

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-527525
(P2023-527525A)

(43)公表日 令和5年6月29日(2023.6.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12		4 C 0 8 4
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16		4 C 0 8 6
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		4 C 0 8 7
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全111頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-571117(P2022-571117)	(71)出願人	507244910 プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ クインシー ストリート 17
(86)(22)出願日	令和3年5月21日(2021.5.21)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85)翻訳文提出日	令和5年1月18日(2023.1.18)	(74)代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86)国際出願番号	PCT/US2021/033617	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87)国際公開番号	WO2021/237067	(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87)国際公開日	令和3年11月25日(2021.11.25)	(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31)優先権主張番号	63/029,199		
(32)優先日	令和2年5月22日(2020.5.22)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/082,742		
(32)優先日	令和2年9月24日(2020.9.24)		
(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)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターフェロン誘導オリゴヌクレオチド二重鎖および使用方法

(57)【要約】

本明細書にはI型インターフェロン産生を誘導するための組成物および方法が記載される。記載する組成物は、5'末端-リン酸-CUGA-3'配列を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む。記載する免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む組成物は、インターフェロンに反応する疾患または障害の処置に使用することができる。

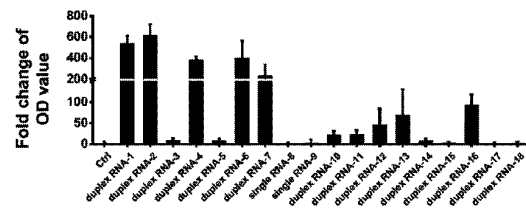
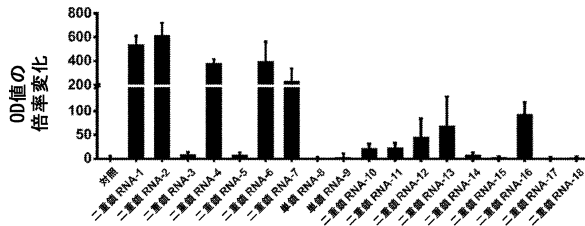


FIG. 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5'端にSEQ ID NO:1を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 2】

オリゴヌクレオチド二重鎖がRNAである、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 3】

オリゴヌクレオチド二重鎖が5'-ウリリン酸基を含む、請求項1または2記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 4】

オリゴヌクレオチド二重鎖が少なくとも20核酸塩基長である、請求項1～3のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチド二重鎖が二本鎖RNAである、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 6】

オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖と接触した細胞におけるインターフェロン（IFN）産生を誘導するのに十分である、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 7】

IFN産生がI型IFN産生である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

オリゴヌクレオチド二重鎖がRIG-I-IRF3パスウェイを活性化する、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 9】

オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖と接触した細胞または細胞の集団におけるウイルス力価またはウイルス量を低減する、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 10】

オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖が接触した細胞中のSTAT1およびSTAT2を増加させる、請求項1記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項 11】

対象における抗ウイルス応答を誘導する方法であって、それを必要とする対象に請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

【請求項 12】

対象におけるウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

【請求項 13】

前記それを必要とする対象が、ウイルス感染を有するか、またはウイルス感染を有するリスクがある、請求項11または12記載の方法。

【請求項 14】

投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると前記対象を診断する工程をさらに含む、請求項11または12記載の方法。

【請求項 15】

投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると前記対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程をさらに含む、請求項11または12記載の方法。

【請求項 16】

投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると前記対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程をさらに含む、請求項11または12記載の方法。

10

20

30

40

50

ウイルス感染が、ジョン・カニンガムウイルス、麻疹ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、アルボウイルス、狂犬病ウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型単純ヘルペス、2型単純ヘルペス、ヒトヘルペスウイルス6、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、ムンプスウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、コロナウイルス、SARSコロナウイルス、SARS-CoV-2ウイルス、A型コクサッキーウイルス、B型コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、HTLV-1、A型、B型、C型、D型、およびE型肝炎ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、痘瘡ウイルス、伝染性軟属腫、ヒトパピローマウイルス、パルボウイルスB19、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、デングウイルス（DENV）、ならびにジカウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる、請求項11～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

ウイルス感染が、中枢神経系組織、眼組織、上部呼吸器系組織、下部呼吸器系組織、肺組織、腎臓組織、膀胱組織、脾臓組織、心組織、胃腸組織、表皮組織、生殖組織、鼻腔組織、喉頭組織、気管組織、気管支組織、口腔組織、血液組織、および筋組織からなる群より選択される組織の感染である、請求項11～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

前記投与が全身性である、請求項11～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

前記投与がウイルス感染の部位に局所的である、請求項11～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項11～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

少なくとも1つの追加治療薬が抗ウイルス治療薬である、請求項20記載の方法。

【請求項22】

対象におけるインフルエンザ感染を処置する方法であって、インフルエンザ感染を有する対象に、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

【請求項23】

インフルエンザ感染がA型インフルエンザ感染またはB型インフルエンザ感染である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項22または23記載の方法。

【請求項25】

対象におけるコロナウイルス疾患を処置する方法であって、コロナウイルス疾患を有する対象に、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

【請求項26】

コロナウイルス疾患がCOVID-19である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項25または26記載の方法。

【請求項28】

コロナウイルス疾患から回復した対象から得られた血漿を投与する工程をさらに含む、請求項25または26記載の方法。

【請求項29】

10

20

30

40

50

抗ウイルス治療薬の効力を増加させる方法であって、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを投与する工程を含む、方法。

【請求項30】

抗ウイルス治療薬が、アバカビル、アシクロビル (Acyclovir、Aciclovir)、アデホビル、アマンタジン、アンプリジェン、アンブレナビル (アジェネラーゼ)、アモジアキン、アピリモド、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、アトバコン、バラビル、バロキサビルマルボキシル (Xofluza (登録商標))、ビクタルビ、ボセプレビル (Videxrelis (登録商標))、シドフォビル、クロファジミン、クロミフェン、クロファザミン (Clofazamine)、コビシスタット (Tybost (登録商標))、コンビビル (固定用量薬)、ダクラタスビル (Daklinza (登録商標))、ダルナビル、デラビルジン、デシコビ、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、ドラビリン (Pifeltro (登録商標))、エコリエベル、エドクスジン、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンピルチド、エンテカビル、エトラビリン (Intelence (登録商標))、ファミシクロビル、ファビピラビル、フェノフィブラート、ホミビルセン、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル (Cytovene (登録商標))、イバシタピン、イバリズマブ (Trogarzo (登録商標))、イドクスウリジン、イミキモド、イムノビル、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害薬、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターフェロン、イベルメクチン、ラミブジン、ラサロシド、レテルモビル (Prevymis (登録商標))、ロピナビル、ロピリド、マンノース結合レクチン、マラビロク、メチサゾン、モロキシジン、ナファモスタット、ネルフィナビル、ネビラピン、Nexavir (登録商標)、ニロチニブ、ニタゾキサニド、ノービア、ヌクレオチド類似体、オセルタミビル (Tamiflu (登録商標))、パゾパニブ、ペグインターフェロン・アルファ-2a、ペグインターフェロン・アルファ-2b、ペンシクロビル、ペラミビル (Rapivab (登録商標))、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬 (薬理学)、ピオナリジン、ピラミジン、ラルテグラビル、レムデシビル、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リルピビリン (Eduvant (登録商標))、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、シメプレビル (Olysio (登録商標))、ソホスブビル、スタブジン、相乗的エンハンサー (抗レトロウイルス薬)、タフェノキン、テラプレビル、テルビブジン (Tyzeka (登録商標))、テノホビルアラフェナミド、テノホビルジソプロキシル、テノホビル、トレミフェン、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル (バルトレックス)、バルガンシクロビル、ベルムラフェニブ、ベネトクラクス、ピクリピロク、ピダラピン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル (Relenza (登録商標))、およびジドブジンからなる群より選択される、請求項29記載の方法。

10

20

30

【請求項31】

免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが、実質的に同時に投与される、請求項29または30記載の方法。

【請求項32】

免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが異なる時点で投与される、請求項29または30記載の方法。

40

【請求項33】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項34】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを含む、薬学的組成物。

【請求項35】

気道投与用に製剤化される、請求項33または34記載の組成物。

【請求項36】

50

エアロゾル投与、ネブライザー投与、または気管洗浄投与用に製剤化される、請求項35記載の組成物。

【請求項37】

インターフェロン（IFN）産生を誘導する方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、または請求項33～36のいずれか一項記載の薬学的組成物を投与する工程を含み、それによって投与後はIFN産生が増加する、方法。

【請求項38】

IFN産生が、I型IFN、II型IFN、またはIII型IFNの産生である、請求項37記載の方法。

10

【請求項39】

IFN産生がI型IFNの産生である、請求項37または38記載の方法。

【請求項40】

I型IFNが、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、またはIFN- ϵ である、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

II型IFNがIFN- λ である、請求項38記載の方法。

【請求項42】

増加したIFN産生がウイルス感染に対する細胞の抵抗性を増加させる、請求項37記載の方法。

20

【請求項43】

IFN関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

【請求項44】

前記その必要がある対象が、IFN関連疾患を有するか、またはIFN関連疾患を有するリスクがある、請求項43記載の方法。

【請求項45】

投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患を有するリスクがあると対象を診断する工程をさらに含む、請求項43記載の方法。

【請求項46】

投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患のリスクがあると対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程をさらに含む、請求項43記載の方法。

30

【請求項47】

IFN関連疾患が、基準レベルと比較して低減したIFNレベルを伴う疾患である、請求項43記載の方法。

【請求項48】

IFN関連疾患が、基準レベルと比較して低減したI型IFNレベルを伴う疾患である、請求項43記載の方法。

【請求項49】

IFN関連疾患が、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、真菌感染性疾患、寄生虫感染性疾患、がん、および自己免疫疾患からなる群より選択される、請求項43～48のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項50】

少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項43～49のいずれか一項記載の方法。

【請求項51】

少なくとも1つの追加治療薬が、抗ウイルス治療薬、抗細菌治療薬、抗真菌治療薬、抗寄生虫治療薬、抗がん治療薬、または抗自己免疫治療薬である、請求項50記載の方法。

【請求項52】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくと

50

も1つの抗細菌治療薬とを含む、組成物。

【請求項53】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗真菌治療薬とを含む、組成物。

【請求項54】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗寄生虫治療薬とを含む、組成物。

【請求項55】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗がん治療薬とを含む、組成物。

10

【請求項56】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗自己免疫治療薬とを含む、組成物。

【請求項57】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項52～56のいずれか一項記載の組成物。

【請求項58】

抗原またはワクチンにコンジュゲートされた、5'端にSEQ ID NO:1を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

【請求項59】

請求項58記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、組成物。

20

【請求項60】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とワクチンとを含む、組成物。

【請求項61】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とナノ粒子とを含む、組成物。

【請求項62】

請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、ナノ粒子。

【請求項63】

請求項58記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とナノ粒子とを含む、組成物。

30

【請求項64】

請求項58記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、ナノ粒子。

【請求項65】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項59～64のいずれか一項記載の組成物。

【請求項66】

ワクチン接種をする方法であって、それを必要とする対象に、

- a. 請求項58記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、
- b. 請求項59～64のいずれか一項記載の組成物、または
- c. 請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、および

40

ワクチン

を投与する工程を含む、方法。

【請求項67】

ワクチンの効力を増加させる方法であって、それを必要とする対象に、

- a. 請求項58記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、
- b. 請求項59～64のいずれか一項記載の組成物、または
- c. 請求項1～10のいずれか一項記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、および

ワクチン

を投与する工程を含む、方法。

【請求項68】

50

静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または髄腔内投与用に製剤化された、請求項33または34記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2020年5月22日に出願された米国仮出願第63/029,199号および2020年9月24日に出願された米国仮出願第63/082,742号の、米国特許法第119条(e)項に基づく恩典を主張し、それらの内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府の支援

本発明は、米国国立衛生研究所によって交付されたHL141797ならびに米国陸軍によって交付されたW911NF-12-2-0036およびW911NF-16-C-0050の下に、政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本明細書記載の技術は免疫刺激のための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

病原性感染は、宿主生物において病原体を防御するように設計された自然免疫応答および適応免疫応答の複雑な制御系を惹起する。病原体の侵入、例えばウイルス、細菌、真菌または寄生虫感染に対する多くの反応の一つは、例えばウイルス複製などといった病原体の活動を「妨害」(interfering)することによってヒトの免疫応答において決定的な役割を果たす多面的サイトカイン群、インターフェロン(interferon:IFN)産生の誘導である。インフルエンザ、MERS、SARS、そして現在はSARS-CoV-2などといったパンデミックウイルスの出現が増加していることから、多くの異なるタイプのウイルスおよび病原体による感染を阻害する新しい広域スペクトル治療の開発が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

概要

本明細書記載の組成物および方法は、一つには、インターフェロン産生を誘導するオリゴヌクレオチド二重鎖の発見に係る。

【0006】

一局面において、本明細書には、5'端にSEQ ID NO:1を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖が記載される。

【0007】

この局面または他の任意の局面の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖はRNAである。

【0008】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は5'-リン酸基を含む。

【0009】

この局面または他の任意の局面の別の一態様では、前記5'末端配列(SEQ ID NO:1)に対する修飾はない。

【0010】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は少なくとも20核酸塩基長である。

【0011】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は

10

20

30

40

50

二本鎖RNAである。

【0012】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は、該二重鎖と接触した細胞におけるインターフェロン(IFN)産生を誘導するのに十分である。

【0013】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖はRIG-I-IRF3パスウェイを活性化する。

【0014】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は、該二重鎖と接触した細胞または細胞集団におけるウイルス力価を低減する。

【0015】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は、該二重鎖が接触した細胞中のSTAT1およびSTAT2を増加させる。

【0016】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、インターフェロン応答の誘導が利益になりうる任意の疾患または障害を処置するために、またはその処置を支援するために、使用することができる。そのような疾患または障害には、ウイルス感染、ならびに細菌性、真菌性または寄生虫性病原体による感染、ならびにインターフェロン誘導が利益になるがんおよび自己免疫疾患が含まれる。したがって本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染または寄生虫感染を処置する方法が開示される。同様に、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、がんまたは自己免疫疾患を処置する方法も開示される。

【0017】

別の一局面において、本明細書には、対象における抗ウイルス応答を誘導する方法であって、それを必要とする対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。

【0018】

この局面または他の任意の局面の一態様において、前記それを必要とする対象は、ウイルス感染を有するか、またはウイルス感染を有するリスクがある。

【0019】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると対象を診断する工程を、さらに含む。

【0020】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程を、さらに含む。

【0021】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、ウイルス感染は、ジョン・カニンガムウイルス、麻疹ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、アルボウイルス、狂犬病ウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型単純ヘルペス、2型単純ヘルペス、ヒトヘルペスウイルス6、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、ムンプスウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、コロナウイルス、SARSコロナウイルス、SARS-CoV-2ウイルス、A型コクサッキーウイルス、B型コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、HTLV-1、A型、B型、C型、D型、およびE型肝炎ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、痘瘡ウイルス、伝染性軟属腫、ヒトパピローマウイルス、パルボウイルスB19、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ロタウイルス、ノロウイ

10

20

30

40

50

ルス、アストロウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、デングウイルス（DENV）、ならびにジカウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる。

【0022】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、ウイルス感染は、中枢神経系組織、眼組織、上部呼吸器系組織、下部呼吸器系組織、肺組織、腎臓組織、膀胱組織、脾臓組織、心組織、胃腸組織、表皮組織、生殖組織、鼻腔組織、喉頭組織、気管組織、気管支組織、口腔組織、血液組織、および筋組織からなる群より選択される組織の感染である。

【0023】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、投与は全身性である。

10

【0024】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、投与は感染の部位に局所的である。

【0025】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程を、さらに含む。

【0026】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、前記少なくとも1つの追加治療薬は抗ウイルス治療薬である。

【0027】

別の一局面において、本明細書には、対象におけるインフルエンザ感染を処置する方法であって、インフルエンザ感染を有する対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。

20

【0028】

この局面または他の任意の局面の一態様において、インフルエンザ感染はA型インフルエンザ感染またはB型インフルエンザ感染である。

【0029】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む。

【0030】

別の一局面において、本明細書には、対象におけるコロナウイルス疾患を処置する方法であって、コロナウイルス疾患を有する対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。

30

【0031】

この局面または他の任意の局面の一態様において、コロナウイルス疾患はCOVID-19である。

【0032】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む。

【0033】

この局面または他の任意の局面の別の一態様において、本方法は、コロナウイルス疾患から回復した対象から得られた血漿を投与する工程をさらに含む。

40

【0034】

別の一局面において、本明細書には、抗ウイルス治療薬の効力を増加させる方法であって、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを投与する工程を含む方法が記載される。

【0035】

この局面または他の任意の局面の一態様において、抗ウイルス治療薬は、アバカビル、アシクロビル（Acyclovir、Aciclovir）、アデホビル、アマンタジン、アンプリジェン、アンブレナビル（アジェネラーゼ）、アモジアキン、アピリモド、アルビドール、ア

50

タザナビル、アトリブラ、アトパコン、パラビル、バロキサビルマルボキシル（Xofluz a（登録商標））、ピクトルビ、ボセプレビル（VICTRELIS（登録商標））、シドフォビル、クロファジミン、クロミフェン、クロファザミン、コビシスタット（Tybost（登録商標））、コンビビル（固定用量薬）、ダクラタスビル（Daklinza（登録商標））、ダルナビル、デラビルジン、デシコビ、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、ドラピリン（Pifeltro（登録商標））、エコリエベル、エドクスジン、エファビレンツ、エルピテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、エトラピリン（Intelence（登録商標））、ファムシクロビル、ファビピラビル、フェノフィブラート、ホミビルセン、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル（Cytovene（登録商標））、イバシタピン、イバリズマブ（Trogarzo（登録商標））、イドクスウリジン、イミキモド、イムノビル、インジナビル、イノシン、インテグラゼ阻害薬、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターフェロン、イベルメクチン、ラミブジン、ラサロシド、レテルモビル（Prevyomis（登録商標））、ロピナビル、ロビリド、マンノース結合レクチン、マラビロク、メチサゾン、モロキシジン、ナファモスタット、ネルフィナビル、ネビラピン、Nexavir（登録商標）、ニロチニブ、ニタゾキサニド、ノービア、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル（Tamiflu（登録商標））、パゾパニブ、ペグインターフェロン・アルファ-2a、ペグインターフェロン・アルファ-2b、ペンシクロビル、ペラミビル（Rapivab（登録商標））、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬（薬理学）、ピオナリジン、ピラミジン、ラルテグラビル、レムデシビル、逆転写酵素阻害薬、リバピリン、リルピピリン（Edurant（登録商標））、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、シメプレビル（Olysio（登録商標））、ソホスビル、スタブジン、相乗的エンハンサー（Synergistic enhancer）（抗レトロウイルス薬）、タフェノキン、テラプレビル、テルピブジン（Tyzeka（登録商標））、テノホビルアラフェナミド、テノホビルジソプロキシル、テノホビル、トレミフェン、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルパダ、バラシクロビル（バルトレックス）、バルガンシクロビル、ベルムラフェニブ、ベネトクラクス、ピクリビロク、ビダラピン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル（Relenza（登録商標））、およびジドブジンからなる群より選択される。

【0036】

この局面または他の任意の局面の別の態様では、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と前記少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが、実質的に同時に投与される。

【0037】

この局面または他の任意の局面の別の態様では、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と前記少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが異なる時点で投与される。

【0038】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物が記載される。

【0039】

この局面または他の任意の局面の一態様において、組成物は気道投与用に製剤化される。この局面または他の任意の局面の別の態様において、組成物は、エアロゾル投与、ネブライザー投与、または気管洗浄投与用に製剤化される。

【0040】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを含む薬学的組成物が記載される。

【0041】

この局面または他の任意の局面の一態様において、組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または髄腔内投与用に製剤化される。

【0042】

別の局面において、本明細書には、インターフェロン（IFN）産生を誘導する方法で

あって、それを必要とする対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖または本明細書記載のそのような二重鎖を含む薬学的組成物を投与する工程を含み、これにより、投与後にIFN産生が増加する方法が記載される。

【0043】

この局面または他の任意の局面の一態様において、IFN産生は、I型IFN、II型IFN、またはIII型IFNの産生である。

【0044】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、IFN産生は、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、およびIFN- ϵ のうちの1つまたは複数を含むI型IFNの産生である。

【0045】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、II型IFNはIFN- β である。

【0046】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、増加したIFN産生は、ウイルス感染に対する細胞の抵抗性を増加させる。

【0047】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、前記その必要がある対象は、IFN関連疾患を有するか、またはIFN関連疾患を有するリスクがある。

【0048】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、本方法は、投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患を有するリスクがあると対象を診断する工程を、さらに含む。

【0049】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、本方法は、投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患のリスクがあると対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程を、さらに含む。

【0050】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、IFN関連疾患は、基準レベルと比較して低減したIFNレベルを伴う疾患である。

【0051】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、IFN関連疾患は、基準レベルと比較して低減したI型IFNレベルを伴う疾患である。

【0052】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、IFN関連疾患は、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、真菌感染性疾患、寄生虫感染性疾患、がん、および自己免疫疾患からなる群より選択される。

【0053】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、本方法は、少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程を、さらに含む。

【0054】

この局面または他の任意の局面の別の態様において、前記少なくとも1つの追加治療薬は、抗ウイルス治療薬、抗細菌治療薬、抗真菌治療薬、抗寄生虫治療薬、抗がん治療薬、または抗自己免疫治療薬である。

【0055】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗細菌治療薬とを含む組成物が記載される。この局面の一態様において、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0056】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗真菌治療薬とを含む組成物が記載される。この局面の一態様において、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗寄生虫治療薬とを含む組成物が記載される。この局面の一態様において、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

【 0 0 5 8 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗がん治療薬とを含む組成物が記載される。この局面の一態様において、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

【 0 0 5 9 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの自己免疫疾患処置用の治療薬とを含む組成物が記載される。この局面の一態様において、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

【 0 0 6 0 】

別の局面において、本明細書には、例えばワクチンとして使用するための、抗原または抗原をコードする核酸配列にコンジュゲートされた、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖が、記載される。

【 0 0 6 1 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とワクチンとを含む組成物が記載される。

【 0 0 6 2 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とナノ粒子とを含む組成物が記載される。

【 0 0 6 3 】

別の局面において、本明細書には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含むナノ粒子が記載される。いずれかの局面の一態様において、ナノ粒子は脂質ナノ粒子である。

【 0 0 6 4 】

別の局面において、本明細書には、ワクチン接種をする方法であって、それを必要とする対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。この局面または他の任意の局面の一態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原または抗原をコードする核酸配列と共に投与される。この局面または他の任意の局面の別の態様において、抗原または抗原をコードする核酸は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖にコンジュゲートされる。

【 0 0 6 5 】

別の局面において、本明細書には、ワクチンの効力を増加させる方法であって、それを必要とする対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。この局面または他の任意の局面の一態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原または抗原をコードする核酸配列と共に投与される。この局面または他の任意の局面の別の態様において、抗原または抗原をコードする核酸は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖にコンジュゲートされる。

【 0 0 6 6 】

定義:

本明細書にいう「オリゴヌクレオチド二重鎖」は、生理学的に妥当な温度およびイオン強度の条件下で相補的塩基対の形成によってハイブリダイズすることで二重鎖を形成する、2本の別個のリボ核酸鎖を包含する。オリゴヌクレオチド二重鎖という用語は、同様の条件下で二重鎖を形成するためのハイブリダイゼーションを可能にする自己相補的配列を含む一本鎖も包含する。一本鎖から形成された二重鎖は、二重鎖の一方の鎖から他方の鎖への移行部においてハイブリダイズしていない数個のヌクレオチドで自分自身に折り返すヘアピン構造を含むか、またはハイブリダイズしている配列の間に、より明白なハイブリダイズしていないヌクレオチドのループを含む、ヘアピンループ構造もしくはステムルー

10

20

30

40

50

ブ構造を含むことができる。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、一本鎖オーバーハング（一般的にはGGまたはその修飾型）を含まずに20ヌクレオチド以上の二重鎖部分長（duplexed length）を有するだろう。5'末端ーリン酸-CUGA-3'二重鎖状配列（duplexed sequence）を含めて20ヌクレオチドという二重鎖状配列の最小長は、本明細書記載のオリゴヌクレオチド二重鎖の免疫刺激活性のために決定されたものであるが、残りの最小16ヌクレオチド長の二重鎖内には、例えば残り16ヌクレオチド中の少なくとも11ヌクレオチドは相補的でなければならないという形で、ある程度のミスマッチを許容することができ、例えば16ヌクレオチド中の少なくとも11ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも12ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも13ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも14ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも15ヌクレオチド、または少なくとも16個である残りのヌクレオチドのすべてが、相補的であることが考えられる。ミスマッチが1つまたは複数ある場合、ミスマッチは、それが二重鎖を形成する20ヌクレオチドの配列の内部に位置するのであれば、すなわち両端のヌクレオチドのストレッチが完全に相補的であるのであれば、より良く許容されるだろうと予期され、また、配列内にミスマッチが2つ以上ある場合、連続するミスマッチはあまり好ましくないだろうと予期される。ミスマッチが1つまたは複数ある場合、残りのヌクレオチド中のGC含量が比較的高ければ、それは、ミスマッチの何らかの相対的不利益を相殺するのに役立つとも考えられる。同じ原則は、二重鎖領域が20ヌクレオチド長より長い場合のミスマッチにも、当てはまるだろう。

10

20

【0067】

本明細書において使用される「RNA」という用語はリボ核酸を指し、自然界で典型的に転写される場合、これは、プリン核酸塩基アデニンおよびグアニンとピリミジン核酸塩基シトシンおよびウラシルとを含む。本明細書記載のRNAオリゴヌクレオチドは、修飾核酸塩基またはリボース-リン酸エステル主鎖への修飾、例えば安定性または分解に対する抵抗性を強化するものを、含むことができる。そのような修飾の例は、以下に本明細書において考察するか、または当技術分野において公知である。本明細書記載の局面のいずれかの一態様において、修飾は、RNAをデオキシリボ核酸と区別する2'ヒドロキシルの除去ではない。

【0068】

本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド二重鎖は5'ーリン酸基を含む」という表現は、ーリン酸が、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖によって含まれる配列5'-CUGA-3'の5'末端のC上またはその類似体もしくは修飾型上にあることを意味する。

30

【0069】

「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語は、いずれも、本明細書では、再現性ある統計的に有意な量の増加を意味するために使用される。いくつかの態様において、「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語は、基準レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または最大100%（100%を含む）の増加、または基準レベルと比較して10~100%の間の任意の増加、または適当な対照と比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、20倍の増加、30倍の増加、40倍の増加、50倍の増加、6倍の増加、75倍の増加、100倍の増加など、または2倍~10倍もしくはそれ以上の間の任意の増加を意味することができる。マーカーとの関連において、「増加」は、そのようなレベルの再現性ある統計的に有意な増加である。

40

【0070】

「減少」、「低減した」、「低減」または「阻害する」という用語は、いずれも本明細書では、統計的に有意な量の減少を表すために使用される。いくつかの態様において、「

50

減少」、「低減した」、「低減」または「阻害する」は、典型的には、適当な対照（例えば所与の処置がない場合）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれ以上の減少を含むことができる。本明細書にいう「低減」または「阻害」は、基準レベルと比較して完全な阻害または完全な低減を包含しない。「完全な阻害」とは適当な対照と比較して100%の阻害である。

【0071】

10

本明細書にいう「基準レベル」は、正常な、他の点では影響を受けていない、細胞集団または組織（例えば健常対象から得られた生物学的試料、または先の時点で当該対象から得られた生物学的試料、例えばインターフェロン媒介疾患（interferon-mediated disease）と診断される前に患者から得られた生物学的試料、または本明細書に開示する組成物と接触させていない生物学的試料）を指す。

【0072】

本明細書にいう「適当な対照」は、無処置の、他の点では同一な、細胞または集団（例えば本明細書記載の作用物質を投与されなかった患者、または、非対照細胞と比較して本明細書記載の組成物の一部だけによる投与がなされた患者）を指す。

【0073】

20

本明細書において使用される「インターフェロン産生を誘導する」または「インターフェロン産生を増加させる」という用語は、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の投与後に、または細胞、細胞の集団、組織もしくは生物の、そのような免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖との接触後に、インターフェロン産生が少なくとも3倍は増加することを意味する。いくつかの態様において、インターフェロン産生の増加は、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍またはそれ以上であることができる。インターフェロン産生は、例えばイムノアッセイ（例えばELISA、免疫沈降など）、生物学的レポーターアッセイ、または当技術分野において公知の他のアッセイによって測定することができる。

【0074】

30

本明細書にいう「インターフェロン関連疾患または障害」または「インターフェロンに関連する疾患または障害」は、インターフェロンを投与することによって、またはインターフェロンの産生を誘導することによって、処置することができる疾患または障害である。

【0075】

本明細書において使用される「ウイルス力価を低減する」（reduce a viral titerまたはreduces viral titer）という用語は、血清、血液または組織試料などの試料中の、または細胞培養上清中の、感染性ウイルス粒子の数が、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖による対象または細胞培養の処置によって、少なくとも10%は低減されることを意味する。

【0076】

40

本明細書において使用される「処置する」、「処置」、「処置すること」または「改善」（amelioration）という用語は、疾患もしくは障害に関連する状態の進行もしくは重症度を反転し、緩和し、改善し、阻害し、減速し、または停止させることを目的とする治療的処置を指す。「処置すること」という用語は、感染に関連する状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害作用または症状を低減するかまたは緩和することを包含する。処置は一般に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減するのであれば、「有効」である。あるいは、処置は、疾患の進行が低減するかまたは停止するのであれば、「有効」である。すなわち「処置」は、症状またはマーカーの改善を包含するだけでなく、処置がなかった場合に予想されるであろう症状の進行または悪化の停止または少なくとも減速も包含する。有益な臨床結果または望ましい臨床結果としては、検出可能であれ検出不可

50

能であれ、1つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化（すなわち悪化しないこと）、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または一時的軽減（palliation）、および寛解（remission）（部分的であるか完全であるかを問わない）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。疾患の「処置」という用語は、疾患の症状または副作用の軽減（待期的処置を含む）も包含する。

【0077】

本明細書にいう「防止すること」または「防止」は、任意の方法論であって、その方法論の作用ゆえに当該疾患状態が生じなくなるもの（例えば、限定するわけではないが、ある病原体による感染または疾病を防止するワクチンの投与）を指す。一局面において、防止は、無処置の対照で起こるほどには疾患が確立されないことも意味しうると理解される。したがって疾患の防止は、無処置の対象（例えば本明細書記載の方法または組成物で処置されていない対象）との比較で、対象が疾患を発生させうる可能性の低減を包含する。

10

【0078】

「統計的に有意」または「有意」という用語は、統計的有意性を指し、一般に、2標準偏差（2SD）以上の差を意味する。

【0079】

本明細書において使用される「comprising」または「comprises」（を含む）という用語は、本方法または組成物にとって本質的な組成物、方法およびそれらの各構成要素に関連して使用されるが、本質的であるか否かを問わず、指定されていない要素の包含も許容される。

20

【0080】

単数の用語「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数の指示対象を包含する。同様に、「または」という単語は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、「および」を包含するものとする。本開示の実施または試験では、本明細書に記載するものと類似するか等価な方法および材料を使用することができるが、適切な方法および材料を以下に説明する。「e.g.」という略号は *exempli gratia* というラテン語に由来し、本明細書では限定でない例を示すために使用される。したがって「e.g.」という略号は「例えば」（for example）と同義である。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】図1A～1Bは、その処置によりインフルエンザウイルス感染が減少した、二重鎖RNAの発見を表す。（図1A）A549細胞に二重鎖RNA（IDT Inc）をトランスフェクトした。24時間後に、細胞をインフルエンザA/WSN/33（H1N1）ウイルス（MOI=0.01）に感染させた。プラーク形成アッセイによるウイルス力価検出のために、上清を収集した。スクランブルDisRNAを対照として使用した。（図1B）ヒト気道チップに二重鎖RNA1（IDT Inc）をトランスフェクトした。24時間後に、細胞をインフルエンザA/WSN/33（H1N1）ウイルス（MOI=0.01）に感染させた。RT-qPCRによるウイルスNP遺伝子検出のために試料を収集した。スクランブル二重鎖RNAを対照として使用した。

30

【図2】図2は、共通する配列を含有する異なるバージョンのRNAがA549細胞におけるIRF-IFNパスウェイを増加させうることを表す。A549 Dual（商標）（InvivoGen（登録商標））細胞（10,000細胞/ウェル）を96ウェルプレートに播種し、48時間にわたって表示のRNAをトランスフェクトした。次に、QUANTI-Luc（商標）キットを使用し、製造者の説明書に従って、IRF-IFNパスウェイの活性化レベルを表すルシフェラーゼ活性を測定した。スクランブルRNA群のOD値を1に設定した。各試料につき6回の反復。

40

【図3】図3A～3Dは、二重鎖RNA1がI型インターフェロン（IFN-1）パスウェイの正の制御物質であることを示す。（図3A）二重鎖RNA1による処置後のRNA-seqからの差次的発現遺伝子（DEG）のボルカノプロット。（図3B）DEGに関するGOエンリッチメント解析。（図3C）二重鎖RNA1による処置後のTMT質量分析からの差次的発現タンパク質のボルカノプロット。（図3D）差次的発現タンパク質のGOエンリッチメント解析。

50

【図4】図4は、二重鎖RNA-1が、IFNパスウェイに特異的なSTAT1およびSTAT2を特異的に増加させることを示す。A549細胞に二重鎖RNA-1をトランスフェクトし、48時間培養してから、表示した遺伝子のqPCRによる検出のために細胞試料を収集した。

【図5】図5は、IRF3のロックアウトが、IFN-1パスウェイに対する二重鎖RNA1の効果消失させたことを示す。DGCR5をロックダウンするために、野生型HAP1細胞、IRF7ノックアウトHAP1細胞、またはIRF3ノックアウトHAP1細胞に、二重鎖RNA1 (IDT Inc) をトランスフェクトした。48時間後に、STAT1、IL4L1、TRAIL、IFFI6およびIFN-1を含むIFN-1パスウェイの遺伝子の、RT-qPCRによる検出のために、細胞を収集した。スクランブル二重鎖RNAを対照として使用した。

【図6】図6は、二重鎖RNA-1がIRF3のリン酸化に影響を及ぼすことによってIFN産生を誘導することを示す。A549細胞に二重鎖RNA-1をトランスフェクトし、48時間培養してから、qPCRによってIRF3のmRNAレベルを検出するか、または免疫蛍光染色によってIRF3のリン酸化レベルを検出した。

【図7】図7は、実施例1において検討したRNAオリゴヌクレオチドの表である。

【図8】図8は、dsRNA-4がIFN- β 産生を増加させることを表す。分化したヒト初代気道上皮細胞、ヒト初代肺胞上皮細胞またはヒト肺初代微小血管内皮細胞 (HMVEC) に、陰性対照 (Negative control:NC) またはdsRNA-4をトランスフェクトした。48時間後に、IFN- β 産生を測定するためにqPCRを行った。

【図9】図9は、dsRNA-1およびdsRNA-2が高レベルのIFN- β を誘導し、天然SARS-CoV-2を約 10^4 倍阻害したことを表す。ACE2発現A549細胞に表示のdsRNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、ACE2-A549をSARS-CoV-2にMOI 0.05で48時間、感染させた。細胞をTrizol (商標) に採取し、Zymo RNAミニプレップキット (商標) を使用し、製造者のプロトコールに従って、全RNAを単離してDNase-I処理した。表示の遺伝子のレベルを検出するために、qPCRを行った。低用量dsRNAの遺伝子レベルを1に設定した。

【図10-1】図10A~10Dは新規免疫刺激性RNAの評価を示す。図10Aは、A549細胞にRNA-A、RNA-B、またはスクランブル化二重鎖RNA対照をトランスフェクトし、24時間後に、インフルエンザA/WSN/33 (H1N1) ウイルス (MOI=0.01) に感染させたことを示す。感染48時間後に収集した培地上清中の子孫ウイルスの力価を、プラーク形成単位 (PFU) を定量することによって決定した。データは、対照RNAで処置した細胞において測定されるウイルス感染に対する%として示されている (示されているデータは平均 \pm 標準偏差である; N=3; ***, P<0.001)。図10Bは、A549細胞にRNA-A、RNA-Bまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトした48時間後の、細胞のIFN- α およびIFN- β のRNAレベルのqPCR解析を示す (N=3)。

【図10-2】図10A~10Dは新規免疫刺激性RNAの評価を示す。図10Cは、RNA-A、RNA-BまたはスクランブルRNA対照をトランスフェクトした野生型A549-Dual細胞における、Quanti-Lucアッセイを使って測定した、IFN産生のRNA媒介産生キネティクスを示す。スクランブル化RNA対照をトランスフェクトした細胞からのOD値を、バックグラウンドとして差し引いた (N=6)。図10Dは、トランスフェクションの48時間後に測定した、スクランブル化RNA対照と比較した、A549-Dual細胞における、RNA-AおよびRNA-BによるIFNの用量依存的誘導を表す (対照OD値をバックグラウンドとして差し引いた; N=6)。

【図11】図11Aおよび11Bは、RNA-seqおよびTMT質量分析によるRNA-Bの効果のプロファイリングを表す。A549細胞にRNA-Bまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間時点で細胞溶解物を収集し、RNA-seq (図11A) またはTMT質量分析 (図11B) によって解析した。差次的発現遺伝子 (DEG) または差次的発現タンパク質をボルカノプロットに示し (上)、DEGについてGOエンリッチメント解析を行った (下) (N=3)。差次的発現タンパク質についてプロット (上) およびGOエンリッチメント解析 (下) を行った (N=3)。

【図12A】図12Aおよび12Bは、IFNパスウェイ関連遺伝子レベルに対する免疫刺激

10

20

30

40

50

性RNAの効果を示すヒートマップを表す。図1Bおよび図11に示すRNA-seqからのDEG (図12A) およびTMT質量分析からの差次的発現タンパク質 (図12B) を、ここではヒートマップとして表す (スクランブル化RNA対象の遺伝子レベルを1に設定した; N = 3) 。

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図13】図13A~13Bは、I型インターフェロンパスウェイに関連するRNA誘導遺伝子発現を表す。図13Aは、RNA-AによるTMT質量分析からの差次的発現ISGが、I型またはII型インターフェロン刺激遺伝子に属することを示すベン図を表す。図13Bは、RNA-IがI型インターフェロンパスウェイを優先的に活性化することを示すqPCR結果のヒートマップを示す。A549細胞にRNA-Aまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトし、48時間時点で収集し、qPCRによって解析した (発現レベルをGAPDHに対して正規化した; RNA対照によって誘導される遺伝子レベルを1に設定した; N = 3) 。

10

【図14-1】図14は、実施例2~5において検討したRNAオリゴヌクレオチド配列の要約を示す。

【図14-2】図14-1の説明を参照のこと。

【図15】図15は免疫刺激性RNAの特徴を要約している。

【図16】図16は、図14に記した異なるRNAの免疫刺激活性の比較を示す。A549-Dual細胞に表示の二重鎖RNAを48時間トランスフェクトし、次に、ルシフェラーゼレポーター活性を定量することによって、IFNパスウェイの活性化を測定した。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている (N = 6) 。

20

【図17-1】図17A~17Fは、免疫刺激性RNAがRIG-I-IRF3パスウェイによってIFN- β 産生を誘導することを表す。図17Aは、野生型 (WT) HAP1細胞、IRF3ノックアウトHAP1細胞またはIRF7ノックアウトHAP1細胞にRNA-Aまたはスクランブル化RNA対照を48時間トランスフェクトし、qPCRによってIFN- β mRNAレベルを定量したことを示す。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている (N = 3) 。

IRF3ノックダウンがIFN- β 応答を完全に消失させたことに注目されたい。図17Bは、トランスフェクションの48時間後にqPCRによって決定された、免疫刺激性RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照がトランスフェクトされたA549細胞において測定されるIRF3 mRNAレベルを示す (データは対照RNAに対する倍率変化として示されている; N = 3) 。

30

図17Cは、RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトしたA549細胞において、ウェスタンブロット解析による検出でトランスフェクションの48時間後に検出された、総IRF3タンパク質およびリン酸化IRF3を示す (GAPDHをローディング対照として使用した) 。図17Dは、RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照がトランスフェクトされたA549細胞における、トランスフェクション48時間後の、リン酸化IRF3の分布を示す免疫蛍光顕微鏡像を示す (矢じり、リン酸化IRF3を発現する核。図17Eは、野生型 (WT) A549-Dual細胞、RIG-IノックアウトA549-Dual細胞、MDA5ノックアウトA549-Dual細胞またはTLR3ノックアウトA549細胞に、免疫刺激性RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間後に、Quanti-LucアッセイまたはqPCRを使ってIFN- β 発現レベルを定量したことを示す (データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている; N = 6) 。

40

RIG-Iノックアウトが免疫刺激性RNAのIFN- β 誘導能力を消失させたことに注目されたい。

【図17-2】図17A~17Fは、免疫刺激性RNAがRIG-I-IRF3パスウェイによってIFN- β 産生を誘導することを表す。図17F:細胞RNAセンサー (RIG-I、MDA5およびTLR3) とストレプトアビジン (SA) センサーチップ上に固定化されたRNA-1との間の結合アフィニティのSPR特性解析。平衡解離定数 (KD)、会合速度定数 (Ka) および解離速度定数 (Kd) をグラフ上に記す。

【図18】図18は、IRF3ノックアウトが免疫刺激性RNAのIFN- β パスウェイ関連遺伝子誘導能力を消失させたことを示す。野生型 (WT) HAP1細胞、IRF3ノックアウトHAP1細胞またはIRF7ノックアウトHAP1細胞にRNA-Aまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後にqPCRによって、STAT1、IL4L1

50

、TRAILおよびIFI6 mRNAレベルを定量した。データはRNA対照に対する倍率変化として表されている (N = 3)。

【図19】図19は、RIG-IノックアウトがIFN- γ に対する免疫刺激性RNAの誘導効果を消失させたことを表す。野生型 (WT) A549-Dual細胞、RIG-IノックアウトA549-Dual細胞、MDA5ノックアウトA549-Dual細胞またはTLR3ノックアウトA549細胞にRNA-A、RNA-B、RNA-Cまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後に、WT、RIG-I KOおよびMDA5 KO A549-Dual細胞ではQuant-Lucアッセイによって、TLR3 KO A549細胞ではqPCRによって、IFN- γ mRNAレベルを検出した。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている (N = 6)。

【図20-1】図20A~20Dは、免疫刺激性RNAが、臓器チップ中の分化したヒト肺上皮および内皮細胞において、IFN- γ 産生を誘導し、インフルエンザH3N2、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoVおよびHCoV-NL63による感染の広域スペクトル阻害を呈することを示す。図20A:ヒト肺の生理機能および病態生理を忠実に再現するヒト肺オンチップ (Lung-on-Chip) の横断面の概略図。図20B:チップの両チャンネルを通した灌流によってヒト肺気道および肺胞チップにRNA-1またはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間後に、qPCRによるIFN- γ mRNAの検出のために上皮細胞および内皮細胞を収集した (データはRNA対照に対する倍率変化として表されている; N = 3; *, p < 0.05; ***, p < 0.001)。図20C:インフルエンザA/HK/8/68 (H3N2) (MOI = 0.1) に感染させたヒト肺気道チップまたはヒト肺胞チップにおけるRNA-1またはスクランブル化対照による処置の効果。感染48時間後の溶解物においてウイルスNP遺伝子をqPCRで定量することによって、ウイルス量を決定した。結果はRNA対照に対する倍率変化として示されている; N = 3; *, p < 0.05。

【図20-2】図20A~20Dは、免疫刺激性RNAが、臓器チップ中の分化したヒト肺上皮および内皮細胞において、IFN- γ 産生を誘導し、インフルエンザH3N2、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoVおよびHCoV-NL63による感染の広域スペクトル阻害を呈することを示す。図20D:免疫刺激性二重鎖RNAによる処置は、SARS-CoV-2を含む複数の潜在的パンデミックウイルスの強力な阻害をもたらした。表示の細胞を、RNA-1、RNA-2またはスクランブル化対照で処置し、インフルエンザA/HK/8/68 (H3N2) (MOI = 0.1)、SARS-CoV-2 (MOI = 0.05)、SARS-CoV-1 (MOI = 0.01)、MERS-CoV (MOI = 0.01) およびHCoV-NL63 (MOI = 0.002) に、それぞれ感染させた。感染の48時間後に、細胞溶解物において、H3N2についてはウイルスNP遺伝子、SARS-CoV-2およびHCoV-NL63についてはN遺伝子をqPCRで定量し、プラークアッセイによってウイルス力価を定量することにより、ウイルス量を決定した。結果はすべて、RNA対照に対する倍率変化として示されている; N = 3; *, p < 0.05; ***, p < 0.001。

【図21】図21は、ACE2を過剰発現するA549細胞におけるIFNの免疫刺激性RNA媒介産生を表す。RNA-A、RNA-Bまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトした細胞におけるIFN- γ とISG15のレベルを、トランスフェクションの48時間後に、qPCRによって検出した。スクランブル化dsRNA対照によって誘導されたIFN- γ またはISG15のレベルを1に設定した。データは対照に対する倍率変化として示されている (N = 3)。

【図22】図22Aおよび図22Bは、免疫刺激性RNAはポリ (I:C) および5'ppp-dsRNAよりも強力なIFN- γ 誘導物質であるが、炎症誘発性サイトカインの産生は誘導しないことを表す。図22A:トランスフェクション48時間後のA549細胞における、同じ濃度 (2.8 μ g/mL) での、IFN- γ を誘導するRNA-1、ポリ (I:C) および5'ppp-dsRNAの力価の比較。データはスクランブルRNA対照に対する倍率変化として示されている (N = 3)。図22B:トランスフェクション48時間後のA549細胞においてポリ (I:C) またはRNA-1およびRNA-2によって誘導される炎症性遺伝子の発現変化を比較するヒートマップ。

【図23】図23は、免疫刺激性RNAがヒト肺上皮細胞におけるインフルエンザ感染を阻害できることを示す。

10

20

30

40

50

【図24】図24は、免疫刺激性RNAがサル腎臓細胞における感冒コロナウイルス感染を阻害できることを表す。

【図25】図25は、ACE2を過剰発現するヒト肺上皮細胞における、SARS-CoV-2ウイルスの、RNA-AおよびRNA-Bによる阻害を表す。

【図26】図26は、免疫刺激性RNAがインビボでSARS-CoV2感染を阻害することを表す。-1日目、0日目および+1日目に投与された二重鎖dsRNAによるI型インターフェロンの誘導は、ハムスターにおけるウイルス量を有意に低減させるのに十分である。

【図27】図27は、本明細書記載の免疫刺激性RNA二重鎖のモチーフ1およびモチーフ2を含むモチーフ1を図解している。

【図28】図28A~28Cは、インビボでの天然SARS-CoV-2感染の阻害を表す。図28A :SARS-CoV-2 Nタンパク質をコードするサブゲノムRNAに関するqPCRによって(左; *、 $p = 0.030$)、またはプラークアッセイでウイルス力価を定量することによって(右; *、 $p = 0.032$)、1日後に測定された、SARS-CoV-2ウイルス(10^2 PFU)を鼻腔内投与する1日前、感染当日および感染1日後に鼻腔内に投与されるRNA-1(PBS中20ug)で予防的に処置されたハムスターの肺における、ウイルス量の低減。図28B:SARS-CoV-2ウイルス(10^3 PFU)の鼻腔内投与の1日後から開始し、2日にわたって1日1回、鼻腔内にRNA-1(20ug)を投与することによって産生され、1日後に、SARS-CoV-2 Nタンパク質をコードするサブゲノムRNAに関するqPCRによって測定された、ハムスターの肺におけるウイルス量の低減(* $p = 0.01$)。図28C:感染1日後から開始して、送達ビヒクルのみ(上)またはRNA-1を含有するビヒクル(下)で処置された、Bからの肺の低倍率(左)および高倍率(右)組織H&E染色像(左バー、2.5mm;右バー、100 μ m)。

【図29】図29Aおよび図29Bは、RNA-seqおよびTMT質量分析によるRNA-2の効果のプロファイリングを表す。A549細胞にRNA-2またはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトした。48時間で細胞溶解物を収集し、RNA-seq(図29A)またはTMT質量分析(図29B)によって解析した。差次的発現遺伝子(DEG)または差次的発現タンパク質をボルカノプロットに示し(上)、DEGについてGOエンリッチメント解析を行った(下)($N = 3$)。差次的発現タンパク質についてプロット(上)およびGOエンリッチメント解析(下)を行った($N = 3$)。

【図30】図30は、ビヒクル対照と比較した、RNA-1についてのサブゲノムN転写産物を表す。レベルはアクチンローディング対照との比較である。

【発明を実施するための形態】

【0082】

詳細な説明

本明細書記載の組成物および方法は、一つには、インターフェロン(IFN)産生を誘導する免疫調節性/免疫刺激性オリゴヌクレオチドRNA二重鎖の発見に係る。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、ロバストな先天性免疫応答を誘導し、インターフェロンで処置できる疾患、またはインターフェロンの増加が利益になる疾患、例えば限定するわけではないが、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染および/または寄生虫感染、がんならびに自己免疫疾患を、阻害または処置する能力を有する。

【0083】

以下に、当業者が本技術を作製し使用することが可能になるように、考慮すべき事項を記載する。

【0084】

インターフェロン(IFNまたはIFNs)は、免疫細胞が感染に対する先天性免疫応答の一部として産生し放出する一群の多面的サイトカインである。IFNは、自己免疫疾患(例えば多発性硬化症および狼瘡)、多くのタイプのがん、およびウイルス感染の処置に、治療薬として使用されてきた。例えばPaolicelli, D., D'Amico, V., & Trojano, M. (2009), Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. *Biologics: targets & therapy*, 3, 369-376、Tamura T, Yana

10

20

30

40

50

i H, Savitsky D, Taniguchi T., The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* (2008)、McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A., Type I interferons in infectious disease *Nat Rev Immunol.* (2015) を参照されたい。これらの文献はそれぞれ、参照により、その全体が本明細書に組み入れられる。

【0085】

IFNの免疫調節効果は、インターフェロンポリペプチドの受容体を発現する広範囲にわたる細胞タイプに対して発揮される。インターフェロンの下流効果は、シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)複合体および他のシグナリング分子を活性化することにより、免疫系の制御を可能にする。STATは、いくつかの免疫系遺伝子の発現を制御する転写因子のファミリーである。インターフェロンシグナリングパスウェイは当技術分野において公知である。例えばMuller U, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* (1994)、Honda et al, *Immunity*, 25, 349-360 (2006)、Marchetti M, et al. Stat-mediated signaling induced by type I and type II interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors. *Mol Biol Cell* (2006)、Lee and Ashkar, *Front. Immunol.*, 2018、Platanias LC. Mechanisms of type-I-and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* (2005) 5:375-86を参照されたい。これらの文献はそれぞれ、参照により、その全体が本明細書に組み入れられる。

10

20

【0086】

インターフェロン(interferon:IFN)産生の誘導は、ヒト免疫応答において、ウイルス複製を「妨害」(interfering)することにより、決定的な役割を果たす。IFN遺伝子発現の誘導は、免疫細胞(例えばナチュラルキラー細胞およびマクロファージ)を活性化すること、および主要組織適合遺伝子複合体(MHC)抗原の発現を増加させて抗原提示をアップレギュレートすることで宿主防御を増大させることにより、限定するわけでは無いがウイルス感染を含む感染に対する、細胞の抵抗性の増加につながりうる。IFN遺伝子およびIFNタンパク質のタイプはいくつかあり、それらはヒトでは、典型的には3つのクラス、すなわちI型IFN(IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω およびIFN- τ)、II型IFN(IFN- γ)およびIII型IFNに分類される。3つのクラスに属するIFNはすべて、感染との戦いおよび免疫系の制御に関与する。

30

【0087】

IFN発現の制御は複雑であり、インターフェロン制御因子(interferon regulatory factor:IRF)によって緻密に管理されている。IRFは、免疫細胞の発生と分化および病原体に対する応答の制御を含む免疫応答の多くの局面に関与する転写因子のファミリーである。IRFの機能的役割とシグナリングパスウェイは当技術分野において公知である。例えばJefferies, *Front. Immunol.*, 2019およびBustamante et al. *Clinical immunology*, 5th ed. (2019)を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。そのようなIRFの一つであるIRF3はI型インターフェロン遺伝子誘導の正の制御物質である。IRF3は、細胞内RNAセンサーであるパターン認識受容体RIG-Iの下流で活性化される細胞内ポリペプチドである。特にIRF3は、IL-12 およびTGF- β を阻害する一方で、IFN- α と、I型IFNの他にも、CXCL10、RANTES、ISG56、IL-12p35、IL-23およびIL-15などのサイトカインの発現を、直接誘導することができる。

40

【0088】

インターフェロンパスウェイは、ウイルス、細菌、真菌および寄生虫が引き起こす病原性感染、ならびにがんおよび自己免疫疾患を含む多くの疾患に関与する。多くの場合、インターフェロン産生の増加は、感染に対する自然応答の一部であるので、そのような産生をさらに促進する処置は、感染との戦いを支援することができる。他の例、特にSARS-CoV-2コロナウイルスによる感染などを含むいくつかのウイルス感染では、身体のインタ

50

ーフェロン応答が活性化されないか、または他のウイルスもしくは病原体で見られるものとの比較で抑制されるので、インターフェロン産生を促進する処置は、感染との戦いを支援することができる。そえゆえに、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、インターフェロンを含む作用物質またはインターフェロン産生を促進する作用物質が利益になるかまたはそのような作用物質で処置することができる疾患を、防止し、軽減し、および/または処置するために使用することができる。

【0089】

免疫調節性オリゴヌクレオチド二重鎖組成物

本明細書において開示される免疫調節性オリゴヌクレオチド二重鎖は、5'末端配列5'-CUGA-3'(SEQ ID NO:1)が、その相補体5'-UCAG-3'と複合体を形成していて、該相補体が3'GGオーバーハングを含むことを特徴とする。したがって、本免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、以下の配列を含む:

10

トップ鎖5'>3'	5'-CUGAN ₁₆ -3'	SEQ ID NO: 1
ボトム鎖3'>5'	3'- <u>GGG</u> ACUN' ₁₆ -5'	SEQ ID NO: 2

下線部-3'オーバーハング;

N = G、A、CもしくはUのいずれかまたはその修飾バージョン;

N' = Nに対する相補的塩基

太字-SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の相補的部分;

20

【0090】

本明細書において開示される免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、二重鎖状のRNAを含み、5'-CUGA-3'上の5'-リン酸と、20ヌクレオチドの最小二重鎖部分長を有する(図27も参照されたい)。5'-リン酸-CUGA-3'配列の3'側にある二重鎖の配列構成はインターフェロン誘導にとって決定的ではない。N16は最小値である。しかし、N(および対応するN'相補配列)は、さらに長くてもよい。本明細書のどこか他の箇所を考察するように、二重鎖はある程度のミスマッチを許容できるが、ミスマッチはN₁₆:N'₁₆核酸塩基のうち5個以下であるべきである。ミスマッチが存在する場合のミスマッチに関する一般則についても、本明細書のどこか他の箇所を考察する。

30

【0091】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は少なくとも20核酸塩基長である。いくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、20~300、20~250、20~200、20~150、20~100、20~50、50~300、50~250、50~200、50~150または50~100ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100ヌクレオチドの長さを有する。これらの長さは、ボトム鎖上の二重鎖になっていない3'GGオーバーハングを含まない。

40

【0092】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は抗原または生体分子にコンジュゲートすることができる。いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、リンカーをさらに含む。本明細書記載のリンカーは、抗原の抗原コード配列への本オリゴヌクレオチド配列のコンジュゲーションに使用することができる。

【0093】

50

修飾/置換

本明細書記載のオリゴヌクレオチド二重鎖配列は、核酸塩基部分および/または糖-リン酸エステル主鎖部分への修飾を含む修飾ヌクレオチドを、その修飾ヌクレオチドが反対鎖上の適当なヌクレオチドへの塩基対合を許す限り、そしてそのような（1つまたは複数の）修飾が、例えば当技術分野において公知の方法または本明細書記載の方法を使って測定した場合に、結果として生じる二重鎖分子によるインターフェロン産生の促進を許す限り、含むことができる。そのような修飾は、二重鎖の安定性を、例えば酵素的分解または化学的分解に対する感受性を低減することなどによって、変化させることができるか、または限定するわけではないが塩基対合相互作用を含む分子内もしくは分子間相互作用を改変する（増加または減少させる）ことができる。RNAオリゴヌクレオチド二重鎖核酸塩基は、プリン塩基アデニン（A）およびグアニン（G）ならびにピリミジン塩基シトシン（C）およびウラシル（U）またはその修飾型もしくは類縁型を含む。

10

【0094】

一態様において、二重鎖配列は、5'-リン酸-CUGA-3'配列中または5'-UCAGGG-3'配列中に1つまたは複数の修飾リボヌクレオチドを含む。
5'-リン酸-CUGAN₁₆

**【0095】**

別の態様において、二重鎖は、N₁₆配列もしくはN'₁₆配列中に、または二重鎖が20ヌクレオチドより長い場合には二重鎖中の他のどこかに、1つまたは複数の修飾リボヌクレオチドを含む。そのような修飾を含むRNAの、例えば翻訳を許す修飾は、本明細書記載の二重鎖との関連において、許容され、免疫刺激性/インターフェロン誘導活性を保つ可能性が高いだろうと考えられる。所与の二重鎖分子では、リボヌクレオチド5'-CUGA-3'のうち、4つすべてを含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上を修飾できると考えられる。さらに、所与の二重鎖分子では、リボヌクレオチド5'-UCAGGG-3'のうち、6つすべてを含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上を修飾できると考えられる。さらに、N₁₆配列またはN'₁₆配列は、1つまたは複数の核酸塩基またはリボース-リン酸エステル主鎖の修飾を含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、もしくは15個以上の、または最大ですべて、およびすべてを含むリボヌクレオチドへの修飾を含むことができると考えられる。同様に、N-N'二重鎖が16個を超えるリボヌクレオチドを含む場合は、それらの任意の1つまたはそれらの任意の組み合わせが、または最大でそれらのすべて（すべてを含む）が、核酸塩基またはリボース-リン酸エステル主鎖構造への1つまたは複数の修飾を含むことができる。

20

30

【0096】

例示的な核酸修飾には、核酸塩基修飾、糖修飾、糖間連結部修飾、コンジュゲート（例えばリガンド）およびそれらの組み合わせがあるが、それらに限定されるわけではない。一態様において、修飾は、デオキシリボ核酸に存在するデオキシリボースによるリボース糖の置き換えを含まない。核酸修飾は当技術分野において公知である。例えばUS20160367702A1、US20190060458A1I、米国特許第8,710,200号、および米国特許第7,423,142号を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

40

【0097】

例示的な修飾核酸塩基には、チミン（T）、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン（nubularine）、イソグアニシン（isoguanisine）、ツベルシジン、ならびにアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルの置換類似体または修飾類似体、例えば2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルその他のアルキル誘導體、アデニンおよびグアニンの2-プロピルその他のアルキル誘導體、5-ハロウラシルおよび5-

50

ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシンおよび6-アゾチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシルその他の8-置換アデニンおよび同8-置換グアニン、5-トリフルオロメチルその他の5-置換ウラシルおよび同5-置換シトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン、例えば2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6,N6-ジメチルアデニン、2,6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換1,2,4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3カルボキシプロピル）ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N4-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化塩基があるが、それらに限定されるわけではない。さらなるプリン類およびピリミジン類には、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、『Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering』（Kroschwitz, J.I. 編、John Wiley & Sons, 1990）の858～859頁に開示されているもの、およびEnglisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613が開示しているものがある。

【0098】

例示的な糖修飾には、2'-フルオロ、3'-フルオロ、2'-OMe、3'-OMe、および非環状ヌクレオチド、例えばペプチド核酸（PNA）、アンロックト核酸（UNA）またはグリコール核酸（GNA）があるが、それらに限定されるわけではない。

【0099】

いくつかの態様において、核酸修飾は、糖間連結部の置き換えまたは修飾を含むことができる。例示的な糖間糖間連結部修飾には、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、ホスホチオエート、メチレンメチルイミノ、チオジエステル、チオノカルバメート、シロキサソ、N,N'-ジメチルヒドラジン（-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-）、アミド-3（3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'）およびアミド-4（3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'）、ヒドロキシルアミノ、シロキサソ（ジアルキルシロキサソ（dialkylsiloxane））、カルボキサミド、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルフィド、スルホネート、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール（3'-S-CH₂-O-5'）、ホルムアセタール（3'-O-CH₂-O-5'）、オキシム、メチレンイミノ、メチレンカルボニルアミノ（methykenecarbonylamino）、メチレンメチルイミノ（MMI、3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'）、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル（C3'-O-C5'）、チオエーテル（C3'-S-C5'）、チオアセトアミド（C3'-N(H)-C(=O)-CH₂-S-C5'、C3'-O-P(O)-O-SS-C5'、C3'-CH₂-N(H)-NH-C5'、3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5'および3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5'）があるが、それらに限定されるわけではない。

【0100】

いくつかの態様において、核酸修飾は、ペプチド核酸（PNA）、架橋型核酸（BNA）、モルホリノ類、ロックト核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）または当技術分野において記載されている他のキセノ核酸（XNA）を含むことができる。

【0101】

いくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、ヘアピン分子内二

重鎖またはヘアピン-ループ分子内二重鎖の形態をとることができる。そのような態様では、5'末端配列と3'末端配列とが自己相補的であり、本明細書において開示される免疫刺激性二重鎖に共通する5'-N₁₆UCAGGG-3'構造にハイブリダイズした5-ーリン酸-CUGAN₁₆を与える。

【0102】

前記局面のいずれかの別の態様において、本明細書記載のオリゴヌクレオチド二重鎖はリンカーを含む。例えばリンカーは、単に核酸主鎖連結部、例えばホスホジエステル連結部であることができる。加えて、核酸リンカーは、すべて同じであるか、またはすべて異なることができ、または一部が同じであり、かつ一部が異なる。

【0103】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、リンカーまたはスペーサーは、光切断可能リンカー、加水分解可能リンカー、酸化還元切断可能リンカー、リン酸エステルに基づく切断可能リンカー、酸切断可能リンカー、エステルに基づく切断可能リンカー、ペプチドに基づく切断可能リンカー、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択することができる。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、ジスルフィド結合、テトラジン-trans-シクロオクテン基、スルフヒドリル基、ニトロベンジル基、ニトロインドリン(nitroindoline)基、プロモヒドロキシクマリン基、プロモヒドロキシキノリン基、ヒドロキシフェナシル基、ジメトキシベンゾイン(dimethoxybenzoin)基、またはそれらの組み合わせを含むことができる。

【0104】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、相補鎖が共有結合でつながれるように架橋される。そのような架橋は、例えば、本明細書において特定された末端の5'-CUGA'3'配列が、その活性コンフォメーションに、より良く保たれるように、改良された二重鎖安定性を提供することができる。いくつかの態様において、架橋部分は化学官能基であることができる。いくつかの態様において、該化学官能基は、アジド、アルキン、テトラジン、DBCO、チオール、アミン、カルボニル、カルボキシル基、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0105】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、光架橋部分によって架橋される。光架橋部分の限定でない例としては、3-シアノビニルカルバゾール(CNVK)ヌクレオチド;5-プロモデオキシシトシン;5-ヨードデオキシシトシン;5-プロモデオキシウリジン(deoxyurdine);5-ヨードデオキシウリジン;およびアリアルアジド(AB-dUMP)、ベンゾフェノン(BP-dUMP)、パーフッ素化アリアルアジド(FAB-dUMP)またはジアジリン(DB-dUMP)を含むヌクレオチドが挙げられる。

【0106】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は薬学的に許容される担体にコンジュゲートされる。別の態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は薬学的に許容される担体と混合される。

【0107】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原もしくはその抗原性フラグメントまたは抗原もしくはその抗原性フラグメントをコードする配列に、コンジュゲートされる。

【0108】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原をコードする配列に融合されるか、または抗原をコードする配列を他の形で含むことができる。そのような組成物は、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖が共有する末端5'-ーリン酸-CUGA-3'および5'-UCAGGG-3'二重鎖/オーバーハング構造を与えるRNAに融合された、または該RNAとの複合体を形成した、抗原をコードする一本鎖RNA配列を含むだろう。細胞へのそのような組成物の導入は、適応免疫応答を刺激するための抗原の産生と、それと同時に起こるインターフェロン応答の刺激との両方をもた

10

20

30

40

50

らすことができる。

【0109】

オリゴヌクレオチド二重鎖を調製する方法

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、中でも、ヌクレオシドホスホラミダイトアプローチを含むがこれらに限定されない化学合成またはインビトロ転写を含むがこれらに限定されない、当技術分野において公知の合成方法によって調製することができる。修飾ヌクレオチドを含めるための化学合成の方法も当技術分野において公知である。

【0110】

インビトロ転写では、限定するわけではないが、バクテリオファージポリメラーゼ、例えばT7ポリメラーゼ、T3ポリメラーゼおよびSP6ポリメラーゼ、ウイルスポリメラーゼ、および大腸菌 (*E. coli*) RNAポリメラーゼなどといった、ポリメラーゼを使用することができる。

10

【0111】

オリゴヌクレオチド鎖は、当技術分野において公知のRNA抽出・精製方法を使って、試料から単離することができる。これらの方法には、カラム精製、エタノール沈殿、フェノール-クロロホルム抽出、または酸グアニジニウムチオシアネート-フェノールクロロホルム抽出 (AGPC) などがあるが、それらに限定されるわけではない。一本鎖オリゴヌクレオチドの単離後に、トップ鎖とボトム鎖とのハイブリダイゼーションおよび/またはアニーリングを行うことで、二重鎖二次構造を形成させることができる。

20

【0112】

本明細書において使用される「ハイブリダイズすること」、「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイゼーション」、「アニーリング」または「アニールする」という用語は、核酸の鎖を塩基対合によって相補鎖とつなぐことでハイブリダイゼーション複合体を形成させる任意のプロセスを使った相補的核酸の対合に関して、相互可換的に使用される。言い換えると、「ハイブリダイゼーション」という用語は、2つの一本鎖ポリヌクレオチドが非共有結合的に結合することで二本鎖ポリヌクレオチドを形成するプロセスを指す。結果として生じる二本鎖ポリヌクレオチドは「ハイブリッド」または「二重鎖」である。ハイブリダイズした配列または二重鎖状の配列を形成させるための条件は当業者には公知であり、これは一般に、正常なまたはほぼ正常な生理的条件、例えば細胞内条件の塩濃度および温度を含む。一般に、本明細書記載の二重鎖を形成させるためのハイブリダイゼーションは、実質的に等モル濃度で存在する各鎖で行うことができる。

30

【0113】

合成、ハイブリダイゼーションおよび任意で二重鎖になっていない鎖の除去後に、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、当技術分野において公知の任意の方法、例えば液体クロマトグラフィー、質量分析、次世代シーケンシング、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ゲル電気泳動、またはヌクレオシド配列、二次構造、化学組成、発現、熱力学、結合または機能を明らかにする他の任意の方法で、特徴づけることができる。

【0114】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖のさらなる特徴づけのために、5'-リン酸を、例えばスプリントライゲーション (splinted ligation) アッセイによって検出することができる。例えばShoenberg et al, *Nat Chem Biol* 3 (9) (2007) およびCelesnik H et al. *Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. Mol Cell.* 2007;27:79-90を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。反応条件を注意深く最適化し、ライゲートされるRNAをライゲートされないRNAと比較することにより、このアッセイでは、5'-リン酸末端を持つRNAの量の定量的データが得られる。

40

【0115】

上述したオリゴヌクレオチド修飾の安定性を改良し、そのいずれかを生産するために、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、適切な方法で化学修飾されうる

50

。上述のように、細胞外酵素および細胞内酵素に対するオリゴヌクレオチド二重鎖の安定性の要件と、ヒト治療への応用のために細胞膜を透過する能力の要件とを満たすために、修飾を行うことができる。例えばUhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.* 1990, 90, 544、Milligan, J. F.; Matteucci, M. D.; Martin, J. C. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1923、Crooke, S. T.; Lebleu, B. 編. 1993 『Antisense research and applications』(CRC Press: フロリダ州ボカトン)、およびThuong, N. T.; Helene, C. *Angew. Chim. Int. Ed.* 1993, 32, 666を参照されたい。核酸に対する化学修飾は、複素環式塩基の導入、リン酸エステル主鎖修飾、糖部分修飾、およびコンジュゲートされた基の取り付けを含みうる。例えばBeaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* 1993, 49, 1925、Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* 1993, 49, 6123、Manoharan, M. 『Antisense Technology』 2001, S. T. Crooke 編 (Marcel Dekker、ニューヨーク)、およびManoharan, M. *Antisense & Nucleic acid Development* 2002, 12, 103、Schweitzer, B. A.; Kool, E. T. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 7238、Schweitzer, B. A.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 1863、Moran, S. Ren, R. X.-F. Rumney, S.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 2056、Guckian, K. M.; Kool, E. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 2825、およびMatray, T. J.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 6191を参照されたい。さらなる情報については、Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature*, 1998, 391, 806、Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature*, 2001, 411, 494、McManus, M. T. Sharp, P. A. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3, 737、Hannon, G. J. *Nature*, 2002, 418, 244、およびRoychowdhury, A.; Illangkoon, H.; Hendrickson, C. L.; Benner, S. A. *Org. Lett.* 2004, 6, 489を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

20

【0116】

いくつかの治療目的には、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖が、分布と細胞取込みとが可能になるように、血清中においてある程度の安定性を有するべきである。血清における本オリゴヌクレオチドの治療レベルの長期間にわたる維持は、分布および細胞取込みに対して有意な効果を有し、増加した血清中安定性は、特異的細胞受容体を標的とするコンジュゲート基とは異なり、すべての細胞に影響するだろう。

【0117】

化学修飾は、リガンド、リンカーおよび抗原の付加を含むこともできる。例えばリガンドは、安定性、標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、特定組織または細胞タイプへのターゲティング、または細胞透過性を、例えばエンドサイトーシス依存的機序またはエンドサイトーシス非依存的機序によって、改良することができる。ペプチド(例えば抗原)コンジュゲートを保持するオリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知の手順を使って調製することができる。Trufert et al., *Tetrahedron* 1996, 52, 3005、および『Antisense Drug Technology』(S. T. Crooke 編, Marcel Dekker, Inc., 2001)のManoharan 「Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology」を参照されたい。これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0118】

薬学的組成物

本明細書記載の方法およびオリゴヌクレオチド二重鎖組成物は、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を薬学的に許容される担体と共に製剤化することを、さらに含むことができる。

40

【0119】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、本方法は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、薬学的に許容される担体および抗原または抗原をコードする核酸配列と共に製剤化する工程を、さらに含む。そのような製剤は、本明細書記載の免疫刺激性二重鎖を利用することで、例えば該製剤がワクチンとしてまたはワクチンと一緒に投与された場合に、アジュバント効果を提供する。前記局面のいずれかのいくつかの態様において、本

50

方法は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、薬学的に許容される担体、抗原または抗原をコードする核酸配列、および別個のアジュバントと共に製剤化する工程を、さら

【0120】

本明細書記載の方法および組成物の臨床的使用のために、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の投与は、非経口投与、例えば静脈内投与、粘膜投与、例えば鼻腔内投与、眼投与または他の投与様式のための薬学的組成物または薬学的製剤への製剤化を含むことができる。いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、対象における有効な処置をもたらす任意の薬学的に許容される担体化合物、材料または組成物と一緒に、投与することができる。したがって、本明細書記載の方法において使用するための薬学的製剤は、1つまたは複数の薬学的に許容される成分と組み合わされた本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含有することができる。「薬学的に許容される」という表現は、妥当な医学的判断の範囲内で、合理的なベネフィット/リスク比に見合っ

10

20

【0121】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、化合物を、例えば(1)非経口投与、例えば滅菌溶液もしくは滅菌懸濁液または徐放性製剤として、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射などによるもの、(2)経皮投与、(3)経粘膜投与、(4)気管支肺胞洗浄による投与に適合させたものを含む、固体、液体またはゲルの形態で、対象に投与するために製剤化することができる。

30

【0122】

いくつかの態様において、本明細書記載の組成物は、粒子またはポリマーに基づくビヒクルを含む。例示的な粒子またはポリマーに基づくビヒクルとして、ナノ粒子、マイクロ粒子、ポリマーマイクロスフェア、またはポリマー-薬物コンジュゲートが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0123】

いずれかの局面の一態様において、本明細書記載の組成物は、脂質ビヒクルをさらに含む。例示的な脂質ビヒクルとして、リポソーム、リン脂質、ミセル、脂質エマルション、および脂質-薬物複合体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0124】

製剤は、例えば呼吸器感染に対処するために、気道への送達に適合させることができる。そのような製剤は、例えば吸入用の、エアロゾルとしての送達に適合させることができる。いくつかの態様において、本明細書記載の組成物は、エアロゾル投与、ネブライザー投与、または気管洗浄投与用に製剤化される。いくつかの態様において、組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または髄腔内投与用に製剤化される。

40

【0125】

エアロゾルとして使用するために、本明細書記載の組成物は溶液中または懸濁液中に調製することができ、適切な噴射剤、例えばプロパン、ブタンまたはイソブタンのような炭化水素噴射剤および従来の賦形剤と一緒に、加圧エアロゾル容器に充填しうる。

【0126】

50

本明細書記載のオリゴヌクレオチド二重鎖組成物は、液状物を細かい飛沫に変えるネブライザーまたはアトマイザーの場合のように、加圧されていない形態で投与することもできる。好ましくは、そのような噴霧化により、一様なサイズの小さな液滴が、より大きな液体のかたまりから、制御された形で生成される。噴霧化は、そのための任意の適切な手段によって、例えば公知であり現在販売されている多くのネブライザーを使用することによって、達成することができる。例えばイリノイ州ナイルズのInhalation Plastic, Inc. から入手することができるAEROMIST（商標）ニューマティックネブライザー（pneumatic nebulizer）。

【0127】

複数の活性成分を、ネブライザーによって一緒にまたは個別に投与するように適合させる場合、それらは、単位用量としてまたは多用量デバイスとして、適切なpHまたは張性の調整が行われたまたは行われていない、水性懸濁液または水溶液の形態をとることができる。

10

【0128】

さらにまた、噴霧化中に圧力をかけるために任意の適切なガスを使用することもでき、現在までのところ好ましいガスは化学的に不活性なものである。限定するわけではないが、窒素、アルゴンまたはヘリウムなどといった例示的ガスを、効果的に使用することができる。

【0129】

いくつかの態様において、本明細書記載の組成物は、乾燥粉末の形態で気道に直接投与することもできる。したがって免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は吸入器によって投与することができる。例示的な吸入器には、定量吸入器およびドライパウダー吸入器（dry powdered inhaler）がある。

20

【0130】

定量吸入器、すなわち「MDI」は、液化噴射剤に溶解された薬学的組成物または液化噴射剤に懸濁された微粉化粒子などの製品が充填された、耐圧キャニスターまたは耐圧容器である。使用することができる噴射剤には、クロロフルオロカーボン、炭化水素またはヒドロフルオロアルカンがある。よく使用される噴射剤はP134a（テトラフルオロエタン）およびP227（ヘプタフルオロプロパン）であり、これらはそれぞれ単独で使用するかまたは組み合わせて使用されうる。これらは、任意で、1つもしくは複数の他の噴射剤および/または1つもしくは複数の界面活性剤および/または1つもしくは複数の他の賦形剤、例えばエタノール、潤滑剤、酸化防止剤および/または安定化剤と組み合わせて使用される。

30

【0131】

乾燥粉末吸入器（dry powder inhaler）（すなわちTurbuhaler（商標）（Astra AB））は、極めて小さな体積に圧縮された薬学的組成物の乾燥粉末粒子を生成させるための、加圧空気源による作動が可能なシステムである。

【0132】

吸入治療用の乾燥粉末エアロゾルは、一般に、平均直径が主として $< 5 \mu\text{m}$ の範囲内になるように生産される。粒子の直径が $3 \mu\text{m}$ を超えるにつれて、マクロファージによる貪食は次第に少なくなる。しかし、粒径を増加させると、粒子（標準的質量密度を有するもの）が気道および腺房に進入する確率は、口咽頭領域または鼻腔領域における過剰な沈着により、最小限になることもわかっている。

40

【0133】

適切な粉末組成物には、例えば、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む粉末状調製物が挙げられる。これらは、ラクトースまたは気管支内投与にとって許容される他の不活性粉末と、混合することができる。粉末組成物は、エアロゾルディスペンサーから投与するか、または破砕可能なカプセルに入れて、それを患者または臨床家がデバイスに挿入し、デバイスがそのカプセルに穴を開けて、吸入に適した定常流にその粉末を吹き出すことができる。組成物は、噴射剤、界面活性剤および共溶媒を含むことがで

50

き、適切な絞り弁で閉じられた従来のエアロゾル容器に充填されうる。

【0134】

気道への送達のためのエアロゾルは、例えばAdjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 1:565-569 (1990)、Zanen, P. and Lamm, J.-W. *J. Int. J. Pharm.*, 114:111-115 (1995)、*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990) のGonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract", Anderson et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140:1317-1324 (1989)) に記載されており、ペプチドおよびタンパク質の全身送達も潜在的に可能である (Patton and Platz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8:179-196 (1992)); Timsina et al., *Int. J. Pharm.*, 101:1-13 (1995)、およびTansey, I. P., *Spray Technol. Market*, 4:26-29 (1994)、French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., *Aerosol Sci.*, 27:769-783 (1996)、Visser, J., *Powder Technology* 58:1-10 (1989)、Rudt, S. and R. H. Muller, *J. Controlled Release*, 22:263-272 (1992)、Tabata, Y. and Y. Ikada, *Biomed. Mater. Res.*, 22:837-858 (1988)、Wall, D. A., *Drug Delivery*, 2:101-20 (1995)、Patton, J. and Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8:179-196 (1992)、Bryon, P., *Adv. Drug Del. Rev.*, 5:107-132 (1990)、Patton, J. S., et al., *Controlled Release*, 28:1579-85 (1994)、Damms, B. and Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996)、Niven, R. W., et al., *Pharm. Res.*, 12(9):1343-1349 (1995)、ならびにKobayashi, S., et al., *Pharm. Res.*, 13(1):80-83 (1996)。これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0135】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の化学修飾に加えて、核酸およびオリゴヌクレオチドの膜越しの送達 (transmembrane delivery) を改良することを目指す取り組みとして、タンパク質担体、抗体担体、リポソーム送達系、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、ウイルスベクター、およびリン酸カルシウム媒介形質転換が利用されてきた。米国特許第7,423,142号 (B2)、同第7,786,290号 (B2)、同第8,598,139号 (B2)、同第8,808,747号 (B2)、同第10,125,369号 (B2)、同第10,130,649号 (B2) および米国特許出願公開第2018/0369419号 (A1) (これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる) には、mRNA、siRNAおよびdsRNA組成物を皮膚、血液、肝臓および他の標的組織または標的器官に送達するための製剤が記載されている。ほんの一例として、米国特許第8,598,139号 (B2) には送達用の核酸-脂質粒子の例がいくつか記載されている。例えば第42~48欄を参照されたい。本明細書において開示されるインターフェロン誘導分子も二重鎖の特徴を有するので、siRNA組成物をそのような組織に送達するための製剤を使って本明細書において開示される二重鎖を送達することができると、明確に考えられる。

【0136】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、ミセル、両親媒性担体、ポリマー、シクロデキストリン、リポソームおよび封入デバイスを含む組成物に製剤化される。

【0137】

マイクロエマルション化技術は、いくつかの親油性 (水不溶性) 医薬品のバイオアベイラビリティを改良することができる。例としては、トリメトリン (Trimetrine) (Dordunoo, S. K., et al., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991、およびREV 5901 (Sheen, P. C., et al., *J. Pharm. Sci.* 80(7), 712-714, 1991) が挙げられる。なかんずく、マイクロエマルション化は、吸収を循環系ではなくリンパ系に優先的に向かわせ、よって肝臓を迂回し、肝胆循環における化合物の破壊を防止することによって、強化されたバイオアベイラビリティを与える。

【0138】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、両親媒性担体を使って製剤化

することができる。両親媒性担体は、飽和およびモノ不飽和ポリエチレングリコール化 (polyethyleneglycolized) 脂肪酸グリセリド、例えば完全にまたは部分的に水素化されたさまざまな植物油から得られるものである。そのような油は、トリ-、ジ-およびモノ-脂肪酸グリセリドならびに対応する脂肪酸のジ-およびモノ-ポリエチレングリコールエステルからなるものが好都合であるだろう。また、特に好ましい脂肪酸組成物は、カプリン酸4~10、カプリン酸3~9、ラウリン酸40~50、ミリスチン酸14~24、パルミチン酸4~14、およびステアリン酸5~15%を含む。両親媒性担体のもう一つの有用なクラスには、飽和もしくはモノ不飽和脂肪酸 (SPANシリーズ) または対応するエトキシ化類似体 (TWEENシリーズ) による部分エステル化ソルビタンおよび/またはソルビトールがある。

10

【0139】

Gelucireシリーズ、Labrafil、Labrasol、またはLauroglycol (いずれもGattefosse Corporation (フランス・サン-プリエスト) が製造販売している)、PEG-モノオレート、PEG-ジオレート、PEG-モノラウレートおよびジラウレート、レシチン、ポリソルベート80など (米国を含む世界中のいくつかの会社が製造販売している) など、市販の両親媒性担体は、特に考えられる。

【0140】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、親水性ポリマーを使って製剤化することができる。親水性ポリマーは水溶性であり、小胞形成脂質に共有結合で取り付けることができ、それらは毒性効果を伴わずにインビボで認容される (すなわち生体適合性である)。適切なポリマーとしては、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリ乳酸 (ポリラクチドとも呼ばれる)、ポリグリコール酸 (ポリグリコリドとも呼ばれる)、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、およびポリビニルアルコールが挙げられる。適切でありうる他の親水性ポリマーとして、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、およびヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースなどの誘導体化セルロースが挙げられる。

20

【0141】

一定の態様において、本明細書記載の薬学的組成物は、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー、ポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、セルロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ無水物、ポリ (オルト) エステル、ポリ酪酸 (poly (butic acid))、ポリ吉草酸、ポリ (ラクチド-co-カプロラクトン)、多糖、タンパク質、ポリヒアルロン酸、ポリシアノアクリレート、およびそれらの配合物、混合物またはコポリマーからなる群より選択される生体適合性ポリマーを含む。

30

【0142】

一定の態様において、本明細書記載の薬学的組成物はリポソームとして製剤化される。リポソームは、当技術分野において公知のさまざまな技法のいずれかによって調製することができる。例えば、米国特許第4,235,871号、PCT出願公開WO96/14057、New RRC, 『Liposomes: A practical approach』 (IRL Press、オックスフォード (1990)、33~104頁、Lasic DD, 『Liposomes from physics to applications』 (Elsevier Science Publishers BV、アムステルダム、1993) を参照されたい。

40

【0143】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原またはその抗原性フラグメントにコンジュゲートし、ワクチン組成物として製剤化することができる。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の治療用製剤は、所望の純度を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を、随意的に許容される担体、賦形剤または安定化剤 (『Remington's Pharmaceutical Sciences』第16版、Osol, A. 編 (1980)) と混合することにより、凍結乾燥製剤また

50

は水溶液の形態で、貯蔵用に調製することができる。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、使用される投薬量および濃度において受容者にとって無毒性であり、これには、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤;酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン;保存剤(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム;フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)のポリペプチド;タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えばポリ(ビニルピロリドン);アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン;単糖、二糖および他の糖質、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン;キレート剤、例えばEDTA;糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール;塩形成対イオン、例えばナトリウム;金属錯体(例えばZn-タンパク質錯体);および/または非イオン界面活性剤、例えばTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)またはポリエチレングリコール(PEG)などがある。

10

【0144】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖組成物を含むワクチンまたは他の薬学的組成物は、薬学的に許容される塩、典型的には例えば塩化ナトリウムを、好ましくはほぼ生理的濃度で含有することができる。本明細書記載のワクチンまたは他の薬学的組成物の製剤は、薬学的に許容される保存剤を含有することができる。いくつかの態様において、保存剤濃度は0.1~2.0%(典型的にはv/v)の範囲にある。適切な保存剤としては医薬分野において公知のものが挙げられる。ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンは保存剤の例である。本明細書に記載のワクチンまたは他の薬学的組成物の製剤は、薬学的に許容される界面活性剤を0.005~0.02%の濃度で含むことができる。

20

【0145】

本明細書記載の治療用の薬学的組成物は、処置される特定適応症の必要に応じて、2種以上の活性化化合物、好ましくは互いに有害な影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含有することができる。

【0146】

ワクチンにおいて使用するためにまたはワクチンと共に使用するために二重鎖が製剤化されるいくつかの態様では、ワクチン組成物がアジュバントとしての二重鎖を使って製剤化される。別の態様では、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と追加のアジュバント、例えば当技術分野において公知のものを使って、ワクチン組成物を製剤化することができる。

30

【0147】

免疫処置、免疫応答およびワクチン接種との関連で本明細書において使用される「アジュバント」という用語は、特異的抗原と組み合わせて使用した場合に抗原のみよりもロバストな免疫応答を生じさせる任意の物質を指す。ワクチン製剤に組み込まれた場合、アジュバントは一般に、ワクチン抗原に対する特異的免疫応答を加速し、長引かせ、またはその質を強化するように作用する。

40

【0148】

アジュバントは、典型的には、アクセサリ細胞またはアクセサリ因子の蓄積および/または活性化を促進することで、抗原-特異的免疫応答を強化し、それにより、ワクチンの効力、すなわち抗原に対する防御免疫を誘導するために使用される抗原含有組成物または抗原コード組成物の効力を、強化する。

【0149】

アジュバントには、一般に、デポー効果を生み出すアジュバント、免疫刺激性アジュバント、およびデポー効果を生み出すと共に免疫系を刺激するアジュバントが含まれる。デポー効果を生み出すアジュバントは、体内で抗原をゆっくりと放出させることで、抗原へ

50

の免疫細胞の曝露を長引かせるアジュバントである。このクラスのアジュバントには、ミョウバン（例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）；エマルジョン系製剤、例えば鉱油、非鉱油、油中水型または油中水中油型（oil-in-water-in oil）エマルジョン、水中油型エマルジョン、例えばMontanideアジュバントのSeppic ISAシリーズ（例えばMontanide ISA 720;AirLiquide、フランス・パリ）；MF-59（Span 85およびTween 80で安定化された水中スクアレン型エマルジョン;Chiron Corporation、カリフォルニア州エメリービル）；およびPROVAX（商標）（安定化デタージェントおよびミセル形成剤を含有する水中油型エマルジョン;IDEC Pharmaceuticals Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ）などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0150】

免疫刺激性アジュバントは、免疫系の細胞の活性化を引き起こすアジュバントである。例えばこれは、免疫細胞に、サイトカインおよびインターフェロンを産生させ、分泌させる。このクラスのアジュバントには、シャボンノキ（*Q.saponaria tree*）の樹皮から精製されるサポニン、例えばQS21（HPLC分画で21番目のピークに溶出する糖脂質;Aquila Biopharmaceuticals, Inc.、マサチューセッツ州ウスター）；ポリ[ジ（カルボキシラトフェノキシ）ホスファゼン（PCPPポリマー;Virus Research Institute、米国）；リポ多糖の誘導体、例えばモノホスホリルリピドA（MPL;Ribi ImmunoChem Research, Inc.、モンタナ州ハミルトン）、ムラミルジペプチド（MDP;Ribi）およびスレオニル-ムラミルジペプチド（t-MDP;Ribi）；OM-174（リピドAに類縁のグルコサミン二糖;OM Pharma SA、スイス・メイラン）；およびリーシュマニア伸長因子（精製されたリーシュマニア（*Leishmania*）属タンパク質;Corixa Corporation、ワシントン州シアトル）などがあるが、それらに限定されるわけではない。このクラスのアジュバントにはCpG DNAも含まれる。

【0151】

デポー効果を生み出しかつ免疫系を刺激するアジュバントは、上述した機能の両方を有する化合物である。このクラスのアジュバントには、ISCOM（混合されたサポニン、脂質を含有し、抗原を保持することができる細孔を持つウイルスサイズの粒子を形成する免疫刺激複合体;CSL、オーストラリア・メルボルン）；SB-AS2（MPLおよびQS21を含有する水中油型エマルジョンであるSmithKline Beechamアジュバントシステム#2;SmithKline Beecham Biologicals [SBB]、ベルギー・リクサンサール）；SB-AS4（ミョウバンおよびMPLを含有するSmithKline Beechamアジュバントシステム#4;SBB、ベルギー）；ミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー、例えばCRL1005（これらはポリオキシエチレンに挟まれた疎水性ポリオキシプロピレンの線状鎖を含有する;Vaxcel, Inc.、ジョージア州ノークロス）；およびシンテックスアジュバント製剤（Syntex Adjuvant Formulation）（SAF、Tween 80および非イオン性ブロックコポリマーを含有する水中油型エマルジョン;Syntex Chemicals, Inc.、コロラド州ボルダー）などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0152】

本明細書記載の薬学的組成物の活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに包括するか、コロイド薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）に包括するか、またはマクロエマルジョンに包括することができる。そのような技法は、『Remington's Pharmaceutical Sciences』第16版, Osol, A. 編（1980）に開示されている。

【0153】

いくつかの態様では徐放性調製物を使用することができる。徐放性調製物の好適な例としては、本明細書記載の抗原またはそのフラグメントを含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態にあるものが挙げられる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、

10

20

30

40

50

ヒドロゲル（例えばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばルプロン・デポ（LUPRON DEPOT（商標））（乳酸-グリコール酸コポリマーとロイプロリド酢酸塩とで構成される注射可能なマイクロスフェア）、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日超にわたる分子の放出を可能にし、一方、一定のヒドロゲルはそれより短い期間でタンパク質を放出する。カプセル化されると、抗原またはそのフラグメントは、体内に長時間留まり、37℃における水分への曝露の結果として、変性または凝集して、生物学的活性の喪失および考えうる免疫原性の変化をもたらす。関与する機序に応じて、合理的戦略を安定化のために工夫することができる。例えば、凝集機序がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S-結合形成であるとわかった場合には、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、水分量を管理すること、適当な添加剤を使用すること、および特別なポリマーマトリックス組成物を開発することによって、安定化を達成することができる。

【0154】

免疫刺激活性

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、薬学的組成物およびワクチン組成物は、免疫刺激を必要とする対象、特に、インターフェロン産生の誘導を必要としているかまたはインターフェロン産生の誘導により利益を得るであろう対象に投与することができる。さまざまな態様において、インターフェロン誘導活性は、単独で、1つもしくは複数の抗感染薬（例えば抗ウイルス薬、抗細菌薬、抗真菌薬または抗寄生虫薬との組み合わせで、1つもしくは複数の抗がん剤、または1つもしくは複数の自己免疫疾患治療薬との組み合わせで、治療効果を有する。

【0155】

免疫刺激活性は、例えば、生物学的試料（例えば血清）におけるサイトカインおよびインターフェロン産生のレベルを検出し、測定することによって、決定することができる。

【0156】

生物学的試料中のIFNのレベルを検出し、測定し、決定するための方法は、当技術分野において公知である。IFNポリペプチドレベルは、例えばイムノアッセイによって検出することができる。ThermoFisher Scientificは、ヒトインターフェロンガンマレベルを測定するためのELISAに基づくキットを販売している-カタログ番号29-8319-65を参照されたい。IFN遺伝子発現も検出することができる。遺伝子発現を測定する方法は、例えばPCR、マイクロアレイ、ならびにウェスタンブロットティングおよび免疫細胞化学などの免疫検出法など、当技術分野において公知である。例えば、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）解析は、例えばApplied Biosystems（商標）から市販されているキットおよびアレイを使って行うことができる-Applied Biosystems（登録商標）TaqMan（登録商標）アレイ・ヒトインターフェロンパスウェイ、カタログ番号4414154を参照されたい。de Veer MJ et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J Leukoc Biol. (2001) 69:912-20も参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0157】

一群のインターフェロンポリペプチド（例えばIFN- γ ）に特異的な抗体は当技術分野において公知であり、例えばAbcam（商標）から市販されていて、免疫組織化学、免疫蛍光およびウェスタンブロットティングにおいて使用することができる。

【0158】

インターフェロンのレベルと活性は、レポーターアッセイまたはバイオアッセイを使って決定することもできる。例えば、生物学的に活性なI型インターフェロンを検出するためのレポーターアッセイは、ISGF3パスウェイの活性化をモニタリングすることによる

ものを、InvovGen（登録商標）から入手することができる。例えばRees et al. *J Immunol Methods*, (2018)を参照されたい。

【0159】

ウイルス感染アッセイも、ウイルス防御に対する免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の効果を決定するために使用することができる。例えばIFN活性は、適切な対照と比較した、ウイルス感染後の細胞死からの細胞株の保護レベルによって、測定することができる。例えばBarber et al. *Host defense, viruses and apoptosis. Cell Death Differ* 8, 113-126, doi:10.1038/sj.cdd.4400823 (2001)、およびLiu, S. et al. *Science* 347, (2015)を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

【0160】

加えて、関連する動物モデルおよびヒトインビトロ操作プラットフォーム（in vitro engineered platform）も、インターフェロン産生を直接的または間接的に検出するために使用することができる。当技術分野において公知の任意のモデルを使用することができる。例えばSi, L. et al. *Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. bioRxiv*, doi:10.1101/2020.04.13.039917 (2020)、Van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. *Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. Immunol Rev.* (1995)を参照されたい。

20

【0161】

関連病原体からの防御を提供することには、対象が後に微生物、その抗原または抗原フラグメント（例えば生きた病原体上または病原体中の抗原）に曝された時に、対象がその抗原に対してナイーブである場合よりも、効果的な免疫応答を惹起するように、免疫系を刺激することが含まれる。防御には、病原体のより速いクリアランス、症状の重症度および/もしくは時間の低減、ならびに/または疾患もしくは症状の発生の欠如が含まれる。等価な無処置対照と比較して、そのような低減は、任意の標準的技法による測定で、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%以上の低減である。

【0162】

処置の方法

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、インフルエンザ感染を阻害することに加えて、広範囲にわたるウイルス、細菌、真菌および寄生虫病原体による感染、ならびにがんおよび自己免疫疾患を含むIFN関連疾患を処置するために、使用することができる。

30

【0163】

ある疾患または状態がインターフェロンの投与またはインターフェロン産生の誘導によって処置されるのであれば、その疾患または医学的状态はインターフェロンに関連するとみなされる。一部の疾患または障害には、治癒過程または回復過程の一部として、インターフェロン誘導が関与しており、他の疾患または状態では、その病理が、インターフェロン、例えばIFN、I型IFN、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ およびIFN- ϵ 、II型IFN（IFN- ω ）、ならびにIII型IFNの欠乏、低い産生量または産生がないことを特徴とする。

40

【0164】

本明細書には、感染の処置を必要とする対象における感染を処置する方法であって、該対象に本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む方法が記載される。

【0165】

この局面または任意の局面の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖は、該二重鎖と接触した細胞におけるインターフェロン（IFN）産生を誘導するのに十分である。別

50

の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖を、それを必要とする対象に投与する工程は、IFNのレベルまたは活性を増加させるのに十分である。別の一態様において、本オリゴヌクレオチド二重鎖を、それを必要とする対象に投与する工程は、対象における免疫応答を増加させるのに十分である。別の一態様において、免疫応答は抗ウイルス応答である。

【0166】

限定するわけではないが、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、微生物感染を処置するために使用することができる。微生物感染を引き起こすことができる微生物の限定でない例として、ウイルス、細菌、真菌および寄生虫が挙げられる。

【0167】

別の一態様において微生物感染は慢性である。一態様において微生物感染は急性である。急性感染は、持続期間が2週間未満である短期間の感染であり、一方、慢性感染は長期間であって、2週間より長く持続する。急性感染を処置するための方法は、慢性感染を処置するために使用される方法と同じである場合がある。対照的に、急性感染の処置と慢性感染の処置には異なる方法が使用される場合もある。

【0168】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、微生物感染は全身感染である。本明細書にいう「全身感染」とは、体中に拡がった感染、例えば血中に存在する感染を指す。全身感染の限定でない例として、細菌性敗血症およびエンドトキシンショックが挙げられる。

【0169】

いくつかの態様において、微生物感染は細菌によって引き起こされる。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与することによって処置または防止することができる細菌感染症の限定でない例として、エロモナス (*Aeromonas*) 感染症、アフリカダニ咬傷熱、アメリカダニ咬傷熱 (*american tick bite fever*) (リケッチア・パルケリ (*Rickettsia parkeri*) 感染症)、アルカノバクテリウム・ヘモリティクム (*Arcanobacterium haemolyticum*) 感染症、細菌性血管腫症、ベジェル (地方病性梅毒)、プラストミセス症様膿皮症 (増殖性膿皮症)、水疱性指端炎、ポトリオミセス症、ブリル・ジンサー病 (*Briii-Zinsser disease*)、ブルセラ症 (バング病、マルタ熱、波状熱)、腺ペスト、水疱性膿痂疹、ネコひっかき病 (ネコひっかき熱、イングリッシュ・ウェア感染症 (*English-Wear infection*))、接種リンパ性細網内皮症、亜急性所属リンパ節炎)、蜂窩織炎、下疳、軟性下疳 (*chancroid, soft chancre, ulcer molle*)、クラミジア感染症、慢性リンパ管炎、慢性習慣性丹毒、慢性潜蝕性穿掘性潰瘍 (メレー壊疽)、クロモバクテリウム症感染症 (*chromobacteriosis infection*)、扁平コンジローマ、皮膚放線菌症、皮膚炭疽感染症、皮膚ジフテリア菌 (*C.diphtheriae*) 感染症 (パーカーただれ、ジフテリア性砂漠潰瘍 (*diphtheric desert sore*))、敗血症性潰瘍 (*septic sore*)、草原潰瘍)、皮膚B群連鎖球菌感染症、皮膚パスツレラ・ヘモリチカ (*Pasteurella hemo/ytica*) 感染症、皮膚ストレプトコッカス・イニアエ (*Streptococcus iniae*) 感染症、壊疽性皮膚炎 (皮膚の壊疽)、膿瘡、壊疽性膿瘡、ユーリキア・ユーイングイ (*Ehrlichiosis ewingii*) 感染症、自国象皮病 (*elephantiasis nostras*)、発疹熱 (*endemic typhus, murine typhus*)、発疹チフス (流行性シラミ媒介性発疹チフス)、丹毒 (*erysipelas, ignis sacer, Saint Anthony's fire*)、ローゼンバッハの類丹毒 (*erysipeloid of Rosenbach*)、輪状紅斑、紅色陰癬、外耳炎 (外耳道炎、水泳者耳)、ひょう疽、ノミ媒介性紅斑熱、フリンダーズ島紅斑熱、ムササビチフス (*flying squirrel typhus*)、毛包炎、フルニエ壊疽 (陰茎または陰囊のフルニエ壊疽)、せつ腫症 (せつ)、ガス壊疽 (クロストリジウム性筋壊死、筋壊死)、鼻疽 (馬鼻疽 (*Equinia, farcy, malleus*))、淋菌敗血症 (関節炎-皮膚症候群、播種性淋菌感染症)、淋疾 (淋病) グラム陰性毛包炎、グラム陰性足趾間感染症、鼠径肉芽腫 (ドノバン症、生殖鼠径肉芽腫、熱帯性鼠径肉芽腫、性病性肉芽腫、生殖鼠径性病性肉芽腫、類狼瘡型の鼠径部潰瘍形成、鼠径部の蛇行状潰瘍形成、外陰部の潰瘍化肉

10

20

30

40

50

芽腫、潰瘍硬化性肉芽腫)、緑色爪症候群、JK群コリネバクテリウム敗血症、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 蜂窩織炎、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 蜂窩織炎、病院せつ腫症、温水浴槽毛包炎 (緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 毛包炎)、ヒト顆粒球向性 (*granulocytotropic*) アナプラズマ症、ヒト単球向性 (*monocytotropic*) エーリキア症、伝染性膿痂疹、日本紅斑熱、レプトスピラ症 (フォート・ブラッグ熱、前脛骨熱、ワイル病)、リステリア症、ルートヴィヒアンギナ、狼瘡様毛瘡、ライム病 (アフセリウス (*Afzelius*) 病、ライムボレリア症)、鼠径リンパ肉芽腫 (気候性横痃、デュラン・ニコラス・ファーブル病、鼠径リンパ肉芽腫症、鼠径部腸骨リンパ腺炎 (*poradenitis inguinale*)、腺病性横痃 (*strumous bubo*))、マラコプラキア (*malakoplakia*、*malacoplakia*)、地中海紅斑熱 (ボタン熱)、類鼻疽 (ホイットモア病)、髄膜炎菌血症、ミズーリライム病 (*Missouri Lyme disease*)、マイコプラズマ感染症、壊死性筋膜炎 (人食いバクテリア症候群)、新生児毒素性ショック症候群様発疹症、ノカルジア症、新生児水瘡 (*noma neonatorum*)、北アジアダニ発疹チフス、新生児眼炎、オロヤ熱 (カリオン病)、パストレラ症、肛門周囲蜂窩織炎 (会陰皮膚炎、レンサ球菌肛門周囲病)、根尖周囲膿瘍、ピンタ、陥凹性角質溶解 (溝状臍剥脱性皮膚炎、溝状臍角化腫、輪状角質溶解 (*ringed keratolysis*))、ペスト、原発性淋菌性皮膚炎、シュードモナス性膿皮症、シュードモナス性ホットフット症候群、化膿性爪周囲炎、化膿性筋炎、Q熱、クイーンズランドマダニチフス、鼠咬熱、再発性毒素媒介性会陰紅斑、鼻硬化症、リケッチア・アエスクリマンニイ (*Rickettsia aeschlimannii*) 感染症、リケッチア痘症、ロッキー山紅斑熱、剣状脛 (前脛骨内反)、鞍鼻、サルモネラ症、猩紅熱、ツツガムシ病 (ツツガムシ熱)、細菌性赤痢、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (新生児天疱瘡、リッター病)、レンサ球菌性間擦疹、浅在性膿疱性毛包炎 (ポックハルト膿痂疹、浅在性毛包炎)、尋常性毛瘡 (床屋かゆみ症、ひげ毛瘡)、梅毒疹、梅毒 (*sypilis*、*lues*) ダニ媒介性リンパ節腫脹、毒素性ショック症候群 (レンサ球菌毒素性ショック症候群、レンサ球菌毒素性ショック様症候群、毒性レンサ球菌症候群 (*toxic streptococcal syndrome*))、塹壕熱 (五日熱 (*five-day fever*、*quintan fever*))、都市塹壕熱 (*urban trench fever*)、熱帯性潰瘍 (アデン潰瘍、熱帯皮膚病、マラバル潰瘍、熱帯壊疽)、野兔病 (シカバエ熱、大原病、パーヴァントバレーペスト、ウサギ熱)、ペルーいぼ、ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) 感染症、イチゴ腫 (プーバ、フランベジア、パランジ、ピャン)、アクアリウム肉芽腫 (水槽肉芽腫、水泳プール肉芽腫)、境界群らい腫性ハンセン病、境界群ハンセン病、境界群類結核、ハンセン病、ブルーリ潰瘍 (ベアンズデイル (*Bairnsdale*) 潰瘍、サール (*Searl*) 潰瘍、サール (*Searle*) 潰瘍)、硬結性紅斑 (バザン病)、組織球様ハンセン病、らい腫性ハンセン病、らい (ハンセン病)、腺病性苔癬 (苔癬性皮膚結核)、尋常性狼瘡 (狼瘡性結核)、粟粒結核 (播種性結核、全身性急性皮膚結核、播種性皮膚結核)、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレム (*Mycobacterium avium-intracel/ulare*) 複合体感染症、マイコバクテリウム・ヘモフィルム (*Mycobacterium haemophilum*) 感染症、マイコバクテリウム・カンサシ (*Mycobacterium kansasii*) 感染症、丘疹性壊疽性結核疹、原発性接種結核 (皮膚初期変化群、初期結核変化群、結核性下疳)、迅速発育マイコバクテリウム感染症、皮膚腺病 (軟化性皮膚結核)、開口部皮膚結核 (急性潰瘍性結核、開口部結核)、皮膚疣状結核 (いぼ状狼瘡、解剖者結節、いぼ状皮膚結核)、結核性蜂窩織炎、結核性肉芽腫 (転移性結核性膿瘍、転移性結核性潰瘍)、結核性ハンセン病、および細菌が引き起こす性行為感染症が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。微生物感染を含む性行為感染症の限定でない例としては、軟性下疳、クラミジア感染症、淋疾、鼠径リンパ肉芽腫、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*Mycoplasma Genitalium*)、非淋菌性尿道炎、骨盤内炎症性疾患、梅毒、膣炎、細菌性膣炎、酵母性膣炎、酵母感染症が挙げられる。

【0170】

別の一態様において、微生物感染は真菌感染症である。本明細書記載の組み合わせ治療組成物および方法の使用が想定される真菌感染症を引き起こす感染性真菌の限定でない例

10

20

30

40

50

としては、カンジダ属 (*Candida*) の種;クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*) の種;アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の種;ミクロスポルム属 (*Microsporium*) の種;白癬菌属 (*Trichophyton*) の種;表皮菌属 (*Epidermophyton*) の種;トリコスポロン属 (*Trichosporon*) の種;癬風;須毛部白癬;体部白癬;股部白癬;手白癬;足白癬;爪白癬;顔面白癬;かわら状白癬 (*tinea imbricate*);異型白癬 (*tinea incognito*);エピデルモフィトン・フロッコーズム (*Epidermophyton floccosum*);ミクロスポルム・カニス (*Microsporium canis*);オーズアン小孢子菌 (*Microsporium audouinii*);トリコフィトン・インタージギタレ (*Trichophyton interdigitale*);トリコフィトン・メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*);トリコフィトン・トンスランス (*Trichophyton tonsurans*);トリコフィトン・シェーンライニ (*Trichophyton schoenleini*);トリコフィトン・ルブルム (*Trichophyton rubrum*);ホルタエア・ウェルネキイ (*Hortaea werneckii*);ピデライア・ホルタエ (*Piedraia hortae*);マラセルチア・フルフル (*Malasserzia furfur*);コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*);コクシジオイデス・ポサダシ (*Coccidioides posadasii*);ヒストプラズマ・カプスラーツ (*Histoplasma capsulatum*);ヒストプラズマ・デュボアシイ (*Histoplasma duboisii*);ラカジア・ロボイ (*Lacazia loboi*);パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*);ブラストミセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis*);スポロトリックス・シェンキイ (*Sporothrix schenckii*);ペニシリウム・マルネッフエイ (*Penicillium marneffeii*);カンジダ・アルピカンス (*Candida albicans*);カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*);カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*);カンジダ・ルシタニアエ (*Candida lusitanae*);カンジダ・ジロベシイ (*Candida jirovecii*);エキソフィアラ・ジーンセルメイ (*Exophiala jeanselmei*);フォンセカエア・ペドロソイ (*Fonsecaea pedrosoi*);フォンセカエア・コンパクタ (*Fonsecaea compacta*);フィアロフォラ・ベルコーサ (*Phialophora verrucosa*);ゲオトリクム・カンディダム (*Geotrichum candidum*);シュードアレシェリア・ボイディ (*Pseudallescheria boydii*);リゾプス・オリザエ (*Rhizopus oryzae*);ムコ・インディカス (*Mucor indicus*);アブシジア・コリムピフェラ (*Absidia corymbifera*);シンセプラサストラム・ラセモスム (*Syncephalastrum racemosum*);バシジオボラス・ラナルム (*Basidiobolus ranarum*);コニジオボルス・コロナツス (*Conidiobolus coronatus*);コニジオボルス・インコングルオウス (*Conidiobolus incongruus*);クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*);エンテロシトゾアン・ビエネウシ (*Enterocytozoan bieneusi*);エンセファリトゾーン・インテスティナリス (*Encephalitozoon intestinalis*);およびリノスポリジウム・セーベリ (*Rhinosporidium seeberi*) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

20

30

40

【0171】

真菌感染または真菌感染中に産生される毒素が引き起こす障害/疾患であって、それに対して本明細書記載の組成物および方法をさまざまな局面および態様で応用可能であるものの限定でない例としては、体表創もしくは体表熱傷の感染;粘膜表面の感染;呼吸器感染;眼、耳、鼻もしくはのどの感染;または腸病原体の感染が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。別の態様において、真菌感染は軟部組織または皮膚の感染、例えば表在性真菌症;皮膚真菌症;皮下真菌症;膻真菌症;全身性真菌症であるか、または感染創もしくは感染熱傷である。

【0172】

他の医学的に関連する微生物は文献に広く記載されている。例えば、その内容がすべて参照により本明細書に組み入れられるC.G.A Thomas, 『Medical Microbiology』 Bailliere Tindall、英国1983を参照されたい。上記のリストのそれぞれは例示であって限定を意図していない。

【0173】

ウイルス感染

50

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖はウイルス感染を処置するために使用することができる。

【0174】

一局面において、本明細書には、対象における抗ウイルス応答を誘導する方法であって、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を対象に投与する工程を含む方法が記載される。

【0175】

別の局面において、本明細書には、対象におけるウイルス感染を処置する方法が記載される。

【0176】

いくつかの態様において、ウイルス感染は、中枢神経系組織、眼組織、上部呼吸器系組織、下部呼吸器系組織、肺組織、腎臓組織、膀胱組織、脾臓組織、心組織、胃腸組織、表皮組織、生殖組織、鼻腔組織、喉頭組織、気管組織、気管支組織、口腔組織、血液組織、および筋組織からなる群より選択される組織の感染である。

【0177】

ウイルス感染の限定でない例としては、鼻、のど、上気道および肺の呼吸器感染、例えばインフルエンザ、肺炎、コロナウイルス、SARS、COVID19、細気管支炎、および喉頭気管支炎；胃腸感染、例えば胃腸炎、ロタウイルス、ノロウイルス；肝臓感染、例えば肝炎；神経系感染、例えば狂犬病、ウエストナイルウイルス、脳炎、髄膜炎、およびポリオ；皮膚感染、例えば疣贅、斑点および水痘；胎盤および胎児ウイルス感染、例えばジカウイルス、風疹ウイルスおよびサイトメガロウイルス；エンテロウイルス、コクサッキーウイルス；エコーウイルス、チクングニアウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ロスリバーウイルス、跳躍病ウイルス、ジョン・カニンガムウイルス、麻疹ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、アルポウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型単純ヘルペス、2型単純ヘルペス、ヒトヘルペスウイルス6、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、ムンプスウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、コロナウイルス、SARSコロナウイルス、SARS-CoV-2ウイルス、A型コクサッキーウイルス、B型コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、HTLV-1、A型、B型、C型、D型、およびE型肝炎ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、痘瘡ウイルス、伝染性軟属腫、ヒトパピローマウイルス、パルボウイルスB19、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、デングウイルス（DENV）、ならびにジカウイルスが挙げられる。

【0178】

ウイルス感染症を有するかまたはウイルス感染症を発症するリスク因子としては、ウイルスへの曝露、ウイルスに感染した対象への曝露または接触、ウイルスと接触した汚染表面への曝露、ウイルスに感染した対象からの生物学的試料または体液との接触、ウイルスに感染した対象との性交、注射針の共用、輸血、薬物使用、およびある対象から別の対象にウイルスを伝播させる当技術分野において公知の他の任意のリスク因子が挙げられる。ある対象のリスク因子の評価は、例えば熟練した臨床家によって、または該対象によって行われうる。

【0179】

微生物感染の同定

一態様において、対象は、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の投与に先立って、微生物感染を有すると診断される。別の態様において、本方法は、ウイルス感染を有すると対象を診断する工程を含む。別の態様において、本方法は、投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程を含む。

【0180】

10

20

30

40

50

微生物感染の診断を確立または確認すると共に原因微生物種を同定するために検査室で行われるさまざまな検査が、当業者には知られている。一般的なウイルス感染、例えば麻疹、風疹、水痘は、症状に基づいて診断することができる。ウイルス感染に関連する症状は、ウイルスのタイプに依存してさまざまである。例えば、上部呼吸器ウイルス感染の場合、症状には、咳嗽、息切れ、発熱および倦怠感が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0181】

流行期に起こる感染（例えばCOVID19およびインフルエンザ）の場合は、他の類似の症例の存在が、医師が特定の感染症を同定するのに役立つ。類似する症状を引き起こす異なるウイルス同士、例えばCOVID-19（SARS-CoV2）とインフルエンザを区別するために、検査診断は重要である。

10

【0182】

抗微生物薬感受性検査を伴う微生物種の培養は、いくつかの微生物にとってはゴールドスタンダード臨床検査であるとみなされる。皮膚試料または粘膜試料は次の方法で収集することができる:1)感染部位をこすった乾燥滅菌綿先スワブ、2)粘膜表面、例えば口の内側から採取した、湿スワブ(moist swab)、3)針と注射器を使った皮膚病変部からの体液/膿の吸引、および4)皮膚生検、すなわち局部麻酔下で取り除かれた皮膚の小さな試料。細菌などの培養は、最も一般的には、皮膚スワブをヒツジ血液寒天プレート上でブラッシングし、それらを異なる条件に曝露することによって行われる。成長する微生物の種は、標本を培養するために使用した培地、インキュベーションの温度、および利用可能な酸素量に依存する。例えば、偏性好気性菌は、酸素の存在下でのみ成長することができ、一方、偏性嫌気性菌は酸素の存在下では全く成長することができない。

20

【0183】

血液検査には、静脈から針でアクセスされる血液の試料が必要である。微生物感染に関する検査の限定でない例としては、1)全血球数、感染では、好中球の増加を伴って白血球数が上昇することが多い(好中球増加症)、2)C反応性タンパク質(CRP)、重症感染症ではCRPがしばしば>50に上昇する、3)プロカルシトニン、細菌感染による全身性敗血症のマーカー、3)血清学、特定微生物に対する免疫応答を決定するための10日間隔の検査、4)迅速血漿レアギン(RPR)検査、梅毒が疑われる場合、および4)>100.4°Fの高熱であるなら、検出するための血液培養が挙げられる。血液検査は、微生物感染の存在下で生成した抗体を同定するために行うことができる。

30

【0184】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)では、皮膚、血液または他の試料から微生物DNAの断片が単離され、増幅されることになる。試料のDNAを既知生物からのDNAと比較することで、種を同定する。

【0185】

微生物感染の処置

感染(例えば細菌感染またはウイルス感染)を処置するための薬物療法はいくつか開発されている。感染の処置には、例えば感染後に投与される抗生物質および抗ウイルス薬物療法を含めることができる。

40

【0186】

「治療作用物質」という用語は当技術分野において認識されており、対象において局所的にまたは全身性に作用する生物学的、生理学的または薬理学的に活性な物質である任意の化学部分を指す。「薬物」とも呼ばれる治療作用物質の例は、『Merck Index』、『Physicians' Desk Reference』および『The Pharmacological Basis of Therapeutic』などの周知の参考文献に記載されており、それらには、薬物療法;ビタミン;ミネラル補給剤;疾患または疾病の処置、防止、診断、治癒または軽減に使用される物質;身体構造または機能に影響を及ぼす物質;または生理的環境に置かれた後に生物学的に活性になるかもしくは生物学的活性が増すプロドラッグが含まれるが、それらに限定されるわけではない。対象に投与した時に本願組成物から隣接する組織または体液中に放出され

50

うるさまざまな形態の治療作用物質を使用しうる。

【0187】

感染の防止および処置のための例示的な治療作用物質およびワクチンには、ペニシリン、セフトリアキソン、アジスロマイシン、アモキシシリン、ドキシサイクリン、セファレキシム、シプロフロキサシン、クリンダマイシン、メトロニダゾール、アジスロマイシン、スルファメトキサゾール、トリメトプリム、髄膜炎菌多糖ワクチン、破傷風トキソイド、コレラワクチン、腸チフスワクチン、肺炎球菌7価ワクチン、肺炎球菌13価ワクチン、肺炎球菌23価ワクチン、ヘモフィルスbコンジュゲート、炭疽ワクチン、イムノビル、インジナビル、イノシン、ロピナビル、ロバリド (lovaviride)、マラビロクス (maraviroc)、ネビラピン、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル、ペンシクロビル、リマンチジン (rimantidine)、ピリミジン、サキナビル、スタブジン、テノホビル、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、シラミジン (ciramidine)、ザナミビル、ジドブジン、MMRワクチン、DTaPワクチン、肝炎ワクチン、Hibワクチン、HPVワクチン、インフルエンザワクチン、ポリオワクチン、ロタウイルスワクチン、帯状疱疹ワクチン、Tdapワクチン、破傷風ワクチン、フルコナゾール、ケトコナゾール、アンホテリシンB、およびスルファドキシム/ピリメタミンなどがあるが、それらに限定されるわけではない。さらなる非限定的な例には、アバカビル、アシクロビル (Acyclovir、Aciclovir)、アデホビル、アマンタジン、アンプリジェン、アンブレナビル (アジェネラーゼ)、アモジアキン、アピリモド、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、バラビル、バロキサビルマルボキシル (Xofluza (登録商標))、ビクトルビ、ボセプレビル (VICTRELIS (登録商標))、シドフォビル、クロファジミン、クロミフェン、コビシスタット (Tybost (登録商標))、コンビビル (固定用量薬)、ダクラタスビル (Daklinza (登録商標))、ダルナビル、デラビルジン、デシコビ、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、ドラビリン (Pifeltro (登録商標))、エコリエベル、エドクスジン、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、エトラビリン (Intelence (登録商標))、ファムシクロビル、ファビピラビル、フェノフィブラート、ホミビルセン、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル (Cytovene (登録商標))、イバシタピン、イバリズマブ (Trogarzo (登録商標))、イドクスウリジン、イミキモド、イムノビル、インジナビル、イノシン、インテグラール阻害薬、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターフェロン、ラミブジン、レテルモビル (Prevymis (登録商標))、ロピナビル、ロビリド、マンノース結合レクチン、マラビロク、メチサゾン、モロキシジン、ナファモスタット、ネルフィナビル、ネビラピン、Nexavir (登録商標)、ニロチニブ、ニタゾキサニド、ノービア、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル (Tamiflu (登録商標))、パゾパニブ、ペグインターフェロン・アルファ-2a、ペグインターフェロン・アルファ-2b、ペンシクロビル、ペラミビル (Rapivab (登録商標))、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬 (薬理学)、ピラミジン、ラルテグラビル、レムデシビル、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リルピビリン (Edurant (登録商標))、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、シメプレビル (Olysio (登録商標))、ソホスブビル、スタブジン、相乗的エンハンサー (抗レトロウイルス薬)、テラプレビル、テルビブジン (Tyzeka (登録商標))、テノホビルアラフェナミド、テノホビルジソプロキシル、テノホビル、トレミフェン、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル (バルトレックス)、バルガンシクロビル、ピクリビロク、ビダラビン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル (Relenza (登録商標))、およびジドブジンが含まれる。

【0188】

前記局面のいずれかのいくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は単独治療として使用される。

【0189】

前記局面のいずれかの別の態様において、本明細書記載の組成物は、インターフェロ

10

20

30

40

50

ン媒介疾患（例えば自己免疫疾患、感染またはがん）のための公知の組成物および治療法と組み合わせて使用することができる。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、例えば抗ウイルス治療薬と混合するか、またはインターフェロン媒介疾患の処置のための治療レジメンとして投与することができる。

【0190】

本明細書にいう「組み合わせて」投与するとは、対象の闘病中に2つ（またはそれ以上）の異なる処置が対象に送達されること、例えば対象がその障害（呼吸器疾患）であると診断された後、その障害が治癒するかもしくは排除されるかまたは処置が他の理由で中止されるまでに、2つ以上の処置が送達されることを意味する。本明細書において提供される組成物と組み合わせて使用することができる処置の非限定的な例には、アパカビル、アシクロビル（Acyclovir、Aciclovir）、アデホビル、アマンタジン、アンプリジェン、アンブレナビル（アジェネラーゼ）、アモジアキン、アピリモド、アルピドール、アタザナビル、アトリブラ、アトパコン、パラビル、パロキサビルマルボキシル（Xofluza（登録商標））、ピクトルビ、ボセプレビル（Vicitrelis（登録商標））、シドフォビル、クロファジミン、クロミフェン、クロファザミン、コピシスタット（Tybost（登録商標））、コンビビル（固定用量薬）、ダクラタスビル（Daklinza（登録商標））、ダルナビル、デラビルジン、デシコビ、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、ドラビリン（Pifeltro（登録商標））、エコリエベル、エドクスジン、エファビレンツ、エルピテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、エトラビリン（Intelence（登録商標））、ファムシクロビル、ファビピラビル、フェノフィブラート、ホミビルセン、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル（Cytovene（登録商標））、イバシタピン、イバリズマブ（Trogarzo（登録商標））、イドクスウリジン、イミキモド、イムノビル、インジナビル、イノシン、インテグラゼ阻害薬、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターフェロン、イベルメクチン、ラミブジン、ラサロシド、レテルモビル（Prevydis（登録商標））、ロピナビル、ロビリド、マンノース結合レクチン、マラビロク、メチサゾン、モロキシジン、ナファモスタット、ネルフィナビル、ネビラピン、Nexavir（登録商標）、ニロチニブ、ニタゾキサニド、ノービア、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル（Tamiflu（登録商標））、パゾパニブ、ペグインターフェロン・アルファ-2a、ペグインターフェロン・アルファ-2b、ペンシクロビル、ペラミビル（Rapivab（登録商標））、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬（薬理学）、ピオナリジン、ピラミジン、ラルテグラビル、レムデシビル、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リルピビリン（Edurant（登録商標））、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、シメプレビル（Olysio（登録商標））、ソホスブビル、スタブジン、相乗的エンハンサー（抗レトロウイルス薬）、タフェノキン、テラプレビル、テルビブジン（Tyzeka（登録商標））、テノホビルアラフェナミド、テノホビルジソプロキシル、テノホビル、トレミフェン、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル（パルトレックス）、バルガンシクロビル、ベルムラフェニブ、ベネトクラクス、ピクリビロク、ピダラピン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル（Relenza（登録商標））、およびジドブジンが含まれる。

【0191】

いくつかの態様では、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と前記少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが実質上同時に投与される。

【0192】

いくつかの態様において、前記少なくとも1つの抗ウイルス治療薬は異なる時点で投与される。

【0193】

いくつかの態様において、ある処置の送達は、第2の処置の送達が始まった時点ではまだ行われているため、投与期間には一部重複がある。これを、本明細書では、「同時」（simultaneous）または「並行（concurrent）送達」という場合もある。別の態様に

において、ある処置の送達は他の処置の送達が始まる前に終了する。いずれかの場合のいくつかの態様において、処置は、併用投与ゆえに、より有効である。例えば、第2の処置はより有効であり、例えばより少ない第2の処置で等価な効果が認められるか、または第2の処置は、第1の処置を行わずに第2の処置が実施された場合に認められるであろう程度よりも強く、症状を低減し、または同様の状況が第1の処置でも認められる。いくつかの態様において、送達は、症状の低減またはその障害に関係する他のパラメータの低減が、ある処置を他方の処置の非存在下で送達した場合に観察されるであろうものよりも大きくなるような送達である。2つの処置の効果は、部分的に相加的であるか、完全に相加的であるか、または相加的効果を上回る。送達は、送達された第1処置の効果が、第2処置が送達される時にまだ検出可能であるような形で行うことができる。本明細書記載の組成物と前記少なくとも1つの追加治療は、同じ組成物または別々の組成物で同時に投与するか、または逐次的に投与することができる。逐次的投与の場合、本明細書記載の組成物を最初に投与し、追加の組成物を2番目に投与することができ、または投与順序を反対にすることができる。本組成物および/または他の治療組成物、治療手順または治療モダリティは、障害が活動性である期間中、または寛解期間中もしくは疾患の活動性が低下している期間中に、投与することができる。本組成物は、もう一つの処置の前に、またはその処置と並行して、または処置後に、または障害の寛解中に、投与することができる。

10

【0194】

組み合わせて投与する場合、本組成物および追加の作用物質もしくは組成物（例えば第2または第3の作用物質）、またはそのすべてを、例えば単独治療などとして個別に使用される各作用物質の量または投薬量よりも高いか、または低いか、またはそれと同じ量または用量で、投与することができる。一定の態様において、本作用物質、追加作用物質（例えば第2または第3の作用物質）、またはそれらのすべての、投与される量または投薬量は、個別に使用される各作用物質の量または投薬量よりも低い（例えば少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%である）。別の態様において、所望の効果（例えば呼吸器疾患の処置）をもたらす、本作用物質、追加作用物質（例えば第2または第3の作用物質）、またはそれらのすべての量または投薬量は、同じ治療効果を達成するために個別に必要な各作用物質の量または投薬量よりも低い（例えば少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%低い）。

20

【0195】

本明細書記載のワクチン組成物は、例えば疾患に対して対象を保護しまたは処置するために、使用することができる。「免疫処置する」および「ワクチン接種をする」という用語は、本技術分野では相互可換的に使用されがちである。しかし、疾患、例えば抗原を発現する病原体が引き起こす感染性疾患に対する防御を提供するための本明細書記載のワクチン組成物の投与については、「免疫処置する」という用語は、投与されたワクチン組成物によって付与される受動的防御を指すと理解すべきである。

30

【0196】

投与、投薬量、および効力

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、薬学的組成物またはワクチン組成物は、適正医療規範（good medical practice）に合致する方法で、製剤化し、適量に分け、投与することができる。この文脈において考慮すべき因子としては、処置される特定障害、処置される特定対象、個々の対象の臨床状態、障害の原因、ワクチン組成物の送達部位、投与の方法、投与のスケジューリング、および医療従事者に公知の他の因子が挙げられる。

40

【0197】

本明細書記載の方法におけるインピボ投与、例えば非経口投与に使用される治療用製剤は無菌であることができ、これは、滅菌濾過膜による濾過または当業者に公知の他の方法によって、容易に達成される。

【0198】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖およびその組成物は、それを必要

50

とする対象に、その対象における有効な処置をもたらす任意の適当な経路で投与することができる。本明細書において使用される「投与する」および「導入する」という用語は相互可換的に使用され、ワクチン組成物、抗原またはそのフラグメントを、所望の効果が生じるように、そのようなワクチン組成物が所望の部位、例えば感染の部位に少なくとも部分的には局在化することになる方法または経路によって、対象に入れることを指す。抗原もしくはそのフラグメントまたはワクチン組成物は、ワクチン組成物を全身性にまたは所望の表面もしくは標的に送達する任意の投与様式によって、対象に投与することができ、そのような投与様式には、例えば注射、注入、点滴および吸入投与が含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗原もしくはそのフラグメントまたはワクチン組成物を腸における失活から保護することができるのであれば、経口投与形態も考えられる。「注射」には、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、室内 (intraventricular)、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、皮膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内への注射および注入が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0199】

本明細書において使用される「非経口投与」および「非経口的に投与」という表現は、経腸投与および外用投与以外の投与様式、通常は注射によるものを指す。本明細書において使用される「全身性投与」、「全身性に投与」、「末梢投与」および「末梢に投与」という表現は、治療作用物質が対象の循環系に入り、よって代謝その他のプロセスに供されるような、標的部位、組織または器官、例えば腫瘍部位への直接的投与以外の、治療作用物質の投与を指す。別の態様において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、例えば障害または感染の場所がそれを許すのであれば、局所的に、例えば直接注射によって投与され、注射は周期的に繰り返すことができる。

20

【0200】

いくつかの態様において、本明細書記載の組成物は、エアロゾル投与、ネブライザー投与、または気管洗浄投与によって投与される。いくつかの態様において、組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または髄腔内投与用に製剤化される。

【0201】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、感染、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を緩和しまたは防止するのに必要な免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖組成物の量を指し、所望の効果を与えるのに十分な、例えば感染部位における病原微生物のレベルを低減し、病態、または病原微生物に関連するもしくは病原微生物が引き起こす任意の症状を低減するのに十分な、薬理的組成物の量に関する。それゆえに、「治療有効量」という用語は、本明細書において開示される方法を使って、典型的な対象に投与された場合に特定の効果を達成するのに十分な、本明細書記載の抗原もしくはそのフラグメントまたはワクチン組成物の量を指す。本明細書において使用される有効量には、疾患の症状の発生を遅延させ、疾患症状の経過を変化させ（例えば疾患症状の進行を減速し）、または疾患の症状を反転させるのに十分な量も含まれるであろう。したがって正確な「有効量」を具体的に挙げることはできない。しかし、任意の所与のケースについて、当業者は、日常的な実験だけを使って、適当な「有効量」を決定することができる。

30

40

【0202】

有効量、毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物において、例えばLD50（集団の50%にとって致死的な用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための標準的な薬学的手順で決定することができる。投薬量は使用する剤形および利用する投与経路に応じて変動しうる。毒性効果と治療効果の間の用量比が治療係数であり、これは比LD50/ED50として表すことができる。大きな治療係数を呈する組成物および方法が好ましい。治療有効用量はまず細胞培養アッセイから推定することができる。また、細胞培養または適当な動物モデルにおいて決定されたIC50（すなわち症状の50%最大障害を達成する抗原またはそのフラグメントの濃度）を含む循環血漿中濃度範囲が得られるように、動物モデルにおいて用量を策定することもできる。血漿中のレ

50

ベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。任意の特定投薬量の効果は適切なバイオアッセイによってモニターすることができる。医師は投薬量を決定し、それを、必要に応じて、観察された処置の効果に合わせて調整することができる。

【0203】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、薬学的組成物またはワクチン組成物は、いくつかの態様では、例えば感染を防止しまたは処置するために現在使用されている1つまたは複数の追加治療剤と共に、製剤化することができる。そのような他の作用物質の有効量は、製剤中の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖の量、障害または処置のタイプ、および上で考察した他の因子に依存する。これらは、一般に、本明細書において以前に使用したのと同じ投薬量および投与経路で使用されるか、または今までに使用された投薬量の約1～約99%で使用される。

10

【0204】

本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、薬学的組成物またはワクチン組成物の投薬量範囲は力価に依存し、所望の効果を生じさせるのに十分な量を包含する。投薬量は許容されない有害副作用を引き起こすほど多くてはならない。一般的に、投薬量は患者の年齢、状態および性別によって変動し、当業者はそれを決定することができる。何らかの合併症がある場合は、個々の医師が投薬量を調整することもできる。いくつかの態様において、投薬量は0.001mg/kg体重～100mg/kg体重の範囲にある。いくつかの態様において、用量範囲は5µg/kg体重～100µg/kg体重である。あるいは、用量範囲は、血清中レベルを1µg/mL～1000µg/mLに維持するようにタイトレートすることができる。全身性投与の場合、対象には、例えば0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kgまたはそれ以上などの治療量を投与することができる。これらの用量は、1回または複数回の個別投与によって、または持続注入によって、投与することができる。数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、処置は、状態に応じて、例えば上述の方法または当技術分野において公知の方法による測定で感染が処置されるまで、持続される。ただし他の投薬レジメンも役立つ。

20

【0205】

本明細書記載の方法を使った治療の継続期間は、医学的に必要とされる限り、または所望の治療効果（例えば本明細書に記載するもの）が達成されるまで、続くだろう。一定の態様において、本明細書記載のワクチン組成物の投与は、1ヶ月、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、1年、2年、3年、4年、5年、10年、20年にわたって、または対象の寿命までの年数にわたって、続けられる。

30

【0206】

当業者には理解されるであろうとおり、所与の組成物について、適当な投与レジメンは、単回の投与/免疫処置または複数回の投与/免疫処置を含むことができる。例えば持続的な防止効果を提供するために、後続の投与を、ある期間で、例えば約2週間またはそれ以上、対象の生涯までの期間で、反復して与えうる。後続の投与には、初回免疫処置後、例えば約2週間、約3週間、約4週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、または約1年の間隔を開けることができる。

40

【0207】

製剤に使用される正確な用量は、投与経路にも依存し、医師の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。最終的には、専門家（practitioner）または医師が、特定の対象に投与されるべき免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖またはその組成物の量を決定することになる。

【0208】

これらの方法および本明細書記載のすべてのそのような方法のいくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖またはその組成物は、感染からの短期間防御を提

50

供するために、または感染を処置するために、有効な量で投与される。いくつかの態様において、感染はウイルス感染である。本明細書にいう「短期間防御」とは、少なくとも約2週間、少なくとも約1ヶ月、少なくとも約6週間、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約3ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約5ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約7ヶ月、少なくとも約8ヶ月、少なくとも約9ヶ月、少なくとも約10ヶ月、少なくとも約11ヶ月、または少なくとも約12ヶ月は持続する、マラリア感染などの感染からの防御を指す。そのような防御は反復投与を伴いうる。

【0209】

これらの方法および本明細書記載のすべてのそのような方法のいくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖またはその組成物は、感染からの防御を提供するために、または持続感染の症状を緩和するために、有効な量で投与される。

10

【0210】

「持続感染の症状を緩和する」とは、持続感染に関連する任意の状態または症状を改善させることをいう。あるいは、持続感染の症状を緩和することは、対照における感染性微生物（例えばウイルス、細菌、真菌または寄生虫）負荷量を、無処置対照におけるそのような負荷量との比較で低減することを伴いうる。等価な無処置対照と比較して、そのような低減または防止の程度は、任意の標準的技法による測定で、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、または100%である。望ましくは、持続感染は、当技術分野において公知の任意の標準的方法による検出では完全に消失し、その場合、持続感染の処置は完了したとみなされる。

20

【0211】

持続感染について処置されている患者は、医師がそのような状態を有すると診断した患者である。診断は任意の適切な手段によって行われうる。診断およびモニタリングは、例えば生物学的試料中の微生物量のレベルを検出すること（例えば組織生検、血液検査または尿検査）、生物学的試料中の微生物感染の代用マーカーのレベルを検出すること、持続感染に関連する症状を検出すること、または持続感染に特有の免疫応答に關与する免疫細胞を検出すること（例えばアネルギー状態にあるおよび/または機能的に損なわれている抗原特異的T細胞の検出）を伴いうる。持続感染の発生が防止されている患者はそのような診断を受けたことがあっても受けたことがなくてもよい。これらの患者は上述したものと同一標準的検査を受けたことがあってもよいし、1つまたは複数のリスク因子（例えば家族歴または感染性物質への曝露）の存在ゆえにリスクが高いと検査なしで同定されていてもよいことは、当業者には理解されるだろう。

30

【0212】

特定された特許その他の刊行物はいずれも、参照により、例えばそれらの刊行物に記載の方法論であって本開示との関連で使用されうるものを記載し開示する目的で、本明細書に明確に組み入れられる。これらの刊行物は、それらの開示が本願の出願日より前になされたという理由で提供されるにすぎない。この点について、本発明者らが先行開示を理由に、または他の何らかの理由で、そのような開示に先行する資格がないことの自白であるとみなすべきものは何もない。これらの文書の日付に関する陳述またはこれらの文書の内容に関する表現は、いずれも出願人が入手できる情報に基づくが、これらの文書の日付または内容の正しさに関する承認を構成するものではない。

40

【0213】

本開示は本明細書において提供される特定の方法、プロトコールおよび試薬に限定されず、したがってさまざまでありうる理解すべきである。本明細書において使用される術語には、特定の態様を説明する目的しかなく、本願の請求項によってのみ画定される本開示の範囲を限定する意図はない。以下に実施例を挙げて本発明をさらに例示するが、これらの実施例をさらなる限定と解釈すべきでない。

【0214】

本技術は、以下の番号付き項目において、さらに記載されうる。

1 .

50

- 5'端にSEQ ID NO:1を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 2 .
オリゴヌクレオチド二重鎖がRNAである、項目1の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 3 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が5'-ーリン酸基を含む、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 4 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が少なくとも20核酸塩基長である、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。 10
- 5 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が二本鎖RNAである、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 6 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖と接触した細胞におけるインターフェロン（IFN）産生を誘導するのに十分である、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 7 .
IFN産生がI型IFN産生である、先行する項目のいずれかの方法。
- 8 . 20
オリゴヌクレオチド二重鎖がRIG-I-IRF3パスウェイを活性化する、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 9 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖と接触した細胞または細胞の集団におけるウイルス力価またはウイルス量を低減する、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 10 .
オリゴヌクレオチド二重鎖が、該二重鎖が接触した細胞中のSTAT1およびSTAT2を増加させる、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。
- 11 . 30
対象における抗ウイルス応答を誘導する方法であって、それを必要とする対象に先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。
- 12 .
対象におけるウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。
- 13 .
前記それを必要とする対象が、ウイルス感染を有するか、またはウイルス感染を有するリスクがある、先行する項目のいずれかの方法。
- 14 . 40
投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると前記対象を診断する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。
- 15 .
投与する工程に先立って、ウイルス感染を有するかまたはウイルス感染を有するリスクがあると前記対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。
- 16 . 50
ウイルス感染が、ジョン・カニンガムウイルス、麻疹ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、アルボウイルス、狂犬病ウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型単純ヘルペス、2型単純ヘルペス、ヒトヘルペスウイルス6、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン

・バー・ウイルス、ムンプスウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、コロナウイルス、SARSコロナウイルス、SARS-CoV-2ウイルス、A型コクサッキーウイルス、B型コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、HTLV-1、A型、B型、C型、D型、およびE型肝炎ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、痘瘡ウイルス、伝染性軟属腫、ヒトパピローマウイルス、パルボウイルスB19、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、デングウイルス（DENV）、ならびにジカウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる、先行する項目のいずれかの方法。

17 .

ウイルス感染が、中枢神経系組織、眼組織、上部呼吸器系組織、下部呼吸器系組織、肺組織、腎臓組織、膀胱組織、脾臓組織、心組織、胃腸組織、表皮組織、生殖組織、鼻腔組織、喉頭組織、気管組織、気管支組織、口腔組織、血液組織、および筋組織からなる群より選択される組織の感染である、先行する項目のいずれかの方法。

10

18 .

前記投与が全身性である、先行する項目のいずれかの方法。

19 .

前記投与がウイルス感染の部位に局所的である、先行する項目のいずれかの方法。

20 .

少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

20

21 .

少なくとも1つの追加治療薬が抗ウイルス治療薬である、先行する項目のいずれかの方法。

22 .

対象におけるインフルエンザ感染を処置する方法であって、インフルエンザ感染を有する対象に、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

23 .

インフルエンザ感染がA型インフルエンザ感染またはB型インフルエンザ感染である、先行する項目のいずれかの方法。

30

24 .

少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

25 .

対象におけるコロナウイルス疾患を処置する方法であって、コロナウイルス疾患を有する対象に、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

26 .

コロナウイルス疾患がCOVID-19である、先行する項目のいずれかの方法。

27 .

少なくとも1つの追加抗ウイルス治療薬を投与する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

40

28 .

コロナウイルス疾患から回復した対象から得られた血漿を投与する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

29 .

抗ウイルス治療薬の効力を増加させる方法であって、先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを投与する工程を含む、方法。

30 .

50

抗ウイルス治療薬が、アバカビル、アシクロビル (Acyclovir、Aciclovir)、アデホビル、アマンタジン、アンプリジェン、アンブレナビル (アジェネラーゼ)、アモジアキン、アピリモド、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、アトバコン、バラビル、パロキサビルマルボキシル (Xofluza (登録商標))、ビクタルビ、ボセプレビル (Vicitrelis (登録商標))、シドフォビル、クロファジミン、クロミフェン、クロファザミン (Clofazamine)、コビシスタット (Tybost (登録商標))、コンビビル (固定用量薬)、ダクラタスビル (Daklinza (登録商標))、ダルナビル、デラビルジン、デシコビ、ジダノシン、ドコサノール、ドルテグラビル、ドラビリン (Pifeltro (登録商標))、エコリエベル、エドクスジン、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、エトラビリン (Intelence (登録商標))、ファムシクロビル、ファビピラビル、フェノフィブラート、ホミビルセン、ホスアンブレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、融合阻害薬、ガンシクロビル (Cytovene (登録商標))、イバシタピン、イパリズマブ (Trogarzo (登録商標))、イドクスウリジン、イミキモド、イムノビル、インジナビル、イノシン、インテグラゼ阻害薬、I型インターフェロン、II型インターフェロン、III型インターフェロン、インターフェロン、イベルメクチン、ラミブジン、ラサロシド、レテルモビル (Prevymis (登録商標))、ロピナビル、ロビリド、マンノース結合レクチン、マラビロク、メチサゾン、モロキシジン、ナファモスタット、ネルフィナビル、ネビラピン、Nexavir (登録商標)、ニロチニブ、ニタゾキサニド、ノービア、ヌクレオシド類似体、オセルタミビル (Tamiflu (登録商標))、パゾパニブ、ペグインターフェロン・アルファ-2a、ペグインターフェロン・アルファ-2b、ペンシクロビル、ペラミビル (Rapivab (登録商標))、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害薬 (薬理学)、ピオナリジン、ピラミジン、ラルテグラビル、レムデシビル、逆転写酵素阻害薬、リバビリン、リルピビリン (Eduvant (登録商標))、リマンタジン、リトナビル、サキナビル、シメプレビル (Olysio (登録商標))、ソホスビル、スタブジン、相乗的エンハンサー (抗レトロウイルス薬)、タフェノキン、テラプレビル、テルビブジン (Tyzeka (登録商標))、テノホビルアラフェナミド、テノホビルジソプロキシル、テノホビル、トレミフェン、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル (バルトレックス)、バルガンシクロビル、ベルムラフェニブ、ベネトクラクス、ビクリビロク、ビダラピン、ピラミジン、ザルシタピン、ザナミビル (Relenza (登録商標))、およびジドブジンからなる群より選択される、先行する項目のいずれかの方法。

10

20

30

31.

免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが、実質的に同時に投与される、先行する項目のいずれかの方法。

32.

免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とが異なる時点で投与される、先行する項目のいずれかの方法。

33.

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

40

34.

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗ウイルス治療薬とを含む、薬学的組成物。

35.

気道投与用に製剤化される、先行する項目のいずれかの組成物。

36.

エアロゾル投与、ネブライザー投与、または気管洗浄投与用に製剤化される、先行する項目のいずれかの組成物。

37.

インターフェロン (IFN) 産生を誘導する方法であって、それを必要とする対象に、先

50

行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、または先行する項目のいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含み、それによって投与後はIFN産生が増加する、方法。

38 .

IFN産生が、I型IFN、II型IFN、またはIII型IFNの産生である、先行する項目のいずれかの方法。

39 .

IFN産生がI型IFNの産生である、先行する項目のいずれかの方法。

40 .

I型IFNが、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、またはIFN- ϵ である、先行する項目のいずれかの方法。 10

41 .

II型IFNがIFN- β である、先行する項目のいずれかの方法。

42 .

増加したIFN産生がウイルス感染に対する細胞の抵抗性を増加させる、先行する項目のいずれかの方法。

43 .

IFN関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を投与する工程を含む、方法。

44 .

前記その必要がある対象が、IFN関連疾患を有するか、またはIFN関連疾患を有するリスクがある、先行する項目のいずれかの方法。 20

45 .

投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患を有するリスクがあると対象を診断する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

46 .

投与する工程に先立って、IFN関連疾患を有するかまたはIFN関連疾患のリスクがあると対象を診断するアッセイの結果を受け取る工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。

47 .

IFN関連疾患が、基準レベルと比較して低減したIFNレベルを伴う疾患である、先行する項目のいずれかの方法。 30

48 .

IFN関連疾患が、基準レベルと比較して低減したI型IFNレベルを伴う疾患である、先行する項目のいずれかの方法。

49 .

IFN関連疾患が、ウイルス感染性疾患、細菌感染性疾患、真菌感染性疾患、寄生虫感染性疾患、がん、および自己免疫疾患からなる群より選択される、先行する項目のいずれかの方法。

50 .

少なくとも1つの追加治療薬を投与する工程をさらに含む、先行する項目のいずれかの方法。 40

51 .

少なくとも1つの追加治療薬が、抗ウイルス治療薬、抗細菌治療薬、抗真菌治療薬、抗寄生虫治療薬、抗がん治療薬、または抗自己免疫治療薬である、先行する項目のいずれかの方法。

52 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗細菌治療薬とを含む、組成物。

53 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗真菌治療薬とを含む、組成物。

54 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗寄生虫治療薬とを含む、組成物。

55 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗がん治療薬とを含む、組成物。

56 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖と少なくとも1つの抗自己免疫治療薬とを含む、組成物。

10

57 .

薬学的に許容される担体をさらに含む、先行する項目のいずれかの組成物。

58 .

抗原またはワクチンにコンジュゲートされた、5'端にSEQ ID NO:1を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖。

59 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、組成物。

60 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とワクチンとを含む、組成物。

20

61 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とナノ粒子とを含む、組成物。

62 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、ナノ粒子。

63 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖とナノ粒子とを含む、組成物。

64 .

先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖を含む、ナノ粒子。

30

65 .

薬学的に許容される担体をさらに含む、先行する項目のいずれかの組成物。

66 .

ワクチン接種をする方法であって、それを必要とする対象に、

a. 先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、

b. 先行する項目のいずれかの組成物、または

c. 先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、およびワクチンを投与する工程を含む、方法。

67 .

ワクチンの効力を増加させる方法であって、それを必要とする対象に、

a. 先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、

b. 先行する項目のいずれかの組成物、または

c. 先行する項目のいずれかの免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖、およびワクチンを投与する工程を含む、方法。

40

68 .

静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または髄腔内投与用に製剤化された、先行する項目のいずれかの組成物。

【実施例】

【0215】

50

実施例1:病原性感染および他の免疫応答関連疾患のための二重鎖RNAインターフェロン誘導物質治療薬

インフルエンザ、MERS、SARS、そして現在はSARS-CoV-2などといった、潜在的パンデミックウイルスの出現が増加していることから、多くの異なるタイプのウイルスによる感染を阻害する新しい広域スペクトル治療の開発が必要とされている。これを達成するための最善の方法は、ウイルスそれ自体を標的にするのではなくウイルスに対する一般的な宿主応答を標的にすることによるものである。一例として、A型インフルエンザウイルスは、季節性流行および偶発的パンデミックを引き起こし、深刻な公衆衛生上および経済上の影響を持つ、重大なヒト病原体である。宿主細胞におけるインフルエンザの感染と複製は多段階プロセスである。すなわち、ウイルスは宿主表面受容体に結合し、細胞に侵入してから、そのゲノムを細胞質に放出する。次にウイルスゲノムは核に移入され、そこでウイルスの転写と複製が起こり、合成された新しいウイルスタンパク質とRNAとが子孫ウイルス粒子に組み立てられ、それが出芽によって細胞外環境に放出される。

10

【0216】

ウイルスおよび他のタイプの病原体（例えば細菌、真菌、寄生虫）による感染後に、人体は、ウイルスを防御するように設計された自然免疫応答および適応免疫応答の複雑な制御系を惹起する。ウイルス進入に対する数多くの応答の一つは、ウイルス複製を「妨害」（interfering）することによってヒト免疫応答において決定的な役割を果たす多面的サイトカインであるインターフェロン（interferon:IFN）産生の誘導である¹。IFN遺伝子発現の誘導は、免疫細胞（例えばナチュラルキラー細胞およびマクロファージ）を活性化することにより、および主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原の発現を増加させて抗原提示をアップレギュレートすることで宿主防御を増大させることにより、ウイルス感染に対する細胞の抵抗性の増加にもつながる。タイプの異なる数多くのIFN遺伝子およびIFNタンパク質があり、それらはヒトでは、典型的には3つのクラス、すなわちI型IFN（IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω およびIFN- ϵ ）、II型IFN（IFN- γ ）およびIII型IFNに分類される。3つのクラスに属するIFNはすべて、ウイルス感染との戦いおよび免疫系の制御にとって重要である。IFNは、多発性硬化症、多くのタイプのがんおよびウイルス感染の処置において、治療薬としても使用されてきた。

20

【0217】

IFN産生の増加は、インフルエンザおよび他の多くのタイプのウイルスによる感染を阻害できるが、この潜在的治療経路はCOVID-19の処置にとりわけ有用であるかもしれない。A型インフルエンザウイルスおよび呼吸器合胞体ウイルスに対する応答と比較して、COVID-19を引き起こすウイルス（SARS-CoV-2）は、I型およびIII型IFNを含むサイトカインのサブセットのロバストな誘導を欠く弱い応答を引き出す一方で、多くの患者の死亡原因であるサイトカインストームにつながりうる他の炎症性サイトカインは産生し続けるからである²。

30

【0218】

本明細書には、ヒトA549肺上皮細胞にトランスフェクトした場合に、インターフェロンパスウェイを活性化し、I型IFNの発現をアップレギュレートし、A型インフルエンザウイルス感染を減少させる、特異的二重鎖RNA配列が記載される。本明細書において特定される二重鎖RNA配列は、ヒトA549肺上皮細胞にトランスフェクトした場合に、A型インフルエンザウイルス感染の大きな（100倍の）低減も、もたらす。

40

【0219】

インフルエンザウイルス感染を媒介するlncRNAのスクリーニング

本明細書には、インフルエンザウイルス感染を媒介するlncRNAを同定するための、CRISPR/Cas9に基づくスクリーニング戦略が記載される。lncRNAをノックアウトするsgRNAであって、インフルエンザ感染に対する抵抗性を細胞に付与するが、細胞成長には影響を及ぼさないものを内包する細胞は、生き残って迅速に増殖することができる。ディーブシーケンシング後に、ゲノムスケールのCRISPR/Cas9ノックアウトスクリーンにおいてsgRNA、遺伝子およびパスウェイに優先順位をつけるために、ゲノムワイドCRISP

50

R/Cas9ノックアウトのモデルベース解析 (Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR/Cas9 knockout: MAGeCK) 法を使って、エンリッチされたlncRNAが同定された。関連lncRNA配列を標的とする何百ものダイサー基質短鎖干渉RNA (Dicer-Substrate Short Interfering RNA: DsiRNA) を、それらをヒトA549肺上皮細胞にトランスフェクトし、次にそれらの細胞をインフルエンザウイルスに感染させることによって試験した。この解析は、lncRNAであるDGCR5 (二重鎖RNA-1) およびLINC00261 (二重鎖RNA-2) を標的とするこれらのDsiRNAのうちの2つのトランスフェクションが、インフルエンザ感染を約80%および約98%抑制するという発見をもたらした (図1A)。ヒト肺気道の病態生理をより密接に模倣するインフルエンザ感染ヒト肺気道チップで同じ実験を実行したところ、ウイルス力価の約100倍の阻害が観察された (図1B) ³⁻⁵。

10

【0220】

共通する配列を持つsiRNAは、lncRNAを介してではなく直接的に、インターフェロンを誘導した。

重要なことに、DGCR5およびLINC00261の機能をさらに検証するためにDGCR5およびLINC00261に対する複数のDsiRNAを使って追加の研究を行ったところ、驚いたことに、DGCR5またはLINC00261のノックダウンとIFN産生の誘導との両方を行うことができるのはsiRNAのサブセットだけで、他のsiRNAは設計どおりDGCR5またはLINC00261を特異的にノックダウンするものの、IFN産生を誘導することはないことが見いだされた。より一層重要なことに、IFN産生を誘導した活性siRNAはいずれも、それらは異なるlncRNAを標的とするように設計されたのではあるけれども、同じ配列を含有していた (灰色および明るい灰色で示すもの、表1、図7)。これらの二本鎖 (二重鎖) RNAが、他の研究者らによって示されているようにインターフェロン誘導を誘導しないように特に設計された配列コード構造を含有することに注目することは重要である⁶。したがって、表1 (図7) に示すこれらの二重鎖RNA (二重鎖RNA-1および-2) の両方に見いだされる共通配列は、lncRNA発現を抑制することによってではなく、それらの特異的ヌクレオチド配列組成に基づいて、IFN産生を特異的に誘導するようである。

20

【0221】

(表1) 二重鎖および単鎖RNA

30

40

50

RNA ID	SEQ ID NOs:	配列 5' > 3'
二重鎖 RNA-1	SEQ ID NO: 3	CUGAUGACACUGGCUAGUUCACCTT
	SEQ ID NO: 4	<u>GGG</u> GACUACUGUGACCGAUCAAGUGGAA
二重鎖 RNA-2	SEQ ID NO: 5	CUGAGGUUACUGAAUCUAACAAUGA
	SEQ ID NO: 6	<u>GGG</u> GACUCCAAUGACUUAGAUUGUUUCA
二重鎖 RNA-3	SEQ ID NO: 7	CUGAUGACACUGGCT
	SEQ ID NO: 8	<u>GGG</u> GACUACUGUGACCGA
二重鎖 RNA-4	SEQ ID NO: 9	CUGACAUCGUCUCGCAUUUAUGAGC
	SEQ ID NO: 10	<u>GGG</u> GACUGUAGCAGAGCGUAAAU
二重鎖 RNA-5	SEQ ID NO: 11	ACACUGGCUAGUUCACCTT
	SEQ ID NO: 12	ACUGUGACCGAUCAAGUGGAA
二重鎖 RNA-6	SEQ ID NO: 13	CUGAUGACACUGGCUAGUUCACCTT
	SEQ ID NO: 14	<u>GGG</u> GACUACUGUGACCGAUCAAGUGGAA
二重鎖 RNA-7	SEQ ID NO: 15	CUGAUGACACUGGCUAGTT
	SEQ ID NO: 16	<u>GGG</u> GACUACUGUGACCGAUCAA
単鎖 RNA 8	SEQ ID NO: 17	CUGAUGACACUGGCUAGUUCACCTT
単鎖 RNA 9	SEQ ID NO: 18	GGGACUACUGUGACCGAUCAAGU

10

20

* 図7も参照されたい。

【0222】

30

この仮説を探究するために、異なるバージョンの二重鎖RNAおよび一本鎖RNAを設計した(表1、図7)。灰色の共通配列(二重鎖RNA-4)または灰色の共通配列と明るい灰色の共通配列との両方(二重鎖RNA-6)を保てば、残りの配列をシャッフルしても、類似するレベルのIFN産生を誘導できることが見いだされたことから(表1、図7;図2)、IFN産生の誘導にとって灰色の共通配列は必要であり、一方、明るい灰色の配列は必要ではないことが示唆される。これは、灰色の共通配列を有さず、IFN産生を誘導しない、二重鎖RNA-5によって証明される(表1、図7;図2)。加えて、灰色の共通配列を含有する短いRNA配列(二重鎖RNA-3および二重鎖RNA-7)は、異なるIFN産生能を呈することから(表1、図7;図2)、二重鎖RNAの長さも、IFN産生を誘導する灰色の共通配列の能力に影響を及ぼすことが示唆される。一本鎖RNA(単鎖RNA-8および単鎖RNA-9)はIFN産生を誘導できず(表1、図7;図2)、したがって二重鎖構造が重要であることもわかった。

40

【0223】

二重鎖RNAは、IRF3を調節することによって、I型インターフェロンパスウェイを負に制御する。

これらの二重鎖RNAがウイルス感染を低減する機序を特徴づけるために、RNA-seqを使って、トランスクリプトーム変化を特徴づけた。二重鎖RNA1による処置後に、21の遺伝子が、0.01の閾p値で、2倍を超える増加を呈した(図3A)。遺伝子オントロジー(GO)エンリッチメント解析により、これらの遺伝子の生物学的プロセスは、I型IFNシグナリングパスウェイおよびウイルス感染に対する防御応答に関係することが明らかにな

50

った(図3B)。並行して、タンデム質量タグ(Tandem Mass Tag:TMT)質量分析定量により、0.01の閾p値で4倍を超える増加を有する73のタンパク質のアップレギュレーションが明らかになった(図3C)。GOエンリッチメント解析により、二重鎖RNA1の処置とI型IFNパスウェイのアップレギュレーションとの間の関連も確認された(図3D)。二重鎖RNA-1がII型IFNパスウェイと比較して主にI型IFNパスウェイを活性化することはqPCRアッセイによって、さらに検証された(表2~3、下記参照)。

【0224】

(表2) IFN- / の遺伝子に対する二重鎖RNA-1の効果

遺伝子	遺伝子発現レベルの倍率変化		
	対照	二重鎖RNA-1	
IFI6	1	212.35	10
IFIT2	1	1581.71	
IFNA1	1	7.25	
IFNA2	1	282.76	
IFNA4	1	11.92	
IFNA5	1	85.49	20
IFNAR1	1	1.15	
IFNAR2	1	1.44	
IFNB1	1	5665.91	
IRF1	1	17.88	
IRF2	1	5.74	
IRF9	1	12.48	
ISG15	1	380.92	30
JAK1	1	0.97	
PML	1	13.11	
PRMT1	1	1.01	
PTPN1	1	0.86	
PTPN11	1	0.96	
PTPN6	1	1.18	
SOCS1	1	81.39	
STAT1	1	10.96	40
STAT2	1	25.30	
TYK2	1	1.58	
USP18	1	26.83	
TBP	1	1.04	
HPRT1	1	0.99	

【0225】

(表3) IFN- γ パスウェイの遺伝子に対する二重鎖RNA-1の効果

遺伝子	遺伝子発現レベルの倍率変化		
	対照	二重鎖 RNA-1	
<i>AKT1</i>	1	2.04	
<i>AKT2</i>	1	2.48	
<i>AKT3</i>	1	1.80	
<i>BRCA1</i>	1	1.45	
<i>CALM1</i>	1	1.26	10
<i>CALM2</i>	1	0.80	
<i>CALM3</i>	1	2.01	
<i>CAMK2G</i>	1	1.21	
<i>CBL</i>	1	2.56	
<i>CDKN1A</i>	1	2.11	
<i>CEBPB</i>	1	1.13	
<i>CREBBP</i>	1	2.44	20
<i>EIF2AK2</i>	1	9.97	
<i>EP300</i>	1	2.62	
<i>ICAM1</i>	1	5.08	
<i>IFNG</i>			
<i>IFNGR1</i>	1	2.02	
<i>IFNGR2</i>	1	1.99	
<i>IRF1</i>	1	24.19	30
<i>JAK1</i>	1	1.58	
<i>JAK2</i>	1	7.81	
<i>MAP2K1</i>	1	1.54	

40

50

遺伝子	遺伝子発現レベルの倍率変化		
	対照	二重鎖 RNA-1	
<i>MAP2K6</i>	1	2.02	
<i>MAPK1</i>	1	1.63	
<i>MAPK14</i>	1	1.73	
<i>MAPK3</i>	1	2.06	
<i>MYC</i>	1	1.39	10
<i>PIK3CA</i>	1	1.58	
<i>PIK3CB</i>	1	1.36	
<i>PIK3R1</i>	1	1.32	
<i>PLCG2</i>	1	1.73	
<i>PRKCA</i>	1	1.30	
<i>PRKCD</i>	1	2.70	
<i>PTK2B</i>	1	4.25	20
<i>PTPN11</i>	1	1.30	
<i>SMAD7</i>	1	1.24	
<i>SOCS1</i>	1	86.26	
<i>SRC</i>	1	1.40	
<i>STAT1</i>	1	15.01	
<i>TBP</i>	1	1.24	
<i>HPRT1</i>	1	0.83	30

【 0 2 2 6 】

加えて、二重鎖RNA-1は、IFNパスウェイに特異的なSTAT1およびSTAT2のレベルだけを増加させることができる（図4）。これらの結果は、二重鎖RNA-1による処置が、I型IFNパスウェイを特異的に活性化できることを示しており、これは、二重鎖RNA-1による処置がインフルエンザ感染を抑制する理由の説明になる。

【 0 2 2 7 】

I型IFN系に対する二重鎖RNA-1の効果を、野生型HAP1細胞、インターフェロン制御因子3（IRF3）ノックアウトHAP1細胞およびIRF7ノックアウトHAP1細胞において、さらに探究した。IRF3およびIRF7は、ウイルス感染時のインターフェロン-I（IFN-1）の産生および機能において極めて重要な役割を果たす転写因子である⁷。本発明者らの結果から、IRF3のノックアウトはI型IFNパスウェイを活性化する二重鎖RNA1の能力を消失させるが、IRF7のノックアウトはそうではないことが明らかになった（図5）。総合すると、本発明者らの結果は、二重鎖RNA1がIRF3を介してI型IFNパスウェイを正に制御することを示唆している。さらなる探究により、二重鎖RNA-1はIRF3の発現レベルに影響を及ぼさないが、そのリン酸化状態を変化させることが示された（図6）。同様の機序が二重鎖RNA-2についても観察された。

【 0 2 2 8 】

二重鎖RNAがヒト初代肺胞上皮におけるインターフェロン産生を増加させることができるかどうかを決定するために、Benam et al. Nature Methods（2016）に記載の

10

20

30

40

50

気道チップを使って、分化したヒト初代気道上皮細胞、ヒト初代肺胞上皮細胞またはヒト肺初代微小血管内皮細胞（HMVEC）に、陰性対照（NC）またはdsRNA-4をトランスフェクトした。dsRNA-4の添加に続いて、IFN- γ 産生を測定するために、48時間後にqPCRを行った。dsRNA-4は、インターフェロン- γ 産生を、対照気道チップと比較して、ほぼ4倍増加させる（図8）。それゆえに、dsRNA-4は、気道および内皮細胞だけでなく、チップ上のヒト初代肺胞上皮細胞におけるインターフェロン- γ 産生も増加させる。

【0229】

さらに、本明細書に提示するデータは、増加したインターフェロン- γ 産生が、SARS-CoV-2ウイルスに感染させた細胞において、SARS-CoV-2 N mRNAの著しい低減をもたらしたことを示している（図9）。SARS-CoV-2 N mRNAにおける「N」は、ウイルスのヌクレオカプシドをコードするSARS-CoV-2の遺伝子を指す。ACE2発現A549細胞にdsRNA-1およびdsRNA-2を低用量または高用量でトランスフェクトしたところ、結果として、インターフェロン- γ 産生が様々に増加した。トランスフェクトされたACE2-A549細胞に、トランスフェクションの24時間後に、SARS-CoV-2をMOI 0.05で感染させた。感染の48時間後に、細胞を採取し、全RNAを単離し、特定遺伝子のレベルを検出するためにqPCRを行った。感染細胞において、SARS-CoV-2 N mRNAは、dsRNA-対照と比較して、およそ 10^4 倍低減することがわかった。したがって、これらのデータにより、インターフェロン- γ 産生の活性化は、ウイルス感染、特にSARS-CoV-2感染を低減し、阻害または防止するのに有効であることが確認される。

【0230】

これらの特異的二重鎖RNAがI型IFNパスウェイを活性化することを考えると、これらは、本発明者らの原理証明研究で示されたようにインフルエンザウイルス感染を阻害することだけでなく、広範囲にわたるウイルス、細菌、真菌および寄生虫病原体による感染、ならびにがんおよび自己免疫疾患を含む、IFN関連疾患に、広域スペクトル予防薬および治療薬として使用することができる。上述のように、I型IFNシグナリングの誘導は、このパスウェイが異常に抑制されているCOVID19患者の処置には、とりわけ役立つ。

【0231】

ウイルス感染を処置するには、IFNパスウェイ活性化二重鎖RNAを、エアロゾル、ネブライザーまたは気管洗浄により、ナノ粒子、リポソーム、液滴または他の製剤を使って、肺上皮に直接投与することができる。あるいは、二重鎖RNAは、薬物送達ビヒクルを使用してまたは使用せずに、静脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射によって送達される。これらの二重鎖RNA分子の投与経路および投薬量は、処置される疾患に応じて最適化される必要があるだろう。

【0232】

結果の要約:

本明細書には、IFN産生を誘導することによってウイルス感染を阻害することができる、共通の配列を共有する二重鎖RNAが記載される。

【0233】

さらにまた、IRF3が、IFN発現に対するこれら二重鎖RNAの効果を媒介することが決定された。

【0234】

IFN-Iパスウェイは多くの疾患に関与するので、鍵となる同じ機能的二本鎖ポリヌクレオチド配列を含有するこれらのRNAまたは関連分子は、細菌、真菌または寄生虫が引き起こすさまざまなタイプの病原性感染、がんおよび自己免疫障害を含む、IFN応答に依拠するさまざまな免疫関連疾患における介入のための新しい治療薬になる。

【0235】

参考文献:

10

20

30

40

50

1 Barber, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 113-126, doi:10.1038/sj.cdd.4400823 (2001).

2 Blanco-Melo, D. *et al.* SARS-CoV-2 launches a unique transcriptional signature from in vitro, ex vivo, and in vivo systems. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.03.24.004655 (2020).

3 Benam, K. H. *et al.* Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nat Methods* 13, 151-157, doi:10.1038/nmeth.3697 (2016).

4 Si, L. *et al.* Discovery of influenza drug resistance mutations and host therapeutic targets using a human airway chip. *bioRxiv*, doi:10.1101/685552 (2019).

5 Si, L. *et al.* Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.04.13.039917 (2020).

6 Kim, D. H. *et al.* Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23, 222-226, doi:10.1038/nbt1051 (2005).

7 Liu, S. *et al.* Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 347, aaa2630, doi:10.1126/science.aaa2630 (2015).

【 0 2 3 6 】

実施例 2: I 型インターフェロンを誘導する 5'-リン酸 RNA による SARS-CoV-2、HCoV-NL63、およびインフルエンザの阻害

COVID-19 危機により、SARS-CoV-2 ウイルスならびに将来パンデミックの原因になりうる感染性の高い他のウイルス変異体による感染を阻害することができる治療薬の必要が明白になった。本明細書では、マイクロ流体ヒト臓器オンチップ (organ-on-a-chip) 内で成長させた高度に分化した初代肺気道、肺胞上皮および微小血管内皮を含む広範囲にわたる細胞において、I 型インターフェロン (IFN-I)、特に IFN- β の産生を強力に誘導することによって、SARS-CoV-2、HCoV-NL63 およびインフルエンザウイルス感染を阻害する、5'-リン酸を含有する新しい種類の免疫刺激性二重鎖 RNA が提供される。これらの RNA は、公知の免疫刺激性 RNA のいかなる配列特徴または構造特徴も持っておらず、その代わりに、ユニークな保存された配列モチーフ (センス鎖: 5'-CUGA-3'、アンチセンス鎖: 3'-GGGACU-5') と 20 塩基の最小長を、それらの免疫刺激活性のために必要とする。驚いたことに、このモチーフを含有する RNA は、5'-リン酸を含有しているにもかかわらず、RIG-I/IRF3 パスウェイの活性化によって、IFN-I 産生を誘導する。この新しい種類の免疫刺激性 RNA は、将来、COVID-19 を含むウイルス感染およびパンデミック、ならびに異常な IFN-I 制御に関わる他の疾患のための、広域スペクトル予防薬または治療薬として有用であることが明らかになりうる。

【 0 2 3 7 】

コロナウイルス疾患 2019 (COVID-19) は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) が引き起こす世界的健康危機である。この疾患を処置または防止するための承認薬やワクチンはなく、新しい治療的介入様式の懸命な探索がなされてきた。病原体に直面した時に宿主細胞が産生する I 型および III 型インターフェロン (IFN-I および IFN-III) は、ウイルス感染に対する自然宿主防御の第一線に相当する。細胞のセンサー、例えば Toll 様受容体 3 (TLR3)、レチノイン酸誘導性遺伝子 1 (RIG-I) およびメラノーマ分化関連タンパク質 5 (MDA-5) によるウイルス構成要素の認識は、IFN-I/-III の分泌と、この抗ウイルス応答の生物学的効果および治療効果を媒介する何百ものインターフェロン応答遺伝子 (interferon-stimulated gene: ISG) のその後のアップレギュレーションとを誘導する、シグナリングカスケードを開始させる (1)。組換え IFN-I および I

FN-IIIまたはそれらの合成誘導物質は、それらの強力かつ広域スペクトルな効果ゆえに、ウイルス感染ならびに自己免疫疾患およびがんの処置のために、探究されてきた(2~4)。SARS-CoV-2はIFN-Iパスウェイの誘導を妨害することが示されているので(5、6)、これらはCOVID-19患者における潜在的治療効力も検討されている(4、7~9)。しかし、類縁の病原性コロナウイルスSARS-CoVおよびMERS-CoVを処置するために過去に使用された組換えIFNは、ウイルス量を低減するその能力に関して疑わしかったので、合成アゴニストの使用を含むこの自然防御機序を利用するための代替的アプローチを探究する必要があることが示唆された(4)。そのうえ、SARS-CoV-2の非構造タンパク質1(nsp1)は、本来であれば感染のクリアランスを容易にするRIG-I依存的先天性免疫応答を阻止することが、最近示された(10)。したがって、RIG-Iパスウェイの阻害に対抗することによって宿主の抗ウイルスIFN応答を活性化する免疫刺激治療の開発は、COVID-19と戦うための有望な戦略になりうる。

10

【0238】

結果

IFN-Iパスウェイ活性化免疫刺激性RNAの発見

SARS-CoV-2および他のウイルスに対して強力な広域スペクトル阻害活性を呈するIFN-Iパスウェイの新規RNA誘導物質を、思いがけなく発見した。インフルエンザA/WSN/33(H1N1)感染に対するヒトA549肺上皮細胞応答を媒介する宿主遺伝子を同定するために>200の低分子干渉RNA分子(siRNA)を使用している時に、2つのsiRNA(RNA-AおよびRNA-B)がH1N1感染を90%超阻害することを見いだした(図10A)。長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)DGCR5およびLINC00261をそれぞれ標的とするこれらのsiRNAの作用機序を探究するために、RNA-AおよびRNA-BをトランスフェクトしたA549細胞のトランスクリプトームおよびプロテオームを、スクランブル化siRNAを対照として使用して、プロファイリングした(図11A~11B)。RNA-seq解析により、RNA-Aは21の遺伝子の発現を2倍超アップレギュレートする(0.01の閾p値)ことが示された(図11A)。遺伝子オンコロジー(Gene Oncology)(GO)エンリッチメント解析により、これらの遺伝子は、MX1、OASL、IFIT1およびISG15を含み、IFN-Iシグナリングパスウェイおよびウイルス感染に対する宿主防御応答に関与することが明らかになった(図12A、左)。並行して、タンデム質量タグ質量分析(TMT質量分析)定量により、IL4I1、TNFSF10、XAF1、IFI6およびIFIT3を含む73のタンパク質の4倍を超えるアップレギュレーション(0.01の閾p値)が示された(図12B)。アップレギュレートされたこれらのタンパク質のGOエンリッチメント解析でも、RNA-Aの処置とIFN-Iパスウェイの誘導との関連が確認された(図13A)。定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)アッセイにより、RNA-Aは、II型またはIII型IFNパスウェイとの対比で、IFN-Iパスウェイを優先的に活性化すること(図13B)が独立して検証され、IFN- β はIFN- α よりはるかに高レベル(>1000倍)に誘導された(図10B)。遺伝子発現およびタンパク質発現の同様のパターンが、RNA-Bについても観察された(図10Bおよび図11~12)。

20

30

【0239】

興味深いことに、追加のsiRNAで研究を実行することで、それらが標的とするlncRNAの機能をさらに検証したところ、それら他のsiRNAによるDGCR5またはLINC00261のノックダウンはIFN産生を誘導しないことが見いだされた。これは驚くべきことであった。なぜなら、RNA干渉技術の発端以来、短い二重鎖(二本鎖)siRNAがIFN-Iを誘導することは公知であり(11、12)、これらの分子のその後の設計は、本発明者らの研究において使用されたものを含めて、この作用および潜在的免疫調節性副作用を回避するために、最適化されている(13)からである。5'-三リン酸端を有する、ファージポリメラーゼによって合成されたsiRNAは、インターフェロン α および β の強力な誘導を惹起することができ(12)、3'端に9ヌクレオチド(5'-GUCCUCAA-3')を含有するsiRNAは、TLR-7を介してIFN- β を誘導することができるが(14)、本明細書記載の二重鎖RNAはこれらの構造をどちらも有しない。本明細書記載のRNAは、宿主RNA中に存在する

40

50

5'-ーリン酸も含有するが、これは、5'-二リン酸または5'-三リン酸を含有する二重鎖RNAによるRIG-Iシグナリングを介したIFN-Iの活性化を、能動的に抑制する(15)。したがってこれらのデータは、強力なIFN-I誘導物質であることが見いだされたこれら2つの特別なRNA(RNA-AおよびRNA-B)が、新規免疫刺激性RNAに相当しうることを示唆した。

【0240】

これをさらに探究するために、IFNによって刺激される応答エレメントを含有するプロモーターによって駆動されるルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するA549-Dual(商標)IFNレポーター細胞株(16)を使って、これら2つの推定上の免疫刺激性RNAによって誘導されるIFN-I産生を評価した。これらの研究により、RNA-AとRNA-Bはどちらも、IFN-Iが先天免疫における初期応答遺伝子であることと合致して、トランスフェクションの早くも6時間後にはIFN産生の誘導を開始し、高レベルのIFN発現が少なくとも24~48時間は持続することが明らかになった(図10C)。これらの二重鎖RNAによるIFN産生の用量依存的誘導も、nM域で観察された(図10D)。総合すると、これらの結果から、同定された2つのsiRNAは、実際に、強いIFN-I応答を特異的にアップレギュレートする免疫刺激性RNAであることが確認された。

10

【0241】

RIG-Iによって感知される新規免疫刺激性RNAモチーフ

活性なRNA-1および-2は、5'-ーリン酸とアンチセンス鎖上に単一の2塩基3'オーバーハングとを含む、化学合成された27マーRNA二重鎖である(図14、下記表4)。それらの配列および構造上の特徴は、既存の免疫刺激性RNA分子のどの特徴とも一致しないことから(図15)、これまで知られていなかった要素がこの免疫学的活性を担っているに違いないことが示唆される。

20

【0242】

(表4) RNA二重鎖配列

30

40

50

RNA 二重鎖名	SEQ ID NO : トップ鎖 (センス) ボトム鎖 (アンチセンス)
RNA-A	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14
RNA-B	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6
RNA-C	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 20
RNA-D	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10
RNA-E	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 22
RNA-F	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 24
RNA-G	SEQ ID NO: 25 SEQ ID NO: 26
RNA-H	SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 28
RNA-I	SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 30
RNA-J	SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 32
RNA-K	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 34
RNA-L	SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 16
RNA-M	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 36
RNA-N	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 38

10

20

30

40

50

RNA-O	SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40
RNA-P	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8
RNA-Q	SEQ ID NO: 17
RNA-R	SEQ ID NO: 18

10

【0243】

意外なことに、これらは異なる宿主遺伝子を標的とするように設計されたにもかかわらず、RNA-AとRNA-Bは2つの同一モチーフを、一つはその5'端に(モチーフ-1;センス鎖:5'-CUGA-3'、アンチセンス鎖:3'-GGGACU-5')、そしてもう一つは中央領域に(モチーフ-2;センス鎖:5'-ACUG-3'、アンチセンス鎖:3'-UGAC-5')含有することが、配列アラインメントによって明らかになった(図14)。どちらのRNAもIFN- γ の強力な誘導物質であったので、特定の理論に束縛されるものではないが、これらの共通モチーフがそれらの免疫刺激活性を媒介している可能性があると考えた。

【0244】

これを検証するために、RNA-Aの18種の異なる配列変異体(図14)によって誘導されるIFN-I産生を、IFNレポーター発現細胞株を使って、体系的に調べた。モチーフ-1とモチーフ-2を維持し、残りのヌクレオチドをランダムな配列で置き換えても(RNA-C対-Aおよび-B)、二重鎖RNAの免疫刺激活性に影響はなかった(図16および図14)。モチーフ-2をランダム配列でさらに置換しても、やはりその免疫刺激活性に影響はなかったことから(RNA-D対RNA-C)、モチーフ-2ではなくモチーフ-1が二重鎖RNA媒介IFN-I産生を担っていることが示唆された。これは、残りのヌクレオチドには手を加えずに保ったまま、モチーフ-1を入れ替えるかまたは欠失させると、RNAの免疫刺激活性が完全に消失することによって証明された(RNA-Eおよび-F対-A)。

20

【0245】

免疫刺激活性を担うモチーフ-1中の最小配列を決定するために、モチーフ-1のヌクレオチドを欠失させるかまたは置き換えることによって、変異体を作製した。アンチセンス鎖の3'端にある2つのオーバーハング塩基GGの欠失または置換は、それらの免疫刺激活性を消失させた(RNA-Gおよび-H対-A)。オーバーハング塩基CGを保ちつつ、モチーフ-1の残りの塩基を変化させた場合も、免疫刺激活性は著しく減少するか(RNA-Jおよび-K)、さらには完全に消失した(RNA-I対-A)。これらのデータにより、モチーフ-1はIFN-I誘導にとって必要であることと、その免疫刺激効力は配列の置換または欠失に鋭敏であることが確認される。RNA-Aの3'端から塩基を漸次切り詰めることによって、モチーフ-1媒介IFN産生に対するRNAの長さの効果を、さらに評価した。除去する塩基の数を増やすと、免疫刺激活性は徐々に減少し(RNA-Lおよび-M対-A)、RNA-Aの3'端から8塩基以上を除去すると活性は完全に失われた(RNA-N、-O、および-P)。それゆえに、INF誘導に必要なこの新規形態の免疫刺激性RNAの最小長は、20塩基(アンチセンス鎖)である。加えて、RNA-Aのセンス鎖一本だけまたはアンチセンス鎖一本だけではIFN産生を誘導しなかったので(RNA-Qおよび-R)、その免疫刺激活性には二本鎖RNA構造が必要であることが示された。化学合成されたRNAは5'-ヒドロキシル基を含有するので、5'-リン酸の付加がインターフェロン誘導活性に影響を及ぼすかどうかとも試験した。これを探究することは重要である。なぜなら、5'-リン酸は宿主RNA中に存在し、それが5'-二または三リン酸を含有する二重鎖RNAによって誘導されるRIG-IシグナリングによるIFN-Iの活性化を能動的に抑制しているからである。しかし、5'-リン酸を含有するRNA-1は、qPCRで解析した場合、5'-ヒドロキシルを含有するRNA-1

30

40

50

と類似するレベルまで、IFN- γ 発現を誘導することがわかったことから（図2B）、これらの短い二重鎖RNAの5'-リン酸はそれらの効果には必要ではないものの、それを妨害するものでもないことが示唆された。

【0246】

転写因子インターフェロン制御因子3（IRF3）および7（IRF7）は、IFN-I産生において極めて重要な役割を果たす（17、18）。IRF3ノックアウト（KO）細胞およびIRF7 KO細胞を使用することで、IRF3の喪失は、IFN- γ （図17A）ならびにSTAT1、IL4、L1、TRAILおよびIFI6を含む下流のISG（図18）を誘導するRNA-Aの能力を完全に消失させるが、IRF7の喪失はそうではないことがわかった。IRF3は、IFN-Iのマスターかつ主要（master and primary）転写活性化因子であり、そのIFN-I誘導は、IRF3のリン酸化、二量体化および核移行を含むイベントのカスケードを伴う（19、20）。siRNAとして開発されたRNA-Aによる宿主遺伝子ノックダウンによる潜在的妨害を緩和するために、同様に活性な免疫刺激性モチーフを含有するが、いかなる宿主遺伝子も標的としない（サイレンシングしない）RNA-Dを使って、さらなる機序研究を行った。RNA-DはIRF3 mRNAレベルにもIRF3総タンパク質レベルにも影響しなかったが（図17B~17C）、IRF3の転写活性にとって不可欠である（17）IRF3のリン酸化（図17C）と、それに続いて、IRF3がIFN-I発現を誘導する転写因子として作用する核（19、20）への移行（図17D）を増加させた。

10

【0247】

このユニークな免疫刺激性モチーフを含有する短い二重鎖RNAはRIG-Iに直接結合する。RIG-I、MDA5およびTLR3は、IRF3の上流にあってRNAを認識する主要なセンサーである（21）。これらのうちのどれが本発明者らの新規二重鎖RNAを検出するのかを調べるために、IFN-IのRNA媒介産生を、RIG-I、MDA5またはTLR3 KO細胞において定量した。RIG-Iのノックアウトが、IFN-Iを誘導するRNA-D（図17E）ならびにRNA-A、-Bおよび-C（図19）の能力を完全に抑制したのに対し、MDA5またはTLR3の喪失はRNA媒介IFN-I産生に影響しなかった（図17Eおよび図19）。重要なことに、表面プラズモン共鳴（SPR）解析により、RNA-1はMDA5またはTLR3ではなくRIG-I細胞RNAセンサーと直接相互作用することが明らかになった（図3F）。したがって、前記の新規免疫刺激性モチーフを含有する小さな二重鎖RNAは、たとえそれらがIFN産生のRIG-I依存的活性化を刺激するよりむしろ拮抗することが以前に示唆されている5'-リン酸を含有していても、RIG-I/IRF3パスウェイを特異的に使用して、IFN-I産生を刺激する（15）。

20

30

【0248】

最後に、これらの新しい免疫刺激性RNAは、よく使用される病原体認識受容体（PRR）アゴニストであるポリ（I:C）と比較しても、または活性化RIG-Iリガンドであることが公知の5'-三リン酸を含有する二重鎖RNAと比較しても、はるかに（>2,000倍）強力なIFN- γ 産生の誘導を呈した（図S6A）。さらに重要なことに、ポリ（I:C）とは対照的に、RNA-seq解析により、これらの新しい免疫刺激性RNAは、広範囲にわたる炎症関連遺伝子の発現を誘導しないことが明らかになった（図S6B）。このことは臨床上極めて重要である。なぜなら、ポリ（I:C）は、IFN応答を誘導することができるものの、より全身性の炎症応答の誘導に関連する複雑な毒性ゆえに、患者におけるその潜在的使用には限界があるからである。

40

【0249】

複数のコロナウイルスおよびA型インフルエンザウイルスの広域スペクトル阻害

樹立細胞株において免疫刺激活性を示したこれら新規RNAの潜在的な生理学上および臨床上の重要性を探究するために、ヒトの臓器レベルでの肺の生理機能および病態生理を忠実に再現することが実証されている（22~24）、動的流体流れ下で培養された肺微小血管内皮に近接して気液界面下で成長させたヒト初代肺上皮によって覆われたヒト肺気道および肺泡チップマイクロ流体培養デバイスにおいて、それらがIFN-I応答を惹起することができるかどうかを調べた。ヒト肺チップの空気チャンネルを通してRNA-Aをヒト気道

50

および肺胞上皮細胞にトランスフェクトしたところ（図20A）、スクランブル化二重鎖RNA対照と比較して4～12倍のIFN- γ 発現の増加が観察された。加えて、RNA-Aによる処置は、ヒト初代肺内皮オンチップ（図20A）において、それをチップの血管チャンネルに導入した場合に、ロバストな（>40倍）IFN- γ 発現を誘導した。

【0250】

RNA-Aおよび-BはH1N1による感染を阻害する（図1A）という最初の発見と、IFN-Iの公知の抗ウイルス機能（25）とを踏まえて、次に、これらの効果の普遍性を探究した。まず、これらのIFN-I誘導性RNAの、インフルエンザA/HK/8/68（H3N2）ウイルスによる感染を阻止する潜在能力を検討した。感染の1日前に細胞にRNAをトランスフェクトした。その後、COVID-19パンデミックの出現と共に、SARS-CoV-2および類縁のコロナウイルスHCoV-NL63を使って同様の研究を実行することにより、この研究を拡張した。ウイルスmRNAをqPCRで解析したところ、免疫刺激性RNAによる処置は、A549細胞におけるインフルエンザH1N1ウイルスでの結果（図10A）と同様に、A549細胞（>95%阻害）および肺微小血管内皮と境界を接する初代肺胞上皮で覆われたヒト肺胞チップ（約80%阻害）において、インフルエンザH3N2ウイルスによる感染を、有意に抑制することが明らかになった（図20B）。

10

【0251】

これらの同じ二重鎖RNAが、LLC-MK2細胞においてHCoV-NL63を>90%阻害し（図20B）、印象的なことに、それらはSARS-CoV-2感染のさらに強力な阻害剤であって、ACE2受容体過剰発現A549細胞におけるウイルス量を10,000倍超（>99.99%）低減させた（図20Bおよび図21）。これは、SARS-CoV-2がIFN-Iシグナリングを異なる形で制御し、これら他のウイルスとの対比で、その発現を誘導し損ねるといふ観察結果と合致している（6）。重要なことに、よく使用される病原体認識受容体（PRR）アゴニストであるポリ（I:C）とは対照的に、これらの免疫刺激性RNAは、広範囲にわたる炎症関連遺伝子の発現を誘導しないことが、RNA-seq解析によって明らかになった（図22）。このことは重要である。なぜなら、ポリ（I:C）は、IFN応答を誘導することができるものの、より全身性の炎症応答の誘導に関連する複雑な毒性ゆえに、その潜在的臨床使用には限界があるからである（26、27）。

20

【0252】

インビトロで観察されたSARS-CoV-2に対する強力な阻害活性を踏まえて、次に、RNA-1をハムスターCOVID-19モデルで評価した。RNA-1をリン酸緩衝食塩水（PBS）に溶解し、動物をSARS-CoV-2ウイルス（ 10^2 PFU）に鼻腔内感染させる1日前、感染の日、および感染の1日後に、鼻腔内投与した。ウイルスチャレンジ後の2日目に、これらのハムスターの肺においてSARS-CoV-2ウイルスN転写産物を測定したところ、RNA-1による予防は、RT-qPCRによって測定しても（ $p = 0.030$ ）、ブランクアッセイを使ってウイルス力価を定量することによって測定しても（ $p = 0.032$ ）、ウイルス量の有意な低減をもたらしたので、感染を効果的に防止したことがわかった（図5A）。加えて、培地中のRNA-1を、ウイルス感染（ 10^3 PFU）の1日後に開始して、2日にわたってビヒクルにおいて毎日鼻腔内に導入することによって、RNA-1を治療薬モードで投与してから、RT-PCRによって肺を分析した場合にも、ウイルス感染の同様の阻害が測定された（図5B）。最も重要なことに、これらの肺の組織学的解析により、感染の1日後に開始したRNA-1による処置がもたらすウイルス量の低減は、ビヒクルのみで処置された対照感染肺では完全に閉塞され細胞と滲出液で満たされている肺胞気腔への免疫細胞浸潤の大幅な減少をもたらすことが明らかになった（図5C）。

30

40

【0253】

考察

この研究では、5'- γ -リン酸とユニークな配列モチーフとを含有する、新しい種類の短いオーバーハング付き二重鎖RNAにより、広域スペクトルのヒト細胞において、IFN-Iシグナリングの強力な刺激が観察され、IFN- γ の誘導はIFN- γ との対比で特に効率が良かった。これは、5'- γ または三リン酸を含有し、主としてIFN- γ または他の炎症性サイト

50

カインを誘導する、これまでに記載された免疫刺激性RNAとは対照的である(28)。IFN-I誘導に対するこれらのRNAの配列と長さの効果を体系的に調べることにより、これらの二重鎖RNAは、その免疫刺激活性を呈するために、保存されたオーバーハング付き免疫刺激性モチーフ(センス鎖:5'-CUGA-3'、アンチセンス鎖:3'-GGGACU-5')と5'-ーリン酸末端とに加えて、20塩基の最小長を必要とすることが決定された。5'-ーリン酸を持つ二重鎖RNAは5'-二または三リン酸を持つRNAによるIFNシグナリングを拮抗することが以前に示されているにもかかわらず(15、29)、これらの新規免疫刺激性RNAは、RIG-I/IRF3パスウェイを特異的に活性化することが、機序の探究によって明らかになった。加えて、観察されたRNA媒介IFN-I産生は、インフルエンザウイルスH1N1およびH3N2ならびにコロナウイルスHCoV-NL63およびSARS-CoV-2を含む複数のヒト呼吸器ウイルスによる感染の有意な阻害をもたらした。注目すべきことに、これらの新規免疫刺激性RNAは、SARS-CoV-2ウイルス量を10,000倍超低減した。これらの知見は、これらのIFN-I誘導性免疫刺激性RNAが、将来出現するかもしれない広範囲にわたる呼吸器ウイルスに対する潜在的な広域スペクトル予防を提供することに加えて、目下のCOVID-19パンデミックにも、新規な予防戦略または治療戦略を提供できることを示している。

10

【0254】

強力なIFN-I誘導活性を持つ2つのRNAのオーバーラップしている配列に基づいて、保存されたオーバーハング付き免疫刺激性モチーフは、センス鎖5'-CUGA-3'およびアンチセンス鎖3'-GGGACU-5'を、5'-ーリン酸と共に含有することが同定された。このモチーフを中央領域または3'端に含有するRNAでは免疫刺激活性が観察されなかったことから、免疫刺激には5'末端に位置することが必要であることが示唆される。この知見は、RIG-Iが二重鎖RNAの5'端を認識することを示す研究(15)と合致するが、本発明者らの免疫刺激性RNAは5'-ーリン酸をオーバーハングと共に含有し、RIG-Iの配列依存的活性化を呈するので、これらは、これまでに公知であった免疫刺激性RNAのどのカテゴリーにも属さず(図15)、したがって新しい種類の免疫刺激性RNAに相当する。

20

【0255】

上で実証された知見は、細胞質RNAセンサーによるRNAの細胞認識の新しい形態の同定にもつながった。RIG-I、MDA5、TLR3およびTLR7/8を含む少なくとも4つのシグナリングパスウェイは、免疫刺激性RNA分子を認識して、IFN-Iおよび炎症誘発性サイトカインの産生を誘導することがわかっている(図15)。MDA5は長いRNA分子(約0.5~7kb長)を認識し(30)、TLR3は、エンドソーム内の、少なくとも40~50bp長の二重鎖RNA分子を検出し(31)、TLR7およびTLR8はGUリッチな短い一本鎖RNAならびに小さな人工分子、例えばヌクレオシド類似体およびイミダゾキノリン類を検出する(32)。RIG-Iは、哺乳動物の自然免疫系の中心的構成要素であり、これは、病原体関連RNA分子を検出して、迅速な抗ウイルス免疫応答を誘導する。RIG-Iは長いdsRNA(300~1,000bp長)、RNase Lが生成する小さな自己RNA、または5'-二または三リン酸を持つ短い平滑末端の二重鎖RNAを認識することが、以前の研究によって示されている(28、33~39)。上述のように、RIG-Iは、5'-ーリン酸を含有するRNAによって拮抗されると考えられており(15)、ほとんどあらゆるタイプの5'または3'オーバーハングはRIG-I結合を妨げ、シグナリングを排除できることが、別の研究によって示されている(33)。対照的に、5'-ーリン酸を持つ短いオーバーハング付き二重鎖RNAによるRIG-Iの強力な配列依存的活性化が観察された。これは、RIG-Iによる全く新規な形態のRNA認識に相当する。

30

40

【0256】

siRNAによる免疫刺激は一部の遺伝子サイレンシング応用には望ましくないものの、ウイルス感染またはがんの処置など、他の遺伝子サイレンシング応用では有益でありうる。これにより、RNAi活性と免疫刺激活性との両方を持つsiRNAを設計することで、さらに強い力価を提供しうる可能性が高まる。本発明者らの研究において同定されたモチーフは、この目的に適している。というのも、これはRNAの5'端に位置し、それゆえに、ウイルスmRNAまたは他の感染関連宿主遺伝子を標的とする配列と、RNAi活性を損なうこ

50

となく共役させることができるからである。IFN応答はウイルスに対する防御の主要な第一線を構成しており、SARS-CoV-2を含むこれらの感染性病原体は、この応答を抑制するためのさまざまな戦略を進化させてきた(5、6)。特に、SARS-CoV-2に感染させたヒト培養細胞とCOVID-19患者のトランスクリプトーム解析ではどちらも、SARS-CoV-2感染が、ケモカインおよび炎症誘発性サイトカイン産生を刺激しつつも、IFN-I、IFN-IIIおよび関連ISG応答は極めて低いという、ユニークな炎症応答を生じさせることを明らかにしており(5、6)、この不均衡が、罹病率と末期COVID-19患者に見られる死亡率の増加の一因になっている可能性がある。この新興呼吸器ウイルスに対して承認された抗ウイルス治療薬やワクチンはないことから、I型およびIII型IFNが前臨床モデルおよび臨床試験においてそれらの効力について評価されている(4、8、9、40)。IFNによる前処置はウイルス力価を劇的に低減することが示されていることから、IFN-I応答の誘導はSARS-CoV-2感染の予防または早期処置のための潜在的に有効なアプローチになりうることを示唆される(41、42)。IFN- β 、ロピナビル、リトナビルおよびリバビリンの三剤併用が、軽度または中等度COVID-19の患者においてウイルス排出期間および入院期間を短縮することも、最近報告されている(7)。しかし、IFN- β による治療は一般に注射による全身性投与を必要とするので、送達される治療薬のレベルが全身毒性によって制限されることがあり、それが、これを予防的治療として使用することを困難にしている。

10

【0257】

これらの観察結果と合致して、本明細書において提供される結果は、IFN-I誘導性RNAによる前処置が、SARS-CoV-2ならびにHCoV-NL63およびインフルエンザウイルスによる感染の劇的な減少をもたらすことを示した。重要なことに、本発明者らの免疫刺激性RNAはRIG-I/IFN-Iパスウェイを特異的に活性化するが、MDA5またはTLR3などの他の細胞RNAセンサーによって認識されることはない。これは興味深いことである。なぜなら、SARS-CoV-2はnsp1の発現によってRIG-Iシグナリングおよび感染の排除を阻害することを、最近の研究は示しており(10)、したがって本発明者らの結果は、少なくとも、ヒト肺の生理機能および病態生理を再現することが以前に示されている臓器チップ培養において維持された培養ヒト肺上皮および内皮細胞では(43、44)、これらの新規二重鎖RNAが、この阻害を克服できることを実証しているからである。加えて、これには、固有の毒性に関して、他の免疫刺激性RNAに対する明確な利点がある。例えば、よく使用されるPRRアゴニストであるポリ(I:C)が、RIG-I、MDA5およびTLR3を含む複数のシグナリングパスウェイを活性化し(45~47)、TNF- α 、IL-1、IL-6およびIL-8など、複数の炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの産生を惹起するのに対し(48)、ここに記載する新規免疫刺激性RNAはそうしない。加えて、本明細書記載のRNAがIFN-Iを特異的に誘導し、IFN-IIIを誘導しないという事実は、それらを、エンデミックウイルスに対する臨床使用に関して、より安全にする。というのも、IFN-IIIはウイルス認識時に肺上皮障壁を破壊しうるからである(40)。

20

30

【0258】

これらの免疫刺激性RNAが、ヒトの病態生理を再現するマイクロ流体臓器チップ中の高度に分化した初代ヒト肺上皮および内皮細胞においてIFN-Iを誘導できるという知見は、COVID-19または他の未来のウイルスパンデミックに対する予防薬または治療薬としてのそれらの臨床使用に関して、さらなる裏付けになる。これらの臨床応用を探究するために、RNA送達の効率を最適化することができるが、COVID-19などのウイルスパンデミックの状況下で感染拡大を防止するために内在性IFN- β レベルを気道において局所的に何倍にも上昇させることができる(喘息吸入器に類似する)鼻腔内または吸入RNA製剤のコンセプトは、特筆すべきものである。

40

【0259】

参考文献

50

- 1) J. W. Schoggins, Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* doi:10.1146/annurev-virology-092818-015756. (2019).
- 2) E. C. Borden *et al.*, Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6, 975-990 (2007).
- 3) A. Watson *et al.*, Dynamics of IFN-beta Responses During Respiratory Viral Infection: Insights for Therapeutic Strategies. *Am J Respir Crit Care Med*. doi:10.1164/rccm.201901-0214OC. (2019). 10
- 4) A. Park, A. Iwasaki, Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe* 27, 870-878 (2020).
- 5) J. Hadjadj *et al.*, Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* doi:10.1126/science.abc6027. (2020).
- 6) D. Blanco-Melo *et al.*, Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 181, 1036-1045 e1039 (2020).
- 7) I. F. Hung *et al.*, Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 395, 1695-1704 (2020). 20
- 8) M. Wadman, Can interferons stop COVID-19 before it takes hold? *Science* 369, 125-126 (2020).
- 9) M. Wadman, Can boosting interferons, the body's frontline virus fighters, beat COVID-19? *Science* doi:10.1126/science.abd7137. (2020).
- 10) M. T. e. al., Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* doi:10.1126/science.abc8665. (2020).
- 11) C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839 (2003).
- 12) D. H. Kim *et al.*, Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22, 321-325 (2004). 30
- 13) D. H. Kim *et al.*, Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23, 222-226 (2005).
- 14) V. Homung *et al.*, Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263270 (2005).
- 15) X. Ren, M. M. Linhan, A. Iwasaki, A. M. Pyle, RIG-I Selectively Discriminates against 5'-Monophosphate RNA. *Cell Rep* 26, 2019-2027 e2014 (2019).
- 16) J. Tissari, J. Siren, S. Meri, I. Julkunen, S. Matikainen, IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *Journal of immunology* 174, 4289-4294 (2005). 40
- 17) S. Liu *et al.*, Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 347, aaa2630 (2015).
- 18) P. Wang, J. Xu, Y. Wang, X. Cao, An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism. *Science* 358, 1051-1055 (2017).
- 19) Y. Zhou *et al.*, Interferon-inducible cytoplasmic lncLrrc55-AS promotes antiviral innate responses by strengthening IRF3 phosphorylation. *Cell Res* 29, 641-654 (2019).

- 20) K. A. Fitzgerald *et al.*, IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 491-496 (2003).
- 21) K. T. Chow, M. Gale, Jr., Y. M. Loo, RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol* 36, 667-694 (2018).
- 22) K. H. Benam *et al.*, Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nat Methods* 13, 151-157 (2016).
- 23) L. Si *et al.*, Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. *bioRxiv* doi:10.1101/2020.04.13.039917. (2020). 10
- 24) L. Si *et al.*, Discovery of influenza drug resistance mutations and host therapeutic targets using a human airway chip. *bioRxiv* doi:10.1101/685552. (2019).
- 25) E. V. Mesev, R. A. LeDesma, A. Ploss, Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol* 4, 914-924 (2019).
- 26) N. C. Stowell *et al.*, Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir Res* 10, 43 (2009).
- 27) A. R. Lever *et al.*, Comprehensive evaluation of poly(I:C) induced inflammatory response in an airway epithelial model. *Physiol Rep* 3, (2015).
- 28) Z. Meng, M. Lu, RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Front Immunol* 8, 331 (2017). 20
- 29) D. Goubau *et al.*, Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 514, 372-375 (2014).
- 30) A. Peisley *et al.*, Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3340-3349 (2012).
- 31) L. Liu *et al.*, Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320, 379-381 (2008).
- 32) O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820 (2010). 30
- 33) X. Ren, M. M. Linehan, A. Iwasaki, A. M. Pyle, RIG-I Recognition of RNA Targets: The Influence of Terminal Base Pair Sequence and Overhangs on Affinity and Signaling. *Cell Rep* 29, 3807-3815 e3803 (2019).
- 34) V. Hornung *et al.*, 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997 (2006).
- 35) A. Pichlmair *et al.*, RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001 (2006).
- 36) M. Schlee *et al.*, Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25-34 (2009). 40

- 37) A. Schmidt *et al.*, 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12067-12072 (2009).
- 38) A. Kohlway, D. Luo, D. C. Rawling, S. C. Ding, A. M. Pyle, Defining the functional determinants for RNA surveillance by RIG-I. *EMBO Rep* 14, 772-779 (2013).
- 39) J. Zheng *et al.*, High-resolution HDX-MS reveals distinct mechanisms of RNA recognition and activation by RIG-I and MDA5. *Nucleic Acids Res* 43, 1216-1230 (2015).
- 40) A. Broggi *et al.*, Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science* doi:10.1126/science.abc3545. (2020). 10
- 41) K. G. Lokugamage, Hage, A., Schindewolf, C., Rajsbaum, R., and Menachery, V.D., SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv* doi:2020.03.07.982264., (2020).
- 42) E. Mantlo, N. Bukreyeva, J. Maruyama, S. Paessler, C. Huang, Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. *Antiviral Res* 179, 104811 (2020).
- 43) A. Jain *et al.*, Primary Human Lung Alveolus-on-a-chip Model of Intravascular Thrombosis for Assessment of Therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* 103, 332-340 (2018). 20
- 44) D. Huh *et al.*, A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med* 4, 159ra147 (2012).
- 45) L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738 (2001).
- 46) T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann NY Acad Sci* 1143, 1-20 (2008).
- 47) H. Kato *et al.*, Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105 (2006). 30
- 48) J. M. Burke, S. L. Moon, T. Matheny, R. Parker, RNase L Reprograms Translation by Widespread mRNA Turnover Escaped by Antiviral mRNAs. *Mol Cell* 75, 1203-1217 e1205 (2019).

【 0 2 6 0 】

実施例3:材料および方法

細胞培養

【 0 2 6 1 】

A549細胞(ATCC CCL-185)、A549-Dual(商標)細胞(InvivoGen)、RIG-I KO A549-Dual(商標)細胞(InvivoGen)、MDA5 KO A549-Dual(商標)細胞(InvivoGen)、TLR3 KO A549細胞(Abcam)、MDCK細胞(ATCC CRL-2936)およびLLC-MK2細胞(ATCC CCL-7.1)は、10%ウシ胎児血清(FBS)(Life Technologies)およびペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies)を補足したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)(Life Technologies)において培養した。HAP1細胞、IRF3 KO HAP1細胞およびIRF7 KO HAP1細胞はHorizon Discovery Ltdから購入し、10%ウシ胎児血清(FBS)(Life Technologies)およびペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies)を補足したイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Gibco)において培養した。細胞はすべて、加湿インキュベータ中、37 40

および5%CO₂に維持した。この研究において使用した細胞株はすべて、マイコプラズマを含まないことを、LookOutマイコプラズマPCR検出キット (Sigma) で確認した。細胞株はATCC、InvivoGen、AbcamまたはHorizon Discovery Ltdによって認証された。初代ヒト肺気道上皮基底幹細胞 (Lonza、米国) は、気道上皮細胞増殖培地 (Promocell、ドイツ) を使って、75cm²組織培養フラスコにおいて、60~70%コンフルエントまで増殖させた。初代ヒト肺胞上皮細胞 (Cell Biologics、H-6053) は肺胞上皮増殖培地 (Cell Biologics、H6621) を使って培養した。初代ヒト肺微小血管内皮細胞 (Lonza、CC-2527、P5) は、ヒト内皮細胞増殖培地 (Lonza、CC-3202) を使って、75cm²組織培養フラスコにおいて、70~80%コンフルエントまで増殖させた。

【0262】

ウイルス

この研究において使用したウイルスには、SARSコロナウイルス-2 (SARS-CoV-2)、ヒトコロナウイルスHCoV-NL63、インフルエンザA/WSN/33 (H1N1) およびインフルエンザA/香港/8/68 (H3N2) が含まれる。SARS-CoV-2分離株USA-WA1/2020 (NR-52281) は、米国疾病管理予防センターによって寄託されており、NIH、NIAIDのBEI Resourcesから入手し、以前に記載されたように増殖させた (Blanco-Melo et al., 2020)。HCoV-NL63はATCCから入手し、LLC-MK2細胞において増殖させた。インフルエンザA/WSN/33 (H1N1) は逆遺伝学的技法を使って生成させ、インフルエンザA/香港/8/68 (H3N2) はATCCから入手した。どちらのインフルエンザウイルス株もMDCK細胞中で増殖させた。HCoV-NL63の力価はReed-Muench法によりLLC-MK2細胞において測定した。インフルエンザウイルスの力価はブランク形成アッセイによって測定した (Si et al., 2020)。

【0263】

トランスフェクションによる細胞株の刺激

RNAおよびスクランブル化陰性対照dsRNAはすべてIntegrated DNA Technologies, Inc. (IDT) によって合成された。細胞を、 3×10^5 細胞/ウェルで6ウェルプレートに播種するか、または 10^4 細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種し、トランスフェクション前に24時間培養した。トランスフェクションは、TransIT-X2ダイナミックデリバリーシステム (Dynamic Delivery System) (Mirus) を使用し、製造者の説明書にいくつかの変更を加えて行った。別段の表示がなければ、6.8 μ Lの10 μ M RNA保存溶液および5 μ Lのトランスフェクション試薬を200 μ LのOpti-MEM (Invitrogen) に加えて、トランスフェクション混合物を作った。6ウェルプレートでのトランスフェクションには、200 μ Lのトランスフェクション混合物を各ウェルに加え、96ウェルプレートでのトランスフェクションには、10 μ Lのトランスフェクション混合物を各ウェルに加えた。トランスフェクション後、表示の時点において、細胞試料を収集し、RNA-seq (Genewiz, Inc.)、TMT質量分析、qRT-PCR、ウェスタンブロット、またはQuantilucアッセイ (InvivoGen) に供した。

【0264】

RNA-seqおよび遺伝子オントロジー (ontology) 解析

RNA-seqは、Genewizにより、ポリA選択とIllumina HiSeqにおける150bpペアエンドリードでのシーケンシングとを含む標準的RNA-seqパッケージを使って処理された。考えうるアダプター配列と低品質のヌクレオチドを除去するために、Trimmomatic v.0.36を使って、配列リードをトリミングした。トリミングされたリードはヒト (Homo sapiens) GRCh38リファレンスゲノムにSTARライナー v.2.5.2bを使ってマッピングされた。Subreadパッケージ v.1.5.2のfeature Countsを使用することによってユニーク遺伝子ヒット数 (Unique gene hit count) を計算し、次にDESeq2を使って差次的発現解析を行った。遺伝子オントロジー解析はDAVIDを使って行った (Huang et al., 2009)。ボルカノプロットおよびヒートマップはGraphPad Prismを使って作成した。ポリ (1:C) で処置したA549細胞のRNA-seqに関するデータは、Gene Expression Omnibusからアクセッション番号GSE124144として取得した (Burke et

10

20

30

40

50

al., 2019)。

【0265】

タンデム質量タグ質量分析によるプロテオミクス解析

細胞を氷上に採取した。細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害薬を含む8M尿素および200mM EPPS pH8.5中、シリンジで溶解した (syringe-lysed)。BCAアッセイを行って各試料のタンパク質濃度を決定した。試料を5mM TCEP中で還元し、10mMヨードアセトアミドでアルキル化し、15mM DTTでクエンチした。100 µgのタンパク質をクロロホルム-メタノール沈殿させ、100 µLの200mM EPPS pH8.5に再懸濁した。タンパク質を、Lys-Cにより、1:100のプロテアーゼ対ペプチド比で、穏やかに振とうしながら室温で一晩、消化した。さらなる消化には、トリプシンを、Lys-Cの場合と同じ比で、37 °Cで6時間使用した。消化後に、30 µLのアセトニトリル (ACN) を各試料に加えて30%最終体積にした。ACN 10 µL中のTMT試薬 (126、127N、127C、128N、128C、129N、129C、130N、130C) 200 µgを各試料に加えた。1時間の標識化後に、2 µLの各試料を合わせ、脱塩し、質量分析を使って解析した。各チャンネルにおいて総強度を決定して、正規化因子を計算した。0.3%ヒドロキシルアミンを使ってクエンチした後、11の試料を、正規化因子に基づいて1:1の比で合わせた。その混合物を固相抽出によって脱塩し、塩基性pH逆相 (basic pH reversed phase: BPRP) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分画し、96ウェルプレート (a 96 six well plate) 上に収集し、それらを合わせて合計24のフラクションにした。12のフラクションを脱塩し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で解析した (Navarrete-Perea et al., 2018)。

【0266】

質量分析データは、Proxeon NanoLC-1200 UHPLCと接続したOrbitrap Fusion Lumos質量分析計で収集した。100 µmキャピラリーカラムに35cmのAccucore 50レジジン (2.6 µm、150 Å、ThermoFisher Scientific) を充填した。スキャンシーケンスをMS1スペクトラムから始めた (オービトラップ解析、分解能120,000、375~1500Th、オートゲインコントロール (AGC) ターゲット4E5、最大インジェクションタイム50ms)。SPS-MS3解析を使って、イオン干渉を低減した (Gygi et al., 2019; Paullo et al., 2016)。次に、トップ10のプリカーサーをMS2/MS3解析用に選択した。MS2解析は、衝突誘起解離 (CID)、四重極イオントラップ解析、オートゲインコントロール (AGC) 2E4、NCE (normalized collision energy; 正規化衝突エネルギー) 35、q値0.25、最大インジェクションタイム35ms) および0.7の分離ウィンドウ (isolation window) からなった。各MS2スペクトルの取得後に、MS3スペクトルを収集した。ここでは、多重周波数ノッチ (multiple frequency notches) を持つ分離波形 (isolation waveform) を使って、複数のMS2フラグメントイオンをMS3プリカーサー集団 (precursor population) に捕捉した。MS3プレカーサーをHCDによって断片化し、オービトラップを使って解析した (NCE 65、AGC 1.5E5、最大インジェクションタイム120ms、分解能は400Thで50,000であった)。

【0267】

質量スペクトルはSequestベースのパイプラインを使って処理した (Huttlin et al., 2010)。改変版のReAdW.exeを使ってスペクトルをmzXMLに変換した。データベース検索には、ヒトUniProtデータベース (ダウンロード日2014-02-04) の全エントリを含めた。このデータベースは逆順の全タンパク質配列で構成されるものと連結された。検索は、総タンパク質レベル解析 (total protein level analysis) について50ppmのプリカーサーイオン許容差 (precursor ion tolerance) を使って行った。プロダクトイオン許容差 (product ion tolerance) は0.9Daに設定した。リジン残基およびペプチドN末端上のTMTタグ (+229.163Da) およびシステイン残基のカルボアミドメチル化 (+57.021Da) を静的修飾 (static modification) に設定し、メチオニン残基の酸化 (+15.995Da) を可変的修飾 (variable modification) に設定した。

【0268】

ペプチド-スペクトルマッチ (peptide-spectrum match:PSM) を1%偽発見率 (false discovery rate:FDR) に調整した (Elias and Gygi,2007,2010)。PSMフィルタリングは、以下のパラメータを考慮しつつ、以前に記載されているように (Huttlin et al.,2010)、線形判別分析 (linear discriminant analysis:LDA) を使った:XCorr、Cn、missed cleavages (切断見逃し)、peptide length (ペプチド長)、charge state (荷電状態) およびprecursor mass accuracy (プリカーサー質量精度)。TMTベースのレポーターイオン定量のために、積算信号雑音 (S:N) 比 (summed signal-to-noise (S:N) ratio) を各TMTチャンネルについて抽出し、TMTレポーターイオンの予想質量に対する最整合重心 (closest matching centroid) を見つけた。タンパク質レベル比較のために、PSMを同定し、定量し、1%ペプチド偽発見率 (FDR) に縮約 (collapse) し、次に1%の最終タンパク質レベルFDRにさらに縮約することで、<0.1%の最終ペプチドレベルFDRがもたらされた。さらに、タンパク質アセンブリは、最節約原理 (principles of parsimony) に従って行われ、観察されたペプチドを説明するのに必要なタンパク質の最小セットを得た。以前に記載されているように、すべての整合PSMにわたってレポーターイオン数を積算することにより、タンパク質を定量した (Huttlin et al.,2010)。低品質のPSM、TMTレポーター積算信号雑音比が100未満であるMS3スペクトル、またはMS3スペクトルがないものは、定量から除外した (McAlister et al.,2012)。各レポーターイオンチャンネルを、定量されたすべてのタンパク質について積算し、試験したすべての試料のタンパク質負荷量は等しいと仮定して正規化した。

【0269】

qRT-PCR

RNeasy Plusミニキット (QiaGen、カタログ番号74134) を使用し、製造者の説明書に従って、全RNAを細胞から抽出した。次に、AMV逆転写酵素キット (Promega) を使用し、製造者の説明書に従って、cDNAを合成した。遺伝子レベルを検出するために、GoTaq qPCRマスターミックスキット (Promega) を使用し、遺伝子特異的プライマーを含有する20 μ Lの反応混合物で、またはPrimePCRアッセイキット (Bio-Rad) を使用し、製造者の説明書に従って、定量リアルタイムPCRを実行した。標的遺伝子の発現レベルをGAPDHに対して正規化した。

【0270】

抗体およびウェスタンブロッティング

この研究において使用した抗体は、抗IRF3 (Abcam,ab68481)、抗IRF3 (ホスホS396) (Abcam, ab138449)、抗GAPDH (Abcam, ab9385) およびヤギ抗ウサギIgG H&L (HRP) (Abcam,ab205718) である。細胞を採取し、 Halt (商標) プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Thermo Scientific、カタログ番号78440) を補足したRIPA緩衝液 (Thermo Scientific、カタログ番号89900) 中、氷上で溶解した。細胞溶解物をウェスタンブロッティングに供した。GAPDHをローディング対照として使用した。

【0271】

共焦点免疫蛍光顕微鏡法

細胞をPBSですすぎ、4%パラホルムアルデヒド (Alfa Aesar) で30分間固定し、PBS中の0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (PBST) で10分間透過処理し、室温において1時間、PBST中の10%ヤギ血清 (Life Technologies) でブロッキングし、ブロッキング緩衝液 (PBST中の1%ヤギ血清) に希釈した抗IRF3 (ホスホS396) (Abcam,ab138449) 抗体と共に4 \times で一晩インキュベートした後、Alexa Fluor 488コンジュゲート二次抗体 (Life Technologies) と共に室温で1時間インキュベートした。二次抗体染色後に核をDAPI (Invitrogen) で染色した。蛍光イメージングは、共焦点レーザー走査顕微鏡 (SP5 X MP DMI-6000、ドイツ) を使って実行し、画像処理はImarisソフトウェア (Bitplane、スイス) を使って行った。

【0272】

10

20

30

40

50

表面プラズモン共鳴

二重鎖RNA-1と細胞RNAセンサー分子（RIG-I（Abcam、カタログ番号ab271486）、MDA5（Creative-Biomart、カタログ番号IFIH1-1252H）およびTLR3（Abcam、カタログ番号ab73825））の間の相互作用を、25 °Cでの、Biacore T200システム（GE Healthcare）によるSPRで解析した（Creative-Biolabs Inc.）。3'末端でピオチンにコンジュゲートされたRNA-1（IDT Inc.によって合成されたもの）を、約60レスポンスユニット（RU）の最終レベルで、SPRセンサーチップ上に固定化した。ランニング緩衝液（10×HBS-EP+；GE Healthcare、カタログ番号BR100669）に希釈したさまざまな濃度のRNAセンサーを、30 µl/分の流速、180秒の接触時間および300秒の解離時間で、分析物として注入した。表面は、2M NaClで60秒間、再生させた。データ解析はBiacore T200評価ソフトウェアを使ってBiacore T200コンピュータで行った。

10

【0273】

臓器チップ培養

マイクロ流体2チャンネル臓器チップデバイスおよびそれらを培養するために使用される自動ZOE（登録商標）機器は、Emulate Inc（Boston、米国マサチューセッツ州）から入手した。ヒト肺気道チップ（Si et al., 2020、Si et al., 2019）および肺胞チップを培養するための本発明者らの方法は、以前に記載されている。この研究では、肺胞チップ法に、デバイスの内側チャンネルを200 µg/mlコラーゲンIV（5022-5MG、Advanced Biomatrix）および15 µg/mlのラミニン（L4544-100UL、Sigma）で37 °Cにおいて一晚コーティングし、翌日（1日目）、初代ヒト肺微小血管内皮細胞（Lonza、CC-2527、P5）および初代ヒト肺胞上皮細胞（Cell Biologics、H-6053）を、チップのボトム（bottom）チャンネルおよびトップ（top）チャンネルに、それぞれ8および1.6 × 10⁶細胞/mlの密度で、静的条件下に、逐次的に播種することによるわずかな変更を加えた。2日目に、チップを、ZOE（登録商標）機器内に設置したPods（登録商標）（Emulate Inc.）に挿入し、頂端（apical）チャンネルおよび基底（basal）チャンネルに、それぞれ、上皮増殖培地（Cell Biologics、H6621）および内皮増殖培地（Lonza、CC-3202）を灌流した（60 µl/時）。5日目に、障壁機能を強化するために、1 µMデキサメタゾンを頂端培地に加えた。7日目に、上皮チャンネルに、このチャンネルから培地をすべて除去することによって、気液界面（air-liquid interface:ALI）を導入すると共に、下側の血管チャンネルに灌流させた培地を介してすべての細胞に栄養補給を続け、9日目にはこの培地を、0.5% FBSを含むEGM-2MVに変えた。2日後に、オンチップで肺呼吸を模倣するために、ZOE（登録商標）機器を使って、周期的（0.25 Hz）な5%の機械的歪みを、工学的に作り出された肺胞-毛細血管界面に適用した。RNAを15日目にトランスフェクトした。

20

30

【0274】

ヒト肺気道および肺胞チップにおけるRNAトランスフェクション

RNAとトランスフェクション試薬（Lipofectamine RNAiMAX）の混合物を、臓器チップの頂端チャンネルおよび基底チャンネルに加え、静的条件下に37 °Cで6時間インキュベートしてから、ALIを再確立することによって、ヒト気道または肺胞チップに二重鎖RNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、まず100 µlの溶解緩衝液を頂端チャンネルに導入して上皮細胞を溶解し、次に100 µlを基底チャンネルに導入して内皮細胞を溶解することにより、オンチップで培養された組織を、RNeasyマイクロキット（QiaGen）によって収集した。溶解物をIFN- γ 遺伝子発現のqPCR解析に供した。

40

【0275】

天然SARS-CoV-2感染およびRNA処置による障害

ACE2発現A549細胞（Brad Rosenbergから寄贈）に表示のRNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、トランスフェクトされたACE2-A549細胞にSARS-CoV-2（MOI = 0.05）を48時間感染させた。細胞をTrizol（Invitrogen

50

)に採取し、Zymo RNAミニプレップキットを使用し、製造者のプロトコールに従って、全RNAを単離し、DNase-I処理した。KAPA SYBR FAST ONE-STEP qRT-PCRキット (Roche) を使用し、製造者の説明書に従って、Lightcycler 480 Instrument-II (Roche) で、
-チュープリン (フォワード:
5'-GCCTGGACCACAAGTTTGAC-3'

;リバーズ:

3'-TGAAATTCTGGGAGCATGAC-5'

)およびSARS-CoV-2 N mRNA (フォワード:

5'-CTCTTGATAGATCTGTTCTCTAAACGAAC-3'

10

;リバーズ:

3'-GGTCCACCAAACGTAATGCG-5'

)に関するqRT-PCRを行った。

【0276】

天然SARS-CoV-1およびMERS-CoV感染ならびにRNA処置による阻害

10% (v/v) ウシ胎児血清 (Sigma)、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gemini Bio-products) および1% (v/v) L-グルタミン (2mM最終濃度、Gibco) を補足したDMEM (Quality Biological) 中でVero E6細胞 (ATCC番号CRL 1586) を培養した。細胞を37 (5%CO₂) に維持した。トランスフェクションの2日前に、Vero E6細胞を、6ウェルプレートに1ウェルにつき1.5 × 10⁵細胞ずつプレATINGした。OptiMEM (Gibco 31985-070) 中のTransit X2デリバリーシステム (MIRUS;MIR6003) を使って、RNA-1、RNA-2およびスクランブル化対照RNAを各ウェルにトランスフェクトした。SARS-CoV (ウルバーニ株、BEI# NR-18925) およびMERS-CoV (ヨルダン株、NIHにより提供) をMOI 0.01で加えた。感染後72時間の時点で、培地を収集して、ウイルスのPFU/mLを定量するためのプラークアッセイに使用した。

20

【0277】

ハムスター効力研究

天然SARS-CoV-2分離株USA-WA1/2020 (NR-52281) を使ってゴールデンハムスターにおける効力研究を実行するための方法は、以前に記載されている(13)。防止研究では、PBSに希釈したRNA-1を、SARS-CoV-2ウイルス (PBS100 μl中の10²PFUの3代継代ウイルス) の鼻腔内投与の1日前から開始して、さらに2日間にわたって、毎日鼻腔内投与した。処置実験では、in vivo-jetPEI (登録商標) 送達試薬 (Genesee Scientificカタログ番号55-202G;50uL中、20ug) を含有する5%グルコースに希釈したRNA-1を、SARS-CoV-2ウイルス (10³PFU) の鼻腔内投与の1日後から開始して2日間、毎日鼻腔内投与した。すべての実験において、最後の処置を投与した1日後に動物を殺し、解析のために肺を採取した。動物を100 μlのケタミンおよびキシラジン (3: 40

30

【0278】

肺RNAをフェノールクロロホルム抽出およびDNA-free (商標) DNA除去キット (Invitrogen) を使ったDNase処理によって抽出し、KAPA SYBR FAST qPCRマスターミックスキット (Kapa Biosystems) を使用し、LightCycler 480 Instrument II (Roche) で、サブゲノムヌクレオカプシド (N) RNA (sgRNA) およびアクチンに関するRT-qPCRを、以下のプライマーを使って行った:アクチンフォワードプライマー:
5'-CCAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'

50

、アクチンリバースプライマー：
5'-ATGGCTACGTACATGGCTGG-3'

、N sgRNAフォワードプライマー：
5'-CTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAAC-3'

、N sgRNAリバースプライマー：
5'-GGTCCACCAAACGTAATGCG-3'

。sgRNAをアクチン発現に対して正規化することによって、相対的sgRNAレベルを定量した。 10

【0279】

定量および統計的解析

データはすべて平均±標準偏差(SD)として表す。Nは生物学的レプリケート数を表す。インビトロ実験における差の統計的有意性は、2群間の差を比較する場合には対応のある両側スチューデントt検定を使用し、3つ以上の試料を含む群間で試料を比較する場合には多重比較による一元配置ANOVAを使用することによって決定した。インビボ実験については、対応のない片側スチューデントt検定を使って、RNA-1によるウイルス量の阻害の有意性を推定した。すべての実験について、差は $p < 0.05$ で統計的に有意とみなした(*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s.、有意差なし)。 20

【0280】

参考文献

1) D. Blanco-Melo *et al.*, Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045 e1039 (2020).

2) L. Si *et al.*, Human organs-on-chips as tools for repurposing approved drugs as potential influenza and COVID19 therapeutics in viral pandemics. *bioRxiv* doi:10.1101/2020.04.13.039917. (2020).

3) W. Huang da, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57 (2009). 30

4) J. M. Burke, S. L. Moon, T. Matheny, R. Parker, RNase L Reprograms Translation by Widespread mRNA Turnover Escaped by Antiviral mRNAs. *Mol Cell* **75**, 1203-1217 e1205 (2019).

5) J. Navarrete-Perea, Q. Yu, S. P. Gygi, J. A. Paulo, Streamlined Tandem Mass Tag (SL-TMT) Protocol: An Efficient Strategy for Quantitative (Phospho)proteome Profiling Using Tandem Mass Tag-Synchronous Precursor Selection-MS3. *J Proteome Res* **17**, 2226-2236 (2018). 40

6) J. P. Gygi *et al.*, Web-Based Search Tool for Visualizing Instrument Performance Using the Triple Knockout (TKO) Proteome Standard. *J Proteome Res* **18**, 687693 (2019).

7) J. A. Paulo, J. D. O'Connell, S. P. Gygi, A Triple Knockout (TKO) Proteomics Standard for Diagnosing Ion Interference in Isobaric Labeling Experiments. *J Am Soc Mass Spectrom* **27**, 1620-1625 (2016).

【0281】

実施例4:新規二重鎖RNAは複数のインフルエンザ株による感染を阻害する 50

本明細書記載の二重鎖RNAを、ヒトおよび霊長類細胞培養における感染を阻害するそれらの能力について試験した。本明細書記載の二重鎖RNAは、ヒト肺上皮細胞において、インフルエンザ感染の95%を超える阻害を与えた(図23)。感冒コロナウイルスHCoV-NL63に感染させたサル腎臓細胞で試験した場合も、本明細書記載のRNA二重鎖は、サル腎臓細胞におけるコロナウイルス感染の95%超を阻害した(図24)。

【0282】

最も注目すべきことに、本明細書記載のRNA二重鎖は、ACE2を過剰発現するヒト肺上皮細胞におけるSARS-CoV-2ウイルス感染を阻害した(図25)。

【0283】

方法-細胞培養およびウイルス:10%(v/v)ウシ胎児血清(Sigma)、1%(v/v)ペニシリン/ストレプトマイシン(Gemini Bio-products(登録商標))および1%(v/v)L-グルタミン(2mM最終濃度、Gibco(登録商標))を補足したDMEM(Quality Biological(登録商標))中でVero E6細胞(ATCC番号CRL 1586)を培養した。細胞を37(5%CO₂)に維持した。トランスフェクションの2日前に、Vero E6細胞を、6ウェルプレートに1ウェルにつき1.5E5細胞ずつプレーティングした。OptiMEM(Gibco(登録商標)31985-070)中のTransit X2(商標)デリバリーシステム(MIRUS(登録商標);MIR6003)を使って、RNA-A、RNA-Bおよびスクランブル化対照RNAを、6ウェルプレートの各ウェルにトランスフェクトした。SARS-CoV(ウルバーニ株、BEI#NR-18925)およびMERS-CoV(ヨルダン株、NIHにより提供)をMOI 0.01で加えた。感染の72時間後に培地を収集し、ウイルスのpfu/mlを定量するためのプ
ークアッセイに使用した(例えばColeman CM, Frieman MB. 2015. Growth and Qu
antification of MERS-CoV Infection. Curr Protoc Microbiol 37:15E.2.1-1
5E.2.9)。

【0284】

実施例5:新規RNA二重鎖はインビボでのSARS-CoV-2感染を阻害する

本明細書記載のRNA二重鎖を、SARS-CoV2に感染させたハムスターにおける経肺投与によって、インビボで試験した。感染の-1日目、0日目および+1日目に投与された二重鎖RNAによるI型インターフェロンの誘導は、これらの動物におけるウイルス量を有意に低減させるのに十分である(図26)。

【0285】

要約すると、本明細書記載のdsRNAは、肺気道に送達された場合、全身性に注射されたIFNタンパク質製剤よりも高いIFN応答を局所的に生じさせることができる。さらにまた、これらのdsRNAは、他の免疫刺激性RNAで見られる全身性の炎症応答を生じず、毒性が最小限に抑えられる。本明細書記載のdsRNAは、とりわけCOVID-19およびインフルエンザ感染において、予防にも処置にも使用することができる。

10

20

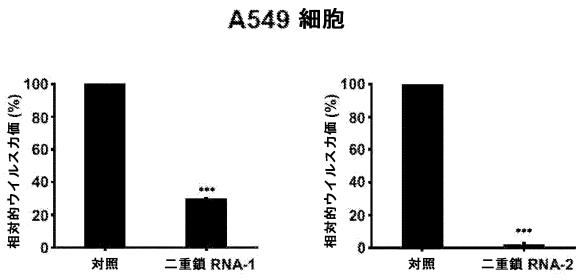
30

40

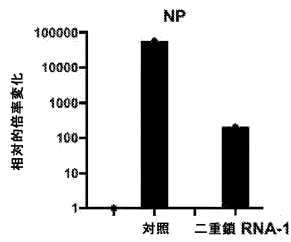
50

【 図 面 】

【 図 1 】

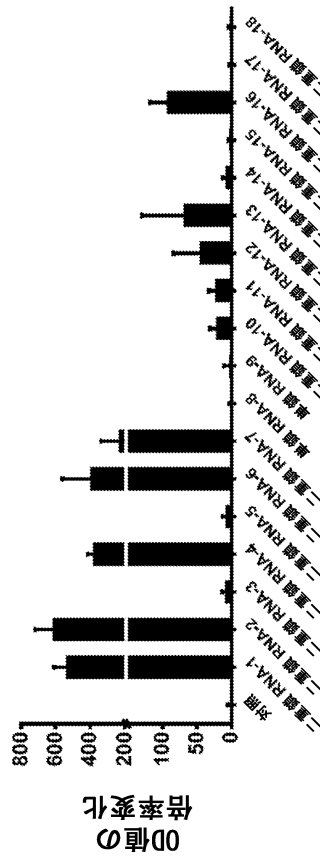


A



B

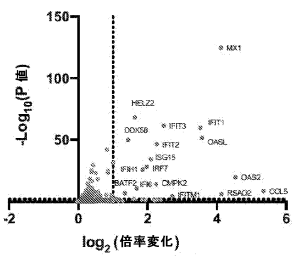
【 図 2 】



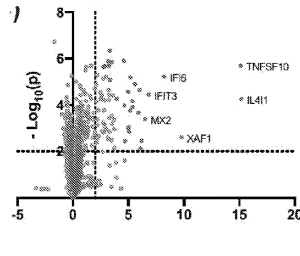
10

20

【 図 3 】

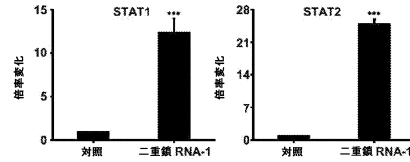


A

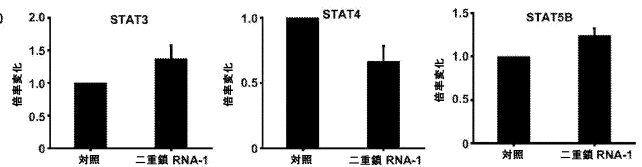


C

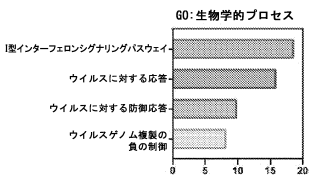
【 図 4 】



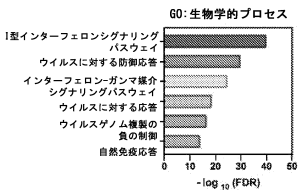
30



40



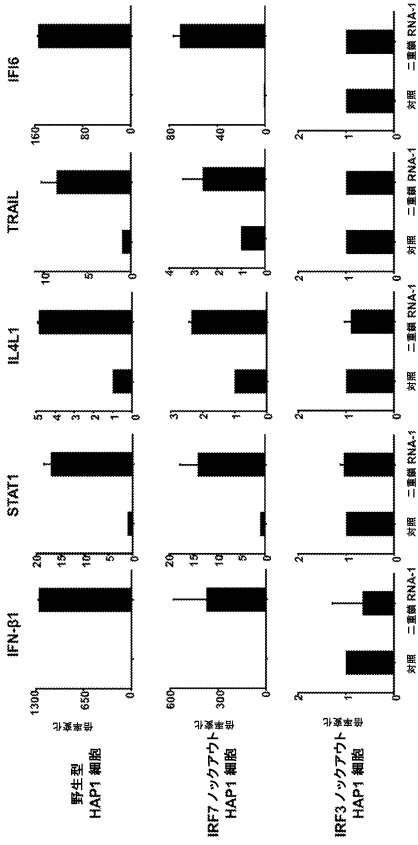
B



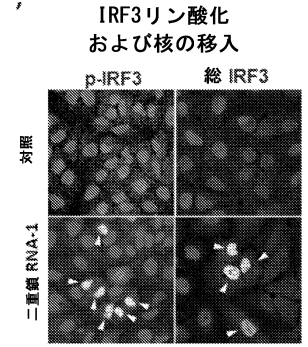
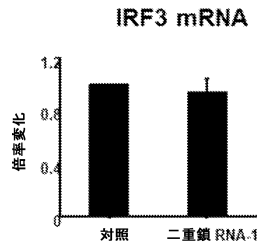
D

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

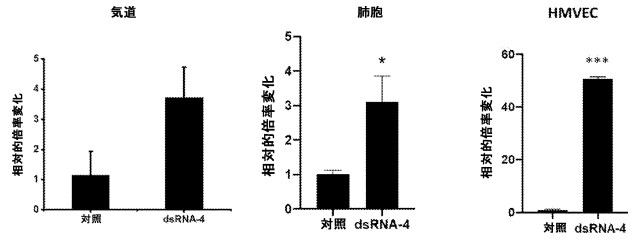
20

【 図 7 】

RNA ID	配列	備考
二重鎖 RNA-1	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	テンプレート1
二重鎖 RNA-2	C U G A U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	テンプレート2
二重鎖 RNA-3	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	3'に10ntの欠失
二重鎖 RNA-4	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	最初のAntを戻し、 残りをシャッフル
二重鎖 RNA-5	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	5'に6ntの欠失
二重鎖 RNA-6	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	岡モチーフを 戻し、残りを シャッフル
二重鎖 RNA-7	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	3'に6ntの欠失
単鎖 RNA-8	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	一本鎖 #1
単鎖 RNA-9	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	一本鎖 #2

表1. さまざまなバージョンのRNA

【 図 8 】

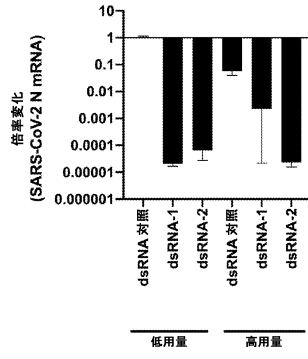
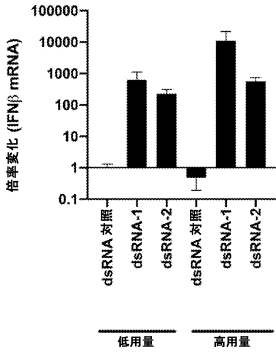


30

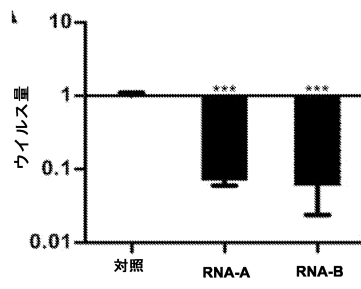
40

50

【図 9】

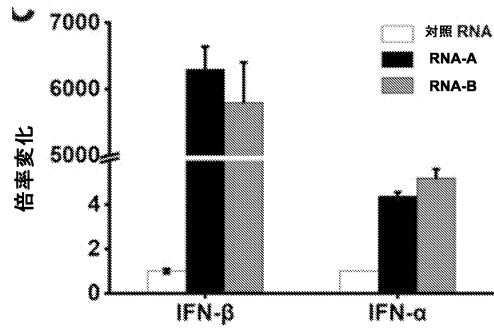


【図 10 - 1】



A

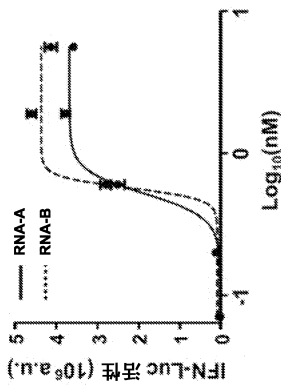
10



B

20

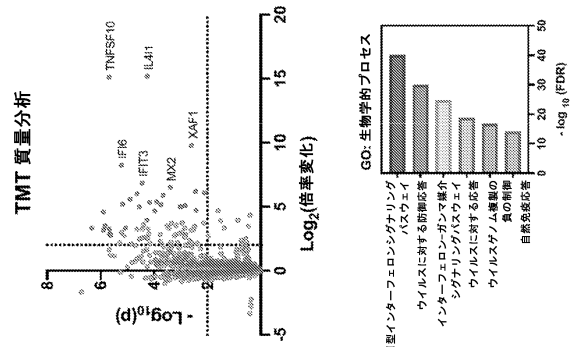
【図 10 - 2】



D

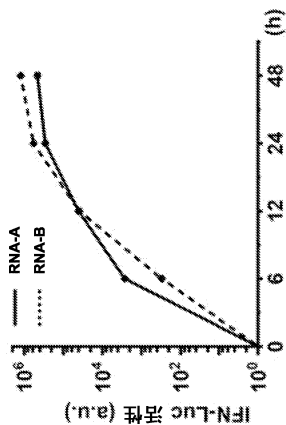
30

【図 11】

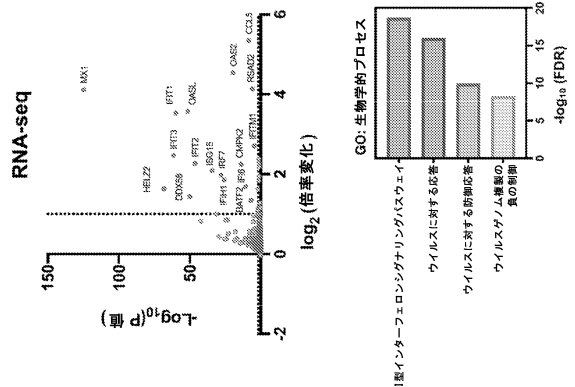


B

40



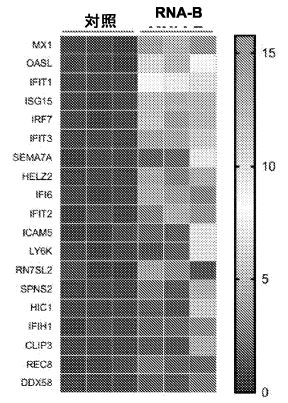
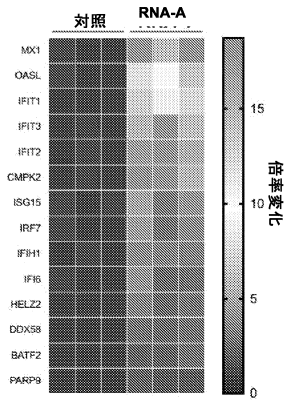
C



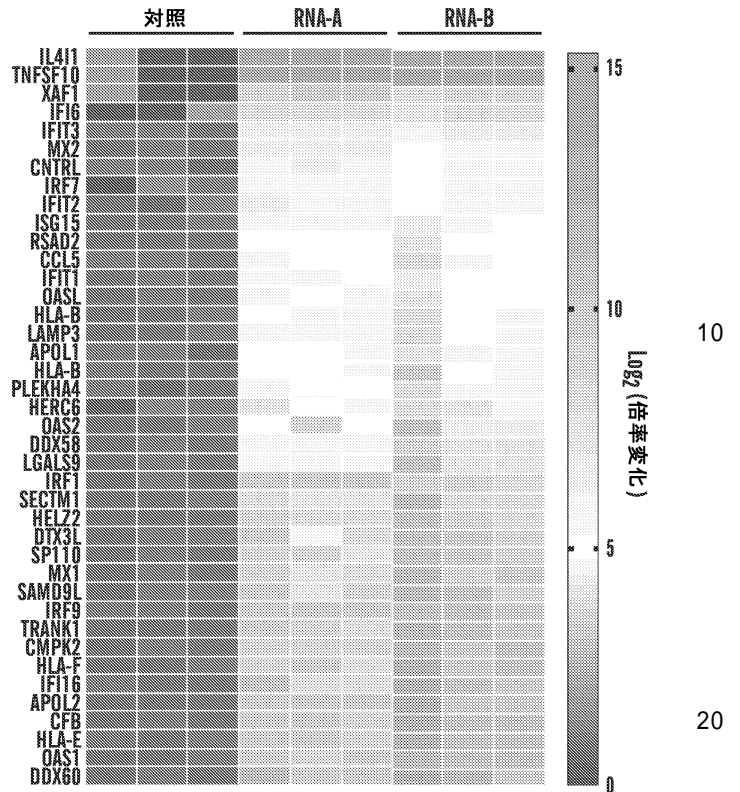
A

50

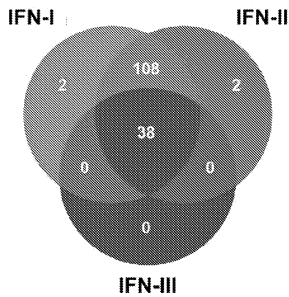
【 1 2 A 】



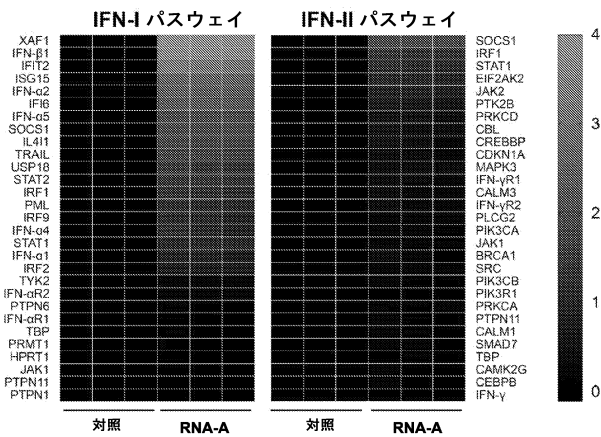
【 1 2 B 】



【 1 3 】



A



B

【 1 4 - 1 】

RNA ID	配列 (5'-3')	活性	備考
RNA-A	CUGACUAGACACUGGCUAGUUCACCTT	+++	DGCR5を標的とするsiRNA
RNA-B	GGACUAGUUCAGUUCACCGAUCAGUGGAA	+++	LIN00261を標的とするsiRNA
RNA-C	CUGACUACUGGCUAGUUCACCTT	+++	両モチーフを保ち、残りをシャッフル
RNA-D	CUGACUAGUUCAGUUCACCGAUCAGUGGAA	+++	最初の4ntを保ち、残りをシャッフル
RNA-E	UCAGUGACACUGGCUAGUUCACCTT	-	「GG」を「CC」に変え、残りをシャッフル
RNA-F	CUGACUAGUUCAGUUCACCGAUCAGUGGAA	-	5'に4ntの欠失
RNA-G	CUGACUAGACACUGGCUAGUUCACCTT	-	「GG」なし
RNA-H	CUGACUAGACACUGGCUAGUUCACCTT	-	「GG」 → 「CC」

30

40

50

【 図 1 4 - 2 】

RNA-I	U C A G U G A C A C U G G C U A G U U C A C C T T	「CUGA」をシャッフル	-
RNA-I	G G A G U C A C U G G A C C G G A U C A A G U G G A A		
RNA-J	U G C A U G A C A C U G G C U A G U U C A C C T T	「CUG」をシャッフル	+
RNA-K	G G A C G U A C U G A C C G G A U C A A G U G G A A		
RNA-L	U C G A U G A C A C U G G C U A G U U C A C C T T	「CU」をシャッフル	++
RNA-L	G G A G C C U G C U G U G A C C G A U C A A G U G G A A		+++
RNA-L	C U G A U G A C A C U G G C U A G T T	3'に6ntの欠失	+++
RNA-M	G G A C U A C U G U G A C C G A U C A A		
RNA-M	C U G A U G A C A C U G G C U A G T T	3'に7ntの欠失	++
RNA-M	C C A G U C A C U G G A C C G A U C A		
RNA-N	C U G A U G A C A C U G G C U A G	3'に8ntの欠失	-
RNA-O	C U G A U G A C A C U G G C T A		
RNA-O	G G G A C U A C U G U G A C C G A U	3'に9ntの欠失	-
RNA-P	C U G A U G A C A C U G G C T		
RNA-P	C C G A C U A C U G U G A C C G A	3'に10ntの欠失	-
RNA-Q	C U G A U G A C A C U G G C U A G U U C A C C T T	単鎖センス鎖	-
RNA-R	G G G A C U A C U G U G A C C G A U C A A G U G G A A	単鎖アンチセンス鎖	-

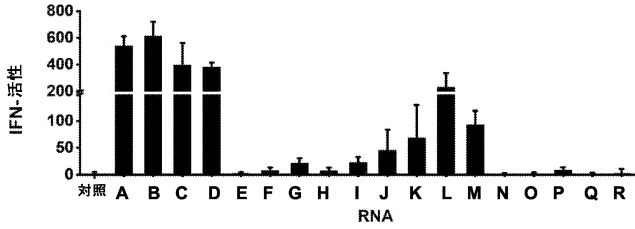
【 図 1 5 】

特徴	シグナリングパスウェイ	サイトカイン
モチーフ:センス鎖: 5'-CUGA-3' アンチセンス鎖: 3'-GGGACU-5' RNA二重鎖の最小長: 20 bp 二本鎖 RNA 5'端にニリン酸または-OH 5'-オーバーハング端	RIG-I	IFN-ベータ
5'-UGUGU-3'モチーフ 5'-GUCCUUCAM-3'モチーフ GUまたはAURリッチ	Toll様受容体 (TLR)8 TLR7/8 TLR7/8 TLR7	IFN-アルファ IFN-アルファ IFN-アルファ, TNF-アルファ IFN-アルファ, IL-6, TNF-アルファ
ウラシルリピート 平滑末端 dsRNA 5'-三リン酸; 5'-ニリン酸	TLR7 RIG-I RIG-I	I型 IFN, p56 IFN-アルファ, IFN-ベータ
マイクロRNA様 siRNA 長い dsRNA 一本鎖 (ss)RNA	TLR7/8 MDA5/TLR3 TLR7	IFN-アルファ, TNF-アルファ I型 IFN I型 IFN

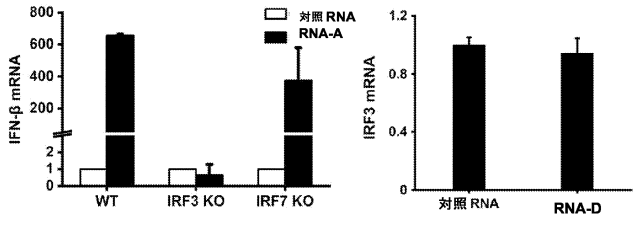
10

20

【 図 1 6 】



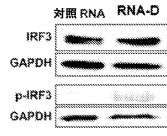
【 図 1 7 - 1 】



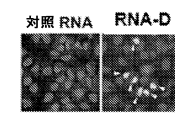
30

A

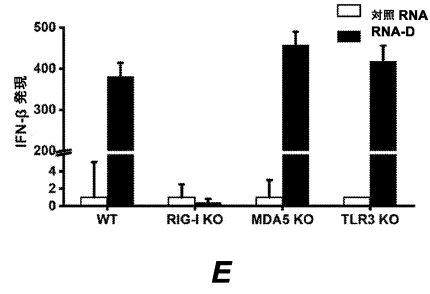
B



C



D

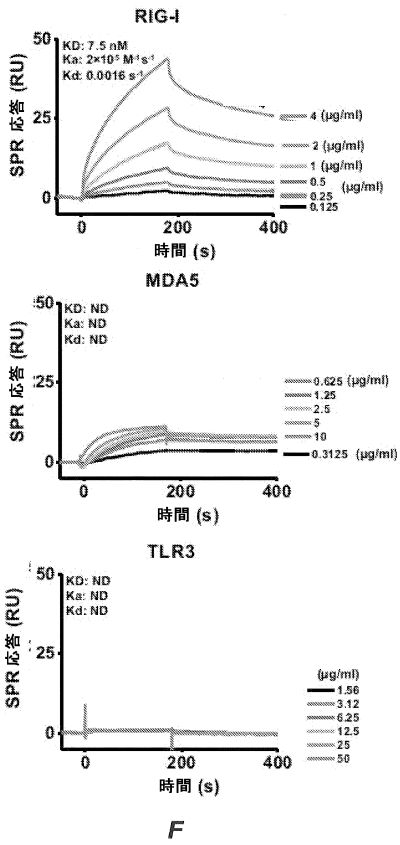


E

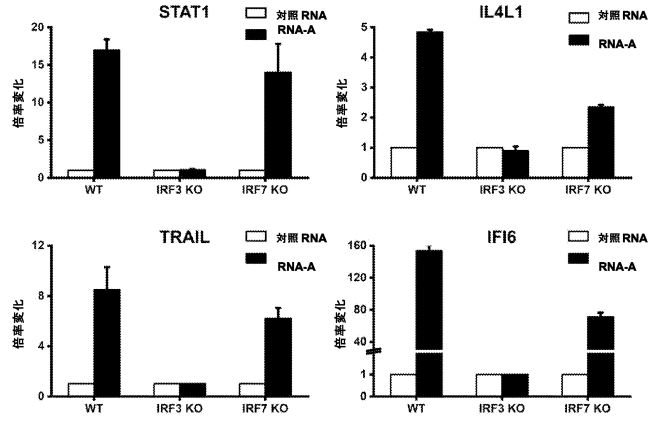
40

50

【 図 1 7 - 2 】



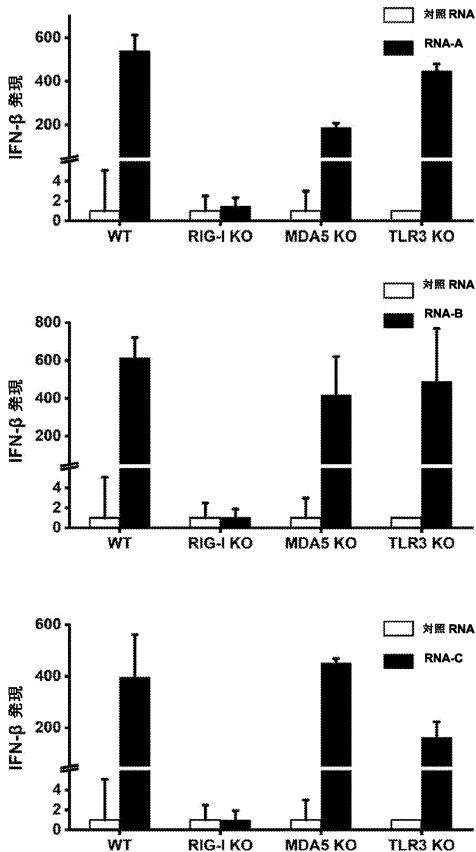
【 図 1 8 】



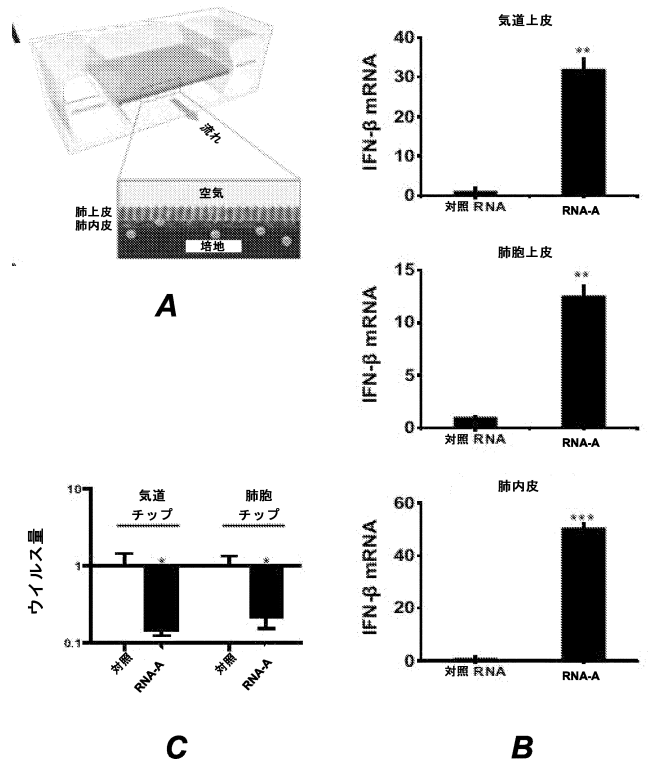
10

20

【 図 1 9 】



【 図 2 0 - 1 】

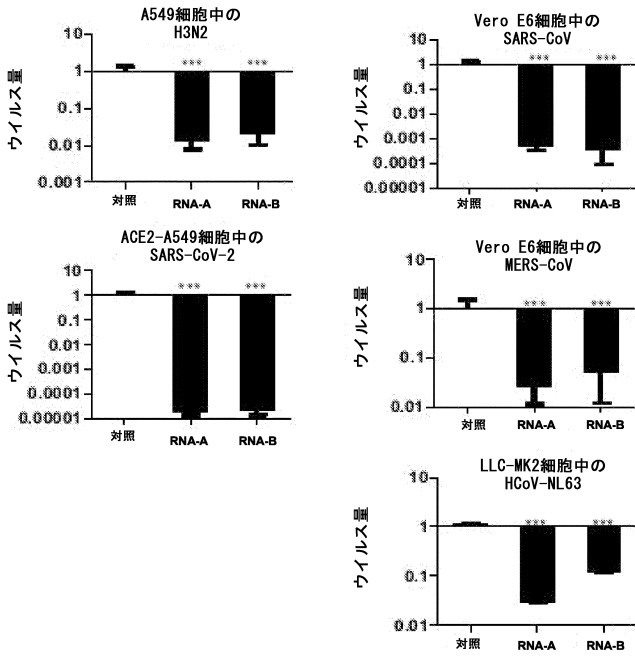


30

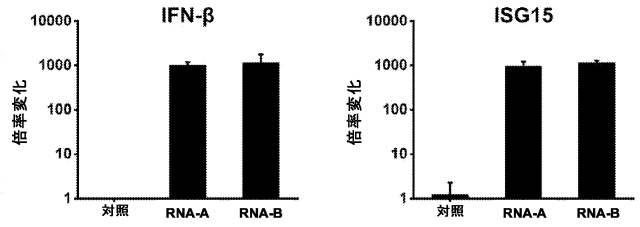
40

50

【図 2 0 - 2】



【図 2 1】

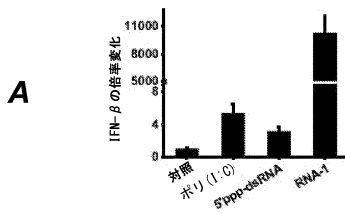


D

10

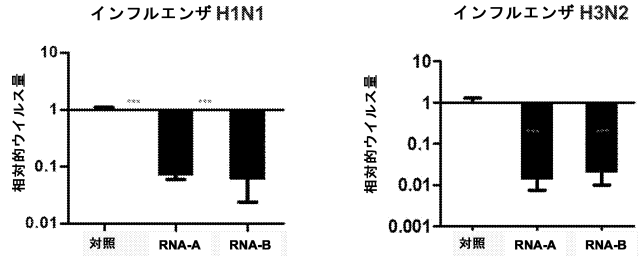
20

【図 2 2】



A

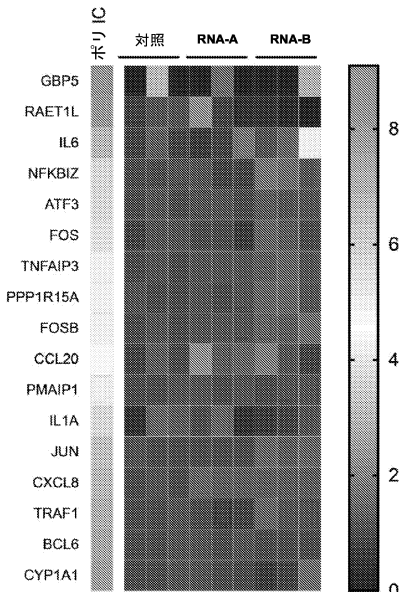
【図 2 3】



30

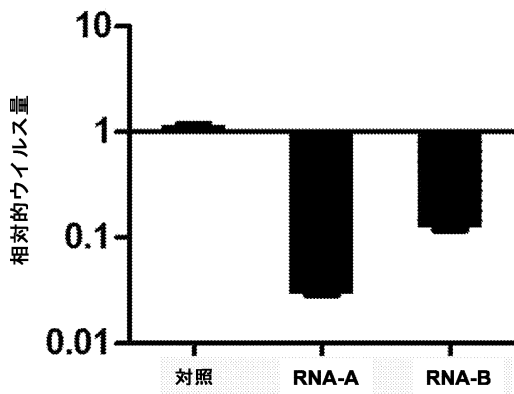
40

50

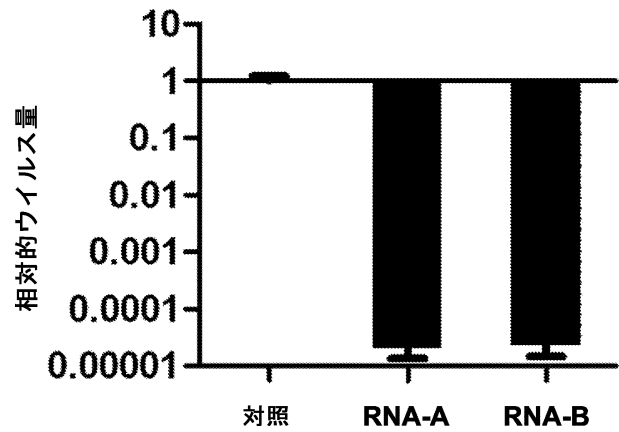


B

【 図 2 4 】
HCoV-NL63 コロナウイルス

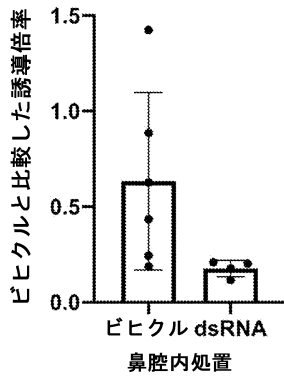


【 図 2 5 】
SARS-CoV-2 コロナウイルス



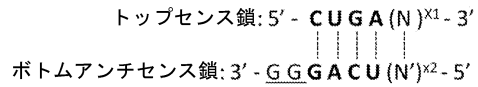
10

【 図 2 6 】
TRS-N vRNA qPCR



【 図 2 7 】

モチーフ1

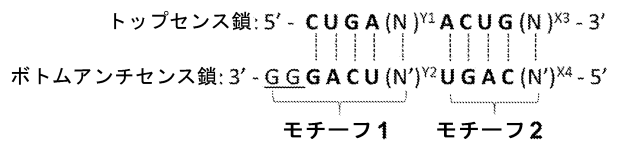


20

ここで、Nは、G、A、C、U、Tのいずれかである。
N'はトップ鎖の対応するNヌクレオチドに対して相補的である。

X1 は ≥ 14
X2 は ≥ 14

モチーフ2を含むモチーフ1



30

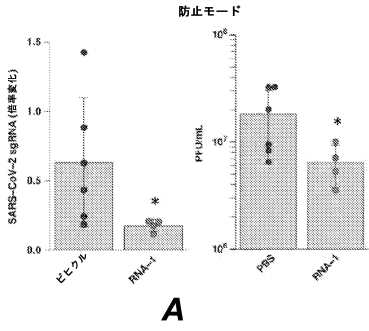
ここで、Nは、G、A、C、U、Tのいずれかである。
N'はトップ鎖の対応するNヌクレオチドに対して相補的である。

X3 は ≥ 6
X4 は ≥ 6
Y1 は ≥ 4
Y2 は ≥ 4

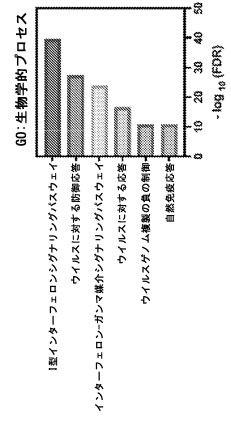
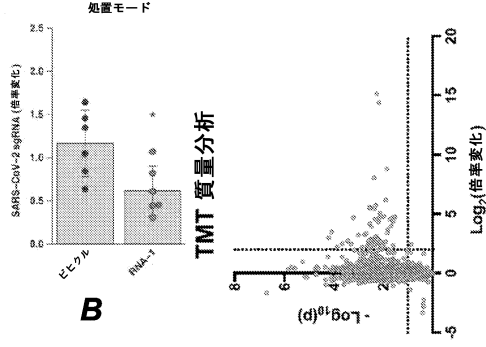
40

50

【 図 2 8 】

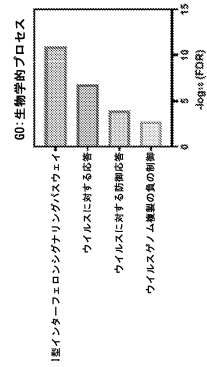
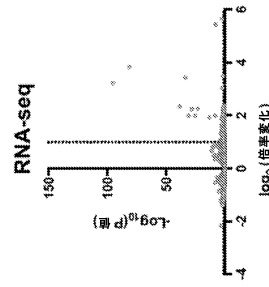
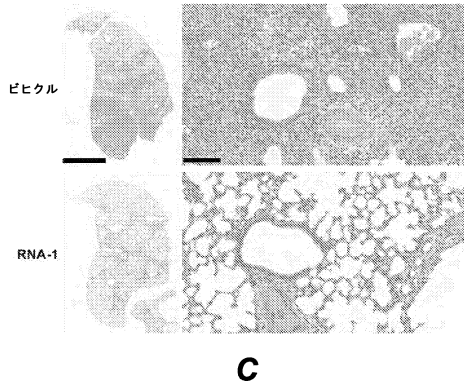


【 図 2 9 】



B

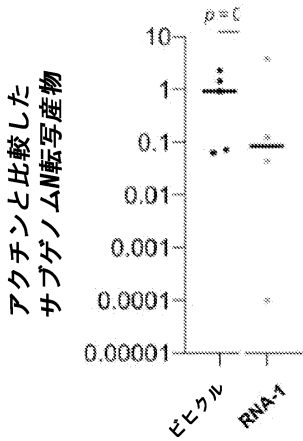
10



A

20

【 図 3 0 】



30

40

50

【誤訳訂正書】

【提出日】令和5年6月21日(2023.6.21)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】図面

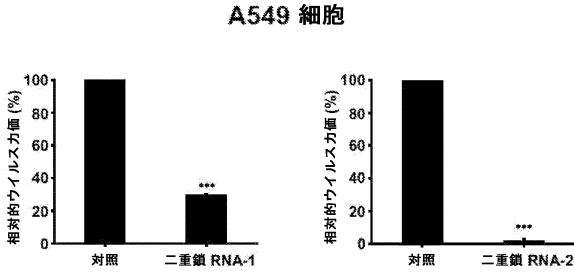
【訂正対象項目名】全図

【訂正方法】変更

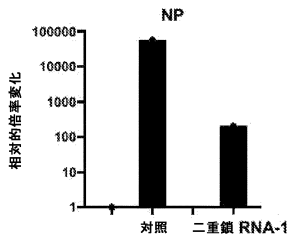
【訂正の内容】

【図面】

【図1】

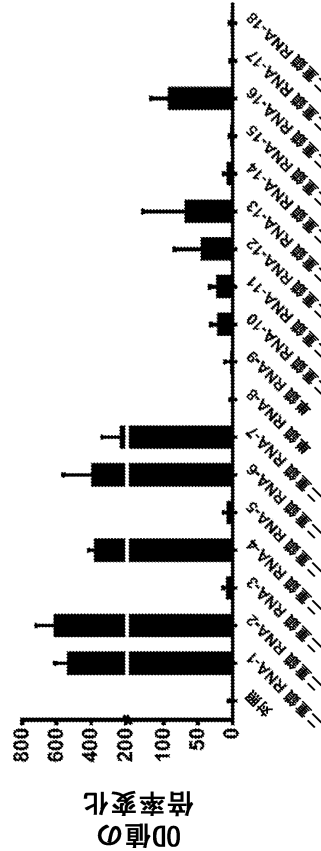


A



B

【図2】

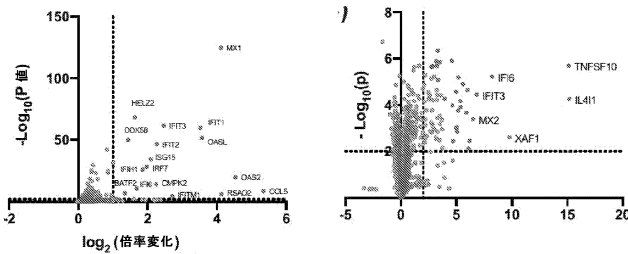


10

20

30

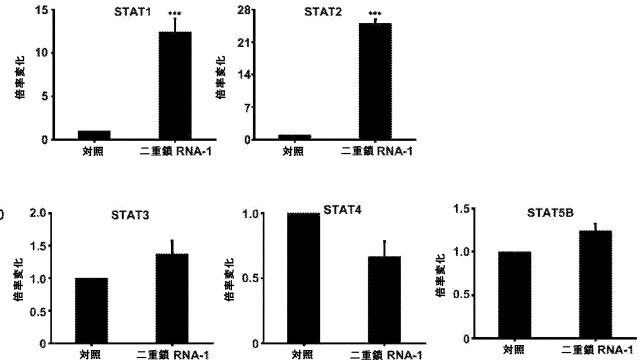
【図3】



A

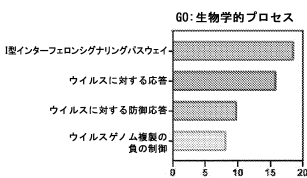
B

【図4】

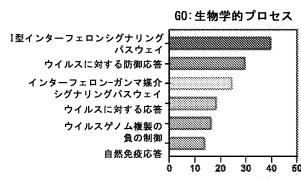


40

50

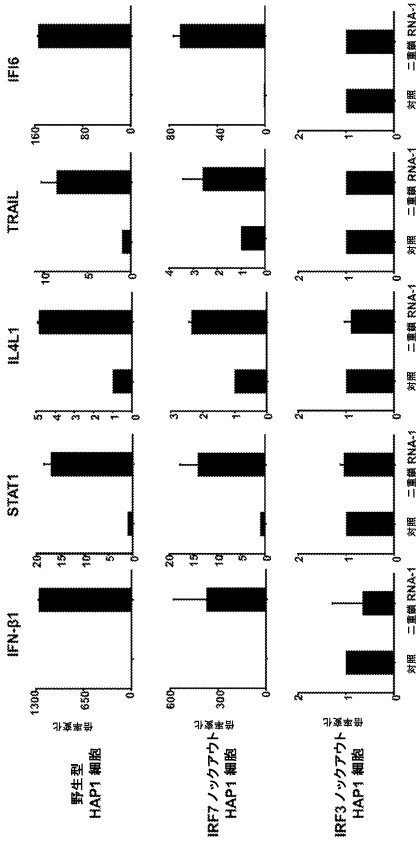


B

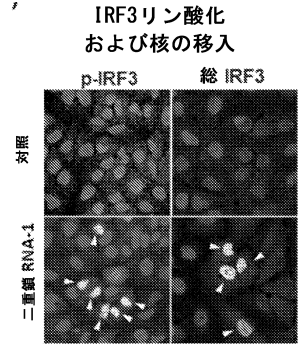
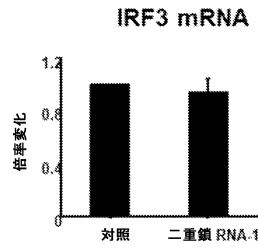


D

【 図 5 】



【 図 6 】



10

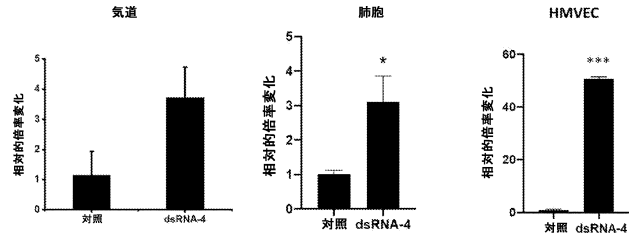
20

【 図 7 】

RNA ID	配列	備考
二重鎖 RNA-1	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	テンプレート1
二重鎖 RNA-2	C U G A U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	テンプレート2
二重鎖 RNA-3	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	3'に10ntの欠失
二重鎖 RNA-4	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	最初のAntを戻し、残りをシャッフル
二重鎖 RNA-5	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	5'に6ntの欠失
二重鎖 RNA-6	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	岡モチーフを戻し、残りをシャッフル
二重鎖 RNA-7	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	3'に6ntの欠失
単鎖 RNA-8	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	一本鎖 #1
単鎖 RNA-9	G G A C U A C U G A C C A C U G G C U A G U U C A C C U U T	一本鎖 #2

表1. さまざまなバージョンのRNA

【 図 8 】

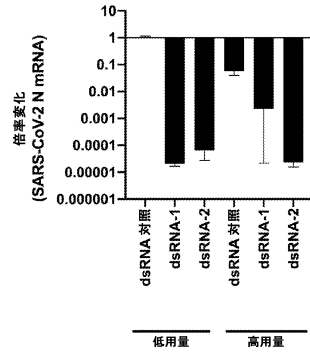
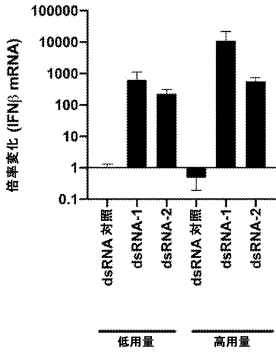


30

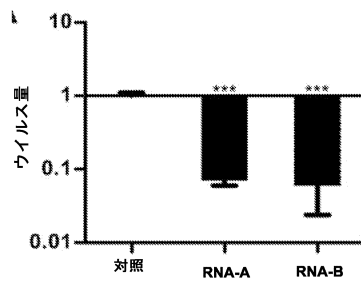
40

50

【図 9】

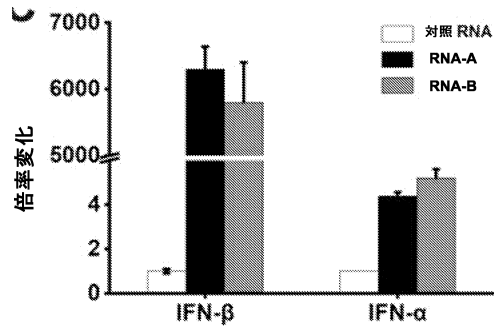


【図 10 - 1】



A

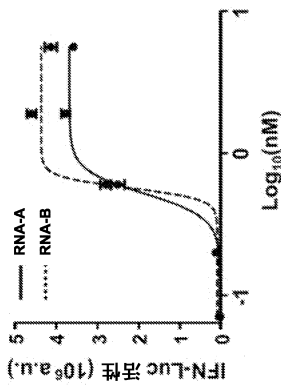
10



B

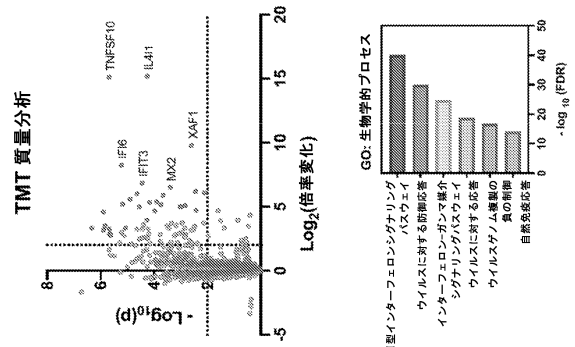
20

【図 10 - 2】



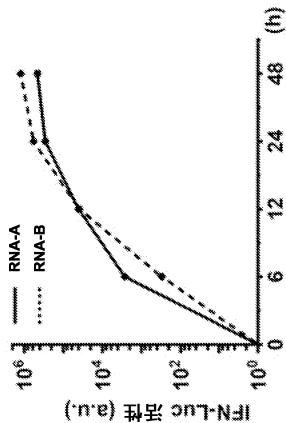
D

【図 11】

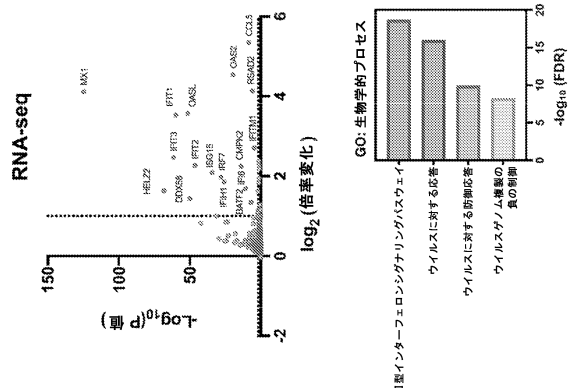


B

30



C

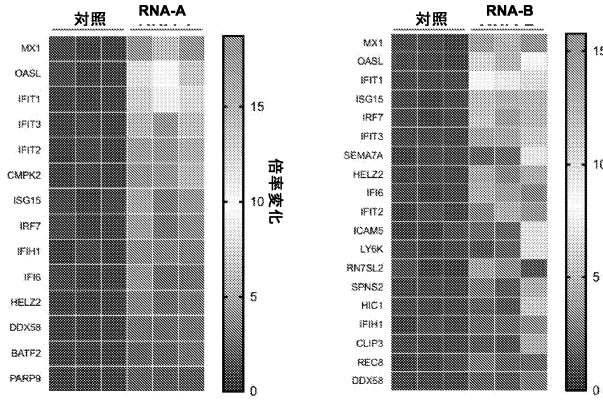


A

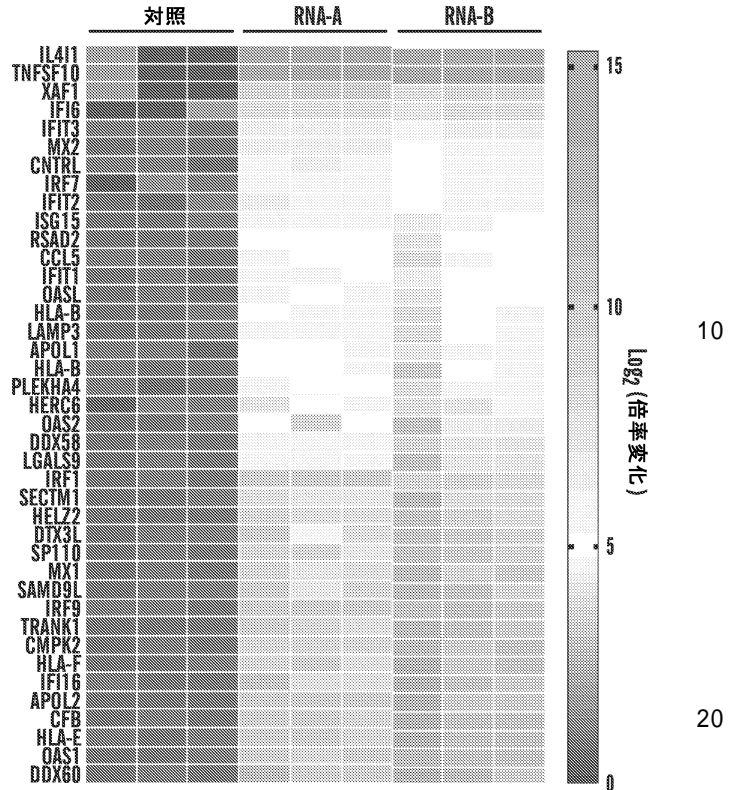
40

50

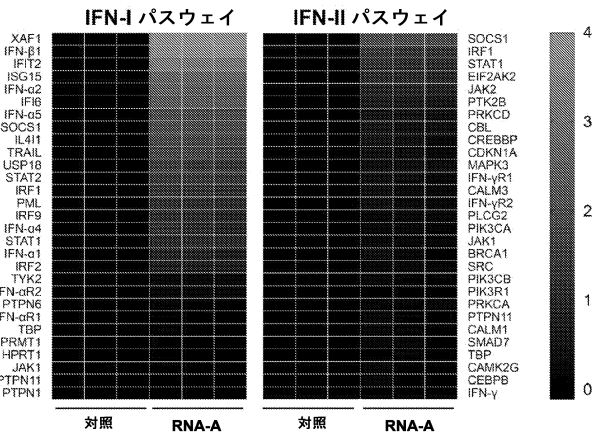
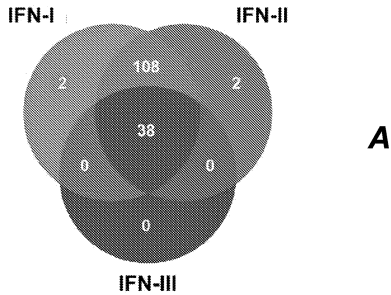
【 1 2 A 】



【 1 2 B 】



【 1 3 】



【 1 4 】

RNA ID	配列 (5'-3')	備考	活性
RNA-A	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	DG95を標的とするsiRNA	***
RNA-B	GGAGGUVACGGAAUCUAACAUAUA	LIN00261を標的とするsiRNA	***
RNA-C	CGGACAUACGUCGCGCAUUUAUGAGG	両モチーフを標的、残りをシャッフル	***
RNA-D	CGGACAUUCGUCGCGCAUUUAUGAGG	最初の4ntを標的、残りをシャッフル	***
RNA-E	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GG」を「GC」に変え、「GUGA」をシャッフル	-
RNA-F	UGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	5'に4ntの欠失	-
RNA-G	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GG」なし	-
RNA-H	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GG」→「CC」	-
RNA-I	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GUGA」をシャッフル	-
RNA-J	UGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GUG」をシャッフル	+
RNA-K	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	「GU」をシャッフル	**
RNA-L	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUAGII	3'に4ntの欠失	***
RNA-M	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUAGI	3'に7ntの欠失	**
RNA-N	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUAG	3'に8ntの欠失	-
RNA-O	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUAGI	3'に9ntの欠失	-
RNA-P	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUAGI	3'に10ntの欠失	-
RNA-Q	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	単鎖センス鎖	-
RNA-R	CGGAGUGACACGUGGCGUAGUUCACCGII	単鎖アンチセンス鎖	-

B

10

20

30

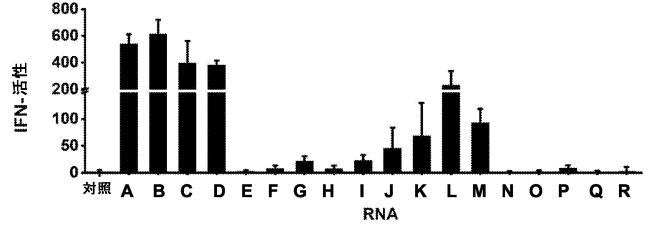
40

50

【 図 1 5 】

特徴	シグナリングパスウェイ	サイトカイン
モチーフ・センス鎖: 5'-CUGA-3' アンチセンス鎖: 3'-GGGAGU-5' RNA二重鎖の最小長: 20 bp	RIG-I	IFN-ベータ
二本鎖 RNA	ToI様受容体 (TLR)8	IFN-アルファ
5'端にニリン酸または-OH	TLR7/8	IFN-アルファ
5'-オナーハンギング端	TLR7/8	IFN-アルファ, TNF-アルファ
5'-UGUGU3'モチーフ	TLR7	IFN-アルファ, IL-6, TNF-アルファ
5'-GUCCUUGAA3'モチーフ	RIG-I	I型 IFN, p56
GUまたはAURリッチ	RIG-I	IFN-アルファ, IFN-ベータ
ウラシルリピート	TLR7/8	IFN-アルファ, TNF-アルファ
平滑末端 dsRNA	MDA5/TLR3	I型 IFN
5'-三リン酸: 5'-ニリン酸	TLR7	I型 IFN
マイクロRNA様 siRNA		
長い dsRNA		
一本鎖 (ss)RNA		

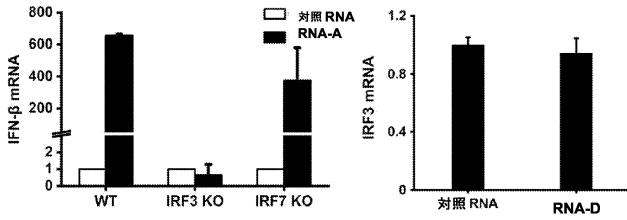
【 図 1 6 】



10

20

【 図 1 7 - 1 】

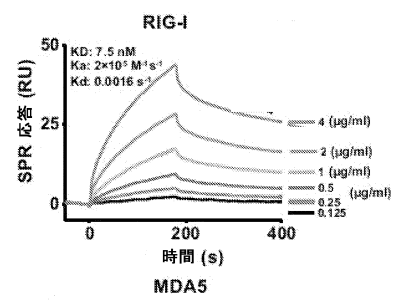


A

B

30

【 図 1 7 - 2 】

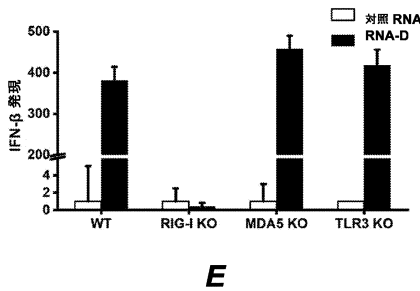


MDA5

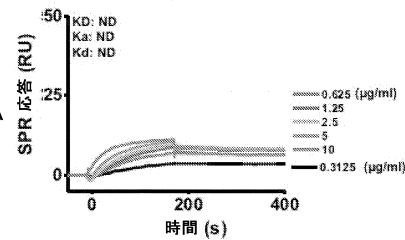
40



C



E

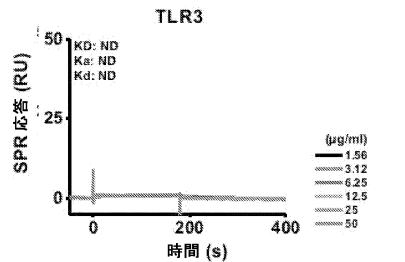


TLR3

50



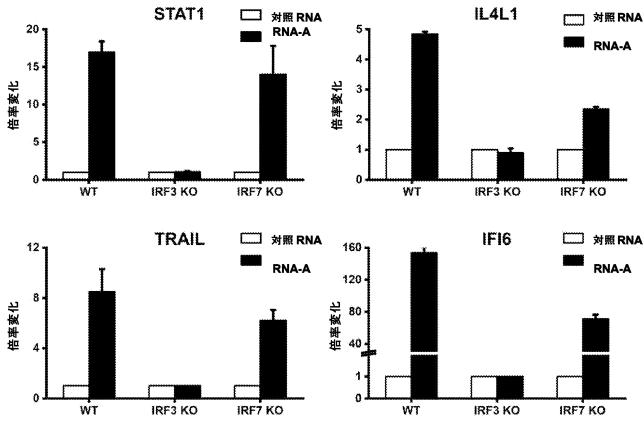
D



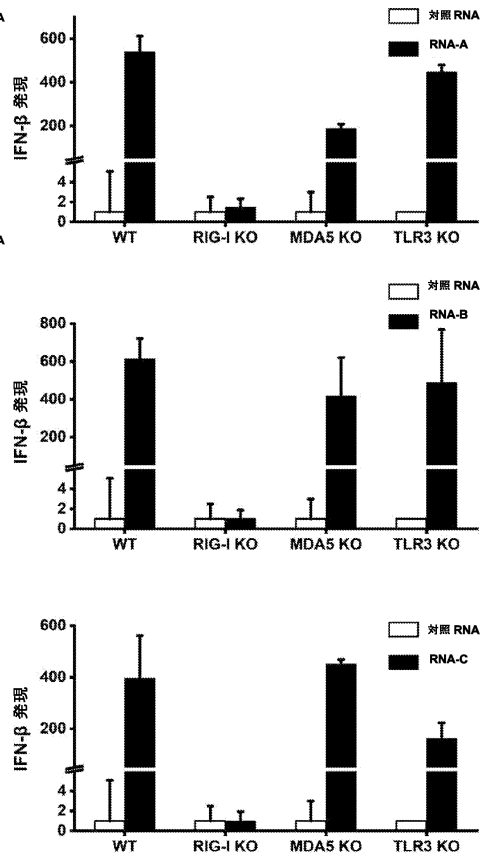
F

50

【 図 18 】



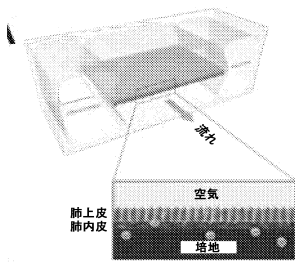
【 図 19 】



10

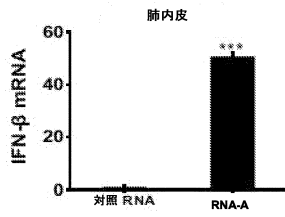
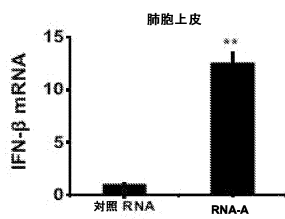
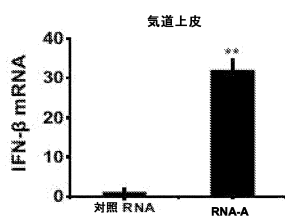
20

【 図 20 - 1 】

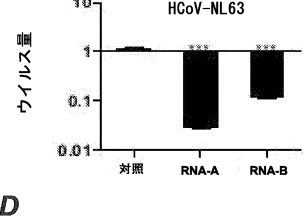
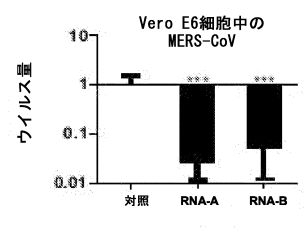
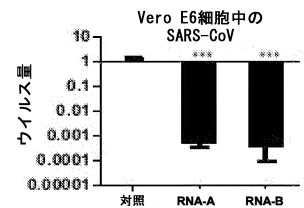
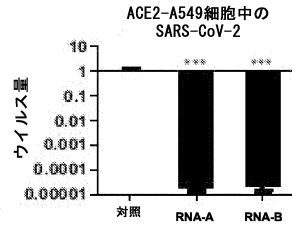
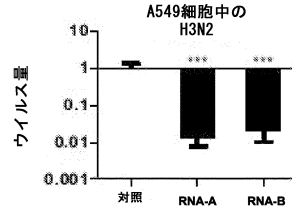


A

【 図 20 - 2 】



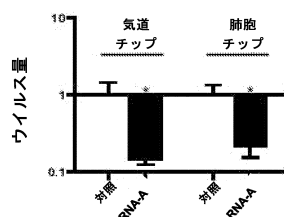
B



D

30

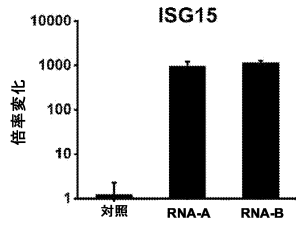
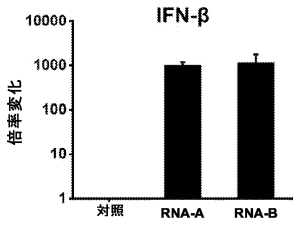
40



C

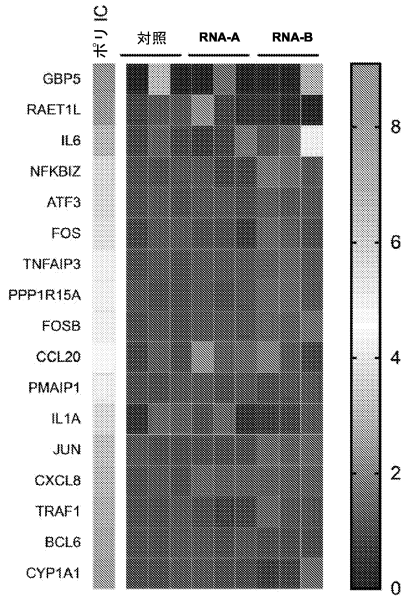
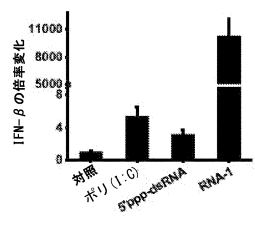
50

【 図 2 1 】



【 図 2 2 】

A



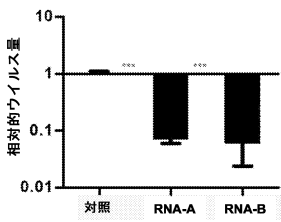
B

10

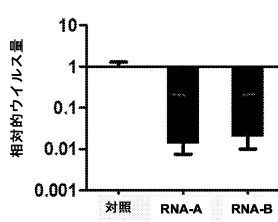
20

【 図 2 3 】

インフルエンザ H1N1

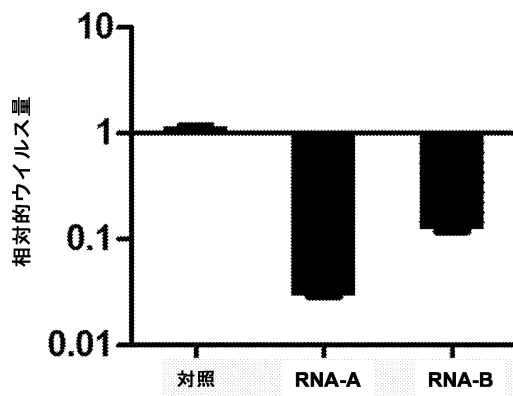


インフルエンザ H3N2



【 図 2 4 】

HCoV-NL63 コロナウイルス



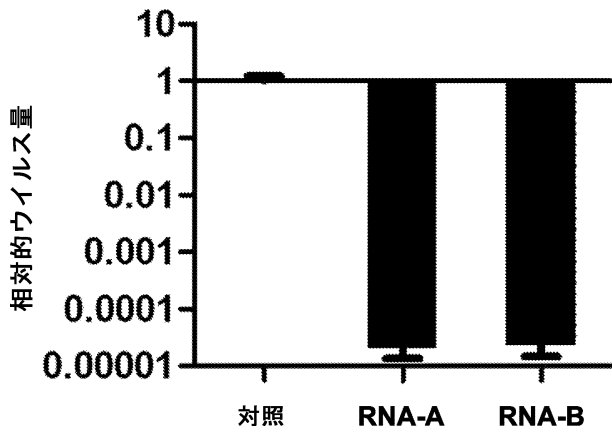
30

40

50

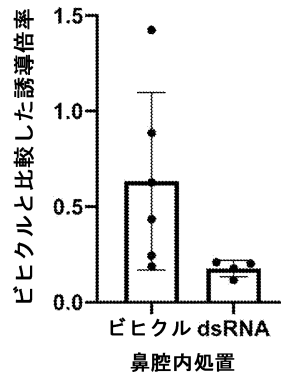
【 図 2 5 】

SARS-CoV-2 コロナウイルス



【 図 2 6 】

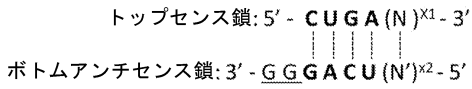
TRS-N vRNA qPCR



10

【 図 2 7 】

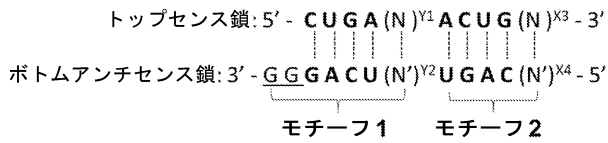
モチーフ1



ここで、Nは、G、A、C、U、Tのいずれかである。
 N' はトップ鎖の対応するNヌクレオチドに対して相補的である。

X1 は ≥ 14
 X2 は ≥ 14

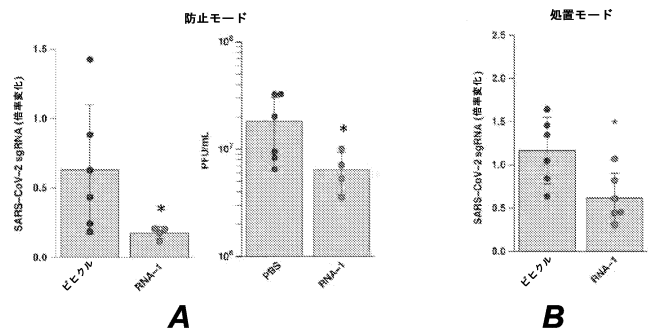
モチーフ2を含むモチーフ1



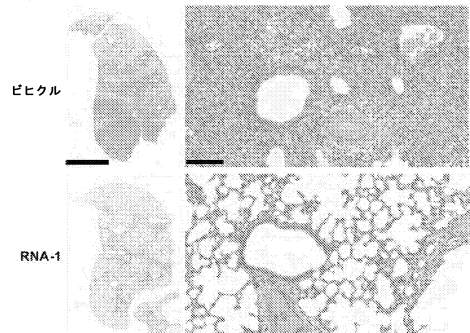
ここで、Nは、G、A、C、U、Tのいずれかである。
 N' はトップ鎖の対応するNヌクレオチドに対して相補的である。

X3 は ≥ 6
 X4 は ≥ 6
 Y1 は ≥ 4
 Y2 は ≥ 4

【 図 2 8 】



20



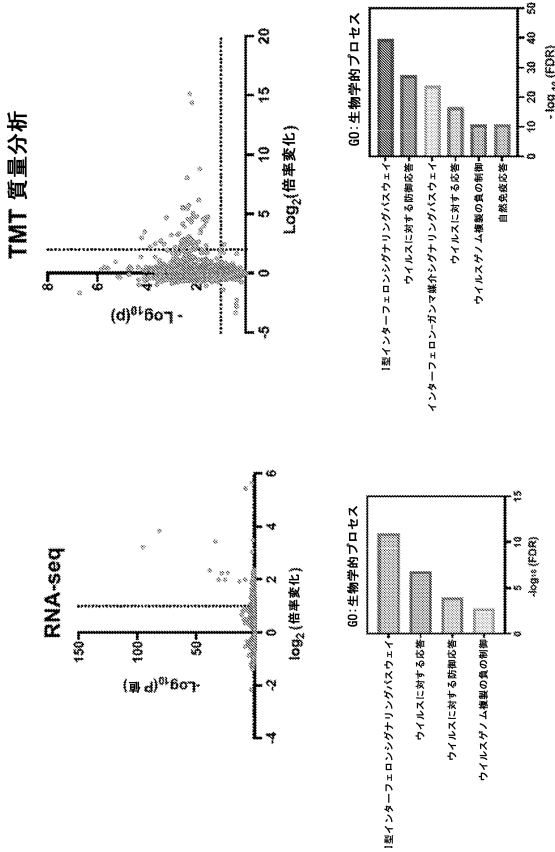
30

C

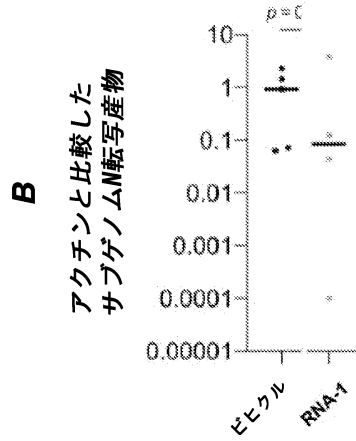
40

50

【 図 29 】



【 図 30 】



B

A

10

20

【 誤訳訂正 2 】

【 訂正対象書類名 】 明細書

【 訂正対象項目名 】 0 2 4 5

【 訂正方法 】 変更

【 訂正の内容 】

30

【 0 2 4 5 】

免疫刺激性を担うモチーフ-1中の最小配列を決定するために、モチーフ-1のヌクレオチドを欠失させるかまたは置き換えることによって、変異体を作製した。アンチセンス鎖の3'端にある2つのオーバーハング塩基GGの欠失または置換は、それらの免疫刺激性を消失させた（RNA-Gおよび-H対-A）。オーバーハング塩基GGを保ちつつ、モチーフ-1の残りの塩基を変化させた場合も、免疫刺激性は著しく減少するか（RNA-Jおよび-K）、さらには完全に消失した（RNA-I対-A）。これらのデータにより、モチーフ-1はIFN-I誘導にとって必要であることと、その免疫刺激効力は配列の置換または欠失に鋭敏であることが確認される。RNA-Aの3'端から塩基を漸次切り詰めることによって、モチーフ-1媒介IFN産生に対するRNAの長さの効果を、さらに評価した。除去する塩基の数を増やすと、免疫刺激性は徐々に減少し（RNA-Lおよび-M対-A）、RNA-Aの3'端から8塩基以上を除去すると活性は完全に失われた（RNA-N、-O、および-P）。それゆえに、INF誘導に必要とされるこの新規形態の免疫刺激性RNAの最小長は、20塩基（アンチセンス鎖）である。加えて、RNA-Aのセンス鎖一本だけまたはアンチセンス鎖一本だけではIFN産生を誘導しなかったため（RNA-Qおよび-R）、その免疫刺激性には二本鎖RNA構造が必要であることが示された。化学合成されたRNAは5'-ヒドロキシル基を含有するので、5'-リン酸の付加がインターフェロン誘導活性に影響を及ぼすかどうかを試験した。これを探究することは重要である。なぜなら、5'-リン酸は宿主RNA中に存在し、それが5'-二または三リン酸を含有する二重鎖RNAによって誘導されるRIG-IシグナリングによるIFN-Iの活性化を能動的に抑制しているからである。しかし、5'-

40

50

リン酸を含有するRNA-1は、qPCRで解析した場合、5'-ヒドロキシルを含有するRNA-1と類似するレベルまで、IFN- γ 発現を誘導することがわかったことから（図2B）、これらの短い二重鎖RNAの5'-リン酸はそれらの効果には必要ではないものの、それを妨害するものでもないことが示唆された。

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年6月21日(2023.6.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

定義:

本明細書にいう「オリゴヌクレオチド二重鎖」は、生理学的に妥当な温度およびイオン強度の条件下で相補的塩基対の形成によってハイブリダイズすることで二重鎖を形成する、2本の別個のリボ核酸鎖を包含する。オリゴヌクレオチド二重鎖という用語は、同様の条件下で二重鎖を形成するためのハイブリダイゼーションを可能にする自己相補的配列を含む一本鎖も包含する。一本鎖から形成された二重鎖は、二重鎖の一方の鎖から他方の鎖への移行部においてハイブリダイズしていない数個のヌクレオチドで自分自身に折り返すヘアピン構造を含むか、またはハイブリダイズしている配列の間に、より明白なハイブリダイズしていないヌクレオチドのループを含む、ヘアピンループ構造もしくはステムループ構造を含むことができる。本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、一本鎖オーバーハング（一般的にはGGまたはその修飾型）を含まずに20ヌクレオチド以上の二重鎖部分長（duplexed length）を有するだろう。5'末端ーリン酸-CUGA-3' (SEQ ID NO:1) 二重鎖状配列（duplexed sequence）を含めて20ヌクレオチドという二重鎖状配列の最小長は、本明細書記載のオリゴヌクレオチド二重鎖の免疫刺激活性のために決定されたものであるが、残りの最小16ヌクレオチド長の二重鎖内には、例えば残り16ヌクレオチド中の少なくとも11ヌクレオチドは相補的でなければならないという形で、ある程度のミスマッチを許容することができ、例えば16ヌクレオチド中の少なくとも11ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも12ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも13ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも14ヌクレオチド、16ヌクレオチド中の少なくとも15ヌクレオチド、または少なくとも16個である残りのヌクレオチドのすべてが、相補的であることが考えられる。ミスマッチが1つまたは複数ある場合、ミスマッチは、それが二重鎖を形成する20ヌクレオチドの配列の内部に位置するのであれば、すなわち両端のヌクレオチドのストレッチが完全に相補的であるのであれば、より良く許容されるだろうと予期され、また、配列内にミスマッチが2つ以上ある場合、連続するミスマッチはあまり好ましくないだろうと予期される。ミスマッチが1つまたは複数ある場合、残りのヌクレオチド中のGC含量が比較的高ければ、それは、ミスマッチの何らかの相対的不利益を相殺するのに役立つとも考えられる。同じ原則は、二重鎖領域が20ヌクレオチド長より長い場合のミスマッチにも、当てはまるだろう。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド二重鎖は5'ーリン酸基を含む」という表現は、ーリン酸が、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖によって含まれる配列5'-CUGA-3' (SEQ ID NO:1) の5'末端のC上またはその類似体もしくは修飾型上にあることを意味する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

10

20

30

40

50

【補正の内容】

【0081】

【図1】図1A~1Bは、その処置によりインフルエンザウイルス感染が減少した、二重鎖RNAの発見を表す。(図1A) A549細胞に二重鎖RNA (IDT Inc) をトランスフェクトした。24時間後に、細胞をインフルエンザA/WSN/33 (H1N1) ウイルス (MOI = 0.01) に感染させた。プラーク形成アッセイによるウイルス力価検出のために、上清を収集した。スクランブルDisRNAを対照として使用した。(図1B) ヒト気道チップに二重鎖RNA1 (IDT Inc) をトランスフェクトした。24時間後に、細胞をインフルエンザA/WSN/33 (H1N1) ウイルス (MOI = 0.01) に感染させた。RT-qPCRによるウイルスNP遺伝子検出のために試料を収集した。スクランブル二重鎖RNAを対照として使用した。

10

【図2】図2は、共通する配列を含有する異なるバージョンのRNAがA549細胞におけるIRF-IFNパスウェイを増加させることを表す。A549 Dual (商標) (InvivoGen (登録商標)) 細胞 (10,000細胞/ウェル) を96ウェルプレートに播種し、48時間にわたって表示のRNAをトランスフェクトした。次に、QUANTI-Luc (商標) キットを使用し、製造者の説明書に従って、IRF-IFNパスウェイの活性化レベルを表すルシフェラーゼ活性を測定した。スクランブルRNA群のOD値を1に設定した。各試料につき6回の反復。

【図3】図3A~3Dは、二重鎖RNA1がI型インターフェロン (IFN-1) パスウェイの正の制御物質であることを示す。(図3A) 二重鎖RNA1による処置後のRNA-seqからの差次的発現遺伝子 (DEG) のボルカノプロット。(図3B) DEGに関するGOエンリッチメント解析。(図3C) 二重鎖RNA1による処置後のTMT質量分析からの差次的発現タンパク質のボルカノプロット。(図3D) 差次的発現タンパク質のGOエンリッチメント解析。

20

【図4】図4は、二重鎖RNA-1が、IFNパスウェイに特異的なSTAT1およびSTAT2を特異的に増加させることを示す。A549細胞に二重鎖RNA-1をトランスフェクトし、48時間培養してから、表示した遺伝子のqPCRによる検出のために細胞試料を収集した。

【図5】図5は、IRF3のノックアウトが、IFN-1パスウェイに対する二重鎖RNA1の効果を消失させたことを示す。DGCR5をノックダウンするために、野生型HAP1細胞、IRF7ノックアウトHAP1細胞、またはIRF3ノックアウトHAP1細胞に、二重鎖RNA1 (IDT Inc) をトランスフェクトした。48時間後に、STAT1、IL4L1、TRAIL、IFFI6およびIFN-1を含むIFN-1パスウェイの遺伝子の、RT-qPCRによる検出のために、細胞を収集した。スクランブル二重鎖RNAを対照として使用した。

30

【図6】図6は、二重鎖RNA-1がIRF3のリン酸化に影響を及ぼすことによってIFN産生を誘導することを示す。A549細胞に二重鎖RNA-1をトランスフェクトし、48時間培養してから、qPCRによってIRF3のmRNAレベルを検出するか、または免疫蛍光染色によってIRF3のリン酸化レベルを検出した。

【図7】図7は、実施例1において検討したRNAオリゴヌクレオチドの表である。図7は、表示する順にそれぞれ、SEQ ID NO: 3~18を開示する。

【図8】図8は、dsRNA-4がIFN- β 産生を増加させることを表す。分化したヒト初代気道上皮細胞、ヒト初代肺胞上皮細胞またはヒト肺初代微小血管内皮細胞 (HMVEC) に、陰性対照 (Negative control: NC) またはdsRNA-4をトランスフェクトした。48時間後に、IFN- β 産生を測定するためにqPCRを行った。

40

【図9】図9は、dsRNA-1およびdsRNA-2が高レベルのIFN- β を誘導し、天然SARS-CoV-2を約 10^4 倍阻害したことを表す。ACE2発現A549細胞に表示のdsRNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、ACE2-A549をSARS-CoV-2にMOI 0.05で48時間、感染させた。細胞をTrizol (商標) に採取し、Zymo RNAミニプレップキット (商標) を使用し、製造者のプロトコールに従って、全RNAを単離してDNase-I処理した。表示の遺伝子のレベルを検出するために、qPCRを行った。低用量dsRNAの遺伝子レベルを1に設定した。

【図10-1】図10A~10Dは新規免疫刺激性RNAの評価を示す。図10Aは、A549細胞にRNA-A、RNA-B、またはスクランブル化二重鎖RNA対照をトランスフェクトし、2

50

4時間後に、インフルエンザA/WSN/33(H1N1)ウイルス(MOI=0.01)に感染させたことを示す。感染48時間後に収集した培地上清中の子孫ウイルスの力価を、プラーク形成単位(PFU)を定量することによって決定した。データは、対照RNAで処置した細胞において測定されるウイルス感染に対する%として示されている(示されているデータは平均±標準偏差である;N=3;***、P<0.001)。図10Bは、A549細胞にRNA-A、RNA-Bまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトした48時間後の、細胞のIFN- α およびIFN- β のRNAレベルのqPCR解析を示す(N=3)。

【図10-2】図10A~10Dは新規免疫刺激性RNAの評価を示す。図10Cは、RNA-A、RNA-BまたはスクランブルRNA対照をトランスフェクトした野生型A549-Dual細胞における、Quanti-Lucアッセイを使って測定した、IFN産生のRNA媒介産生キネティクスを示す。スクランブル化RNA対照をトランスフェクトした細胞からのOD値を、バックグラウンドとして差し引いた(N=6)。図10Dは、トランスフェクションの48時間後に測定した、スクランブル化RNA対照と比較した、A549-Dual細胞における、RNA-AおよびRNA-BによるIFNの用量依存的誘導を表す(対照OD値をバックグラウンドとして差し引いた;N=6)。

【図11】図11Aおよび11Bは、RNA-seqおよびTMT質量分析によるRNA-Bの効果のプロファイリングを表す。A549細胞にRNA-Bまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間時点で細胞溶解物を収集し、RNA-seq(図11A)またはTMT質量分析(図11B)によって解析した。差次的発現遺伝子(DEG)または差次的発現タンパク質をボルカノプロットに示し(上)、DEGについてGOエンリッチメント解析を行った(下)(N=3)。差次的発現タンパク質についてプロット(上)およびGOエンリッチメント解析(下)を行った(N=3)。

【図12A】図12Aおよび12Bは、IFNパスウェイ関連遺伝子レベルに対する免疫刺激性RNAの効果を示すヒートマップを表す。図1Bおよび図11に示すRNA-seqからのDEG(図12A)およびTMT質量分析からの差次的発現タンパク質(図12B)を、ここではヒートマップとして表す(スクランブル化RNA対象の遺伝子レベルを1に設定した;N=3)。

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図13】図13A~13Bは、I型インターフェロンパスウェイに関連するRNA誘導遺伝子発現を表す。図13Aは、RNA-AによるTMT質量分析からの差次的発現ISGが、I型またはII型インターフェロン刺激遺伝子に属することを示すベン図を表す。図13Bは、RNA-IがI型インターフェロンパスウェイを優先的に活性化することを示すqPCR結果のヒートマップを示す。A549細胞にRNA-Aまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトし、48時間時点で収集し、qPCRによって解析した(発現レベルをGAPDHに対して正規化した;RNA対照によって誘導される遺伝子レベルを1に設定した;N=3)。

【図14】図14は、実施例2~5において検討したRNAオリゴヌクレオチド配列の要約を示す。図14は、表示する順にそれぞれ、SEQ ID NO: 13~14、5~6、19~20、9~10、21~34、15~16、35~40、7~8、および17~18を開示する。

【図15】図15は免疫刺激性RNAの特徴を要約している。図15は、SEQ ID NO: 1として「5'-CUGA-3'」を開示する。

【図16】図16は、図14に記した異なるRNAの免疫刺激活性の比較を示す。A549-Dual細胞に表示の二重鎖RNAを48時間トランスフェクトし、次に、ルシフェラーゼレポーター活性を定量することによって、IFNパスウェイの活性化を測定した。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている(N=6)。

【図17-1】図17A~17Fは、免疫刺激性RNAがRIG-I-IRF3パスウェイによってIFN- α 産生を誘導することを表す。図17Aは、野生型(WT)HAP1細胞、IRF3ノックアウトHAP1細胞またはIRF7ノックアウトHAP1細胞にRNA-Aまたはスクランブル化RNA対照を48時間トランスフェクトし、qPCRによってIFN- α mRNAレベルを定量したことを示す。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている(N=3)。IRF3ノックダウンがIFN- α 応答を完全に消失させたことに注目されたい。図17Bは、

トランスフェクションの48時間後にqPCRによって決定された、免疫刺激性RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照がトランスフェクトされたA549細胞において測定されるIRF3 mRNAレベルを示す(データは対照RNAに対する倍率変化として示されている;N=3)。図17Cは、RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトしたA549細胞において、ウェスタンブロット解析による検出でトランスフェクションの48時間後に検出された、総IRF3タンパク質およびリン酸化IRF3を示す(GAPDHをローディング対照として使用した)。図17Dは、RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照がトランスフェクトされたA549細胞における、トランスフェクション48時間後の、リン酸化IRF3の分布を示す免疫蛍光顕微鏡像を示す(矢じり、リン酸化IRF3を発現する核。図17Eは、野生型(WT)A549-Dual細胞、RIG-IノックアウトA549-Dual細胞、MDA5ノックアウトA549-Dual細胞またはTLR3ノックアウトA549細胞に、免疫刺激性RNA-Dまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間後に、Quanti-LucアッセイまたはqPCRを使ってIFN- γ 発現レベルを定量したことを示す(データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている;N=6)。RIG-Iノックアウトが免疫刺激性RNAのIFN- γ 誘導能力を消失させたことに注目されたい。

【図17-2】図17A~17Fは、免疫刺激性RNAがRIG-I-IRF3パスウェイによってIFN- γ 産生を誘導することを表す。図17F:細胞RNAセンサー(RIG-I、MDA5およびTLR3)とストレプトアビジン(SA)センサーチップ上に固定化されたRNA-1との間の結合アフィニティのSPR特性解析。平衡解離定数(KD)、会合速度定数(Ka)および解離速度定数(Kd)をグラフ上に記す。

【図18】図18は、IRF3ノックアウトが免疫刺激性RNAのIFN- γ パスウェイ関連遺伝子誘導能力を消失させたことを示す。野生型(WT)HAP1細胞、IRF3ノックアウトHAP1細胞またはIRF7ノックアウトHAP1細胞にRNA-Aまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後にqPCRによって、STAT1、IL4L1、TRAILおよびIFI6 mRNAレベルを定量した。データはRNA対照に対する倍率変化として表されている(N=3)。

【図19】図19は、RIG-IノックアウトがIFN- γ に対する免疫刺激性RNAの誘導効果を消失させたことを表す。野生型(WT)A549-Dual細胞、RIG-IノックアウトA549-Dual細胞、MDA5ノックアウトA549-Dual細胞またはTLR3ノックアウトA549細胞にRNA-A、RNA-B、RNA-Cまたはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後に、WT、RIG-I KOおよびMDA5 KO A549-Dual細胞ではQuanti-Lucアッセイによって、TLR3 KO A549細胞ではqPCRによって、IFN- γ mRNAレベルを検出した。データはスクランブル化RNA対照に対する倍率変化として示されている(N=6)。

【図20-1】図20A~20Dは、免疫刺激性RNAが、臓器チップ中の分化したヒト肺上皮および内皮細胞において、IFN- γ 産生を誘導し、インフルエンザH3N2、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoVおよびHCoV-NL63による感染の広域スペクトル阻害を呈することを示す。図20A:ヒト肺の生理機能および病態生理を忠実に再現するヒト肺オンチップ(Lung-on-Chip)の横断面の概略図。図20B:チップの両チャネルを通じた灌流によってヒト肺気道および肺胞チップにRNA-1またはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトし、48時間後に、qPCRによるIFN- γ mRNAの検出のために上皮細胞および内皮細胞を収集した(データはRNA対照に対する倍率変化として表されている;N=3; *、 $p < 0.05$; ***、 $p < 0.001$)。図20C:インフルエンザA/HK/8/68(H3N2)(MOI=0.1)に感染させたヒト肺気道チップまたはヒト肺胞チップにおけるRNA-1またはスクランブル化対照による処置の効果。感染48時間後の溶解物においてウイルスNP遺伝子をqPCRで定量することによって、ウイルス量を決定した。結果はRNA対照に対する倍率変化として示されている;N=3; *、 $p < 0.05$ 。

【図20-2】図20A~20Dは、免疫刺激性RNAが、臓器チップ中の分化したヒト肺上皮および内皮細胞において、IFN- γ 産生を誘導し、インフルエンザH3N2、SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoVおよびHCoV-NL63による感染の広域スペクトル阻害を

呈することを示す。図20D:免疫刺激性二重鎖RNAによる処置は、SARS-CoV-2を含む複数の潜在的パンデミックウイルスの強力な阻害をもたらした。表示の細胞を、RNA-1、RNA-2またはスクランブル化対照で処置し、インフルエンザA/HK/8/68 (H3N2) (MOI=0.1)、SARS-CoV-2 (MOI=0.05)、SARS-CoV-1 (MOI=0.01)、MERS-CoV (MOI=0.01) およびHCoV-NL63 (MOI=0.002) に、それぞれ感染させた。感染の48時間後に、細胞溶解物において、H3N2についてはウイルスNP遺伝子、SARS-CoV-2およびHCoV-NL63についてはN遺伝子をqPCRで定量し、ブランクアッセイによってウイルス力価を定量することにより、ウイルス量を決定した。結果はすべて、RNA対照に対する倍率変化として示されている;N=3; *、p<0.05; ***、p<0.001。

【図21】図21は、ACE2を過剰発現するA549細胞におけるIFNの免疫刺激性RNA媒介産生を表す。RNA-A、RNA-Bまたはスクランブル化dsRNA対照をトランスフェクトした細胞におけるIFN- とISG15のレベルを、トランスフェクションの48時間後に、qPCRによって検出した。スクランブル化dsRNA対照によって誘導されたIFN- またはISG15のレベルを1に設定した。データは対照に対する倍率変化として示されている (N=3)。

【図22】図22Aおよび図22Bは、免疫刺激性RNAはポリ (I:C) および5'ppp-dsRNAよりも強力なIFN- 誘導物質であるが、炎症誘発性サイトカインの産生は誘導しないことを表す。図22A:トランスフェクション48時間後のA549細胞における、同じ濃度 (2.8 μg/mL) での、IFN- を誘導するRNA-1、ポリ (I:C) および5'ppp-dsRNAの力価の比較。データはスクランブルRNA対照に対する倍率変化として示されている (N=3)。図22B:トランスフェクション48時間後のA549細胞においてポリ (I:C) またはRNA-1およびRNA-2によって誘導される炎症性遺伝子の発現変化を比較するヒートマップ。

【図23】図23は、免疫刺激性RNAがヒト肺上皮細胞におけるインフルエンザ感染を阻害できることを示す。

【図24】図24は、免疫刺激性RNAがサル腎臓細胞における感冒コロナウイルス感染を阻害できることを表す。

【図25】図25は、ACE2を過剰発現するヒト肺上皮細胞における、SARS-CoV-2ウイルスの、RNA-AおよびRNA-Bによる阻害を表す。

【図26】図26は、免疫刺激性RNAがインビボでSARS-CoV2感染を阻害することを表す。-1日目、0日目および+1日目に投与された二重鎖dsRNAによるI型インターフェロンの誘導は、ハムスターにおけるウイルス量を有意に低減させるのに十分である。

【図27】図27は、本明細書記載の免疫刺激性RNA二重鎖のモチーフ1およびモチーフ2を含むモチーフ1を図解している。図27は、表示する順にそれぞれ、SEQ ID NO: 53~54および42~43を開示する。

【図28】図28A~28Cは、インビボでの天然SARS-CoV-2感染の阻害を表す。図28A:SARS-CoV-2 Nタンパク質をコードするサブゲノムRNAに関するqPCRによって (左; *、p=0.030)、またはブランクアッセイでウイルス力価を定量することによって (右; *、p=0.032)、1日後に測定された、SARS-CoV-2ウイルス (10²PFU) を鼻腔内投与する1日前、感染当日および感染1日後に鼻腔内に投与されるRNA-1 (PBS中20ug) で予防的に処置されたハムスターの肺における、ウイルス量の低減。図28B:SARS-CoV-2ウイルス (10³PFU) の鼻腔内投与の1日後から開始し、2日にわたって1日1回、鼻腔内にRNA-1 (20ug) を投与することによって産生され、1日後に、SARS-CoV-2 Nタンパク質をコードするサブゲノムRNAに関するqPCRによって測定された、ハムスターの肺におけるウイルス量の低減 (* p=0.01)。図28C:感染1日後から開始して、送達ビヒクルのみ (上) またはRNA-1を含有するビヒクル (下) で処置された、Bからの肺の低倍率 (左) および高倍率 (右) 組織H&E染色像 (左バー、2.5mm; 右バー、100 μm)。

【図29】図29Aおよび図29Bは、RNA-seqおよびTMT質量分析によるRNA-2の効果のプロファイリングを表す。A549細胞にRNA-2またはスクランブル化RNA対照をトランスフェクトした。48時間で細胞溶解物を収集し、RNA-seq (図29A) またはTMT質

10

20

30

40

50

量分析（図29B）によって解析した。差次的発現遺伝子（DEG）または差次的発現タンパク質をボルカノプロットに示し（上）、DEGについてGOエンリッチメント解析を行った（下）（N=3）。差次的発現タンパク質についてプロット（上）およびGOエンリッチメント解析（下）を行った（N=3）。

【図30】図30は、ピヒクル対照と比較した、RNA-1についてのサブゲノムN転写産物を表す。レベルはアクチンローディング対照との比較である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

免疫調節性オリゴヌクレオチド二重鎖組成物

本明細書において開示される免疫調節性オリゴヌクレオチド二重鎖は、5'末端配列5'-CUGA-3'（SEQ ID NO:1）が、その相補体5'-UCAG-3'と複合体を形成して、該相補体が3'GGオーバーハングを含むことを特徴とする。したがって、本免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、以下の配列を含む：

下線部-3'オーバーハング；

N = G、A、CもしくはUのいずれかまたはその修飾バージョン；

N' = Nに対する相補的塩基

太字-SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の相補的部分；

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

本明細書において開示される免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、二重鎖状のRNAを含み、5'-CUGA-3'（SEQ ID NO:1）上の5'-リン酸と、20ヌクレオチドの最小二重鎖部分長を有する（図27も参照されたい）。5'-リン酸-CUGA-3'（SEQ ID NO:1）配列の3'側にある二重鎖の配列構成はインターフェロン誘導にとって決定的ではない。N16は最小値である。しかし、N（および対応するN'相補配列）は、さらに長くてもよい。本明細書のどこか他の箇所を考察するように、二重鎖はある程度のミスマッチを許容できるが、ミスマッチはN₁₆:N'₁₆核酸塩基のうちの5個以下であるべきである。ミスマッチが存在する場合のミスマッチに関する一般則についても、本明細書のどこか他の箇所を考察する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

一態様において、二重鎖配列は、5'-リン酸-CUGA-3'（SEQ ID NO:1）配列中または5'-UCAGGG-3'配列中に1つまたは複数の修飾リボヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

トップ鎖 5' > 3'	5'-CUGAN ₁₆ -3'	SEQ ID NO:1
ボトム鎖 3' > 5'	3'-GGGACUN' ₁₆ -5'	SEQ ID NO:2

【手続補正 7】

5'-一リン酸-CUGAN₁₆ (SEQ ID NO: 41)

【補正対象書類名】明細書

3'-GGGACUN₁₆ (SEQ ID NO: 2)

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

別の態様において、二重鎖は、N₁₆配列もしくはN'₁₆配列中に、または二重鎖が20ヌクレオチドより長い場合には二重鎖中の他のどこかに、1つまたは複数の修飾リボヌクレオチドを含む。そのような修飾を含むRNAの、例えば翻訳を許す修飾は、本明細書記載の二重鎖との関連において、許容され、免疫刺激性/インターフェロン誘導活性を保つ可能性が高いだろうと考えられる。所与の二重鎖分子では、リボヌクレオチド5'-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1)のうち、4つすべてを含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上を修飾することができると考えられる。さらに、所与の二重鎖分子では、リボヌクレオチド5'-UCAGGG-3'のうち、6つすべてを含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上を修飾することができると考えられる。さらに、N₁₆配列またはN'₁₆配列は、1つまたは複数の核酸塩基またはリボース-リン酸エステル主鎖の修飾を含む、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、もしくは15個以上の、または最大ですべて、およびすべてを含むリボヌクレオチドへの修飾を含むことができると考えられる。同様に、N-N'二重鎖が16個を超えるリボヌクレオチドを含む場合は、それらの任意の1つまたはそれらの任意の組み合わせが、または最大でそれらのすべて(すべてを含む)が、核酸塩基またはリボース-リン酸エステル主鎖構造への1つまたは複数の修飾を含むことができる。

10

20

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

いくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、ヘアピン分子内二重鎖またはヘアピン-ループ分子内二重鎖の形態をとることができる。そのような態様では、5'末端配列と3'末端配列とが自己相補的であり、本明細書において開示される免疫刺激性二重鎖に共通する5'-N'₁₆UCAGGG-3' (SEQ ID NO: 2) 構造にハイブリダイズした5'-一リン酸-CUGAN₁₆ (SEQ ID NO: 41) を与える。

30

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、相補鎖が共有結合でつながれるように架橋される。そのような架橋は、例えば、本明細書において特定された末端の5'-CUGA'3' (SEQ ID NO: 1) 配列が、その活性コンフォメーションに、より良く保たれるように、改良された二重鎖安定性を提供することができる。いくつかの態様において、架橋部分は化学官能基であることができる。いくつかの態様において、該化学官能基は、アジド、アルキン、テトラジン、DBCO、チオール、アミン、カルボニル、カルボキシル基、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

40

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 1 0 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 0 8 】

いくつかの態様において、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖は、抗原をコードする配列に融合されるか、または抗原をコードする配列を他の形で含むことができる。そのような組成物は、本明細書記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチド二重鎖が共有する末端5'-ーリン酸-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1) および5'-UCAGGG-3'二重鎖/オーバーハング構造を与えるRNAに融合された、または該RNAとの複合体を形成した、抗原をコードする一本鎖RNA配列を含むだろう。細胞へのそのような組成物の導入は、適応免疫応答を刺激するための抗原の産生と、それと同時に起こるインターフェロン応答の刺激との両方をもたらすことができる。

10

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 2 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 2 1 】

(表 1) 二重鎖および単鎖RNA

20

RNA ID	SEQ ID NOs:	配列 5' > 3'
二重鎖 RNA-1	SEQ ID NO: 3	CUGAUGACACUGGG
	SEQ ID NO: 4	GGGACUACUGUGACCC
二重鎖 RNA-2	SEQ ID NO: 5	CUGAGGUUACUGAA
	SEQ ID NO: 6	GGGACUCCAAUGACUU
二重鎖 RNA-3	SEQ ID NO: 7	CUGAUGACACUGGG
	SEQ ID NO: 8	GGGACUACUGUGACCC
二重鎖 RNA-4	SEQ ID NO: 9	CUGACAUCGUCUCC
	SEQ ID NO: 51	GGGACUGUAGCAGAGC
二重鎖 RNA-5	SEQ ID NO: 11	ACACUGGGCUAGUUC
	SEQ ID NO: 12	ACUGUGACCGAUCAAC
二重鎖 RNA-6	SEQ ID NO: 13	CUGAUGACACUGGG
	SEQ ID NO: 14	GGGACUACUGUGACCC
二重鎖 RNA-7	SEQ ID NO: 15	CUGAUGACACUGGG
	SEQ ID NO: 16	GGGACUACUGUGACCC
単鎖 RNA 8	SEQ ID NO: 17	CUGAUGACACUGGGUA
単鎖 RNA 9	SEQ ID NO: 52	GGGACUACUGUGACCC

* 図7も参照されたい。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0236

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0236】

実施例2: I型インターフェロンを誘導する5'-リン酸RNAによるSARS-CoV-2、HCoV-NL63、およびインフルエンザの阻害

COVID-19危機により、SARS-CoV-2ウイルスならびに将来パンデミックの原因になりうる感染性の高い他のウイルス変異体による感染を阻害することができる治療薬の必要が明白になった。本明細書では、マイクロ流体ヒト臓器オンチップ (organ-on-a-chip) 内で成長させた高度に分化した初代肺気道、肺胞上皮および微小血管内皮を含む広範囲にわたる細胞において、I型インターフェロン (IFN- α)、特にIFN- α の産生を強力に誘導することによって、SARS-CoV-2、HCoV-NL63およびインフルエンザウイルス感染を阻害する、5'-リン酸を含有する新しい種類の免疫刺激性二重鎖RNAが提供される。これらのRNAは、公知の免疫刺激性RNAのいかなる配列特徴または構造特徴も持っておらず、その代わりに、ユニークな保存された配列モチーフ (センス鎖: 5'-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1)、アンチセンス鎖: 3'-GGGACU-5') と20塩基の最小長を、それらの免疫刺激活性のために必要とする。驚いたことに、このモチーフを含有するRNAは、5'-リン酸を含有しているにもかかわらず、RIG-I/IRF3パスウェイの活性化によって、IFN- α 産生を誘導する。この新しい種類の免疫刺激性RNAは、将来、COVID-19を含むウイルス感染およびパンデミック、ならびに異常なIFN- α 制御が関わる他の疾患のための、広域スペクトル予防薬または治療薬として有用であることが明らかになりうる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0243

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0243】

意外なことに、これらは異なる宿主遺伝子を標的とするように設計されたにもかかわらず、RNA-AとRNA-Bは2つの同一モチーフを、一つはその5'端に (モチーフ-1; センス鎖: 5'-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1)、アンチセンス鎖: 3'-GGGACU-5')、そしてもう一つは中央領域に (モチーフ-2; センス鎖: 5'-ACUG-3'、アンチセンス鎖: 3'-UGAC-5') 含有することが、配列アラインメントによって明らかになった (図14)。どちらのRNAもIFN- α の強力な誘導物質であったので、特定の理論に束縛されるものではないが、これらの共通モチーフがそれらの免疫刺激活性を媒介している可能性があると考えた。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0253

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0253】

考察

この研究では、5'-リン酸とユニークな配列モチーフとを含有する、新しい種類の短いオーバーハング付き二重鎖RNAにより、広域スペクトルのヒト細胞において、IFN- α シグナリングの強力な刺激が観察され、IFN- α の誘導はIFN- α との対比で特に効率が良かった。これは、5'-二または三リン酸を含有し、主としてIFN- α または他の炎症性サイトカインを誘導する、これまでに記載された免疫刺激性RNAとは対照的である (28)。IFN- α 誘導に対するこれらのRNAの配列と長さの効果を体系的に調べることにより、これら

の二重鎖RNAは、その免疫刺激活性を呈するために、保存されたオーバーハング付き免疫刺激性モチーフ（センス鎖:5'-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1)、アンチセンス鎖:3'-GGGACU-5')と5'-ーリン酸末端とに加えて、20塩基の最小長を必要とすることが決定された。5'-ーリン酸を持つ二重鎖RNAは5'-二または三リン酸を持つRNAによるIFNシグナリングを拮抗することが以前に示されているにもかかわらず(15、29)、これらの新規免疫刺激性RNAは、RIG-I/IRF3パスウェイを特異的に活性化することが、機序の探究によって明らかになった。加えて、観察されたRNA媒介IFN-I産生は、インフルエンザウイルスH1N1およびH3N2ならびにコロナウイルスHCoV-NL63およびSARS-CoV-2を含む複数のヒト呼吸器ウイルスによる感染の有意な阻害をもたらした。注目すべきことに、これらの新規免疫刺激性RNAは、SARS-CoV-2ウイルス量を10,000倍超低減した。これらの知見は、これらのIFN-I誘導性免疫刺激性RNAが、将来出現するかもしれない広範囲にわたる呼吸器ウイルスに対する潜在的な広域スペクトル予防を提供することに加えて、目下のCOVID-19パンデミックにも、新規な予防戦略または治療戦略を提供できることを示している。

10

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0254

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0254】

20

強力なIFN-誘導活性を持つ2つのRNAのオーバーラップしている配列に基づいて、保存されたオーバーハング付き免疫刺激性モチーフは、センス鎖5'-CUGA-3' (SEQ ID NO: 1)およびアンチセンス鎖3'-GGGACU-5'を、5'-ーリン酸と共に含有することが同定された。このモチーフを中央領域または3'端に含有するRNAでは免疫刺激活性が観察されなかったことから、免疫刺激には5'末端に位置することが必要であることが示唆される。この知見は、RIG-Iが二重鎖RNAの5'端を認識することを示す研究(15)と合致するが、本発明者らの免疫刺激性RNAは5'-ーリン酸をオーバーハングと共に含有し、RIG-Iの配列依存的活性化を呈するので、これらは、これまでに公知であった免疫刺激性RNAのどのカテゴリーにも属さず(図15)、したがって新しい種類の免疫刺激性RNAに相当する。

30

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0275

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0275】

天然SARS-CoV-2感染およびRNA処置による阻害

ACE2発現A549細胞(Brad Rosenbergから寄贈)に表示のRNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、トランスフェクトされたACE2-A549細胞にSARS-CoV-2(MOI=0.05)を48時間感染させた。細胞をTrizol(Invitrogen)に採取し、Zymo RNAミニプレップキットを使用し、製造者のプロトコールに従って、全RNAを単離し、DNAse-I処理した。KAPA SYBR FAST ONE-STEP qRT-PCRキット(Roche)を使用し、製造者の説明書に従って、Lightcycler 480 Instrument-II(Roche)で、-チュープリン(フォワード):

40

50

;リバーズ: 5'-GCCTGGACCACAAGTTTGAC-3' (SEQ ID NO: 44)
) およびSARS-CoV-2 N mRNA (フォワード) 3'-TGAAATTCTGGGAGCATGAC-5' (SEQ ID NO: 45)
 ;リバーズ: 5'-CTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAAC-3' (SEQ ID NO: 46)
) に関するqRT-PCRを行った。 3'-GGTCCACCAAACGTAATGCG-5' (SEQ ID NO: 47)

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0278

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0278】

10

肺RNAをフェノールクロロホルム抽出およびDNA-free (商標) DNA除去キット (Invitrogen) を使ったDNase処理によって抽出し、KAPA SYBR FAST qPCRマスターミックスキット (Kapa Biosystems) を使用し、LightCycler 480 Instrument II (Roche) で、サブゲノムヌクレオカプシド (N) RNA (sgRNA) およびアクチンに関するRT-qPCRを、以下のプライマーを使って行った:アクチンフォワードプライマー:

、アクチンリバーズプライマー: 5'-CCAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' (SEQ ID NO: 48)

、N sgRNAフォワードプライマー:

、N sgRNAリバーズプライマー:

。sgRNAをアクチン発現に対して正規化することによって、相対的sgRNAレベルを定量した。

20

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

202352752500001.app

5'-ATGGCTACGTACATGGCTGG-3' (SEQ ID NO: 49)

5'-CTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAAC-3' (SEQ ID NO: 50)

5'-GGTCCACCAAACGTAATGCG-3' (SEQ ID NO: 50)

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/33817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC - C12N 15/117; A61K 48/00; A61K 31/713; A61K 31/7105; C12N 15/88 (2021.01) CPC - C12N 15/117; A61K 48/00; A61K 31/713; A61K 31/7105; C12N 15/88	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
A	US 2018/0171338 A1 (ADIU TIDE PHARMACEUTICALS GMBH) 21 June 2018; claims 1-2
A	WO 2006/002538 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC., et al.) 12 January 2006; paragraphs [0026], [0184]
A	ES 2749855 T3 (BROWN, BD, et al.) 24 March 2020; abstract; table 2
A	US 7,842,459 B2 (AYALON-SOFFER, M et al.) 30 November 2010; column 2017, lines 15-16
	Relevant to claim No.
	1-3, 5-10, 58-59, 63-64
	1-3, 5-10, 58-59, 63-64
	1-3, 5-10, 58-59, 63-64
	1-3, 5-10, 58-59, 63-64
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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
08 September 2021 (08.09.2021)	OCT 14 2021
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/33617

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

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

10

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

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

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

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/33617

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 4, 11-57, 60-62, 65-68
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	35/16 (2015.01)	A 6 1 K	35/16
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,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,Z
W

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シ ロンロン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ クインシー ストリート 17 ブ
レジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ内

(72)発明者 バイ ハイチン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ クインシー ストリート 17 ブ
レジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ内

(72)発明者 イングバー ドナルド イー .

アメリカ合衆国 0 2 1 1 8 マサチューセッツ州 ボストン ウェスト カントン ストリート 16 2

(72)発明者 オー クリスタル ユーリ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ クインシー ストリート 17 ブ
レジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ内

(72)発明者 ブランティル - バウン レイチェル

アメリカ合衆国 0 1 7 2 1 マサチューセッツ州 アシュランド インディペンデンス レーン 7 6

F ターム (参考) 4C076 AA11 AA24 BB11 BB15 BB16 BB21 BB27 CC07 CC27 CC31

F ターム (参考)

CC32 CC34 CC35 FF70
4C084 AA13 AA19 CA01 CA18 DA21 DA22 DA23 DA24 MA13 MA16
MA56 MA66 NA05 NA14 ZB07 ZB09 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZB07 ZB09 ZB26
ZB32 ZB33 ZB35 ZB37
4C087 AA01 AA02 BB35 BC83 MA02 NA05 NA14 ZB07 ZB09 ZB26
ZB32 ZB33 ZB35 ZB37