

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-534232
(P2023-534232A)

(43)公表日 令和5年8月8日(2023.8.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/69 (2017.01)	A 6 1 K	47/69		4 C 0 7 6
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14		4 C 0 8 6
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全78頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-501772(P2023-501772)	(71)出願人	508070909	(71)出願人 522012488 ピーディーエックス ファーマシューテ ィカルズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウスウエスト サム ジ ャクソン パーク ロード 3 1 8 1 メー ル コード エル1 0 6 ティーティー	
(86)(22)出願日	令和3年7月13日(2021.7.13)		オレゴン ヘルス アンド サイエンス ユ ニバーシティ		
(85)翻訳文提出日	令和5年3月6日(2023.3.6)		アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/041487		ポートランド サウスウエスト サム ジ		
(87)国際公開番号	WO2022/015766		ジャクソン パーク ロード 3 1 8 1 メー		
(87)国際公開日	令和4年1月20日(2022.1.20)		ル コード エル1 0 6 ティーティー		
(31)優先権主張番号	63/051,351	(71)出願人	522012488	(74)代理人 100102978 弁理士 清水 初志	
(32)優先日	令和2年7月13日(2020.7.13)		ピーディーエックス ファーマシューテ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ィカルズ インコーポレイテッド		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州		
			ポートランド サウス ボンド アベニュー 3 3 0 3 サーティーンズ フロアー		
			最終頁に続く	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 免疫原性構築物、組成物、および免疫応答を誘導する方法

(57)【要約】

ナノ粒子と、ナノ粒子の外面に静電的に結合したカチオン性ポリマーと、カチオン性ポリマーに結合した安定剤またはナノ粒子の外面に結合した安定剤と、抗原または抗原産生因子とを含む免疫原性構築物が、開示される。任意で、構築物は、アジュバントおよび/または1つもしくは複数の官能性オリゴヌクレオチド（例えば、siRNAまたはpDNA）を含み得る。アジュバントと、抗原と、任意でsiRNAとを細胞に同時送達し、対象において免疫応答を誘導し、対象の感染性疾患を治療または予防するために、本明細書において提供される免疫原性構築物を使用する方法も、開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナノ粒子、

ナノ粒子の外面に静電的に結合したポリエチレンジアミン（PEI）を含む、ある量の架橋カチオン性ポリマーであって、PEI含有量がナノ粒子プラットフォーム（NP）の少なくとも10重量%である、前記架橋カチオン性ポリマー、および

架橋PEIに共有結合したポリエチレングリコール（PEG）を含む、ある量の安定剤を含む、NPと、

感染因子の抗原または抗原産生因子と

を含む、免疫原性構築物であって、

前記構築物の流体力学的サイズが1ミクロン以下である、前記免疫原性構築物。

10

【請求項2】

ナノ粒子がメソポーラスシリカナノ粒子（MSNP）である、請求項1記載の免疫原性構築物。

【請求項3】

ナノ粒子、

ナノ粒子の外面に結合した架橋カチオン性ポリマー、および

架橋カチオン性ポリマーに結合した安定剤またはナノ粒子の外面に結合した安定剤を含む、ナノ粒子プラットフォーム（NP）と、

感染因子の抗原または抗原産生因子と

を含む、免疫原性構築物。

20

【請求項4】

アジュバントをさらに含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項5】

アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくは界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む、請求項4記載の免疫原性構築物。

【請求項6】

アジュバントがCpGオリゴヌクレオチドを含む、請求項5記載の免疫原性構築物。

30

【請求項7】

アジュバントがポリI:Cを含む、請求項4記載の免疫原性構築物。

【請求項8】

アジュバントが、NPの1～20重量%で存在する、請求項4記載の免疫原性構築物。

【請求項9】

ナノ粒子が、シリカナノ粒子、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、炭酸カルシウムナノ粒子、リン酸カルシウムナノ粒子、カーボンナノチューブ、またはアジュバントナノ粒子である、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項10】

ナノ粒子がメソポーラスシリカナノ粒子（MSNP）である、請求項9記載の免疫原性構築物。

40

【請求項11】

MSNPが、2～6nm、7nm、または7nm未満の平均孔径を有する、請求項10記載の免疫原性構築物。

【請求項12】

ナノ粒子が酸化鉄ナノ粒子である、請求項9記載の免疫原性構築物。

【請求項13】

カチオン性ポリマーが、PEI、キトサン、ポリプロピレンジアミン、ポリリジン、ポリアミドアミン、ポリ（アリルアミン）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）、

50

ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリル酸）、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリ（N-エチル-ビニルピリジニウムブロミド）、ポリ（ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、ポリ（エチレングリコール）-コ-ポリ（トリメチルアミノエチルメタクリレートクロリド）、またはそれらの2つ以上の混合物を含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項14】

カチオン性ポリマーが、PEIであるかまたはPEIを含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項15】

カチオン性ポリマーが、約0.8kDa～約25kDaの分子量を有する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

10

【請求項16】

カチオン性ポリマーが、NPの1～50重量%で存在する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項17】

安定剤が、PEG、デキストラン、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、またはそれらの2つ以上の混合物を含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項18】

安定剤がPEGである、請求項17記載の免疫原性構築物。

20

【請求項19】

安定剤が、約1kDa～約20kDaまたは約5kDaの分子量を有する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項20】

安定剤が、NPの1～50重量%、約10～30重量%、約5～20重量%、約15重量%、または約20重量%で存在する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項21】

抗原がタンパク質を含み、タンパク質抗原が、安定剤にコンジュゲートされる、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項22】

抗原がペプチドであり、ペプチド抗原が、架橋カチオン性ポリマーに静電的に結合している、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

30

【請求項23】

抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAであり、抗原産生因子が、架橋カチオン性ポリマーに静電的に結合している、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項24】

感染因子がウイルスである、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項25】

感染因子がβ-コロナウイルスである、請求項24記載の免疫原性構築物。

【請求項26】

感染因子が、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoVである、請求項25記載の免疫原性構築物。

40

【請求項27】

感染因子がSARS-CoV-2である、請求項26記載の免疫原性構築物。

【請求項28】

抗原が、組換え全長SARS-CoV-2タンパク質であるか、または抗原産生因子が、組換え全長SARS-CoV-2タンパク質をコードする、請求項27記載の免疫原性構築物。

【請求項29】

全長SARS-CoV-2タンパク質が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である、請求項21記載

50

の免疫原性構築物。

【請求項 30】

抗原が、タンパク質サブユニットであるか、または抗原産生因子が、タンパク質サブユニットをコードする、請求項27記載の免疫原性構築物。

【請求項 31】

タンパク質サブユニットが、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質S1領域、S2領域、または受容体結合ドメイン（RBD）領域に対応する、請求項30記載の免疫原性構築物。

【請求項 32】

抗原が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドであるか、または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドをコードする、請求項27記載の免疫原性構築物。

10

【請求項 33】

ペプチドが、配列番号：1～8のいずれか1つの配列を含む、請求項32記載の免疫原性構築物。

【請求項 34】

抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAである、請求項27記載の免疫原性構築物。

【請求項 35】

感染因子が、細菌、寄生生物、原虫、または真菌である、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項 36】

20

抗原または抗原産生因子が、NPの0.5～20重量%で存在する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項 37】

少なくとも1つのオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項 38】

少なくともオリゴヌクレオチドが、カチオン性ポリマーに静電的に結合している、請求項37記載の免疫原性構築物。

【請求項 39】

少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項38記載の免疫原性構築物。

30

【請求項 40】

少なくとも1つのオリゴヌクレオチドがsiRNAを含む、請求項38記載の免疫原性構築物。

【請求項 41】

siRNAが、その発現またはアップレギュレーションが細胞の免疫抑制に関連する、遺伝子を阻害またはダウンレギュレートする、請求項40記載の免疫原性構築物。

【請求項 42】

細胞が抗原提示細胞である、請求項41記載の免疫原性構築物。

40

【請求項 43】

抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、請求項42記載の免疫原性構築物。

【請求項 44】

遺伝子が、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である、請求項43記載の免疫原性構築物。

【請求項 45】

オリゴヌクレオチドが、NPの1～10重量%で存在する、請求項37記載の免疫原性構築物。

【請求項 46】

50

細胞に対する標的化剤をさらに含む、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項47】

細胞が抗原提示細胞である、請求項46記載の免疫原性構築物。

【請求項48】

抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、請求項47記載の免疫原性構築物。

【請求項49】

標的化剤が、

マンノース、

抗原提示細胞上に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体
もしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、または

抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンド

のうちの少なくとも1つを含む、請求項48記載の免疫原性構築物。

【請求項50】

約10nm～約10ミクロンの流体力学的直径を有する、請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項51】

約30nm～約200nmの流体力学的直径を有する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項52】

約80nm～約999nmの流体力学的直径を有する、請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物。

【請求項53】

請求項1または請求項3記載の複数の免疫原性構築物を含む、免疫原性組成物。

【請求項54】

請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物と、少なくとも1つの生物学的または薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

【請求項55】

請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、ワクチン。

【請求項56】

細胞を請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物と接触させる工程を含む、抗原とアジュバントとを細胞に同時送達する方法。

【請求項57】

細胞が抗原提示細胞である、請求項56記載の方法。

【請求項58】

細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、請求項57記載の方法。

【請求項59】

細胞が筋細胞である、請求項56記載の方法。

【請求項60】

請求項1または請求項3記載の免疫原性構築物の免疫刺激量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項61】

対象において感染因子に対する免疫応答の誘導をもたらす、請求項60記載の方法。

【請求項62】

対象の感染性疾患の治療または予防をもたらす、請求項60記載の方法。

【請求項63】

対象がヒトである、請求項62記載の方法。

【請求項64】

対象が免疫無防備状態である、請求項62記載の方法。

【請求項65】

10

20

30

40

50

免疫原性構築物が、経皮投与されるか、筋肉内投与されるか、吸入によって投与されるか、または鼻腔内投与される、請求項62記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年7月13日に出願された米国仮出願第63/051,351号の優先権および先の出願日の恩典を主張し、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、国立衛生研究所からの助成金番号R44 CA217534の下、政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

2020年の最初の週に、世界では、高病原性β-コロナウイルスから、パンデミックを引き起こすのに十分な人畜共通感染症の拡大を達成した新しいヒト病原体の出現が明示された。COVID-19として知られている高感染性疾患の原因である2019年新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、β-コロナウイルスの新しいメンバーであり、β-コロナウイルスには、2002～2003年に中国で流行を引き起こした重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV-1）、ならびに2012～2013年にサウジアラビアおよび近隣諸国に影響を与えた中東呼吸器症候群（MERS-CoV）が含まれる。

【0004】

中国で最初に出現した後、COVID-19の急速な蔓延は、1300万人を超える確認された症例、および50万人を超える死亡者をもたらした（2020年7月現在）。この新型コロナウイルスに対する安全で効果的な治療剤および予防剤が緊急に必要とされている。

【0005】

したがって、このウイルスおよび新興感染性疾患に適用可能な新しい免疫原性戦略が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本開示の概要

本開示は、感染因子に対する免疫応答を誘導するための免疫原性構築物、組成物および方法を提供する。例えば、本開示の組成物は、β-コロナウイルス感染、例えば、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoV、および関連ウイルスによる感染に対する免疫応答を誘導するために使用され得る。開示される技術はまた、動物（ペットおよび家畜など）の感染性疾患とともに、デング熱、マラリアなどの他の現在の感染性疾患にも適応可能である。

【0007】

一局面では、本開示は、ナノ粒子と、ナノ粒子の外面に結合した架橋カチオン性ポリマーと、架橋カチオン性ポリマーに結合した安定剤またはナノ粒子の外面に結合した安定剤と、感染因子に対する抗原（例えば、全長タンパク質、タンパク質サブユニット、ポリペプチド、ペプチド、またはそれらの混合物）または抗原産生因子（antigen producing agent）（抗原産生核酸、例えば、mRNAまたはpDNAなど）とを含有する免疫原性構築物を特徴とする。

【0008】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、アジュバントをさらに含む。いくつかの態様では、アジュバントは、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくはは

10

20

30

40

50

界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様では、アジュバントは、CpGオリゴヌクレオチド（例えば、CpG ODN 1826またはCpG ODN 7909/2006）を含む。いくつかの態様では、アジュバントは、ポリI:Cを含む。いくつかの態様では、アジュバントは、ナノ粒子プラットフォーム（NPまたはポリマー/安定剤被覆ナノ粒子）の1～20重量%（例えば、1～10重量%、2～7重量%、2～4重量%、2～10重量%、5～10重量%、10～20重量%；または約4重量%、約5重量%、約6重量%、約7重量%、約10重量%もしくは約20重量%）で存在する。いくつかの態様では、アジュバントは、NPの2～10重量%で存在する。

【0009】

いくつかの態様では、ナノ粒子は、シリカナノ粒子（例えば、メソポーラスシリカナノ粒子）、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、カーボンナノ粒子、またはカーボンナノチューブである。様々な態様では、メソポーラスナノ粒子の孔径は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、2～5、2～7、6～10、11～15、16～20、21～30、または31～50nmである。

【0010】

態様では、ナノ粒子は、アジュバントナノ粒子または免疫刺激ナノ粒子（例えば、リポソーム、リポプレックス粒子、脂質系粒子、ポリプレックス粒子、ポリマー系粒子、無機粒子（例えば、リン酸カルシウムナノ粒子または炭酸カルシウムナノ粒子、アルミニウム塩粒子、シリカ粒子）、ピロソームもしくはウイルス様粒子、または1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、コレステロール、3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール、ホスファチジルコリン/コレステロール、キトサン、ポリ- γ -グルタミン酸（ γ -PGA）、ヒアルロン酸、ポリエチレンジアミン（PEI）、ポリ（プロピルアクリル酸）、ポリプロピレンスルフィド、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）、アミロペクチン、マルトデキストリン、ポリステレン、金、酸化コバルト、ミョウバン、トリ-パルミトイル-S-グリセリルシステイン（PA M₃Cys）、スクアレン、Montanide ISA 50V、Montanide ISA 51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206およびMontanide ISA 720のうちの1つもしくは複数を含有するナノ粒子）である。

【0011】

いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、ポリエチレンジアミン（PEI）、キトサン、ポリプロピレンジアミン、ポリリジン、ポリアミドアミン、ポリ（アリルアミン）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリル酸）、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリ（N-エチル-ビニルピリジニウムブロミド）、ポリ（ジメチルアミノ）エチルメタクリレートおよびポリ（エチレングリコール）-コ-ポリ（トリメチルアミノエチルメタクリレートクロリド）からなる群より選択される。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーはPEIである。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、約0.8kDa～約25kDa（例えば、約0.8kDa～約10kDa、約0.8kDa～約5kDa、約0.8kDa～約2.5kDa、約2.5kDa～約10kDa、または約5kDa～約10kDa）の分子量を有する。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、NPの約1～50重量%（例えば、5～40重量%、10～30重量%、20～30重量%、5～10重量%、5～15重量%、5～20重量%、5～25重量%、5～30重量%、10～20重量%、10～25重量%もしくは25～40重量%；または約5、約10、約15、約20、約25、約30もしくは約35重量%）で存在する。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、NPの10～20重量%で存在する。

【0012】

いくつかの態様では、安定剤は、ポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよびポリアクリルアミドからなる群より選択される。いくつかの態様では、安定剤はPEGである。いくつかの態様では、安定剤は、約1kDa～約20kDa（例えば、約0.8kDa～約10kDa

10

20

30

40

50

a、約0.8kDa～約5kDa、約2kDa～約10kDa、約0.8kDa～約2.5kDa、約2.5kDa～約10kDa、または約5kDa～約10kDa)の分子量を有する。いくつかの態様では、安定剤は、NPの1～50重量% (例えば、5～30重量%、10～20重量%、10～25重量%、5～15重量%、5～20重量%、5～25重量%もしくは1～10重量%、または約5、約10、約15、約20、約25、約35、約40もしくは約45重量%)で存在する。安定剤は、カーゴ負荷の前もしくは後、またはその両方に導入され得る。

【0013】

いくつかの態様では、感染因子は、ウイルス、例えば、β-コロナウイルス (例えば、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoV) である。いくつかの態様では、抗原は、組換え全長タンパク質、例えば、全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である。いくつかの態様では、抗原は、タンパク質サブユニット、例えば、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質のS1領域、S2領域、または受容体結合ドメイン (RBD) 領域に対応するタンパク質サブユニットである。いくつかの態様では、抗原は、感染因子の免疫原性配列に対応するペプチドまたはペプチドの混合物である。例えば、感染因子はSARS-CoV-2であり、抗原は、配列番号：1、2、3、4、5、6、7および/または8のペプチド配列を有する。いくつかの態様では、抗原産生因子は、mRNAまたはpDNA、例えば、インビトロ (例えばDC) またはインビボ (例えば、DC、筋細胞) で抗原に発現または翻訳されるmRNAまたはpDNAである。いくつかの態様では、抗原または抗原産生因子は、NPの0.5～20重量% (例えば、0.5～10重量%、1～6重量%、1～15重量%、1.5～10重量%または2～5重量%)で存在する。いくつかの態様では、抗原は、タンパク質サブユニットとペプチドとの混合物を含み得る。

【0014】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、カチオン性ポリマーに静電的に結合している。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、siRNA、例えば、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞またはマクロファージ) などの細胞の免疫抑制に関連する遺伝子を阻害またはダウンレギュレートするものを含む。いくつかの態様では、遺伝子は、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、NPの約1～50重量% (例えば、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、2～5重量%、2～8重量%、2～10重量%、2～25重量%または2～50重量%)で存在する。

【0015】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞またはマクロファージ) などの細胞に対する標的化剤をさらに含む。いくつかの態様では、標的化剤は、マンノース、抗原提示細胞の表面に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはその断片、アプタマー、および抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンドである。いくつかの態様では、標的化剤は、NPの0.1～20重量% (例えば、0.1～1重量%、0.2～2重量%、1～5重量%もしくは1～10重量%;または約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8もしくは約9重量%)で存在する。

【0016】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、標識剤をさらに含む。いくつかの態様では、標識剤は、蛍光色素および/または金属プローブ (例えば、ランタニドプローブ、量子ドット、金ナノ粒子またはガドリニウムキレート) である。

【0017】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、動的光散乱技術もしくはZetasizer (Malvern Panalytical) または同様の装置によって、水溶液 (PBS、トリス緩衝液または水など) 中で測定して、約10nm～約999nm (例えば、約80nm～約200nmまたは約90

10

20

30

40

50

nm～約130nm)の流体力学的直径を有する。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、水溶液(PBS、トリス緩衝液または水など)中で測定して、約1ミクロン～約10ミクロン(例えば、約1ミクロン～約2ミクロン)の流体力学的直径を有する。いくつかの態様では、ナノ粒子は、例えば、透過型電子顕微鏡法によって測定した場合に、約5nm～999nm(例えば、約20nm～約200nm、約30nm～約60nm、約10nm、約20nm、約30nm、約50nm、約60nm、約200～約750nmまたは約500～999nm)の直径を有する。

【0018】

本開示は、ナノ粒子と、脂質層と、感染因子に対する抗原(例えば、全長タンパク質、タンパク質サブユニット、ポリペプチドまたはペプチド)または抗原産生因子(抗原産生核酸、例えば、mRNAまたはpDNAなど)とを含有する免疫原性構築物をさらに特徴とする。

10

【0019】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、アジュバントをさらに含有する。いくつかの態様では、アジュバントは、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくは界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの態様では、アジュバントは、CpGオリゴヌクレオチド(例えば、CpG ODN 1826またはCpG ODN 7909/2006)を含む。いくつかの態様では、アジュバントは、NPに負荷される。いくつかの態様では、アジュバントは、脂質層上または脂質層内に負荷される。いくつかの態様では、アジュバントは、NPの1～20重量%(例えば、1～10重量%、2～7重量%、2～4重量%、2～10重量%、5～10重量%、10～20重量%;または約4重量%、約5重量%、約6重量%、約7重量%、約10重量%もしくは約20重量%)で存在する。いくつかの態様では、アジュバントは、NPの2～10重量%で存在する。

20

【0020】

いくつかの態様では、ナノ粒子は、シリカナノ粒子(例えば、メソポーラスシリカナノ粒子)、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、またはカーボンナノチューブである。

30

【0021】

いくつかの態様では、ナノ粒子は、アジュバントナノ粒子または免疫刺激ナノ粒子(例えば、リポソーム、リポプレックス粒子、脂質系粒子、ポリプレックス粒子、ポリマー系粒子、無機粒子(例えば、リン酸カルシウムナノ粒子、アルミニウム塩粒子、シリカ粒子)、ウイルス様粒子、または1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、コレステロール、3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール、ホスファチジルコリン/コレステロール、キトサン、ポリ- γ -グルタミン酸(γ -PGA)、ヒアルロン酸、ポリエチレンジイミン(PEI)、ポリ(プロピルアクリル酸)、ポリプロピレンスルフィド(PPS)、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)、アミロペクチン、マルトデキストリン、ポリスチレン、金、酸化コバルト、ミョウバン、トリ-パルミトイル-S-グリセリルシステイン(PAM₃Cys)、スクアレン、Montanide ISA 50V、Montanide ISA 51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206およびMontanide ISA 720のうちの1つもしくは複数を含むナノ粒子)である。

40

【0022】

いくつかの態様では、脂質層は、中性脂質(例えば、プロスタグランジン、エイコサノイドまたはグリセリド)、脂肪酸修飾脂質(例えば、2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたは1-(12-ビオチニル(アミノドデカノイル))-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、リン脂質(例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたは1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、脂肪酸(例えば、ステア

50

リン酸またはラウリン酸)、重合性脂質(例えば、コレステロール-PEGまたはジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2K)、カチオン性脂質(例えば、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパンまたはジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴミエリンまたはセラミド)およびステロール(例えば、コレステロールまたはスチグマステロール)から選択される脂質のうちの1つまたは複数を含む単層膜または多層膜である。いくつかの態様では、脂質層は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、コレステロール、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンおよびジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2Kを含む。態様では、脂質層は、NPの0.1~99.9重量%で存在する。

10

【0023】

いくつかの態様では、感染因子は、ウイルス、例えば、 β -コロナウイルス(例えば、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoV)である。いくつかの態様では、抗原は、組換え全長タンパク質、例えば、全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である。いくつかの態様では、抗原の組合せ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の異なる抗原)が製剤に使用される。いくつかの態様では、抗原は、タンパク質サブユニット、例えば、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質のS1領域、S2領域、またはRBD領域に対応するタンパク質サブユニットである。いくつかの態様では、抗原は、感染因子の免疫原性配列に対応するペプチドまたはペプチドの混合物である。例えば、感染因子はSARS-CoV-2であり、抗原は、配列番号:1、2、3、4、5、6、7および/または8のペプチド配列を有する。いくつかの態様では、抗原産生因子は、mRNAまたはpDNA、例えば、インビトロ(例えばDC)またはインビボ(例えば、DC、筋細胞)で抗原に発現または翻訳されるmRNAまたはpDNAである。いくつかの態様では、抗原または抗原産生因子は、NPの0.5~20重量%(例えば、1~15重量%、1.5~10重量%または2~5重量%)で存在する。いくつかの態様では、抗原は、タンパク質サブユニットとペプチドとの混合物を含み得る。

20

【0024】

いくつかの態様では、感染因子は細菌である。いくつかの態様では、抗原は、トキシイド、例えば、ある特定の細菌毒素に対して免疫することを意図した不活化毒素である。いくつかの態様では、抗原は、細菌の糖被覆に対する免疫を作り出すことを意図した、細菌の多糖である。いくつかの態様では、抗原は、細菌由来の1つまたは複数の組換えタンパク質からなる。

30

【0025】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、siRNA、例えば、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞またはマクロファージ)などの細胞の免疫抑制に関連する遺伝子を阻害またはダウンレギュレートするものを含む。いくつかの態様では、遺伝子は、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、NPに負荷される。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、脂質層上または脂質層内に負荷される。いくつかの態様では、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドは、NPの0.01~10重量%で存在する。

40

【0026】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞またはマクロファージ)などの細胞に対する標的化剤をさらに含む。いくつかの態様では、標的化剤は、マンノース、抗原提示細胞の表面に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、アプタマー、または抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンドである。

【0027】

50

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、標識剤をさらに含む。いくつかの態様では、標識剤は、蛍光色素および/または金属プローブ（例えば、ランタニドプローブ、量子ドット、金ナノ粒子またはガドリニウムキレート）である。

【0028】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、10nm～10ミクロンの流体力学的直径を有する。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、水溶液（PBS、トリス緩衝液または水など）中で測定して、約10nm～約999nm（例えば、約80nm～約200nmまたは約90nm～約150nm）の流体力学的直径を有する。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、水溶液（PBS、トリス緩衝液または水など）中で測定して、約1ミクロン～約10ミクロン（例えば、約1ミクロン～約2ミクロン）の流体力学的直径を有する。いくつかの態様では、ナノ粒子は、例えば、透過型電子顕微鏡法によって測定した場合に、約5nm～約999nm（例えば、約20nm～約200nm、約30nm～約60nm、約200～約750nmまたは約500～999nm）の直径を有する。

10

【0029】

いくつかの態様では、ナノ粒子は、抗酸化剤ナノ粒子である。

【0030】

別の局面では、本開示は、本開示の免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を特徴とする。いくつかの態様では、薬学的組成物は、記載される非結合アジュバントをさらに含む。

【0031】

別の局面では、本開示は、本開示の免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチンを特徴とする。

20

【0032】

別の局面では、本開示は、オリゴヌクレオチド（例えばsiRNA）、抗原もしくは抗原産生因子（例えば、mRNAまたはpDNA）および/またはアジュバントを細胞（例えば、筋細胞または抗原提示細胞、例えば、樹状細胞またはマクロファージ）に同時送達する方法を特徴とする。方法は、細胞を本開示の免疫原性構築物と接触させる工程を含む。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、少なくとも1つの抗原産生因子（例えば、mRNAまたはpDNA）を含み、対象に筋肉内投与され、筋細胞によって取り込まれ、免疫原性構築物は、その後の免疫細胞活性化のために少なくとも1つの抗原を産生するように筋細胞を誘導する。

30

【0033】

別の局面では、本開示は、対象において感染因子に対する免疫応答を誘導する方法を特徴とする。方法は、本開示の免疫原性構築物の免疫原性量を対象に投与する工程を含む。いくつかの態様では、対象はヒトである。いくつかの態様では、対象は、免疫無防備状態（例えば、50、55、60、65、70、75もしくは80歳を超えるなど、例えば、高齢もしくは高齢の対象、または免疫無防備状態であり、感染し易いことが知られている糖尿病および癌などの基礎医学的状态を有する対象）である。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、筋肉内注射によって投与される。

【0034】

別の局面では、本開示は、対象において感染因子に対する免疫応答を増加させる方法を特徴とする。方法は、本開示の免疫原性構築物の有効量を対象に投与する工程を含む。いくつかの態様では、対象はヒトである。いくつかの態様では、対象は、免疫無防備状態（例えば、50、55、60、65、70、75もしくは80歳を超えるなど、例えば、高齢もしくは高齢の対象、または免疫無防備状態であり、感染し易いことが知られている基礎医学的状态を有する対象）である。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、筋肉内注射によって投与される。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、吸入によって投与される。

40

【0035】

別の局面では、本開示は、感染因子に対して対象にワクチン接種する方法を特徴とする。方法は、本開示の免疫原性構築物の有効量を対象に投与する工程を含む。いくつかの態

50

様では、対象はヒトである。いくつかの態様では、対象は、免疫無防備状態（例えば、50、55、60、65、70、75もしくは80歳を超えるなど、例えば、高齢もしくは老齢の対象、または免疫無防備状態であり、感染し易いことが知られている基礎医学的状态を有する対象）である。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、筋肉内注射によって投与される。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、吸入によって投与される。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、感染に対する免疫応答を誘導するための、本開示の一態様による免疫原性構築物の使用を示すスキームである（SARS-CoV-2、別名CoVによるウイルス感染が示されている）。筋肉内注射または皮下注射時に、免疫原性構築物（AIRISE-CoV）は、抗原提示細胞（APC、例えば、樹状細胞およびマクロファージ）によって取り込まれる。CpGによる免疫活性化、およびAPC内のsiRNAによる免疫抑制遺伝子の阻害は、送達された提示用抗原（A）をプロセッシングする活性を増強する。活性化抗原負荷APCは、注射部位からリンパ節に移動し（B）、その後、抗原特異的CD8+T細胞を活性化し（C）、続いて、ウイルスに対するエフェクターT細胞およびメモリーT細胞に増殖する。活性化APCはまた、B細胞およびCD4+T細胞を活性化し、後者はCD8+T細胞およびB細胞をさらに活性化することができ、これにより、肺（E）などの体内の至る所でウイルス感染（現在および将来）に対する体液性免疫応答（抗体、D）が生じる。構築物が抗原産生因子（mRNAおよびpDNAなど）を送達する場合、筋細胞も注射された構築物を取り込み、APCによってプロセッシングされる抗原を産生し、続いて、同じプロセスA～Eが行われる。

10

20

【図2】図2は、SIINFEKLペプチド（配列番号：90;SF、Anaspec）およびCpG 1826（Invivogen）を負荷したPEIおよびPEG（ナノ粒子プラットフォーム;NP）で被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子の流体力学的サイズ（直径またはZ平均直径）を示すグラフである。

【図3】図3は、PBS中で測定した、NPの約2重量%および約9重量%のポリI:Cを負荷したNP（MSNP-PEI-PEG）の流体力学的サイズを示す。

【図4A】図4A～図4Dは、（図4A）STAT3に対するsiRNA（siSTAT3）を負荷したNPと、（図4B）siSTAT3およびCpGを負荷したNPとを使用した、複数の種の複数の細胞における48時間でのSTAT3ノックダウンを示す。対応する種のプライマーを用いて、STAT3およびHPRT mRNAについて、D-17（イヌ骨肉腫）、BMDC（マウス由来の骨髄由来樹状細胞）、J774（マウスマクロファージ）、B16F10（マウス黒色腫）およびHCC1954（ヒト乳癌）qRT-PCR分析を行った。全体を通して、単一のsiSTAT3配列を使用した。siSCR=スクランブルsiRNA対照。*** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。siSTAT3の用量は50nMであり、CpGの用量は220nMであった。図4Cは、C3H/HEJマウスから採取した樹状細胞へのNPまたはDharmafectによる非標的スクランブルsiRNA（siSCR）とCpGとの同時送達を示すグラフである。各siRNAの用量は50nM、およびNPの2.0重量%であり、CpGの用量はNPの4重量%であった。製造業者のプロトコルに従って、siRNA-Dharmafect製剤を調製した。処置の48時間後にqRT-PCRを用いてmRNAを分析した。図4Dは、siSTAT3に加えて、NPが、PD-L1に対するsiRNA（siPDL1）を送達し、LLC-JSP細胞内でPD-L1タンパク質発現の効果的なノックダウン（フローサイトメトリーによって測定した場合）をもたらすこともできることを示すグラフである。PD-L1に対する30nMのsiRNA（siPDL1）、または30nMのスクランブルsiRNA（siSCR）を2重量%のsiRNAで含有するNPを用いて細胞を処理した。処理の72時間後、細胞を採取し、フローサイトメトリーによってPD-L1タンパク質発現について評価した。RFU=相対蛍光単位。「NP」は、Ngamcherdtrakul et al., Advanced Functional Materials, 25 (18):2646-2659, 2015および米国特許出願公開第2017/0173169号に記載されているように、架橋PEIおよびPEGで被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子を示す。

30

40

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

50

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

【図5A】図5A～図5Cは、siSTAT3またはCpGを単独で送達するNPよりも大きい免疫原性効果を誘導するsiSTAT3-CpG-NPを示す。両側性B16F10黒色腫瘍を有するマウスの1つの腫瘍に、3日間隔で合計3用量のみを腫瘍内注射した。(図5A)局所処置腫瘍および(図5B)遠位未処置腫瘍の腫瘍成長曲線を平均±SEMとしてプロットする。(図5C)マウスの生存曲線。用量(各注射当たり):CpG 20 μg;siSTAT3 4 μg;NP 0.22 mg。CpG-NP対siSTAT3-CpG-NPについて、* $p < 0.05$ 、**** $p < 0.0001$ 。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

10

【図6A】図6A～図6Cは、siSTAT3-CpG-NPが、siSTAT3またはCpGのみを送達するNPよりも良好に腫瘍および排出リンパ節(DLN)内でCD8⁺T細胞の増殖を増強することを示す。モデル、処置用量およびスケジュールは、図5A～図5Cの通りであった。最初の処置の7日後に、腫瘍ならびに局所(処置)腫瘍および遠位(未処置)腫瘍の両方のDLNから採取した細胞を分析して、リンパ節(図6C)内のエフェクター(CD44⁺)CD8⁺T細胞の増殖状態(Ki-67)とともに、腫瘍(図6A)およびDLN(図6B)の生CD45⁺CD3⁺T細胞集団におけるCD8⁺T細胞とCD4⁺FoxP3⁺制御性T細胞との比を決定した。括弧が別途指定しない限り、siSTAT3-CpG-NP対生理食塩水について、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ ($n = 3$ /群)。

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

20

【図6C】図6Aの説明を参照のこと。

【図7】図7は、SF(配列番号:90)の存在下でのインキュベーション後のIFN γ 活性化CD8⁺T細胞の割合を示すグラフである。未処置マウス、SFおよびCpGを負荷したNP(CpG-SF-NP)を用いて処置したマウス、SFを負荷したNP(SF-NP)を用いて処置したマウス、CpGを負荷したNP(CpG-NP)を用いて処置したマウス、および不完全フロイントアジュバントを用いて製剤化したSF(IFA/SF)を用いて処置したマウスから細胞を得た。* $p < 0.05$ 。使用した用量:CpG 16 μgおよびSF 40 μg。

【図8A】図8Aおよび図8Bは、(図8A)1)PEIおよびPEG(NP)で被覆され、約3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質、2重量%のsiRNA、および4重量%のCpGを負荷したメソポーラスシリカナノ粒子の流体力学的サイズと、(図8B)siRNAの2重量%のスパイクタンパク質コンジュゲートNP(スパイク-NP)によって送達された30または60nMのsiLUC(ルシフェラーゼに対するsiRNA)による処理の際のLM2-4luc+/H2Nにおけるルシフェラーゼのサイレンシングの成功とを示す。siSCR=スクランブルsiRNA対照。

30

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

【図9】図9Aおよび図9Bは、(図9A)H2N(乳房)細胞株に、表5のようにCaP-Lとともに送達されたルシフェラーゼsiRNAによるルシフェラーゼ遺伝子ノックダウンを示す。図9Bは、未処理細胞と比較して処理細胞の変化していない総タンパク質レベルによって示されるように、処理が細胞に対して毒性でなかったことを示す。siRNA用量は50nMであった。タンパク質分析は、処理の2日後であった。

40

【図10】図10は、CpG、siSTAT3-NP、CpG-NP、siSTAT3-CpG-NP(AIRISE-02)またはAIRISE-CoV(スパイクタンパク質、siSTAT3およびCpGを含有する免疫原性構築物)を用いて処置した後の活性化樹状細胞(MHCII+CD80+CD11c+細胞)の集団を示す。足蹠注射によって様々な処置をマウスに投与した。用量は、0.5mgのNP(2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、および/または3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原)であった。処置の2日後、排出リンパ節(DLN)および非排出リンパ節(NDLN)を採取し、フローサイトメトリー分析のために単一細胞に処理した。生理食塩水と対比して* $p < 0.05$ ($n = 3$ /群)。

【図11】図11は、AIRISE-CoVをワクチン接種したBALB/cマウスにおけるSARS-CoV-2スパイク(S)抗原に対する体液性応答を示す。80 μlのAIRISE-CoV(0.5mgのN

50

P、2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原)の足蹠注射によって、8週齢のBALB/cマウスにワクチン接種した(用量1:0日目;用量2:17日目)。血清を16日目(用量1の効果)および38日目(用量2の効果)に採取して、血清の段階希釈後にELISAによってSARS-CoV-2 S IgG抗体のレベルを評価した。データは、n=2(未処置)およびn=3(AIRISE-CoV)に関する平均OD_{450nm}値(平均±SD)を表す。

【図12A】図12Aおよび図12Bは、12週間後の、AIRISE-CoVをワクチン接種したBALB/cマウスにおけるSARS-CoV-2スパイク(S)抗原に対する体液性応答を示す。抗原として2つのSARS-CoV-2スパイクペプチド(0.5mgのNP、2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、3重量%のSARS-CoV-2スパイクペプチド抗原)を利用して、(図12A) 80μlのAIRISE-CoV(0.5mgのNP、2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原)または(図12B) 80μlのAIRISE-CoVの足蹠注射によって、8週齢のBALB/cマウス(M1~M3はマウス1、2および3を表す)にワクチン接種した(用量1:0日目;用量2:17日目)。血清を80日目に採取して、ELISAによってSARS-CoV-2 S IgG抗体のレベルを評価した。データは、各免疫マウスまたはナীবマウスに関する2回の実験反復の平均OD_{450nm}値(平均±SD)を表す。

10

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図13】図13は、2用量のAIRISE-CoVをワクチン接種したBALB/cマウスにおけるSARS-CoV-2スパイク(S)抗原に対する体液性応答を示す。AIRISE-CoV(0.5mgのNP、2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原)の足蹠(f.p.)注射によって、8週齢のBALB/cマウスにワクチン接種した(用量1:0日目;用量2:17日目)。ワクチン接種後の異なる週(3週目~54週目)に血清を採取して、ELISAによってSARS-CoV-2 S IgG抗体のレベルを評価した。データは、免疫マウス5匹およびナীবマウス1匹の平均OD_{450nm}値(平均±SD)を表す。

20

【図14A】図14A~Cは、それぞれ単回用量のAIRISE-CoV、siSTAT3-スパイク-NPまたはCpG-スパイク-NPをワクチン接種したBALB/cマウスにおけるSARS-CoV-2スパイク(S)抗原に対する体液性応答を示す。単回用量の(A) AIRISE-CoV(0.4mgのNP、2重量%のsiSTAT3、4重量%のCpG、3重量%のSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗原;n=4)、(B) siSTAT3-スパイク-NP(0.4mgのNP、2重量%のsiSTAT3、3重量%のスパイクタンパク質抗原;n=3)または(C) CpG-スパイク-NP(0.4mgのNP、4重量%のCpG、3重量%のスパイクタンパク質抗原;n=3)を用いた筋肉内(i.m.)注射によって、8週齢のBALB/cマウスにワクチン接種した。ワクチン接種後の異なる週(6週目~36週目)に血清を採取して、ELISAによってSARS-CoV-2 S IgG抗体のレベルを評価した。データは、免疫マウス3~4匹およびナীবマウス1匹の平均OD_{450nm}値(平均±SD)を表す。

30

【図14B】図14Aの説明を参照のこと。

【図14C】図14Aの説明を参照のこと。

【図15】図15は、免疫血清(図11由来)によるHEK293-hACE2細胞のSARS-CoV-2擬似ウイルス感染の阻害を示す。ナীবマウスと対比して、AIRISE-CoVを用いて免疫したマウス由来の血清の様々な希釈下の%GFP+細胞を示すグラフ。計算された中和価(50%のウイルスを中和するために必要な希釈;NT₅₀)の値を表6に示す。

40

【図16】図16Aおよび図16Bは、siSTAT3-NPまたはsiSTAT3-CpG-NPを用いて処理した後のBMDC(図16A)およびJ774(図16B)の細胞生存率を示すグラフである。NP用量は、処理の2日後に35μg/ml(2重量%のsiRNA;7重量%のCpG)である。

【0037】

配列表への参照

本明細書において記載される核酸配列および/またはアミノ酸配列は、37 C.F.R. § 1.822において定義されているように、標準的な略語を使用して示されている。各核酸配列の1つの鎖のみが示されているが、相補鎖は、適切であれば、態様に含まれると理解される。2021年7月12日またはその付近に作成され、ファイルサイズ16KBの「2IS969

50

6.txt (Sequence Listing.txt)」と題されたコンピュータ可読テキストファイルは、本出願の配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0038】

配列番号：1～8は、スパイクタンパク質（配列番号：1～5）、ヌクレオカプシドタンパク質（配列番号：6）、膜タンパク質（配列番号：7）およびエンベロープタンパク質（配列番号：8）由来の代表的なSARS-CoV-2 T細胞および/またはB細胞エピトープのアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号：8～89および91は、表2（下記）に記載されるような例示的なsiRNAに対応する核酸配列である。配列表の各配列には含まれていないが、各siRNAは、3'末端にデオキシチミジンヌクレオチド（dTdT）オーバーハングまたは他のデオキシヌクレオチド（例えばdTdG）オーバーハングを任意で含み得る。

【0040】

配列番号：90は、T細胞を刺激するために使用されるオボアルブミンペプチドである。

【発明を実施するための形態】

【0041】

詳細な説明

感染因子、例えばウイルス、例えばβ-コロナウイルス感染、例えば、SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染、MERS-CoV感染、または他のウイルスおよび病原体に対する治療または予防などのための免疫応答を誘導するための免疫原性構築物が本明細書において記載される。感染性疾患のためのこれらの新規な免疫原性構築物は、免疫抑制遺伝子を調節して免疫を刺激するために、抗原、アジュバント、およびいくつかの態様ではsiRNAを送達するための単一送達担体を利用する。

【0042】

免疫原性構築物は、ナノ粒子（例えばメソポーラスシリカナノ粒子（MSNP））、カチオン性ポリマー（例えばPEI）、安定剤（例えばPEG）および抗原、ならびにいくつかの態様では、少なくとも1つのアジュバント（例えばCpG）および/またはオリゴヌクレオチド（例えばsiRNA）を含有する。様々な追加の作用物質の組合せも企図される。本開示の免疫原性構築物はまた、複数の種類のカチオン性ポリマー、安定剤、抗原、アジュバントおよび/またはオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、免疫原性構築物は、同じまたは異なる標的感染因子に作用する複数の異なるオリゴヌクレオチドおよび/または抗原を含み得る。そのような追加の作用物質の使用は、相加効果または相乗効果を提供し得る。

【0043】

本開示の免疫原性構築物は、アジュバント（例えばCpGオリゴヌクレオチド）、ウイルス抗原（例えば、タンパク質またはペプチド）または抗原産生因子（例えば、mRNAまたはpDNA）、および任意でsiRNAを同時送達して、新規感染性疾患に対する強力な長期持続性免疫を誘導するために使用され得る（図1）。免疫原性構築物は、抗原を利用して、感染因子タンパク質を認識するエフェクターTリンパ球およびメモリーTリンパ球ならびに体液性免疫応答を活性化するように、身体の抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、B細胞およびマクロファージ）をプライミングする。そのような免疫原性構築物は、将来の感染を予防し得るか、または疾患重症度を低下させ得る。

【0044】

ここで、以下の追加の詳細および選択肢を用いて本開示の局面を説明する：(I) 定義；(II) ナノ粒子；(III) カチオン性ポリマー；(IV) 安定剤；(V) アジュバント；(VI) 抗原および抗原産生因子；(VII) オリゴヌクレオチド；(VIII) 標的化剤；(IX) 標識剤；(X) 免疫原性構築物の合成；(XI) 脂質被覆ナノ粒子を含む免疫原性構築物；(XII) 免疫原性構築物製剤および使用方法；(XIII) 例示的な態様；(XIV) 実験例（実施例1～8を含む）；ならびに(XV) 最終パラグラフ。これらの見出しは、本開示の解釈を限定するものではなく、組織的目的のためにのみ提供される。

10

20

30

40

50

【0045】

1. 定義

本開示の理解を容易にするために、いくつかの用語を以下に定義する。本明細書において定義される用語は、本開示に関連する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。本明細書における用語は、本開示の特定の態様を説明するために使用されるが、それらの使用は、特許請求の範囲に概説されている場合を除いて、本開示を限定するものではない。

【0046】

用語「CpGモチーフ」は、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合を介して3'Gヌクレオチドに連結された5'Cヌクレオチドを指す。いくつかの態様では、CpGモチーフは、ホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む。いくつかの態様では、CpGモチーフは、ホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合を含む。

10

【0047】

本明細書において使用される場合、用語「クラスA CpG ODN」（「AクラスCpG ODN」、「D型CpG ODN」または「クラスA CpG DNA配列」とも呼ばれる）は、生物学的科学および化学的 science におけるその一般的な意味に従って使用され、5'、3'もしくは両末端にあるポリG配列;CpGモチーフを含む内部回文配列;またはデオキシヌクレオチドを結合する1つもしくは複数のホスホジエステル誘導体のうちの1つまたは複数を含むオリゴデオキシヌクレオチドを含むCpGモチーフを指す。いくつかの態様では、クラスA CpG ODNは、5'、3'または両末端にあるポリG配列と、CpGモチーフを含む内部回文配列と、デオキシヌクレオチドを結合する1つまたは複数のホスホジエステル誘導体とを含む。いくつかの態様では、ホスホジエステル誘導体はホスホロチオエートである。クラスA CpG ODNの例には、ODN D19、ODN 1585、ODN 2216およびODN 2336が挙げられる。

20

【0048】

用語「クラスB CpG ODN」または「BクラスCpG ODN」または「K型CpG ODN」または「クラスB CpG DNA配列」は、生物学的科学および化学的 science におけるそれらの一般的な意味に従って使用され、CpGモチーフを含む6量体モチーフ;あらゆるデオキシヌクレオチドを結合するホスホジエステル誘導体のうちの1つまたは複数を含むオリゴデオキシヌクレオチドを含むCpGモチーフを指す。いくつかの態様では、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6量体モチーフ、およびあらゆるデオキシヌクレオチドを結合するホスホジエステル誘導体の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様では、ホスホジエステル誘導体はホスホロチオエートである。いくつかの態様では、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む1つの6量体モチーフを含む。いくつかの態様では、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6量体モチーフの2つのコピーを含む。いくつかの態様では、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6量体モチーフの3つのコピーを含む。いくつかの態様では、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6量体モチーフの4つのコピーを含む。クラスB CpG ODNの例には、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006およびODN 2007が挙げられる。

30

40

【0049】

用語「クラスC CpG ODN」または「CクラスCpG ODN」または「C型CpG DNA配列」は、生物学的科学および化学的 science におけるそれらの一般的な意味に従って使用され、CpGモチーフを含む回文配列と、あらゆるデオキシヌクレオチドを結合するホスホジエステル誘導体（ホスホロチオエート）とを含むオリゴデオキシヌクレオチドを指す。クラスC CpG ODNの例には、ODN 2395およびODN M362が挙げられる。

【0050】

本明細書において使用される場合、「免疫原性」は、例えば、インビトロアッセイ（例えば、混合リンパ球反応;細胞傷害性T細胞の死滅、抗原を用いて免疫細胞を刺激した際のサイトカインのアップレギュレーションなど）、エキスピボアッセイ（例えば、マイク

50

口中和試験アッセイによる抗体中和価;ELISAアッセイによる抗原特異的抗体および抗体分泌B細胞)、ならびに細胞性免疫および体液性免疫の誘導の成功を確認するインビオアッセイ(例えば、生きた標本をウイルス負荷から保護する免疫化の能力)によって測定した場合に、免疫応答を引き起こす作用物質(例えば、免疫原性構築物、その成分、または免疫原性構築物を含有する組成物)の能力を指す。

【0051】

本明細書において使用される場合、用語「免疫原性量」は、対象において免疫応答を誘導する免疫原性構築物または組成物の量を指す(例えば、ELISAなどの従来の技術によって決定した場合に、対象における抗体価の増加によって反映される)。

【0052】

本明細書において使用される用語「感染因子」は、感染および/または疾患を引き起こす因子を指す。感染因子には、ウイルス、細菌、真菌および寄生生物、またはそれらの組合せが含まれる。いくつかの態様では、感染因子はウイルスである。追加の感染因子は、本明細書において説明され、および/または当業者に公知である。例では、感染因子は、本明細書において記載される免疫原性構築物の「標的」と呼ばれ得る。例えば、ウイルス標的は、コロナウイルス、コリネバクテリウム(*corynebacterium*)、エボラウイルス(*ebolavirus*)、オルソミクソウイルス(*orthomyxovirus*)、ヘパトウイルス(*hepatovirus*)、ヘモフィルス(*haemophilus*)細菌、HIV、HPV、モルビリウイルス(*morbillivirus*)、マイコバクテリウム(*mycobacterium*)、髄膜炎菌(*meningococcus*)細菌、オルソルブラウイルス(*orthorubulavirus*)、ノロウイルス(*norovirus*)、ストレプトコッカス(*streptococcus*)、エンテロウイルス(*enterovirus*)、オルソニューモウイルス(*orthopneumovirus*)、ロタウイルス(*rotavirus*)、ルビウイルス(*rubivirus*)、ヘルペスウイルス(*herpesvirus*)、クロストリジウム(*clostridium*)細菌、ボルダテラ(*bordatella*)細菌またはフラビウイルス(*flavivirus*)であり得る。病原体は、感染因子とも呼ばれる。

【0053】

本明細書において使用される用語「感染性疾患」は、細菌、ウイルス、寄生生物または真菌などの感染因子によって引き起こされる疾患を指す。いくつかの態様では、感染性疾患はウイルス感染である。感染性疾患の例には、コロナウイルスに基づく感染(中東呼吸器症候群(MERS)、重症急性呼吸器症候群(SARS)およびコロナウイルス疾患(例えばCOVID-19)など);コリネバクテリウムに基づく感染(ジフテリアなど);エボラウイルスに基づく感染(エボラなど);オルソミクソウイルス科(*orthomyxoviridae*)ウイルスに基づく感染(インフルエンザA、BまたはCなど);ヘパトウイルスA、B、C、DまたはEに基づく感染(肝炎など);ヘモフィルスに基づく感染(hib疾患など);ヒト免疫不全ウイルス(*human immunodeficiency virus*)(HIV)に基づく感染(後天性免疫不全症候群(AIDS)など);ヒトパピローマウイルス(*human papillomavirus*)(HPV)に基づく感染;モルビリウイルスに基づく感染(麻疹など);マイコバクテリウムに基づく感染(結核など);ナイセリア(*Neisseria*)に基づく感染(髄膜炎など);オルソルブラウイルスに基づく感染(流行性耳下腺炎など);ノロウイルスに基づく感染;ストレプトコッカスに基づく感染;エンテロウイルスに基づく感染(ポリオなど);オルソニューモウイルスに基づく感染;ロタウイルスに基づく感染;ルビウイルスに基づく感染(風疹など);ヘルペスウイルスに基づく感染(ヘルペス、水痘および帯状疱疹など);クロストリジウムに基づく感染(破傷風およびボツリヌス症など);ボルダテラに基づく感染(百日咳など);フラビウイルスに基づく感染(ジカなど)などが挙げられる。追加の感染性疾患は、本明細書において説明され、および/または当業者に公知である(例えば、Patel et al., Front Immunol. 9:2224, 2018 (16頁)、およびそこに引用される参考文献)。

【0054】

本明細書において使用される用語「生物学的に許容される賦形剤」および「薬学的に許容される賦形剤」は、対象において非毒性および非炎症性であるという特性を有する任意

10

20

30

40

50

の不活性成分（例えば、免疫原性構築物を懸濁することができるビヒクル）を指す。典型的な賦形剤には、例えば、担体、結合剤、充填剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁化剤、甘味料、香料、保存剤、緩衝液、湿潤剤、崩壊剤、発泡剤および他の従来の賦形剤および添加剤、ならびに/または安定性、送達、吸収、半減期、有効性、薬物動態および/もしくは薬力学を向上させ、有害な副作用を低減し、もしくは生物学的使用および/もしくは薬学的使用および/もしくは栄養補助食品の使用に他の利点を提供し得る他の添加剤が含まれる。いくつかの態様では、許容される賦形剤は、免疫原性構築物に結合していないアジュバントを含む。

【0055】

本明細書において使用される場合、「pDNA」は、プラスミドDNA、例えば、感染因子の少なくとも1つの抗原をコードするプラスミドを指す。

10

【0056】

本明細書において使用される場合、用語「予防する（preventing）」は、感染性疾患、例えばウイルス感染（ β -コロナウイルス、例えば、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoV、または関連ウイルスによる感染など）、細菌感染、真菌感染または寄生虫感染に罹患するリスクを低下させること（例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%または約100%だけ）を意味する。予防が有効であるかどうかを決定するために、本開示の組成物を投与された対象と、組成物を投与されなかった同様の状況の対象（例えば、SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染もしくはMERS-CoV感染、または関連ウイルスによる感染などのウイルス感染のリスクがある対象）との間で比較を行うことができる。組成物を投与された対象と、対照、ベースライン、または公知の測定レベルとの間で比較を行うこともできる。

20

【0057】

本明細書において使用される用語「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類または非霊長類哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、サル、ラット、マウスおよび/またはヒツジであり得る。いくつかの態様では、対象はヒトである。

【0058】

本明細書において使用される場合、用語「TLR結合DNA置換基」は、少なくとも1つのデオキシリボ核酸を含む、Toll様受容体（「TLR」）に結合することができる置換基または部分を指す。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は核酸である。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、少なくとも1つの核酸類似体を含む。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、代替骨格（例えば、ホスホジエステル誘導体（例えば、ホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ボロンホスホネートまたはO-メチルホスホロアミダイト）、ペプチド核酸骨格、LNAまたは結合）を有する少なくとも1つの核酸類似体を含む。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基はDNAを含む。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基中のヌクレオチドはいずれも、デオキシリボヌクレオチドである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、ホスホジエステルおよびホスホジエステル誘導体（例えば、ホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ボロンホスホネート、O-メチルホスホロアミダイトまたはそれらの組合せ）から選択されるヌクレオチド間結合を有するDNAを含むか、またはそのようなDNAである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートから選択されるヌクレオチド間結合を有するDNAを含む。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートから選択される骨格結合を有するDNAを含むか、またはそのようなDNAである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、ホスホジエステル骨格結合を含むDNAを含むか、またはそのようなDNAである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置

30

40

50

換基は、ホスホロチオエート骨格結合を含むDNAを含むか、またはそのようなDNAである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、ホスホロジチオエート骨格結合を含むDNAを含むか、またはそのようなDNAである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、他のTLRよりもTLR9に優先的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、TLR9に特異的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、TLR3に特異的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、TLR7に特異的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、TLR8に特異的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、細胞サブコンパートメント（例えば、エンドソーム）関連TLR（例えば、TLR3、TLR7、TLR8またはTLR9）に特異的に結合する。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、グリッチオリゴヌクレオチドを含むか、またはグリッチオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、CpGモチーフを含む（すなわち、CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である）。いくつかの態様では、CpGモチーフは非メチル化されている。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、クラスA CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、クラスB CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基は、クラスC CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。いくつかの態様では、TLR結合DNA置換基（例えば、TLR9結合DNA置換基）は、A塩基、G塩基、C塩基またはT塩基と、ホスホジエステル結合および/またはホスホジエステル誘導体結合（例えば、ホスホロチオエート結合）とを有するデオキシリボ核酸を含む。

10

20

【0059】

本明細書において使用される場合、用語「治療（treatment）」または「治療する（treating）」は、感染性疾患、例えばウイルス感染、例えばβ-コロナウイルス（例えば、SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染もしくはMERS-CoV感染、または関連ウイルス）感染を低減する、減少させる、その進行を減少させる、またはその副作用を減少させること（例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%または約100%だけ）を指す。治療が有効であるかどうかを決定するために、治療された対象と、治療を受けなかった同様の状況の対象（例えば、SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染もしくはMERS-CoV感染、もしくは関連するウイルス感染による感染などのウイルス感染を有するか、またはそのリスクがある対象）との間で比較を行うことができる。治療された対象と、対照、ベースライン、または公知のレベルもしくは測定値との間で比較を行うこともできる。ウイルス感染（例えば、β-コロナウイルス感染、例えば、SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染もしくはMERS-CoV感染、または関連ウイルスによる感染）を治療することは、ウイルス量を減少させること（例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%または約100%だけ）、対象の入院日数を減らすこと（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50日またはそれ以上だけ）、対象が抗ウイルス療法を必要とする日数を減らすこと（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50日またはそれ以上だけ）、および/または対象が必要とする抗ウイルス療法の用量を減らすことのうちの1つまたは複数を含む。

30

40

【0060】

本明細書において使用される場合、用語「ワクチン」は、対象において感染因子に対する免疫応答を誘導し、ならびに/または感染因子に関連する感染および/もしくは疾患を治療および/もしくは予防することができる作用物質（例えば、免疫原性構築物、その成分、または免疫原性構築物を含有する組成物）を指す。

【0061】

II. ナノ粒子

本開示の組成物および方法とともに用いて有用なナノ粒子には、限定されることなく、メソポーラスシリカナノ粒子（例えばMSNP）、酸化鉄ナノ粒子、銀ナノ粒子、金ナノ粒

50

子、リン酸カルシウム、無機ナノ粒子、カーボンナノチューブ、リポソーム、脂質ナノ粒子、またはカチオン性ポリマー粒子が含まれる。ナノ粒子は、多孔質であってもなくてもよい。ナノ粒子コアの例示的なサイズは、約5nm～約999nm、約5nm～約90nm、約5nm～約20nm、約20nm～約400nm、約20nm～約500nm、約20nm～約100nm、約20nm～200nm、約30nm～約100nm、約30nm～約80nm、約30nm～約60nm、約40nm～約80nm、約50nm～400nm、約50～500nm、約70nm～約90nm、約100nm～約200nm、約200nm～約500nm、約500nm～約999nm、または約5nm、約10nm、約20nm、約30nm、約40nm、約50nm、約60nm、約70nm、約80nm、約90nmもしくは約100nmである。一般に、ナノ粒子コアは球形であるが、ロッドおよびディスクなどの他の形状も使用され得る。いくつかの態様では、ナノ粒子は、メソポーラスシリカナノ粒子(MSNP)である。

10

【0062】

いくつかの態様では、ナノ粒子は、アジュバント特性または免疫刺激特性を有する。アジュバント特性または免疫刺激特性を有する例示的なナノ粒子には、リポソーム、リポプレックス、脂質系粒子、ポリプレックス、ポリマー粒子、無機粒子(例えば、アルミニウム塩粒子およびリン酸カルシウムナノ粒子)、ウイルス様粒子、または1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、コレステロール、3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール、ホスファチジルコリン/コレステロール、キトサン、ポリ- γ -グルタミン酸(γ -PGA)、ヒアルロン酸、ポリエチレンジイミン(PEI)、ポリ(プロピルアクリル酸)、ポリプロピレンスルフィド(PPS)、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)、アミロペクチン、マルトデキストリン、ポリスチレン、金、酸化コバルト、ミョウバン、トリ-パルミトイル-S-グリセリルシステイン(PAM3Cys)、スクアレン、Montanide ISA 50V、Montanide ISA 51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206およびMontanide ISA 720のうちの1つもしくは複数から形成されたナノ粒子が含まれる。

20

【0063】

ナノ粒子プラットフォーム(NP)を作製するために、追加の成分が、様々な機構によってナノ粒子に共有結合的または非共有結合的に付着される。例えば、カチオン性ポリマーは、例えば、シリカナノ粒子または酸化鉄ナノ粒子の場合、電荷によってナノ粒子に付着され得る。あるいは、ナノ粒子の表面は、カチオン性ポリマーおよび/もしくは他の成分へのコンジュゲーションのための反応性部分を含むように変更され得るか、またはカチオン性ポリマーもしくは他の成分は、ナノ粒子に結合する部分を含み得る。例えば、ナノ粒子コア、例えば、シリカナノ粒子、シリコンナノ粒子、金ナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子および銀ナノ粒子、ならびにカーボンナノチューブは、カチオン性ポリマーおよび他の成分との付着の前に、チオール、ホスホネート、カルボキシレートおよびアミンなどの反応性部分によって修飾され得る。カチオン性ポリマーおよび他の成分は、ナノ粒子コアに結合する前に、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)エステル、またはアジドを含むこれらまたは他の部分を含むように修飾され得る。成分は、表面上または細孔内(存在する場合)のいずれかでナノ粒子に直接付着され得る。タンパク質、mRNAまたはプラスミドDNA(pDNA)などの大分子カーゴは、ナノ粒子の外面(または任意で、ナノ粒子コアに適用された、すなわち、NPに負荷されたコーティング上)に付着されるが、色素などのさらに小さな分子は、ナノ粒子またはNPの細孔の内側、ならびに外面に付着され得る。本開示の免疫原性構築物は、有利には、追加の成分が負荷された後にそれらのサブミクロンサイズを維持する。

30

40

【0064】

III. カチオン性ポリマー

いくつかの態様では、MSNなどのナノ粒子は、カチオン性ポリマーまたは他の化合物で被覆される。カチオン性ポリマーは、任意の適切な手段を使用してナノ粒子の表面に結合し得る。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、静電相互作用を介してナノ粒子に結合する。カチオン性ポリマーは、正電荷を有する任意のポリマー、例えば、限定され

50

ることなく、PEI、ポリアミドアミン、ポリ（アリルアミン）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）、キトサン、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリル酸）、ポリ（L-リジン）、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリ（N-エチル-ビニルピリジニウムブロミド）、ポリ（ジメチルアミノ）エチルメタクリレート）またはポリ（エチレングリコール）-コ-ポリ（トリメチルアミン-エチルメタクリレートクロリド）であり得る。他のカチオン性ポリマーは、当業者には明らかであり、例えば、Polymer Handbook, 4th Edition, Edited by: Brandrup, E.H. Immergut, and E.A. Grukle; John Wiley & Sons, 2003）に見出され得る。

【0065】

カチオン性ポリマーは、直鎖状または分枝状であり得る。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、約500Da～約25kDaのサイズの範囲であり得、分枝状または直鎖状であり得る。例えば、1.8kDa～10kDaの平均サイズを有する分枝状PEIをナノ粒子上に負荷してもよい（ナノ粒子プラットフォーム; NPを得る）。カチオン性ポリマーとナノ粒子との比は、所望の結果に応じて変化し得る。カチオン性ポリマーは、NPの1～50重量%、例えば、5～40重量%、10～30重量%、20～30重量%、5～15重量%、5～20重量%、5～25重量%、5～30重量%、10～20重量%、10～25重量%または25～40重量%、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約30または約35重量%で存在し得る。いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、NPの10～20重量%で存在する。

【0066】

いくつかの態様では、カチオン性ポリマーは、ナノ粒子上への被覆前または被覆後に、例えば、切断可能なジスルフィド結合によって架橋される。いくつかの態様では、付着したカチオン性ポリマーは、例えば、DSP（ジチオビス〔スクシンイミジルプロピオネート〕）、DTSSP（3,3'-ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）およびDTBP（ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート）を使用して、ナノ粒子、例えばMSNPに結合した後に架橋される。架橋は、溶液中の遊離カチオン性ポリマーの非存在下または存在下で起こり得る。他の態様では、カチオン性ポリマーは架橋されていない。

【0067】

IV. 安定剤

安定剤は、例えば、任意の適切な手段によって、ナノ粒子および/またはカチオン性ポリマーにコンジュゲートされ得る。いくつかの態様では、安定剤は、ナノ粒子（例えば、MSNP）上に被覆された架橋カチオン性ポリマーのアミン基または他の反応性基にコンジュゲートされる。例示的な安定剤には、PEG、デキストラン、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよびポリアクリルアミドまたはそれらの組合せが含まれる。

【0068】

安定剤は、例えば、ナノ粒子、カチオン性ポリマーおよび/または他の成分に付着するための複数の化学反応性基を有し得る。例えば、反応性安定剤、例えばPEG誘導体は、2つの官能性部分、例えば、各末端にマレイミドおよび活性化エステルの両方を含むマレイミド-PEG-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（Mal-PEG-NHS）を有し得る。本開示の組成物および方法と併せて使用される安定剤、例えばPEGは、一般に、500Da～40kDa、例えば2～10kDaの範囲の分子量を有する。安定剤は、NPの1～50重量%、例えば、5～30重量%、10～20重量%、10～25重量%、5～15重量%、5～20重量%、5～25重量%または1～10重量%、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約35、約40または約45重量%で存在し得る。

【0069】

いくつかの態様では、安定剤（例えばPEG）は、NP安定性を増強する（例えば、凝集および沈殿を減少させる）ために、ならびに/または例えば酵素分解からsiRNA、miRNA、mRNAおよびpDNAなどのカーゴ分子を保護するために導入される。

【0070】

10

20

30

40

50

本開示の組成物および方法と併せて使用される安定剤（例えばPEG）は、一般に、500Da～40kDa、例えば、5kDa、2～5kDa、2～10kDa、5～10kDaの範囲の分子量を有する。様々な態様では、安定剤は、ナノ粒子プラットフォーム（NP）の1～50重量%、例えば、5～30重量%、10～20重量%、10～25重量%、5～15重量%、5～20重量%、5～25重量%または1～10重量%、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約35、約40または約45重量%で存在する。安定剤のサイズおよび密度は、タンパク質およびmRNAなどの大きなカーゴを収容するように最適化され得る。

【0071】

いくつかの態様では、安定剤は、カーゴ負荷前に導入される。いくつかの態様では、安定剤は、カーゴ負荷後に導入される。いくつかの態様では、安定剤は、カーゴ負荷前および後の両方に、ならびに/または少なくとも1つのカーゴ分子の負荷と同時に導入される。

【0072】

一部のナノ粒子（PEIおよびPEGによって被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子および酸化鉄ナノ粒子など）は、非常に低温（例えば-80℃）で材料を保存する必要がないように、長期保存および輸送中に抗原および抗原産生因子を保護することができる。

【0073】

V. アジュバント

本明細書において提供される構築物は、少なくとも1つのアジュバントを含み得る。アジュバントは、ナノ粒子内に含有されてもよい、またはナノ粒子上の部分との水素結合、ファンデルワールス相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用および化学的コンジュゲーションを含む非共有結合相互作用もしくは共有結合相互作用を介してナノ粒子、カチオン性ポリマーもしくは安定剤と会合してもよい。化学的コンジュゲーションには、チオール-マレイミド、NHSエステル-アミン、アジド-アルキンおよび他のクリックケミストリーが含まれる。いくつかの態様では、アジュバントは、チオール化され、チオール-マレイミド反応を介してマレイミド基を含む安定剤にコンジュゲートされる（参照によりその全体が本明細書に組み入れられる国際出願番号PCT/US2016/022655を参照）。いくつかの態様では、アジュバントは、ナノ粒子上に被覆されたカチオン性ポリマー上に静電的に負荷される。アジュバントは、NPの1～20重量%、例えば、1～10重量%、2～7重量%、2～4重量%、2～10重量%、5～10重量%、10～20重量%、例えば、約4重量%、約5重量%、約6重量%、約7重量%、約10重量%または約20重量%で存在し得る。

【0074】

アジュバントはまた、治療剤の一部であってよい、または治療剤とコンジュゲートされてもよく、例えば、標的遺伝子をノックダウンするsiRNAなどのオリゴヌクレオチドは、免疫刺激配列を含むように設計され得る。

【0075】

一般に、アジュバントは、ワクチン組成物に混合すると抗原に対する免疫応答を増加させるか、そうでなければ改変する任意の物質である。抗原に対する免疫応答を増加させるアジュバントの能力は、典型的には、免疫媒介反応の顕著な増加、または疾患症状の低減によって明らかにされる。例えば、体液性免疫の増加は、典型的には、抗原に対して惹起された抗体の力価の顕著な増加によって現れ、T細胞活性の増加は、典型的には、抗原特異的T細胞増殖の増加、標的細胞の死、またはサイトカイン分泌に現れる。アジュバントはまた、例えば、主に体液性応答またはTh2応答を主に細胞性応答またはTh1応答に変化させることによって、免疫応答を変化させ得る。

【0076】

好適なアジュバントには、TLR結合DNA置換基、例えばCpGオリゴヌクレオチド（例えば、ISS1018;Amplivax;CpG ODN 7909、CpG ODN 1826、CpG ODN D19、CpG ODN 1585、CpG ODN 2216、CpG ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、ODN M362およびSD-101）、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト（例えば、dSLIM）、非CpG DNA TLRアゴニスト（例え

ば、EnanDIM)、およびカチオン性ペプチドコンジュゲートCpGオリゴヌクレオチド(例えば、IC30、IC31);RNA TLRアゴニスト(例えば、ポリI:Cおよびポリ-ICLC);アルミニウム塩(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、塩化アルミニウムおよび硫酸アルミニウムカリウム);抗CD40抗体(例えば、CP-870、893);サイトカイン、例えば顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF);小分子TLRアゴニスト(例えば、イミキモド、レシキモド、ガーディキモドおよび3M-052);融合タンパク質(例えば、ImuFact IMP321、CyaAおよびONTAK);油系アジュバントまたは界面活性剤系アジュバント、例えば、MF59、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50VおよびMontanide ISA-51;植物抽出物、例えば、サポニンに由来するQS21ステイミュロン(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA);マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣物、例えばリポ多糖(例えば、モノホスホリルリピドA、OM-174、OM-197-MP-ECおよびPam3Cys);キサンテノン誘導体(例えば、バジメザン);それらの混合物(例えば、AS-15);ならびに他の独自のアジュバント、例えば、Ribi's Detox、QuilまたはSuperfosが含まれる。いくつかの免疫学的アジュバント(例えば、樹状細胞に特異的なMF59)およびそれらの調製物が、以前に記載されている(Dupuis et al., Cell Immunol. 186 (1):18-27, 1998; Allison, Dev Biol Stand.; 92:3-11, 1998)。サイトカインも使用され得る。いくつかのサイトカインは、リンパ系組織への樹状細胞遊走に影響を及ぼし(例えば、TNF- α)、Tリンパ球のための効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を促進し(例えば、GM-CSF、IL-1およびIL-4)(米国特許第5,849,589号)、免疫アジュバントとして機能する(例えば、IL-12)(Gabrilovich et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. (6):414-418, 1996)ことに直接関連している。また、Toll様受容体(TLR)、またはTLRを活性化する薬剤は、アジュバントとして使用されてもよく、「病原体関連分子パターン」(PAMP)と呼ばれる、多くの微生物に共有される保存されたモチーフを認識するパターン認識受容体(PRR)のファミリーの重要なメンバーである。

10

20

30

40

50

【0077】

いくつかの態様では、アジュバントは、CpGオリゴヌクレオチドを含む。CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドはまた、ワクチン設定では、アジュバントの効果を増強することが報告されている。いかなる具体的に構造的な理論にも束縛されるものではないが、CpGオリゴヌクレオチドは、Toll様受容体(TLR)、主にTLR9を介して自然(非適応)免疫系を活性化することによって少なくとも部分的に機能する。CpGによって引き起こされたTLR9活性化は、予防ワクチンおよび治療ワクチンの両方で、ペプチド抗原またはタンパク質抗原、生ウイルスまたは死ウイルス、樹状細胞ワクチン、自己細胞ワクチンおよび多糖コンジュゲートを含む多種多様な抗原に対する抗原特異的な体液性応答および細胞性応答を増強する。さらに重要なことには、CpGによって引き起こされたTLR9活性化は、CD4ヘルパーT細胞がない場合でも、樹状細胞の成熟および分化を促進し、T_H1細胞の活性化を増強し、強力な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を生成する。TLR9刺激によって誘導されるT_H1バイアスは、通常T_H2バイアスを促進するミョウバンまたは不完全フロイントアジュバント(IFA)などのワクチンアジュバントの存在下であっても維持される。CpGオリゴヌクレオチドは、製剤化された場合、もしくは他のアジュバントと同時投与された場合、または抗原が比較的弱い場合に強い応答を誘導するために特に必要なマイクロ粒子、ナノ粒子、脂質エマルジョンもしくは同様の製剤などの製剤中で、さらに大きなアジュバント活性を示す。それらはまた、免疫応答を加速し、いくつかの実験では、CpGを含まない完全用量ワクチンに匹敵する抗体応答を得ながら、抗原用量を2桁減少させることを可能にした(Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5:471-484, 2006)。米国特許第6,406,705号は、抗原特異的免疫応答を誘導するためのCpGオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバントおよび抗原の併用を記載している。市販のCpG TLR9アタゴニストは、Mologen (Berlin, GERMANY)製のdSLIM(double Stem Loop Immunomodulator)である。他のTLR結合分子、例えば、RNA結合TLR 7、RNA結合TLR 8および/またはRNA結合TLR9を使用してもよい。

【0078】

例えば、バジメザンまたはAsA404（5,6-ジメチルキサンテノン-4-酢酸（DMXAA）としても知られる）などのキサンテノン誘導体もまた、本開示の態様によるアジュバントとして使用され得る。あるいは、そのような誘導体はまた、腫瘍部位で免疫を刺激するために、例えば、全身送達または腫瘍内送達を介して、本開示のワクチンと並行して投与され得る。理論に拘束されるものではないが、そのようなキサンテノン誘導体は、IFN遺伝子（ISTING）受容体の刺激因子を介してインターフェロン（IFN）産生を刺激することによって機能すると考えられる（例えば、Conlon et al., J Immunology, 190:5216-5225, 2013; および Kim et al., ACS Chem Biol, 8:1396-1401, 2013を参照）。有用なアジュバントの他の例には、化学修飾CpG（例えば、CpR、Idera）、ポリI:C（例えば、ポリI:C12U）、非CpG細菌DNAまたは非CpG細菌RNA、ならびに免疫活性小分子および抗体、例えば、治療的におよび/またはアジュバントとして機能し得るシクロホスファミド、スニチニブ、ペバシズマブ、Celebrex（商標）、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフィニブ（sorafenib）、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、ZD2171、AZD2171、イピリムマブ、トレメリムマブおよびSC58175が含まれるが、それらに限定されない。本開示の文脈では、有用なアジュバントおよび添加剤の量および濃度は、過度の実験を用いることなく当業者によって容易に決定され得る。追加のアジュバントには、コロニー刺激因子、例えば顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスチム）が含まれる。

10

【0079】

いくつかの態様では、アジュバントは、ポリ-ICLCを含む。ポリ-ICLCは、平均長5000ヌクレオチドのポリI鎖およびポリC鎖を含む合成的に調製された二本鎖RNAであり、ポリリジンおよびカルボキシメチルセルロースを加えることによって熱変性と、血清ヌクレアーゼによる加水分解とに対して安定化されている。この化合物は、いずれもPAMPファミリーのメンバーであるTLR3とMDA5のRNAヘリカーゼドメインとを活性化し、DCおよびナチュラルキラー（NK）細胞の活性化、ならびにI型インターフェロン、サイトカインおよびケモカインの「天然混合物」の産生をもたらす。さらに、ポリ-ICLCは、2つのIFN誘導性核酵素系、すなわち、2'5'-OAS、およびPKR（4-6）としても知られるPI/eIF2aキナーゼ、ならびにRIG-IヘリカーゼおよびMDA5によって媒介されるさらに直接的な、広範囲な宿主を標的とする抗感染性効果と、おそらくは抗腫瘍効果とを発揮する。

20

30

【0080】

免疫原性構築物と結合させることができる免疫学的アジュバントの例には、TLRリガンド、C型レクチン受容体リガンド、NOD様受容体リガンド、RLRリガンドおよびRAGEリガンドが挙げられる。TLRリガンドには、リポ多糖（LPS）およびその誘導体、ならびにモノホスホリルリピドA（MPL）、グリコピラノシルリピドA、PET-リピドAおよび3-O-デサシル-4'-モノホスホリルリピドAを含む、リピドAおよびその誘導体が含まれ得る。具体的な態様では、免疫学的アジュバントはMPLである。別の態様では、免疫学的アジュバントはLPSである。TLRリガンドにはまた、TLR3リガンド（例えば、ポリイノシン-ポリシチジン酸（ポリI:C）、TLR7リガンド（例えば、イミキモドおよびレシキモド）およびTLR9リガンドが含まれ得る。

40

【0081】

VI. 抗原および抗原産生因子

本明細書において提供される免疫原性構築物は、少なくとも1つの抗原または抗原産生因子を含む。典型的な構築物は、少なくとも1つの抗原および少なくとも1つの抗原産生因子の両方を含む。免疫原性構築物が複数の抗原および/または抗原産生因子を含有する態様では、これらの抗原は、異なる感染因子に対応し得る/由来し得るか、または同じ感染因子に対応し得る/由来し得る。抗原または抗原産生因子は、抗原が、対応する因子に対する免疫応答を誘発することができる場合、例えば、抗原（または抗原産生因子）が、実験室で合成、操作、組換え、および/もしくは産生される場合、または感染因子自体か

50

ら単離もしくは抽出される場合、感染因子「の (of)」または「由来の (from)」と考えられ得る。

【0082】

抗原または抗原産生因子は、ナノ粒子内に部分的もしくは完全に含有されてもよい、またはナノ粒子上の部分との水素結合、ファンデルワールス相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用および化学的コンジュゲーションを含む非共有結合相互作用もしくは共有結合相互作用を介してナノ粒子、カチオン性ポリマーおよび/もしくは安定剤と会合してもよい。化学的コンジュゲーションには、チオール-マレイミド、NHSエステル-アミン、アジド-アルキンおよび他のクリックケミストリーが含まれる。いくつかの態様では、抗原または抗原産生因子は、チオール化され、チオール-マレイミド反応を介してマレイミド基を含む安定剤にコンジュゲートされる（国際出願番号PCT/US2016/022655を参照）。いくつかの態様では、抗原または抗原産生因子は、ナノ粒子との疎水性相互作用を介してカチオン性ポリマー上に負荷される。いくつかの態様では、抗原または抗原産生因子は、カチオン性ポリマー上に静電的に負荷される。抗原または抗原産生因子は、NPの2重量%、3重量%、4重量%5重量%、0.5~20重量%、例えば、1~15重量%、1.5~10重量%、1~6重量%または2~5重量%で存在し得る。

10

【0083】

抗原は、身体によって「異物」として認識され、その結果、身体の免疫細胞による抗原特異的免疫応答を誘発する何らかの物質である。抗原は、多くの場合、身体の抗原提示細胞（例えば樹状細胞）によって貪食され、抗原特異的免疫を誘導するために主要組織適合遺伝子複合体を介してT細胞および/またはB細胞に提示されるエピトープにプロセッシングされる。免疫応答は、細胞性および/または体液性であり得る。細胞性免疫の増加は、典型的には、抗原特異的T細胞活性の増加、増殖、および抗原を認識し排除するT細胞の能力の増強によって表される。体液性免疫の増加は、典型的には、関心対象の抗原を認識および中和することができる抗体を産生する抗原特異的B細胞活性の増加、および増殖によって表される。

20

【0084】

抗原の1つのカテゴリーが、関心対象の感染因子（標的）に関連する（または由来する）特定のタンパク質に対応する組換え全長タンパク質またはタンパク質サブユニットである。例えば、抗原は、免疫原性として同定されている全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質であり得る（Grifoni et al. Cell Host Microbe. 2020; 27 (4) : 671-80; Ou et al. Nat Commun. 2020; 11 (1) : 1620; Walls et al. Cell. 2020; 181 (2) : 281-92）。さらに、抗原は、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、膜タンパク質などに対応し得る。抗原はまた、タンパク質の特定の機能領域（すなわち、タンパク質サブユニットまたはタンパク質ドメイン）に対応し得る。例えば、抗原は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質のS1領域、S2領域、またはRBD領域に対応し得る。

30

【0085】

抗原はまた、関心対象の感染因子（標的感染因子）内の免疫原性配列に対応する（由来する）ペプチド（またはいくつかのペプチド）であり得る。ペプチドは、様々な免疫応答を誘発することができるエピトープとして挙動する。抗原は、生物情報学的手法によって分析されるような予測免疫原性、および/または免疫細胞刺激にそれらに関与させた実験データに基づいて選択されるエピトープであり得る。例えば、ペプチドは、細胞免疫原性および体液性免疫原性の両方において予測されるSARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の494~508位または1056~1070位に相当し得る（Fast et al. bioRxiv. 2020: 2020.02.19.955484）。

40

【0086】

いくつかのペプチドから構成される抗原に関して、抗原は、タンパク質全体（またはほぼ全体）を包含する重複（または非重複）ペプチドのカクテルであり得るか、または単一のタンパク質もしくは2つ以上の異なるタンパク質（1つまたは異なる標的感染性生物を標的とし得る）の免疫原性領域に対応するペプチドの混合物であってよい。例えば、抗原

50

は、SARS-CoV-2スパイクタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質および膜タンパク質を含むペプチドの混合物であり得る。表1には、免疫原性に基づく生物情報学的予測手法、例えば、Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) および Discotope 2.0 予測アルゴリズムであると予測されるSARS-CoV-2 T細胞および/またはB細胞エピトープの例、ならびにエピトープ応答に関して最もよく特性評価されたコロナウイルスであるSARS-CoV-1との高い配列類似性（例えば、>90%、>80%、>70%、>60%または>50%）が示されている（Grifoni et al. Cell Host Microbe. 2020; 27 (4) : 671-80; Fast et al. bioRxiv. 2020: 2020.02.19.955484）。

【0087】

（表1）

遺伝子	配列	位置	配列番号:
スパイク (S)	KLPDDFTGCV	424-433	1
	SQSIIAYTMSLGAEN	689-703	2
	IPTNFTISVTTEILP	714-728	3
	FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG	888-909	4
	APHGVVFLHVTYVPA	1056-1070	5
ヌクレオカプシド (N)	ATKAYNVTQAFGRRG	267-281	6
膜 (M)	IASFRLFARTRSMWS	97-111	7
エンベロープ (E)	VKPSFYVYSRVKNLN	52-66	8

10

20

【0088】

予測される免疫原性エピトープの他の例は、文献（Prachar et al. bioRxiv. 2020: 2020.03.20.000794; Chour et al. medRxiv. 2020: 2020.05.04.20085779）、およびSARS-CoV-2抗原の販売業者のウェブサイト（例えば、Sino Biological、Creative Diagnostics、Sengenics、ABclonal Technology）全体にわたって見出すことができる。MHC結合能に基づいて免疫原性領域を同定するための予測ツールも広く利用可能である。

【0089】

様々な態様では、抗原産生因子は、標的感染因子に対応するまたは標的感染因子に特異的な特定のタンパク質またはペプチドをコードするmRNAまたはpDNAなどの核酸である。mRNAまたはpDNAは、対象に投与されると、細胞の細胞質に入り、そこで細胞性および体液性免疫応答を最終的に活性化することができる所望のタンパク質に発現される（mRNAの翻訳、またはpDNAの転写/翻訳）。抗原コード配列は、特定のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする任意の配列、例えば、SARS-CoV-2スパイクタンパク質、スパイクRBDドメイン、スパイクS1ドメインなどをコードするmRNAまたはpDNAであり得る。効力、安定性およびタンパク質収量を増加させるために、mRNAまたはpDNAは、コドン最適化、修飾ヌクレオシドの使用、ポリアデニル化などに供され得る。例えば、5'UTRおよび3'UTRの設計は、mRNAの安定性、翻訳、タンパク質産生、および構造にとって重要である。関心対象のmRNAに基づいて5'UTRおよび3'UTRの設計を最適化するいくつかのオンラインツールが存在する。効果的な抗原発現のために、mRNAは、以下を含むように合成される: 5'キャップ-5'非翻訳領域 (UTR) - 抗原コード配列 - 3'非翻訳領域 (UTR) - ポリAテール。mRNAはまた、非修飾型、ヌクレオシド修飾型または自己増幅型であり得る。例えば、修飾ウリジンまたは修飾シチジンの組み込みは、自然免疫分子による早すぎる認識を回避し、翻訳の効率を改善するために行われ得る。

30

40

【0090】

好適な追加の標的抗原は、当技術分野において公知であり（例えば、Pati et al., Front Immunol. 9:2224, 2018 (16頁)、およびそこに引用される参考文献内）、商業的な政府機関供給源および科学的供給源から入手可能である。追加の例示的な抗原を以下に示す。

【0091】

50

例示的なウイルス抗原:ウイルス抗原は、限定されることなく、以下のウイルス科のいずれかに由来するウイルスを含む任意のウイルスから単離され得る:アデノウイルス (Adenovirus)、アレナウイルス科 (Arenaviridae)、アルテリウイルス (Arterivirus)、アストロウイルス科 (Astroviridae)、バキュロウイルス科 (Baculoviridae)、バドナウイルス (Badnavirus)、バルナウイルス科 (Barnaviridae)、ビルナウイルス科 (Birnaviridae)、ブロモウイルス科 (Bromoviridae)、ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae)、カリシウイルス科 (Caliciviridae)、カピロウイルス (Capillivirus)、カーラウイルス (Carlavirus)、カリモウイルス (Caulimovirus)、サーコウイルス科 (Circoviridae)、クロステロウイルス (Closterovirus)、コモウイルス科 (Comoviridae)、コロナウイルス科 (Coronaviridae) (例えば、コロナウイルス、例えば、COVID-19を含む重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルス)、コルチコウイルス科 (Corticoviridae)、シストウイルス科 (Cystoviridae)、デルタウイルス (Deltavirus)、ダイアンソウイルス (Dianthovirus)、エナモウイルス (Enamovirus)、フィロウイルス科 (Filoviridae) (例えば、マールブルグウイルス (Marburg virus) およびエボラウイルス (例えば、ザイール株、レストン株、コートジボワール株またはスーダン株))、フラビウイルス科 (Flaviviridae) (例えば、C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus)、デングウイルス1 (Dengue virus 1)、デングウイルス2 (Dengue virus 2)、デングウイルス3 (Dengue virus 3) およびデングウイルス4 (Dengue virus 4))、ハンタウイルス科 (Hantaviridae) (例えばハンタウイルス (hantavirus))、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae)、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) (例えば、ヒトヘルペスウイルス (Human herpesvirus) 1、3、4、5および6、ならびにサイトメガロウイルス (Cytomegalovirus))、ハイポウイルス科 (Hypoviridae)、イリドウイルス科 (Iridoviridae)、レビウイルス科 (Leviviridae)、リポスリクスウイルス科 (Lipothrixviridae)、ミクロウイルス科 (Microviridae)、オルソミクソウイルス科 (例えば、インフルエンザウイルス (Influenza virus) AおよびBおよびC)、パピローマウイルス科 (Papillomaviridae) (ヒトパピローマウイルス (HPV) および動物パピローマウイルス (animal papillomavirus) の両方を含む)、パポバウイルス科 (Papovaviridae)、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) (例えば、麻疹ウイルス (measles virus)、流行性耳下腺炎ウイルス (mumps virus) およびヒト呼吸器多核体ウイルス (human respiratory syncytial virus))、パルボウイルス科 (Parvoviridae)、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) (例えば、ポリオウイルス (poliovirus)、ライノウイルス (rhinovirus)、ヘパトウイルスおよびアフトウイルス (aphthovirus))、ポックスウイルス科 (Poxviridae) (例えば、ワクシニアウイルス (vaccinia virus) および天然痘ウイルス (smallpox virus))、レオウイルス科 (Reoviridae) (例えばロタウイルス)、レトロウイルス科 (Retroviridae) (例えば、レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 1およびHIV 2)、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae) (例えば、狂犬病ウイルス (rabies virus)、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルスなど)、ロタウイルス科 (Rotaviridae) (例えばロタウイルスA~J)、トガウイルス科 (Togaviridae) (例えば、風疹ウイルス (rubella virus)、デングウイルスなど)、海綿状ウイルス (Spongiform virus) およびトティウイルス科 (Totiviridae)。好適なウイルス抗原には、デングタンパク質Mまたはタンパク質E、デングD1NS1、デングD1NS2およびデングD1NS3の全部または一部も含まれる。

【0092】

ウイルス抗原は、特定の株、例えば、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペス (herpes simplex) 1および2;肝炎ウイルス (hepatitis virus)、例えば、A型肝炎ウイルス (hepatitis A virus) (HAV)、B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus) (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、D型デルタ肝炎ウイルス (delta hepatitis D virus) (HDV)、E型肝炎ウイルス (hepatitis E virus) (HEV) およびG型肝炎ウイルス (hepatitis G virus) (HGV)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (tic

10

20

30

40

50

k-borne encephalitis virus) ;パラインフルエンザ (parainfluenza)、水痘帯状疱疹 (varicella-zoster)、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー (Epstein-Barr)、ロタウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス (coxsackievirus)、ウマ脳炎 (equine encephalitis)、日本脳炎 (Japanese encephalitis)、黄熱病 (yellow fever)、リフトバレー熱 (Rift Valley fever) ならびにリンパ性脈絡髄膜炎 (lymphocytic choriomeningitis) に由来し得る。追加の態様では、ウイルス抗原マーカーには、CMV、風邪ウイルス、エプスタイン・バー、インフルエンザウイルス (flu virus)、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、HIVウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、風疹ウイルス、天然痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスまたは西ナイルウイルス (West Nile virus) によって発現されるペプチドが含まれる。

10

【0093】

さらなる特定の例として、サイトメガロウイルス抗原には、エンベロープ糖タンパク質BおよびCMV pp65が含まれ、エプスタイン・バー抗原には、EBV EBNA1、EBV P18およびEBV P23が含まれ、肝炎抗原には、HBVのS、MおよびLタンパク質、HBVのプレS抗原、HBCAG DELTA、HBV HBE、C型肝炎ウイルスRNA、HCV NS3およびHCV NS4が含まれ、単純ヘルペスウイルス抗原には、前初期タンパク質および糖タンパク質Dが含まれ、HIV抗原には、gag、polおよびenv遺伝子の遺伝子産物、例えば、HIV gp32、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV P17/24、HIV P24、HIV P55 GAG、HIV P66 POL、HIV TAT、HIV GP36、Nefタンパク質および逆転写酵素が含まれ、インフルエンザ抗原には、赤血球凝集素およびノイラミニダーゼが含まれ、日本脳炎ウイルス抗原には、タンパク質E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2Aおよび80%Eが含まれ、麻疹抗原には、麻疹ウイルス融合タンパク質が含まれ、狂犬病抗原には、狂犬病糖タンパク質および狂犬病核タンパク質が含まれ、呼吸器多核体ウイルス抗原には、RSV融合タンパク質およびM2タンパク質が含まれ、ロタウイルス抗原には、VP7scが含まれ、風疹抗原には、タンパク質E1およびE2が含まれ、水痘帯状疱疹ウイルス抗原には、gplおよびgpIIが含まれる。追加の特定の例示的なウイルス抗原配列には、Nef (66~97) ;Nef (116~145) ;Gag p17 (17~35) ;Gag p17~p24 (253~284) ;およびPol 325~355 (RT 158~188) が含まれる。ウイルス抗原の追加の例については、Fundamental Virology, Second Edition, eds. Fields, B.N. and Knipe, D.M. (Raven Press, New York, 1991) を参照されたい。

20

30

【0094】

例示的な細菌抗原:細菌抗原は、アクチノミセス (Actinomyces)、アナベナ (Anabaena)、バチルス (Bacillus)、バクテロイデス (Bacteroides)、デロビブリオ (Bdellovibrio)、ボルデテラ (Bordetella)、ボレリア (Borrelia)、カンピロバクター (Campylobacter)、カウロバクター (Caulobacter)、クラミジア (Chlamydia)、クロロビウム (Chlorobium)、クロマチウム (Chromatium)、クロストリジウム、コリネバクテリウム、サイトファーガ (Cytophaga)、ディノコッカス (Deinococcus)、エシェリキア (Escherichia)、フランシセラ (Francisella)、ハロバクテリウム (Halobacterium)、ヘリオバクター (Heliobacter)、ヘモフィルス、ヘモフィルスインフルエンザB型 (HIB)、ハイフォミクロビウム (Hyphomicrobium)、レジオネラ (Legionella)、レプトスピロシス (Leptospiriosis)、リステリア (Listeria)、髄膜炎菌A、BおよびC、メタノバクテリウム (Methanobacterium)、ミクロコッカス (Micrococcus)、マイコバクテリウム、マイコプラズマ (Mycoplasma)、ミキソコッカス (Myxococcus)、ナイセリア、ニトロバクター (Nitrobacter)、オシラトリア (Oscillatoria)、プロクロロン (Prochloron)、プロテウス (Proteus)、シュードモナス (Pseudomonas)、フォドスピリラム (Phodospirillum)、リケッチア (Rickettsia)、サルモネラ (Salmonella)、シゲラ (Shigella)、スピリラム (Spirillum)、スピロヘータ (Spirochaeta)、スタフィロコッカ

40

50

ス (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、スルホロブス (*Sulfolobus*)、サーモプラズマ (*Thermoplasma*)、チオバチルス (*Thiobacillus*)、ならびにトレポネーマ (*Treponema*)、ビブリオ (*Vibrio*)、ならびにエルシニア (*Yersinia*) を含む任意の細菌に由来し得る。細菌を標的とする抗原は、例えば、炭疽、グラム陰性杆菌、クラミジア、ジフテリア、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、百日咳毒素、肺炎球菌 (*pneumococcus*)、リケッチア (*rickettsiae*)、スタフィロコッカス、ストレプトコッカスおよび破傷風に由来し得る。

【0095】

主題の免疫原性構築物および方法が使用され得る細菌感染には、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の両方が含まれる。グラム陽性菌の例には、パストツレラ (*Pasteurella*) 種、ブドウ球菌 (*Staphylococci*) 種および連鎖球菌 (*Streptococci*) 種が挙げられる。グラム陰性菌の例には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス種およびサルモネラ種が挙げられる。

【0096】

感染性細菌の具体例には、アクチノマイセス・イスラエリー (*Actinomyces israeli*)、バチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、バクテロイデス種、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、病原性カンピロバクター種、クロストリジウム・パーフリンジェンス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム種、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 種、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エリシペロスリクス・ルシオパシエ (*Erysipelothrix rhusiopathie*)、大腸菌、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、ヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、レジュネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ (*Leptospira*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、マイコバクテリア (*Mycobacteria*) 種 (例えば、結核菌、*M. アビウム* (*M. avium*)、*M. イントラセルラーエ* (*M. intracellulare*)、*M. カンサイ* (*M. kansasii*)、*M. ゴドナエ* (*M. gordonae*))、ナイセリア・ゴノレー (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、リケッチア、シゲラ・フレックスネリ (*Shigella flexneri*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、ストレプトコッカス (ビリダンス群)、大便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス (嫌気性種)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モニリフォルミス連鎖杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、およびトレポネーマ・ペルテニュー (*Treponema pertenue*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が挙げられる。

【0097】

細菌抗原の特定の例として、炭疽抗原には、炭疽保護抗原 (*anthrax protective antigen*) が含まれ、グラム陰性杆菌抗原には、リポ多糖が含まれ、ジフテリア抗原には、ジフテリア毒素が含まれ、結核菌抗原には、ミコール酸、熱ショックタンパク質 65 (HSP 65)、30kDa 主要分泌タンパク質および抗原 85A が含まれ、百日咳毒素抗原には、赤血球凝集素、パータクチン、FIM2、FIM3 およびアデニル酸シクラーゼが含まれ、肺炎球菌抗原には、ニューモリシンおよび肺炎球菌莢膜多糖が含まれ、リケッチア抗原には、*rmpA* が含まれ、連鎖球菌抗原には、M タンパク質が含まれ、破傷風抗原には、破傷風毒素が含まれる。

10

20

30

40

50

【0098】

例示的な寄生生物抗原:寄生生物抗原は、任意の寄生生物、例えば、ネズミバベシア (*Babesia microti*)、バベシ・ディベルガンズ (*Babesi divergens*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、リーシュマニア種、ブラジルリーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、ドノバンリーシュマニア (*Leishmania donovani*)、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、リケッチア・リケッチイ (*Rickettsia rickettsii*)、発疹熱リケッチア (*Rickettsia typhi*)、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、トリパノソーマ・クルージ (*Trypanosoma cruzi*)、ガンビア・トリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシア・トリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*) (アフリカ睡眠病)、トリパノソーマ・クルージ (シャーガス病)、白癬 (陰金田虫)、扁形動物および回虫由来の抗原から得ることができる。寄生生物は、蠕虫生物もしくは虫、または限定されることなく、鉤虫症/鉤虫、アニサキス症、回虫-寄生性肺炎、回虫-アライグマ回虫症 (*Baylisascariasis*)、条虫-条虫感染、肝吸虫症、ジオクトフィメ・リナリス (*Dioctophyme renalis*) 感染、裂頭条虫症-条虫、メジナ虫-メジナ虫症、エキノコックス症-条虫、ギョウチュウ-腸蟯虫症、肝蛭-肝蛭症、肥大吸虫症-腸ジストマ、顎口虫症、膜様条虫症、ロア糸状虫 (*Loa loa*) フィラリア症、カラバル腫脹、マンソネラ症、フィラリア症、横川吸虫症-腸ジストマ、河川盲目症、中国肝吸虫、肺吸虫症、肺吸虫、住血吸虫症-ビルハルジア (*bilharzia*)、ビルハルチア病もしくはマキガイ熱 (全種類)、腸住血吸虫症、尿路住血吸虫症、日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) による住血吸虫症、アジア腸住血吸虫症、孤虫症、糞線虫症-寄生性肺炎、無鉤条虫、有鉤条虫、トキソカラ症、旋毛虫病、沼地皮膚症、鞭虫およびリンパ性フィラリア性象皮症 (*Elephantiasis Lymphatic filariasis*) を含む疾患を引き起こす生物であり得る。寄生生物は、寄生虫、ハルザン症候群、ハエ幼虫症、砂ノミ、ヒトヒフバエおよびカンディルを含む疾患を引き起こす単数または複数の生物であり得る。寄生生物は、トコジラミ、アタマジラミ-シラミ寄生症、コロモジラミ-シラミ寄生症、ケジラミ-シラミ寄生症、ニキビダニ (*Demodex*) -毛包虫症、疥癬、螺旋虫およびコクリオミヤ (*Cochliomyia*) を含む疾患を引き起こす外寄生生物または生物であり得る。

【0099】

抗原には、孢子虫 (*Sporozoan*) 抗原、マラリア原虫 (*Plasmodium*) 抗原、例えば、スポロゾイト周囲タンパク質、スポロゾイト表面タンパク質、肝ステージ抗原 (*liver stage antigen*)、頂端膜関連タンパク質またはメロゾイト表面タンパク質の全部または一部が含まれる。ヒストプラズマ抗原には、熱ショックタンパク質60 (HSP60) が含まれ、リーシュマニア抗原には、gp63およびリポホスホグリカンが含まれ、熱帯熱マラリア原虫抗原には、メロゾイト表面抗原、スポロゾイト表面抗原、スポロゾイト周囲抗原、ガメトサイト/配偶子表面抗原、血液ステージ抗原 (*blood-stage antigen*) pf 155/RESAを含む原虫抗原および他の寄生虫抗原が含まれ、住血吸虫抗原には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびパラミオシンが含まれ、トキソプラズマ抗原には、SAG-1およびp30が含まれ、トリパノソーマ・クルージ抗原には、75~77kDa抗原および56kDa抗原が含まれ、白癬抗原には、トリコフィチンが含まれる。

【0100】

例示的な真菌抗原:真菌病原体の例には、アスペルギルス (*Aspergillus*) 種、ブラストミセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、カンジダ・アルビカンスおよび他のカンジダ種、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム、クラミジア・トラコマチス、ノカルジア種ならびにニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) が挙げられる。真菌を標的とする抗原は、例えば、カンジダ、コクシジオイデス、クリプトコッカスおよびヒストプラズマに由来し得る。真菌抗原の特定の例として、コクシジオイデス抗原には、球状体抗原が含まれ、クリプトコッカス抗原には、莢膜多糖が含まれる。

10

【0101】

上記のように、細菌、ウイルス、真菌および寄生生物由来の抗原を本開示のワクチンに製剤化し、本開示の方法に従って投与してもよい。抗原の非限定的な例には、以下のような、動物に感染する感染因子を形成するものが挙げられる:

【0102】

ブタ:ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、アクチノバシラス・プルロニューモニア (*Actinobacillus pleuroneumoniae*)、マイコプラズマ・ハイオニューモニア (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、大腸菌 K88、K99、F41 および 987P、c 型ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、サルモネラ・コレラエシス (*Salmonella choleraesuis*)、パスツレラ・マルトシダ、ボルデテラ・ブロンキセプチカ (*Bordetella bronchiseptica*)、レプトスピラ・ブラティスラバ (*Leptospira bratislava*)、イヌレプトスピラ (*Leptospira canicola*)、レプトスピラ・グリポティフォーサ (*Leptospira grippotyphosa*)、レプトスピラ・ハージョ (*Leptospira hardjo*)、レプトスピラ・プロモナ (*Leptospira promona*)、レプトスピラ・イクテロ (*Leptospira ictero*)、ブタインフルエンザウイルス (*Porcine Influenza virus*)、サーコウイルス (*Circovirus*)、ブタ生殖および呼吸症候群ウイルス (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) (PRRSV)、豚痘、口タウイルス、ブタ呼吸器コロナウイルス (*Porcine Respiratory Coronavirus*)、パルボウイルス (*Parvo virus*)、仮性狂犬病、伝染性胃腸炎因子。

20

【0103】

ウマ:腺疫菌 (*Streptococcus equi*)、クロストリジウム・テタニ、ウマインフルエンザウイルス (*Equine Influenza Virus*) A1 株および A2 株、ウマ鼻肺炎 1 型、1b 型および 4 型、東部ウマ脳脊髄炎、西部ウマ脳脊髄炎、ベネズエラ馬脳炎、ウマ伝染性貧血ウイルス (*Equine Infectious Anemia Virus*)、西ナイルウイルス、カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス、コクシジオイデス・イミチス、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・ファルシミノーズム (*Histoplasma farciminosum*)。

30

【0104】

ウシ:大腸菌 O157:H7、パスツレラ・マルトシダ、パスツレラ・ヘモリチカ (*Pasteurella haemolytica*)、イヌレプトスピラ、レプトスピラ・グリポティフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・プロモナ、レプトスピラ・イクテロ、C 型ウェルシュ菌、D 型ウェルシュ菌、クロストリジウム・シャボイ (*Clostridium chauvoei*)、クロストリジウム・ノビイ (*Clostridium novyi*)、クロストリジウム・セプティカム (*Clostridium septicum*)、クロストリジウム・テタナス (*Clostridium tetanus*)、溶血クロストリジウム (*Clostridium haemolyticum*)、クロストリジウム・ソルデリ (*Clostridium sodellii*)、サルモネラ・ダブリンおよびネズミチフス菌 (*Salmonella dublin and typhimurium*)、ウシ口タウイルス (*Bovine Rotavirus*)、ウシコロナウイルス (*Bovine coronavirus*)、ウシ鼻気管炎、ウシ下痢症ウイルス (*Bovine diarrhea virus*)、パラインフルエンザ-3、呼吸器多核体ウイルス、トリ

40

50

コフィトン・ベルコースム (*Trichophyton verrucosum*)。

【0105】

家禽:ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、セルプリナ・ピロシコリ (*Serpulina pilosicoli*)、マレック病ウイルス (*Marek's disease virus*)、感染性囊疾患、伝染性気管支炎、ニューカッスル病ウイルス (*Newcastle disease virus*)、レオウイルス (*Reo virus*)、七面鳥鼻気管炎、コクシジウム症。

【0106】

イヌ:イヌレプトスピラ、レプトスピラ・グリボティフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・プロモナ、レプトスピラ・イクテロ、イヌボレリア・ブルグドルフェリ (*Canine Borrelia burgdorferi*)、イヌエーリキア・カニス (*Canine Ehrlichia canis*)、イヌボルデテラ・ブロンキセプチカ、イヌランブル鞭毛虫 (*Canine Giardia lamblia*)、イヌジステンパー、イヌアデノウイルス (*Canine Adenovirus*)、イヌコロナウイルス (*Canine Coronavirus*)、イヌパラインフルエンザ (*Canine Parainfluenza*)、イヌパルボウイルス (*Canine Parvovirus*)、イヌ狂犬病、ノミ、ジアルジア、肺虫、イヌ鉤虫 (*Ancylostoma caninum*)、狭頭鉤虫 (*Uncinaria stenocephala*)、イヌ小孢子菌 (*Microsporum canis*)。

【0107】

ネコ:ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (*Feline infectious peritonitis virus*)、ネコ鼻気管炎、ネコ汎白血球減少症、ネコカリシウイルス (*Feline calicivirus*)、ネココロナウイルス (*Feline coronavirus*)、ネコアルファヘルペスウイルス (*Feline alphaherpesvirus*) 1、ネコ免疫不全ウイルス (*Feline immunodeficiency virus*)、ネコ白血病ウイルス (*Feline leukemia virus*)、狂犬病リッサウイルス (*rabies lyssavirus*)。ボルデテラ、バチルス、バルトネラ (*Bartonella*)、バークホルデリア (*Burkholderia*)、クラミジア、クロストリジウム、コリネバクテリウム、サルモネラ、プロテウス、エシェリキア、プロテウス、モラクセラ (*Moraxella*)、ノカルジア、パスツレラ、ヘモフィルス、パスツレラ、シュードモナス、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、イヌ小孢子菌、ナニッチア・ジプス (*Nannizzia gyps*)、ナニッチア・フルバ (*Nannizzia fulva*)、ナニッチア・ナナ (*Nannizzia nana*)、トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン・ベルコースム、イヌ鉤虫、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、イヌ糸状虫 (*Dirofilaria immitis*)、ノミ、ジアルジア、イソスポラ (*Isospora*) 種、肺虫、オラヌラス・トリクスピ (*Ollanulus tricuspi*)、フィサロプテラ・ヒスピダ (*Physaloptera hispida*)、ヒゼンダニ (*Sarcoptes scabiei*)、条虫、イヌ小回虫 (*Toxascaris leonina*)、ネコ回虫 (*Toxocara cati*)、トキシプラズマ原虫、狭頭鉤虫および鞭毛虫。

【0108】

VII. オリゴヌクレオチド

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド、例えば、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、任意の手段によって結合され得る。いくつかの態様では、負に帯電したsiRNAは、静電相互作用を使用して、ナノ粒子、例えばMSNP上の正に帯電したカチオン性ポリマーに結合する。オリゴヌクレオチドは、細胞内で発現される1つまたは複数の遺伝子、例えば、抗原提示細胞 (例えば樹状細胞) の免疫抑制に関連する遺伝子、例えば、STAT3、PD-L1、IDO-1およびIL-6を阻害またはダウンレギュレートするものを標的とし得る。いくつかの態様では、単一のオリゴヌクレオチドは、様々な効力で複数の遺伝子を標的とし得る。他の態様では、複数のオリゴヌクレオチドは、単一の遺伝子を標的とし得る。さらなる態様では、複数のオリゴヌクレオチドは、複数の遺伝子を標的とし得る。

【0109】

オリゴヌクレオチドは、NPの約1重量%~10重量%、例えば、約2重量%~約6重量%

で存在し得る。いくつかの態様では、例えば、siRNA1つ当たりのNP（NP/siRNA）が、結合プロセス中に約10:1～約100:1の範囲の重量比で使用され、完全な結合が達成される。完全な結合は、40重量%のsiRNA/NPまで達成され得る。

【0110】

典型的には、オリゴヌクレオチドは、そのアップレギュレーションが抗原提示細胞（例えば樹状細胞）の免疫抑制のいくつかの局面に関連する遺伝子を阻害またはダウンレギュレートする。当業者であれば、公開配列データベースにおいて容易に入手可能な、これらの標的の代表的な配列を利用する方法を理解するであろう。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドは、STAT3、PD-L1、IDO-1、IL-6などのようなsiRNAである。例示的なsiRNAを表2に示す。

【0111】

（表2）

名称	代表的なGenBankアクセッション番号	siRNA 配列 配列番号：
シグナル伝達性 転写因子3 (STAT3)	NM_003150.3; NM_139276.2; NM_213662.1; XM_005257616.3; XM_005257617.3; XM_011525145.2; XM_011525146.2; XM_017024972.1; XM_017024973.1; XM_017024974.1; XM_017024975.1; XM_017024976.1	9 および 10
プログラム細胞死 リガンド1 (PD-L1)	NM_001267706.1; NM_001314029.2; NM_014143.4; NR_052005.2	11-14
プログラム細胞死 リガンド2 (PD-L2)	NM_025239.4; XM_005251600.3; XP_005251657.1	15-18
インドールアミン2, 3- ジオキシゲナーゼ1 (IDO-1)	NM_002164.6; NG_028155.1	19-22
サイトカイン シグナル伝達抑制因子1 (SOCS-1)	NM_003745.1; DQ086801.1; U88326.1; NP_003736.1	23-29
トランスフォーミング 増殖因子β1 (TGF-β)	NM_000660.7; XM_011527242.2;	30 および 31
TGFβ 受容体1 (TGFBR1)	NM_004612.4; NM_001130916.3; NM_001306210.2; XM_011518948.2; XP_011517250.1; XM_011518949.2; XP_011517251.1	32-36
TGFβ 受容体2 (TGFBR2)	NM_003242.6; NM_001024847.2; XM_011534043.2; XP_011532345.1; XM_011534045.3; XP_011532347.1; XM_017007106.1; XP_016862595.1	37-40
インターロイキン-10 (IL-10)	NG_012088.1; NM_000572.3; NM_001382624.1; NR_168466.1; NR_168467.1	41-45
インターロイキン10受容体 サブユニットα (IL- 10RA)	NM_001558.4; NR_026691.2; XM_024448493.1; XP_024304261.1	46 および 47
アルギナーゼ-1 (ARG-1)	NG_007086.2; NM_000045.4; NM_001244438.2; NM_001369020.1; NR_160934.1	48-51
ガレクチン-1 (LGALS1)	NM_002305.4; NP_002296.1	52-54
ガレクチン-3 (LGALS3)	NG_017089.1; NM_001357678.2; NP_001344607.1; NM_002306.4; NP_002297.2; NR_003225.2	55-51
インターロイキン-6 (IL-6)	NG_011640.1; NM_000600.5; NM_001318095.2; NP_001305024.1; NM_001371096.1; NP_001358025.1	62-66
Vセットドメイン 含有T細胞 活性化阻害剤 (VTCN-1)	NM_024626.4; NP_078902.2; NM_001253849.1; NP_001240778.1; NM_001253850.1; NP_001240779.1	67 および 68

10

20

30

40

50

名称	代表的なGenBankアクセッション番号	siRNA 配列 配列番号:
誘導型一酸化窒素 合成酵素 (iNOSまたはNOS2)	NG_011470.1; NM_000625.4; NP_000616.3	69-75
セマフォリン-4A (SEMA4A)	NM_022367.4; NM_001193300.2; NM_001193301.1; NM_001193302.1; NP_001180231.1; NM_001370567.1	
Bcl-2相同拮抗性キラー (BAK1)	NM_001188.4; NP_001179.1; XM_011514779.3; XP_011513081.1; XM_011514780.1; XP_011513082.1	76-78
Bcl-2結合Xタンパク質 (BAX)	NM_138761.4; NP_620116.1; NM_004324.4; NP_004315.1; NM_138763.4; NP_620118.1; NM_138764.5; NP_620119.2; NM_001291428.2; NP_001278357.1	79-81
Bcl-2様タンパク質11 (BIMまたはBCL2L11)	NM_138621.5; NP_619527.1; NM_006538.5; NP_006529.1; NM_138622.3; NP_619528.1; NM_138623.3; NP_619529.1; NM_138624.3; NP_619530.1	82-85, 91
(ホスファターゼ・テンシン・ ホモログ) PTEN	NM_000314.8; NP_000305.3; NM_001304717.5; NP_001291646.4; NM_001304718.2; NP_001291647.1	86-89

10

20

【0112】

VIII. 標的化剤

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、例えば、標的部位への免疫原性構築物の特異的送達のための標的化剤をさらに含み得る。標的化剤は、部位を標的とするために、および任意で細胞内への内在化を補助または誘導するために使用され得る。

【0113】

例示的な標的化剤には、モノクローナル抗体、一本鎖可変断片 (scFv) 抗体、抗体の他の抗原結合断片、アプタマー、小さな標的化分子 (例えば、細胞表面受容体に結合するリガンド、例えば、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、トランスフェリンおよび葉酸)、アプタマー、炭水化物、および細胞または組織、例えば、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞またはマクロファージ) などの免疫細胞に対する結合親和性を有するペプチドが含まれる。

30

【0114】

いくつかの態様では、標的化剤は、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞またはマクロファージ) などの免疫細胞を標的とする。標的化剤には、免疫細胞の表面に提示されたエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその断片、および免疫細胞上の細胞表面受容体に結合するリガンドが含まれる。そのような受容体の1つであるレクチンDEC-205は、インビトロで、およびマウスに使用されて、体液性 (抗体に基づく) 応答および細胞性 (CD8 T細胞) 応答の両方を2~4桁増強している (Hawiger et al., J. Exp. Med., 194 (6): 769-79, 2001; Bonifaz et al., J. Exp. Med., 196 (12): 1627-38, 2002; Bonifaz et al., J. Exp. Med., 199 (6): 815-24, 2004)。これらの報告では、抗原が抗DEC205重鎖に融合され、組換え抗体分子が免疫化に使用された。

40

【0115】

マンノース特異的レクチン (マンノース受容体) およびIgG Fc受容体を含む様々な他のエンドサイトーシス受容体も、このように標的とされており、抗原提示効率が同様に向上している。標的とされ得る他の好適な受容体および表面タンパク質には、DC-SIGN、33D1、SIGLEC-H、DCIR、CD11c、CD40、DEC-205、熱ショックタンパク質受容体およびスカベンジャー受容体が含まれる。これらの受容体を発現する免疫細胞への優先的な取込みのために、これらの受容体に対する標的化部分を免疫原性構築物に付着するこ

50

とができる。例には、高レベルのマンノース受容体を有するマクロファージおよびDCへの標的送達のために免疫原性構築物上に付着させたマンノースがある。

【0116】

標的とされ得る他の受容体には、toll様受容体 (TLR) が含まれる。TLRは、病原体関連分子パターン (PAMP) を認識し、それに結合する。PAMPは、樹状細胞の表面上のTLRを標的とし、内部でシグナル伝達し、それによって、DC抗原取込み、成熟およびT細胞刺激能力を潜在的に増大させる。粒子表面にコンジュゲートされるか共カプセル化されるPAMPには、非メチル化CpG DNA (細菌性)、二本鎖RNA (ウイルス性)、リボ多糖 (細菌性)、ペプチドグリカン (細菌性)、リポアラビノマンニン (lipoarabino mannin) (細菌性)、サイモサン (酵母)、マイコプラズマリポタンパク質、例えばMALP-2 (細菌性)、フラジェリン (細菌性) ポリ (イノシン-シチジル) 酸 (細菌性)、リポテイコ酸 (細菌性) またはイミダゾキノリン (合成) が含まれる。

10

【0117】

標的化剤は、任意の手段によって免疫原性構築物に付着されてもよく、好適なコンジュゲーション化学が当技術分野において公知であり、本明細書において記載されている。いくつかの態様では、標的化剤は、チオール化され、続いて、チオール-マレイミド反応を介してMal-PEG-PEI-MSNPとコンジュゲートされる。いくつかの態様では、標的化剤は、NHSエステルとアミンとの反応によるNPへのコンジュゲーションの前にPEG安定剤に付着される。標的化剤は、NPの0.1~10重量%、例えば、0.1~1重量%または1~5重量%、例えば、抗体について1~10重量%、またはscFVについて0.1~2重量%、例

20

【0118】

IX. 標識剤

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、例えば、ランタニド、蛍光色素、量子ドット、放射性トレーサーまたは金ナノ粒子によって標識され得る。標識は、機械、検出器、センサー、装置、カラム、または強化されたもしくは強化されていないヒトの眼が、標識された組成物を標識されていない組成物から区別するのを補助することができる任意の物質であり得る。標識の例には、放射性同位体 (例えばPETトレーサー)、色素、染色、量子ドット、金ナノ粒子、酵素、非放射性金属 (例えばMRI造影剤)、磁石、ビオチン、タンパク質タグ、任意の抗体エピトープまたはそれらの任意の組合せが挙げられる。例示的な蛍光色素には、FITC、RITC、Cy (商標) 色素、アミン反応性Dylight (登録商標) 色素およびアミン反応性Alexa Fluor (登録商標) 色素が含まれる。いくつかの態様では、ランタニドは、共有結合または吸着によって、ナノ粒子、例えばMSNPのヒドロキシル基、チオール基、アミン基またはホスホネート基上に負荷され得る。ランタニドは、例えば、質量分析による高感度および高分解能での試料検出を容易にすることができるのに対して、蛍光色素は、蛍光イメージング技術による試料定量を可能にする。ガドリニウムなどのランタニドを含有する免疫原性構築物は、疾患部位を撮像するためのMRI造影剤としても役立ち得る。

30

【0119】

いくつかの態様では、蛍光色素などの標識は、例えば、1つまたは複数のナノ粒子結合アミンと蛍光色素に付加された活性化エステル部分 (NHSエステルなど) との求核アシル置換を介して、ナノ粒子、例えばアミン-MSNPの細孔の内側に負荷される。そのような標識は、蛍光イメージング技術を使用して追跡され得る免疫原性構築物をもたらす。そのような標識は、カチオン性ポリマーおよび/または安定剤の負荷の前または後に加えられ得る (すなわち、標識は、ナノ粒子またはNPに適用され得る)。さらなる態様では、標識は、任意の適切な手段によって、ナノ粒子へのそれらの付着の前または後に、カチオン性ポリマー、安定剤、またはNPの他の成分 (例えばオリゴヌクレオチド) に付着され得る。

40

【0120】

X. 免疫原性構築物の合成

50

成分は、共有結合および静電結合を含む任意の手段によって、ナノ粒子、またはNPの他の成分、または免疫原性構築物に結合していてもよい。様々なコンジュゲーション化学が当技術分野において公知であり、本明細書において記載されている。いくつかの態様では、成分のうちの1つまたは複数の、ナノ粒子またはNPの表面に結合している。他の態様では、成分のうちの1つまたは複数の、ナノ粒子（例えばMSNP）の細孔内に結合している。さらなる態様では、成分のうちの1つまたは複数の、互いに結合している。いくつかの態様では、アジュバントおよび/または抗原もしくは抗原産生因子は、安定剤に共有結合している。安定剤は、カチオン性ポリマーに（例えば、アミンを介して）共有結合していてもよく、次いで、カチオン性ポリマーは、ナノ粒子の外部に静電的に結合していてもよい。いくつかの態様では、アジュバントおよび/または抗原もしくは抗原産生因子は、化学的コンジュゲーション、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合またはファンデルワールス相互作用を介してカチオン性ポリマーに結合している。例えば、抗原または抗原産生因子は、安定剤に共有結合していてもよいのに対して、アジュバントは、カチオン性ポリマーに静電的または疎水的に結合している。

10

【0121】

ナノ粒子が細孔を有するいくつかの態様では、細孔は、ナノ粒子（例えばMSNP）の外面上の第1の位置に第1の開口部を有し、ナノ粒子の外面上の第2の位置に第2の異なる開口部を有する。成分は、細孔のサイズおよび成分のサイズが結合に影響を及ぼすものの、細孔の内側の長さに沿ってどこに結合していてもよい。

20

【0122】

MSNPなどのナノ粒子は商業的に入手され得るか、または任意の方法によって作製され得るが、いくつかの態様では、MSNPは、第1の界面活性剤を第2の異なる界面活性剤と組み合わせて第1の混合物を形成し、第1の混合物を加熱し、シリカ前駆体を第1の混合物に加えて第2の混合物を形成し、一定期間温度を保持してMSNPを生成し、遠心分離によってMSNPを回収することによって形成される。界面活性剤は、還流条件下で酸性溶媒中でMSNPを混合することによって除去され得る。いくつかの態様では、シリカ前駆体を加える前に、第1の混合物が加熱され得る。他の態様では、第1の混合物は室温であってよく、第2の混合物は加熱されてもよい。得られたMSNPは、均一または不均一な粒径を有し得、高い多孔度を有する。

30

【0123】

例えば、均一なMSNPを形成するために、塩化セチルトリメチルアンモニウム（CTAC）を水中でトリエタノールアミン（TEA）と合わせ、オルトケイ酸テトラエチルを加えながら95℃に加熱してもよい。CTACの量を一定に保ちながらTEAの量を変化させることにより、得られるMSNPのサイズを変化させることができる。いくつかの態様では、TEAの量は、約100～約600μL、約200～約450μLまたは約200～約350μLである。いくつかの態様では、TEAの量は、0.1～1%v/v、例えば0.35%v/vである。不均一なMSNPは、NaOHなどの強塩基を使用して作製され得る。例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を界面活性剤として使用してもよく、NaOHを塩基触媒として使用してもよい。

40

【0124】

酸化鉄ナノ粒子は、購入（例えばFeraheme）または合成され得る。金ナノ粒子および銀ナノ粒子は、様々な公開プロトコルに従って合成され得るか、またはSigma Aldrich、Nanocs、nanoComposixなどの販売業者から購入され得る。カーボンナノチューブは、様々な公開プロトコルに従って合成され得るか、またはSigma Aldrich、US Research nanomaterialおよびAmerican Elementsなどの販売業者から購入され得る。

【0125】

いくつかの態様では、限定されることなく、チオール、アミン、カルボキシレートまたはホスホネートなどの官能基が、1つまたは複数の試薬、例えば、（3-アミノプロピル）トリエトキシシランおよび（3-アミノプロピル）トリメトキシシランなどのオルガノシランの使用による合成中に、ナノ粒子、例えばMSNPの外面に付加され得る。オルガノ

50

シランは、界面活性剤がMSNPから除去される前または除去された後に加えられる。類似の試薬および他の有機試薬、例えば、グルタチオン、メルカプトプロピオン酸、DMSA、PEG-チオール、オレイン酸およびデキストランを使用して、酸化鉄ナノ粒子、銀ナノ粒子、金ナノ粒子、およびカーボンナノチューブを修飾してもよい。官能化ナノ粒子は直接購入することもでき、例えば、カルボン酸、アミド、ポリアミノベンゼンスルホン酸、オクタデシルアミン、およびPEGによって表面修飾されたカーボンナノチューブは、Sigma Aldrichから購入することができる。

【0126】

得られたNP（例えば、表面修飾後のMSNP）は、任意の適切なサイズ、例えば、約20nm～約200nm、約20nm～約400nm、約20nm～約500nm、約20nm～約100nm、約30nm～約100nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約50nm～400nm、約50～500nm、約30nm～約80nm、40nm～約80nm、約30nm、約40nm、約30nm～約60nm、約50nm、約60nm、約80nm、約100nm、約120nmまたは約150nmであり得る。

【0127】

得られた免疫原性構築物、例えば、抗原または抗原産生因子を負荷したNPは、適切なサイズ、例えば、約20nm～約200nm、約30nm～約100nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約30nm～約80nm、40nm～約80nm、約30nm、約40nm、約30nm～約60nm、約100nm～200nm、約100nm～約500nm、約100nm～約999nm、約100nm～約400nm、約50nm、約60nm、約80nm、約100nm、約120nm、約150nm、約200nm、約300nm、約400nm、約500nm、約600nm、約700nm、約800nm、約900nm、約999nmであり得る。

【0128】

XI. 脂質被覆ナノ粒子を含む免疫原性構築物

脂質被覆ナノ粒子コア（例えば、本明細書において開示されるナノ粒子のいずれか）を含む免疫原性構築物も本明細書において開示される。いくつかの態様では、脂質被覆リン酸カルシウムを含む免疫原性構築物は、リン酸カルシウムコア（CaP-L）から構成され、コアは、例えば、 CaCl_2 と Na_2HPO_4 と周囲の脂質層との反応によって形成される。Ca/Pモル比は、10～200の範囲であり得る。CaPコアナノ粒子のサイズは、5～999nm（例えば、約20nm～約200nm、約30nm～約100nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約30nm～約80nm、40nm～約80nm、約30nm、約40nm、約30nm～約60nm、約50nmまたは約60nm）の範囲であり得る。脂質層の厚さは、1～999nm（例えば、約20nm～約200nm、約30nm～約100nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約30nm～約80nm、40nm～約80nm、約200～約750nm、約500～999nm約30nm、約40nm、約30nm～約60nm、約50nmまたは約60nm）の範囲であり得る。脂質層は、カチオン性脂質（例えば、DOTAP、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、D-Lin-MC3-DMA）、PEG化脂質（例えば、DMG-PEG 2000、DSG-PEG 2000）、官能基を有する官能化PEG化脂質（例えば、-SH、-NH₂、-COOH）と標的化剤（例えば、マンノース、または本明細書において開示されるもののいずれか）とコンジュゲートされたPEG化脂質、リン脂質（例えば、1,2-ジステアロイル-sn-3-ホスホコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジン酸（DOPA）またはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE））およびコレステロールのうちの1つまたは複数を含む。上記の脂質の各々は、脂質層の0～100%（w/w）（例えば、0～10%、0～20%、0～30%、0～40%、0～50%、0～60%、0～70%、0～80%、0～90%、5～15%、5～25%、10～50%、25～75%、50～90%、または約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、もしくは100%）を占め得る。PEG化脂質/官能化PEG化脂質/標的化PEG化脂質は、安定性を高め、血液中の免疫原性構築物の循環を延長するのに対して、リン脂質組成物およびコレステロールは、脂質被覆構造体を形成し、安定化する。官能化PEG化脂質は、核酸および/または抗原とさらにコンジュゲートするためのものである。標的化PEG化脂質は、標的とされる細

胞への取込み効率を高めるためのものである。リン酸カルシウムコアは、CaP-Lの0.1～99.9%（w/w）（例えば、0～10%、0～20%、0～30%、0～40%、0～50%、0～60%、0～70%、0～80%、0～90%、5～15%、5～25%、10～50%、25～75%、50～90%、または約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、もしくは99.9%）を占め得る。脂質層は、CaP-Lの0.1～99.9%（w/w）（例えば、0～10%、0～20%、0～30%、0～40%、0～50%、0～60%、0～70%、0～80%、0～90%、5～15%、5～25%、10～50%、25～75%、50～90%、または約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、もしくは99.9%）を占め得る。CaP-Lの形成を助けるために、1種または複数種の界面活性剤（例えば、Tween 80、Tween 20、Span 80、Span 20、PVP、SDS、SLS、PEG）を含めることができる。界面活性剤:CaP-L重量比は、0～50%の範囲であり得る。負荷されたカーゴの有無にかかわらず、CaP-Lの流体力学的サイズは、10nm～10ミクロン（例えば、約80nm～約200nm、または約90nm～約150nm、約1ミクロン～約2ミクロン）の範囲であり得る。

10

20

30

40

【0129】

いくつかの態様では、1種または複数種のオリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNAおよびCpGオリゴヌクレオチドのうちの1つまたは複数）は、ナノ粒子のコア（例えば、Ca²⁺カチオンとオリゴヌクレオチドの核酸骨格のリン酸基との間のイオン相互作用によるリン酸カルシウムコア）に負荷される。いくつかの態様では、1種または複数種のオリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNAおよびCpGオリゴヌクレオチドのうちの1つまたは複数）は、カチオン性脂質と核酸骨格のリン酸基との間のイオン相互作用によって脂質層に負荷される。いくつかの態様では、1種または複数種のオリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNAおよびCpGオリゴヌクレオチドのうちの1つまたは複数）は、脂質層の官能化PEG化脂質にコンジュゲートされる。例えばCaP-Lへの1種または複数種のオリゴヌクレオチドの負荷は、ナノ粒子の0.01～10重量%の範囲であり得る。

【0130】

いくつかの態様では、1種または複数種の抗原または抗原産生因子（例えば、ペプチド、タンパク質および多糖のうちの1つまたは複数）は、ナノ粒子のコア（例えばリン酸カルシウムコア）に負荷される。いくつかの態様では、適切な親水性-親油性バランスを有する1種または複数種の抗原または抗原産生因子（例えば、ペプチド、タンパク質および多糖のうちの1つまたは複数）は、脂質層に挿入される。いくつかの態様では、1種または複数種の抗原または抗原産生因子（例えば、ペプチド、タンパク質および多糖のうちの1つまたは複数）は、ナノ粒子（例えば、ファンデルワールス相互作用、および/またはリン酸カルシウムコアのCa²⁺イオンとのイオン相互作用を介したリン酸カルシウムナノ粒子）の表面に吸着される。いくつかの態様では、1種または複数種の抗原または抗原産生因子（例えば、ペプチド、タンパク質および多糖のうちの1つまたは複数）は、共有結合を介して脂質層の官能化PEG化脂質にコンジュゲートされ得る。ナノ粒子（例えばリン酸カルシウムナノ粒子）への1種または複数種の抗原または抗原産生因子の負荷は、ナノ粒子の0.01～10重量%の範囲であり得る。

【0131】

XII. 免疫原性構築物製剤および使用方法

免疫原性構築物は、当技術分野において公知のように、治療的、診断的または研究的使用のために製剤化され得る。免疫原性構築物は、インビボまたはエクシビボ用途のために使用され得る。免疫原性構築物に含有される因子の効果は、細胞内または細胞外で起こり得る。

【0132】

免疫原性構築物は、製剤化直後に使用され得るか、または保存され得る。いくつかの態様では、免疫原性構築物は、糖様トレハロースなどの凍結乾燥保護剤を使用して乾燥状態になるように凍結乾燥され得る。最適なトレハロースおよび凍結乾燥条件により、新たに

50

作製された材料と比較して、粒径ならびに電荷および効果に関して、例えば、ある特定の siRNA を含有する免疫原性構築物に対する遺伝子ノックダウン効果に関して、免疫原性構築物が保存され得る。本開示の免疫原性構築物は、凍結乾燥した場合、少なくとも6ヶ月間安定である。

【0133】

免疫原性構築物は、薬学的組成物中の薬学的に有効な賦形剤とともに製剤化され得る。薬学的組成物は、活性剤、例えば、免疫原性構築物に結合していないアジュバント、凍結乾燥保護剤、安定化剤、保存剤および/または可溶化剤を含み得る。治療的投与のための免疫原性構築物の有効量は、例えば、臨床的および患者特異的因子に応じて、当業者によって容易に決定されるであろう。

10

【0134】

これらおよび他の有効な単位投与量は、単回用量で、または複数回の連日、毎週もしくは毎月の用量の形態で、例えば、3週間サイクルにわたって週に2回の投与レジメンで投与され得る。追加の態様では、投与量は、臨床的および患者特異的因子に応じて、任意の適切な投与レジメンで他の治療レジメンと協調して投与され得る。免疫原性構築物の免疫原性量を含む、本開示の組成物の送達量、タイミングおよび様式は、個体の体重、年齢、性別および状態、疾患および/または関連症状の急性度などの因子に応じて、投与が予防的または治療的であるかどうかに応じて、ならびに薬物送達、吸収、半減期を含む薬物動態、および有効性をもたらすことが知られている他の因子に基づいて、個体ごとに常用的に調整される。

20

【0135】

本開示の製剤は、通常、ヒトを含む哺乳動物対象の癌、線維症および炎症を含む疾患の症状を実質的に予防または緩和するのに必要かつ十分な最小投与レジメンに近似するように選択される。治療的な投与量および投与プロトコルは、多くの場合、数日間、またはさらには1週間もしくは複数週間、もしくは1年間もしくは複数年間にわたる反復投与を含む。有効な治療レジメンはまた、数日、数週間、数ヶ月またはさらには数年にわたって持続する1日、または1日当たり複数回投与ペースで投与される予防投与量を伴い得る。

【0136】

いくつかの態様では、本開示の免疫原性構築物は、非経口投与用に製剤化され、例えば、静脈内、筋肉内、腫瘍内、鼻腔内、皮下、皮内または腹腔内投与され、本開示の多くの他の企図される組成物と同様に、製剤を哺乳動物対象の血液と等張にする抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および/または溶質を任意で含有し得る水性および非水性滅菌注射液と、懸濁化剤および/または増粘剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液とを含む。製剤は、単位用量または複数用量容器で提供され得る。本開示の追加の組成物および製剤は、非経口投与後の持続放出のためのポリマーを含み得る。非経口調製物は、そのような投与に適した溶液、分散液またはエマルジョンであり得る。主題の薬剤はまた、非経口投与後の持続放出のためにポリマーに製剤化されてもよい。薬学的に許容される製剤および成分は、典型的には、滅菌されているかまたは容易に滅菌可能であり、生物学的に不活性であり、容易に投与される。そのような材料は、薬学的配合分野の当業者に周知である。非経口調製物は、典型的には、緩衝剤および保存剤、ならびに水、生理食塩水、平衡塩類溶液、デキストロース水溶液、グリセロールなどのような薬学的および生理学的に許容される注射液を含有する。即時注射液、エマルジョンおよび懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。好ましい単位投与製剤は、本明細書において上記に記載されるような1日用量もしくは単位、1日サブ用量、またはその適切な割合の活性成分を含有するものである。

30

40

【0137】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、経口投与用に製剤化され、カプセル、錠剤、エマルジョンおよび水性懸濁液、分散液および溶液を含む任意の経口的に許容される剤形であり得る。いくつかの態様では、剤形は、経口剤形、例えば、押圧錠剤、硬質もしくは軟質ゲルカプセル、腸溶錠、浸透圧放出カプセル、または賦形剤の独自の組合せである。

50

錠剤の場合、一般的に使用される賦形剤には、ラクトース、マンニトールおよびコーンスターチが含まれる。限定されることなく、ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤も典型的に加えられる。カプセル形態での経口投与では、有用な希釈剤には、ラクトース、マンニトール、グルコース、スクロース、コーンスターチ、ジャガイモデンプンまたはセルロースが含まれる。追加の態様では、剤形にはカプセルが含まれ、カプセルは、所望の持続放出製剤を提供するための材料の混合物を含有する。水性懸濁液またはエマルジョンを経口投与する場合、活性成分を乳化剤または懸濁化剤と組み合わせて油相に懸濁または溶解することができる。所望であれば、ある特定の甘味剤、香味剤または着色剤を加えることができる。

【0138】

いくつかの態様では、免疫原性構築物は、鼻腔内投与または吸入用に製剤化される。経鼻投与または吸入のための組成物は、好都合には、エアロゾル、液滴、ゲルおよび粉末として製剤化され得る。エアロゾル製剤は、典型的には、生理学的に許容される水性または非水性溶媒中の活性物質の溶液または微細懸濁液を含み、通常、噴霧装置とともに使用するためのカートリッジまたはリフィルの形態をとることができる密封容器内の滅菌形態で単回または複数回投与量で提供される。あるいは、密封容器は、一体型分配装置、例えば、単回用量の経鼻吸入器、または使用後の廃棄を目的とした定量弁を備えたエアロゾルディスペンサーであってよい。剤形がエアロゾルディスペンサーを含む場合、それは噴射剤を含み、噴射剤は、圧縮空気などの圧縮ガス、またはフルオロ-クロロ-炭化水素などの有機噴射剤であり得る。エアロゾル剤形は、ポンプ噴霧器の形態をとることもできる。

【0139】

免疫原性構築物を送達するために、局所担体を使用してもよい。いくつかの態様では、局所担体は、エマルジョン、ゲルまたは軟膏である。他の態様では、免疫原性構築物は、スプレー製剤に製剤化され得る。クリームおよびローションなどのエマルジョンは、一方の相が他方の相に直径 $0.1\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ の範囲の液滴として分散している、少なくとも2つの非混和性相を含む分散系である。安定性を改善するために、典型的には乳化剤が含まれる。水が分散相であり、油が分散媒体である場合、エマルジョンは油中水型エマルジョンと呼ばれる。油が液滴として水相全体に液滴として分散される場合、エマルジョンは水中油型エマルジョンと呼ばれる。局所担体として使用され得るクリームおよびローションなどのエマルジョン、ならびにそれらの調製は、参照により本明細書に組み入れられる Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lloyd V. Allen 22nd ed .2012) に開示されている。

【0140】

軟膏は、均質で粘稠な半固体調製物、最も一般的には高粘度の脂っぽい濃厚な油（油80%-水20%）であり得る。軟膏は、皮膚軟化剤として、またはある程度の閉塞が望まれる場合、保護目的、治療目的もしくは予防目的で活性成分を皮膚に塗布するために使用され得る。

【0141】

クリームは、ほぼ等しい割合の油と水とのエマルジョンである。クリームは、皮膚の角質層外層に非常によく浸透する。クリームは、一般に軟膏よりも薄く、その容器から取り出された際にその形状を維持する。

【0142】

軟膏/クリームのビヒクルは、軟膏基剤として公知である。基剤の選択は、軟膏の臨床的適応症に依存する。様々な種類の軟膏基剤には、炭化水素基剤、例えば、硬質パラフィン、軟質パラフィン、マイクロクリスタリンワックスおよびセレシン; 吸収基剤、例えば、羊毛脂、蜜蝋; 水溶性基剤、例えば、マクロゴール200、300および400; ならびに乳化基剤、例えば、乳化ワックス、植物油（オリーブ油、ヤシ油、ゴマ油、アーモンド油および落花生油など）が含まれる。免疫原性構築物は、基剤に分散され、薬物が創傷に浸透した後に分割される。皮膚分泌物と非混和性、混和性または乳化性である調製物を提供するために、疎水性、親水性または水乳化性基剤を組み込んで軟膏/クリームを製剤化する

10

20

30

40

50

ことができる。それらはまた、脂肪炭化水素、吸収性基剤、水除去性基剤または水溶性基剤に由来し得る。例えば、クリーム/軟膏基剤は、他の成分の中でも、活性剤、白色ワセリン、水、アラントイン、EDTA、ステアリルアルコール、Brij 721、Brij 72、メチルセルロース、ミリスチン酸イソプロピル、ソルビタンモノオレエート、ステアリン酸ポリオキシシル40、ブチル化ヒドロキシトルエン、プロピレングリコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、脱イオン水を100%まで含有し、中性pHに緩衝することができる。

【0143】

別の態様では、本開示の免疫原性構築物を送達するために使用される局所担体は、ゲル、例えば、二相ゲルまたは単相ゲルである。ゲルは、液体が相互浸透した小さな無機粒子または大きな有機分子の懸濁液からなる半固体系である。ゲル塊が小さな個別の無機粒子のネットワークを含む場合、それは二相ゲルとして分類される。いくつかの態様では、液体は水または別の水性媒体であってよく、ゲル塊はヒドロゲルとして定義される。ヒドロゲルは、アルジネート、ポリアクリレート、ポリアルキレンオキシドおよび/またはポリN-ビニルピロリドンを含むことができる。ヒドロゲルはまた、プロピレングリコールまたはグリセリンなどの湿潤剤を含有するカルボキシメチルセルロースの製剤などの固体とは対照的に、非晶質、すなわち粘性ゲルであってよい。例示的な非晶質ヒドロゲルには、マルトデキストラ (maltodextra) - β -グルカン、アセマンナン、カルボキシメチルセルロース、ペクチン、キサンタンガム、コラーゲン、ケラチンおよびハチミツが含まれる。

【0144】

免疫原性構築物は、経口投与のために生分解性カプセルに包装され得る。あるいは、免疫原性構築物懸濁液が、膀胱の内部に設置されてもよい。これは、膀胱内化学療法と同様であり、膀胱内化学療法では、膀胱に投与された薬物が膀胱内層の癌細胞と直接接触する。

【0145】

以下の例示的な態様および実施例は、本開示の特定の態様を実証するために含まれる。当業者は、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書において開示された特定の態様に多くの変更を加えることができ、同様または類似の結果を依然として得ることができることを本開示に照らして認識すべきである。以下の実施例では、説明を目的として、本開示の様々な局面の完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が記載される。ただし、当業者には、本開示がこれらの具体的な詳細を伴わず実施され得ることが理解されるであろう。他の例では、本発明を不明瞭にすることを避けるために、公知の構造および装置がさらに一般的に示されるか、または説明される。開示された発明が適用され得る多くの異なる代替の構成、装置および技術があることに留意されたい。以下の実施例は、開示された方法の例示である。本開示に照らして、当業者であれば、開示された方法のこれらの例および他の例の変形例が過度の実験を伴わず実現可能であることを認識するであろう。

【0146】

XIII. 例示的な態様

例示的な態様セット1:

1. ナノ粒子と、ナノ粒子の外面に結合した架橋カチオン性ポリマーと、架橋カチオン性ポリマーに結合した安定剤またはナノ粒子の外面に結合した安定剤と、感染因子のための抗原または抗原産生因子とを含む、免疫原性構築物。
2. アジュバントをさらに含む、態様1の免疫原性構築物。
3. アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくは界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む、態様2の免疫原性構築物。

4. アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチドを含む、態様2または3の免疫原性構築物。
5. アジュバントが、ポリI:Cを含む、態様2～4のいずれか1つの免疫原性構築物。
6. アジュバントが、ナノ粒子の1～20重量%で存在する、態様2～5のいずれか1つの免疫原性構築物。
7. ナノ粒子が、シリカナノ粒子、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、カーボンナノチューブ、またはアジュバントナノ粒子である、態様1～6のいずれか1つの免疫原性構築物。
8. ナノ粒子がメソポーラスシリカナノ粒子である、態様1～7のいずれか1つの免疫原性構築物。
9. カチオン性ポリマーが、PEI、キトサン、ポリプロピレンイミン、ポリリジン、ポリアミドアミン、ポリ（アリルアミン）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリル酸）、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリ（N-エチル-ビニルピリジニウムブロミド）、ポリ（ジメチルアミノ）エチルメタクリレートおよびポリ（エチレングリコール）-コ-ポリ（トリメチルアミノエチルメタクリレートクロリド）からなる群より選択される、態様1～8のいずれか1つの免疫原性構築物。
10. カチオン性ポリマーがPEIである、態様1～9のいずれか1つの免疫原性構築物。
11. カチオン性ポリマーが、約0.8kDa～約25kDaの分子量を有する、態様1～10のいずれか1つの免疫原性構築物。
12. カチオン性ポリマーが、ナノ粒子の1～50重量%で存在する、態様1～11のいずれか1つの免疫原性構築物。
13. 安定剤が、PEG、デキストラン、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよびポリアクリルアミドからなる群より選択される、態様1～12のいずれか1つの免疫原性構築物。
14. 安定剤がPEGである、態様1～13のいずれか1つの免疫原性構築物。
15. 安定剤が、約1kDa～約20kDaの分子量を有する、態様1～14のいずれか1つの免疫原性構築物。
16. 安定剤が、ナノ粒子の1～50重量%で存在する、態様1～15のいずれか1つの免疫原性構築物。
17. 感染因子がウイルスである、態様1～16のいずれか1つの免疫原性構築物。
18. 感染因子がβ-コロナウイルスである、態様1～17のいずれか1つの免疫原性構築物。
19. 感染因子が、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoVである、態様1～18のいずれか1つの免疫原性構築物。
20. 感染因子がSARS-CoV-2である、態様1～19のいずれか1つの免疫原性構築物。
21. 抗原または抗原産生因子が組換え全長タンパク質である、態様20の免疫原性構築物。
22. 抗原または抗原産生因子が、全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である、態様21の免疫原性構築物。
23. 抗原または抗原産生因子がタンパク質サブユニットである、態様20の免疫原性構築物。
24. 抗原または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質のS1領域、S2領域、またはRBD領域に対応するタンパク質サブユニットである、態様23の免疫原性構築物。
25. 抗原または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドである、態様20の免疫原性構築物。
26. 抗原または抗原産生因子が、配列番号：1～8のいずれか1つのペプチド配列を有する、態様25の免疫原性構築物。

10

20

30

40

50

27. 抗原または抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAである、態様20の免疫原性構築物。

28. 抗原または抗原産生因子が、ナノ粒子の0.5~20重量%で存在する、態様1~27のいずれか1つの免疫原性構築物。

29. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドをさらに含む、態様1~28のいずれか1つの免疫原性構築物。

30. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、カチオン性ポリマーに静電的に結合している、態様29の免疫原性構築物。

31. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様30の免疫原性構築物。

10

32. 少なくとも1種類のヌクレオチドが、siRNAを含む、態様31の免疫原性構築物。

33. siRNAが、そのアップレギュレーションが細胞の免疫抑制に関連する遺伝子を阻害またはダウンレギュレートする、態様32の免疫原性構築物。

34. 細胞が抗原提示細胞である、態様33の免疫原性構築物。

35. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様34の免疫原性構築物。

36. 遺伝子が、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である、態様35の免疫原性構築物。

37. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、ナノ粒子の1~10重量%で存在する、態様29~35のいずれか1つの免疫原性構築物。

20

38. 細胞に対する標的化剤をさらに含む、態様1~37のいずれか1つの免疫原性構築物。

39. 細胞が抗原提示細胞である、態様38の免疫原性構築物。

40. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様39の免疫原性構築物。

41. 標的化剤が、マンノース、抗原提示細胞上に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、または抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンドである、態様39または40の免疫原性構築物。

42. 標的化剤が、ナノ粒子の0.1~10重量%で存在する、態様38~41のいずれか1つの免疫原性構築物。

30

43. 標識剤をさらに含む、態様1~42のいずれか1つの免疫原性構築物。

44. 標識剤が、蛍光色素および/または金属プローブである、態様43の免疫原性構築物。

45. 約10nm~約10ミクロンの流体力学的直径を有する、態様1~44のいずれか1つの免疫原性構築物。

46. 約90nm~約150nmの流体力学的直径を有する、態様45の免疫原性構築物。

47. ナノ粒子が、約5~約999nmの直径を有する、態様1~46のいずれか1つの免疫原性構築物。

48. ナノ粒子と、ナノ粒子の外表面を被覆する脂質層と、感染因子のための抗原または抗原産生因子とを含む免疫原性構築物。

40

49. アジュバントをさらに含む、態様40の免疫原性構築物。

50. アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくは界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む、態様49の免疫原性構築物。

51. アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチドを含む、態様49または50の免疫原性構築物。

52. アジュバントが、ナノ粒子に負荷される、態様49~51のいずれか1つの免疫原性

50

構築物。

53. アジュバントが、脂質層上または脂質層内に負荷される、態様49～52のいずれか1つの免疫原性構築物。

54. アジュバントが、ナノ粒子の1～20重量%で存在する、態様49～53のいずれか1つの免疫原性構築物。

55. ナノ粒子が、シリカナノ粒子、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、カーボンナノチューブ、またはアジュバントナノ粒子である、態様48～54のいずれか1つの免疫原性構築物。

56. ナノ粒子がリン酸カルシウムナノ粒子である、態様55の免疫原性構築物。

57. 脂質層が、中性脂質、脂肪酸修飾脂質、リン脂質、脂肪酸、重合性脂質、カチオン性脂質、スフィンゴ脂質およびステロールから選択される脂質のうちの1つまたは複数を含む単層膜または多層膜である、態様48～56のいずれか1つの免疫原性構築物。

58. 中性脂質が、プロスタグランジン、エイコサノイドまたはグリセリドであり、脂肪酸修飾脂質が、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたは1-(12-ビオチニル(アミノドデカノイル))-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンであり、リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたは1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンであり、脂肪酸が、ステアリン酸またはラウリン酸であり、重合性脂質が、コレステロール-PEGまたはジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2Kであり、カチオン性脂質が、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパンまたはジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミドであり、スフィンゴ脂質が、スフィンゴミエリンまたはセラミドであり、ステロールが、コレステロールまたはスチグマステロールである、態様57の免疫原性構築物。

59. 脂質層が、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、コレステロール、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンおよびジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2Kを含む、態様58の免疫原性構築物。

60. 脂質層が、ナノ粒子の0.1～99.9重量%で存在する、態様48～59のいずれか1つの免疫原性構築物。

61. 感染因子がウイルスである、態様48～60のいずれか1つの免疫原性構築物。

62. 感染因子がβ-コロナウイルスである、態様48～61のいずれか1つの免疫原性構築物。

63. 感染因子が、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoVである、態様48～62のいずれか1つの免疫原性構築物。

64. 感染因子がSARS-CoV-2である、態様48～63のいずれか1つの免疫原性構築物。

65. 抗原または抗原産生因子が組換え全長タンパク質である、態様64の免疫原性構築物。

66. 抗原または抗原産生因子が、全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である、態様65の免疫原性構築物。

67. 抗原または抗原産生因子がタンパク質サブユニットである、態様64の免疫原性構築物。

68. 抗原または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質のS1領域、S2領域、またはRBD領域に対応するタンパク質サブユニットである、態様67の免疫原性構築物。

69. 抗原または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドである、態様64の免疫原性構築物。

70. 抗原または抗原産生因子が、配列番号：1～8のいずれか1つのペプチド配列を有する、態様69の免疫原性構築物。

71. 抗原または抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAである、態様64の免疫原性構築

10

20

30

40

50

物。

72. 抗原または抗原産生因子が、ナノ粒子に負荷される、態様48~71のいずれか1つの免疫原性構築物。

73. 抗原または抗原産生因子が、脂質層上または脂質層内に負荷される、態様48~72のいずれか1つの免疫原性構築物。

74. 抗原または抗原産生因子が、ナノ粒子の0.01~10重量%で存在する、態様48~73のいずれか1つの免疫原性構築物。

75. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドをさらに含む、態様48~74のいずれか1つの免疫原性構築物。

76. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、siRNAを含む、態様75の免疫原性構築物。

77. siRNAが、そのアップレギュレーションが細胞の免疫抑制に関連する遺伝子を阻害またはダウンレギュレートする、態様76の免疫原性構築物。

78. 細胞が抗原提示細胞である、態様77の免疫原性構築物。

79. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様78の免疫原性構築物。

80. 遺伝子が、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である、態様79の免疫原性構築物。

81. 少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、ナノ粒子の0.01~10重量%で存在する、態様74~80のいずれか1つの免疫原性構築物。

82. 細胞に対する標的化剤をさらに含む、態様48~81のいずれか1つの免疫原性構築物。

83. 細胞が抗原提示細胞である、態様82の免疫原性構築物。

84. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様83の免疫原性構築物。

85. 標的化剤が、マンノース、抗原提示細胞上に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、または抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンドである、態様84の免疫原性構築物。

86. 標識剤をさらに含む、態様48~85のいずれか1つの免疫原性構築物。

87. 標識剤が、蛍光色素および/または金属プローブである、態様86の免疫原性構築物。

88. 約10nm~約10ミクロンの流体力学的直径を有する、態様48~87のいずれか1つの免疫原性構築物。

89. 約90nm~約150nmの流体力学的直径を有する、態様88の免疫原性構築物。

90. ナノ粒子が、約5nm~999nmのサイズを有する、態様1~89のいずれか1つの免疫原性構築物。

91. 態様1~90のいずれか1つの免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

92. 態様1~90のいずれか1つの免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチン。

93. 細胞を態様1~90のいずれか1つの免疫原性構築物と接触させる工程を含む、抗原とアジュバントとを細胞に同時送達する方法。

94. 細胞が抗原提示細胞である、態様93の方法。

95. 細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様94の方法。

96. 細胞が筋細胞である、態様93の方法。

97. 態様1~90のいずれか1つの免疫原性構築物の免疫原性量を対象に投与する工程を含む、対象において感染因子に対する免疫応答を誘導する方法。

98. 対象がヒトである、態様97の方法。

99. 対象が免疫無防備状態である、態様97または98の方法。

100. 免疫原性構築物が、筋肉内注射によって投与される、態様97~99のいずれか1

10

20

30

40

50

つの方法。

101. 態様1～90のいずれか1つの免疫原性構築物の免疫原性量を対象に投与する工程を含む、対象の感染性疾患を治療または予防する方法。

102. 対象がヒトである、態様101の方法。

103. 対象が免疫無防備状態である、態様101または102の方法。

104. 免疫原性構築物が、筋肉内投与されるか、吸入によって投与されるか、または鼻腔内投与される、態様101～103のいずれか1つの方法。

【0147】

例示的な態様セット2:

1. ナノ粒子、

ナノ粒子の外面に静電的に結合したポリエチレンイミン (PEI) を含む、ある量の架橋カチオン性ポリマーであって、PEI含有量がナノ粒子プラットフォーム (NP) の少なくとも10重量%である、前記架橋カチオン性ポリマー、および

架橋PEIに共有結合したポリエチレングリコール (PEG) を含む、ある量の安定剤を含む、NPと、

感染因子の抗原または抗原産生因子と

を含む、免疫原性構築物であって、

前記構築物の流体力学的サイズが1ミクロン以下である、前記免疫原性構築物。

2. ナノ粒子がメソポーラスシリカナノ粒子 (MSNP) である、態様1の免疫原性構築物。

3. ナノ粒子、

ナノ粒子の外面に結合した架橋カチオン性ポリマー、および

架橋カチオン性ポリマーに結合した安定剤またはナノ粒子の外面に結合した安定剤を含む、ナノ粒子プラットフォーム (NP) と、

感染因子の抗原または抗原産生因子と

を含む、免疫原性構築物。

4. アジュバントをさらに含む、態様1または態様3の免疫原性構築物。

5. アジュバントが、CpGオリゴヌクレオチド、CpG配列を含むDNA TLRアゴニスト、非CpG DNA TLRアゴニスト、RNA TLRアゴニスト、アルミニウム塩、抗CD40抗体、融合タンパク質、サイトカイン、小分子TLRアゴニスト、油系アジュバントもしくはは界面活性剤系アジュバント、リポ多糖、植物抽出物、またはそれらの誘導体のうちの1つまたは複数を含む、態様4の免疫原性構築物。

6. アジュバントがCpGオリゴヌクレオチドを含む、態様5の免疫原性構築物。

7. アジュバントがポリI:Cを含む、態様4の免疫原性構築物。

8. アジュバントが、NPの1～20重量%で存在する、態様4～7のいずれか1つの免疫原性構築物。

9. ナノ粒子が、シリカナノ粒子、シリコンナノ粒子、酸化鉄ナノ粒子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、炭酸カルシウムナノ粒子、リン酸カルシウムナノ粒子、カーボンナノチューブ、またはアジュバントナノ粒子である、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

10. ナノ粒子がメソポーラスシリカナノ粒子 (MSNP) である、態様9の免疫原性構築物。

11. MSNPが、2～6nm、7nm、または7nm未満の平均孔径を有する、態様10の免疫原性構築物。

12. ナノ粒子が酸化鉄ナノ粒子である、態様9の免疫原性構築物。

13. カチオン性ポリマーが、PEI、キトサン、ポリプロピレンイミン、ポリリジン、ポリアミドアミン、ポリ (アリルアミン)、ポリ (ジアリルジメチルアンモニウムクロリド)、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリルアミド)、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド-コ-アクリル酸)、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリ (N-エチル-ビニルピリジニウムブロミド)、ポリ (ジメチルアミノ) エチルメタクリレート

10

20

30

40

50

、ポリ（エチレングリコール）-コ-ポリ（トリメチルアミノエチルメタクリレートクロリド）、またはそれらの2つ以上の混合物を含む、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

14. カチオン性ポリマーが、PEIであるかまたはPEIを含む、態様1または態様3の免疫原性構築物。

15. カチオン性ポリマーが、約0.8kDa～約25kDaの分子量を有する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

16. カチオン性ポリマーが、NPの1～50重量%で存在する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

17. 安定剤が、PEG、デキストラン、ポリシアル酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、またはそれらの2つ以上の混合物を含む、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

10

18. 安定剤がPEGである、態様17の免疫原性構築物。

19. 安定剤が、約1kDa～約20kDaまたは約5kDaの分子量を有する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

20. 安定剤が、NPの1～50重量%、約10～30重量%、約5～20重量%、約15重量%、または約20重量%で存在する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

21. 抗原がタンパク質を含み、タンパク質抗原が、安定剤にコンジュゲートされる、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

20

22. 抗原がペプチドであり、ペプチド抗原が、架橋カチオン性ポリマーに静電的に結合している、態様1または態様3の免疫原性構築物。

23. 抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAであり、抗原産生因子が、架橋カチオン性ポリマーに静電的に結合している、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

24. 感染因子がウイルスである、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

25. 感染因子がβ-コロナウイルスである、態様24の免疫原性構築物。

26. 感染因子が、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、またはMERS-CoVである、態様25の免疫原性構築物。

30

27. 感染因子がSARS-CoV-2である、態様26の免疫原性構築物。

28. 抗原が、組換え全長SARS-CoV-2タンパク質であるか、または抗原産生因子が、組換え全長SARS-CoV-2タンパク質をコードする、態様27の免疫原性構築物。

29. 全長SARS-CoV-2タンパク質が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質、またはSARS-CoV-2膜タンパク質である、態様21または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

30. 抗原が、タンパク質サブユニットであるか、または抗原産生因子が、タンパク質サブユニットをコードする、態様27の免疫原性構築物。

31. タンパク質サブユニットが、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質S1領域、S2領域、または受容体結合ドメイン（RBD）領域に対応する、態様30の免疫原性構築物。

40

32. 抗原が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドであるか、または抗原産生因子が、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の免疫原性配列に対応するペプチドをコードする、態様27または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

33. ペプチドが、配列番号：1～8のいずれか1つの配列を含む、態様32の免疫原性構築物。

34. 抗原産生因子が、mRNAまたはpDNAである、態様27の免疫原性構築物。

35. 感染因子が、細菌、寄生生物、原虫、または真菌である、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

36. 抗原または抗原産生因子が、NPの0.5～20重量%で存在する、態様1もしくは態

50

様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

37. 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドをさらに含む、態様1または態様3の免疫原性構築物。

38. 少なくともオリゴヌクレオチドが、カチオン性ポリマーに静電的に結合している、態様37の免疫原性構築物。

39. 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが、siRNA、miRNA、miRNA模倣物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様38の免疫原性構築物。

40. 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドがsiRNAを含む、態様38の免疫原性構築物。

41. siRNAが、

その発現またはアップレギュレーションが細胞の免疫抑制に関連する、遺伝子を阻害またはダウンレギュレートする、態様40の免疫原性構築物。

42. 細胞が抗原提示細胞である、態様41の免疫原性構築物。

43. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様42の免疫原性構築物。

44. 遺伝子が、STAT3、IDO-1、IL-6、またはPD-L1である、態様43の免疫原性構築物。

45. オリゴヌクレオチドが、NPの1~10重量%で存在する、態様37の免疫原性構築物。

46. 細胞に対する標的化剤をさらに含む、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

47. 細胞が抗原提示細胞である、態様46の免疫原性構築物。

48. 抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様47の免疫原性構築物。

49. 標的化剤が、

マンノース、

抗原提示細胞上に提示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、または

抗原提示細胞上の表面受容体に結合するリガンド

のうちの少なくとも1つを含む、態様48の免疫原性構築物。

50. 約10nm~約10ミクロンの流体力学的直径を有する、態様3の免疫原性構築物。

51. 約30nm~約200nmの流体力学的直径を有する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

52. 約80nm~約999nmの流体力学的直径を有する、態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物。

53. 態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の複数の免疫原性構築物を含む、免疫原性組成物。

54. 態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物と、少なくとも1つの生物学的または薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

55. 態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、ワクチン。

56. 細胞を態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物と接触させる工程を含む、抗原とアジュバントとを細胞に同時送達する方法。

57. 細胞が抗原提示細胞である、態様56の方法。

58. 細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、態様57の方法。

59. 細胞が筋細胞である、態様56の方法。

60. 態様1もしくは態様3または本セットの任意の他の態様の免疫原性構築物の免疫刺激量を対象に投与する工程を含む、方法。

61. 対象において感染因子に対する免疫応答の誘導をもたらす、態様60の方法。

62. 対象の感染性疾患の治療または予防をもたらす、態様60の方法。

63. 対象がヒトである、態様62の方法。

10

20

30

40

50

64. 対象が免疫無防備状態である、態様62の方法。

65. 免疫原性構築物が、経皮投与されるか、筋肉内投与されるか、吸入によって投与されるか、または鼻腔内投与される、態様62の方法。

【実施例】

【0148】

XIV. 実験例

実施例1. 免疫原性構築物の調製

以前に記載されたように、PEIおよびPEGで被覆された、メソポーラスシリカベースのナノ粒子を合成した（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる国際出願番号PCT/US2016/022655を参照）。要約すると、ゾルゲル合成によってメソポーラスシリカナノ粒子（MSNP）を合成した。ポリエチレンイミン（PEI）およびポリエチレングリコール（PEG）で、MSNPコアを層ごとに被覆した。また、オリゴヌクレオチド送達の効果および安全性を高めるために、MSNP上のPEIを架橋した（主にそれ自体に対して）（Ngamcherdtrakul et al., Advanced Functional Materials, 25 (18): 2646-2659, 2015を参照）。このような架橋は、カーゴの緩衝能およびエンドソーム脱出を増加させ、ナノ粒子プラットフォーム（NP）の表面電荷も減少させる。NPまたは免疫原性構築物の表面電荷が減少すると、ワクチン接種にとって重要な抗原提示細胞の安全性がもたらされる（図16を参照）。本実施例で使用したMSNPの孔径をTEMによって測定したところ、2~3nmであり、Barrett-Joyner-Halenda（BJH）孔径分析（例えば、窒素の吸着および脱着を介して）によって測定したところ、6.6nmであった。架橋PEIと、PEGとで被覆されたMSNPは、以後、ナノ粒子プラットフォームまたは「NP」と呼ばれる。

【0149】

10分の混合によってCpG 1826（マウス配列; Invivogen）をNP上に静電的に負荷したが、さらに短い時間（2~5分）も有効であった。遠心分離によってカーゴ負荷NPを分離する際に上清中に遊離カーゴ分子が存在しないことによって確認されるように、完全な結合様式で負荷を行った。siRNAをDy677色素（Dharmacon）とコンジュゲートさせ、蛍光シグナルによって定量した。Nanodrop分光光度計、マイクロプレート分光光度計またはゲル電気泳動によって、上清中の非結合CpGおよびsiRNAカーゴ含有量を測定した。NPとの2時間の混合によって（PEI層上の）NPとの非共有結合相互作用を介してSIINFEKL（SF; 配列番号：90）ペプチドを負荷したが、さらに短い時間も有効であった。大きなタンパク質（抗体、全長タンパク質）は、典型的には共有結合によって負荷されるが（実施例4）、非共有結合も可能である。スパイクタンパク質などの大きなタンパク質カーゴは、メソポーラスシリカの小孔（例えば、2~6nm）の内部にカプセル化されず、代わりに、材料の表面に付着する（例えば、PEG-PEI層上にコンジュゲートされるか、もしくは静電的に結合されるか、または外部シリカ表面上への吸着）。

【0150】

ペプチド/タンパク質にコンジュゲートした蛍光色素の蛍光シグナル、またはBCAアッセイのいずれかによって、上清中の非結合ペプチドまたはタンパク質の量（遠心分離時）を特性評価した。他のタンパク質アッセイも使用することができる。複数の種類のカーゴ負荷では、得られた免疫原性構築物の流体力学的サイズ（直径）は、細胞取込みに適した5ミクロン未満（例えば、1ミクロン未満）のままである。図2に示すように、NPに5重量%のSF（非共有結合を介して）と2重量%のCpGとを負荷した場合、それらは約100nmの流体力学的サイズを維持した。表3に示すように、ナノ粒子プラットフォーム（熱重量測定分析（TGA）によって特性評価したMSNP-PEI-PEG [15重量%の架橋PEIと10重量%のPEGとを負荷したMSNP]）に約3重量%のスパイクタンパク質（例えば、共有結合を介して）と、2重量%のsiRNAと、4重量%のCpGとを負荷したところ、150nm未満の流体力学的サイズを維持した。siRNAおよびCpGは、免疫原性構築物上に最後に負荷される。約2~4重量%のsiRNA負荷では、サイズを150nm未満に維持しながら、約4~9重量%のCpGを負荷することができる（表4）。対応する最終重量%で完全な結

合様式で（遠心分離時に上清中に非結合カーゴが存在しないことによって確認される）、先に記載されたように、NP溶液と混合することによってCpG、siRNAおよびペプチドを負荷した。実施例1～4を通してCpG 1826（マウス配列）を使用したか、CpG 7909/2006（ヒト配列）も評価したところ、同様の特性が得られた。負荷率はいずれも、NPの重量による。

【0151】

表3は、1) 15重量%の架橋PEIと10重量%のPEGとで被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子（NP）、2) 約2重量%のsiRNAと約6重量%のCpGとを負荷したNP、3) スパイクタンパク質（3重量%）コンジュゲートNP（スパイク-NP）、および4) 約2重量%のsiRNAと約4重量%のCpGとを負荷したスパイク-NPの流体力学的サイズを示す。Malvern Zetasizerを使用した3回の測定から、平均サイズ（Z平均）および多分散性指数（PDI）を示す。負荷はいずれも、ナノ粒子プラットフォーム（NPまたはPEG-PEI-MSN）の重量による。

【0152】

（表3）

材料	流体力学的サイズ	PDI
NP	90.1 ± 0.8	0.17 ± 0.03
(2%) siRNA-(6%) CpG-NP	106.6 ± 0.4	0.15 ± 0.01
スパイク-NP	84.4 ± 0.5	0.12 ± 0.01
スパイク-(2%) siRNA-(4%) CpG-NP	146.1 ± 6.1	0.18 ± 0.01

【0153】

表4は、PEIとPEG（NP）とで被覆され、NPの約2～4重量%のsiRNAと約4～9重量%のCpGとを負荷したメソポーラスシリカナノ粒子の流体力学的サイズを示す。

【0154】

（表4）

材料	流体力学的サイズ	PDI
(2%) siRNA-(4%) CpG-NP	95.5 ± 1.3	0.14 ± 0.01
(2%) siRNA-(6%) CpG-NP	106.6 ± 0.4	0.15 ± 0.01
(2%) siRNA-(9%) CpG-NP	146.7 ± 1.5	0.22 ± 0.03
(4%) siRNA-(6%) CpG-NP	120.4 ± 1.7	0.17 ± 0.02

【0155】

CpGに加えて、他のアジュバント、例えば、ポリI:C（Adipogen）を免疫原性構築物上に非共有結合的に負荷することができる。ポリI:C溶液とNP溶液とを10分間混合することによって、ポリI:CをNP上に静電的に、かつ完全な結合様式で負荷した。流体力学的サイズは、約2重量%の負荷では小さいままであったが（88nm）、約9重量%の負荷では顕著に増加した（4.8ミクロン）（図3）。

【0156】

実施例2. 免疫抑制遺伝子（例えば、STAT3、PD-L1）をノックダウンするためのCpGおよびオリゴヌクレオチド（例えば、siRNA）のNP同時送達

STAT3は、強力な免疫抑制遺伝子と考えられている。STAT3に対するsiRNA（siSTAT3）を負荷したNPのノックダウン効果を決定するために、siSTAT3-NP（PEIとPEGとで被覆された、実施例1からのメソポーラスシリカ）を用いて、免疫細胞（すなわち、樹状細胞、マクロファージ）および様々な癌細胞（B16-F10、HCC1954、D17）を48

時間処理した後、RNA単離およびqRT-PCRを行って、該細胞株に対するSTAT3のノックダウン効果を決定した。図4Aに示すように、免疫原性構築物 (siSTAT3-NP) は、免疫細胞株および癌細胞株の両方に対して、 $>70\%$ の標的遺伝子ノックダウンをもたらす。同じsiSTAT3配列は、ヒト細胞、イヌ細胞およびマウス細胞では、STAT3遺伝子をノックダウンすることができる (図4A)。siRNAおよびCpGの両方を負荷した同じ免疫原性構築物は、免疫細胞および癌細胞ではともに、STAT3をノックダウンするのに依然として有効であった (図4B)。興味深いことに、siSCR-NPもDC内でSTAT3レベルを低下させることが見出された (図4Cを参照)。細胞生存率が未処置対照と対比して変化せず、STAT3 mRNAがハウスキーピングmRNAによって正常化されたため、これはNP毒性によって引き起こされなかった。いかなる説明にも拘束されるものではないが、抗酸化剤が、STAT3活性化を含む免疫抑制経路に対抗することが以前に報告されたため (Yoon et al., Autophagy, 6 (8) :1125-1138, 2010)、これは、メソポーラスシリカナノ粒子の抗酸化特性に起因し得ることが提案されている。一方、Dharmafect (Horizon Discovery製の、カチオン性脂質 (非抗酸化剤) に基づく市販のトランスフェクション剤) は、DC内でSTAT3発現を増加させ (図4C)、望ましくない免疫抑制性TMEをもたらし得ることが見出された。図4Dは、ナノ粒子を使用して、PD-L1 siRNAを送達して肺細胞内でPD-L1タンパク質発現をノックダウンすることもできることを示す。これは、Ngamcherdtrakul et al., Advanced Functional Materials, 25 (18) :2646-2659, 2015、およびMorry et al., Biomaterials, 66:41-52, 2015に記載されている抗酸化剤メソポーラスシリカナノ粒子プラットフォームの使用が、STAT3媒介経路を制御するために脂質ナノ粒子よりも有利であり得ることを示唆している。

10

20

30

40

【0157】

NP (PEG-PEI-MSN) には、免疫原性構築物の流体力学的サイズを150nm未満に維持しながら、NPの2~4重量%のsiRNAと4~9重量%とを負荷することができる (表4)。図5および図6に示すように、CpGとsiSTAT3とのインビボNP同時送達、CpGまたはsiSTAT3単独のNP送達よりも良好な適応免疫を誘発する。C57BL/6マウスの両肩に250Kおよび100KのB16F10黒色腫細胞を移植して、それぞれ局所 (原発性) および遠位 (転移性) 腫瘍をモデル化した。腫瘍移植の8日後、局所腫瘍に合計3用量、それぞれ3日間隔で処置を腫瘍内注射したのに対して、遠位腫瘍は未処置のままにした。図5A~Cに示すように、腫瘍サイズおよび生存率を週に少なくとも2回モニタリングした。図5は、siSTAT3とCpGとのNP同時送達 (siSTAT3-CpG-NP) が、(siSTAT3による) 免疫抑制環境を調節し、CpG (CpG-NP) またはsiTAT3単独 (siSTAT3-NP) を送達するNPよりも、局所処置腫瘍 (図5A) および遠位腫瘍 (図5B) の両方における大きな腫瘍減少、ならびに優れた生存率 (図5C) によって証明される、優れた全身抗腫瘍免疫応答をもたらすことを示す。図6は、siSTAT3-CpG-NP処置が、局所 (処置) 腫瘍および遠位 (未処置) 腫瘍 (図6A) ならびに関連する排出リンパ節 (DLN) の両方に対して有意に高いCD8/Treg比をもたらしたことを示しており (生理食塩水と対比して $p<0.05$) (図6B)、インサイチュー腫瘍ワクチン接種の成功を裏付けている。患者の腫瘍内では、制御性T細胞 (Treg) は典型的に上昇し、CD8⁺T細胞活性を含む抗腫瘍免疫応答を抑制する。活性化T細胞はまた、腫瘍排出リンパ節ではさらに増殖した (図6C)。これらの結果は、免疫細胞および他の細胞 (例えば、癌細胞または筋細胞) 内で標的遺伝子をノックダウンする免疫原性構築物の能力を実証し、siRNAとアジュバント (例えばCpG) との同時送達のために本開示の免疫原性構築物を使用する理論的根拠を提供する。図5および図6におけるインサイチュー癌ワクチン接種について、腫瘍は抗原のデポーとして信頼するに値した (したがって、構築物に外部抗原を加えなかった)。

【0158】

実施例3. 適応 (抗原特異的) 免疫応答を誘導するためのCpGと抗原とのNP同時送達

全身性抗原特異的免疫を誘導するCpG-SF-NP (CpGおよびSFを負荷したNP) の能力を決定するための試験を行った。要約すると、C57BL/6マウス ($n=3$ /群) に、CpG-SF-NPの免疫原性構築物、SF (SF-NP) またはCpG単独 (CpG-NP) を負荷したNP、お

50

よび不完全フロイントアジュバント (IFA) を用いて製剤化したSF (IFA/SF) を足蹠を介して注射した。未処置マウスを対照として含めた。処置の1週間後、マウスの脾臓から細胞を採取し、これをGolgi blockを用いて処理し、SFの存在下または非存在下で6時間インキュベートした。その産生がCD8+T細胞応答に対応する細胞内IFN γ をフローサイトメトリーによって分析した。図7に示すように、CpG-SF-NPは、エキスビボペプチド再刺激後に優れたCD8+T細胞応答を誘導した。実施例1~3からの結果は、アジュバント、抗原および/またはオリゴヌクレオチドの同時送達のために本開示の免疫原性構築物を使用することに関する強力な理論的根拠を提供する。

【0159】

実施例4. スパイクタンパク質コンジュゲートNP (免疫原性構築物) の合成

一例として、全長SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質 (Sino Biological) をNPに共有結合させた (PEI-PEG-MSNP)。要約すると、スパイクタンパク質を1時間かけてチオール化した後、NPと混合し、4°Cで一晩振盪した。振盪後、最終免疫原性構築物を洗浄し、上清のBCAアッセイによって決定される非結合タンパク質の量に基づいて、最終スパイクタンパク質含有量をNPの3重量%であると決定した。静電相互作用を介して (室温で5~10分間振盪)、siRNA (ルシフェラーゼまたは非標的スクランブルsiRNA に対する) とCpGとを免疫原性構築物上に最後に負荷した。スパイクコンジュゲートNPの流体力学的サイズは、100nm未満であり、スパイク糖タンパク質の負荷後も150nm未満のままであった (表3および図8A)。スパイク-NPは、ヒト細胞内でモデル遺伝子 (ルシフェラーゼ) をノックダウンするためにsiRNAを効果的に送達することができた (図8B)。要約すると、細胞を3500細胞/ウェルで播種し、37°Cで一晩インキュベートした。翌日、30または60nMのsiRNA用量でスパイク-NPを用いて細胞を処理した。処理の48時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼグロアッセイキット (ThermoFisher Scientific) によってルシフェラーゼ活性について分析し、製造プロトコル (ThermoFisher Scientific) に従ってBCAタンパク質アッセイキットによってタンパク質濃度について分析した。溶解物のルシフェラーゼ活性を同じウェル内の対応するタンパク質濃度によって正規化し、未処理対照のパーセンテージとして報告した。処理はいずれも4連で行った。

【0160】

実施例5. 脂質被覆リン酸カルシウムナノ粒子プラットフォーム (CaP-L) の合成

油中水型マイクロエマルジョン中でリン酸カルシウムナノ粒子 (CaPNP) を合成した。要約すると、60 μ Lの2.5M CaCl₂ (Fisher Scientific, USA) を4mLのシクロヘキサン (Sigma, USA) /Igepal CO-520 (Sigma, USA) (71:29, v/v) に分散させて、カルシウム相を形成した。60 μ Lの12.5mM Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, USA) を、別の4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (71:29, v/v) に分散させて、ホスフェート相を形成した。40 μ Lの20mM 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (Avanti Polar Lipids, USA) のCHCl₃ (Fisher Scientific, USA) 溶液をホスフェート相に加えた。次いで、ホスフェート相をカルシウム相に滴下した。混合物を室温で0、10、15または20分間攪拌した。等体積のエタノール (Decon Labs, USA) を加えて、マイクロエマルジョンを破壊した。CaPNPを21,000gで15分間の遠心分離によって回収し、次いで、無水エタノールを用いて3回洗浄して残留油相を除去した。ペレットを100 μ LのCHCl₃に懸濁した。10 μ LのCaPNPのCHCl₃溶液と、1.4 μ Lの20mMジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (Sigma, USA)、1.4 μ Lの20mMコレステロール (Sigma, USA)、2.8 μ Lの20mMジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2K (Avanti Polar Lipids, USA) および0.7 μ Lの20mM 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (Sigma, USA) のCHCl₃溶液とを混合した後、わずかな槽内超音波処理 (bath sonication) によって、CaP-Lを形成した。次いで、CHCl₃を減圧下で除去し、100 μ LのPBS 1X (pH=7.2) を用いて再水和することによってCaP-Lを形成した。Zetasizer (ZS-90/Malvern, Malvern, U.K.) を用いて、CaP-Lの流体力学的サイズを測定した (表5)。

【0161】

表5は、脂質被覆リン酸カルシウムNP (CaP-L)、およびCaP-Lの0.3重量%のsiRNAを負荷したCaP-Lの流体力学的サイズを示す。

【0162】

(表5)

材料	流体力学的サイズ	PDI
CaP-L	98.1 ± 0.6	0.25 ± 0.02
siRNA/CaP-L	90.6 ± 2.8	0.26 ± 0.03

10

【0163】

siRNA負荷脂質被覆CaP-L (siRNA-CaP-L) の合成

油中水型マイクロエマルジョン中でsiRNA負荷リン酸カルシウムナノ粒子を合成した。要約すると、5 µgのsiRNAを60 µLの2.5M CaCl₂ (Fisher Scientific, USA) に加え、その後、得られた溶液を4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (Sigma, USA) (71:29、v/v) に分散させて、カルシウム相を形成した。60 µLの12.5mM Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, USA) を、別の4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (71:29、v/v) に分散させて、ホスフェート相を形成した。40 µLの20mM 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (Avanti Polar Lipids, USA) のCHCl₃ (Fisher Scientific, USA) 溶液をホスフェート相に加え、次いで、ホスフェート相をカルシウム相に滴下した。混合物を室温で10分間攪拌し、その後、等体積のエタノール (Decon Labs, USA) を加えて、マイクロエマルジョンを破壊した。得られたsiRNA-CaP-Lを21,000gで15分間の遠心分離によって回収し、次いで、無水エタノールを用いて3回洗浄して残留油相を除去した。このようにして得られたペレットを100 µLのCHCl₃に懸濁した。10 µLのsiRNA-CaP-LのCHCl₃溶液と、1.4 µLの20mM ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (Sigma, USA)、1.4 µLの20mM コレステロール (Sigma, USA)、2.8 µLの20mM ジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2K (Avanti Polar Lipids, USA) および0.7 µLの20mM 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (Sigma, USA) のCHCl₃溶液とを混合した後、わずかな槽内超音波処理によって、siRNA-CaP-Lを形成した。次いで、CHCl₃を減圧除去し、100 µLのPBS 1X (pH=7.2) を用いて再水和することによってCaP-Lを形成した。Zetasizer (ZS-90/Malvern, Malvern, U.K.) を用いて、siRNA-CaP-L流体力学的サイズを測定した (表5)。該材料は、ヒト細胞では (モデルタンパク質としての) ルシフェラーゼをノックダウンすることができ (図9A)、細胞にとって安全であることが分かった (図9B)。

20

30

【0164】

siRNA/CpG負荷脂質被覆CaP-L (siRNA/CpG-CaP-L) の合成

油中水型マイクロエマルジョン中でsiRNA負荷リン酸カルシウムナノ粒子 (siRNA-CaP-L) を合成した。要約すると、5 µgのsiRNA (スクランブルsiRNA) を60 µLの2.5M CaCl₂ (Fisher Scientific, USA) に加えた。その後、上記溶液を4mLのシクロヘキサン (Sigma, USA) /Igepal CO-520 (Sigma, USA) (71:29、v/v) に分散させて、カルシウム相を形成した。60 µLの12.5mM Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, USA) を、別の4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (71:29、v/v) に分散させて、ホスフェート相を形成した。40 µLの20mM 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (Avanti Polar Lipids, USA) のCHCl₃ (Fisher Scientific, USA) 溶液をホスフェート相に加えた。次いで、ホスフェート相をカルシウム相に滴下し、混合物を室温で10分間攪拌した。等体積のエタノール (Decon Labs, USA) を加えてマイクロエマルジョンを破壊し、このようにして得られたsiRNA-CaP-Lを21,000gで15分間の遠心分離によって回収し、次いで、無水エタノールを用いて3回洗浄して、残留油

40

50

相を除去した。得られたペレットを100 μ LのCHCl₃に懸濁した。10 μ LのsiRNA-CaP NPのCHCl₃溶液と、1.4 μ Lの20mMジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (Sigma,USA)、1.4 μ Lの20mMコレステロール (Sigma,USA)、2.8 μ Lの20mMジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2K (Avanti Polar Lipids,USA) および0.7 μ Lの20mM 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (Sigma,USA) のCHCl₃溶液とを混合した後、わずかな槽内超音波処理によって、siRNA/CaP-Lを形成した。次いで、CHCl₃を減圧除去し、2 μ gのCpG (CpG 7909/2006) を含有する、100 μ LのPBS 1X (pH=7.2) を用いて再水和することによってsiRNA/CpG-CaP-Lを形成した。

【0165】

mRNA/siRNA/CpG負荷脂質被覆CaP NP (mRNA/siRNA/CpG-CaP-L) の合成

油中水型マイクロエマルジョン中でmRNA/siRNA負荷リン酸カルシウムコア (mRNA/siRNA-CaP NP) を合成した。2.5 μ gのsiRNA (スクランブルsiRNA) および2.5 μ gのmRNA (ホタルシフェラーゼmRNA) を60 μ Lの2.5M CaCl₂ (Fisher Scientific,USA) に加えた。その後、上記溶液を4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (Sigma,USA) (71:29、v/v) に分散させて、カルシウム相を形成した。60 μ Lの12.5mM Na₂HPO₄ (Fisher Scientific,USA) を、別の4mLのシクロヘキサン/Igepal CO-520 (71:29、v/v) に分散させて、ホスフェート相を形成した。40 μ Lの20mM 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (Avanti Polar Lipids,USA) のCHCl₃ (Fisher Scientific,USA) 溶液をホスフェート相に加えた。次いで、ホスフェート相をカルシウム相に滴下した。混合物を室温で10分間攪拌した。等体積のエタノール (Decon Labs,USA) を加えて、マイクロエマルジョンを破壊した。mRNA/siRNA-CaP NPを21,000gで15分間の遠心分離によって回収し、次いで、無水エタノールを用いて3回洗浄して残留油相を除去した。ペレットを100 μ LのCHCl₃に懸濁した。10 μ LのmRNA/siRNA-CaP NPのCHCl₃溶液と、1.4 μ Lの20mMジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (Sigma,USA)、1.4 μ Lの20mMコレステロール (Sigma,USA)、2.8 μ Lの20mMジステアロイル-rac-グリセロール-PEG2K (Avanti Polar Lipids,USA) および0.7 μ Lの20mM 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (Sigma,USA) のCHCl₃溶液とを混合した後、わずかな槽内超音波処理によって、mRNA/siRNA/CaP-Lを形成した。次いで、CHCl₃を減圧下で除去し、1 μ gのCpG (CpG 7909/2006) を含有する、100 μ LのPBS 1X (pH=7.2) を用いて再水和することによってmRNA/siRNA/CpG-CaP-Lを形成した。

【0166】

実施例6. COVID-19ワクチン (AIRISE-CoV) のための免疫原性構築物

AIRISE-CoVの合成および特性評価。AIRISE-CoVは、架橋ポリエチレンイミン (PEI) およびポリエチレングリコール (PEG) ポリマー層で被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子 (MSNP、50nm) コアからなる。本発明者らの以前の研究 (Ngamcherdtrakul et al., Advanced Functional Materials, 25 (18):2646-2659, 2015、および米国特許出願公開第2017/0173169号。) における抗体負荷と同様に、外部でのPEGとのコンジュゲーションによってSARS-CoV-2スパイク糖タンパク質抗原 (S) を負荷し、続いて、PEIとの静電相互作用を介してCpGオリゴヌクレオチドおよびsiRNAを負荷し、PEG層による酵素分解から保護する。生還元性 (bio-reducible) 架橋は、低分子量PEI (10kDa) の使用を可能にして、毒性を伴わずに細胞質ゾルへのsiRNAまたはタンパク質のエンドソーム脱出に必要な高分子量PEI (25kDa) の効果を実現する。ナノ粒子プラットフォームは、小さな粒径 (約200nm) を維持しながら、複数の種類のカーゴ (siRNA、CpG) を負荷し、保護するためのその汎用性のために癌ワクチン送達に使用されてきた。癌ワクチン用途では、本発明者らは、構築物上に抗原を負荷せず、ワクチン効果を生み出すために (腫瘍内注射を介して) 腫瘍内の抗原に依存する。AIRISE-CoVの最終組成は、15% PEI、10% PEG (TGAによる)、3% スパイクタンパク質 (ピシンコニン酸アッセイ (BCA) による) (いずれもNPの重量による) である。それぞれ

10

20

30

40

50

NPの4重量%および2重量%でCpGおよびsiRNAを負荷する（完全な負荷はnanodropによって確認される）。

【0167】

ナノ粒子上のsiSTAT3およびCpGは、DC活性化を効果的に促進する。本発明者らは、足蹠注射時に、siSTAT3およびCpGの両方を負荷したNPが、単一成分を送達するNPよりも効果的に、排出リンパ節（DLN）内でDCを活性化し得ることを図10に示す。生理食塩水と比較した場合、AIRISE処置マウスのみが、排出リンパ節内で有意に高い割合の活性化DCを示す（ $p < 0.05$ ）。非排出リンパ節（NDLN）では活性がないようであり、DCプライミングの局所的な効果が示唆される。免疫細胞の集団を定量するための抗体染色方法は、公開されている報告（Ngamcherdtrakul et al., Advanced Material, 2021; doi:10.1002/adma.202100628）に従う。

10

【0168】

AIRISE-CoVをワクチン接種したマウスにおけるSARS-CoV-2 IgG抗体の存在。図11に示すように、AIRISE-CoVをワクチン接種したBALB/cマウスは、ELISAのエンドポイント力価によって評価した場合、血清中に高レベルのSARS-CoV-2結合IgG抗体を生成した。エンドポイント力価は、SARS-CoV-2結合抗体が検出可能である血清希釈倍数を表し、体液性免疫原性（抗体産生）の誘導を評価するために広く使用されている。AIRISE-CoVは、1用量および2用量後にそれぞれ 10^5 および 10^6 のエンドポイント力価を誘発し（図11）、これは、他の主要なCOVID-19ワクチン候補と同等またはそれよりも良好である（表6）。

20

【0169】

図12Aでは、本発明者らは、最初の用量後12週間まで、全免疫マウスにおいて高レベルのIgG抗体が維持されたことを示す。さらに、本発明者らは、全長スパイクタンパク質抗原を2つの免疫原性スパイクペプチド（424～433および891～906、JPT Peptide Technologies製）によって置き換えると、顕著な抗体価が誘発されなかったことを示し（図12B）、全長スパイクタンパク質抗原の使用について強力な理論的根拠を提供する。静電相互作用を介して、ナノ構築物上に両ペプチドを負荷した。いかなる説明にも拘束されるものではないが、2つのペプチドは強い応答を誘発しなかった。ただし、抗原特異的免疫応答を誘発するための有効なペプチド送達について、同じNPが以前に示された（例えば、SF送達、図7）。

30

【0170】

本発明者らは、AIRISE-CoVを足蹠を介して注射した（図13、合計2用量）、または筋肉内注射した（図14A、1用量のみ）マウスが、今日まで高レベルの抗体を持続していることを見出した（すなわち、足蹠投与経路を介して最大54週間、筋肉内経路を介して36週間）。このことは、抗体生成、および体液性免疫の誘導が長期間持続することを示唆している。

【0171】

（表6）主要なCOVID-19ワクチンまたはワクチン候補の抗体（Ab）応答

名称 (企業)	ワクチンの種類	ヒトにおける抗体価 (対回復期)	マウスにおける抗体価 (エンドポイント力価)
mRNA-1273 (Moderna)	スパイク(S)タンパク質をコードするmRNA	5.5倍	約 10^5
ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca/Oxford)	Sタンパク質を発現するアデノウイルスベクター	同等	約 $10^2 \sim 10^3$
BNT162b1 (Pfizer/BioNTech)	三量体S-RBDをコードするmRNA	約2～5倍	N/A
NVX-CoV2373 (Novavax)	三量体Sタンパク質を有する組換えNP	6倍	約 10^5
INO-4800 (Inovio)	Sタンパク質をコードするDNAワクチン	N/A	約 10^3

40

50

【0172】

スパイクタンパク質、siSTAT3およびCpGを有するAIRISE-CoVは、免疫抑制対象または免疫無防備状態の対象（例えば、加齢対象、または免疫系を損なう疾患および状態を有する対象）に対する有効なワクチン接種のために開発された。しかし、試験した正常な免疫マウスでは、本発明者らは、スパイクタンパク質のみ、スパイクタンパク質およびsiSTAT3（図14B）、またはスパイクタンパク質およびCpG（図14C）を負荷したPEIおよびPEGで被覆されたメソポーラスシリカナノ粒子（NP）もまた、これらのマウスでは、高く、かつ持続性の抗体レベルをもたらし得ることを見出し、NPが抗原送達に効果的に使用されて、遊離抗原（npなし）よりも良好なワクチンを作製することができることが示唆された。図14B～図14Cに示すように、1用量のsiSTAT3負荷スパイク-NP（図14B）または1用量のCpG負荷スパイク-NP（図14C）によるワクチン接種もまた、少なくとも36週間持続する高レベルのSARS-CoV-2 IgG抗体を誘発し得る。このことは、抗体生成、および体液性免疫の誘導が、長期間持続することをさらに実証している。これは、NPがカーゴを保護および保持し、それらを抗原提示細胞に効果的に送達する能力に起因する可能性がある。

10

【0173】

免疫血清によるSARS-CoV-2擬似ウイルスの中和。SARS-CoV-2特異的IgG抗体がSARS-CoV-2の中和に有効であるかどうかを決定するために、本発明者らは、ヒトACE2（スパイクタンパク質結合受容体）を発現するHEK293由来細胞株のトランスフェクションからSARS-CoV-2擬似ウイルスを阻害する免疫血清の能力を評価する広く使用されている方法である擬似ウイルス（CoV2-S-PsV）中和アッセイを構築した。このアッセイは、SARS-CoV-2スパイク（S）タンパク質によって偽型された複製欠損GFPコードレポーターレンチウイルスを利用する。したがって、中和能は、%GFP+細胞によって決定される（すなわち、低い%GFP+は、中和抗体の存在に起因して、擬似ウイルスがHEK293-hACE2細胞をトランスフェクトすることができないことを示唆する）。図15は、AIRISE-CoVをワクチン接種したマウスから得られた血清中の抗体価がCoV2-S-PsV感染をどのように効果的に中和する（すなわち、ACE2受容体への結合を阻害する）ことができるかを示しているが、ナイーブマウスから得られた血清は効果がなかった。さらに、本発明者らは、2用量後の中和価（50%のウイルスを中和するために必要な希釈;NT₅₀）が、表7に示すように、回復期患者血清に見られる中和価よりも高いかまたはそれと同等であることを見出した。

20

30

【0174】

表7は、図15の試料から得られた中和価（50%のウイルスを中和するために必要な希釈;NT₅₀）を示す。

【0175】

（表7）

血清試料	NT ₅₀
回復期試料1	3.3×10^2
回復期試料2	2.2×10^3
AIRISE-CoV M1 (1用量)	5.74×10^1
AIRISE-CoV M2 (1用量)	7.57×10^1
AIRISE-CoV M3 (1用量)	3.02×10^2
AIRISE-CoV M1 (2用量)	1.11×10^3
AIRISE-CoV M2 (2用量)	6.09×10^3
AIRISE-CoV M3 (2用量)	6.34×10^3

40

【0176】

実施例7．架橋PEIとPEGとを有するナノ粒子（NP）は、抗原提示細胞に対して安全で

50

ある

図16に示すように、siSTAT3またはsiSTAT3+CpGを負荷した、本明細書において記載されるNPは、骨髄由来樹状細胞（BMDC、図16A）およびマクロファージ（J774、図16B）の両方に対して安全であった。NP用量は35 µg/ml（2重量%のsiRNA;7重量%のCpG%）であった。製造業者のプロトコルに従って、処置の2日後にCellTiter-Gloアッセイによって生存率を評価した。

【0177】

実施例8．mRNA負荷MSNP構築物の合成

ワクチンを生成するためのmRNA送達に、メソポーラスシリカ被覆架橋PEI（MSNP-PEI）またはメソポーラスシリカ被覆架橋PEIおよびPEG（MSNP-PEI-PEG）を使用することができる。MSNP-PEIまたはMSNP-PEI-PEGと、ホタルルシフェラーゼmRNA（ナノ粒子の1重量%）のPBS溶液とをオービタルシェーカー上、350rpmで室温で15～60分間混合した。mRNAは、粒子の外面に静電的に結合した。Zetasizerを使用して、mRNAと混合する前後の粒径を測定した（表8）。混合物を遠心分離した後、非結合mRNAを含有する上清を得た。NanoDrop（ND-1000、Thermo Scientific）を使用して、上清中のmRNA濃度を分析した。97%を超えるmRNAが、MSNP-PEIまたはMSNP-PEI-PEGに結合していた。

【0178】

表8は、mRNAを負荷したナノ粒子の流体力学的サイズを示す。

【0179】

（表8）

材料	Z-Ave (nm)	PDI
MSNP-PEI	100.7 ± 0.5	0.18 ± 0.01
MSNP-PEI-PEG	102.9 ± 1.8	0.16 ± 0.02
MSNP-PEI + 1 wt.% mRNA	222.9 ± 5.4	0.30 ± 0.04
MSNP-PEI-PEG + 1 wt.% mRNA	157.9 ± 2.2	0.35 ± 0.02

【0180】

XV．結びのパラグラフ

当業者によって理解されるように、本明細書において開示される各態様は、その特定の記載された要素、工程、成分または構成要素を含むか、それから本質的になるか、それからなることができる。したがって、用語「含む（include）」または「含む（including）」は、「含む（comprise）、からなる（consist of）、またはから本質的になる（consist essentially of）」を列挙するように解釈されるべきである。移行用語「含む（comprise）」または「含む（comprises）」は、不特定の要素、工程、成分または構成要素を大量であっても有するがそれらに限定されないこと、および含むことを可能にすることを意味する。移行句「からなる（consisting of）」は、指定されていないいかなる要素、工程、成分または構成要素も排除する。移行句「から本質的になる（consisting essentially of）」は、態様の範囲を、指定された要素、工程、成分または構成要素、および態様に実質的に影響を及ぼさないものに限定する。重大な影響とは、記載されたようにナノ粒子構築物/プラットフォームの活性（例えば免疫原性）における統計学的に有意な変化を生じるであろう。

【0181】

特に明記しない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される成分の量、分子量などの特性、反応条件などを表すすべての数字は、いずれの場合も用語「約」によって修飾されていると理解されるべきである。したがって、反対のことが示されない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載の数値パラメーターは、本発明によって得ることが求められる所望の特性に応じて変動し得る近似値である。少なくとも、特許請求の範囲に対する均等論の適用を制限する試みとしてではなく、各数値パラメーターは、報告

された有効数字の数に照らして、かつ通常の丸め技術を適用することによって少なくとも解釈されるべきである。さらに明確にする必要がある場合、用語「約」は、記載された数値または範囲と組み合わせて使用される際に、当業者によって合理的に与えられる意味を有し、すなわち、記載された値または範囲よりもいくらか大きいかいくらか小さく、記載された値の±20%、記載された値の±19%、記載された値の±18%、記載された値の±17%、記載された値の±16%、記載された値の±15%、記載された値の±14%、記載された値の±13%、記載された値の±12%、記載された値の±11%、記載された値の±10%、記載された値の±9%、記載された値の±8%、記載された値の±7%、記載された値の±6%、記載された値の±5%、記載された値の±4%、記載された値の±3%、記載された値の±2%、または記載された値の±1%の範囲内であることを示す。

10

【0182】

本発明の広い範囲を示す数値範囲およびパラメーターが近似値であるとしても、特定の実施例に示される数値は、実行可能な程度に正確に報告される。ただし、任意の数値は、それぞれの試験測定値に見出された標準偏差に必然的に起因する特定の誤差を本質的に含む。

【0183】

本発明を説明する文脈において（特に添付の特許請求の範囲の文脈において）使用される用語「a」、「an」、「the」および同様の指示対象は、本明細書において別段の指定がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を包含すると解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、その範囲内に入る各別の値を個別に言及する簡略方法として機能することを意図しているに過ぎない。本明細書において別段の指定がない限り、各個々の値は、本明細書において個別に記載されているかのように本明細書に組み入れられる。本明細書において記載されるすべての方法は、本明細書において別段の指定がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で行うことができる。本明細書において提供されるいずれかのおよびすべての実施例または例示的な文言（例えば、「など」）の使用は、単に本発明をさらによく説明することを意図するものであり、他の方法で特許請求される本発明の範囲に対して限定を課すものではない。本明細書中のいかなる文言も、本発明の実施に不可欠な特許請求されていないいずれかの要素を示すものとして解釈されるべきではない。

20

【0184】

本明細書において開示される、本発明の代替的な要素または態様の群分けは、限定として解釈されるべきではない。各群構成要素は、個別に、または群の他の構成要素もしくは本明細書において見出される他の要素と任意に組み合わせて参照および特許請求され得る。便宜および/または特許性の理由から、ある群の1つまたは複数の構成要素が、ある群に包含されるか、ある群から削除されることが予測される。そのようないずれかの包含または削除が生じる場合、本明細書は、改変された群を含み、したがって、添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュ群の記述された説明を満たすと見なされる。

30

【0185】

本発明を実施するために本発明者に公知の最良の形態を含めて、本発明の一定の態様が本明細書において記載されている。言うまでもなく、前述の説明を読めば、これらの記載された態様に対する変形例が当業者に明らかになるであろう。本発明者は、当業者がそのような変形例を適切に使用することを予測しており、本発明者らは、本発明が本明細書において具体的に記載されている以外の方法で実施されることを意図している。したがって、本発明は、適用法が許容する限り、本明細書に添付された特許請求の範囲に列挙された主題のすべての改変および均等物を含む。さらに、そのすべての可能な変形例における上述の要素の任意の組合せは、本明細書において別段の指定がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

40

【0186】

さらに、本明細書全体を通して、特許、印刷刊行物、学術論文、他の文章、およびウェブサイトコンテンツ（本明細書において参照される資料）が多数参照されている。参照さ

50

れる資料の各々は、特定の参照が含まれる優先権チェーン (priority chain) の最初の出願の出願日の時点で、参照される教示について参照によりその全体が本明細書に個別に組み入れられる。例えば、公開データベースで利用可能な本明細書で言及される化合物および核酸またはアミノ酸配列に関して、引用データベースエントリの情報は、データベース識別子が優先権チェーンの出願のテキストに最初に含まれた日付の時点で、参照により本明細書に組み入れられる。

【0187】

本明細書において開示される本発明の態様は、本発明の原理の例示であることを理解されたい。使用され得る他の改変は、本発明の範囲内である。このため、限定されることなく例として、本明細書における教示に従って、本発明の代替的な構成が利用され得る。したがって、本発明は、示され記載されたものと正確に同じものに限定されない。

10

【0188】

本明細書において示される詳細は、例としてのものであり、本発明の好ましい態様の例示的な説明のためのものに過ぎず、本発明の様々な態様の原理および概念的局面の最も有用で容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示されている。これに関連して、本発明の基本的な理解のために必要なものよりも詳細に本発明の構造的詳細を示すことは試みられておらず、図面および/または実施例を用いた説明は、本発明のいくつかの形態が実際にどのように具現化され得るかを当業者に明らかにする。

【0189】

本開示において使用される定義および説明は、実施例において明確かつ一義的に変更されない限り、または意味の適用により任意の構成が無意味もしくは本質的に無意味になる場合を除いて、将来の任意の構成を制御することを意味および意図している。定義は、用語の構成がそれを無意味または本質的に無意味にする場合、Webster's Dictionary, 11th Editionまたは当業者に公知の辞書、例えば、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2006) および/または A Dictionary of Chemistry, 8th Edition (Ed. J. Law & R. Rennie, Oxford University Press, 2020) から解釈されるべきである。

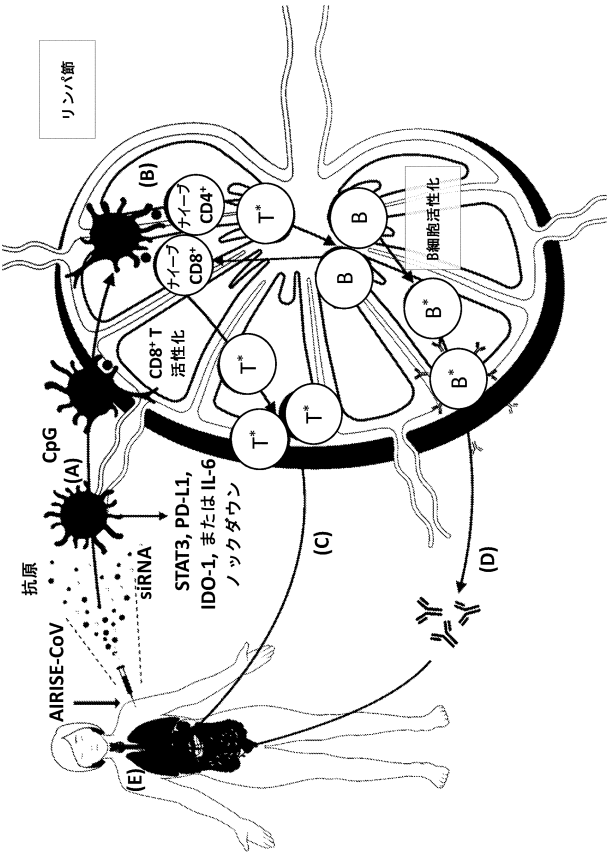
20

30

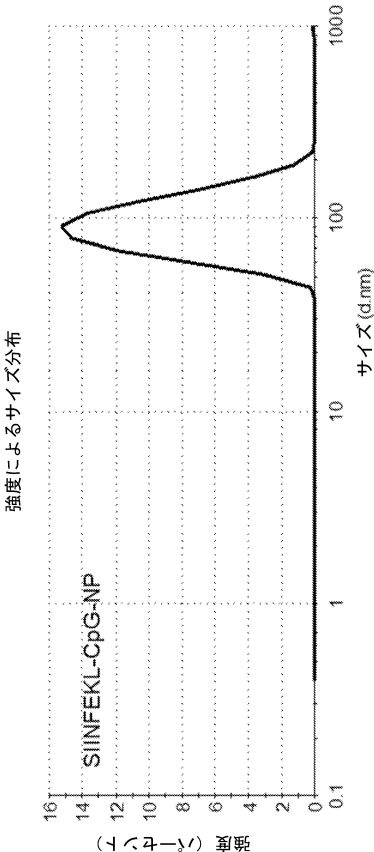
40

50

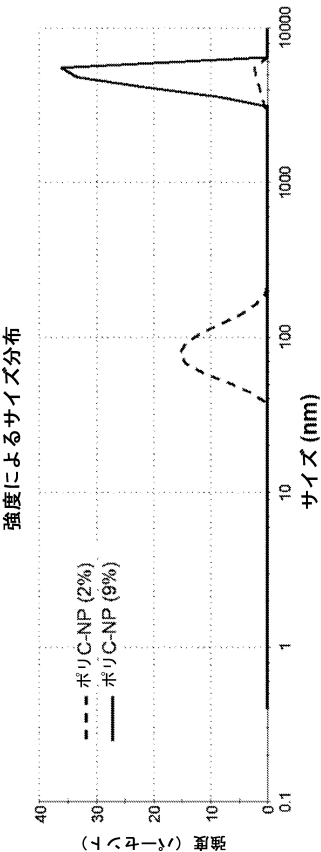
【図面】
【図 1】



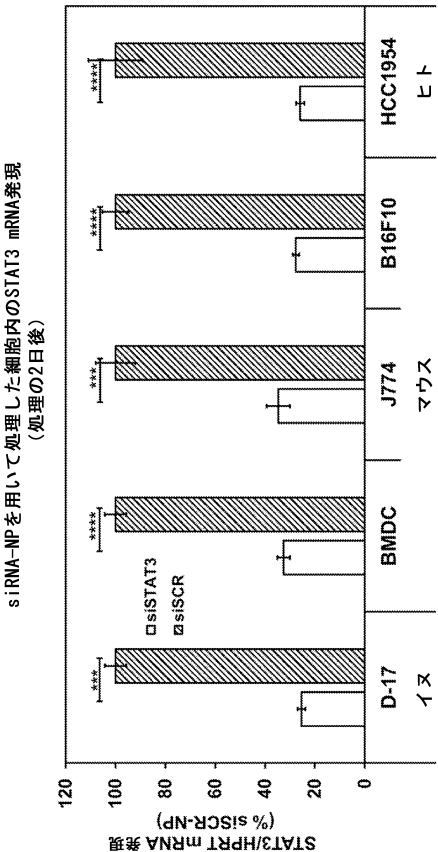
【図 2】



【図 3】



【図 4 A】



10

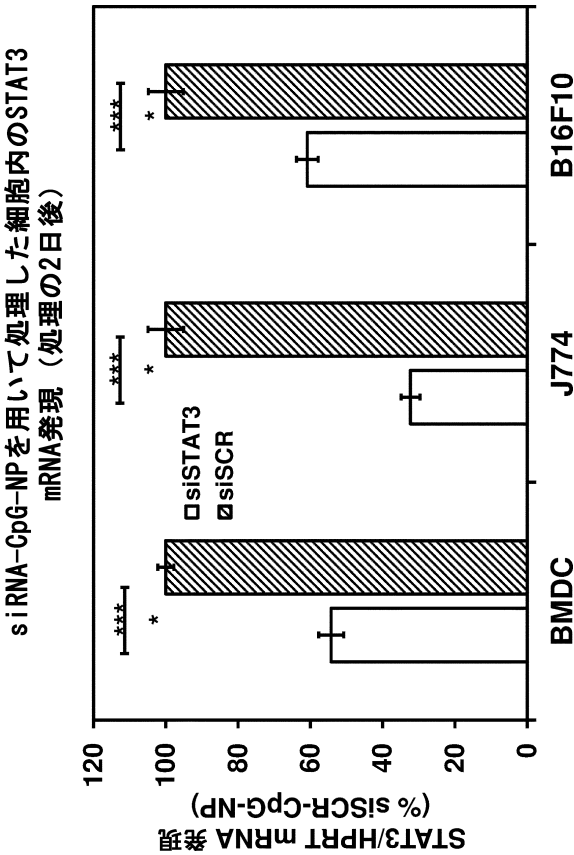
20

30

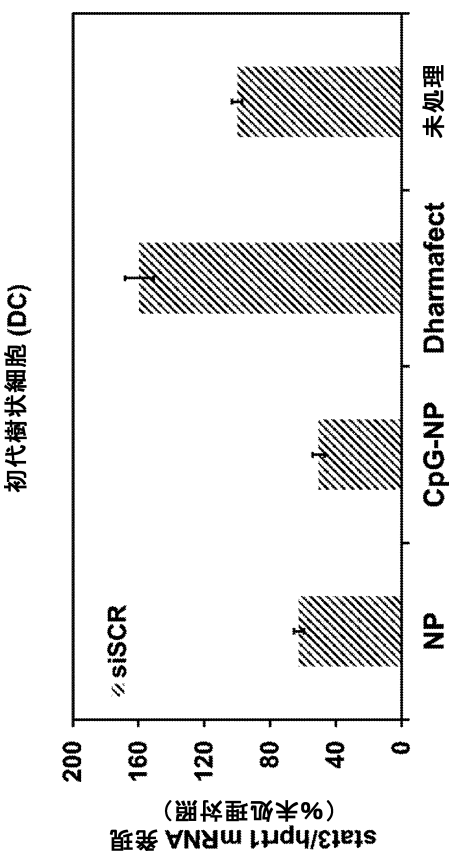
40

50

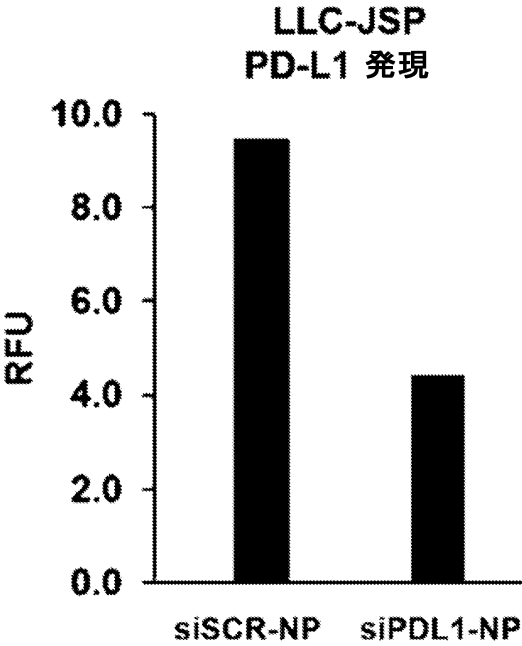
【図 4 B】



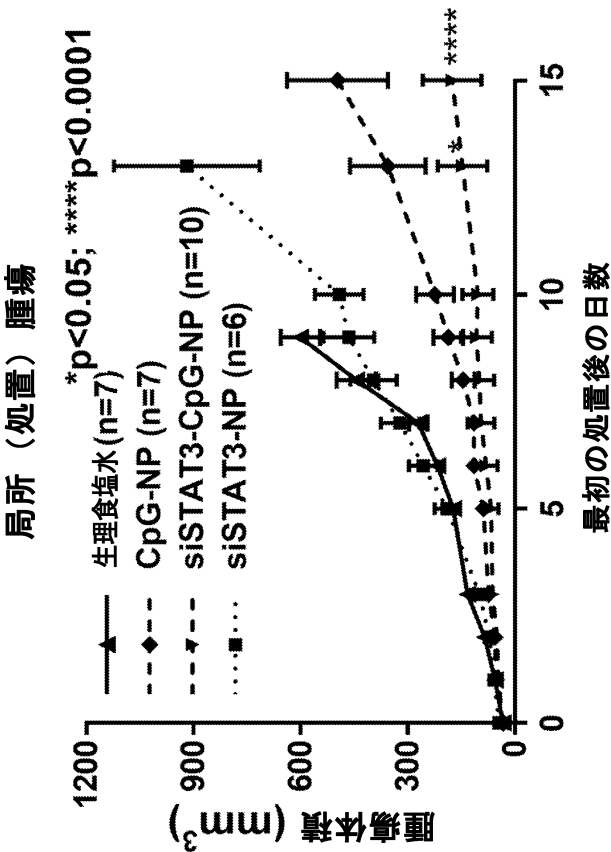
【図 4 C】



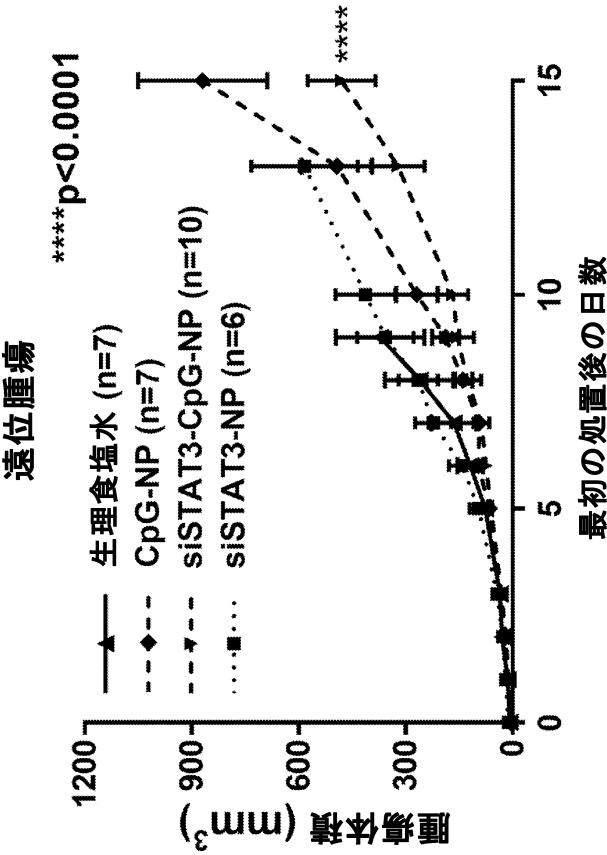
【図 4 D】



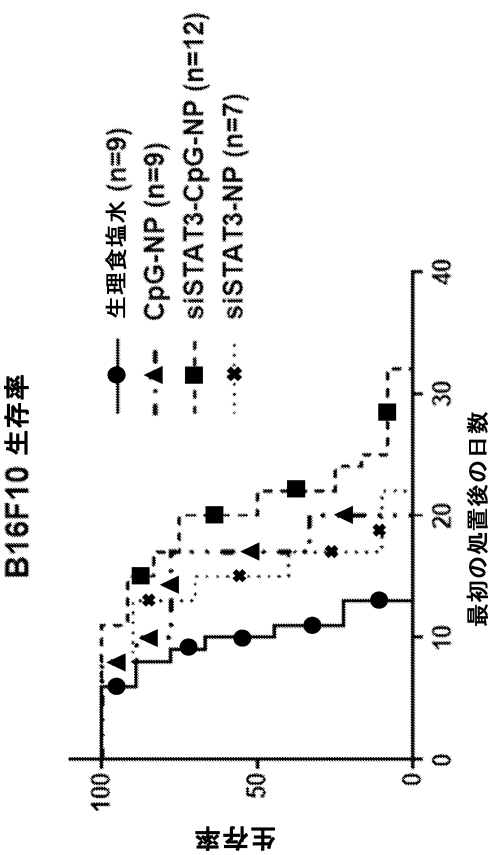
【図 5 A】



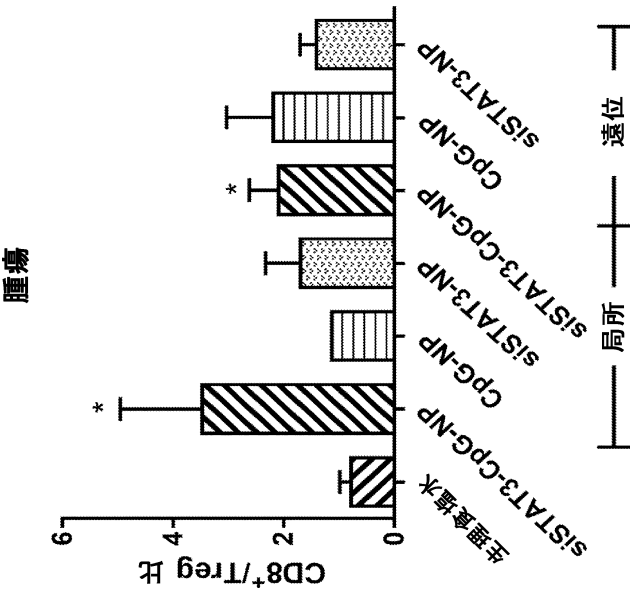
【図 5 B】



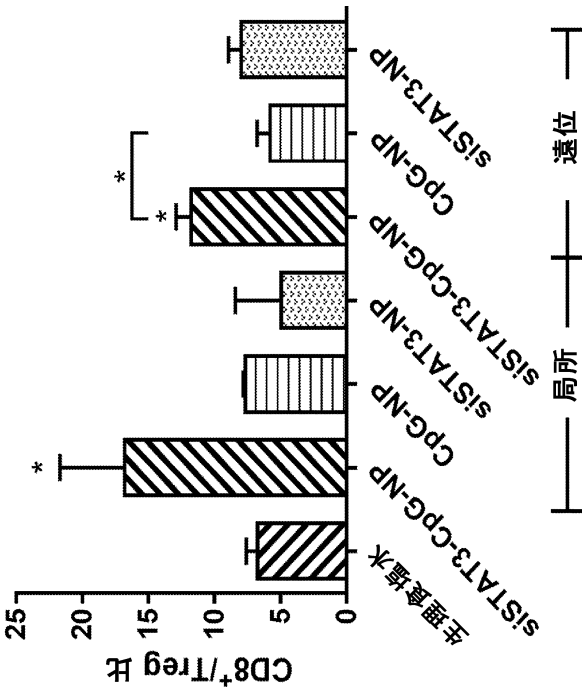
【図 5 C】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

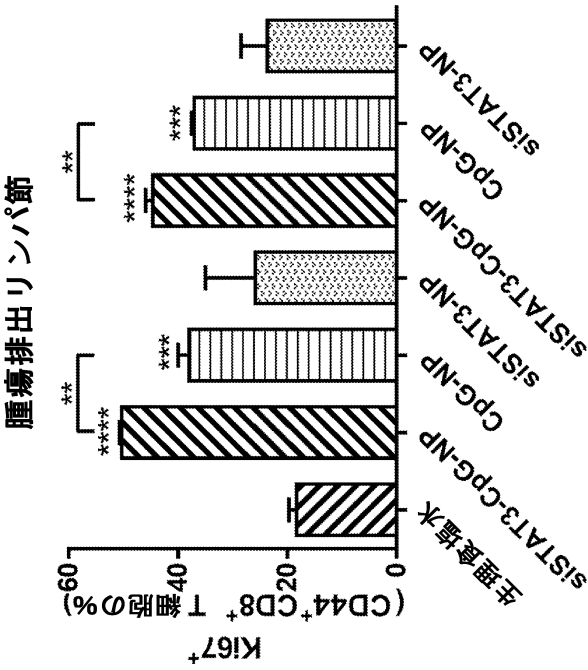
20

30

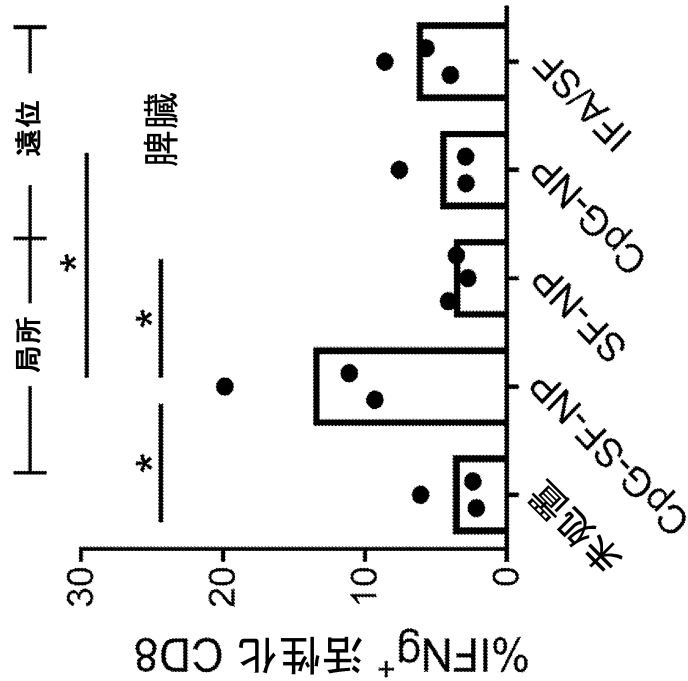
40

50

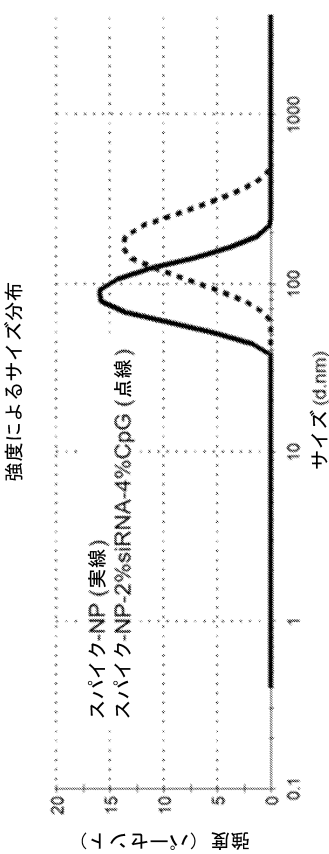
【図 6 C】



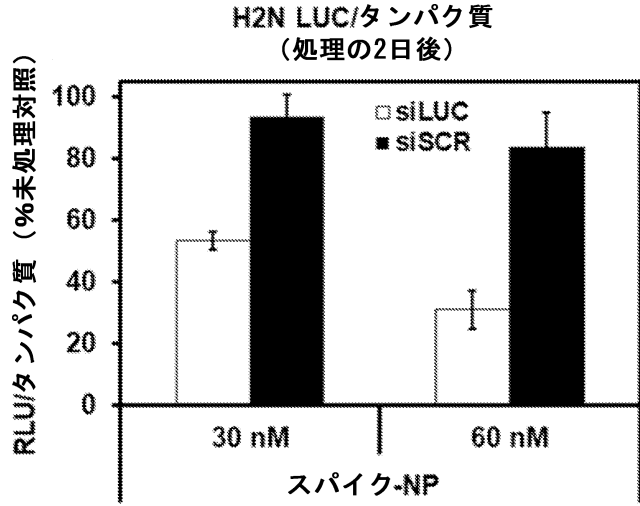
【図 7】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

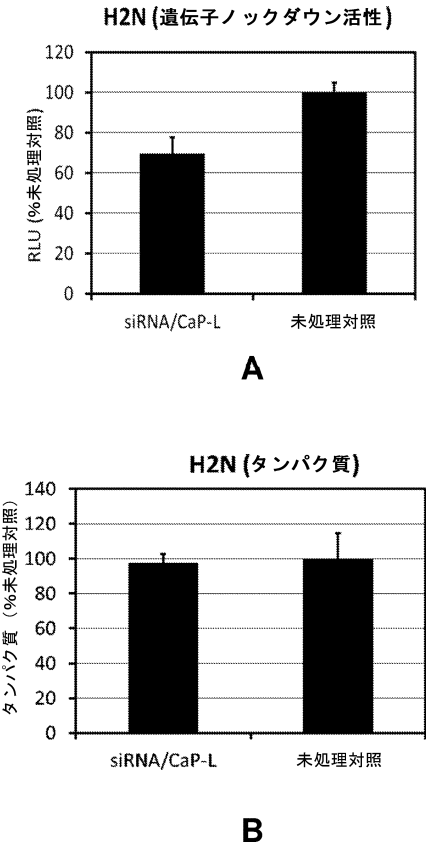
20

30

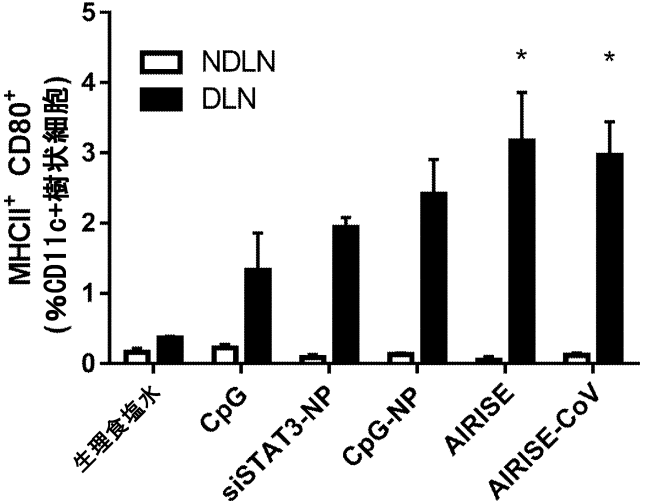
40

50

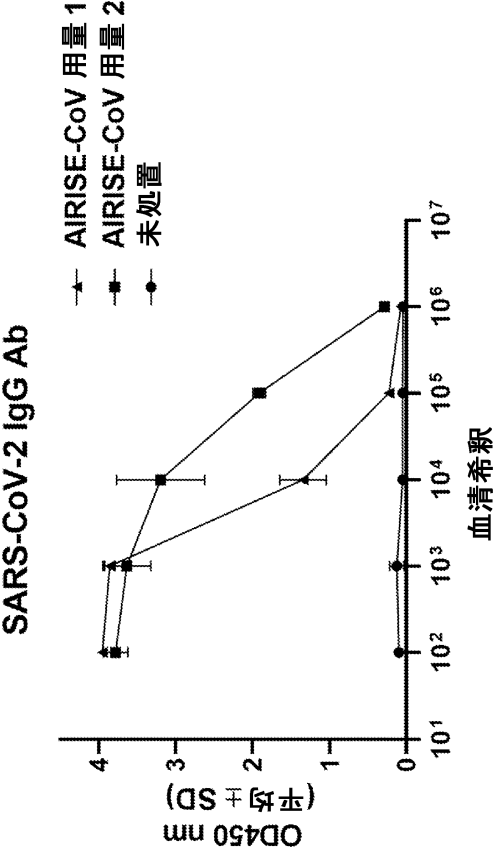
【 図 9 】



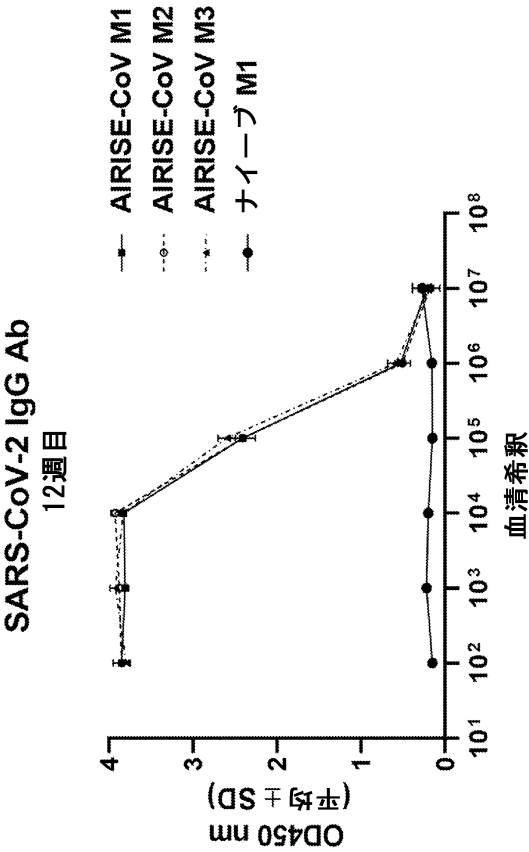
【 図 1 0 】

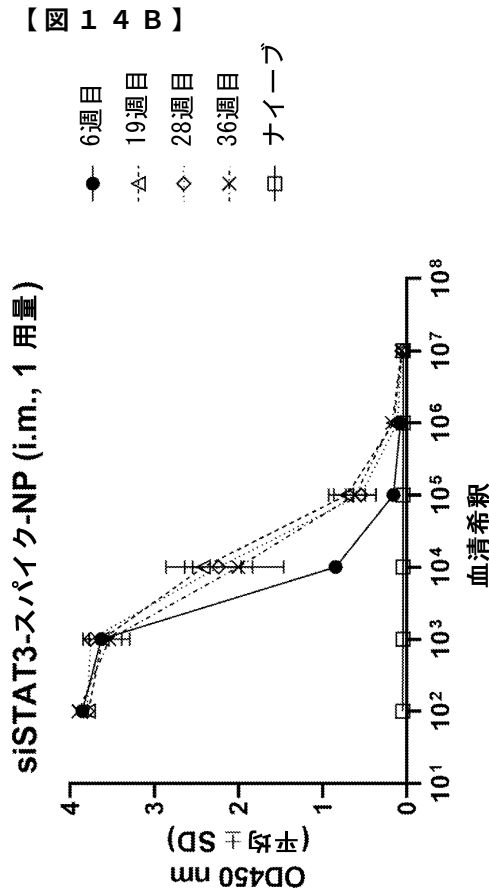
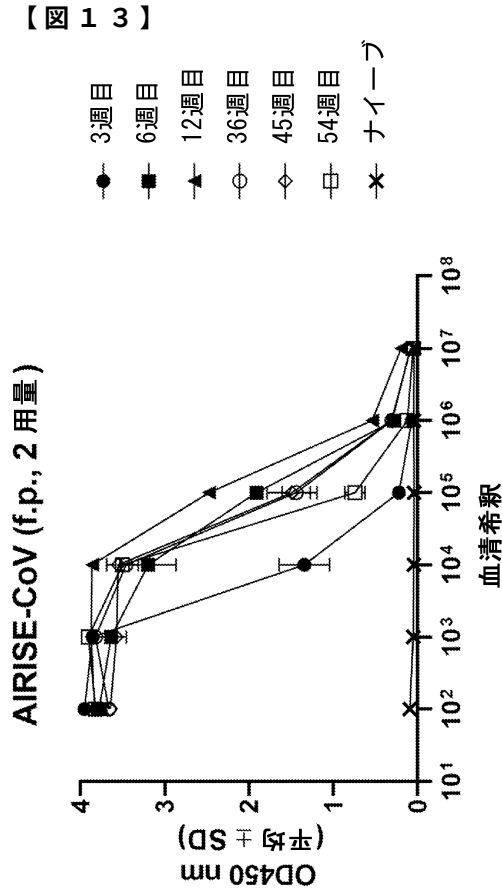
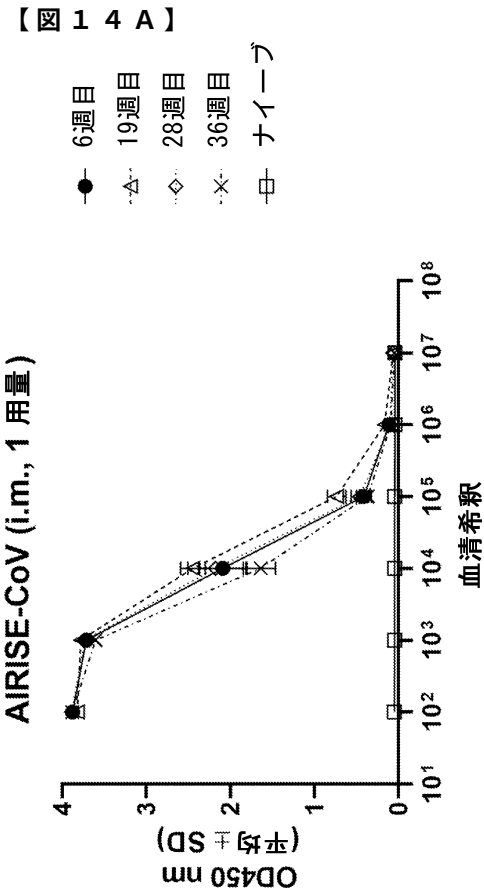
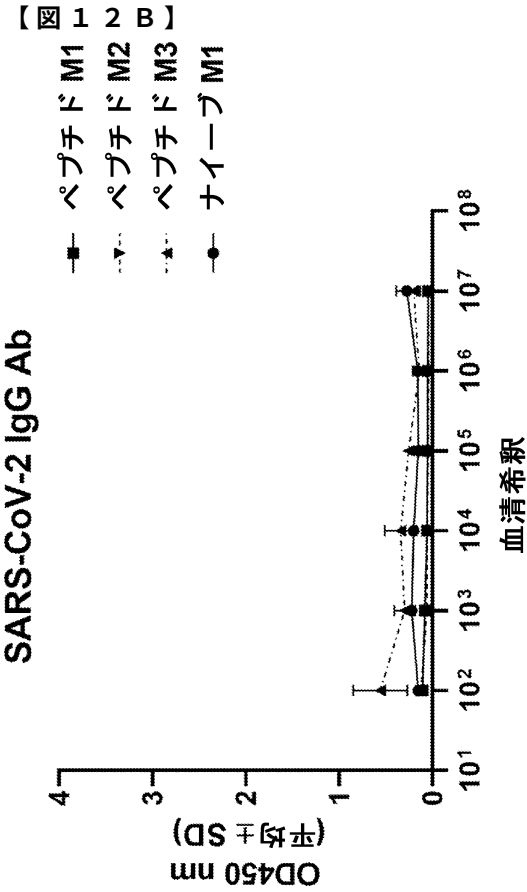


【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】





10

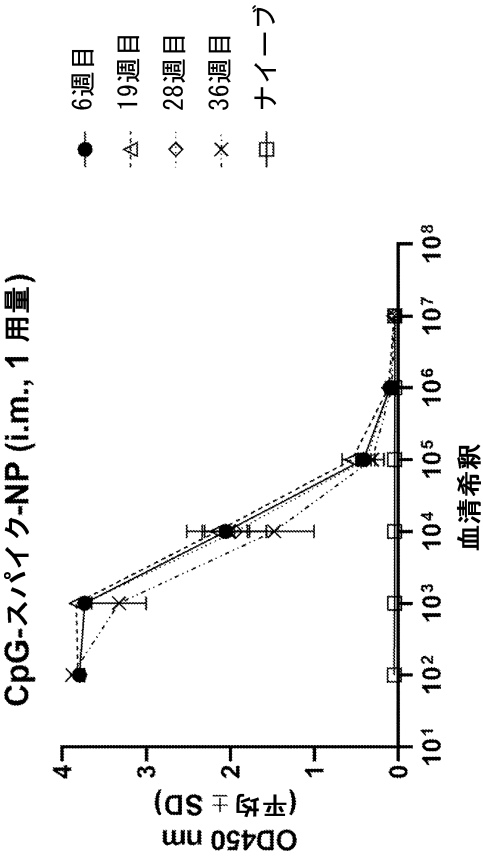
20

30

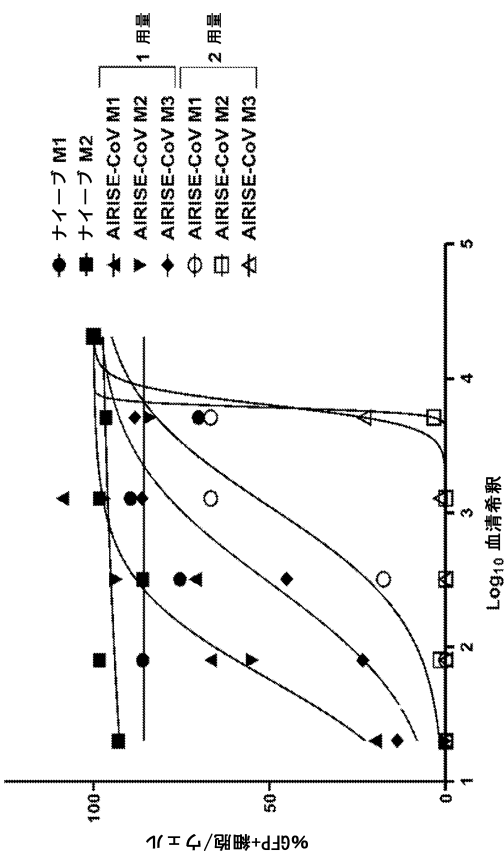
40

50

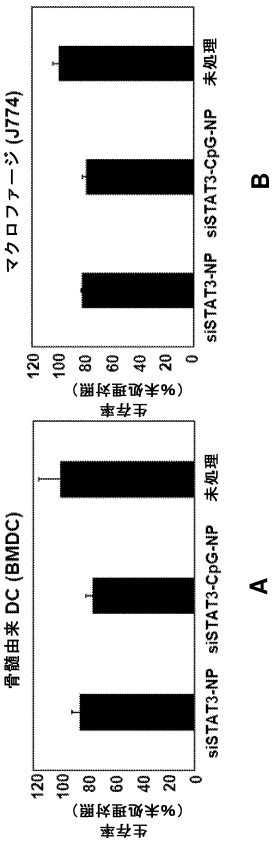
【図 1 4 C】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023534232000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年3月20日(2023.3.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

本明細書において使用される用語「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類または非霊長類哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、サル、ラット、マウスおよび/またはヒツジであり得る。いくつかの態様では、対象はヒトである。

10

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

例示的な細菌抗原:細菌抗原は、アクチノミセス (Actinomyces)、アナベナ (Anabaena)、バチルス (Bacillus)、バクテロイデス (Bacteroides)、デロビブリオ (Bdellovibrio)、ボルデテラ (Bordetella)、ボレリア (Borrelia)、カンピロバクター (Campylobacter)、カウロバクター (Caulobacter)、クラミジア (Chlamydia)、クロロビウム (Chlorobium)、クロマチウム (Chromatium)、クロストリジウム、コリネバクテリウム、サイトファーガ (Cytophaga)、ディノコッカス (Deinococcus)、エシェリキア (Escherichia)、フランシセラ (Francisella)、ハロバクテリウム (Halobacterium)、ヘリオバクター (Heliobacter)、ヘモフィルス、ヘモフィルスインフルエンザB型 (HIB)、ハイフォミクロビウム (Hyphomicrobium)、レジオネラ (Legionella)、レプトスピローシス (Leptospirosis)、リステリア (Listeria)、髄膜炎菌A、BおよびC、メタノバクテリウム (Methanobacterium)、ミクロコッカス (Micrococcus)、マイコバクテリウム、マイコプラズマ (Mycoplasma)、ミキソコッカス (Myxococcus)、ナイセリア、ニトロバクター (Nitrobacter)、オシラトリア (Oscillatoria)、プロクロロン (Prochloron)、プロテウス (Proteus)、シュードモナス (Pseudomonas)、ロドスピリラム (Rhodospirillum)、リケッチア (Rickettsia)、サルモネラ (Salmonella)、シゲラ (Shigella)、スピリラム (Spirillum)、スピロヘータ (Spirochaeta)、スタフィロコッカス (Staphylococcus)、ストレプトコッカス、ストレプトマイセス (Streptomyces)、スルホロブス (Sulfolobus)、サーモプラズマ (Thermoplasma)、チオバチルス (Thiobacillus)、ならびにトレポネマ (Treponema)、ビブリオ (Vibrio)、ならびにエルシニア (Yersinia) を含む任意の細菌に由来し得る。細菌を標的とする抗原は、例えば、炭疽、グラム陰性杆菌、クラミジア、ジフテリア、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori)、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、百日咳毒素、肺炎球菌 (pneumococcus)、リケッチア (rickettsiae)、スタフィロコッカス、ストレプトコッカスおよび破傷風に由来し得る。

20

30

40

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0096】

感染性細菌の具体例には、アクチノマイセス・イスラエリー (Actinomyces israeli)、バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis)、バクテロイデス種、ボレリア

50

・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、病原性カンピロバクター種、クロストリジウム・パーフリンジェンス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、コリネバクテリウム・ジフテリエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム種、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 種、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エリシペロスリクス・ルシオパシエ (*Erysipelothrix rhusiopathie*)、大腸菌、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、ヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)、ヘリコバクター・ピロリ、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、レジュネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ (*Leptospira*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、マイコバクテリア (*Mycobacteria*) 種 (例えば、結核菌、*M.アビウム* (*M. avium*)、*M.イントラセルラーエ* (*M. intracellulare*)、*M.カンサイ* (*M. kansasii*)、*M.ゴドナエ* (*M. gordonae*))、ナイセリア・ゴノレー (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、リケッチア、シゲラ・フレックスネリ (*Shigella flexneri*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、ストレプトコッカス (ビリダンス群)、大便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス (嫌気性種)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モニリフォルミス連鎖桿菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、およびトレポネーマ・ペルテニュー (*Treponema pertenue*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

例示的な寄生生物抗原:寄生生物抗原は、任意の寄生生物、例えば、ネズミバベシア (*Babesia microti*)、バベシ・ディベルガンズ (*Babesia divergens*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、リーシュマニア種、ブラジルリーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、ドノバンリーシュマニア (*Leishmania donovani*)、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、ノカルジア・アステロイデス (*Nocardia asteroides*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、リケッチア・リケッチイ (*Rickettsia rickettsii*)、発疹熱リケッチア (*Rickettsia typhi*)、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、トリパノソーマ・クルージ (*Trypanosoma cruzi*)、ガンビア・トリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシア・トリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*) (アフリカ睡眠病)、トリパノソーマ・クルージ (シャーガス病)、白癬 (陰金田虫)、扁形動物および回虫由来の抗原から得ることができる。寄生生物は、

蠕虫生物もしくは虫、または限定されることなく、鉤虫症/鉤虫、アニサキス症、回虫-寄生性肺炎、回虫-アライグマ回虫症 (Baylisascariasis)、条虫-条虫感染、肝吸虫症、ジオクトフィメ・リナリス (Dioctophyme renalis) 感染、裂頭条虫症-条虫、メジナ虫-メジナ虫症、エキノコックス症-条虫、ギョウチュウ-腸蟯虫症、肝蛭-肝蛭症、肥大吸虫症-腸ジストマ、顎口虫症、膜様条虫症、ロア糸状虫 (Loa loa) フィラリア症、カラバール腫脹、マンソネラ症、フィラリア症、横川吸虫症-腸ジストマ、河川盲目症、中国肝吸虫、肺吸虫症、肺吸虫、住血吸虫症-ビルハルジア (bilharzia)、ビルハルチア病もしくはマキガイ熱 (全種類)、腸住血吸虫症、尿路住血吸虫症、日本住血吸虫 (Schistosoma japonicum) による住血吸虫症、アジア腸住血吸虫症、孤虫症、糞線虫症-寄生性肺炎、無鉤条虫、有鉤条虫、トキソカラ症、旋毛虫病、沼地皮膚症、鞭虫およびリンパ性フィラリア性象皮症 (Elephantiasis Lymphatic filariasis) を含む疾患を引き起こす生物であり得る。寄生生物は、寄生虫、ハルザン症候群、ハエ幼虫症、砂ノミ、ヒトヒフバエおよびカンディルを含む疾患を引き起こす単数または複数の生物であり得る。寄生生物は、トコジラミ、アタマジラミ-シラミ寄生症、コロモジラミ-シラミ寄生症、ケジラミ-シラミ寄生症、ニキビダニ (Demodex) -毛包虫症、疥癬、螺旋虫およびコクリオミイヤ (Cochliomyia) を含む疾患を引き起こす外寄生生物または生物であり得る。

10

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

ブタ:ブタ丹毒菌 (Erysipelothrix rhusiopathiae)、アクチノバシラス・プルロニューモニア (Actinobacillus pleuropneumoniae)、マイコプラズマ・ハイオニューモニア (Mycoplasma hyopneumoniae)、大腸菌K88、K99、F41および987P、c型ウェルシュ菌 (Clostridium perfringens)、サルモネラ・コレレスイス (Salmonella choleraesuis)、パストレラ・マルトシダ、ボルデテラ・ブロンキセプチカ (Bordetella bronchiseptica)、レプトスピラ・ブラティスラバ (Leptospira Bratislava)、イヌレプトスピラ (Leptospira canicola)、レプトスピラ・グリポティフォーサ (Leptospira grippotyphosa)、レプトスピラ・ハージョ (Leptospira hardjo)、レプトスピラ・プロモナ (Leptospira promona)、レプトスピラ・イクテロ (Leptospira ictero)、ブタインフルエンザウイルス (Porcine Influenza virus)、サーコウイルス (Circovirus)、ブタ生殖および呼吸症候群ウイルス (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) (PRRSV)、豚痘、口タウウイルス、ブタ呼吸器コロナウイルス (Porcine Respiratory Coronavirus)、パルボウイルス (Parvo virus)、仮性狂犬病、伝染性胃腸炎因子。

30

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

40

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

ウシ:大腸菌O157:H7、パストレラ・マルトシダ、パストレラ・ヘモリチカ (Pasteurella haemolytica)、イヌレプトスピラ、レプトスピラ・グリポティフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・プロモナ、レプトスピラ・イクテロ、C型ウェルシュ菌、D型ウェルシュ菌、クロストリジウム・シャボイ (Clostridium chauvoei)、クロストリジウム・ノビイ (Clostridium novyi)、クロストリジウム・セプティカム (Clostridium septicum)、クロストリジウム・テタナス (Clostridium tetanus)、溶血クロストリジウム (Clostridium haemolyticum)、クロストリジウム・ソ

50

ルデリ (*Clostridium sordellii*)、サルモネラ・ダブリンおよびネズミチフス菌 (*Salmonella dublin and typhimurium*)、ウシロタウイルス (*Bovine Rotavirus*)、ウシコロナウイルス (*Bovine coronavirus*)、ウシ鼻気管炎、ウシ下痢症ウイルス (*Bovine diarrhea virus*)、パラインフルエンザ-3、呼吸器多核体ウイルス、トリコフィトン・ベルコースム (*Trichophyton verrucosum*)。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0107】

ネコ:ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (*Feline infectious peritonitis virus*)、ネコ鼻気管炎、ネコ汎白血球減少症、ネコカリシウイルス (*Feline calicivirus*)、ネココロナウイルス (*Feline coronavirus*)、ネコアルファヘルペスウイルス (*Feline alphaherpesvirus*) 1、ネコ免疫不全ウイルス (*Feline immunodeficiency virus*)、ネコ白血病ウイルス (*Feline leukemia virus*)、狂犬病リッサウイルス (*rabies lyssavirus*)。ボルデテラ、バチルス、バルトネラ (*Bartonella*)、バークホルデリア (*Burkholderia*)、クラミジア、クロストリジウム、コリネバクテリウム、サルモネラ、プロテウス、エシェリキア、プロテウス、モラクセラ (*Moraxella*)、ノカルジア、ヘモフィルス、パスツレラ、シュードモナス、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、イヌ小胞子菌、ナニッチア・ジプス (*Nannizzia gyps*)、ナニッチア・フルバ (*Nannizzia fulva*)、ナニッチア・ナナ (*Nannizzia nana*)、トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*)、トリコフィトン・ベルコースム、イヌ鉤虫、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、イヌ糸状虫 (*Dirofilaria immitis*)、ノミ、ジアルジア、イソスポラ (*Isospora*) 種、肺虫、オラヌラス・トリクスピ (*Ollanulus tricuspi*)、フィサロプテラ・ヒスピダ (*Physaloptera hispida*)、ヒゼンダニ (*Sarcoptes scabiei*)、条虫、イヌ小回虫 (*Toxascaris leonina*)、ネコ回虫 (*Toxocara cati*)、トキソプラズマ原虫、狭頭鉤虫および鞭虫。

20

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0113】

例示的な標的化剤には、モノクローナル抗体、一本鎖可変断片 (scFv) 抗体、抗体の他の抗原結合断片、アプタマー、小さな標的化分子 (例えば、細胞表面受容体に結合するリガンド、例えば、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、トランスフェリンおよび葉酸)、炭水化物、および細胞または組織、例えば、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞またはマクロファージ) などの免疫細胞に対する結合親和性を有するペプチドが含まれる。

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/41487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 49/18, A61K 49/00, A61K 31/713, A61K 38/16, A61K 47/48, A61K 9/51 (2021.01)

CPC - A61K 38/16, A61K 31/713, A61K 47/6929, B82Y 5/00, A61K 47/6923, A61K 49/186, A61K 47/6849, A61K 49/1875, A61K 49/0093, B82Y 30/00, A61K 47/59, A61K 47/60, A61K 49/1857, A61K 47/6855, A61K 47/551

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NGAMCHERDTRAKUL, et al. Lyophilization and stability of antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticle with cationic polymer and PEG for siRNA delivery. Int J Nanomedicine, 2018, Vol. 13, pp. 4015-4027; Abstract, pg 4016, Fig 1 and its legend; pg 4016, col 2 to pg 4019, col 1; pg 4019, Fig 2 and its legend	1-6, 8-11, 13-21, 24-31, 36-55
Y	HUANG, et al. An Assessment of Mesoporous Silica Nanoparticle Architectures as Antigen Carriers. Pharmaceutics 24 March 2020, Vol 12, No: 3, Article 294; Abstract, pg 4 and Table 1, pg 6, Table 2; pg 12, 13	1-6, 8-11, 13-21, 24-31, 36-55
Y	US 2018/0312843 A1 (CITY OF HOPE) 01 November 2018 (01.11.2018) claims 12-18, para [0562]	5, 6, 8, 41-44, 47-49
Y	QI, et al. Construction and immunogenic studies of a mFc fusion receptor binding domain (RBD) of spike protein as a subunit vaccine against SARS-CoV-2 infection. Chem Commun (Camb). Epub 02 July 2020, Vol. 56, No. 61, pp. 8683-8686; Abstract, pg 8684, col 1	24-31
A	US 2017/0173169 A1 (PDX PHARMACEUTICALS, LLC, et al.) 22 June 2017 (22.06.2017) in entirety	1-6, 8-11, 13-21, 24-31, 36-55

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

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

15 October 2021

Date of mailing of the international search report

DEC 28 2021

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

Authorized officer

Keri Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/41487

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.e 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

International application No.

PCT/US 21/41487

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1:

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 8-11, 13-21, 24-31, 36-55

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/41487

In Continuation of
Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group I+, claims 1-55, directed to an immunogenic construct. The immunogenic construct will be searched to the extent that the nanoparticle encompasses a silica nanoparticle, an adjuvant encompasses a CpG oligonucleotide, the cationic polymer encompasses PEI, the stabilizer encompasses PEG, the antigen encompasses a protein, the protein encompasses a full-length SARS-Cov-2 spike glycoprotein, the infectious agent encompasses a virus. It is believed that claims 1-6, 8-21, 24-31, 38-55 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the nanoparticle encompasses a silica nanoparticle, an adjuvant encompasses a CpG oligonucleotide, the cationic polymer encompasses PEI, the stabilizer encompasses PEG, the antigen encompasses a protein, the protein encompasses a full-length SARS-Cov-2 spike glycoprotein, the infectious agent encompasses a virus. Additional nanoparticle(s) and/or adjuvant(s) and/or cationic polymer(s) and/or stabilizer(s) and/or antigen(s) and/or the protein an antigen producing agent(s) and/or infectious agent(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected nanoparticle(s) and/or adjuvant(s) and/or cationic polymer(s) and/or stabilizer(s) and/or antigen(s) and/or the protein an antigen producing agent(s) and/or infectious agent(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a gold nanoparticle, poly I:C adjuvant, polylysine cationic polymer, dextran stabilizer, peptide antigen of SEQ ID NO: 2, mRNA antigen producing agent, (s) and/or infectious agent(s), i.e., claims 1-5, 7-9, 13, 15-17, 19, 20, 22-27, 32-34, 36-55.

[NOTE: claims 12 does not belong to the first invention, because the first invention is restricted to a silica nanoparticle, while claim 12 is drawn to an iron oxide nanoparticle. For this reason, claim 12 was excluded from the search.]

Group II, claims 56-65, directed to a method of co-delivering an antigen and an adjuvant to a cell comprising: contacting the cell with an immunogenic construct of claim 1 or claim 3.

The inventions listed as Group I+ and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I+ is not a method of co-delivering an antigen and an adjuvant to a cell that is required by Group II.

The inventions of Group II share the special technical feature of a method of co-delivering an antigen and an adjuvant to a cell that is not required by Group I+.

The special technical feature of some inventions of Group I+ is a specific nanoparticle and/or adjuvant and/or cationic polymer and/or stabilizer and/or antigen and/or antigen producing agent and/or infectious agent recited therein.

The special technical feature of some inventions of Group I+ is a specific amino acid sequence recited therein.

The inventions of Groups I+ and Group II share the technical feature of an immunogenic construct (claims 1, 3). However, this shared technical feature does not represent an improvement over prior art as being obvious over a paper titled "Lyophilization and stability of antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticle with cationic polymer and PEG for siRNA delivery" by Ngamcherdtrakul, et al. (Int J Nanomedicine 2018, Vol 13, pp. 4015-4027) (hereinafter "Ngamcherdtrakul") in view of a paper titled "An Assessment of Mesoporous Silica Nanoparticle Architectures as Antigen Carriers" by Huang, et al. (Pharmaceutics 24 March 2020, Vol. 12, No. 3, Article 294) (hereinafter "Huang") as follows:

Ngamcherdtrakul discloses a nanoparticle platform (NP), comprising: a nanoparticle; an amount of crosslinked cationic polymer comprising polyethylenimine (PEI) bound electrostatically to an exterior surface of the nanoparticle (pg 4016, Figure 1 and its legend, "Mesoporous silica-based nanoconstruct for targeted delivery of siRNA. Notes: (A) TEM image of MSNP [mesoporous silica nanoparticle], scale bar = 50 nm. (B) Schematic illustration of nanoconstruct (T-siRNA-NP). (C) The process of how MSNP was coated layer by layer with PEI [polyethylenimine] and cross-linked, PEG [polyethyleneglycol], and trastuzumab resulting in T-NP, which was then lyophilized and stored in various conditions. Prior to use, lyophilized T-NP and lyophilized siRNA were resuspended in RNase-free water and mixed together in one vial. The siRNA was loaded last and bound to the PEI layer due to charge preference, being protected under the PEG layer from enzyme degradation"; pg 4018, col 1, "The dry MSNPs with the size of 50 nm were then mixed with branched-PEI in absolute ethanol at a mass ratio of 4:1 of MSNP per PEI. The mixture was shaken continuously for 3 h at room temperature, centrifuged, and resuspended in the ethanol solution containing PEI and 0.2 mg DSP [dithiobis (succinimidyl propionate)] as a cross-linker").

- wherein the PEI content is at least 10% by weight of the NP (pg 4018, col 1, "The material contained 65.3 wt.% of MSNP, 13.5 wt.% of PEI, 18.2 wt.% of PEG (all by TGA analysis)"); and

- an amount of a stabilizer comprising polyethylene glycol (PEG) bound covalently to the crosslinked PEI (pg 4017, col 2, "Maleimide-PEG (5 kDa)-NHS was conjugated to MSNP-PEI at a mass ratio of 1:1 in PBS pH 7.2 under shaking condition for 2 h"),

- wherein the hydrodynamic size of the construct is about 1 micron (pg 4018, col 1, "The hydrodynamic size of about 110 nm of the final nanoparticles (after the polymer coating, antibody attachment, and siRNA loading on the 50 nm [TEM size] MSNP core) indicated that the particles were not aggregated but remained as individual particles owing to the dense layer of PEG").

Albeit Ngamcherdtrakul discloses that said nanoparticle platform comprises a monoclonal antibody (pg 4016, Figure 1 and its legend, "(C) The process of how MSNP was coated layer by layer with PEI and cross-linked, PEG, and trastuzumab resulting in T-NP"), it does not specifically disclose that said nanoparticle platform is immunogenic and comprises an antigen of an infectious agent.

***** See the Following Supplemental Sheet to continue *****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/41487

In Continuation of
Box III. Observations where unity of invention is lacking and the Preceding Supplemental Sheet:

Huang discloses an immunogenic construct comprising: a nanoparticle platform (NP), comprising: a nanoparticle and an antigen of an infectious agent (Abstract, "We investigated the adsorption and desorption of diphtheria toxoid as a proof-of-concept. Two series of nanoparticles were prepared... (i) small pores (SP) (<10 nm) and (ii) large pores (LP) (>10 nm)... Antigen loading was assessed at a number of different ratios of silica-to-antigen and at 4C, 20C and 37C. Our data showed that protein adsorption by the SP series was in general consistently lower than that shown by the large pore series. Unloading was then examined at 4C, 20C and 37C and a pH 1.2, 4.5, 6.8 and 7.4... The stability of the MSNP: antigen complex was tested at two different storage temperatures, and storage in solution or after lyophilization. After 6 months there was negligible release from any of the particles under any of the storage conditions. The particles were also shown not to cause hemolysis" (Abstract),

-wherein the hydrodynamic size of the construct is about 1 micron (pg 13, "The optimal external diameter for take up into the cells was shown to be 217 nm (LP3). When this particle was loaded with diphtheria toxoid, there was an internalization rate of 53%. The MSNPs were also shown to be generally biocompatible since cell viability was not altered by the loading of particles, either with or without antigen").

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to combine, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, Ngamcherdtrakul and Huang by loading the MSNP-PEI-PEG siRNA-loaded particles disclosed by Ngamcherdtrakul with a suitable antigen, as disclosed by Huang, instead of with siRNA, to improve efficiency of the immunogenic platform disclosed by Huang, because Ngamcherdtrakul discloses that "[t]he cross-linked PEI allows the loading of negatively charged siRNA and promotes endosomal escape via proton sponge effect, while PEG provides a steric effect that protects siRNA from enzymatic degradation and nanoparticles from aggregation and phagocytosis. The PEI was cross-linked to increase the buffering capacity and enhance the endosomal escape of siRNA by the proton sponge effect principle" (pg 4016, col 2).

As the technical feature would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Therefore, inventions of Groups I+ and II lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/18	(2017.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/04	(2006.01)	A 6 1 K	47/04	
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32	
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	47/58	(2017.01)	A 6 1 K	47/58	
A 6 1 K	47/61	(2017.01)	A 6 1 K	47/61	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	39/215	(2006.01)	A 6 1 K	39/215	
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K	9/72	
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K	9/12	
C 0 7 K	14/005	(2006.01)	C 0 7 K	14/005	
C 0 7 K	14/165	(2006.01)	C 0 7 K	14/165	
C 0 7 K	14/195	(2006.01)	C 0 7 K	14/195	
C 0 7 K	14/37	(2006.01)	C 0 7 K	14/37	
C 0 7 K	14/44	(2006.01)	C 0 7 K	14/44	
C 1 2 N	15/30	(2006.01)	C 1 2 N	15/30	
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/33	(2006.01)	C 1 2 N	15/33	
C 1 2 N	15/50	(2006.01)	C 1 2 N	15/50	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. B R I J

3. S P A N

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヤンタシー ワッサナ
アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウス バンクロフト ストリート 6 9 0
エル 1 0 6 ティーティー

(72)発明者 レダ シェリフ
アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウス ボンド アベニュー 3 3 0 3 サ
ーティーンズ フロア

(72)発明者 レダ モタシュ
アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウス バンクロフト ストリート 6 9 0
エル 1 0 6 ティーティー

(72)発明者 ンガムチェルドトラクル ウォラポール
アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウス ボンド アベニュー 3 3 0 3 サ
ーティーンズ フロア

(72)発明者 ワン ルイジエ
アメリカ合衆国 9 7 2 3 9 オレゴン州 ポートランド サウス ボンド アベニュー 3 3 0 3 サ
ーティーンズ フロア

F ターム (参考) 4C076 AA11 AA24 AA31 AA65 AA93 AA95 BB15 BB25 BB27 BB31
CC07 CC31 CC41 DD21H DD25H DD26H DD29H DD49H DD67 EE06Q EE13
EE13Q EE16Q EE23H EE23Q EE24 EE26 EE30 EE30Q EE37Q EE41 EE49H
EE59 FF21 FF63

4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 AA17 BA03 BA44 CA01 MA13 MA17
MA56 MA59 MA63 MA65 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB09 ZB32

4C085 AA03 AA21 AA38 BA01 BA51 BA71 CC22 DD61 EE01 EE06
FF02 FF11 FF13 FF14 FF24 FF30 GG03 GG10

4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA13 MA17 MA38 MA41 MA55
MA59 MA63 MA65 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB09 ZB32

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA29