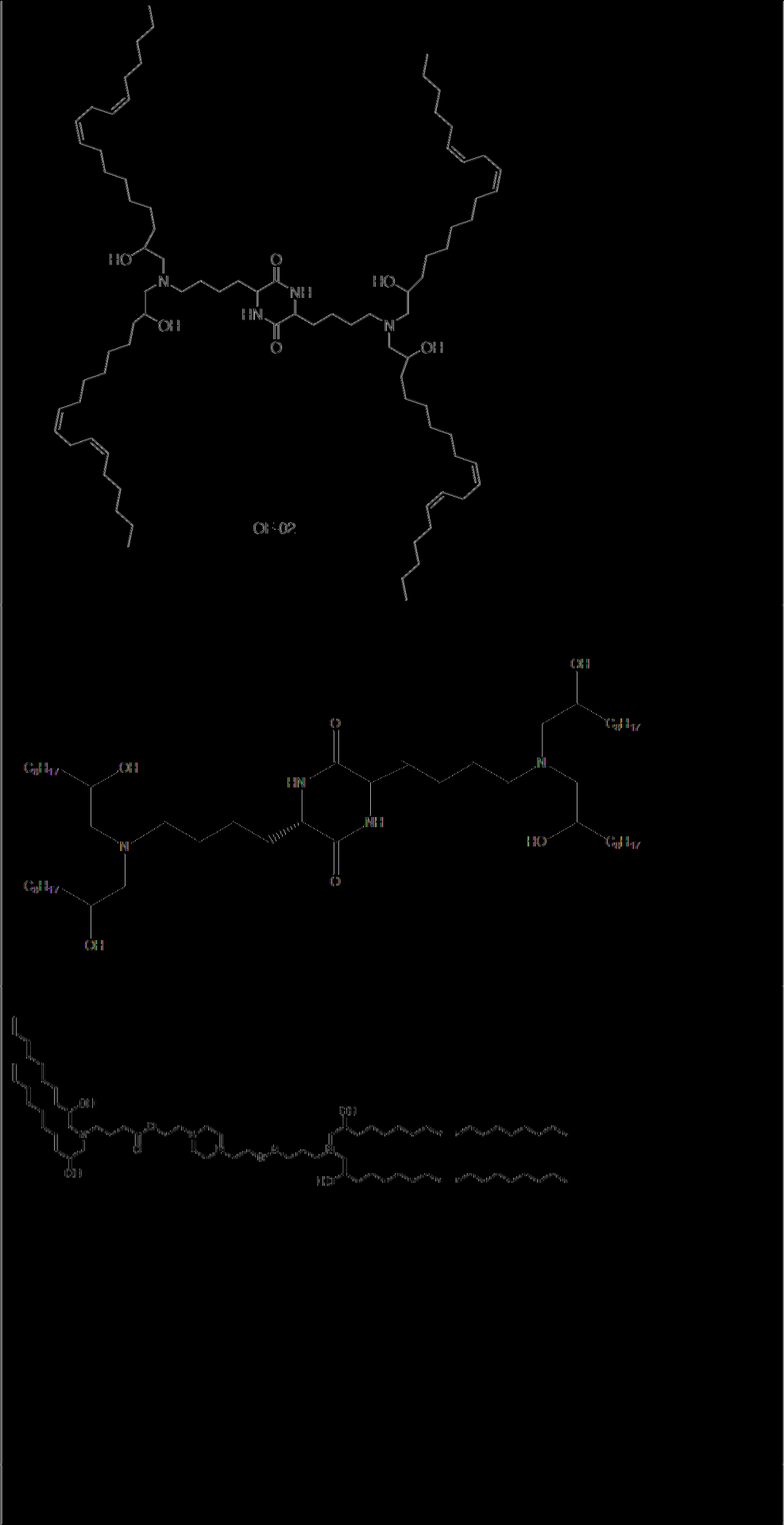
名稱	結構
OF-02 (ML7)	

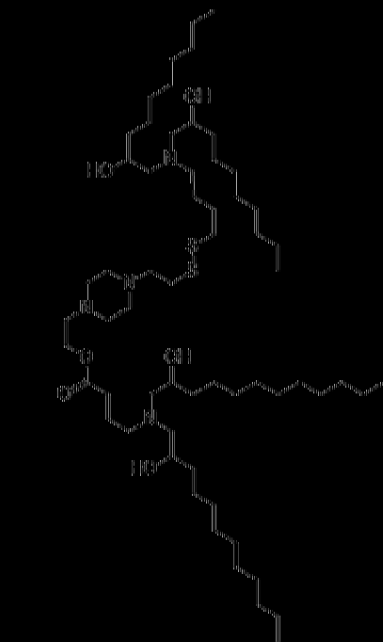
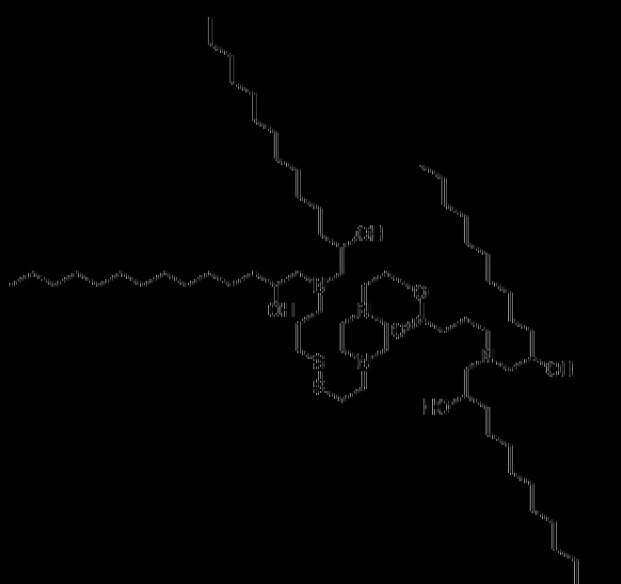
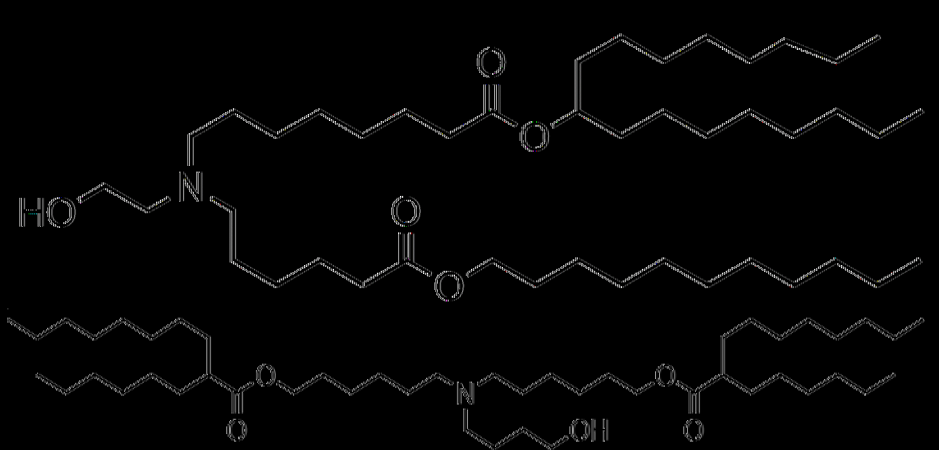
cKK-B10

GL HEPES-
B3-B10-DS-3
-B18-1

(4-(雙(2-羥基癸基)胺基)-丁酸(2-(4-(2-(3-(雙((2-羥基十八碳-9-烯-1-基)胺基)丙基)二硫烷基)乙基)哌啶-1-基)乙酯))

GL HEPES-
B3-B12-DS-4



3310 (4-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)丁酸2-(4-(2-((3-(雙(2-羥基癸基)胺基)丁基)二硫烷基)乙基)哌啶-1-基)乙酯))	
GL-DEPES-13-3312-DS-3-3314 (4-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)丁酸2-(4-(2-((3-(雙(2-羥基十四烷基)胺基)丙基)二硫烷基)乙基)哌啶-1-基)乙酯))	
MC3	
SM-102 (8-((2-羥乙基)16-氧代-6-(十一烷基基)己基)胺基)辛酸9-十七烷基酯)	
AIC-0315 (4-羥丁基)癸(癸二基)二	

(己烷-6,1-二基)雙(2-己基癸酸酯)	
-----------------------	--

【0178】陽離子脂質可以選自 [ckkE10]/[OF-02]、[(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基]4-(二甲基胺基)丁酸酯 (D-Lin-MC3-DMA)；2,2-二亞油基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧戊環 (DLin-KC2-DMA)；1,2-二亞油基氧基-N,N-二甲基-3-胺基丙烷 (DLin-DMA)；二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基胺基)丁醯基)氧基)十七烷二酸酯 (L319)；8-{(2-羥乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]胺基}辛酸9-十七烷基酯 (SM-102)；[(4-羥丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)雙(2-己基癸酸酯) (ALC-0315)；[3-(二甲基胺基)-2-[(Z)-十八碳-9-烯醯基]氧基丙基](Z)-十八碳-9-烯酸酯 (DODAP)；2,5-雙(3-胺基丙基胺基)-N-[2-[二(十七烷基)胺基]-2-氧代乙基]戊醯胺 (DOGS)；[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R)-6-甲基庚烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氫-1H-環戊二烯並[a]菲-3-基] N-[2-(二甲基胺基)乙基]胺基甲酸酯 (DC-Chol)；四(8-甲基壬基)3,3',3'',3'''-(((甲基氮烷二基)雙(丙烷-3,1-二基))雙(氮烷三基))四丙酸酯 (306Oi10)；(2-(二辛基銨基)乙基)磷酸癸酯 (9A1P9)；5,5-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-2,5-二氫-1H-咪唑-2-甲酸乙酯 (A2-Iso5-2DC18)；雙(2-(十二烷基二硫烷基)乙基)3,3'-((3-甲基-9-氧代-10-氧雜-13,14-二噻-3,6-二氮雜二十六基)氮烷二基)二丙酸酯 (BAME-O16B)；1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌咩-1-基)乙基)氮烷二基)雙(十二烷-2-醇) (C12-200)；3,6-雙(4-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)丁基)哌咩-2,5-二酮 (cKK-E12)；六(辛烷-3-基)9,9',9'',9''',9''',9''''-((((苯-1,3,5-三羰基)三(氮烷二基))三(丙烷-3,1-二基))三(氮烷三基))六壬酸酯 (FTT5)；

(((3,6-二氧代哌啶-2,5-二基)雙(丁烷-4,1-二基))雙(氮烷三基))四(乙烷-2,1-二基)(9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-四(十八碳-9,12-二烯酸酯) (OF-Deg-Lin) ; TT3 ; N¹,N³,N⁵-三(3-(雙十二烷基胺基)丙基)苯-1,3,5-三甲醯胺 ; N1-[2-((1S)-1-[(3-胺基丙基)胺基]-4-[二(3-胺基丙基)胺基]丁基甲醯胺基)乙基]-3,4-二[油烯基氧基]-苯甲醯胺 (MVL5) ; 8-((2-羥乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)胺基)辛酸十七烷-9-基酯 (脂質5) ; 和它們的組合。

【0179】 在某些實施例中，所述陽離子脂質是可生物降解的。

【0180】 在各種實施例中，所述陽離子脂質不是可生物降解的。

【0181】 在一些實施例中，所述陽離子脂質是可裂解的。

【0182】 在某些實施例中，所述陽離子脂質不是可裂解的。

【0183】 陽離子脂質進一步詳細描述在Dong等人 (PNAS. 111(11):3955-60. 2014) ; Fenton等人 (Adv. Mater. 28:2939. 2016) ; 美國專利號9,512,073 ; 和美國專利號10,201,618中，將其各自藉由引用併入本文中。

B. PEG化脂質

【0184】 PEG化的脂質組分提供了對奈米顆粒的細微性和穩定性的控制。此類組分的添加可以防止複合物聚集，並且提供用於增加脂質-核酸醫藥組合物的循環壽命並且增加其向靶組織的遞送的手段 (Klibanov等人 FEBS Letters 268(1):235-7. 1990) 。可以選擇這些組分以在體內快速交換出醫藥組合物 (參見例如，美國專利號5,885,613) 。

【0185】 所考慮的PEG化脂質包括但不限於長度長達5 kDa的聚乙二醇 (PEG) 鏈，其共價連接至具有C₆-C₂₀ (例如，C₈、C₁₀、C₁₂、C₁₄、C₁₆或C₁₈) 長度的一條或多條烷基鏈的脂質，諸如衍生化神經醯胺 (例如，N-辛醯基-鞘胺

醇-1-[琥珀醯基(甲氧基聚乙二醇)](C8 PEG神經醯胺))。在一些實施例中，PEG化脂質是1,2-二肉豆蔻醯-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇(DMG-PEG)；1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷醯乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)；1,2-二月桂醯基-sn-甘油-3-磷醯乙醇胺-聚乙二醇(DLPE-PEG)；或1,2-二硬脂醯基-外消旋-甘油-聚乙二醇(DSG-PEG)；PEG-DAG；PEG-PE；PEG-S-DAG；PEG-S-DMG；PEG-cer；PEG-二烷氧基丙基胺基甲酸酯；2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺(ALC-0159)；以及其組合。

【0186】 在某些實施例中，PEG具有高分子量，例如2000-2400 g/mol。在某些實施例中，PEG是PEG2000（或PEG-2K）。在某些實施例中，本文的PEG化脂質是DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DLPE-PEG2000、DSG-PEG2000、C8 PEG2000、或ALC-0159（2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺）。在某些實施例中，本文的PEG化脂質是DMG-PEG2000。

C. 基於膽固醇的脂質

【0187】 膽固醇組分為奈米顆粒內的脂質雙層結構提供了穩定性。在一些實施例中，LNP包含一種或多種基於膽固醇的脂質。合適的基於膽固醇的脂質包括例如：DC-Choi（N,N-二甲基-N-乙基甲醯胺基膽固醇）、1,4-雙(3-N-油烯基胺基-丙基)吡啶（Gao等人, *Biochem Biophys Res Comm.* (1991) 179:280；Wolf等人, *BioTechniques* (1997) 23:139；美國專利5,744,335）、咪唑膽固醇酯（“ICE”；WO 2011/068810）、穀甾醇（22,23-二氫豆甾醇）、β-穀甾醇、穀甾烷醇、岩藻甾醇、豆甾醇（豆甾烷-5,22-二烯-3-醇）、麥角甾醇；鏈甾醇（3β-羟基-5,24-膽甾二烯）；羊毛甾醇（8,24-羊毛甾二烯-3b-醇）；7-脫氫膽固醇（Δ⁵,7-膽固醇）；二氫羊毛甾醇（24,25-二氫羊毛甾醇）；酵母甾醇（5α-膽甾-8,24-二烯-3β-醇）；膽甾烯

醇 (lathosterol) (5α -膽甾-7-烯-3 β -醇)；薯蓣皂苷元 ((3 β ,25R)-螺甾-5-烯-3-醇)；菜油甾醇 (campesterol) (菜油甾-5-烯-3 β -醇)；菜油甾烷醇 (campestanol) (5α -菜油甾烷-3 β -醇)；24-亞甲基膽固醇 (5,24(28)-膽甾二烯-24-甲基烯-3 β -醇)；十七烷酸膽甾醇酯 (cholesteryl margarate) (十七烷酸膽甾-5-烯-3 β -基酯)；油酸膽甾醇酯；硬脂酸膽甾醇酯和膽固醇的其他修飾形式。在一些實施例中，在LNP中使用的基於膽固醇的脂質是膽固醇。

D. 輔助脂質

【0188】 輔助脂質增強了LNP的結構穩定性，並且說明LNP在內體中逃逸。它改善了mRNA藥物有效載荷的攝取和釋放。在一些實施例中，輔助脂質是兩性離子脂質，其具有用於增強藥物有效載荷的攝取和釋放的促融合特性。輔助脂質的例子是1,2-二油醯基-SN-甘油-3-磷醯乙醇胺 (DOPE)；1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷醯膽鹼 (DSPC)；1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸-L-絲胺酸 (DOPS)；1,2-二反油醯基-sn-甘油-3-磷醯乙醇胺 (DEPE)；以及1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷醯膽鹼 (DPOC)、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼 (DPPC)、DMPC、1,2-二月桂醯基-sn-甘油-3-磷醯膽鹼 (DLPC)、1,2-二硬脂醯磷脂醯乙醇胺 (DSPE) 和1,2-二月桂醯基-sn-甘油-3-磷醯乙醇胺 (DLPE)。

【0189】 其他例示性輔助脂質是二油醯磷脂醯膽鹼 (DOPC)、二油醯磷脂醯甘油 (DOPG)、二棕櫚醯磷脂醯甘油 (DPPG)、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼 (POPC)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯乙醇胺 (POPE)、二油醯基-磷脂醯乙醇胺4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯 (DOPE-mal)、二棕櫚醯磷脂醯乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻醯磷脂醯乙醇胺 (DMPE)、磷脂醯絲胺酸、鞘脂、鞘磷脂、神經醯胺、腦苷脂、神經節苷脂、16-O-單甲基PE、16-O-二甲基PE、18-1-反式PE、

1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺 (SOPE) 或其組合。在某些實施例中，輔助脂質是DOPE。在某些實施例中，輔助脂質是DSPC。

【0190】 在各種實施例中，本發明的LNP包含 (i) 選自OF-02、cKK-E10、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10或GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14的陽離子脂質；(ii) DMG-PEG2000；(iii) 膽固醇；和 (iv) DOPE。

E. 脂質組分的莫耳比

【0191】 上述組分的莫耳比對於LNP在遞送mRNA中的有效性是重要的。陽離子脂質、PEG化脂質、基於膽固醇的脂質和輔助脂質的莫耳比是A:B:C:D，其中 $A + B + C + D = 100\%$ 。在一些實施例中，在LNP中陽離子脂質相對於總脂質的莫耳比（即，A）是35%-55%，諸如35%-50%（例如，38%-42%，諸如40%或45%-50%）。在一些實施例中，PEG化的脂質組分相對於總脂質的莫耳比（即，B）是0.25%-2.75%（例如，1%-2%，諸如1.5%）。在一些實施例中，基於膽固醇的脂質相對於總脂質的莫耳比（即，C）是20%-50%（例如，27%-30%，諸如28.5%或38%-43%）。在一些實施例中，輔助脂質相對於總脂質的莫耳比（即，D）是5%-35%（例如，28%-32%，諸如30%或8%-12%，諸如10%）。在一些實施例中，（PEG化的脂質 + 膽固醇）組分具有與輔助脂質相同的莫耳量。在一些實施例中，LNP所含有的陽離子脂質與輔助脂質的莫耳比大於1。

【0192】 在某些實施例中，本揭露的LNP包含：

【0193】 莫耳比為35%至55%或40%至50%的陽離子脂質（例如，莫耳比為35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%或55%的陽離子脂質）；

【0194】 莫耳比為0.25%至2.75%或1.00%至2.00%的聚乙二醇（PEG）接合的（PEG化的）脂質（例如，莫耳比為0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%、1.75%、2.00%、2.25%、2.50%或2.75%的PEG化脂質）；

【0195】 莫耳比為20%至50%、25%至45%或28.5%至43%的基於膽固醇的脂質（例如，莫耳比為20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%的基於膽固醇的脂質）；以及

【0196】 莫耳比為5%至35%、8%至30%或10%至30%的輔助脂質（例如，莫耳比為5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%或35%的輔助脂質），

【0197】 其中所有莫耳比均相對於所述LNP的總脂質含量。

【0198】 在某些實施例中，所述LNP包含莫耳比為40%的陽離子脂質；莫耳比為1.5%的PEG化的脂質；莫耳比為28.5%的基於膽固醇的脂質；和莫耳比為30%的輔助脂質。

【0199】 在某些實施例中，所述PEG化脂質是二肉豆蔻醯-PEG2000（DMG-PEG2000）。

【0200】 在各種實施例中，所述基於膽固醇的脂質是膽固醇。

【0201】 在一些實施例中，所述輔助脂質是1,2-二油醯基-SN-甘油-3-磷醯乙醇胺（DOPE）。

【0202】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的OF-02；

莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DOPE。

【0203】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的cKK-E10；莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DOPE。

【0204】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1；莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DOPE。

【0205】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10；莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DOPE。

【0206】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14；莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DOPE。

【0207】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的SM-102；莫耳比為0.25%至2.75%的DMG-PEG2000；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DSPC。

【0208】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為35%至55%的ALC-0315；莫耳比為0.25%至2.75%的ALC-0159；莫耳比為20%至50%的膽固醇；和莫耳比為5%至35%的DSPC。

【0209】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的OF-02；莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000；莫耳比為28.5%的膽固醇；和莫耳比為30%的DOPE。

這種LNP配製品在本文中被指定為“脂質A”。

【0210】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的cKK-E10；莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000；莫耳比為28.5%的膽固醇；和莫耳比為30%的DOPE。這種LNP配製品在本文中被指定為“脂質B”。

【0211】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1；莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000；莫耳比為28.5%的膽固醇；和莫耳比為30%的DOPE。這種LNP配製品在本文中被指定為“脂質C”。

【0212】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10；莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000；莫耳比為28.5%的膽固醇；和莫耳比為30%的DOPE。這種LNP配製品在本文中被指定為“脂質D”。

【0213】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14；莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000；莫耳比為28.5%的膽固醇；和莫耳比為30%的DOPE。這種LNP配製品在本文中被指定為“脂質E”。

【0214】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為50%的8-[(2-羥乙基)[6-氧-6-(十一烷氧基)己基]胺基}辛酸9-十七烷基酯 (SM-102)；莫耳比為10%的1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷醯膽鹼 (DSPC)；莫耳比為38.5%的膽固醇；和莫耳比為1.5%的1,2-二肉豆蔻醯-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (DMG-PEG2000)。

【0215】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為46.3%的(4-羥丁基)氮

烷二基]二(己烷-6,1-二基)雙(2-己基癸酸酯) (ALC-0315) ; 莫耳比為9.4%的1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷醯膽鹼 (DSPC) ; 莫耳比為42.7%的膽固醇 ; 和莫耳比為1.6%的2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺 (ALC-0159) 。

【0216】 在某些實施例中，所述LNP包含：莫耳比為47.4%的(4-羥丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)雙(2-己基癸酸酯) (ALC-0315) ; 莫耳比為10%的1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷醯膽鹼 (DSPC) ; 莫耳比為40.9%的膽固醇 ; 和莫耳比為1.7%的2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺 (ALC-0159) 。

【0217】 為了計算待放入LNP配製品中的每種脂質的實際量，首先基於所需的N/P比確定陽離子脂質的莫耳量，其中N是陽離子脂質中氮原子的數量，並且P是待由LNP轉運的mRNA中的磷酸基團的數量。接下來，基於陽離子脂質的莫耳量和所選擇的莫耳比計算每種其他脂質的莫耳量。然後使用每種脂質的分子量將這些莫耳量轉化為重量。

F. 緩衝液和其他組分

【0218】 為了穩定核酸和/或LNP（例如，為了延長疫苗產品的保質期），為了促進LNP醫藥組合物的投予，和/或為了增強核酸的體內表現，核酸和/或LNP可以與一種或多種載劑、靶向配體、穩定試劑（例如，防腐劑和抗氧化劑）和/或其他醫藥上可接受的賦形劑組合配製。此類賦形劑的例子是對羥基苯甲酸酯、硫柳汞（thimerosal）、硫柳汞鈉（thiomersal）、氯丁醇、苯紮氯銨、螯合劑（例如，EDTA）。

【0219】 本揭露的LNP組合物可以作為冷凍液體形式或凍乾形式提供。可以使用各種冷凍保護劑，包括但不限於蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甘露醇、甘露糖、右旋糖等。冷凍保護劑可以構成LNP組合物的5%-30%（w/v）。在一些實施

例中，LNP組合物包含海藻糖，例如為5%-30%（例如，10%）（w/v）。一旦用冷凍保護劑配製，LNP組合物便可以在-20°C至-80°C下冷凍（或凍乾和冷凍保存）。

【0220】 可以將LNP組合物在水性緩衝溶液中提供給患者：如果先前冷凍，則解凍，或者如果先前凍乾，則在床邊在水性緩衝溶液中重構。緩衝溶液可以是等滲的，並且適用於例如肌內或皮內注射。在一些實施例中，緩衝溶液是磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）。

V. 用於製造LNP疫苗的方法

【0221】 本發明的LNP可以藉由各種技術製備。例如，可以根據常規技術製備多層囊泡（MLV），諸如藉由使所選擇的脂質沉積在合適的容器或器皿的內壁上（藉由將脂質溶解在適當的溶劑中，然後蒸發溶劑以在器皿內部留下薄膜）或藉由噴霧乾燥來製備。然後可以伴隨渦旋運動向器皿中添加水相，這導致MLV的形成。然後可以藉由均質化、超聲處理或擠出多層囊泡來形成單層囊泡（ULV）。另外，可以藉由洗滌劑去除技術形成單層囊泡。

【0222】 各種方法描述在US 2011/0244026、US 2016/0038432、US 2018/0153822、US 2018/0125989和US 2021/0046192，並且可以用於製造LNP疫苗。一種例示性方法需要藉由將其與脂質的混合物混合來包封mRNA，而無需首先將脂質預形成脂質奈米顆粒，如US 2016/0038432中所述。另一種例示性方法需要藉由將預形成的LNP與mRNA混合來包封mRNA，如US 2018/0153822中所述。

【0223】 在一些實施例中，製備裝載mRNA的LNP的方法包括將一種或多種溶液加熱到大於環境溫度的溫度的步驟，所述一種或多種溶液是包含預形成

的脂質奈米顆粒的溶液、包含mRNA的溶液和包含LNP包封的mRNA的混合溶液。在一些實施例中，所述方法包括在混合步驟之前加熱mRNA溶液和預形成的LNP溶液中的一種或兩種的步驟。在一些實施例中，所述方法包括在混合步驟期間加熱包含預形成的LNP的溶液、包含mRNA的溶液和包含LNP包封的mRNA的溶液中的一種或多種。在一些實施例中，所述方法包括在混合步驟之後加熱LNP包封的mRNA的步驟。在一些實施例中，一種或多種溶液被加熱到的溫度是或高於約30°C、37°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C或70°C。在一些實施例中，一種或多種溶液被加熱到的溫度範圍為從約25°C-70°C、約30°C-70°C、約35°C-70°C、約40°C-70°C、約45°C-70°C、約50°C-70°C或約60°C-70°C。在一些實施例中，溫度是約65°C。

【0224】 可以使用各種方法來製備適用於本揭露的mRNA溶液。在一些實施例中，可以將mRNA直接溶解在本文所述的緩衝溶液中。在一些實施例中，可以藉由在與用於包封的脂質溶液混合之前將mRNA儲備溶液與緩衝溶液混合來產生mRNA溶液。在一些實施例中，可以藉由緊接在與用於包封的脂質溶液混合之前將mRNA儲備溶液與緩衝溶液混合來產生mRNA溶液。在一些實施例中，合適的mRNA儲備溶液可以含有在水或緩衝液中的濃度為或大於約0.2 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.8 mg/ml、1.0 mg/ml、1.2 mg/ml、1.4 mg/ml、1.5 mg/ml、或1.6 mg/ml、2.0 mg/ml、2.5 mg/ml、3.0 mg/ml、3.5 mg/ml、4.0 mg/ml、4.5 mg/ml或5.0 mg/ml的mRNA。

【0225】 在一些實施例中，使用泵將mRNA儲備溶液與緩衝溶液混合。例示性泵包括但不限於齒輪泵、蠕動泵和離心泵。典型地，將緩衝溶液以大於mRNA儲備溶液的速率的速率混合。例如，緩衝溶液可以按mRNA儲備溶液的速率的至

少1x、2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x或20x的速率混合。在一些實施例中，將緩衝溶液以範圍為約100-6000 ml/分鐘（例如，約100-300 ml/分鐘、300-600 ml/分鐘、600-1200 ml/分鐘、1200-2400 ml/分鐘、2400-3600 ml/分鐘、3600-4800 ml/分鐘、4800-6000 ml/分鐘或60-420 ml/分鐘）的流速混合。在一些實施例中，將緩衝溶液以為或大於約60 ml/分鐘、100 ml/分鐘、140 ml/分鐘、180 ml/分鐘、220 ml/分鐘、260 ml/分鐘、300 ml/分鐘、340 ml/分鐘、380 ml/分鐘、420 ml/分鐘、480 ml/分鐘、540 ml/分鐘、600 ml/分鐘、1200 ml/分鐘、2400 ml/分鐘、3600 ml/分鐘、4800 ml/分鐘或6000 ml/分鐘的流速混合。

【0226】 在一些實施例中，將mRNA儲備溶液以範圍為約10-600 ml/分鐘之間（例如，約5-50 ml/分鐘、約10-30 ml/分鐘、約30-60 ml/分鐘、約60-120 ml/分鐘、約120-240 ml/分鐘、約240-360 ml/分鐘、約360-480 ml/分鐘或約480-600 ml/分鐘）的流速混合。在一些實施例中，將mRNA儲備溶液以為或大於約5 ml/分鐘、10 ml/分鐘、15 ml/分鐘、20 ml/分鐘、25 ml/分鐘、30 ml/分鐘、35 ml/分鐘、40 ml/分鐘、45 ml/分鐘、50 ml/分鐘、60 ml/分鐘、80 ml/分鐘、100 ml/分鐘、200 ml/分鐘、300 ml/分鐘、400 ml/分鐘、500 ml/分鐘或600 ml/分鐘的流速混合。

【0227】 將所需mRNA摻入脂質奈米顆粒中的過程稱為“加樣”。例示性方法描述於Lasic等人, *FEBS Lett.* (1992) 312:255-8中。LNP摻入的核酸可以完全或部分位於脂質奈米顆粒的內部空間中，脂質奈米顆粒膜的雙層膜內，或與脂質奈米顆粒膜的外表面相關。將mRNA摻入脂質奈米顆粒中在本文中也稱為“包封”，其中核酸完全或基本上包含在脂質奈米顆粒的內部空間內。

【0228】 合適的LNP可以按各種尺寸製備。在一些實施例中，減小的脂質奈米顆粒尺寸與mRNA的更有效遞送相關。選擇適當的LNP尺寸可以考慮靶細胞

或組織的位點以及在某種程度上脂質奈米顆粒將用於的應用。

【0229】 各種方法可用於改變脂質奈米顆粒群體的尺寸。在各種實施例中，本文中的方法利用Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) 來測量LNP細微性。在一種方案中，將10 μ l的LNP樣品與990 μ l的10%海藻糖混合。將此溶液裝入比色皿中，並且然後放入Zetasizer機器中。z-平均直徑 (nm) 或累積量平均值被認為是樣品中LNP的平均尺寸。Zetasizer機器還可以用於藉由使用動態光散射 (DLS) 和自相關函數的累積量分析來測量多分散性指數 (PDI)。可以藉由對所形成的LNP進行超聲處理來減小平均LNP直徑。間歇超聲處理循環可以與准彈性光散射 (QELS) 評估交替，以指導有效的脂質奈米顆粒合成。

【0230】 在一些實施例中，大部分純化LNP (即，大於約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的LNP) 的尺寸為約70-150 nm (例如，約145 nm、約140 nm、約135 nm、約130 nm、約125 nm、約120 nm、約115 nm、約110 nm、約105 nm、約100 nm、約95 nm、約90 nm、約85 nm或約80 nm)。在一些實施例中，基本上所有 (例如，大於80%或90%) 的經純化的脂質奈米顆粒的尺寸為約70-150 nm (例如，約145 nm、約140 nm、約135 nm、約130 nm、約125 nm、約120 nm、約115 nm、約110 nm、約105 nm、約100 nm、約95 nm、約90 nm、約85 nm或約80 nm)。

【0231】 在某些實施例中，LNP的平均直徑為30-200 nm。

【0232】 在各種實施例中，LNP的平均直徑為80-150 nm。

【0233】 在一些實施例中，本發明的組合物中的LNP的平均尺寸小於150 nm、小於120 nm、小於100 nm、小於90 nm、小於80 nm、小於70 nm、小於60 nm、小於50 nm、小於30 nm或小於20 nm。

【0234】 在一些實施例中，本發明的組合物中的大於約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的LNP的尺寸的範圍為從約40-90 nm（例如，約45-85 nm、約50-80 nm、約55-75 nm或約60-70 nm）或約50-70 nm（例如，約55-65 nm），這特別適合於經由霧化進行肺部遞送。

【0235】 在一些實施例中，藉由本揭露提供的醫藥組合物中的LNP的分散性或分子尺寸異質性量度（PDI）小於約0.5。在一些實施例中，LNP的PDI小於約0.5、小於約0.4、小於約0.3、小於約0.28、小於約0.25、小於約0.23、小於約0.20、小於約0.18、小於約0.16、小於約0.14、小於約0.12、小於約0.10或小於約0.08。PDI可以藉由如上所述的Zetasizer機器測量。

【0236】 在一些實施例中，本文提供的醫藥組合物中大於約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的經純化的LNP將mRNA包封在每個單獨的顆粒內。在一些實施例中，醫藥組合物中基本上所有（例如，大於80%或90%）的經純化的脂質奈米顆粒將mRNA包封在每個單獨的顆粒內。在一些實施例中，脂質奈米顆粒的包封效率為50%至99%；或大於約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%或99%。典型地，用於在本文中使用的脂質奈米顆粒的包封效率為至少90（例如，至少91%、92%、93%、94%或95%）。

【0237】 在一些實施例中，LNP的N/P比為1至10。在一些實施例中，脂質奈米顆粒的N/P比高於1、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7或約8。在某些實施例中，本文的典型LNP的N/P比為4。

【0238】 在一些實施例中，根據本揭露的醫藥組合物含有至少約0.5 μg 、1 μg 、5 μg 、10 μg 、100 μg 、500 μg 或1000 μg 包封mRNA。在一些實施例中，醫藥組合物含有約0.1 μg 至1000 μg 、至少約0.5 μg 、至少約0.8 μg 、至少約1 μg 、至少

約5 µg、至少約8 µg、至少約10 µg、至少約50 µg、至少約100 µg、至少約500 µg或至少約1000 µg包封mRNA。

【0239】 在一些實施例中，mRNA可以藉由化學合成或藉由DNA模板的體外轉錄（IVT）來製備。用於製備和純化mRNA的例示性方法描述於實例1中。在此方法中，在IVT過程中，使用cDNA模板來產生mRNA轉錄物，並且將DNA模板藉由DNA酶降解。藉由深度過濾和切向流過濾（TFF）純化轉錄物。藉由添加帽和尾進一步修飾經純化轉錄物，並且藉由深度過濾和TFF再次純化經修飾RNA。

【0240】 然後在水性緩衝液中製備mRNA，並且將其與含有LNP的脂質組分的兩親溶液混合。用於溶解LNP的四種脂質組分的兩親溶液可以是醇溶液。在一些實施例中，醇是乙醇。水性緩衝液可以是例如檸檬酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽或琥珀酸鹽緩衝液，並且可以具有約3.0-7.0（例如，約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0或約6.5）的pH。緩衝液可以含有其他組分，諸如鹽（例如，鈉，鉀和/或鈣鹽）。在特定實施例中，水性緩衝液具有1 mM檸檬酸鹽、150 mM NaCl，pH 4.5。

【0241】 製造mRNA-LNP組合物的例示性非限制性方法涉及將經緩衝的mRNA溶液與脂質的乙醇溶液以受控的均勻方式混合，其中在整個混合過程中維持脂質:mRNA的比率。在此說明性例子中，mRNA在含有檸檬酸一水合物、檸檬酸三鈉二水合物和氯化鈉的水性緩衝液中呈現。將mRNA溶液添加到溶液（1 mM檸檬酸鹽緩衝液、150 mM NaCl，pH 4.5）中。將四種脂質（例如，陽離子脂質、PEG化的脂質、基於膽固醇的脂質和輔助脂質）的脂質混合物溶解在乙醇中。將水性mRNA溶液和乙醇脂質溶液在具有近“無脈”泵系統的“T”形混合器中

以4：1的體積比混合。然後對所得混合物進行下游純化和緩衝液交換。可以使用透析盒或TFF系統實現緩衝液交換。可以使用TFF來緊接在經由T混合過程形成之後對所得的新生LNP進行濃縮和緩衝液交換。滲濾過程是連續操作，藉由以與滲透物流相同的速率添加適當的緩衝液使體積保持不變。

VI. mRNA-LNP RSV疫苗的包裝和用途

【0242】 mRNA-LNP疫苗可以被配製或包裝用於腸胃外（例如，肌內、皮內或皮下）投予或鼻咽（例如，鼻內）投予。在各種實施例中，mRNA-LNP疫苗可以被配製或包裝用於肺部投予。在各種實施例中，mRNA-LNP疫苗可以被配製或包裝用於靜脈內投予。疫苗組合物可以呈即用配製品的形式，其中LNP組合物被凍乾並剛好在使用前用生理緩衝液（例如，PBS）重構。疫苗組合物還可以按水溶液或冷凍水溶液的形式運送和提供，並且可以直接投予給個體而無需重構（如果先前冷凍，則在解凍後）。

【0243】 因此，本揭露提供了製品（諸如套組），其在單個容器中提供mRNA-LNP疫苗，或者在一個容器（例如，第一容器）中提供mRNA-LNP疫苗並且在另一個容器（例如，第二容器）中提供用於重構的生理緩衝液。所述一個或多個容器可以含有單次使用劑量或多次使用劑量。所述一個或多個容器可以是預處理的玻璃小瓶或安瓿。製品也可以包括使用說明書。

【0244】 在特定實施例中，提供mRNA-LNP疫苗用於在肌內（IM）注射中使用。疫苗可以注射到個體的例如他/她的上臂中的三角肌處。在一些實施例中，疫苗在預填充的針筒或注射器（例如，單室的或多室的）中提供。在一些實施例中，疫苗被提供以用於在吸入中使用，並且在預填充的泵、霧化器或吸入器中提供。

【0245】 可以將mRNA-LNP疫苗以預防有效量投予給有需要的個體，所述預防有效量即提供針對靶病原體的足夠免疫保護持續足夠量的時間（例如，一年、兩年、五年、十年或一生）的量。足夠的免疫保護可以是例如預防或減輕與病原體感染相關的症狀。在一些實施例中，將多劑（例如，兩劑）的疫苗投予（例如，注射）於有需要的個體，以實現所需的預防效果。劑量（例如，初免劑量和加強劑量）可以隔開至少例如2週、3週、4週、一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月、一年、兩年、五年或十年的間隔。

VII. 載體

【0246】 在一態樣，本文公開了包含本文公開的mRNA組合物的載體。編碼目的蛋白的RNA序列（例如，編碼RSV F蛋白的mRNA）可以轉殖到許多類型的載體中。例如，可以將所述核酸轉殖到載體中，所述載體包括但不限於質粒、噬菌粒、噬菌體衍生物、動物病毒和粘粒。特別感興趣的載體可以包括表現載體、複製載體、探針產生載體、測序載體和為體外轉錄而優化的載體。

【0247】 在某些實施例中，載體可以用於在宿主細胞中表現mRNA。在各種實施例中，載體可以用作IVT的模板。適用於治療用途的最佳轉譯的IVT mRNA的構建詳細公開在Sahin等人 (2014). *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 759–780；Weissman (2015). *Expert Rev. Vaccines* 14, 265-281中。

【0248】 在一些實施例中，本文公開的載體可以從5'至3'包括至少以下：RNA聚合酶啟動子；編碼5' UTR的多核苷酸序列；編碼ORF的多核苷酸序列；編碼3' UTR的多核苷酸序列；和編碼至少一種RNA適體的多核苷酸序列。在一些實施例中，本文公開的載體可以包含編碼聚(A)序列和/或多腺苷酸化信號的多核苷酸序列。

【0249】 已知多種RNA聚合酶啟動子。在一些實施例中，啟動子可以是T7 RNA聚合酶啟動子。其他有用的啟動子可以包括但不限於T3和SP6 RNA聚合酶啟動子。用於T7、T3和SP6啟動子的共有核苷酸序列是已知的。

【0250】 本文還公開了包含本文公開的載體或RNA組合物的宿主細胞（例如，哺乳動物細胞，例如，人類細胞）。

【0251】 可以使用多種不同方法中的任一種將多核苷酸導入靶細胞，例如，商業上可獲得的方法，包括但不限於電穿孔（Amaxa Nucleofector-II（Amaxa Biosystems, Cologne, Germany））、（ECM 830 (BTX)（Harvard Instruments, Boston, Mass.）或Gene Pulser II（BioRad, Denver, Colo.））、Multiporator（Eppendorf, Hamburg, Germany）、使用脂質(lipofection)轉染的陽離子脂質體介導的轉染、聚合物包封、肽介導的轉染、生物射彈顆粒遞送系統諸如“基因槍”（參見例如，Nishikawa等人(2001). Hum Gene Ther. 12(8):861-70或TransIT-RNA轉染套組（Mirus, Madison, WI））。

【0252】 用於將多核苷酸引入宿主細胞中的化學手段包括膠體分散系統，諸如大分子複合物、奈米膠囊、微球、珠粒、和基於脂質的系統（包括水包油乳劑、膠束、混合膠束、和脂質體）。用作體外和體內遞送載體的例示性膠體系統是脂質體（例如，人造膜囊）。

【0253】 不管使用何種方法將外源核酸引入宿主細胞中或以其他方式將細胞暴露於本揭露的抑制劑，為了證實宿主細胞中mRNA序列的存在，可以進行多種測定。

VIII. 自我複製RNA和反式複製RNA

【0254】 自我複製RNA：

第 55 頁，共 89 頁(發明說明書)

【0255】 在一態樣，本文公開了編碼RSV F蛋白的自我複製RNA。

【0256】 可以藉由使用來源於例如甲病毒的複製元件並且用編碼目的蛋白（例如，RSV F蛋白）的核苷酸序列取代結構病毒蛋白來產生自我複製RNA。自我複製RNA典型地是正股分子，所述正股分子在遞送到細胞後可以直接轉譯，並且這種轉譯提供RNA依賴性RNA聚合酶，所述聚合酶然後從遞送的RNA產生反義和有義轉錄物兩者。因此，遞送的RNA導致多個子RNA的產生。這些子體RNA以及共線亞基因體轉錄物可以自身轉譯以提供編碼抗原（即RSV F蛋白抗原）的原位表現，或者可以被轉錄以提供與遞送的RNA具有相同意義的進一步轉錄物，所述轉錄物被轉譯以提供抗原的原位表現。這一轉錄序列的總體結果是引入的複製子RNA的數量大量擴增，並且因此編碼的抗原成為細胞的主要多肽產物。

【0257】 一種合適的以這種方式實現自我複製的系統是使用基於甲病毒的複製子。這些複製子是正股（正義股）RNA，其在遞送至細胞後導致複製酶（或複製酶-轉錄酶）的轉譯。複製酶被轉譯成多蛋白，所述多蛋白自動切割以提供複製複合物，所述複合物產生正股遞送RNA的基因體股拷貝。這些負（-）股轉錄物本身可以被轉錄以產生正（-）股親本RNA的進一步拷貝，並且也產生編碼抗原的亞基因體轉錄物。因此，亞基因體轉錄物的轉譯導致被感染細胞原位表現抗原。合適的甲病毒複製子可以使用來自辛德比斯病毒（Sindbis virus）、塞姆利基森林病毒（Semliki forest virus）、東部馬腦炎病毒（eastern equine encephalitis virus）、委內瑞拉馬腦炎病毒（Venezuelan equine encephalitis virus）等的複製酶。可以使用突變體或野生型病毒序列，例如，VEEV的減毒TC83突變體已經用於複製子中，參見以下參考文獻：WO 2005/113782，將其藉由引用

併入本文。

【0258】 在一個實施例中，本文所述的每種自我複製RNA編碼 (i) RNA依賴性RNA聚合酶，其可以從自我複製RNA分子轉錄RNA，和 (ii) RSV F蛋白抗原。聚合酶可以是甲病毒複製酶，例如，包含甲病毒蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4中的一種或多種。儘管除了非結構複製酶多蛋白之外，天然甲病毒基因體還編碼結構病毒體蛋白，但在某些實施例中，自我複製RNA分子不編碼甲病毒結構蛋白。因此，自我複製RNA可能導致細胞中自身基因體RNA拷貝的產生，但不導致含RNA病毒體的產生。無法產生這些病毒體意味著，與野生型甲病毒不同，自我複製RNA分子無法以感染形式使自身永久存在。在野生型病毒中永久存在所必需的甲病毒結構蛋白不存在本揭露的自我複製RNA，並且它們的位置被一個或多個編碼目的免疫原的基因所取代，使得亞基因體轉錄物編碼免疫原，而不是甲病毒結構病毒體蛋白。自我複製RNA進一步詳細描述在WO 2011005799中，將其藉由引用併入本文。

【0259】 反式複製RNA：

【0260】 在一態樣，本文公開了編碼RSV F蛋白的反式複製RNA。

【0261】 反式複製RNA具有與上述自我複製RNA相似的元件。然而，對於反式複製RNA，使用兩種單獨的RNA分子。第一RNA分子編碼上述RNA複製酶（例如，甲病毒複製酶），並且第二RNA分子編碼目的蛋白（例如，RSV F蛋白抗原）。RNA複製酶可以複製第一RNA分子和第二RNA分子中的一個或兩個，從而大大增加編碼目的蛋白的RNA分子的拷貝數。反式複製RNA進一步詳細描述在WO 2017162265中，將其藉由引用併入本文。

IX. 醫藥組合物

【0262】 根據本揭露純化的RNA可以用作醫藥組合物中的組分，例如用作疫苗。這些組合物將典型地包含RNA和醫藥上可接受的載劑。本揭露的醫藥組合物還可以包含一種或多種附加組分，諸如小分子免疫增強劑（例如，TLR激動劑）。本揭露的醫藥組合物還可以包含用於RNA的遞送系統，諸如脂質體、水包油乳液或微粒。在一些實施例中，所述醫藥組合物包含脂質奈米顆粒（LNP）。在某些實施例中，所述組合物包含包封在LNP內的抗原編碼核酸分子。

X. 疫苗接種方法

【0263】 本文公開的RSV疫苗可以投予於個體以誘導針對RSV F蛋白的免疫反應，其中相對於未用本文公開的RSV疫苗接種的個體中的抗抗原抗體力價或相對於針對RSV的替代疫苗，在疫苗接種後個體中的抗抗原抗體力價增加。“抗抗原抗體”是與抗原特異性結合的血清抗體。

【0264】 在一態樣，本揭露提供了一種引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的方法，所述方法包括向個體投予本文所述RSV疫苗。本揭露還提供了本文所述的RSV疫苗，用於引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染。本揭露還提供了本文所述的RSV mRNA，用於製造疫苗，所述疫苗用於引發對RSV的免疫反應或用於保護個體免受RSV感染。

【0265】 在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 1的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更高的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【0266】 在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予了與佐劑共同投予的RSV蛋白疫苗的個體具有相當的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【0267】 在某些實施例中，所述RSV疫苗增加對所述RSV F蛋白的O位點具有結合特異性的抗體的血清濃度。

【0268】 在某些實施例中，在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 2的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更低的對所述RSV F蛋白的位點I或位點II具有結合特異性的抗體的血清濃度。

【0269】 在某些實施例中，所述RSV疫苗增加預先存在RSV免疫的個體的中和抗體的血清濃度。

【0270】 為了可以更好地理解本發明，闡述了以下實例。這些實例僅用於說明目的，並不被解釋為以任何方式限制本發明的範圍。

實例

【0271】 具體實施例的前述描述將如此充分地揭示本揭露的一般性質，其他人可以藉由應用本領域技術範圍內的知識，在無需過度實驗並且不偏離本揭露總體概念的情況下容易地修改和/或調整此類具體實施例用於各種應用。因此，基於本文給出的傳授內容和指導，此類調整和修改旨在包含在所公開的實施例的等效方案的含義和範圍內。應理解，本文中的措辭或術語是出於描述而非限制的目的，因此本說明書的術語或措辭將由本領域技術人員根據傳授內容和指導來解釋。

實例1：編碼RSV F蛋白的mRNA

【0272】 選擇三種不同RSV F蛋白作為基於mRNA的疫苗進行測試。指定為FD1的F蛋白對應於WT RSV F蛋白。指定為FD2的F蛋白對應於可溶性RSV F蛋白，其缺乏跨膜結構域和胞質尾並且含有C末端纖維蛋白（fibrin）三聚化結構

域(也稱為T4折疊子(foldon))。指定為FD3的F蛋白對應於融合前RSV F蛋白。
下面列舉了每種RSV F蛋白的胺基酸序列。

【0273】 FD1:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
SVITIELSNIKKKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNR
ARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVL
HLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNKQS
CSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI
TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTS
PLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTAS
NKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIV
IIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 1)

【0274】 FD2:

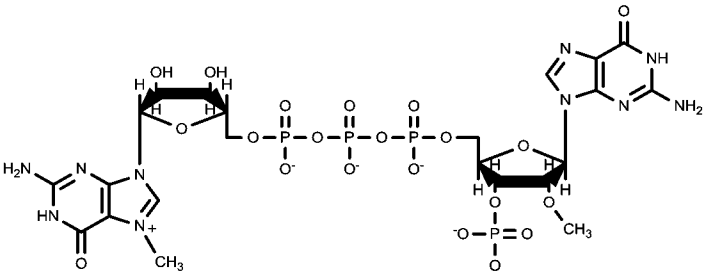
MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
SVITIELSNIKKKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNR
ARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVL
HLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNKQS
CSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI
TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTS
PLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTAS

NKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVR
KDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 2)

【0275】 FD3:

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
SVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMGSGNVGLGG
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKNYI
DKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYG
VIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGS NICLTRTDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCK
VQSNRVFCDTMNSRTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI
VSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEG
KSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNE LINQSLAFINQSD ELLHNVNAG
KSTTNIMITTHIIVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN
(SEQ ID NO: 3)

【0276】 本文所述mRNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF）、至少一個5’非轉譯區（5’UTR）、至少一個3’非轉譯區（3’UTR）和至少一個多腺苷酸化（聚(A)）序列。mRNA進一步包含具有以下結構的5’帽：



【0277】 下面列舉了編碼RSV F蛋白的每個mRNA開放閱讀框（ORF）的核酸序列。

【0278】 FD1 mRNA ORF:

AUGGAAUUGCUGAUCCUCAAGCGAACGCAAUCACCACUAUCCUCACU
GCGGUCACCUUCUGCUUUGCGAGCGGACAGAACAUCACCGAAGAAUUC
UACCAAUCUACUUGCUCGCGGUGUCCAAGGGUUACCUGUCCGCCCUGA
GGACCGGAUGGUACACUUCGUGAUUACCAUUGAGUUGUCGAAUAUCA
AGAAGAACAAGUGCAACGGAACCGAUGCUAAGGUCAAGCUGAUCAAGC
AGGAGCUGGACAAGUACAAGAAUGCUGUGACCGAGCUGCAGCUGCUGA
UGCAGUCCACUCAAGCCACCAACAAUCGCGCCCCGGCGGGGAACUCCCAAG
GUUCAUGAACUACACCUUGAACAACGCCAAGAAAACGAACGUGACCCU
GUCCAAGAAGCGCAAGCGCAGAUUCCUUGGCUUCCUUCUGGGGCGUCGG
UAGCGCCAUCGCCUCCGGCGUGGGCCGUCAGCAAGGUCCUGCACCUCGAG
GGAGAAGUCAACAAGAUUAAGAGCGCCCUGCUGUCCACCAACAAGGCC
GUGGUGUCGCUAUCAAACGGCGUCAGCGUACUGACCAGCAAAGUGCUG
GAUCUCAAGAACUACAUUGAUUAGCAACUCCUCCCUAUCGUGAAUAAG
CAGAGCUGUUCGAUUUCCAACAUCGAGACUGUGAUUGAAUUCCAGCAG
AAGAACAACCGGCUGCUGGAAAUUACCAGAGAAUUCAGCGUGAAUGCC
GGAGUCACUACCCCCGUGUCCACCUACAUGCUGACAAACUCCGAGCUGC
UGAGCCUGAUCAACGAUAUGCCGAUUACCAACGACCAGAAGAAGCUGA
UGUCGAACAACGUGCAGAUUCGUGCGCCAGCAGUCCUACUCAAUCAUGU
CGAUCAUCAAGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCUGU
ACGGCGUGAUUGACACUCCGUGUUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGU
GCACUACUAAACACCAAGGAGGGCAGCAAUAUCUGCCUGACUCGGACCG
AUAGAGGCUGGUACUGUGAUUAAACGCCGGGUCCGUGUCCUUCUUCCCGC
AAGCCGAGACUUGCAAAGUGCAGAGCAACCGGGUGUUCUGUGACACUA

UGAACUCACUGACCUUGCCGAGCGAAGUCAACCUUUGCAACGUGGACA
UCUUUAACCCUAAAUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACG
UGUCGAGCUCAGUGAUUACUUCGCUGGGAGCCAUUGUGUCCUGCUACG
GGAAAACCAAGUGCACGGCCUCAAACAAGAACCGGGGUUAUCAUUAAGA
CCUUCUCCAACGGCUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGGUGGACACUG
UGUCCGUGGGAAACACCUUGUAUUACGUGAACAAGCAGGAGGGAAAGU
CCCUCUACGUGAAGGGCGAACCCAUCAUCAAUUUCUACGACCCGCUCGU
GUUCCCCUCCGAUGAAUUCGACGCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAA
GAUUAACCAGUCCCUGGCUUUCAUUCGCAAGUCCGACGAACUGCUCCA
UAACGUCAACGCUGGAAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACCACGAU
CAUUAUUGUGAUCAUCGUCAUCCUGCUGUCACUGAUAGCAGUGGGACU
GCUCCUCUACUGCAAAGCGCGGUCGACCCCAGUGACACUCUCGAAGGAC
CAGCUGUCCGGGAUCAACAACAUCGCGUUUUCGAACUGA (SEQ ID NO: 4)

【0279】 FD2 mRNA ORF:

AUGGAACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCACUACCAUCCUGACU
GCCGUCACCUUCUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAUUU
UACCAAAGCACCUGUAGCGCGGUGUCCAAGGGAUACCUGAGCGCUCUG
AGGACCGGAUGGUACACCAGCGUGAUUACCAUCGAGCUGAGUAACAUC
AAGAAGAACAAGUGCAACGGGACCGAUGCUAAGGUCAAGUUGAUCAAA
CAAGAGCUCGACAAGUACAAGAACGCCGUGACUGAGCUGCAGCUGCUG
AUGCAGUCAACUCAGGCCACCAACAACCGGGGCCAGACGGGAACUGCCG
AGAUUCAUGAACUACACCCUGAACAACGCCAAAAAGACCAACGUGACC
CUGUCCAAGAAGAGAAAGCGCCGGUUCUCCUGGGUUUCCUGCUUGGCGUG
GGAUCAGCAAUCGCGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGGUCUUGCACCUC

GAGGGCGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAG
GCCGUCGUUUCCCUGUCGAACGGAGUGUCCGUGCUCACGAGCAAAGUG
CUCGACCUGAAGAACUACAUCGACAAACAGCUGCUGCCCAUCGUCAAC
AAGCAGAGCUGCAGCAUCUCAAAACAUUGAAACCGUGAUCGAGUUCCAG
CAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUUACCAGAGAGUUUUCCGUGAAC
GCCGGCGUGACCACCCCGGUGUCGACCUACAUGCUCACAAAUUCGGAAC
UUCUCUCCCUGAUUAAUGACAUGCCCAUUAACGAUCAGAAAAAGC
UGAUGUCGAACAAUGUGCAGAUUGUGCGCCAGCAGUCCUACUCCAUCA
UGUCCAUCAUUAAGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGUUGCCGC
UGUACGGUGUCAUCGAUACCCCCUGCUGGAAGCUCCAUAUCUUCGCCCCU
GUGUACUACCAACACCAAGGAAGGCUCCAACAUCUGCCUGACCCGGAC
GGAUCGCGGCUGGUACUGUGACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCUUCCC
GCAAGCGGAGACUUGCAAAGUGCAGUCCAACCGGGUGUUCUGUGACAC
UAUGAACUCCCUGACUCUGCCGUCCGAAGUCAACCUCUGCAACGUGGA
CAUUUUCAAUCCAAAAUACGACUGCAAGAUAAUGACCUCCAAGACUGA
CGUGUCAUCGUCCGUGAUCACAUCUCUGGGAGCCAUUGUCUCCUGCUA
CGGAAAGACUAAGUGCACCGCGUCGAACAAGAACAGGGGGCAUUAUCAA
GACCUUCAGCAACGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGCGUGGAUAC
CGUGUCCGUGGGCAACACCUUGUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGAA
GUCCCUUUUUGUGAAGGGGGAGCCAAUCAUUAACUUUUACGACCCCCU
GGUGUUCCCUAGCGACGAGUUCGACGCCUCAAUUCUCAAGUCAACGA
AAAGAUCAACCAGAGCCUCGCCUUCAUCCGCAAGUCCGAUGAACUGCU
GUCAGCCAUUGGGGGGUACAUCCCUGAGGCCCCUCGGGACGGACAGGC
AUACGUCCGCAAGGACGGCGAAUGGGUGCUGCUUAGCACCUUCCUCUA

A (SEQ ID NO: 5)

【0280】 FD3 mRNA ORF:

AUGGAACUGCUGAUCCUCAAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCG
CUGUGACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUACUGAAGAGUUUU
ACCAGAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUACCUUUCGCGACUGC
GGACCGGAUGGUACACUUCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUCA
AGGAAAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAAC
AAGAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGA
UGGGAUCCGGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGG
CUGUGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGU
CCGCGCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCCUGUCUAACGGCG
UCAGCGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUACAUUGACA
AGCAGCUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCC
CGAAACCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAU
UACUCGCGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACC
UACAUGCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCA AUGACAUGCCU
AUCACGAACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUG
CGGCAGCAGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUG
GCGUACGUGGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGC
UGGAAGCUGCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGA
UCCAACAUCUGCUUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAAC
GCCGGGAAUGUUUCGUUCUCCCCACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAG
UCAAACAGAGUGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGC
GAAGUGAACCUGUGUAACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGC

AAGAUUAUGACCAGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUAAACAAGC
CUGGGGGGCGAUUGUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCG
AACAAAGAACCGCGGCAUCAUUAAGACUUUCUCGAAUGGUUGCGACUAU
GUGUCCAACAAGGGGCGUGGAUACUGUGUCAGUCGGGAUACUCUUUAC
UACGUGAACAAGCAGGAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCU
AUUAUCAACUUUUACGAUCCGCUGGUGUUCCCGUCCGACGAAUUCGAC
GCCAGCAUCAGCCAAGUCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCGCCUUCA
UCAACCAAUCCGACGAGCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAAGUCCA
CCACCAACAUCAUGAUCACUACUAUUAUCAUCGUGAUCAUCGUCAUCC
UGCUGAGCCUGAUUUGCUGUGGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGU
CCACCCCGGUCACCCUGUCGAAGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAU
UGCCUUCUCCAACUAA (SEQ ID NO: 6)

【0281】 下面列舉了編碼RSV F蛋白的每個DNA模板的核酸序列。

【0282】 FD1 DNA:

ATGGAATTGCTGATCCTCAAAGCGAACGCAATCACCCTATCCTCACTGCG
GTCACCTTCTGCTTTGCGAGCGGACAGAACATCACCGAAGAATTCTACCAA
TCTACTTGCTCCGCCGTGTCCAAGGGTTACCTGTCCGCCCTGAGGACCGGA
TGGTACACTTCCGTGATTACCATTGAGTTGTCGAATATCAAGAAGAACAAG
TGCAACGGAACCGATGCTAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGGACAA
GTACAAGAATGCTGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGTCCACTCAAG
CCACCAACAATCGCGCCCGGCGGGAACTCCCAAGGTTTCATGAACTACACC
TTGAACAACGCCAAGAAAACGAACGTGACCCTGTCCAAGAAGCGCAAGC
GCAGATTCCTTGGCTTCCTTCTGGGCGTCGGTAGCGCCATCGCCTCCGGCG

TGGCCGTCAGCAAGGTCCTGCACCTCGAGGGAGAAGTCAACAAGATTAAG
AGCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTCTGCTATCAAACGGCGT
CAGCGTACTGACCAGCAAAGTGCTGGATCTCAAGAACTACATTGATAAGC
AACTCCTCCCTATCGTGAATAAGCAGAGCTGTTCGATTTC AACATCGAGA
CTGTGATTGAATTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATTACCAGA
GAATTCAGCGTGAATGCCGGAGTCACTACCCCCGTGTCCACCTACATGCTG
ACAAACTCCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGATATGCCGATTACCAACGAC
CAGAAGAAGCTGATGTCGAACAACGTGCAGATCGTGCGCCAGCAGTCCTA
CTCAATCATGTCGATCATCAAGGAAGAGGTCCTGGCCTACGTGGTGCAGCT
TCCTCTGTACGGCGTGATTGACACTCCGTGTTGGAAACTGCACACTAGTCC
CCTGTGCACTACTAACACCAAGGAGGGCAGCAATATCTGCCTGACTCGGA
CCGATAGAGGCTGGTACTGTGATAACGCCGGGTCCGTGTCCTTCTTCCCGC
AAGCCGAGACTTGCAAAGTGCAGAGCAACCGGGTGTTCTGTGACACTATG
AACTCACTGACCTTGCCGAGCGAAGTCAACCTTTGCAACGTGGACATCTTT
AACCTAAATACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTCGAG
CTCAGTGATTACTTCGCTGGGAGCCATTGTGTCCTGCTACGGGAAAACCAA
GTGCACGGCCTCAAACAAGAACCGGGGTATCATTAAGACCTTCTCCAACG
GCTGCGACTATGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACTGTGTCCGTGGGAAAC
ACCTTGTATTACGTGAACAAGCAGGAGGGGAAAGTCCCTCTACGTGAAGGG
CGAACCCATCATCAATTTCTACGACCCGCTCGTGTTCCCCTCCGATGAATTC
GACGCATCCATCTCACAAGTCAACGAAAAGATTAACCAGTCCCTGGCTTTC
ATTCGCAAGTCCGACGAACTGCTCCATAACGTCAACGCTGGAAAGTCCAC
CACCAACATCATGATCACCACGATCATTATTGTGATCATCGTCATCCTGCTG
TCACTGATAGCAGTGGGACTGCTCCTCTACTGCAAAGCGCGGTCGACCCC

AGTGACACTCTCGAAGGACCAGCTGTCCGGGATCAACAACATCGCGTTTT
CGAACTGA (SEQ ID NO: 7)

【0283】 FD2 DNA:

ATGGAACCTCCTGATCCTGAAGGCCAATGCTATCACTACCATCCTGACTGCC
GTCACCTTCTGCTTCGCCTCCGGACAAAATATCACTGAAGAATTTTACCAA
AGCACCTGTAGCGCGGTGTCCAAGGGATACCTGAGCGCTCTGAGGACCGG
ATGGTACACCAGCGTGATTACCATCGAGCTGAGTAACATCAAGAAGAACA
AGTGCAACGGGACCGATGCTAAGGTCAAGTTGATCAAACAAGAGCTCGAC
AAGTACAAGAACGCCGTGACTGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGTCAACTCA
GGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAAGTCCGAGATTCATGAACTACA
CCCTGAACAACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGTCCAAGAAGAGAAA
GCGCCGGTTCCTGGGTTTCCTGCTTGGCGTGGGATCAGCAATCGCGTCCGG
AGTGGCAGTGTCCAAGGTCTTGACCTCGAGGGCGAAGTGAACAAGATCA
AGTCCGCGCTTCTGTGACCAACAAGGCCGTCGTTTCCCTGTGCAACGGA
GTGTCCGTGCTCACGAGCAAAGTGCTCGACCTGAAGAACTACATCGACAA
ACAGCTGCTGCCCATCGTCAACAAGCAGAGCTGCAGCATCTCAAACATTG
AAACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGCCTGCTCGAGATTACC
AGAGAGTTTTCCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGGTGTCGACCTACAT
GCTCACAAATTCGGAACCTTCTCTCCCTGATTAATGACATGCCCATTAAC
GATCAGAAAAAGCTGATGTCGAACAATGTGCAGATTGTGCGCCAGCAGTC
CTACTCCATCATGTCCATCATTAAGGAAGAGGTCCTGGCCTACGTGGTGCA
GTTGCCGCTGTACGGTGTGATCGATACCCCCTGCTGGAAGCTCCATACTTC
GCCCCTGTGTACTACCAACACCAAGGAAGGCTCCAACATCTGCCTGACCC
GGACGGATCGCGGCTGGTACTGTGACAATGCCGGATCCGTGTCGTTCTTCC

CGCAAGCGGAGACTTGCAAAGTGCAGTCCAACCGGGTGTCTGTGACACT
ATGAACTCCCTGACTCTGCCGTCCGAAGTCAACCTCTGCAACGTGGACATT
TTCAATCCAAAATACGACTGCAAGATAATGACCTCCAAGACTGACGTGTCA
TCGTCCGTGATCACATCTCTGGGAGCCATTGTCTCCTGCTACGGAAAGACT
AAGTGCACCGCGTCGAACAAGAACAGGGGGCATTATCAAGACCTTCAGCAA
CGGTTGCGACTATGTGTCCAACAAGGGGCGTGGATACCGTGTCCGTGGGCA
ACACCTTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGGAAGTCCCTTTATGTGAAG
GGGGAGCCAATCATTAACCTTTTACGACCCCCTGGTGTTCCTAGCGACGAG
TTCGACGCCTCAATCTCTCAAGTCAACGAAAAGATCAACCAGAGCCTCGC
CTTCATCCGCAAGTCCGATGAACTGCTGTCAGCCATTGGGGGGTTACATCCC
TGAGGCCCCCTCGGGACGGACAGGCATACGTCCGCAAGGACGGCGAATGG
GTGCTGCTTAGCACCTTCCTCTAA (SEQ ID NO: 8)

【0284】 FD3 DNA:

ATGGAACTGCTGATCCTCAAAGCCAACGCAATCACCACCATTCTCACCGCT
GTGACCTTCTGCTTCGCATCGGGGCAGAACATCACTGAAGAGTTTTACCAG
AGCACTTGCAGCGCGGTGTCAAAGGGTTACCTTTCCGCACTGCGGACCGG
ATGGTACACTTCCGTGATCACCATTGAGCTCAGCAACATCAAGGAAAACA
AGTGCAATGGCACCGACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAACAAGAACTGGA
CAAGTACAAGAACGCCGTGACAGAATTGCAGCTCCTGATGGGATCCGGAA
ACGTCGGTCTGGGCGGAGCCATCGCGAGTGGAGTGGCTGTGTCCAAGGTC
TTGCACCTCGAGGGAGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCGCTGCTGTCAAC
GAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGTCTAACGGCGTCAGCGTGCTGACGTTCA
AGGTCCTGGACCTGAAGAATTACATTGACAAGCAGCTGCTGCCCATCCTCA
ACAAGCAATCCTGCTCCATCTCCAACCCCGAAACCGTGATCGAGTTCCAGC

AGAAGAACAACCGCCTGCTGGAAATTACTCGCGAGTTCTCTGTGAATGCC
GGCGTGACCACCCCTGTGTCCACCTACATGCTGACCAACTCCGAGCTTCTC
TCCCTTATCAATGACATGCCTATCACGAACGACCAGAAGAAGCTGATGTCG
AACAAACGTGCAGATTGTGCGGCAGCAGTCATACAGCATCATGTCGATCATC
AAGGAAGAAGTGCTGGCGTACGTGGTGCAACTCCCGCTGTACGGCGTCAT
CGATACCCCGTGCTGGAAGCTGCACACCTCGCCTTTGTGTACCACCAACAC
CAAGAACGGATCCAACATCTGCTTAACCCGGACTGATCGGGGTTGGTACTG
CGACAACGCCGGGAATGTTTCGTTCTTCCCACAAGCCGAGACTTGTAAG
TGCAGTCAAACAGAGTGTTCTGTGACACCATGAACTCGAGAACCCTGCCC
AGCGAAGTGAACCTGTGTAACGTCGACATCTTTAACCCAAAATACGATTGC
AAGATTATGACCAGCAAAACCGACGTGTCCTCCTCCGTGATAACAAGCCTG
GGGGCGATTGTGTCATGCTACGGAAAGACTAAGTGCACCGCCTCGAACAA
GAACCGCGGCATCATTAAGACTTTCTCGAATGGTTGCGACTATGTGTCCAA
CAAGGGCGTGGATACTGTGTCAGTCGGGAATACTCTTTACTACGTGAACAA
GCAGGAGGGGAAAAGCCTCTACGTGAAGGGAGAGCCTATTATCAACTTTT
ACGATCCGCTGGTGTTCCCGTCCGACGAATTCGACGCCAGCATCAGCCAA
GTCAACGAGCTGATTAACCAGTCCCTCGCCTTCATCAACCAATCCGACGAG
CTCCTGCATAACGTGAACGCCGGAAAGTCCACCACCAACATCATGATCACT
ACTATTATCATCGTGATCATCGTCATCCTGCTGAGCCTGATTGCTGTGGGCC
TGTTGCTGTATTGCAAAGCCAGGTCCACCCCGGTCACCCTGTCGAAGGATC
AGCTGTCCGGAATCAACAACATTGCCTTCTCCAATAA (SEQ ID NO: 9)

【0285】 下面列舉了5’UTR和3’UTR的核酸序列。

【0286】 5’UTR:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGA
ACGCGGAU UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ
ID NO: 10)

【0287】 3'UTR:

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAA
GUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGC
AUC (SEQ ID NO: 11)

【0288】 下面列舉了編碼RSV F蛋白的每個全長mRNA的核酸序列。

【0289】 FD1 mRNA:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGA
ACGCGGAU UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGG
AAUUGCUGAUCCUCAAAGCGAACGCAAUCACCACUAUCCUCACUGCGG
UCACCUUCUGCUUUGCGAGCGGACAGAACAUACCGAAGAAUUCUACC
AAUCUACUUGCUCCGCCGUGUCCAAGGGUUACCUGUCCGCCCUUGAGGA
CCGGAUGGUACACUUCCGUGAUUACCAUUGAGUUGUCGAAUAUCAAGA
AGAACAAGUGCAACGGAACCGAUGCUAAGGUCAAGCUGAUCAAGCAGG
AGCUGGACAAGUACAAGAAUGCUGUGACCGAGCUGCAGCUGCUGAUGC
AGUCCACUCAAGCCACCAACAAUCGCGCCCCGGCGGGAACUCCCAAGGUU
CAUGAACUACACCUUGAACAACGCCAAGAAAACGAACGUGACCCUGUC
CAAGAAGCGCAAGCGCAGAUUCCUUGGCUUCCUUCUGGGCGUCGGUAG
CGCCAUCGCCUCCGGCGUGGCCGUCAGCAAGGUCCUGCACCUCGAGGGA

GAAGUCAACAAGAUUAAGAGCGCCCUGCUGUCCACCAACAAGGCCGUG
GUGUCGCUAUCAAACGGCGUCAGCGUACUGACCAGCAAAGUGCUGGAU
CUCAAGAACUACAUUGAUUAAGCAACUCCUCCCUAUCGUGAAUAAGCAG
AGCUGUUCGAUUUCCAACAUCGAGACUGUGAUUGAAUUCCAGCAGAAG
AACAAACCGGCUGCUGGAAAUUACCAGAGAAUUCAGCGUGAAUGCCGGA
GUCACUACCCCCGUGUCCACCUACAUGCUGACAAACUCCGAGCUGCUGA
GCCUGAUCAACGAUAUGCCGAUUACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGU
CGAACAACGUGCAGAUUCGUGCGCCAGCAGUCCUACUCAAUCAUGUCGA
UCAUCAAGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCUGUACG
GCGUGAUUGACACUCCGUGUUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGUGCA
CUACUAAACACCAAGGAGGGCAGCAAUAUCUGCCUGACUCGGACCGAUA
GAGGCUGGUACUGUGAUAAACGCCGGGUCCGUGUCCUUCUUCCCGCAAG
CCGAGACUUGCAAAGUGCAGAGCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGA
ACUCACUGACCUUGCCGAGCGAAGUCAACCUUUGCAACGUGGACAUCU
UUAACCCUAAAUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACGUGU
CGAGCUCAGUGAUUACUUCGCUGGGAGCCAUUGUGUCCUGCUACGGGA
AAACCAAGUGCACGGCCUCAAACAAGAACCGGGGUAUCAUUAAGACCU
UCUCCAACGGCUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGGUGGACACUGUGU
CCGUGGGAAACACCUUGUAUUACGUGAACAAGCAGGAGGGAAAGUCCC
UCUACGUGAAGGGCGAACCCAUCAUCAAUUUCUACGACCCGCUCGUGU
UCCCCUCCGAUGAAUUCGACGCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAAGA
UUAACCAGUCCCUGGCUUUCAUUCGCAAGUCCGACGAACUGCUCCAUA
ACGUCAACGCUGGAAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACCACGAUCA
UUAUUGUGAUCAUCGUCAUCCUGCUGUCACUGAUAGCAGUGGGACUGC

UCCUCUACUGCAAAGCGCGGUCGACCCCAGUGACACUCUCGAAGGACCA
GCUGUCCGGGAUCAACAACAUCGCGUUUUCGAACUGACGGGUGGCAUC
CCUGUGACCCCUCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCCACUCC
AGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO:
12)

【0290】 FD2 mRNA:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGA
AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGA
ACGCGGAU UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGG
AACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCACUACCAUCCUGACUGCCG
UCACCUUCUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAUUUUACC
AAAGCACCUGUAGCGCGGUGUCCAAGGGAUACCUGAGCGCUCUGAGGA
CCGGAUGGUACACCAGCGUGAUUACCAUCGAGCUGAGUAACAUCAAGA
AGAACAAGUGCAACGGGACCGAUGCUAAGGUCAAGUUGAUCAAACAAG
AGCUCGACAAGUACAAGAACGCCGUGACUGAGCUGCAGCUGCUGAUGC
AGUCAACUCAGGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAACUGCCGAGAU
UCAUGAACUACACCCUGAACAACGCCAAAAAGACCAACGUGACCCUGU
CCAAGAAGAGAAAGCGCCGGUUCUGGGUUUCCUGCUUUGGCGUGGGAU
CAGCAAUCGCGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGG
GCGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAGGCCG
UCGUU UCCCUGUCGAACGGAGUGUCCGUGCUCACGAGCAAAGUGCUCG
ACCUGAAGAACUACAUCGACAAACAGCUGCUGCCCAUCGUCAACAAGC
AGAGCUGCAGCAUCUCAACA AUUGAAACCGUGAUCGAGUCCAGCAGA
AGAACAACCGCCUGCUCGAGAUUACCAGAGAGUUU UCCGUGAACGCCG

GCGUGACCACCCCGGUGUCGACCUACAUGCUCACAAAUUCGGAACUUC
UCUCCCUGAUUAAUGACAUGCCCAUUAACGAUCAGAAAAAGCUGA
UGUCGAACAAUGUGCAGAUUGUGCGCCAGCAGUCCUACUCCAUCAUGU
CCAUCAUUAAGGAAGAGGUCCUGGGCCUACGUGGUGCAGUUGCCGCUGU
ACGGUGUCAUCGAUACCCCCUGCUGGAAGCUCCAUAUUCGCCCCUGUG
UACUACCAACACCAAGGAAGGCUCCAACAUCUGCCUGACCCGGACGGA
UCGCGGCUGGUACUGUGACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCUUCCCGCA
AGCGGAGACUUGCAAAGUGCAGUCCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAU
GAACUCCCUGACUCUGCCGUCCGAAGUCAACCUCUGCAACGUGGACAU
UUUCAAUCCAAAAUACGACUGCAAGAUAAUGACCUCCAAGACUGACGU
GUCAUCGUCCGUGAUCACAUCUCUGGGAGCCAUUGUCUCCUGCUACGG
AAAGACUAAGUGCACCGCGUCGAACAAGAACAGGGGGCAUUAUCAAGAC
CUUCAGCAACGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGCGUGGAUACCGU
GUCCGUGGGCAACACCUUGUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGGAAGUC
CCUUUAUGUGAAGGGGGGAGCCAAUCAUUAACUUUUACGACCCCCUGGU
GUUCCCUAGCGACGAGUUCGACGCCUCAUCUCUCAAGUCAACGAAAA
GAUCAACCAGAGCCUCGCCUUCAUCCGCAAGUCCGAUGAACUGCUGUC
AGCCAUUGGGGGGUUACAUCCCUGAGGCCCCUCGGGACGGACAGGCAUA
CGUCCGCAAGGACGGCGAAUGGGUGCUGCUUAGCACCUUCCUCUAACG
GGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGGCCUGGAAGU
UGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAU
C (SEQ ID NO: 13)

【0291】 FD3 mRNA:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGA

AGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGA
ACGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGG
AACUGCUGAUCCUCAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCGCUGU
GACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUACUGAAGAGUUUUACCA
GAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGGUUACCUUCCGCACUGCGGAC
CGGAUGGUACACUCCGUGAUACCAUUGAGCUCAGCAACAUCAAGGA
AAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAAGA
ACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGGG
AUCCGGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUGU
GUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGC
GCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCUGUCUAAACGGCGUCAG
CGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUACAUGACAAGCA
GCUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAA
ACCGUGAUUCGAGUCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACU
CGCGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACA
UGCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCAUGACAUGCCUAUCAC
GAACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCA
GCAGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUA
CGUGGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAA
GCUGCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAAC
AUCUGCUUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGG
AAUGUUUCGUUCUCCCCACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAAAC
AGAGUGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUG
AACCUGUGUAACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUU

AUGACCAGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUAACAAGCCUGGGG
GCGAUUGUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAG
AACCGCGGCAUCAUUAAGACUUUCUCGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCC
AACAAGGGGCGUGGAUACUGUGUCAGUCGGGAUACUCUUUACUACGUG
AACAAGCAGGAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUUUC
AACUUUUACGAUCCGCUGGUGUUCCTCGUCCGACGAAUUCGACGCCAGC
AUCAGCCAAGUCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCGCCUUCAUCAACC
AAUCCGACGAGCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAAGUCCACCACCA
ACAUCAUGAUCACUACUAUUUAUCAUCGUGAUAUCGUCAUCCUGCUGA
GCCUGAUUUGCUGUGGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCC
CGGUCACCCUGUCGAAGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAUUGCCU
UCUCCAACUAACGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCC
UGGCCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAA
AAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 14)

【0292】 RSV F mRNA蛋白表現：

【0293】 評價FD1、FD2和FD3 mRNA構建體的蛋白質表現。將mRNA構建體轉染到人胚胎腎細胞（HEK）中，並且24小時後回收細胞裂解物或上清液用於藉由蛋白質印跡分析。圖1A示出了從轉染細胞回收並且使用5353C75小鼠單株抗體檢測的蛋白質的蛋白質印跡圖像。基於DS-Cav1蛋白對照，FD1構建體在約50 kDa的預期分子量（MW）處產生中等強度的條帶，然而，在<30 kDa處也存在非常密集的條帶。FD2條帶以正確的MW表現，但其密度顯著低於來自FD1的50 kDa條帶，表明表現較低。FD3條帶大得多，並且從60-80 kDa變得模糊，這與FD3是糖基化蛋白一致。FD2和FD3都不像FD1那樣表現在<30 kDa處的蛋白條帶。

為了研究用FD1觀察到的低分子量條帶，對mRNA進行體外轉譯。如圖1B所示，製備蛋白質印跡，其中泳道中來自FD1 mRNA的HEK轉染蛋白標記為“FD1-T”並且泳道中來自FD1 mRNA的體外轉譯產物標記為“FD1-IVT”。在此印跡的FD1-IVT泳道中缺乏小MW條帶的表現表明小MW條帶可能是由於HEK細胞加工蛋白質的問題。

【0294】 為了進一步研究FD1的低分子量條帶表現並且確保mRNA批次之間的一致性，為所有三種FD構建體製備兩個新轉錄的mRNA批次。將這些mRNA轉染到HEK細胞中以及核轉染到人骨骼肌細胞（HskMC）中，如圖2A和圖2B所示。

【0295】 最後，對膜結合的FD1和FD3構建體進行免疫染色，以評價細胞表面表現和針對已知抗原位點的單株抗體的結合。將HEK細胞用FD1或FD3 mRNA轉染，並且在轉染後24小時用單株抗體探測。如圖3所示，儘管當用位點II特異性單株抗體探測時，兩種構建體都具有高信號，但與FD3轉染細胞不同，當用位點O特異性單株抗體D25探測時，FD1構建體在背景（模擬轉染）上具有非常小的信號。這表明在FD1轉染細胞表面上表現的RSV-F蛋白不顯示具有最高中和潛力的抗原位點。連同顯示出乎意料的條帶圖案的蛋白質印跡（例如，圖1A、圖1B、圖2A和圖2B），這些資料表明FD1可能不會在體內誘導有效保護，並且將需要進行免疫原性測試來證實這一點。

實例2：編碼RSV F蛋白的mRNA在小鼠體內的免疫原性

【0296】 在未免疫(幼稚)小鼠中測試編碼上面列舉的RSV F蛋白FD1、FD2和FD3的mRNA的免疫原性。將每種mRNA包封到脂質奈米顆粒（LNP）中。

【0297】 將每種LNP-mRNA組合物以每隻小鼠1 μ g的劑量投予於幼稚小鼠。

作為對照，將融合前F蛋白奈米顆粒(Pre-F-NP)與alum-85佐劑一起投予於小鼠。Alum-85（也稱為alhydrogel-85）是一種基於氫氧化鋁的佐劑類型。Pre-F-NP利用Pre-F蛋白的C末端的鐵蛋白結構域，其中每個鐵蛋白結構域與其他鐵蛋白結構域自組裝形成球狀奈米顆粒。在注射後第0、21和35天，從免疫小鼠中提取血清。測量RSV F蛋白抗體力價（圖9A）和RSV微中和力價（圖9B）。抗體力價測量如下：將ELISA板用1 µg/ml的RSV融合前F蛋白包被。阻斷後，板然後接受每種血清樣品的序列稀釋液，其覆蓋的稀釋範圍為從1：1000至1：729,000。然後將板使用與辣根過氧化物酶接合的抗小鼠二抗檢測，隨後使用Pierce 1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液視覺化。然後在SpectraMax讀板器中在450 nm處讀取板。力價報告為導致光密度 > 0.2的最高血清稀釋度。

【0298】 RSV微中和力價測量如下：在感染前一天，將Vero細胞（ATCC CCL-81）以30,000個細胞/孔接種在適用於螢光讀取的96孔板中。將血清樣品熱滅活，並且從1：20至1：81,920續列稀釋4倍。將稀釋的血清與表現綠色螢光蛋白報告物的RSV毒株A2以1：1合併，並且培育1小時。將血清-病毒混合物添加到細胞板中，將所述細胞板培育24小時。然後在高內涵成像儀上讀取板，並且定量螢光事件。使用SoftMax GxP中的4參數邏輯回歸計算血清50%中和力價。

【0299】 在FD1、FD2和FD3 mRNA中，資料顯示FD1和FD3 mRNA在小鼠中誘導最高的RSV F-蛋白結合抗體力價，並且FD2和FD3 mRNA誘導最高的RSV中和。

實例3：模組化免疫體外構建體（MIMIC®）系統中編碼RSV F蛋白的mRNA的免疫原性

【0300】 MIMIC®系統使用個體捐贈者的循環免疫細胞來重現每個個體的

人類免疫反應。人類暴露於RSV的歷史表現在用於開發MIMIC® B細胞淋巴組織等同物（LTE）模組的人類供體細胞的免疫群體中。此模組允許測量循環淋巴細胞中的“回憶”反應，這是在預先存在對RSV的免疫力的人類群體進行免疫期間所預期的情況。MIMIC®系統進一步描述在Higbee等人 (Altern. Lab Anim. 37: Suppl 1: 19-27. 2009) 中，將其藉由引用併入本文。將mRNA-LNP組合物與MIMIC®系統一起培育。每種LNP由40%陽離子脂質F、30%磷脂DOPE、1.5% PEG化脂質DMG PEG2000和28.5%膽固醇構成。

【0301】 為了證實FD1、FD2和FD3的抗體反應，在MIMIC® B細胞LTE中使用0.37 µg劑量的mRNA-LNP。14天后，收集MIMIC®上清液並且基於Luminex的抗體取證測定中測試抗體與Pre-F和Post-F的結合。

【0302】 測量FD1、FD2和FD3 mRNA中每一種的抗Pre-F蛋白IgG的力價，並且以Pre-F NP作為對照。如圖10A所示，三種mRNA中的每一種都刺激抗Pre-F蛋白IgG的穩健產生。還測量抗Pre-F/抗Post-F抗體比。如圖10B所示，FD3 mRNA比FD1或FD2 mRNA更大程度地刺激抗Pre-F抗體的產生。

【0303】 確定由上述刺激在MIMIC®系統中誘導的中和抗體力價。如圖11所示，FD1、FD2和FD3 mRNA中的每一種都刺激高的抗RSV中和力價。

實例4：編碼RSV F蛋白的mRNA在非人靈長類動物（NHP）中的免疫原性

【0304】 在NHP中進行免疫原性實驗。將每種mRNA包封到LNP中，LNP由40%陽離子脂質OF-02、30%磷脂DOPE、1.5% PEG化脂質DMG PEG2000和28.5%膽固醇構成（“脂質A”LNP配製品）。

【0305】 將每種LNP-mRNA組合物以每隻動物10 µg的劑量投予於幼稚NHP。作為對照，將Pre-F-NP與AF03佐劑一起投予於NHP。AF03是在Klucker

等人 (J. Pharma. Scien. 101(12): 4490-4500. 2012) 中進一步描述的基於角鯊烯的乳劑佐劑。在注射後第0、28和56天，從免疫NHP中提取血清。測量RSV F蛋白抗體力價（圖4A）和RSV微中和力價（圖4B）。資料顯示所有三種mRNA在NHP中誘導高的RSV F-蛋白結合抗體力價，並且FD2和FD3 mRNA誘導最高的RSV中和。

【0306】也在用Pre-F NP預免疫的NHP中進行免疫原性實驗。將每種mRNA包封到與上述在幼稚NHP中使用的相同的LNP中。

【0307】在競爭性ELISA中進一步表徵在免疫NHP中產生的抗RSV F蛋白抗體。免疫NHP的血清用於確定血清競爭三種不同抗RSV F蛋白抗體的能力。抗體D25與Pre-F蛋白上的位點Ø結合（McLellan等人, Science. 340(6136): 1113-7. 2013）。抗體Synagis（帕利珠單抗）結合位點II（Johnson等人 J. Infect. Dis. 176(5): 1215-24. 1997）。抗體131-2a結合位點I（Widjaja等人 J. Virol. 90(13): 5965-5977. 2016）。如圖5所描繪，來自用FD3 mRNA或含佐劑的Pre-F NP免疫的NHP的血清具有高位點Ø抗體，如D25抗體的高Log₂ IT₅₀值所證明。此外，產生有限的位點I（優選融合後F蛋白，131-2a）或位點II（Synagis）抗體。這可能是由於在FD3設計中對F蛋白進行的修飾，這促進了融合前F蛋白的形成並且引入了糖基化位點，從而掩蓋了產量較低的表位。這允許免疫重新聚焦於在位點Ø最有效力的表位。

【0308】與FD3相反，FD2 mRNA引發了相似水準的位點Ø、II和I特異性抗體。在Espeseth等人 (npj Vaccines. 5(1): 16. 2020) 中觀察到類似的結果。位點II抗體不如位點Ø抗體有效力。此外，來自位點I的不太有效抗體可以潛在地影響中和活性或增強感染。

免疫前NHP評價：

【0309】 在比較FD2和FD3時要考慮的另一個因素是在經疫苗接種個體中誘導記憶B細胞回憶反應的能力。可溶性蛋白（諸如由FD2構建體產生的可溶性蛋白）通常在交聯B細胞受體（BCR）和啟動記憶B細胞群體方面不如膜結合蛋白那麼有效（Kowalski等人 *Molecular Therapy*. 27(4): 710-728. 2019；Maruggi等人 *Molecular Therapy*. 27(4): 757-772. 2019；Pardi等人 *Nature Reviews Drug Discovery*. 17(4): 261-279. 2018）。用FD2構建體的疫苗接種確實在幼稚小鼠和猴群體中產生強的RSV中和抗體反應，然而，FD2構建體產生可溶性RSV-F蛋白並且因此應在免疫前群體中進行測試以評價加強反應。為了測試這一點，使用12隻先前已接種RSV Pre-F NP與佐劑的猴，並且基於免疫前狀態（藉由RSV-F ELISA）和先前的研究參與分成2組（n=6）。被選擇用於免疫前加強研究的動物先前用含佐劑的RSV pre-F NP亞單位疫苗免疫。簡而言之，選擇三項研究，其中最後一次免疫日期是在免疫前加強研究開始前至少6個月。藉由ELISA篩選這三項研究中所有合格的和可用的動物的RSV力價，並且選擇12隻動物用於免疫前加強研究。基於RSV力價、性別和先前的研究參與情況，將動物置於FD2或FD3加強組。

【0310】 一組用5 µg FD2 mRNA-LNP（脂質A LNP配製品）加強，並且另一組用5 µg FD3 mRNA-LNP（脂質A LNP配製品）加強。在D0、D14和D28採取血液，並且藉由RSV-F ELISA和RSV MNA評價血清，以分別確定結合和中和抗體的增加倍數。FD2和FD3加強組的結合抗體力價（圖6A所示）和中和抗體力價（圖6B所示）兩者均從D0到D14顯著增加（ $p<0.001$ ），但在D14與D28之間沒有變化。FD2和FD3誘導的反應之間沒有觀察到差異，表明兩種構建體都可以有效

地加強免疫前個體。

實例5：陽離子脂質篩選

【0311】 針對LNP包封的RSV F蛋白mRNA測試了不同陽離子脂質在LNP中的影響。測試陽離子脂質cKK-E10、OF-02、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14和GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1。每種LNP由40%的五種陽離子脂質之一、30%磷脂DOPE、1.5% PEG化脂質DMG-PEG2000和28.5%膽固醇構成。還使用具有陽離子脂質MC3的LNP，其被認為是行業基準（Jayaraman等人 Angew Chem Int Ed. 51:8529-33. 2012）。

【0312】 測試LNP的特徵示出在下表2中。

表2 - 測試LNP的特徵

特徵	脂質A	脂質B	脂質C	脂質D	脂質E	MC3
外觀	半透明	半透明	半透明	半透明	半透明	半透明
包封%	93	99	88	90	94	98
尺寸(nm)	89	101	103	87	74	89
多分散性指數(PDI)	0.119	0.207	0.119	0.139	0.186	0.147
pH	4.8	5.5	5.5	5.4	4.6	4.5

【0313】 將LNP-FD3 mRNA組合物投予於NHP。在D0和D21，藉由肌內(IM)注射向各組6隻食蟹猴投予5 µg劑量的用上述LNP包封的mRNA或10 µg劑量的加有Al(OH)₃佐劑的RSV Pre-F NP亞基對照疫苗。在每次疫苗投予之前以及在最後一次疫苗接種後兩週（D35），給食蟹猴放血。如圖7所示，所測試的所有陽離子脂質均有效誘導與具有鋁佐劑的Pre-F NP類似水準的抗RSV F蛋白抗體的產生。

【0314】 如圖8所示，所測試的所有陽離子脂質均產生與具有鋁佐劑的Pre-F NP類似水準的有效的RSV中和力價。

【0315】圖7和圖8的累積結果示出在下表3和表4中。

表3 - 免疫反應的幅度

LNP配製品	中和力價	相比於MC3的倍數
脂質A	9.86	23.43
脂質B	10.03	26.35
脂質C	8.509	9.18
脂質E	6.929	3.07
脂質D	8.894	11.99
MC3	5.308	1.00
Pre-F NP	10.97	50.56

表4 - 免疫反應的品質

LNP配製品	抗體力價	中和力價	抗體力價/中和力價比
脂質A	15.58	9.86	52.71
脂質B	15.56	10.03	46.21
脂質C	14.67	8.51	71.51
脂質E	13.27	6.93	81.01
脂質D	14.71	8.89	56.49
MC3	11.3	5.31	63.56
Pre-F NP	17.59	10.97	98.36

【0316】證明了更好的免疫反應品質，其中抗體力價/中和力價比的值更低。

於此，含有陽離子脂質cKK-E10的LNP展現出最佳品質的免疫反應，而所有陽離子脂質展現出比非mRNA疫苗Pre-F NP更優的免疫反應品質。

實例6：I/II期、隨機、雙盲、安慰劑對照的多組劑量發現研究，用於評價用LNP cKK-E10或LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10配製的RSV mRNA疫苗候選物在年齡18至50歲或60歲及以上的成年參與者中的安全性和免疫原性。

研究基本原理

【0317】本文描述的臨床試驗測試了RSV mRNA LNP疫苗的安全性和免

疫原性。RSV mRNA LNP疫苗包含在兩種包封LNP配製品之一(即,含有cKK-E10或GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10的LNP)中的RSV mRNA,其以三種不同劑量(即,低劑量、中劑量或高劑量)投予於警哨群體中年齡18-50歲的健康成人和主群體和加強群體中60歲及以上的健康成人。RSV mRNA LNP疫苗以在小瓶中的液體冷凍溶液形式提供,用於肌肉(IM)投予。

簡要概述

【0318】 本研究的目的是在前哨群體中年齡在18-50歲的健康成人參與者以及主群體和加強群體中年齡在60歲及以上的健康成人參與者中評估3種劑量水準的用2種不同脂質奈米顆粒(LNP)(即,含有cKK-E10或GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10的LNP)配製的呼吸道融合病毒(RSV)傳訊核糖核酸(mRNA)疫苗候選物的單次肌肉(IM)注射的安全性和免疫原性。本研究的主要目的是評估2種LNP(cKK-E10和GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10)在不同劑量水準組(低、中、高劑量)的安全性和免疫原性特徵。另外,所述研究將在研究群體的亞組中評價初次疫苗接種後12個月投予的加強疫苗接種的安全性和免疫原性。對於前哨群體和主群體,每個參與者的參與持續時間為12個月,並且對於入選加強群體中的參與者亞組,總的持續時間為24個月。

表5. 研究組的總結

組數：	7	
組標記	組描述	組類型
組1: 警哨群體和主群體	經由肌肉注射的1次RSV mRNA LNP cKK-E10疫苗(低劑量)注射	實驗
組2: 警哨群體和主群體	經由肌肉注射的1次RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10疫苗(低劑量)注射	實驗
組3: 警哨群體和主群體	經由肌肉注射的1次RSV mRNA LNP cKK-E10疫苗(中劑量)注射	實驗

組4: 警哨群體和主群體	經由肌內注射的1次RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10疫苗（中劑量）注射	實驗
組5: 警哨群體和主群體	經由肌內注射的1次RSV mRNA LNP cKK-E10疫苗（高劑量）注射	實驗
組6: 警哨群體和主群體	經由肌內注射的1次RSV mRNA LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10疫苗（高劑量）注射	實驗
組7: 主群體、警哨群體和加強群體	經由肌內注射的1次安慰劑注射	安慰劑對比

目標

【0319】 *主要目標* 主要目標是評估三種不同劑量水準（即，低劑量、中劑量和高劑量）的包封在包含cKK-E10的LNP或包含GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10的LNP中的本文所述RSV mRNA疫苗的安全性和免疫原性特徵。

【0320】 *次要目標* 次要目標是評估：(1) 在參與者亞組中在初次疫苗接種後12個月給予的加強疫苗接種的安全性特徵；(2) 在初次疫苗接種後3、6和12個月免疫反應的持久性；和 (3) 在參與者亞組中在初次接種後12個月加強疫苗接種後免疫反應的持久性。

【0321】 *終點* 為了測試是否符合主要目標和次要目標，建立主要終點和次要終點。下表6和表7分別總結了主要終點和次要終點的描述和評價時間框架。

表6. 主要研究終點的總結

終點標題	終點描述	評價時間框架
即現不良事件(AE)的存在	經歷即現不良事件的參與者的數量	疫苗接種後30分鐘內
徵集性注射部位或全身反應的存在	報告以下的參與者的數量： - 注射部位反應：疼痛、紅斑和腫脹 - 全身反應：發熱、頭痛、不適、肌痛、關節痛和發冷	疫苗接種後7天內
非徵集性AE的存在	經歷非徵集性AE的參與者的數量	疫苗接種後28天內
醫學處理的不良事件 (medically attended adverse event)(MAAE)的存在	經歷MAAE的參與者的數量	疫苗接種後28天內

嚴重不良事件(SAE)的存在	經歷SAE的參與者的數量	第12個月
特別感興趣的不良事件(AESI)的存在	經歷AESI的參與者的數量	第12個月
超出範圍的生物測試結果的存在	生物安全性評估值超出正常範圍的參與者的數量(根據執行測試的實驗室)	疫苗接種後7天內
初次疫苗接種後中和抗體(nAb)力價的幾何平均力價(GMT)	初次疫苗接種後的中和抗體(nAb)力價	第1天和第29天

表7.次要研究終點的總結

終點標題	終點描述	評價時間框架
加強疫苗接種後即現不良事件 (immediate adverse event)的存在	經歷即現不良事件的參與者的數量	疫苗接種後30分鐘內
加強疫苗接種後徵集性注射部位或全身反應的存在	報告以下的參與者的數量： - 注射部位反應：疼痛、紅斑和腫脹 - 全身反應：發熱、頭痛、不適、肌痛、關節痛和發冷	疫苗接種後7天內
加強疫苗接種後非徵集性AE的存在	經歷非徵集性AE的參與者的數量	疫苗接種後28天內
加強疫苗接種後醫學處理的不良事件的存在	經歷MAAE的參與者的數量	疫苗接種後28天內
加強疫苗接種後嚴重不良事件(SAE)的存在	經歷SAE的參與者的數量	在整個加強研究中，大約12個月
加強疫苗接種後特別感興趣的不良事件的存在	經歷AESI的參與者的數量	在整個加強研究中，大約12個月
加強疫苗接種後超出範圍的生物測試結果的存在	生物安全性評估值超出正常範圍的參與者的數量(根據執行測試的實驗室)	疫苗接種後7天內

在疫苗接種前(D01)和初次疫苗接種後28天的RSV-A血清nAb力價	在疫苗接種前(D01)、初次疫苗接種後28天(D29)以及3、6和12個月的RSV-A血清nAb力價	第1天、第29天、第3個月、第6個月和第12個月
初次疫苗接種後血清抗F免疫球蛋白G(IgG)抗體(Ab)力價的GMT	在疫苗接種前(D01)、初次疫苗接種後28天(D29)以及3、6和12個月的血清抗F免疫球蛋白G(IgG)抗體(Ab)力價	第1天、第29天、第3個月、第6個月和第12個月
加強疫苗接種後RSV-A血清nAb的GMT	在加強疫苗接種前、加強疫苗接種後28天以及3、6和12個月的RSV-A血清nAb力價(表示為幾何平均力價)	加強後第1天、第29天、第3個月、第6個月和第12個月
加強疫苗接種後血清抗F免疫球蛋白G(IgG)抗體(Ab)力價的GMT	在加強疫苗接種前、加強疫苗接種後28天以及3、6和12個月的血清抗F免疫球蛋白G(IgG)抗體(Ab)力價(表示為幾何平均力價)	加強後第1天、第29天、第3個月、第6個月和第12個月

研究群體

入選和排除標準

【0322】 *入選標準* 入選當天年齡在18-50歲的哨點群體中，入選當天年齡在60歲或以上的主群體和加強群體中。如果女性參與者沒有懷孕或哺乳並且無生育潛能，則她有資格參與。要考慮無生育潛能，女性必須絕經至少1年或手術絕育。能夠參加所有安排的訪視並且遵守所有研究程序。已經簽署知情同意書並且注明日期

【0323】 *排除標準* 如果適用以下任一標準，則參與者將被排除在研究之外：
已知或疑似先天性或獲得性免疫缺陷；或在前6個月內接受免疫抑制療法，諸如抗癌化療或放療；或長期全身皮質類固醇療法（在過去3個月內連續超過2週使用潑尼松或等效物）；針對任何研究干預組分（例如，聚乙二醇和聚山梨醇酯）的已知全身過敏；對研究中使用的研究干預或含有任何相同物質的產品有危及生命的反應史；投予mRNA COVID-19疫苗後的任何過敏反應（allergic reaction）（例如，過敏性反應（anaphylaxis））；在過去12個月內，臨床、血清學或微生物

物學診斷的RSV相關病患史；心肌炎、心包炎和/或心肌心包炎的既往史；基於研究者的判斷，血小板減少症或出血性障礙，禁用IM注射；出血性障礙，或入選前3週內接受抗凝劑，禁用肌肉注射；研究者認為處於可能干擾研究進行或完成的階段的慢性病患；研究者認為可能干擾研究進行或完成的酒精、處方藥或藥物濫用；在任何研究干預投予前4週內接受除mRNA疫苗以外的任何疫苗，或在任何研究干預投予後4週內計畫接受除mRNA疫苗以外的任何疫苗；在任何研究干預投予前60天內接受任何mRNA疫苗，或在任何研究干預投予後60天內計畫接受任何mRNA疫苗；先前用研究疫苗針對RSV的疫苗接種；在過去3個月內接受免疫球蛋白、血液或血液衍生產品；首次抽血前72小時內接受口服或注射抗生素療法；在研究入選時（或在第一次研究干預投予前4週內）參與或計畫在當前研究期間參與另一項研究疫苗、藥物、醫療器械或醫療程序的臨床研究；被行政或法院命令剝奪自由，或在緊急環境下，或非自願住院；藉由任何FDA批准/驗證的測試、B型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、B型肝炎核心抗體（HBcAb）、C型肝炎病毒抗體（HCV Ab）或陽性SARS-CoV-2 RTPCR或抗原測試檢測到的自我報告或記錄的人類免疫缺陷病毒（HIV）；或被鑒定為直接參與擬議研究的研究者或研究者的員工或研究中心，或被鑒定為直接參與擬議研究的研究者或員工的直系家庭成員（即，父母、配偶、親生或領養子女）。

每位參與者的持續時間

【0324】 對於前哨群體和主群體，每個參與者的參與持續時間為12個月，並且對於入選加強群體中的參與者亞組，總的持續時間為24個月。前哨群體中的參與者（1次肌內（IM）注射）將在疫苗接種後接受12個月的隨訪。主群體中的參與者（1次IM注射）將在疫苗接種後接受12個月的隨訪。加強群體中的參與

者（初次疫苗接種後12個月進行1次IM注射）將在投予加強劑量後接受12個月的隨訪。

【0325】 考慮到本文公開的說明書和實踐，本揭露的其他實施例對於本領域技術人員而言是清楚的。所述說明書和實例旨在僅被視為例示性的，所附申請專利範圍指示了本揭露的真實範圍和精神。

【0326】 本文引用的所有專利和出版物藉由引用以其整體併入本文。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，其包含傳訊RNA(mRNA)，所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框(ORF)，其中所述RSV F蛋白抗原包含與SEQ ID NO: 3具有至少98%同一性的胺基酸序列或由SEQ ID NO: 3的胺基酸序列組成。

【請求項2】 如請求項1所述的RSV疫苗，其中所述RSV F蛋白抗原是融合前蛋白。

【請求項3】 如請求項1或2所述的RSV疫苗，其中所述ORF是經密碼子優化的。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA包含至少一個5'非轉譯區(5' UTR)、至少一個3'非轉譯區(3' UTR)、和至少一個多腺苷酸化(聚(A))序列。

【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA包含至少一個化學修飾。

【請求項6】 如請求項1-5中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【請求項7】 如請求項1-5中任一項所述的RSV疫苗，其中所述ORF中至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的尿嘧啶核苷酸是經化學修飾的。

【請求項8】 如請求項5-7中任一項所述的RSV疫苗，其中所述化學修飾選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-

甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

【請求項9】 如請求項8所述的RSV疫苗，其中所述化學修飾選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲氧基尿苷、及其組合。

【請求項10】 如請求項8所述的RSV疫苗，其中所述化學修飾是N1-甲基假尿苷。

【請求項11】 如請求項1-10中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中。

【請求項12】 如請求項11所述的RSV疫苗，其中所述LNP包含至少一種陽離子脂質。

【請求項13】 如請求項12所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質是可生物降解的。

【請求項14】 如請求項12所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質不是可生物降解的。

【請求項15】 如請求項12所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質是可裂解的。

【請求項16】 如請求項12所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質不是可裂解的。

【請求項17】 如請求項12所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質選自OF-02、cKK-E10、GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1、GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10、和GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14。

【請求項18】 如請求項17所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質是cKK-E10。

【請求項19】 如請求項17所述的RSV疫苗，其中所述陽離子脂質是GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10。

【請求項20】 如請求項11-19中任一項所述的RSV疫苗，其中所述LNP進一步包含聚乙二醇（PEG）接合的（PEG化的）脂質、基於膽固醇的脂質、和輔助脂質。

【請求項21】 如請求項11-20中任一項所述的RSV疫苗，其中所述LNP包含：
莫耳比為35%至55%的陽離子脂質；
莫耳比為0.25%至2.75%的聚乙二醇（PEG）接合的（PEG化的）脂質，
莫耳比為20%至45%的基於膽固醇的脂質，和
莫耳比為5%至35%的輔助脂質，
其中所有莫耳比均相對於所述LNP的總脂質含量。

【請求項22】 如請求項21所述的RSV疫苗，其中所述LNP包含：
莫耳比為40%的陽離子脂質，
莫耳比為1.5%的PEG化的脂質，
莫耳比為28.5%的基於膽固醇的脂質，和
莫耳比為30%的輔助脂質。

【請求項23】 如請求項20-22中任一項所述的RSV疫苗，其中所述PEG化脂質是二肉豆蔻醯-PEG2000（DMG-PEG2000）或2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺（ALC-0159）。

【請求項24】 如請求項20-22中任一項所述的RSV疫苗，其中所述基於膽固醇的脂質是膽固醇。

【請求項25】 如請求項20-22中任一項所述的RSV疫苗，其中所述輔助脂質是1,2-二油醯基-SN-甘油-3-磷醯乙醇胺（DOPE）或1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷醯膽鹼（DSPC）。

【請求項26】 如請求項11-22中任一項所述的RSV疫苗，其中所述LNP包含：
莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10，
莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000，
莫耳比為28.5%的膽固醇，和
莫耳比為30%的DOPE。

【請求項27】 如請求項11-22中任一項所述的RSV疫苗，其中所述LNP包含：
莫耳比為40%的cKK-E10，
莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000，
莫耳比為28.5%的膽固醇，和
莫耳比為30%的DOPE。

【請求項28】 如請求項11-27中任一項所述的RSV疫苗，其中所述LNP的平均直徑為30 nm至200 nm。

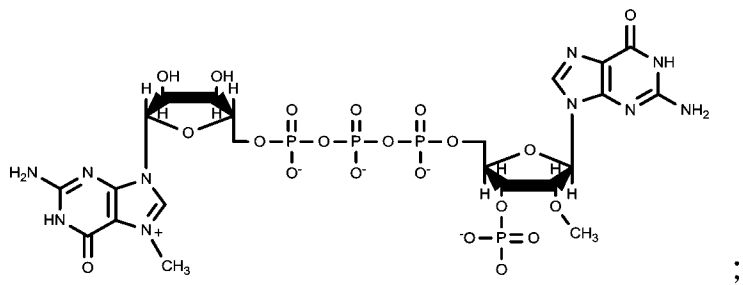
【請求項29】 如請求項28所述的RSV疫苗，其中所述LNP的平均直徑為80 nm至150 nm。

【請求項30】 如請求項1-29中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA包含與SEQ ID NO: 6所示的核酸序列具有至少80%同一性的核酸序列。

【請求項31】 如請求項1-29中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA包含與SEQ ID NO: 14所示的核酸序列具有至少80%同一性的核酸序列。

【請求項32】 如請求項1-29中任一項所述的RSV疫苗，其中所述mRNA包含以下結構元件：

(i) 具有以下結構的5'帽：



(ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；

(iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；

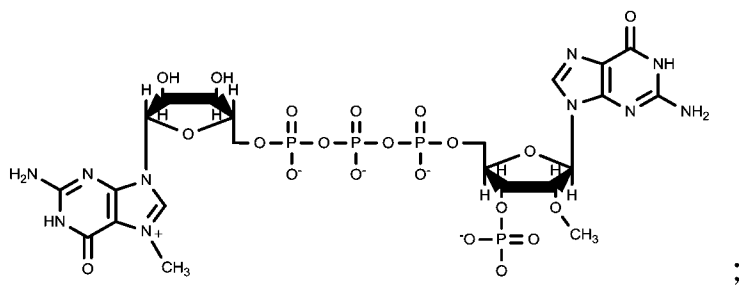
(iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和

(v) 聚(A)尾。

【請求項33】 一種呼吸道融合病毒(RSV)疫苗，其包含傳訊RNA(mRNA)，所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），

其中所述mRNA包含以下結構元件：

(i) 具有以下結構的5'帽：



- (ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；
- (iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；
- (iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和
- (v) 聚(A)尾；

其中所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中，其包含：

莫耳比為40%的GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10，

莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000，

莫耳比為28.5%的膽固醇，和

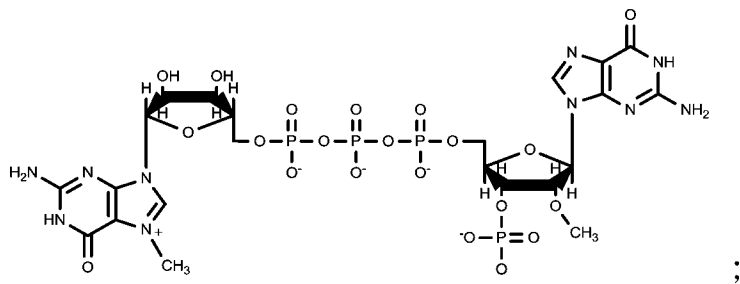
莫耳比為30%的DOPE。

【請求項34】 一種呼吸道融合病毒（RSV）疫苗，其包含傳訊RNA（mRNA），

所述傳訊RNA包含編碼RSV F蛋白抗原的開放閱讀框（ORF），

其中所述mRNA包含以下結構元件：

- (i) 具有以下結構的5'帽：



- (ii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 10的5'非轉譯區（5' UTR）；
- (iii) 具有核酸序列SEQ ID NO: 6的蛋白質編碼區；
- (iv) 具有核酸序列SEQ ID NO: 11的3'非轉譯區（3' UTR）；和
- (v) 聚(A)尾；

其中所述mRNA被配製在脂質奈米顆粒（LNP）中，所述脂質奈米顆粒包含：

莫耳比為40%的cKK-E10，

莫耳比為1.5%的DMG-PEG2000，

莫耳比為28.5%的膽固醇，和

莫耳比為30%的DOPE。

【請求項35】 一種引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的方法，所述方法包括向個體投予如請求項1-34中任一項所述的RSV疫苗。

【請求項36】 如請求項35所述的方法，其中在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 1的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更高的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【請求項37】 如請求項35所述的方法，其中在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予蛋白RSV疫苗的個體具有相當的抗RSV中和抗體的血清濃度。

【請求項38】 如請求項37所述的方法，其中所述蛋白RSV疫苗與佐劑共同投予。

【請求項39】 如請求項35所述的方法，其中所述RSV疫苗增加對所述RSV F蛋白的Ø位點具有結合特異性的抗體的血清濃度。

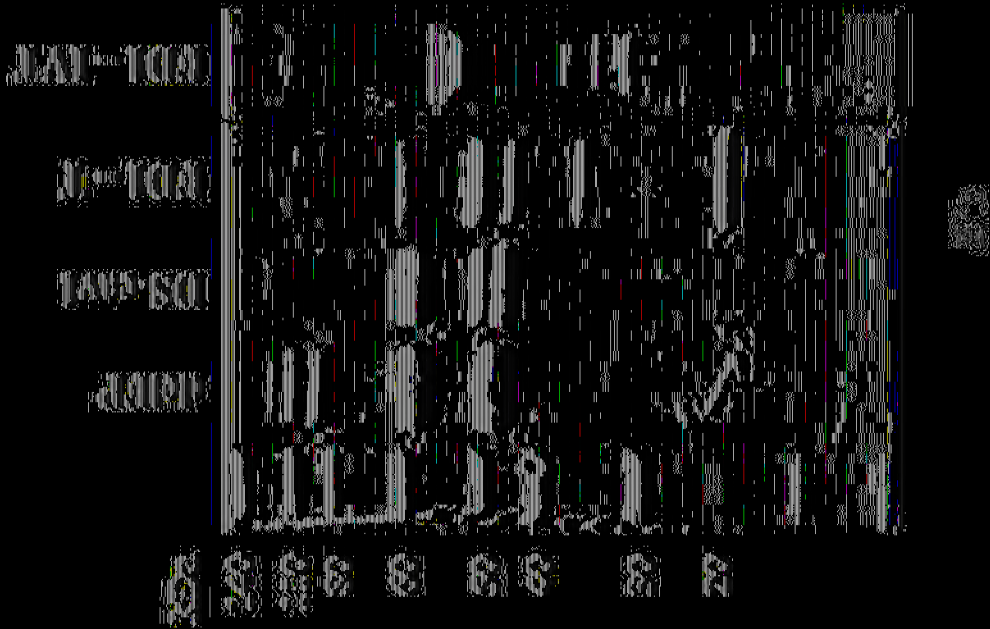
【請求項40】 如請求項35所述的方法，其中在投予所述RSV疫苗後，所述個體相對於投予包含編碼SEQ ID NO: 2的RSV F蛋白抗原的mRNA ORF的RSV疫苗的個體具有更低的對所述RSV F蛋白的位點I或位點II具有結合特異性的抗體的血清濃度。

【請求項41】 如請求項35所述的方法，其中所述RSV疫苗增加預先存在RSV免疫的個體的中和抗體的血清濃度。

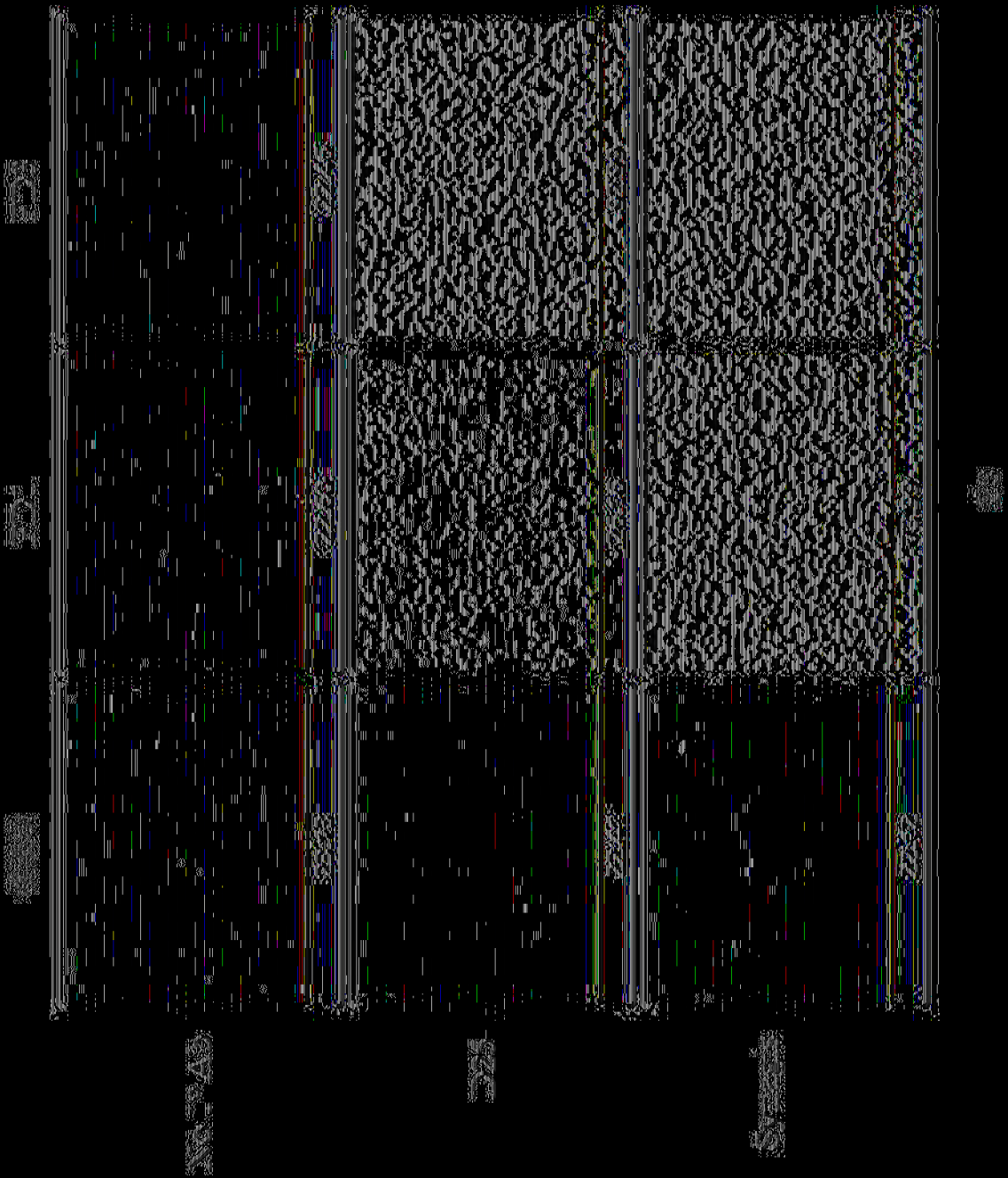
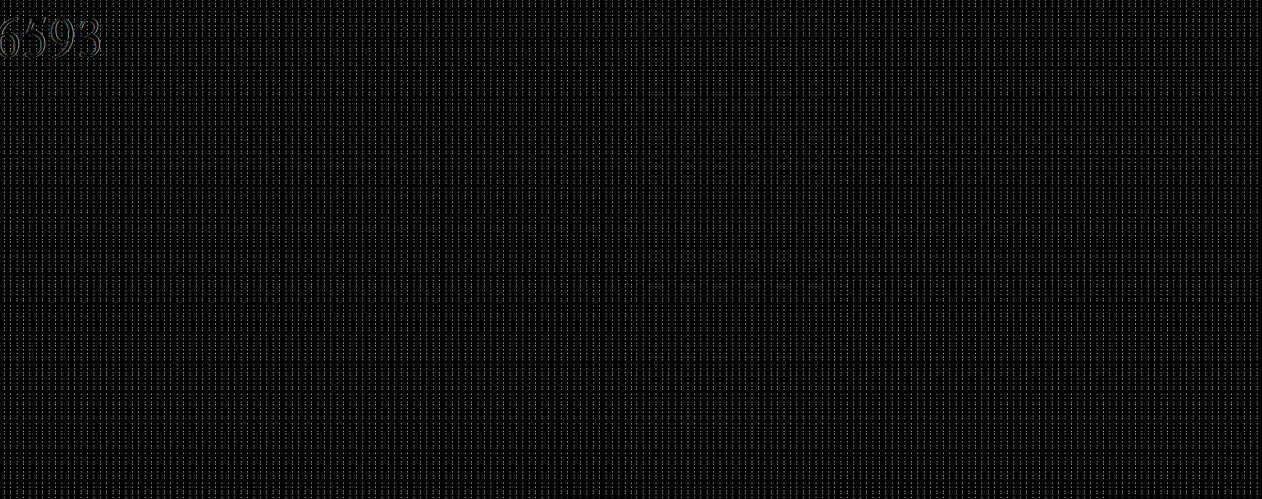
【請求項42】 一種用於引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的RSV疫苗，其包括向個體投予如請求項1-34中任一項所述的RSV疫苗。

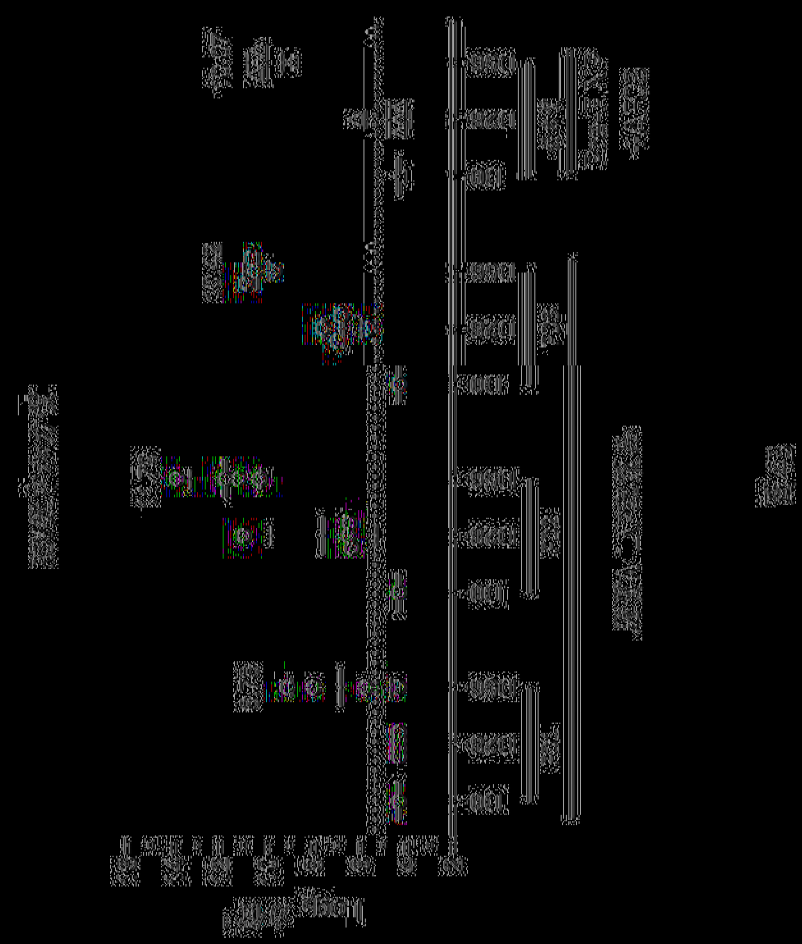
【請求項43】 一種如請求項1至34中任一項所述的RSV疫苗在製造用於引發對RSV的免疫反應或保護個體免受RSV感染的藥劑的用途。

|(發明圖式)|

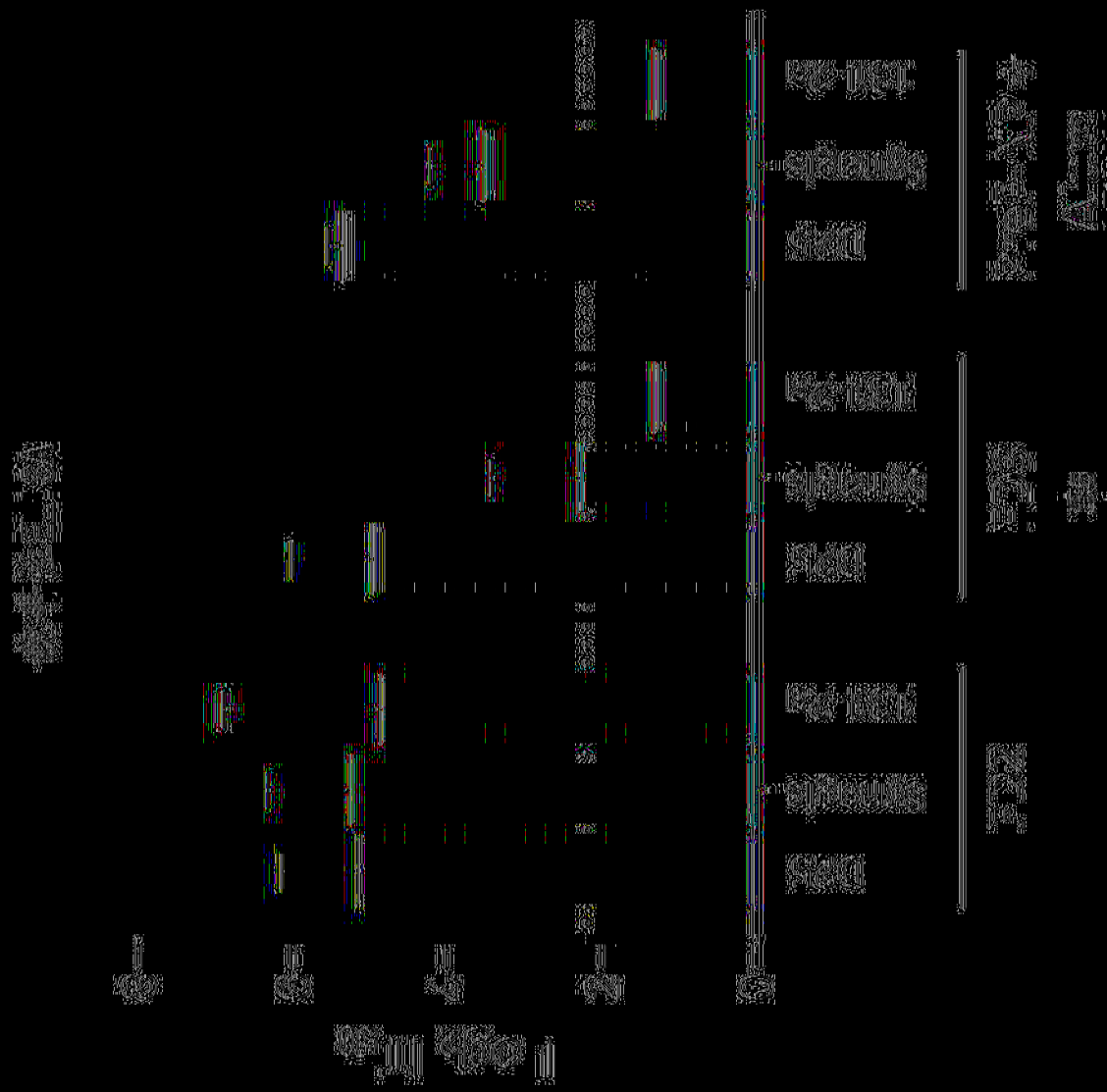


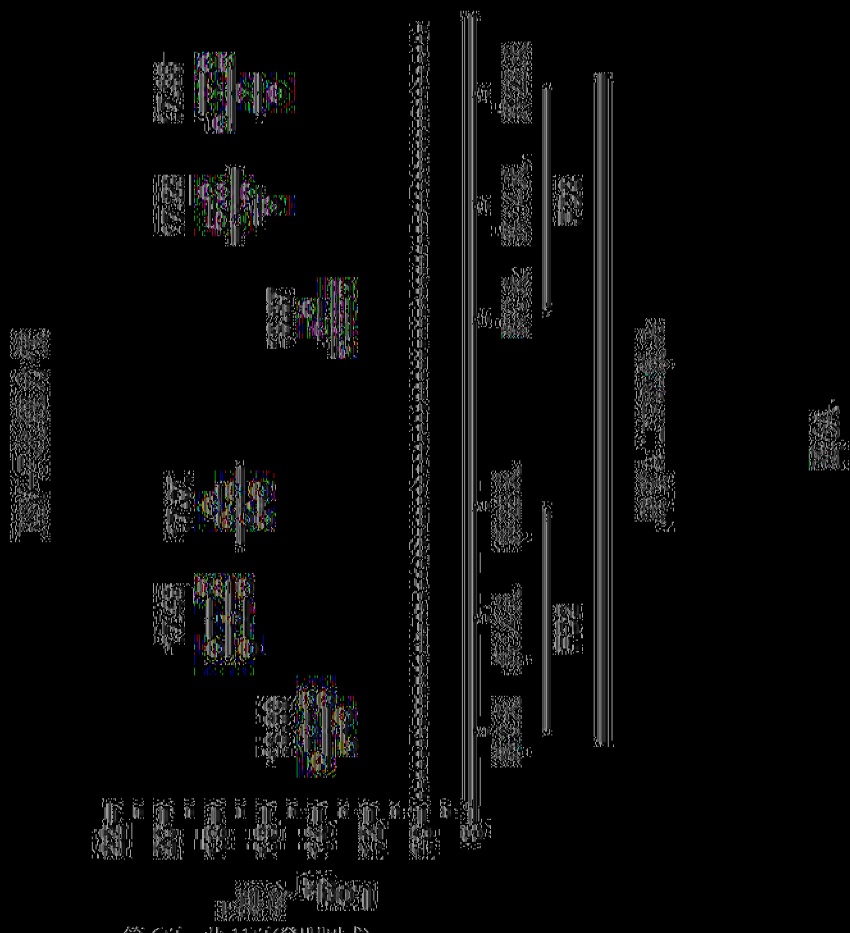
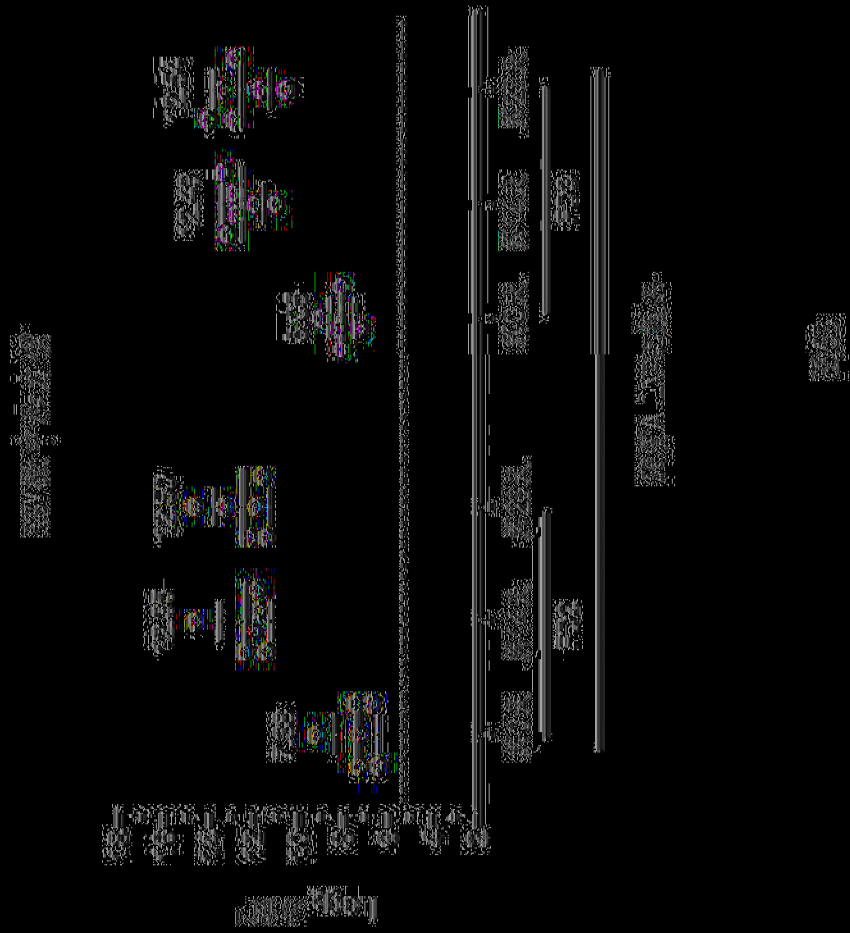




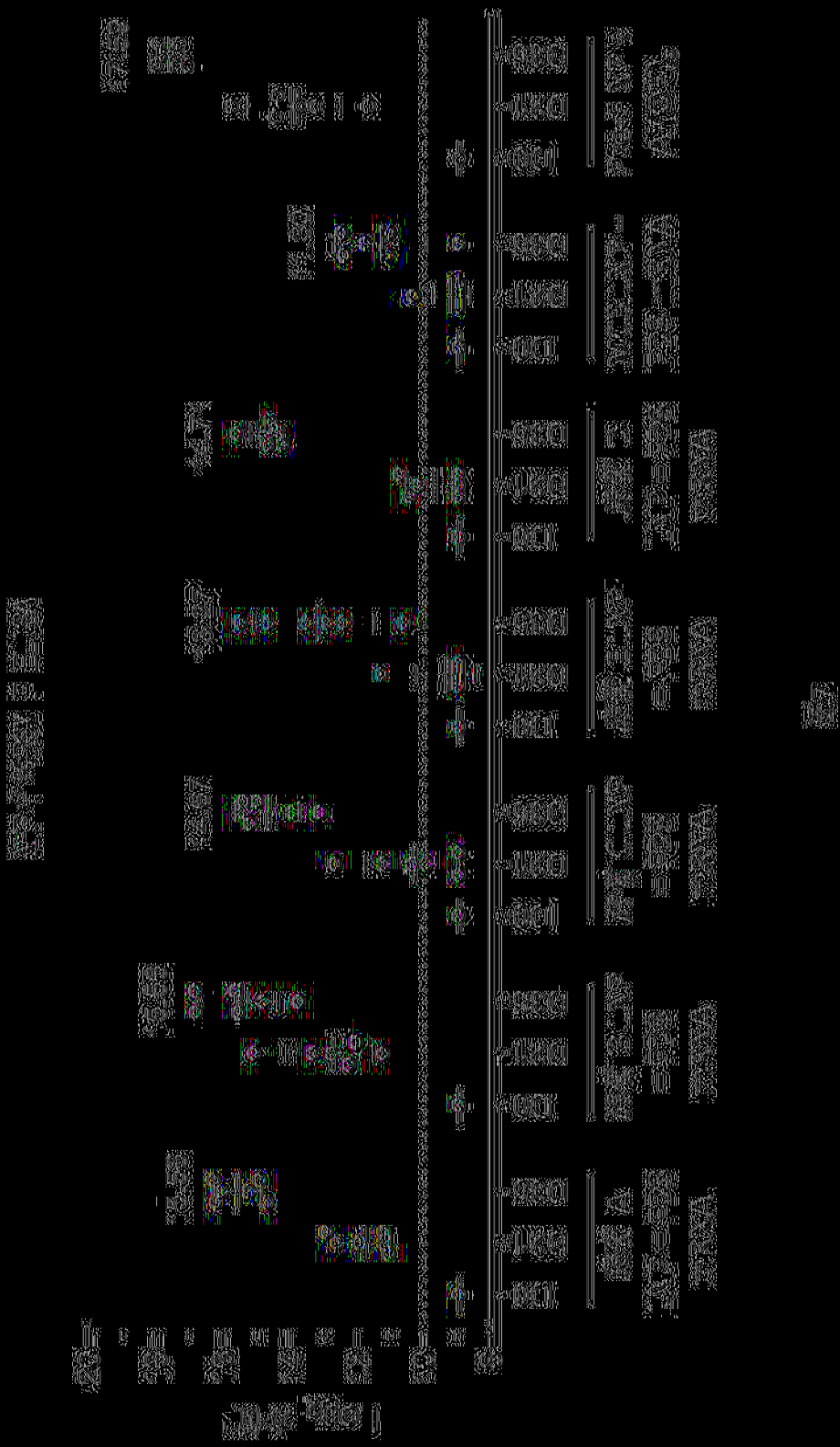


第 4 頁，共 11 頁(發明式)

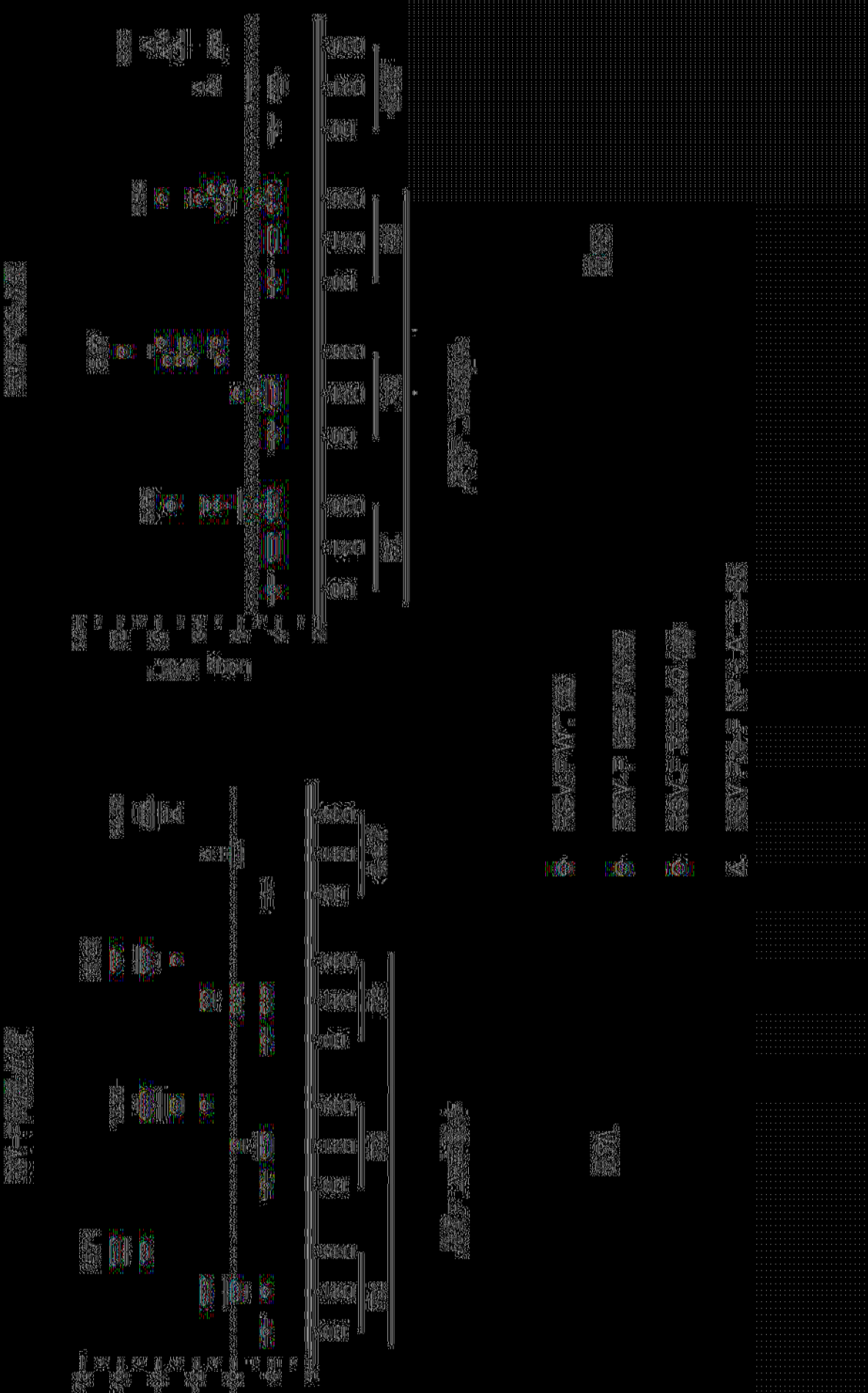


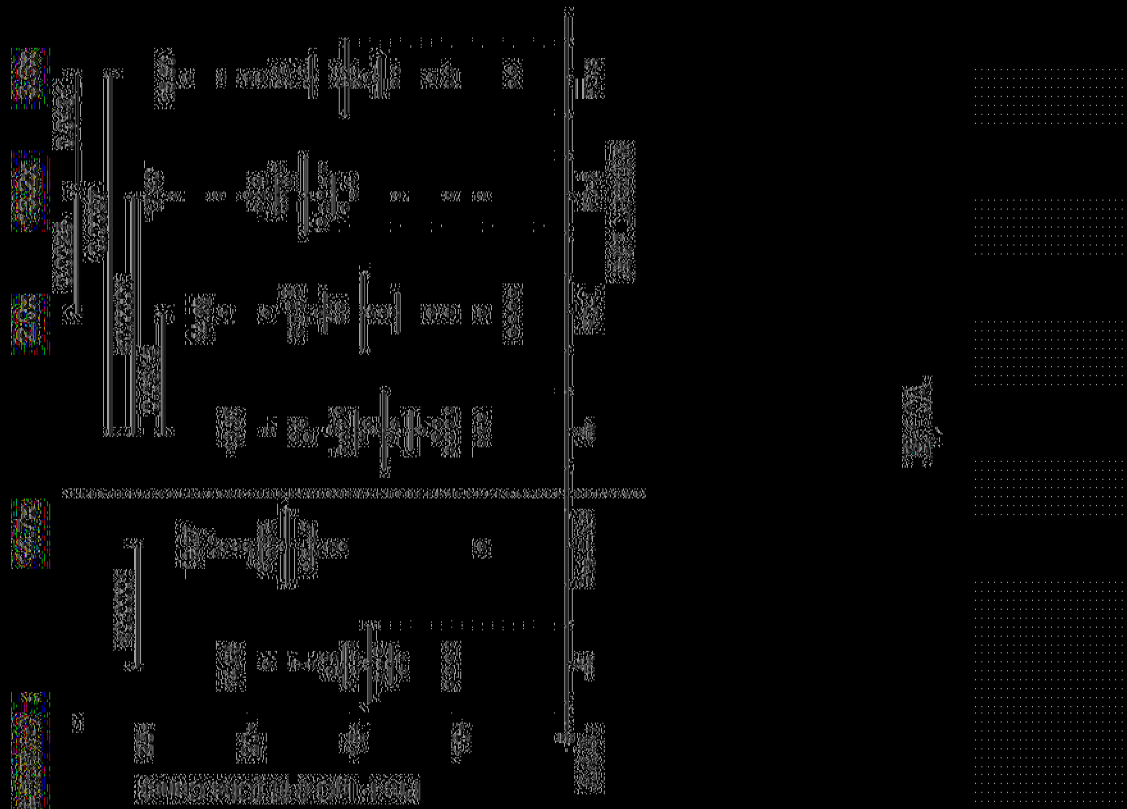
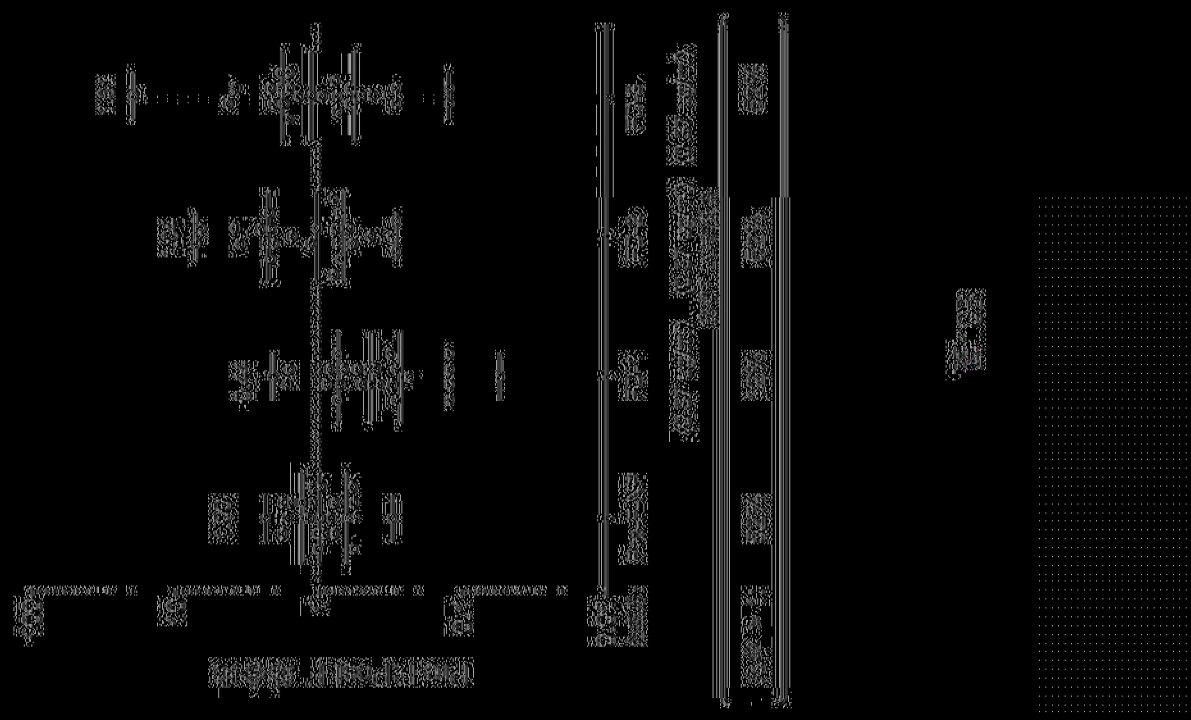


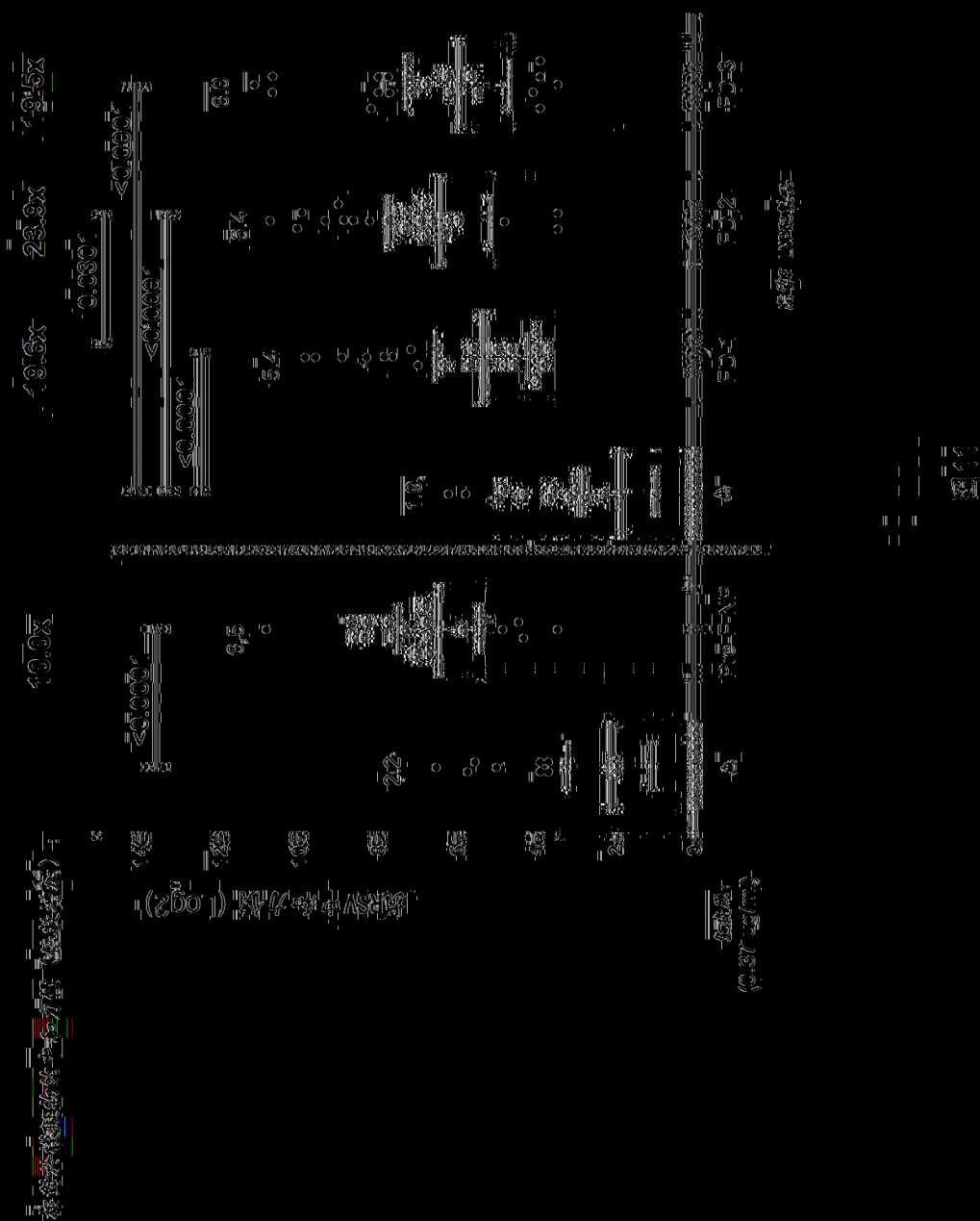
第 6 頁，共 11 頁(發明式)











```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="111382-seq.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-04-
07">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>111142195</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-11-04</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/276, 233</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-11-05</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">法商賽諾菲公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SANOFI</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">呼吸道融合病毒RNA疫苗</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>19</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>574</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..574</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELS
NIKKKNCNGTDAKVKLKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFL
GVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIE
FQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQ
LPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLC
NVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIVIVILLSLI
AVGLLLYCKARSTPVTLSKQDLSGINNIAFSN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>544</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..544</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELS
NIKKKNCNGTDAKVKLKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFL
GVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIE
FQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQ
```

```
LPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDGRWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLC
NVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQ
EGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLST
FL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>534</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..534</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELS
NIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLS
NGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLIN
DMPITNDQKKLMSNNVQIVRQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKNGSNICLTRTRDGRWY
CDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKC
TASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSPDEFDASISQVNELINQS
LAFINQSDELLHNVNAGKSTTNIMITTI IIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFSN</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 4">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1725</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1725</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q8">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atggaattgctgatcctcaaagcgaacgcaatcaccactatcctcactgcggtcaccttctg
ctttgcgagcggacagaacatcaccgaagaattctaccaatctacttgctccgccgtgtccaagggttacctgtccgcc
tgaggaccggatggtacacttccgtgattaccattgagttgtcgaatatcaagaagaacaagtgcacggaaccgatgct
aaggtcaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagaatgctgtgaccgagctgcagctgctgatgcagtcactca
agccaccaacaatcgcgccccggcggaactcccaaggttcatgaactacaccttgaacaacgccaagaaaacgaacgtga
ccctgtccaagaagcgcaagcgagattccttggcttccttctgggcgtcggttagcgccatcgccctccggcgtggccgtc
agcaaggtcctgcacctcgagggagaagtcaacaagattaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtcgct
atcaaacggcgctcagcgtactgaccagcaaagtgttgatctcaagaactacattgataagcaactcctccctatcgtga
ataagcagagctgttcgatttccaacatcgagactgtgattgaattccagcagaagaacaaccggctgctggaaattacc
agagaattcagcgtgaatgccggagtcactacccccgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctgagcctgat
caacgatatgccgattaccaacgaccagaagaagctgatgtcgaacaacgtgcagatcgtgcgccagcagtcctactcaa
tcatgtcgatcatcaaggaagaggtcctggcctacgtggtgcagcttcctctgtacggcgtgattgacactccgtgttgg
aaactgcacactagttcccctgtgcactactaacaacgaaggaggcgcaatatctgcctgactcggaccgatagaggctg
gtactgtgataacgccgggtccgtgtccttcttcccgaagccgagacttgcaaagtcagagcaaccgggtgttctgtg
acactatgaactcactgaccttgccgagcgaagtcaacctttgcaacgtggacatctttaaccctaaatacgaactgcaag
atcatgacctccaagaccgacgtgtcgagctcagtgattacttcgctgggagccattgtgtcctgctacgggaaaaccaa
gtgcacggcctcaaacaagaaccggggtatcattaagaccttctccaacggctgcgactatgtgtccaacaagggggtgg
acactgtgtccgtgggaaacaccttgtattacgtgaacaagcaggagggaagtccctctacgtgaagggcgaacccatc
atcaatttctacgaccgcctcgtgttccccctccgatgaattcgacgcattccatctcacaagtcacgaaaagattaacca
```

```
gtccctggcttttcattcgcaagtcgacgaactgctccataacgtcaacgctggaaagtcaccaccaacatcatgatca
ccacgatcattattgtgatcatcgatcctgctgtcactgatagcagtgaggactgctcctctactgcaaagcgcggtcg
acccagtgacactctcgaaggaccagctgtccgggatcaacaacatcgcggttttcgaactga</INSDSeq_sequenc
e>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1635</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1635</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaactcctgatcctgaaggccaatgctatcactaccatcctgactgccgtcaccttctg
cttcgcctccggacaaaatatcactgaagaattttaccaaagcacctgtagcgcggtgtccaagggatacctgagcgctc
tgaggaccggatggtacaccagcgtgattaccatcgagctgagtaacatcaagaagaacaagtgcaacgggaccgatgct
aaggtcaagttgatcaacaagagctcgacaagtacaagaacgccgtgactgagctgcagctgctgatgcagtcactca
ggccaccaacaaccgggccagacgggaactgccgagattcatgaactacaccctgaacaacgccaaaaagaccaacgtga
ccctgtccaagaagagaaagcgccggttccctgggtttccctgcttggcggtgggatcagcaatcgcgctccggagtggcagt
tccaaggtcttgcacctcgagggcgaagtgaacaagatcaagtccgcgcttctgtcgaccaacaaggccgctcggttccct
gtcgaacggagtgtccgtgctcacgagcaaagtgtcgacctgaagaactacatcgacaaacagctgctgcccatcgctca
acaagcagagctgcagcatctcaaacattgaaaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgcctgctcgagattacc
agagagttttccgtgaacgccggcgtgaccaccccggtgtcgacctacatgctcacaatttcggaacttctctccctgat
taatgacatgcccattactaacgatcagaaaaagctgatgtcgaacaatgtgcagattgtgcgccagcagtcctactcca
tcatgtccatcattaaggaagaggtcctggcctacgtggtgcagttgccgctgtacggtgtcatcgataccccctgctgg
```

aagctccatacttcgccccctgtgtactaccaacaccaaggaaggctccaacatctgcctgacccggacggatcgcggtg
gtactgtgacaatgccgatccgtgtcgtttcttcccgaagcggagacttgcaaagtcagtcacaaccgggtgttctgtg
acactatgaactccctgactctgccgtccgaagtcaacctctgcaacgtggacattttcaatccaaaatacgactgcaag
ataatgacctccaagactgacgtgtcatcgtccgtgatcacatctctgggagccattgtctcctgctacggaaagactaa
gtgcaccgcgtcgaacaagaacaggggcattatcaagaccttcagcaacggttgcgactatgtgtccaacaagggcggtgg
ataccgtgtccgtgggcaacaccttgactacgtgaacaagcaggaggggaagtccctttatgtgaagggggagccaatc
attaacttttacgacccccctggtgttccctagcgacgagttcgacgcctcaatctctcaagtcaacgaaaagatcaacca
gagcctcgcttcatccgcaagtccgatgaactgctgtcgaccattgggggttacatccctgaggccccctcgggacggac
aggcatacgtccgcaaggacggcgaatgggtgctgcttagcaccttctctaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1605</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1605</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaactgctgatcctcaaagccaacgcaatcaccaccattctcaccgctgtgaccttctg
cttcgcatcggggcagaacatcactgaagagttttaccagagcacttgacgcggtgtcaaagggttacctttccgcac
tgcgaccggatggtacattccgtgatcaccattgagctcagcaacatcaaggaaaacaagtgaatggcaccgacgcc
aaggtcaagctgatcaacaagaactggacaagtacaagaacgccgtgacagaattgcagctcctgatgggatccggaaa
cgtcggtctgggcggagccatcgcgagtggagtggctgtgtccaaggtcttgacctcgaggggagaagtgaacaagatca
agtccgcgctgctgtcaacgaacaaggccgtggtgtccctgtctaacggcgctcagcgtgctgacgttcaaggtcctggac
ctgaagaattacattgacaagcagctgctgccccatcctcaacaagcaatcctgctccatctccaaccccgaaaccgtgat

cgagttccagcagaagaacaaccgcctgctggaaattactcgcgagttctctgtgaatgccggcgtgaccacccctgtgt
ccacctacatgctgaccaactccgagcttctctcccttatcaatgacatgcctatcacgaacgaccagaagaagctgatg
tcgaacaacgtgcagattgtgcggcagcagtcatacagcatcatgtcgatcatcaaggaagaagtgtggcgtacgtggt
gcaactcccgtgtacggcgtcatcgataccccgtgctggaagctgcacacctgcctttgtgtaccaccaacaccaaga
acggatccaacatctgcttaacccggactgatcggggttggtactgcgacaacgccgggaatgtttcgttcttcccacaa
gccgagacttgtaaagtgcagtcaaacagagtgttctgtgacaccatgaactcgagaaccctgccagcgaagtgaacct
gtgtaacgtcgacatctttaacccaaaatacgattgcaagattatgaccagcaaaaccgacgtgtcctcctccgtgataa
caagcctgggggcgattgtgtcatgctacggaaagactaagtgcaccgcctcgaacaagaaccgcggcatcattaagact
ttctcgaatggttgcgactatgtgtccaacaaggcgctggatactgtgtcagtcgggaatactctttactacgtgaacaa
gcaggaggggaaaagcctctacgtgaaggagagcctattatcaacttttacgatccgctggtgttcccgctccgacgaat
tcgacgccagcatcagccaagtcaacgagctgattaaccagtccttcgccttcacccaatccgacgagctcctgcat
aacgtgaacgccggaagtccaccaccaacatcatgatcactactattatcatcgtgatcatcgtcacctgtgtgagcct
gattgctgtgggcctgttgctgtattgcaaagccaggtccaccccggtcacctgtcgaaggatcagctgtccggaatca
acaacattgccttctccaactaa</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
 <INSDSeq_length>1725</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..1725</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_qual>
 <INSDQualifier>
 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 <INSDQualifier id="q14">
 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
 <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 </INSDFeature_qual>
 </INSDFeature>
 </INSDSeq_feature-table>
 <INSDSeq_sequence>atggaattgctgatcctcaaagcgaacgcaatcaccactatcctcactgcggtcaccttctg
ctttgcgagcggacagaacatcaccgaagaattctaccaatctacttgctccgccgtgtccaagggttacctgtccgcc

tgaggaccggatggtacacttccgtgattaccattgagttgtcgaatatcaagaagaacaagtgcaacggaaccgatgct
aaggtcaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagaatgctgtgaccgagctgcagctgctgatgcagtccactca
agccaccaacaatcgcgccccggcggaactcccaaggttcatgaactacaccttgaacaacgccaagaaaacgaacgtga
ccctgtccaagaagcgcaagcgagattccttggcttcccttctgggcgtcggttagcgccatcgccctccggcgtggccgtc
agcaaggtcctgcacctcgagggagaagtcaacaagattaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtcgct
atcaaacggcgtcagcgtactgaccagcaaagtgttgatctcaagaactacattgataagcaactcctccctatcgtga
ataagcagagctgttcgatttccaacatcgagactgtgattgaattccagcagaagaacaaccggctgctggaaattacc
agagaattcagcgtgaatgccggagtcactacccccgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctgagcctgat
caacgatatgccgattaccaacgaccagaagaagctgatgtcgaacaacgtgcagatcgtgcgccagcagtcctactcaa
tcatgtcgatcatcaaggaagaggtcctggcctacgtggtgcagcttccctctgtacggcgtgattgacactccgtgttgg
aaactgcacactagtccccgtgtgcactactaacaccaaggaggggcagcaatatctgcctgactcggaccgatagaggctg
gtactgtgataacgccgggtccgtgtccttcttccccgaagccgagacttgcaaagtgcagagcaaccgggtgttctgtg
acactatgaactcactgaccttgccgagcgaagtcaacctttgcaacgtggacatctttaaccctaaatacgactgcaag
atcatgacctccaagaccgacgtgtcgagctcagtgattacttcgctgggagccattgtgtcctgctacgggaaaaccaa
gtgcacggcctcaaacaagaaccggggtatcattaagaccttctccaacggctgcgactatgtgtccaacaagggggtgg
acactgtgtccgtgggaaacaccttgtattacgtgaacaagcaggagggaagtccctctacgtgaaggcggaaccatc
atcaatttctacgaccgctcgtgttccccctccgatgaattcgacgcattccatctcacaagtcaacgaaaagattaacca
gtccctggctttcattcgcaagtccgacgaactgtctcataacgtcaacgctggaaagtccaccaccaacatcatgatca
ccacgatcattattgtgatcatcgatcctgtgtcactgatagcagtgaggactgtcctctactgcaaagcgcggtcg
accccgtagactctcgaaggaccagctgtccgggatcaacaacatcgcggttttcgaactga</INSDSeq_sequenc
e>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >

<INSDSeq>

<INSDSeq_length>1635</INSDSeq_length>

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

<INSDSeq_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..1635</INSDFeature_location>

<INSDFeature_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q16">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaactcctgatcctgaaggccaatgctatcactaccatcctgactgccgtcaccttctg
cttcgcctccggacaaaatatcactgaagaattttaccaaagcacctgtagcgcggtgtccaagggatacctgagcgctc
tgaggaccggatggtacaccagcgtgattaccatcgagctgagtaacatcaagaagaacaagtgcaacgggaccgatgct
aaggtcaagttgatcaacaagagctcgacaagtacaagaacgccgtgactgagctgcagctgctgatgcagtcaactca
ggccaccaacaaccggggccagacgggaactgccgagattcatgaactacacctgaacaacgcaaaaaagaccaacgtga
ccctgtccaagaagagaaagcgccggttcctgggtttcctgcttggcggtgggatcagcaatcgcgctccggagtggcagtg
tccaaggtcttgcacctcgagggcgaagtgaacaagatcaagtcgcgcttctgtcgaccaacaaggccgtcgtttccct
gtcgaacggagtgtccgtgctcacgagcaaagtgtctgacctgaagaactacatcgacaaacagctgctgcccatcgtea
acaagcagagctgcagcatctcaaacattgaaaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgcctgctcgagattacc
agagagttttccgtgaacgccggcgtgaccaccccggtgtcgacctacatgctcacaattcggaacttctctccctgat
taatgacatgcccattactaacgatcagaaaaagctgatgtcgaacaatgtgcagattgtgcgccagcagtcctactcca
tcatgtccatcattaaggaagaggtcctggcctacgtggtgcagttgccgctgtacggtgtcatcgataccccctgctgg
aagctccatacttcgccccctgtgtactaccaacaccaaggaaggctccaacatctgcctgacccggacggatcgcggtg
gtactgtgacaatgccgatccgtgtcgtttcttcccgaagcggagacttgcaaagtgcagtcacaaccgggtgttctgtg
acactatgaactccctgactctgccgtccgaagtcaacctctgcaacgtggacattttcaatccaaaatacgactgcaag
ataatgacctccaagactgacgtgtcatcgctccgtgatcacatctctgggagccattgtctcctgctacggaaagactaa
gtgcaccgcgtcgaacaagaacaggggcattatcaagaccttcagcaacggttgcgactatgtgtccaacaagggcggtgg
ataccgtgtccgtgggcaacaccttgtagctgaacaagcaggaggggaagtcctttatgtgaagggggagccaatc
attaacttttacgacccccctggtgttccctagcgacgagttcgacgcctcaatctctcaagtcaacgaaaagatcaacca
gagcctgccttcatccgcaagtccgatgaactgctgtcgaccattgggggttacatccctgaggccccctcgggacggac
aggcatacgtccgcaaggacggcgaatgggtgctgcttagcaccttctcttaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1605</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1605</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql8">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaactgctgatcctcaaagccaacgcaatcaccaccattctcaccgctgtgaccttctg
cttcgcatcggggcagaacatcactgaagagttttaccagagcacttgacgcgcggtgtcaaagggttacctttccgcac
tgcggaccggatggtacacttccgtgatcaccattgagctcagcaacatcaaggaaaacaagtgcaatggcaccgacgcc
aaggtcaagctgatcaaacaagaactggacaagtacaagaacgccgtgacagaattgcagctcctgatgggatccggaaa
cgtcggctctgggcggagccatcgcgagtgagtggtgtgtccaaggtcttgcacctcgagggagaagtgaacaagatca
agtccgcgctgctgtcaacgaacaaggccgtggtgtccctgttctaacggcgctcagcgtgctgacgttcaaggctcctggac
ctgaagaattacattgacaagcagctgctgccccatcctcaacaagcaatcctgctccatctccaaccccgaaaccgtgat
cgagttccagcagaagaacaaccgcctgctggaaattactcgcgagttctctgtgaatgccggcgctgaccacccctgtgt
ccacctacatgctgaccaactccgagcttctctcccttatcaatgacatgcctatcacgaacgaccagaagaagctgatg
tcgaacaacgtgcagattgtgcggcagcagtcatacagcatcatgtcgatcatcaaggaagaagtgtggcgctacgtggt
gcaactcccgtgtacggcgctcatcgataccccgtgctggaagctgcacacctgcctttgtgtaccaccaacaccaaga
acggatccaacatctgcttaaccggactgatcgggggttggtactgcgacaacgccgggaatgtttcgttcttcccacaa
gccgagacttgtaaagtgcagtcaaacagagtgttctgtgacaccatgaactcgagaaccctgccagcgaagtgaacct
gtgtaacgtcgacatctttaacccaaaatacgattgcaagattatgaccagcaaaaccgacgtgtcctcctccgtgataa
caagcctgggggcgattgtgtcatgctacggaaagactaagtgcaccgcctcgaacaagaaccgcggcatcattaagact
ttctcgaatggttgcgactatgtgtccaacaaggcggtggatactgtgtcagtcgggaatactctttactacgtgaacaa
gcaggaggggaaaagcctctacgtgaaggagagcctattatcaacttttacgatccgctggtgttcccgtccgacgaat
tcgacgccagcatcagccaagtcaacgagctgattaaccagtccttcgccttcataccaatccgacgagctcctgcat
aacgtgaacgccggaagtccaccaccaacatcatgatcactactattatcatcgtgatcatcgtcatectgctgagcct
gattgctgtgggcctgttgctgtattgcaaagccaggtccaccccggtcacctgtcgaaggatcagctgtccggaatca
acaacattgccttctccaactaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>140</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_mol type>RNA</INSDSeq_mol type>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..140</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccg
atccagcctccgcgcccggaacgggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgactcacgcgtccttgacacg</
INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>100</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..100</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q22">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cgggtggcatccctgtgaccctccccagtcctctcctggccctggaagttgccactccag
tgccaccagccttgtcctaataaaattaagttgcatc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1965</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1965</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q24">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacagatcgcttgagacgccatccacgtgttttgacctccatagaagacaccgggaccg
atccagcctccgcggccgggaacgggtgattggaacgcggttccccgtgccaaagtgactcacctccttgacacgat
ggaattgctgatcctcaaagcgaacgcaatcaccactatcctcactgcggtcaccttctgctttgcgagcggacagaaca
tcaccgaagaattctaccaatctacttgctccgccgtgtccaagggttacctgtccgccctgaggaccggatggtacact
tccgtgattaccattgagttgtcgaatatcaagaagaacaagtgcaacggaaccgatgctaaggtcaagctgatcaagca
ggagctggacaagtacaagaatgctgtgaccgagctgcagctgctgatgcagtccactcaagccaccaacaatcgcgccc
ggcgggaactccaaggttcatgaactacaccttgaacaacgccaagaaaacgaacgtgacctgtccaagaagcgcaag
cgcgattccttggtctccttctgggcgtcggtagcgccatcgccctccggcgtggccgtcagcaaggtcctgcacctga
```

gggagaagtcaacaagattaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtcgctatcaaacggcgtcagcgta
tgaccagcaaagtgtggtatctcaagaactacattgataagcaactcctccctatcgtgaataagcagagctgttcgatt
tccaacatcgagactgtgattgaattccagcagaagaacaaccggctgctggaaattaccagagaattcagcgatgaatgc
cggagtcactacccccgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctgagcctgatcaacgatatgccgattacca
acgaccagaagaagctgatgtcgaacaacgtgcagatcgtgcgccagcagtcctactcaatcatgtcgatcatcaaggaa
gaggtcctggcctacgtggtgcagcttcctctgtacggcggtgattgacactccgtgttggaactgcacactagtcacct
gtgcactactaacaccaaggaggggcagcaatatctgcctgactcggaccgatagaggctgggtactgtgataacgccgggt
ccgtgtccttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagagcaaccgggtgttctgtgacactatgaactcactgacc
ttgccgagcgaagtcaacctttgcaacgtggacatctttaaccctaaatacgaactgcaagatcatgacctccaagaccga
cgtgtcgagctcagtgattacttcgctgggagccattgtgtcctgctacgggaaaaccaagtgcacggcctcaaacaaga
accgggggtatcattaagaccttctccaacggctgcgactatgtgtccaacaaggggggtggacactgtgtccgtgggaaac
accttgattacgtgaacaagcaggagggaagtccctctacgtgaaggcggaacccatcatcaatttctacgacctgct
cgtgttccctccgatgaattcgacgcattccatctcacaagtcaacgaaaagattaaccagtccttggtttcattcgca
agtccgacgaactgctccataacgtcaacgttggaagtccaccaccaacatcatgatcaccacgatcattattgtgatc
atcgtcatcctgctgtcactgatagcagtgaggactgctcctctactgcaaagcgcggtcgacccagtgacactctcgaa
ggaccagctgtccgggatcaacaacatcgcggttttgaactgacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccctctc
ctggccctggaagttgccactccagtgccaccagccttgtcctaataaaaattaagttgcatc</INSDSeq_sequenc
e>

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
 <INSDSeq>
 <INSDSeq_length>1875</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..1875</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_qual>
 <INSDQualifier>
 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 <INSDQualifier id="q26">
 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
 <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
 <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
 </INSDFeature>
 </INSDFeature>
 </INSDSeq>
 </SequenceData>
</SequenceData>

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccg
atccagcctccgcggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaaagagtgactcaccgtccttgacacgat
ggaactcctgatcctgaaggccaatgctatcactaccatcctgactgccgtcaccttctgcttcgcctccggacaaaata
tcactgaagaattttaccaaagcacctgtagcgcggtgtccaagggatacctgagcgcctctgaggaccggatggtacacc
agcgtgattaccatcgagctgagtaacatcaagaagaacaagtgcaacgggaccgatgctaagggtcaagttgatcaaca
agagctcgacaagtacaagaacgccgtgactgagctgcagctgctgatgcagtcaactcaggccaccaacaaccgggcca
gacgggaactgccgagattcatgaactacacctgaacaacgcaaaaagaccaacgtgacctgtccaagaagagaaaag
cgccggttcctgggtttcctgcttggcgtgggatcagcaatcgcgctccggagtggcagtggtccaaggtccttgacctcga
ggcggaagtgaacaagatcaagtccgcgcttctgtcgaccaacaaggccgtcggtttccctgtcgaaacggagtgctcgtgc
tcacgagcaaagtgtcgacctgaagaactacatcgacaaacagctgctgcccacgtcaacaagcagagctgcagcatc
tcaaacattgaaaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgcctgctcgagattaccagagagttttccgtgaacgc
cggcgtgaccaccccggtgtcgacctacatgctcacaattcggaaattctctccctgattaatgacatgcccattacta
acgatcagaaaaagctgatgtcgaacaatgtgcagattgtgcccagcagtcctactccatcatgtccatcattaaggaa
gaggtcctggcctacgtggtgcagttgccgctgtacggtgtcatcgataccccctgctggaagctccatacttcgccct
gtgtactaccaacaccaaggaaggctccaacatctgcctgacccggacggatcgcggttggtactgtgacaatgccggat
ccgtgtcgttcttcccgaagcggagacttgcaaagtgcagtcacaaccgggtgttctgtgacactatgaactccctgact
ctgccgtccgaagtcaacctctgcaacgtggacattttcaatccaaaatacgactgcaagataatgacctccaagactga
cgtgtcatcgtccgtgatcacatctctgggagccattgtctcctgtctacggaaagactaagtgcaccgcgtcgaacaaga
acaggggcattatcaagaccttcagcaacggttgcgactatgtgtccaacaagggcggtggataaccgtgtccgtgggcaac
acctgtactacgtgaacaagcaggagggggaagtccctttatgtgaagggggagccaatcattaacttttacgacccccct
ggtgttccctagcgacgagttcgacgcctcaatctctcaagtcaacgaaaagatcaaccagagcctcgcccttcacccgca
agtccgatgaactgctgtcagccattgggggttacatccctgaggccccctcgggacggacaggcatacgtccgcaaggac
ggcgaatgggtgctgcttagcaccttctctaacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccctctcctggccctgg
aagttgccactccagtgccaccagccttgtcctaataaaaattaagttgcatc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1845</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1845</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q28">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacagatcgcttgagacgccatccacgtgttttgacctccatagaagacaccgggaccg
atccagcctccgcgccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaaagagtgactcacctccttgacacgat
ggaactgctgatcctcaaagccaacgcaatcaccaccattctcaccgctgtgaccttctgcttcgcacgcccgcagaaca
tcactgaagagttttaccagagcacttgacgcgcggtgtcaaagggttacctttccgcactgcggaccggatggtacact
tccgtgatcaccattgagctcagcaacatcaaggaaaacaagtgcaatggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaaaca
agaactggacaagtacaagaacgccgtgacagaattgcagctcctgatgggatccggaaacgtcggtctgggcccggagcca
tcgcgagtgagtggtgtgtccaaggtcttgcacctcgagggagaagtgaacaagatcaagtcgcgctgctgtcaacg
aacaaggccgtggtgtccctgtctaacggcgctcagcgtgctgacgttcaaggtcctggacctgaagaattacattgacaa
gcagctgctgcccacctcaacaagcaatcctgtccatctccaacccgaaacccgtgatcgagttccagcagaagaaca
accgcctgctggaaattactcgcgagttctctgtgaatgccggcgctgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaac
tccgagcttctctcccttatcaatgacatgcctatcacgaacgaccagaagaagctgatgtcgaacaacgtgcagattgt
gcggcagcagtcatacagcatcatgtcgatcatcaaggaagaagtgtggcgctacgtggtgcaactcccgtgtacggcg
tcatcgataccccgtgctggaagctgcacacctgcctttgtgtaccaccaacaccaagaacggatccaacatctgctta
accggactgatcgggggttggtactgcgacaacgccgggaatgttttcgttcttcccacaagccgagacttgtaaagtga
gtcaaacagagtggtctgtgacaccatgaactcgagaacctgcccagcgaagtgaacctgtgtaacgtcgacatcttta
acccaaaatacgattgcaagattatgaccagcaaaaccgacgtgtcctcctccgtgataacaagcctggggggcgattgtg
tcattgctacggaaagactaagtgcaccgcctcgaacaagaaccgcggcatcattaagactttctcgaatggttgcgacta
tgtgtccaacaagggcggtggatactgtgtcagtcgggaatactctttactacgtgaacaagcaggaggggaaaagcctct
acgtgaaggagagcctattatcaacttttacgatccgctggtgttcccgtccgacgaattcgacgccagcatcagccaa
gtcaacgagctgattaaccagtccttcgccttcatcaaccaatccgacgagctcctgcataacgtgaacgccggaaagtc
caccaccaacatcatgatcactactattatcatcgtgatcatcgatcctgctgagcctgattgctgtgggcctgttgc
tgtattgcaaagccaggtccaccccggtcaccctgtcgaaggatcagctgtccggaatcaacaacattgccttctccaac
taacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccctccttgcccctggaagttgccactccagtgccaccagccttg
tcctaataaaaattaagttgcatc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q30">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGNVGL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSGNVGLGG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>50</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..50</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q34">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN</INSDSeq_se
quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
```

```

<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q36">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gggacacctacc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>

```

<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
 </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcatatgactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>