

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)

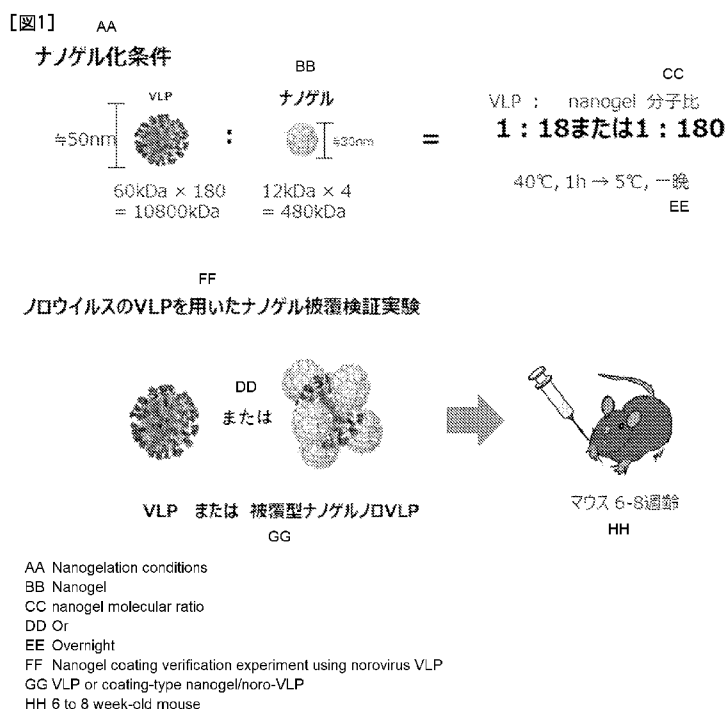


(10) 国際公開番号
WO 2022/210465 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/014798
- (22) 国際出願日: 2022年3月28日(28.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2021-056392 2021年3月30日(30.03.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654
- 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
 株式会社 H a n a V a x (HANAVAX INC.) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町一丁目9番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 清野 宏 (KIYONO Hiroshi); 〒1138654
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 幸 義和 (YUKI Yoshikazu); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町一丁目9番10号 株式会社 H a n a V a x 内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 奥原 康司 (OKUHARA Koji); 〒1900023
 東京都立川市柴崎町2丁目10番18号 観月ビル 305 ウィンググリーン特許事務所 立川オフィス Tokyo (JP).

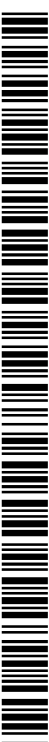
(54) Title: NANOGEL-COATED VACCINE

(54) 発明の名称: ナノゲル被覆型ワクチン



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composite of a nanogel with an antigen not contained in nanogel, and a vaccine formulation that contains this composite. Specifically, the present invention provides a nanogel/vaccine antigen composite, wherein the vaccine antigen is coated by nanogel.

(57) 要約: 本発明は、ナノゲルに内包されない抗原とナノゲルとの複合体および当該複合体を含むワクチン製剤の提供を目的とする。具体的には、本発明は、ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている、前記複合体を提供する。



WO 2022/210465 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： ナノゲル被覆型ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、ナノゲルを用いたワクチンに関する。より具体的には、ワクチン抗原とナノゲルの複合体であって、抗原がナノゲルによって被覆されているワクチンに関する。

背景技術

[0002] 従来、ワクチンの投与は注射により行われることがほとんどである。注射によるワクチン投与は、生体内において、抗体の産生を含む免疫応答を誘導することが可能である。しかしながら、注射によるワクチン投与では、ウイルスの感染局所に防御免疫反応を誘導することが難しく、その結果、病原体の感染自体を阻害することが困難であった。特に、ウイルス感染症の場合、感染後、感染による諸症状が発症する前に、他者にウイルスが伝播することが多いため、注射型ワクチンでは、感染直後の他者への感染を有効に阻止できなかった。注射型ワクチンに対し、経鼻型ワクチンなどの、粘膜に投与するワクチンは、病原体が感染する粘膜領域において、粘膜免疫（粘膜IgA）を誘導し、病原体を中和することができるので、病原体の感染、強いては病原体の他者への伝播を抑えることができる。

[0003] これまでに発明者らは、粘膜免疫を有効に誘導するために、経鼻粘膜ワクチンのデリバリー単体としてコレステロールが付加されたカチオン性プルランによって構成される自己凝集性ナノサイズヒドロゲル（cCHP ; cationic type of cholesteryl group-bearing pullulan（特許文献1、非特許文献1））を利用して、ワクチン抗原をナノゲル内に内包した形状で抗原複合体を製剤化し、有効な粘膜免疫を誘導できる方法を確認した。cCHPナノゲルは、そのナノマトリックス内部にタンパク質抗原を内包すると、人工的なシャペロンとして機能し、抗原の凝集および変性を防ぎ、抗原放出後のリフォールディングを助ける。このナノゲルは、効率的に負電荷の粘膜表面に付着する性質

を持ち、持続的に抗原を放出して抗原提示細胞まで抗原を送達することで免疫応答を誘導する（非特許文献2、非特許文献3および特許文献2）。また、マウスにおいて、 $[^{111}\text{In}]$ -標識 BoHc/A（ボツリヌスA型毒素の重鎖C末端領域無毒領域）や肺炎球菌表面抗原PspAを担持するcCHPナノゲルを経鼻的に投与しても、嗅球や脳などの中枢神経系に蓄積することはなく（非特許文献2）、その安全性も確認されている（非特許文献4）。

[0004] ところで、これまでに報告されているナノゲル-抗原複合体は、cCHP4分子程度からなるナノゲルの内部にタンパク質抗原を内包することによって、抗原の凝集および変性を防ぎ、ナノゲル内部から放出された抗原のリフォールディングを促進し、効率的な免疫応答を誘導する（非特許文献5）。そのため、ナノゲルの分子量（約1,000 kDa）以上の分子をナノゲルに内包させることはできず、そのような巨大分子は、ナノゲルとの複合体を形成することはできないと考えられていた（非特許文献5）。すなわち、従来の抗原をナノゲルに内包させる製剤化法では、ナノゲル（直径約30 nm）よりも大きなウイルス抗原、VLP（virus like particle、ウイルス様粒子）および不活化ウイルスなどの抗原とナノゲルとの複合体を作製することはできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W000/12564号
特許文献2：特開2010-105968

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ayameら, Bioconjug Chem 19:882-890 2008
非特許文献2：Nochiら, Nat Mater 9:572-578 2010
非特許文献3：Yukiら, Biotechnol Genet Eng Rev 29:61-72 2013
非特許文献4：Kongら, Infect Immun 81:1625-1634 2013
非特許文献5：Yukiら, Mol. Pharmaceutics, 18:1582-1592 2021

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記事情に鑑み、本発明は、ナノゲルに内包されない抗原（ナノゲルに内包可能な大きさを超える抗原）とナノゲルとの複合体および当該複合体を含むワクチン製剤の提供を解決課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ナノゲル内に内包可能な大きさを超える抗原とナノゲルとの複合体を形成する方法について鋭意研究を行った。

本発明者らは、ワクチン抗原をナノゲル内に内包するのではなく、ワクチン抗原の表面にナノゲルを付着させる、すなわち、ワクチン抗原をナノゲルで被覆した複合体（以下このような複合体を「ナノゲル被覆型」複合体とも記載する）の作製を試みたところ、首尾良くナノゲル被覆型の複合体の作製に成功した。本発明者らは、ナノゲル被覆型抗原が有効な粘膜免疫を誘導することを確認した。

具体的には、従来の抗原を内包するナノゲル複合体（以下「抗原内包型複合体」とも記載する）を調製するための抗原とナノゲルとの最適な混合比は、抗原1分子に対し、1~2.5分子（CHPNH₂換算で1~10）、好ましくは1分子（CHPNH₂換算で4）とされていた（特許文献2）ところ、本発明者らは、1分子のノロウイルスVLP（抗原）に対して混合するナノゲルの量を大幅に増加させ、ナノゲルを18分子（CHPNH₂換算で72）または180分子（CHPNH₂換算で720）のナノゲルで処理したところ、ナノゲルで比較的均一にVLP（抗原）を被覆できることを初めて見出した（図8および図9を参照）。得られたナノゲル被覆型VLPをマウスに経鼻投与すると、VLP単独投与に比して10倍以上高い粘膜免疫応答を誘導できることを確認した。ノロウイルスのVLPの粒径は約30-40nmでナノゲルの粒径（約30nm）を超える抗原である。

すなわち、本発明者らは、VLPのようにナノゲルよりも大きな抗原であっても、ナノゲルで抗原を被覆する（ナノゲルに内包化するのではなく）ことで、ナノゲルと抗原との複合体を形成することが可能であり、このナノゲル-抗原複合体は粘膜免疫応答を効果的に誘導することを初めて見出し、本発明

を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は以下の(1)～(7)である。

(1) ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている、複合体。

(2) 前記ワクチン抗原の粒径が、20 nm以上であることを特徴とする上記(1)に記載の複合体。

(3) 前記ワクチン抗原が、ナノゲルよりも大きな物質であることを特徴とする上記(1)または(2)に記載の複合体。

(4) 前記ワクチン抗原が、VLP (virus like particle)、不活性化ウイルス、20 nm以上の巨大タンパク分子または重合体であることを特徴とする上記(1)から(3)までのいずれかに記載の複合体。

(5) 前記ワクチン抗原とナノゲルが、1:15～1:200のモル比で複合化されることを特徴とする上記(1)から(4)までのいずれかに記載の複合体。

(6) アジュバントをさらに含むことを特徴とする上記(1)から(5)までのいずれかに記載の複合体。

(7) 上記(1)から(6)までのいずれかに記載の複合体を含むワクチン製剤。

なお、本明細書において「～」の符号は、その左右の値を含む数値範囲を示す。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、大きな抗原分子であっても、ナノゲルとの複合体を形成させることが可能であるため、粘膜における免疫応答を効果的に誘導することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の実施例にかかるナノゲル被覆型のナノゲル-抗原複合体に関する実験条件の概要を示す。

[図2]ナノゲル被覆型VLP (GII.4 VLPまたはGII.17 VLP) による経鼻免疫応答の結果を示す。Aはナノゲル被覆型GII.17 VLPまたはGII.17 VLP単独をマウ

スに経鼻投与した後、血清中のIgG、鼻腔洗浄液中のIgAおよび糞便中のIgAの抗体価を測定した結果である。Bはナノゲル被覆型GII.4 VLPまたはGII.4 VLP単独をマウスに経鼻投与した後、血清中のIgGおよび鼻腔洗浄液中のIgAを測定した結果である。VLPとナノゲル（粒子）の混合比率は、分子比で、VLP：ナノゲル=1：180とした。

[図3]ナノゲル被覆型VLP（GII.17 VLP）による経鼻免疫応答の結果を示す。ナノゲル被覆型GII.17 VLPまたはGII.17 VLP単独をマウスに経鼻投与した後、血清中のIgGおよび鼻腔洗浄液中のIgAを測定した結果である。VLPとナノゲル（粒子）の混合比率は、分子比で、VLP：ナノゲル=1：180または=1：18とした。

[図4]ナノゲル被覆型VLP（GII.4 VLPまたはGII.17 VLP）によって誘導された抗体の中和効果を検討した結果を示す。Aはナノゲル被覆型GII.17 VLPによって誘導された血清中のIgGおよび鼻腔洗浄液中のIgAによる、ノロウイルスGII.17の増殖抑制効果を検討した結果である。Bはナノゲル被覆型GII.4 VLPによって誘導された血清中のIgGおよび鼻腔洗浄液中のIgAによる、ノロウイルスGII.4の増殖抑制効果を検討した結果である。Preは、経鼻免疫前のマウス血清または鼻腔洗浄液でノロウイルス溶液を処理した後、腸管上皮細胞に添加し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数を測定した結果である。cHP+VLPは、ノロウイルス溶液を、予めナノゲル被覆型VLPによって誘導された血清中のIgGまたは鼻腔洗浄液中のIgAで処理した後、腸管上皮細胞に添加し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数を測定した結果である。

[図5]ナノゲル被覆型VLP（GII.2 VLP）による経鼻免疫応答の結果を示す。ナノゲル被覆型GII.2 VLPまたはGII.2 VLPのみをマウスに経鼻投与した後、血清中のIgG、鼻腔洗浄液中のIgA、唾液中のIgAおよび腸管洗浄液中のIgAの抗体価を測定した結果である。VLPとナノゲル（粒子）の混合比率は、分子比で、VLP：ナノゲル=1：180とした。

[図6]ナノゲル被覆型VLP（GII.2 VLP）によって誘導された血清中のIgGの中和効果を検討した結果を示す。ノロウイルス溶液を、経鼻免疫前のマウス血

清で処理（未免疫）、VLPのみによって誘導された血清中のIgGで処理（VLP単独）またはナノゲルで被覆したVLPによって誘導された血清中のIgGで処理（ナノゲル化VLP）した後、腸管上皮細胞に添加し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数を測定した結果である。

[図7]ナノゲル被覆型VLP（GII.2 VLP）によって誘導された腸管洗浄液中のIgAの中和効果を検討した結果を示す。ノロウイルス溶液を、経鼻免疫前のマウスの腸管洗浄液（未免疫）、VLPのみによって誘導された腸管洗浄液中のIgAで処理（VLP単独）またはナノゲルで被覆したVLPによって誘導された腸管洗浄液中のIgAで処理（ナノゲル化VLP）した後、腸管上皮細胞に添加し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数を測定した結果である。

[図8]ナノゲル被覆型VLP（GII.17 VLP）の電子顕微鏡による観察画像を示す。AはGII.17 VLPの電子顕微鏡観察画像、Bはナノゲルの電子顕微鏡観察画像、Cはナノゲル被覆型GII.17 VLPの電子顕微鏡観察画像である。Cについては、観察画像中の四角で囲んだ領域をそれぞれ拡大した画像を併せて示す。

[図9]ナノゲル被覆型VLP（GII.2 VLP）の電子顕微鏡による観察画像を示す。AおよびBはGII.2 VLPの電子顕微鏡観察画像、CおよびDはナノゲル被覆型GII.2 VLPの電子顕微鏡観察画像、Eはナノゲル（cCHP）の電子顕微鏡観察画像、FはPspAを内包したナノゲル-PspA複合体の電子顕微鏡観察画像である。

[図10]インジュウム（¹¹¹In）標識化ナノゲルの経鼻投与によるマウス体内動態試験の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 第1の実施形態は、ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体（以下「ナノゲル-ワクチン抗原（または抗原）」とも記載する）であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている、前記複合体（以下「本実施形態にかかる複合体」とも記載）である。

本実施形態において、ナノゲルとは、疎水性のコレステロールが側鎖として付加された親水性の多糖（例えば、プルラン）からなる、高分子ゲルナノ

粒子のことである。ナノゲルは公知の方法、例えば、国際公開第W000/12564号公報に記載された方法などに基づいて製造することができる。

具体的には、まず、炭素数12~50の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN-R}_1\text{NCO}$ (式中、 R_1 は炭素数1~50の炭化水素基である) で表されるジイソシアナート化合物を反応させて、炭素数12~50の水酸基含有炭化水素またはステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造する。得られたイソシアナート基含有疎水性化合物と多糖類とを反応させ、炭素数12~50の炭化水素基またはステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造する。次に、得られた生成物をケトン系の溶媒で精製することにより、純度の高い疎水性基含有多糖類を製造することができる。

ここで、多糖類としては、プルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンまたは水溶性セルロース等が利用可能であり、特に、プルランが好ましい。

[0013] 本実施形態で使用されるナノゲルとしては、カチオン性コレステロール置換プルラン (cationic cholesteryl-group-bearing pullulan : cCHPと称する) およびその誘導体を挙げることができる。cCHPは、分子量3万から20万、例えば分子量100,000のプルランに100単糖あたりコレステロールが1~10個、好ましくは1~3個置換された構造を有する。なお、本発明で使用されるcCHPは、抗原のサイズや疎水性の度合いにより、コレステロール置換量を適宜変更してもよい。また、CHPの疎水性の度合いを変更するために、アルキル基 (炭素数10~30、好ましくは、炭素数15~20程度) を付加させてもよい。本発明で使用されるナノゲルは、粒径10~50nm、好ましくは20~30nmである。ナノゲルは既に広く市販されており、これら市販品を使用してもよい。

[0014] 本実施形態で使用されるナノゲルは、ワクチンが負に帯電する鼻粘膜表面へ侵入できるように、正電荷を有する官能基、例えばアミノ基を導入したナノゲルである。アミノ基のナノゲルへの導入の方法としては、アミノ基を付加したコレステロールプルラン (CHPNH₂) を用いる方法を挙げることができる。

。具体的には、減圧乾燥したCHPをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、これに1-1' カルボニルジイミダゾールを窒素気流下に加え数時間、室温で反応させる。その反応溶液にエチレンジアミンを徐々に添加し、数時間から数十時間程度攪拌する。得られた反応溶液を蒸留水に対して、数日間透析する。透析後の反応溶液を凍結乾燥し、乳白色の固体を得る。エチレンジアミンの置換度は元素分析やH-NMRなどを用いて評価することができる。

[0015] これまでに報告されているナノゲル-抗原複合体は、カチオン性コレステロール置換プルラン4分子程度からなるナノ粒子（ナノゲル）の内部に抗原が内包される形体であった（Yukiら, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021）。これに対し、本実施形態にかかる複合体は、抗原がナノゲルに内包され得る大きさを超える物質であるため、当該抗原がナノゲルに内包されることなく、抗原表面にナノゲルが付着した形体（このような形体を「抗原がナノゲルで被覆された形体」とも記載する）である（図1、図8および図9を参照のこと）ことを特徴とする。ここで、ナノゲルに内包されない抗原とは、ナノゲルと同程度の大きさの抗原、またはナノゲルよりも大きな抗原のことである。当該抗原とナノゲルの大きさの比較は、例えば、光散乱法（例えば、動的光散乱（dynamic light scattering : DLS）法）などにより算出される抗原の粒径（抗原が球体であると仮定した場合の直径）を指標とする方法、電子顕微鏡観察によりナノゲルと抗原を観察し各大きさを評価する方法などにより、比較することができるが、これらの方法に限定されるものではなく、当業者であれば種々の方法を容易に選択することができる。より具体的には、ナノゲルの粒径が約30nm程度（DLS法）（Yukiら, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021）であることから、本実施形態にかかる抗原は、例えば、DLS法で決定した粒径が、ナノゲルの粒径よりやや小さい約20nm以上（例えば、20nm以上1,000nm以下程度、あるいは30nm以上600nm以下程度）である抗原が好ましい。本実施形態にかかる抗原として、例えば、不活性化したウイルス、VLP（virus like particle、ウイルス様粒子

）、20nm以上の巨大タンパク分子または重合体（例えば、分子量が5,000 kDa以上の分子）などであるが、これらに限定されるものではない。また、上記ウイルスとしては、いかなるウイルスであっても良いが、強いて挙げるならば、ノロウイルス以外では例えば、サポウイルス、ロタウイルス、季節性インフルエンザウイルス（A型及びB型）、新型（強毒性）インフルエンザウイルス（例H1N1、H5N1、H7N9 インフルエンザウイルス）、コロナウイルス（例SARS-CoV、SARS-CoV 2、MERS-CoVなど）、RSウイルス（A型、B型）、ライノウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、エンテロウイルス、サイトメガロウイルス、エボラウイルス、西ナイルウイルス、ジカウイルス、デングウイルス、ATL（ヒト成人T細胞ウイルス）、HIV、A型肝炎ウイルス、チクングニアウイルスなどが挙げられる。

[0016] 本実施形態にかかる複合体は、ナノゲルおよびワクチン抗原を共存させ、相互作用させ、ナノゲルを抗原表面に付着させることにより作製することができる。このとき、ナノゲルとワクチン抗原の混合比は、特に限定されず、当業者であれば予備的な実験により容易に決定することができる。例えば、ワクチン抗原とナノゲルの好ましい混合比は、ワクチン抗原：ナノゲルが、モル比または分子比で、例えば、1：10（CHPNH₂換算で40）から1：400（CHPNH₂換算で1,600）程度、より好ましくは1：15（CHPNH₂換算で60）から1：200（CHPNH₂換算で800）程度の範囲内の混合比を適宜選択することができる。

本実施形態にかかる複合体の製造は、ナノゲルおよびワクチン抗原を混合し、4℃から50℃（例えば、40℃）にて、30分から48時間（例えば、1時間程度）静置して実施することができる。ナノゲル-ワクチン抗原の複合体形成に使用するバッファーは、特に限定されず、あえて例示するならば、Tris-HCl緩衝液などが挙げられる。

[0017] また、本実施形態にかかる複合体には、ナノゲル-ワクチン抗原複合体に加えてアジュバントが含まれてもよい（当該複合体も「本実施形態にかかる複合体」に含まれる）。

ここで、アジュバントとは、抗原性補強剤または免疫賦活化剤などと称さ

れるものと同義で、当該分野において、これらの剤の通常の使用目的に用いられるものである。本実施形態で使用されるアジュバントの有効成分は、特に限定はしないが、例えば、STING (stimulator of interferon genes) を活性化するSTINGリガンド (例えばcGAMP、cyclic-di AMP、cyclic-di GMP、cyclic-di CMP、cyclic-di UMPまたはcyclic-di IMPなどの環状ジヌクレオチドやDMXAA (5,6-dimethylXAA (xanthenone-4- acetic acid)、VadimezanまたはASA404) などのキサンテノン (Xanthenone) 誘導体)、polyICまたはCpG ODNなどを挙げることができる。当該アジュバントは、さらに、医薬上許容される担体やその他の成分 (例えば、安定化剤、pH調整剤、保存剤、防腐剤および緩衝剤など) を含んでいてもよい。医薬上許容される担体およびその他の成分は、ワクチン投与される動物の健康に悪影響を及ぼさない物質であることが必要である。

[0018] 本実施形態にかかる複合体にアジュバントが含まれる場合、当該アジュバントの含量は、ワクチン製剤 (第2の実施形態を参照) 100重量%に対して、0.01重量%から99.99重量%程度含まれていてもよく、ワクチン抗原1重量に対し、例えば、0.01重量から10重量程度であってもよい。

[0019] 本実施形態の複合体の形成は、ナノゲルおよびワクチン抗原、またはナノゲル、ワクチン抗原およびアジュバントを混合し、4℃から50℃ (例えば、40℃) にて、30分から48時間 (例えば、1時間程度) 静置して実施することができる。ナノゲルおよびワクチン抗原、またはナノゲル、ワクチン抗原およびアジュバントの複合体形成に使用するバッファーは、特に限定されず、あえて例示するならば、Tris-HCl緩衝液などが挙げられる。

[0020] 第2の実施形態は、第1の実施形態にかかる複合体、すなわち、ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている複合体を含むワクチン製剤 (以下「本実施形態にかかるワクチン製剤」とも記載する) である。

本実施形態にかかるワクチン製剤は、組成物 (本実施形態にかかるワクチン組成物) として、薬理学上許容された添加剤を含んでいてもよい。本実施

形態にかかるワクチン製剤は経鼻投与に適したものであり、剤形としても、経鼻投与が可能な形体が望ましく、液体製剤（点鼻剤および注射剤など）などが挙げられる。

本実施形態にかかるワクチン製剤が液体製剤の場合、有効成分を必要に応じて塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸一水素ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウムおよびブドウ糖などの等張化剤と共に製剤用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンフルに充填するか、さらに、マンニトール、デキストリン、シクロデキストリンおよびゼラチンなどを加えて真空凍結乾燥し、用事溶解型の製剤としてもよい。当該液体製剤には、薬学的に許容できる公知の安定剤、防腐剤、酸化防止剤等が含まれていても良く、安定剤としては、例えば、ゼラチン、デキストランおよびソルビトール等が、防腐剤としては、例えば、チメロサルおよび β プロピオラクトン等が、酸化防止剤としては、例えば、 α トコフェロール等が挙げられる。

[0021] 第3の実施形態は、第2の実施形態にかかるワクチン製剤、すなわち、ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている複合体を含むワクチン製剤を患者に経鼻投与することを含む、疾患の予防および／または治療方法である。

第3の実施形態の治療または予防の対象疾患は、使用するワクチン抗原に依存し、特に限定はされず、病原体による感染症の他、がんなどであってもよい。

本発明のワクチン製剤は、鼻粘膜を介して投与してもよい。その方法としては、例えば、鼻粘膜への噴霧、塗布、滴下等により鼻腔内へ投与する方法が挙げられる。

[0022] 第2の実施形態にかかるワクチン製剤の投与量は、投与対象の年齢や体重等により適宜決定することができるが、薬学的に有効な量のワクチン抗原を含む。薬学的に有効な量とは、そのワクチン抗原に対する免疫反応を誘導するのに必要な抗原量をいう。例えば、1回のワクチン抗原投与量数 μg から数

10mgで1日1回から数回投与し、1週間から数週間間隔でトータル数回、例えば1から5回程度投与すればよい。

[0023] 本明細書において引用されたすべての文献の開示内容は、全体として明細書に参照により組み込まれる。また、本明細書全体において、単数形の「a」、「an」、および「the」の単語が含まれる場合、文脈から明らかにそうでないことが示されていない限り、単数のみならず複数のものを含むものとする。

以下に実施例を示してさらに本発明の説明を行うが、実施例は、あくまでも本発明の実施形態の例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

[0024] 1. 材料と方法

1-1. VLPの調製

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所から分与されたHuNoV (human norovirus) を含む糞便からウイルスを粗精製し、そこからウイルスゲノムを調製した。調製したゲノム上のGII.4、GII.17またはGII.2のVP1 ORFの外側にプライマーを設定して各ORF領域をPCRで増幅し、その増幅産物のヌクレオチド配列を決定した。各VP1のORFは、pFastBac Dual Expression Vector (Invitrogen) にクローニングした。GII.4 VP1のアミノ酸配列およびこれをコードする核酸配列を、各々、配列番号1および配列番号2に、GII.17 VP1のアミノ酸配列およびこれをコードする核酸配列を、各々、配列番号3および配列番号4に、GII.2 VP1のアミノ酸配列およびこれをコードする核酸配列を、各々、配列番号5および配列番号6に示す。各コンストラクトは、その配列が正しいことを確認した後、Bac-to-Bac expression system (Invitrogen) の組換バキュロウイルスの作製に使用した。High Five細胞 (Invitrogen) に対して各組換バキュロウイルスをMOI (multiplicity of infection)、7 pfu (plaque-forming units) /細胞で感染させた。感染から6日後、培養上清を回収し、20,000gで1時間遠心した。得られた上清を100,000gで2時間超遠心し、沈殿し

たVLPをPBSに懸濁した。濃縮したVLPは、10%-60%スクロース密度勾配に重層し、100,000gで1時間超遠心を行い、精製した。スクロース密度勾配を通したVLPを2 LのPBSに対して3回透析し、サンプル中のスクロースを除去した。VLPはAmiconUltra 30-kDa centrifugal filter (Millipore) で濃縮した。

[0025] 1-2. ノロウイルスVLPのナノゲルによる被覆化

cCHPナノゲルは、既報 (Ayameら, *Bioconjugate Chem* 19:882-890, 2008) の方法に従って調製した。調製したナノゲル (4分子のcCHPが1分子のナノゲルを形成するとして種々の算定を行った; Kurodaら, *Langmuir* 18, 3780-3786, 2002) と精製したノロウイルスVLP (virus like particle) (VP1 (60kDa) 分子が180個で1分子のVLPを形成するとして種々の算定を行った; Glassら, *N. Engl. J. Med* 361, 1776-1785, 2009) を分子比 (VLP:ナノゲル)、1:18または1:180で混合し、40°Cのヒートブロックで1時間インキュベートした後、4°Cで一晩静置した。

[0026] 1-3. ナノゲル被覆ノロウイルスVLPによるマウス経鼻免疫

ナノゲル-VLP複合体またはVLP (複合体を形成していないVLP、以下同じ)、Balb/cマウスの7週齢メスに経鼻的に投与した。投与抗原量は、1匹一回あたりVLPタンパク質に換算して5 μ gを投与した。経鼻免疫は1週間隔で計3回実施した。最終免疫から1週間後に、血清、鼻洗浄液、腸管洗浄液、糞便を採取した。糞便は100 mg/mLのPBSに懸濁後、その上清を検体とした。

[0027] 1-4. 抗ノロウイルスVLP抗体の抗体価の測定

抗原特異的な抗体応答について、ELISA法により解析を行った (Kongら, *Infect Immun* 81 :1625-1634, 2013を参照)。PBS中、1 μ g/mLのVLPを4°Cで一晩、96ウェルプレートにコートした。1% BSAを含むPBS-Tweenでブロッキングをした後、10倍に連続希釈したサンプルを添加し、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、HRP結合ヤギ抗マウスIgG (Southern Biotech社) またはHRP結合ヤギ抗マウスIgA (Southern Biotech社) を1:4,000に希釈し、ウェルに添加後、室温で1時間30分インキュベートした。インキュベート後、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (XPL社) で発色させた。エンドポイント

トタイターは、ネガティブコントロールよりもOD450の値が0.1以上高い最終希釈倍率について、対数表示した (reciprocal log₁₀ titer) で表示した。

[0028] 1-5. ヒトiPS細胞から誘導したオルガノイドまたは単層化細胞を用いたノロウイルスの増殖の中和活性測定法

ヒトiPS細胞株から誘導した腸管オルガノイドのMatrigel (Corning) 上での培養、および単層化の方法、ならびにそれらを用いた抗VLP抗体によるノロウイルスの増殖の中和活性測定は、既報 (Satoら, Cell Mol Gastroenterol Hepatol 7: 686-688, 2019) に記載の方法に従って行った。ノロウイルス (GII.4_2012 Sydney, GII.17_2015 KawasakiおよびGII.2 OSN201926 ; 大阪健康安全基盤研究所から供与) 溶液は基本培地 (Advanced DMEM/F12 (Gibco) に10 mM HEPES (pH 7.3, Gibco) 、2 mM Glutamax (Gibco) および100 units/mL Penicillin plus 100 µg/mL streptomycin (Gibco) を添加したもので100 µLあたり 2×10^6 ゲノムコピーになるように希釈した。その後、細胞に感染させる前に希釈したウイルス溶液を適当に希釈したマウス抗血清もしくは鼻洗浄液と混合し、またはマウス抗血清、鼻洗浄液と混合せずに、37°Cで90分間インキュベートした。得られたウイルス溶液を腸管上皮細胞への感染に使用した。

[0029] 単層化した腸管上皮細胞に、希釈したウイルス液を100 µL添加し、ウイルスを腸管上皮細胞に感染させた後、37°C、5% CO₂条件下で、1時間または3時間インキュベートした。その後、ウイルス液を除去し、細胞を150 µLの基本培地で2回洗浄した。洗浄後のウェルに分化培地 (基本培地に1× B-27 base medium、1.25% 仔ウシ血清 (Biosera) 、50 ng/mL マウスEGF、375 ng/mL マウス R-Spondin1 (R&D Systems) 、50 ng/mL マウスNoggin (Peprotech) および500 nM A83-01を添加したものに胆汁を0.03% 添加した溶液を100 µL加えた後、すぐ上清を回収した。ウイルス感染後1時間または3時間の培養上清を、各々、1 hpi (1 hour post infection) または3 hpiサンプルとした。

[0030] 次いで、上清回収後のウェルに100 µLの分化培地および0.03% 胆汁を加え、37°C、5% CO₂条件下で、48時間インキュベートした。この上清を48hpi (48

hour post infection、感染後48時間)として回収した。ウイルスゲノムコピーの定量はHigh Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用して、希釈したウイルス溶液、感染後1時間(上記1 hpi)、3時間(上記3 hpi)または48時間(上記48 hpi)に回収したサンプルからRNAを調製した。RT-qPCRは、qPCR (GI/GII) Typing Kit (TakaRa) およびStepOne Plus リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いて実施した。

[0031] 1-6. ナノゲル被覆ノロウイルスVLPのネガティブ染色による電子顕微鏡観察

GII.17 VLPとcCHPをモル比1:18の割合で、あるいは、GII.2 VLPとcCHPをモル比1:180の割合でナノゲル化し、観察用サンプルとした。また、すでに報告のあるナノゲル内包型のナノゲル-抗原複合体として、PspAとcCHPをモル比1:1の割合でナノゲル化した。GII.17 VLPはPBS(-)で0.5 mg/mLに希釈し、GII.2 VLPはGII.2 VLPはPBS(-)で0.1 mg/mLに希釈した。cCHPは、1% cCHPを原液で使用した。カーボン蒸着と親水化処理を施したフォルムバル支持膜を貼ったグリッド (MAXTAFORMグリッド HF36 Cu 400メッシュ) にサンプルを5 μ L載せ、1分間染色した。サンプル液を除いて1%酢酸ウラニウム溶液(蒸留水に溶解)で負染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400、日本電子株式会社) にて観察を行った。

[0032] 2. 結果

2-1. 本実施例の概略

従来報告されている方法により、抗原をナノゲルに内包化して経鼻免疫することで効果的な免疫を誘導することができる。この場合、抗原とモノマーであるcCHPの最適な混合比率は、分子比(抗原:cCHP)で1:2から1:8程度である。これを抗原と球状のナノゲル(4分子のcCHPで1分子のナノゲルが形成される:Kurodaら, Langmuir 18: 3780-3786, 2002)との比率に換算すると、1:0.5から1:2(抗原:ナノゲル)となる。従って、1分子のナノゲルに、1分子から2分子程度の蛋白質抗原が内包されていることになる(Yukiら, M

olecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021)。

[0033] 以上の知見を参考にして、抗原がナノゲルより大きな場合（すなわち、抗原をナノゲルに内包化できない場合）、抗原をナノゲルで被覆する（抗原表面にナノゲルを付着させる）ことで、ナノゲルの持つ経鼻免疫での有用性を発揮させることができないか検討した。具体的には、30から40 nmの球状構造のVLPを形成するノロウイルスVLP（GII.17およびGII.4）を抗原とし、VLPに対するナノゲルの分子比（VLP：ナノゲル）を、1：180および1：18程度にして、VLPに対するナノゲルの比率を従来の方法よりも大幅に上げて、ナノゲル-VLP複合体の調製を実施した（図1参照）。

[0034] 2-2. ナノゲル被覆型VLP（GII.17 およびGII.4）のマウス経鼻免疫応答

抗原分子に対するナノゲルの分子数が大過剰の状態、すなわち、ノロウイルスVLPに対するナノゲルの分子比を1：180とし、ノロウイルスVLP（GII.17 およびGII.4）とナノゲルとの複合体を形成させた。GII.17 VLPのみまたはナノゲル-GII.17 VLP複合体で、マウスを1週間おき3回経鼻免疫した。1週間後の抗原特異的な血清IgG、鼻腔洗浄液中IgAおよび糞便中IgAの抗体価を図2 Aに示す。ナノゲル-GII.17 VLP複合体で免疫したすべてのマウスにおいて誘導された抗体価は、VLPのみで免疫した場合の抗体価と比較して、約10倍以上の上昇が認められた。

図2 Bは、同様の条件での、GII.4 VLPのみまたはナノゲル-GII.4 VLP複合体での経鼻免疫の結果を示す。ナノゲル-GII.4 VLP複合体で免疫したすべてのマウスにおいて誘導された抗体価は、VLPのみで免疫した場合の抗体価と比較して、約10倍以上の上昇が認められた。

[0035] 2-3. ナノゲル被覆型VLP（GII.17）のマウス経鼻免疫応答

次に、VLPに対するナノゲルの混合比率を上記2-2の場合の混合比率の1/10にして、すなわち抗原（VLP）に対するナノゲルの分子比（VLP：ナノゲル）を、1：18としてノロウイルスVLP（GII.17）とナノゲルとの複合体を形成させた。GII.17 VLPのみまたはナノゲル-GII.17 VLP複合体で、マウスを1週

間おき3回経鼻免疫した。1週間後の抗原特異的な血清IgGおよび鼻腔洗浄液中IgAの抗体価を図3に示す。VLPに対するナノゲルの混合比を下げた場合においても、抗原特異的な血清IgGおよび鼻洗浄液IgAの抗体価は、VLPのみで免疫した場合の抗体価に比べて、約10倍以上の上昇が認められた。

[0036] 2-4. ナノゲル被覆型VLP (GII.17 VLPおよびGII.4 VLP) により誘導された抗体の中和活性の検討

次に、ナノゲル被覆型VLP (GII.17 VLPおよびGII.4 VLP) によって誘導された抗体が、中和活性、すなわち、ノロウイルスの腸管上皮細胞中での増殖を抑制する活性を有するかどうかについて検討を行った。ノロウイルスの増殖は、培養上清中のウイルスゲノムのコピー数を指標にして評価した。結果を図4に示す。ナノゲル被覆型VLPの経鼻投与によって誘導された血清IgGおよび鼻洗浄液IgAは、VLPがGII.17 VLP (図4 A) およびGII.4 VLP (図4 B) のいずれの場合においても、各々、ノロウイルスGII.17およびノロウイルスGII.4の腸管上皮細胞内での増殖を抑制することが確認された。すなわち、ナノゲル被覆型VLPの経鼻免疫によって誘導される抗体は、顕著な中和活性を有している事が分かった。

[0037] 2-5. ナノゲル被覆型VLP (GII.2 VLP) のマウス経鼻免疫応答

GII.2 VLPに対するナノゲルの分子比を1:180とし、GII.2 VLPとナノゲルとの複合体を形成させた。GII.2 VLPのみまたはナノゲル-GII.2 VLP複合体で、マウスを1週間おき3回経鼻免疫した。1週間後の抗原特異的な血清中IgG、鼻腔洗浄液中IgA、唾液中IgAおよび腸管洗浄液中IgAの抗体価を図5に示す。ナノゲル-GII.2 VLP複合体で免疫したすべてのマウスにおいて誘導された抗体価は、VLPのみで免疫した場合の抗体価と比較して、約10倍~100倍以上の上昇が認められた。特に、腸管洗浄液中の抗体価の上昇が顕著であった。

[0038] 2-6. ナノゲル被覆型VLP (GII.2 VLP) により誘導された血清中のIgG抗体の中和活性の検討

ナノゲル被覆型VLPの経鼻投与によって誘導された血清中IgGは、VLPのみを経鼻投与した場合に誘導される血清中IgGと比較して、ノロウイルス (HuNoV

GII.2) の腸管上皮細胞内での増殖をより強く抑制することが確認された (図6)。

[0039] 2-7. ナノゲル被覆型VLP (GII.2 VLP) により誘導された腸管洗浄液中のIgA抗体の中和活性の検討

次に、ナノゲル被覆型VLPの経鼻投与によって誘導された血清中IgGは、VLPのみを経鼻投与した場合に誘導される血清中IgAと比較して、ノロウイルス (HuNoV GII.2) の腸管上皮細胞内での増殖をより強く抑制することが確認された (図7)。

特筆すべきは、本実施例において、ナノゲルで被覆したGII.2 VLPを経鼻免疫すると、GII.2 VLPのみを単独で経鼻免疫した場合よりも、腸管洗浄液中に、HuNoV GII.2特異的IgA抗体が100倍以上多く誘導され、HuNoV GII.2の増殖が非常に効果的に抑制されることを実証できたことである。この結果により、ノロウイルスの経鼻ワクチンの臨床応用に、非常に期待が持てる。すなわち、従来、このような経鼻VLPワクチンでノロウイルスの防御効果を得るためにはアジュバンドが必要とされることが報告されていた (Atmar, N. Eng. J. Med. 365:2187-87, 2011)。しかしながら、本実施例で示した結果を踏まえると、製剤添加物であるナノゲルで抗原を被覆することで、アジュバンド未添加のノロウイルス経鼻ワクチンの製造が十分可能であると考えられる。

[0040] 2-6. ネガティブ染色によるナノゲル被覆型VLPの電子顕微鏡観察

図8Aは、GII.17 VLP単独サンプルの電子顕微鏡観察像を示す。粒径が約38nmで正二十面体の中空粒子であるVLPが観察された。一方、1% cCHPのみのサンプル中におけるナノゲルの大きさ (粒径) は約20-40nmで、コントラストのやや弱い白く抜けた粒子状の連なりとして観察された (図8B)。ナノゲル被覆型VLPの電子顕微鏡観察画像においては、VLP、ナノゲルが見られる他、ナノゲルと複合体を形成しているVLPが観察された (図5Cの拡大図中、矢印で示す)。ナノゲルと複合体を形成しているVLPは、表面がcCHP (ナノゲル) に覆われているために全体的に白い円盤状に見えた。また、真空状態で観察しているためVLPの中央が凹んだ結果、中身が透けてやや暗く見える球状の粒

子として観察された。

[0041] また、図9 AおよびBは、GII.2 VLP単独サンプルの観察像を示す。粒径が約30-40 nmで正二十面体の中空粒子であるGII.2 VLPが観察された。実際、このGII.2 VLPは分子量60,000のVP1 の180個から形成されており、分子量約1000万である。ナノゲル化GII.2 VLPの観察像（図9 CおよびD）では、ナノゲル化されていないVLPやcCHPが見られるとともに、ナノゲル化されていると思われる粒子は表面がcCHPに覆われたため全体的に白～薄いグレーの立体的な球状で観察され（図中の矢印）、VLPよりやや大きいサイズのものが被覆状態のナノゲルであると考えられた。このような観察されることは、上述ナノゲル被覆型GII.17VLPと同様に、真空状態で中央が凹んだためにVLPの中空が透けてやや暗く見える球状の粒子として観察されたことと同様と考えられる。一方、1% cCHP単独サンプル（図9 E）の大きさは約15-40 nmでやや幅がみられ、白く抜けた粒子状として観察された。PspAは透過型電子顕微鏡観察において単独での確認が困難なためナノゲル化されたPspAを観察した結果、観察像はcCHP単独と比べて大きな変化はほぼみられなかった（約20-40 nm）。

以上の電子顕微鏡観察の結果から、cCHP（ナノゲル）がVLPの周囲を覆うようにして付着し、被覆化していることが示唆された。

[0042] 2-7. DLS (dynamic light scattering) 法によるナノゲル被覆型VLPの粒径の測定

電子顕微鏡による観察に加え、cCHPナノゲル、GII.2 VLPおよびナノゲル被覆型GII.2 VLPの粒径をDLS法で測定し、各々の粒径を比較した（表1）。

[表1]

表1. DLS測定

サンプル	D _H (nm)	PDI
cCHPナノゲル	51.8	0.394
GII.2 VLP	69.7	0.345
cCHPナノゲル化VLP (モル比1:180)	109.2	0.308
cCHPナノゲル化PspA (モル比1:1)	53.8	0.407

その結果、cCHP ナノゲルは、粒径 (DH) 52nm、多分散度 (PDI) 0.394であ

った。また、GII.2 VLPは粒径70nm、PDI:0.345とTEM 観察像と比較して大きくなっているが、PDI がやや大きいことから両者ともわずかな凝集体などの影響により値が大きくなっていると考えられる。ナノゲルで被覆化したVLPは、粒径109nm、PDI:0.308 となっており、ナノゲルの被覆化による粒径増加が値として現れている結果となった。一方、ナノゲルに内包したPspA の粒径およびPDIは、共に、cCHPナノゲルの粒径およびPDIとほぼ同一であった。以上の結果から、ナノゲルに内包されたPspA 抗原（ナノゲル内包PspA抗原）に比して、ナノゲルで被覆されたナノゲル被覆型VLP抗原は、粒径が増加しており、上記電子顕微鏡観察の結果（図8および図9）の結果が、DSL測定結果からも確認することができた。

[0043] 2-8. ナノゲルの安全性の検討（参考）

本実施形態にかかるナノゲル被覆型抗原（巨大分子の抗原をナノゲルで被覆した複合体）は、アジュバントを添加せずに、経鼻ワクチンとして臨床応用することができる。このような結果は、過去のインフルエンザ経鼻ワクチンと大腸菌易熱性毒素アジュバントの脳内移行関連で経鼻ワクチン開発に失敗した問題（Mutschら, N. Engl. J Med 350: 896-903, 2004）とも関連し、非常に重要な結果であると言える。本発明者らは、これまでに、ナノゲル経鼻ワクチンに関し、抗原部分の脳内移行を否定する体内動態試験の結果を報告している（Yukiら, J. Immunol. 185: 5436-5443 2010; Fukuyamaら, Mucosal Immunol. 8:1144-1153 2015）。この結果に加え、新たに、ナノゲル自体を経鼻投与することによる体内動態への影響に関し、特に脳内移行について、検討したデータをここに示す。図10に示す結果は、mRNAワクチンのDDS（製剤添加物）である脂質系ナノ粒子自体の筋注による安全性に関する体内動態試験と同様に、ナノゲル（製剤添加物としての）自体の経鼻ワクチン製剤としての体内動態試験と考えることができる。

ナノゲルの体内動態を調べるため、まず、ナノゲルを¹¹¹Inで標識した。¹¹¹In標識したナノゲルをDEAE Sepharoseカラムを用いて、未反応の¹¹¹Inと¹¹¹In標識化ナノゲルと分離し、¹¹¹In標識化ナノゲルを精製した。精製した¹¹¹In標識化ナ

ノゲル（ナノゲルとして0.1mg）を、マウス（n=3）に経鼻投与後、0.25時間、1時間、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間および72時間に、各種臓器における¹¹¹Inの放射活性を測定した（図10）。その結果、製剤添加物であるcCHPナノゲルは、嗅球および脳内へは移行しないことが明らかとなり、ナノゲル自体の安全性を確認することができた。なお、¹¹¹In標識は、既報（Yukiら, J. Immunol 185: 5436-5443, 2010）に基づいて行った

産業上の利用可能性

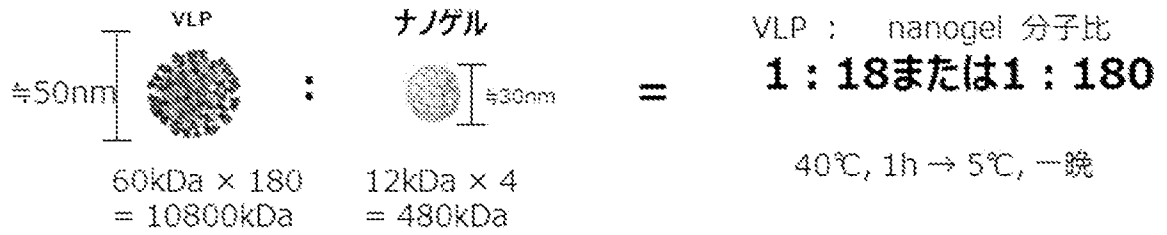
[0044] 本発明は、これまで製剤化困難であった、大きな抗原分子を含むナノゲルワクチン製剤を提供するものであり、医学分野における利用が期待される。

請求の範囲

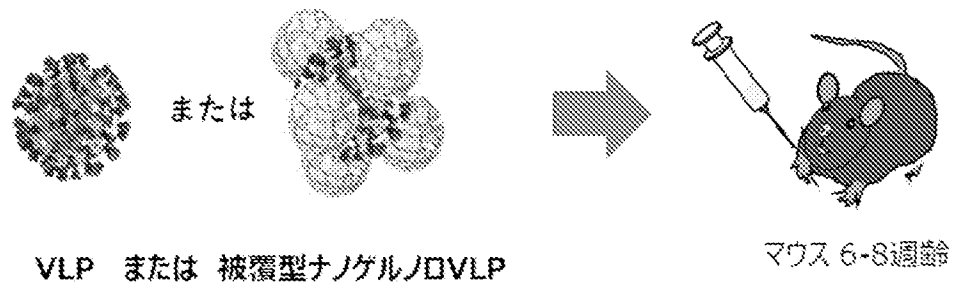
- [請求項1] ナノゲルおよびワクチン抗原の複合体であって、該ワクチン抗原がナノゲルで被覆されている、前記複合体。
- [請求項2] 前記ワクチン抗原の粒径が、20 nm以上であることを特徴とする請求項1に記載の複合体。
- [請求項3] 前記ワクチン抗原が、ナノゲルよりも大きな物質であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の複合体。
- [請求項4] 前記ワクチン抗原が、VLP (virus like particle)、不活性化ウイルス、20 nm以上の巨大タンパク分子または重合体であることを特徴とする請求項1から請求項3までのいずれか1項に記載の複合体。
- [請求項5] 前記ワクチン抗原とナノゲルが、1:15~1:200のモル比で複合化されることを特徴とする請求項1から請求項4までのいずれか1項に記載の複合体。
- [請求項6] アジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項1から請求項5までのいずれか1項に記載の複合体。
- [請求項7] 請求項1から請求項6までのいずれか1項に記載の複合体を含むワクチン製剤。

[図1]

ナノゲル化条件

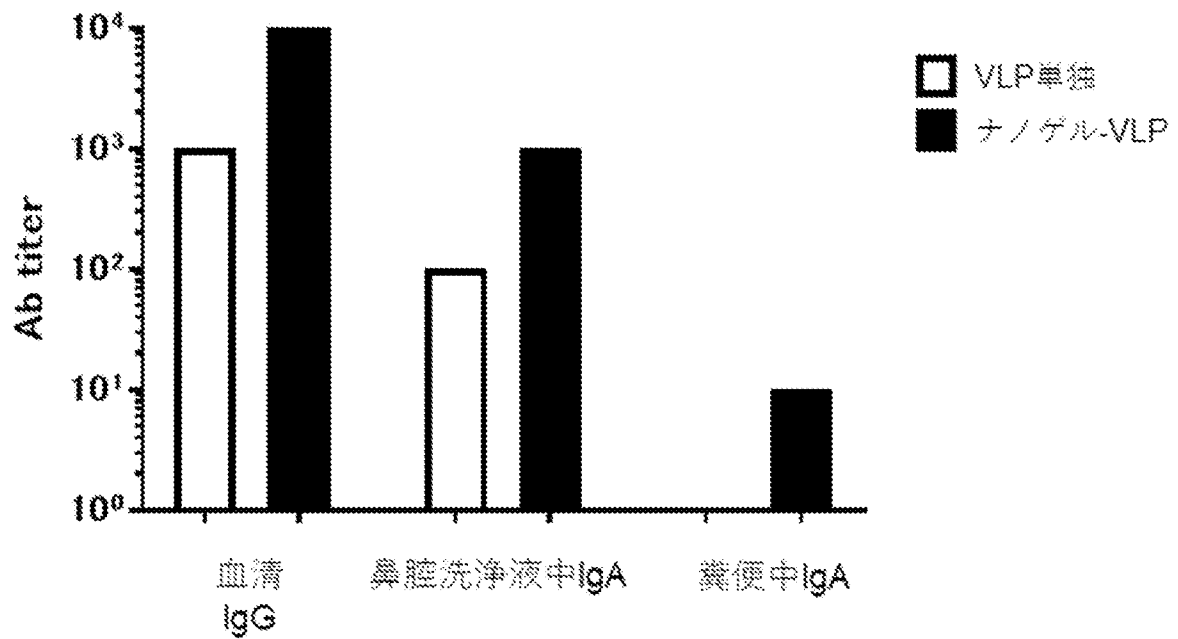


ノロウイルスのVLPを用いたナノゲル被覆検証実験

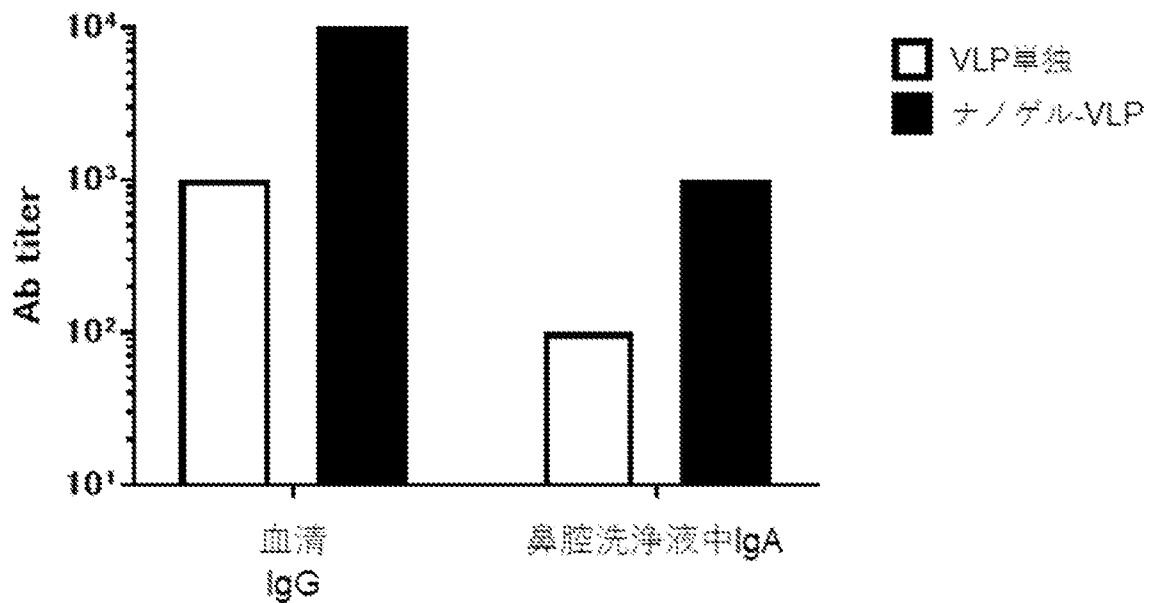


[図2]

A ノロウイルスGII.17 VLPに対する抗体価（比1：180）

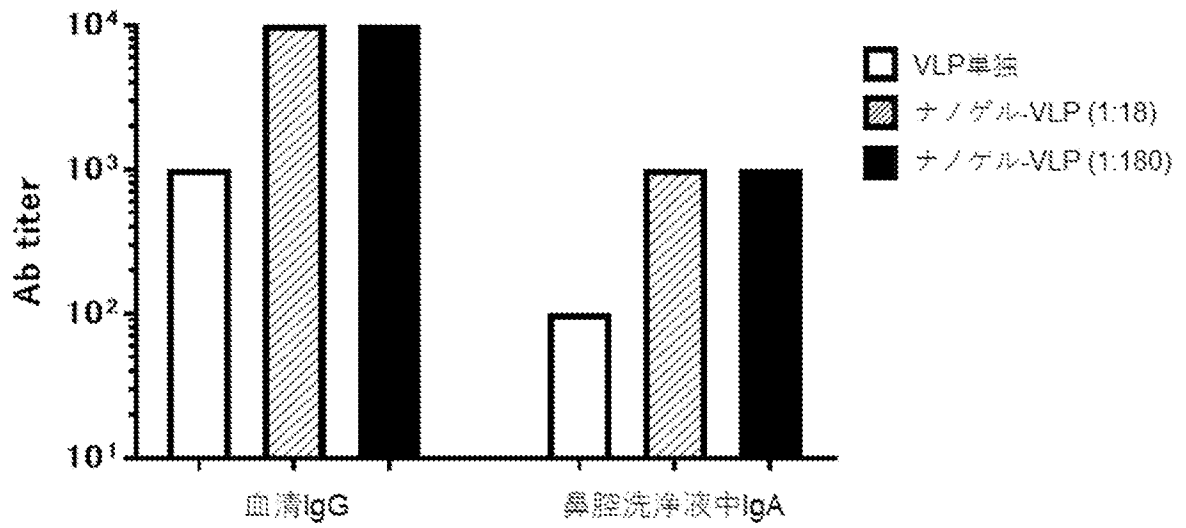


B ノロウイルスGII.4 VLPに対する抗体価（比1：180）



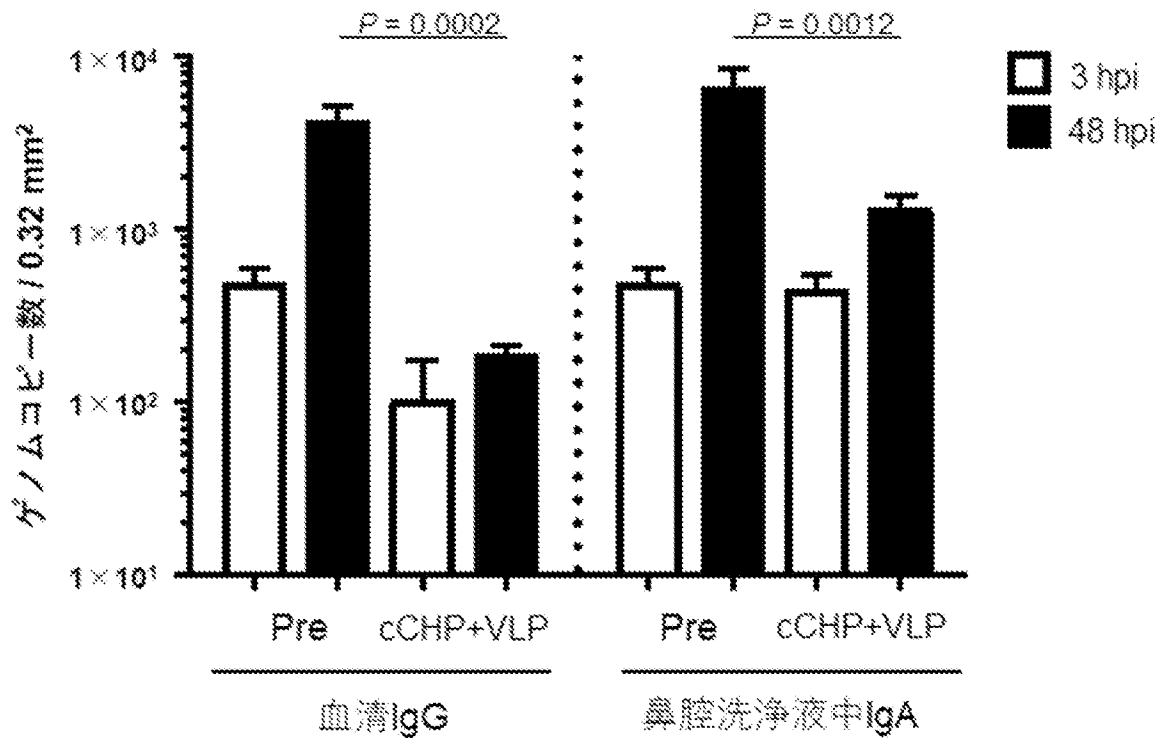
[図3]

ノロウイルスGII.17 VLPに対する抗体価（比1：18）

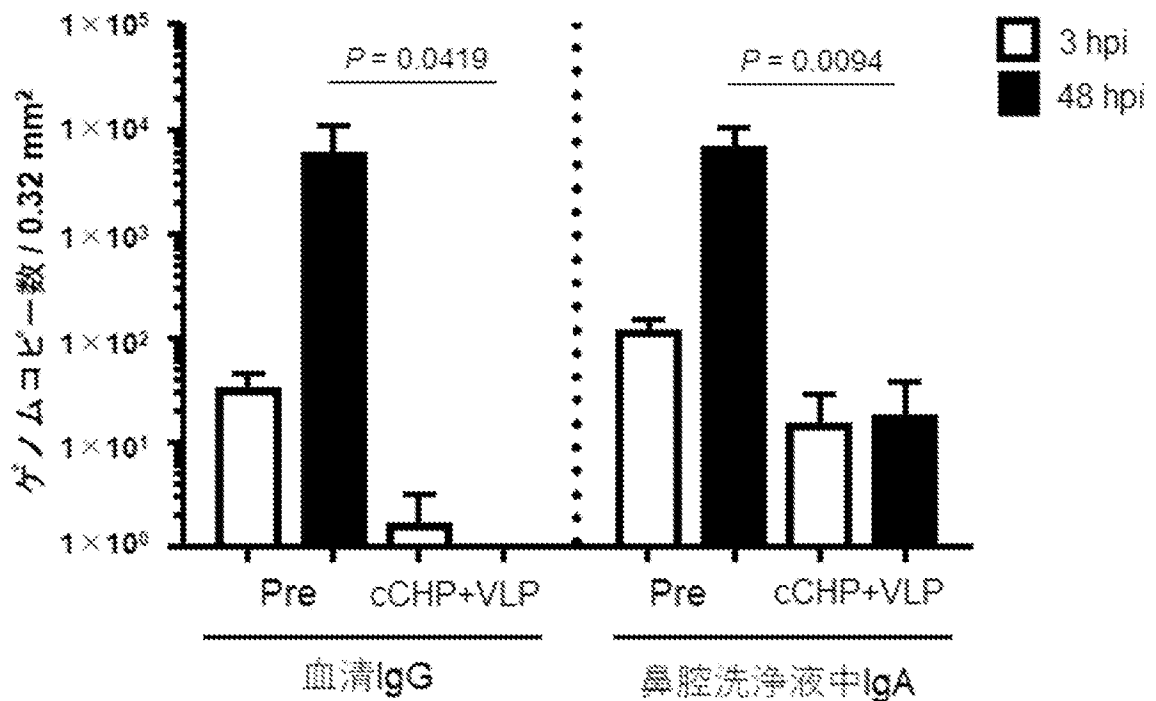


[図4]

A ノロウイルスGII.17に対する中和効果（比1：180）

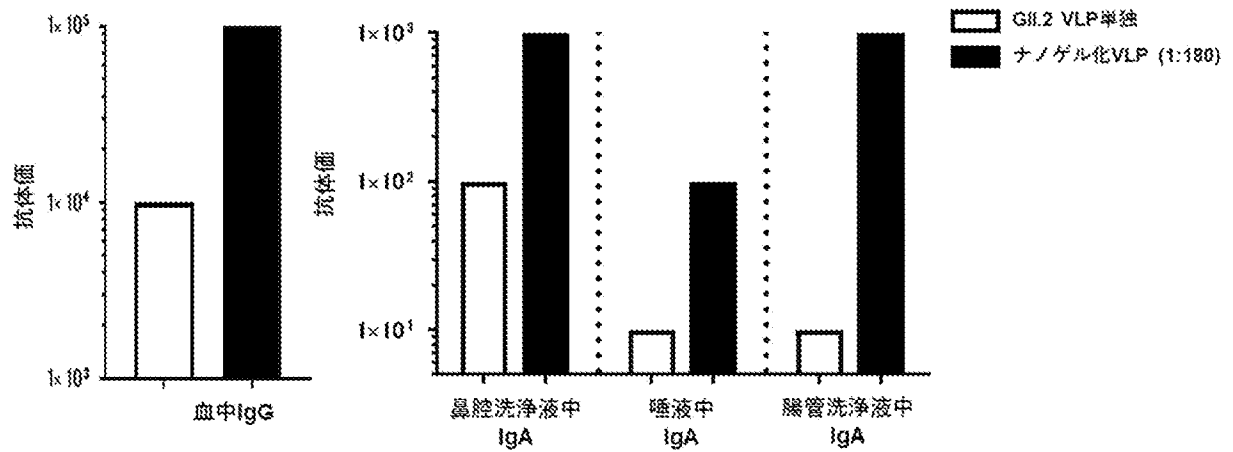


B ノロウイルスGII.4に対する中和効果（比1：180）



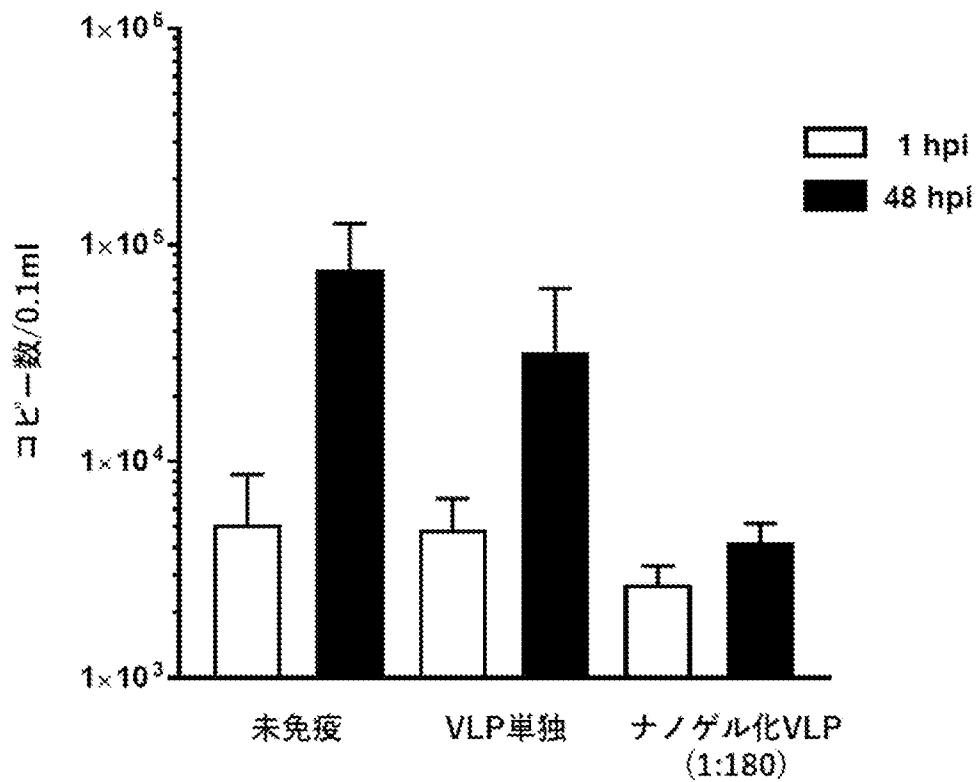
[図5]

ノロウイルスGII.2 VLPの経鼻免疫でのマウス抗原特異的抗体価



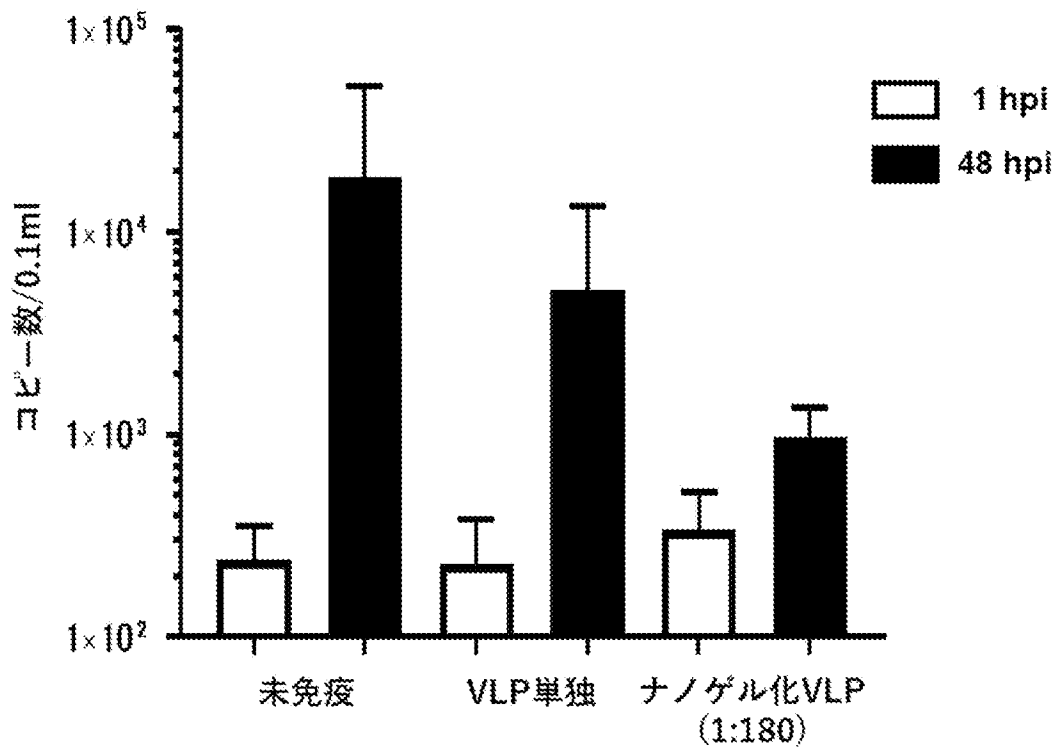
[図6]

ノロウイルスGII.2 に対するVLP経鼻免疫の血清中IgGの中和効果

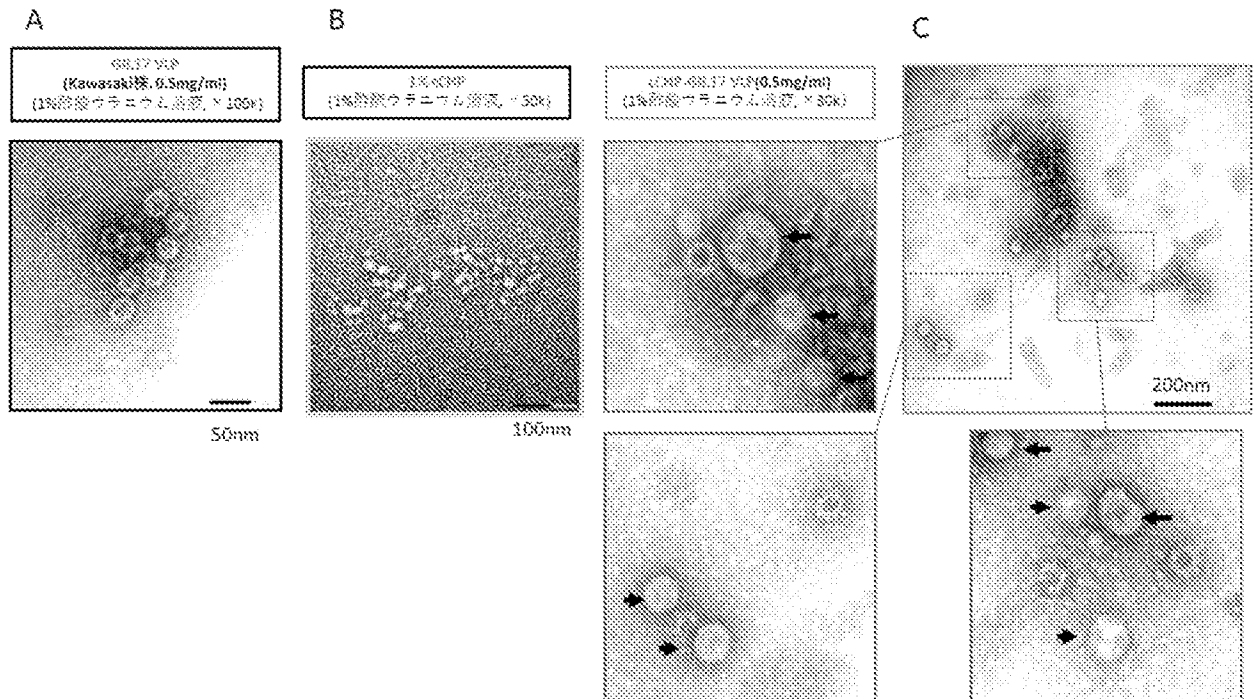


[図7]

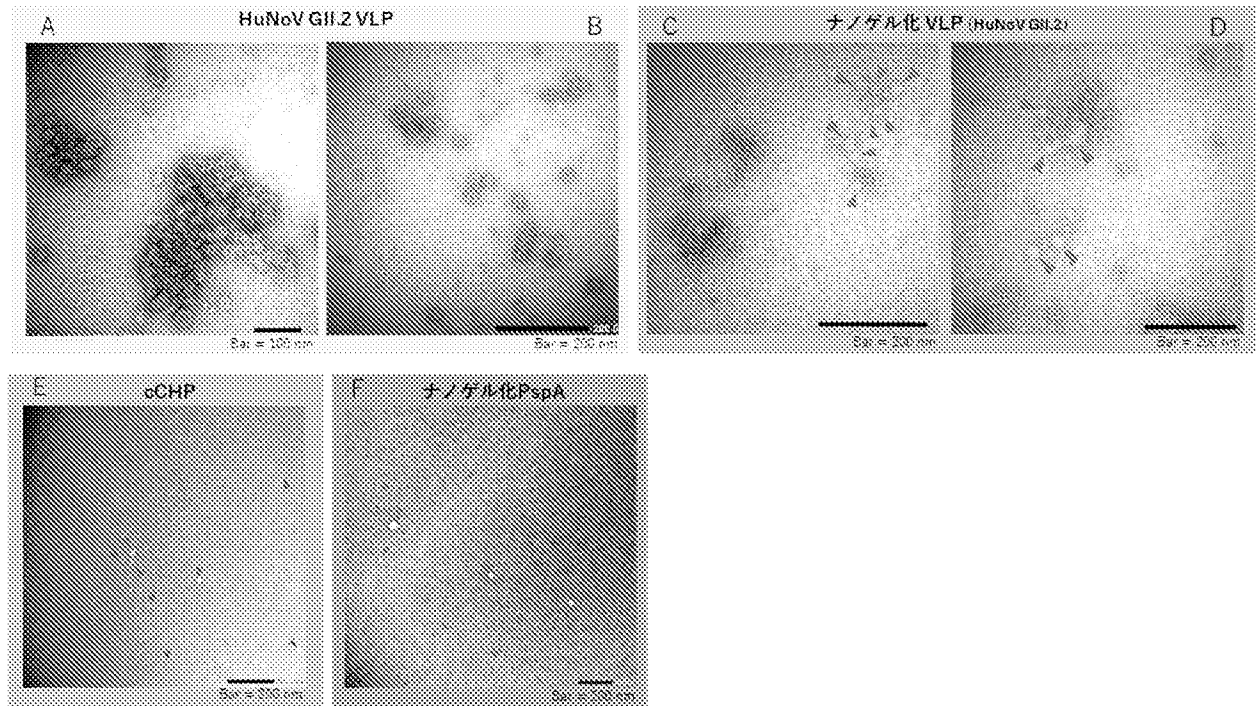
ノロウイルスGII.2に対するVLP経鼻免疫での腸管洗浄液中IgAの中和効果



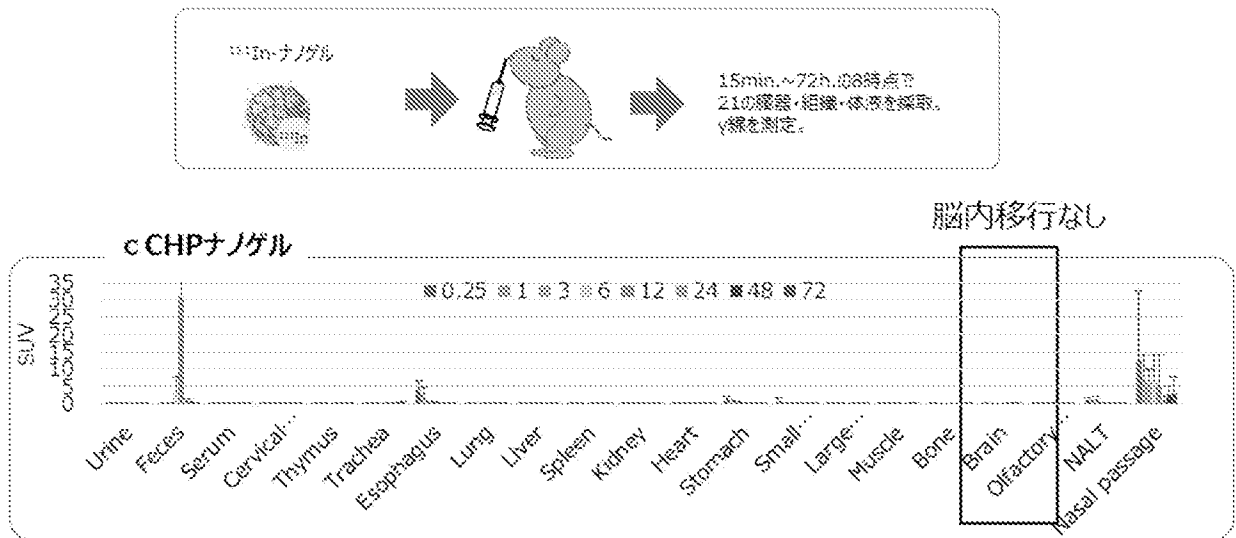
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/014798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i FI: A61K39/00 H ZNA; A61K39/00 G; A61K39/12; A61K39/39; A61K47/36; A61P31/12; A61P31/14; A61P37/04</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00; A61K39/12; A61K39/39; A61K47/36; A61P31/12; A61P31/14; A61P37/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/027318 A1 (NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORG.) 06 February 2020 (2020-02-06) claims, paragraphs [0027], [0040], [0041], examples	1-3, 5-7
Y		1-7
X	WO 2010/050578 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIV.) 06 May 2010 (2010-05-06) claims, paragraphs [0025], [0026], examples	1, 7
Y		1-7
Y	谷本武史, 経鼻吸収型 インフルエンザワクチンの開発, Drug Delivery System, 2010, vol. 25, no. 1, pp. 15-21, non-official translation (TANIMOTO, Takeshi. Development of nasal absorption influenza vaccine.) particularly, pp. 18-20, right column, tables 2, 3	1-7
Y	VALASQUEZ, L. S. et al. Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine. Vaccine. 2011, vol. 29, issue 32, pp. 5221-5231 particularly, abstract, Materials and methods	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2022		Date of mailing of the international search report 14 June 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/014798

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/027318 A1	06 February 2020	US 2021/0322531 A1 claims, paragraphs [0045], [0058], [0059], examples JP 2020-19754 A EP 3831405 A1	
WO 2010/050578 A1	06 May 2010	US 2011/0206729 A1 claims, paragraphs [0048], [0049], examples JP 2010-105968 A EP 2345419 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/12(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i FI: A61K39/00 H ZNA; A61K39/00 G; A61K39/12; A61K39/39; A61K47/36; A61P31/12; A61P31/14; A61P37/04</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K39/00; A61K39/12; A61K39/39; A61K47/36; A61P31/12; A61P31/14; A61P37/04</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年													
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																						
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																						
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020/027318 A1 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.02.2020 (2020 - 02 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0027], [0040], [0041], 実施例</td> <td>1-3, 5-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/050578 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 06.05.2010 (2010 - 05 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0025], [0026], 実施例</td> <td>1, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>谷本武史, 経鼻吸収型インフルエンザワクチンの開発, Drug Delivery System, 2010, vol.25, no.1, p.15-21 特にp.18-20右欄, 表2, 表3</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>VALASQUEZ, L.S., et al., Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine, Vaccine, 2011, vol.29, issue 32, p.5221-5231 特にABSTRACT, Materials and methods</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2020/027318 A1 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.02.2020 (2020 - 02 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0027], [0040], [0041], 実施例	1-3, 5-7	Y		1-7	X	WO 2010/050578 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 06.05.2010 (2010 - 05 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0025], [0026], 実施例	1, 7	Y		1-7	Y	谷本武史, 経鼻吸収型インフルエンザワクチンの開発, Drug Delivery System, 2010, vol.25, no.1, p.15-21 特にp.18-20右欄, 表2, 表3	1-7	Y	VALASQUEZ, L.S., et al., Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine, Vaccine, 2011, vol.29, issue 32, p.5221-5231 特にABSTRACT, Materials and methods	1-7
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																					
X	WO 2020/027318 A1 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 06.02.2020 (2020 - 02 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0027], [0040], [0041], 実施例	1-3, 5-7																					
Y		1-7																					
X	WO 2010/050578 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 06.05.2010 (2010 - 05 - 06) 特許請求の範囲, 段落[0025], [0026], 実施例	1, 7																					
Y		1-7																					
Y	谷本武史, 経鼻吸収型インフルエンザワクチンの開発, Drug Delivery System, 2010, vol.25, no.1, p.15-21 特にp.18-20右欄, 表2, 表3	1-7																					
Y	VALASQUEZ, L.S., et al., Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine, Vaccine, 2011, vol.29, issue 32, p.5221-5231 特にABSTRACT, Materials and methods	1-7																					
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																							
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																							
<p>国際調査を完了した日</p> <p>02.06.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.06.2022</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>池上 文緒 4U 3765</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																						

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/014798

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/027318	A1	06.02.2020	US	2021/0322531	A1	特許請求の範囲, 段落 [0045], [0058], [0059], 実 施例
				JP	2020-19754	A	
				EP	3831405	A1	
WO	2010/050578	A1	06.05.2010	US	2011/0206729	A1	特許請求の範囲, 段落 [0048], [0049], 実施例
				JP	2010-105968	A	
				EP	2345419	A1	