(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-529065
(P2023-529065A)
(43)公表日　令和5年7月7日(2023.7.7)

| (51)国際特許分類 | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ* | *39/12* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 39/12 | ４Ｃ０７６ |
| *Ａ６１Ｐ* | *31/20* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 31/20 | ４Ｃ０８５ |
| *Ａ６１Ｋ* | *9/16* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 9/16 | ４Ｈ０４５ |
| *Ａ６１Ｋ* | *47/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 47/04 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *47/52* | *(2017.01)* | Ａ６１Ｋ | 47/52 | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全62頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-568723(P2022-568723)
(86)(22)出願日　令和3年5月12日(2021.5.12)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月6日(2023.1.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/062748
(87)国際公開番号　WO2021/229014
(87)国際公開日　令和3年11月18日(2021.11.18)
(31)優先権主張番号　20174156.8
(32)優先日　令和2年5月12日(2020.5.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　20196027.5
(32)優先日　令和2年9月14日(2020.9.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　514225146
ライフ サイエンス インクバトーア ベトリープス ゲーエムベーハー ウント コンパニー カーゲー
ドイツ国 ５３１７５ ボン， ルートヴィヒ－エアハルト－アレー ２
(71)出願人　522440072
ドイチェス クレープスフォアシュングスツェントルム シュティフトゥング デス エッフェントリッヒェン レヒテス
ドイツ国 ６９１２０ ハイデルベルク，イム ノイエンハイマー フェルト ２８０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントのためのの担体としてのナノ粒子の組成物

(57)【要約】
本開示は、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントの担体としてのナノ粒子の組成物、および医療目的、特に免疫予防法または免疫療法のための組成物の使用に関する。本発明はまた、組成物および／またはナノ粒子を含有するワクチンに関する。この組成物は、二酸化ケイ素および表面上の官能基を有するナノ粒子を含む組成物であり得、ナノ粒子に、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントおよびポリ（Ｉ：Ｃ）またはその任意の誘導体を含む薬学的に許容され得る化合物が負荷され得る。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つもしくはそれを超えるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントまたはそのバリアントを含む薬学的に許容され得る化合物が負荷された、二酸化ケイ素および表面上の官能基を有するナノ粒子を含む組成物であって、
－前記官能基は、前記薬学的に許容され得る化合物の負電荷および正電荷の両方を担持および／または安定化することができ、
－前記組成物のゼータ電位は、少なくとも±１５ｍＶの値を有し、
－前記ナノ粒子は、１５０ｎｍ未満の粒径を有する、
組成物。
【請求項２】
前記免疫原性フラグメントが、好ましくは配列番号５～２５７から選択される、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来することを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記免疫原性フラグメントが、好ましくは配列番号２５８～２９５から選択される、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来する免疫原性フラグメントと少なくとも７５％同一であることを特徴とする、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記免疫原性フラグメントが、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩおよび／またはＭＨＣクラスＩＩに結合することができることを特徴とする、請求項１から３までのいずれかに記載の組成物。
【請求項５】
前記免疫原性フラグメントが細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導することができることを特徴とする、請求項１から４までのいずれかに記載の組成物。
【請求項６】
前記ナノ粒子に、１つもしくはそれを超えるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントおよびポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリ（Ｉ：Ｃ））またはその任意の誘導体を含む薬学的に許容され得る化合物が負荷されている、請求項１から５までのいずれかに記載の組成物。
【請求項７】
前記ナノ粒子が、$nm^2$単位の前記ナノ粒子の表面に対する前記薬学的に許容され得る化合物の総数［分子／$nm^2$］に関して、最大０．５、好ましくは０．０１～０．５、より好ましくは０．０３～０．４、最も好ましくは０．０５～０．３の表面負荷密度を有する、請求項１から６までのいずれかに記載の組成物。
【請求項８】
前記負荷されたナノ粒子の合計の正味電荷が０とは異なる、先行する請求項のいずれかに記載の組成物。
【請求項９】
前記官能基が、共有結合または吸着結合によって前記ナノ粒子の表面に結合されたリンカーＬに連結されている、先行する請求項のいずれかに記載の組成物。
【請求項１０】
前記リンカー化合物Ｌが、官能基として少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（$-COO^-$）基を含む、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記リンカー化合物Ｌが、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（$=NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（$-NH_2$もしくは$-NH_3^+$）基を含む、請求項９または１０に記載の組成物。
【請求項１２】

前記薬学的に許容され得る化合物が、吸着結合によって前記ナノ粒子にコンジュゲートされている、先行する請求項のいずれかに記載の組成物。
【請求項１３】
ワクチンとしてまたは免疫賦活剤として使用するための、先行する請求項のいずれかに記載の組成物。
【請求項１４】
ＨＰＶ感染症の予防もしくはＨＰＶ陽性ヒトの処置またはＨＰＶ陽性腫瘍の処置のためのワクチンとして使用するための、先行する請求項のいずれかに記載の組成物。
【請求項１５】
先行する請求項のいずれかに記載の組成物を含むワクチン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントの担体としてのナノ粒子の組成物、および医療目的、特に免疫予防法または免疫療法のための組成物の使用に関する。本発明はまた、組成物および／またはナノ粒子を含有するワクチンに関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
子宮頸癌は、世界で最も頻繁に見られる癌の種類の１つであり、一般にヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって誘導される。さらに、ＨＰＶ感染症は、いくつかの他の前癌状態および悪性状態を引き起こす可能性があり、世界中で年間数十万人の死亡につながっている。したがって、効果的な処置様式が緊急に必要とされている。
【０００３】
１００を超える個々のＨＰＶ遺伝子型が記載されている。「高リスク」ＨＰＶ遺伝子型は、悪性状態を発症するリスクと関連している。これらの高リスク遺伝子型には、ＨＰＶ型１６、１８、３１、３３、３５、３９、４５、５１、５２、５６、５８、５９、６６、６８、７３および８２が含まれ、これらは子宮頸癌につながる可能性があり、他の粘膜肛門性器癌および頭頸部癌に関連している（ｚｕｒ Ｈａｕｓｅｎ Ｈ．，Ａｐｐｌ Ｐａｔｈｏｌ １９８７，５：１９－２４；Ｂｏｓｃｈ ＦＸら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐａｔｈｏｌ ５５：２４４－６５；Ｇｉｌｌｉｓｏｎ ＭＬら、Ｖａｃｃｉｎｅ ３０ Ｓｕｐｐｌ ５：Ｆ３４－５４１－３，２０１２）。ＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８は主な発癌型であり、累積的にすべての浸潤性子宮頸癌症例の７０～８０％超を占める。蓄積されたデータは、細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞の両方の応答が、ＨＰＶ感染症の制御および排除において極めて重要な役割を果たすことを示唆している（Ｓｔａｎｌｅｙ ＭＡ，Ｊ Ｒｅｐｒｏｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ ５２：４５－５９，２００１；Ｗｅｌｔｅｒｓ ＭＪら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６３：６３６－４，２００３；Ｎａｋａｇａｗａ Ｍら、Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ １８２：５９５－８，２０００；ｖａｎ ｄｅｒ Ｂｕｒｇ ＳＨら、Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ ８９：２７５－８４，２００２）。ＨＰＶタンパク質Ｅ６およびＥ７は、ＨＰＶ免疫回避および悪性進行にとって特に重要であると見なされている。主要なトランスフォーミングタンパク質としてのＥ６およびＥ７は、前悪性病変および進行病変の両方で構成的に発現され、ＨＰＶ誘導性悪性腫瘍の免疫療法アプローチの理想的な標的となる（ｚｕｒ Ｈａｕｓｅｎ Ｈ．，Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ９２：６９０－８，２０００；Ｔａｎ Ｓら、Ｃｕｒｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ １２：１７０－８４，２０１２）。
【０００４】
免疫療法は、感染症および（前）癌性状態の処置のための魅力的な選択肢である。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞は細胞傷害性Ｔ細胞応答の誘導および維持に重要であり、また直接抗腫瘍免疫にも重要であることが示されていることから、主要組織適合遺伝子複合体

（ＭＨＣ）クラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩによって提示される免疫原性フラグメントは、ＨＰＶワクチンなどのペプチドベースのＨＰＶ免疫療法の有効性を改善するために集中的に調査されている。各ヒトは、３～６個のＭＨＣクラスＩおよび少なくとも同じ数のＭＨＣクラスＩＩ分子（ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）分子とも呼ばれる）を発現する。これまでに、ヒトＭＨＣクラスＩの３０００を超えるバリアントおよびＭＨＣクラスＩＩの１０００のバリアントが特徴付けられている（Ｒｏｂｉｎｓｏｎ Ｊら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３７：Ｄ １０１３－Ｄ１０１７，２００９）。したがって、効果的な免疫予防法および免疫療法のための多種多様な異なるＨＬＡ分子に結合する能力を有する免疫原性フラグメントの使用が望ましい。したがって、細胞傷害性Ｔ細胞応答をＥ６および／またはＥ７タンパク質に集中させるためには、悪性細胞のＨＬＡ分子上に提示される免疫原性フラグメントを定義することが重要である。

【０００５】

ＨＰＶ感染症および関連症状に対処する上での重要な進歩は、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）予防ワクチンの開発であった。現在までに、市場で入手可能な３つのＨＰＶワクチンは、組換え産生されたＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８由来の主要カプシドタンパク質Ｌ１を含む。Ｃｅｒｖａｒｉｘ（登録商標）（グラクソ・スミスクライン社）は、組換え産生されたＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８ ＶＬＰを含み、免疫賦活剤３－０－デサシル－４’－モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬとしても知られている３Ｄ ＭＰＬ）および水酸化アルミニウム塩と共に製剤化される。Ｇａｒｄａｓｉｌ（登録商標）およびＧａｒｄａｓｉｌ（登録商標）９（Ｍｅｒｃｋ Ｓｈａｒｐ＆Ｄｏｈｍｅ社）は、組換え産生されたＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８ ＶＬＰを含有し、非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェイト硫酸塩と製剤化される。Ｇａｒｄａｓｉｌ（登録商標）はＨＰＶ６およびＨＰＶ１１のＶＬＰも含有するが、Ｇａｒｄａｓｉｌ（登録商標）９は、ＨＰＶ３１、ＨＰＶ３３、ＨＰＶ４５、ＨＰＶ５２、およびＨＰＶ５８のＶＬＰをさらに含む。これらの承認されたワクチンについて、発癌型ＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８ならびに関連する前癌性病変による感染症に対する特異的保護が、無作為化臨床試験において実証されている。

【０００６】

ＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８のＥ６およびＥ７タンパク質を標的とする合成ＤＮＡワクチンＶＧＸ－３１００は、ＨＰＶ１６およびＨＰＶ１８感染症ならびに子宮頸部（第ＩＩＩ相）および外陰部（第ＩＩ相）の前癌性病変の免疫療法における使用の可能性について臨床試験で現在調査されている。

【０００７】

ＨＰＶ関連症状の処置に適したＨＰＶのＥ６およびＥ７タンパク質のいくつかの免疫原性フラグメントは、当該技術分野で公知である。

【０００８】

例えば、ＨＰＶ１６の合成免疫原性フラグメントＥ７$_{11-19}$を含むＨＰＶワクチンＤＰＸ－Ｅ７の安全性および有効性は、現在、ＨＰＶまたはＨＰＶ関連頭頸部、子宮頸癌または肛門癌の可能な処置選択肢として第Ｉｂ／ＩＩ相臨床試験で調査されている。

【０００９】

国際公開第２０１５／０８６３５４号は、ＭＨＣクラスＩＩに結合し、免疫応答を誘発することができるＨＰＶ１６由来のペプチドの新規アミノ酸配列に関する（第４／５欄、表ＡおよびＡ１、配列番号４および７）。さらに、前述のペプチドは、ワクチンなどの医薬品における使用のために提案される。

【００１０】

国際公開第２０１８／０８５７５１号は、ＨＰＶ Ｅ６タンパク質またはポリペプチド（第３０頁、表１、配列番号４、５、７）およびＨＰＶ Ｅ７タンパク質またはポリペプチド（第３０頁、表１、配列番号８、１０、１２）に由来するタンパク質またはポリペプチドに関する。さらに、タンパク質またはペプチドを含む組成物を対象に投与することによって、対象におけるＨＰＶ感染症またはＨＰＶ関連癌を阻害する方法が記載される。

【００１１】

抗原は、単独で注射された場合、通常、抗原提示細胞によって無視され、速やかに除去され、ひいては免疫応答を誘導しないことから、適切なアジュバントと組み合わせた投与が必要である。したがって、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントの適切な送達、ひいてはＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩに結合したそれらの免疫原性フラグメントのＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞への適切な提示を確実にする担体系を提供することへの高い需要がある。

【００１２】

ナノ医療およびナノ送達システムは、比較的新しいが急速に発展している科学であり、ナノスケール範囲の材料を使用して、診断もしくは治療ツールの手段として機能させるか、または治療薬を体内の特定の標的部位に送達される。特に、ナノ粒子は、化学療法薬、生物学的薬剤、免疫療法薬の送達、および免疫療法におけるワクチンとして知られている。

【００１３】

官能化ナノ粒子は、薬物送達系として、例えば抗原の担体としてよく知られている。文献には、特に、抗原がカプセル化されているかまたはナノ粒子の表面に結合している担体系が記載されている。

【００１４】

国際公開第２００６／０３７９７９号は、アジュバントおよび抗原、例えば腫瘍および病原体抗原を含む金ナノ粒子（ＧＮＰ）、ならびに癌および感染性疾患の処置などの様々な用途におけるそれらの使用を記載している。糖質リガンドを有するナノ粒子または抗体に基づく免疫原性構造、ならびに治療目的および予防目的、ならびに糖質構造に対する抗体の単離および検出のためのそれらの使用も開示される。

【００１５】

国際公開第２０１３／０３４７４１号および国際公開第２０１３／０３４７２６号は、リンカーを介して結合したエピトープペプチドを有し、例えば哺乳動物対象における腫瘍の予防的処置または治療的処置においてワクチンとしての使用が見出されるナノ粒子に関する。

【００１６】

国際公開第２０１１／１５４７１１号は、インスリンなどのペプチドの送達のための担体として作用する糖化金ナノ粒子を記載している。

国際公開第２０１０／００６７５３号は、少なくとも１つの抗原が表面に結合した二酸化ケイ素の単分散ナノ粒子を開示している。ナノ粒子は、癌の免疫予防または免疫療法に使用される。

多くのナノ粒子が、特に癌の処置に関連して調査および開発されてきたが、特にそのアジュバント効果の点で、改善された特性を有する物質を提供することへの需要は依然として高い。さらに、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントなどの薬理学的に関連する薬剤を身体の免疫系に提示するための柔軟で便利な系としてナノ粒子を提供する必要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１７】

【特許文献１】国際公開第２００６／０３７９７９号
【特許文献２】国際公開第２０１３／０３４７４１号
【特許文献３】国際公開第２０１３／０３４７２６号
【特許文献４】国際公開第２０１１／１５４７１１号
【特許文献５】国際公開第２０１０／００６７５３号
【特許文献６】国際公開第２０１５／０８６３５４号
【特許文献７】国際公開第２０１８／０８５７５１号

【非特許文献】

【００１８】

【非特許文献１】ｚｕｒ　Ｈａｕｓｅｎ　Ｈ．，Ａｐｐｌ　Ｐａｔｈｏｌ　１９８７，５

：１９－２４
【非特許文献２】Ｂｏｓｃｈ ＦＸら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐａｔｈｏｌ ５５：２４４－６５
【非特許文献３】Ｇｉｌｌｉｓｏｎ ＭＬら、Ｖａｃｃｉｎｅ ３０ Ｓｕｐｐｌ ５：Ｆ３４－５４１－３，２０１２
【非特許文献４】Ｓｔａｎｌｅｙ ＭＡ，Ｊ Ｒｅｐｒｏｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ ５２：４５－５９，２００１
【非特許文献５】Ｗｅｌｔｅｒｓ ＭＪら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６３：６３６－４，２００３
【非特許文献６】Ｎａｋａｇａｗａ Ｍら、Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ １８２：５９５－８，２０００
【非特許文献７】；ｖａｎ ｄｅｒ Ｂｕｒｇ ＳＨら、Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ ８９：２７５－８４，２００２
【非特許文献８】ｚｕｒ Ｈａｕｓｅｎ Ｈ．，Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ９２：６９０－８，２０００
【非特許文献９】Ｔａｎ Ｓら、Ｃｕｒｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔｓ １２：１７０－８４，２０１２
【非特許文献１０】Ｒｏｂｉｎｓｏｎ Ｊら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３７：Ｄ １０１３－Ｄ１０１７，２００９

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１９】
発明の要旨
したがって、本発明の目的は、特に免疫予防法または免疫療法に使用するための、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントの担体としての改善されたナノ粒子およびそれらを含む組成物を提供することである。さらに、本発明の目的は、ＨＰＶ関連症状の予防および処置に使用するための改善されたＨＰＶワクチン組成物を提供することである。
【００２０】
これらの目的は、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントを含む薬学的に許容され得る化合物が負荷された、二酸化ケイ素および表面上の官能基を有するナノ粒子を含む組成物を提供することによって解決される。あるいは、ナノ粒子に、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントおよびポリ（Ｉ：Ｃ）またはその任意の誘導体を含む薬学的に許容され得る化合物が負荷される。薬学的に許容され得る化合物（ポリ（Ｉ：Ｃ）およびＨＰＶ由来の免疫原性フラグメント）は、ナノ粒子のペイロードを表す。ナノ粒子は、１５０ｎｍ未満の粒径を有する。ナノ粒子の表面上の官能基は、そのような化合物の負電荷および正電荷を担持および／または安定化するのに適している。組成物は、少なくとも±１５ｍＶのゼータ電位を有する。
【００２１】
ポリ（Ｉ：Ｃ）は、ウイルス感染のパターンと同様のパターンで宿主防御の複数の要素を活性化することができる合成ｄｓＲＮＡである。ポリ（Ｉ：Ｃ）の誘導体は、例えば、ポリＩ：ポリＣ$_{12}$ＵおよびポリＩＣＬＣである。
【００２２】
本発明による組成物は、ＨＰＶ関連症状の免疫予防法および免疫療法のための免疫調節有効性を示すことが見出された。
【００２３】
さらに、本発明による組成物を用いて、生理学的条件下であってもコロイド懸濁液の安定性が欠如するという、薬物送達のためのナノ粒子の１つの基本的な問題が克服される。
【００２４】
水性系において、表面電荷は本質的にコロイド系の安定性を保証する。これらの電荷は正または負であり得る。粒子の凝集を実質的に低減またはそれどころか回避するためには、同じ電荷の十分な官能基が存在することが重要であり、これが静電反発をもたらす。コ

ロイド担体系の電荷が反対に荷電した分子の吸着によって補償される場合、凝集体が形成され、コロイド系が崩壊するであろう。

【００２５】

凝集体は、著しく大きな粒径を有し、このことは体内でのこれらの大きな粒子の効果的な輸送を危険にさらし、あまり効果的でない免疫調節有効性もたらす。

【００２６】

１５０ｎｍ未満の粒径および少なくとも±１５ｍＶのゼータ電位を有するナノ粒子を含む本発明による組成物は、組成物が十分に安定であることを保証する。特に生理学的条件下では、その中に分散されたナノ粒子は、体内の主要な活性部位に効果的に輸送され得る。したがって、本発明による組成物は、リンパ系への、特に投与部位から樹状細胞が位置するリンパ節へのナノ粒子の改善された輸送を可能にする。

【００２７】

皮下注射によって投与される場合、本発明による粒子は、血液循環に入るには大きすぎるため、それらの迅速な排出ならびに重度の全身有害作用は本質的に回避される。同時に、それらはリンパ管に侵入し、食作用によってリンパ節に位置するナイーブな樹状細胞に入るくらい十分小さい。粒子を皮内、腹腔内または筋肉内に投与する場合も同様である。したがって、静脈内または動脈内投与を除いて、粒子を非経口的に投与することが好ましい。

【００２８】

本発明者らは、本発明による組成物中の粒子が表面上に多数の薬学的に許容され得る化合物を担持できることを見出した。化合物の総量は、$nm^2$（表面負荷密度）単位のナノ粒子の表面に対して最大５％（重量基準）であり得る。大量の化合物を担持するナノ粒子の適合性は、高用量のそのような化合物（例えば、抗原または原薬）が送達される場合に特に重要である。

【００２９】

本発明による組成物は、二酸化ケイ素および表面上の官能基を有するナノ粒子を含む。官能基は、ナノ粒子の表面に直接的または間接的に連結することができる。本発明の好ましい実施形態では、官能基は、リンカー（以下、リンカー化合物Ｌ）を介してナノ粒子の表面に連結している。リンカー化合物Ｌは、任意の方法によって、特に共有結合または吸着結合によって、最も好ましくは共有結合によってナノ粒子の表面に連結することができる。

【００３０】

特に好ましい実施形態では、リンカー化合物Ｌは、カルボキシル（－ＣＯＯＨ）もしくはカルボキシレート（－$COO^-$）基からなる群から選択される少なくとも１つの官能基および／またはグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）もしくはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）からなる群から選択される少なくとも１つの官能基を含む。好ましくは、それは、カルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、グアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）からなる群から選択される少なくとも１つの基との両方を含む。最も好ましいのは、リンカー化合物Ｌがカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）とを含むことである。

そのようなリンカー化合物Ｌは、アニオン性もしくはカチオン性の、また非極性の薬学的に許容され得る化合物（例えば、疎水性ペプチド）の吸着結合を可能にする。これにより、リンカーは、ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントの単純なカップリングを提供し、あるいはポリ（Ｉ：Ｃ）と組み合わせてナノ粒子の表面に提供する。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１－１】記載なし。

【図１－２】記載なし。
【図１－３】記載なし。
【図１－４】記載なし。
【図２】記載なし。
【図３】記載なし。
【図４】記載なし。
【図５】記載なし。
【図６】記載なし。
【図７－１】記載なし。
【図７－２】記載なし。
【図８】記載なし。
【図９】記載なし。
【図１０】記載なし。
【図１１－１】記載なし。
【図１１－２】記載なし。
【図１２】記載なし。
【図１３】記載なし。
【図１４】記載なし。
【図１５】記載なし。
【図１６】記載なし。
【図１７】記載なし。
【図１８】記載なし。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
発明の詳細な説明
本発明の組成物は、１つもしくはそれを超えるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントまたはそのバリアントが負荷されたナノ粒子を含有する。
【００３３】
本発明による「免疫原性フラグメント」は、高リスクＨＰＶ遺伝子型の病原性抗原またはエピトープに由来し、患者において免疫応答を誘導することができるペプチドである。本発明の免疫原性フラグメントは、人工的に作製される。
【００３４】
本発明による「ペプチド」は、好ましくはペプチド結合によって連結された任意の種類の任意の数のアミノ酸、好ましくは天然に存在するアミノ酸から構成される。ペプチドはまた、翻訳後修飾、例えばリン酸化、グリコシル化、脂質化（ミリストイル化またはパルミトイル化など）、シトルリン化、（リジンの）アセチル化、（プロリンまたはリジンの）ヒドロキシル化を示すことができる。
【００３５】
本発明による「抗原」は、細胞性または体液性の免疫応答を誘導することができる構造体である。抗原は、好ましくはタンパク質原性であり、すなわち、それらはタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドである。原則として、それらは任意のサイズ、起源および分子量を有することができる。それらは、少なくとも１つの抗原決定基または抗原エピトープを含有する。
【００３６】
代替的な実施形態では、抗原は、それ自体核酸であるか、または抗原提示細胞の核内への輸送後に、次いでＭＨＣ分子によって提示されるタンパク質生成抗原に翻訳される核酸によってコードされる。
【００３７】
核酸は、一本鎖および二本鎖のＤＮＡもしくはＲＮＡまたはオリゴヌクレオチドであり得る。核酸はまた、脂質、炭水化物、タンパク質またはペプチドとの複合体の構成要素で

あり得る。
【００３８】
抗原決定基としても知られている本発明による「エピトープ」は、免疫系によって、具体的には抗体、Ｂ細胞またはＴ細胞によって認識される抗原の一部である。Ｔ細胞エピトープは、抗原提示細胞の表面に提示され、そこでＭＨＣ分子に結合する。ヒトでは、プロフェッショナル抗原提示細胞はＭＨＣクラスＩＩペプチドを提示するように特殊化されているが、ほとんどの有核体細胞はＭＨＣクラスＩペプチドを提示する。ＭＨＣクラスＩ分子によって提示されるＴ細胞エピトープは、典型的には８～１１アミノ酸長のペプチドであるが、ＭＨＣクラスＩＩ分子はより長いペプチド、１３～１７アミノ酸長を提示し、非古典的ＭＨＣ分子も糖脂質などの非ペプチドエピトープを提示する。
【００３９】
本発明による「バリアント」は、高リスクＨＰＶ遺伝子型の病原性抗原またはエピトープに由来する免疫原性フラグメントと少なくとも７５％同一の免疫原性フラグメントである。
【００４０】
ナノ粒子のゼータ電位は、ナノ粒子の表面電荷特性を特徴付けるために当業者に知られている一般的に使用されるパラメータである。それは、粒子の電位を反映している。粒子の凝集を回避するために、互いに反発する同じ電荷の十分な官能基が存在することが重要である。凝集体は、コロイド系を崩壊させる。結果として生じる凝集体は、個々の粒子よりも著しく大きい粒径を有し、したがって、リンパ管の有窓内皮を介した所望の輸送機構はもはや保証されない。それはコロイド系の安定性を示す尺度として受け入れられている。
【００４１】
現在の特性評価方法は、懸濁液中の粒子の平均電気泳動移動度を測定するアンサンブル測定（例えば、位相分析光散乱、ドップラー速度測定、ストリーミング電位差測定）に基づく（Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．１２　Ｄｅｃ．２０１７；７（１）：１７４７９，ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ５７２７１７７）。動的光散乱（ＤＬＳ）（ＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ，Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、英国）を用いて本発明による組成物のゼータ電位を測定することが特に好ましい。
【００４２】
本発明による組成物のゼータ電位は、少なくとも±１５ｍＶ、好ましくは±３０ｍＶ、より好ましくは±６０ｍＶ、最も好ましくは±２５～±４０ｍＶの値を有する。これにより、望ましくはコロイド懸濁液である組成物が安定化され、これは系の崩壊が本質的に回避されることを意味する。
【００４３】
本発明による組成物は、１５０ｎｍ未満、好ましくは１００ｎｍまたはそれ未満の粒径を有するナノ粒子を含有する。５０ｎｍまたはそれ未満の粒径を有するナノ粒子がより好ましく、２０～３０ｎｍの粒径を有するナノ粒子が最も好ましい。本明細書で定義される粒径は、全範囲にわたるランダムな分布は存在せず、代わりに、その範囲内の定義された粒径が選択され、その標準偏差は最大１５％、好ましくは最大１０％であり、標準偏差は常に二峰性または多峰性分布の場合の極大値に関連するように解釈されるべきである。
【００４４】
ナノ粒子の粒径の指標は、Ｚ平均直径である。動的光散乱で測定されるＺ平均直径は、キュムラント平均としても知られているパラメータである。これは、本技術によって生み出される主要かつ最も信頼性の高いパラメータである。Ｚ平均直径は、典型的には、ＩＳＯ　２２４１２：２０１７に従った品質管理設定で使用される。動的光散乱技術は、強度加重分布を与え、分布における各粒子の寄与は、粒子によって散乱された光の強度に関連するであろう。強度加重分布は、ＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、英国）で測定することが好ましい。
【００４５】

好ましい実施形態では、本発明によるナノ粒子のＺ平均直径は、ＩＳＯ　２２４１２：２０１７に従って測定して、５ｎｍ以上１５０ｎｍ未満、好ましくは１５ｎｍ以上６０ｎｍ以下、より好ましくは２０ｎｍ以上４０ｎｍ以下、さらにより好ましくは２０ｎｍ～３０ｎｍの範囲にある。

【００４６】

本発明によるナノ粒子の粒径および組成物の安定性は、最大０．２μｍの孔径を有する滅菌フィルターによる濾過によってさらに確認される。しかしながら、これは直径５０ｎｍ未満のナノ粒子にのみ実用的である。

【００４７】

本発明の組成物の安定性は、その多分散性指数（ＰＤＩ）によって実証され得る。ＰＤＩは、一般に、系の均一性、本発明の文脈において、コロイド状ナノ粒子懸濁液の均一性および安定性の指標である。ＰＤＩはナノ粒子サイズ分布を反映している。より広い範囲の粒径を有するサンプルはより高いＰＤＩを有するが、均一なサイズの粒子からなるサンプルはより低いＰＤＩを有する。当業者は、ＰＤＩを測定するための方法および機器、特にＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、英国）を知っている。

【００４８】

０．７を超えるＰＤＩは、サンプルが広いサイズ分布を有することを示す。０．１未満のＰＤＩは単分散であると考えられる。様々なサイズ分布アルゴリズムは、これらの２つの極値の間に収まるデータを扱うこれらのパラメータの計算は、ＩＳＯ標準文書１３３２１：１９９６　ＥおよびＩＳＯ　２２４１２：２００８に定義されている。

【００４９】

本発明による組成物は、０～０．３２、好ましくは０．１～０．３、より好ましくは０．１～０．２、最も好ましくは０．１未満のＰＤＩを示す。０．１未満のＰＤＩを有する本発明による組成物は、好ましくは単分散である。

【００５０】

好ましい実施形態では、本発明によるナノ粒子のＺ平均直径は、２０ｎｍ以上４０ｎｍ以下の範囲内であり、ＰＤＩは０．１～０．３０であり、ゼータ電位は±２０ｍＶ～±４０ｍＶである。

【００５１】

より好ましい実施形態では、本発明によるナノ粒子のＺ平均直径は２０～３０ｎｍの範囲内であり、ＰＤＩは０．１～０．２であり、ゼータ電位は±２５～±４０ｍＶである。

【００５２】

最も好ましい実施形態では、本発明によるナノ粒子のＺ平均直径は２０ｎｍ～３０ｎｍの範囲内であり、ＰＤＩは０．１未満であり、ゼータ電位は±２５ｍＶ～±４０ｍＶである。

【００５３】

また、ＴＥＭまたはＳＥＭにより、負荷および放出された粒子の粒径を測定することも可能である。

【００５４】

本明細書で使用される場合、「透過型電子顕微鏡法（ＴＥＭ）」という用語は、電子ビームが超薄試料を透過し、それが通過するときに試料と相互作用する顕微鏡法技術を指す。試料を透過した電子から画像が形成され、対物レンズによって拡大されて集束され、画像スクリーン、たいていのＴＥＭでは蛍光スクリーン、加えてモニタ、もしくは写真フィルムの層に現れるか、またはＣＣＤカメラなどのセンサによって検出される。

【００５５】

本明細書で使用される場合、「走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）」という用語は、電子の集束ビームで表面を走査することによってサンプルの画像を生成する電子顕微鏡の一種を指す。電子はサンプル中の原子と相互作用し、サンプルの表面トポグラフィおよび組成に関する情報を含む様々な信号を生成する。電子ビームはラスタ走査パターンで走査され、ビ

ームの位置は検出された信号の強度と組み合わされて画像を生成する。
【００５６】
図１ａ～図１ｄは、以下のＳｉＯ$_2$粒子のＴＥＭ画像を示す。
図１ａは、粒径６８ｎｍのＳｉＯ$_2$ナノ粒子のＴＥＭ画像を示す。
図１ｂは、粒径４０ｎｍのＳｉＯ$_2$ナノ粒子のＴＥＭ画像を示す。
図１ｃは、粒径２５ｎｍのＳｉＯ$_2$ナノ粒子のＴＥＭ画像を示す。
図１ｄは、粒径１５ｎｍのＳｉＯ$_2$ナノ粒子のＴＥＭ画像を示す。
図２は、粒径１５０ｎｍのＳｉＯ$_2$ナノ粒子のＳＥＭを示す。
【００５７】
本発明に関連して、「ナノ粒子」は、薬学的に許容され得る化合物、例えば最終的に結合または吸着される抗原の認識点として機能する官能基をその表面上に有する粒子状結合マトリックスを意味すると解釈される。ここでの表面は、粒子内の空洞（細孔）のすべての領域、つまり外面の他に、内面も包含する。官能基は、表面に直接的または間接的に結合していてもよい。
【００５８】
本明細書で提供される疾患または症状のいずれかに関連する病原性抗原またはエピトープに由来する任意の免疫原性フラグメントを、本明細書に記載される組成物および方法で使用することができる。これらには、癌、感染症または感染性疾患に関連する病原性抗原またはエピトープに由来する免疫原性フラグメントが含まれる。病原性抗原またはエピトープに由来する好ましい免疫原性フラグメントは、好ましくは高リスクＨＰＶ遺伝子型によって引き起こされるＨＰＶ感染症に関連するものである。
【００５９】
いわゆる高リスクＨＰＶ遺伝子型は、悪性状態、例えばＨＰＶ型１６、１８、３１、３３、３５、３９、４５、５１、５２、５６、５８、５９、６６、６８、７３および８２を発症するリスクと関連している。さらに、ＨＰＶタンパク質Ｅ６およびＥ７は、ＨＰＶ免疫回避および悪性進行にとって特に重要であると見なされている。
【００６０】
したがって、本発明の好ましい実施形態では、ナノ粒子に結合した免疫原性フラグメントは、好ましくはＨＰＶ型１６、１８、３１、３３、３５、３９、４５、５１、５２、５６、５８、５９、６６、６８、７３および８２から選択される高リスクＨＰＶ遺伝子型に由来する。
【００６１】
本発明のより好ましい実施形態では、免疫原性フラグメントは、好ましくは配列番号５～２５７から選択される、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質（配列番号１～４）に由来する。
表１：配列表

【表１－１】

| 配列番号 | HPV型 | タンパク質/バリアント | アミノ酸 | 配列 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | HPV16 | E6 | 1-158 | MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTI HDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYR DGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYG TTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQ RHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRT RRETQL |
| 2 | HPV16 | E7 | 1-98 | MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLND SSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCK CDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVC PICSQKP |

【表１－２】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3 | HPV18 | E6 | 1-158 | MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEIT CVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPH AACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDTLEKL TNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRHLNEK RRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRR RETQV |
| 4 | HPV18 | E7 | 1-105 | MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQL SDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTM LCMCCKCEARIKLVVESSADDLRAFQQLFLN TLSFVCPWCASQQ |
| 5 | HPV 16 | E6 | 1-30 | MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTI |
| 6 | HPV 16 | E6 | 7-15 | AMFQDPQER |
| 7 | HPV 16 | E6 | 8-18 | MFQDPQERPRK |
| 8 | HPV 16 | E6 | 9-18 | FQDPQERPRK |
| 9 | HPV 16 | E6 | 11-19 | DPQERPRKL |
| 10 | HPV 16 | E6 | 11-32 | DPQERPRKLPQLCTELQTTIHD |
| 11 | HPV 16 | E6 | 13-22 | QERPRKLPQL |
| 12 | HPV 16 | E6 | 15-22 | RPRKLPQL |
| 13 | HPV 16 | E6 | 15-23 | RPRKLPQLC |
| 14 | HPV 16 | E6 | 15-24 | RPRKLPQLCT |
| 15 | HPV 16 | E6 | 15-25 | RPRKLPQLCTE |
| 16 | HPV 16 | E6 | 18-26 | KLPQLCTEL |
| 17 | HPV 16 | E6 | 18-28 | KLPQLCTELQT |
| 18 | HPV 16 | E6 | 19-26 | LPQLCTEL |
| 19 | HPV 16 | E6 | 19-28 | LPQLCTELQT |
| 20 | HPV 16 | E6 | 23-31 | CTELQTTIH |
| 21 | HPV 16 | E6 | 25-33 | ELQTTIHDI |
| 22 | HPV 16 | E6 | 26-34 | LQTTIHDII |
| 23 | HPV 16 | E6 | 28-38 | TTIHDIILECV |
| 24 | HPV 16 | E6 | 29-37 | TIHDIILEC |
| 25 | HPV 16 | E6 | 29-38 | TIHDIILECV |
| 26 | HPV 16 | E6 | 29-39 | TIHDIILECVY |
| 27 | HPV 16 | E6 | 30-39 | IHDIILECVY |
| 28 | HPV 16 | E6 | 31-38 | HDIILECV |
| 29 | HPV 16 | E6 | 31-39 | HDIILECVY |
| 30 | HPV 16 | E6 | 31-41 | HDIILECVYCK |
| 31 | HPV 16 | E6 | 32-41 | DIILECVYCK |
| 32 | HPV 16 | E6 | 33-41 | IILECVYCK |
| 33 | HPV 16 | E6 | 34-41 | ILECVYCK |
| 34 | HPV 16 | E6 | 34-44 | ILECVYCKQQL |
| 35 | HPV 16 | E6 | 35-44 | LECVYCKQQL |
| 36 | HPV 16 | E6 | 37-46 | CVYCKQQLLR |
| 37 | HPV 16 | E6 | 37-54 | CVYCKQQLLRREVYDFAF |
| 38 | HPV 16 | E6 | 37-68 | CVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNP YA |
| 39 | HPV 16 | E6 | 38-45 | VYCKQQLL |
| 40 | HPV 16 | E6 | 38-46 | VYCKQQLLR |
| 41 | HPV 16 | E6 | 38-47 | VYCKQQLLRR |
| 42 | HPV 16 | E6 | 40-50 | CKQQLLRREVY |
| 43 | HPV 16 | E6 | 41-50 | KQQLLRREVY |

【表１－３】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **44** | HPV 16 | E6 | 42-50 | QQLLRREVY |
| **45** | HPV 16 | E6 | 42-52 | QQLLRREVYDF |
| **46** | HPV 16 | E6 | 43-52 | QLLRREVYDF |
| **47** | HPV 16 | E6 | 43-57 | QLLRREVYDFAFRDL |
| **48** | HPV 16 | E6 | 44-52 | LLRREVYDF |
| **49** | HPV 16 | E6 | 44-54 | LLRREVYDFAF |
| **50** | HPV 16 | E6 | 45-68 | LRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYA |
| **51** | HPV 16 | E6 | 47-54 | REVYDFAF |
| **52** | HPV 16 | E6 | 48-55 | EVYDFAFR |
| **53** | HPV 16 | E6 | 48-57 | EVYDFAFRDL |
| **54** | HPV 16 | E6 | 49-57 | VYDFAFRDL |
| **55** | HPV 16 | E6 | 49-58 | VYDFAFRDLC |
| **56** | HPV 16 | E6 | 49-59 | VYDFAFRDLCI |
| **57** | HPV 16 | E6 | 50-59 | YDFAFRDLCI |
| **58** | HPV 16 | E6 | 51-59 | DFAFRDLCI |
| **59** | HPV 16 | E6 | 52-60 | FAFRDLCIV |
| **60** | HPV 16 | E6 | 52-61 | FAFRDLCIVY |
| **61** | HPV 16 | E6 | 52-62 | FAFRDLCIVYR |
| **62** | HPV 16 | E6 | 53-61 | AFRDLCIVY |
| **63** | HPV 16 | E6 | 53-62 | AFRDLCIVYR |
| **64** | HPV 16 | E6 | 54-68 | FRDLCIVYRDGNPYA |
| **65** | HPV 16 | E6 | 55-86 | RDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHY |
| **66** | HPV 16 | E6 | 57-67 | LCIVYRDGNPY |
| **67** | HPV 16 | E6 | 58-67 | CIVYRDGNPY |
| **68** | HPV 16 | E6 | 59-67 | IVYRDGNPY |
| **69** | HPV 16 | E6 | 59-68 | IVYRDGNPYA |
| **70** | HPV 16 | E6 | 59-69 | IVYRDGNPYAV |
| **71** | HPV 16 | E6 | 60-67 | VYRDGNPY |
| **72** | HPV 16 | E6 | 60-69 | VYRDGNPYAV |
| **73** | HPV 16 | E6 | 61-82 | YRDGNPYAVCDKCLKFYSKISE |
| **74** | HPV 16 | E6 | 65-75 | NPYAVCDKCLK |
| **75** | HPV 16 | E6 | 66-74 | PYAVCDKCL |
| **76** | HPV 16 | E6 | 66-75 | PYAVCDKCLK |
| **77** | HPV 16 | E6 | 66-76 | PYAVCDKCLKF |
| **78** | HPV 16 | E6 | 67-75 | YAVCDKCLK |
| **79** | HPV 16 | E6 | 67-76 | YAVCDKCLKF |
| **80** | HPV 16 | E6 | 67-77 | YAVCDKCLKFY |
| **81** | HPV 16 | E6 | 68-75 | AVCDKCLK |
| **82** | HPV 16 | E6 | 68-76 | AVCDKCLKF |
| **83** | HPV 16 | E6 | 68-77 | AVCDKCLKFY |
| **84** | HPV 16 | E6 | 68-78 | AVCDKCLKFYS |
| **85** | HPV 16 | E6 | 69-79 | VCDKCLKFYSK |
| **86** | HPV 16 | E6 | 71-78 | DKCLKFYS |
| **87** | HPV 16 | E6 | 72-80 | KCLKFYSKI |
| **88** | HPV 16 | E6 | 73-83 | CLKFYSKISEY |
| **89** | HPV 16 | E6 | 73-105 | CLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCD |
| **90** | HPV 16 | E6 | 74-83 | LKFYSKISEY |

【表１－４】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **91** | HPV 16 | E6 | 74-88 | LKFYSKISEYRHYCY |
| **92** | HPV 16 | E6 | 75-83 | KFYSKISEY |
| **93** | HPV 16 | E6 | 75-84 | KFYSKISEYR |
| **94** | HPV 16 | E6 | 75-85 | KFYSKISEYRH |
| **95** | HPV 16 | E6 | 76-83 | FYSKISEY |
| **96** | HPV 16 | E6 | 76-85 | FYSKISEYRH |
| **97** | HPV 16 | E6 | 76-86 | FYSKISEYRHY |
| **98** | HPV 16 | E6 | 77-86 | YSKISEYRHY |
| **99** | HPV 16 | E6 | 78-86 | SKISEYRHY |
| **100** | HPV 16 | E6 | 78-88 | SKISEYRHYCY |
| **101** | HPV 16 | E6 | 79-86 | KISEYRHY |
| **102** | HPV 16 | E6 | 79-87 | KISEYRHYC |
| **103** | HPV 16 | E6 | 79-88 | KISEYRHYCY |
| **104** | HPV 16 | E6 | 80-88 | ISEYRHYCY |
| **105** | HPV 16 | E6 | 81-88 | SEYRHYCY |
| **106** | HPV 16 | E6 | 81-90 | SEYRHYCYSL |
| **107** | HPV 16 | E6 | 81-91 | SEYRHYCYSLY |
| **108** | HPV 16 | E6 | 82-90 | EYRHYCYSL |
| **109** | HPV 16 | E6 | 82-91 | EYRHYCYSLY |
| **110** | HPV 16 | E6 | 83-90 | YRHYCYSL |
| **111** | HPV 16 | E6 | 83-91 | YRHYCYSLY |
| **112** | HPV 16 | E6 | 84-91 | RHYCYSLY |
| **113** | HPV 16 | E6 | 84-94 | RHYCYSLYGTT |
| **114** | HPV 16 | E6 | 85-95 | HYCYSLYGTTL |
| **115** | HPV 16 | E6 | 86-96 | YCYSLYGTTLE |
| **116** | HPV 16 | E6 | 87-95 | CYSLYGTTL |
| **117** | HPV 16 | E6 | 87-96 | CYSLYGTTLE |
| **118** | HPV 16 | E6 | 88-95 | YSLYGTTL |
| **119** | HPV 16 | E6 | 89-99 | SLYGTTLEQQY |
| **120** | HPV 16 | E6 | 90-99 | LYGTTLEQQY |
| **121** | HPV 16 | E6 | 91-100 | YGTTLEQQYN |
| **122** | HPV 16 | E6 | 91-101 | YGTTLEQQYNK |
| **123** | HPV 16 | E6 | 91-112 | YGTTLEQQYNKPLCDLLIRCIN |
| **124** | HPV 16 | E6 | 92-99 | GTTLEQQY |
| **125** | HPV 16 | E6 | 92-101 | GTTLEQQYNK |
| **126** | HPV 16 | E6 | 93-101 | TTLEQQYNK |
| **127** | HPV 16 | E6 | 94-101 | TLEQQYNK |
| **128** | HPV 16 | E6 | 95-103 | LEQQYNKPL |
| **129** | HPV 16 | E6 | 97-106 | QQYNKPLCDL |
| **130** | HPV 16 | E6 | 98-106 | QYNKPLCDL |
| **131** | HPV 16 | E6 | 98-107 | QYNKPLCDLL |
| **132** | HPV 16 | E6 | 98-108 | QYNKPLCDLLI |
| **133** | HPV 16 | E6 | 99-106 | YNKPLCDL |
| **134** | HPV 16 | E6 | 101-108 | KPLCDLLI |
| **135** | HPV 16 | E6 | 101-111 | KPLCDLLIRCI |
| **136** | HPV 16 | E6 | 101-122 | KPLCDLLIRCINCQKPLCPEEK |
| **137** | HPV 16 | E6 | 105-115 | DLLIRCINCQK |
| **138** | HPV 16 | E6 | 106-115 | LLIRCINCQK |
| **139** | HPV 16 | E6 | 107-115 | LIRCINCQK |

【表１－５】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **140** | HPV 16 | E6 | 107-117 | LIRCINCQKPL |
| **141** | HPV 16 | E6 | 109-119 | RCINCQKPLCP |
| **142** | HPV 16 | E6 | 113-121 | CQKPLCPEE |
| **143** | HPV 16 | E6 | 118-126 | CPEEKQRHL |
| **144** | HPV 16 | E6 | 121-142 | EKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGR |
| **145** | HPV 16 | E6 | 122-132 | KQRHLDKKQRF |
| **146** | HPV 16 | E6 | 125-133 | HLDKKQRFH |
| **147** | HPV 16 | E6 | 125-135 | HLDKKQRFHNI |
| **148** | HPV 16 | E6 | 127-134 | DKKQRFHN |
| **149** | HPV 16 | E6 | 127-135 | DKKQRFHNI |
| **150** | HPV 16 | E6 | 127-141 | DKKQRFHNIRGRWTG |
| **151** | HPV 16 | E6 | 128-135 | KKQRFHNI |
| **152** | HPV 16 | E6 | 128-136 | KKQRFHNIR |
| **153** | HPV 16 | E6 | 129-138 | KQRFHNIRGR |
| **154** | HPV 16 | E6 | 129-139 | KQRFHNIRGRW |
| **155** | HPV 16 | E6 | 131-139 | RFHNIRGRW |
| **156** | HPV 16 | E6 | 134-144 | NIRGRWTGRCM |
| **157** | HPV 16 | E6 | 136-144 | RGRWTGRCM |
| **158** | HPV 16 | E6 | 137-146 | GRWTGRCMSC |
| **159** | HPV 16 | E6 | 139-148 | WTGRCMSCCR |
| **160** | HPV 16 | E6 | 142-151 | RCMSCCRSSR |
| **161** | HPV 16 | E6 | 148-158 | RSSRTRRETQL |
| **162** | HPV 16 | E6 | 149-158 | SSRTRRETQL |
| **163** | HPV 16 | E6 | 151-158 | RTRRETQL |
| **164** | HPV 16 | E7 | 1-12 | MHGDTPTLHEYM |
| **165** | HPV 16 | E7 | 2-11 | HGDTPTLHEY |
| **166** | HPV 16 | E7 | 4-11 | DTPTLHEY |
| **167** | HPV 16 | E7 | 5-12 | TPTLHEYM |
| **168** | HPV 16 | E7 | 5-13 | TPTLHEYML |
| **169** | HPV 16 | E7 | 5-18 | TPTLHEYMLDLQPE |
| **170** | HPV 16 | E7 | 7-15 | TLHEYMLDL |
| **171** | HPV 16 | E7 | 7-17 | TLHEYMLDLQP |
| **172** | HPV 16 | E7 | 7-27 | TLHEYMLDLQPETTDLYCYEQ |
| **173** | HPV 16 | E7 | 11-18 | YMLDLQPE |
| **174** | HPV 16 | E7 | 11-19 | YMLDLQPET |
| **175** | HPV 16 | E7 | 11-20 | YMLDLQPETT |
| **176** | HPV 16 | E7 | 11-21 | YMLDLQPETTD |
| **177** | HPV 16 | E7 | 11-26 | YMLDLQPETTDLYCYE |
| **178** | HPV 16 | E7 | 12-19 | MLDLQPET |
| **179** | HPV 16 | E7 | 12-20 | MLDLQPETT |
| **180** | HPV 16 | E7 | 12-26 | MLDLQPETTDLYCYE |
| **181** | HPV 16 | E7 | 14-23 | DLQPETTDLY |
| **182** | HPV 16 | E7 | 15-23 | LQPETTDLY |
| **183** | HPV 16 | E7 | 15-24 | LQPETTDLYC |
| **184** | HPV 16 | E7 | 15-25 | LQPETTDLYCY |

【表１－６】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **185** | HPV 16 | E7 | 17-38 | PETTDLYCYEQLNDSSEEEDEI |
| **186** | HPV 16 | E7 | 18-25 | ETTDLYCY |
| **187** | HPV 16 | E7 | 18-26 | ETTDLYCYE |
| **188** | HPV 16 | E7 | 19-27 | TTDLYCYEQ |
| **189** | HPV 16 | E7 | 19-29 | TTDLYCYEQLN |
| **190** | HPV 16 | E7 | 21-40 | DLYCYEQLNDSSEEEDEIDG |
| **191** | HPV 16 | E7 | 21-42 | DLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPA |
| **192** | HPV 16 | E7 | 35-50 | EDEIDGPAGQAEPDRA |
| **193** | HPV 16 | E7 | 42-52 | AGQAEPDRAHY |
| **194** | HPV 16 | E7 | 43-51 | GQAEPDRAH |
| **195** | HPV 16 | E7 | 43-52 | GQAEPDRAHY |
| **196** | HPV 16 | E7 | 43-53 | GQAEPDRAHYN |
| **197** | HPV 16 | E7 | 43-77 | GQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQST HVDIR |
| **198** | HPV 16 | E7 | 44-52 | QAEPDRAHY |
| **199** | HPV 16 | E7 | 44-62 | QAEPDRAHYNIVTFCCKCD |
| **200** | HPV 16 | E7 | 46-55 | EPDRAHYNIV |
| **201** | HPV 16 | E7 | 47-57 | PDRAHYNIVTF |
| **202** | HPV 16 | E7 | 48-57 | DRAHYNIVTF |
| **203** | HPV 16 | E7 | 48-62 | DRAHYNIVTFCCKCD |
| **204** | HPV 16 | E7 | 49-57 | RAHYNIVTF |
| **205** | HPV 16 | E7 | 50-57 | AHYNIVTF |
| **206** | HPV 16 | E7 | 50-60 | AHYNIVTFCCK |
| **207** | HPV 16 | E7 | 50-62 | AHYNIVTFCCKCD |
| **208** | HPV 16 | E7 | 51-58 | HYNIVTFC |
| **209** | HPV 16 | E7 | 51-59 | HYNIVTFCC |
| **210** | HPV 16 | E7 | 51-72 | HYNIVTFCCKCDSTLRLCVQST |
| **211** | HPV 16 | E7 | 52-60 | YNIVTFCCK |
| **212** | HPV 16 | E7 | 53-60 | NIVTFCCK |
| **213** | HPV 16 | E7 | 56-65 | TFCCKCDSTL |
| **214** | HPV 16 | E7 | 62-75 | DSTLRLCVQSTHVD |
| **215** | HPV 16 | E7 | 64-78 | TLRLCVQSTHVDIRT |
| **216** | HPV 16 | E7 | 66-74 | RLCVQSTHV |
| **217** | HPV 16 | E7 | 67-76 | LCVQSTHVDI |
| **218** | HPV 16 | E7 | 67-98 | LCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP |
| **219** | HPV 16 | E7 | 69-76 | VQSTHVDI |
| **220** | HPV 16 | E7 | 69-86 | VQSTHVDIRTLEDLLMGT |
| **221** | HPV 16 | E7 | 71-85 | STHVDIRTLEDLLMG |
| **222** | HPV 16 | E7 | 72-97 | THVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQK |
| **223** | HPV 16 | E7 | 73-84 | HVDIRTLEDLLM |
| **224** | HPV 16 | E7 | 76-86 | IRTLEDLLMGT |
| **225** | HPV 16 | E7 | 77-86 | RTLEDLLMGT |
| **226** | HPV 16 | E7 | 77-87 | RTLEDLLMGTL |
| **227** | HPV 16 | E7 | 78-86 | TLEDLLMGT |
| **228** | HPV 16 | E7 | 79-87 | LEDLLMGTL |
| **229** | HPV 16 | E7 | 80-90 | EDLLMGTLGIV |
| **230** | HPV 16 | E7 | 81-90 | DLLMGTLGIV |
| **231** | HPV 16 | E7 | 81-91 | DLLMGTLGIVC |
| **232** | HPV 16 | E7 | 82-89 | LLMGTLGI |

【表１－７】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **233** | HPV 16 | E7 | 82-90 | LLMGTLGIV |
| **234** | HPV 16 | E7 | 82-91 | LLMGTLGIVC |
| **235** | HPV 16 | E7 | 82-92 | LLMGTLGIVCP |
| **236** | HPV 16 | E7 | 83-93 | LMGTLGIVCPI |
| **237** | HPV 16 | E7 | 84-93 | MGTLGIVCPI |
| **238** | HPV 16 | E7 | 85-93 | GTLGIVCPI |
| **239** | HPV 16 | E7 | 86-93 | TLGIVCPI |
| **240** | HPV 16 | E7 | 86-94 | TLGIVCPIC |
| **241** | HPV 16 | E7 | 87-97 | LGIVCPICSQK |
| **242** | HPV 16 | E7 | 88-97 | GIVCPICSQK |
| **243** | HPV 16 | E7 | 89-97 | IVCPICSQK |
| **244** | HPV 16 | E7 | 98 | VCPICSQKP |
| **245** | HPV18 | E6 | 13-21 | KLPDLCTEL |
| **246** | HPV18 | E6 | 36-43 | KTVLELTE |
| **247** | HPV18 | E6 | 40-48 | ELTEVFEFA |
| **248** | HPV18 | E6 | 43-57 | EVFEFAFKDLFVVYR |
| **249** | HPV18 | E6 | 51-72 | DLFVVYRDSIPHAACHKCIDFY |
| **250** | HPV18 | E6 | 71-92 | FYSRIRELRHYSDSVYGDTLEK |
| **251** | HPV18 | E6 | 125-135 | RRFHNIAGHYR |
| **252** | HPV18 | E7 | 1-32 | MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQL S |
| **253** | HPV18 | E7 | 5-16 | KATLQDIVLHLE |
| **254** | HPV18 | E7 | 7-15 | TLQDIVLHL |
| **255** | HPV18 | E7 | 21-42 | IPVDLLCHEQLSDSEEENDEID |
| **256** | HPV18 | E7 | 86-94 | FQQLFLNTL |
| **257** | HPV18 | E7 | 88-97 | QLFLNTLSFV |
| **258** | HPV16 | E6V R17I | 9-17 | FQDPQERPI |
| **259** | HPV16 | E6V R17I | 9-19 | FQDPQERPIKL |
| **260** | HPV16 | E6V R17T | 15-25 | RPTKLPQLCTE |
| **261** | HPV16 | E6V Q21D | 18-28 | KLPDLCTELQT |
| **262** | HPV16 | E6V D32E | 25-33 | ELQTTIHEI |
| **263** | HPV16 | E6V D32E | 26-34 | LQTTIHEII |
| **264** | HPV16 | E6V D32E | 28-38 | TTIHEIILECV |
| **265** | HPV16 | E6V D32E, I34R | 28-38 | TTIHEIRLECV |
| **266** | HPV16 | E6V D32E | 29-38 | TIHEIILECV |
| **267** | HPV16 | E6V D32E, I34R | 29-38 | TIHEIRLECV |
| **268** | HPV16 | E6V D32E | 31-41 | HEIILECVYCK |
| **269** | HPV16 | E6V D32E, I34R | 31-41 | HEIRLECVYCK |
| **270** | HPV16 | E6V D32E | 32-41 | EIILECVYCK |
| **271** | HPV16 | E6V I34R | 34-41 | RLECVYCK |
| **272** | HPV16 | E6V A68G | 60-69 | VYRDGNPYGV |
| **273** | HPV16 | E6V H85Y | 79-89 | KISEYRYYCYS |
| **274** | HPV16 | E6V H85Y | 81-90 | SEYRYYCYSL |
| **275** | HPV16 | E6V H85Y, | 81-90 | SEYRYYCYSV |

【表１－８】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | L90V | | |
| 276 | HPV16 | E6V L90V | 81-91 | SEYRHYCYSVY |
| 277 | HPV16 | E6V L90V | 82-90 | EYRHYCYSV |
| 278 | HPV16 | E6V H85Y | 83-90 | YRYYCYSL |
| 279 | HPV16 | E6V L90V | 83-90 | YRHYCYSV |
| 280 | HPV16 | E6V H85Y, L90V | 83-90 | YRYYCYSV |
| 281 | HPV16 | E6V L90V | 83-91 | YRHYCYSVY |
| 282 | HPV16 | E6V L90V | 84-91 | RHYCYSVY |
| 283 | HPV16 | E6V H85Y | 84-93 | RYYCYSLYGT |
| 284 | HPV16 | E6V L90V | 84-94 | RHYCYSVYGTT |
| 285 | HPV16 | E6V L90V | 86-95 | YCYSVYGTTL |
| 286 | HPV16 | E6V L90V | 87-95 | CYSVYGTTL |
| 287 | HPV16 | E6V L90V | 87-96 | CYSVYGTTLE |
| 288 | HPV16 | E6V L90V | 88-95 | YSVYGTTL |
| 289 | HPV16 | E6V L90V | 89-99 | SVYGTTLEQQY |
| 290 | HPV16 | E6V L90V | 90-97 | VYGTTLEQ |
| 291 | HPV16 | E6V L90V | 90-99 | VYGTTLEQQY |
| 292 | HPV16 | E7V L28F | 21-28 | DLYCYEQF |
| 293 | HPV16 | E7V S63F | 56-63 | TFCCKCDF |
| 294 | HPV16 | E7V S63F | 56-65 | TFCCKCDFTL |
| 295 | HPV16 | E7V S63F | 56-66 | TFCCKCDFTLR |

【００６２】

本発明の更なる実施形態では、免疫原性フラグメントは、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来する免疫原性フラグメントと少なくとも７５％同一である任意の免疫原性フラグメントである。ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６（Ｅ６Ｖ）および／またはＥ７（Ｅ７Ｖ）タンパク質に由来する免疫原性フラグメントのバリアントの例を表１に示す（配列番号２５８～２９５）。

【００６３】

ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞と、それぞれ抗原提示ＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩとの相互作用は、細胞傷害性Ｔ細胞応答の誘導および維持において極めて重要な役割を果たし、直接抗腫瘍免疫にとっても重要である。「細胞傷害性Ｔ細胞応答」という用語は、病原性抗原、エピトープまたは免疫原性フラグメントの特異的認識、および細胞傷害性Ｔ細胞による感染細胞におけるアポトーシスの誘導を指す。

【００６４】

本発明による組成物は、免疫原性フラグメントがＭＨＣクラスＩおよび／またはＭＨＣクラスＩＩに結合することができることを特徴とする。

【００６５】

本発明の好ましい実施形態では、免疫原性フラグメントは、細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導することができる。

【００６６】

それぞれＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩに結合し、それによって細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導する能力を有する、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のそれぞれのＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来する免疫原性フラグメントは、例えば、ヒトＨＰＶ１６＋およびＨＰＶ１８＋腫瘍細胞の質量分析（ＭＳ）、酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳｐｏｔ）アッセイ、インビトロ細胞傷害性アッセイ、ＭＨＣ－ヒト化動物モデルにおける抗腫瘍活性測定、ならびにＭＨＣクラスＩ結合予測ツール（例えば、ＭＨＣｆｌｕｒ

ｒｙ、ＭＳＩｎｔｒｉｎｓｉｃ、ＭｉｘＭＨＣＰｒｅｄ、ＮｅｔＭＨＣ、ＮｅｔＭＨＣｐａｎ、ＮｅｔＭＨＣｃｏｎｓ）などの生物情報学的アプローチによって同定することができる。

【００６７】

本発明の好ましい実施形態では、免疫原性フラグメントは、３～３５個のアミノ酸を含む。特に、免疫原性フラグメントは、少なくとも３個のアミノ酸、好ましくは少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、または少なくとも８個のアミノ酸を含む。好ましい実施形態では、免疫原性フラグメントは、３５アミノ酸の長さを超えず、好ましくは２５アミノ酸の長さを超えず、より好ましくは２０アミノ酸の長さを超えない。最も好ましい実施形態では、免疫原性フラグメントは、８～２０アミノ酸の長さを有する。

【００６８】

本発明の代替的に好ましい実施形態では、ナノ粒子は、１つもしくはそれを超えるＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントおよびポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリ（Ｉ：Ｃ））またはその任意の誘導体を含む薬学的に許容され得る化合物が負荷されている。

【００６９】

本発明の好ましい実施形態では、ポリ（Ｉ：Ｃ）の誘導体は、平均サイズが０．２ｋｂ～１ｋｂのポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷ（低分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、平均サイズが１．５ｋｂ～８ｋｂのポリ（Ｉ：Ｃ）ＨＭＷ（高分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、ポリＩ：ポリ$C_{12}U$である。

【００７０】

本発明によれば、ナノ粒子は、別の材料との混合物であってもよい二酸化ケイ素（$SiO_2$）を含む。したがって、この材料は、二酸化ケイ素が典型的には多成分系において最も高い割合を有する更なる成分と混合することもできる。本発明のナノ粒子は、少なくとも８０％、好ましくは少なくとも９０％の二酸化ケイ素を含むことができる。

【００７１】

本発明によるナノ粒子の特に好ましい実施形態では、材料は、本質的に純粋な、すなわち調製プロセスの過程で予想される不純物のみを含む二酸化ケイ素を含む。本発明のより好ましい実施形態では、ナノ粒子材料は二酸化ケイ素からなる。

【００７２】

他の材料の例は、金属、金属カルコゲナイド、磁性材料、磁性合金、半導体材料、金属酸化物、ポリマー、オルガノシラン、他のセラミックまたはガラスである。金属は、Ａｕ、Ａｇ、Ｃｕ、Ｐｔ、Ｐｄ、Ｆｅ、Ｃｏ、Ｇｄ、Ｒｕ、ＲｈおよびＺｎの群、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。

【００７３】

本発明の更なる実施形態では、ナノ粒子は、二酸化ケイ素を含むコーティングを有する。コアは、金属、ポリマー、または$Fe_2O_3$もしくは$Fe_3O_4$などの強磁性金属などの任意の他の材料を含んでもよい。コアは、二酸化ケイ素を欠いていてもよい。

【００７４】

本発明による二酸化ケイ素ナノ粒子は、例えば、国際公開第２０１０／００６７５３号に記載されており、これは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【００７５】

二酸化ケイ素ナノ粒子は、とりわけ、古典的なＳｔｏｅｂｅｒ合成を使用して調製することができ、この場合、定義されたサイズの単分散ナノスケール二酸化ケイ素は、水性アルコール－アンモニア媒体中でのテトラエトキシシラン（ＴＥＯＳ）の加水分解によって調製することができる（Ｊ．Ｃｏｌｌｏｉｄ　Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ　Ｓｃｉ．１９６８，２６，６２）。

【００７６】

二酸化ケイ素ナノ粒子の調製プロセスは、欧州特許第０２１６　２７８号および国際公開第２００５／０８５１３５号に詳細に記載されており、したがって、これらの文献は、その全体が参照により本発明の開示内容に組み込まれる。少なくとも１つのアミンが、好

ましくは媒体中で使用される。

【００７７】

本発明によるナノ粒子の二酸化ケイ素マトリックスは、多孔質または非多孔質のいずれかであり得る。多孔度は、本質的に製造プロセスに依存する。欧州特許第０２１６２７８号に従った合成では、特に非多孔質粒子が得られる。

【００７８】

本発明によれば、ナノ粒子は、その表面上に官能基を含む。これらの官能基は、負電荷および正電荷の両方を担持および／または安定化することができる。これらの電荷は、薬学的に許容され得る化合物、例えば（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントおよびＴＬＲアゴニスト、例えばポリ（Ｉ：Ｃ）およびその誘導体に属し得る。

【００７９】

好ましいＴＬＲアゴニストは、ポリ（Ｉ：Ｃ）（ｄｓＲＮＡ、ＴＬＲ３アゴニストならびにＲＩＧ－Ｉアゴニスト）、ポリＩ：ポリ$C_{12}U$（ｄｓＲＮＡ、ＴＬＲ３アゴニスト、商品名Ａｍｐｌｉｇｅｎ（登録商標）、ＩＮＮ：リンタトリモド）およびＮＡＢ２（核酸バンド２、酵母から単離され、パターン認識受容体ＴＬＲ３およびＭＤＡ－５のアゴニストとして同定されたｄｓＲＮＡ）からなる群から選択されるＴＬＲ３アゴニストである。より好ましいのは、ポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷ（平均サイズ０．２ｋｂ～１ｋｂの低分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、ポリ（Ｉ：Ｃ）ＨＭＷ（平均サイズ１．５ｋｂ～８ｋｂの高分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、ポリＩ：ポリ$C_{12}U$またはポリＩＣＬＣである。最も好ましいのは、ポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷである。

【００８０】

負電荷および正電荷の両方を担持および／または安定化することができる官能基は、例えば、－ＳＨ、－ＣＯＯＨ、－$NH_2$、－グアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ））$NH_2$）、－$PO_3H_2$、－$PO_2CH_3H$、－$SO_3H$、－ＯＨ、－$NR_3^+X^-$である。好ましい官能基は、－ＣＯＯＨ、－グアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ））$NH_2$）および－$NH_2$である。官能基は、それらの塩形態で存在してもよい。

【００８１】

本発明による組成物は、$nm^2$単位のナノ粒子の表面に対する薬学的に許容され得る化合物の総数［分子／$nm^2$］に関して、最大０．５、好ましくは０．０１～０．５、より好ましくは０．０３～０．４、最も好ましくは０．０５～０．３の表面負荷密度を有するナノ粒子を含む。

【００８２】

この表面負荷密度は、完全な球体を仮定し、粒子当たりのモル負荷によって計算される。例えば、直径２５ｎｍの球状粒子は、１９６４$nm^2$（$A=\pi*d^2$）の表面積および１．６４Ｅ－８ｎｇの重量を有する（非晶質シリカの仮定密度は２０００　ｋｇ／$m^3$）。そのような粒子に５重量％のペプチドＫＫＫＶ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴ（Ｍ＝１，９１０．３１ｇ／ｍｏｌ）を負荷すると、４．２８３Ｅ－２２　ｍｏｌになる。この値にアボガドロ定数を乗算すると、１９６４$nm^2$の１個の粒子に結合した２５８個の単一分子のＫＫＫＶ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴが得られる。これは、０．１３分子／$nm^2$の表面負荷密度に相当する。

【００８３】

本発明による組成物は、６．０～８．０、好ましくは６．５～７．８、より好ましくは６．８～７．５、さらにより好ましくは７．２～７．４のｐＨを有するように配合される。組成物のｐＨは、典型的には約１ｍＭ～５０ｍＭの範囲で使用される、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、ＴＲＩＳ（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）またはヒスチジンなどの緩衝液の使用によって維持することができる。別の方法では、組成物のｐＨは、生理学的に許容され得る酸または塩基を使用することによって調整することができる。

【００８４】

本発明の一実施形態では、官能基は－$PO_3H$基である。本発明によるリン酸化ナノ粒

子は、例えば、アンモニアの添加下で（ジエチルホスファトエチル）トリエトキシシランとシリカナノ粒子との反応によって調製することができる。

【００８５】

本発明の好ましい実施形態では、官能基は、リンカーＬを介してナノ粒子に連結されている。リンカーは、例えば共有結合または吸着結合によってナノ粒子に連結することができる。

【００８６】

本発明の好ましい実施形態では、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－ＣＯＯ$^-$）基を含む。

【００８７】

より好ましい実施形態では、そのようなリンカーは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$または－ＮＨＣ（＝ＮＨ$_2^+$）ＮＨ$_2$）またはアミノ基（－ＮＨ$_2$もしくは－ＮＨ$_3^+$）をさらに含む。

【００８８】

本発明の最も好ましい実施形態では、リンカー化合物Ｌは、少なくとも一般式（Ｉ）の構造単位

＊－（－Ｏ）$_3$Ｓｉ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ（ＣＯＯＸ）－（ＣＨ$_2$）$_p$－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ（ＣＯＯＸ）－（ＣＨ$_2$）$_q$－Ｙ（Ｉ）

［式中、

Ｘは、互いに独立して、Ｈまたは負電荷であり、

Ｙは、互いに独立して、－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$、－ＮＨＣ（＝ＮＨ$_2^+$）ＮＨ$_2$、－ＮＨ$_2$または－ＮＨ$_3^+$であり、

ｎ、ｐおよびｑは、互いに独立して、０または１～２５の数であり、

＊－は、ナノ粒子との連結点である］を含む。

【００８９】

好ましい実施形態では、リンカー化合物Ｌは、ｎが３であり、ｐが１であり、ｑが４であり、Ｙが互いに独立して－ＮＨ$_2$または－ＮＨ$_3^+$基である、少なくとも式（Ｉ）の構造単位を含む。

【００９０】

特に好ましい実施形態では、リンカー化合物Ｌは、ｎが３であり、ｐが１であり、ｑが３であり、Ｙが互いに独立して－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$または－ＮＨＣ（＝ＮＨ$_2^+$）ＮＨ$_2$基である、少なくとも式（Ｉ）の構造単位を含む。

【００９１】

本発明の別の態様は、本発明によるナノ粒子の調製方法であって、

－　第１のステップ（ｉ）では、水、少なくとも１つの可溶化剤および少なくとも１つのアミンまたはアンモニアを含む媒体中でのテトラアルコキシシランおよび／またはオルガノトリアルコキシシランの加水分解重縮合が行われ、ここで、まず一次粒子のゾルが生成され、その後、反応の程度に対応して制御された方法で対応するシランの連続的な計量投入によって更なる核生成が制限されるように、得られたナノ粒子が５～１５０ｎｍの範囲内の所望の粒径にされ、

－　第２のステップ（ｉｉ）では、ステップ（ｉ）からのナノ粒子を［（３－トリエトキシシリル）プロピル］コハク酸無水物と反応させ、これを同時反応でＬ－アルギニンまたはＬ－リジンとアミドを形成させる、方法を提供することである。

【００９２】

方法のステップ（ｉｉ）でＬ－アルギニンの使用することが好ましい。

【００９３】

別の実施形態では、リンカー化合物Ｌは、Ｌ－アルギニンとＮ－（３－トリエトキシシリルプロピル）マレイミドとの反応によっても得ることができた。反応は、好ましくは８を超えるｐＨ値で行われる。

【００９４】

本発明の一実施形態では、［（３－トリエトキシシリル）プロピル］コハク酸無水物と、アグマチン、ヒスタミン、カダベリンまたはスペルミジンとの反応によってリンカー化合物Ｌを生成することも可能である。

【００９５】

本発明の更なる実施形態は、リンカー化合物Ｌが共有結合または吸着結合した二酸化ケイ素ベースの表面を含むナノ粒子であって、リンカーＬは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）を含む。好ましい実施形態では、リンカーＬは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基とを含む。より好ましい実施形態では、リンカーＬは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ２または－ＮＨＣ（＝ＮＨ２＋）ＮＨ２）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基とを含む。

【００９６】

本発明によるナノ粒子の一実施形態を図３に示す。

【００９７】

図３は、本発明によるナノ粒子の横断面の概略図を示す。Ａはリンカー化合物Ｌによる表面官能化を表し、Ｂは非晶質$SiO_2$シェルを表し、Ｃはコア材料を表し、これは空隙、水または任意の他の材料ならびに非晶質$SiO_2$であり得る。直径ｄ１は０～１４９ｎｍであり、ｄ２は１０～１５０ｎｍである。

【００９８】

本発明の一実施形態では、薬学的に許容され得る化合物は、吸着または共有結合によってナノ粒子にコンジュゲートされる。吸着結合が好ましい。

【００９９】

本発明の更なる目的は、二酸化ケイ素および表面上の官能基を有し、１５０ｎｍ未満の粒径を有するナノ粒子であって、それに共有結合または吸着結合したリンカーＬを含み、リンカーＬが、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）基を含むナノ粒子である。

【０１００】

薬学的に許容され得る化合物の吸着結合の主な利点は、ほとんどの共有結合性コンジュゲーションとは対照的に、副生成物が形成されないか、または「反応」混合物中に残存しないことである。共有結合の場合、反応性官能基を分子に付加することによって結合すべき分子を化学的に修飾することが必要になる可能性がある。これは、ペプチド／抗原の構造における基本的な介入であり、ＲＮＡもしくはＤＮＡベースの抗原またはアジュバントの場合、複雑な化学修飾を構成する。さらに、医薬品局によって既に承認されている既知の化合物の共有結合は、規制上の理由から新たな承認を必要とする新たな独立した物質（新規化学物質、ＮＣＥ）を作り出す。

【０１０１】

好ましい実施形態では、式（Ｉ）によるリンカー化合物Ｌは、正電荷もしくは負電荷を有する薬学的に許容され得る化合物を吸着によって担持および／または安定化することができる。

【０１０２】

特に好ましい実施形態では、式（Ｉ）によるリンカー化合物Ｌは、負電荷を有する薬学的に許容され得る化合物を吸着によって担持および／または安定化することができる。

【０１０３】

より好ましい実施形態では、式（Ｉ）によるリンカー化合物Ｌは、リン酸基またはホスホン酸基を有する薬学的に許容され得る化合物を吸着によって担持および／または安定化

することができる。

【０１０４】

驚くべきことに、リンカー化合物Ｌのアルギニン基と薬学的に許容され得る化合物のリン酸基の負電荷との間の静電相互作用は、「共有結合様」安定性を有することが見出された。

【０１０５】

本明細書における「結合」という用語は、表面官能基と抗原との間の任意の種類の相互作用、特に共有結合および非共有結合、例えば疎水性／親水性相互作用、ファンデルワールス力、イオン結合、水素結合、リガンド－受容体相互作用、ヌクレオチドの塩基対合またはエピトープと抗体結合部位との間の相互作用に関する。

【０１０６】

薬学的に許容され得る化合物が疎水性、例えば疎水性ペプチドである場合、その親水性を高めることが有利である。タンパク質またはペプチドの場合、これは、例えば極性アミノ酸によるＮ末端またはＣ末端伸長によって可能である。本発明の好ましい実施形態では、タンパク質またはペプチドは、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、セリン、トレオニンまたはチロシン、好ましくはリジン、アルギニン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、より好ましくはリジンを含む群から選択される１つもしくはそれを超える極性アミノ酸で伸長される。

【０１０７】

したがって、本発明は、特に、溶解性を向上させるための極性アミノ酸を有するＮ末端またはＣ末端伸長部を含み、吸着結合によってリンカー化合物Ｌ、リンカーユニットＵおよび図４ａに示される抗原／エピトープに連結された３つの部分からなるバイオコンジュゲートに関する。

【０１０８】

本発明によるリンカーユニットＵは、例えば、様々なタイプのリンカーを含む抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）に使用される。化学的に切断可能なリンカーには、酸で切断可能な、還元可能なジスルフィドおよび外因性刺激によって切断可能なものの３つの主なタイプがある。

【０１０９】

ＡＤＣの例は、ゲムツズマブオゾガマイシン（ファイザー社のＭｙｌｏｔａｒｇ（登録商標）、リンカーは４－（４－アセチルフェノキシ）ブタン酸）、イノツズマブオゾガマイシン（ファイザー社のＢｅｓｐｏｎｓａ（登録商標）、リンカーは４－（４’－アセチルフェノキシ）－ブタン酸（ＡｃＢｕｔ）と３－メチル－３－メルカプトブタンヒドラジド（ジメチルヒドラジドとして知られている）との縮合生成物である）、トラスツズマブエムタンシン（ロシュ社のＫａｄｃｙｌａ（登録商標）、リンカーは４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシレートである）またはブレンツキシマブベドチン（ＳＧＮ－０３５としても知られている；Ｓｅａｔｔｌｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｃ．社によるＡｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標）、リンカーはジペプチドバリン－シトルリンである）である。

【０１１０】

本発明の好ましい実施形態では、ペプチドは、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩに対して天然の未修飾抗原の放出を確実にするために酵素カテプシンＢによる切断が可能なリンカー（ｃａｔＢ切断リンカー）を有するＮ末端伸長部を含むリンカーユニットＵを含む。酵素ｃａｔＢ切断リンカーは、カテプシンＢ感受性ジペプチドＶａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－ＬｙｓまたはＶａｌ－Ｌｙｓのうちの１つを含み、好ましいジペプチドはＶａｌ－ＣｉｔまたはＴｒｐ－Ｃｉｔであり、より好ましくはＶａｌ－Ｃｉｔである。

【０１１１】

一実施形態では、本発明による組成物は、リン酸化ナノ粒子と、吸着結合によってナノ粒子にコンジュゲートされた１つもしくはそれを超えるペプチドとを含み、ペプチドは、

カテプシンＢ感受性ジペプチドとしてＶａｌ－ＣｉｔまたはＴｒｐ－Ｃｉｔを含む。

【０１１２】

図４ｂは、本発明による好ましい３つの部分からなるバイオコンジュゲートを示す。図４ｂで使用したペプチドは、ヒトＮＹ－ＥＳＯ－１（配列番号２９７）由来の極めて疎水性のエピトープである。Ｎ末端伸長のために、酵素（カテプシンＢ）により切断可能なペプチドリンカーＶａｌ－Ｃｉｔを使用して、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩに対する天然の未修飾抗原の放出を確実にした。ナノ粒子への溶解性および静電引力を高めるために、伸長部分「Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓ」を使用した。

【０１１３】

本発明の好ましい実施形態では、ＨＰＶ１６　Ｅ７$_{82-90}$エピトープＬＬＭＧＴＬＧＧＩＶ（配列番号２３３）は、酵素により切断可能なリンカーＶａｌ－Ｃｉｔおよびカチオン性可溶化配列Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－ＬｙｓによってＮ末端部位で拡大され、ＫＫＫＶ－Ｃｉｔ－ＬＬＭＧＴＬＧＩＶをもたらす。

【０１１４】

本発明の別の好ましい実施形態では、ＨＰＶ１６　Ｅ７$_{11-19}$エピトープＹＭＬＤＬＱＰＥＴ（配列番号１７４）は、酵素により切断可能なリンカーＴｒｐ－Ｃｉｔおよびカチオン性可溶化配列Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－ＬｙｓによってＮ末端部位で拡大され、ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴをもたらす。

【０１１５】

更なる実施形態は、表面上にリンカー化合物Ｌを有する$SiO_2$ナノ粒子を含む本発明による組成物であり、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、吸着結合によりリンカー化合物Ｌにコンジュゲートされている１つもしくはそれを超えるペプチドまたは抗原とを含み、ペプチドまたは抗原は、リンカーユニットＵおよび１つもしくはそれを超えるアミノ酸による親水性伸長部を含む。

【０１１６】

好ましい実施形態は、表面上にリンカー化合物Ｌを有する$SiO_2$ナノ粒子を含む本発明による組成物であって、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、吸着結合によりリンカー化合物Ｌにコンジュゲートされている１つもしくはそれを超えるペプチドまたは抗原とを含み、ペプチドまたは抗原は、カテプシンＢ感受性ジペプチドおよびＬｙｓ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓによる親水性伸長部を含むものである。

【０１１７】

より好ましい実施形態は、表面上にリンカー化合物Ｌを有する$SiO_2$ナノ粒子を含む本発明による組成物であって、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、吸着結合によりリンカー化合物Ｌにコンジュゲートされている１つもしくはそれを超えるペプチドまたは抗原とを含み、ペプチドまたは抗原は、カテプシンＢ感受性ジペプチドとしてＶａｌ－ＣｉｔまたはＴｒｐ－Ｃｉｔと、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓによる親水性伸長部とを含むものである。

【０１１８】

別の実施形態は、表面上にリンカー化合物Ｌを有する$SiO_2$ナノ粒子を含む本発明による組成物であって、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基－ＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、吸着結合によりリンカー化合物Ｌにコンジュゲートされている１つもしくはそれを超えるモデルペプチドＳＩＩＮＦＥＫＬとを含み、ペプチドは、カテプシンＢ感受性ジペプチドとしてＶａｌ－

ＣｉｔまたはＴｒｐ－Ｃｉｔと、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓによる親水性伸長部とを含むものである。

【０１１９】

しかしながら、ペプチドのこの親水性修飾は、ＭＨＣクラスＩへのより強い結合をもたらし、それによって標的エピトープを置換し、腫瘍細胞上に存在しないエピトープに対する免疫応答を誘発し得る。この影響を回避するために、親水化サブ分子とエピトープとの間にスペーサが必要になる可能性がある。

【０１２０】

本発明の任意の実施形態は、いわゆる自己犠牲スペーサ（ＰＡＢＣ、ｐ－アミノベンジルカルバメート）の使用である。そのような自己犠牲スペーサの例は、４－アミノベンジルアルコール、２－アミノベンジルアルコールまたは４－ヒドロキシベンジルアルコール、２－ヒドロキシベンジルアルコールの構造単位を含む化合物である。（欧州特許出願公開第０６４８５０３号、国際公開第２００７／０３１７３４号、国際公開第２０１５／１６２２９１号、米国特許第６，１８０，０９５号、米国特許第６，２１４，３４５号）。

【０１２１】

自己犠牲スペーサは、分子部分への結合の１つが放出されると、残りの結合が分割され、先に結合した分子が放出されるように、少なくとも２つの更なる分子部分に化学的に結合している分子部分として定義される。

【０１２２】

自己犠牲スペーサが使用される場合、スペーサは、酵素ｃａｔＢによる切断リンカーとペプチドとの間に配置されることが好ましい。一例として、以下のバイオコンジュゲートを生成することができる：（$Arg_6$）－（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）－（ＰＡＢＣ）－（ＳＩＩＮＦＥＫＬ）、ここで、ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号２９６）はモデル抗原である。

【０１２３】

驚くべきことに、酵素的ｃａｔＢ切断リンカー系は、自己犠牲スペーサを必要とせずに使用できることが見出された。

【０１２４】

治療的ワクチン接種に使用されるエピトープは、典型的には、ＭＨＣクラスＩでは８～１１アミノ酸およびＭＨＣクラスＩＩでは最大２５アミノ酸からなる。それらのエピトープでは、はるかに大きな薬物と比較してこれらのエピトープのサイズが小さく、酵素による切断を阻害するため、自己犠牲スペーサを使用する必要はない。

【０１２５】

より好ましい実施形態は、表面上にリンカー化合物Ｌを有する$SiO_2$ナノ粒子を含む本発明による組成物であり、リンカー化合物Ｌは、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$または－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）と、少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－$COO^-$）基と、ポリ（Ｉ：Ｃ）またはその任意の誘導体と、吸着結合によりリンカー化合物Ｌにコンジュゲートされている１つもしくはそれを超える免疫原性フラグメントとを含み、免疫原性フラグメントは、リンカーユニットＵおよび１つもしくはそれを超えるアミノ酸による親水性伸長部を含む。

【０１２６】

特定の実施形態では、免疫原性フラグメントは、以下からなる群から選択することができる：

（ａ）感染性疾患に対する免疫応答を誘導するのに適したペプチド；

（ｂ）癌細胞に対する免疫応答を誘導するのに適したペプチド；

【０１２７】

いくつかの実施形態では、免疫原性フラグメントは、感染性疾患の予防に有用なものである。そのような処置は、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ならびに他の哺乳動物種および非哺乳動物種を含む広範囲の宿主、好ましくはヒトに影響を及ぼす多種多様な感染性疾患を処置するのに有用であろう。

【０１２８】
癌の例としては、子宮頸癌、肛門性器癌、頭頸部癌または細胞学的異常、例えば意義不明な異型扁平上皮細胞（ＡＳＣＵＳ）または１つもしくはそれを超えるＨＰＶ型によって引き起こされる任意の癌が挙げられるが、これらに限定されない。ＨＰＶ感染症によって引き起こされる疾患の別の例は、子宮頸部上皮内新生物グレード１（ＣＩＮ１）、ＣＩＮ２、ＣＩＮ３である。子宮頸部上皮内新生物（ＣＩＮ）は、子宮頸部異形成としても知られており、潜在的に子宮頸癌をもたらし得る子宮頸部の表面上の細胞の異常な増殖である。より具体的には、ＣＩＮは、子宮頸部の細胞の潜在的な前癌性形質転換を指す。
【０１２９】
感染性疾患の一例は、高リスクＨＰＶ型による持続性感染症である。
【０１３０】
ＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントは、例えばワクチンとして、または免疫賦活剤として、ＨＰＶ関連症状の免疫予防法に一般的に使用される。
【０１３１】
「ワクチン」または「免疫賦活剤」という用語は、個体、例えばヒトにおいて免疫応答を誘発することができる免疫原性フラグメントを含む組成物であって、必要に応じてアジュバントを含有する組成物を指す。ＨＰＶのためのワクチンは、偶発的感染症、または持続性感染症、またはＡＳＣＵＳ、ＣＩＮ１、ＣＩＮ２、ＣＩＮ３、または１つもしくはそれを超えるＨＰＶ型によって引き起こされる癌などの細胞学的異常に対する防御免疫応答を適切に誘発する。
【０１３２】
本発明の別の目的は、ワクチンとしてまたは免疫賦活剤として使用するための本発明による１つもしくはそれを超えるＨＰＶ由来の免疫原性フラグメントまたはそのバリアントを含む薬学的に許容され得る化合物が負荷されたナノ粒子を含む組成物である。
【０１３３】
一実施形態では、本発明による組成物は、個別化された癌処置のためのワクチンとして使用される。
【０１３４】
本発明による組成物は、ＨＰＶ感染症の予防またはＨＰＶ陽性ヒトの処置またはＨＰＶ陽性腫瘍の処置のためのワクチンとして使用される。
【０１３５】
また、本発明の目的は、本発明によるナノ粒子を含む凍結乾燥物である。凍結乾燥物は、添加剤、例えば、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルデンプン、デキストランおよびフィコール）ならびに糖（例えば、トレハロース、ラクトース、スクロース、グルコース、ガラクトース、マルトース、マンノースおよびフルクトース）、ポリヒドロキシアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトールおよびイノシトール）、アミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、プロリンおよびリジン）ならびにメチルアミン（例えば、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド、ベタインおよびサルコシン）を含み得る。本発明による凍結乾燥物は、ワクチン接種前に滅菌水で再懸濁することができる。
【０１３６】
本発明の更なる目的は、本発明による組成物を含むワクチンを提供することである。
【０１３７】
本発明による組成物は、好ましくは安定な分散液である。
【０１３８】
ナノ粒子は、ナノ粒子が溶媒によって化学的に攻撃されず、物理的に修飾されず、逆もまた同様である限り、任意の所望の溶媒中に分散形態であり得、その結果、得られるナノ分散液は安定であり、特に薬学的および物理的に安定である。分散液は、ナノ粒子が単分散および非凝集形態であり、沈降傾向がなく、無菌濾過が可能であることを特に特徴とする。

【０１３９】
本発明による医薬組成物は、特に感染性疾患、腫瘍または癌の結果として、患者生体の個々の部分の全体的な状態または状態の病原性変化を少なくとも一時的に示す患者の予防、治療、制御または後処置に使用することができる任意の組成物である。したがって、特に、本発明の意味における医薬組成物がワクチンおよび／または免疫療法薬であることが可能である。
【０１４０】
本発明による組成物は、固体または液体組成物の形態であり得る医薬組成物として製剤化され得る。プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなどの生理食塩水またはグリセロールまたはグリコールが含まれてもよい。
【０１４１】
本発明による組成物は、必要に応じて他の有効成分を含んでもよく、または薬学的に許容され得る医薬品添加剤、担体、緩衝剤、安定剤、等張剤、保存剤もしくは酸化防止剤、または当業者に周知の他の材料の１つもしくはそれを超えるものを含んでもよい。そのような材料は非毒性であるべきであり、薬学的に許容され得る化合物の有効性を妨げるべきではない。担体または他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば経口または非経口に依存し得る。
【０１４２】
静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または罹患部位での注射のために、本発明による組成物は、パイロジェンフリーであり、適切なｐＨ、等張性および安定性を有する非経口的に許容され得る水溶液の形態である。
【０１４３】
保存剤は、一般に、微生物の増殖を遅らせ、組成物の貯蔵寿命を延ばし、複数回使用の包装を可能にするために、本発明による組成物に含まれる。保存剤の例としては、フェノール、メタ－クレゾール、ベンジルアルコール、パラヒドロキシ安息香酸およびそのエステル、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、１－チオグリセロールおよび塩化ベンゼトニウムが挙げられる。
【０１４４】
本発明のナノ粒子含有組成物は、経腸または非経口経路を含む任意の数の異なる経路によって患者に投与され得る。医薬組成物の非経口投与が好ましい。非経口投与には、以下の経路による投与が含まれる：皮膚または皮下、経鼻、膣、直腸、筋肉内、眼内、経上皮、腹腔内、心臓内、骨内、皮内、髄腔内、腹腔内、経皮、経粘膜、ならびに吸入および局所（皮膚、眼、直腸、鼻、膣、吸入およびエアロゾルを含む）、ならびに直腸全身経路。好ましい実施形態では、医薬組成物は局所（例えば、粘膜、皮膚）適用のためのものである。
【０１４５】
投与は、例えば注射によって、または送達ガンを使用してバリスティックに実施して、表皮の外層を通る経皮通過を促進する。次いで、ナノ粒子は、例えばリンパ系を通って移動するにつれて成熟する樹状細胞によって取り込まれ、エピトープペプチドおよび／またはエピトープペプチドが由来するもしくはエピトープペプチドが一部を形成する抗原に対する免疫応答およびワクチン接種の調節をもたらす。ナノ粒子はまた、エアロゾルで送達され得る。これは、ナノ粒子のサイズが小さいことによって可能になる。
【０１４６】
特に好ましいのは、皮内、皮下、筋肉内注射である。投与は、例えば、いわゆるワクチン接種ガンを用いて、または注射器を用いて行うことができる。粘膜投与、特に粘膜ワクチン接種は、病原体が粘膜経路を介して体内に侵入した場合に有益であり得る。粘膜送達経路は、主に経口および直腸経路を含む。粘膜の前処理が必要な場合がある。生体、好ましくはヒト患者によって吸入され、鼻および／または気管支粘膜によって取り込まれるエアロゾルとして物質を調製することも可能である。粘膜投与の他の可能な形態は、膣および直腸坐剤である。これらの投与形態は、費用対効果が高く（注射器および針のような消

耗品がない）、安全であり（感染および操作ミスのリスクが非常に低く）、適用が容易であり、患者のコンプライアンスが高い（針恐怖がない）。また、粘膜免疫系（ＭＡＬＴ）に直接対処する。

【０１４７】

本発明の一実施形態では、本発明による組成物を含むワクチンは、粘膜投与に使用される。

【０１４８】

本発明のナノ粒子の例外的に小さいサイズは、標的分子または治療分子に結合されている場合であっても細胞によって取り込まれ得るので、細胞および組織への送達にとって大きな利点である。したがって、ナノ粒子はＡＰＣによって内在化され得、免疫原性フラグメントはＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩを介してプロセシングおよび提示される。

本発明の特に好ましい実施形態

【０１４９】

１．１つもしくはそれを超えるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントまたはそのバリアントを含む薬学的に許容され得る化合物が負荷された、二酸化ケイ素および表面上に官能基を有するナノ粒子を含む組成物であって、

－官能基は、薬学的に許容され得る化合物の負電荷および正電荷の両方を担持および／または安定化することができ、

－組成物のゼータ電位は、少なくとも±１５ｍＶの値を有し、

－ナノ粒子は、１５０ｎｍ未満の粒径を有する、組成物。

【０１５０】

２．免疫原性フラグメントが、好ましくはＨＰＶ型１６、１８、３１、３３、３５、３９、４５、５１、５２、５６、５８、５９、６６、６８、７３および８２から選択される高リスクＨＰＶ遺伝子型に由来することを特徴とする、実施形態１に記載の組成物。

【０１５１】

３．免疫原性フラグメントが、好ましくは配列番号５～２５７から選択される、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来することを特徴とする、実施形態１または２に記載の組成物。

【０１５２】

４．免疫原性フラグメントが、好ましくは配列番号２５８～２９５から選択される、ＨＰＶ１６および／またはＨＰＶ１８のＥ６および／またはＥ７タンパク質に由来する免疫原性フラグメントと少なくとも７５％同一であることを特徴とする、実施形態１から３までのいずれかに記載の組成物。

【０１５３】

５．免疫原性フラグメントが、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩおよび／またはＭＨＣクラスＩＩに結合することができることを特徴とする、実施形態１から４までのいずれかに記載の組成物。

【０１５４】

６．免疫原性フラグメントが細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導することができることを特徴とする、実施形態１から５までのいずれかに記載の組成物。

【０１５５】

７．免疫原性フラグメントが、３～３５アミノ酸、より好ましくは５～２５アミノ酸、より好ましくは６～２５アミノ酸、より好ましくは７～２５アミノ酸、より好ましくは８～２５アミノ酸、最も好ましくは８～２０アミノ酸の長さを有することを特徴とする、実施形態１から６までのいずれかに記載の組成物。

【０１５６】

８．ナノ粒子に、１つもしくはそれを超えるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の免疫原性フラグメントおよびポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリ（Ｉ：Ｃ））またはその任意の誘導体を含む薬学的に許容され得る化合物が負荷されている、実施形態１から

７までのいずれかに記載の組成物。
【０１５７】
９．ポリ（Ｉ：Ｃ）の誘導体が、平均サイズが０．２ｋｂ～１ｋｂのポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷ（低分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、平均サイズが１．５ｋｂ～８ｋｂのポリ（Ｉ：Ｃ）ＨＭＷ（高分子量ポリ（Ｉ：Ｃ））、ポリＩ：ポリ$C_{12}U$である、実施形態８に記載の組成物。
【０１５８】
１０．ナノ粒子が、$nm^2$単位のナノ粒子の表面に対する薬学的に許容され得る化合物の総数［分子／$nm^2$］に関して、最大０．５、好ましくは０．０１～０．５、より好ましくは０．０３～０．４、最も好ましくは０．０５～０．３の表面負荷密度を有する、実施形態１から９までのいずれかに記載の組成物。
【０１５９】
１１．組成物の多分散指数（ＰＤＩ）が、０～０．３２、好ましくは０．１～０．３、より好ましくは０．１～０．２、最も好ましくは０．１未満である、実施形態１から１０までのいずれかに記載の組成物。
【０１６０】
１２．組成物のｐＨ値が６．０～８．０である、実施形態１から１１までのいずれかに記載の組成物。
【０１６１】
１３．組成物のゼータ電位が、少なくとも±３０ｍＶの値を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１６２】
１４．ナノ粒子のＺ平均直径が、５ｎｍ以上１５０ｎｍ未満、好ましくは１５ｎｍ以上６０ｎｍ以下、より好ましくは２０ｎｍ以上５０ｎｍ以下、さらにより好ましくは２０ｎｍ～３０ｎｍの範囲にある、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１６３】
１５．負荷されたナノ粒子の合計の正味電荷が０とは異なる、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１６４】
１６．官能基が、共有結合または吸着結合によってナノ粒子の表面に結合されたリンカーＬに連結されている、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１６５】
１７．リンカー化合物Ｌが、官能基として少なくとも１つのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（$-COO^-$）基を含む、実施形態１６に記載の組成物。
【０１６６】
１８．リンカー化合物Ｌが、官能基として少なくとも１つのグアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$もしくは－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$）またはアミノ基（－$NH_2$もしくは－$NH_3^+$）基を含む、実施形態１６または１７に記載の組成物。
【０１６７】
１９．リンカーＬが、－ＳＨ、－ＣＯＯＨ、－$NH_2$、－グアニジノ基（－ＮＨＣ（＝ＮＨ））$NH_2$）、－$PO_3H_2$、－$PO_2CH_3H$、－$SO_3H$、－ＯＨ、－$NR_3^+X^-$の群から選択される少なくとも１つの更なる官能基Ｌ’を含む、実施形態１６から１８までのいずれかに記載の組成物。
【０１６８】
２０．リンカー化合物Ｌが、少なくとも式（Ｉ）の構造単位
＊－（－Ｏ）３Ｓｉ－（ＣＨ２）ｎ－ＣＨ（ＣＯＯＸ）－（ＣＨ２）ｐ－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ（ＣＯＯＸ）－（ＣＨ２）ｑ－Ｙ（Ｉ）
［式中、
Ｘは、互いに独立して、Ｈまたは負電荷であり、
Ｙは、互いに独立して、－ＮＨＣ（＝ＮＨ）$NH_2$、－ＮＨＣ（＝$NH_2^+$）$NH_2$、

－ＮＨ$_2$または－ＮＨ$_3^+$であり、
ｎ、ｐおよびｑは、互いに独立して、０または１～２５の数であり、
＊－は、ナノ粒子との連結点である］を含む、実施形態１０から１３までのいずれかに記載の組成物。

【０１６９】
２１．薬学的に許容され得る化合物が、吸着結合によってナノ粒子にコンジュゲートされている、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１７０】
２２．免疫原性フラグメントが、極性アミノ酸でＮ末端またはＣ末端に伸長されている、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１７１】
２３．極性アミノ酸が、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、セリン、トレオニン、チロシンの群から選択される、実施形態２２に記載の組成物。

【０１７２】
２４．ペプチドが、酵素カテプシンＢにより切断可能なリンカーを有するＮ末端伸長部を含む、実施形態２２または２３に記載の組成物。

【０１７３】
２５．酵素により切断可能なリンカーが、カテプシンＢ感受性ジペプチドＶａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－ＬｙｓまたはＶａｌ－Ｌｙｓのうちの１つを含む、実施形態２４に記載の組成物。

【０１７４】
２６．スペーサが、酵素により切断可能なリンカーとペプチドとの間に配置されている、実施形態２４または２５に記載の組成物。

【０１７５】
２７．スペーサが自己犠牲スペーサである、実施形態２６に記載の組成物。

【０１７６】
２８．スペーサが、４－アミノベンジルアルコール、２－アミノベンジルアルコールまたは４－ヒドロキシベンジルアルコール、２－ヒドロキシベンジルアルコールの構造単位を含む、実施形態２６または２７に記載の組成物。

【０１７７】
２９．ナノ粒子が、別の材料との混合物であってもよい、少なくとも二酸化ケイ素（ＳｉＯ$_2$）を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１７８】
３０．ナノ粒子がＳｉＯ$_2$からなる、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１７９】
３１．ワクチンとしてまたは免疫賦活剤として使用するための、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１８０】
３２．個別化された癌処置のための、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１８１】
３３．ＨＰＶ感染症の予防もしくはＨＰＶ陽性ヒトの処置またはＨＰＶ陽性腫瘍の処置のためのワクチンとして使用するための、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１８２】
３４．先行する実施形態のいずれかに記載の組成物を含む凍結乾燥物。

【０１８３】
３５．先行する実施形態のいずれかに記載の組成物を含むワクチン。

【０１８４】
３６．組成物が安定な分散液である、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。

【０１８５】
３７．組成物のｐＨ値が７．２～７．４である、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１８６】
３８．組成物が等張性である、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【０１８７】
３９．組成物が更なる薬学的に許容され得る添加剤を含有する、先行する実施形態のいずれかに記載の組成物。
【実施例】
【０１８８】
実施例１
直径２５ｎｍの単分散二酸化ケイ素ナノ粒子の調製
５００ｍＬの無水エタノールを５００ｍＬのメスシリンダからスクリューキャップ付き１０００ｍＬのガラスびんに採取した。３５８ｍＬの滅菌ＤＩ水を加え、混合物を十分に振盪した。
【０１８９】
６９．６ｍＬのオルトケイ酸テトラエチル（ＴＥＯＳ）をびんに加えた。びんをしっかりと閉じ、十分に振盪した。１時間の待機時間の後、無色透明の混合物は室温（２２℃）になった。次いで、９．５ｍＬのアンモニア水（２５％）を素早く加えた。
【０１９０】
びんを手で１０秒間非常によく振盪し、室温で保存した。
【０１９１】
室温で２４時間後、より狭いサイズ分布を得るために、さらに３４．８ｍＬのＴＥＯＳを混合物に加えた（シード成長プロセス）。室温でさらに２４時間後、再び混合物に３４．８ｍＬを加えた（シード成長プロセスを続けた）。室温で２４時間後、５０μＬの反応混合物を一方向ＰＭＭＡキュベット（幅１０ｍＭ）に入れ、１．５ｍＬのＤＩ水（０．２μｍ濾過）で希釈した。キュベットを粒径測定のためにＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ（ＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、英国）に入れた。
適用パラメータ：
測定角度：１７３°後方散乱（ＮＩＢＳデフォルト）
測定セル：ＤＴＳ１０７０（粒径およびゼータ電位に使用）
屈折率ＳｉＯ２：１．４６０
吸収：０．０１０
分散剤：水
屈折率：１．３３０
粘度：０．８８７２ｃＰ（＝サンプル粘度）
温度：２５℃
１０回を超える粒径測定の実行
結果：
Ｚ平均（体積基準）：２３．８６ｎｍ
ＰＤＩ：０．１０８
強度ピーク：２６．７７ｎｍ
ｐＨ：１１．０（新たに較正された複合電極）
【０１９２】
ナノ粒子懸濁液を２リットルの丸底フラスコに移し、エタノールならびにアンモニアガスを、加熱式水浴を備えたロータリーエバポレーターによって除去した。４００ｍＬの滅菌ＤＩ水を少量ずつ加えた。体積を１９８．１５ｇに減少させた。
【０１９３】
懸濁液の固形分（純粋なナノ分散二酸化ケイ素）を２５０μＬの蒸発により三連で測定

し、残渣を秤量した。
結果：
固形分：１６３．３ｍｇ／ｍＬ
ｐＨ：８．０（新たに較正された複合電極）
【０１９４】
７０．０ｍｇ／ｍＬの固形分を得るために、蒸留残渣を２６４．５ｍＬの滅菌ＤＩ水で希釈した。
実施例２：
アルギン酸化シリカナノ粒子（$SiO_2$－Ａｒｇ）を得るためのＬ－アルギニンによるナノ粒子の官能化
【０１９５】
実施例１で得られた４６２．６５ｇのナノ粒子懸濁液４６２．６５ｇを５００ｍＬのガラスびんに入れた。磁気撹拌機を加え、びんを磁気撹拌機に置いた。１７．３５ｇのＬの（＋）－アルギニン（ＣＡＳ番号７４－７９－３、ＰａｎＲｅａｃ　ＡｐｐｌｉＣｈｅｍ社、欧州薬局方・米国薬局方、製品コードＡ１３４５．０５００）をナノ粒子懸濁液に加えた。アルギニンが完全に溶解したら、１０．８のｐＨ値が得られ、次いで、５．３４ｍＬの３－（トリエトキシシリル）プロピルコハク酸無水物（ＣＡＳ番号９３６４２－６８－３、Ｇｅｌｅｓｔ　Ｃｏｒｐ．社、製品コード：ＳＩＴ８１９２．６）を室温でゆっくりと加えた。反応混合物は非常に混濁したが、約３０分以内にきれいになった。この時間中、２つの反応が同時に起こった：
【０１９６】
シランのエトキシ基は、高いｐＨ値のために加水分解された。生成されたシラノール基は、ナノ粒子上に沈殿し、ナノ粒子の上に表面コーティングを構築した。並行して、過剰のアルギニンのアミノ基は無水コハク酸基と反応し、アミド結合を形成する。
【０１９７】
環状無水物を開環することによって、アルギニンの消費および主にカルボン酸基の形成により、ｐＨ値は９．８に低下した。
【０１９８】
２４時間撹拌した後、懸濁液を１００ｋＤａの膜（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．社Ｍａｃｒｏｓｅｐ（登録商標）Ａｄｖａｎｃｅ、製品コードＭＡＰ　１００Ｃ３８）を備えた２０ファルコンチューブに移した。ナノ粒子懸濁液を４，０００ｒｐｍ（使用した遠心分離機で＝２，７３７ｇ）で１０分間遠心分離して、開始体積より少なくとも５小さい体積にした。遠心分離後、ファルコンチューブ内の体積を滅菌ＤＩ水で元へ戻し、遠心分離を５回繰り返した。遠心分離ステップは、過剰なアルギニンおよび結合していない可能性のある反応生成物を除去するために必要である。
【０１９９】
遠心分離後、回収した上清の固形分を３連で測定した。方法は実施例１と同じであった。
結果：
収率：１７８．３ｇ
固形分：９７．１６ｍｇ／ｍＬ
【０２００】
ナノ粒子懸濁液を１６８．１７ｍＬの滅菌ＤＩ水で希釈して、５０．０ｍｇ／ｍＬの最終濃度を得た。
実施例３
直径２５ｎｍのリン酸化シリカナノ粒子の合成
【０２０１】
２００ｍＬの無水エタノールを２５０ｍＬのメスシリンダからスクリューキャップ付き５００ｍＬの耐圧ガラスびんに採取し、１４３．５ｍＬの滅菌ＤＩ水を加え、混合物を十分に振盪した。２７．８５ｍＬのオルトケイ酸テトラエチル（ＴＥＯＳ）をびんに加えた

。びんをしっかりと閉じ、十分に振盪した。

【０２０２】

１時間の待機時間の後、無色透明の混合物は室温（２２℃）になった。次いで、３．９５ｍＬのアンモニア水（２５％）を素早く加えた。びんを手で１０秒間非常によく振盪し、室温で保存した。室温で２４時間後、さらに１．５ｍＬの（ジエチルホスファトエチル）トリエトキシシラン（ＣＡＳ番号７５７－４４－８、Ｇｅｌｅｓｔ　Ｃｏｒｐ．社、製品コードＳＩＤ３４１２．０）を室温で混合物に加えた。１０ｍＬのアンモニア水（２５％）も加え、反応混合物を８５℃の水浴に２４時間入れた。

【０２０３】

この温度で、２つの反応が並行して行われた：高いｐＨ値のために、シランのエトキシ基が加水分解された。シラノール基はシリカナノ粒子上に沈殿し、ナノ粒子の上に表面コーティングを構築した。並行して、しかしながらはるかに遅く、リン酸エステルが加水分解されて、アンモニアを対イオンとする対応する酸が得られた。５０μＬの反応混合物を一方向ＰＭＭＡキュベット（１０ｍＭ幅）に入れ、１．５ｍＬのＤＩ水（０．２μｍ濾過）で希釈した。キュベットを粒径測定のためにＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏに入れた。

結果：

Ｚ平均（体積基準）：２１．３ｎｍ

ＰＤＩ：０．１４４

強度ピーク：２７．７ｎｍ

【０２０４】

ナノ粒子懸濁液を５００ｍＬの丸底フラスコに移し、エタノールならびにアンモニアガスを、加熱式水浴を備えたロータリーエバポレーターによって除去した。２００ｍＬの滅菌ＤＩ水を少量ずつ加えた。体積を１２０ｍＬまで減少させた。この体積を、１００ｋＤａの膜（Ｐａｌｌ　Ｃｏｒｐ．社Ｍａｃｒｏｓｅｐ（登録商標）Ａｄｖａｎｃｅ、製品コードＭＡＰ１００Ｃ３８）を備えた６本のファルコンチューブに入れた。ナノ粒子懸濁液を４，０００ｒｐｍ（使用した遠心分離機で＝２，７３７ｇ）で１０分間遠心分離して、開始体積より少なくとも８０小さい体積にした。遠心分離後、ファルコンチューブ内の体積を滅菌ＤＩ水で元へ戻し、遠心分離を５回繰り返した。遠心分離ステップは、過剰な結合していない可能性のある反応生成物を除去するために必要である。遠心分離後、回収した上清の固形分を３連で測定した。方法は実施例１と同じであった。

結果：

収率：８３．３ｇ

固形分：１０４．０ｍｇ／ｍＬ

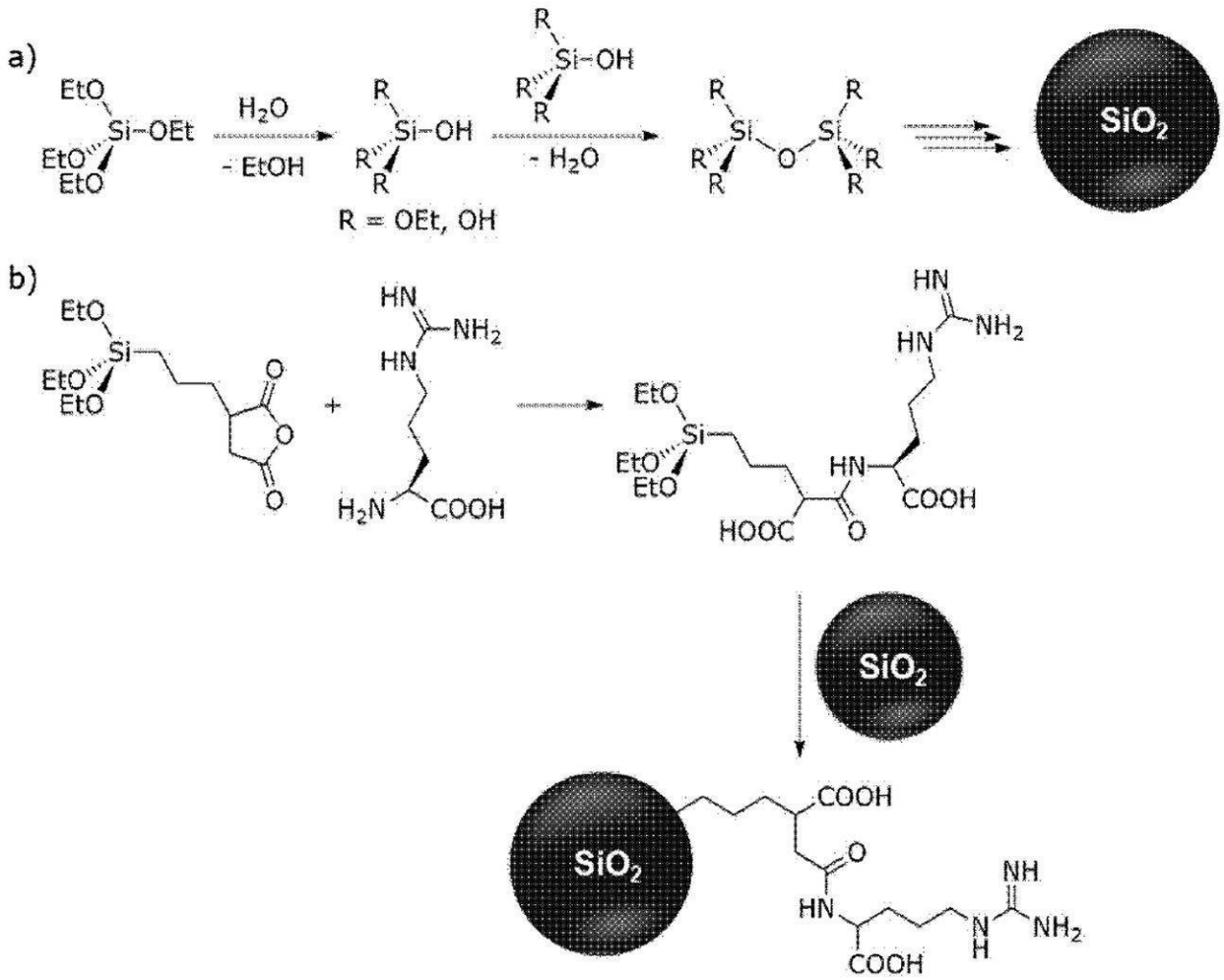
【０２０５】

ナノ粒子懸濁液を８６．６ｍＬの滅菌ＤＩ水で希釈して、５０．０ｍｇ／ｍＬの最終濃度を得た。

反応スキーム１：

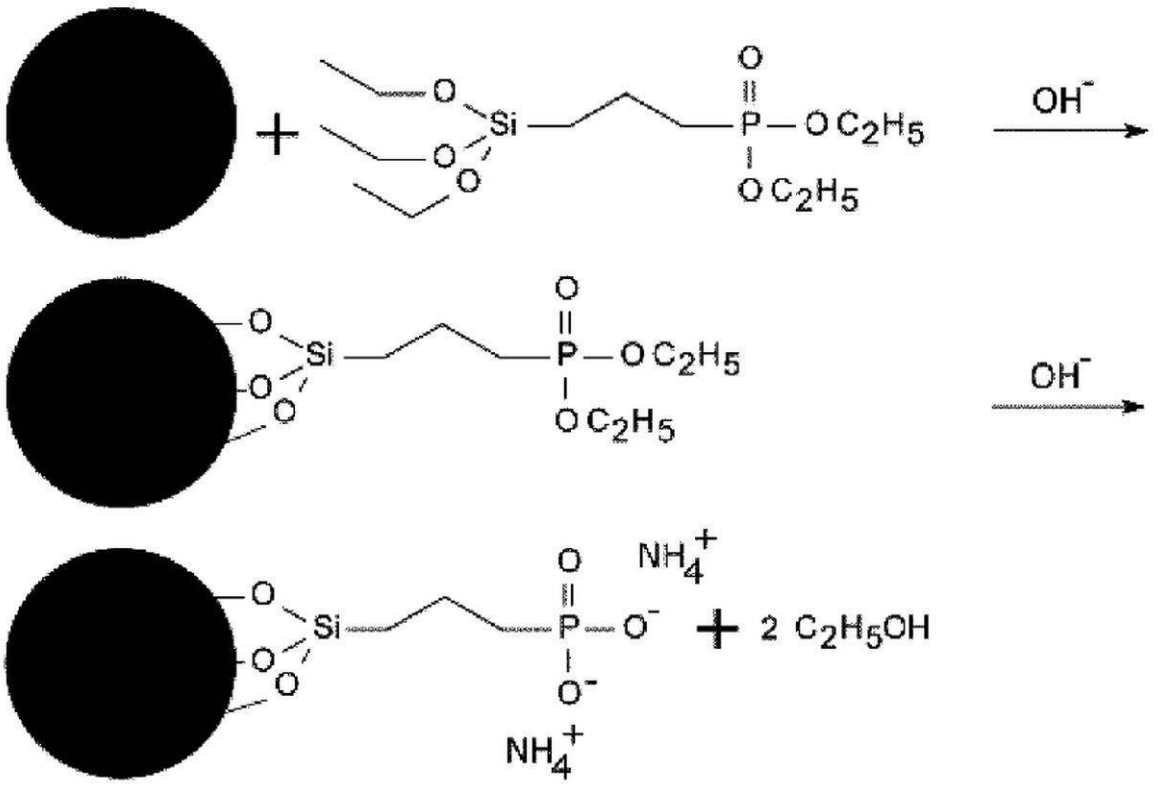
実施例１＝ａ）および実施例２＝ｂ）

【化１】




反応スキーム２：
実施例３

【化２】



20

実施例４

ポリ（Ｉ：Ｃ）の吸着結合によるポリ（Ｉ：Ｃ）@ＳｉＯ$_2$－Ａｒｇの調製

【０２０６】

２００ｍＬのエタノール、１４３．５ｍＬの滅菌脱イオン水および２７．８５ｍＬのオルトケイ酸テトラエチル（ＴＥＯＳ）の混合物を調製した。３．７０ｍＬのアンモニア、２５％（水中ＮＨ$_3$）を室温で加えた。反応混合物を１０秒間振盪することによって激しく混合し、撹拌せずに室温で２４時間放置した。翌日、別の部分である２７．８５ｍＬのオルトケイ酸テトラエチル（ＴＥＯＳ）を混合物に加えた。得られた混合物から５０μＬを取り出し、ＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ社）で動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定した。以下の結果が得られた：

Ｚ平均：２５．５３ｎｍ

平均：２０．３６ｎｍ

多分散指数（ＰＤＩ）：０．１３６

【０２０７】

続いて、先に生成した１００ｍＬの二酸化ケイ素粒子の一部をロータリーエバポレーターで約３０ｍＬの体積に濃縮し、再び１００ｍＬまで充填した。これを３回繰り返し、反応溶液からエタノールおよびアンモニアを除去した。得られた懸濁液を滅菌脱イオン水で１００ｋＤａの膜上で５回洗浄した。最後の洗浄ステップの後、懸濁液の固形分を７．９％のＳｉＯ$_2$で重量測定により測定し、計算された量の水を加えることによって懸濁液を固形分５．０％に調整した。

【０２０８】

実施例１で生成した１５ｍＬの二酸化ケイ素粒子（７５０ｍｇのＳｉＯ$_2$）に、５００ｍｇのＬ－アルギニン（ＣＡＳ番号７４－７９－３；ａｂｃｒ　ＧｍｂＨ社、ドイツ国）（＝２．８７ｍｍｏｌ）を加え、アルギニンを完全に溶解させながら撹拌した。透明な粒

子懸濁液が得られ、この懸濁液に、室温で撹拌しながら１２７μＬの（３－トリエトキシシリルプロピル）コハク酸無水物基（ＣＡＳ番号：９３６４２－６８－３）（＝０．４５ｍｍｏｌ）をゆっくりと加えた。

【０２０９】

上記で得られた２．００ｍＬの「アルギニル化」シリカナノ粒子を、１ｍＬ当たり０．８３３ｍｇのポリ（Ｉ：Ｃ）の濃度を有する３．００ｍＬのポリ（Ｉ：Ｃ）（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社製（フランス国トゥールーズ在）ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＬＭＷ、サイズ０．２～１ｋｂ、ＣＡＳ番号３１８５２－２９－６）の低分子量溶液と混合した。ボルテックスミキサーで１５秒間完全に混合した後、１時間後に透明な懸濁液を２５０ｍｇのグルコースと混合した。配合物は、以下のものを含む：

１００ｍｇ　「アルギニル化」シリカナノ粒子、$SiO_2$－Ａｒｇ（ｃ＝２０ｍｇ／ｍＬ）

２．５ｍｇ　ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＬＭＷ（ｃ＝０，５ｍｇ／ｍＬ）

２５０ｍｇ　グルコース（ｃ＝５０ｍｇ／ｍＬ）（配合物の等張化のため）

【０２１０】

次いで、混合物を０．２μｍ滅菌フィルターを使用して３つの滅菌２．０ｍＬのＨＤＰＥバイアルに充填した。得られた懸濁液は澄んでおり完全に透明である。

【０２１１】

ポリ（Ｉ：Ｃ）負荷粒子は、滅菌フィルターを容易に通過する。２種類のフィルターを使用した：Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社、Ａｃｒｏｄｉｓｃ　Ｓｕｐｏｒ（登録商標）膜（低タンパク質結合）０．２μｍ、カタログ番号ＰＮ４６０２およびＶＷＲ０．２μｍセルロースアセテート膜０．２μｍ、カタログ番号５１４－００６１。

【０２１２】

より多量のポリ（Ｉ：Ｃ）を加えた後でも、懸濁液は澄んでおり完全に透明のままである。

実施例５

$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子のペプチド負荷容量

【０２１３】

ペプチド負荷実験では、直径２５ｎｍ（Ｚ平均）、固形分２０ｍｇ／ｍＬおよびアルギニル化表面を有する１００μＬのシリカナノ粒子に、異なる量のモデルペプチドＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＳＩＩＮＦＥＫＬを負荷した。生理学的条件をシミュレートするために、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を加えて等張懸濁液（０．９％ＮａＣｌ）を得た。最大１０％のペプチドをナノ粒子に加えた。ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＳＩＩＮＦＥＫＬはｐＨ１０．２４の等電点を有し、４つの塩基性アミノ酸（リジン）および１つの酸性アミノ酸（グルタミン酸）によって決定されるカチオン特性を示す。

【０２１４】

５０μＬの対応する粒子－ペプチド－ＮａＣｌ混合物を１．５ｍＬの滅菌濾過脱イオン水で希釈し、ＺｅｔａＳｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、英国）中で動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定した。各サンプル番号１～１０について、１００μＬの$SiO_2$－Ａｒｇストック溶液を使用した。得られた結果を表２に示す。

表２：動的光散乱の結果

【表２】

| # | [mg/mL] $SiO_2$-Arg | [mg] ペプチド | [%] ペプチド | [μL] ペプチドストック[2] | [mg] NaCl | [μL] NaClストック[3] | z 平均 [nm] | PDI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 20 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 0.90 | 9.00 | 23.62 | 0.07 |
| 1 | 20 | 0.02 | 1.00 | 5.1 | 0.95 | 9.45 | 24.00 | 0.10 |
| 2 | 20 | 0.04 | 2.00 | 10.2 | 0.99 | 9.92 | 24.48 | 0.10 |
| 3 | 20 | 0.06 | 3.00 | 15.5 | 1.04 | 10.39 | 26.03 | 0.14 |
| 4 | 20 | 0.08 | 4.00 | 20.8 | 1.09 | 10.87 | 26.91 | 0.14 |
| 5 | 20 | 0.11 | 5.00 | 26.3 | 1.14 | 11.37 | 28.,70 | 0.18 |
| 6 | 20 | 0.13 | 6.00 | 31.9 | 1.19 | 11.87 | 59.09 | 0.27 |
| 7 | 20 | 0.15 | 7.00 | 37.6 | 1.24 | 12.39 | 44.58 | 0.20 |
| 8 | 20 | 0.17 | 8.00 | 43.5 | 1.29 | 12.91 | 440.5 | 0.58 |
| 9 | 20 | 0.20 | 9.00 | 49.5 | 1.35 | 13.45 | 1074 | 0.31 |
| 10 | 20 | 0.22 | 10.00 | 55.6 | 1.40 | 14.00 | 2753 | 0.21 |

[1]保存溶液$SiO_2$－Ａｒｇ：２０ｍｇ／ｍＬの$SiO_2$－Ａｒｇ
[2]ストック溶液ペプチド：４ｍｇ／ｍＬのペプチド（ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＳＩＩＮＦＥＫＬ）
[3]ストック溶液ＮａＣｌ：１００ｍｇ／ｍＬのＮａＣｌ

【０２１５】
図５ａは、Ｚ平均対ペプチド濃度を示し、図５ｂは、ＰＤＩ対ペプチド濃度を示す。

【０２１６】
図５ａおよび図５ｂに示すように、最大５重量％このペプチドをナノ粒子に加えて、凝集または沈殿なしに安定な懸濁液を維持することができる。裸の粒子と比較して、直径はわずかに増加しており（＋５ｎｍ）、ＰＤＩは依然として非常に狭い粒径分布を示す。この光学透明懸濁液は、依然として滅菌フィルターを通過している。

【０２１７】
ペプチドを負荷した粒子は、滅菌フィルターを容易に通過する。２種類のフィルターを使用した：Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社、Ａｃｒｏｄｉｓｃ　Ｓｕｐｏｒ（登録商標）膜（低タンパク質結合）０．２μｍ、カタログ番号ＰＮ４６０２およびＶＷＲ０．２μｍセルロースアセテート膜０．２μｍ、カタログ番号５１４－００６１。

【０２１８】
ペプチド負荷が増加すると、粒径が増加し、吸着ペプチドがシリカナノ粒子表面に結合することを示している。より高いペプチド濃度（上記の例では６％）では、ナノ懸濁液は崩壊しており、これは、濁りや凝集による測定可能な粒径の増加によって示される。これらの懸濁液は滅菌フィルターを通過せず、非経口投与には非常に好ましくない。

実施例６
$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子のポリ（Ｉ：Ｃ）負荷容量

【０２１９】
負荷実験では、直径２５ｎｍ（Ｚ平均）、固形分２０ｍｇ／ｍＬおよびアルギニル化表面を有する５０μＬのシリカナノ粒子に、Ｇｉｂｃｏ（商標）によってＲＮａｓｅ／ＤＮａｓｅフリーの水中の異なる量のポリ（Ｉ：Ｃ）溶液を負荷した。ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＬＭＷ）は、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ　Ｅｕｒｏｐｅ社（カタログ番号ｔｌｒｌ－ｐｉｃｗ）から入手した。生理学的条件をシミュレートするために、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を加えて等張懸濁液（０．９％ＮａＣｌ）を得た。最大８％のポリ（Ｉ：Ｃ）をナノ粒子に加えた。コロイドは安定したままであった：沈殿または濁りは観察されなかった。粒径および

分布ならびにゼータ電位は、目視観察を裏付けるものである。

【０２２０】

ゼータ電位は、Ｓｍｏｌｕｃｈｏｗｓｋｉ計算モデルに従って、以下の条件下で測定した：

測定温度：２５℃

平衡時間：３０秒

測定ごとに１０～１００回、サンプルごとに５回の測定（ゼータ電位＝５回の測定の平均値を行う。

表３：動的光散乱の結果

【表３】

| [mg] ポリ(I:C) | [μL] ポリ(I:C) ストック | 体積 [μL] | [mg] NaCl | [μL] NaCl ストック | Z 平均 [nm] | PDI | ピーク [nm] | 初期ピーク [nm] | ゼータ電位 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | 50 | - | 0.45 | 4.50 | 33.83 | 0.557 | 12.69 | *) | - |
| 0.00 (0 %) | - | 50.0 | 0.45 | 4.50 | 22.79 | 0.077 | 20.23 | 24.47 | -27.4 |
| 0.01 (1 %) | 4.0 | 54.0 | 0.49 | 4.86 | 22.92 | 0.067 | 21.42 | 24.25 | -28.1 |
| 0.02 (2 %) | 8.2 | 58.2 | 0.52 | 5.23 | 23.12 | 0.075 | 19.96 | 23.97 | -28.7 |
| 0.04 (4 %) | 16.7 | 66.7 | 0.60 | 6.00 | 23.35 | 0.075 | 20.04 | 25.23 | -34.2 |
| 0.06 (6 %) | 25.5 | 75.5 | 0.68 | 6.80 | 23.45 | 0.08 | 19.96 | 34.93 | -36.2 |
| 0.09 (8 %) | 34.8 | 84.8 | 0.76 | 7.63 | 23.97 | 0.134 | **) | 32.15 | -37.2 |

＊）２つのピーク：２７．３８ｎｍ（６７．８％）および３６２．６ｎｍ（３２．２％）

＊＊）２つのピーク：７．６９１ｎｍ（２２．９％）および１８．４ｎｍ（７７．１％）

【０２２１】

６％ポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷの負荷まで、吸着されたポリ（Ｉ：Ｃ）による粒径の増加のために、測定されたＺ平均値は増加する（図６ｂ）。また、低いＰＤＩ（＜０．１）は、滑らかな粒子負荷（図６ａ）を示す。８％の負荷では、２つのピーク（７．６９１ｎｍおよび１８．４ｎｍ）が現れ、より低い直径の値に向かう方向のピークの強いピーク広がりも起こり、ＰＤＩ値は悪化している（図７ｄ）。これらのデータは、粒子の「過負荷」を示す：結合していないポリ（Ｉ：Ｃ）は追加のピークを生成し、それぞれ測定ピークを広げる。

【０２２２】

図７ａ～図７ｄは、ＺｅｔａＳｉｚｅｒのディスプレイにおけるＮｕｍｂｅｒ％を示す。Ｎｕｍｂｅｒ％は、そのパーセンテージ頻度で粒子分布を表現したものである。

図７ａ：ナノ粒子を含まないポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷ

図７ｂ：ポリ（Ｉ：Ｃ）を含まない$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子

図７ｃ：６重量％のポリ（Ｉ：Ｃ）を担持した$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子

図７ｄ：８重量％のポリ（Ｉ：Ｃ）を担持した$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子

実施例７

ペプチドおよびポリ（Ｉ：Ｃ）による$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子の負荷

【０２２３】

ペプチドおよびポリ（Ｉ：Ｃ）負荷実験では、直径２５ｎｍ（Ｚ平均）、固形分２０ｍｇ／ｍＬおよびアルギニル化表面を有する１００μＬのシリカナノ粒子に、異なる量のモデルペプチドＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＳＩＩＮＦＥＫＬおよび各５０μｇのポリＩＣ（ＬＭＷ）（２．５ｍｇ／ｍＬの濃度を有する２０μＬのポリ（Ｉ：Ｃ）ストック溶液）を負荷した。

【０２２４】

生理学的条件をシミュレートするために、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を加えて等張懸

濁液（０．９％ＮａＣｌ）を得た。最大４％のペプチドをナノ粒子に加えた。コロイドは安定したままであった：沈殿または濁りは観察されなかった。粒径および分布ならびにゼータ電位は、目視観察を裏付けるものである。

表５：動的光散乱の結果

【表５－１】

| [mg] pept.* | [μL] pept.* ストック | 体積 [μL] | [mg] NaCl | [μL] NaCl ストック | [μg] ポリ(I:C) | z 平均 [nm] | PDI | 初期ピーク [nm] | ピーク [nm] | ゼータ電位 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.04 (2 %) | 10.2 | 110.2 | 0.99 | 9.92 | 50 | 24.09 | 0.172 | 24.57 | 19.48 | -37.1 |
| 0.06 (3 %) | 15.5 | 115.5 | 1.04 | 10.39 | 50 | 27.87 | 0.279 | 25.7 | 21.31 | -27.6 |
| 0.08 (4 %) | 20.8 | 120.8 | 1.09 | 10.87 | 50 | 28.47 | 0.305 | 25.41 | 20.76 | -25.9 |

＊（ｐｅｐｔ．＝ペプチド）

実施例８

ｓｓＲＮＡ（ポリ（Ｕ））による$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子の負荷

【０２２５】

ｓｓＲＮＡ負荷実験では、直径２５ｎｍ（Ｚ平均）、固形分５０ｍｇ／ｍＬおよびアルギニル化表面（合計２０ｍｇの二酸化ケイ素）を有する４００μＬのシリカナノ粒子に、濃度１．０ｍｇ／ｍＬを有する５００μＬのポリ（Ｕ）溶液（合計０．５ｍｇのポリ（Ｕ））および濃度９０ｍｇ／ｍＬを有する１００μＬの塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を加えて、等張懸濁液（０．９％ＮａＣｌ）を得た。この場合のシリカナノ粒子へのポリ（Ｕ）の負荷量は２．４４重量％である。５０μＬのこのサンプルをＤＬＳによって測定した。ポリ（Ｕ）は、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社製（フランス国トゥールーズ在）（カタログコード：ｔｌｒｌ－ｓｓｐｕ）から得た。

表５：動的光散乱の結果

【表５－２】

| [mg] ポリ(U) | [mg] SiO2-Arg | [mg] NaCl | [μL] 総体積 | Z 平均 [nm] | PDI | ピーク [nm] | 初期ピーク [nm] | ゼータ電位 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.5 (2 %) | 20.0 | 90 | 1000 | 23.19 | 0.065 | 20.21 | 24.93 | -31.6 |

実施例９

非メチル化ＤＮＡ（ＣｐＧ　ＯＤＮ）による$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子の負荷

【０２２６】

ＤＮＡ負荷実験では、直径２５ｎｍ（Ｚ平均）、固形分５０ｍｇ／ｍＬおよびアルギニル化表面（合計２ｍｇの二酸化ケイ素）を有する４０μＬのシリカナノ粒子に、濃度１．０ｍｇ／ｍＬを有する５０μＬのＯＤＮ２３９５溶液（合計０．５ｍｇのＯＤＮ２３９５）および濃度９０ｍｇ／ｍＬを有する１０μＬの塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を添加して、等張懸濁液（０．９％　ＮａＣｌ）を得た。この場合のシリカナノ粒子の担持量は２．４４重量％である。５０μＬのこのサンプルをＤＬＳによって測定した。

【０２２７】

ＯＤＮ２３９５は、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社（フランス国）（カタログコード：ｔｌｒｌ－２３９５）から入手した。これは、構造：５’－ｔｃｇｔｃｇｔｔｔｔｃｇｇｃｇｃ：ｇｃｇｃｃｇ－３’（塩基はホスホロチオエート（ヌクレアーゼ耐性）であり、回文配列に下線が引かれている）を有する２２量体である。

表６：動的光散乱の結果

【表６】

| [mg] CPG ODN | [mg] SiO2-Arg | [mg] NaCl | [μL] 総体積 | Z平均 [nm] | PDI | ピーク [nm] | 初期ピーク [nm] | ゼータ電位 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.05 (2.44 %) | 2.0 | 9 | 100 | 23.88 | 0.083 | 20.76 | 25.19 | -28.5 |

実施例１０

エピトープの溶解度向上の例

【０２２８】

酵素によって切断されたリンカーのＮ末端部位に、極性アミノ酸の付加を使用して、ペプチド全体の溶解度を高めることができる。例えば、ＨＬＡ－Ａ：０２免疫原性ＨＰＶ１６　Ｅ７８２－９０エピトープＬＬＭＧＴＬＧＩＶ（配列番号２３３）は、極めて無極性であり、水への溶解度が非常に悪い。ヒトワクチンにおける使用は困難である。動物研究では、研究者らはそれをＤＭＳＯに溶解する。例えば皮下注射後の溶解性は疑わしい：希釈は大きなペプチド粒子の沈殿をもたらす可能性があり、これはリンパ節への輸送にとって非常に好ましくない。

本発明によれば、エピトープＬＬＭＧＴＬＧＩＶは、酵素によって切断可能なリンカーＶａｌ－Ｃｉｔおよびカチオン性可溶化配列Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－ＬｙｓによってＮ末端部位で拡大され、
ＫＫＫＶ－Ｃｉｔ－ＬＬＭＧＴＬＧＩＶが生じる。

【０２２９】

完全な合成を、自動化マイクロ波支援固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって１回の実行で行った。

【０２３０】

このペプチドは、水への溶解性に優れる。カテプシンＢによるエンドソームおよび／または細胞質ゾルの切断後、天然のＨＰＶ　１６　Ｅ７８２－９０が放出される。また、残りのＫＫＫＶ－Ｃｉｔは、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩのいずれにも提示するには短すぎるために、免疫原性ではない。

実施例１１

初代ヒトマクロファージモデル（ＴＨＰ－１）におけるヒトＴＬＲ誘導サイトカイン

【０２３１】

分化したＴＨＰ－１細胞をポリ（Ｉ：Ｃ）、$SiO_2$－Ａｒｇおよびポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇで刺激した後のサイトカインの産生を、Ｑｉａｇｅｎ社製のＭｕｌｔｉ－Ａｎａｌｙｔｅ　ＥＬＩＳＡｒｒａｙを用いて行った。ナノ粒子直径は２２．１ｎｍ（Ｚ平均）、ＰＤＩは０．０８である。

【０２３２】

すべての実験は、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ　Ｅｕｒｏｐｅ社（フランス国トゥールーズ在）製の低分子量ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＬＭＷを用いて行った。

【０２３３】

サイトカインのスクリーニングにより、サイトカインの有意な産生が示された。

【０２３４】

図８：７２時間の刺激後の異なるタイプのサイトカインのサイトカイン発現（任意単位）。

【０２３５】

ＴＮＦ－α、ＩＬ　８（ＣＸＣＬ８）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２）、ＲＡＮＴＥＳ（ＣＣＬ５）、ＩＰ－１０（ＣＸＣＬ１０）、ＭＩＧ（ＣＸＣＬ９）は、ポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇで７２時間刺激した後に高度に発現した。$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子では、

ＩＬ８（ＣＸＣＬ８）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２）、ＲＡＮＴＥＳ（ＣＣＬ５）、ＩＰ－１０（ＣＸＣＬ１０）、ＭＩＧ（ＣＸＣＬ９）の高いサイトカイン放出も認められた。

【０２３６】

図９：９６時間の刺激後の異なるタイプのサイトカインのサイトカイン発現（任意単位）

【０２３７】

ポリ（Ｉ：Ｃ）＠$SiO_2$－Ａｒｇで９６時間刺激した後、サイトカインＩＬ１－β、ＩＬ１２、ＩＬ１７Ａ、ＴＡＲＣ、ＩＦＮ－αの発現率が増加する。$SiO_2$－Ａｒｇナノ粒子では、ＩＬ８（ＣＸＣＬ８）、ＭＣＰ－１（ＣＣＬ２）、ＲＡＮＴＥＳ（ＣＣＬ５）、ＩＰ－１０（ＣＸＣＬ１０）、ＭＩＧ（ＣＸＣＬ９）の高いサイトカイン放出も認められた。

【０２３８】

ＴＬＲ３アゴニストポリ（Ｉ：Ｃ）－ＬＭＷと$SiO_2$－Ａｒｇとの組み合わせがサイトカイン放出を刺激できるかどうかを調べるために、分化したヒトマクロファージ様ＴＨＰ－１細胞を、$SiO_2$－Ａｒｇに吸着結合したポリ（Ｉ：Ｃ）－ＬＭＷ（ポリ（Ｉ：Ｃ）＠$SiO_2$－Ａｒｇ）または個々の化合物と共にインキュベートし、次いでサイトカイン特異的酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）に供した。ＴＨＰ－１細胞の上清を、いくつかの時点でインターロイキン８（ＩＬ－８）および腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）について分析した（図１０）。ＩＬ－８およびＴＮＦ－αは、自然免疫系応答の重要なメディエーターであり、様々な免疫細胞の活性を調節する。これらの２つのサイトカインの放出は、免疫系の刺激が成功したことの証明である。

【０２３９】

図１０ａおよび図１０ｂ：分化したＴＨＰ－１細胞をポリ（Ｉ：Ｃ））［１２．５μｇ／ｍｌ］、$SiO_2$－Ａｒｇ［０．５ｍｇ／ｍＬ］または新規なアジュバント（$SiO_2$－Ａｒｇ［０．５ｍｇ／ｍＬ］に結合したポリ（Ｉ：Ｃ）［１２．５μｇ／ｍｌ］）で刺激した後の異なる時点でのサイトカイン放出。

【０２４０】

図１０ａ：ＩＬ－８放出の定量化を、ＥＬＩＳＡ　ＭＡＸＴＭＤｅｌｕｘｅ　Ｓｅｔ　Ｈｕｍａｎ　ＩＬ－８（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社、米国）を使用して行った。

【０２４１】

図１０ｂ：ＴＮＦ－α放出の定量化を、ＥＬＩＳＡ　ＭＡＸＴＭＤｅｌｕｘｅ　Ｓｅｔ　Ｈｕｍａｎ　ＴＮＦ－α（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社、米国）を使用して行った。

実施例１２

マウスのインフルエンザＡモデルにおける実験

【０２４２】

ＴＬＲ３アゴニストの免疫刺激効力を決定するために、実施例６に従って調製した懸濁液を、インフルエンザＡウイルスＰＲ８／３４の５倍のＬＤ５０用量に対するその予防効果に関して、免疫刺激剤としての他の活性化合物と共にインビボ研究で試験した。

【０２４３】

以下の活性化合物を試験した：

－　プラセボ：グルコース溶液（５％）

－　遊離ポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷ：低分子量ポリ（Ｉ：Ｃ）は、シチジン酸ポリ（Ｃ）ホモポリマーの鎖にアニールされたイノシン酸ポリ（Ｉ）ホモポリマーの短い鎖を含む。グルコース溶液（５％）中のポリ（Ｉ：Ｃ）ＬＭＷの平均サイズは０．２ｋｂ～１ｋｂ（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社、フランス国）である。

－　ＺｅｌＮａｔｅ（登録商標）：Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ　ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ（バイエルＡＧ社、ドイツ国）によるウシ呼吸器病（ＢＲＤ）の予防を補助するＦＤＡ承認の免疫賦活剤

－　実施例６に従って調製したポリ（Ｉ：Ｃ）＠$SiO_2$－アルギニル化

－　５％グルコース溶液中で直径２５ｎｍの未修飾のシリコンナノ粒子

表７：各群が１０匹のマウスからなる、マウスにおける予防試験の概要
【表７】

| 群番号 | 活性化合物 | 組成物 | H1N1-用量;投与 |
|---|---|---|---|
| A | プラセボ | - | 50 $TCID_{50}$ (5x $LD_{50}$); i.n. |
| B | Zelnate（登録商標） | 100 μL | 50 $TCID_{50}$ (5x $LD_{50}$); i.n. |
| C | ポリ(I:C) (LMW) | 100μL中50μg | 50 $TCID_{50}$ (5x $LD_{50}$); i.n. |
| D | $SiO_2$ (25nm) | 2mg $SiO_2$; (未修飾) | 50 $TCID_{50}$ (5x $LD_{50}$); i.n. |
| E | ポリ(I:C)@$SiO_2$-Arg (25 nm) | 2 mg $SiO_2$-「アルギニル化」および100μL中50μgのポリ (I:C) (LMW) | 50 $TCID_{50}$ (5x $LD_{50}$); i.n. |

【０２４４】
すべての場合において、注入量は１００μＬであった。
【０２４５】
１０匹のＣ５７ＢＬ／６マウスからなる各動物群（Ａ～Ｅ）を、インフルエンザＡウイルスの皮下投与の２４時間前に、それぞれの活性化合物またはプラセボで処置した。ウイルスを鼻腔内投与した。
【０２４６】
この研究では、動物の健康のための信頼性が高く容易に測定できるマーカーとして体重を使用した。病気の動物は食べる量が少なくなり、体重が非常に急速に減少する。倫理的理由から、研究は、終了基準として、ウイルス投与日の体重に基づいて２５％の体重減少を定義した。対照的に、より古い研究からの多くの刊行物において、「終了基準」は、ウイルス性疾患による動物の死である。
【０２４７】
この研究では、「アルギニル化」表面を有するシリカナノ粒子に吸着結合した、実施例６に従って調製したポリ（Ｉ：Ｃ）の製剤は、驚くほど強い免疫刺激効果を示し、Ｅ群の動物の統計的に有意に長い生存率および有意に少ない体重減少をもたらした。
【０２４８】
同じ濃度の有効成分を有するナノ粒子（Ｃ群）に結合していない遊離ポリ（Ｉ：Ｃ）は、プラセボ群（Ａ群）と比較していかなる統計学的に有意な改善も示さない。未修飾シリカナノ粒子（群Ｄ）も統計的に有意な改善を示さなかった。
【０２４９】
上記の比較実験から、シリカナノ粒子に吸着的に結合したＴＬＲ３アゴニスト（群Ｅ）は、同じ濃度および同一の試験条件下で適用された遊離ＴＬＲ３アゴニスト（群Ｃ）よりも明らかに優れていることを示すことができた。免疫ブースターＺｅｌＮａｔｅ（登録商標）（群Ｂ）もまた、プラセボ群（群Ａ）と比較して、この研究で有意な改善を示さなかった。これは、有意な効果が観察されなかった群Ｄの未修飾シリカナノ粒子にも当てはまる（図１１ａおよび図１１ｂ）。
【０２５０】
図１２は臨床スコアを示す。データは、平均臨床スコア（最大スコア＝５；動物の死亡、実験中止）±ＳＥＭ（ｎ＝１０）として抗原刺激後の日数との関連で提示している。
実施例１３
腫瘍を含まないＡ２．ＤＲ１マウスにおけるＨＰＶ１６　Ｅ７$_{11-19}$特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫応答の生成

【０２５１】
ヒトＨＰＶ１６　Ｅ６／Ｅ７由来のＨＬＡ－Ａ２結合エピトープの免疫原性は、遺伝子改変マウスにおいてのみ研究することができる。したがって、ＨＬＡヒト化Ａ２．ＤＲ１ＢＬ６マウスを用いてインビボ研究を行った。Ａ２．ＤＲ１マウスは、ＨＬＡ－Ａ２＋／ＨＬＡ－ＤＲ１＋、Ｈ－２表現型を示すために多数の遺伝子改変を受け、ＨＬＡ－Ａ２およびＨＬＡ－ＤＲ１によって拘束される複数のエピトープに対する機能的ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を組み立てることが示されていることから、非常に洗練されたマウスモデルである（Ｐａｊｏｔ，Ａら、Ａ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｈｕｍａｎ ａｄａｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ：ＨＬＡ－Ａ２．１－／ＨＬＡ－ＤＲ１－ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｈ－２ ｃｌａｓｓＩ－／ｃｌａｓｓＩＩ－ｋｎｏｃｋｏｕｔ ｍｉｃｅ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００４，Ｖｏｌ．３４，ｐ．３０６０－３０６９）。

【０２５２】
様々な製剤の有効性を、毎週３回の皮下免疫化（０日目：プライム、７日目：ブースト、１４日目：ブースト、２１日目：脾臓サンプリング）後に高頻度の免疫原性フラグメント特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を誘導するそれらの能力を評価するために調べた。

使用物質：

－ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ：ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷの平均サイズは１．５～８ｋｂ、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ社（フランス国）

－実施例３の$SiO_2$－$PO_3H_2$

● ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－Ｅ７$_{11-19}$＋ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ@$SiO_2$－Ａｒｇの調製：

【０２５３】
２．７２ｍｇ（１．４８μｍｏｌ）のＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－Ｅ ７１１－１９を、滅菌条件下で５９２μＬのＤＮａｓｅ／ＲＮａｓｅフリー蒸留水に溶解する。溶液をボルテックス下で５０ｍｇ／ｍＬの$SiO_2$－Ａｒｇのストック溶液２．３７ｍＬ加える。２９６ｍｇの固体グルコースを加え、固体が完全に溶解するまで溶液を混合する。最後に、サンプルをボルテックスしながら、２．９６ｍＬのポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷを１．０ｍｇ／ｍＬのストック溶液として加える。ワクチンを０．４５μｍフィルターで濾過する。１．８ｍＬを各々３本の別々のバイアル（免疫ごとに１バイアル）に充填し、４℃で保存する。

【０２５４】
免疫原性フラグメントＨＰＶ１６　Ｅ７$_{11-19}$（配列番号１７４＝ＹＭＬＤＬＱＰＥＴ）のＮ末端ペプチド伸長の影響ならびにナノ粒子表面修飾の影響を調査した。ワクチン誘導性ＨＰＶ１６　Ｅ７$_{11-19}$特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を評価するために、エクスビボ再刺激脾細胞をＩＦＮ－γ細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）とそれに続くフローサイトメトリーで評価した（図１３）。

図１３：

Ｙ軸：

ＨＰＶ－００１：ＲＷ－Ｃｉｔ－Ｅ７$_{11-19}$［５０ｎｍｏｌ］＋ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ［５０μｇ］

ＨＰＶ－００２：ＲＷ－Ｃｉｔ－Ｅ７$_{11-19}$［５０ｎｍｏｌ］＋ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ［５０μｇ］@$SiO_2$－Ａｒｇ［２．２５　ｍｇ］

ＨＰＶ－００３：ＲＷ－Ｃｉｔ－Ｅ７$_{11-19}$［５０ｎｍｏｌ］＋ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ［５０μｇ］@$SiO_2$－$PO_3H_2$［２．２５　ｍｇ］

ＨＰＶ－００４：ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－Ｅ７$_{11-19}$［５０ｎｍｏｌ］＋ポリ（Ｉ：Ｃ）－ＨＭＷ［５０μｇ］@$SiO_2$－Ａｒｇ［２．２５　ｍｇ］

Ｘ軸：

ＩＦＮ－γ＋－ＣＤ８＋Ｔ細胞（マウス脾臓から採取）のパーセンテージ

【０２５５】
ゴルジ装置－輸送阻害剤の存在下でのＥ７$_{11-19}$による脾細胞のエクスビボ刺激後

のＩＦＮ－γ陽性Ｅ７$_{11-19}$特異的ＣＤ　８$^{+}$Ｔ細胞の頻度その後のＩＦＮ－γＩＣＳの後、ＩＦＮ－γ陽性Ｅ７$_{11-19}$特異的Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって決定した。データを平均＋／－ＳＥＭとして表す。各点は１匹のマウスを表す。

【０２５６】

図１３に示すように、エピトープにコンジュゲートしたナノ粒子による３つの免疫化は、遊離エピトープ注射と比較してより高い頻度で抗原特異的脾臓ＩＦＮ－γ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を誘導することができた。さらに、ナノ粒子の２つの表面修飾（ＨＰＶ－００２対ＨＰＶ－００３）の直接比較により、エピトープを$SiO_2$－Ａｒｇ（ＨＰＶ－００２）にコンジュゲートした場合により良好な性能が実証された。

【０２５７】

さらに、Ｎ末端ペプチド伸長（ＨＰＶ－００２対ＨＰＶ－００４）の影響を分析したところ、「ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－」修飾（ＨＰＶ－００４）は、エピトープ特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のより高い頻度をもたらした。

【０２５８】

この実験は、本発明によるＨＰＶ１６ワクチンが高頻度のエピトープ特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を誘導する能力を首尾よく実証した。要約すると、$SiO_2$－Ａｒｇならびに「ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－」ペプチド伸長は、$SiO_2$－$PO_3H_2$ナノ粒子および「ＲＷ－Ｃｉｔ－」ペプチド伸長よりも有益な特性を示している。したがって、両方の組み合わせを腫瘍研究における治療有効性を評価するために使用した。

実施例１４

ＰＡＰ－Ａ２－ＨＰＶ１６腫瘍モデルにおける治療有効性

【０２５９】

最終研究目標は、前駆病変または確立された癌のいずれかと診断された患者に与えられる治療用抗ＨＰＶ１６ワクチンの開発である。したがって、治療ワクチン接種実験において腫瘍増殖の制御を誘導する新規ワクチンの能力を試験した。

【０２６０】

ＰＡＰ－Ａ２－ＨＰＶ１６腫瘍モデルにおける早期治療処置研究のための免疫スケジュール（Ｋｒｕｓｅ，Ｓ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ａｇａｉｎｓｔ ＨＰＶ－ｐｏｓｉｔｉｖｅ ｔｕｍｏｒｓ ｉｎ ａ ＭＨＣ－ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ，Ｒｕｐｅｒｔｏ Ｃａｒｏｌａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，２０１９，Ｄｉｓｓｅｒｔａｔｉｏｎ；Ｋｒｕｓｅら、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｍｉｎｉｍａｌ ＨＰＶ１６ ｅｐｉｔｏｐｅｓ ｉｎ ａ ｎｏｖｅｌ ＭＨＣ－ｈｕｍａｎｉｚｅｄ，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０１９，Ｖｏｌ．８，１，ｐ．ｅ１５２４６９４）：

【０２６１】

ＨＰＶ１６　Ｅ７由来の免疫原性フラグメントとコンジュゲートした$SiO_2$－Ａｒｇの治療有効性を評価するために、ＨＬＡヒト化Ａ２．ＤＲ１　ＢＬ６マウスにおけるＨＰＶ１６　Ｅ６$^{+}$／Ｅ７$^{+}$ＰＡＰ－Ａ２腫瘍モデルを使用した。１．５・１０$^{6}$個のＰＡＰ－Ａ２細胞を皮下注射したが、これは２～３週間以内に大きな腫瘍をもたらすはずである。腫瘍接種後４日目から開始して、倫理的エンドポイント（腫瘍体積１０００ｍｍ$^{3}$）に達するまで、腫瘍担持マウスを完全ワクチンまたは対照としての個々の化合物で毎週（合計３回の免疫化、プライムブーストブースト）処置した。

【０２６２】

図１４は、「遊離抗原＋ＴＬＲアゴニスト」　として示される遊離抗原ＨＰＶ１６　Ｅ７　ＹＭＬＤＬＱＰＥＴ（配列番号１７４）＋ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＨＭＷ、高分子量）または　「ＨＰＶ１６Ｎａｎｏ」　として示される２３ｎｍの直径を有するアルギニル化シリカナノ粒子に両方とも吸着結合したＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴ＋ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＨＭＷ）のいずれかを受けたマウスの生存率を示す。

【０２６３】

図１４に示すように、両方ともアルギニル化シリカナノ粒子（ＨＰＶ１６Ｎａｎｏ）に

吸着的に結合したＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴ＋ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＨＭＷ）による腫瘍担持マウスの処置は、９匹のマウスのうち５匹で完全な腫瘍退縮（ＣＲ）をもたらし、全生存率は５５％であった。対照的に、キャリア対照（遊離抗原＋ＴＬＲ３アゴニスト）マウスの９０％は、過剰な腫瘍増殖のために排除されなければならなかった。図１５ａおよび図１５ｂは、両方の群の個々の腫瘍増殖を示す。

【０２６４】

単一化合物およびエピトープとコンジュゲートした$SiO_2$－Ａｒｇを用いた治療的ワクチン接種からの結果をまとめると、ＫＫＫＷ－Ｃｉｔ－ＹＭＬＤＬＱＰＥＴワクチン接種とコンジュゲートした三重表面アルギニル化ナノ粒子を用いて最良の治療的抗腫瘍結果が達成されたと結論付けることができる。

実施例１５

交差提示実験

ＤＣ２．４細胞における細胞内プロセシング後の$OVA_{257-264}$のＭＨＣクラスＩ交差提示

【０２６５】

免疫原性エピトープに結合した酵素による切断（Ｗ－Ｃｉｔ）部位の機能性を実証するために、マウス樹状細胞（ＤＣ２．４細胞、不死化マウス樹状細胞）におけるモデル抗原$OVA_{257-264}$（＝アミノ酸の一文字表記でＳＩＩＮＦＥＫＬ）の交差提示に関する実験を行った。したがって、ナノ粒子を含むまたは含まない様々なＯＶＡ由来構築物とのインキュベーション後のＭＨＣクラスＩ上のＳＩＩＮＦＥＫＬの発現を、ＭＨＣクラスＩ上に提示された天然のエピトープの抗体（２５－Ｄ１．１６、ＳＩＩＮＦＥＫＬ抗体に結合したＰＥ／Ｃｙ７抗マウスＨ－２Ｋｂ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．社、米国）特異的検出によって決定した。ＭＨＣクラスＩに結合していない遊離の、ＭＨＣ　Ｉ結合エピトープまたはＭＨＣクラスＩ上の伸長／修飾もしくは他のエピトープは、ＭＨＣクラスＩ分子Ｈ－２Ｋｂ上に提示されるＳＩＩＮＦＥＫＬに対して高度に選択的である抗体によって認識されない。

【０２６６】

実験では、それぞれナノ粒子の有無で、全長タンパク質（ＯＶＡ＝オボアルブミン）、Ｎ末端およびＣ末端伸長エピトープ（$OVA_{247-264}A_5K$、いわゆる合成ロングペプチド（ＳＬＰ））、カテプシンＢ切断可能配列を有するＮ末端伸長エピトープ（例示的に示されるＲＷ－Ｃｉｔ－$OVA_{257-264}$）または天然のエピトープ（$OVA_{257-264}$）の５μＭ溶液と５・$10^4$　個のＤＣ２．４細胞のインキュベーション後の$OVA_{257-264}$提示有効性を比較した。平均直径２５ｎｍ（他の実験で使用した$SiO_2$－Ａｒｇに匹敵するサイズ）の表面リン酸化シリカナノ粒子（$SiO_2$－$PO_3H_2$）を担体として使用した。６時間のインキュベーション時間後、試験物質をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄することによって除去した。次のステップでは、細胞のＦｃ（フラグメント、結晶性）受容体への検出抗体の非特異的結合を遮断するために、細胞をＣＤ１６／ＣＤ３２抗体とインキュベートした。２５－Ｄ１．１６抗体とのインキュベーション後、交差提示$OVA_{257-264}$の量をフローサイトメトリーによって定量化した。

【０２６７】

図１６：Ｈ２－Ｋｂ陽性細胞を、$SiO_2$－$PO_3H_2$の有無で、天然のもしくは伸長$OVA_{257-264}$エピトープまたは全長ＯＶＡタンパク質の５μＭ溶液と６時間インキュベートした後の$OVA_{257-264}$ＭＨＣクラスＩ提示。２５－Ｄ１．１６検出抗体で標識した後、フローサイトメトリーによって定量化を行った。

【０２６８】

図１６に示すように、天然のエピトープおよび酵素による切断部位を有する伸長エピトープのみがＭＨＣ上に有意な量で提示される。ナノ粒子に吸着的に結合したペプチドとのインキュベーションによって、提示されたエピトープの取り込み、ひいてはその量をわずかに増加させることができる。天然のエピトープは、必ずしも細胞内に内在化される必要はないが、ＭＨＣ分子上に外因的に負荷され得るので、Ｎ末端伸長エピトープは、天然配

列を放出するために内在化されなければならない。細胞をＲＷ－Ｃｉｔ－ＯＶＡ$_{257-264}$とインキュベートした後のＭＨＣクラスＩ上の天然のエピトープの検出は、酵素による切断部位の機能性の証拠を裏付けるものである。

実施例１６

ヒト血清中の安定性測定

【０２６９】

ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞は、ＮＦ－ｋＢの活性化を監視することによってヒトＴＬＲ３の刺激を測定するように設計されている。ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞は、ｈＴＬＲ３遺伝子と、ＮＦ－ｋＢおよびＡＰ－１誘導性プロモーターの制御下に置かれた最適化分泌胚性アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）レポーター遺伝子とをＨＥＫ２９３細胞に共トランスフェクションすることによって得た。ＴＬＲ３リガンドによる刺激は、ＳＥＡＰの産生を誘導するＮＦ－ｋＢおよびＡＰ－１を活性化する。ＳＥＡＰのレベルは、ＳＥＡＰのリアルタイム検出を可能にする細胞培養培地であるＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）検出を用いて容易に決定することができる。ＳＥＡＰによる基質の加水分解は、肉眼で容易に検出することができるか、または９６ウェルプレートリーダー（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｈｅｋ－ｂｌｕｅ－ｈｔｌｒ３を参照）で測定することができる紫／青色を生じる。

【０２７０】

ポリ（Ｉ：Ｃ）およびポリ（Ｉ：Ｃ）@ＳｉＯ$_2$－Ａｒｇを３７℃で６０分間ヒト血清（ＨＳ）に曝露した。血清は５、１０および２０％の濃度で使用した。２０％の血清濃度は、末梢リンパの組成に非常によく対応する。

【０２７１】

ポリ（Ｉ：Ｃ）およびポリ（Ｉ：Ｃ）@ＳｉＯ$_2$－Ａｒｇを別々にヒト血清に加えて、１ｍＬ当たり１μｇのポリ（Ｉ：Ｃ）の濃度を得た。ポリ（Ｉ：Ｃ）@ＳｉＯ$_2$－Ａｒｇの場合、ＳｉＯ$_2$濃度は４０μｇ／ｍＬであった。この場合のＳｉＯ$_2$－Ａｒｇにおけるポリ（Ｉ：Ｃ）ペイロードは約２．５％であった。ＨＳに曝露した後、２０μＬの培地を取り、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）検出培地中の１８０μＬのＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞に加えた。この混合物を３７℃で１３時間インキュベートし、プレートを９６ウェルプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ　Ｒｅａｄｅｒ社、型式：Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ２００　Ｐｒｏ）で分析した。

【０２７２】

結果を図１７に示す。

【０２７３】

２０％ヒト血清中の遊離ポリ（Ｉ：Ｃ）の計算された半減期は、選択された条件下で２４．２分（６０分後の初期濃度の１８％）である。半減期計算：

$t_{1/2}$＝ｌｎ　２／（ｌｎ　１００／ｌｎ　１８）＊６０　［分］

【０２７４】

同じ条件下でのポリ（Ｉ：Ｃ）@ＳｉＯ$_2$－Ａｒｇの半減期は、３９５分（６０分後の初期濃度の９０％）と計算される。

$t_{1/2}$＝ｌｎ　２／（ｌｎ　１００／ｌｎ　９０）＊６０　［分］

【０２７５】

したがって、ポリ（Ｉ：Ｃ）のアルギニル化シリカナノ粒子への結合は、半減期を１６倍増加させる（＝３９５／２４．２）。

実施例１７

ウシ血清中の安定性測定

【０２７６】

ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞は、ＮＦ－ｋＢの活性化を監視することによってヒトＴＬＲ３によるヒトＴＬＲ３の刺激を測定するように設計されている。ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞は、ｈＴＬＲ３遺伝子と、ＮＦ－ｋＢおよびＡＰ－１誘導性プロモーターの制御下に置かれた最適化分泌胚性アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ

）レポーター遺伝子とをＨＥＫ２９３細胞に共トランスフェクションすることによって得た。ＴＬＲ３リガンドによる刺激は、ＳＥＡＰの産生を誘導するＮＦ－ｋＢおよびＡＰ－１を活性化する。ＳＥＡＰのレベルは、ＳＥＡＰのリアルタイム検出を可能にする細胞培養培地であるＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）検出を用いて容易に決定することができる。ＳＥＡＰによる基質の加水分解は、肉眼で容易に検出することができるか、または９６ウェルプレートリーダー（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社）で測定することができる紫／青色を生じる。

【０２７７】

ポリ（Ｉ：Ｃ）およびポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇを、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）に３７℃で６０分間曝露した。血清は５、１０および２０％の濃度で使用した。２０％の血清濃度は、末梢リンパの組成に非常によく対応する。

【０２７８】

ポリ（Ｉ：Ｃ）およびポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇを別々にウシ血清に加えて、１ｍＬ当たり１μｇのポリ（Ｉ：Ｃ）の濃度を得た。ポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇの場合、$SiO_2$濃度は４０μｇ／ｍＬであった。この場合の$SiO_2$－Ａｒｇにおけるポリ（Ｉ：Ｃ）ペイロードは約２．５％であった。ＦＢＳに曝露した後、２０μＬの培地を取り、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）検出培地中の１８０μＬのＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ３細胞に加えた。この混合物を３７℃で１３時間インキュベートし、プレートを９６ウェルプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ　Ｒｅａｄｅｒ社、型式：Ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ２００　Ｐｒｏ）で分析した。

結果を図１８に確認することができる。

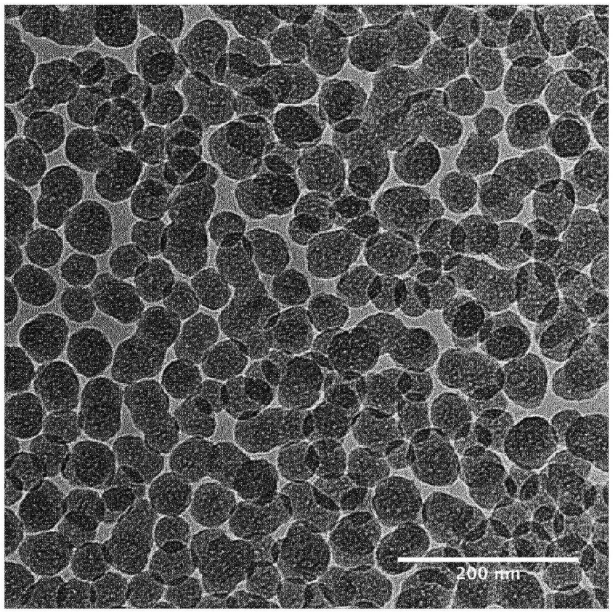
【０２７９】

遊離ポリ（Ｉ：Ｃ）は、より高い血清濃度で分解の明確な徴候を示すが、ポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇは、著しく高い安定性を示す。ポリ（Ｉ：Ｃ）@$SiO_2$－Ａｒｇの半減期計算は、非常に低い崩壊速度のために役に立たない。

【図面】

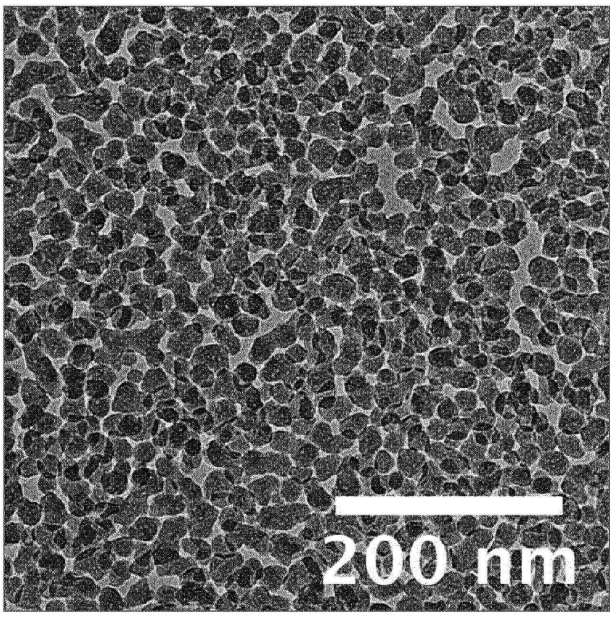
【図１－１】

Figure 1a



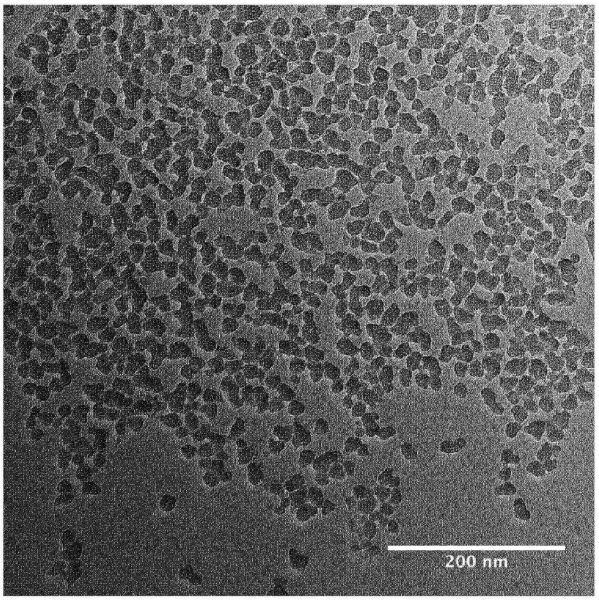

【図１－２】

Figure 1b



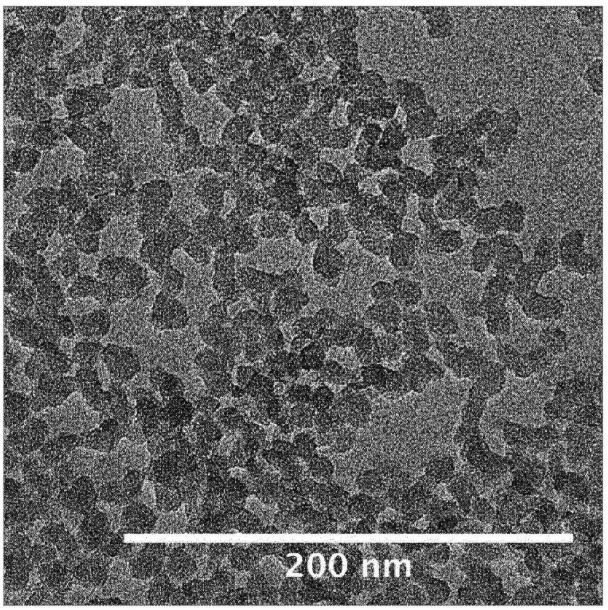
【図１－３】

Figure 1c



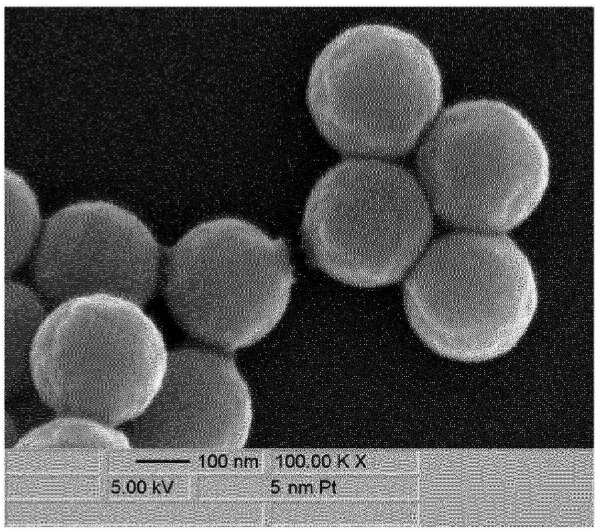

【図１－４】

Figure 1d



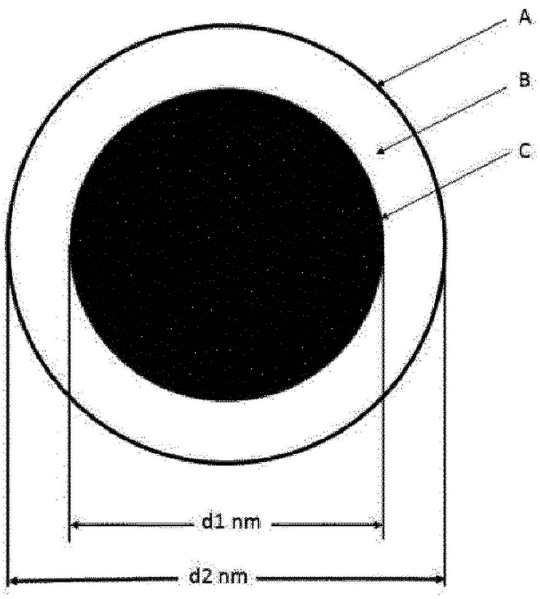

【図２】

Figure 2




【図３】

Figure 3



【図４】

Figure 4a

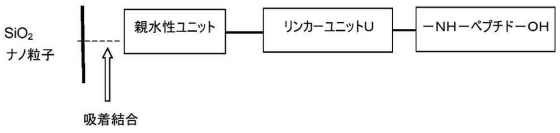
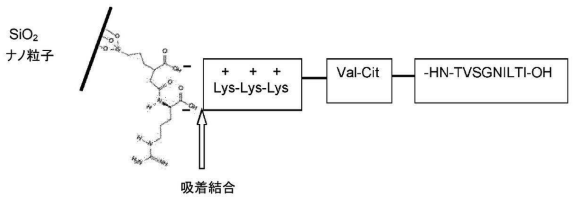



Figure 4b




【図５】

Figure 5a

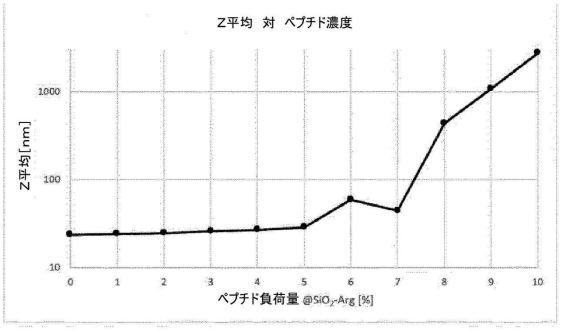
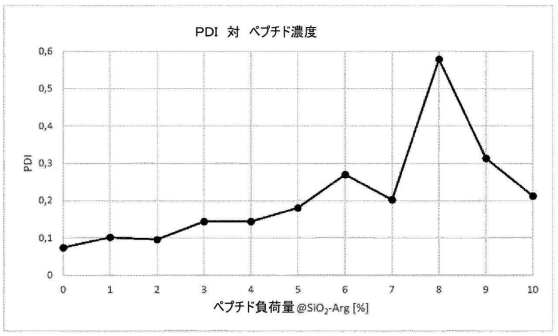



Figure 5b




【図６】

Figure 6a

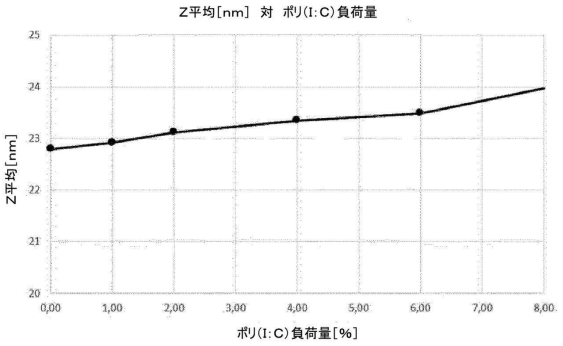
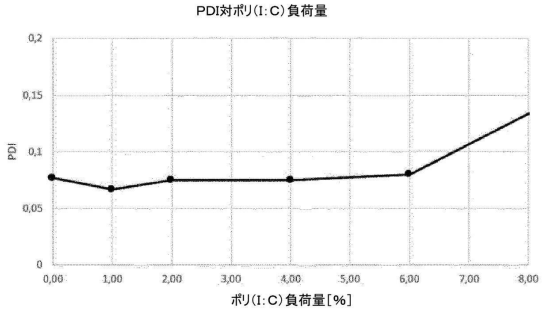



Figure 6b




【図７－１】

Figure 7a

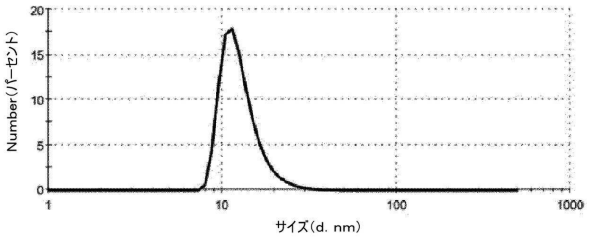
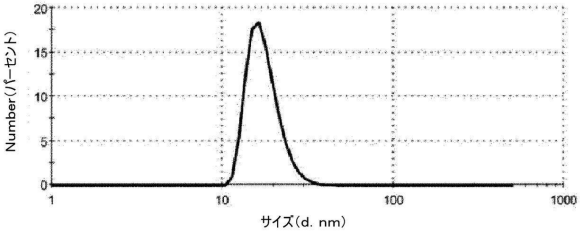



Figure 7b



【図７－２】

Figure 7c

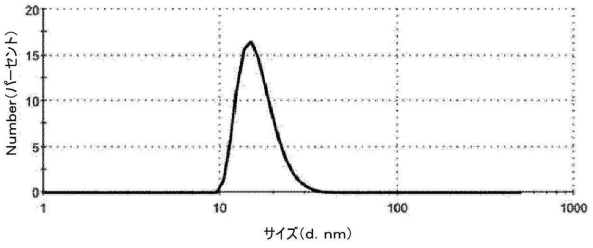
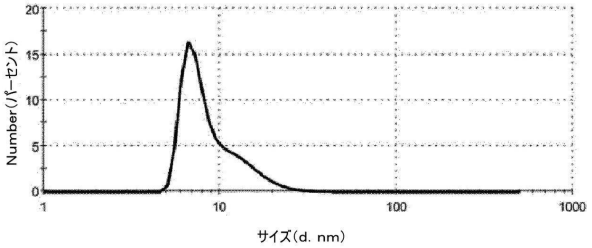
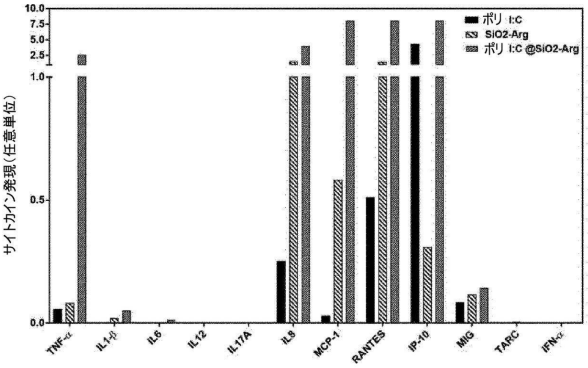



Figure 7d



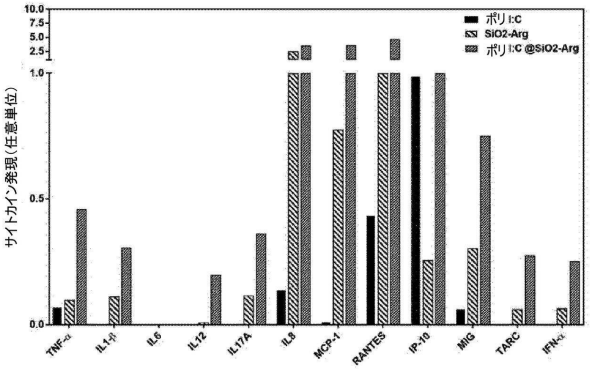

【図８】

Figure 8




【図９】

Figure 9




【図１０】

Figure 10a

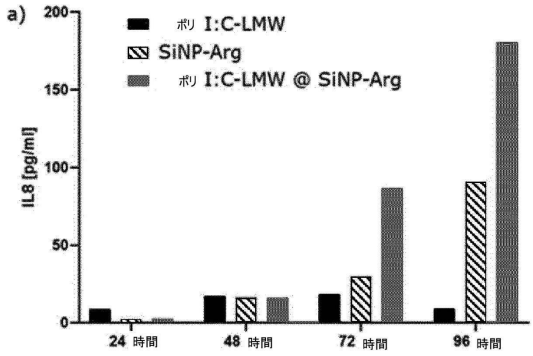
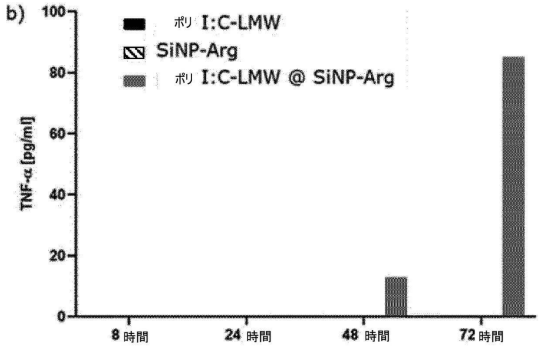
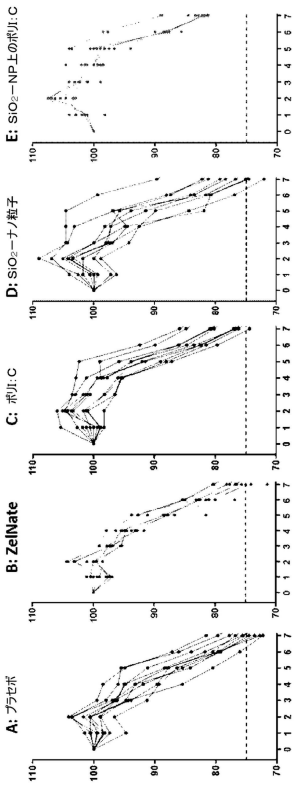



Figure 10b



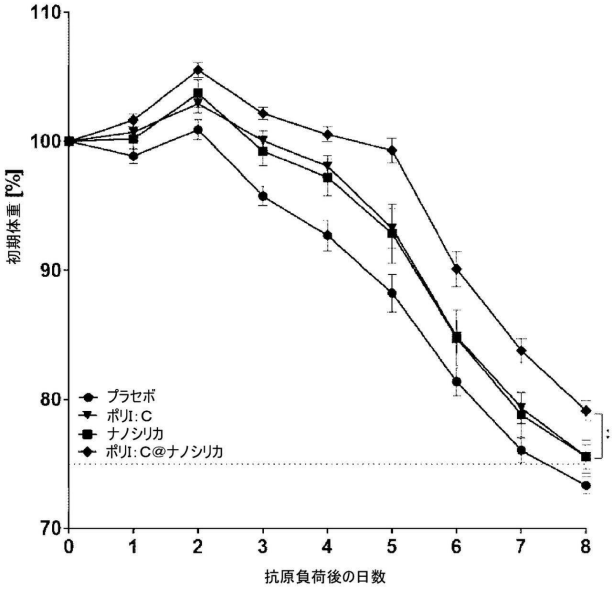
【図１１－１】

Figure 11a



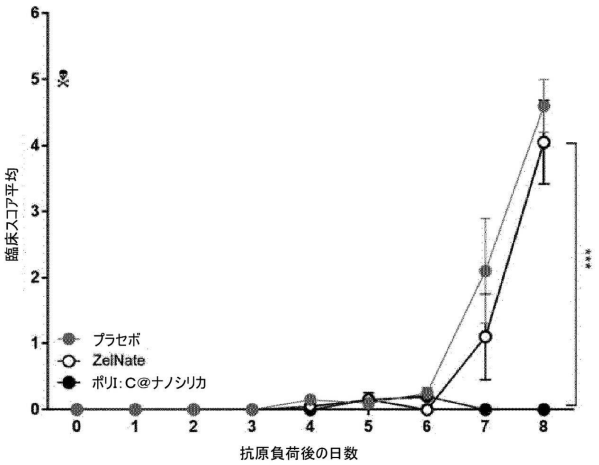

【図１１－２】

Figure 11b



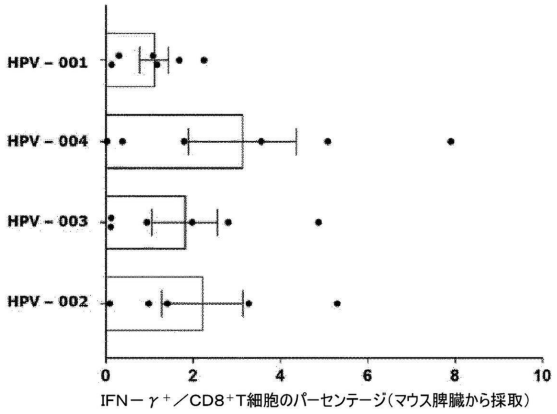

【図１２】

Figure 12



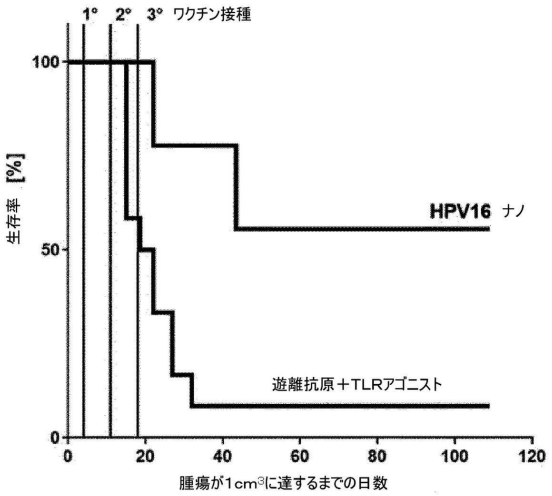

【図１３】

Figure 13



【図１４】

Figure 14




【図１５】

Figure 15a

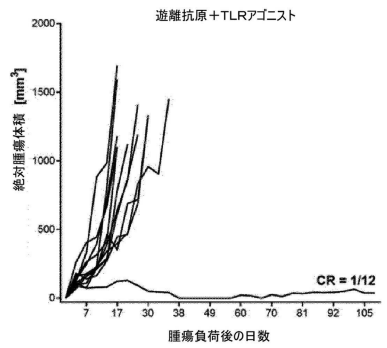
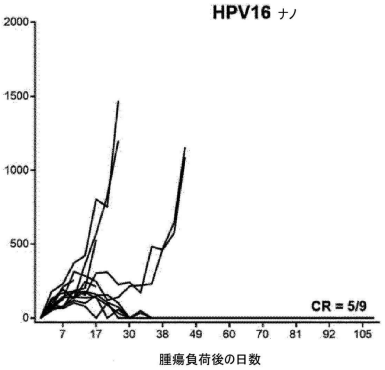
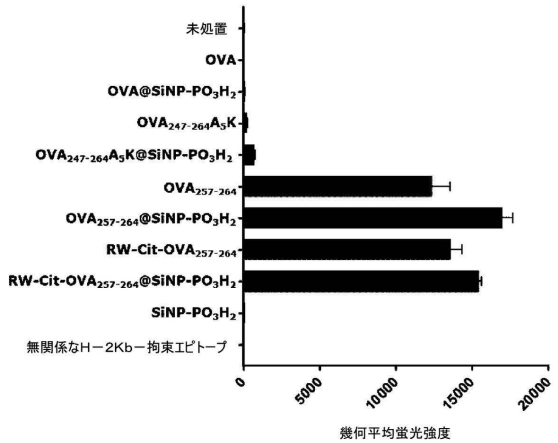



Figure 15b



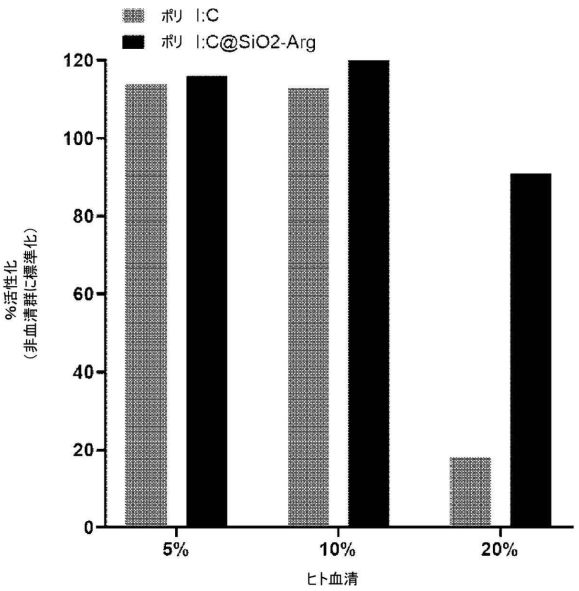

【図１６】

Figure 16



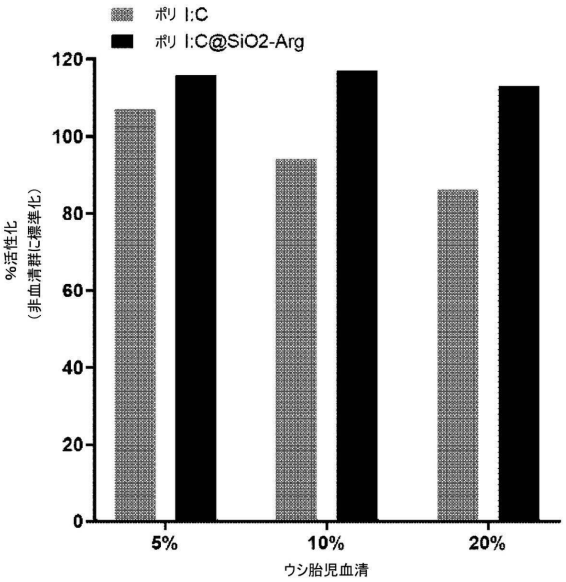

【図１７】

Figure 17



【図１８】

Figure 18




【配列表】

2023529065000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062748

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/69 A61P35/00 A61K39/12 A61K39/00 A61K39/385
ADD.

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)
A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | US 2016/090603 A1 (CARNES ERIC CHRISTOPHER [US] ET AL) 31 March 2016 (2016-03-31)<br>figure 1B<br>example 4; tables 2,3<br>-----<br>-/-- | 1-15 |

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 1 July 2021 | 12/07/2021 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Dullaart, Anwyn |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062748

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | SEONG SOO A. AN ET AL: "Analysis of SiO2 nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol. 9, no. Suppl.2, 15 December 2014 (2014-12-15), pages 207-215, XP055749347, ISSN: 1176-9114, DOI: 10.2147/IJN.S58203 abstract page 208, right-hand column tables 1-3 figures 1-2 page 214, left-hand column, paragraph Conclusion | 1-15 |
| Y | DE 10 2011 018499 A1 (EMC MICROCOLLECTIONS GMBH [DE]) 25 October 2012 (2012-10-25) examples figures | 1-15 |
| Y | WO 2019/097226 A1 (N4 PHARMA UK LTD [GB]) 23 May 2019 (2019-05-23) examples 2-3 | 1-15 |
| Y | ES 2 366 841 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; UNIV VALENCIA POLITECNICA ET AL.) 26 October 2011 (2011-10-26) figure 1; examples | 1-15 |
| Y | WO 2006/017476 A2 (UNIV NEW YORK STATE RES FOUND [US]; PRASAD PARAS N [US] ET AL.) 16 February 2006 (2006-02-16) examples figures | 1-15 |
| Y | SHAKIBA SHAHABI ET AL: "Utilizing the protein corona around silica nanoparticles for dual drug loading and release", NANOSCALE, vol. 7, no. 39, 2015, pages 16251-16265, XP055749759, ISSN: 2040-3364, DOI: 10.1039/C5NR04726A abstract figures; table 1 page 16264, left-hand column, paragraph Conclusions | 1-15 |
| Y | WO 00/56288 A1 (INST NEUE MAT GEMEIN GMBH [DE] ET AL.) 28 September 2000 (2000-09-28) examples claims | 1-15 |

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062748

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CHRISTINA GRAF ET AL: "Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells", LANGMUIR, vol. 28, no. 20, 22 May 2012 (2012-05-22), pages 7598-7613, XP055749340, ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la204913t abstract figures; tables | 1-15 |
| Y | WANG HANQI ET AL: "Amino acid-based anti-fouling functionalization of silica nanoparticles using divinyl sulfone", ACTA BIOMATERIALIA, vol. 40, 23 March 2016 (2016-03-23), pages 273-281, XP029652904, ISSN: 1742-7061, DOI: 10.1016/J.ACTBIO.2016.03.035 abstract page 276 figures; tables | 1-15 |
| Y | AMARIA ET AL: "Coating of L-Arginine Modified Silica on Magnetite through Two Different Sol-Gel Routes", INDONESIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 17, no. 2, April 2017 (2017-04), pages 256-263, XP055749820, ISSN: 1411-9420, DOI: 10.22146/ijc.22521 abstract figures; tables page 261, right-hand column | 1-15 |
| Y | SEONG SOO A. AN ET AL: "Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, December 2014 (2014-12), page 29, XP055261799, DOI: 10.2147/IJN.S57922 abstract figure 6 | 1-15 |
| Y | WO 2017/223085 A2 (UNIV MICHIGAN REGENTS [US]) 28 December 2017 (2017-12-28) examples | 1-15 |

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062748

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | DAFTARIAN PIROUZ M ET AL: "Rejection of large HPV-16 expressing tumors in aged mice by a single immunization of VacciMax encapsulated CTL/T helper peptides", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 5, no. 1, 7 June 2007 (2007-06-07), pages 26-1-26-9, XP021030172, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-5-26 abstract page 2 page 6, paragraph Discussion - page 7 figures | 1-15 |
| Y | JUNKO MATSUZAKI ET AL: "Recognition of naturally processed and ovarian cancer reactive CD8+ T cell epitopes within a promiscuous HLA class II T-helper region of NY-ESO-1", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 57, no. 8, 6 February 2008 (2008-02-06), pages 1185-1195, XP019624374, ISSN: 1432-0851 abstract figures page 1192, right-hand column - page 1194 | 1-15 |
| Y | ANGELIKA B. RIEMER ET AL: "A Conserved E7-derived Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Expressed on Human Papillomavirus 16-transformed HLA-A2 + Epithelial Cancers", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 38, 17 September 2010 (2010-09-17), pages 29608-29622, XP055207597, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.126722 abstract figures; tables | 1-15 |
| Y | TSANG KWONG Y ET AL: "Identification and characterization of enhancer agonist human cytotoxic T-cell epitopes of the human papillomavirus type 16 (HPV16) E6/E7", VACCINE, vol. 35, no. 19, 4 April 2017 (2017-04-04) , pages 2605-2611, XP029971906, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2017.03.025 abstract figure 1; tables page 2608, paragraph Discussion - page 2610 | 1-15 |

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062748

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | XU M ET AL: "Ii-Key/HPV16 E7 hybrid peptide immunotherapy for HPV16+ cancers", VACCINE, vol. 27, no. 34, 23 July 2009 (2009-07-23), pages 4641-4647, XP026266831, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.05.054 [retrieved on 2009-06-09] abstract figures; table 1 page 4644, paragraph Discussion - page 4646 ----- | 1-15 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/062748

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] 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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/062748

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| US 2016090603 A1 | 31-03-2016 | US 2016090603 A1 | 31-03-2016 |
| | | US 2018028686 A1 | 01-02-2018 |
| | | US 2018049984 A1 | 22-02-2018 |
| | | WO 2016054225 A1 | 07-04-2016 |
| DE 102011018499 A1 | 25-10-2012 | DE 102011018499 A1 | 25-10-2012 |
| | | EP 2701740 A1 | 05-03-2014 |
| | | WO 2012146364 A1 | 01-11-2012 |
| WO 2019097226 A1 | 23-05-2019 | AU 2018366384 A1 | 04-06-2020 |
| | | CA 3082682 A1 | 23-05-2019 |
| | | CN 111601771 A | 28-08-2020 |
| | | EP 3710404 A1 | 23-09-2020 |
| | | JP 2021509393 A | 25-03-2021 |
| | | US 2020392005 A1 | 17-12-2020 |
| | | WO 2019097226 A1 | 23-05-2019 |
| ES 2366841 A1 | 26-10-2011 | ES 2366841 A1 | 26-10-2011 |
| | | WO 2011124739 A1 | 13-10-2011 |
| WO 2006017476 A2 | 16-02-2006 | US 2006088599 A1 | 27-04-2006 |
| | | WO 2006017476 A2 | 16-02-2006 |
| WO 0056288 A1 | 28-09-2000 | AT 297716 T | 15-07-2005 |
| | | DE 19912502 A1 | 21-09-2000 |
| | | EP 1162955 A1 | 19-12-2001 |
| | | WO 0056288 A1 | 28-09-2000 |
| WO 2017223085 A2 | 28-12-2017 | CA 3028721 A1 | 28-12-2017 |
| | | EP 3471778 A2 | 24-04-2019 |
| | | US 2021106538 A1 | 15-04-2021 |
| | | WO 2017223085 A2 | 28-12-2017 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｐ* | *37/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/04 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *47/56* | *(2017.01)* | Ａ６１Ｋ | 47/56 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *39/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 39/00 | Ｇ | |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *15/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 15/00 | | |
| *Ｃ０７Ｋ* | *14/025* | *(2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 14/025 | ＺＮＡ | |

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,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

弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　リーマー， アンゲーリカ
ドイツ国 ６９１２０ ハイデルベルク， イム ノイエンハイマー フェルト ２８０， ドイチェス クレープスフォアシュングスツェントルム シュティフトゥング デス エッフェントリッヒェン レヒテス 気付
(72)発明者　キューベルベック， アルミン
ドイツ国 ５３１７５ ボン， ルートヴィヒ－エアハルト－アレー ２， ライフ サイエンス インクバトーア ベトリープス ゲーエムベーハー ウント コンパニー カーゲー 気付
(72)発明者　グラボウスカ， アグニエシュカ
ドイツ国 ５３１７５ ボン， ルートヴィヒ－エアハルト－アレー ２， ライフ サイエンス インクバトーア ベトリープス ゲーエムベーハー ウント コンパニー カーゲー 気付
(72)発明者　クルーゼ， ゼバスティアン
ドイツ国 ６９１２０ ハイデルベルク， イム ノイエンハイマー フェルト ２８０， ドイチェス クレープスフォアシュングスツェントルム シュティフトゥング デス エッフェントリッヒェン レヒテス 気付
(72)発明者　ファイト， エーファ
ドイツ国 ５３１７５ ボン， ルートヴィヒ－エアハルト－アレー ２， ライフ サイエンス インクバトーア ベトリープス ゲーエムベーハー ウント コンパニー カーゲー 気付
(72)発明者　ユングラース， エレン
ドイツ国 ５３１７５ ボン， ルートヴィヒ－エアハルト－アレー ２， ライフ サイエンス インクバトーア ベトリープス ゲーエムベーハー ウント コンパニー カーゲー 気付

Ｆターム（参考）　4C076　AA31 BB11 CC17 CC27 CC35 DD29 EE59
4C085　AA03 BA51 CC08 CC21 EE01 GG01
4H045　AA10 AA30 CA01 DA86 EA31