

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年1月20日(20.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/014620 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01) C07K 14/165 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/50 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/026368

(22) 国際出願日: 2021年7月13日(13.07.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

63/050,880 2020年7月13日(13.07.2020) US
63/153,385 2021年2月25日(25.02.2021) US

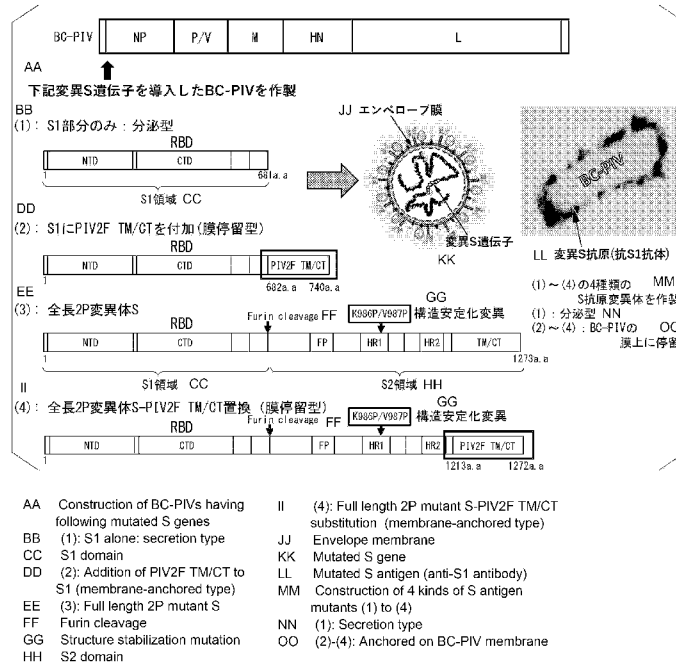
(71) 出願人: バイオコモ株式会社 (BIOCOMO INCORPORATION) [JP/JP]; 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野 1 3 2 5 番地 Mie (JP). 国立大学法人三重大学 (MIE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 Mie (JP). 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 福村 正之 (FUKUMURA Masayuki); 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野 1 3 2 5 番地 バイオコモ株式会社内 Mie (JP). 大塚 順平 (OHTSUKA Junpei); 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野 1 3 2 5 番地 バイオコモ株式会社内 Mie (JP). 野阪 哲哉 (NOSAKA

(54) Title: SARS-CoV-2 VACCINE

(54) 発明の名称: SARS-CoV-2 ワクチン

[図1]



(57) Abstract: A vaccine that comprises, as an active ingredient, a viral vector which comprises a sequence containing any of the following amino acid sequences (a) to (c) and in which an induced neutralizing antibody presents, on the viral particle envelope, a protein inhibiting the binding of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) to human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2). (a) An amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1; (b) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 in which one to several amino acids have been deleted, inserted, substituted or

Tetsuya); 〒5148507 三重県津市栗真町屋町 1
5 7 7 国立大学法人三重大学内 Mie (JP). 小
埜 良一(ONO Ryoichi); 〒5148507 三重県津市
栗真町屋町 1 5 7 7 国立大学法人三重大学
内 Mie (JP). 河岡 義裕(KAWAOKA Yoshihiro);
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号
国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 今井 正
樹(IMAI Masaki); 〒1138654 東京都文京区本
郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学
内 Tokyo (JP). 山吉 誠也(YAMAYOSHI Seiya);
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号
国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 棚 井 澄 雄, 外 (TANAI Sumio et al.);
〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁
目 9 番 2 号 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

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

added; and (c) an amino acid sequence having a sequence identity of 80% or more to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

(57) 要約: 以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ誘導される中和抗体が、SARS-CoV-2 の受容体結合ドメイン (RBD) とヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (hACE2) の結合を阻害するタンパク質をウイルス粒子エンベロープ上に提示するウイルスペクターを有効成分として含有する、ワクチン。(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

明 細 書

発明の名称：SARS-CoV-2 ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対するワクチンに関する。

背景技術

[0002] 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、プラス鎖一本鎖RNAをゲノムとして持つエンベロープウイルスであり、5'末端キャップ構造、3'末端ポリA配列を持ち、ウイルスとしては極めて長い約30kbのゲノムを持つ。当該ウイルスは、自前のRNAポリメラーゼに修復機能があるが、ゲノムの変異は避けられない。ゲノムは、14のORFよりなり、27のタンパク質をコードしている。当該タンパク質は、Membrane (M)、Envelope (E)、Spike (S)、及びNucleocapsid protein (N)の4種類の構造タンパク質よりなる。Spikeタンパク質は、主にワクチン用抗原として用いられる。Spikeタンパク質は、受容体結合ドメイン (RBD) を含むS1領域と宿主の細胞膜とウイルスの膜融合に必要なS2領域よりなる。

[0003] SARS-CoV-2による宿主細胞への感染は、RBDと宿主細胞のヒトアンジオテンシン変換酵素2 (hACE2) の結合により始まる。RBDは、upとdownの2状態があり、up状態のときhACE2と結合することができる。この結合によりtransmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) プロテアーゼによって切断されたS2'が露出され、細胞とウイルスの融合が生じる。また、後期エンドソーム・カテプシン経路による別の感染ルートがあるが、前者の方がウイルスの細胞侵入速度は速いとされる。

[0004] SARS-CoV-2感染が、重症化を引き起こす病態として、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress sy

ndrome ; ARDS) を呈する肺炎に最も留意すべきである。SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 は、II 型肺胞上皮をはじめとする気道上皮細胞の表面に発現しており、SARS-CoV-2 の RBD を介して気道上皮細胞に感染する。SARS-CoV-2 感染肺炎では、ARDS によるびまん性肺胞障害が特徴的である。一般的にびまん性肺胞障害の組織像は、時間経過とともに、滲出期から器質化期、更に線維化期へと変化していくのが一般的であるが、SARS-CoV-2 感染ではこれらの病期の異なる病変が、同一個体の肺葉内に同時に進行し、重篤化する場合も多い。

[0005] ワクチンの中和抗体作用は、RBD と hACE2 の結合を阻害することである。これまで以下のような Spike タンパク質の変異が報告され、ワクチンが誘導する中和抗体に影響を与えるものと予想される。当該変異は、イギリス型 (alpha) : N501Y / D614G 変異、南アフリカ型 (beta) : E484K / N501Y / D614G、日本型 : E484K が報告されてきた。

[0006] さらに WHO より直近で Variant of Interest (VOI) or Variant of Concern (VOC) に認定されたにインド型 (kappa) : L452R / E484Q / D614G、インド型 (delta) : L452R / T478K / D614G、インド型 (delta plus) K417N / L452R / T478K / D614G が報告されている。

[0007] 例えば、N501Y 変異は、RBD と hACE2 との結合に主に関与する領域のアミノ酸変異で、RBD のチロシン (Y) 側鎖と hACE2 のアミノ酸の Y41 と K353 との相互結合が形成されることにより、結合親和性が Wuhan 型と比較して 7 倍上昇するとされる。

[0008] SARS-CoV-2 に対する中和抗体作用が最も強いと評価される抗体 (IC_{50} が 2 ng/mL) において、Spike タンパク質との結合の分子レベルの解析により、当該抗体の重鎖及び軽鎖中のアミノ酸が Spike タンパク質の E484 と相互作用をしていることが明らかにされている。つま

り、E484K変異では、E484でみられた当該抗体との相互作用がK484では低くなり、Wuhan型SARS-CoV-2ワクチン接種で誘導される中和作用の最も高い抗体が、E484K変異では中和抗体として機能不全に陥る可能性が考えられる。

[0009] 野生株新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対し、Spikeタンパク質を抗原として、mRNAワクチン、組換えウイルスベクターワクチン、全粒子不活化ワクチン、タンパク質コンポーネントワクチン等の多様なモダリティのワクチンがあり、中でもファイザー社及びモデルナ社のmRNAワクチンは90%以上の有効性が報告されている（非特許文献1参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1: The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine - United States, December 2020. Oliver SE, Gargano JW, Marin M, Wallace M, Curran KG, Chamberland M, McClung N, Campos-Outcalt D, Morgan RL, Mbaeyi S, Romero JR, Talbot HK, Lee GM, Bell BP, Dooling K. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020 Dec 18;69(50):1922-1924.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] これらのワクチンはすべて筋肉内投与である。一方、ワクチン投与によるアナフィラキシー及び血栓、心筋症等の副反応が報告されており、mRNAワクチンは2回目の投与後により強い副反応が知られている。副反応等を理由にワクチン接種拒否者も多く、集団免疫の獲得が難しくなることが推測される。今後新型コロナワクチンには、筋肉内投与以外の投与法、副反応の低減、複数回投与が可能である多様なモダリティが必要である。

[0012] 本発明は上記事情を鑑みてなされたものであり、新しいモダリティである

SARS-CoV-2 ワクチン提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ誘導される中和抗体が、SARS-CoV-2 の受容体結合ドメイン (RBD) とヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (hACE2) の結合を阻害するタンパク質をウイルス粒子エンベロープ上に提示するウイルスベクターを有効成分として含有する、ワクチン。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[0014] [2] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、D614G 変異を有する、[1] に記載のワクチン。

[0015] [3] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、K417N、L452R 又は L452Q、T478K、E484K、E484Q、F490S、及び N501Y からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの変異を有する、[1] 又は [2] に記載のワクチン。

[0016] [4] 前記タンパク質は、その transmembrane (TM) 配列及び cytoplasmic tail (CT) 配列が、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスの TM 及び CT 配列に置換されている、[1] ~ [3] のいずれか一つに記載のワクチン。

[0017] [5] 前記ウイルスベクターは、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスである、[1] ~ [4] のいずれか一つに記載のワクチン。

[0018] [6] ウイルスベクターとしての前記ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスは、ゲノムより F 遺伝子を欠失した非増殖型である、[5] に記載のワクチン。

[0019] [7] ウイルスベクターとしての前記ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスは、ゲノムが不活化している、[5] 又は [6] に記載のワクチン。

[0020] [8] 経鼻噴霧投与用である [1] ~ [7] のいずれか一つに記載のワクチン。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、新しいモダリティであるSARS-CoV-2ワクチン提供することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]BC-P1Vに導入する4種類の改変Wuhan型SARS-CoV-2のSpikeタンパク質の説明図である。具体的には、(1):S1領域タンパク質、(2):S1領域とhPIV2 Fタンパク質のTM及びCT領域を融合したタンパク質、(3):Wuhan型Spikeタンパク質(2か所に変異導入、以下、2P置換導入ともいう。)、及び(4):(3)のWuhan型Spikeタンパク質のTM及びCT領域をhPIV2 Fタンパク質のTM及びCT領域に置換したタンパク質(BC-P1V/S2PMと命名)である。これらタンパク質をコードする遺伝子を、F遺伝子を欠失したhPIV2構築用プラスミドのNotI(NPタンパク質をコードする遺伝子上流領域)又はMluI(MとHNタンパク質をコードする遺伝子間の領域)制限酵素切断部位に所望遺伝子を導入した。

[図2]2P置換を導入したWuhan型SARS-CoV-2のSpikeタンパク質をコードするプラスミドをトランスフェクションした細胞の融合を調べた図である。

[図3]4種類のWuhan型SARS-CoV-2のSpike遺伝子を保持するBC-P1Vの感染細胞及びウイルス粒子でのそれぞれのタンパク質をウエスタンブロットにより確認した図である。

[図4]4種類の改変Wuhan型SARS-CoV-2のSpike遺伝子/タンパク質を保持するBC-P1Vを感染させた細胞において、細胞融合が喪失していることを示す図である。

[図5A] 4種類の各ウイルスをプレートに吸着し、hACE-2 + Fc tagとの結合程度を調べた図である。

[図5B] 3種類の各不活化ウイルスをプレートに吸着し、hACE-2 + Fc tagとの結合程度を調べた図である。

[図6] BC-P1VとBC-P1V/S2PMの通常電頭と抗S1抗体を用いた免疫電頭の図である。

[図7] BC-P1V/S2PMの赤血球凝集活性を調べた図である。

[図8] BC-P1V/S2PMをマウスに経鼻又は筋肉内投与を行い、回収した血清を用いて、RBDタンパク質に結合するIgG抗体価をELISAで比較した図である。

[図9] 2P置換を導入した4種類の改変Wuhan型SARS-CoV-2のSpike遺伝子を保持するBC-P1Vを経鼻感染させたマウスより回収した血清のS1又はRBDに対するIgG抗体価をELISAで比較した図である。

[図10] 単回又は2回BC-P1V/S2PMを経鼻投与したマウスの血清のS1又はRBDに対するIgG抗体価及び鼻腔洗浄液のS1又はRBDに対するIgA抗体価をELISAにより調べた図である。

[図11] 2回投与マウスの血清を、cPassキットを用いてRBDとhACE-2との結合阻害により中和抗体価の評価を示した図である。

[図12] ハムスターでBC-P1V/S2PワクチンによるSARS-CoV-2阻害効果を調べる前にcPassキットにより中和抗体の誘導を確認した図である。

[図13] 1回又は2回BC-P1V/S2Pワクチンを経鼻投与したハムスターにSARS-CoV-2を感染させた後、回収した各組織を用いてプラークアッセイによりSARS-CoV-2の増殖を調べた図である。

[図14] BC-P1Vに導入する変異株（イギリス株、南アフリカ株、日本株、インド株）SARS-CoV-2のSpikeタンパク質の説明図である。

[図15A]図14のSARS-CoV-2の変異株（イギリス株、南アフリカ株、日本株、インド株）Spike遺伝子を保持するBC-PIVの感染細胞及びウイルス粒子でのそれぞれのタンパク質をウエスタンブロットにより確認した図である。

[図15B]図14のSARS-CoV-2の変異株（イギリス株、南アフリカ株、日本株、インド株）Spike遺伝子を保持するBC-PIVの感染細胞及びウイルス粒子でのそれぞれのタンパク質をウエスタンブロットにより確認した図である。

[図16]BC-PIVに導入する変異株（インド株（delta、delta plus）、南米株（lambda））SARS-CoV-2のSpikeタンパク質の説明図である。

[図17]BC-PIVに導入する今後予想される変異株SARS-CoV-2のSpikeタンパク質の説明図である。

発明を実施するための形態

[0023] 《ワクチン》

1実施形態において、本発明は、以下の（a）～（c）のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ誘導される中和抗体が、SARS-CoV-2の受容体結合ドメイン（RBD）とヒトアンジオテンシン変換酵素2（hACE2）の結合を阻害するタンパク質をウイルス粒子エンベロープ上に提示するウイルスベクターを有効成分として含有する、ワクチンを提供する。

（a）配列番号1で表されるアミノ酸配列、

（b）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、

（c）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列

[0024] （a）において、配列番号1で表されるアミノ酸配列は、Wuhan型SARS-CoV-2のSpikeタンパク質のアミノ酸配列であり、K98

6 P/V 9 8 7 Pの変異を有している。本明細書において、Wu h a n型SARS-CoV-2を、2 P置換を導入したWu h a n型SARS-CoV-2ともいう。

[0025] 本明細書において、アミノ酸配列における置換変異を表す場合、元のアミノ酸の一文字表記、続いて1～4桁の数字による位置番号、次に置換されたアミノ酸の一文字表記により表現することがある。例えば、アミノ酸番号986位においてリジン（K）がプロリン（P）に置換される変異が生じている場合、「K 9 8 6 P」と表され、これは、「アミノ酸番号986位のL y sのP r oの置換」と同義である。

[0026] （b）において、欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸の数としては、1～190個が好ましく、1～120個がより好ましく、1～50個がより好ましく、1～25個がより好ましく、1～10個が更に好ましく、1～5個が最も好ましい。

[0027] （c）において、同一性としては、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、98%以上が最も好ましい。

[0028] 本実施形態のワクチンに用いられる抗原としてのタンパク質は、Wu h a n型SARS-CoV-2のS p i k eタンパク質に限定されず、（b）及び（c）に規定される同一性以上のタンパク質にも適用される。

即ち、本実施形態のワクチンに用いられるタンパク質は、イギリス型（a l p h a）：N 5 0 1 Y又はN 5 0 1 Y/D 6 1 4 G、南アフリカ型（b e t a）：E 4 8 4 K/N 5 0 1 Y又はE 4 8 4 K/N 5 0 1 Y/D 6 1 4 G、日本型：E 4 8 4 K又はE 4 8 4 K/D 6 1 4 G、インド型（k a p p a）：L 4 5 2 R/E 4 8 4 Q又はL 4 5 2 R/E 4 8 4 Q/D 6 1 4 G、インド型（d e l t a）：L 4 5 2 R/T 4 7 8 K又はL 4 5 2 R/T 4 7 8 K/D 6 1 4 G、インド型（d e l t a p l u s）：K 4 1 7 N/L 4 5 2 R/T 4 7 8 K又はK 4 1 7 N/L 4 5 2 R/T 4 7 8 K/D 6 1 4 G、南米型（l a m b d a）：L 4 5 2 Q/F 4 9 0 S又は、L 4 5 2 Q/F 4 9 0 S/D 6 1 4 G、にも適用される。

[0029] 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、D614G変異を有することが好ましく、D614G変異に加えて／又はD614G変異とは独立して、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、K417N、L452R又はL452Q、T478K、E484K、E484Q、F490S及びN501Yからなる群から選ばれる少なくとも1つの変異を有することがより好ましい。

本実施形態のワクチンに用いられるタンパク質は、これら変異の組み合わせとして、今後予想される変異型にも適用される。今後予想される変異としては、イギリス型+インド型(alpha+ kappa) : L452R/E484Q/N501Y (CTC/GAG/AAT→cgg/cag/tat) 又はL452R/E484Q/N501Y/D614G (CTC/GAG/AAT/GAT→cgg/cag/tat/ggt)、イギリス型+インド型(alpha+ delta) : L452R/T478K/N501 (CTC/ACA/AAT→cgg/aaa/tat) 又はL452R/T478K/N501/D614G (CTC/ACA/AAT/GAT→cgg/aaa/tat/ggt)、イギリス型+インド型(alpha+ delta plus) : K417N/L452R/T478K/N501Y (AAG/CTC/ACA/AAT→aac/cgg/aaa/tat) 又はK417N/L452R/T478K/N501Y/D614G (AAG/CTC/ACA/AAT/GAT→aac/cgg/aaa/tat/ggt) が挙げられる。

[0030] 本発明において、「誘導される中和抗体が、SARS-CoV-2の受容体結合ドメイン(RBD)とヒトアンジオテンシン変換酵素2(hACE2)の結合を阻害する」とは、ワクチンを投与されたヒト体内で誘導される中和抗体が、RBDに結合することにより、RBDとhACE2との結合を阻害することを意味する。

実施例で後述するように、本発明のワクチンは、あらゆる変異型SARS-CoV-2に対して中和活性を有する。

[0031] 本実施形態のワクチンが含有するウイルスベクターとしては、抗原タンパク質をエンベロープ上に提示するものであれば限定されず、センダイウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスが挙げられ、ヒトパラインフルエンザウイルスが好ましく、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスがより好ましい。

[0032] [BC-P1Vベクター及びVLP、BC-P1Vベクター]

本発明者らは、マイナスイオン鎖RNAウイルスであるパラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科ルブラウイルス属に属するヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(以後hP1V2という。)の膜融合(Fusion)タンパク質(F膜タンパク質又はFタンパク質)をコードするF遺伝子を機能しないように欠失させ、当該F遺伝子が恒常的に発現するように組込まれたVerro細胞を樹立し、当該細胞で2次感染性粒子が産生しないよう作製されたBC-P1Vベクターを構築した。

[0033] 当該ベクターでは、感染宿主で2次感染性粒子が産生されないため高い安全性が担保される。当該ベクターは外来遺伝子を導入することができ、RNAベクターの特性を活かし、感染細胞で高い外来遺伝子発現が認められる。

更に、BC-P1Vは、抗原導入に特徴をもつ。その特徴は、抗原遺伝子だけでなく、外来のウイルス外膜等の大型抗原タンパク質の立体構造を維持した状態で、BC-P1Vエンベロープ上に、hP1V2のHN膜タンパク質及びF膜タンパク質と共存させることができ、効率的なワクチン用ベクターとして利用できる。

エボラウイルスワクチン等の中和抗体誘導に立体構造が必須とされる、当該ウイルス以外のウイルスの高分子量膜タンパク質を当該ベクターに導入し、中和抗体の誘導に成功している。また、抗原をエンベロープ上に導入したBC-P1Vはゲノムを不活化してもベクターとしての利用が可能である(VLP、BC-P1V)。不活化の際、非増殖型ベクターであるために、通常のウイルス不活化処理より遥かに低濃度の薬剤で処理することが可能で、導入抗原の免疫原性を維持することができる。

[0034] 好ましい実施形態では、BC-PIVは、SARS-CoV-2に対するワクチンを提供し、当該ワクチンは、2P置換を導入したWuhan型SARS-CoV-2及びその変異型ウイルスのSpikeタンパク質をコードする遺伝子又は当該タンパク質の細胞内領域のtransmembrane (TM) 及びcytoplasmic tail (CT) 配列（塩基配列を配列番号13に示す。）を、hPIV2 FのTM/CT配列（塩基配列を配列番号14に示す。）に置換したWuhan型SARS-CoV-2及びその変異ウイルスのSpikeタンパク質をコードする遺伝子-PIV2 F TM/CT遺伝子を保持する。

これには、当該ベクターを経鼻投与及び筋肉内投与する方法も含む。Wuhan型SARS-CoV-2及びその変異型ウイルスのSpikeタンパク質をコードする遺伝子-PIV2 F TM/CT遺伝子は、遺伝子形式だけでなく、タンパク質形式でもBC-PIV又はVLP、BC-PIV上に取込まれる。当該タンパク質は、自然免疫細胞や獲得免疫細胞により投与時点で認識され、その後遺伝子の転写・複製により産生される当該タンパク質と相互作用し、より強いワクチン効果を生じる。

[0035] 一つの好ましい形態では膜外領域を含むWuhan型SARS-CoV-2及びその変異ウイルスのSpikeタンパク質をウイルスエンベロープ上に搭載するエンベロープ型ウイルスである。より好ましい形態では、Wuhan型SARS-CoV-2及びその変異型ウイルスのSpikeを、遺伝子形式かつタンパク質形式で保持するBC-PIV又はWuhan型SARS-CoV-2及びその変異型ウイルスのSpike-PIV2 F TM/CTをタンパク質形式で保持するBC-PIVである。

[0036] [担体・添加剤]

本実施形態のワクチンは、薬学的に許容される担体を含有していてもよい。薬学的に許容される担体としては、通常製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができ、例えば、滅菌水、生理食塩水等の溶媒；ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤、結晶性セルロ

ース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤等が挙げられる。

[0037] 本実施形態のワクチンは、添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤；界面活性剤；乳化剤等が挙げられる。

[0038] 本実施形態のワクチンの投与形態としては、筋肉内投与又は経鼻投与が好ましい。経鼻投与は、鼻腔内へ噴霧投与がより好ましい。

投与における溶媒としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液が挙げられる。注射剤用の溶媒は、エタノール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のポリアルコール；ポリソルベート80（商標）、HCO-50等の非イオン性界面活性剤等を含有していてもよい。

また、経鼻投与におけるワクチンの製剤は、スプレーでもよい。

[0039] 本実施形態のワクチンの1回あたりの投与量は、通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約10ng～1000μgの有効成分を投与することが考えられる。必要な場合には、2～12週間の間隔で複数回投与される。

[0040] <治療方法>

1実施形態において、本発明は、上述したワクチンを、治療を必要とする患者に投与することを含む、重症急性呼吸器症候群の治療方法を提供する。

実施例

[0041] 以下に実施例を挙げて本発明を更に詳述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0042] [実施例1] BC-P1Vに導入する4種類の改変Spikeタンパク質図
SARS-CoV-2 Spike遺伝子(Gene Bank, MN9

08947)のコドン最適化したSARS-CoV-2 Spike遺伝子(SinoBiological Inc. Cat. VG40591-UT、VG40590-UT / Gene Bank. QHD43416.1 配列番号2)を鋳型にし、BC-PIVに導入する4種類の改変Wuhan型SARS-CoV-2のSpikeタンパク質をコードする遺伝子を構築した(図1参照。)。具体的には、(1): S1領域タンパク質、(2): S1領域とhPIV2 Fタンパク質のTM及びCT領域を融合したタンパク質、(3): Wuhan型Spikeタンパク質(2P置換導入)、及び(4): (3)のWuhan型Spikeタンパク質のTM及びCT領域をhPIV2 Fタンパク質のTM及びCT領域に置換したタンパク質(BC-PIV/S2PMと命名)で、これらタンパク質をコードする遺伝子を構築した。(3)と(4)において、全長Spikeタンパク質はSpikeタンパク質の持つ自律増殖能をなくすために、S2領域内に2P変異(K986P/V987P(AAGGTG→cccccc))を導入しタンパク質の構造を安定化させ細胞融合能をなくした。4種類の改変遺伝子は、BC-PIVのNotI切断部位に当該制限酵素切断配列とBC-PIV導入用tag配列を付加したプラスミドを構築した。この際、導入遺伝子を含めたBC-PIVの遺伝子全長の塩基数を6の倍数(ルール・オブ・6)になるように調整した。BC-PIVは、エンベロープ上に異種ウイルスの多量体の抗原の立体構造を維持した状態で搭載できることが可能である。抗原が外来ウイルス等の膜タンパク質以外の場合は、当該抗原にhPIV2 F膜タンパク質の膜領域(transmembrane domain(TM)配列)及び細胞内領域(cytoplasmic tail(CT)配列)を付加することにより、当該抗原はBC-PIVエンベロープに取込まれる。

一方、BC-PIVへの導入抗原が、ウイルス膜タンパク質又は膜結合タンパク質の場合、導入抗原の膜アンカーリングシグナルはそのままでもBC-PIVエンベロープに取込まれる場合と、膜アンカーリングシグナルをhPIV2のそれと置換しないとBC-PIVエンベロープに取込まれない場

合があり、(3)と(4)の構築で検討した。

[0043] [実施例2] 2P変異をもつ改変タンパク質の融合能喪失の確認

MERS-CoVで報告された、細胞融合を抑制するSpikeタンパク質における変異を、SARS-CoV-2のSpikeタンパク質へ導入することにより細胞融合が抑制されるか調べた。SARS-CoV-2 Spike遺伝子(Gene Bank, MN908947)のコドンが最適化されたSARS-CoV-2 Spike遺伝子を鋳型に、SARS-CoV-2 Spikeタンパク質のS2領域内に2P変異(K986P/V987P(AAGGTG→cccccc))を導入した構造安定型Spike遺伝子(SARS-CoV-2 S2P)とWuhan型Spike遺伝子(SARS-CoV-2 S)をプラスミド pcDNAに導入した。各プラスミドをVero細胞にトランスフェクションし、3日後、4% Paraformaldehyde (PFA)で固定し、透過処理後、SARS-CoV-2 S1タンパク質にも交差反応する抗SARS-CoV S1抗体(SinoBiological Inc. Cat. 40150-T62-COV2)とDAPI(Nacalai Tesque Cat. 19174-31)で細胞染色し細胞融合の有無を確認した(図2参照。)。Wuhan型Spikeタンパク質は、細胞融合に特徴的な多核巨細胞が観察され細胞融合が誘導されたが、変異導入Spikeタンパク質ではタンパク質発現を確認できたが、多核巨細胞は認められず、細胞融合は起こらなかった。

[0044] [実施例3] 各4種類の改変Spike遺伝子を有するBC-PIVのウエスタンブロットによる改変型Spikeタンパク質の確認

図1の4種類の改変Spike遺伝子を導入したBC-PIV構築用プラスミドを用いて、マイナスイオン鎖ウイルス作製に常用されるリバーシジェネティックス法によりBC-PIVウイルスの回収を行った。すべてのウイルスを回収することができたので、タンパク質の発現及びBC-PIVベクター取込みを調べた。

以後、特に断りが無ければ、実施例1に記載した4種類について、(1)を「BC-P1V/S1」、(2)を「BC-P1V/S1M」、(3)を「BC-P1V/S2P」、(4)を「BC-P1V/S2PM」と表記する。数継代後の各BC-P1V感染細胞とウイルスをウエスタンブロットに供した。ウイルスは、培養上清を遠心し、細胞残渣を取り除き、さらに0.8 μ mフィルターを通した上清を超遠心(141,000g, 4°C, 30min)し、濃縮した。抗SARS-CoV S1抗体(SinoBiological Inc. Cat. 40150-T62-COV2)、抗GAPDH-HRP結合抗体、及び抗P1V2 NP(20A)、又は抗P1V2 P(211A)を用いた。なお、ウイルスは、それぞれ 10^6 粒子をウエスタンブロットに供した。感染細胞では、全てのBC-P1VでS1タンパク質の発現が確認でき、BC-P1V/S2P、BC-P1V/S2PMでは開裂前のS0タンパク質の発現も確認された(図3左参照。)。また、図3右に示したウイルス粒子への取込みでは、BC-P1V/S1M、BC-P1V/S2P、BC-P1V/S2PMでは、S1タンパク質が確認でき、粒子上に存在することが確認された。また、BC-P1V/S2P、BC-P1V/S2PMでは、開裂前のS0タンパク質も粒子上に存在していたが、BC-P1V/S2Pでは、BC-P1V/S2PMに比べ、ベクター粒子への取込みが少ないことが分った(図3右参照。)。BC-P1V/S1では、粒子上にS1タンパク質は認められなかったことから、感染した細胞で、S1タンパク質が発現し細胞外へ分泌されていると考えられた。

[0045] [実施例4] 回収ウイルスの非F発現細胞での融合能喪失の確認

各BC-P1Vに導入したSpikeタンパク質による細胞への感染・細胞融合能の動態を観察するため、各BC-P1VをVero細胞に感染させ3日後に4%PFA固定し透過処理を行い、抗SARS-CoV S1抗体(SinoBiological Inc. Cat. 40150-T62-COV2)、DAPI(Nacalaitesque Cat. 19174-3)、及び抗P1V2 NP抗体(20A)で染色し、SARS-C

o V-2 S1をAlexa-568（赤色）で染色し、PIV2 NPをAlexa-488（緑色）で染色し、核をDAPI（青色）で検出した。BC-PIV/S2PM感染細胞は、いずれも細胞融合を誘導せず、多核巨細胞を形成しないことから、BC-PIV/S2PM由来Spikeタンパク質は、Wuhan型Spikeタンパク質と異なり細胞融合能を有しないことが確認された。

PIV2 F遺伝子欠損BC-PIVに改変Spike遺伝子を導入しても、PIV2 Fタンパク質非発現細胞では、改変Spikeタンパク質に自律増殖能力はないため、2次感染性粒子を産生することは無い。

[0046] [実施例5] 回収ウイルスのhACE2との結合確認

各BC-PIV粒子上にタンパク質が存在し、Spikeタンパク質のレセプターであるhACE2タンパク質と結合できるかを確認した。 1×10^6

TCID₅₀/wellの各BC-PIVを、96well ELISA plateに固定した。Human ACE2 (hACE2)-Fc tag (Acro Biosystems, Cat. AC2-H5257) 5 ng、10 ng、25 ng、50 ng、75 ng、100 ng、150 ng、200 ngを添加し、HRP-ProteinA (Biolegend Cat. 689202)とインキュベート後、TMB試薬で反応させ、450 nmの吸光度を計測した。なお試験は、各n=3で実施した。

BC-PIV/S2PM、BC-PIV/S2P、及びBC-PIV/S1Mは、添加濃度依存的に、吸光度が上昇したが、BC-PIV/S1及びBC-PIVは、結合が認められず（図5A参照。）、BC-PIV/S1粒子上にS1タンパク質が存在していないことが確認された。

結合能力は、BC-PIV/S2PとBC-PIV/S1Mでは、ほぼ同等の結合力を持っていたが、BC-PIV/S2PMは、それらよりも高い結合価を示し、BC-PIV/S2PMより多くのSpikeタンパク質が取込まれていると考えられる。これは、Transmembrane Cytoplasmic TailをPIV2F TM/CTに置換することに

より、BC-P1V粒子にSpikeタンパク質がより多く取込まれるためと推察された。この結果は、図3の粒子ウエスタンブロット（BC-P1V/S2PとBC-P1V/S2PM）の結果と符合する。

[0047] 図5Bは、0.05%のβ-プロピオラクトンで不活化したVLP、BC-P1VとhACE2タンパク質との結合を確認した図である。不活化したVLP、BC-P1V/S1M、VLP、BC-P1V/S2P、VLP、BC-P1V/S2PMの順にhACE2タンパク質との結合量は多く、BC-P1Vと同様の結果となり、不活化したVLP、BC-P1Vを利用しても、SARS-CoV-2ワクチンになり得る可能性が示唆された。

[0048] [実施例6] ウイルスの形態と赤血球凝集活性

電子顕微鏡によりBC-P1V/S2PMの形態を確認した。

通常電顕では、BC-P1V/S2PMまたはBC-P1V感染細胞を4%PFA+2.5% Glutaraldehyde (GA)で固定し、更に1%OsO4で固定後、アルコールで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。超薄切片を作製して、電子顕微鏡で観察を行った。また、免疫電顕は、感染細胞BC-P1V/S2PM、又はBC-P1V感染細胞を、2%PFA+0.1%GA混合液で固定し、更に4%PFAで固定を行った。

その後、抗SARS-CoV-2 S1 antibody (Sino Biological Inc. Cat. 40591-T62)と抗ウサギビオチン化抗体 (Vector Laboratories)で染色後、DAB反応を行い1%OsO4で後固定した。アルコールで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。超薄切片を作製して電子顕微鏡で観察を行った。

通常電顕像では、BC-P1V/S2PMのエンベロープ外側にSpikeタンパク質（図6上段 右 矢印参照。）と想定される大きな突起が認められたが、BC-P1Vではそのような突起は認められなかった（図6上段 左 参照。）。抗SARS-CoV-2 S1抗体を用いた免疫電顕では、BC-P1V/S2PMに抗S1抗体の陽性像（図6下段 右 矢印参照。）が認められ、エンベロープはSpikeタンパク質に覆われていることが視覚的

に確認できた。

[0049] 次に S p i k e タンパク質による B C - P I V の特性変化の有無を確認するため、特性の1つである「赤血球凝集活性」を調べた。同じ粒子数の B C - P I V 又は B C - P I V / S 2 P M ウイルス溶液を、冷 P B S で 2 倍段階希釈液し、9 6 w e l l U b o t t o m p l a t e に、2 % モルモット赤血球と等量混ぜ赤血球凝集活性を調べた。試験は $n = 2$ で実施した。B C - P I V では、少なくとも 6 4 H A U の赤血球凝集値が認められたが、B C - P I V / S 2 P M では、赤血球凝集活性が認められなかった。B C - P I V は、H N 膜タンパク質による赤血球凝集活性を持ち、通常当該特性を無くすことは困難であるところ、今回の B C - P I V / S 2 P M ウイルスが、赤血球凝集活性特性を喪失したことは、驚くべき結果であった。当該特性の喪失は、B C - P I V 粒子上の H N タンパク質がより大きな分子量で嵩高な S p i k e タンパク質に覆われ、H N タンパク質上で赤血球が凝集を起こせなかったことによるものと推察された。B C - P I V / S 1 M に比べてより嵩高な S p i k e タンパク質を保持する B C - P I V / S 2 P M の方が h A C E 2 との結合量が多くなるという図 5 の結果を支持するものである。なお、B C - P I V / S 2 P M の H N タンパク質は、嵩高な S p i k e タンパク質と共存していると考えられるが、S p i k e タンパク質には 2 P 変異が導入されており、図 2 と図 4 で示すように、S p i k e タンパク質依存的な細胞融合は認められていないことから、細胞への感染は B C - P I V 由来の H N タンパク質と F タンパク質に依存しており両タンパク質の機能は維持されている。

[0050] [実施例 8] マウスでの投与法(経鼻又は筋肉)の確認

ワクチン投与経路により誘導される抗体の抗体価の差異を調べるため、マウスに経鼻投与又は筋肉内投与し、誘導される抗体の抗体価を評価した。5 - 7 週齢 B A L B / c マウスに、 2×10^7 T C I D ₅₀ の B C - P I V / S 2 P M 又は B C - P I V を 1 回経鼻又は筋肉内に投与した。試験は $n = 3$ で実施した。投与後 33 日目にマウスから血液を採取し、遠心分離後、血清を

回収し非働化処理を行い、ELISAで抗体価を確認した。96well ELISA plateにRBDタンパク質 (SinoBiological Inc. Cat. 40592-V02H) を一晩4℃で固相化し、ブロッキング処理後、希釈した血清と反応させ、HRP結合抗マウスIgG抗体 (Biolegend Cat. 405306) で処理し、TMB試薬と反応させて450nmの吸光度を計測した。

経鼻投与、筋肉内投与の場合でも、BC-PIVよりBC-PIV/S2PMは共にRBDタンパク質に対するIgGの抗体価が高かった。また、経鼻投与、筋肉内投与による吸光度はほぼ同等値となったことから、投与経路による抗体誘導価に差異はなかった(図8参照。)。これらのことから、BC-PIVを用いたワクチンは、経鼻投与でも筋肉内投与と遜色なく、十分な抗体価を有する抗体を誘導することが示された。

[0051] [実施例9] S1及びRBDに対する抗体誘導

マウスに(1)～(4)の4種類のBC-PIVワクチンを経鼻投与した後、S1及びRBDに対する血清中のIgG抗体価を評価した。5～7週齢BALB/cマウスに 2×10^7 TCID₅₀の(1):BC-PIV/S1、(2):BC-PIV/S1M、(3):BC-PIV/S2P、(4):BC-PIV/S2PM、BC-PIV、又はPBSを経鼻投与した。初回投与後33日目にマウスから血液を採取し遠心分離後、血清を回収し非働化処理を行い、ELISAで抗体価を確認した。96well ELISA plateにS1タンパク質 (SinoBiological Inc. Cat. 40591-V02H) 又はRBDタンパク質 (SinoBiological Inc. Cat. 40592-V02H) を固相化し、ブロッキング後、希釈した血清と反応させ、さらにHRP結合抗マウスIgG抗体 (Biolegend Cat. 405306) 処理し、TMB試薬と反応させて450nmの吸光度を計測した。この試験はn=6で実施した。

全てのワクチン投与群でS1タンパク質及びRBDタンパク質に対する高

い抗体誘導を認めた（図9参照）。BC-P1Vは、マウスでpoor-permissiveであるため、転写・翻訳効率が低いことが知られているが、分泌型BC-P1V/S1は、膜停留型BC-P1V/S1MとS1タンパク質に対してほぼ同等の抗体価の誘導を示し、RBDタンパク質に対して若干高い抗体価の誘導を示したが、全長Spikeタンパク質のワクチン群には抗体価は及ばなかったことから、SARS-CoV-2ワクチン抗原として、S1領域のタンパク質よりも全長のSpikeタンパク質を用いた方が抗体誘導には効果があった。全長Spikeタンパク質を搭載したBC-P1V/S2PMが、ワクチンに最も適していることが確認された。

[0052] [実施例10] マウス血清でのSpike/RBDタンパク質に対するIgG・IgA抗体誘導評価

マウスにBC-P1V/S2PMワクチンを、1回又は2回経鼻投与したマウスでのS1及びRBDに対する血清中のIgG抗体価と鼻腔内のIgA抗体価を評価した。5-7週齢BALB/cマウスに 2×10^7 TCID₅₀のBC-P1V/S2PM又はBC-P1Vを経鼻投与した。2回の投与は4週間後に行った。初回投与後35日目に、マウスから血液を採取し遠心分離後、血清を回収し非働化処理を行い、また鼻腔洗浄液は、PBSで回収し、ELISAで抗体価を確認した。96well ELISA plateに、S1タンパク質（SinoBiological Inc. Cat. 40591-V02H）、又はRBDタンパク質（SinoBiological Inc. Cat. 40592-V02H）を固相化し、ブロッキング後、希釈した血清又は希釈した鼻腔洗浄液を反応させ、さらにHRP結合抗マウスIgG抗体（Biolegend Cat. 405306）又はHRP結合抗マウスIgA抗体（Southern Biotech Cat. 1040-05）で処理し、TMB試薬と反応させて450nmの吸光度を計測した。この試験はn=5-6で実施した。

血清のS1及びRBDに対するIgG抗体価は、1回投与群で上昇していたが、2回投与群で更に抗体価が上昇した（図10参照。）。鼻腔洗浄液の

S1及びRBDに対するIgA抗体価は1回投与群で上昇していた。2回投与群では、2回投与1週間後に更に高いIgAの抗体価を認められた。IgAの半減期は短いことが知られているが1回投与の5週間後も鼻腔内にS1またはRBDに対するSpikeタンパク質特異的なIgAの存在が確認できた(図10参照。)

[0053] [実施例11] 中和抗体の確認

マウスに2回のワクチン投与を行い、中和抗体の誘導を市販のキット用いて調べた。

5-7週齢BALB/cマウスに、BC-PIV/S2PM又はBC-PIVを 2×10^7 TCID₅₀を4週間間隔で2回経鼻投与した。この試験はn=4で実施した。最終投与後7日目、マウスから血液を採取し遠心分離後、血清を回収し非働化处理後、SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Kit (cPass kit) (GenScript Cat. L00847)を用いて、中和抗体を計測した。各血清を20、60、180、540、1620、4860倍希釈し、HRP結合RBDタンパク質と37℃ 30分間保温し、hACE2タンパク質を固相化したプレートに混合液を入れ、37℃ 15分間保温し、洗浄後、TMBで発光させて450nmの吸光度を計測し、得られた数値より阻害率 $(1 - (\text{サンプルOD} / \text{ネガティブコントロールOD})) \times 100\%$ を計算した。(注:ネガティブコントロールは、kitに付属している非特異的抗体の20倍希釈での値である。)マニュアルによれば、20% 阻害率以上の場合、中和抗体活性を有するとしており、BC-PIV/S2PM群では、540倍希釈ですべての個体で20%を超えており、また1620倍希釈でも、20%阻害率を超えている個体が確認できた(図11参照)。しかし、BC-PIV群では、20倍希釈でも全ての個体で阻害率20%以下のため中和抗体が確認できなかった。BC-PIV/S2PMの2回経鼻投与は、高い中和抗体を誘導することが可能であった。

[0054] [実施例12] ハムスターを用いた感染防御試験の確認

動物での感染防御試験を行うため、BC-P I V及びSARS-CoV-2に感受性を有するハムスターを用いて、ワクチン効果の検討を行った。

4週齢シリアンハムスターに、BC-P I V又はBC-P I V/S 2 P Mを、1回経鼻投与した。さらにBC-P I V/S 2 P Mを、9週間間隔で2回経鼻投与した群を作製した。1回目投与より、それぞれ10週（1回投与群）、9週（2回投与群）の尻尾より採血した血清を用いて、c P a s s k i tにより中和抗体が誘導されていることを確認した。試験はn=4で実施した。

中和抗体の評価は、希釈倍率を30倍にした以外は、全て実施例11と同じ方法で行った。BC-P I V/S 2 P M投与群では1回投与、2回投与共にポジティブコントロール（注：k i t付属の抗RBD特異的陽性抗体の20倍希釈での値）と同等の高い阻害率が得られた（図12参照。）。一方、BC-P I V投与群では、阻害率が20%以下だったため、中和抗体の存在は確認できなかった。

[0055] 中和抗体評価を行った同一のハムスターを用い、1回目ワクチン投与11週間後に、 10^3 PFUのSARS-CoV-2を経鼻経由で感染させ、3日後に肺組織及び鼻甲介組織を回収した。組織1g当たりのSARS-CoV-2ウイルス数を、TMPRSS2遺伝子組換えVeroE6細胞を用いたプラークアッセイ法によりSARS-CoV-2数を評価した。肺組織（g当たり）BC-P I V投与群では、 10^8 以上のSARS-CoV-2粒子が認められたが、1回及び2回BC-P I V/S 2 P M投与群では、全くSARS-CoV-2粒子が認められなかった。BC-P I V/S 2 P M投与により、高い中和抗体が誘導され、ウイルス増殖が強く阻害された（図13参照。）。

また、鼻甲介組織（g当たり）BC-P I V投与群では、 10^8 個のSARS-CoV-2粒子が認められたが、1回投与群では、 10^6 – 10^7 にウイルス数が減少しており、また2回投与群では、2匹はウイルスが認められず、残りの2匹でもウイルス数が激減していた（図13参照。）。これらの結

果より、肺でのウイルス増殖阻害効果は、1回投与でも長期にわたって持続する。鼻甲介では、IgAが主体と考えられる感染防御効果が確認できたが、IgAの特性によりIgG抗体と比べて長期間の感染防御を持続できないことも明らかになった（図13参照。）。

[0056] [実施例13] 変異株SARS-CoV-2（イギリス型（alpha）：N501Y又はN501Y/D614G、南アフリカ型（beta）：E484K/N501Y又はE484K/N501Y/D614G、日本型：E484K又はE484K/D614G、インド型（kappa）：L452R/E484Q又はL452R/E484Q/D614G、に対するBC-PIVワクチンの構築

[0057] SARS-CoV-2 Wuhan株が世界中に広がり、その後、多数の変異株が報告されている。変異株に対して、Wuhan株由来Spikeタンパク質を用いたワクチンによる効果の低下が予想される。

そのため、変異株（イギリス型（alpha）：N501Y又はN501Y/D614G、南アフリカ型（beta）：E484K/N501Y又はE484K/N501Y/D614G、日本型：E484K又はE484K/D614G、インド型（kappa）：L452R/E484Q又はL452R/E484Q/D614G）に対応し2P変異を保持するSpike遺伝子を導入したBC-PIVを作製した。

イギリス型（alpha）N501Y/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号3に示し、南アフリカ型（beta）E484K/N501Y/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号4に示し、日本型E484K/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号5に示し、インド型（kappa）L452R/E484Q/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号6に示す。

[0058] 各変異部位を図14に示した。これらウイルスを、実施例3と同様のリバーシジェネテクス法によりウイルスを回収した。回収したウイルス粒子を用いて、実施例3と同様の方法で行ったウエスタンブロットを図15A及びB

に示す。すべてのウイルスの感染細胞でS p i k eタンパク質は発現しており、またBC-P I V上に変異型S p i k eタンパク質が認められた。

当該変異型ウイルスに対するBC-P I Vは、これまでのW u h a n型S A R S - C o V - 2に対するBC-P I Vの高いワクチン効果から、変異株にも対しても効果を有するものと考えられる。

[0059] [実施例14] 変異株S A R S - C o V - 2 (インド型 (d e l t a) : L 4 5 2 R / T 4 7 8 K又はL 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 G、インド型 (d e l t a p l u s) : K 4 1 7 N / L 4 5 2 R / T 4 7 8 K又はK 4 1 7 N / L 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 G、南米型 (l a m b d a) : L 4 5 2 Q / F 4 9 0 S又はL 4 5 2 Q / F 4 9 0 S / D 6 1 4 G)、に対するBC-P I Vワクチンの構築

[0060] 更に変異株 (インド型 (d e l t a) L 4 5 2 R / T 4 7 8 K (C T C / A C A → c g g / a a a) 又はL 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 G (C T C / A C A / G A T → c g g / a a a / g g t)、インド型 (d e l t a p l u s) K 4 1 7 N / L 4 5 2 R / T 4 7 8 K (A A G / C T C / A C A → a a c / c g g / a a a) 又はK 4 1 7 N / L 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 G (A A G / C T C / A C A / G A T → a a c / c g g / a a a / g g t)、南米型 (l a m b d a) : L 4 5 2 Q / F 4 9 0 S (C T C / T T T → c a g / t c t) 又はL 4 5 2 Q / F 4 9 0 S / D 6 1 4 G (C T C / T T T / G A T → c a g / t c t / g g t)) に対応した2 P変異を保持するS p i k e遺伝子を導入したBC-P I Vを作製した。

インド型 (d e l t a) L 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 GのS p i k e遺伝子の塩基配列を配列番号7に示し、インド型 (d e l t a p l u s) K 4 1 7 N / L 4 5 2 R / T 4 7 8 K / D 6 1 4 GのS p i k e遺伝子の塩基配列を配列番号8、南米型 (l a m b d a) : L 4 5 2 Q / F 4 9 0 S / D 6 1 4 GのS p i k e遺伝子の塩基配列を配列番号12に示す。

各変異部位を図16に示した。インド型変異型ウイルスに対するBC-P I Vは、これまでのW u h a n型S A R S - C o V - 2に対するBC-P I

Vの高いワクチン効果から、今後出現が予想される変異株に対しても効果を有するものと考えられる。

[0061] [実施例15] 今後予想される変異株SARS-CoV-2（イギリス型+インド型（alpha+kappa）：L452R/E484Q/N501Y又はL452R/E484Q/N501Y/D614G、イギリス型+インド型（alpha+delta）：L452R/T478K/N501Y又はL452R/T478K/N501Y/D614G、イギリス型+インド型（alpha+delta plus）：K417N/L452R/T478K/N501Y又はK417N/L452R/T478K/N501Y/D614G、に対するBC-P1Vワクチンの構築

[0062] 更に今後予想される変異株（イギリス型+インド型（alpha+kappa）：L452R/E484Q/N501Y（CTC/GAG/AAT→cgg/cag/tat）又はL452R/E484Q/N501Y/D614G（CTC/GAG/AAT/GAT→cgg/cag/tat/ggt）、イギリス型+インド型（alpha+delta）：L452R/T478K/N501Y（CTC/ACA/AAT→cgg/aaa/tat）又はL452R/T478K/N501Y/D614G（CTC/ACA/AAT/GAT→cgg/aaa/tat/ggt）、イギリス型+インド型（alpha+delta plus）：K417N/L452R/T478K/N501Y（AAG/CTC/ACA/AAT→aac/cgg/aaa/tat）又はK417N/L452R/T478K/N501Y/D614G（AAG/CTC/ACA/AAT/GAT→aac/cgg/aaa/tat/ggt））に対応した2P変異を保持するSpike遺伝子を導入したBC-P1Vを作製した。

イギリス型+インド型（alpha+kappa）L452R/E484Q/N501Y/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号9に示し、イギリス型+インド型（alpha+delta）L452R/T478K/N501Y/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号1

0に示し、イギリス型+インド型 (alpha+delta plus) K417N/L452R/T478K/N501Y/D614GのSpike遺伝子の塩基配列を配列番号11に示す。

各変異部位を図17に示した。ウイルスは実施例3のリバースジェネティックス法を用いて作製した。今後予想される変異型ウイルスに対するBC-PIVはこれまでのWuhan型SARS-CoV-2に対するBC-PIVの高いワクチン効果から、今後出現が予想される変異株に対しても効果を有するものと考えられる。

産業上の利用可能性

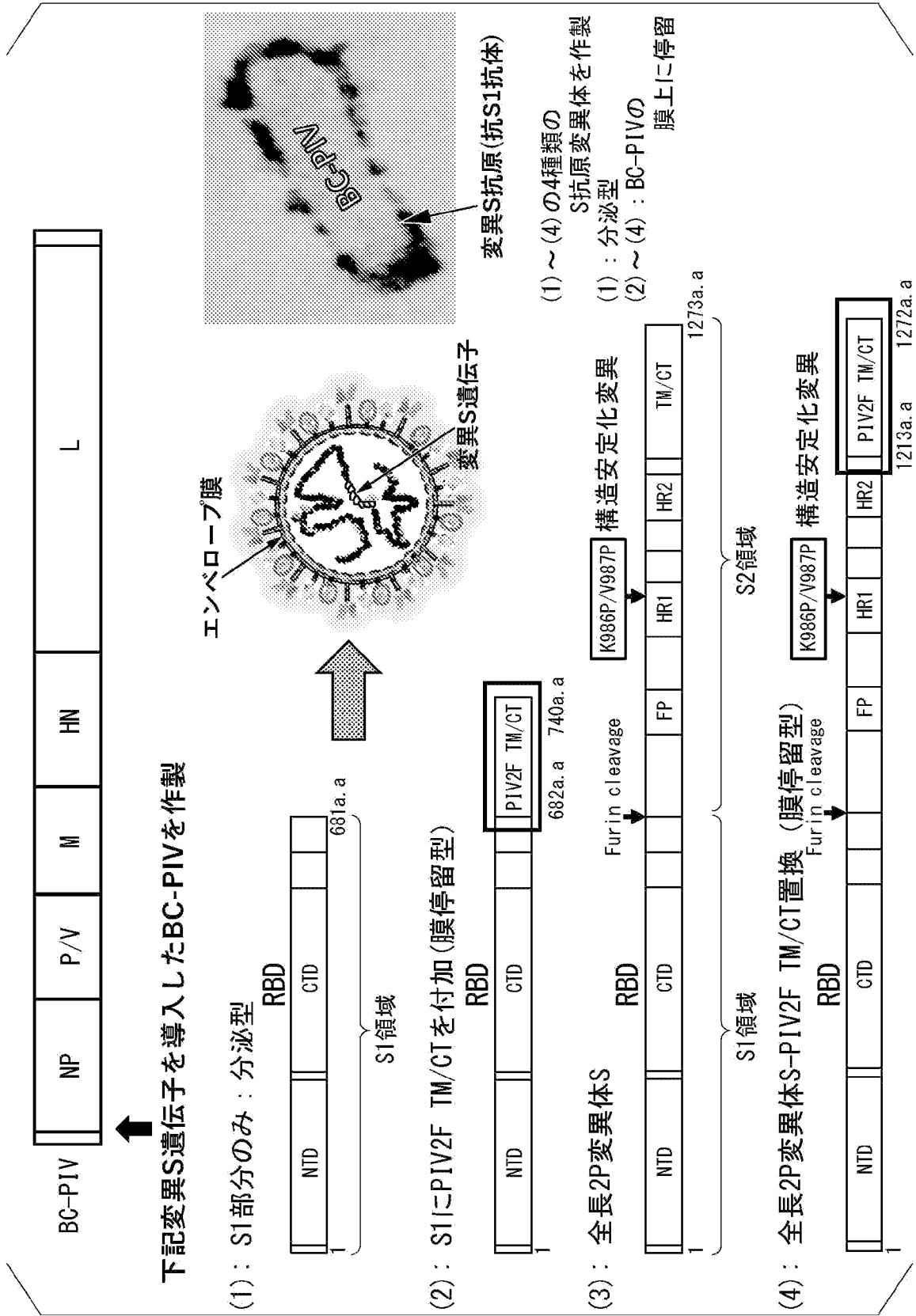
[0063] 本発明によれば、新しいモダリティであるSARS-CoV-2ワクチン提供することができる。

請求の範囲

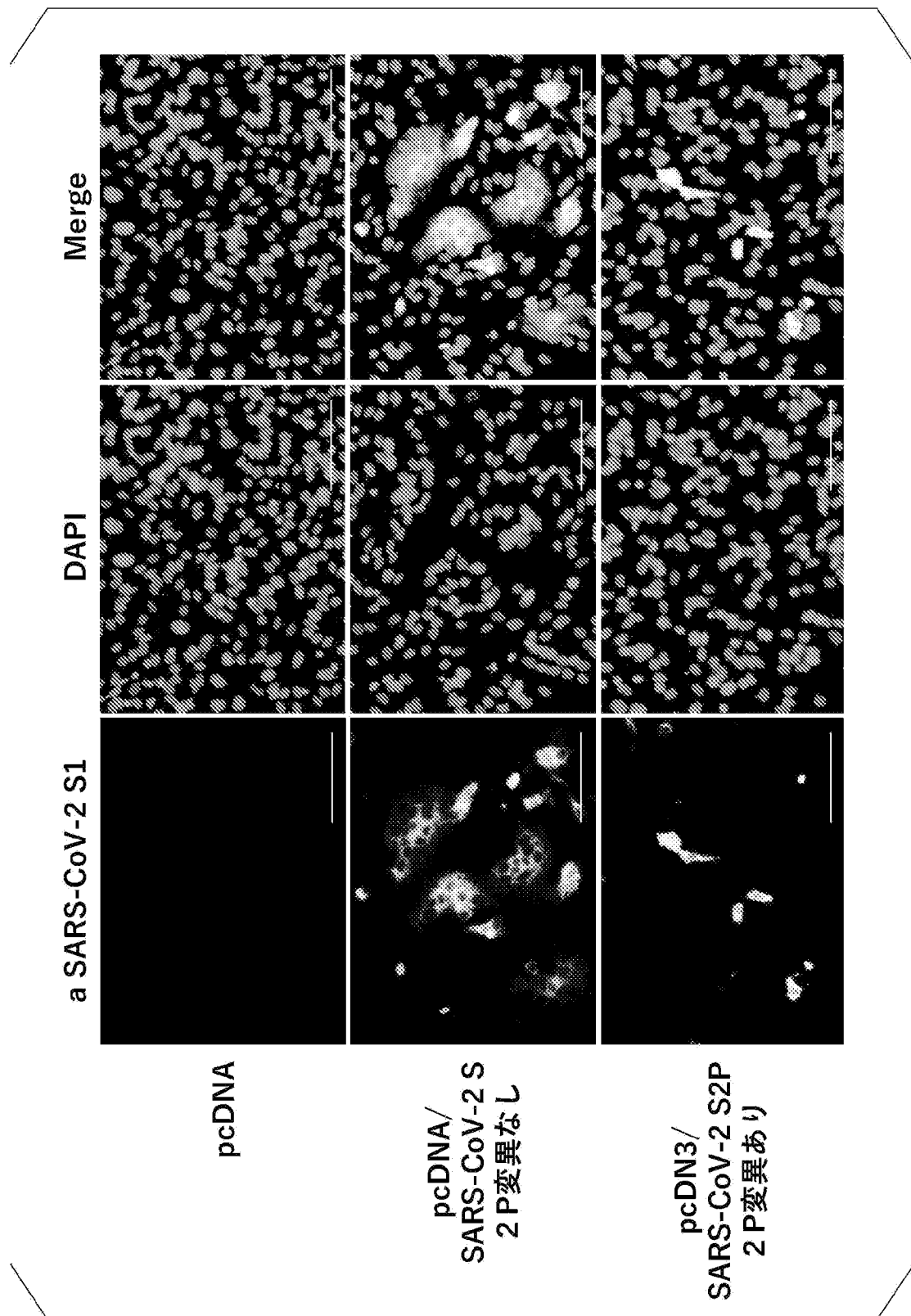
- [請求項1] 以下の（a）～（c）のいずれか一つのアミノ酸配列を含む配列からなり、且つ誘導される中和抗体が、SARS-CoV-2の受容体結合ドメイン（RBD）とヒトアンジオテンシン変換酵素2（hACE2）の結合を阻害するタンパク質をウイルス粒子エンベロープ上に提示するウイルスベクターを有効成分として含有する、ワクチン。
- （a）配列番号1で表されるアミノ酸配列、
- （b）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、
- （c）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- [請求項2] 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、D614G変異を有する、請求項1に記載のワクチン。
- [請求項3] 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、K417N、L452R又はL452Q、T478K、E484K、E484Q、F490S、及びN501Yからなる群から選ばれる少なくとも1つの変異を有する、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項4] 前記タンパク質は、そのtransmembrane（TM）配列及びcytoplasmic tail（CT）配列が、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスのTM及びCT配列に置換されている、請求項1～3のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項5] 前記ウイルスベクターは、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスである、請求項1～4のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項6] ウイルスベクターとしての前記ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスは、ゲノムよりF遺伝子を欠失した非増殖型である、請求項5に記載のワクチン。
- [請求項7] ウイルスベクターとしての前記ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスは、ゲノムが不活化している、請求項5又は6に記載のワクチン。

[請求項8] 経鼻噴霧投与用である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のワクチン。

[図1]



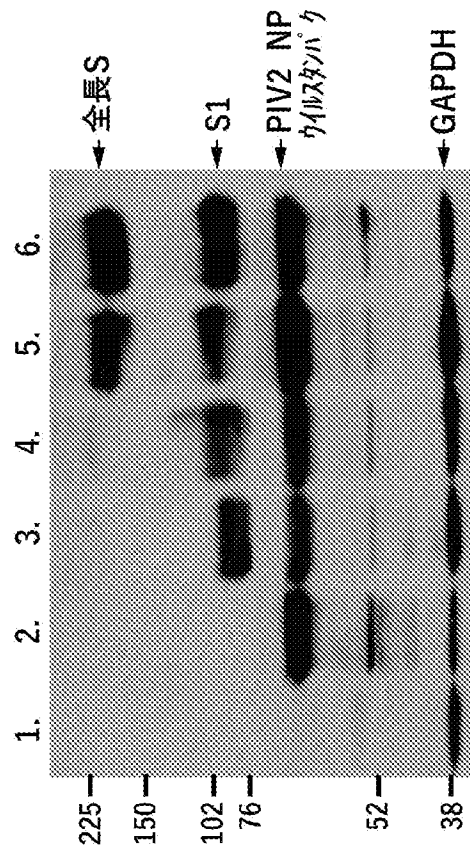
[図2]



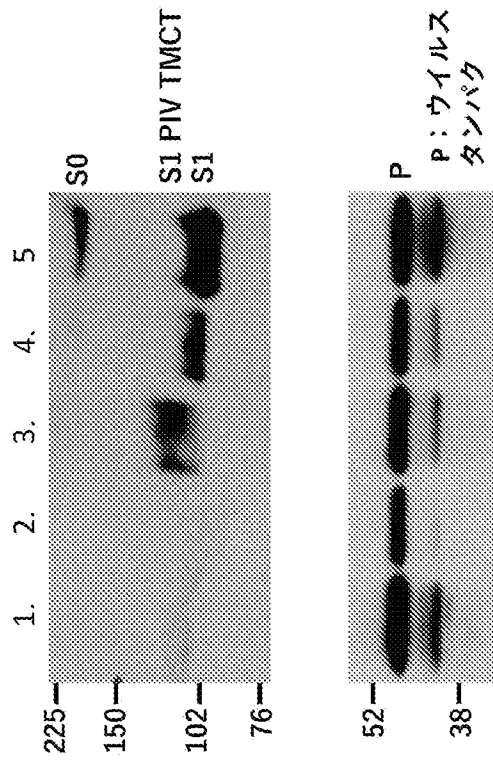
[図3]

感染細胞でのSの発現

BC-PIV感染細胞でのSタンパクの発現確認
(抗S1タンパク抗体使用)

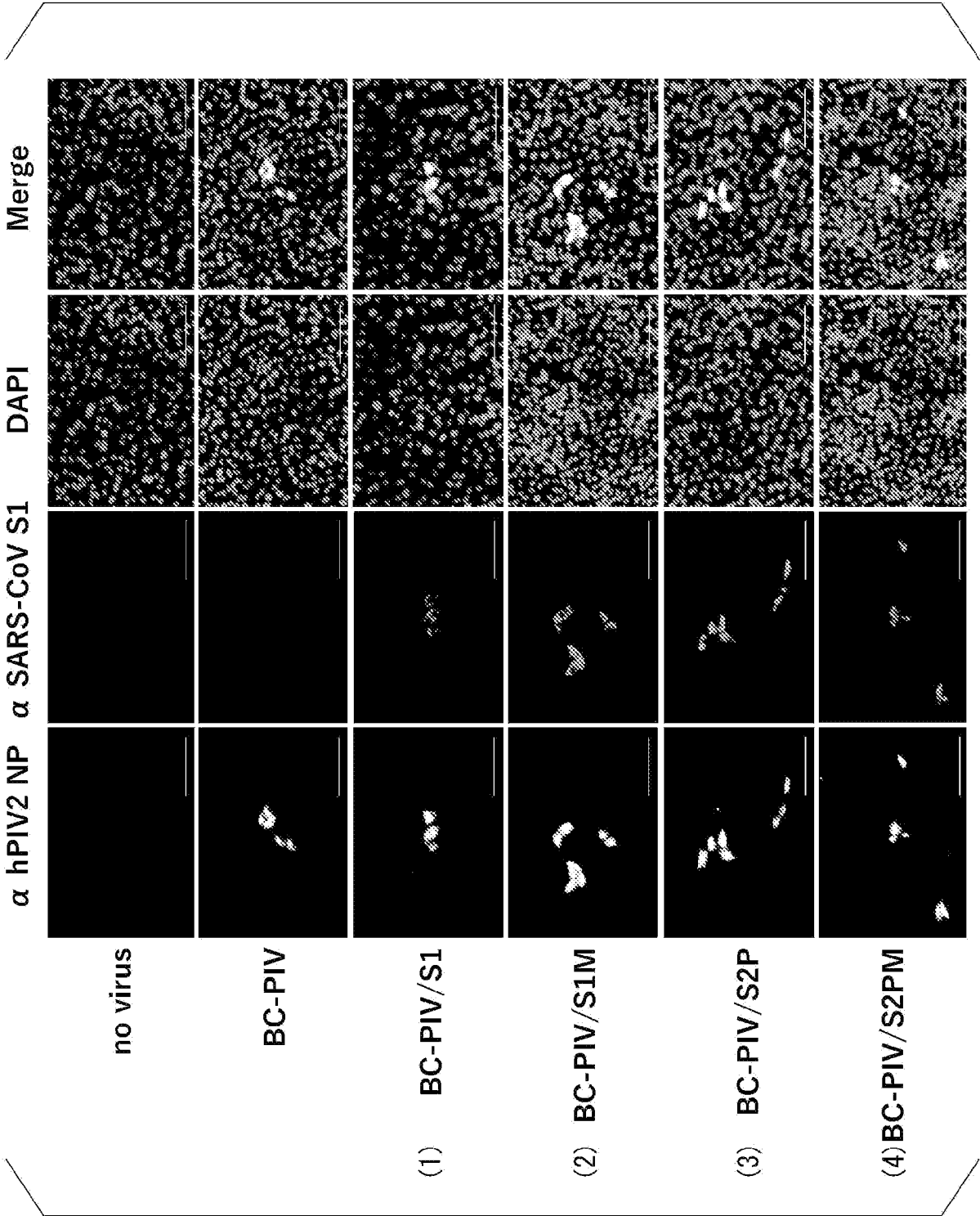


ウイルス粒子でのSの取込み

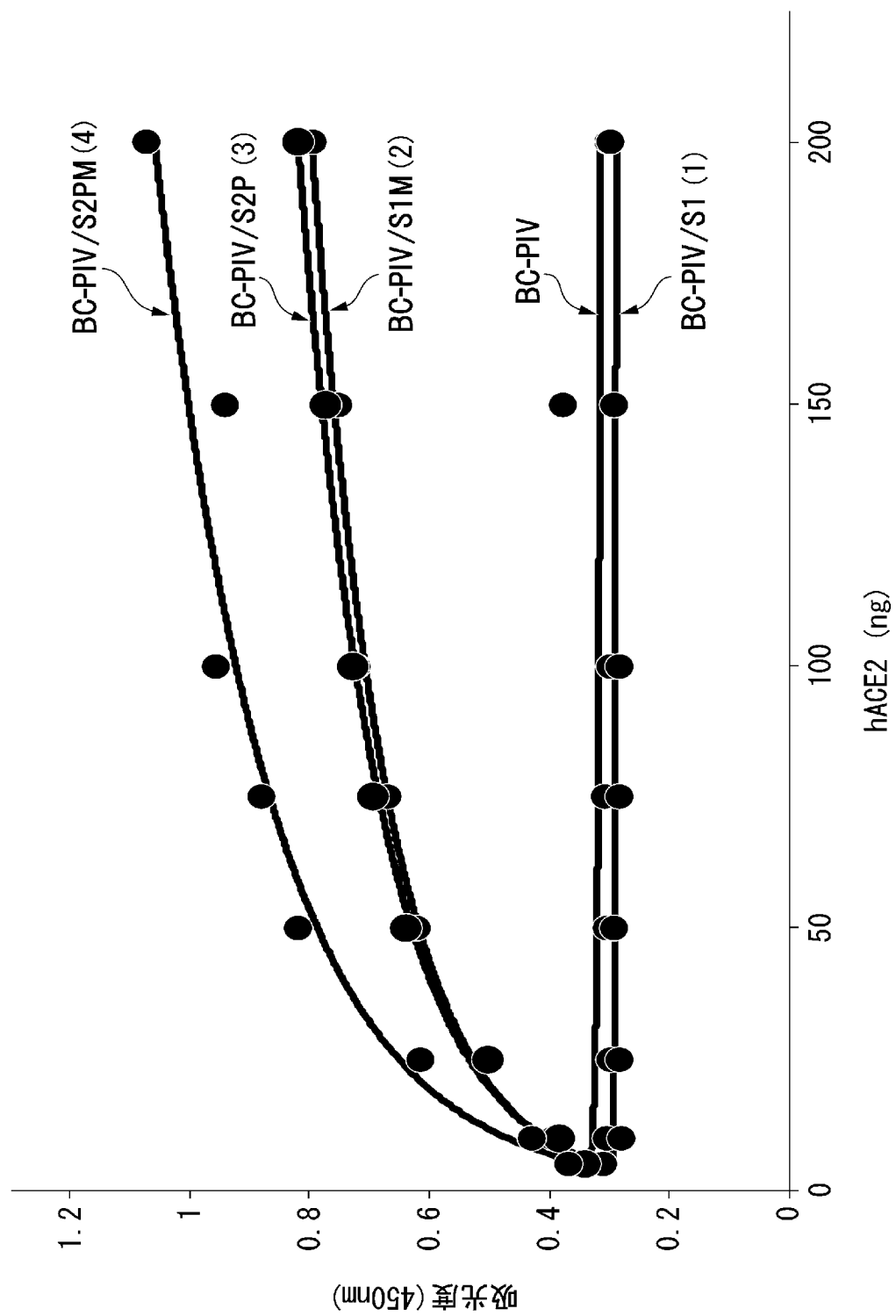


粒子(2)、(3)、(4)にはSが取込まれている

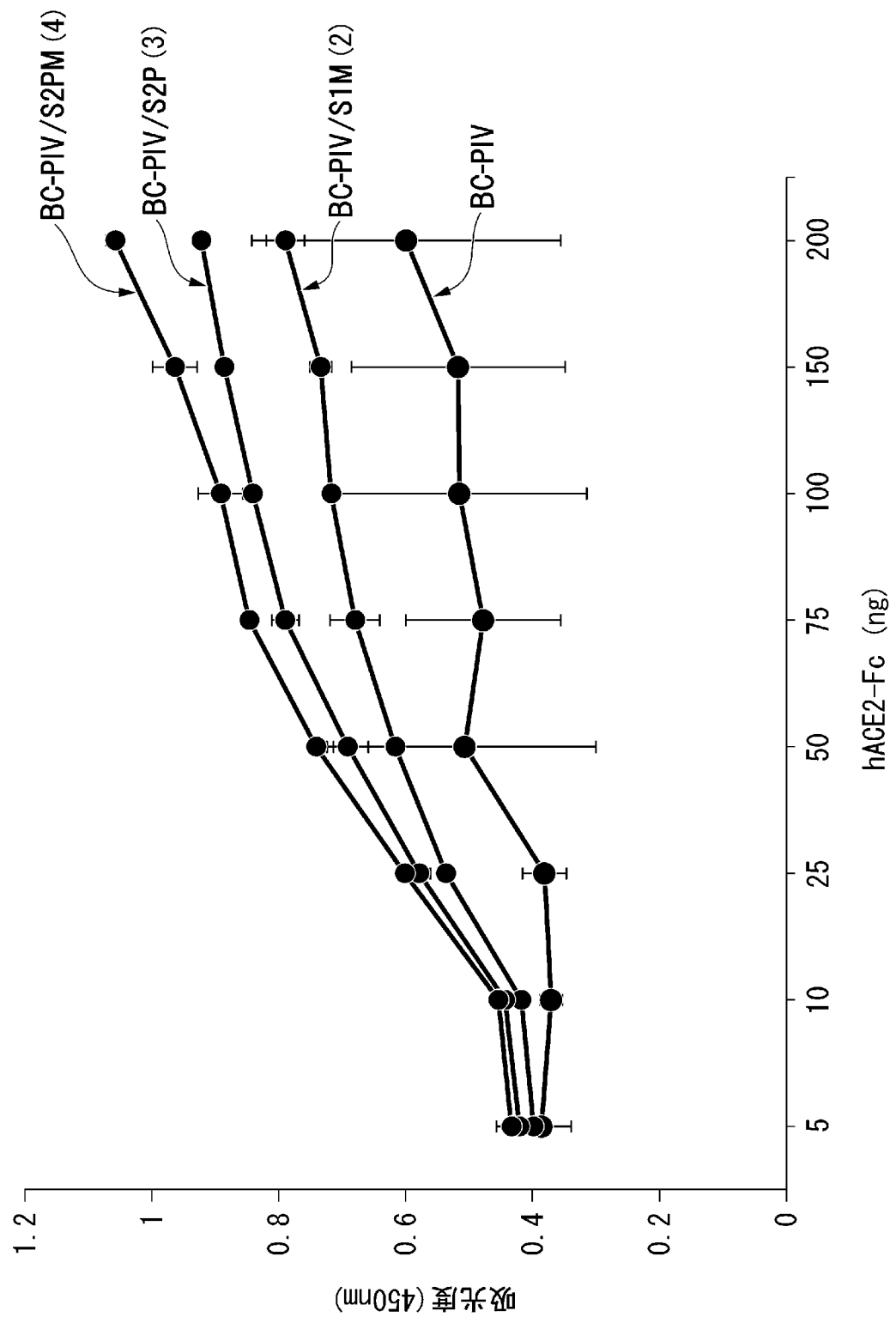
[図4]



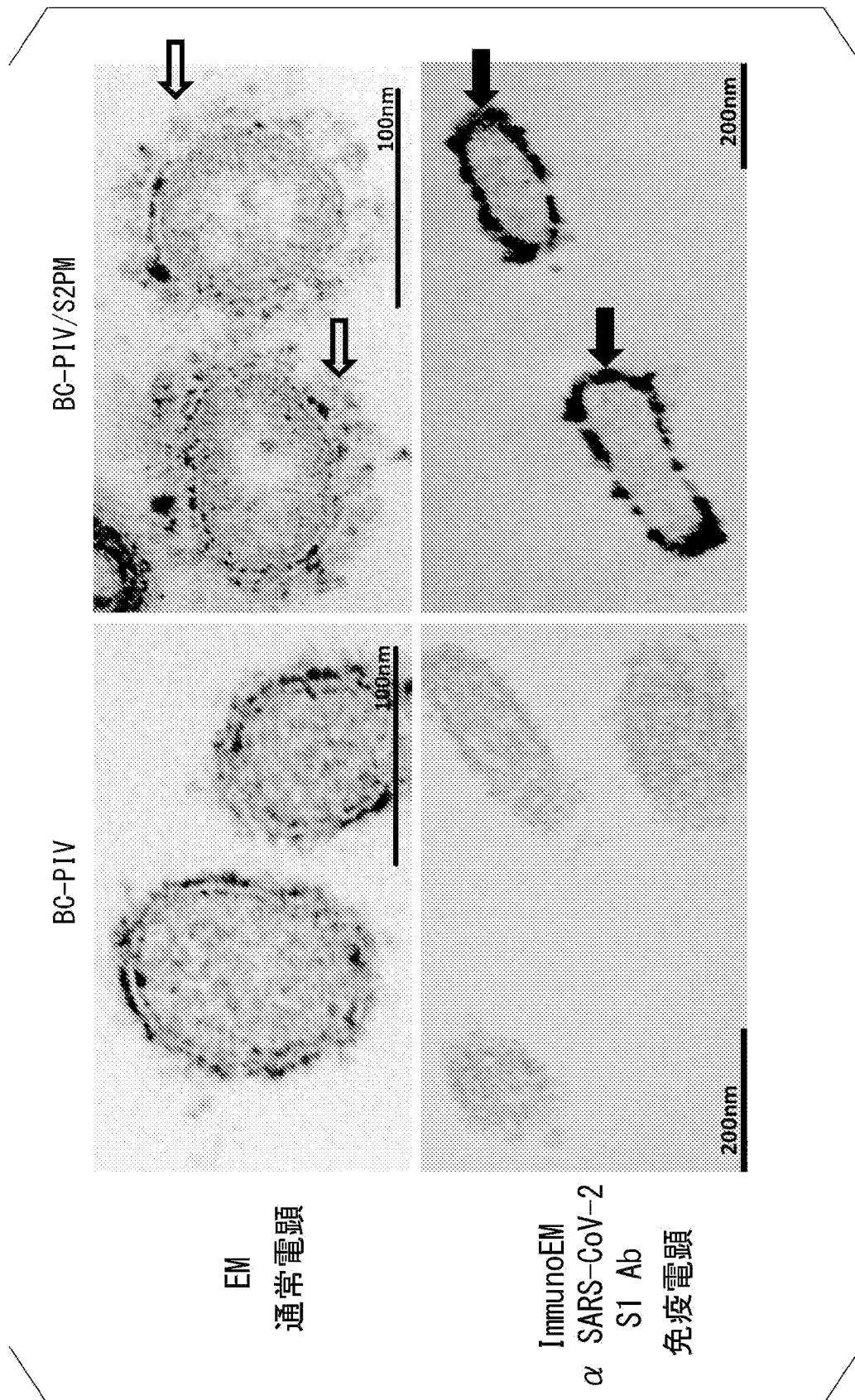
[図5A]



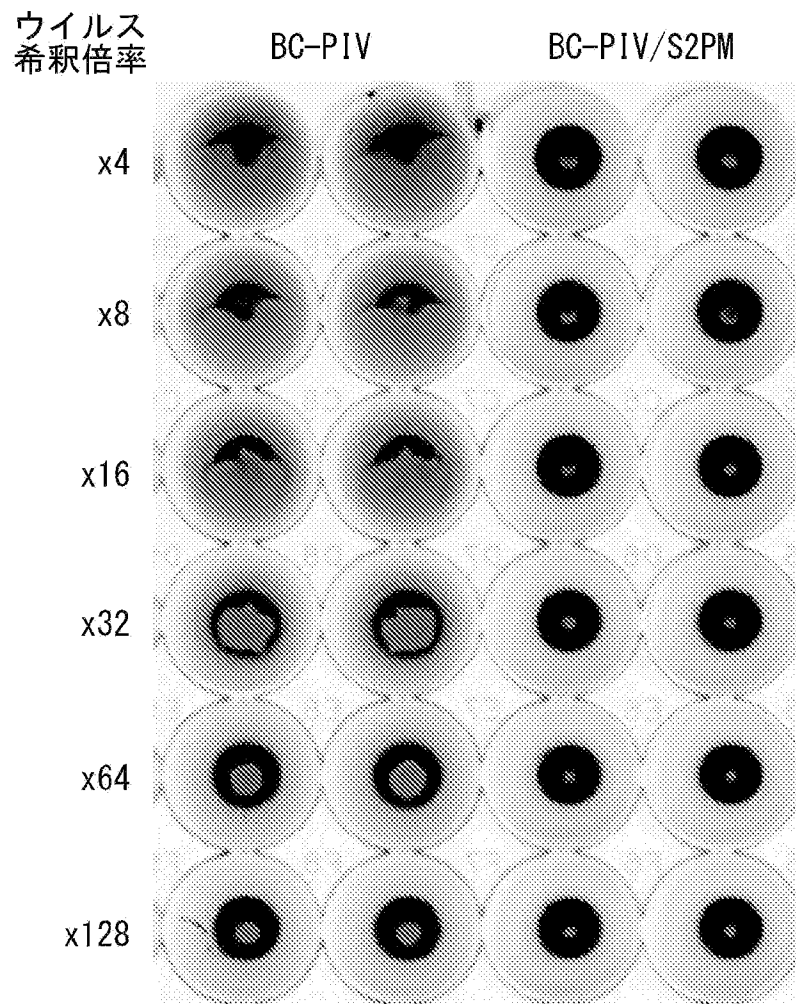
[図5B]



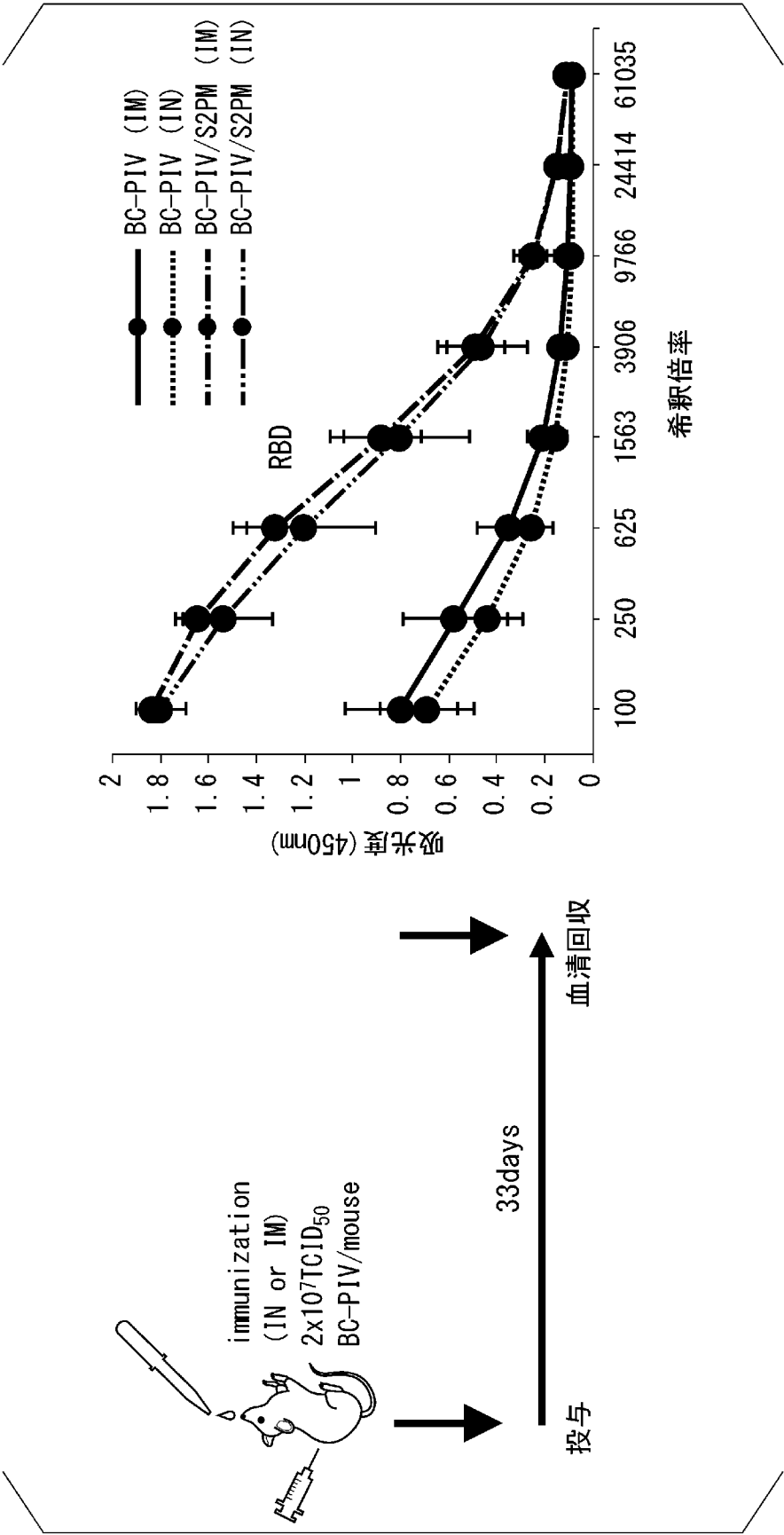
[図6]



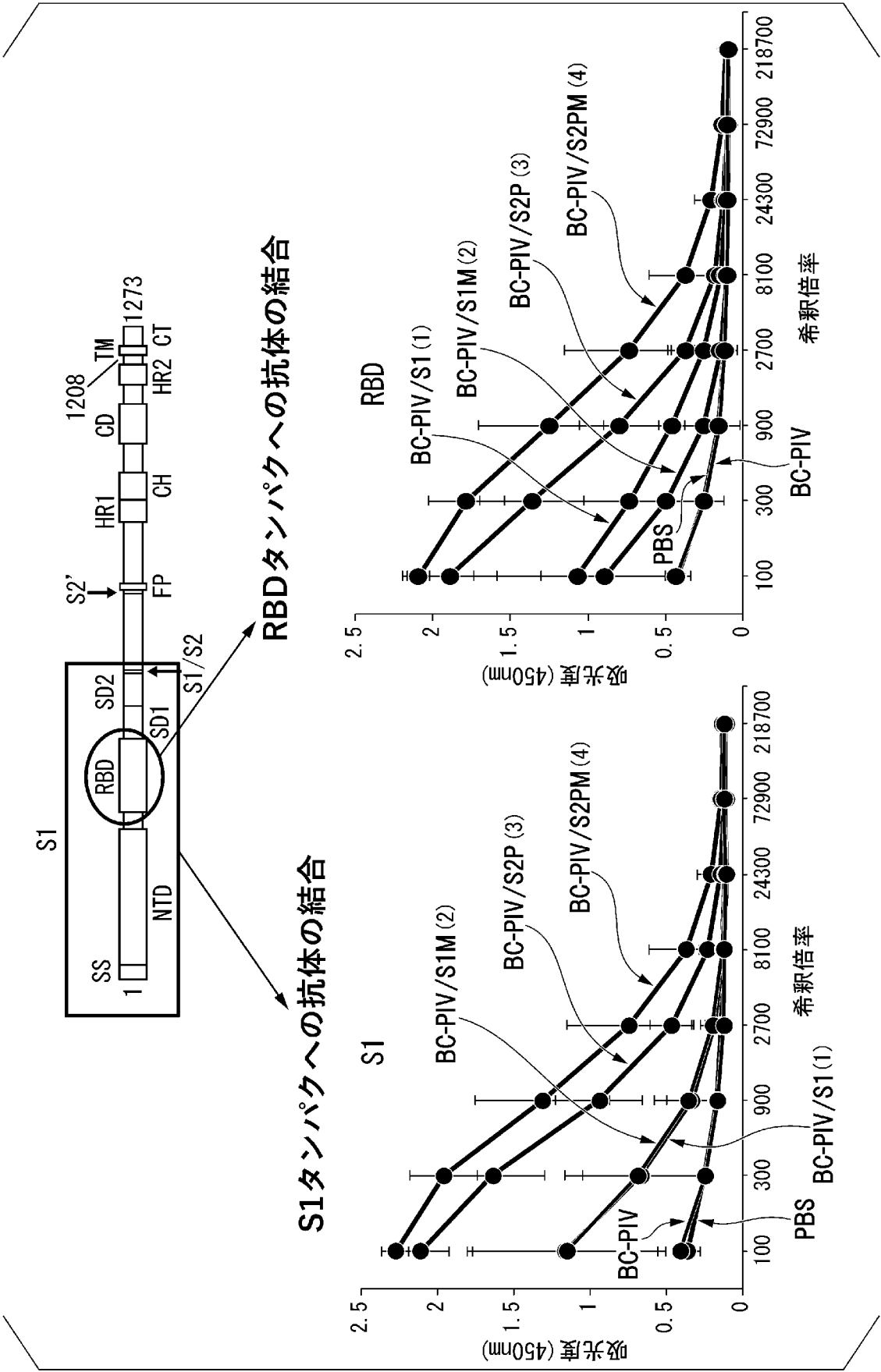
[図7]



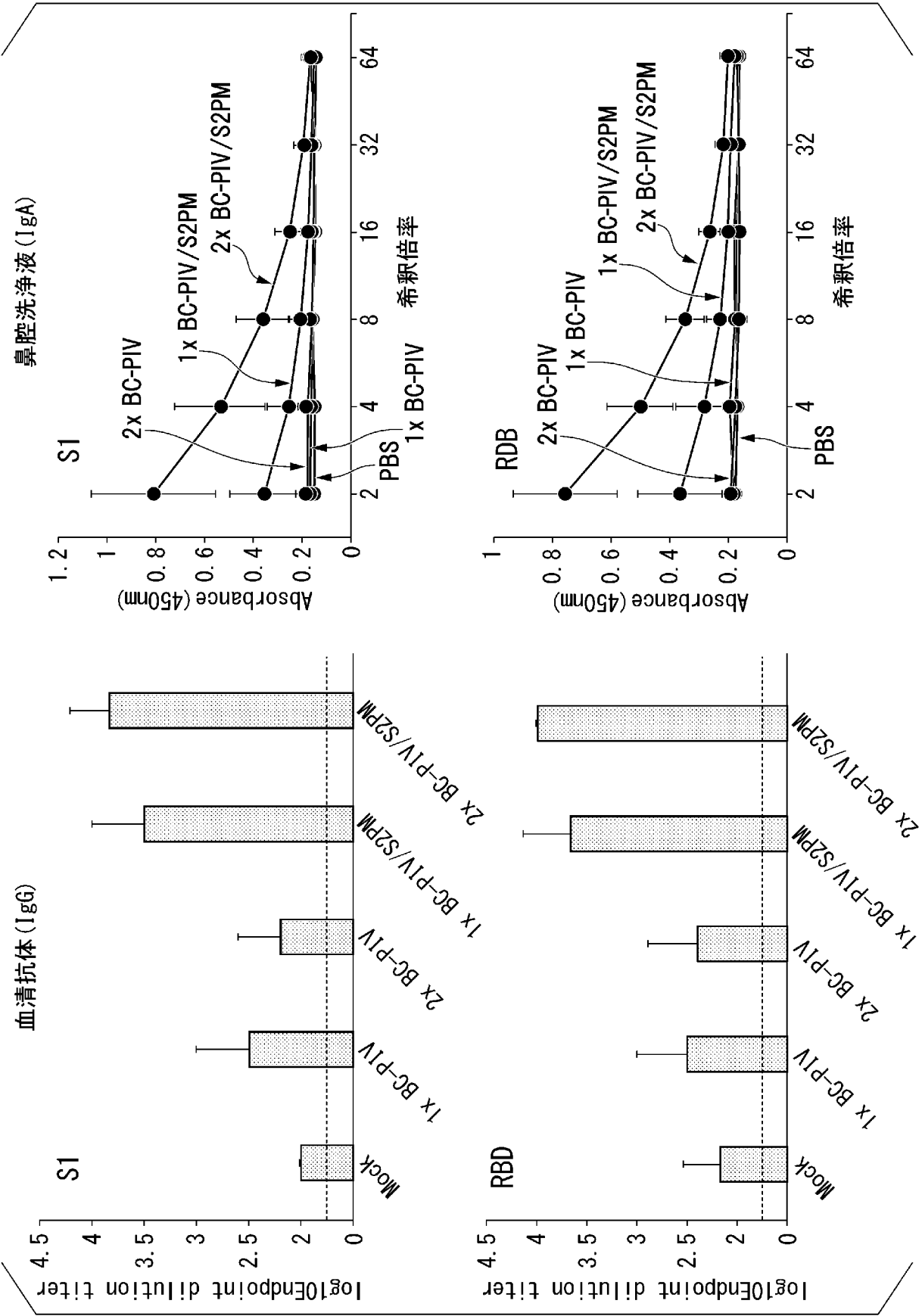
[図8]



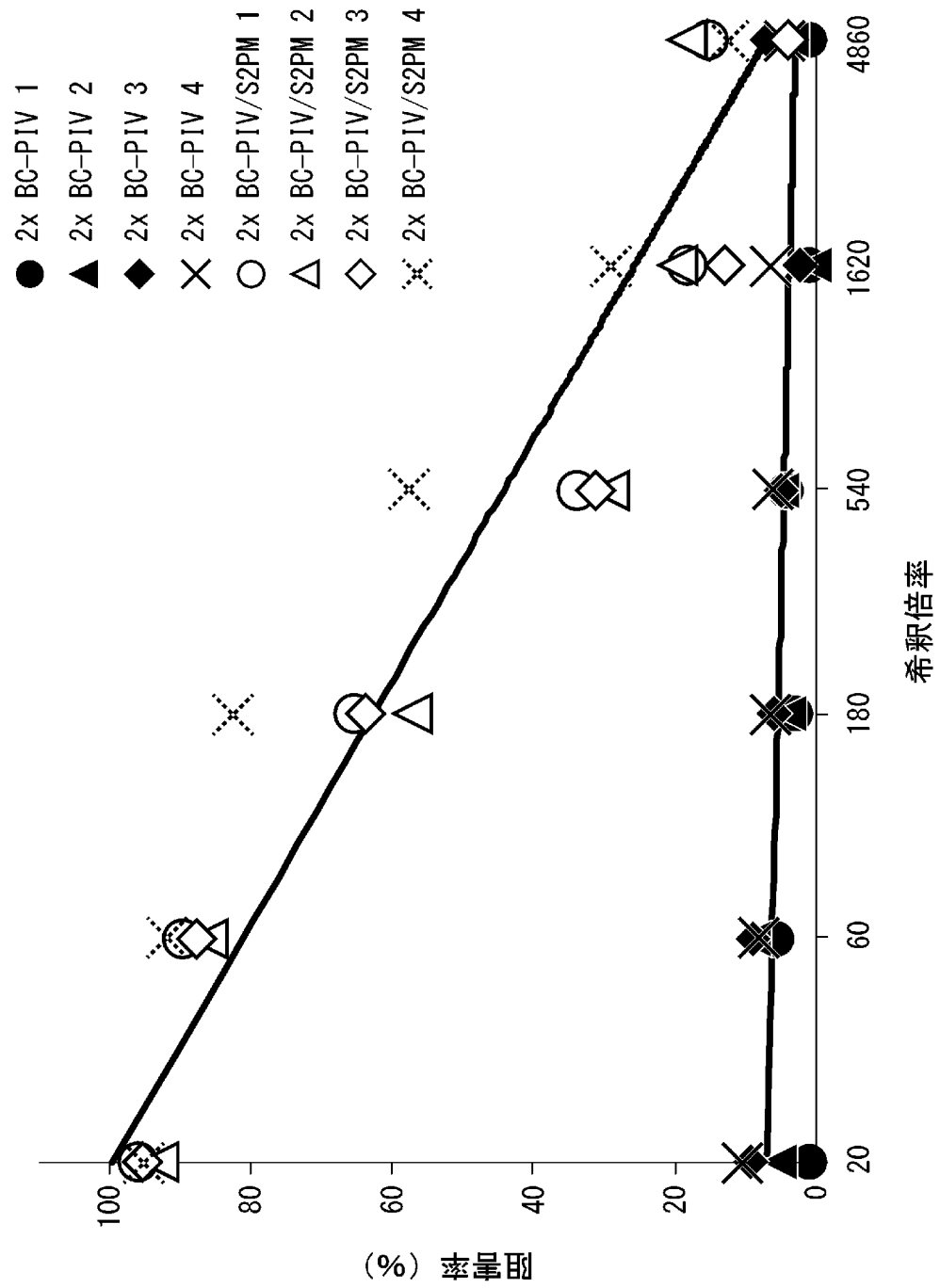
[図9]



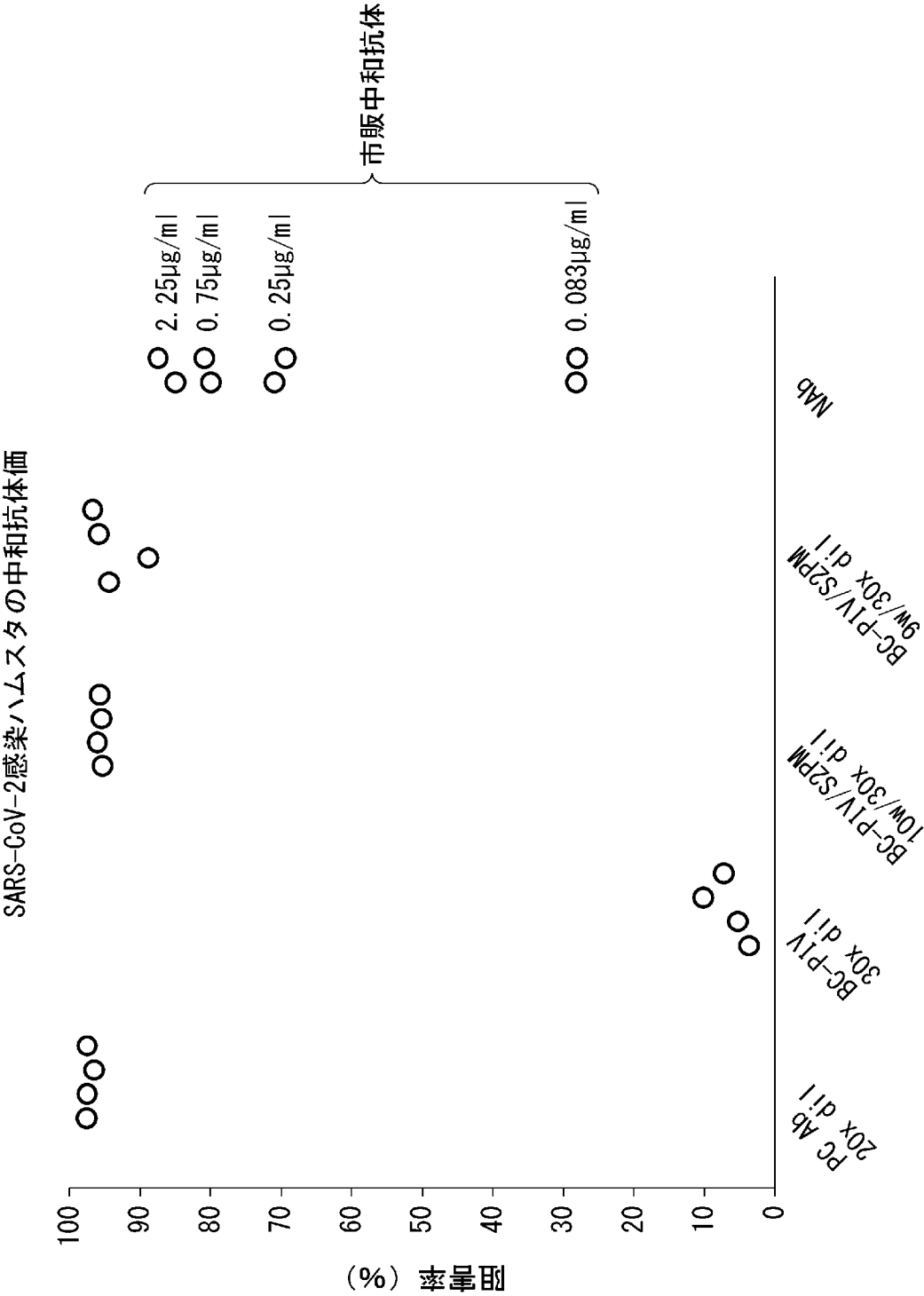
[図10]



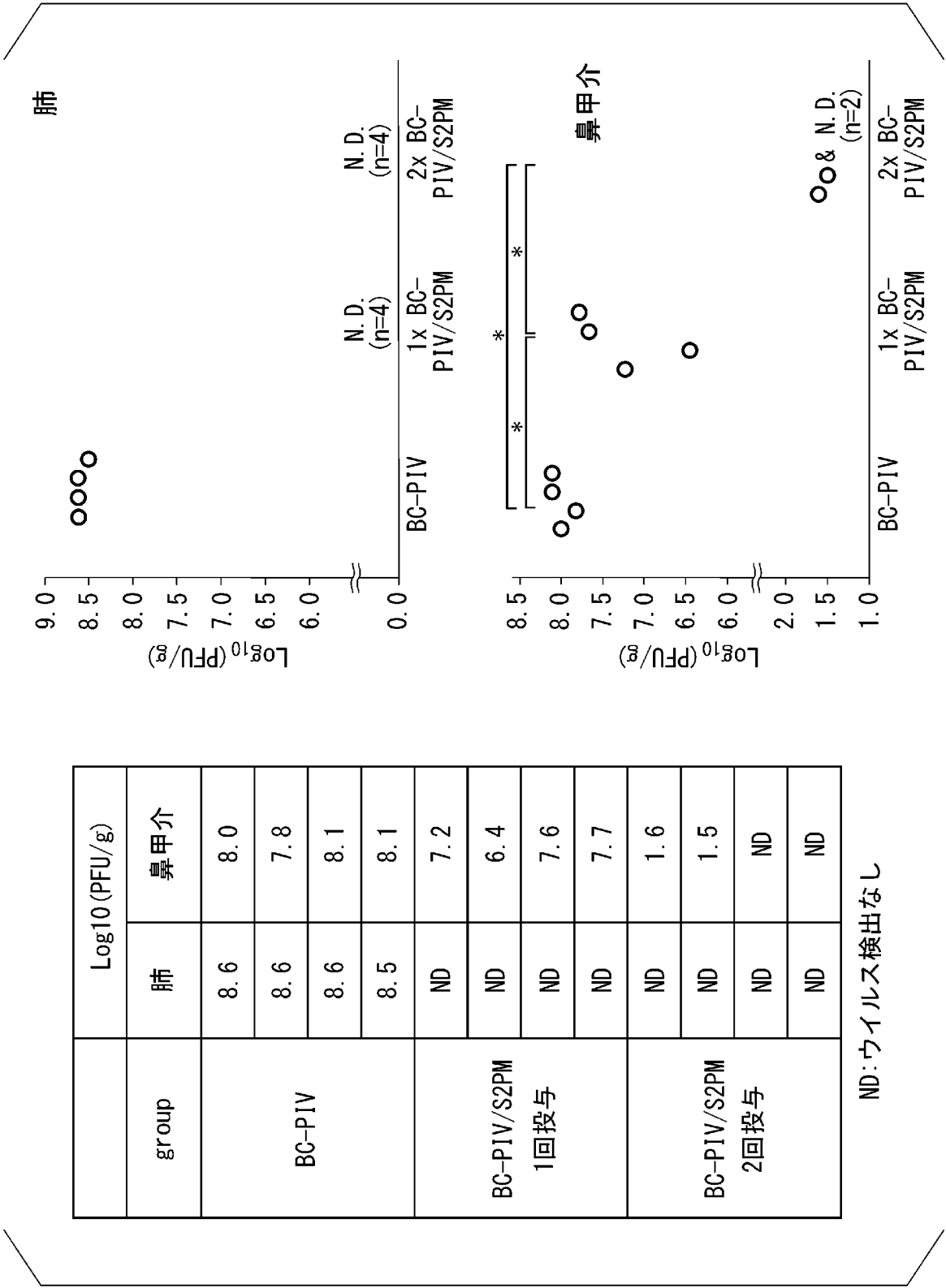
[図11]



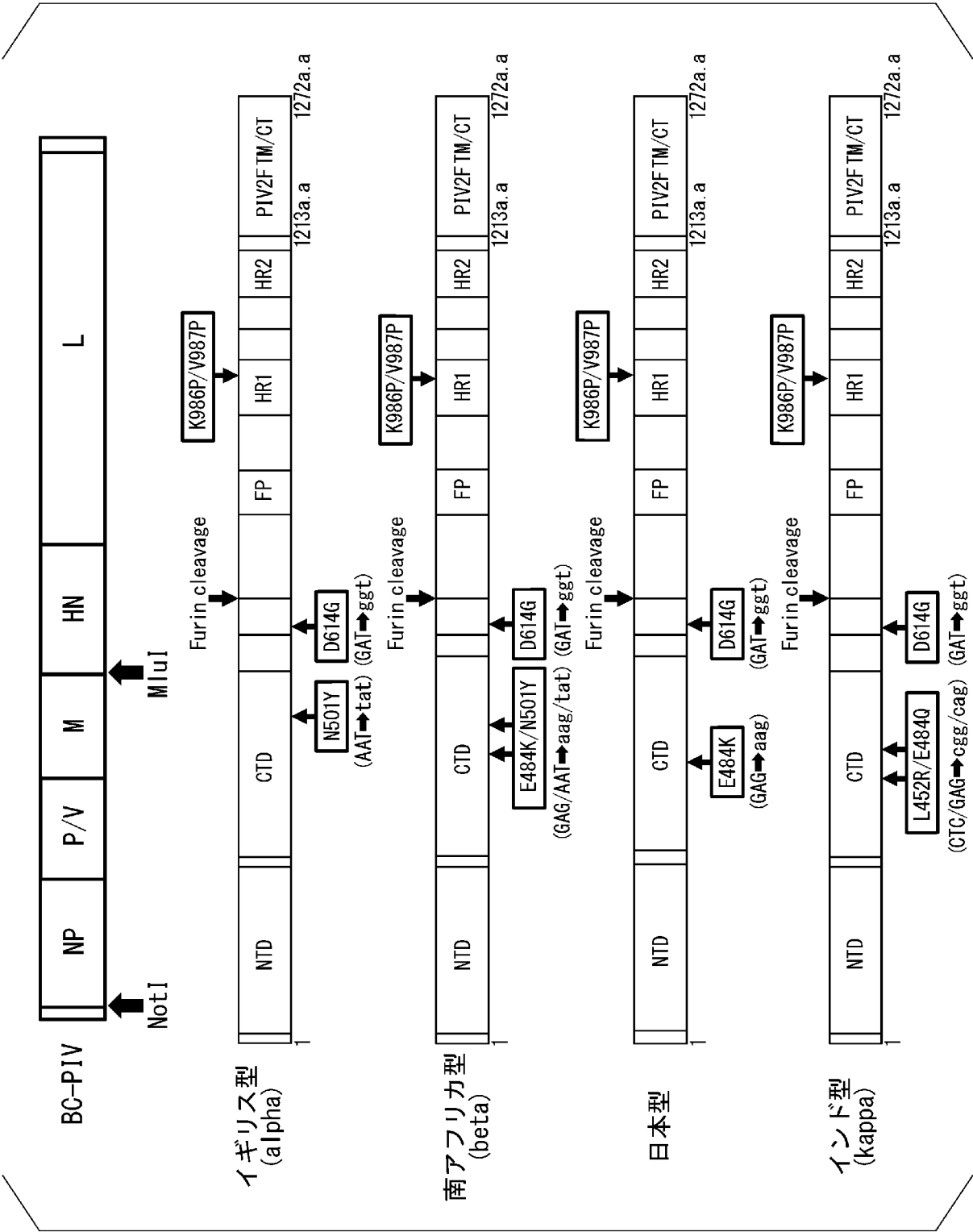
[図12]



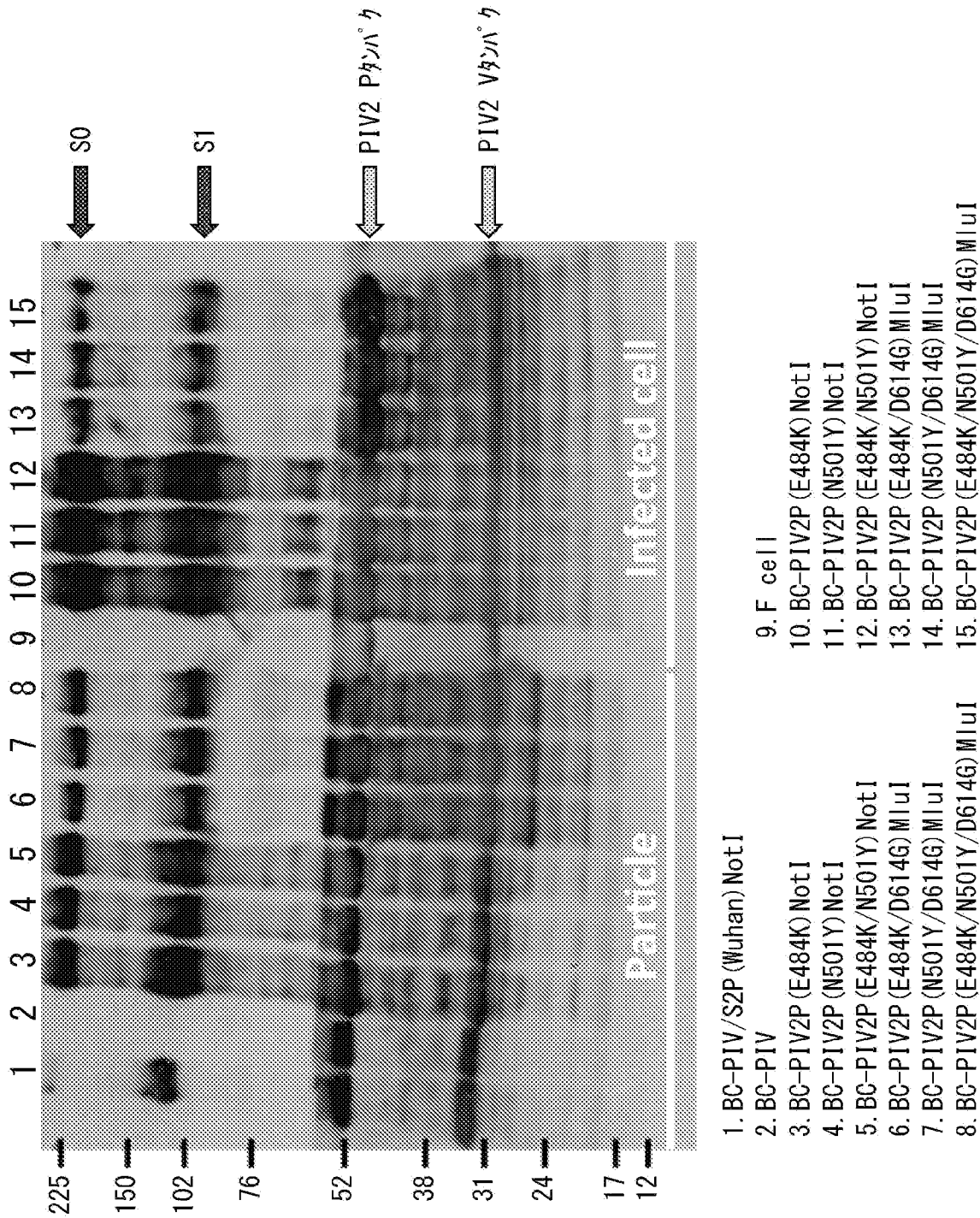
[図13]



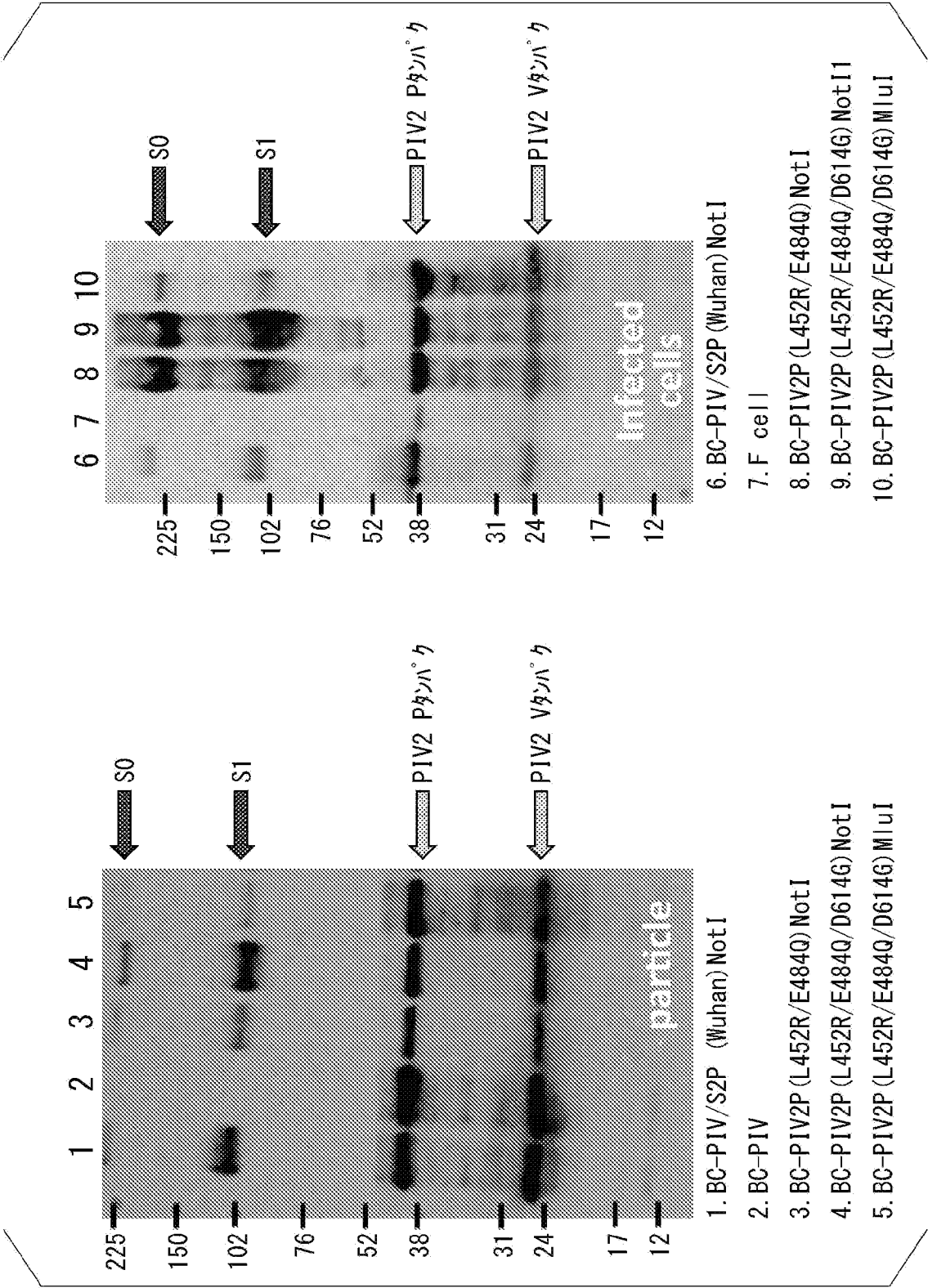
[図14]



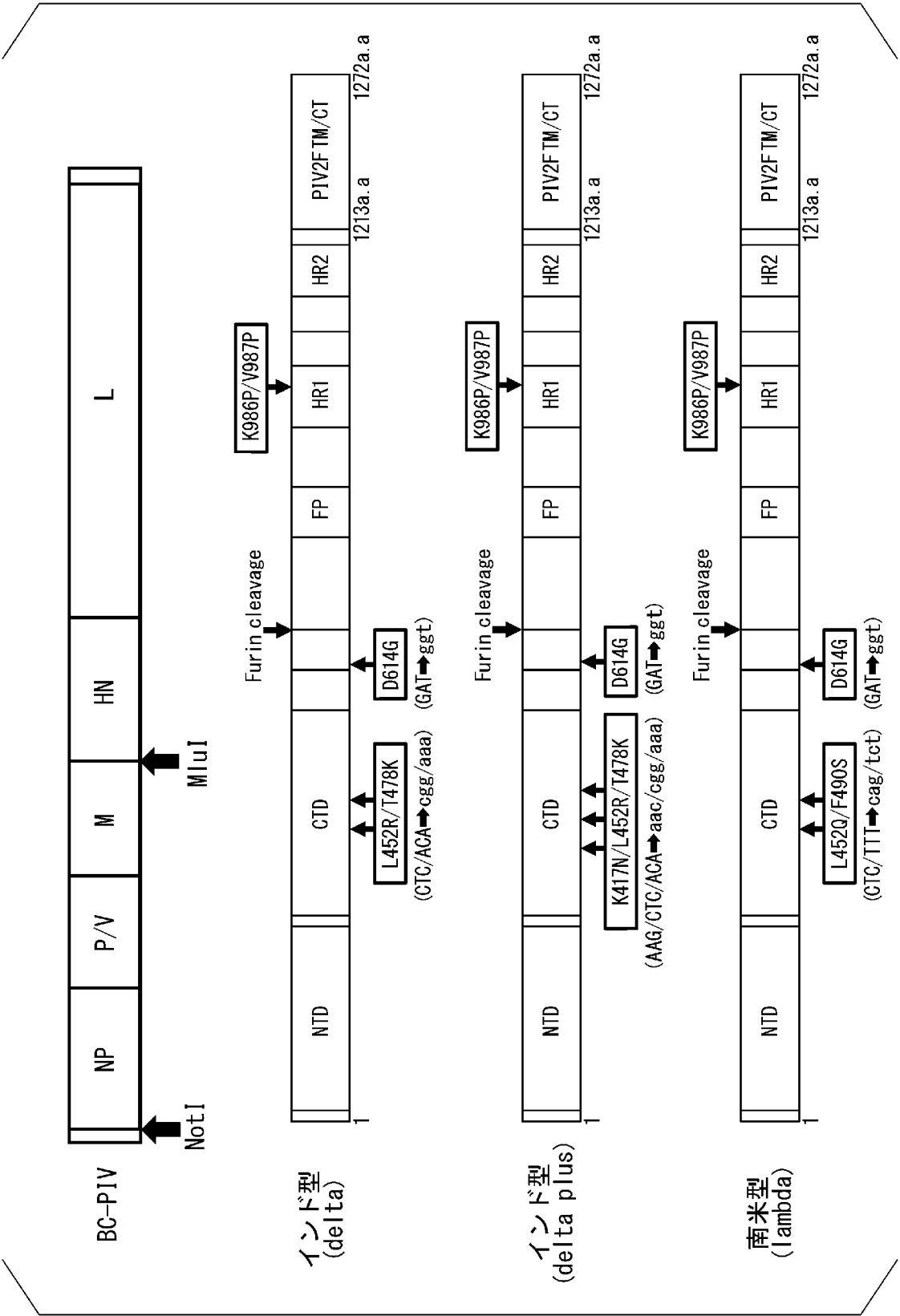
[図15A]



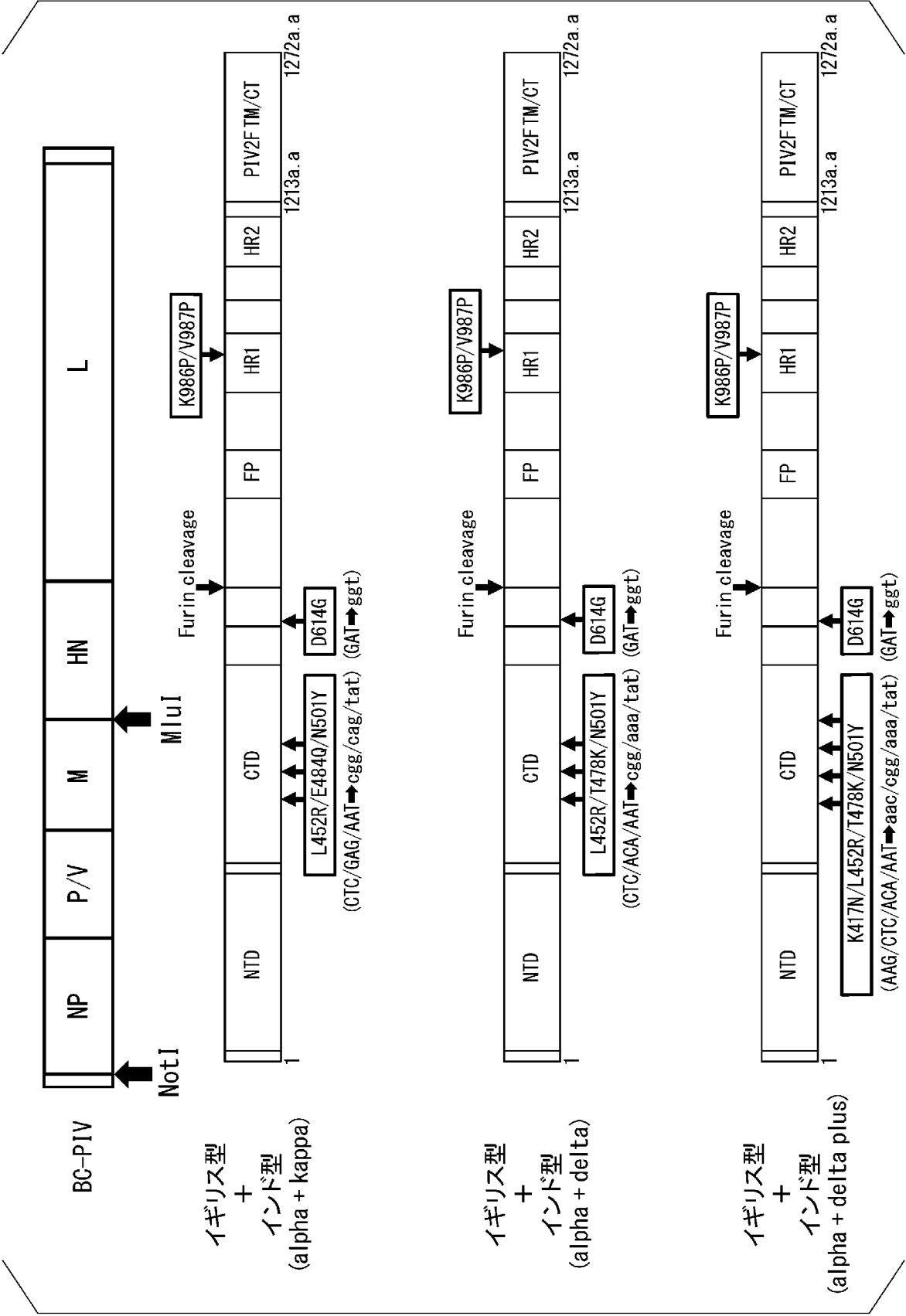
[図15B]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/026368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/215(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; C07K 14/165(2006.01)n; C12N 15/50(2006.01)n

FI: A61K39/215 ZNA; A61K48/00; A61K35/76; A61P31/16; A61P11/00; C12N15/50; C07K14/165

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)

A61K39/215; A61K35/76; A61K48/00; A61P11/00; A61P31/16; C07K14/165; C12N15/50

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CASE, J. B. et al., "Replication-competent vesicular stomatitis virus vaccine vector protects against SARS-CoV-2-mediated pathogenesis", bioRxiv [online], 10 July 2020, [retrieved on 06 September 2021], < https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.09.196386v1.full >, 10 July 2020, in particular, SUMMARY, INTRODUCTION, Recombinant VS, Generation of a VSV-eGFP-SARS-CoV-2 as a vaccine platfor, VSV-eGFP-SARS-CoV-2 protects mice against SARS-CoV-2 infection, DISCUSSION, fig. 1., 2.	1, 8 1-8



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

"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

"I" 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
08 September 2021 (08.09.2021)

Date of mailing of the international search report
21 September 2021 (21.09.2021)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/026368

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CASE, J. B. et al., "Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2", Cell Host Microbe, 03 July 2020, vol. 28, issue 3, pp. 475-485, in particular, SUMMARY, pp. 476-478, left column, fig. 1., METHOD DETAILS	1-8
Y	WO 2016/199936 A1 (MIE UNIVERSITY) 15 December 2016 (2016-12-15) claims, paragraphs [0019], [0020], [0026], [0032]-[0036], [0040], [0046]-[0048]	1-8
Y	新型コロナウイルスワクチン開発着手のお知らせ, バイオコモ株式会社 [online], 19 March 2020, [retrieved on 06 September 2021], < http://www.biocomo.jp/20200319.pdf >, 19 March 2020, entire text, non-official translation ("Notice for development of starting new coronavirus vaccine development", BIOCOMO INCORPORATION [online])	1-8
Y	DOREMALEN, N. et al., "ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques", bioRxiv [online], 13 May 2020, [retrieved on 06 September 2021], < https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1 >, in particular, SUMMARY, Generation of vaccine ChAdOx1 nCoV-19	1-8
Y	PALLESEN, J. et al., "Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2017, vol. 114, issue 35, pp. E7348-E7357, in particular, fig. 1.	1-8
Y	KORBER, B. et al., "Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2", bioRxiv [online], 30 April 2020, [retrieved on 06 September 2021], < https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.29.069054v1 >, in particular, table 1.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/026368

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016/199936 A1	15 Dec. 2016	US 2018/0339038 A1 claims, paragraphs [0036], [0059], [0065]-[0069], [0073], [0079]-[0081] EP 3309251 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/215(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; C07K 14/165(2006.01)n; C12N 15/50(2006.01)n FI: A61K39/215 ZNA; A61K48/00; A61K35/76; A61P31/16; A61P11/00; C12N15/50; C07K14/165																	
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K39/215; A61K35/76; A61K48/00; A61P11/00; A61P31/16; C07K14/165; C12N15/50 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CASE, J. B., et al., Replication-competent vesicular stomatitis virus vaccine vector protects against SARS-CoV-2-mediated pathogenesis, bioRxiv [online], 2020-07-10, [retrieved on 2021-09-06], <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.09.196386v1.full>, 2020.07.10 特にSUMMARY, INTRODUCTION, Recombinant VS, Generation of a VSV-eGFP-SARS-CoV-2 as a vaccine platfor, VSV-eGFP-SARS-CoV-2 protects mice against SARS-CoV-2 infection, DISCUSSION, Figure 1., Figure 2.</td> <td>1,8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CASE, J. B., et al., Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2, Cell Host Microbe, 2020.07.03, vol.28, issue 3, p.475-485 特にSUMMARY, p.476-p.478左欄, Figure 1., METHOD DETAILS</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016/199936 A1 (国立大学法人三重大学) 15.12.2016 (2016-12-15) 特許請求の範囲, 段落[0019], [0020], [0026], [0032]-[0036], [0040], [0046]-[0048]</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	CASE, J. B., et al., Replication-competent vesicular stomatitis virus vaccine vector protects against SARS-CoV-2-mediated pathogenesis, bioRxiv [online], 2020-07-10, [retrieved on 2021-09-06], <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.09.196386v1.full>, 2020.07.10 特にSUMMARY, INTRODUCTION, Recombinant VS, Generation of a VSV-eGFP-SARS-CoV-2 as a vaccine platfor, VSV-eGFP-SARS-CoV-2 protects mice against SARS-CoV-2 infection, DISCUSSION, Figure 1., Figure 2.	1,8	Y		1-8	Y	CASE, J. B., et al., Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2, Cell Host Microbe, 2020.07.03, vol.28, issue 3, p.475-485 特にSUMMARY, p.476-p.478左欄, Figure 1., METHOD DETAILS	1-8	Y	WO 2016/199936 A1 (国立大学法人三重大学) 15.12.2016 (2016-12-15) 特許請求の範囲, 段落[0019], [0020], [0026], [0032]-[0036], [0040], [0046]-[0048]	1-8
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
X	CASE, J. B., et al., Replication-competent vesicular stomatitis virus vaccine vector protects against SARS-CoV-2-mediated pathogenesis, bioRxiv [online], 2020-07-10, [retrieved on 2021-09-06], <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.09.196386v1.full>, 2020.07.10 特にSUMMARY, INTRODUCTION, Recombinant VS, Generation of a VSV-eGFP-SARS-CoV-2 as a vaccine platfor, VSV-eGFP-SARS-CoV-2 protects mice against SARS-CoV-2 infection, DISCUSSION, Figure 1., Figure 2.	1,8															
Y		1-8															
Y	CASE, J. B., et al., Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2, Cell Host Microbe, 2020.07.03, vol.28, issue 3, p.475-485 特にSUMMARY, p.476-p.478左欄, Figure 1., METHOD DETAILS	1-8															
Y	WO 2016/199936 A1 (国立大学法人三重大学) 15.12.2016 (2016-12-15) 特許請求の範囲, 段落[0019], [0020], [0026], [0032]-[0036], [0040], [0046]-[0048]	1-8															
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献	"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献				
* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献																
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																	
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																	
国際調査を完了した日 08.09.2021		国際調査報告の発送日 21.09.2021															
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 池上 文緒 4U 3765 電話番号 03-3581-1101 内線 3439															

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	新型コロナウイルス策貨開発着手のお知らせ, パイオコモ株式会社 [online], 2020-03-19, [retrieved on 2021-09-06], < http://www.biocomo.jp/20200319.pdf >, 2020.03.19 全文	1-8
Y	DOREMALEN, N., et al., ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques, bioRxiv [online], 2020-05-13, [retrieved on 2021-09-06], < https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1 > 特にSUMMARY, Generation of vaccine ChAdOx1 nCoV-19	1-8
Y	PALLESEN, J., et al., Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2017, vol.114, issue 35, p.E7348-E7357 特にFig. 1.	1-8
Y	KORBER, B., et al., Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2, bioRxiv [online], 2020-04-30, [retrieved on 2021-09-06], < https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.29.069054v1 > 特にTable 1.	1-8

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際出願番号
PCT/JP2021/026368

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2016/199936	A1	15.12.2016	US 2018/0339038 A1 特許請求の範囲，段落 [0036]，[0059]，[0065]- [0069]，[0073]，[0079]- [0081] EP 3309251 A1	