(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-535405
(P2023-535405A)
(43)公表日　令和5年8月17日(2023.8.17)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*31/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/16	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*31/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20	
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全69頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-504251(P2023-504251)
(86)(22)出願日　令和3年7月22日(2021.7.22)
(85)翻訳文提出日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/042684
(87)国際公開番号　WO2022/020542
(87)国際公開日　令和4年1月27日(2022.1.27)
(31)優先権主張番号　63/055,165
(32)優先日　令和2年7月22日(2020.7.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/060,503
(32)優先日　令和2年8月3日(2020.8.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/108,980
最終頁に続く

(71)出願人　511248249
ユニバーシティー オブ ヒューストン システム
アメリカ合衆国 ７７２０４ テキサス州 ヒューストン カルフーン ロード ４８００
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100126985
弁理士　中村 充利
(72)発明者　バラダラジャン，ナビン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　呼吸器疾患に関連する状態の処置および防止

(57)【要約】
動物（例えば、対象）における状態などの病原体の防止のための組成物および方法が本明細書に記載される。一部の場合において、本明細書に記載される組成物または方法は、１種またはそれより多くのＳＴＩＮＧアゴニストをカプセル化するのに使用できるリポソームを含んでいてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物または方法のリポソームは、リポソームのリポソーム膜に付着した、それに組み込まれた、またはそれと会合する１種またはそれより多くの抗原を含んでいてもよい。
【選択図】図１

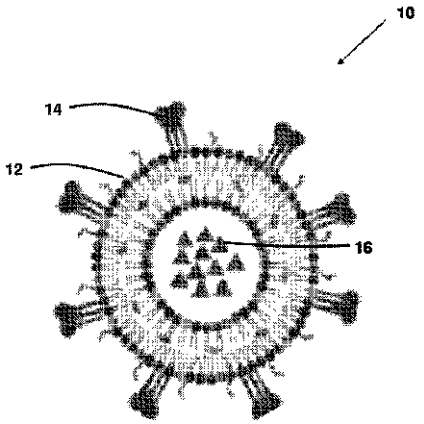


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
動物における疾患を防止することにおける使用のための組成物であって、
抗原および調節因子を含む脂質ベースの粒子
を含み、
該調節因子は、パターン認識受容体アゴニストである、上記組成物。
【請求項２】
対象における疾患を処置することにおける使用のための組成物であって、
抗原および調節因子を含む脂質ベースの粒子
を含み、
該調節因子は、パターン認識受容体アゴニストである、上記組成物。
【請求項３】
前記脂質ベースの粒子が、リポソームである、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記脂質ベースの粒子が、ＤＰＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））、ＤＰＰＥ（１，２－ビス（ジフェニルホスフィノ）エタン）、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］）、コレステロール、またはそれらの組合せを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
前記脂質ベースの粒子が、ＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記脂質ベースの粒子が、前記ＤＰＰＣ、前記ＤＰＰＧ、前記コレステロール、および前記ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００を、それぞれ１０：１：１：１の比率で含む、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記抗原が、前記脂質ベースの粒子の外部表面と会合している、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記抗原の少なくとも一部が、前記脂質ベースの粒子の膜に統合されている、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記抗原の少なくとも一部が、前記脂質ベースの粒子内にカプセル化されている、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記抗原が、前記疾患に対する免疫応答を惹起する、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記抗原が、スパイクタンパク質またはその一部を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記抗原が、ヌクレオカプシドタンパク質またはその一部を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記調節因子が、前記対象におけるインターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路を活性化または阻害することが可能である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１４】
前記調節因子が、前記ＳＴＩＮＧ経路のアゴニストである、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記疾患が、病原体によって引き起こされる感染を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６】
前記病原体が、呼吸器病原体である、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記呼吸器病原体が、ウイルスである、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記ウイルスが、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、呼吸系発疹ウイルス、ライノウイルス、ＤＮＡウイルス、ＲＮＡウイルス、またはそれらの組合せから選択される、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
前記インフルエンザウイルスが、インフルエンザＡウイルスまたはインフルエンザＢウイルスである、請求項１８に記載の組成物。
【請求項２０】
前記疾患が、呼吸器疾患である、請求項１～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１】
前記疾患が、がんを含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２】
静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹膜内投与、皮下投与、スプレーベースの投与、エアロゾルベースの投与、胚内投与、経口投与、眼球内投与、気管内投与、鼻腔内投与、吸入による投与、またはそれらの組合せからなる群から選択される投与様式に好適である、請求項１～２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】
凍結乾燥されている、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２４】
単独療法剤としての単位用量配合物の形態で製剤化される、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
対象において前記疾患に対する免疫性を発生させるために好適である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６】
前記対象において前記疾患に対する自然免疫応答を惹起する、請求項１～２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
前記自然免疫応答が、インターフェロン制御因子（ＩＲＦ）の活性化をもたらす、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記自然免疫応答が、核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化をもたらす、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２９】
請求項１～２８のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患を防止する方法。
【請求項３０】
請求項１～２８のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患を処置する方法。

【請求項３１】
前記組成物が、前記対象において前記疾患に対する免疫性を発生させるために好適である、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記組成物を前記対象に投与することが、前記対象において前記疾患に対する免疫応答を惹起する、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記組成物を投与することが、前記対象において前記疾患に対する自然免疫応答を惹起する、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記自然免疫応答が、前記対象においてインターフェロン制御因子（ＩＲＦ）の活性化をもたらす、請求項２９～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記自然免疫応答が、核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化をもたらす、請求項２９～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記自然免疫応答が、Ｉ型およびＩＩＩ型インターフェロンの合成および分泌ならびにそれに続くＩＦＮ刺激遺伝子（ＩＳＧ）の上方制御をもたらす、請求項２９～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記自然免疫応答が、関連する適応免疫をもたらす、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記疾患が、病原体によって引き起こされる、請求項２９～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記病原体が、呼吸器病原体である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記呼吸器病原体が、ウイルスである、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記ウイルスが、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳｒ－ＣｏＶ）、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）、ヒトコロナウイルスＮＬ６３（ＨＣｏＶ－ＮＬ６３）、ヒトコロナウイルスＯＣ４３（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１（ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の変異体、またはそれらの組合せから選択される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記組成物が、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹膜内投与、皮下投与、スプレーベースの投与、エアロゾルベースの投与、胚内投与、経口投与、眼球内投与、気管内投与、鼻腔内投与、吸入による投与、またはそれらの組合せによって対象に投与される、請求項２９～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記組成物が、単回用量で前記対象に投与される、請求項２９～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記組成物が、少なくとも２つの用量で前記対象に投与され、該少なくとも２つの用量の第１の用量および第２の用量は、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも２日、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも７日、少なくとも１４日、または少なくとも

２８日の間隔で投与される、請求項２９～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記対象が、哺乳動物である、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記対象における前記疾患の定着を防止するのに使用される、請求項２９または請求項３１～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記対象における前記疾患の進行を防止するのに使用される、請求項２９または請求項３１～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
第２の対象への疾患の伝染を防止するのに使用される、請求項２９または請求項３１～４７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府による資金提供を受けた研究に関する陳述
[0001]本発明は、国立衛生研究所によって付与されたＵ０１ＡＩ１４８１１８に基づく政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。
【０００２】
関連出願の相互参照
[0002]本出願は、２０２０年７月２２日付けで出願された米国仮特許出願第６３／０５５，１６５号；２０２０年８月３日付けで出願された米国仮特許出願第６３／０６０，５０３号；および２０２０年１１月３日付けで出願された米国仮特許出願第６３／１０８，９８０号の利益を主張する。前述の出願のそれぞれの全体は、参照により本明細書に組み入れられる。
【背景技術】
【０００３】
[0003]様々な疾患、例えば病原体によって引き起こされる感染や様々な種類のがんを処置するための安全で長持ちする防止および治療用組成物が緊急に求められている。本発明の開示の多数の実施態様は、前述の必要性に取り組むものである。
【発明の概要】
【０００４】
[0004]様々な形態において、動物における疾患を防止することにおける使用のための組成物は、抗原および調節因子を含む脂質ベースの粒子を含み、該調節因子は、パターン認識受容体アゴニストである。様々な形態において、対象における疾患を処置することにおける使用のための組成物は、抗原および調節因子を含む脂質ベースの粒子を含み、該調節因子は、パターン認識受容体アゴニストである。一部の場合において、脂質ベースの粒子は、リポソームである。一部の場合において、脂質ベースの粒子は、ＤＰＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））、ＤＰＰＥ（１，２－ビス（ジフェニルホスフィノ）エタン）、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］）、コレステロール、またはそれらの組合せを含む。一部の場合において、脂質ベースの粒子は、ＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００を含む。一部の場合において、脂質ベースの粒子は、ＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００を、それぞれ１０：１：１：１の比率で含む。一部の場合において、抗原は、脂質ベースの粒子の外部表面と会合している。一部の場合において、抗原は、脂質ベースの粒子の外部表面に共有結合または非共有結合で結合している。一部の場合において、抗原の少なくとも一部は、脂質ベースの粒子の膜に統合されている。一部の場合において、抗原の少なくとも一部は、脂質ベ

ースの粒子内にカプセル化されている。一部の場合において、抗原は、疾患に対する免疫応答を惹起する。一部の場合において、抗原は、弱毒化した病原体またはその一部を含む。一部の場合において、抗原は、致死させた病原体またはその一部を含む。一部の場合において、抗原は、病原体のペプチドまたはタンパク質を含む。一部の場合において、抗原は、スパイクタンパク質またはその一部を含む。一部の場合において、抗原は、ヌクレオカプシドタンパク質またはその一部を含む。一部の場合において、抗原は、キメラタンパク質を含む。一部の場合において、抗原は、三量体である。一部の場合において、抗原は、腫瘍細胞の弱毒化した、または致死させたバージョンを含む。一部の場合において、腫瘍細胞は、がんに関連している。一部の場合において、抗原は、がん細胞に関連するペプチドまたはタンパク質を含む。一部の場合において、調節因子は、対象におけるインターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路を活性化または阻害することが可能である。一部の場合において、調節因子は、ＳＴＩＮＧ経路のアゴニストである。一部の場合において、調節因子は、ビス（３’，５’）環状二量体グアノシン一リン酸（ｃ－ジ－ＧＭＰ）、環状グアノシン一リン酸－アデノシン一リン酸（ｃＧＡＭＰ）、アミドベンズイミダゾール、アミドベンズイミダゾールの誘導体、ヌクレオチド調節因子、プラスミドＤＮＡ調節因子またはそれらの組合せからなる群から選択される。一部の場合において、調節因子は、ＳＴＩＮＧ経路のアンタゴニストである。一部の場合において、疾患は、病原体によって引き起こされる感染を含む。一部の場合において、病原体は、呼吸器病原体である。一部の場合において、呼吸器病原体は、ウイルスである。一部の場合において、ウイルスは、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、呼吸系発疹ウイルス、ライノウイルス、ＤＮＡウイルス、ＲＮＡウイルス、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、インフルエンザウイルスは、インフルエンザＡウイルスまたはインフルエンザＢウイルスである。一部の場合において、ウイルスは、呼吸系発疹ウイルスである。一部の場合において、ウイルスは、コロナウイルスである。一部の場合において、コロナウイルスは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳｒ－ＣｏＶ）、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）、ヒトコロナウイルスＮＬ６３（ＨＣｏＶ－ＮＬ６３）、ヒトコロナウイルスＯＣ４３（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１（ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の変異体、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、疾患は、呼吸器疾患である。一部の場合において、疾患は、がんを含む。一部の場合において、がんは、気管がん、肺がん、気管支がん、上皮がん、血液のがん、乳がん、黒色腫、卵巣がん、婦人科系がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、神経膠腫、肉腫、膠芽腫、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、がんは、肺がんである。一部の場合において、組成物は、ワクチンの形態である。一部の場合において、組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹膜内投与、皮下投与、スプレーベースの投与、エアロゾルベースの投与、胚内（ｉｎ ｏｖｏ）投与、経口投与、眼球内投与、気管内投与、鼻腔内投与、吸入による投与、またはそれらの組合せからなる群から選択される投与様式に好適である。一部の場合において、組成物は、凍結乾燥されている。一部の場合において、組成物は、単独療法剤としての単位用量配合物の形態で製剤化される。一部の場合において、組成物は、アジュバントを含む。一部の場合において、組成物は、対象において疾患に対する免疫性を発生させるために好適である。一部の場合において、組成物は、疾患に対する免疫応答を惹起する。一部の場合において、組成物は、対象において疾患に対する自然免疫応答を惹起する。一部の場合において、自然免疫応答は、インターフェロン制御因子（ＩＲＦ）の活性化をもたらす。一部の場合において、自然免疫応答は、核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化をもたらす。一部の場合において、自然免疫応答は、Ｉ型およびＩＩＩ型インターフェロンの合成および分泌ならびにそれに続くＩＦＮ刺激遺伝子（ＩＳＧ）の上方制御をもたらす。

【０００５】

[0005]様々な形態において、対象における疾患を防止する方法は、上記でまたはここに記載の組成物を対象に投与することを含む。様々な形態において、対象における疾患を処置する方法は、上記でまたはここに記載の組成物を対象に投与することを含む。一部の場合において、組成物は、対象において疾患に対する免疫性を発生させるために好適である。一部の場合において、組成物を対象に投与することは、対象において疾患に対する免疫応答を惹起する。一部の場合において、組成物を投与することは、対象において疾患に対する自然免疫応答を惹起する。一部の場合において、自然免疫応答は、対象においてインターフェロン制御因子（ＩＲＦ）の活性化をもたらす。一部の場合において、自然免疫応答は、核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化をもたらす。一部の場合において、自然免疫応答は、Ｉ型およびＩＩＩ型インターフェロンの合成および分泌ならびにそれに続くＩＦＮ刺激遺伝子（ＩＳＧ）の上方制御をもたらす。一部の場合において、自然免疫応答は、関連する適応免疫をもたらす。一部の場合において、疾患は、病原体によって引き起こされる。一部の場合において、病原体は、呼吸器病原体である。一部の場合において、呼吸器病原体は、ウイルスである。一部の場合において、ウイルスは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳｒ－ＣｏＶ）、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）、ヒトコロナウイルスＮＬ６３（ＨＣｏＶ－ＮＬ６３）、ヒトコロナウイルスＯＣ４３（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１（ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の変異体、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、疾患は、がんである。一部の場合において、がんは、気管がん、肺がん、気管支がん、上皮がん、血液のがん、乳がん、黒色腫、卵巣がん、婦人科系がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、神経膠腫、肉腫、膠芽腫、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、がんは、肺がんである。一部の場合において、組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹膜内投与、皮下投与、スプレーベースの投与、エアロゾルベースの投与、胚内投与、経口投与、眼球内投与、気管内投与、鼻腔内投与、吸入による投与、またはそれらの組合せによって対象に投与される。一部の場合において、組成物は、鼻腔内投与によって対象に投与される。一部の場合において、組成物は、吸入による投与によって対象に投与される。一部の場合において、組成物は、単回用量で対象に投与される。一部の場合において、組成物は、少なくとも２つの用量で対象に投与され、少なくとも２つの用量の第１の用量および第２の用量は、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも２日、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも７日、少なくとも１４日、または少なくとも２８日の間隔で投与される。一部の場合において、組成物は、１種またはそれより多くのアジュバント組成物または処置と組み合わせて投与される。一部の場合において、１つまたはそれより多くのアジュバント療法は、免疫療法、ウイルス療法、標的化阻害、放射線療法、化学療法、またはそれらの組合せから選択される。一部の場合において、対象は、哺乳動物である。一部の場合において、対象は、呼吸器感染症またはがんを有するリスクがある。一部の場合において、本方法は、対象における疾患の定着を防止するのに使用される。一部の場合において、本方法は、対象における疾患の進行を防止するのに使用される。一部の場合において、本方法は、第２の対象への疾患の伝染を防止するのに使用される。

【０００６】

[0006]本発明の主題の特徴および利点のより優れた理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施態様を説明する以下の詳細な説明への参照により得られるであろう。添付の図面は、以下の通りである。

【図面の簡単な説明】

【０００７】

【図１】[0007]図１は、本発明の開示の様々な実施態様に従って疾患を処置または防止

するためのリポソーム、ペイロード、および抗原を含む組成物の描写を提供する。
【図２】[0008]図２Ａは、病原体に曝露される前に、本発明の開示の１つまたはそれより多くの治療用組成物を対象に投与することによって、対象（例えば、哺乳動物などの動物）における疾患を防止する方法を例示する。図２Ｂは、病原体に曝露された後に、本発明の開示の１つまたはそれより多くの治療用組成物を対象に投与することによって、対象における疾患を処置する方法を例示する。
【図３】[0009]図３は、実施態様に従って、疾患を処置または防止するための、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物の投与、または三量体抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如した対照組成物の投与の概略図を示す。
【図４】[0010]図４Ａは、実施態様に従って疾患を処置または防止するための組成物に取り込まれる三量体Ｓタンパク質の概略図を示す。図４Ｂは、実施態様に従って図４Ａに表示される精製された三量体Ｓタンパク質で実行された変性ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）ゲルアッセイからの画像を示す。
【図５－１】[0011]図５Ａは、実施態様に従って対象における疾患を処置または防止するための、本明細書に記載される組成物を使用したインビボにおける動物対象の試験のための方法工程のタイムラインを示す。[0012]図５Ｂは、実施態様に従って疾患を処置または防止するための本明細書に記載される組成物を用いて試験されているインビボのマウス対象の体重測定値のタイムラインを示す。[0013]図５Ｃは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物を用いて試験されているインビボのマウス対象の体重測定のタイムラインを示す。
【図５－２】[0014]図５Ｄおよび図５Ｅは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物の投与後の７日目（図５Ｄ）および１５日目（図５Ｅ）における血清の抗原ベースのＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ分析を使用した体液性免疫応答の評価を示す。[0015]図５Ｆは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物の投与後の１５日目にマウスから得られた気管支肺胞洗浄液の抗原ベースのＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ分析を使用した体液性免疫応答の評価を示す。
【図５－３】[0016]図５Ｇは、実施態様に従って、三量体抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物の投与後の７日目、１５日目、２１日目、および２４日目に収集された血清の抗体力価を使用した、処置したマウスにおける体液性免疫応答の時間依存性速度論を示す。図５Ｈは、図５Ｇに提示される各マウス対象のデータの縦方向分析を示す。
【図５－４】[0017]図５－Ｉは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後に脾臓から収集されたサンプル中で検出されたＩｇＡを分泌する抗体分泌細胞（ＡＳＣ）の定量化を示す。図５Ｊは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後に脾臓から収集されたサンプル中で検出されたＳタンパク質に特異的なＩｇＡを分泌する抗体分泌細胞（ＡＳＣ）の定量化を示す。
【図５－５】[0018]図５Ｋは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後の２４日目に動物対象の血清中で検出されたＳタンパク質に特異的なＩｇＡレベルの定量化を示す。[0019]図５Ｌは、実施態様に従って、三量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本

明細書に記載される組成物で処置したマウスから得られた気管支肺胞洗浄液中で検出されたＳタンパク質に特異的なＩｇＡレベルの定量化を示す。
【図５－６】[0020]図５Ｍは、実施態様に従って、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置したマウスからの血清のシュードウイルス中和アッセイの測定値から決定された抗体応答のＩＤ５０レベルを示す。
[0021]図５Ｎは、実施態様に従って、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からの気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）のシュードウイルス中和アッセイの測定値から決定された気管支肺胞洗浄液抗体応答のＩＤ５０レベルを示す。
【図５－７】[0022]図５-Ｏは、実施態様に従って、リポソーム、三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後に脾臓から得られたサンプル中で検出されたインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）レベルのＥＬＩＳｐｏｔアッセイデータを示す。
【図５－８】図５Ｐは、実施態様に従って、ＥＬＩＳｐｏｔインターフェロンガンマ定量化アッセイに使用した保存されたペプチド（１５ｍｅｒ）のタンパク質レベルマッピングを示す。
【図６－１】[0023]図６Ａは、実施態様に従って、鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）から得られたサンプルでシングルセルＲＮＡ（ｓｃＲＮＡ）シーケンシング（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）を実行するための実験的方法を示す。
【図６－２】[0024]図６Ｂ、図６Ｃ、および図６Ｄは、実施態様に従って、シングルセルＲＮＡシーケンシング（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）アッセイにおける使用のための生細胞の単離ためのフローサイトメトリーゲーティング戦略を示す。一部の場合において、細胞は、フローサイトメトリーゲートを使用して同定される図６Ｂで示されるように、単一の細胞は、図６Ｃにおけるゲートを使用することによって、図６Ｂに示されるゲートを用いて得られた細胞の集団から同定され、生きた単一の細胞は、図６Ｄにおけるゲートを使用することによって、図６Ｃに示されるゲートを用いて得られた単一の細胞の集団から得られる。
【図７－１】[0025]図７Ａは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象の鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）における免疫細胞の均一多様体近似および投影（ＵＭＡＰ）分析を示す。
【図７－２】図７Ｂ、図７Ｃ、図７Ｄは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた免疫細胞集団におけるそれぞれＢ細胞マーカーのＣＤ１９、Ｍｓ４ａ１、およびＣＤ７９ａの相対発現のバイオリン図を示す。
【図７－３】図７Ｅ、図７Ｆ、および図７Ｇは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた免疫細胞集団における、それぞれＴ細胞マーカーＣＤ３ｄ、ＣＤ３ｅ、およびＣＤ３ｇの相対発現のバイオリン図を示す。
【図７－４】図７Ｈ、図７－Ｉ、および図７Ｊは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた免疫細胞集団における、それぞれＮＫ－細胞マーカーＧｚｍＢ、Ｎｃｒ１、およびＣｃｌ５の相対発現のバイオリン図を示す。
【図７－５】図７Ｋ、図７Ｌ、および図７Ｍは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた免疫細胞集団における、それぞれ骨髄性細胞マーカーＣＤ１４、Ｓ１００ａ９、およびＩＬ－１ｂの相対発現のバイオリン図を示す。
【図８－１】[0026]図８Ａは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象に実行されたｓｃＲＮＡ－ｓｅｑアッセイの均一多様体近似および投影（ＵＭＡＰ）分析に基づく、Ｂ細胞部分集団の同定を示す。

【図８－２】[0027]図８Ｂは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象に実行されたｓｃＲＮＡ－ｓｅｑアッセイのＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＢ細胞部分集団の相対頻度の定量化を示す。
【図８－３】[0028]図８Ｃ、図８Ｄ、および図８Ｅは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ６９、ＣＤ３８、ＣＤ８３、ＣＸＣＲ４、Ｚｆｐ３６、およびＥｒｇ１の相対発現のバイオリン図を示す。
【図８－４】[0028]図８Ｆ、図８Ｇ、および図８Ｈは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ６９、ＣＤ３８、ＣＤ８３、ＣＸＣＲ４、Ｚｆｐ３６、およびＥｒｇ１の相対発現のバイオリン図を示す。
【図９－１】[0029]図９Ａ、図９Ｂ、および図９Ｃは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ１９、Ｍｓ４ａ１、Ｉｇｈｍ、Ｉｒｆ４、Ｐａｘ５、Ｓｅｃ６１ｂ、Ｆｏｓｂ、Ｊｕｎ、Ｔｒａｍ１、Ｉｇｈａ、ＥＧＲ３、Ｃａｓｐ３、およびＦｏｓの相対発現のバイオリン図を示す。
【図９－２】[0029]図９Ｄ、図９Ｅ、および図９Ｆは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ１９、Ｍｓ４ａ１、Ｉｇｈｍ、Ｉｒｆ４、Ｐａｘ５、Ｓｅｃ６１ｂ、Ｆｏｓｂ、Ｊｕｎ、Ｔｒａｍ１、Ｉｇｈａ、ＥＧＲ３、Ｃａｓｐ３、およびＦｏｓの相対発現のバイオリン図を示す。
【図９－３】[0029]図９Ｇ、図９Ｈ、および図９－Ｉは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ１９、Ｍｓ４ａ１、Ｉｇｈｍ、Ｉｒｆ４、Ｐａｘ５、Ｓｅｃ６１ｂ、Ｆｏｓｂ、Ｊｕｎ、Ｔｒａｍ１、Ｉｇｈａ、ＥＧＲ３、Ｃａｓｐ３、およびＦｏｓの相対発現のバイオリン図を示す。
【図９－４】[0029]図９Ｊ、図９Ｋ、図９Ｌ、および図９Ｍは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＢ細胞部分集団における、それぞれＣＤ１９、Ｍｓ４ａ１、Ｉｇｈｍ、Ｉｒｆ４、Ｐａｘ５、Ｓｅｃ６１ｂ、Ｆｏｓｂ、Ｊｕｎ、Ｔｒａｍ１、Ｉｇｈａ、ＥＧＲ３、Ｃａｓｐ３、およびＦｏｓの相対発現のバイオリン図を示す。
【図１０－１】[0030]図１０Ａは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象に実行されたｓｃＲＮＡ－ｓｅｑアッセイの均一多様体近似および投影（ＵＭＡＰ）分析に基づく、Ｔ細胞部分集団の同定を示す。
【図１０－２】[0031]図１０Ｂは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象に実行されたｓｃＲＮＡ－ｓｅｑアッセイのＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＴ細胞部分集団の相対頻度の定量化を示す。
【図１０－３】[0032]図１０Ｃ、図１０Ｄ、および図１０Ｅは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られたＴ細胞部分集団における、それぞれＣＤ６９、Ｉｌ６ｒａ、ＣＤ２７、Ｎｒ４ａ１、Ｔｃｆ７、およびＬｅｆ１の相対発現のバイオリン図を示す。
【図１０－４】[0032]図１０Ｆ、図１０Ｇ、および図１０Ｈは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置

した動物対象から得られたＴ細胞部分集団における、それぞれＣＤ６９、Ｉｌ６ｒａ、ＣＤ２７、Ｎｒ４ａ１、Ｔｃｆ７、およびＬｅｆ１の相対発現のバイオリン図を示す。

【図１１－１】[0033]図１１Ａ、図１１Ｂ、および図１１Ｃは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＴ細胞部分集団における、それぞれＣＤ４、ＣＤ８ａ、ＣＤ２８、ＩＬ７Ｒ、Ｎｐｍ１、Ｆｏｓ、およびＪｕｎの相対発現のバイオリン図を示す。

【図１１－２】[0033]図１１Ｄ、図１１Ｅ、図１１Ｆ、および図１１Ｇは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象から得られた細胞を使用したＵＭＡＰ分析を使用して同定されたＴ細胞部分集団における、それぞれＣＤ４、ＣＤ８ａ、ＣＤ２８、ＩＬ７Ｒ、Ｎｐｍ１、Ｆｏｓ、およびＪｕｎの相対発現のバイオリン図を示す。

【図１２－１】[0034]図１２Ａは、実施態様に従って、抗原、リポソーム、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象の鼻関連リンパ組織から得られた細胞のｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ分析から得られたデータを使用して作成された細胞間相互作用ネットワークを示す。

【図１２－２】図１２Ｂは、鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）内のＧＣ　Ｂ細胞部分集団の細胞とＴｆｈ部分集団の細胞との間における予測されたリガンド－受容体相互作用（左から右へ：ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ対ＴＮＦＳＦ１３Ｂ；ＩＣＯＳＬＧ対ＩＣＯＳ；ＢＴＬＡ対ＴＮＦＳＦ１４；ＣＤ４０対ＣＤ４０ＬＧ；ＩＬ－２１受容体対ＩＬ－２１；ＣＸＣＬ１２対ＣＸＣＲ４；ＣＤ２８対ＣＤ８６；ＣＤ２８対ＣＤ８０）を示す。

【図１３－１】[0035]図１３Ａは、実施態様に従って、動物対象の免疫化（例えば、ワクチン接種）において有用な可能性がある本明細書に記載される組成物に取り込まれる単量体Ｓタンパク質の概略図を示す。

【図１３－２】図１３Ｂは、実施態様に従って、図１３Ａに描写された単量体Ｓタンパク質を特徴付けるのに使用された変性ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの画像を示す。

【図１３－３】[0036]図１３Ｃは、実施態様に従って、単量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後の１５日目に（「ｄ１５」）動物対象から得られた血清における体液性免疫応答のＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ定量化を示す。

【図１３－４】[0037]図１３Ｄは、実施態様に従って、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からの血清のシュードウイルス中和アッセイの測定値から決定された抗体応答のＩＤ５０レベルを示す（検出限界（ＬｏＤ）は、点線で示され；水平線は、データポイント平均を表し；ｐ値は、マン－ホイットニー統計的分析を使用してコンピューターで計算した）。

【図１３－５】[0038]図１３Ｅは、実施態様に従って、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後に、動物対象の脾臓または肺から得られたサンプル中で検出されたインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）レベルのＥＬＩＳｐｏｔアッセイデータを示す。

【図１３－６】[0039]図１３Ｆは、単量体タンパク質特異的なＩｇＡが、実施態様に従って、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物で処置した２匹の動物対象の鼻洗浄液中で検出可能であったことを示す（検出限界（ＬｏＤ）は、点線で示され；水平線は、データポイント平均を表す）。

【図１４】[0040]図１４は、実施態様に従って、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧ抗原を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象の平均体重を示す（エラーバーは平均標準誤差を現す）。

【図１５】[0041]図１５は、実施態様に従って、単量体抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、単量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後に動物対象の脾臓から収集

されたサンプル中で検出されたＳタンパク質に特異的なＩｇＡを分泌する抗体分泌細胞（ＡＳＣ）の定量化を示す（水平線は、平均を示す；エラーバーは、平均標準誤差を表す）。

【図１６】[0042]図１６は、実施態様に従って、疾患を処置または防止するために、リポソーム、ヌクレオカプシドタンパク質抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物を動物対象に投与すること、またはヌクレオカプシドタンパク質抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如した対照組成物を投与することを含む方法工程の概略図を示す。

【図１７】[0043]図１７は、実施態様に従って、リポソーム、ヌクレオカプシドタンパク質、およびｃＧＡＭＰを含む本明細書に記載される組成物での処置後の６時間、１２時間、または２４時間に動物対象から単離されたＴＨＰ－１細胞におけるインターフェロン感度係数（ＩＲＦ）応答の誘導を示す。

【図１８】[0044]図１８は、実施態様に従って、動物対象における疾患を処置または防止するための組成物において有用なＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２ヌクレオカプシドタンパク質の概略図を示す。

【図１９】[0045]図１９は、実施態様に従って、図１８に表示される精製されたＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）で実行された変性ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）ゲルアッセイからの画像を示す。

【図２０】[0046]図２０Ａは、実施態様に従って、０μＭ、０．１μＭ、０．５μＭのヌクレオカプシド濃度での、図１８に表示されるヌクレオカプシドタンパク質の存在下でＤＮＡが結合したＤｉＹＯ－１の蛍光発光スペクトルを示す。図２０Ｂは、実施態様に従って、ＤＮＡ結合陽性対照（ＰＥＩの窒素対ＤＮＡリン酸の様々なモル比（Ｒ）での分岐鎖ポリエチレンイミン（ＰＥＩ））の存在下でＤＮＡが結合したＤｉＹＯ－１の蛍光発光スペクトルを示す。

【図２１－１】[0047]図２１Ａは、実施態様に従って、マウス対象の鼻腔内処置またはワクチン接種およびサンプル収集のための工程のタイムラインを示す。

【図２１－２】[0048]図２１Ｂは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ（NanoSTING）－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらに、ヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物（「対照」）を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の２７日目に（「Ｄ２７」）動物対象から得られた血清における体液性免疫応答のＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ定量化を示す。図２１Ｃは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらに、ヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物（「対照」）を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の２７日目に（「Ｄ２７」）動物対象から得られた気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）中の体液性免疫応答のＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ定量化を示す。図２１Ｄは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらに、ヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の２７日目に（「Ｄ２７」）動物対象から得られた血清中の体液性免疫応答のＩｇＡ　ＥＬ

ＩＳＡ定量化を示す。図２１Ｂ、２１Ｃ、および２１Ｄにおけるバーおよび柱は中央値を示し、有意性は、マン－ホイットニー検定を使用して＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１で明示された。

【図２２】[0049]図２２は、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置の後に脾臓および肺サンプルから得られた細胞の、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）およびインターロイキン－４（ＩＬ４）のＥＬＩＳｐｏｔ分析の定量化を示す。バーおよび柱は中央値を示し、有意性は、マン－ホイットニー検定を使用して＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１で明示された。

【図２３】[0050]図２３は、実施態様に従って、リポソーム、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物での処置後の動物対象から得られたＣＤ８陽性細胞における追加のマーカー発現の定量化のためのフローサイトメトリーゲーティング戦略を示す。

【図２４】[0051]図２４Ａは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）でもある脾細胞におけるＣＤ１３７発現のフローサイトメトリー定量化を示す。バーおよび柱は中央値を示し、有意性は、マン－ホイットニー検定を使用して＊ｐ＜０．０５で明示された。図２４Ｂは、実施態様に従って、ヌクレオカプシドタンパク質抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置後に動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるＣＤ１３７発現のフローサイトメトリーデータを示す。図２４Ｃは、実施態様に従って、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるＣＤ１３７発現のフローサイトメトリーデータを示す。図２４Ｄは、実施態様に従って、ヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるＣＤ１３７発現のフローサイトメトリーデータを示す。

【図２５】[0052]図２５Ａは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）でもある脾細胞におけるグランザイムＢ（ＧｒＢ）発現のフローサイトメトリー定量化を示す。バーおよび柱は中央値を示し、有意性は、マン－ホイットニー検定を使用して＊ｐ＜０．０５で明示された。図２５Ｂは、実施態様に従って、ヌクレオカプシドタンパク質抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置後に動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるグランザイムＢ発現のフローサイトメトリ

ーデータを示す。図２５Ｃは、実施態様に従って、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるグランザイムＢ発現のフローサイトメトリーデータを示す。図２５Ｄは、実施態様に従って、ヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の動物対象から得られたＣＤ８陽性脾細胞におけるグランザイムＢ発現のフローサイトメトリーデータを示す。

【図２６】[0053]図２６Ａは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）でもある肺Ｔ細胞におけるグランザイムＢ（ＧｒＢ）発現のフローサイトメトリー定量化を示す。図２６Ｂは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）でもある肺Ｔ細胞におけるＣＤ１３７発現のフローサイトメトリー定量化を示す。図２６Ｃは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）でもある肺Ｔ細胞におけるＣＤ１０３発現のフローサイトメトリー定量化を示す。図２６Ｄは、実施態様に従って、リポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置に対する、さらにヌクレオカプシドタンパク質抗原またはＳＴＩＮＧアゴニスト非含有の組成物を使用した対照処置に対する、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物で処置した動物対象からのＣＤ６９およびＣＤ１０３の両方も発現するＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）肺Ｔ細胞のフローサイトメトリー定量化を示す。

【図２７】[0054]図２７は、実施態様に従って、ポリ（ｄＡ：ｄＴ）／ＬＶへの曝露後の６時間、１２時間、および２４時間における、カチオン脂質ベースのトランスフェクション試薬であるＬｙｏＶｅｃ（商標）（インビボジェン（InvivoGen））（「ポリ（ｄＡ：ｄＴ）／ＬＶ」）と複合体化したＩ型インターフェロンインデューサーであるポリ（ｄＡ：ｄＴ）に応答したＴＨＰ－１デュアル細胞（THP-1 dual cell）におけるインターフェロン感度係数（ＩＲＦ）応答の定量化　を示す。バーは、相対発光量（ＲＬＵ）で示される。

【図２８】[0055]図２８は、実施態様に従って、鼻腔内投与されたナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０組成物に晒された動物対象の体重の測定を示す。

【図２９】[0056]図２９は、実施態様に従って、リポソーム、１０μｇのヌクレオカプ

シドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置、ならびにリポソーム、２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質））抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の、７日目（「ｄ７」）、１４日目（「ｄ１４」）、２１日目（「ｄ２１」）、および２７日目（「ｄ２７」）に動物対象から得られた血清中の体液性免疫応答のヌクレオカプシドタンパク質反応性ＩｇＧ　ＥＬＩＳＡ定量化を示す。

【図３０】[0057]図３０Ａは、実施態様に従って、キメラスパイクタンパク質三量体抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、キメラスパイクタンパク質三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の２８日目に動物対象から得られた血清サンプルを使用した、キメラスパイクタンパク質三量体のアルファ（「α」）、ベータ（「β」）、およびガンマ（「γ」）変異体に対する、またはアルファもしくはガンマ変異体の受容体結合ドメインに対するＩｇＧ反応性のＥＬＩＳＡ定量化を示す。図３０Ｂは、実施態様に従って、キメラスパイクタンパク質三量体抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、キメラスパイクタンパク質三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後の２８日目に動物対象から得られた血清サンプルを使用した、キメラスパイクタンパク質三量体のアルファ変異体に対するＩｇＡ反応性のＥＬＩＳＡ定量化を示す。

【図３１】[0058]図３１Ａは、実施態様に従って、キメラスパイクタンパク質が欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、それぞれペプチドプールの異なるスパイクタンパク質（Ｓタンパク質）変異体を含み、一緒になってＳタンパク質由来のペプチドプールの全てを表すナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物で処置した動物対象の肺サンプルにおいて、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを使用して定量化した場合のインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）応答を示す。図３１Ｂは、実施態様に従って、キメラスパイクタンパク質が欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、ガンマ変異体キメラスパイクタンパク質三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載されるナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物で処置した動物対象の肺サンプルにおいて、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを使用して定量化した場合のインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）応答を示す。バーおよび柱は中央値を示し、有意性は、マン－ホイットニー検定を使用して＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１で明示された。

【図３２】[0059]図３２Ａおよび図３２Ｂは、実施態様に従って、キメラスパイクタンパク質が欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、ＲＳＶ－Ｆ由来抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含む本明細書に記載される組成物（「ナノＳＴＩＮＧ－ＲＳＶ」）での処置後のそれぞれ７日目および１４日目に動物対象から得られた血清を使用して実行されたＥＬＩＳＡアッセイにおけるＢ１型呼吸系発疹ウイルスＦタンパク質（ＲＳＶ－Ｆ）に対するＩｇＧの反応性を示す。

【図３３－１】[0060]図３３Ａ、図３３Ｂ、および図３３Ｃは、実施態様に従って、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定されたリポソームの粒度分布を示す。

【図３３－２】[0061]図３３Ｄ、図３３Ｅ、および図３３Ｆは、実施態様に従って、電気泳動光散乱（ＥＬＳ）によって測定されたリポソームのゼータ電位を示す。

【図３４－１】[0062]図３４Ａは、実施態様に従って、４℃での組成物の貯蔵後に動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定されたリポソームの粒度分布を示す。

【図３４－２】[0063]図３４Ｂは、実施態様に従って、４℃での組成物の貯蔵後に電気泳動光散乱（ＥＬＳ）によって測定されたリポソームのゼータ電位を示す。

【図３４－３】[0062]図３４Ｃは、実施態様に従って、４℃での組成物の貯蔵後に動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定されたリポソームの粒度分布を示す。

【図３４－４】[0063]図３４Ｄは、実施態様に従って、４℃での組成物の貯蔵後に電気泳動光散乱（ＥＬＳ）によって測定されたリポソームのゼータ電位を示す。
【図３５】[0064]図３５Ａおよび図３５Ｂは、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定されたリポソームの粒度分布を示し、抗原は、実施態様に従って、溶液中で（図３５Ａ）または凍結乾燥固体として（図３５Ｂ）貯蔵される。
【図３６－１】[0065]図３６Ａは、実施態様に従って、ｃＧＡＭＰ（ＳＴＩＮＧａ）組成物の紫外可視吸収スペクトルを示す。
【図３６－２】[0066]図３６Ｂは、実施態様に従って、遊離のＳＴＩＮＧａの濃度の計算で使用された標準曲線を示す。
【発明を実施するための形態】
【０００８】
[0067]対象（例えば、哺乳動物などの動物）の疾患または病的な状態、例えば呼吸器疾患またはがんの防止および／または処置のための組成物および方法が本明細書で開示される。一部の場合において、疾患または病的な状態を防止することは、対象における疾患または病的な状態の定着を防止することを含む。一部の場合において、疾患または病的な状態を防止することは、対象における疾患または病的な状態の定着を（例えば、対象が病原体に曝露された後に）防止することを含む。一部の場合において、疾患または病的な状態を防止することは、対象における疾患または病的な状態の発生を（例えば、進行）（例えば、第１の状態から、第２の状態、より重度の状態、または進行した状態への）（例えば、対象において疾患が定着した後、例えば、病原体感染を介して定着した後に）防止することを含む。一部の場合において、疾患または病的な状態を防止することは、第１の対象から第２の対象への疾患または病的な状態の伝染を防止することを含む。対象の疾患または病的な状態を防止または処置するのに有用な組成物１０は、粒子１２、調節因子１６、および／または抗原１４を含んでいてもよい（例えば、図１で示されるように）。例えば、本明細書に記載される組成物は、脂質ベースのリポソーム粒子、調節因子（例えばパターン認識受容体アゴニスト、例えば、ＳＴＩＮＧアゴニスト）、およびリポソーム粒子に会合する、用途に特化した抗原（例えばコロナウイルススパイクタンパク質（「Ｓタンパク質」）、ヌクレオカプシドタンパク質（「Ｎ－タンパク質」）、またはキメラ抗原タンパク質）を含んでいてもよい。一部の場合において、用途に特化した抗原の、調節因子ペイロードをカプセル化しているリポソーム粒子（例えば、その外部表面）との会合は、目的の標的組織（例えば、対象の鼻腔内の区画および／または肺の区画）への調節因子ペイロードの標的化および／または送達を著しく増加させることができる。一部の場合において、用途に特化した抗原のリポソーム粒子との会合（例えば、直接の会合、例えばリポソーム膜に取り込むことを介した、またはリポソーム膜表面へのカップリングを介した会合）は、例えば、組成物の抗原および調節因子を空間的に（例えば、標的組織において）濃縮することによって、対象における疾患または病的な状態を防止および／または処置することにおける組成物の効能を増加させることができる。
【０００９】
組成物
[0068]対象における疾患または病的な状態を防止または処置するための組成物（例えば、治療用組成物）は、送達手段（例えば、粒子）を含んでいてもよい。対象における疾患または病的な状態を防止または処置することにおいて有用な組成物の送達手段は、粒子であってもよく、例えば脂質ベースの粒子であってもよい。例えば、対象における疾患または病的な状態を防止または処置することにおいて有用な組成物は、脂質ベースの粒子、例えばリポソーム（例えば、外部表面および内部空間を有する膜を有する）を含んでいてもよい。一部の実施態様において、組成物は、１種またはそれより多くの調節因子（例えば、１種またはそれより多くのタイプの調節因子）を含む。一部の場合において、調節因子は、小分子、タンパク質もしくはそのフラグメント、および／またはポリヌクレオチドもしくはそのフラグメントを含んでいてもよい。一部の場合において、調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧアゴニスト）または調節因子の組合せは、本明細書に記載される組成物にお

ける使用ごとに、対象においてシグナル伝達経路および／または全身応答経路（例えば、インターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路）の活性化もしくは阻害を誘導するその能力に応じて選択することができる。対象における疾患または病的な状態を防止または処置することにおいて有用な組成物は、１種またはそれより多くの抗原を含んでいてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原は、対象において疾患（例えば、呼吸器疾患）または病的な状態（例えば、がん）を防止または排除することにおいて有用であり得る免疫応答を対象において惹起することができる。一部の実施態様において、対象における疾患または病的な状態を防止または処置するための組成物は、粒子（例えば、リポソーム）内にカプセル化された調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧアゴニスト、例えばｃＧＡＭＰ）を含んでいてもよく、この場合、抗原は、リポソームまたはその一部と会合している（例えば、リポソームの膜に取り込まれることによって）。

【００１０】

[0069]一部の実施態様において、本明細書に記載される組成物は、対象（例えば、哺乳動物、例えばヒト）における疾患または病的な状態を処置または防止するための方法において使用することができる。一部の場合において、病原体（例えば、呼吸器疾患またはがんを引き起こす病原体）に曝露される前に、本明細書に記載される組成物を対象に投与して、例えば、対象が、病原体への曝露（例えば、それによる感染）に関連する疾患または状態に罹らないようにすることができる（例えば、図２Ａで例示される通り）。一部の場合において、本明細書で開示される組成物は、ワクチンの形態で投与されてもよい。一部の場合において、病原体（例えば、呼吸器疾患またはがんを引き起こす病原体）に曝露された後に、本明細書に記載される組成物を対象に投与して、例えば、例えば、対象が病原体への曝露によりその病原体に関連する疾患または状態に罹った後に、病原体への曝露（例えば、それによる感染）に関連する疾患または状態を処置する（例えば、緩和する、または一部の場合において、治癒する）ことができる（例えば、図２Ｂで例示される通り）。

【００１１】

粒子

[0070]本発明の開示の組成物は、送達手段、例えば粒子を含んでいてもよい。粒子は、ペイロード（例えば、調節因子ペイロード）および／または１種またはそれより多くの抗原（例えば、膜または外部表面などの粒子の一部と会合した抗原）を運搬する手段を含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、膜または壁を含んでいてもよい。一部の場合において、粒子の膜または壁は、内部空間を画定することができる。一部の実施態様において、粒子の内部空間は、１種またはそれより多くの調節因子を含んでいてもよい。一部の実施態様において、１種またはそれより多くの抗原は、粒子の膜または壁（例えば、粒子の膜または壁の外部表面）と会合していてもよい。粒子は、脂質ベースの粒子、炭素ベースの粒子、金属ベースの粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【００１２】

[0071]本明細書に記載される組成物の粒子は、脂質ベースの粒子であってもよい。一部の実施態様において、脂質ベースの粒子は、リポソームであってもよい。本明細書に記載される組成物は、肺サーファクタント生体模倣粒子を含んでいてもよい。本明細書で開示される組成物の粒子（例えば、脂質ベースの粒子）は、複数の分子、例えば、膜に組み込まれる複数の分子を含んでいてもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）またはその一部は、アニオン性であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）またはその一部は、カチオン性であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子は、両性イオン性であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）またはその一部は、正味でゼロの電荷を有していてもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）またはその一部は、非荷電性であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の粒子（例えば、リポソーム）は、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（dipalymitoylphosphatidylglycerol）、１，２－ビ

ス（ジフェニルホスフィノ）エタン（ＤＰＰＥ）、コレステロール、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。一部の実施態様において、本明細書に記載される組成物の粒子（例えば、リポソーム）は、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］）、コレステロール、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。一部の実施態様において、粒子は、ＤＰＰＣおよびＤＰＰＧの組合せを、例えば、約１０：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、ＤＰＰＣおよびコレステロールの組合せを、例えば、約１０：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、ＤＰＰＣおよびＤＰＰＥ－２０００の組合せを、例えば、約１０：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、ＤＰＰＧおよびコレステロールの組合せを、例えば、約１：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、コレステロールおよびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００の組合せを、例えば、約１：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、ＤＰＰＧおよびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００の組合せを、例えば、約１：１のモル比で含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、ＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００を含んでいてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：１：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ２０：１：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ５：１：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：２：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：１：２：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：１：１：２のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：２：２：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：１：２：２のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子は、それぞれ１０：２：１：２のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていてもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子の、該粒子を構成する第２の分子に対するモル比は、１：１００～１：１、１：５０～１：２、１：２５～１：３、１：１０～１：５、１：５０～１：１、１：２５～１：１、１：１０～１：１、１：５～１：１、１：３～１：１、１：２５～１：１０、１：５０～１：２５、１：１００～１：５０であってもよいし、または１：１００より大きくてもよい。一部の場合において、本発明の開示の粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子の、該粒子を構成する第２の分子に対するモル比は、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：１０、１：１５、１：２０、１：２５、１：５０、１：１００、またはそれらの間のあらゆる範囲であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子のモル比は、１：５であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子のモル比は、１：１０であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子のモル比は、１：２０であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子のモル比は、１：５０であってもよい。一部の場合において、粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子は、１：１００であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の粒

子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第１の分子は、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、１，２－ビス（ジフェニルホスフィノ）エタン（ＤＰＰＥ）、コレステロール、またはそれらの組合せであってもよい。一部の実施態様において、本明細書に記載される組成物の粒子（例えば、脂質ベースの粒子）を構成する第２の分子は、ＤＰＰＣ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン）、ＤＰＰＧ（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール））、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００（１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］）、またはコレステロールであってもよい。

【００１３】

[0072]本明細書に記載される組成物の粒子は、ナノ粒子であってもよい。小さい粒径（例えば、３００ナノメートル（ｎｍ）未満、２００ｎｍ未満、１５０ｎｍ未満、１２０ｎｍ未満、１１５ｎｍ未満、１１１ｎｍ未満、１１０ｎｍ未満、１０５ｎｍ未満、１００ｎｍ未満、９５ｎｍ未満、９０ｎｍ未満、８５ｎｍ未満、または８０ｎｍ未満の平均流体力学的粒径）、および／または低い多分散性（例えば、０．２５未満、０．２４未満、０．２３未満、０．２２未満、０．２１未満、または０．２０未満の多分散性指標）を維持することは、粒子の安定性および／または送達効率を改善することができる。一部の場合において、粒子は、１ナノメートル～５００ナノメートル、１ナノメートル～７５０ナノメートル、または１ナノメートル～１，０００ナノメートルの外径を有していてもよい。一部の場合において、粒子は、１ナノメートル～１０ナノメートル、１ナノメートル～１５ナノメートル、１ナノメートル～２０ナノメートル、１ナノメートル～３０ナノメートル、１ナノメートル～５０ナノメートル、１ナノメートル～７５ナノメートル、１ナノメートル～１００ナノメートル、１ナノメートル～１５０ナノメートル、１ナノメートル～２００ナノメートル、１ナノメートル～２５０ナノメートル、１ナノメートル～３００ナノメートル、１ナノメートル～４００ナノメートル、１ナノメートル～５００ナノメートル、１０ナノメートル～１５ナノメートル、１０ナノメートル～２０ナノメートル、１０ナノメートル～３０ナノメートル、１０ナノメートル～５０ナノメートル、１０ナノメートル～７５ナノメートル、１０ナノメートル～１００ナノメートル、１０ナノメートル～１５０ナノメートル、１０ナノメートル～２００ナノメートル、１０ナノメートル～２５０ナノメートル、１０ナノメートル～３００ナノメートル、１５ナノメートル～２０ナノメートル、１５ナノメートル～３０ナノメートル、１５ナノメートル～５０ナノメートル、１５ナノメートル～７５ナノメートル、１５ナノメートル～１００ナノメートル、１５ナノメートル～１５０ナノメートル、１５ナノメートル～２００ナノメートル、１５ナノメートル～２５０ナノメートル、１５ナノメートル～３００ナノメートル、２０ナノメートル～３０ナノメートル、２０ナノメートル～５０ナノメートル、２０ナノメートル～７５ナノメートル、２０ナノメートル～１００ナノメートル、２０ナノメートル～１５０ナノメートル、２０ナノメートル～２００ナノメートル、２０ナノメートル～２５０ナノメートル、２０ナノメートル～３００ナノメートル、３０ナノメートル～５０ナノメートル、３０ナノメートル～７５ナノメートル、３０ナノメートル～１００ナノメートル、３０ナノメートル～１５０ナノメートル、３０ナノメートル～２００ナノメートル、３０ナノメートル～２５０ナノメートル、３０ナノメートル～３００ナノメートル、５０ナノメートル～７５ナノメートル、５０ナノメートル～１００ナノメートル、５０ナノメートル～１５０ナノメートル、５０ナノメートル～２００ナノメートル、５０ナノメートル～２５０ナノメートル、５０ナノメートル～３００ナノメートル、７５ナノメートル～１００ナノメートル、７５ナノメートル～１５０ナノメートル、７５ナノメートル～２００ナノメートル、７５ナノメートル～２５０ナノメートル、７５ナノメートル～３００ナノメートル、１００ナノメートル～１５０ナノメートル、１００ナノメートル～２００ナノメートル、１００ナノメートル～２５０ナノメートル、１００ナノメートル～３００ナノメートル、１５０ナノメートル～２００ナノメートル、１５０ナノメートル～２５０ナノメートル、１５０ナノメートル～３００ナノメートル、２００ナノメートル～２５０ナノメート

ル、２００ナノメートル～３００ナノメートル、または２５０ナノメートル～３００ナノメートルの外径を有していてもよい。一部の場合において、粒子は、１ナノメートル、１０ナノメートル、１５ナノメートル、２０ナノメートル、３０ナノメートル、５０ナノメートル、７５ナノメートル、１００ナノメートル、１５０ナノメートル、２００ナノメートル、２５０ナノメートル、３００ナノメートル、４００ナノメートル、または５００ナノメートルの外径を有していてもよい。一部の場合において、粒子は、少なくとも１ナノメートル、１０ナノメートル、１５ナノメートル、２０ナノメートル、３０ナノメートル、５０ナノメートル、７５ナノメートル、１００ナノメートル、１５０ナノメートル、２００ナノメートル、２５０ナノメートル、３００ナノメートル、４００ナノメートル、または５００ナノメートルの外径を有していてもよい。一部の場合において、粒子は、最大で１ナノメートル、１０ナノメートル、１５ナノメートル、２０ナノメートル、３０ナノメートル、５０ナノメートル、７５ナノメートル、１００ナノメートル、１５０ナノメートル、２００ナノメートル、２５０ナノメートル、３００ナノメートル、４００ナノメートル、５００ナノメートル、７５０ナノメートル、または１，０００ナノメートルの外径を有していてもよい。

【００１４】

[0073]本発明の開示の調節因子および／または抗原は、本発明の開示の粒子と会合していてもよい。例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の抗原およびＳＴＩＮＧ調節因子は、本発明の開示の粒子の異なる領域上に位置していてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子）は、粒子中にカプセル化されていてもよい（例えば、図１で例示される通り、ＳＴＩＮＧ調節因子１６が粒子１２中にカプセル化される）。一部の場合において、本発明の開示の抗原の全部または一部は、粒子の表面と会合していてもよい（例えば、それに付着していてもよいし、それに接着していてもよいし、その上に吸着していてもよいし、それに共有結合していてもよいし、それに非共有結合していてもよいし、それに統合されていてもよい）（例えば、図１で例示される通り、粒子１２の表面上の抗原１４）。一部の場合において、抗原の全部または一部は、脂質ベースの粒子内にカプセル化されている。一部の実施態様において、抗原と粒子の表面との会合（例えば、吸着）は、投与後に、粒子の安定性増加させたり、および／または送達効率（例えば、標的組織への）を増加させたりすることができる。

【００１５】

[0074]一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子内にカプセル化されていてもよい。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、粒子の外部表面と会合していてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、（例えば、脂質ベースの）粒子中にカプセル化されていてもよく、一方で本発明の開示の１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、粒子の外部表面と会合している。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、この開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の外部表面と会合していてもよい。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、粒子内にカプセル化されていてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、この開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の外部表面と会合していてもよく、本発明の開示の１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、粒子内にカプセル化されている。一部の実施態様において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原および１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）はどちらも、（例えば、脂質ベースの）粒子内にカプセル化されていてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原および１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）はどちらも、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の表面と会合していてもよい。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、本発明の開示の（例えば、脂質ベース

の）粒子の膜に統合されていてもよい。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の膜に統合されていてもよい。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子内にカプセル化されていてもよく、一方で１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の膜に統合されている。一部の場合において、本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、（脂質ベースの）粒子の外部表面と会合していてもよく、一方で１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の膜に統合されている。一部の場合において、１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子内にカプセル化されていてもよく、一方で本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、粒子の膜に統合されている。一部の場合において、１種またはそれより多くの調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子など）は、本発明の開示の（例えば、脂質ベースの）粒子の外部表面と会合していてもよく、一方で本発明の開示の１種またはそれより多くの抗原は、粒子の膜に統合されている。一部の実施態様において、（例えば、脂質ベースの）粒子内に本発明の開示の抗原と調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ調節因子）の両方を取り込むことは、協調的なサイトゾル送達を容易にすることができる。

【００１６】

抗原

[0075]対象における呼吸器疾患または病的な状態を防止または処置することにおいて有用な組成物は、抗原を含んでいてもよい。本発明の開示の抗原（またはその一部）は、粒子（例えば、脂質ベースの粒子、例えばリポソーム）の表面と会合していてもよい（例えば、それに付着していてもよいし、それに接着していてもよいし、その上に吸着していてもよいし、それに共有結合していてもよいし、それに非共有結合していてもよいし、それに組み込まれていてもよい）。一部の場合において、抗原は、対象において疾患に対する免疫性を発生させるのに好適なものであり得る。例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の組成物における１種またはそれより多くの抗原は、対象において疾患に対する免疫応答を惹起することが可能であってもよい。

【００１７】

[0076]本明細書に記載される組成物の抗原は、疾患を引き起こす病原体またはその一部（例えば、本明細書に記載される病原体の１つまたはそれより多く）の弱毒化した、または致死させたバージョンを含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、病原体と会合する、ペプチドもしくはタンパク質、またはその一部を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、病原体の表面タンパク質（例えば、受容体タンパク質）、またはその一部を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、ポリヌクレオチドの形態であってもよく、例えば、第２の抗原（例えば、第２の抗原を発現するプラスミドＤＮＡ分子）を発現させるのに使用することができるポリヌクレオチドの形態であってもよい。

【００１８】

[0077]本明細書に記載される組成物の抗原は、スパイクタンパク質またはその一部を含んでいてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原は、コロナウイルススパイクタンパク質（Ｓ）の少なくとも１つの成分を含んでいてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原は、コロナウイルススパイクタンパク質（Ｓ）の単量体の形態を含んでいてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原は、コロナウイルススパイクタンパク質（Ｓ）の多量体の形態を含んでいてもよい。

【００１９】

[0078]一部の場合において、本発明の開示の抗原は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の単量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の受容体

結合ドメイン（ＲＢＤ）の単量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の多量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）の多量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の二量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）の二量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の三量体の形態、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）の三量体の形態、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。一部の場合において、組成物の抗原は、キメラタンパク質（例えば、キメラスパイクタンパク質）を含んでいてもよい。

【００２０】

[0079]一部の場合において、抗原は、Ｄ６１４Ｇ突然変異、Ａ２２２Ｖ突然変異、Ｓ４７７Ｎ突然変異、Ｄ８０Ｙ突然変異、Ｓ９８Ｆ突然変異、またはそれらの組合せを含有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（Ｓ）の単量体または多量体の形態を含んでいてもよい。

【００２１】

[0080]一部の実施態様において、抗原は、異なる突然変異を内包するＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質の混合物であってもよい。一部の実施態様において、抗原は、ヌクレオカプシドタンパク質の単量体または多量体の形態を含んでいてもよい。例えば、本発明の開示の抗原は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２ヌクレオカプシド（Ｎ）タンパク質の単量体または多量体の形態を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、Ａ２２０Ｖ突然変異を含有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ２ヌクレオカプシド（Ｎ）タンパク質の単量体または多量体の形態であってもよい。

【００２２】

[0081]一部の実施態様において、抗原は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質の混合物であってもよい。一部の実施態様において、抗原は、異なる突然変異を内包するＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質の混合物であってもよい。

【００２３】

[0082]一部の場合において、抗原は、インフルエンザウイルス抗原もしくはその一部、インフルエンザＡウイルス抗原もしくはその一部、インフルエンザＢウイルス抗原もしくはその一部、パラインフルエンザウイルス抗原もしくはその一部、アデノウイルス抗原もしくはその一部、エンテロウイルス抗原もしくはその一部、コロナウイルス抗原もしくはその一部、呼吸系発疹ウイルス（ＲＳＶ）抗原もしくはその一部、ライノウイルス抗原もしくはその一部、ＤＮＡウイルス抗原もしくはその一部、ＲＮＡウイルス抗原もしくはその一部、またはそれらの組合せであってもよい。

【００２４】

[0083]一部の実施態様において、本発明の開示の組成物は、対象においてがんに対する免疫性を発生させるために好適である。一部の実施態様において、本発明の開示の組成物の抗原は、対象においてがんに対する免疫性を発生させるために好適である。例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物における抗原は、対象においてがん（例えば、上述したがん）に対する免疫応答を惹起することが可能である。

【００２５】

[0084]一部の実施態様において、本発明の開示の組成物の抗原は、がんに関連する腫瘍細胞の弱毒化した、または致死させたバージョン（またはそれらの部分）であってもよい。一部の実施態様において、抗原は、がんに関連するペプチドまたはタンパク質を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、がん細胞の表面タンパク質（例えば、受容体タンパク質）を含んでいてもよい。

【００２６】

[0085]一部の実施態様において、抗原は、がん細胞の突然変異したタンパク質を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、がん突然変異を標的化する合成の長いペプチドであってもよい。

【００２７】

[0086]本発明の開示の組成物の抗原は、様々な形態であってもよい。例えば、一部の実施態様において、抗原は、組換えペプチドもしくはタンパク質、またはＴ細胞によって認識されるペプチドエピトープであってもよい。一部の実施態様において、本明細書で開示される組成物の抗原は、タンデムミニ遺伝子を含んでいてもよい。一部の実施態様において、抗原は、抗原を発現することヌクレオチド（例えば、抗原を発現するプラスミドＤＮＡ分子）の形態であってもよい。

【００２８】

調節因子

[0087]対象における疾患を防止または処置するための本明細書に記載される組成物（例えば、粒子、例えば脂質ベースの粒子、および任意選択で抗原を含む）は、調節因子を含んでいてもよい。本明細書に記載される組成物の調節因子は、パターン認識受容体調節因子、例えばＳＴＩＮＧ調節因子（例えば、ＳＴＩＮＧ経路調節因子）であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、パターン認識受容体アゴニストであってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、パターン認識受容体アンタゴニストであってもよい。本発明の開示の組成物は、様々な種類のＳＴＩＮＧ調節因子を含んでいてもよい。例えば、一部の実施態様において、ＳＴＩＮＧ調節因子は、ＳＴＩＮＧ経路のアンタゴニストである。一部の実施態様において、ＳＴＩＮＧ調節因子は、ＳＴＩＮＧ経路のアゴニストである。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、対象（例えば、組成物が投与される対象）においてＳＴＩＮＧ経路を活性化することが可能である。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、対象（例えば、組成物が投与される対象）においてＳＴＩＮＧ経路を阻害することが可能である。

【００２９】

[0088]本明細書に記載される組成物のＳＴＩＮＧ調節因子は、ビス（３’，５’）環状二量体グアノシン一リン酸（ｃ－ジ－ＧＭＰ）、環状グアノシン一リン酸－アデノシン一リン酸（ｃＧＡＭＰ）、アミドベンズイミダゾール、アミドベンズイミダゾールの誘導体、ヌクレオチド調節因子、プラスミドＤＮＡ調節因子、核酸調節因子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【００３０】

[0089]一部の実施態様において、ＳＴＩＮＧ調節因子は、ＳＴＩＮＧ経路のアンタゴニストであってもよい。一部の場合において、ＳＴＩＮＧアンタゴニストは、例えば、疾患を引き起こす病原体（例えば、ライノウイルスなどのＲＮＡウイルス）がウイルス複製を促進するのにＳＴＩＮＧ経路を利用する場合、疾患の処置および／または防止において特に有効であり得る。一部の場合において、ＳＴＩＮＧアンタゴニストは、ＳＴＩＮＧ経路へのウイルスの接近を低減させることによってウイルス複製を阻害するのに利用することができる。一部の実施態様において、ＳＴＩＮＧアンタゴニストとしては、これらに限定されないが、Ｃ－１７８、Ｈ－１５１、およびそれらの組合せが挙げられる。

【００３１】

[0090]一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、組成物の粒子の内部空間内に配置されていてもよい。例えば、調節因子は、本明細書に記載される組成物の粒子（例えば、脂質ベースの粒子、例えばリポソーム）内にカプセル化されていてもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の調節因子は、組成物の粒子の表面（例えば、膜の外部表面）と会合していてもよい。一部の場合において、粒子の表面と会合する調節因子は、粒子の表面に共有結合または非共有結合で結合することによって会合している。一部の場合において、粒子の表面と会合する調節因子は、粒子の表面（例えば、膜）に統合されることによって会合している。

【００３２】

[0091]一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原の核酸配列と、組成物の調節因子の核酸配列とは、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％

、または１００％同一であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物の抗原の核酸配列の一部は、組成物の調節因子の核酸配列と少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％同一であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される調節因子の核酸配列に少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％同一な核酸配列を含む抗原が、本明細書に記載される組成物の粒子（例えば、脂質ベースの粒子）内にカプセル化されていてもよい（例えば前記調節因子はまた、脂質ベースの粒子内にカプセル化されていてもよい）。一部の場合において、本明細書に記載される抗原および調節因子（例えば、この場合、抗原と調節因子とは、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％同一な核酸配列を含む）はどちらも、本明細書に記載される脂質ベースの粒子内にカプセル化されている。一部の場合において、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％同一な配列を含む抗原および調節因子を含む組成物が、鼻腔内に送達されてもよい。

【００３３】

使用方法

[0092]追加の実施態様において、本発明の開示は、本発明の開示の治療用組成物を対象に投与することによって、対象における疾患を処置または防止する方法に関する。図２Ａで例示されるより具体的な実施態様において、本発明の開示の方法は、治療用組成物を対象に投与して（工程２０）、対象における疾患を処置または防止する工程（工程２２）を含む。

【００３４】

[0093]本明細書においてより詳細に記載される通り、本発明の開示の治療用組成物および方法は、多数の実施態様を有し得る。例えば、本発明の開示の治療用組成物は、様々な種類のＳＴＩＮＧ調節因子および抗原を含んでいてもよい。さらに、本発明の開示の方法は、様々な疾患を処置または防止するために、多数の対象に様々な方式で本発明の開示の治療用組成物を投与するのに利用することができる。

【００３５】

用途

[0094]一部の場合において、本明細書に記載される組成物および／または方法は、呼吸器疾患または状態、例えば、インフルエンザ、コロナウイルス、呼吸系発疹ウイルス、ライノウイルスに関する呼吸器疾患または状態を防止または処置することにおいて有用であり得る。一部の場合において、本明細書に記載される組成物および／または方法は、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、および／または高サイトカイン血症（例えば、サイトカインストーム）を防止または処置することにおいて有用であり得る。一部の場合において、本明細書に記載される組成物および／または方法は、がん、例えば肺がんを防止および／または処置することにおいて有用であり得る。

【００３６】

[0095]呼吸器疾患やがんに対する安全で有効なワクチンが緊急に求められている。一部の場合において、本明細書に記載される組成物は、体液性免疫、Ｔ細胞免疫、全身性免疫および／または粘膜免疫を有効にするために、インターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路のアゴニストを含有するリポソームを含有するワクチンまたは治療的処置（例えば、鼻腔内に送達される）を含んでいてもよい。

【００３７】

[0096]自然免疫は、病原体侵入からの防御の第一線である。自然免疫（適応免疫とは異なり、各病原体につきカスタマイズされる可能性がある）は、保存された病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）１を認識する宿主細胞上のパターン認識受容体（ＰＲＲ）によって発生し得る。この認識の様式により、カスタマイズを必要としない即時応答の存在を確実にすることができる。

【００３８】

[0097]ＲＮＡウイルスの状況で、ウイルス特異的ＲＮＡ分子の認識および活性化は、

インターフェロン制御因子（ＩＲＦ）および核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）の活性化をもたらすことができる。まとめると、これらの転写調節因子は、Ｉ型およびＩＩＩ型インターフェロンの合成および分泌ならびにそれに続くＩＦＮ刺激遺伝子（ＩＳＧ）の上方制御を含む広範な抗ウイルスプログラムを起動させる。

【００３９】

[0098]この総合的な抗ウイルスプログラムは、ウイルス複製に強い選択圧力をかけることができる。ウイルスは、インターフェロンシグナル伝達に干渉するための、進化した精巧な対抗手段を有する。インターフェロン媒介応答とウイルス対抗手段との相互作用はヘテロジニアスであることから、これがヒトでみられる罹患率および死亡率における不均質性の説明になり得る。

【００４０】

[0099]１型インターフェロン応答は、病原体感染（例えば、コロナウイルスまたは他の呼吸器病原体）において抑制される可能性があり、それに続いてＩＳＧとＮＦ－κＢが媒介する炎症促進性応答とのバランスが調節不全になり得る。結果として、病原体感染（例えば、呼吸器病原体感染）において進行した疾患を有する患者は、低いインターフェロンシグナル伝達を有する可能性があるが、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）およびインターロイキン－６（ＩＬ－６）分泌が激化する可能性がある。実際に、インターフェロンの機能を中和するインターフェロンに対する自己抗体を有するヒトは、進行した疾患を発達させる高いリスクを有する可能性がある。

【００４１】

[00100]同様に、Ｉ型ＩＦＮ免疫の先天性異常を有するヒトは、このような異常がないヒトより高い割合で生命を脅かすＣＯＶＩＤ－１９を発症させる可能性がある。一部の場合において、１型インターフェロンでの細胞株の前処置は、そうでなければ感染しやすい細胞におけるウイルス複製を阻害することができる。理論に縛られることはないが、これらの考察は、ロバストなＩ型ＩＦＮ応答の欠如が、ＣＯＶＩＤ－１９進行の根底にあるということの説明を助けることができる。

【００４２】

[00101]インターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路は、環状ＤＮＡジヌクレオチドを感知するＰＲＲであり、ＩＲＦ３およびＮＦ－κＢを活性化して、ＩＳＧの合成をもたらす。ＲＮＡウイルス媒介Ｉ型ＩＦＮおよびサイトカイン生産におけるＳＴＩＮＧの役割は、主として細菌およびＤＮＡウイルスの感知に重要であると考えられるが、より詳細な研究が必要である。本明細書において示した通り、ＲＮＡウイルス媒介Ｉ型ＩＦＮおよびサイトカイン生産におけるＳＴＩＮＧの役割は、ウイルスおよび細胞型特異的であり得る。

【００４３】

[00102]ヒト細胞の細胞質内におけるコロナウイルスのようなウイルス由来の二本鎖ＲＮＡの感知は、レチノイン酸誘導性遺伝子１（retinoic acid inducible gene 1；ＲＩＧ－１）および黒色腫分化遺伝子５（melanoma differentiation gene 5；ＭＤＡ５）などのＲＩＧ－Ｉ様受容体によって達成することができる。一部の場合において、これらの受容体の下流の感知経路は、２つのＩＫＫ関連のキナーゼ、ＴＡＮＫ結合キナーゼ１（ＴＢＫ１）および誘導性ＩκＢキナーゼ（ＩＫＫｉ）の活性化をもたらす。一部の場合において、これらのキナーゼは、活性化されたＳＴＩＮＧ経路によっても取り込まれ得ることから、ＰＲＲは、異なる分子を感知するように進化したのと同時に、その下流応答に収束する可能性があることを示唆している。

【００４４】

[00103]ＳＴＩＮＧアゴニストを治療剤として利用することは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２感染の状況でさえもＩ型インターフェロンのバランスの取れた活性化を促進するために、この保存された下流エフェクター応答を利用することができる。ＲＩＧ－１様受容体から独立してＳＴＩＮＧアゴニストを用いたＩ型インターフェロンの放出を可能にすることによって、これがウイルスによって進化した対抗手段の対象ではないという可能性を増加さ

せる。
【００４５】
[00104]インターフェロンの放出は、ウイルス複製を制限する広範な抗ウイルスプログラムを可能にし、したがって疾患の重症度を軽減する。一方で、ＲＮＡウイルス様ライノウイルスは、一部の場合において、ＳＴＩＮＧ経路をハイジャックして、ウイルス複製を促進することができる。この状況において、ＳＴＩＮＧアンタゴニストを利用することによってウイルス複製を阻害して、炎症の勢いをそぐことが有用な可能性がある。
【００４６】
[00105]理論に縛られることはないが、本発明の開示の治療用組成物は、様々な作用機序を介して疾患を処置または防止するのに使用することができる。例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、対象における疾患を処置するのに使用することができる。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、対象における疾患を防止するのに使用することができる。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、対象における疾患を処置および防止するのに使用することができる。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、対象において疾患に対する免疫性を発生させることによって、対象における疾患を処置または防止するのに使用することができる。
【００４７】
[00106]例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、対象において疾患に対する免疫応答を惹起することができる。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、自然免疫、粘膜免疫、全身性免疫、細胞性免疫、体液性免疫、Ｔ細胞免疫、全身中和抗体の生産、ＩｇＧ応答の誘導、ＩｇＡ応答の誘導、ＩｇＭ応答の誘導、Ｔ細胞応答の誘導、肺および鼻の区画における粘膜ＩｇＡ応答の誘導、Ｔｈ１Ｔ細胞応答の誘導、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘導、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の誘導、ＮＫ細胞応答の誘導、インターフェロン遺伝子の刺激因子（ＳＴＩＮＧ）経路の活性化または阻害、またはそれらの組合せの少なくとも１つを介してこのような免疫性を惹起することができる。
【００４８】
[00107]一部の場合において、本明細書で開示される組成物は、少なくとも１：２５であるか、１：２５より大きい、対象の血清における平均希釈力価（例えば、病原体抗原またはその一部に特異的なＩｇＧまたはＩｇＡの）を惹起することができる。一部の場合において、本明細書で開示される組成物は、１：２５～１：５０、１：３０～１：５０、１：４０～１：５０、１：５０～１：６０、または少なくとも１：２５であるか、１：２５より大きいか、または１：６０未満の、対象の気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）における平均希釈力価（例えば、病原体抗原またはその一部に特異的なＩｇＧまたはＩｇＡの）を惹起することができる。
【００４９】
[00108]一部の実施態様において、本発明の開示の組成物は、例えば、対象において疾患に対する自然免疫応答を惹起することによって、対象における疾患に対する免疫性の発生を引き起こすかまたはそれにおいて役立つことができる。一部の実施態様において、惹起された自然免疫応答は、インターフェロン制御因子（ＩＲＦ）、核内因子κＢ（ＮＦ－κＢ）、またはそれらの組合せの活性化をもたらすことができる。一部の実施態様において、惹起された自然免疫応答は、Ｉ型およびＩＩＩ型インターフェロン（ＩＦＮ）の合成および分泌ならびにそれに続くＩＦＮ刺激遺伝子（ＩＳＧ）の上方制御をもたらすことができる。
【００５０】
[00109]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、例えば、粘膜免疫および／または全身性免疫を介して、対象において疾患に対する免疫性を発生させるのに使用することができる。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、粘膜免疫、全身性免疫、および細胞性免疫を介して対象において免疫性を発生させることにおいて役立ち得る。一部の実施態様において、全身性免疫は、抗原に対する中和抗体の生

産を介して発生させることができる。一部の実施態様において、細胞性免疫は、脾臓細胞および／または肺細胞において発生させることもできる。一部の実施態様において、粘膜免疫は、鼻の区画および肺におけるＩｇＡの生産、ならびに脾臓におけるＩｇＡ分泌細胞を介して発生させることができる。

【００５１】

[00110]本発明の開示の方法および治療用組成物は、様々な実施態様において多数の利点を提供することができる。例えば、一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、大きい臨床施設を必要とすることなく大人数に投与することができる。

【００５２】

[00111]さらに、一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、初期のウイルスリザーバーの定着（例えば、鼻の区画における）を防止でき、個体間のウイルスの拡がりおよび／または個体内での拡がりの制御を助けることができる。

【００５３】

[00112]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、呼吸器ウイルスによって媒介される回避の一次機序の１つの可能性があるインターフェロン活性化における欠乏を修正することができる。加えて、本発明の開示の治療用組成物は、コロナウイルスまたは他の呼吸器病原体などの多数の病原体に対して広域スペクトルを有する治療用組成物を開発するための万能な粘膜アジュバントを提供することができ、これはなぜなら、例えば、本発明の開示の治療用組成物は、一部の実施態様において、対象においてＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＴ細胞応答の１つまたはそれより多くを惹起するのに利用できるためである。

【００５４】

[00113]一部の実施態様において、本発明の開示の方法および治療用組成物は、獣医学的用途を有し得る。一部の実施態様において、獣医学的用途としては、様々なタイプの動物における疾患の処置または防止および他の類似の用途が挙げられる。

【００５５】

配合物および投与

[00114]本発明の開示の組成物は、様々な形態であってもよい。一部の場合において、本明細書に記載される組成物は、可溶化した液体として送達されてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、鼻腔内および／または吸入による対象への投与に好適である。一部の場合において、本明細書で開示される組成物の鼻腔内送達は、鼻腔内区画の組織を標的化するのに使用することができる。一部の場合において、本明細書で開示される組成物の吸入による投与は、肺区画の組織を標的化するのに使用することができる。

【００５６】

[00115]一部の場合において、シリンジまたは液体滴下装置を使用して、本明細書に記載される組成物を対象に鼻腔内投与することができる。一部の場合において、本明細書に記載される組成物を対象に投与することは、スプレーノズル、ネブライザー、および／またはアトマイザーの使用を含んでいてもよい。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、自己投与してもよい。

【００５７】

[00116]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物はまた、１種またはそれより多くの安定剤も含む。一部の実施態様において、安定剤としては、これらに限定されないが、抗酸化剤、金属イオン封鎖剤、紫外線安定剤、またはそれらの組合せが挙げられる。

【００５８】

[00117]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物はまた、１種またはそれより多くの界面活性剤も含む。一部の実施態様において、界面活性剤としては、これらに限定されないが、アニオン性界面活性剤、糖、カチオン性界面活性剤、双性イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、またはそれらの組合せが挙げられる。

【００５９】
[00118]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物はまた、１種またはそれより多くの賦形剤も含む。一部の実施態様において、賦形剤としては、これらに限定されないが、ラクトース、スクロース、デンプン粉末、アルカン酸のセルロースエステル、トレハロース、セルロースアルキルエステル、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウムおよびカルシウム塩、ゼラチン、アラビアゴム、トレハロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、またはそれらの組合せが挙げられる。
【００６０】
[00119]本発明の開示の治療用組成物は、様々な方法によって投与することができる。例えば、一部の実施態様において、投与は、これらに限定されないが、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹膜内投与、皮下投与、スプレーベースの投与、エアロゾルベースの投与、胚内投与、経口投与、眼球内投与、気管内投与、鼻腔内投与、吸入による投与、またはそれらの組合せなどの方法によって行われる。
【００６１】
[00120]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、単回用量で投与される。一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、複数回用量で投与される。一部の場合において、対象（例えば、動物対象）における疾患を処置または防止する方法は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～４０、４０～５０回の、または５０より多くの回数の用量を投与することを含んでいてもよい。一部の場合において、本発明の開示の組成物は、対象（例えば、動物対象）に投与されてもよい。一部の場合において、本発明の開示の方法は、本発明の開示の組成物を含む第１の用量および本発明の開示の組成物を含む第２の用量を対象に投与することを含んでいてもよい。一部の場合において、第１の用量の組成物は、第２の用量の組成物と同じである。一部の場合において、第１の用量の組成物は、第２の用量の組成物と異なる。一部の場合において、本発明の開示の方法は、第１の用量および第２の用量を、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも２日、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも７日、少なくとも１４日、または少なくとも２８日の間隔で対象（例えば、動物対象）に投与することを含んでいてもよい。一部の場合において、本発明の開示の方法は、第１の用量および第２の用量を、最大で６時間、最大で１２時間、最大で２４時間、最大で３６時間、最大で２日、最大で３日、最大で４日、最大で５日、最大で６日、最大で７日、最大で１４日、または最大で２８日の間隔で対象（例えば、動物対象）に投与することを含んでいてもよい。一部の場合において、本発明の開示の方法は、第１の用量および第２の用量を、６時間、１２時間、２４時間、３６時間、２日、３日、４日、５日、６日、７日、１４日、または２８日の間隔で対象（例えば、動物対象）に投与することを含んでいてもよい。一部の場合において、本発明の開示の方法は、複数の用量の第１の用量に続いて、各用量を、前の用量の投与後の、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも２日、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも７日、少なくとも１４日、または少なくとも２８日に対象（例えば、動物対象）に投与すること（例えば、この場合、複数の用量の各用量は、本発明の開示の１種またはそれより多くの組成物を含む）を含んでいてもよい。一部の場合において、本発明の開示の方法は、複数の用量の第１の用量に続いて、各用量を、最大で６時間、最大で１２時間、最大で２４時間、最大で３６時間、最大で２日、最大で３日、最大で４日、最大で５日、最大で６日、最大で７日、最大で１４日、または最大で２８日、対象（例えば、動物対象）に投与することを含んでいてもよい（例えば、この場合、複数の用量の各用量は、本発明の開示の１種またはそれより多くの組成物を含む）。一部の場合において、本発明の開示の方法は、複数の用量の第１の用量に続いて、各用量を、６時間、１２時間、２４時間、３６時間、２日、３日、４日、５日、６日、７日、１４日、または２８日、対象（例えば、

動物対象）に投与することを含んでいてもよい（例えば、この場合、複数の用量の各用量は、本発明の開示の１種またはそれより多くの組成物を含む）。

【００６２】

[00121]一部の場合において、本明細書に記載される組成物（例えば、脂質ベースの粒子、調節因子、および抗原を含む「ナノＳＴＩＮＧ」組成物）は、単独療法剤（例えば、対象において、疾患または状態、例えば病原体への曝露が原因の疾患を処置するための）として、製剤化および／または投与することができる。

【００６３】

[00122]一部の実施態様において、本発明の開示の治療用組成物は、他の治療的処置と組み合わせて投与される。一部の実施態様において、他の治療的処置としては、これらに限定されないが、免疫療法、ウイルス療法、標的化阻害、放射線療法、化学療法、またはそれらの組合せが挙げられる。一部の場合において、本明細書に記載される組成物は、処置レジメンにおいて、アジュバント（例えば、１種またはそれより多くの抗体、１種またはそれより多くの抗ウイルス剤処置、１種またはそれより多くのワクチン、１種またはそれより多くの小分子、１種またはそれより多くの核酸、および／または１種またはそれより多くのペプチドもしくはタンパク質、例えばインターロイキン（例えば、ＩＬ－２１））を含んでいてもよいし、および／またはそれと共に投与されてもよい（例えば、並行に、または非並行に投与される）。

【００６４】

対象

[00123]本発明の開示の治療用組成物は、それを必要とする対象に投与されてもよい。例えば、一部の実施態様において、対象は、哺乳動物（例えば、ヒト）である。一部の実施態様において、対象は、家畜である。例えば、対象は、イヌまたはネコであってもよい。一部の場合において、対象は、ウシ、ウマ、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、キリン、シマウマ、ライオン、トラ、またはクマであってもよい。一部の実施態様において、対象は、ヒトである。一部の実施態様において、対象は、呼吸器感染症を受けやすいかまたはそれに罹っている。一部の実施態様において、対象は、がんを受けやすいかまたはそれに罹っている。一部の場合において、対象は、病原体からの感染の１つまたはそれより多くの症状または疾患の罹患（例えば、呼吸器病原体による感染または呼吸器疾患の罹患）の呈示の結果として、処置に応じて選択することができる。例えば、対象は、持続的な咳、上昇した体温（例えば、額の皮膚の測定によって１００．４℃より高い）、体の寒気、痛みのある関節、呼吸もしくは一呼吸入れることの困難さ、肺内の液体貯留、疲労、頭痛、味覚もしくは嗅覚の喪失、またはＰＣＲ試験などの陽性診断試験などの１つまたはそれより多くの症状を有することに基づく処置に応じて選択することができる。一部の場合において、対象は、人口統計学的なリスク因子、例えば肥満、高齢（例えば、６５歳またはそれ以上）、免疫障害、または妊娠に基づいて、本明細書で開示される組成物での処置のために選択してもよい。一部の場合において、例えば、対象が、客との密接な相互作用、リスクがある集団との頻繁な相互作用、生物学的サンプルの取り扱い、または感染した可能性がある個体との密接な接触を含む職業についている場合、対象は、病原体による感染または疾患の罹患（例えば、呼吸器病原体による感染または呼吸器疾患の罹患）のリスクに基づく処置のために選択してもよい。

【００６５】

疾患の処置または防止

[00124]病原体とがんは、重大な健康上および経済上の懸念を引き起こしてきた。例えば、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）によって引き起こされるウイルス感染は、ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックを引き起こしたが、これは現在、世界で最も緊急の健康上および経済上の危機である。さらに、肺がんなどのがんは、高い死亡率を有する。

【００６６】

[00125]加えて、がん、および病原体によって引き起こされる感染を効果的に処置お

よび防止するためには、極めて限定的な治療選択肢しかない。例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２によって引き起こされるウイルス感染を処置または防止するための薬は現在のところ利用できない。

【００６７】

[00126]加えて、病原体によって引き起こされる感染を防止することを目的とした多くのワクチンは、自然免疫、例えば粘膜免疫または広範なＴ細胞免疫を付与せずに全身性免疫を惹起するように設計された筋肉内ワクチンである。鼻の区画は、肺に拡がる前に病原体によって破壊される必要がある第１のバリアであるため、このような筋肉内ワクチンは限界がある。

【００６８】

[00127]さらに、ワクチン製剤の有効性において高いレベルの予測できないことが存在する。第Ｉ相試験に到達するワクチンの場合、およそ３分の１しか、最終的なＦＤＡの承認を得ることができない。この成功率は、免疫系をプライミングする既存の技術を用いてさえも、病原体ごとの有効な免疫性の発生は、適正な抗原およびアジュバントの設計および最適化を必要とすることを示す。

【００６９】

[00128]ＦＤＡの承認を達成したとしても、ワクチンが有効であることを意味しない。ワクチンの開発は、ＣＯＶＩＤ１９パンデミックの状況でさえも長期にわたるプロセスであり、多数の問題がある。

【００７０】

[00129]プラットフォームの大半が抗原としてスパイクタンパク質を標的化するとしても、抗原設計の最適化は、ワクチンの効能を確実にするために望ましい。適切なワクチン設計を選びだすことにおける困難さは、ＨＩＶ－１、Ｃ型肝炎およびマラリアで際立っており、それらにおいて、数十年の努力および複数の候補にもかかわらず、ワクチンはうまくいかなままである。

【００７１】

[00130]さらに、呼吸器病原体に関して、鼻の区画は、肺に拡がる前に病原体によって破壊される必要がある第１のバリアである。しかしながら、既存の筋肉内ワクチンは、自然免疫、例えば粘膜免疫を付与するなく全身性免疫を惹起するように設計される。

【００７２】

[00131]したがって、様々な疾患、例えば病原体によって引き起こされる感染や様々な種類のがんを処置および防止するための安全で長持ちする治療用組成物が緊急に必要である。例えば、呼吸器病原体によって引き起こされた世界的流行（例えば、コロナウイルス、例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２によって引き起こされるウイルス感染）を処置または防止するための安全で長持ちする治療用組成物が緊急に必要である。本発明の開示の多数の実施態様は、前述の必要性に取り組むものである。

【００７３】

[00132]本発明の開示の治療用組成物および方法は、疾患または状態（例えば、病原体に関連する疾患または状態）を処置または防止するのに利用することができる。例えば、一部の実施態様において、疾患は、病原体によって引き起こされる感染であってもよい。一部の場合において、疾患は、呼吸器疾患であってもよい。一部の実施態様において、病原体は、呼吸器病原体であってもよい。一部の実施態様において、呼吸器病原体は、ウイルスであってもよい。一部の実施態様において、ウイルスは、インフルエンザウイルス、インフルエンザＡウイルス、インフルエンザＢウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、呼吸系発疹ウイルス、ライノウイルス、ＤＮＡウイルス、ＲＮＡウイルス、またはそれらの組合せであってもよい。

【００７４】

[00133]一部の実施態様において、病原体は、コロナウイルスである。一部の実施態様において、コロナウイルスとしては、これらに限定されないが、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡ

ＲＳｒ－ＣｏＶ）、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）、ヒトコロナウイルスＮＬ６３（ＨＣｏＶ－ＮＬ６３）、ヒトコロナウイルスＯＣ４３（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１（ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の変異体（例えば、２０Ａ．ＥＵ１、またはスパイク変異体Ｄ６１４Ｇ）、またはそれらの組合せが挙げられる。

【００７５】

[00134]一部の実施態様において、対象における処置または防止しようとする疾患は、がんである。一部の実施態様において、がんは、気管がん、肺がん、気管支がん、上皮がん、血液のがん、乳がん、黒色腫、卵巣がん、婦人科系がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、神経膠腫、肉腫、膠芽腫、またはそれらの組合せであってもよい。一部の場合において、がんは、肺がんであってもよい。

【実施例】

【００７６】

実施例１．以下を含む脂質ベースの粒子の調製および特徴付け

[00135]この実施例は、対象における疾患（例えば、呼吸器疾患）を処置または防止するための組成物において有用な、ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子およびスパイクタンパク質抗原を含む脂質ベースの粒子の調製および特徴付けを記載する。呼吸器の区画内の免疫系の効率的なプライミングを容易にするために、ＳＴＩＮＧアゴニストを、負電荷を有するリポソーム内にカプセル化して、リポソーム、ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子、およびリポソームの表面と会合する抗原を含む組成物（「ナノＳＴＩＮＧ」）を得た（図１を参照）。

【００７７】

[00136]リポソームは、１０：１：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていた。１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＰＰＧ）、および１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００）を、アバンティポーラーリピッド（Avanti Polar Lipids、アラバマ州アラバスター）から得た。コレステロールを、シグマアルドリッチ（Sigma Aldrich、ミズーリ州セントルイス）から得た。リポソームを調製するために、脂質をクロロホルム（$CHCl_3$）およびメタノール（CH_3OH）に混合し、真空ロータリーエバポレーターによって、４５℃でおよそ８０分間溶液を蒸発させた。得られた脂質薄膜を、全ての有機溶媒が蒸発するまで乾燥させた。予め温めたｃＧＡＭＰ溶液（ＰＢＳ緩衝液中の０．３ｍｇ／ｍｌのｃＧＡＭＰ、ｐＨ７．４）を添加することによって、脂質フィルムを水和した。ＳＴＩＮＧアゴニストである２’－３”環状グアノシン一リン酸アデノシン一リン酸（ｃＧＡＭＰ）を、ケミーテック（Chemietek、インディアナ州インディアナポリス）から得た。

【００７８】

[00137]水和した脂質を、６５℃の上昇させた温度で追加の３０分混合し、次いで凍結融解サイクルに供した。混合物をブランソン（Branson）のソニケーターを使用して、４０ｋＨｚで６０分音波処理した。遊離の捕獲されなかったｃＧＡＭＰを、アミコン（Amicon）限外ろ過ユニットによって、１０ｋＤａの分子量カットオフを使用して除去した。ｃＧＡＭＰ－リポソームをＰＢＳ緩衝液を使用して３回洗浄した。ろ液中のｃＧＡＭＰ濃度を、Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５のＴａｋｅ３　Ｍｉｃｒｏ－Ｖｏｌｕｍｅ吸光度分析器（バイオテック（BioTek））によって、２６０ｎｍでのｃＧＡＭＰの検量線に対して測定した（図３６Ａ）。リポソームにカプセル化されたｃＧＡＭＰの最終濃度およびカプセル化効率を、ろ液中の遊離の薬物の濃度（図３６Ｂに示される標準曲線）を引くことによって計算した。

【００７９】

[00138]ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（「Ｓタンパク質」）単量体または代替として三量体の新たに水和した凍結乾燥形態を、ＳＴＩＮＧａ－リポソーム懸濁液と室温で１０分間混合して、タンパク質をリポソーム上に吸着させた。製剤化した組成物を４℃で貯蔵し、最長２ヶ月間使用した。安定性決定のために、ＳＴＩＮＧアゴニスト－リポソーム懸濁液を４℃で１１ヶ月貯蔵した。平均粒径、多分散性指標、およびゼータ電位を、Ｌｉｔｅｓｉｚｅｒ　５００によって室温で特徴付けた。動的光散乱法（ＤＬＳ）分析は、リポソームおよびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ＳＴＩＮＧａ」）調節因子、ｃＧＡＭＰを含むナノＳＴＩＮＧ組成物の平均粒径が８１ｎｍであり、多分散性指標が０．２１であった（図３３Ｂ）ことを示し、一方でＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子またはスパイクタンパク質抗原が欠如したブランクリポソームのサイズは１１０ｎｍであった（図３３Ａ）。ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子をカプセル化したリポソームを含み、リポソームの外部表面と会合するＳタンパク質三量体を含むナノＳＴＩＮＧ組成物の平均粒径は１０５ｎｍであり、多分散性指標は０．２４であった（図３３Ｃ）。平均のリポソームのゼータ電位は、カプセル化されたＳＴＩＮＧアゴニスト有り（－３５ｍＶ）（図３３Ｅ）および無し（－６８ｍＶ）（図３３Ｄ）の両方でマイナスであった。ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子をカプセル化したリポソームを含み、リポソームの外部表面と会合するＳタンパク質三量体を含むナノＳＴＩＮＧ組成物の場合、リポソームの平均ゼータ電位は、－３０ｍＶであった（図３３Ｆ）。ナノＳＴＩＮＧの安定性を試験したところ、データは、粒度の保存および凝集体の非存在によって証明されたように、それらが４℃で２ヶ月の貯蔵後（図３４Ａ）および４℃で１１ヶ月より多く安定であったことを示した（図３４Ｃ）。リポソームの表面電荷も、４℃で２ヶ月の後（図３４Ｂ）および４℃で１１ヶ月の後（図３４Ｄ）で変わらなかった（－５５ｍＶ）。まとめると、これらの結果は、負電荷を有するリポソームがＳＴＩＮＧａを効率的にカプセル化し、優れた安定性を有していたことを確立した。

【００８０】

[00139]本発明者らは、免疫原として、フューリン切断部位に突然変異を含有するＳタンパク質の凍結乾燥した組換え三量体細胞外ドメインを使用した（図４Ａ）。Ｓタンパク質の大規模なグリコシル化によって予想された通り、ＳＤＳ－ＰＡＧＥは、還元条件下で、タンパク質が１８０～２５０ｋＤａの間に移動したことを確認した（図４Ｂ）。

【００８１】

[00140]一段階での混合および免疫化アプローチを使用して、三量体Ｓタンパク質およびＳＴＩＮＧ調節因子をカプセル化したリポソームを含むナノＳＴＩＮＧ三量体Ｓタンパク質組成物（ナノＳＴＩＮＧ三量体）配合物を調製した。ナノＳＴＩＮＧ懸濁液を、新たに再水和した三量体Ｓタンパク質と共に、室温で穏やかにかき混ぜながら穏やかに混合して、タンパク質をリポソーム上に吸着させた。吸着した三量体Ｓタンパク質（ナノＳＴＩＮＧ三量体）は、１０５ｎｍの平均粒径（図３３Ｃ）および－３０ｍＶの平均ゼータ電位（図３３Ｆ）を表し、多分散性指標は０．２４であり、ナノＳＴＩＮＧ（８１ｎｍ、－３５ｍＶ）よりわずかに大きく、それほど負電位ではなかった。まとめると、これらの結果は、組成物の成分が安定であり、安定なナノ微粒子のコロイド状の形態で容易に製剤化されることを示した。

【００８２】

[00141]Ｓタンパク質の三量体の形態は、一部の場合において溶液中で凝集体する可能性があるため、三量体Ｓタンパク質の２つの異なる配合物、すなわち２０℃で貯蔵された凍結乾燥形態および溶液形態を試験した。凍結乾燥形態は、一旦水和させＤＬＳによってすぐに測定したところ、６ヶ月（２５℃で１ヶ月、および－２０℃で５ヶ月）貯蔵された場合であっても、凝集の証拠を示さなかったが（図３５Ｂ）、それに対して三量体Ｓタンパク質の溶液形態は、－２０℃で１週間後であっても、凝集したタンパク質の存在を示した（＞１００ｎｍで第２の粒子ピークの存在、多分散性指標＝０．２８）（図３５Ａ）。これらの結果は、凍結乾燥したタンパク質は凝集せず、安定な配合物の基剤を形成できることを例示する。

【００８３】

実施例２．ナノＳＴＩＮＧ－Ｓ組成物の定量的酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）分析

[00142]この実施例は、ナノＳＴＩＮＧ組成物のリポソーム粒子上におけるＳタンパク質の吸着を測定するためのＳタンパク質の定量的ＥＬＩＳＡの使用を示す。

【００８４】

[00143]血清または他の生体液中の抗Ｓタンパク質抗体力価を、ＥＬＩＳＡを使用して決定した。簡単に言えば、１μｇ／ｍｌのスパイクタンパク質（シノバイオロジカル（Sino Biological）、米国ペンシルベニア州）を、ＰＢＳ中のＥＬＩＳＡプレート上に、４℃で一晩または３７℃で２時間コーティングした（コーニング（Corning）、米国ニューヨーク州）。プレートを、ＰＢＳ＋１％ＢＳＡ（フィッシャーサイエンティフィック、米国ペンシルベニア州）＋０．１％のポリソルベート２０（Ｔｗｅｅｎ２０（商標）、米国メリーランド州のシグマ－アルドリッチから）で室温で２時間ブロックした。洗浄後、実施例１に記載の通りに調製したサンプルを異なる希釈率で添加した。捕獲された抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート抗マウスＩｇＧ（ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズ（Jackson ImmunoResearch Laboratories）、５，０００に対して１；米国ペンシルベニア州）、抗マウスＩｇＡ（ベチルラボラトリーズ（Bethyl Laboratories）、１０，０００に対して１；米国テキサス州）、およびインビトロジェン（Invitrogen）（米国カリフォルニア州）からのマウス全ＩｇＡ　ＥＬＩＳＡキットからのマウスＩｇＡに対する検出抗体（２５０に対して１）によって検出した。陽性対照（抗Ｓ　ＩｇＧ）を、アベオミクス（Abeomics、米国カリフォルニア州）から得た。

【００８５】

[00144]リポソーム上に吸着したタンパク質の割合を推測するために、三量体Ｓタンパク質（１０μｌ、１μｇ／μｌ）を、ナノＳＴＩＮＧ（２０μｇ）と共に穏やかに混合し、室温で１０分インキュベートした。混合物を２０，０００×ｇで４０分遠心分離して、ペレットを分離し、上清を除去した。ペレットをＰＢＳ（２５μｌ）中に再懸濁し、再び遠心分離して、ペレットを収集した。全ての上清を合わせ、体積を測定した。総Ｓタンパク質、Ｓタンパク質と共に堆積したアジュバントのペレットの割合、および合わさせた上清の割合を、定量的なＳタンパク質ＥＬＩＳＡを使用して定量化した。Ｓタンパク質定量的ＥＬＩＳＡの結果から、６１．５％（２つの独立したタンパク質調製物の平均）のＳタンパク質がリポソーム上に吸着していたことを確認される。

【００８６】

実施例３．インビボでの毒性試験

[00145]この実施例は、実施例１に記載された通りに調製された組成物で処置したマウスにおける体重、罹患率、および過剰炎症性症状への作用の分析を示す。

【００８７】

[00146]雌の７～９週齢のＢＡＬＢ／ｃマウスを、チャールス・リバー・ラボラトリーズ（Charles River Laboratories）から購入した。単回用量の投与の前に、以下のスキームに従って、マウスをケタミンおよびキシラジンの腹膜内注射によって麻酔した：（１）ビヒクルのみのグループは、スパイクタンパク質抗原無しで２０μｇのリポソームおよび調節因子が投与され；（２）対照グループは、１０μｇの三量体スパイクタンパク質（Ｓタンパク質）が投与され；（３）ナノＳＴＩＮＧ三量体グループは、本明細書に記載された通りに製剤化された、ＳＴＩＮＧアゴニストｃＧＡＭＰをカプセル化した２０μｇのリポソームと会合した２０μｇの三量体のスパイクタンパク質を含むナノＳＴＩＮＧ三量体組成物が投与され；（４）単量体－ＳＴＩＮＧａグループは、本明細書に記載された通りに製剤化された、ＳＴＩＮＧアゴニストｃＧＡＭＰをカプセル化した２０μｇのリポソームと会合した４μｇの単量体スパイクタンパク質を含むナノＳＴＩＮＧ単量体組成物が投与された（図３および図５Ａを参照）。リポソームおよび調節因子のみを含みスパイクタンパク質抗原を含まない組成物が投与されたマウス（図５Ｂ）、スパイクタンパク

質抗原単独が投与されたマウス（図５Ｃ、黒色のボックス）、またはリポソームを調節因子および抗原と共に含む組成物が投与されたマウス（図５Ｃ、クローバーの葉のデータポイント）において、１４日にわたり体重の減少は観察されなかった。

【００８８】

実施例４．ナノＳＴＩＮＧ三量体組成物の投与へのインビボでの応答

[00147]この実施例は、本明細書に記載した通りナノＳＴＩＮＧ三量体組成物を投与した後のインビボでのＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＴ細胞応答を示す。

【００８９】

[00148]マウスの２つのグループを、図５Ａに示される方法に従って、ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子をカプセル化したリポソーム上に吸着したスパイクタンパク質三量体抗原（ナノＳＴＩＮＧ三量体、実施例１に従って調製された）の組合せまたはスパイクタンパク質三量体抗原そのもの（対照）のいずれかでの鼻腔内投与によって処置した。いずれの動物も体重の喪失を含むいかなる臨床症状も示さなかった。免疫化後の７日目（ｄ７）に、ナノＳＴＩＮＧ三量体を受けたマウスの１００％が血清変換され、１：６４０の平均希釈力価でのロバストな抗Ｓ　ＩｇＧレベルが検出された（図５Ｄ）。１５日目（ｄ１５）に、抗Ｓ　ＩｇＧ抗体の血清濃度は増加し、１：４，４００の平均希釈力価が検出された（図５Ｅ）。本発明者らは、ＧＦＰ－レポーターベースのシュードウイルス中和アッセイ（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、武漢－Ｈｕ－１シュードタイプ）によって測定した場合、血清の抗Ｓ抗体が、１：４１４の平均５０％の阻害用量（ＩＤ５０）で中和することを確認した（図５Ｍ）。

【００９０】

[00149]ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現するレポーターウイルスを以下のようにして生成した。免疫化されたマウスの血清中の中和抗体の力価を決定するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－Ｓシュードタイプ化レンチウイルス系を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の代用として使用した。安定なＡＣＥ－２およびＴＭＰＲＳＳ２を発現する２９３Ｔ細胞を、ｐＬＶＸ－ＡｃＧＦＰ１－Ｃ１、ｐＭＤＬｇ／ｐＲＲＥ、ｐＲＳＶ－Ｒｅｖ、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、武漢－Ｈｕ－１スパイク糖タンパク質遺伝子を含有するウイルスエンベロープタンパク質発現プラスミドｐＣＡＧＧＳ、またはＶＳＶ－Ｇエンベロープを発現するプラスミドｐＭＤ２．Ｇと共にトランスフェクトして、ＰｓＶ粒子を生成することによって、シュードタイプ化ウイルス（ＰｓＶ）ストックを生成した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体ヒトアンジオテンシン変換酵素ＩＩ（ＡＣＥ２）および原形質膜結合型ＩＩ型膜貫通型セリンプロテアーゼ、ＴＭＰＲＳＳ２（２９３Ｔ／ＡＣＥ２－ＴＭＰＲＳＳ２）を安定して発現する２９３Ｔ細胞を、１０％ウシ胎児血清が補充されたダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で培養した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、武漢－Ｈｕ－１スパイク糖タンパク質遺伝子を含有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ｐＣＡＧＧＳのための発現プラスミドを、ＢＥＩリソース（BEI Resources）（米国バージニア州マナサス）から得た。ＧＦＰを発現するレンチウイルスベクターをコードするプラスミド、ヘルパープラスミドｐＭＤＬｇ／ｐＲＲＥ、ｐＲＳＶ－Ｒｅｖ、およびＶＳＶ－Ｇタンパク質をコードするプラスミドｐＭＤ２．Ｇを、アドジェン（Addgene、米国マサチューセッツ州ウオータータウン）から得た。トランスフェクションの４８時間後に上清中のＰｓＶ粒子を回収し、ろ過し、－８０℃で貯蔵した。ＡＣＥ－２およびＴＭＰＲＳＳ２を発現する２９３Ｔ細胞を４８時間感染させ、ウイルスに感染した蛍光細胞のイメージングおよび計数のためのＣｅｌｉｇｏイメージングシステムを使用することによって、ＰｓＶの用量力価を決定した。ウイルス力価を、蛍光フォーカス形成単位（ＦＦＵ）／ウェルとして表した。

【００９１】

[00150]ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のための中和抗体（Ｎａｂ）滴定アッセイを以下のようにして実行した。ＡＣＥ２－ＴＭＰＲＳＳ２を発現する２９３Ｔ細胞を、Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｃｅｌｉｇｏイメージャーに適合する９６ウェルプレートの半分の領域で、１００μｌの完全培地中、ウェル当たり細胞1×10^{4}個の濃度で一晩培養した。アッセイの日

に、マウスからの熱で不活性化した血清を融解させ、６ポイントで、１：２０～１：６４０に無血清ＤＭＥＭで連続して２倍希釈した。９６ウェルプレートにおいて、５０μｌの希釈した血清を、５０μｌのＧＦＰを発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを発現するＰｓＶ（１５０～３００ＦＦＵ／ウェル）と混合し、３７℃で１時間インキュベートした。１時間後、この混合物を、ＡＣＥ２－ＴＭＰＲＳＳ２を発現する２９３Ｔ細胞に添加し、４８時間インキュベートした。標的細胞の感染を、Ｃｅｌｉｇｏイメージングシステムを使用して、ＦＦＵ／ウェルをイメージングおよび計数することによって決定した。各サンプルを３連のウェルで試験した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１ウサギＭａｂ（クローン番号００７、シノバイオロジカル、ペンシルベニア州ウェイン）を、中和活性のための陽性対照として使用し、ＶＳＶ－Ｇを発現するＰｓＶを、中和機能の特異性のための陰性対照として使用した。ＮＡｂの５０％阻害用量（ＩＤ５０）力価を、非線形回帰（グラフパッドプリズム（GraphPad Prism）、米国カリフォルニア州）を使用して計算した。

【００９２】

[00151]ＩｇＡによって媒介される保護は、呼吸器病原体に対する粘膜免疫の構成要素であり得るため、１５日目の脾臓中の抗体分泌細胞（ＡＳＣ）におけるＩｇＡ応答をＥＬＩＳｐｏｔアッセイによって分析した。ＩｇＡ分泌細胞を、イムノスポット（Immunospot、米国オハイオ州）からのマウスＩｇＧ／ＩｇＡデュアルカラーＥＬＩＳｐｏｔを製造元の説明に従って使用して検出した。脾臓中の総ＩｇＡ分泌細胞に関して、脾細胞を融解させ、即座に捕獲抗体がコーティングされたＥＬＩＳＰＯＴプレートにシーディングした。細胞を３７℃で１６～１８時間インキュベートし、それに続いて発色させた。抗ＳＩｇＡ生産細胞に関して、融解させた脾細胞を、完全培地［ＲＰＭＩ－１６４０（コーニング、米国ニューヨーク州）＋１０％ウシ胎児血清（Ｒ＆Ｄシステム（R&D System）、米国ミネソタ州）、１００μｇ／ｍｌのＮｏｒｍｏｃｉｎ（商標）（インビボジェン、米国カリフォルニア州）、２ｍＭのＬ－グルタミン、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ］、およびＢ－Ｐｏｌｙ－Ｓ（商標）（１：１０００希釈）中で、細胞４００万個／ｍｌで培養した。ウェルを、１０μｇ／ｍｌのスパイクタンパク質（シノバイオロジカル、米国ペンシルベニア州）で、４℃で一晩コーティングした。脾臓細胞を洗浄し、プレート上に３７℃で１６－１８時間シーディングした。図５－Ｉおよび図５Ｊは、ＥＬＩＳｐｏｔ（酵素結合免疫吸着スポット）アッセイを使用して検出されたそれぞれＩｇＡおよびＳタンパク質に特異的なＩｇＡを分泌する抗体分泌細胞（ＡＳＣ）の定量化を示す。ナノＳＴＩＮＧ三量体で処置したマウスは、対照グループと比較した、総ＩｇＡ分泌（図５－Ｉ）およびＳタンパク質特異的ＩｇＡ分泌（図５Ｊ）ＡＳＣの数の増加を示した。

【００９３】

[00152]Ｔ細胞応答は、抗体応答とは無関係の保護に寄与する可能性があると考えられるため、本発明者らは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶとＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２との間でＳタンパク質の高度に保存された領域を標的化する１５ｍｅｒのプールを使用して処置したマウスにおけるＴ細胞応答を評価した（図５Ｐ）。ＩＦＮγ　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを、マウスＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳｐｏｔベーシックキット（ＡＬＰ）を製造元（マブテック（Mabtech）、米国バージニア州）の説明書に従って使用して実行した。凍結した脾細胞または肺細胞を融解させ、さらなる培養を行わずにＥＬＩＳＰＯＴプレート上にシーディングした（ウェル当たり細胞1×10^5～3×10^5個）。脾細胞を、１．５μｇ／ｍｌ／ペプチドでのスパイクタンパク質ペプチドプール（ミルテニーバイオテク（Miltenyi Biotec）、ドイツ）と共に３７℃で１６～１８時間インキュベートした。ＥＬＩＳｐｏｔプレートを、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ（登録商標）Ｓ６　ＭＩＣＲＯアナライザーを使用して読んだ。１５日目に、ナノＳＴＩＮＧ三量体で免疫化した全ての５匹の動物が、細胞10^6個当たり平均１４４個のＩＦＮγスポットで脾性Ｔ細胞応答を示した（図５－Ｏ）。まとめると、これらの結果は、ナノＳＴＩＮＧ三量体を使用した単回の鼻腔内投与が、ロバストな血清中和抗体およびＴ細胞応答を惹起したことを示す。

【００９４】

[00153]これらの実験を三量体Ｓタンパク質を用いて繰り返して、長期にわたる免疫応答の速度論を追跡した。本発明者らは、Ｓタンパク質の三量体バージョンまたはアジュバント単独のいずれかでマウスのグループにワクチン接種した、２４日間にわたり７日毎に血清をサンプリングした。本発明者らの以前の実験と一致して、本発明者らは、１：１４４０の平均希釈力価を有する抗Ｓ　ＩｇＧレベルで、早期のセロコンバージョンを観察した。抗Ｓ　ＩｇＧ応答は、１４日目に１：８０００であり、２４日目にほんのわずか変化した（１：１２，０００）（図５Ｇおよび図５Ｈ）。２４日目に免疫動物において気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）中のＩｇＧ濃度も上昇した（１：４０の中央値）（図５Ｆ）。

【００９５】

[00154]血液および肺におけるＩｇＡ濃度を評価した。１：８０の平均希釈力価での血清の抗ＳＩｇＡ濃度（マウスでは二量体）が観察された（図５Ｋ）。ＢＡＬＦでは、ＩｇＡの濃度も上昇した（図５Ｌ）。最後に、肺における抗体も、１：２１３の平均５０％阻害用量（ＩＤ５０）で中和していたことが確認された（図５Ｎ）。まとめると、これらの結果は、ナノＳＴＩＮＧ三量体が、幅広い細胞性、全身性および粘膜免疫を惹起することを確立した。

【００９６】

実施例５．ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のための中和抗体（Ｎａｂ）滴定アッセイ

[00155]この実施例は、吸入された病原体に対して永続的な局所免疫を引き起こす気道内の局所的な誘導性の応答を調査する実験を示す。

【００９７】

[00156]安楽死のときにナノＳＴＩＮＧ三量体（「三量体－ＳＴＩＮＧａ」）で処置した動物およびスパイクタンパク質三量体だけで処置した動物から鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）を回収した。安楽死の後に、マウスから鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）を単離し、ＡＣＫ溶解緩衝液（サーモフィッシャーサイエンティフィック（Thermo Fisher Scientific）、マサチューセッツ州ウォルサム）中で３分間細胞をインキュベートすることによって赤血球を溶解させた。ＮＡＬＴサンプルを単一細胞懸濁液に転化し、フローサイトメトリーを使用して生きた単一細胞集団にソートし、ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ分析に供した（図６Ａ）。その後、単一細胞懸濁液を、ＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ＋２％ＦＢＳに再懸濁し、生細胞／死細胞の検出のために５０ｎＭのヘリックスＮＰブルー（Helix NP Blue）（バイオレジェンド、カリフォルニア州サンディエゴ）に曝露した。

【００９８】

[00157]ＢＤ　ＦＡＣＳＭｅｌｏｄｙセルソーター（ＢＤバイオサイエンス（BD Biosciences）、カリフォルニア州サンノゼ）を使用して、生細胞をソートした。この方法で利用されたフローサイトメトリーゲーティング戦略は、図６Ｂ、図６Ｃ、および図６Ｄに示される。ＮＡＬＴ細胞の各グループを、プロトコールに従って、ＢＤマウス免疫単一細胞マルチプレクシングキット（BD Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit）（ＢＤバイオサイエンス、カリフォルニア州サンノゼ）からのサンプルタグ（Sample-Tag）で別々に標識した。次いでライブラリー調製を、細胞約６０００個（各グループから細胞３０００個）の混合物を用いて始めた。全トランスクリプトームを、ＢＤラプソディーシステム（BD Rhapsody System）を使用して、ＢＤ「ｍＲＮＡ全トランスクリプトーム分析（ＷＴＡ）およびサンプルタグライブラリー調製プロトコール（mRNA Whole Transcriptome Analysis (WTA) and Sample Tag Library Preparation Protoco）」に従って調製した。最終的なライブラリーの品質および量を、アジレント（Agilent）４２００ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎシステムによって、それぞれ、アジレント高感度Ｄ５０００ＳｃｒｅｅｎＴａｐｅ（アジレント・テクノロジー（Agilent Technologies）、カリフォルニア州サンタクララ）およびキュビットdsDNAHSアッセイを使用したキュビット（Qubit）フルオロメーターを使用して評価した。最終的なライブラリーを３ｎＭ濃度に希釈し、ＨｉＳｅｑ　ＰＥ１５０シーケンサー（イルミナ（Illumina）、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用して、シーケンシングを実行した。ろ過し

た後、合計１，３９８個のｓｃＲＮＡ－ｓｅｑプロファイルを得た。
【００９９】
[00158]均一多様体近似および投影（ＵＭＡＰ）を利用することによって、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞および骨髄部分集団を同定した（図７Ａ）。部分集団は、Ｂ細胞部分集団（図７Ｂ、図７Ｃ、図７Ｄ）、Ｔ細胞部分集団（図７Ｅ、図７Ｆ、図７Ｇ）、ＮＫ細胞部分集団（図７Ｈ、図７－Ｉ、図７Ｊ）、および骨髄部分集団（図７Ｋ、図７Ｌ、図７Ｍ）のための確立された系統マーカーを使用して確認された。対照およびナノＳＴＩＮＧ三量体グループの両方における９５％より多くのｓｃＲＮＡ－ｓｅｑの結果が、ＴおよびＢ細胞と対応していた。これらの免疫細胞のサブセットで詳細な分析を実行した。
【０１００】
[00159]図８Ａ、図８Ｂ、および図８Ｃ～図９Ｍで示されるように、以下の４つのＢ細胞クラスターを同定した：Ｃｄ１９（図９Ａを参照）、Ｍｓ４ａ１（ＣＤ２０）（図９Ｂを参照）、Ｉｇｈｍ（図９Ｃを参照）を発現するナイーブＢ細胞；Ｃｄ６９（図８Ｃを参照）、Ｃｄ３８（図８Ｄを参照）、Ｃｄ８３（図８Ｅを参照）、Ｃｘｃｒ４（図８Ｆを参照）、Ｚｆｐ３６（図８Ｇを参照）、Ｅｒｇ１（図８Ｈを参照）、Ｅｇｒ３（図９Ｋを参照）、Ｉｒｆ４（図９Ｄを参照）、Ｆｏｓｂ（図９Ｇを参照）、Ｊｕｎ（図９Ｈを参照）、およびＦｏｓ（図９Ｍを参照）を発現する胚中心Ｂ細胞（ＧＣ　Ｂ細胞）；Ｃｄ３８を発現する活性化Ｂ細胞を含む中間のＢ細胞クラスター（図８Ｄを参照）；ならびにＳｅｃ６１ｂ（図９Ｆを参照）、Ｃａｓｐ３（図９Ｌを参照）、およびＴｒａｍ１（図９－Ｉを参照）を発現する、ただしＭｓ４ａ１の発現が欠如した（ＣＤ２０）（図９Ｂを参照）ＡＳＣ（形質芽球）。エフェクター部位ではなく誘導性部位としてのＮＡＬＴの役割と一致して、本発明者らは、投与後の１５日目に、ＩｇＡ（Ｉｇｈａ）を発現する細胞の極めて小さい部分集団しか検出しなかった（図９Ｊを参照）。対照およびナノＳＴＩＮＧ三量体グループの比較から、ＧＣ　Ｂ細胞の頻度におけるロバストな増加と、それに伴うナイーブＢ細胞における減少が示された（図８Ｂ）。これらの結果から、成功した鼻腔内のワクチン接種がＧＣ様Ｂ細胞の分化を促進したことが示唆された。
【０１０１】
[00160]次に、ＮＡＬＴ内のＴ細胞がＢ細胞分化を支持するかどうかを調査した。本発明者らは、Ｔ細胞内の３つのクラスターを同定した：１つは、Ｃｄ８ａを発現するＣＤ８＋Ｔ細胞部分集団であり（図１１Ｂを参照）、２つは、ＣＤ４＋Ｔ細胞部分集団であった（図１０Ａを参照）。ＣＤ４＋Ｔ細胞を、Ｃｄ４（図１１Ａを参照）およびＮｐｍ１（図１１Ｅを参照）を発現するナイーブＴ細胞（ナイーブ）；ならびにＣｄ６９（図１０Ｃを参照）、Ｉｌ６ｒａ（図１０Ｄを参照）、Ｎｒ４ａ１（Ｎｕｒ７７）（図１０Ｆを参照）、Ｔｃｆ７（ＴＣＦ１）（図１０Ｇを参照）、Ｌｅｆ１（図１０Ｈを参照）、Ｉｌ７ｒ（図１１Ｄを参照）、Ｆｏｓ（図１１Ｆを参照）、およびＪｕｎ（図１１Ｇを参照）を発現する、さらにメモリーマーカーＣｄ２７（図１０Ｅを参照）およびＣｄ２８（図１１Ｃを参照）も発現する、Ｔ濾胞性ヘルパー様（Ｔｆｈ）として分類した。対照とナノＳＴＩＮＧ三量体グループとの顕著な差は、Ｔｆｈ／ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞の比率における増加であった（図１０Ｂ）。
【０１０２】
[00161]ＧＣ　Ｂ細胞およびＴｆｈ細胞はナノＳＴＩＮＧ三量体ＮＡＬＴにおける優勢なクラスターの一つであるため、これらの細胞間の相互作用の性質をより詳細に調査した。まず、ＮＡＬＴにおける異なるＢおよびＴ細胞クラスター間の細胞間相互作用を可視化した。Ｔｆｈ細胞は、優勢な相互作用する細胞型であり、ＧＣ　Ｂ細胞クラスターと強く相互作用した（図１２Ａ）。分子レベルでの相互作用を調査するために、マウス遺伝子をそれらのヒトカウンターパートに変換し、相互作用するタンパク質対を、ＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢを使用して照合した。簡単に言えば、Ｔ細胞およびＢ細胞を、それらの部分集団およびグループ（処置された、または三量体－ＳＴＩＮＧａ）によって１４種の細胞型に類別した。ＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢで計算された統計的試験によれば、ｐ値＞０．０５のリガンド－受容体対を除き、有意な対を有する異なる細胞型間の関係を評価した。ＧＣ

Ｂ細胞とＴｆｈ細胞との間の相互作用を促進することがわかっている数種の十分に立証された受容体－リガンド対、ＢＡＦＦＲ（ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ）－ＢＡＦＦ（ＴＮＦＳＦ１３Ｂ）；ＩＣＯＳＬＧ－ＩＣＯＳ；ＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ；およびＩＬ２１－ＩＬ２１Ｒが、ＮＡＬＴ内でＢ細胞およびＴｆｈ細胞において相互に検出された（図１２Ｂ）。これらの結果は、ナノＳＴＩＮＧ三量体で免疫化されると、ＮＡＬＴは、ＧＣ様Ｔ細胞依存性活性化およびＢ細胞の分化を促進したことを示し、これは順に、呼吸器の区画において長続きする免疫を促進することができる。

【０１０３】

[00162]これらの結果は、抗原を含むナノＳＴＩＮＧ組成物は、鼻腔内サブユニットワクチンを含んでいてもよく、これは、全身中和抗体、肺および鼻の区画における粘膜ＩｇＡ応答、ならびにマウスの肺におけるＴｈ１Ｔ細胞応答を誘導できることを示す。シングルセルＲＮＡ－シーケンシングは、鼻関連リンパ組織（ＮＡＬＴ）内の胚中心のような方式でのＴおよびＢ細胞応答の併存的な活性化を確認し、さらに、免疫性のための誘導性部位としてのその役割を確認する。気道における免疫性を惹起する能力は、個体における感染の初期の定着を防止し、ヒト同士の疾患の伝染を防止する可能性を有する。

【０１０４】

実施例６．肺および鼻の区画におけるナノＳＴＩＮＧ－Ｓ投与への応答

[00163]この実施例は、インビボにおける本明細書で開示されるナノＳＴＩＮＧ組成物の投与に応答した、肺の区画におけるＴ細胞応答および鼻の区画におけるＩｇＡ応答を示す。

【０１０５】

[00164]単量体スパイクタンパク質（Ｓタンパク質）が幅広い免疫応答も惹起できるかどうかを調査するために、フューリン結合部位への突然変異および一対の安定化する突然変異（Ｌｙｓ９８６ＰｒｏおよびＶａｌ９８７Ｐｒｏ）を含有するＳタンパク質の単量体バージョンを使用した（図１３Ａ）。単量体タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥは、１３０～１８０ｋＤａの範囲のバンドを示した（図１３Ｂ）。４匹のマウスのそれぞれを、単量体スパイクタンパク質（Ｓタンパク質）、またはＳＴＩＮＧアゴニストｃＧＡＭＰをカプセル化したリポソームと会合した単量体スパイクタンパク質を含むナノＳＴＩＮＧ単量体組成物で処置した。実施例１に記載されたものと同じプロトコールを使用して、三量体スパイクタンパク質の代わりに単量体スパイクタンパク質を使用して、ナノＳＴＩＮＧ単量体組成物を製剤化した。動物のいずれにおいても体重の減少は観察されなかった（図１４）。１５日目に、動物の１００％が血清変換され、抗Ｓタンパク質（「抗Ｓ」）ＩｇＧ抗体の平均血清濃度は１：１０００であった（図１３Ｃ）。本発明者らは、血清抗Ｓタンパク質（「抗Ｓ」）抗体が１：１８８の平均ＩＤ５０で中和することを確認した（図１３Ｄ）。

【０１０６】

[00165]２匹の動物からの鼻の区画における抗体応答、および鼻洗浄液中の総ＩｇＡを、ＥＬＩＳＡによって測定した。両方の鼻洗浄液も、検出可能な抗Ｓ　ＩｇＡ抗体を７ｎｇ／ｍｌの平均濃度で有していた（図１３Ｆ）。粘膜免疫応答を惹起する単量体－ＳＴＩＮＧａの能力と一致して、本発明者らはまた、これらのマウスの脾臓においてＳ特異的ＩｇＡを分泌するＡＳＣの検出も確認した（図１５）。これらの結果は、単量体ＳＴＩＮＧａでのワクチン接種が、全身性免疫、肺および脾臓におけるＴ細胞応答、ならびに粘膜ＩｇＡ応答を惹起することを確立した。

【０１０７】

[00166]肺中のＴ細胞が、呼吸器病原体による肺感染からの保護に必要であることが、動物モデルで示されている。したがって、本発明者らは、ペプチドの保存されたプールでワクチン接種した動物の肺中のＳタンパク質特異的なＴ細胞応答を評価した（図５Ｐ）。脾臓において細胞10^6個当たり平均１００個のＩＦＮγスポットで、さらに、処置後の１５日目に、肺において細胞10^6個当たり平均２０６個のＩＦＮγスポットで、Ｔ細胞応答が検出された（図１３Ｅ）。

【０１０８】
[00167]まとめると、これらの結果は、ナノＳＴＩＮＧ単量体を使用した鼻腔内投与も、肺と脾臓の両方においてロバストな血清中和抗体およびＴ細胞応答を惹起したことを確立した。
【０１０９】
実施例７：ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物の調製および特徴付け
[00168]この実施例は、対象における疾患（例えば、呼吸器疾患）を処置または防止するための組成物において有用な、ＳＴＩＮＧアゴニスト調節因子およびヌクレオカプシド抗原を含む脂質ベースの粒子の調製および特徴付けを記載する。呼吸器の区画内の免疫系の効率的なプライミングを容易にするために、ＳＴＩＮＧアゴニストを、負電荷を有するリポソーム内にカプセル化して、リポソーム、調節因子、およびリポソームの表面と会合するヌクレオカプシド抗原を含む組成物（「ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ」）を得た（図１６を参照）。
【０１１０】
[00169]リポソームは、１０：１：１：１のモル比のＤＰＰＣ、ＤＰＰＧ、コレステロール、およびＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００で構成されていた。１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－（１’－ｒａｃ－グリセロール）（ＤＰＰＧ）、および１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＰＰＥ－ＰＥＧ２０００）を、アバンティポーラーリピッド（アラバマ州アラバスター）から得た。コレステロールを、シグマアルドリッチ（ミズーリ州セントルイス）から得た。リポソームを調製するために、脂質をクロロホルム（$CHCl_3$）およびメタノール（CH_3OH）に混合し、真空ロータリーエバポレーターによって、４５℃でおよそ８０分間溶液を蒸発させた。得られた脂質薄膜を、全ての有機溶媒が蒸発するまで乾燥させた。予め温めたｃＧＡＭＰ溶液（ＰＢＳ緩衝液中の０．３ｍｇ／ｍｌのｃＧＡＭＰ、ｐＨ７．４）を添加することによって、脂質フィルムを水和した。ＳＴＩＮＧアゴニストであれる２’－３”環状グアノシン一リン酸アデノシン一リン酸（ｃＧＡＭＰ）を、ケミーテック（インディアナ州インディアナポリス）から得た。
【０１１１】
[00170]水和した脂質を、６５℃の上昇させた温度で追加の３０分混合し、次いで凍結融解サイクルに供した。混合物をブランソンのソニケーターを使用して、４０ｋＨｚで６０分音波処理した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（２０１９－ｎＣｏＶ）ヌクレオカプシド組換えタンパク質（Ｎ－タンパク質）を、ＢＥＩリソース（米国バージニア州、番号ＮＲ－５３７９７）から購入し、２つの異なる用量（１０μｇおよび２０μｇ）で、ＳＴＩＮＧ－リポソーム懸濁液と組み合わせて試験した。組換えＮ－タンパク質を、ｃＧＡＭＰをカプセル化したナノＳＴＩＮＧリポソームと混合して、タンパク質をリポソームに吸着させた。遊離の捕獲されなかったｃＧＡＭＰを、アミコン限外ろ過ユニットによって、１０ｋＤａの分子量カットオフを使用して除去した。ｃＧＡＭＰ－リポソームをＰＢＳ緩衝液を使用して３回洗浄した。ろ液中のｃＧＡＭＰ濃度を、Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５のＴａｋｅ３Ｍｉｃｒｏ－Ｖｏｌｕｍｅ吸光度アナライザー（バイオテック）によって、２６０ｎｍでのｃＧＡＭＰの検量線に対して測定した（図３６Ａ）。リポソームにカプセル化されたｃＧＡＭＰの最終濃度およびカプセル化効率を、ろ液中の遊離の薬物の濃度（図３６Ｂに示される標準曲線）を引くことによって計算した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物を室温で維持して、タンパク質をリポソーム上に吸着させた。製剤化されたナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物を４℃で貯蔵し、最大２ヶ月間使用した。これらの結果から、製剤化されたＮ－タンパク質ＳＴＩＮＧ－リポソームワクチンは、ナノ微粒子のコロイド状の形態で存在することが示唆された。
【０１１２】
[00171]図１８は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｎ－タンパク質の概略図を示し、それが核酸（ＲＮＡ）結合ドメイン、Ｃ末端二量体化ドメイン、および核酸との相分離を促進でき

る３つの本質的に無秩序なドメインで構成されることを示す（図１８）。昆虫細胞由来組換えＮ－タンパク質を免疫原として使用し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、４７ｋＤのサイズを有する優勢なバンドを確認した（図１９）。

【０１１３】

実施例８：インビトロにおけるナノＳＴＩＮＧ組成物のインターフェロン応答への作用

[00172]この実施例は、ナノＳＴＩＮＧが、ＩＲＦ応答性プロモーター下流の分泌されたルシフェラーゼを安定して発現するＴＨＰ－１単球細胞を使用してインターフェロン調節因子（ＩＲＦ）応答を誘導することの実験的な確認を示す。

【０１１４】

[00173]ＴＨＰ－１デュアル細胞株の細胞（インビボジェン）を、加湿したインキュベーター中、３７℃および５％ＣＯ２で培養し、ＲＰＭＩ／１０％ＦＣＳ（コーニング、米国ニューヨーク州）中で増殖させた。ＴＨＰ－１デュアル細胞株培養物に、インビボジェンからのそれぞれの選択薬剤（１００μｇ／ｍｌゼオシン＋１０μｇ／ｍｌブラスチシジン）および対応する選択細胞増殖抑制剤を補充した。

【０１１５】

[00174]ルシフェラーゼレポーター酵素検出を含む細胞刺激実験の初めに、ＴＨＰ－１デュアル細胞を、９６ウェルプレート中で、１８０μｌの成長培地中細胞1×10^5個／ウェルで培養した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎの連続希釈物を増殖培地で作製し、その後、細胞を、１．２μｇ（マイクログラム）、２．３μｇ、４．７μｇ、および９．３μｇの濃度でのナノＳＴＩＮＧ－Ｎの存在下で、３７℃で２４時間インキュベートした。ＩＲＦ活性の検出のために、６時間、１２時間、および２４時間タイムポイントで、ウェル当たり１０μｌの培養上清を収集し、白色の（不透明な）９６ウェルプレートに移した。ウェル当たり５０μｌのＬｕｃ（商標）（インビボジェン）基質溶液を添加したその直後に、Ｃｙｔａｔｉｏｎ　７装置（Cytation 7、バイオテックインスツルメンツ社（Bio-Tek Instruments, Inc.））を使用して、発光を測定した（相対発光量（ＲＬＵ）で）。図２７は、１μｇのポリ（ｄＡ：ｄＴ）／ＬＶへの曝露後の６時間、１２時間、および２４時間における、カチオン脂質ベースのトランスフェクション試薬であるＬｙｏＶｅｃ（商標）（インビボジェン）（「ポリ（ｄＡ：ｄＴ）／ＬＶ」）と複合体化したＩ型インターフェロンインデューサーであるポリ（ｄＡ：ｄＴ）に応答したＴＨＰ－１デュアル細胞におけるインターフェロン感度係数（ＩＲＦ）応答の定量化を示す。

【０１１６】

[00175]ＴＨＰ－１デュアル細胞を接触させ、上清におけるルシフェラーゼ活性を測定することによって、２４時間、反応速度論測定を実行した（図２７）。ルシフェラーゼのＴＨＰ－１分泌は、６時間で低いレベルでのみ観察され、１２時間でナノＳＴＩＮＧ－Ｎの全ての濃度において一桁より多く増加し、２４時間で最も高い観察されたレベルに到達する（図１７）。２４時間に、全ての濃度のナノＳＴＩＮＧ－Ｎが、類似のＴＨＰ－１ルシフェラーゼ分泌を示した。

【０１１７】

実施例９：インビトロのヌクレオカプシドＤＮＡ結合アッセイ

[00176]この実施例は、プラスミドＤＮＡとの機能的な会合に関するＮ－タンパク質ヌクレオカプシドの能力を決定するために実行されたＤＮＡ結合研究を示す。

【０１１８】

[00177]分岐鎖ＰＥＩを、陽性対照（シグマケミカル社（Sigma Chemical Co.）、ミズーリ州セントルイス、番号４０８７２７）として使用した。ＤｉＹＯ－１（ＡＡＴバイオリクエスト（AAT Bioquest）番号１７５７９）およびプラスミド（ｐＭＢ５７．６）－ＤＮＡ複合体を、ＤＮＡとＤｉＹＯ－１とが等量で混合したところ、ビスインターカレートフルオロフォアの量子効率が、ｄｓ－ＤＮＡ（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ＝７．４中）に結合すると数桁レベルで増加して、それぞれ４００ｎＭおよび８ｎＭの最終濃度を達成する。使用前に、溶液を室温で５時間そのままにした。次に、ＰＥＩをＤＮＡ－ＤｉＹＯ－１溶液に異なる濃度で添加し（Ｒ＝０、１、２、

５、ここでＲは、ＰＥＩの窒素対ＤＮＡリン酸のモル比である）、ボルテックスで１分間混合し、２時間そのままにして平衡化させた。本発明者らは、それぞれ４７０ｎｍおよび５１０ｎｍの励起および発光波長で溶液の蛍光強度を測定した（図２０Ｂ）。この手順を、ＰＥＩの代わりにＳＡＲＳ－ＣｏＶ２ヌクレオカプシド（Ｎ－タンパク質）を用いて繰り返した（図２０Ａ）。これらの実験において、ヌクレオカプシド（Ｎ－タンパク質）を０．１および０．５μＭの濃度でＤＮＡ－ＤｉＹＯ－１溶液に添加した。

【０１１９】

[00178]Ｎ－タンパク質は、濃度依存性の方式でＤＮＡ－ＤｉＹＯ－１複合体の蛍光を消光することができた（図２０Ａ）。Ｎ－タンパク質は、０．５μＭの濃度で、公知の合成ポリカチオンＤＮＡ縮合剤であるポリエチレンイミン（ＰＥＩ）Ｒ＝５と同じ程度に（例えば、９６．３％）蛍光強度を減少させた（図２０Ｂ）。これらの結果は、組換えＮ－タンパク質が、ｄｓＤＮＡの結合剤に対して有力であることを確認した。

【０１２０】

実施例１０：ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物を使用した体液性応答の誘導

[00179]この実施例は、マウスにおける体液性応答へのナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物の作用のインビボでの試験を示す。

【０１２１】

[00180]雌の７～９週齢ＢＡＬＢ／ｃマウスを、チャールス・リバー・ラボラトリーズから購入した。組成物の投与の前に、マウスをケタミンおよびキシラジンの腹膜内注射によって麻酔した。免疫化のための２０μｇのリポソーム－ＳＴＩＮＧアジュバント、および１０μｇまたは２０μｇのヌクレオカプシドタンパク質（それぞれナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０）のいずれかを含むナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物の２つの異なる濃度のうち一方での単回鼻腔内投与により、動物を処置した。

【０１２２】

[00181]ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物の投与の後４週間にわたり７日毎に動物の体重を測定した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０またはナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０で処置した動物は、２７日間にわたり体重の減少または全体的な異常を受けていることが観察されなかった（図２８）。

【０１２３】

[00182]血清を、体液性免疫応答の検出のために、投与後７日目、１４日目、２１日目、および２７日目に対象から収集した（図２１Ａ）。血液を室温で１０分間維持して凝固を促進し、その後、血清サンプルを２０００ｇで５分間遠心分離した。遠心分離したサンプルから血清を収集し、それを－８０℃で貯蔵し、後でＥＬＩＳＡアッセイに使用した。鼻腔内投与後の２７日に、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）、肺、および脾臓を、対象から回収した。血清および他の収集された生物学的サンプルを、長期間貯蔵のためのプロテアーゼ阻害剤の存在下で、－８０℃で維持した。解離後、脾細胞および肺リンパ球をＦＢＳ＋１０％ＤＭＳＯ中で凍結し、さらなる使用まで液体窒素の蒸気相中ので貯蔵した。

【０１２４】

実施例１１：ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物を使用した体液性応答の誘導

[00183]この実施例は、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物での処置によって対象において誘導されたヌクレオカプシド特異的なＩｇＧおよびＩｇＡ応答を示す。

【０１２５】

[00184]ＥＬＩＳＡを使用して血清または他の生体液中の抗Ｎ－タンパク質の抗体力価を決定した。簡単に言えば、１μｇ／ｍｌのＮ－タンパク質（シノバイオロジカル、米国ペンシルベニア州）を、ＰＢＳ中のＥＬＩＳＡプレート（コーニング、米国ニューヨーク州）上に、４℃で一晩、３７℃で２時間コーティングした。次いでプレートを、ＰＢＳ＋１％ＢＳＡ（フィッシャーサイエンティフィック、米国ペンシルベニア州）＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０ＴＭ（シグマ－アルドリッチ、米国メリーランド州）で、室温で２時間ブロックした。洗浄した後、本発明者らは、異なる希釈でサンプルを追加した。本発明者らは、ＨＲＰコンジュゲート抗マウスＩｇＧ（ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズ、

５，０００に対して１；米国ペンシルベニア州）、抗マウスＩｇＡ（ベチルラボラトリーズ、１：１０，０００；米国テキサス州）、およびインビトロジェン（米国カリフォルニア州）によるマウス総ＩｇＡ　ＥＬＩＳＡキットからのマウスＩｇＡに対する検出抗体（１：２５０）によって、捕獲された抗体を検出した。本発明者らは、アベオミクス（Abeomics）（米国カリフォルニア州）から陽性対照（抗Ｎ　ＩｇＧ）を得た。

【０１２６】

[00185]免疫化後の１４日目（Ｄ１４）、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎを受けたマウスの１００％が血清変換され、１：６４０の平均希釈力価でのロバストな抗Ｎ　ＩｇＧレベルが検出された（図２９）。処置後の２７日目（Ｄ２７）に、血清サンプル中の抗Ｎ　ＩｇＧ抗体の血清濃度が増加し、１：４，４００の平均希釈力価が検出された（図２１Ｂ）。試験されたタイムポイントの全てにおいて両方の用量におけるＩｇＧ応答は類似しており、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０によって惹起されたＩｇＧ力価はナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０より高いにもかかわらず、有意な差はなかった（図２１Ｂ）。三量体ナノＳＴＩＮＧ－Ｓでのワクチン接種とは対照的に（７日目における早期応答）、ＩｇＧ応答の速度論は遅延し、応答は１４日目にしか観察されなかった。本発明者らはまた、免疫化されたマウスの気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－特異的な抗体応答も評価した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０からのＢＡＬＦサンプルは、それぞれ１：１５および１：８６の平均ＩｇＧ力価を示した（図２１Ｃ）。

【０１２７】

[00186]ＩｇＡによって媒介される保護は、呼吸器病原体に対する粘膜免疫の必須の要素である。血清におけるＩｇＡ応答を試験した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０をワクチン接種したマウスは、１：４０の平均希釈力価を有する血清ＩｇＡレベルを生じたナノ－ＳＴＩＮＧ－Ｎ２０をワクチン接種した動物は、１：５３の平均希釈力価を有する血清ＩｇＡレベルを生じた（図２１Ｄ）。まとめると、これらの結果は、Ｎ－タンパク質での免疫化が、血清および肺においてロバストな体液性免疫を生じたことを確立した。

【０１２８】

実施例１２：ＥＬＩＳＰＯＴおよびフローサイトメトリーのための脾臓および肺の処理

[00187]この実施例は、ナノＳＴＩＮＧ組成物で処置した対象から脾臓および肺組織を回収および処理するための方法を例示する。

【０１２９】

[00188]肺リンパ球の単離のために、肺の脈管構造を、右心室に注射されたCa^{2+}またはMg^{2+}非含有のＰＢＳ中の５ｍｌの１ｍＭのＥＤＴＡで灌流した。各肺を、メスを使用して１００～３００mm^2の断片にカットした。細かく刻んだ組織を、５ｍｌのＲＰＭＩ中、コラゲナーゼＤ（２ｍｇ／ｍｌ、ロシュ（Roche）番号１１０８８８５８００１）およびＤＮアーゼ（０．１２５ｍｇ／ｍｌ、シグマ番号ＤＮ２５）を含有する５ｍｌの消化緩衝液を含有するチューブに移し、水浴中、３７℃で１時間３０分間、毎１０分後にボルテックス混合を実行しながら置いた。残りの無傷の組織を、２１ゲージの針を通過させることにより（６～８回）粉砕した。細胞を９０分インキュベートし、５００μｌの氷冷した停止緩衝液（１×ＰＢＳ、０．１ＭのＥＤＴＡ）を添加して反応を止めた。４０μｍの使い捨てのセルストレーナー（ファルコン（Falcon））を使用して組織片および死細胞を除去し、遠心分離後に細胞を収集した。細胞ペレットを３ｍｌのＡＣＫ溶解緩衝液（インビトロジェン）中に再懸濁することによって赤血球を溶解させ、室温（ＲＴ）で３分間インキュベートし、続いて遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを５ｍｌの完全ＲＰＭＩ培地（コーニング、米国ニューヨーク州）中に再懸濁した。次に、脾臓をＲＰＭＩ培地中に収集し、シリンジプランジャーの硬い端部を使用して、４０μｍのセルストレーナーを介してホモジナイズした。その後、脾細胞を３ｍｌのＡＣＫ溶解緩衝液中で室温で３分間インキュベートして、赤血球（ＲＢＣ）を除去し、次いで４０μｍのストレーナーを通過させて、単一細胞懸濁液を得た。肺リンパ球および脾細胞を、トリパンブルー排除方法によって計数した。

【０１３０】

実施例１３：インビボにおけるＴ細胞応答へのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ヌクレオカプシドタンパク質の作用

[00189]この実施例は、全身性Ｔ細胞応答へのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ヌクレオカプシドタンパク質の鼻腔内投与の作用の評価を示す。

【０１３１】

[00190]対象に本明細書で開示されるＮ－タンパク質ベースの組成物（例えば、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物）を投与することの利点の１つは、Ｔ細胞応答を惹起する能力である。Ｔｈ１／Ｔｃ１分極化応答（例えば、ＩＦＮ－γ分泌を含む）は、保護的応答の指標であり得るそれに対してＴｈ２分極化応答（例えば、ＩＬ－４分泌を含む）は、ウイルス感染に対する抗体依存性増強（ＡＤＥ）を引き起こす可能性を有し得る。ワクチンで誘導されたＮ－特異的Ｔ細胞応答を評価するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ－タンパク質）での処置後の２７日目に、実施例１２に記載された通りに対象から脾細胞および肺リンパ球を回収し、処理した。

【０１３２】

[00191]脾臓および肺由来のＴ細胞を１５－ｍｅｒのペプチドのプールで刺激し、ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを使用して抗原特異的なＴ細胞を定量化した。ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを、マウスＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴベーシックキット（ＡＬＰ）およびマウスＩＬ－４　ＥＬＩＳＰＯＴベーシックキットを使用して実行した。細胞活性化対照のために、培養物を、１０ｎｇ／ｍｌの１２－ミリスチン酸ホルボール１３－酢酸ＰＭＡ（シグマ、米国ミシガン州セントルイス）および１μｇ／ｍｌのイオノマイシン（シグマ、米国ミシガン州セントルイス）で処置した。完全培地（１０％ＦＢＳが補充されたＲＰＭＩ）を、陰性対照として使用した。インビトロで、脾細胞および肺リンパ球（細胞３×10^5個）を、ＡＮ１８　ＩＦＮ－γ（１μｇ／ｍｌ、マブテック番号３３２１－３－２５０；）および１１Ｂ１１　ＩＬ－４（１μｇ／ｍｌ、マブテック番号３３１１－３－２５０）コーティング抗体でコーティングされたプレコーティングされたＥＬＩＳｐｏｔプレート（ミリポアからのＭＳＩＰＳ４Ｗ１０）で、主として、１．５μｇ／ｍｌ／ペプチドの濃度でのＳＡＲＳ－コロナウイルス２（ミルテニーバイオテク；１３０－１２６－６９９、ドイツ）のヌクレオカプシドリンタンパク質（「Ｎ」）の完全配列をカバーする、１１アミノ酸がオーバーラップする１５－ｍｅｒ配列からなるペプチドのプールで、３７℃で１６～１８時間刺激した。次の日、細胞を洗い落とし、それぞれビオチン化Ｒ４－６Ａ２抗ＩＦＮγ（マブテック番号３３２１－６－２５０）およびＢＶＤ６－２４Ｇ２抗ＩＬ－４（マブテック番号３３１１－６－２５０）検出抗体を使用してプレートを発色させた。ウェルを洗浄し、１：３０，０００に希釈したエクストラアビジン－ＡＬＰ（Extravidin-ALP）抗体（シグマ、米国ミシガン州セントルイス）で、室温で１時間処置した。洗浄した後、ウェルに７０μＬ／ウェルのＢＣＩＰ／ＮＢＴ－プラス基質（マブテック番号３６５０－１０）を添加することによってスポットを発色させた。プレートを発色のために２０～３０分インキュベートし、その後水で洗浄した。スポットを、Ｃｙｔａｔｉｏｎ　７（バイオテックインスツルメンツ社）を使用して定量化した。各スポットは、個々のサイトカイン分泌細胞に対応する。値は、測定された３連の値のバックグラウンドを引いた平均として示される。

【０１３３】

[00192]ナノ－ＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０で免疫化されたマウスは、ロバストで有意な脾性Ｔ細胞応答を示し、それぞれ細胞10^6個当たり平均１４３および１７６個のＩＦＮ－γスポットを有していた（図２２、点線の左側の灰色および黒色のバー）。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０で免疫化された動物は、肺において上昇したＴ細胞応答を示し、それぞれ10^6個当たり平均１０２および１５４個のＩＦＮ－γスポットを有していた（図２２、点線の右側の灰色および黒色のバー）。ＩＦＮ－γ（Ｔｈ１／Ｔｃ１）応答とは対照的に脾細胞または肺細胞のいずれにおいても、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０での処置において測定可能なＩＬ－４（Ｔｈ２）応答は観察されなかった（図２２）。まとめると、これらの結果

は、鼻腔内ワクチン接種が強いＴｈ１応答を惹起したことを確立し、Ｔｈ２応答の証拠はなかった。

【０１３４】

実施例１４：ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物で処置したＴ細胞におけるヌクレオカプシド特異的な記憶の決定

[00193]この実施例は、後続のフローサイトメトリー分析のためのナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物で処置した対象からの脾細胞および肺リンパ球の細胞表面および細胞内サイトカイン染色を示す。

【０１３５】

[00194]ＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、抗体媒介応答を補完することができ、抗体応答とは無関係に保護を提供することができる。これらの実験では、肺気道、肺実質、および脾臓におけるＮ－タンパク質特異的なメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化および機能を調査した。ナノＳＴＩＮＧ－Ｎで処置した、および対照で処置した動物からの脾臓および肺リンパ球を、１．５μｇ／ｍｌ／ペプチドの濃度でのヌクレオカプシドタンパク質－ペプチドプール（ミルテニーバイオテク；１３０－１２６－６９９、ドイツ）で、３７℃で１６～１８時間刺激して、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ組成物への曝露後の１８時間にヌクレオカプシドタンパク質特異的なＣＤ８＋Ｔ細胞応答を決定した。インキュベーションの最後の５時間、ブレフェルジンＡ（５μｇ／ｍｌ、ＢＤバイオサイエンス番号ＢＤ５５５０２９）を添加した。１０ｎｇ／ｍｌのＰＭＡ（シグマ、米国ミシガン州セントルイス）および１μｇ／ｍｌのイオノマイシン（シグマ、米国ミシガン州セントルイス）を陽性対照として使用した。ヌクレオカプシドペプチドなしの刺激は、バックグラウンド対照として役立てた。細胞を収集し、ＰＢＳ中のライブ／デッドアクア（Live/Dead Aqua）（サーモフィッシャー番号Ｌ３４９６５）で染色し、それに続いて抗ＣＤ１６／ＣＤ３２（サーモフィッシャー番号１４－０１６１－８５）でのＦｃ受容体を遮断し、次いでフローサイトメトリー染色緩衝液（ＦＡＣＳ）中の以下の抗体を用いて氷上で３０分間染色した：抗ＣＤ４　ＡＦ５８９（クローンＧＫ１．５；バイオレジェンド番号１００４４６）、抗ＣＤ８ｂ（クローンＹＴＳ１５６．７．７；バイオレジェンド番号１２６６０９）、抗ＣＤ６９（クローンＨ１．２Ｆ３；バイオレジェンド番号１０４５３７）、抗ＣＤ１３７（クローン１ＡＨ２；ＢＤ；番号７４０３６４）、抗ＣＣＲ７（クローン４Ｂ１２；バイオレジェンド番号１２０１２４）、抗ＣＤ４５（クローン３０－Ｆ１１；ＢＤ；番号５６４２７９）。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、次いで１００μｌのＩＣ固定緩衝液（ｅバイオサイエンス（eBioscience））で、室温で３０分間固定した。細胞を、２００μｌの透過化緩衝液（ＢＤサイトフィックス（BD Cytofix）溶液キット）で１０分間、透過性にした。細胞内染色を、抗体アレクサフルオロ４８８（Alexa Fluor 488）インターフェロン（ＩＦＮ）ガンマ（クローンＸＭＧ１．２；ＢＤ；番号５５７７３５）およびグランザイムＢ（クローンＧＢ１１；バイオレジェンド；番号５１５４０７）を使用して４℃で一晩実行した。次に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、ＬＳＲ－フォルテッサ（LSR-Fortessa）フローサイトメーター（ＢＤバイオサイエンス（BD Bioscience））で、図２３で例示されたＦｌｏｗＪｏ（商標）ソフトウェアバージョン１０．８（ツリースター社（Tree Star Inc）、米国オレゴン州アシュランド）およびフローサイトメトリーゲーティング戦略を使用して分析した。バックグラウンドを引いたサイトカイン陽性細胞の総数として結果を計算した。抗体濃度を滴定によって最適化した。

【０１３６】

[00195]エフェクター分子であるグランザイムＢ（ＧｚＢ）および活性化により誘導されたマーカーＣＤ１３７を利用して、脾臓および肺におけるＮ－タンパク質反応性ＣＤ８＋Ｔ細胞を同定した。エクスビボにおける上述したＮペプチドのプールでの再刺激は、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０およびナノＳＴＩＮＧ－Ｎ２０の両方でワクチン接種したマウスの脾臓において、活性化（ＣＤ８＋ＣＤ１３７＋）および細胞傷害性（ＣＤ８＋ＧｚＢ＋）Ｔ細胞の頻度における大幅な増加をもたらし、それより程度は低いが肺でもそれらの増加をもたらした（図２２）。ＣＤ１３７陽性ＣＤ８$^{+}$細胞のパーセンテージは、対照処置

細胞と比較して、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０で処置した脾細胞において増加した（図２４Ａ、図２４Ｂ、図２４Ｃ、および図２４Ｄを参照）。ＧｚＢ陽性ＣＤ８$^{+}$細胞のパーセンテージも、対照処置細胞と比較して、ナノＳＴＩＮＧ－Ｎ１０で処置した脾細胞において増加した（図２５Ａ、図２５Ｂ、図２５Ｃ、および図２５Ｄを参照）。肺に定着したＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の全体的な頻度は、免疫動物および対照グループ間で差はなかった（図２６Ａ、図２６Ｂ、図２６Ｃ、および図２６Ｄを参照）。総合すると、これらの結果は、肺および脾臓における鼻腔内免疫化細胞傷害性Ｔ細胞応答を確立した。

【０１３７】

実施例１５：キメラスパイクタンパク質またはＲＳＶ抗原タンパク質を含むナノＳＴＩＮＧ組成物を使用した免疫応答の誘導

[00196]この実施例は、キメラスパイクタンパク質抗原を含むナノＳＴＩＮＧ組成物（ナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ）で処置した対象およびＲＳＶ抗原を含むナノＳＴＩＮＧ組成物（ナノＳＴＩＮＧ－ＲＳＶ）で処置した対象に付与された総合的な免疫性を例示する。

【０１３８】

[00197]Ｃ末端ヒスチジンタグを含有する呼吸系発疹ウイルスＢ１からの融合糖タンパク質の組換え形態を、キンウワバ（Trichoplusia in）昆虫の幼虫のバキュロウイルス感染によって生産し、クロマトグラフ法によって精製した。

【０１３９】

[00198]血清を、ｃＧＡＭＰ調節因子と、アルファ変異体スパイクタンパク質三量体、（２）ベータ変異体スパイクタンパク質三量体、（３）ガンマ変異体スパイクタンパク質三量体（「ナノＳＴＩＮＧ－ｖａｒＳ」）、（４）アルファ変異体スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）の一部、または（５）ガンマ変異体スパイクタンパク質のＲＢＤ部分とをカプセル化したリポソームを含むナノＳＴＩＮＧ組成物（ナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ）で処置した対象から収集した。グループ（１）～（５）のそれぞれの組成物での処置後の２８日目に対象から得られたサンプルは、抗原で免疫化された、ただしアジュバント無しでの対照グループ動物での処置と比較して増加した抗原特異的なＩｇＧ力価を示す（図３０Ａ）。図３０Ｂは、スパイクタンパク質三量体抗原およびＳＴＩＮＧアゴニストが欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、アルファ変異体スパイクタンパク質三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含むナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物での処置後の２８日目に対象から得られた血清サンプルを使用した、キメラスパイクタンパク質三量体のアルファ変異体に対する血清由来ＩｇＡ反応性のＥＬＩＳＡ定量化を示す。ＩｇＡ力価は、対照で処置した対象からのサンプルと比較して、ナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物で処置した対象からのサンプルにおいて増加する。

【０１４０】

[00199]図３１Ａは、リポソームを含み、キメラスパイクタンパク質が欠如した対照組成物での処置に対する、それぞれペプチドプールの異なるスパイクタンパク質（Ｓタンパク質）変異体を含み、一緒になってＳタンパク質由来のペプチドプールの全てを表すナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物で処置した対象の肺サンプルにおけるＥＬＩＳｐｏｔアッセイを使用して定量化した場合のインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）応答を示す。インターフェロンガンマレベルは、対照で処置した動物の肺からのサンプルと比較してナノＳＴＩＮＧで処置した動物の肺サンプルにおいて有意に増加したことから、免疫刺激性ナノＳＴＩＮＧ組成物の作用がロバストであり、概して全ての抗原変異体にわたり有効であることが示される。図３１Ｂは、キメラスパイクタンパク質が欠如したリポソームを含む対照組成物で処置した対象のサンプルに対する、リポソーム、ガンマ変異体キメラスパイクタンパク質三量体抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニストを含むナノＳＴＩＮＧ－ＣｈｉｍＳ組成物で処置した対象の肺サンプルにおいて、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイを使用して定量化した場合のインターフェロンガンマ応答を示す。インターフェロンガンマレベルは、対照で処置した動物の肺からのサンプルに対して、ナノＳＴＩＮＧで処置した動物の肺サン

プルにおいて有意に増加したことから、対象免疫応答へのナノＳＴＩＮＧ組成物の作用が、個々の抗原変異体にも特異的であることが例示される。

【０１４１】

[00200]図３２Ａおよび図３２Ｂは、キメラスパイクタンパク質が欠如したリポソームを含む本明細書に記載される対照組成物での処置に対する、リポソーム、ＲＳＶ－Ｆ由来抗原、およびＳＴＩＮＧアゴニスト（「ナノＳＴＩＮＧ－ＲＳＶ」）を含む本明細書に記載される組成物での処置後のそれぞれ７日目および１４日目に対象から得られた血清を使用して実行されたＥＬＩＳＡアッセイにおけるＢ１型呼吸系発疹ウイルスＦタンパク質（ＲＳＶ－Ｆ）に対するＩｇＧの反応性を示す。ＲＳＶ抗原特異的なＩｇＧレベルは、対照で処置した動物からのサンプルと比較して、７日目と１４日目の両方に増加することから、総合的な免疫性が、抗原を含むナノＳＴＩＮＧ組成物での処置の後に対象に付与されたことが示される。

【０１４２】

[00201]別段の指定がない限り、本明細書で使用される全ての専門用語は、この主題が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。前述の一般的な説明と以下の詳細な説明はいずれも例示的であり説明的であり、特許請求された主題を制限しないことが理解されるであろう。

【０１４３】

[00202]本明細書で使用される章の見出しは、系統化する目的のためであり、記載された主題を限定するものとして解釈されないものとする。これらに限定されないが、特許、特許出願、論文、書籍、および専門書などの本出願で引用された全ての文書、または文書の一部は、それらの全体があらゆる目的で参照により明示的に本明細書に組み入れられる。組み入れられた文献および類似の資料の１つまたはそれより多くが、本出願に記載のその用語の定義と矛盾するように用語を定義している事象では、本出願が優勢である。

【０１４４】

[00203]本明細書で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈上明らかに別段の指示がない限り、複数形の形態も同様に含むことが意図される。例えば、特に別段の規定がない限り、言葉「１つの（ａ）」または「１つの（ａｎ）」は、「少なくとも１つの」を意味し、「または」の使用は、「および／または」を意味する。本明細書で使用される場合、用語「および／または」は、関連する列挙された項目の１つまたはそれより多くのありとあらゆる組合せを含む。用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および／または「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、または「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および／または「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、本明細書中で使用される場合、述べられた特徴、領域、整数、工程、操作、要素および／または成分の存在を特定するが、１つまたはそれより多くの他の特徴、領域、整数、工程、操作、要素、成分、および／またはそれらの群の追加の存在を排除しないことがさらに理解されるであろう。また「要素」または「成分」などの用語は、特に別段の規定がない限り、１つの単位を含む要素または成分と、１つより多くの単位を含む要素または成分の両方を包含する。

【０１４５】

[00204]Ａおよび／またはＢは、本明細書で使用される場合、ＡまたはＢの１つまたはそれより多く、およびそれらの組合せ、例えばＡおよびＢを包含する。ことが理解されるであろうにもかかわらず用語「第１の」、「第２の」、「第３の」などは、本明細書において様々な要素、成分、領域および／またはセクションを記載するために使用することができ、これらの要素、成分、領域および／またはセクションは、必ずしもこれらの用語によって限定されないものとする。これらの用語は、単に１つの要素、成分、領域またはセクションを別の要素、成分、領域、またはセクションと区別するために使用することができる。したがって、一部の場合において、本明細書で論じられる第１の要素、成分、領域またはセクションが、本発明の開示の教示から逸脱することなく第２の要素、成分、領域またはセクションと呼ばれる場合もある。

【０１４６】

[00205]用語「対象」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物を含む。哺乳動物としては、ラット、マウス、非ヒト霊長類、およびヒトなどの霊長類が挙げられる。

[00206]この開示にわたり、様々な実施態様が、範囲の様式で提示される。範囲の様式での記載は、単に便宜上と簡潔さのためであり、あらゆる実施態様の範囲への融通性のない限定として解釈されるべきではないことが理解されるものとする。したがって、範囲の記載は、文脈上明らかに別段の指示がない限り、具体的に開示された全ての可能性のある部分範囲に加えて、その範囲内の個々の数値から下限の単位の１０分の１までも含むとみなされるべきである。例えば、１～６などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲、例えば１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などに加えて、その範囲内の個々の値、例えば、１．１、２、２．３、５、および５．９も含むとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。これらの間にある範囲の上限および下限は、独立してより小さい範囲に含まれていてもよく、これもまた発明に包含され、述べられた範囲におけるあらゆる具体的に排除された限定に従う。述べられた範囲が限定の一方または両方を含む場合、そのような含まれる限定のいずれかまたは両方を排除した範囲も、文脈上明らかに別段の指示がない限り発明に含まれる。

【０１４７】

[00207]本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「約」、および「およそ」、または「実質的に」は、実施態様に応じて、それらの間の増分を含め、±０．１％、±１％、±２％、±３％、±４％、±５％、±６％、±７％、±８％、±９％、±１０％、±１１％、±１２％、±１４％、±１５％、または±２０％以下の数値の変動を指す。非限定的な例として、約１００ナノメートル（ｎｍ）は、実施態様に応じて、９５ナノメートル～１０５ナノメートル（これは、１００ナノメートルの±５％である）、９０～１１０ナノメートル（これは、１００ナノメートルの±１０％である）、または８５ナノメートル～１１５ナノメートル（これは、１００ナノメートルの±１５％である）の範囲を表す。

【０１４８】

[00208]前述の記載に特定の実施態様および実施例が提供されるが、本発明の主題は、具体的に開示された実施態様を超えて、他の代替の実施態様および／または使用、ならびにそれらの改変および均等物まで及ぶ。本明細書で開示されたいずれの方法またはプロセスにおいても、本方法またはプロセスの動作または操作は、いずれの好適な順番で実行でき、必ずしもいずれの特定の開示された順番に限定されない。様々な操作が、特定の実施態様の理解において有用であり得る方式で、複数の別個の操作として順に記載される場合があるが、記載の順番は、これらの操作が順番に依存することを暗に示すと必ずしも解釈されないものとする。加えて、本明細書に記載される構造、システム、および／またはデバイスは、統合された要素として具体化してもよいし、または別々の要素として具体化してもよい。

【０１４９】

[00209]様々な実施態様を比較する目的のために、これらの実施態様の特定の形態および利点が記載される。このような形態または利点の全てが、必ずしもいずれの特定の実施態様によって達成されるわけではない。したがって、例えば、様々な実施態様は、本明細書においても教示または示唆される可能性がある他の形態または利点を必ずしも達成しなくとも、本明細書において教示された通りに１つの利点または利点の群を達成または最適化するように行われてもよい。

【０１５０】

[00210]本発明の好ましい実施態様を本明細書で示し記載してきたが、このような実施態様は一例として提供されたに過ぎないことが当業者にとって明白であろう。当業者であれば、発明から逸脱することなく多数のバリエーション、変化、および置き換えをここで思いつくであろう。本発明の実施において本明細書に記載される本発明の実施態様の様々な代替物が採用される可能性があることが理解されるものとする。以下の特許請求の範囲は発明の範囲を定義すること、およびこれらの特許請求の範囲内の方法および構造なら

びにそれらの均等物は、それによって網羅されることが意図される。

【符号の説明】

【０１５１】

１０　組成物
１２　粒子
１４　抗原
１６　調節因子

【図面】

【図１】

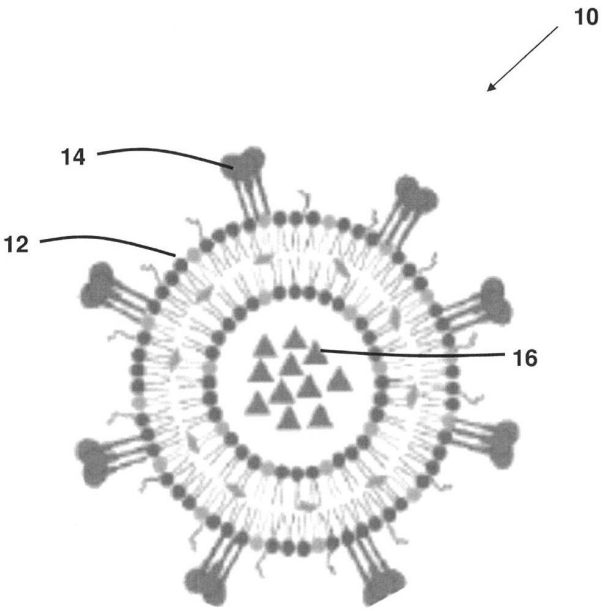


FIG. 1

【図２】

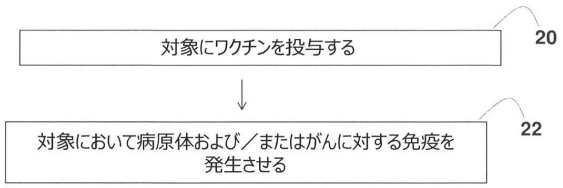


FIG. 2A

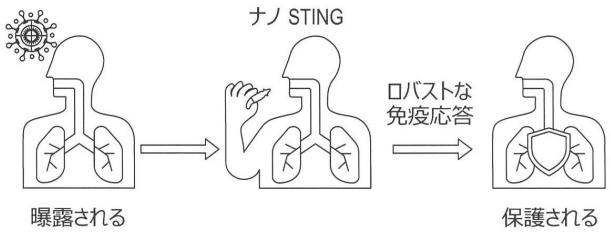


FIG. 2B

【図３】

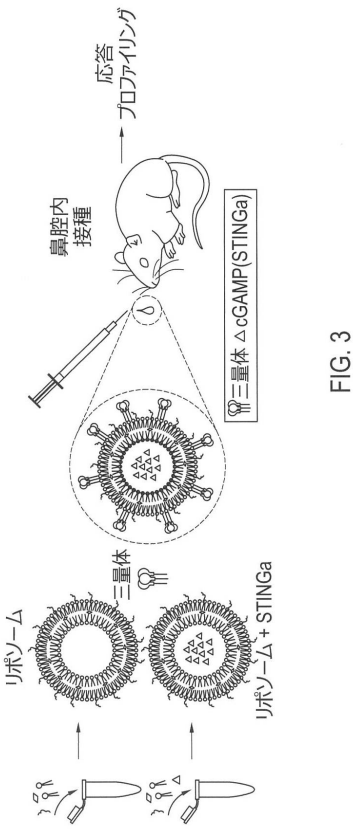


FIG. 3

【図４】

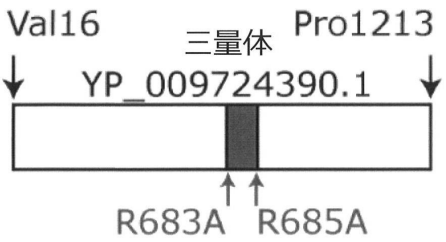


FIG. 4A

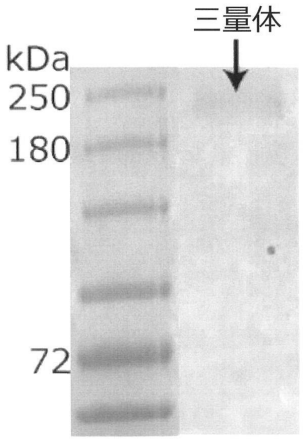


FIG. 4B

【図５－１】

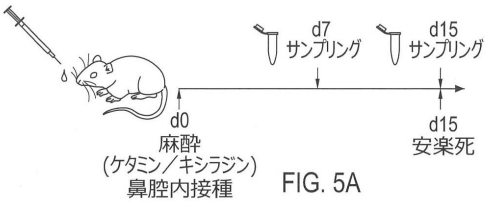


FIG. 5A

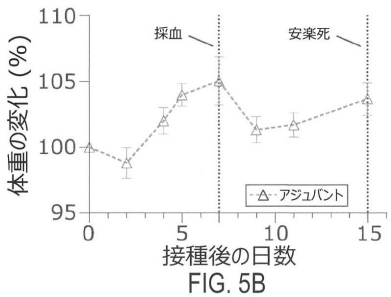


FIG. 5B

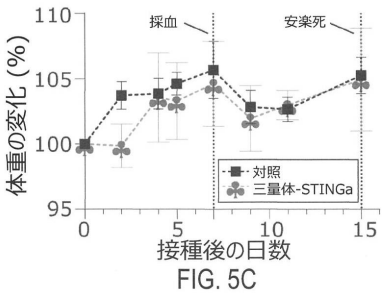


FIG. 5C

【図５－２】

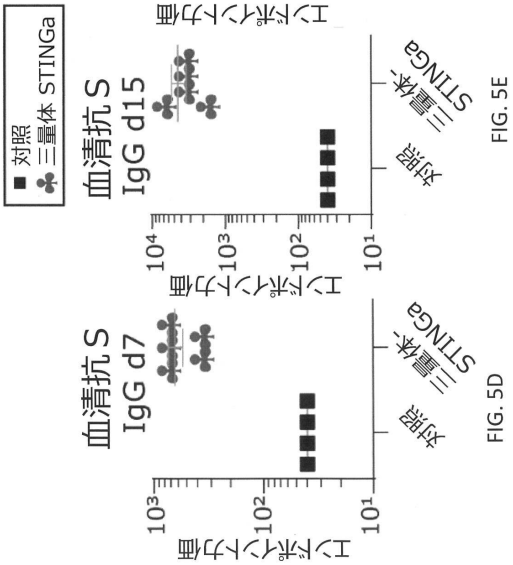


FIG. 5D

FIG. 5E

FIG. 5F

【図５－３】

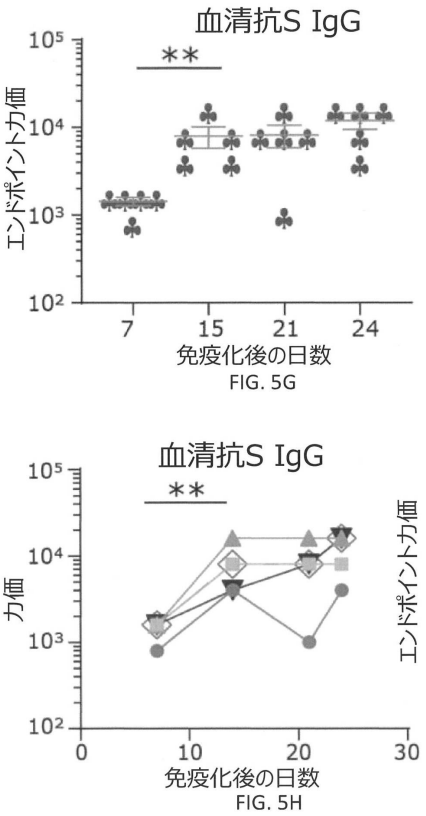


FIG. 5G

FIG. 5H

【図５－４】

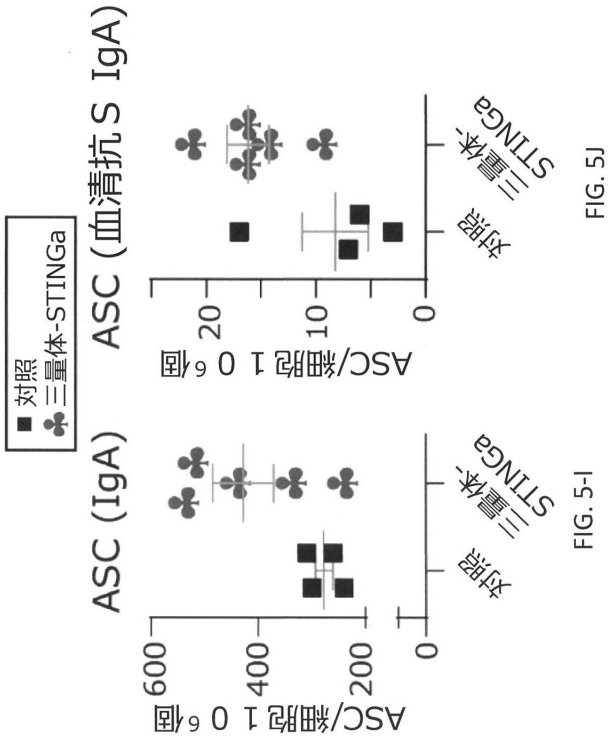


FIG. 5J

FIG. 5-I

【図５－５】

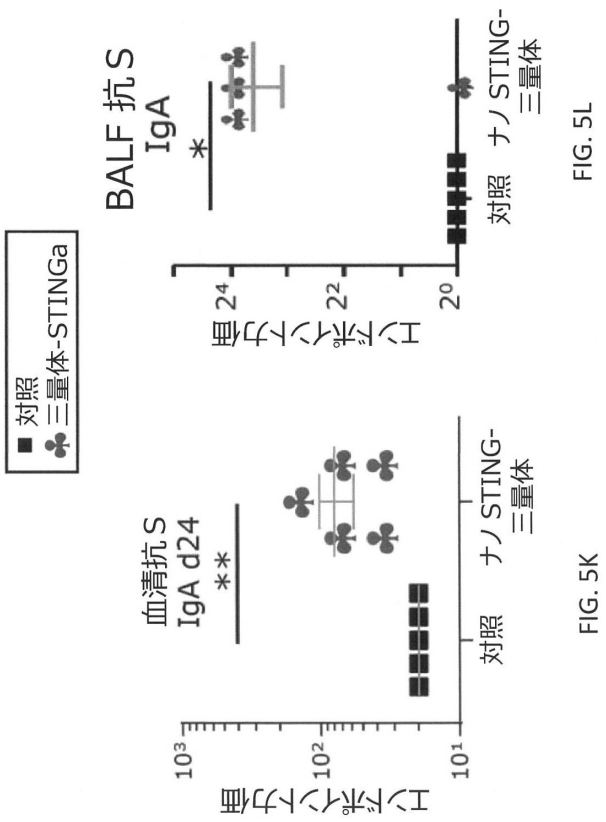


FIG. 5K

FIG. 5L

【図５－６】

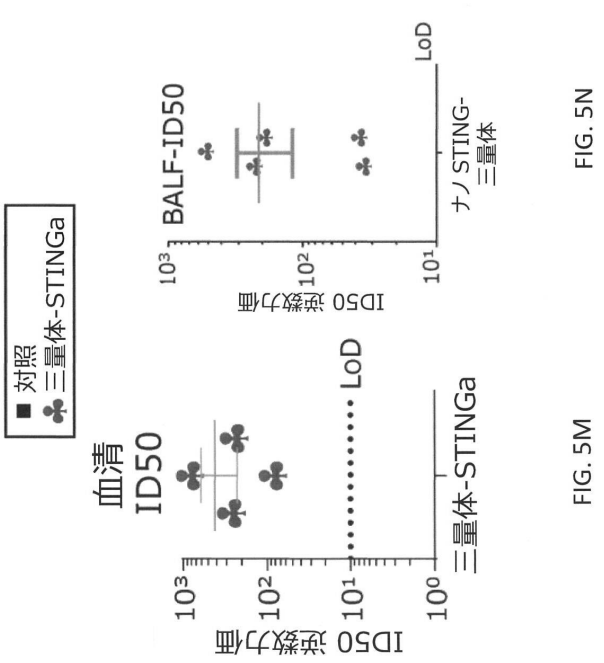


FIG. 5M

FIG. 5N

【図５－７】

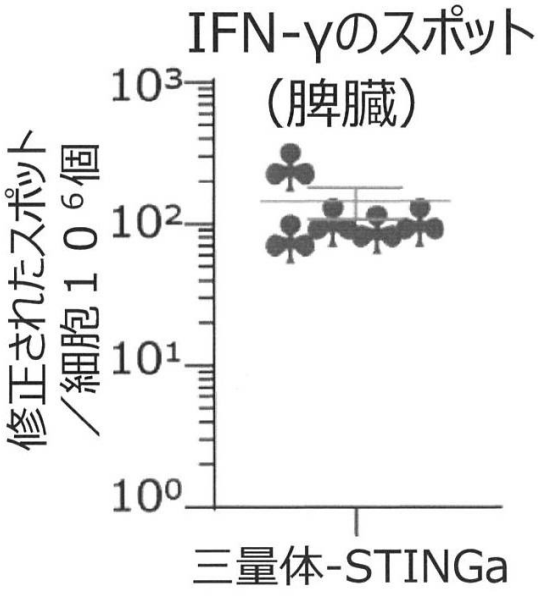


FIG. 5-O

【図５－８】

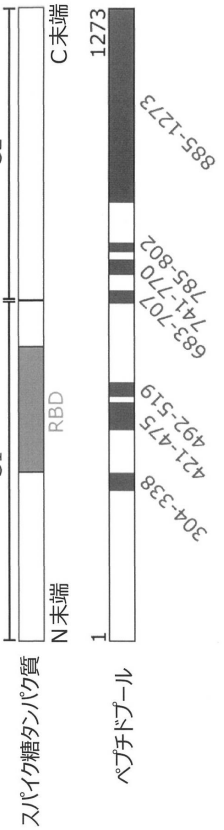


FIG. 5P

【図６－１】

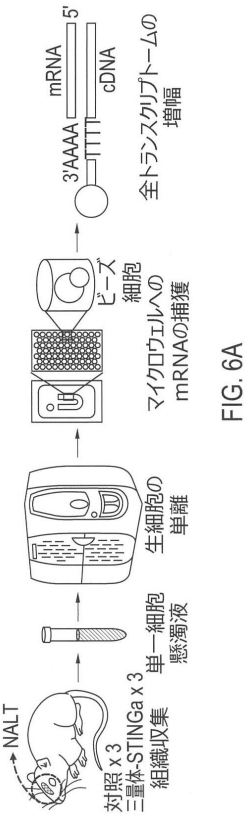


FIG. 6A

【図６－２】

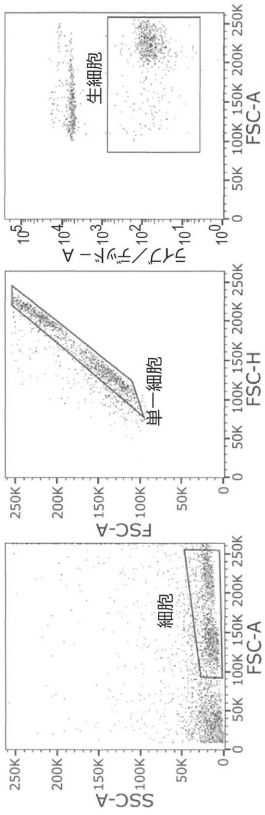


FIG. 6B

FIG. 6C

FIG. 6D

【図７－１】

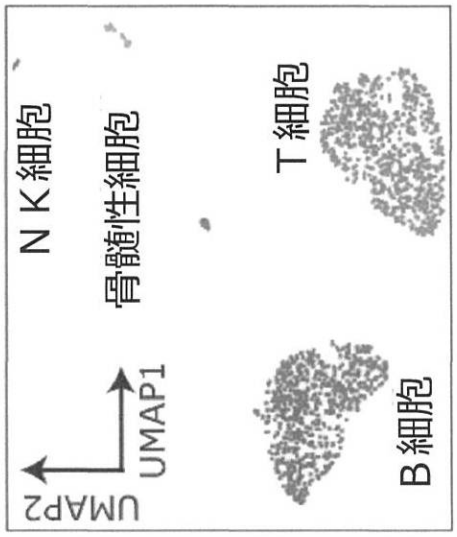
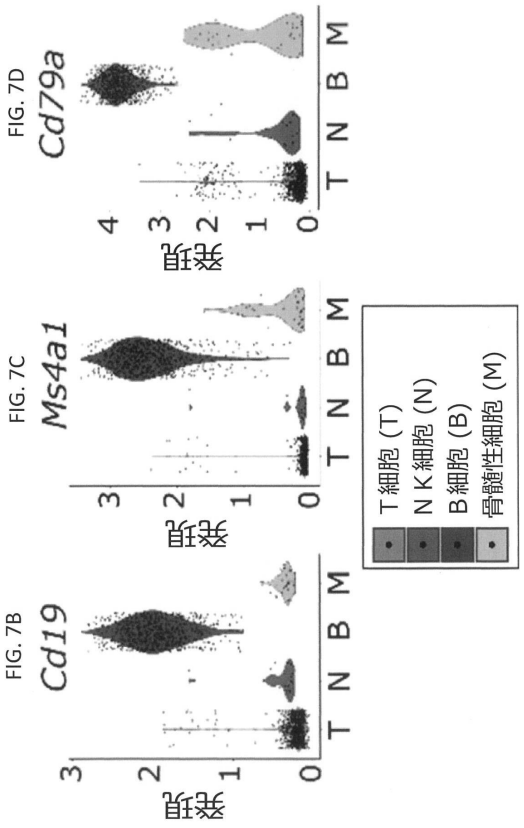
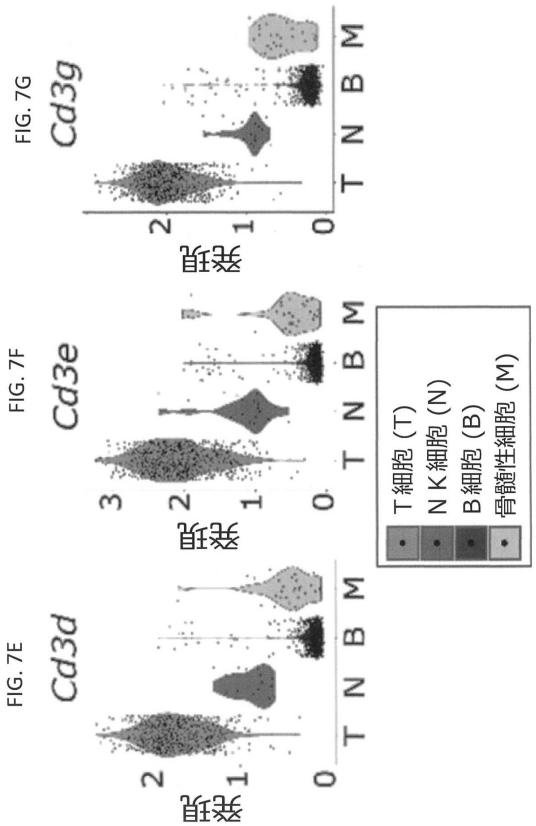


FIG. 7A

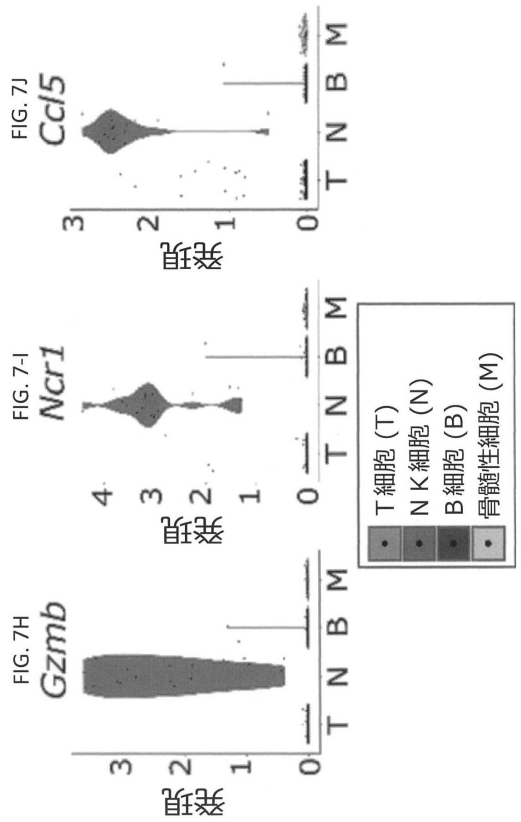
【図７－２】



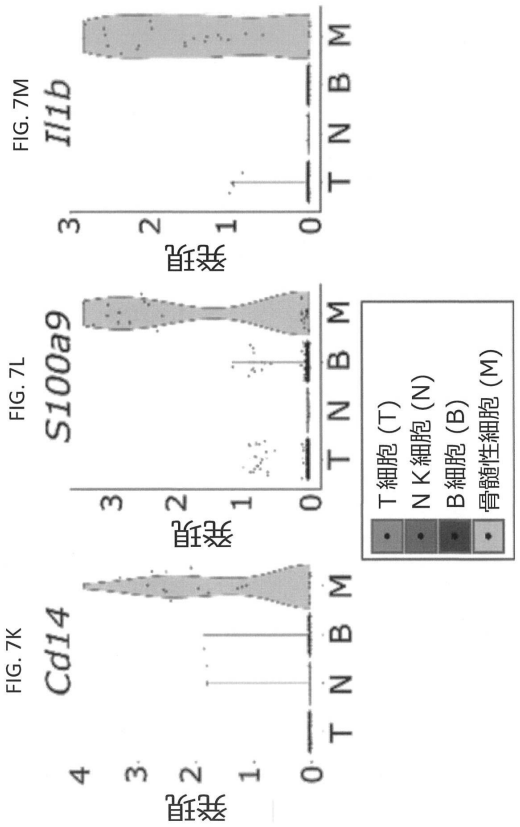
【図７－３】



【図７－４】

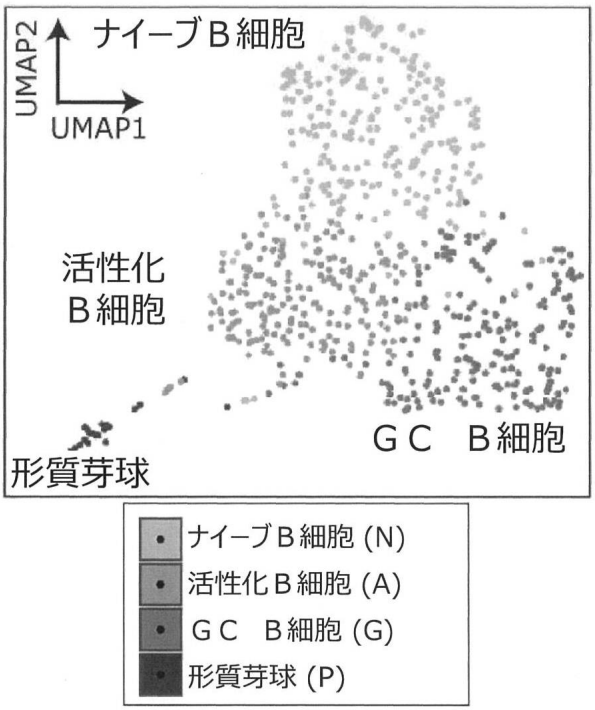


【図７－５】



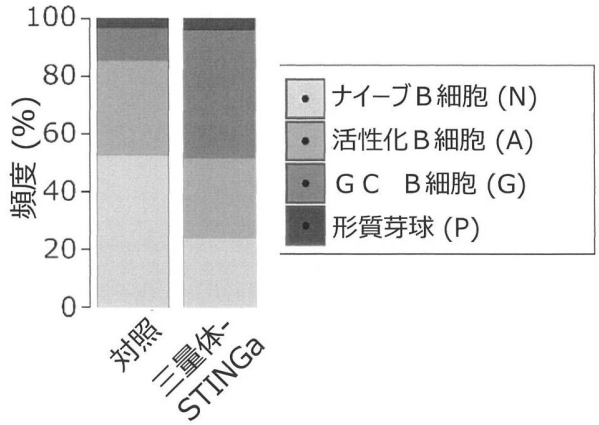
【図８－１】

FIG. 8A

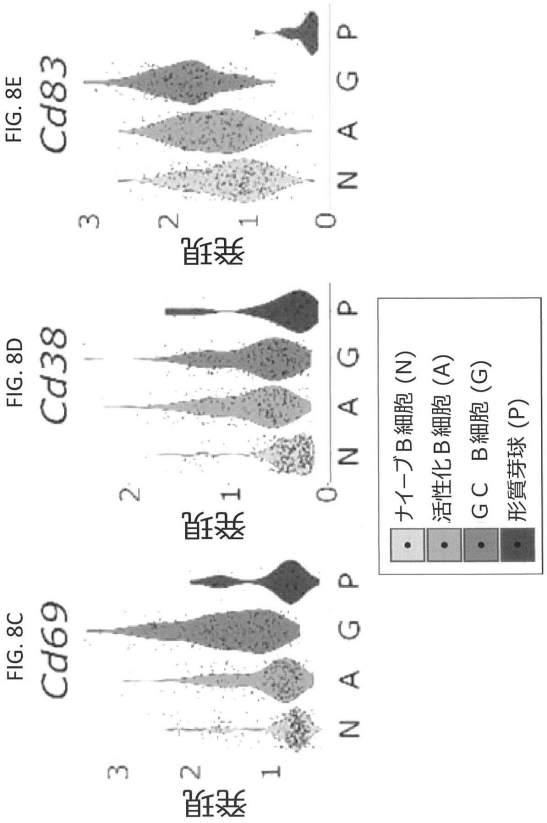


【図８－２】

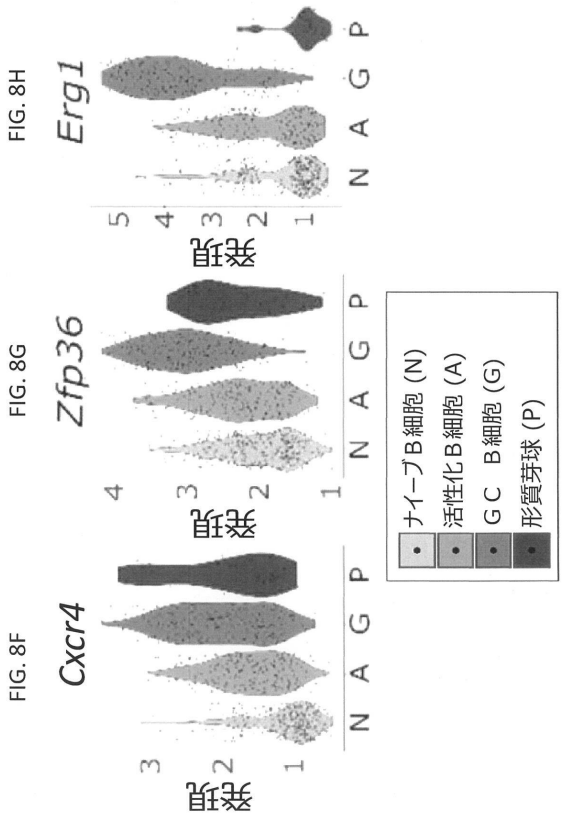
FIG. 8B



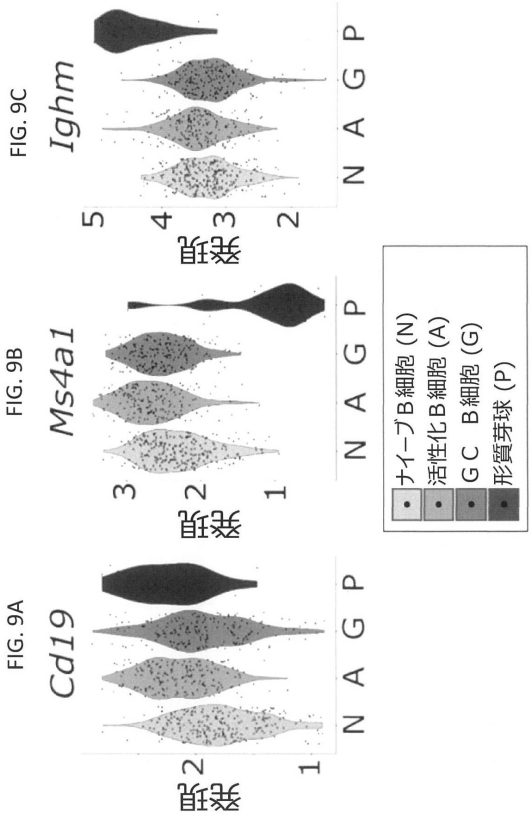
【図８－３】



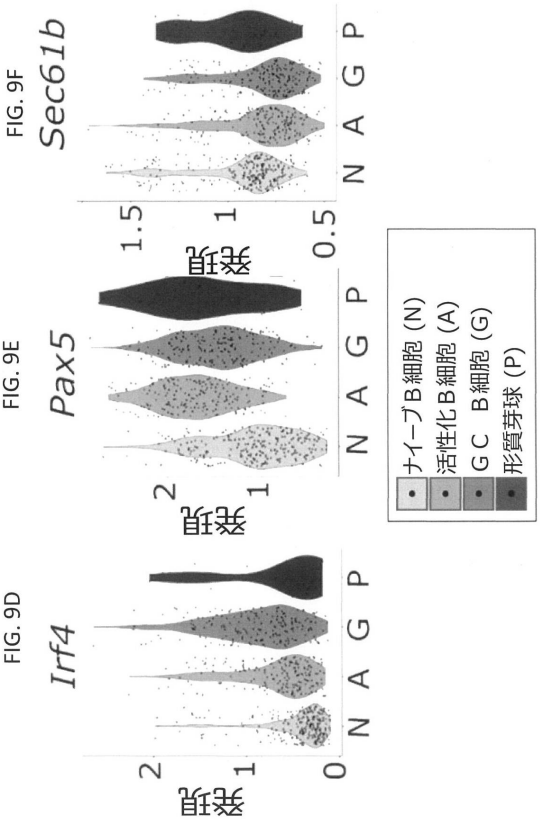
【図８－４】



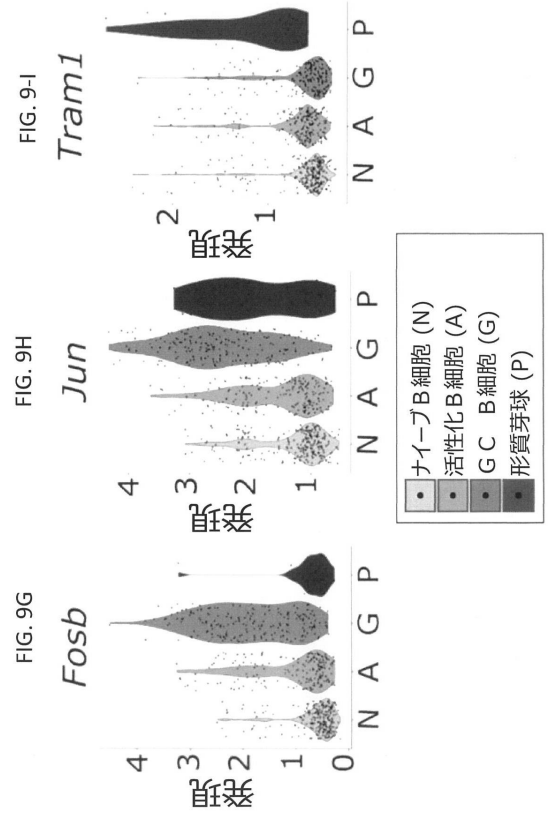
【図９－１】



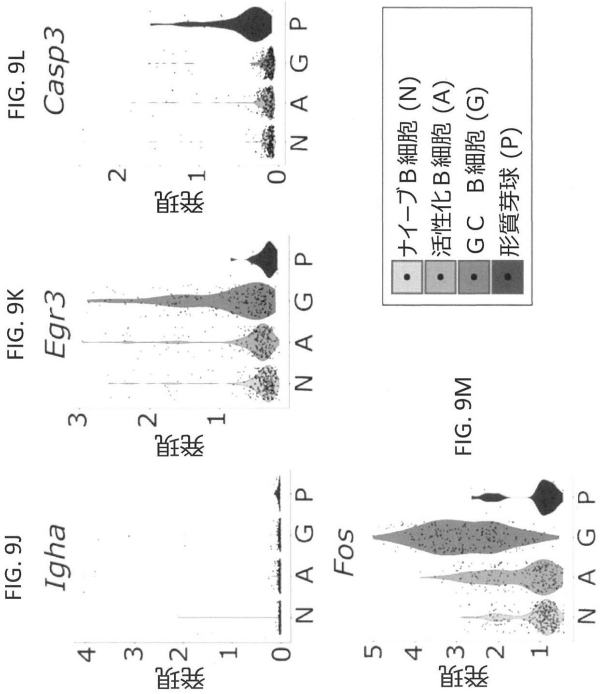
【図９－２】



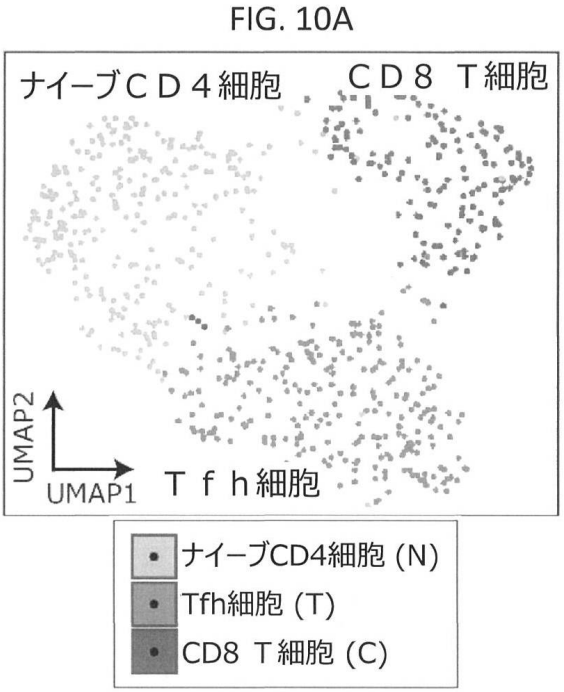
【図９－３】



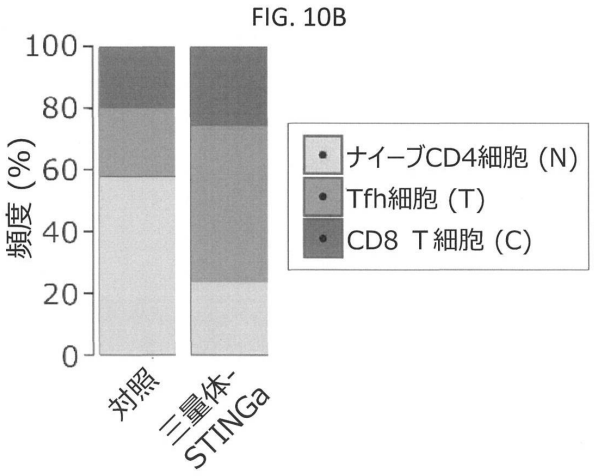
【図９－４】



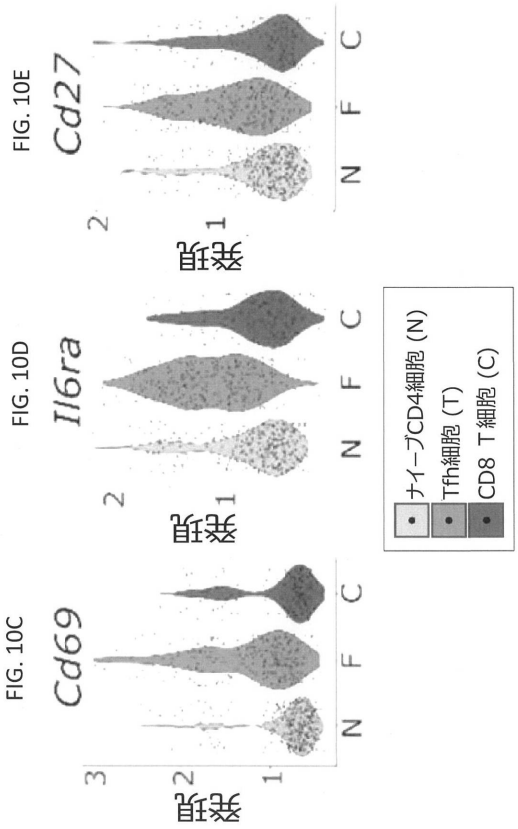
【図１０－１】



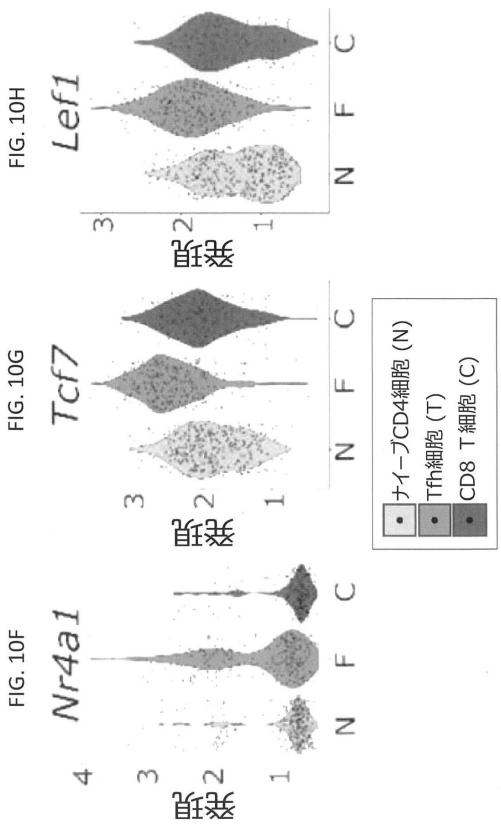
【図１０－２】



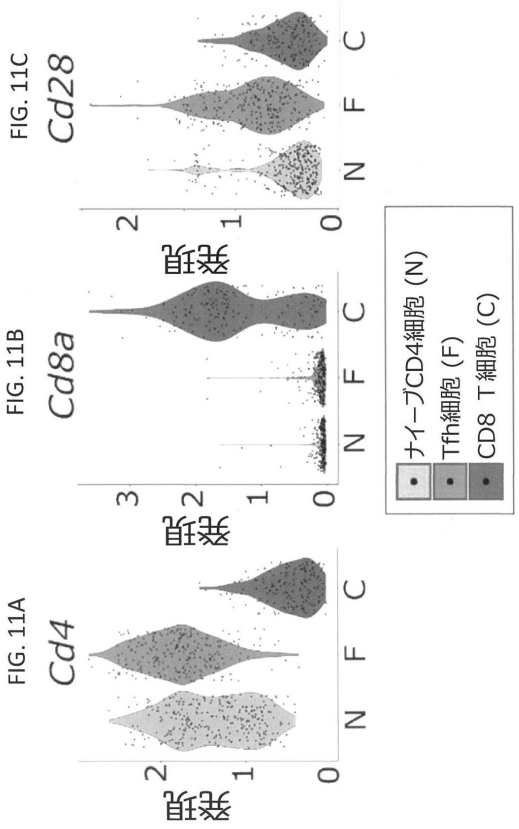
【図１０－３】



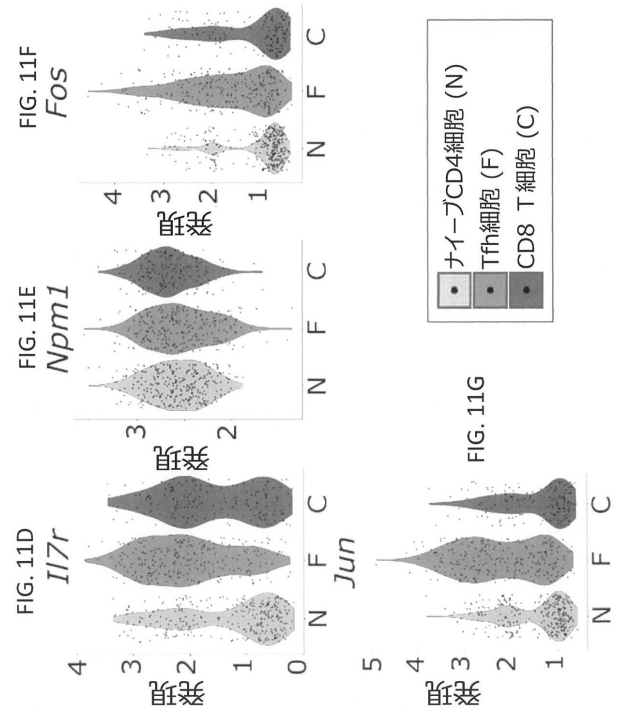
【図１０－４】



【図１１－１】



【図１１－２】



【図１２－１】

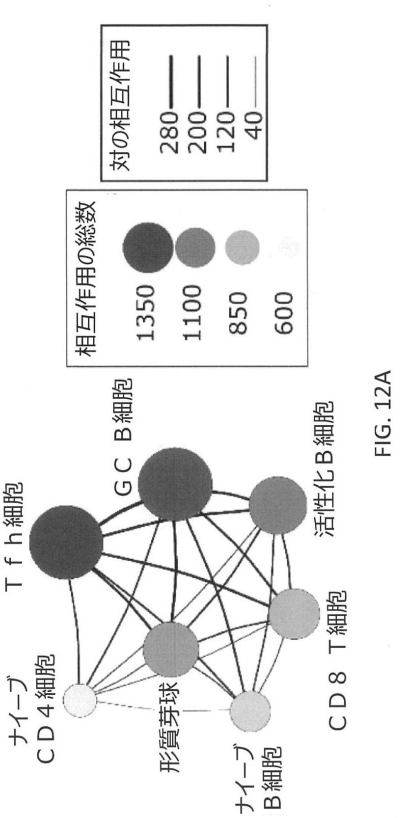


FIG. 12A

【図１２－２】

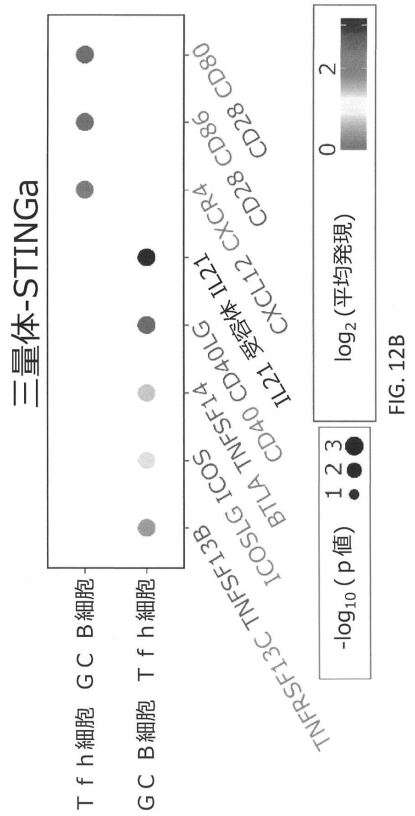


FIG. 12B

【図１３－１】

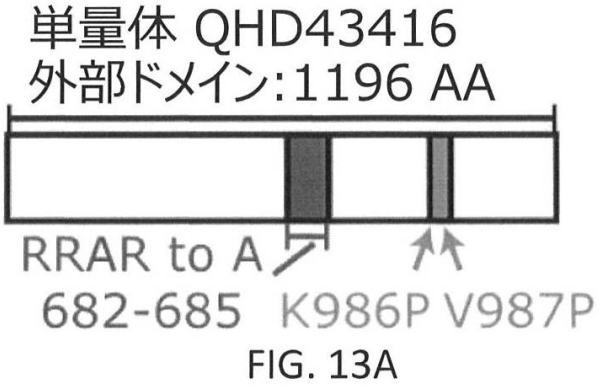


FIG. 13A

【図１３－２】

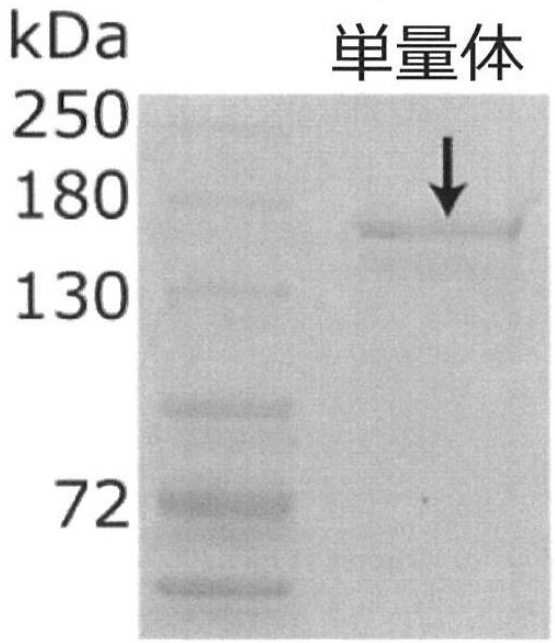


FIG. 13B

【図１３－３】

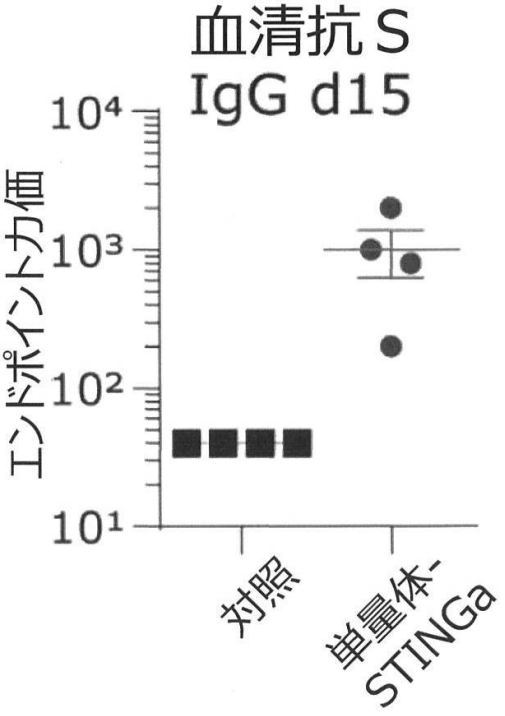


FIG. 13C

【図１３－４】

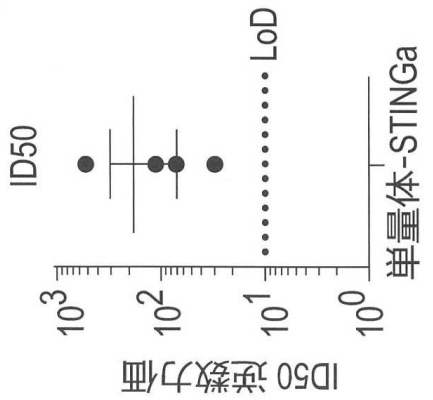


FIG. 13D

【図１３－５】

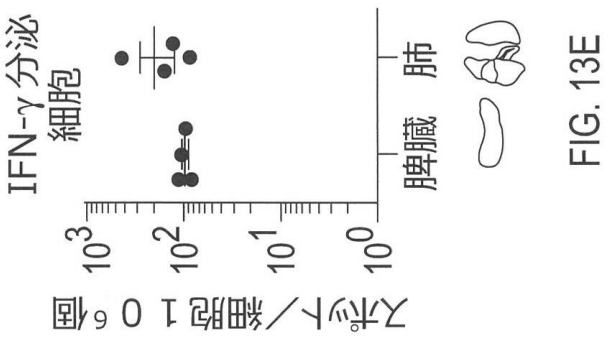


FIG. 13E

【図１３－６】

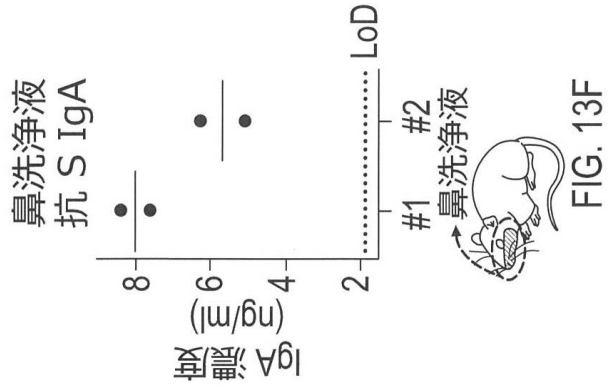


FIG. 13F

【図１４】

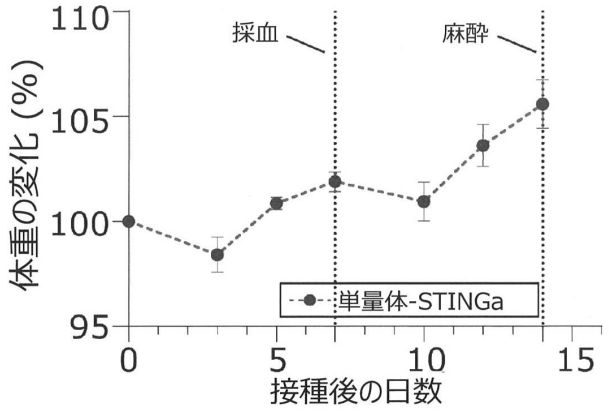


FIG. 14

【図１５】

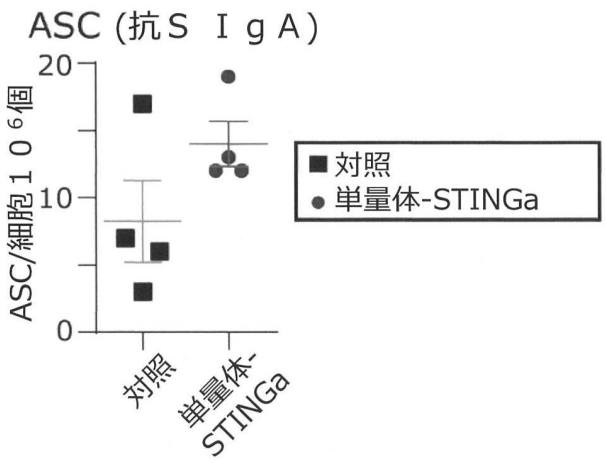


FIG. 15

【図１６】

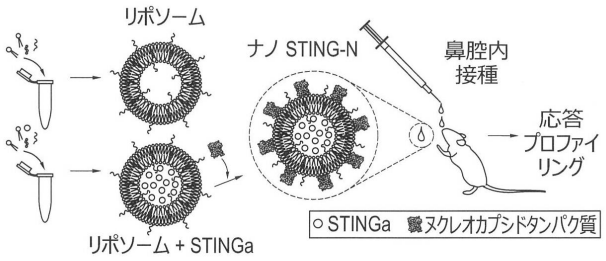


FIG. 16

【図１７】

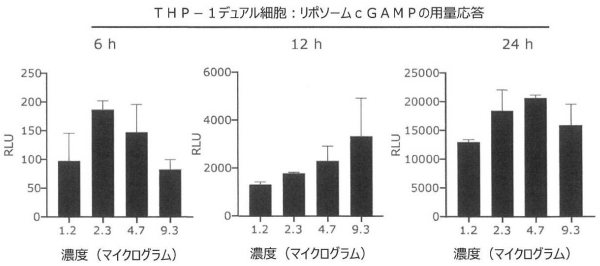


FIG. 17

【図１８】

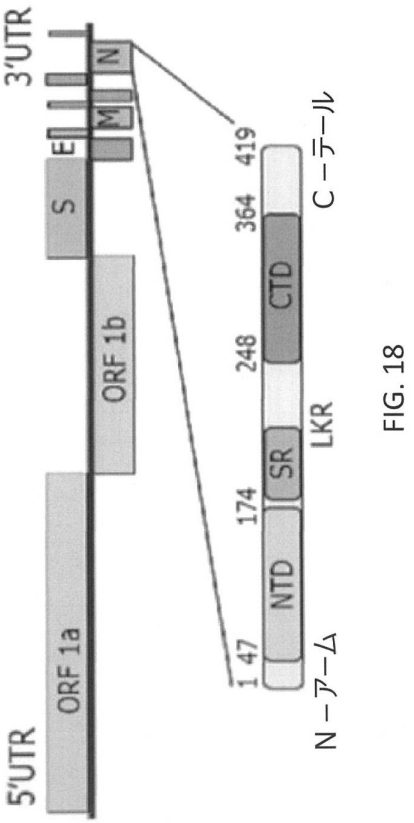


FIG. 18

【図１９】

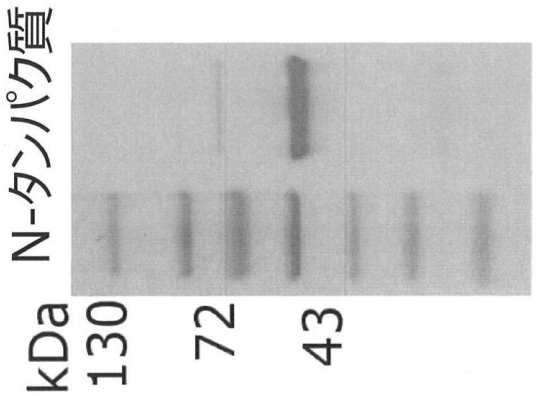


FIG. 19

【図２０】

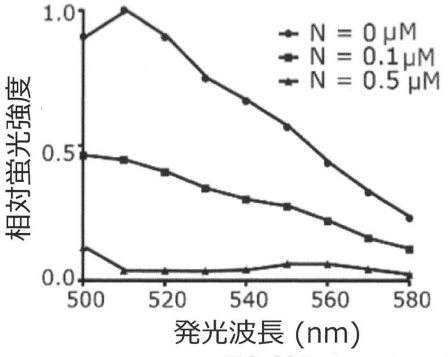


FIG. 20A

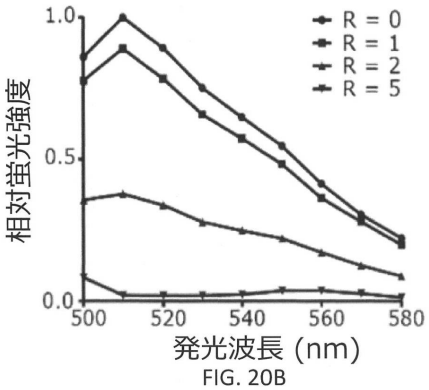


FIG. 20B

【図２１－１】

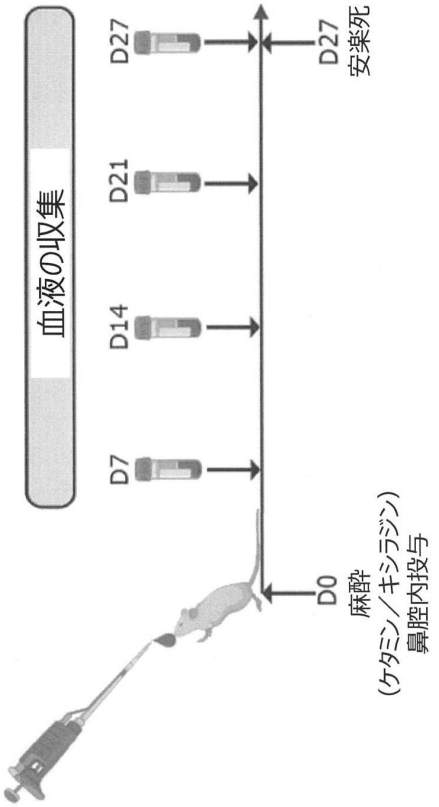
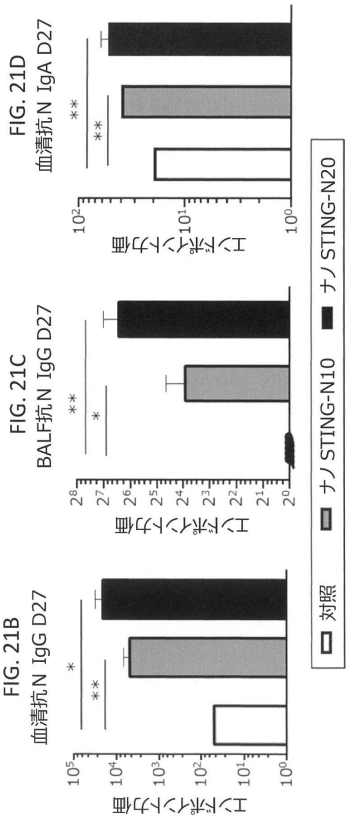
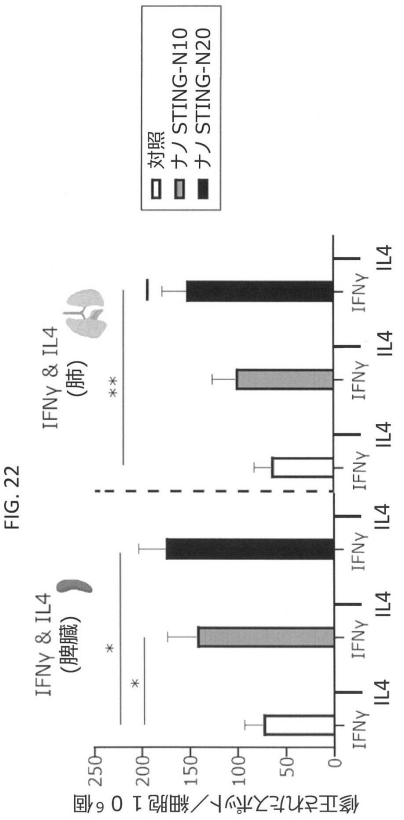


FIG. 21A

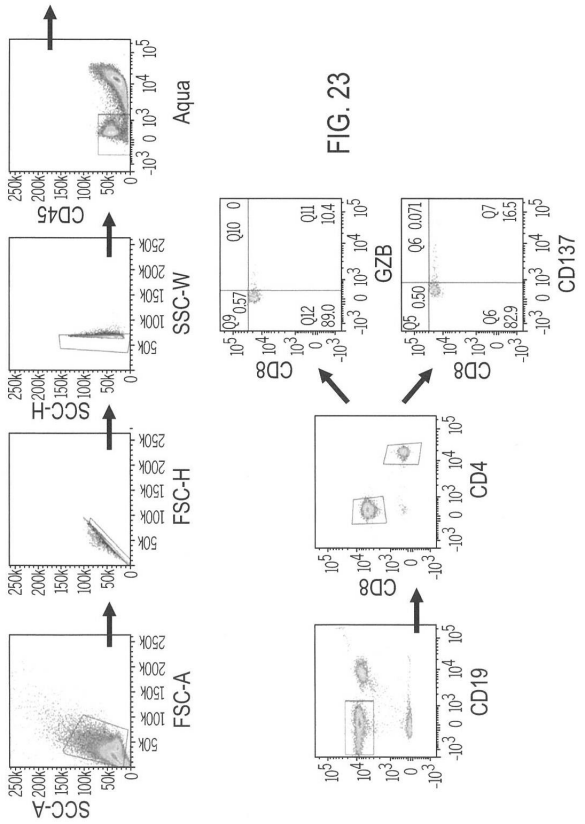
【図２１－２】



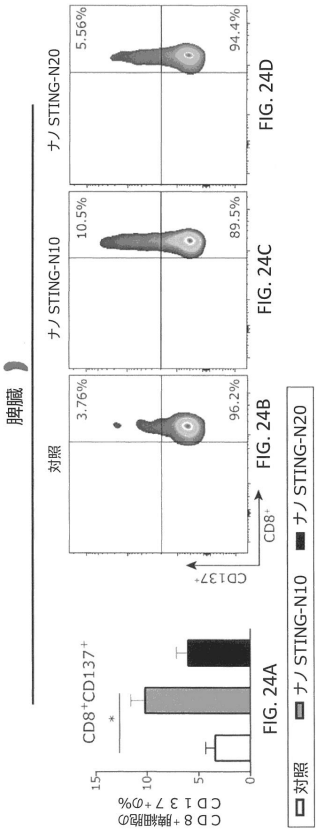
【図２２】



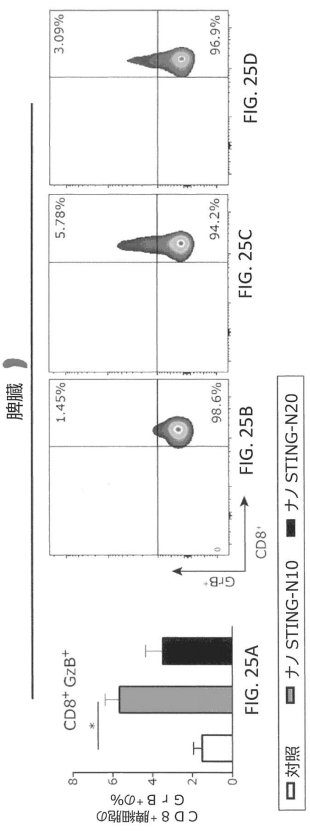
【図２３】



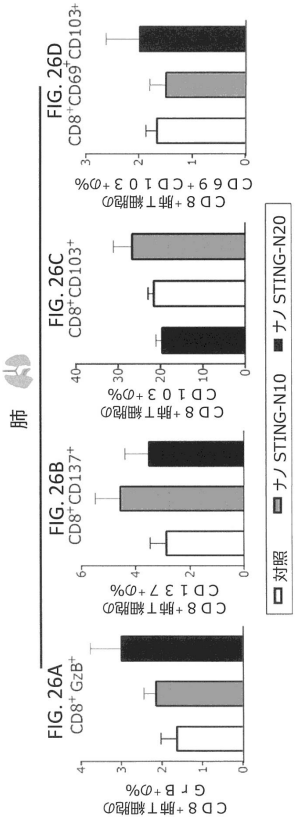
【図２４】



【図２５】



【図２６】



【図２７】

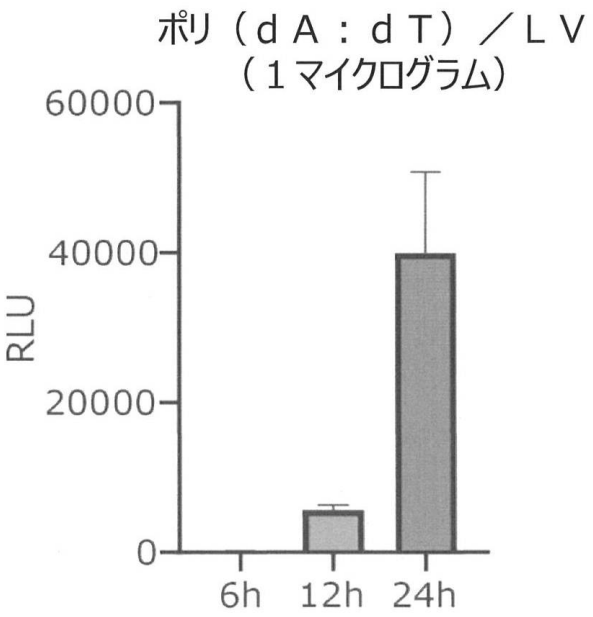


FIG. 27

【図２８】

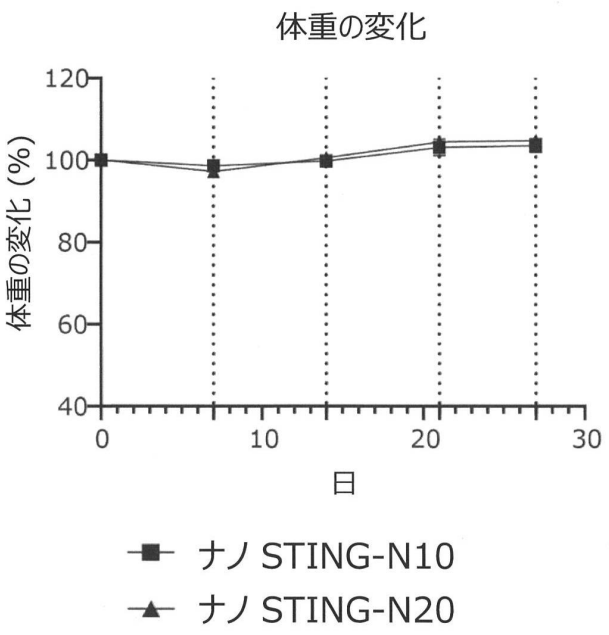


FIG. 28

【図２９】

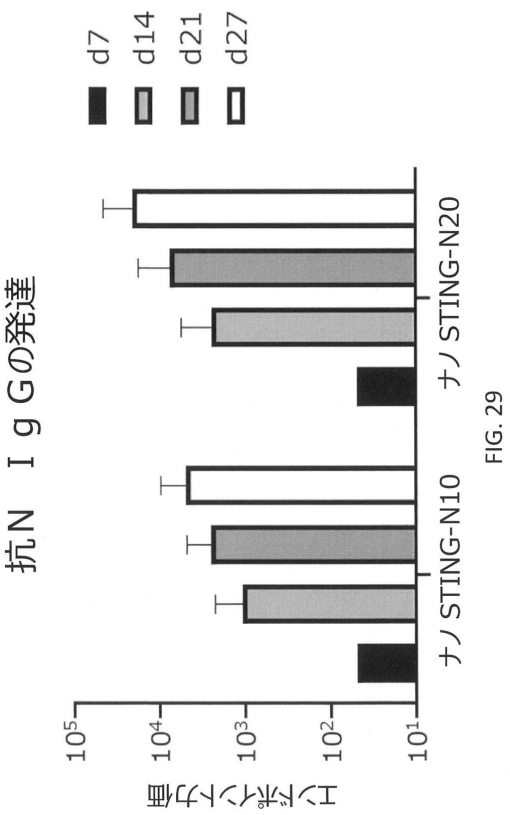
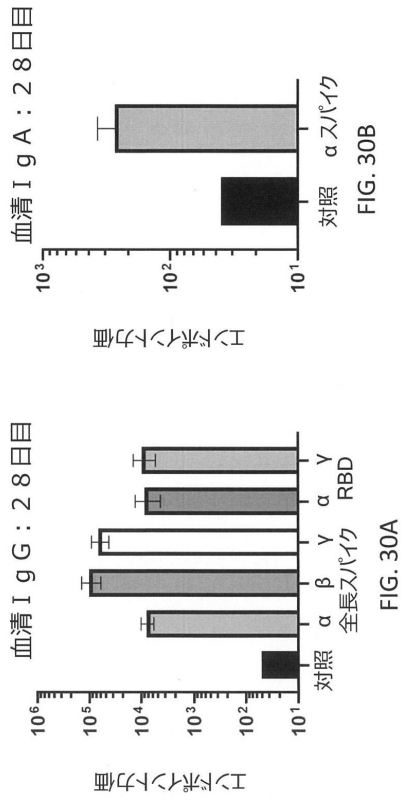
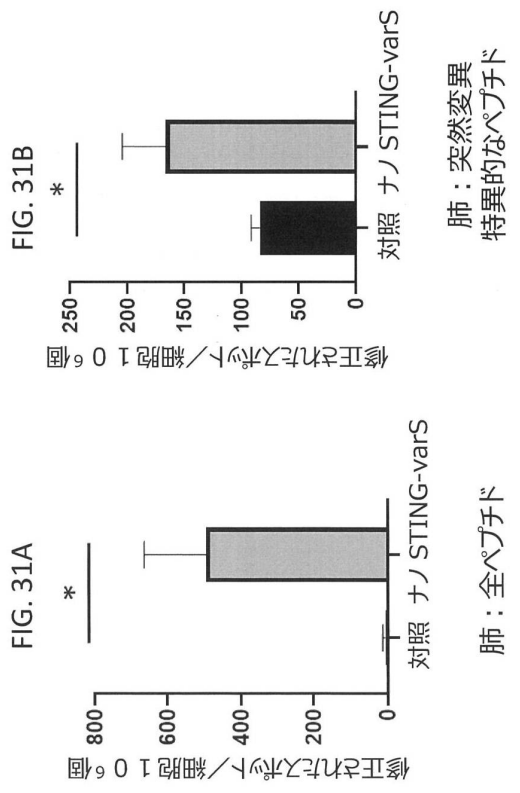


FIG. 29

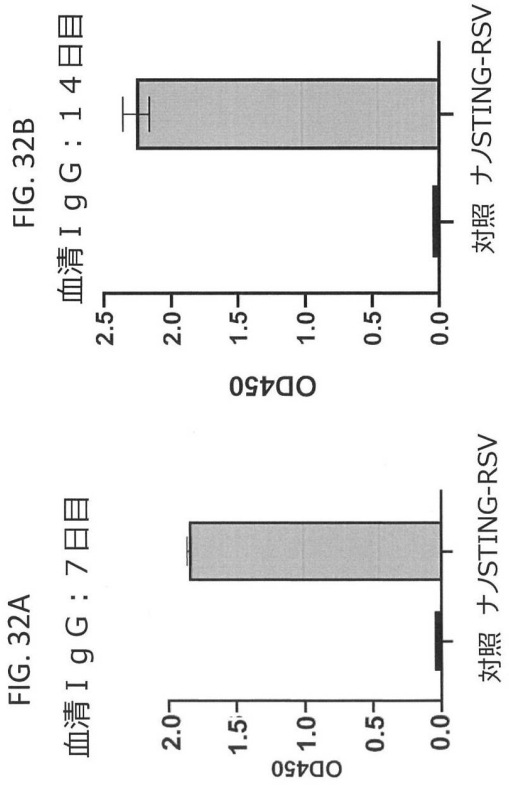
【図３０】



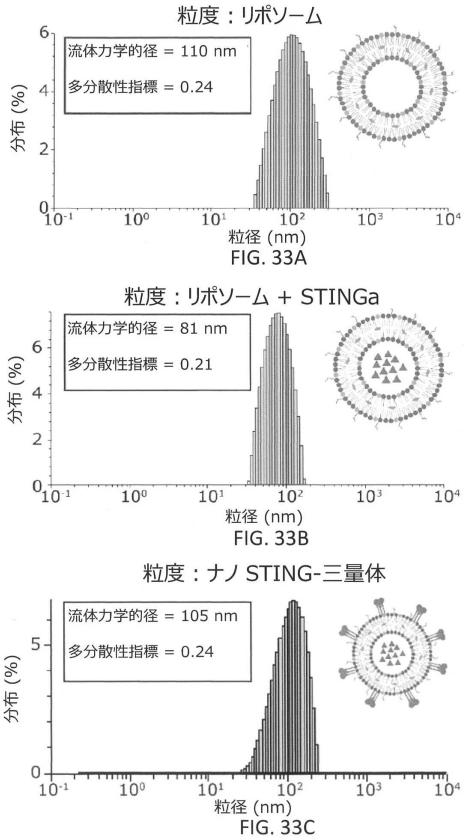
【図３１】



【図３２】



【図３３－１】



【図３３－２】

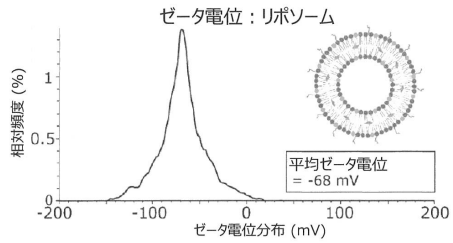


FIG. 33D

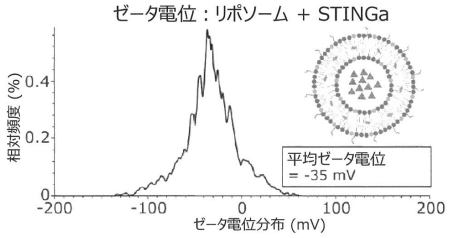


FIG. 33E

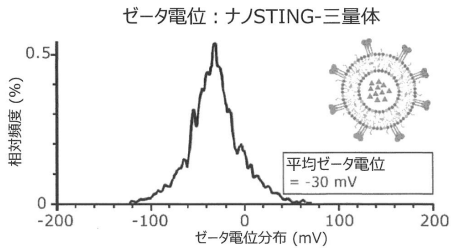


FIG. 33F

【図３４－１】

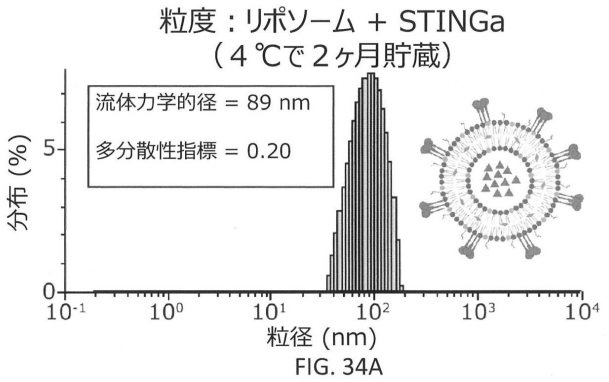


FIG. 34A

【図３４－２】

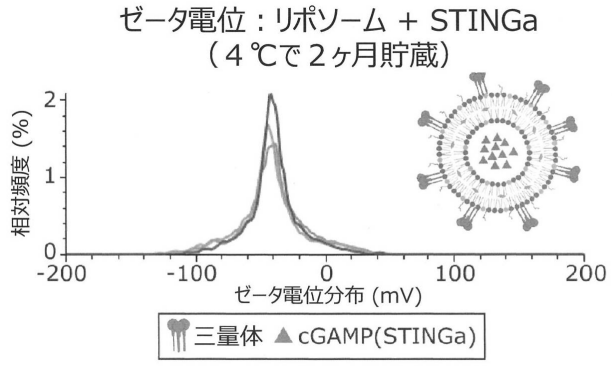


FIG. 34B

【図３４－３】

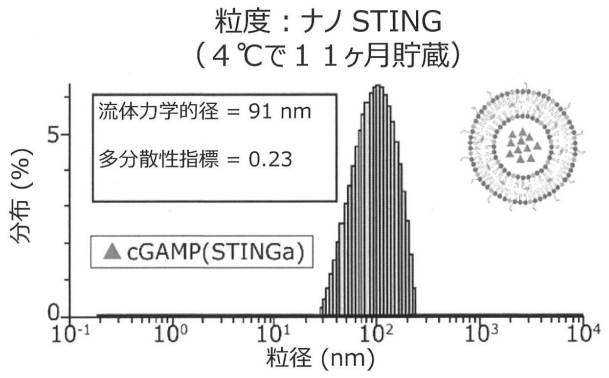


FIG. 34C

【図３４－４】

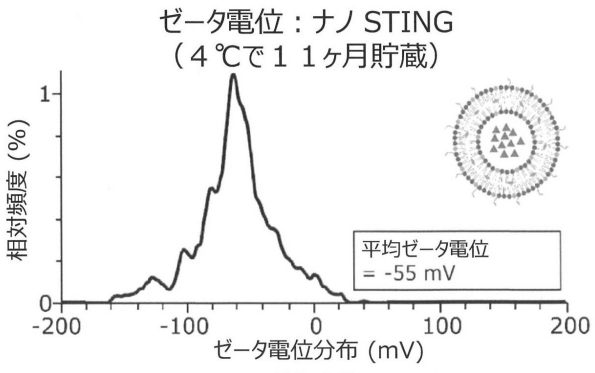


FIG. 34D

【図３５】

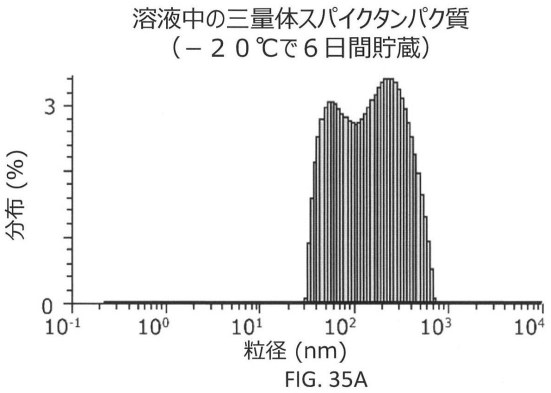


FIG. 35A

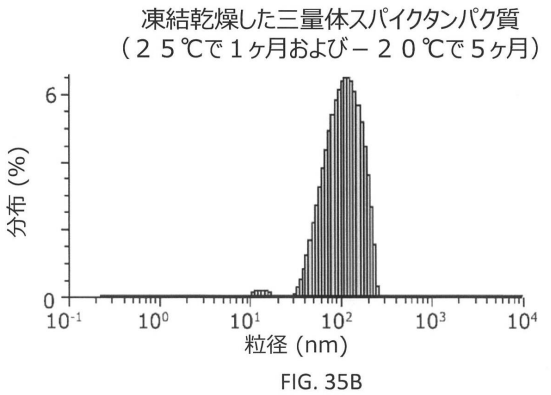


FIG. 35B

【図３６－１】

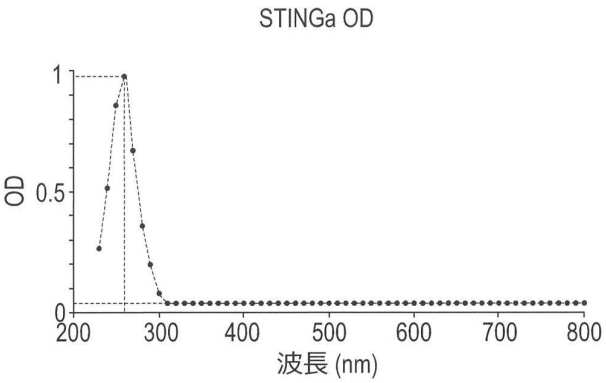


FIG. 36A

【図３６－２】

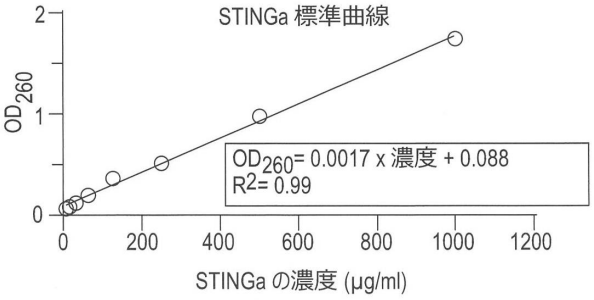


FIG. 36B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/042684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 39/12**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61P 31/12**(2006.01)i; **A61P 31/16**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

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 9/127(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 31/473(2006.01); A61K 39/39(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/85(2006.01)

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

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

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

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: particle, liposome, prevention, treatment, antigen, trimer, modulator, STING agonist

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017-223085 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 28 December 2017 (2017-12-28) abstract, claims 40, 52-55, 56, 58	1-3
A	KR 10-2018-0106825 A (주식회사 큐라티스) 01 October 2018 (2018-10-01) See	1-3
A	WO 2019-183578 A1 (CODIAK BIOSCIENCES, INC.) 26 September 2019 (2019-09-26) the whole document	1-3
A	KOSHY, S. T. et al., "Liposomal delivery enhances immune activation by STING agonist for cancer immunotherapy", Advanced Biosystems, 2017, Article Number : 1600013 (pages 1-13) the whole document	1-3
A	NAKAMURA, T. et al., "Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclin di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma", Journal of Controlled release, 2015, Vol. 216, pages 149-157 the whole document	1-3

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 November 2021	**15 November 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon** **35208, Republic of Korea** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer **Jung, Da Won** Telephone No. **+82-42-481-5373**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/042684

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **29-48**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 29-48 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy(PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).

2. ☑ Claims Nos.: **6, 14, 16-19, 27-28, 33, 39-41**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 6, 14, 16-19, 27-28, 33, 39-41 are regarded to be unclear because they refer to claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☑ Claims Nos.: **4-5, 7-13, 15, 20-26, 29-32, 34-38, 42-48**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2021/042684

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017-223085	A2	28 December 2017	CA	3028721	A1	28 December 2017
				EP	3471778	A2	24 April 2019
				US	2021-0106538	A1	15 April 2021
				WO	2017-223085	A3	15 February 2018
KR	10-2018-0106825	A	01 October 2018	KR	10-1982710	B1	28 May 2019
				KR	10-2019-0050752	A	13 May 2019
				KR	10-2122955	B1	15 June 2020
WO	2019-183578	A1	26 September 2019	CN	112118866	A	22 December 2020
				EP	3768310	A1	27 January 2021
				JP	2021-518386	A	02 August 2021
				KR	10-2020-0141047	A	17 December 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

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	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｋ	*39/145(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/145	
Ａ６１Ｋ	*39/215(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/215	
Ａ６１Ｋ	*39/235(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/235	
Ａ６１Ｋ	*9/50 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/50	
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127	
Ａ６１Ｋ	*9/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14	
Ａ６１Ｋ	*9/19 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/19	
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/34 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	*39/39 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39	
Ａ６１Ｋ	*47/69 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/69	

(32)優先日　令和2年11月3日(2020.11.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,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

アメリカ合衆国テキサス州７７００６，ヒューストン，コモンウェルス・ストリート ２２０５
(72)発明者　リウ，シンリ
アメリカ合衆国テキサス州７７４７９，シュガー・ランド，カンブリア・レーン １８３９

Ｆターム（参考）　4C076 AA19 AA24 AA30 AA61 BB01 BB13 BB15 BB16 BB22 BB24 BB25 CC27 CC35 CC41 DD09 DD63 EE23 FF31 FF36 GG06
4C084 AA17 NA14 ZB331
4C085 AA02 BA55 BA71 EE01 FF14 FF24 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10