

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-533228

(P2023-533228A)

(43)公表日 令和5年8月2日(2023.8.2)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/50 (2006.01)	C 1 2 N	15/50		4 C 0 7 6
C 0 7 K	14/165 (2006.01)	C 0 7 K	14/165	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12		4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64		
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全58頁) 最終頁に続く					

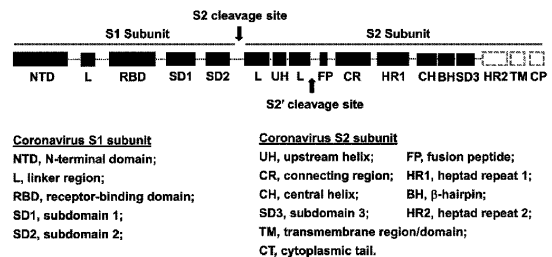
(21)出願番号	特願2022-580848(P2022-580848)	(71)出願人	501244222
(86)(22)出願日	令和2年10月1日(2020.10.1)		ザ スクリプス リサーチ インスティテ
(85)翻訳文提出日	令和5年2月24日(2023.2.24)		ュート
(86)国際出願番号	PCT/US2020/053714		アメリカ合衆国9 2 0 3 7カリフォルニ
(87)国際公開番号	WO2022/005503		ア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パイ
(87)国際公開日	令和4年1月6日(2022.1.6)		ンズ・ロード1 0 5 5 0
(31)優先権主張番号	17/019,825	(74)代理人	100114188
(32)優先日	令和2年9月14日(2020.9.14)		弁理士 小野 誠
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119253
(31)優先権主張番号	63/045,557		弁理士 金山 賢教
(32)優先日	令和2年6月29日(2020.6.29)	(74)代理人	100124855
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 坪倉 道明
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100129713
	最終頁に続く		弁理士 重森 一輝
		(74)代理人	100137213
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 安定化コロナウイルススパイク(S)タンパク質免疫原および関連ワクチン

(57)【要約】

本発明は、野生型可溶性S配列における特定の改変によって安定化される、再設計された可溶性コロナウイルスSタンパク質由来免疫原を提供する。自己集合性ナノ粒子上にディスプレイされる再設計された可溶性S免疫原を含有するナノ粒子ワクチンも本発明において提供される。再設計された免疫原およびナノ粒子ワクチンをコードするポリヌクレオチド配列も本発明で提供される。本発明はさらに、様々な治療適用、例えばコロナウイルス感染症を予防または治療するためにワクチン組成物を使用する方法を提供する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コロナウイルスの野生型可溶性 S 配列と比較して融合前 S 構造を安定化する改変を有する、変更された可溶性 S 配列を含み、前記改変が、(a) S 1 / S 2 切断部位を不活性化する変異、および (b) ヘプタドリピート 1 (HR 1) 領域と中央ヘリックス (CH) 領域との間のターン領域における、融合中に HR 1 および CH が直鎖ヘリックスを形成するのを妨げる変異、を含む、コロナウイルスのスパイク (S) タンパク質由来の操作された免疫原ポリペプチド。

【請求項 2】

ヘプタドリピート 2 領域 (HR 2) のランケーションをさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原ポリペプチド。 10

【請求項 3】

前記コロナウイルスが SARS-CoV-2 であり、cryo-EM モデル PDB ID 6VSB に基づくアミノ酸ナンバリングで、S 1 / S 2 切断部位を不活性化する変異が、⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (配列番号 19) の GSA G (配列番号 20) による置換を含み得、前記ターン領域における変異が、二重変異 K 986 G / V 987 G、K 986 P / V 987 P、K 986 G / V 987 P または K 986 P / V 987 G を含む、請求項 1 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 4】

前記野生型可溶性 S 配列が、配列番号 14、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む、請求項 3 に記載の免疫原ポリペプチド。 20

【請求項 5】

前記野生型可溶性 S 配列の C 末端における HR 2 (配列番号 9) のランケーションをさらに含む、請求項 4 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 15 に示される N 末端リーダー配列をさらに含む、請求項 5 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 C 末端に三量体化モチーフをさらに含む、請求項 5 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 8】

前記三量体化モチーフが、フォルドン (配列番号 26) もしくはウイルスカプシドタンパク質 SHP (配列番号 27)、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む、請求項 7 に記載の免疫原ポリペプチド。 30

【請求項 9】

配列番号 32 ~ 37 のいずれか 1 つに示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む、請求項 5 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 10】

前記変更された可溶性 S 配列の C 末端に融合された自己集合性ナノ粒子のサブユニット配列をさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原ポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 3 に記載の免疫原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。 40

【請求項 12】

前記免疫原ポリペプチドが N 末端リーダーをさらに含む、請求項 11 に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 13】

自己集合性ナノ粒子のサブユニット配列の N 末端に、C 末端において融合された免疫原ポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードする、請求項 11 に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 14】

自己集合性ナノ粒子の表面にディスプレイされた、請求項 1 に記載の免疫原ポリペプチ 50

ドを含む、コロナウイルスワクチン組成物。

【請求項 15】

前記自己集合性ナノ粒子が三量体配列を含み、前記免疫原ポリペプチドのC末端が前記ナノ粒子のサブユニット配列のN末端に融合されている、請求項 14 に記載のワクチン組成物。

【請求項 16】

前記自己集合性ナノ粒子が I 3 - 0 1、E 2 p またはフェリチンを含む、請求項 14 に記載のワクチン組成物。

【請求項 17】

前記ナノ粒子サブユニット配列のC末端に融合されたロックドメインおよび/または T 細胞エピトープをさらに含む、請求項 14 に記載のワクチン組成物。 10

【請求項 18】

(1) N末端からC末端に向かって以下を含むポリペプチド配列、(a) 操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、G S リンカー配列およびナノ粒子配列 I 3 - 0 1 v 9、(b) 操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、G S リンカー配列およびナノ粒子配列 E 2 p、もしくは(c) 操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、G S リンカー配列およびナノ粒子配列フェリチン、または

(2) 前記ポリペプチド配列の保存的に改変された変異体を含む、請求項 14 に記載のワクチン組成物。

【請求項 19】

前記操作された S A R S - C o V - 2 スパイク免疫原ポリペプチドが、c r y o - E M モデル P D B I D 6 V S B に基づくアミノ酸ナンバリングで、(a) 前記 S 1 / S 2 切断部位 ^{6 8 2} R R A R ^{6 8 5} (配列番号 19) の G S A G (配列番号 20) による置換、(b) 前記ターン領域における二重変異 K 9 8 6 G / V 9 8 7 G、および(c) 前記野生型可溶性 S 配列のC末端における H R 2 (配列番号 9) のランケーション、を含む、請求項 18 に記載のワクチン組成物。 20

【請求項 20】

前記操作された S A R S - C o V - 2 スパイク免疫原ポリペプチドが、配列番号 33 もしくは 34、またはその保存的に改変された変異体を含む、請求項 18 に記載のワクチン組成物。 30

【請求項 21】

(1) N末端からC末端に向かって以下を含むポリペプチド配列(a) 配列番号 33 に示される操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、リンカー配列 (G 4 S) ₂ (配列番号 22)、配列番号 23 に示されるナノ粒子配列 (I 3 - 0 1 v 9)、配列番号 29 に示されるロックドメイン (L D 7)、および配列番号 30 に示される T 細胞エピトープ、(b) 配列番号 33 に示される操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、リンカー配列 G 4 S (配列番号 21)、配列番号 24 に示されるナノ粒子サブユニット配列 (E 2 p)、配列番号 28 に示されるロックドメイン (L D 4)、および配列番号 30 に示される T 細胞エピトープ、もしくは(c) 配列番号 33 に示される操作された S A R S - C o V - 2 スパイクポリペプチド、リンカー配列 G 4 S (配列番号 21)、配列番号 25 に示されるナノ粒子配列 (フェリチン) ; または(2) 前記ポリペプチド配列の保存的に改変された変異体 ; を含む、請求項 20 に記載のワクチン組成物。 40

【請求項 22】

配列番号 38 ~ 40 のいずれか 1 つに示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む、請求項 20 に記載のワクチン組成物。

【請求項 23】

請求項 15 に記載のワクチン組成物のサブユニット配列を含むポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列。

【請求項 24】

請求項 14 に記載のワクチン組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。 50

【請求項 25】

対象における S A R S - C o V - 2 感染症を予防または治療する方法であって、薬学的有効量の請求項 14 に記載のワクチン組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、米国特許出願第 17 / 019 , 825 号 (2020 年 9 月 14 日出願 ; 現在係属中) および米国仮特許出願第 63 / 045 , 557 号 (2020 年 6 月 29 日出願 ; 現在係属中) に対する優先権の利益を主張するものである。優先権出願の全開示は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

政府支援の記載

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号 A I 139092 および A I 137472 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

コロナウイルス (C o V) は、プラス鎖 R N A ゲノムを有するエンベロープウイルスである。2002 年に、アジアで重症急性呼吸器症候群 (S A R S) がアウトブレイクした。2003 年には、新型コロナウイルスが S A R S の原因因子であると同定され、その後、S A R S - C o V と命名された。2002 ~ 2003 年のアウトブレイクの間、S A R S - C o V は 8000 人を超える人々に感染し、死亡率は約 10% であった。2012 年に、別のコロナウイルスである中東呼吸器症候群コロナウイルス (M E R S - C o V) が同定された。2012 年以降、M E R S - C o V は、27 カ国で 2000 人を超える人々に感染しており、死亡率は約 35% である。2019 年 12 月に、2019 - n C o V (または S A R S - C o V - 2) と命名された新型コロナウイルスが中国の武漢に出現した。一部が 12 月 8 日という早い時期に症状を示した最初に報告された感染個体は、武漢華南海鮮卸売市場の露店商に存在することが発見された。2020 年 1 月 10 日に、遺伝子配列決定により、この新型コロナウイルス (- コロナウイルス) が M E R S - C o V および S A R S - C o V に関連することが判定された。2020 年 1 月 30 日に、W H O は S A R S - C o V - 2 が国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態 (P H E I C) であることを宣言し、2020 年 3 月 11 日には、この状況をパンデミックとして特徴付けた。2020 年 5 月 24 日に、W H O のコロナウイルス疾患 (C O V I D - 19) ダッシュボードは、216 の国、地域または地方で 342 , 029 人の死亡を含む、合計 5 , 304 , 772 の確認症例を示した。S A R S - C o V、M E R S - C o V および S A R S - C o V - 2 は、 - コロナウイルス属に属し、高病原性の人畜共通ウイルスである。これらの 3 つの高病原性 - コロナウイルスに加えて、4 つの低病原性 - コロナウイルス、H C o V - O C 43、H C o V H K U 1、H C o V - N L 63 および H C o V - 229 E はさらにヒトに固有のものである。

20

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

今日まで、いずれのヒト感染性コロナウイルスを治療または予防するための治療薬またはワクチンも承認されていない。コロナウイルスに対する効果的なワクチンが当技術分野で強く緊急に必要とされている。本発明は、当技術分野におけるこの、および他の差し迫った必要性に関する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、本発明は、S A R S - C o V、M E R S - C o V および S A R S - C o V

50

- 2を含むコロナウイルスのスパイク(S)糖タンパク質に由来するか、またはそれから改変された操作された免疫原ポリペプチドを提供する。コロナウイルスの野生型可溶性Sタンパク質配列と比較して、本発明の免疫原ポリペプチドは、融合前S構造を安定化する改変を有する、変更された可溶性S配列を含有する。様々な実施形態では、この改変は、(a) S1/S2切断部位を不活性化する変異、および(b)膜融合プロセス中にHR1およびCHが直鎖ヘリックスを形成するのを妨げる、ヘプタッドリピート1(HR1)領域と中央ヘリックス(CH)領域との間のターン領域の変異(図1参照)を含む。いくつかの実施形態では、本発明の免疫原ポリペプチドは、上記の安定化変異に加えて、ヘプタッドリピート2領域(HR2)のランケーションも含む。

【0006】

本発明のいくつかの可溶性S免疫原ポリペプチドは、SARS-CoV-2に由来する。これらの実施形態のいくつかでは、S1/S2切断部位を不活性化する変異は、cryo-EMモデルPDB ID 6VSBに基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用して、⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵(配列番号19)のGSAG(配列番号20)による置換を含み得、ターン領域における変異は、二重変異K986G/V987G、K986P/V987P、K986G/V987PまたはK986P/V987Gを含み得る。いくつかの実施形態では、野生型可溶性S配列は、配列番号14に示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む。いくつかの実施形態では、HR2のランケーションは、野生型可溶性S配列のC末端における配列番号9に示される残基の欠失を伴う。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、C末端における配列番号10に示される残基のランケーションをさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、野生型可溶性S配列のC末端における配列番号10に示される残基の、残基GNSによる置換を含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、本発明のSARS-CoV-2由来免疫原ポリペプチドは、配列番号15に示されるN末端リーダー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、免疫原ポリペプチドは、HR2と相互作用するHR1の領域において、(a)1つ以上のプロリンまたはグリシン置換、および/または(b)1つ以上のアミノ酸残基の挿入をさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、A942P、S943P、A944P、A942G、S943GおよびA944Gから選択される1つ以上の置換を有することができる。これらの実施形態のいくつかでは、挿入は、A942~A944の任意の残基間へのGまたはGSの挿入であり得る。いくつかの例示されている実施形態では、本発明のSARS-CoV-2由来免疫原ポリペプチドは、配列番号32~37のいずれか1つに示されている配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む。

【0008】

本発明のいくつかの可溶性S免疫原ポリペプチドは、SARS-CoVに由来する。これらの実施形態のいくつかでは、S1/S2切断部位を不活性化する変異は、UniProt ID P59594に基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用して、R667G置換であり得、ターン領域における変異は、二重変異K968G/V969G、K968P/V969P、K968G/V969PまたはK968P/V969Gを含む。いくつかの実施形態では、野生型可溶性S配列は、配列番号7に示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む。いくつかの実施形態では、本発明のSARS-CoV由来免疫原ポリペプチドは、野生型可溶性S配列のC末端におけるHR2(配列番号9)のランケーションを含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、免疫原ポリペプチドは、C末端における配列番号10に示される残基のランケーションをさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、野生型可溶性S配列のC末端における配列番号10に示される残基の、残基GNSによる置換を含む。

【0009】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本発明のSARS-CoV由来免疫原ポリペプチドは、配列番号8に示されるN末端リーダー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、免疫原ポリペプチドは、HR2と相互作用するHR1の領域において、(a)1つ以上のプロリンまたはグリシン置換、および/または(b)1つ以上のアミノ酸残基の挿入をさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、S924P、T925P、A926P、S924G、T925GおよびA926Gから選択される1つ以上の置換を有することができる。これらの実施形態のいくつかでは、挿入は、S924~A926における任意の残基の後へのGまたはGSの挿入であり得る。

【0010】

本発明のいくつかの可溶性S免疫原ポリペプチドは、MERS-CoVに由来する。これらの実施形態のいくつかにおいて、S1/S2切断部位を不活性化する変異は、UniProt ID R9UQ53に基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用して、R748A/R751G二重変異を含み得、ターン領域における変異は、二重変異V1060G/L1061G、V1060P/L1061P、V1060G/L1061PまたはV1060P/L1061Gを含む。いくつかの実施形態では、野生型可溶性S配列は、配列番号11に示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む。いくつかの実施形態では、本発明のMERS-CoV由来免疫原ポリペプチドは、野生型可溶性S配列のC末端におけるHR2(配列番号13)のランケーションを含む。

10

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明のMERS-CoV由来免疫原ポリペプチドは、配列番号12に示されるN末端リーダー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、免疫原ポリペプチドは、HR2と相互作用するHR1の領域において、(a)HR2と相互作用するHR1の領域において、HR2と相互作用するHR1の領域において、HR2と相互作用するHR1の領域において1つ以上のプロリンまたはグリシン置換、および/または(b)1つ以上のアミノ酸残基の挿入をさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、免疫原ポリペプチドは、T1013P、T1014P、T1015P、T1013G、T1014GおよびT1015Gから選択される1つ以上の置換を有することができる。これらの実施形態のいくつかでは、挿入は、T1013~T1015における任意の残基の後への残基GまたはGSの挿入であり得る。

20

30

【0012】

いくつかの実施形態では、本発明のコロナウイルスSタンパク質由来免疫原ポリペプチドは、C末端に三量体化モチーフをさらに含むことができる。これらの実施形態のいくつかでは、三量体化モチーフは、フォルドン(foldon)またはウイルスカプシドタンパク質SHPである。様々な実施形態では、使用される三量体化モチーフは、配列番号26に示されるフォルドン配列もしくは配列番号27に示されるSHP配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含み得る。いくつかの実施形態では、本発明のコロナウイルスSタンパク質由来免疫原ポリペプチドは、改変された可溶性S配列に融合した自己集合性ナノ粒子のサブユニット配列をさらに含み得る。これらの実施形態のいくつかでは、変更された可溶性S配列のC末端は、ナノ粒子サブユニット配列のN末端に融合される。

40

【0013】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のコロナウイルスSタンパク質由来免疫原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を提供する。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、自己集合性ナノ粒子のサブユニット配列のN末端に、C末端において融合された免疫原ポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードする。

【0014】

別の態様では、本発明は、自己集合性ナノ粒子の表面にディスプレイされる本明細書に記載の免疫原ポリペプチドを含むコロナウイルスワクチン組成物を提供する。これらの実施形態のいくつかでは、自己集合性ナノ粒子は三量体配列を含み、免疫原ポリペプチドの

50

C末端がナノ粒子のサブユニット配列のN末端に融合されている。いくつかの実施形態では、使用される自己集合性ナノ粒子は、フェリチン、E2pまたはI3-01から構成される。本発明のいくつかのナノ粒子ワクチンは、本明細書に記載の操作されたSARS-CoV-2スパイクタンパク質をディスプレイする。

【0015】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子ワクチンは、(1) N末端からC末端に向かって以下を含むポリペプチド配列、(a) 操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、GSリンカー配列およびナノ粒子配列I3-01v9、(b) 操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、GSリンカー配列およびナノ粒子配列E2p、もしくは(c) 操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、GSリンカー配列およびナノ粒子配列フェリチン、または(2) 該ポリペプチド配列の保存的に改変された変異体を含む。これらの実施形態のいくつかでは、ディスプレイされたSARS-CoV-2スパイク免疫原ポリペプチドは、野生型スパイク配列と比較して、(a) S1/S2切断部位⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵(配列番号19)のGSA G(配列番号20)による置換、(b) ターン領域における二重変異K986G/V987G、および(c) C末端におけるHR2(配列番号9)のランケーションを含む。

【0016】

本発明のいくつかのナノ粒子足場SARS-CoV-2ワクチンでは、ディスプレイされたSARS-CoV-2スパイク免疫原ポリペプチドは、配列番号33もしくは34に示される配列、またはその保存的に改変された変異体を含む。これらの実施形態のいくつかでは、足場ワクチンは、(1) N末端からC末端に向かって以下を含むサブユニット配列(a) 配列番号33に示される操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、リンカー配列(G₄S)₂(配列番号22)、配列番号23に示されるナノ粒子配列(I3-01v9)、配列番号29に示されるロックドメイン(LD7)、および配列番号30に示されるT細胞エピトープ(PADRE)、(b) 配列番号33に示される操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、リンカー配列G₄S(配列番号21)、配列番号24に示されるナノ粒子サブユニット配列(E2p)、配列番号28に示されるロックドメイン(LD4)、および配列番号30に示されるT細胞エピトープ(PADRE)、もしくは(c) 配列番号33に示される操作されたSARS-CoV-2スパイクポリペプチド、リンカー配列G₄S(配列番号21)、配列番号25に示されるナノ粒子配列(フェリチン); または(2) 該サブユニット配列の保存的に改変された変異体から構成される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子足場ワクチンのサブユニットは、配列番号38~40のいずれか1つに示される配列、またはその実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体を含む。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載のワクチン組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。別の態様では、本発明は、対象におけるコロナウイルス感染症を予防または治療する方法を提供する。これらの方法は、薬学的有効量の本明細書に記載のワクチン組成物または医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0018】

本発明の性質および利点のさらなる理解は、本明細書の残りの部分および特許請求の範囲を参照することによって実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】 図1は、コロナウイルススパイク(S)タンパク質の異なる構造モチーフの構成を示す図である。図に示すスキームは、本発明に包含される異なるコロナウイルス、例えば、SARS-CoV、MERS-CoVおよびSARS-CoV-2のSタンパク質の構造を反映している。図に示されるSタンパク質の構造ドメインおよびモチーフは、RBD、HR1、CH1およびHR2ドメインまたは領域、ならびにS2切断部位(別名S1/S2切断部位)およびS2'切断部位を含む。図に示される様々なS構成成分に加えて

、HR1とCHとの間のアミノ酸残基は、本明細書では「ターン領域」と称される。

【図2】図2は、マウス免疫化プロトコルの概略図である。5匹のマウスの群を3週間間隔で4回免疫化した。すべてのワクチン抗原(50ug/注射)を、I3-01v9を除いて、水中油型エマルジョンアジュバントであるAddavaxと共に製剤化し、I3-01v9はリン酸アルミニウム(AP)と共に製剤化した。腹腔内(IP)経路を介して注射を行った。各注射の2週間後に血液試料を採取した。

【図3】図3は、マウスにおけるSARS-CoV-2ワクチン誘導性抗体応答の結果を示す図である。SARS-CoV-2スパイク/スパイク-NPワクチン誘導性結合抗体応答。図には、5つのSARS-CoV-2スパイクベースのワクチン群(S2P-5GS-1TD0、S2G HR2-5GS-1TD0、S2G HR2-5GS-FR、S2G HR2-5GS-E2p-L4PおよびS2G HR2-10GS-I3-01v9-L7P)についての、3つの被覆抗原に対するELISAで測定されたED₅₀力価の要約が列挙されている。GraphPad Prism 8.4.3でED₅₀値を計算した。注目すべきことに、より高い精度を達成するために、OD₄₅₀の下限/上限制約を0.0/3.2に設定することによって、w2におけるED₅₀値を導出した。

【図4】図4は、マウスにおけるSARS-CoV-2ワクチン誘導性抗体応答の追加の結果を示す図である。図には、5つのSARS-CoV-2スパイクベースのワクチン群(S2P-5GS-1TD0、S2G HR2-5GS-1TD0、S2G HR2-5GS-FR、S2G HR2-5GS-E2p-L4PおよびS2G HR2-10GS-I3-01v9-L7P)についての、2つの偽ウイルス、SARS-CoV-1-pおよびSARS-CoV-2-ppに対する中和アッセイで測定されたID₅₀力価の要約が列挙されている。ID₅₀値をGraphPad Prism 8.4.3で、中和%の下限/上限制約を0.0/100.0に設定して計算した。

【図5】図5は、マウスにおけるSARS-CoV-2ワクチン誘導性T細胞応答の結果を示す図である。(A)-(B): ワクチン誘導性CD4+T細胞免疫。w11のマウス由来の脾細胞を、S2PECTOSPAイク(1x10⁻⁷mM)、E2p SApNP(1x10⁻⁷mM)およびI3-01v9 SApNP(1x10⁻⁷mM)をパルスしたDCの存在下で、それぞれ(A)16時間および(B)4時間培養した。(C)&(D): ワクチン誘導性CD8+T細胞免疫。w11のマウス由来の脾細胞を、S2PECTOSPAイク(1x10⁻⁷mM)、E2p SApNP(1x10⁻⁷mM)およびI3-01v9 SApNP(1x10⁻⁷mM)をパルスしたDCの存在下で、それぞれ(C)16時間および(D)4時間培養した。5匹のナイーブマウス由来の脾細胞を対照試料として使用し、PBSで培養した。プロットは、細胞画分の頻度を示す。P値を一方向ANOVA分析によって決定した。*、P<0.05; **、P<0.01; ***, P<0.001。

【発明を実施するための形態】

【0020】

I. 概要

SARS-CoV(別名SARS-CoV-1)、MERS-CoVおよびSARS-CoV-2の場合、ウイルスゲノムはスパイク(S)、エンベロープ(E)、膜(M)、およびヌクレオカプシド(N)構造タンパク質をコードし、その中でS糖タンパク質は、そのS1サブユニット内の受容体結合ドメイン(RBD)を介した宿主受容体の結合、ならびにその後の膜融合、およびそのS2サブユニットによって駆動されるウイルス侵入を担う。可能な膜融合プロセスが提案されている。受容体結合は、RBDを「直立」状態に保つのに役立ち、それによってS1サブユニットのS2サブユニットからの解離が促進される。S1サブユニットがS2サブユニットから解離すると、第2のS2'切断が融合ペプチドを放出することができる。接続領域、HR1領域および中心ヘリックスは、融合ペプチドを宿主細胞膜に挿入するための非常に長いヘリックス(200)を形成する。最後に、HR1およびHR2領域はコイル状構造を形成し、ウイルス膜と宿主膜とを融合するために6ヘリックスバンドルに集合する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

SARS-CoV、MERS-CoVおよびSARS-CoV-2について解明されたすべての融合前S構造において、ウイルス膜近位のHR2領域は不可視であり、HR2の高い移動性を示す。RBDは、コアサブドメインと、受容体結合モチーフ(RBM)とを含む。コアサブドメインは3つのコロナウイルス間で非常に類似しているが、それらのRBMは著しく異なり、異なる受容体特異性をもたらす：SARS-CoVおよびSARS-CoV-2はアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を認識するが、MERS-CoVはジペプチジルペプチダーゼ4(DPP4)に結合する。S糖タンパク質は表面露出しており、宿主細胞への侵入を媒介するので、感染時の中和抗体(NAb)の主な標的であり、ワクチン設計の焦点である。S三量体は、適切な折り畳みおよびNAbへのアクセス可能性の調節に重要なN結合グリカンで広範囲に装飾されている。

【 0 0 2 2 】

本発明は、2つの合理的な戦略に基づいて3つの高病原性 - コロナウイルスである、SARS-CoV、MERS-CoV、およびSARS-CoV-2のためのナノ粒子ワクチンを設計するために本発明者らが着手した研究に部分的に基づいている。第1の戦略では、本発明者らは、ナノ粒子上にディスプレイする前に、Sの様々な領域、特にHR1およびHR2における準安定性の原因を排除することによって、融合前コンフォメーションでS三量体を安定化させることを目的とした。第2のワクチン戦略では、本発明者らは、SpyTag/SpyCatcherタンパク質超接着系を利用して、RBD提示ナノ粒子を作製した。いくつかのSタンパク質由来免疫原ポリペプチドおよびナノ粒子ワクチン構築物を設計に基づいて作製し、活性について試験した。

【 0 0 2 3 】

SARS-CoV-2(およびSARS-CoV-1)スパイクタンパク質を用いて本明細書において例示されるように、本発明の操作されたスパイク免疫原ポリペプチドは、操作されていない対照ポリペプチドと比較してより安定であり、より最適なワクチン設計を表す。本明細書に記載のそれらの有利な生化学的および構造的特性は、それらが工業的環境における迅速かつ大規模なワクチン製造に適していることを示している。インビボで試験した場合、操作されたSARS-CoV-2スパイク免疫原(例えば、S2G-HR2)は、単独で、または自己集合性ナノ粒子プラットフォーム(SApNP)上に提示されて、強力な抗SARS-CoV-2 NAb応答を誘発するために、非操作対照タンパク質よりも有効であることが分かった。本明細書の実施例に詳述されているように、本発明の例示的なナノ粒子ワクチン、例えばS2G-HR2提示I3-01v9 SApNPはまた、強力なTh1応答ならびに細胞防御免疫に必要な他のタイプのT細胞応答を誘発することができる。SARS-CoV-2スパイクタンパク質に関する本明細書の例示の研究から得られた結果は、本発明の操作されたスパイク免疫原ポリペプチドが、人体試験における評価のためのより効果的な次世代ワクチン候補を提供することを示している。

【 0 0 2 4 】

本発明は、本明細書に記載される研究および例示される設計によるコロナウイルス免疫原およびワクチン組成物を提供する。関連するポリヌクレオチド配列、発現ベクターおよび医薬組成物もまた本発明において提供される。様々な実施形態では、ウイルスベクターによって担持されるタンパク質または核酸(DNA/mRNA)の形態の安定化S三量体およびRBDタンパク質を、コロナウイルスのワクチンとして使用することができる。さらに、安定化S三量体およびRBDを提示するナノ粒子は、VLP型コロナウイルスワクチンとして使用することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明のコロナウイルスSタンパク質ベースの免疫原およびワクチンは、いくつかの有利な特性を有する。保存された中和エピトープをそれらの天然様コンフォメーションで提示する本明細書に記載のS三量体設計は、S三量体をワクチン抗原として使用すること、またはナノ粒子上に多価にディスプレイ可能にする。本発明のナノ粒子ワクチンは、3つの異なるコロナウイルスに由来するS三量体を、12.2~25.0nmの範囲のサイズ

を有するフェリチン、E2pおよびI3-01などの周知のナノ粒子プラットフォーム上にディスプレイ可能にする。さらに、高安定性中空ナノケージ(E2pおよび1VLW/I3-01変異体)の使用は、ナノケージ内のロックドメイン(LD)、T細胞エピトープ(例えばPADRE)、およびペプチドアダプタの操作を可能にし、したがってオールインワンワクチン溶液を提供する。すべてのS三量体提示ナノ粒子は、ExpichO細胞において高収率で産生され得る。CHOは、タンパク質治療薬およびワクチンの工業的製造に使用される主要な哺乳動物細胞株の1つであり、ExpichOはこのCHO細胞株の一過性バージョンであるため、ExpichOによる産生から得られるナノ粒子は、工業的CHO生産によるナノ粒子と同じ特性を有すると予想される。さらに、抗体およびSEC精製aを用いてExpichO細胞で産生されたS提示ナノ粒子の高収率は、工業生産のための単純で堅牢で費用効果の高い製造プロセスの開発を可能にするものである。

10

【0026】

本明細書において特に指定されない限り、本発明のワクチン免疫原、コードポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞、ならびに関連する治療適用はすべて、本明細書に例示される手順または当技術分野で周知の日常的に実施される方法に従って生成または実施することができる。例えば、Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis, J.N. Abelson, M.I. Simon, G.B. Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); 米国特許第4,965,343号および同第5,849,954号; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbound, 2003); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); または Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S.L. Berger and A.R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), および Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005)、Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)を参照されたい。以下のセクションは、本発明の組成物および方法を実施するためのさらなる指針を提供する。

20

30

40

【0027】

特に明記しない限り、本明細書で使用される「少なくとも(at least)」または「少なくとも1つ(at least one of)」という表現は、文脈および使用から特に理解されない限り、その表現の後の列挙された対象のそれぞれ、および列挙された対象の2つ以上の様々な組み合わせを個々に含む。3つ以上の列挙された対象に関連する「および/または」という表現は、文脈から特に理解されない限り、同じ意味を有す

50

ると理解されるべきである。

【0028】

用語「含む (include)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (have)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contain)」、「含有する (contains)」、または「含有する (containing)」の使用は、その文法上の等価物を含めて、一般に、制限のない非限定的なものとして理解されるべきであり、例えば、特に明記しない限り、または文脈から理解されない限り、列挙されていないさらなる要素またはステップを除外しない。

【0029】

「約」という用語の使用が定量値の前にある場合、本発明は、特に明記しない限り、特定の定量値自体も含む。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特に指示または推論されない限り、公称値から $\pm 10\%$ の変動を指す。

【0030】

特に明記しない限り、ステップの順序または特定の動作を実行するための順序は、本発明が依然として実施可能である限り重要ではない。さらに、2つ以上のステップまたは動作が同時に行われてもよい。

【0031】

特に明記しない限り、本明細書におけるありとあらゆる例、または例示的な言語、例えば「など (such as)」または「含む (including)」の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書中のいかなる言語も、本発明の実施に不可欠な特許請求されていない要素を示すと解釈されるべきではない。

【0032】

II. 定義

他に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する：Academic Press Dictionary of Science and Technology, Morris (Ed.), Academic Press (1st ed., 1992); Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); Encyclopaedic Dictionary of Chemistry, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); Dictionary of Chemistry, Hunt (Ed.), Routledge (1st ed., 1999); Dictionary of Pharmaceutical Medicine, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); Dictionary of Organic Chemistry, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); および A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000)。本発明に具体的に適用されるこれらの用語のいくつかのさらなる明確化が、本明細書に提供される。

【0033】

本明細書で使用される場合、「抗原」または「免疫原」という用語は互換的に使用され

10

20

30

40

50

、対象において免疫応答を誘導することができる物質、典型的にはタンパク質を指す。この用語はまた、対象に投与されると（直接的に、またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列もしくはベクターを対象に投与することによって）、そのタンパク質に対する体液性および/または細胞性の免疫応答を惹起することができるという意味で免疫学的に活性なタンパク質を指す。特に明記しない限り、「ワクチン免疫原」という用語は、「タンパク質抗原」または「免疫原ポリペプチド」と互換的に使用される。

【0034】

「保存的に改変された変異体」という用語は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された変異体とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。ポリペプチド配列の場合、「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸残基が類似の電荷の側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換された、保存的アミノ酸置換を有する変異体を指す。類似の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有する（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有する（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有する（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有する（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖を有する（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有する（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）アミノ酸が含まれる。

10

20

【0035】

エピトープとは、抗原決定基を指す。これらは、特異的免疫応答を誘発するような、抗原性である分子上の特定の化学基またはペプチド配列であり、例えば、エピトープは、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原の領域である。エピトープは、連続アミノ酸またはタンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続アミノ酸の両方から形成され得る。

【0036】

ワクチンまたは他の薬剤の有効量は、肺炎などの状態または疾患の徴候または症状を軽減または排除するなど、所望の応答を生成するのに十分な量である。例えば、これは、ウイルス複製を阻害するため、またはウイルス感染の表面上の症状を測定可能に変化させるために必要な量であり得る。一般に、この量は、ウイルス（例えば、SARS-CoV-2）の複製または感染性を測定可能に阻害するのに十分と思われる。対象に投与される場合、ウイルス複製のインビトロ阻害を達成することが示されている標的組織濃度を達成する投与量が一般に使用される。いくつかの実施形態では、「有効量」は、例えばコロナウイルス感染症を治療するために、障害または疾患のいずれかの1つ以上の症状および/または根本原因を治療する（予防を含む）ものである。いくつかの実施形態では、有効量は治療有効量である。いくつかの実施形態では、有効量は、特定の疾患または状態の1つ以上の徴候または症状、例えばコロナウイルス感染に関連する1つ以上の徴候または症状の発症を防ぐ量である。

30

40

【0037】

特に明記しない限り、融合タンパク質は、単一のタンパク質を作製するためにペプチド結合を介して互いに連結された少なくとも2つの無関係なタンパク質由来のアミノ酸配列を含む組換えタンパク質である。したがって、本明細書に記載の融合（F）タンパク質と呼ばれる天然に存在するコロナウイルス表面抗原を包含しない。無関係なアミノ酸配列は、互いに直接連結されても、またはリンカー配列を使用して連結されてもよい。本明細書で使用される場合、タンパク質は、それらのアミノ酸配列がそれらの天然環境（例えば、細胞の内部）においてペプチド結合を介して共に連結されていることが通常見出されない場合、無関係である。例えば、B.ステアロサーモフィルス（*B. stearother*

50

m o p h i l u s) ジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼ (E 2 p) などの細菌酵素のアミノ酸配列と可溶性コロナウイルスS糖タンパク質のアミノ酸配列とは、通常、ペプチド結合を介して一緒に連結して見出されることはない。

【 0 0 3 8 】

免疫原は、哺乳動物、例えば、病原体に感染しているかまたは感染のリスクがある哺乳動物において免疫応答を誘導することができるタンパク質またはその一部である。免疫原の投与は、目的の病原体に対する防御免疫および/または予防免疫 (p r o a c t i v e i m m u n i t y) をもたらし得る。

【 0 0 3 9 】

免疫原性組成物とは、免疫原性ポリペプチドを発現するウイルスに対して測定可能な C T L 応答を誘導するか、または免疫原性ポリペプチドに対して測定可能な B 細胞応答 (抗体の産生など) を誘導する免疫原性ポリペプチドを含む組成物を指す。

【 0 0 4 0 】

2 つ以上の核酸配列または 2 つ以上のアミノ酸配列の間の配列同一性または類似性は、これらの配列間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は、同一性パーセントに関して測定することができる。パーセンテージが高いほど、配列はより同一である。2 つの配列が、以下の配列比較アルゴリズムの 1 つを使用して、または手動アライメントおよび目視検査によって測定して、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大の一致に関して比較およびアライメントされた場合、同じアミノ酸残基またはヌクレオチドの指定されたパーセンテージ (すなわち、指定された領域にわたって、または指定されない場合、配列全体にわたって、60% の同一性、任意選択で 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% または 99% の同一性) を有する場合、2 つの配列は「実質的に同一」である。同一性は、少なくとも約 50 ヌクレオチド (または 10 アミノ酸) 長の領域にわたって、またはより好ましくは 100 ~ 500 もしくは 1000 もしくはそれを超えるヌクレオチド (または 20、50、200 以上のアミノ酸) 長の領域にわたって存在してもよい。

【 0 0 4 1 】

核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアライメントさせた場合、比較的高度の配列同一性/類似性を保有する。比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73: 237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16: 10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; および Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24: 307-31, 1994 に記載されている。Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990 には、配列アラインメント方法および相同性計算の詳細な考察が提示されている。

【 0 0 4 2 】

Spy Catcher - Spy Tag とは、ストレプトコッカス・ピロゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) の F b a B の C n a B 2 ドメインの、フィブロネクチン結合 M S C R A M M、と病原性因子との内部イソペプチド結合に基づくタンパク質ライゲーション系を指す。例えば、Terao et al., J. Biol. Chem. 2002; 277: 47428-47435; および Zakeri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012; 109: E690-E697 を参照されたい。これは、同族の 13 アミノ酸ペプチド (S p y T a g) を認識する

ストレプトコッカス・ピロゲネス (*Streptococcus pyogenes*) 表面タンパク質 (Spy Catcher) 由来の改変ドメインを利用する。認識すると、2 つは、Spy Catcher のリジンの側鎖と Spy Tag のアスパラギン酸との間に共有結合性イソペプチド結合を形成する。この技術は、他の用途の中でも、共有結合的に安定化された多タンパク質複合体を作製するため、モジュール式ワクチン製造のため、およびタンパク質を標識するため (例えば、顕微鏡検査用) に使用されてきた。Spy Tag 系は、タグが標的タンパク質の露出位置に遺伝的に融合することができる短い折り畳まれていないペプチドであるため汎用性があり、同様に、Spy Catcher は、GFP などのレポータータンパク質およびエピトープまたは精製タグに融合することができる。

【0043】

「対象」という用語は、哺乳動物、例えばヒトおよび非ヒト哺乳動物として分類される任意の動物を指す。非ヒト動物の例としては、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどが挙げられる。特に明記しない限り、「患者」または「対象」という用語は本明細書では互換的に使用される。好ましくは、対象はヒトである。

【0044】

「治療する」または「緩和する」という用語は、疾患 (例えば、コロナウイルス感染症) の症状、合併症、または生化学的徴候の発症を予防または遅延させるため、疾患、状態もしくは障害の症状を緩和するため、またはさらなる発症を停止もしくは阻害するための、化合物または薬剤の対象への投与を含む。治療を必要とする対象には、疾患または障害に既に罹患している対象ならびに障害を発症するリスクがある対象が含まれる。治療は、疾患の発現後の症状の予防的 (疾患の発症を予防もしくは遅延させるため、またはその臨床症状もしくは不顕性症状の発現を予防するため) または治療的抑制もしくは緩和であり得る。

【0045】

ワクチンは、対象において予防的または治療的な免疫応答を誘発する医薬組成物を指す。場合によっては、免疫応答は防御免疫応答である。典型的には、ワクチンは、病原体、例えばウイルス病原体の抗原に対する、または病理学的状態と互いに関係がある細胞成分に対する抗原特異的免疫応答を誘発する。ワクチンは、ポリヌクレオチド (開示される抗原をコードする核酸など)、ペプチドまたはポリペプチド (開示される抗原など)、ウイルス、細胞または1つ以上の細胞成分を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、ワクチンまたはワクチン免疫原またはワクチン組成物は、融合構築物から発現され、表面に免疫原ポリペプチドまたはタンパク質をディスプレイするナノ粒子に自己集合する。

【0046】

ウイルス様粒子 (VLP) とは、いくつかのウイルスのいずれかに由来する非複製的ウイルスシェルを指す。VLP は、一般に、限定するものではないが、キャプシド、コート、シェル、表面および/もしくはエンベロープタンパク質と呼ばれるタンパク質、またはこれらのタンパク質に由来する粒子形成ポリペプチドなどの1つ以上のウイルスタンパク質で構成される。VLP は、適切な発現系におけるタンパク質の組換え発現時に自発的に形成し得る。特定のVLPを作製する方法は、当技術分野において公知である。ウイルスタンパク質の組換え発現後のVLPの存在は、当技術分野において公知の従来の技術を使用して、例えば電子顕微鏡法、生物物理学的特性評価などによって検出することができる。例えば、Baker et al. (1991) *Biophys. J.* 60: 1445 - 1456; および Hagenssee et al. (1994) *J. Virol.* 68: 4503 - 4505 を参照されたい。例えば、VLP は、密度勾配遠心分離によって単離することができ、および/または特徴的な密度バンディングによって同定することができる。あるいは、問題のVLP調製物のガラス化水性試料に対して低温電子顕微鏡を実施し、適切な曝露条件下で画像を記録することができる。

【0047】

自己集合性ナノ粒子とは、直径が数十ナノメートルであり、VLPと同様の外観を有するナノ粒子に自動的に集合することができる非ウイルス性タンパク質の同一のコピーによ

10

20

30

40

50

って形成される、明確な表面形状を有するボール形状タンパク質シェルを指す。公知の例としては、種にわたって保存されており、24量体を形成するフェリチン(FR)、ならびにB.ステアロサーモフィルス(B. stearothermophilus)のジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼ(E2p)、アクイフェックス・エオリカス(Aquifex aeolicus)のルマジンシンターゼ(LS)、およびテルモトガ・マリティマ(Thermotoga maritima)のエンカプスリン(これらはすべて60量体を形成する)が挙げられる。自己集合性ナノ粒子は、適切な発現系におけるタンパク質の組換え発現時に自発的に形成し得る。ナノ粒子の生成、検出および特性評価のための方法は、VLPのために開発されたものと同じ技術を用いて行うことができる。

【0048】

III. 再設計されたコロナウイルス可溶性S免疫原

本発明は、ワクチン組成物を生成するために使用することができる、コロナウイルスの再設計されたまたは改変された可溶性S配列を提供する。再設計された可溶性S三量体免疫原またはタンパク質は、コロナウイルスの野生型可溶性S配列に改変を導入することによって安定化される。特定のSARS-CoV、MERS-CoVおよびSARS-CoV-2株または分離株のいくつかの特定の野生型可溶性S配列、例えば、配列番号1~3が本明細書において例示される。所与のコロナウイルスの異なる分離株または株間の機能的類似性および配列相同性のために、他の公知のコロナウイルスSタンパク質オルソログ配列に由来する再設計された可溶性S免疫原も、本明細書に記載の再設計戦略に従って作製することができる。文献に記載されている多くの公知のコロナウイルスSタンパク質配列が存在する。例えば、James et al., J. Mol. Biol. 432: 3309-25, 2020; Andersen et al., Nat. Med. 26: 450-452, 2020; Walls et al., Cell 180: 281-292, 2020; Zhang et al., J. Proteome Res. 19: 1351-1360, 2020; Du et al., Expert Opin. Ther. Targets 21: 131-143, 2017; Yang et al., Viral Immunol. 27: 543-550, 2014; Wang et al., Antiviral Res. 133: 165-177, 2016; Bosch et al., J. Virol. 77: 8801-8811, 2003; Lio et al., TRENDS Microbiol. 12: 106-111, 2004; Chakraborti et al., Virol. J. 2: 73, 2005; および Li, Ann. Rev. Virol. 3: 237-261, 2016を参照されたい。

【0049】

本明細書で詳述するように、本発明のいくつかの再設計された可溶性S免疫原ポリペプチドは、融合前S構造の安定性を高め得る変異を含む。これらには、S1/S2切断部位を不活性化する変異、およびHR1とCHとの間のターン領域のすべての歪みを除去する、すなわち融合中の直鎖ヘリックスの形成を防止するHR1の変異が含まれる。いくつかの実施形態では、放棄された(resigned)可溶性S免疫原ポリペプチドは、HR2モチーフのランケーションをさらに含み得る。HR2ドメインのランケーションは、HR1/HR2融合コアの破壊をもたらし、融合前S構造を安定化する。

【0050】

いくつかの操作された可溶性S免疫原ポリペプチドは、COVID-19を引き起こしたSARS-CoV-2ウイルスに由来する。これらのポリペプチドのいくつかは、改変されたS1/S2切断部位を含む。例示として、本発明のSARS-CoV-2免疫原ポリペプチドを操作するために使用される野生型可溶性S配列を、配列番号3またはN末端リーダー短縮可溶性S配列(配列番号14)に示す。他の実施形態では、使用される野生型可溶性S配列は、配列番号3または14の変異体、例えば、その実質的に同一な、もしくはは保存的に改変された変異体であり得る。cryo-EMモデルPDB ID 6VSBまたはGenBankアクセッション番号MN908947.3に基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用すると、改変された切断部位は⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷(配

10

20

30

40

50

列番号18)を含む。この切断部位の不活性化は、その部位の内または周囲のいくつかの配列変更(例えば、欠失または置換)によって達成することができる。タンパク質の構造に他の影響を与えることなく切断部位を不活性化する1つの変異は、本明細書中に例示されるように、切断部位の残基⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵(配列番号19)のGSA G(配列番号20)による置換である。切断部位の不活性化に加えて、可溶性SARS-CoV-2免疫原性ポリペプチドは、直鎖ヘリックスの形成を妨げることによって融合中のターン領域(HR1モチーフとCHモチーフとの間)の歪みを除去する、HR1領域の二重変異をさらに含み得る。様々な実施形態では、この二重変異は、K986G/V987G、K986P/V987P、K986G/V987PまたはK986P/V987Gであり得る。

10

【0051】

融合前S構造を安定化する上記の変異への追加またはその代替として、本発明のいくつかのSARS-CoV-2免疫原ポリペプチドは、HR2ドメインのかなりの部分または全体の欠失を含むことができる。例示するために配列番号3の例示的な可溶性SARS-CoV-2 S配列を使用すると、この欠失はアミノ酸残基1150~1208(配列番号9)を包含し得る。様々な他の実施形態では、欠失は、配列番号3の最初の35、40、45、50、55またはそれ以上のC末端残基のランケーションであり得る。さらにいくつかの他の実施形態では、野生型可溶性S配列のC末端ランケーションは、HR2ドメインを超えて伸長し得る。これらの実施形態のいくつかでは、配列番号3の残基1139~1149(配列番号10)からなる領域の1つ以上の残基も欠失させることができる。これらの実施形態のいくつかでは、C末端短縮可溶性S配列は、例えば、配列番号3の残基1139~1149をトリペプチドモチーフ、GNSで置換することによって、挿入されたこのモチーフを含み得る。本明細書に記載されるように、このトリペプチドモチーフは、免疫原ポリペプチドがナノ粒子上にディスプレイされると、タンパク質収量を増加させるように機能する。いくつかの他の実施形態では、可溶性S配列は、配列番号15に示されるN末端リーダー配列を含み得る。

20

【0052】

本発明のいくつかのSARS-CoV-2免疫原ポリペプチドでは、野生型可溶性S配列のさらなる変異を導入して、融合後S構造を不安定化することができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロリンおよび/またはグリシン置換を、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1の領域において操作することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊するように機能する。様々な実施形態では、変異は、A942P、S943P、A944P、A942G、S943GおよびA944Gを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のさらなるアミノ酸残基を、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1の領域内に挿入することができる。同様に、これらの挿入もまた、融合コアの螺旋パターンを破壊するように機能する。様々な実施形態では、挿入は、A942~A944の任意の残基間へのGまたはGSの挿入であり得る。

30

【0053】

本明細書の実施例に詳述されているように、いくつかの特定の操作されたSARS-CoV-2スパイク免疫原ポリペプチドは、野生型SARS-CoV-2スパイク外部ドメインポリペプチドまたは二重プロリン変異を含む周知のSARS-CoV-2スパイクポリペプチド(「S2P」)と比較して免疫原特性の増強を実証した。これらの例示的なSARS-CoV-2スパイクポリペプチドの1つは、配列番号32に示されるS2G HR2である。野生型SARS-CoV-2スパイク外部ドメイン配列(配列番号3)と比較して、S2G HR2は、S1/S2切断部位配列⁶⁸²RRARSV⁶⁸⁷(配列番号31)がGSA GSV(配列番号18)で置き換えられる置換を含む。それはまた、HR1にK986G/V987G二重変異も含む。さらに、それはHR2領域(E1150~Q1208)が除去されている。本明細書に記載されるように、この操作されたSARS-CoV-2スパイク免疫原ポリペプチドは高純度三量体を生成し、スパイクの準安定性の実質的な低下を示した。これはまた、ELISAアッセイおよびバイオレイヤー干渉

40

50

法 (B L I) アッセイの両方において、スパイクに特異的な代表的 m A b に対してより高い親和性を示した。自己集合性ナノ粒子足場上にディスプレイされた場合、この操作されたタンパク質は、産生における満足のいく収率、純度、安定性および構造完全性を示したが、野生型スパイクおよび二重プロリン変異を有する広く使用されているスパイクは、いずれの N P 足場上でも発現することができなかった。N P によりディスプレイされる S 2 G H R 2 は、m A b / N a b のパネルに対して試験した場合も、改善された抗原性を示した。インビボで試験した場合、この操作されたスパイクをディスプレイする N P ワクチンはまた、対照 N P よりも最大 1 0 倍強い中和抗体応答を誘発した。

【 0 0 5 4 】

操作された S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質「 S 2 G H R 2 」 (配列番号 3 2) の配列を以下に示す。この配列では、N 末端リーダーはイタリック体で示し、変異した S 1 / S 2 切断部位には下線を付し、置換された ^{9 8 6} G G ^{9 8 7} 残基は下線を付してイタリック体で示す。

【 0 0 5 5 】

M F V F L V L L P L V S S Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P
D K V F R S S V L H S T Q D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F
D N P V L P F N D G V Y F A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I
V N N A T N V V I K V C E F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V
Y S S A N N C T F E Y V S Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G
Y F K I Y S K H T P I N L V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q
T L L A L H R S Y L T P G D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y
N E N G T I T D A V D C A L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R
V Q P T E S I V R F P N I T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S
N C V A D Y S V L Y N S A S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S
F V I R G D E V R Q I A P G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N
N L D S K V G G N Y N Y L Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P
C N G V E G F N C Y F P L Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H
A P A T V C G P K K S T N L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F
L P F Q Q F G R D I A D T T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T
P G T N T S N Q V A V L Y Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G
S N V F Q T R A G C L I G A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N
S P G S A G S V A S Q S I I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T
I S V T T E I L P V S M T K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F
C T Q L N R A L T G I A V E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G
F N F S Q I L P D P S K P S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D
C L G D I A A R D L I C A Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A
G T I T S G W T F G A G A A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N
Q K L I A N Q F N S A I G K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L
N T L V K Q L S S N F G A I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G
R L Q S L Q T Y V T Q Q L I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R
V D F C G K G Y H L M S F P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P
A I C H D G K A H F P R E G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N
T F V S G N C D V V I G I V N N T V Y D P L Q P E L D S F K

いくつかの操作された可溶性 S 免疫原ポリペプチドは、S A R S - C o V ウイルスに由来する。これらのポリペプチドのいくつかは、改変された S 1 / S 2 切断部位を含む。例示として、本発明の S A R S - C o V 免疫原ポリペプチドを操作するために使用される野生型可溶性 S 配列を、配列番号 1 または N 末端リーダー短縮可溶性 S 配列 (配列番号 7) に示す。他の実施形態では、使用される野生型可溶性 S 配列は、配列番号 1 または 7 の変異体、例えば、その実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体であり得る。U n i P r o t I D P 5 9 5 9 4 または G e n B a n k アクセション番号 N P _ 8 2

10

20

30

40

50

8851に基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用して、改変された配列は、S1/S2切断部位の不活性化をもたらすR667G置換を含み得る。切断部位の不活性化に加えて、可溶性SARS-CoV免疫原性ポリペプチドは、融合中の直鎖ヘリックスの形成を防止することによってターン領域の歪みを除去する、HR1領域における二重変異をさらに含み得る。様々な実施形態では、この二重変異は、K968G/V969G、K968P/V969P、K968G/V969PまたはK968P/V969Gであり得る。

【0056】

融合前S構造を安定化する上記の変異への追加またはその代替として、本発明のいくつかのSARS-CoV免疫原ポリペプチドは、HR2ドメインのかなりの部分または全体の欠失を含むことができる。例示するために配列番号1の例示的な可溶性SARS-CoV S配列を使用すると、この欠失はアミノ酸残基1132~1190(配列番号9)を包含し得る。様々な他の実施形態では、欠失は、配列番号1の最初の35、40、45、50、55またはそれ以上のC末端残基のランケーションであり得る。さらにいくつかの他の実施形態では、野生型可溶性S配列のC末端ランケーションは、HR2ドメインを超えて伸長し得る。これらの実施形態のいくつかでは、配列番号1の残基1121~1131(配列番号10)からなる領域の1つ以上の残基も欠失させることができる。これらの実施形態のいくつかでは、C末端短縮可溶性S配列は、例えば、配列番号1の残基1121~1131をトリペプチドモチーフ、GNSで置換することによって、挿入されたこのモチーフを含み得る。本明細書に記載されるように、このトリペプチドモチーフは、免疫原ポリペプチドがナノ粒子上にディスプレイされると、タンパク質収量を増加させるように機能する。いくつかの他の実施形態では、可溶性S配列は、N末端リーダー配列の短縮を有し得る。

【0057】

本発明のいくつかのSARS-CoV免疫原ポリペプチドでは、野生型可溶性S配列のさらなる変異を導入して、融合後S構造を不安定化することができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロリンおよび/またはグリシン置換を、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1の領域において操作することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊するように機能する。様々な実施形態では、変異は、S924P、T925P、A926P、S924G、T925GおよびA926Gを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のさらなるアミノ酸残基を、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1の領域内に挿入することができる。同様に、これらの挿入もまた、融合コアの螺旋パターンを破壊するように機能する。様々な実施形態では、挿入は、A924~A926の任意の残基間へのGまたはGSの挿入であり得る。

【0058】

いくつかの操作された可溶性S免疫原ポリペプチドは、MERS-CoVウイルスに由来する。これらのポリペプチドのいくつかは、改変されたS1/S2切断部位を含む。例示として、本発明のMERS-CoV免疫原ポリペプチドを操作するために使用される野生型可溶性S配列を、配列番号2またはN末端リーダー短縮可溶性S配列(配列番号11)に示す。他の実施形態では、使用される野生型可溶性S配列は、配列番号2または11の変異体、例えば、その実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体であり得る。UniProt ID R9UQ53またはGenBankアクセッション番号JX869059.2に基づくアミノ酸ナンバリングを参照として使用して、改変された配列は、S1/S2切断部位の不活性化をもたらすR748A/R751G二重変異を含み得る。切断部位の不活性化に加えて、可溶性MERS-CoV免疫原性ポリペプチドは、融合中の直鎖ヘリックスの形成を防止することによってターン領域の歪みを除去する、HR1領域の二重変異をさらに含み得る。様々な実施形態では、この二重変異は、V1060G/L1061G、V1060P/L1061P、V1060G/L1061PまたはV1060P/L1061Gであり得る。

【0059】

10

20

30

40

50

融合前S構造を安定化する上記の変異への追加またはその代替として、本発明のいくつかのMER S - C o V免疫原ポリペプチドは、HR 2ドメインのかなりの部分または全体の欠失を含むことができる。例示するために配列番号2の例示的な可溶性MER S - C o V S配列を使用すると、この欠失はアミノ酸残基1229 ~ 1291(配列番号13)を包含し得る。様々な他の実施形態では、欠失は、配列番号2の最初の35、40、45、50、55、60またはそれ以上のC末端残基のランケーションであり得る。いくつかの他の実施形態では、可溶性S配列は、N末端リーダー配列の短縮を有し得る。

【0060】

本発明のいくつかのMER S - C o V免疫原ポリペプチドでは、野生型可溶性S配列のさらなる変異を導入して、融合後S構造を不安定化することができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロリンおよび/またはグリシン置換を、HR 2と相互作用して融合コアを形成するHR 1の領域において操作することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊するように機能する。様々な実施形態では、変異は、T1013P、T1014P、T1015P、T1013G、T1014GおよびT1015Gを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のさらなるアミノ酸残基を、HR 2と相互作用して融合コアを形成するHR 1の領域内に挿入することができる。同様に、これらの挿入もまた、融合コアの螺旋パターンを破壊するように機能する。様々な実施形態では、挿入は、T1013 ~ T1015の任意の残基間へのGまたはGSの挿入であり得る。

【0061】

上記の様々な置換および欠失に加えて、本発明の操作されたコロナウイルス可溶性S免疫原ポリペプチドは、C末端に三量体化モチーフをさらに含むことができる。本発明に適した三量体化モチーフとしては、例えば、T4フィブリチンフォルドン(PDB ID: 4NCV)およびウイルスカプシドタンパク質SHP(PDB: 1TD0)が挙げられる。T4フィブリチン(フォルドン)は当技術分野において周知であり、バクテリオファージT4由来の三量体タンパク質フィブリチンのC末端30アミノ酸残基を構成し、フィブリチンの折り畳みおよび三量体化を促進するのに機能する。例えば、Papanikolopoulou et al., J. Biol. Chem. 279: 8991 - 8998, 2004; およびGuthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905 - 915, 2004を参照されたい。同様に、SHPタンパク質および機能的三量体化モチーフ(motif)としてのその使用は、当技術分野において周知である。例えば、Dreier et al., Proc Natl Acad Sci USA 110: E869 - E877, 2013; およびHanzelmann et al., Structure 24: 140 - 147, 2016を参照されたい。本明細書で例示される具体的なフォルドンおよびSHP配列は、GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL(フォルドン; 配列番号26)およびEVRI FAGNDPAHTATGSSG I S S P T P A L T P L M L D E A T G K L V V W D G Q K A G S A V G I L V L P L E G T E T A L T Y Y K S G T F A T E A I H W P E S V D E H K K A N A F A G S A L S H A A (1TD0; 配列番号27)である。いくつかの実施形態では、三量体化モチーフは、短いGSリンカーを介して再設計された可溶性S免疫原ポリペプチドに連結される。リンカーを含めることは、形成された三量体分子を安定化することを意図している。様々な実施形態では、リンカーは、GSの1 ~ 6個のタンデムリピートを含み得る。いくつかの実施形態では、例えばニッケルカラムの使用によるタンパク質精製を容易にするために、His 6タグを三量体化モチーフのC末端に付加することができる。

【0062】

上記のS2G HR 2に加えて、本発明の他の例示的な操作されたSARS - C o V - 2スパイクタンパク質を配列番号33 ~ 37に示す。配列番号33は、S2G HR 2からそのN末端リーダーを差し引いた配列である。この配列を、三量体化モチーフのフォルドン(配列番号26)および1TD0(配列番号27)に融合した配列を、それぞれ配列番号35および36に示す。これらの2つの融合配列のそれぞれにおいて、制限部位ASGが、操作されたスパイクタンパク質のC末端に導入され、その後、G4Sリンカーを介し

10

20

30

40

50

て三量体化モチーフのN末端に接続される。配列番号34は、HR1の交換を含有する配列番号33の変異体である。具体的には、HR1領域L922~S943は、SARS-CoV-1スパイクタンパク質由来の等価領域に置き換えられる。本明細書に例示されるように、このHR1が交換されたSARS-CoV-2スパイクタンパク質を含有する、三量体化モチーフ（例えば、1TD0）との融合物は、HR2ストークが除去された場合にのみ満足のいく免疫原特性をディスプレイした。そのような融合物の一例を配列番号37に示す。これらの例示された配列、実質的に同一な配列またはその保存的に改変された変異体のいずれも、SARS-CoV-2ワクチン、例えばナノ粒子足場ワクチンを開発するために本発明で使用することができる。

【0063】

10

操作されたSARS-CoV-2スパイクの配列：S2G HR2（マイナスN末端リーダー）（配列番号33）：

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
V N N T V Y D P L Q P E L D S F K

20

30

40

S2G HR2 - フォルドン融合物の配列（配列番号35）。当該配列において、導入された制限部位ASはイタリック体で示して下線を付し、G4Sリンカーはイタリック体で示し、フォルドン配列には下線を付してある。

【0064】

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L

50

VRDL P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y 10
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
 K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L 20
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S G Y I P E A P R D G Q A Y V R K
D G E W V L L S T F L

S 2 G HR 2 - 1 T D 0 融合物の配列（配列番号 3 6）。当該配列において、導入された制限部位 A S はイタリック体で示して下線を付し、G 4 S リンカーはイタリック体で示し、1 T D 0 配列には下線を付してある。

【 0 0 6 5 】

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q 30
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
 F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 VRDL P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L 40
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A 50

Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
 K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S E V R I F A G N D P A H T A T G
S S G I S S P T P A L T P L M L D E A T G K L V V W D G Q K A G S A V G I L V L
P L E G T E T A L T Y Y K S G T F A T E A I H W P E S V D E H K K A N A F A G S
A L S H A A

10

HR 1 が交換された S 2 G HR 2 の配列 (配列番号 3 4) : S A R s - C o V - 1 由
 来の HR 1 領域で置換した部分に下線を付してある。

【 0 0 6 6 】

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
 F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K Q I A N Q F N K A I S
Q I Q E S L T T T S T A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K

20

30

40

HR 1 を交換した S 2 G HR 2 と 1 T D 0 との融合配列 (配列番号 3 7)。当該配列
 において、導入された制限部位 A S はイタリック体で示して下線を付し、G₄S リンカー
 はイタリック体で示し、1 T D 0 配列には下線を付してある。

【 0 0 6 7 】

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E

50

F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N 10
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K Q I A N Q F N K A I S 20
 Q I Q E S L T T T S T A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S E V R I F A G N D P A H T A T G
S S G I S S P T P A L T P L M L D E A T G K L V V W D G Q K A G S A V G I L V L
P L E G T E T A L T Y Y K S G T F A T E A I H W P E S V D E H K K A N A F A G S
A L S H A A

IV. ナノ粒子ディスプレイコロナウイルスワクチン組成物

本発明は、コロナウイルスタンパク質に由来する少なくとも1つの免疫原ポリペプチドまたは三量体タンパク質をディスプレイする異種足場を含むワクチン組成物を提供する。いくつかの実施形態では、使用されるコロナウイルスS免疫原は、上記の様々な安定化変異を含む安定化可溶性Sポリペプチドである。いくつかの他の実施形態では、使用されるコロナウイルス免疫原は、コロナウイルスタンパク質のRBDドメインを含有するか、またはそれに由来する。後者の実施形態では、SpyTag/SpyCatcherライゲーション系が使用される。本明細書の実施例に詳述されているように、RBD配列は、SpyTagモチーフに融合することができ、ナノ粒子サブユニット配列は、SpyCatcherモチーフに融合することができる。あるいは、RBD配列は、SpyCatcherモチーフに融合することができ、ナノ粒子サブユニット配列は、SpyTagモチーフに融合することができる。例示されている実施形態では、使用されるRBD配列は、配列番号4~6のいずれか1つに示されている配列、またはその実質的に同一な、もしくはは保存的に改変された変異体を含む。SpyTag融合物およびSpyCatcher融合物を発現する2つの構築物を宿主細胞または産生細胞に導入すると、自己集合したナノ粒子へのRBDタンパク質のSpyTag/SpyCatcher媒介ライゲーションの結果として、表面に一連のRBDタンパク質をディスプレイするナノ粒子ワクチンが生成される。

【0068】

本発明のワクチンの構築において免疫原タンパク質またはポリペプチドを提示するために、任意の異種足場を使用することができる。これには、バクテリオファージQ V L

Pなどのウイルス様粒子(VLP)およびナノ粒子が含まれる。様々なナノ粒子プラットフォームを、本発明のワクチン組成物の作製に使用することができる。一般に、本発明で使用されるナノ粒子は、単一サブユニットの複数のコピーによって形成される必要がある。ナノ粒子は、典型的にはボール形状であり、および/または回転対称性(例えば、3倍軸および5倍軸を有する)を有し、例えば本明細書に例示される正二十面体構造を有する。追加的または代替的に、粒子サブユニットのアミノ末端は露出し、3倍軸に近接していなければならない。3つのアミノ末端の間隔は、ディスプレイされた三量体安定化可溶性Sタンパク質のカルボキシル末端の間隔と密接に一致しなければならない。

【0069】

様々な実施形態では、使用される自己集合性ナノ粒子は、約25nm以下(通常、12、24、または60個のサブユニット(subunit)から組み立てられる)の直径を有し、粒子表面に3倍軸を有する。このようなナノ粒子は、多価ワクチンを製造するのに適した粒子プラットフォームを提供する。いくつかの好ましい実施形態では、コロナウイルス免疫原タンパク質またはポリペプチドは、自己集合性ナノ粒子、例えば本明細書に例示されるフェリチン(FR)またはE2pに由来する自己集合性ナノ粒子上に提示され得る。本発明に適したナノ粒子の他の例としては、I3-01に由来するナノ粒子が挙げられる。当技術分野において周知であり、日常的に使用されているフェリチンは、すべての動物、細菌および植物に見られる球状タンパク質である。当技術分野において周知のように、それは主に、水和鉄イオンおよびプロトンの石灰化コアへの、および石灰化コアからの輸送を介して多核Fe(III)₂O₃形成の速度および位置を制御するように作用する。球状形態のフェリチンは、約17~20kDaの分子量を有するポリペプチドである単量体サブユニットタンパク質(単量体フェリチンサブユニットとも呼ばれる)で構成されている。E2pは、熱安定性60量体ナノ粒子に自己集合することが示されている、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のジヒドロリポイルアシルトランスフェラーゼの再設計された変異体である。例えば、He et al., *Nat. Commun.* 7: 12041, 2016を参照されたい。同様に、I3-01は、超安定ナノ粒子に自己集合することができる操作されたタンパク質である。例えば、Hsia et al., *Nature* 535, 136-139, 2016を参照されたい。これらのタンパク質のサブユニットの配列は当技術分野において公知である。例えば、国際公開第2017/192434号を参照されたい。様々なナノ粒子足場の構造的および機能的特性、ならびに三量体タンパク質免疫原の提示におけるそれらの使用に関するより詳細な情報は、当技術分野において提供されている。例えば、国際公開第2017/192434号、国際公開第2019/089817号および国際公開第2019/241483号を参照されたい。様々な実施形態では、本発明のコロナウイルスワクチン組成物は、これらの公知のナノ粒子のいずれか、ならびにそれらの保存的に改変された変異体または実質的に同一な(例えば、少なくとも90%、95%または99%同一)配列有する変異体を使用することができる。

【0070】

上記のナノ粒子配列に加えて、当技術分野において公知の多くの他のナノ粒子またはVLPも本発明の実施に使用することができる。これらには、例えば、アクイフェックス・エオリカス(*Aquifex aeolicus*)のルマジンシンターゼ、テルモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)のエンカプスリン、ミクソコッカス・キサントス(*Mycococcus xanthus*)のエンカプスリン、バクテリオファージQベータウイルス粒子、フロックハウスウイルス(*Flock House Virus*)(FHV)粒子、ORSAYウイルス粒子および感染性ファブリキウス嚢病ウイルス(*IBDV*)粒子が含まれる。

【0071】

いくつかの例示的な実施形態では、本発明のナノ粒子ワクチンは、配列番号23(I3-01v9)、配列番号24(E2p)または配列番号25(フェリチン)に示されるナノ粒子サブユニット配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一の配列を含

10

20

30

40

50

有する。典型的には、操作されたコロナウイルス免疫原ポリペプチドのC末端は、自己集合性ナノ粒子(NP)のサブユニットのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、操作されたコロナウイルスのポリペプチドのC末端は、GSリンカー配列、例えば、G₄S(GGGGS、配列番号21)または(G₄S)₂(GGGGSGGGGS;配列番号22)を介して自己集合性ナノ粒子のナノ粒子サブユニット配列に融合される。

【0072】

I3-01v9サブユニット配列(配列番号23)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALAVFVGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSLKELGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGFPPNVKFPVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTIAEVA AKA AAFVEKIRGCTE

10

E2pサブユニット配列(配列番号24)

AAAKPATTEGEFPE TREKMSGIRRAIAKAMVHSKHTAPHV TLMDEADVTKLVAHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALV SALREYPVLNTAIDDETEEIIQKHYYNIGIAADTD RGLLV PVIKHADRKPIFALAQEINELA EKARDGKLT PGEMK GASCTITNIGSAGGQWFTPVINHPEVA I L G I G R I A E K P I V R D G E I V A A P M L A L S L S F D H R M I D G A T A Q K A L N H I K R L L S D P E L L L M

20

フェリチン配列(配列番号25)

DI IKLLNEQV NKEMNS SNLYMSMS SWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHA KKLII FLNENNV PVQLT SISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISES INNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK

ディスプレイされた可溶性S免疫原以外に、本発明のナノ粒子ワクチン組成物は、より良好な生物学的または薬学的特性のための追加のモチーフを含むことができる。これらの追加の構成成分は、ナノ粒子の表面上の免疫原ディスプレイを促進し、ディスプレイされた免疫原の安定性を増強し、および/または自己集合型タンパク質ワクチンの収量および純度を改善するように機能し得る。これらの実施形態では、1つ以上のリンカー(リンカー配列、モチーフまたは部分)を使用して、構築物中の様々な構成成分を接続することができる。

30

【0073】

いくつかの実施形態では、本発明のナノ粒子ワクチンは、免疫原ポリペプチドを安定化するのに役立つタンパク質ドメイン、例えば上記のT4フィブリチンの三量化モチーフ(「フォルドン」)、または免疫原ポリペプチドをナノ粒子表面から上昇させるのに役立つタンパク質ドメイン、例えば3ヘリックスバンドル(「ネックドメイン」)、または免疫親和性精製を促進するのに役立つタンパク質ドメイン、例えば公知の結合抗体を有するタンパク質ドメインのコード配列を含むことができる。これらの配列は、免疫原ポリペプチド配列とナノ粒子サブユニット配列との間に付加することができる。

40

【0074】

これらの実施形態のいくつかでは、フォルドンおよびウイルスカプシドタンパク質SHP(PDB:1TD0)などの三量体化モチーフを、本明細書に例示する安定化可溶性Sタンパク質のC末端に付加することができる。上記のように、三量体化モチーフを短いGSリンカーを用いて挿入して、三量体をさらに安定化し、また総タンパク質収率内で三量体比率を増加させることができる。いくつかの実施形態では、化学的コンジュゲーションの活性部位として働くポリペプチド断片またはモチーフのコード配列を、構築物の適切な位置に挿入することができる。いくつかの実施形態では、CD4⁺Tヘルパーエピトープ

50

またはCD8⁺T細胞エピトープなどの追加の構成成分もまた、ナノ粒子構築物の適切な位置に挿入することができる。これらには、例えば、本明細書中に例示されるようなPADRE T-ヘルパーエピトープ(AKFVAAWTLKAAA;配列番号30)が含まれる。いくつかの例示の実施形態では、Tヘルパーエピトープは、ロックドメインのC末端に挿入することができ、次いでロックドメインは、後述するNPサブユニット配列のC末端に融合される。

【0075】

いくつかの実施形態では、本発明のナノ粒子ワクチンは、ナノ粒子を安定化するロックドメインを含むことができる。ロックドメインコード配列は、ナノ粒子サブユニットコード配列のC末端に直接または間接的に融合することができる。ロックドメインは、コロナウイルス免疫原ポリペプチドを提示するナノ粒子が製造、ワクチン製剤化および免疫化中に無傷のままであり得るように、ナノ粒子を内側から安定化する。このように構築されたナノ粒子ワクチン免疫原は、有意に増強された安定性を有する。一般に、本発明に適したロックドメインは、界面での非共有結合相互作用によって溶液中の別のタンパク質サブユニットと天然に二量体を形成することができるタンパク質サブユニットである。いくつかの好ましい実施形態では、2つのタンパク質サブユニットは、配列が同一であり、ホモ二量体を形成することができる。いくつかの他の実施形態では、2つのタンパク質サブユニットは、異なるタンパク質、または操作によって誘導された単一タンパク質の2つの異なるドメインであり得、界面での非共有結合相互作用によって溶液中でヘテロ二量体を形成することができる。典型的には、ロックドメインは、免疫原ポリペプチドが連結されているナノ粒子サブユニットに共有結合的に融合される。特定のロックドメインの例およびナノ粒子ディスプレイ三量体免疫原の構築におけるロックドメインの使用に関する指針は、当技術分野、例えば国際公開第2019/241483号に見出すことができる。いくつかの例示の実施形態では、使用されるLDは、配列番号28(LD4)または29(LD7)に示される配列、その保存的に改変された変異体または実質的に同一な配列を含む。

【0076】

ロックドメインLD4(配列番号28):

FSEEQKKA LD LAFYFDRRLTPEWRRYLSQRLGLNEEQIE
RWFRRKEQQIGW SHPQFEK

ロックドメインLD7(配列番号29):

SPAVDIGDR LDELEKALEALS AEDGHDDVGQRLES LLRR
WNSRRAD

本明細書に記載の安定化コロナウイルス可溶性Sタンパク質免疫原のいずれかをディスプレイするナノ粒子(例えば、安定化SARS-CoV-2可溶性S三量体免疫原)は、免疫原ポリペプチドまたは多量体免疫原タンパク質のサブユニット(例えば、三量体免疫原)を、ナノ粒子のサブユニット(例えば、E2pまたはI3-01サブユニット)、ならびに本明細書に記載の他の任意選択要素または代替要素(例えば、ロックドメインまたは三量化モチーフ)に融合することによって構築することができる。本発明のナノ粒子ディスプレイ融合ワクチン免疫原を構築するために、1つ以上のリンカーモチーフまたは部分を使用して、接続を容易にし、異なる成分の構造完全性を維持することができる。典型的には、リンカーモチーフは、短鎖ペプチド配列、例えばGSリッチペプチドを含む。様々な実施形態では、リンカーまたはリンカーモチーフは、それらの機能に干渉することなく2つのタンパク質ドメインまたはモチーフを接続する任意の柔軟なペプチドであり得る。例えば、使用されるリンカーは、(1)スパイクタンパク質およびナノ粒子足場配列、(2)スパイクタンパク質および三量体化モチーフ、ならびに/または(3)ナノ粒子足場配列およびロックドメイン配列を連結するための、本明細書に例示される5-aaのG4Sリンカー(配列番号21)または10-aaの(G4S)₂リンカー(配列番号22)であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に例示するように、ジペプチドGSリンカーを使用して、ロックドメインをTエピトープに接続することができる。本発明のワクチン組成物の組換え生産のための詳細な手順は、本明細書に記載のプロトコルおよび/

または当技術分野において記載されている他の方法、例えば、He et al., Nat. Comm. 7, 12041, 2016; Kong et al., Nat. Comm. 7, 12040, 2016; He et al., Sci Adv. 4(11): eaau6769, 2018; He et al., bioRxiv, 2020.2008.2022.262634, 2020; 国際公開第2017/192434号; 国際公開第2019/089817号および国際公開第2019/241483号に基づくことができる。

【0077】

本発明のいくつかの特定のナノ粒子ディスプレイSARS-CoV-2スパイクタンパク質の配列を配列番号38~40に例示する。配列番号38は、(G₄S)₂リンカーを介してナノ粒子配列I3-01v9(配列番号23)に接続されているリーダーレスS2GHR2(配列番号33)を含む融合配列である。このナノ粒子ディスプレイスパイクは、そのC末端にロックドメインLD7(配列番号29)およびPADRE Tエピトープ(配列番号30)をさらに含む。配列番号39は、G₄Sリンカーを介してナノ粒子配列E2p(配列番号24)に接続されているリーダーレスS2GHR2(配列番号33)を含む融合配列である。このナノ粒子ディスプレイスパイクは、そのC末端にロックドメインLD4(配列番号28)およびPADRE Tエピトープ(配列番号30)をさらに含む。配列番号40は、G₄Sリンカーを介してナノ粒子配列フェリチン(配列番号25)に接続されているリーダーレスS2GHR2(配列番号33)を含む融合配列である。これらの具体的に例示された融合構築物に加えて、本発明はまた、これらの例示されたナノ粒子ワクチン配列のいずれかと実質的に同一な変異体、または保存的に改変された変異体であるサブユニット配列を含有するSARS-CoV-2ナノ粒子ワクチンを包含する。

【0078】

3つの例示的なSARS-CoV-2ナノ粒子ワクチンの配列を以下の配列番号38~40に示す。これらの配列では、(1)スパイクタンパク質とナノ粒子サブユニット配列との間、(2)ナノ粒子サブユニット配列とロックドメインとの間、および(3)ロックドメインとTエピトープとの間のGSリンカーを太字で示し、ナノ粒子サブユニット配列には下線を付し、導入された制限部位ASをイタリック体で示して下線を付し、ロックドメイン配列はイタリック体で示し、Tエピトープ配列は下線を付して太字で示している。

【0079】

S2GHR2-10GS-I3-01v9-LD7-PADREの配列(配列番号38)。

【0080】

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSV L H S T Q
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
 F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G

A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
 K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S G G G G S M K M E E L F K K H K
I V A V L R A N S V E E A K M K A L A V F V G G V H L I E I T F T V P D A D T V
I K E L S F L K E L G A I I G A G T V T S V E Q C R K A V E S G A E F I V S P H
L D E E I S Q F C K E K G V F Y M P G V M T P T E L V K A M K L G H T I L K L F
P G E V V G P Q F V K A M K G P F P N V K F V P T G G V N L D N V C E W F K A G
V L A V G V G S A L V K G T I A E V A A K A A A F V E K I R G C T E G G G G S S
 P A V D I G D R L D E L E K A L E A L S A E D G H D D V G Q R L E S L L R R W N
 S R R A D G S A K F V A A W T L K A A A

10

20

ナノ粒子ワクチン S 2 G HR 2 - 5 G S - E 2 p - L D 4 - P A D R E の配列 (配列番号 3 9) :

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
 F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
 K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I

30

40

50

V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S A A A K P A T T E G E F P E T R
 E K M S G I R R A I A K A M V H S K H T A P H V T L M D E A D V T K L V A H R K
 K F K A I A A E K G I K L T F L P Y V V K A L V S A L R E Y P V L N T A I D D E
 T E E I I Q K H Y Y N I G I A A D T D R G L L V P V I K H A D R K P I F A L A Q
 E I N E L A E K A R D G K L T P G E M K G A S C T I T N I G S A G G Q W F T P V
 I N H P E V A I L G I G R I A E K P I V R D G E I V A A P M L A L S L S F D H R
 M I D G A T A Q K A L N H I K R L L S D P E L L L M G G G G S F S E E Q K K A L
 D L A F Y F D R R L T P E W R R Y L S Q R L G L N E E Q I E R W F R R K E Q Q I
 G W S H P Q F E K G S A K F V A A W T L K A A A

ナノ粒子ワクチンS2G HR2 - 5GS - フェリチンの配列 (配列番号40) :

Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D K V F R S S V L H S T Q
 D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D N P V L P F N D G V Y F
 A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V N N A T N V V I K V C E
 F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y S S A N N C T F E Y V S
 Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y F K I Y S K H T P I N L
 V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T L L A L H R S Y L T P G
 D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N E N G T I T D A V D C A
 L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R V Q P T E S I V R F P N I
 T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A
 S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R Q I A P
 G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L
 Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L
 Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N
 L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T
 T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P G T N T S N Q V A V L Y
 Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S N V F Q T R A G C L I G
 A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S P G S A G S V A S Q S I
 I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T I S V T T E I L P V S M T
 K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L T G I A V
 E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F N F S Q I L P D P S K P
 S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C L G D I A A R D L I C A
 Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G T I T S G W T F G A G A
 A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G
 K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A
 I S S V L N D I L S R L D G G E A E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T Q Q L
 I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L M S F
 P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A I C H D G K A H F P R E
 G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T F V S G N C D V V I G I
 V N N T V Y D P L Q P E L D S F K A S G G G G S D I I K L L N E Q V N K E M Q S
 S N L Y M S M S S W C Y T H S L D G A G L F L F D H A A E E Y E H A K K L I I F
 L N E N N V P V Q L T S I S A P E H K F E G L T Q I F Q K A Y E H E Q H I S E S
 I N N I V D H A I K S K D H A T F N F L Q W Y V A E Q H E E E V L F K D I L D K
 I E L I G N E N H G L Y L A D Q Y V K G I A K S R K S

V . ポリヌクレオチドおよび発現構築物

本発明の安定化コロナウイルス可溶性S免疫原タンパク質および関連するワクチン組成物は、典型的には、本明細書に記載の様々な構造成分の作動可能に連結されたコード配列を含む発現構築物 (すなわち、発現ベクター) を最初に作製することによって生成される。したがって、いくつかの関連する態様では、本発明は、本明細書に記載の免疫原またはナノ粒子ディスプレイ免疫原をコードする実質的に精製されたポリヌクレオチド (DNA または RNA) を提供する。本発明のいくつかのポリヌクレオチドは、本明細書に記載の

10

20

30

40

50

操作されたスパイク免疫原ポリペプチドのうちの一つ、例えば、配列番号32～37に示される安定化SARS-COV-2可溶性S免疫原をコードする。本発明のいくつかのポリヌクレオチドは、本明細書に記載のナノ粒子足場ワクチンの一つのサブユニット配列、例えば配列番号38～40に示される融合タンパク質配列をコードする。本発明の発現されたスパイク免疫原ポリペプチドは、典型的にはN末端リーダー配列を含まないが、本発明のポリヌクレオチド配列のいくつかは、天然スパイクタンパク質のリーダー配列をさらにコードする。したがって、例えば、操作されたSARS-COV-2スパイク免疫原ポリペプチド（例えば、配列番号33～37）またはナノ粒子足場ポリペプチド配列（例えば、配列番号38～40）をコードするポリヌクレオチドは、配列番号15に示される天然のリーダー配列、または実質的に同一な、もしくは保存的に改変された変異体配列をさらにコードすることができる。

10

【0081】

本発明ではまた、そのようなポリヌクレオチドを有する発現ベクター（例えば、本明細書に例示されるCMVベクター）およびワクチン免疫原を産生するための宿主細胞（例えば、本明細書に例示されるHEK293F、ExpicoCHOおよびCHO-S細胞株）も提供される。ポリヌクレオチドによってコードされる、またはベクターから発現される融合ポリペプチドも本発明に含まれる。本明細書に記載されるように、可溶性S免疫原ポリペプチドに融合したナノ粒子サブユニットは、その表面に免疫原ポリペプチドまたはタンパク質をディスプレイするナノ粒子ワクチンに自己集合する。

【0082】

ポリヌクレオチドおよび関連ベクターは、標準的な分子生物学技術または本明細書に例示するプロトコルを用いて容易に作製することができる。例えば、クローニング、トランスフェクション、一過性遺伝子発現および安定なトランスフェクト細胞株を得るための一般的なプロトコルは、当技術分野において記載されており、例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); およびBrent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbound, 2003)に記載されている。PCRによるポリヌクレオチド配列への変異の導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19: 967, 1991; およびEckert et al., *PCR Methods and Applications* 1: 17, 1991に記載のように実施することができる。

20

30

【0083】

特定のベクターの選択は、融合ポリペプチドの意図される使用に依存する。例えば、選択されたベクターは、その細胞型が原核生物であるか真核生物であるかにかかわらず、所望の細胞型における融合ポリペプチドの発現を駆動することができなければならない。多くのベクターは、作動可能に連結された遺伝子配列の原核生物ベクター複製および真核生物発現の両方を可能にする配列を含む。本発明に有用なベクターは自律的に複製することができ、すなわち、ベクターは染色体外に存在し、その複製は必ずしも宿主細胞のゲノムの複製に直接連結されない。あるいは、ベクターの複製は、宿主の染色体DNAの複製に連結されてもよく、例えば、ベクターは、レトロウイルスベクターおよび安定にトランスフェクトされた細胞株によって達成されるように、宿主細胞の染色体に組み込まれてもよい。ウイルスに基づく発現ベクターおよび非ウイルス発現ベクターの両方を、哺乳動物宿主細胞において免疫原を産生するために使用することができる。非ウイルスのベクターお

40

50

よび系には、プラスミド、典型的にはタンパク質またはRNAを発現するための発現カセットを有するエピソーマルベクター、およびヒト人工染色体（例えば、Harrington et al., Nat. Genet. 15: 345, 1997）が含まれる。有用なウイルスベクターとしては、レンチウイルスまたは他のレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルスに基づくベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林ウイルス（SFV）が挙げられる。Brent et al., 上記; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; および Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992を参照されたい。

10

【0084】

融合ポリペプチドを発現させるために使用される特定のベクターに応じて、種々の公知の細胞または細胞株を本発明の実施に使用することができる。宿主細胞は、本発明の融合物を有担持する組換えベクターが導入され得る任意の細胞であり得、ベクターは、本発明に有用な融合ポリペプチドの発現を駆動することができる。それは、原核生物、例えばいくつかの細菌株のいずれかであってもよく、または真核生物、例えば酵母もしくは他の真菌細胞、昆虫もしくは両生類細胞、または例えばげっ歯類、サルもしくはヒト細胞を含む哺乳動物細胞であってもよい。本発明の融合ポリペプチドを発現する細胞は、初代培養細胞であってもよく、または確立された細胞株であってもよい。したがって、本明細書に例示される細胞株（例えば、CHO細胞）に加えて、当技術分野において周知の多数の他の宿主細胞株も本発明の実施に使用することができる。これらには、例えば、様々なCos細胞株、HeLa細胞、Sf9細胞、HEK293、AtT20、BV2およびN18細胞、骨髓腫細胞株、形質転換B細胞およびハイブリドーマが含まれる。

20

【0085】

ポリペプチドを発現させるための哺乳動物組織細胞培養物の使用は、一般に、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987で考察されている。融合ポリペプチド発現ベクターは、当業者に公知のいくつかの適切な方法のいずれかによって、選択された宿主細胞に導入され得る。融合ポリペプチドをコードするベクターの哺乳動物細胞への導入について、使用される方法はベクターの形態に依存する。プラスミドベクターの場合、融合ポリペプチド配列をコードするDNAは、例えば、脂質媒介性トランスフェクション（「リポフェクション」）、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿を含むいくつかのトランスフェクション方法のいずれかによって導入され得る。これらの方法は、例えば、Brentら、上記に詳述されている。多種多様な形質転換細胞および非形質転換細胞または初代細胞の一過性トランスフェクションに適したリポフェクションの試薬および方法が広く利用可能であり、リポフェクションを、真核生物細胞、特に培養中の哺乳動物細胞に構築物を導入する魅力的な方法にしている。例えば、LipofectAMINE（商標）（Life Technologies）またはLipoTaxi（商標）（Stratagene）キットが利用可能である。リポフェクションのための試薬および方法を提供する他の会社には、Bio-Rad Laboratories、CLONTECH、Glen Research、Life Technologies、JBL Scientific、MBI Fermentas、PanVera、Promega、Quantum Biotechnologies、Sigma-AldrichおよびWako Chemicals USAが含まれる。

30

40

【0086】

組換え融合ポリペプチドの長期高収率生産のためには、安定な発現が好ましい。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）、および選択マーカーによって制御される融合ポリペプチドをコードする配列を用いて

50

宿主細胞を形質転換することができる。組換えベクター中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がベクターをそれらの染色体に安定に組み込み可能にする。一般的に使用される選択マーカーには、アミノグリコシド G - 4 1 8 に対する耐性を付与する neo (Colberre - Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150: 1, 1981); およびハイグロマイシンに対する耐性 (Santerre et al., Gene, 30: 147, 1984) を付与する hygro が含まれる。適切な選択により、トランスフェクトされた細胞は、融合ポリペプチドコード配列の組み込まれたコピーを含み得る。

【0087】

V I . 医薬組成物および治療適用

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の再設計されたコロナウイルス S 免疫原およびナノ粒子ワクチン組成物を使用する医薬組成物および関連する治療方法を提供する。様々な実施形態では、医薬組成物は、操作されたウイルススパイクタンパク質または R B D ポリペプチド、ナノ粒子足場ウイルススパイク免疫原、ならびに本明細書に記載の操作されたウイルススパイク免疫原またはナノ粒子ワクチンをコードするポリヌクレオチド配列またはベクターを含有することができる。いくつかの実施形態では、異なるウイルス (例えば、SARS - COV - 2) に対する可溶性 S 三量体免疫原を、対応するウイルス感染症を予防および治療するために使用することができる。様々な他の実施形態では、本明細書に記載の異なるウイルス性または非ウイルス性免疫原を含有するナノ粒子ワクチンを使用して、対応する疾患、例えば様々なコロナウイルスによって引き起こされる感染症を予防または治療することができる。本発明のいくつかの実施形態は、ヒト対象における SARS - COV - 2 感染症を予防または治療するための SARS - COV - 2 免疫原またはワクチンの使用に関する。本発明のいくつかの実施形態は、SARS - CoV 感染症を予防または治療するための SARS - CoV 免疫原またはワクチンの使用に関する。本発明のいくつかの実施形態は、MERS - CoV 感染症を予防または治療するための MERS - CoV 免疫原またはワクチンの使用に関する。

【0088】

本発明の様々な治療方法の実施において、疾患または状態 (例えば、SARS - COV - 2 感染症) の予防または治療を必要とする対象には、本明細書に記載の対応するナノ粒子ワクチン、免疫原タンパク質もしくはポリペプチド、またはコードポリヌクレオチドが投与される。典型的には、本明細書に開示のナノ粒子ワクチン、免疫原タンパク質またはコードポリヌクレオチドは、医薬組成物に含まれる。医薬組成物は、治療用製剤または予防用製剤のいずれかであり得る。典型的には、組成物は、1 つ以上の薬学的に許容されるビヒクルおよび任意選択的に他の治療成分 (例えば、抗ウイルス薬) をさらに含むことができる。様々な薬学的に許容される添加剤も組成物に使用することができる。

【0089】

したがって、本発明の医薬組成物のいくつかはワクチン組成物である。ワクチン組成物の場合、適切なアジュバントをさらに含めることができる。適切なアジュバントの例としては、例えば、水酸化アルミニウム、レシチン、フロイントアジュバント、MPL (商標) および IL - 12 が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のワクチン組成物またはナノ粒子免疫原 (例えば、SARS - COV - 2 ワクチン組成物) は、制御放出製剤または持続放出製剤として製剤化することができる。これは、徐放性ポリマーを含有する組成物で、またはマイクロカプセル化送達系もしくは生体接着性ゲルを介して達成することができる。様々な医薬組成物は、当技術分野で周知の標準的な手順に従って調製することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978); 米国特許第 4, 652, 441 号および第 4, 917, 893 号; 米国特許第 4

10

20

30

40

50

、677、191号および第4、728、721号；ならびに米国特許第4、675、189号を参照されたい。

【0090】

本発明の医薬組成物は、種々の治療的または予防的適用に、例えば、対象におけるSARS-CoV-2感染症の治療またはSARS-CoV-2に対する免疫応答の誘発のために容易に使用することができる。様々な実施形態では、ワクチン組成物は、ナノ粒子ワクチン中のディスプレイされた免疫原ポリペプチドが由来する病原体によって引き起こされる感染症を治療または予防するために使用することができる。したがって、本発明のワクチン組成物は、様々なウイルスによって引き起こされる感染症を治療または予防するための多様な臨床状況で使用することができる。例示として、SARS-CoV-2ナノ粒子ワクチン組成物を対象体に投与して、SARS-CoV-2に対する免疫応答を誘導する、例えばウイルスに対する広域中和抗体の産生を誘導することができる。SARS-CoV-2感染症を発症するリスクがある対象には、本発明のワクチン組成物を投与して、ウイルス感染症に対する予防的防御を提供することができる。本明細書に記載の他の免疫原に由来するワクチンの治療的および予防的適用も同様に行うことができる。具体的な対象および状態に応じて、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の様々な投与様式、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内、関節内、腹腔内または非経口経路によって対象に投与することができる。

10

【0091】

一般に、医薬組成物は、そのような治療を必要とする対象に、選択された疾患もしくは状態またはその1つ以上の(1または複数の)症状を予防、阻害および/または改善するのに十分な時間および条件下で投与される。様々な実施形態では、本発明の治療方法は、コロナウイルス(例えば、SARS-CoV、SARS-CoV-2、またはMERS-CoV)の宿主細胞、例えばヒト宿主細胞への侵入を遮断する方法、コロナウイルスのSタンパク質が宿主受容体に結合するのを防ぐ方法、およびコロナウイルス感染症にしばしば関連する急性呼吸窮迫を治療する方法に関する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療方法および組成物は、コロナウイルス感染症を治療または予防するのに有用な他の公知の治療剤および/またはモダリティと組み合わせて使用することができる。公知の治療剤および/またはモダリティには、例えば、ヌクレアーゼアナログまたはプロテアーゼ阻害剤(例えば、レムデシビル)、1つ以上のコロナウイルスに対するモノクローナル抗体、免疫抑制薬または抗炎症薬(例えば、サリルマブまたはトシリズマブ)、ACE阻害薬、血管拡張薬、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

20

30

【0092】

治療適用のために、組成物は、治療有効量の本明細書に記載のナノ粒子免疫原を含有すべきである。予防適用のために、組成物は、予防有効量の本明細書に記載のナノ粒子免疫原を含有すべきである。免疫原の適切な量は、治療または予防される特定の疾患または状態、対象の重症度、年齢、および特定の対象の他の個人属性(例えば、対象の健康の一般的な状態および対象の免疫系の口バスタ性)に基づいて決定することができる。有効投与量の決定は、動物モデル研究、続くヒト臨床試験によってさらさらに導かれ、対象における標的疾患の症状または状態の発生または重症度を有意に低下させる投与プロトコルによって導かれる。

40

【0093】

予防適用のために、免疫原組成物は、任意の症状の前に、例えば感染の前に提供される。免疫原組成物の予防的投与は、任意のその後の感染症を予防または改善するのに役立つ。したがって、いくつかの実施形態では、治療される対象は、例えばウイルス(例えば、SARS-CoV-2)への曝露または曝露の可能性のために、感染症(例えば、SARS-CoV-2感染症)を有するか、または感染症を発症するリスクがある対象である。治療有効量の開示の治療用組成物を投与した後、対象を、感染症(例えば、SARS-CoV-2感染症)、感染症(例えば、SARS-CoV-2感染症)に関連する症状、またはその両方についてモニターすることができる。

50

【 0 0 9 4 】

治療適用のために、免疫原組成物は、疾患または感染の症状の発症時または発症後、例えば感染症（例えば、SARS-CoV-2感染症）の症状の発症後、または感染症の診断後に提供される。したがって、免疫原組成物は、感染症および/または関連する疾患症状の予想される重症度、持続期間または程度を軽減するために、ウイルスへの予想される曝露の前に、ウイルスへの曝露もしくは曝露の疑いの後に、または感染症の実際の開始の後に提供することができる。本発明の医薬組成物は、関連する病原体による感染症（例えば、SARS-CoV-2感染症）を治療または予防するための当技術分野で公知の他の薬剤と組み合わせることができる。

【 0 0 9 5 】

本発明に記載の新規な構成成分を含有するナノ粒子ワクチン組成物（例えば、SARS-CoV-2ワクチン）または本発明の医薬組成物は、キットの構成要素として提供することができる。そのようなキットは、包装、取り扱い説明書および様々な他の試薬、例えば緩衝液、基質、抗体またはリガンド、例えば対照抗体またはリガンドおよび検出試薬を含む追加の構成要素を含んでもよい。任意選択の取り扱い説明シートをキットに追加で提供することができる。

【 0 0 9 6 】

[実施例]

以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるが、本発明を限定するものではない。

【 0 0 9 7 】

[実施例 1]

S抗原の安定化、生成および精製

この実施例は、再設計された安定で可溶性のコロナウイルスS三量体を記載する：

I. SARS-CoV :

SARS-CoV Sタンパク質の配列を、GenBankからID NP_828851で入手した。ナンバリングは、UniProt ID P59594のUniProtの定義に基づく。可溶性S構築物は、M1-Q1190として定義される。Q1190は、1191YIK1193モチーフで始まる予測された膜貫通領域のすぐ上流にある。短縮可溶性S構築物はM1-K1131として定義され、これはHR2を欠いている。HR2の欠失は、HR1/HR2融合コアを破壊し、融合前S構造を安定化する。S構築物は、Y1120においてさらに短縮し、Y1120に3残基の「GNS」モチーフ（MERS-CoV S由来）を付加することができる。この改変は、ナノ粒子上にディスプレイされた場合、タンパク質収量を有意に増加させる。

【 0 0 9 8 】

切断されていない、融合前に最適化された（UFO）S構築物は、（a）HR1と中心ヘリックス（CH）との間にR667G変異およびK968P/V969P（またはK968G/V969G）二重変異を加えることによって得ることができる。R667G変異はS1/切断部位を除去することを目的としているが、K968P/V969P二重変異は融合前S構造を安定化することが示されている。HR1-ターン-CHを強固にする代わりに、K968G/V969G二重変異は、ターン領域のすべての歪みを除去し、その結果、融合前S構造を安定化することを目的とする。

【 0 0 9 9 】

上記のUFO S構築物は、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1領域にプロリン変異（S924P、T925P、またはA926P）、グリシン変異（S924G、T925G、またはA926G）またはそれらの組み合わせを導入することによってさらに安定化することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊し、融合後Sを不安定化するように機能する。領域S924~A926に1つまたは2つの残基（例えば、GまたはGS）を挿入して螺旋パターンを破壊するなどの他の変異も、融合後Sを不安定化し、コンフォメーション変化を防ぐことができる。

10

20

30

40

50

【0100】

T4フィブリチンフォルドン（PDB ID：4NCV）およびウイルスカプシドタンパク質SHP（PDB：1TD0）などの三量体化モチーフを、短いGSリンカーを間に挟んで上記の再設計されたS構築物のC末端にさらに付加して、三量体を安定化することができる。さらに、ニッケルカラムを使用するタンパク質精製を容易にするために、His6タグを三量体化モチーフのC末端に付加することができる。

【0101】

再設計されたSARS-CoV-UFO S構築物のC末端をナノ粒子形成サブユニット（フェリチン24量体および2つの60量体、E2pおよびI3-01）のN末端に融合させることができ、その結果、融合構築物は、適切な細胞株で発現された場合、ナノ粒子表面に融合前S三量体をディスプレイしたナノ粒子に自己集合することができる。

10

【0102】

SARS-CoV可溶性S配列（配列番号1）：

MFIFLLFLTLLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRG
 VYYPDEIFRSDTLYLTLQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNP
 VIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSIIINN
 STNVVIRACNFE LCDNPF FAVSKPMGTQTHTMIFDNAFNC
 TFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGF LYVYKG
 YQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLGINITNFRAILTAFS
 PAQDIWGTSA AAYFVGYLKPTTFMLKYDENG TITDAVDCS
 QNPLAELKCSVK SFEIDKGIYQTSNFRVVP S G DVVRFPNI
 TNLCPFG EVFNATKFP SVYAWERKKISNCVADYSVLYNST
 FFSTFKCYGVSATK LNDLCFSNVYADSFVVKGD D V R Q I A P
 GQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKY
 YRYLRHGKLRPFERDISNVPFS PDGKPC T P P A L N C Y W P L N
 DYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFEL LNAPATVCGPKLSTD L
 IKNQCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFPFQQFGRDVSDF T
 DSVRDPKTSEILDISP C A F G G V S V I T P G T N A S S E V A V L Y Q
 DVNCTD V S T A I H A D Q L T P A W R I Y S T G N N V F Q T Q A G C L I G A
 EHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTM
 SLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVM P V S M A K T S V D
 CNMYICGDSTECANLLQYGSFCTQLNRALS G I A A E Q D R N
 TREVFAQVKQMYKTP TLKYFGGFNF S Q I L P D P L K P T K R S F
 IEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINARDL I C A Q K F N G
 LTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAA L Q I P
 FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQES
 LTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVL
 NDILSR LDKVEAEVQIDRLITGR L Q S L Q T Y V T Q Q L I R A A E
 IRASANLAATKMSECVLGQS KRVDFCGKGYHLMSPQAAP
 HGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFV
 NGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTV
 YDPLQPELDSFKEELD K Y F K N H T S P D V D L G D I S G I N A S V V
 NIQKEIDRLNEVAKNL NESLIDLQELGKYE Q

20

30

40

SARS-CoV可溶性S配列マイナスN末端リーダー（配列番号7）：配列番号1の残基14～1190。

【0103】

リーダー配列（配列番号8）：MFIFLLFLTLLTSG（配列番号1の残基1～3）。

【0104】

HR2配列（配列番号9）：配列番号1の残基1132～1190

50

E E L D K Y F K N H T S P D V D L G D I S G I N A S V V N I Q K E I D R L N E
V A K N L N E S L I D L Q E L G K Y E Q

さらなる短縮C末端配列（配列番号10）：

D P L Q P E L D S F K（配列番号1の残基1121～1131）。

【0105】

I I . M E R S - C o V :

M E R S - C o V Sタンパク質の配列を、GenBankからID JX869059.2で入手した。ナンバリングは、UniProt ID R9UQ53のUniProtの定義に基づく。

【0106】

可溶性S構築物は、M1-Y1291として定義される。Y1291は、¹²⁹²Y N K¹²⁹⁴モチーフで始まる予測された膜貫通領域のすぐ上流にある。短縮可溶性S構築物はM1-S1226として定義され、これはHR2を欠いている。HR2の欠失は、HR1/HR2融合コアを破壊し、融合前S構造を安定化する。

10

【0107】

切断されていない融合前最適化(UFO)S構築物は、R748A/R751G二重変異およびV1060P/L1061P（またはV1060G/L1061G）二重変異を加えることによって得ることができる。R748A/R751G二重変異はS1/S2切断部位を除去することを目的としているが、V1060P/L1061P二重変異は融合前S構造を安定化することが示されている。HR1-ターン-CHを強固にする代わりに、V1060G/L1061G二重変異は、ターン領域のすべての歪みを除去し、その結果、融合前S構造を安定化することを目的とする。

20

【0108】

UFO S構築物は、HR2と相互作用して融合コアを形成するHR1領域にプロリン変異(T1013P、T1014PまたはT1015P)、グリシン変異(T1013G、T1014GまたはT1015G)またはそれらの組み合わせを導入することによってさらに安定化することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊し、融合後Sを不安定化するものである。領域T1013～T1015に1つまたは2つの残基（例えば、GまたはGS）を挿入して螺旋パターンを破壊するなどの他の変異も、融合後Sを不安定化し、コンフォメーション変化を防ぐものである。

30

【0109】

T4フィブリチンフォルドン(PDB ID: 4NCV)およびウイルスカプシドタンパク質SHP(PDB: 1TD0)などの三量体化モチーフを、短いGSリンカーを間に挟んで上記の再設計されたUFO S構築物のC末端に付加して、三量体を安定化することができる。ニッケルカラムによるタンパク質精製を容易にするために、His6タグを三量体化モチーフのC末端に付加することができる。

【0110】

再設計されたMERS-CoV UFO S構築物のC末端をナノ粒子形成サブユニットのN末端に融合させることができ、その結果、融合構築物は、適切な細胞株で発現された場合、ナノ粒子表面に融合前S三量体をディスプレイしたナノ粒子に自己集合することができる。

40

【0111】

M E R S - C o V 可溶性S（配列番号2）：

M I H S V F L L M F L L T P T E S Y V D V G P D S V K S A C I E V D I Q Q T F
F D K T W P R P I D V S K A D G I I Y P Q G R T Y S N I T I T Y Q G L F P Y Q G
D H G D M Y V Y S A G H A T G T T P Q K L F V A N Y S Q D V K Q F A N G F V V R
I G A A A N S T G T V I I S P S T S A T I R K I Y P A F M L G S S V G N F S D G
K M G R F F N H T L V L L P D G C G T L L R A F Y C I L E P R S G N H C P A G N
S Y T S F A T Y H T P A T D C S D G N Y N R N A S L N S F K E Y F N L R N C T F
M Y T Y N I T E D E I L E W F G I T Q T A Q G V H L F S S R Y V D L Y G G N M F

50

Q F A T L P V Y D T I K Y Y S I I P H S I R S I Q S D R K A W A A F Y V Y K L Q
 P L T F L L D F S V D G Y I R R A I D C G F N D L S Q L H C S Y E S F D V E S G
 V Y S V S S F E A K P S G S V V E Q A E G V E C D F S P L L S G T P P Q V Y N F
 K R L V F T N C N Y N L T K L L S L F S V N D F T C S Q I S P A A I A S N C Y S
 S L I L D Y F S Y P L S M K S D L S V S S A G P I S Q F N Y K Q S F S N P T C L
 I L A T V P H N L T T I T K P L K Y S Y I N K C S R L L S D D R T E V P Q L V N
 A N Q Y S P C V S I V P S T V W E D G D Y Y R K Q L S P L E G G G W L V A S G S
 T V A M T E Q L Q M G F G I T V Q Y G T D T N S V C P K L E F A N D T K I A S Q
 L G N C V E Y S L Y G V S G R G V F Q N C T A V G V R Q Q R F V Y D A Y Q N L V
 G Y Y S D D G N Y Y C L R A C V S V P V S V I Y D K E T K T H A T L F G S V A C 10
 E H I S S T M S Q Y S R S T R S M L K R R D S T Y G P L Q T P V G C V L G L V N
 S S L F V E D C K L P L G Q S L C A L P D T P S T L T P R S V R S V P G E M R L
 A S I A F N H P I Q V D Q L N S S Y F K L S I P T N F S F G V T Q E Y I Q T T I
 Q K V T V D C K Q Y V C N G F Q K C E Q L L R E Y G Q F C S K I N Q A L H G A N
 L R Q D D S V R N L F A S V K S S Q S S P I I P G F G G D F N L T L L E P V S I
 S T G S R S A R S A I E D L L F D K V T I A D P G Y M Q G Y D D C M Q Q G P A S
 A R D L I C A Q Y V A G Y K V L P P L M D V N M E A A Y T S S L L G S I A G V G
 W T A G L S S F A A I P F A Q S I F Y R L N G V G I T Q Q V L S E N Q K L I A N
 K F N Q A L G A M Q T G F T T T N E A F Q K V Q D A V N N N A Q A L S K L A S E
 L S N T F G A I S A S I G D I I Q R L D V L E Q D A Q I D R L I N G R L T T L N 20
 A F V A Q Q L V R S E S A A L S A Q L A K D K V N E C V K A Q S K R S G F C G Q
 G T H I V S F V V N A P N G L Y F M H V G Y Y P S N H I E V V S A Y G L C D A A
 N P T N C I A P V N G Y F I K T N N T R I V D E W S Y T G S S F Y A P E P I T S
 L N T K Y V A P Q V T Y Q N I S T N L P P P L L G N S T G I D F Q D E L D E F F
 K N V S T S I P N F G S L T Q I N T T L L D L T Y E M L S L Q Q V V K A L N E S
 Y I D L K E L G N Y T Y

MERS - CoV 可溶性 S 配列 マイナス N 末端リーダー (配列番号 11) : 配列番号 2 の残基 18 ~ 1291。

【0112】

リーダー配列 (配列番号 12) : M I H S V F L L M F L L T P T E S (配列番号 2 の残基 1 ~ 17)。

【0113】

HR2 配列 (配列番号 13) : 配列番号 2 の残基 1227 ~ 1291

T G I D F Q D E L D E F F K N V S T S I P N F G S L T Q I N T T L L D L T Y E
M L S L Q Q V V K A L N E S Y I D L K E L G N Y T Y

I I I . S A R S - C o V - 2 :

SARS - CoV - 2 S タンパク質の配列を、GenBank から ID MN908947.3 で入手した。アミノ酸ナンバリングは、PDB ID 6VSB の cryo-EM モデルに基づく。

【0114】

可溶性 S 構築物は、M1 - Q1208 として定義される。Q1208 は、¹²⁰⁹Y I K¹²¹¹モチーフで始まる予測された膜貫通領域のすぐ上流にある。短縮可溶性 S 構築物は M1 - K1149 として定義され、これは HR2 を欠いている。HR2 の欠失は、HR1 / HR2 融合コアを破壊し、融合前 S 構造を安定化する。S 構築物は、Y1138 においてさらに短縮し、Y1138 に 3 残基の「GNS」モチーフ (MERS - CoV S 由来) を付加することができる。この改変は、ナノ粒子上にディスプレイされた場合、タンパク質収量を有意に増加させる。

【0115】

切断されていない融合前最適化 (UFO) 可溶性 S 構築物は、改変された S1 / S2 切断部位 ⁶⁸²G S A G S V⁶⁸⁷ (配列番号 18) および K986P / V987P (ま

10

20

30

40

50

たはK 9 8 6 G / V 9 8 7 G) 二重変異を有するM 1 - Q 1 2 0 8として定義される。SARS - CoV - 2は、S 1 / S 2切断部位^{6 8 1} P R R A^{6 8 4}の前に4 - a aの挿入を有し、これにより切断効率が高まる。改変^{6 8 2} G S A G S V^{6 8 7} (配列番号18)は、S 1 / S 2切断部位を除去することを目的としており、K 9 8 6 P / V 9 8 7 P二重変異は融合前S構造を安定化することが示されている。HR 1 - ターン - CHを強固にする代わりに、K 9 8 6 G / V 9 8 7 G二重変異は、ターン領域のすべての歪みを除去し、その結果、融合前S構造を安定化することを目的とする。

【0116】

(b)のSARS - CoV - 2 UFO S構築物は、HR 2と相互作用して融合コアを形成するHR 1領域にプロリン変異(A 9 4 2 P、S 9 4 3 PおよびA 9 4 4 P)、グリシン変異(A 9 4 2 G、S 9 4 3 GおよびA 9 4 4 G)またはそれらの組み合わせを導入することによってさらに安定化することができる。これらの変異は、6ヘリックスバンドル融合コアを破壊し、融合後Sを不安定化するものである。領域A 9 4 2 ~ A 9 4 4に1つまたは2つの残基(例えば、GまたはGS)を挿入して螺旋パターンを破壊するなどの他の変異も、融合後Sを不安定化し、コンフォメーション変化を防ぐものである。

10

【0117】

T 4フィブリチンフォルドン(PDB ID : 4NCV)およびウイルスカプシドタンパク質SHP(PDB : 1TD0)などの三量体化モチーフを、短いGSリンカーを間に挟んで、(b)および(c)の再設計されたS構築物のC末端に付加して、三量体を安定化することができる。ニッケルカラムによるタンパク質精製を容易にするために、His 6タグを三量体化モチーフのC末端に付加することができる。

20

【0118】

上記の再設計されたSARS - CoV - 2 UFO S構築物のC末端をナノ粒子形成サブユニットのN末端に融合させることができ、その結果、融合構築物は、適切な細胞株で発現された場合、ナノ粒子表面に融合前S三量体をディスプレイしたナノ粒子に自己集合することができる。

【0119】

SARS - CoV - 2可溶性S (配列番号3) :

```

M F V F L V L L P L V S S Q C V N L T T R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P
D K V F R S S V L H S T Q D L F L P F F S N V T W F H A I H V S G T N G T K R F
D N P V L P F N D G V Y F A S T E K S N I I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I
V N N A T N V V I K V C E F Q F C N D P F L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V
Y S S A N N C T F E Y V S Q P F L M D L E G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G
Y F K I Y S K H T P I N L V R D L P Q G F S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q
T L L A L H R S Y L T P G D S S S G W T A G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y
N E N G T I T D A V D C A L D P L S E T K C T L K S F T V E K G I Y Q T S N F R
V Q P T E S I V R F P N I T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S
N C V A D Y S V L Y N S A S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S
F V I R G D E V R Q I A P G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N
N L D S K V G G N Y N Y L Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P
C N G V E G F N C Y F P L Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H
A P A T V C G P K K S T N L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E S N K K F
L P F Q Q F G R D I A D T T D A V R D P Q T L E I L D I T P C S F G G V S V I T
P G T N T S N Q V A V L Y Q D V N C T E V P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G
S N V F Q T R A G C L I G A E H V N N S Y E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N
S P R R A R S V A S Q S I I A Y T M S L G A E N S V A Y S N N S I A I P T N F T
I S V T T E I L P V S M T K T S V D C T M Y I C G D S T E C S N L L L Q Y G S F
C T Q L N R A L T G I A V E Q D K N T Q E V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G
F N F S Q I L P D P S K P S K R S F I E D L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D
C L G D I A A R D L I C A Q K F N G L T V L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A

```

30

40

50

G T I T S G W T F G A G A A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N
 Q K L I A N Q F N S A I G K I Q D S L S S T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L
 N T L V K Q L S S N F G A I S S V L N D I L S R L D K V E A E V Q I D R L I T G
 R L Q S L Q T Y V T Q Q L I R A A E I R A S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R
 V D F C G K G Y H L M S F P Q S A P H G V V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P
 A I C H D G K A H F P R E G V F V S N G T H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N
 T F V S G N C D V V I G I V N N T V Y D P L Q P E L D S F K E E L D K Y F K N H
 T S P D V D L G D I S G I N A S V V N I Q K E I D R L N E V A K N L N E S L I D
 L Q E L G K Y E Q

SARS-CoV-2 可溶性 S 配列 マイナス N 末端リーダー (配列番号 14) : 配列番号 3 の残基 14 ~ 1208。 10

【0120】

リーダー配列 (配列番号 15) : M F V F L V L L P L V S S (配列番号 3 の残基 1 ~ 13)。

【0121】

HR2 配列 (配列番号 9) : 配列番号 3 の残基 1150 ~ 1208

E E L D K Y F K N H T S P D V D L G D I S G I N A S V V N I Q K E I D R L N E
 V A K N L N E S L I D L Q E L G K Y E Q

さらなる短縮 C 末端配列 (配列番号 10) :

D P L Q P E L D S F K (配列番号 3 の残基 1121 ~ 1131)

20

[実施例 2]

コロナウイルスの設計された RBD ドメイン

I. SARS-CoV RBD ベースのワクチン :

SARS-CoV S タンパク質の配列およびアミノ酸ナンバリングは上記に記載されている。RBD ベースのワクチン設計に使用される SARS-CoV RBD は、P317 ~ D518 (配列番号 4 を参照されたい) として定義される。具体的には、三量体化モチーフであるウイルスカプシドタンパク質 SHP (PDB: 1TD0) を、短い 5GS リンカーを間に挟んで、SARS-CoV RBD の C 末端に付加して、RBD を三量体コンフォメーションにおいて安定化することができる。精製を容易にするために、His6 タグを三量体化モチーフの C 末端に 1GS リンカーを用いて付加することができる。 30

【0122】

SpyTag および SpyCatcher は、ナノ粒子上の RBD の多価ディスプレイを容易にするために、異なる組み合わせで SARS-CoV RBD およびナノ粒子サブユニットに結合させることができる。例えば、RBD の C 末端が 5GS リンカーを用いて SpyTag の N 末端に融合させる場合、SpyCatcher の C 末端を 5GS リンカーを用いてナノ粒子サブユニットの N 末端に融合させて対を作製することができる。SpyTag および SpyCatcher は、これらの 2 つの構築物で取り替えて、異なる対を作製することができる。SpyTag または SpyCatcher は、5GS リンカーを用いて RBD の N 末端に融合することもできる。2 つの構築物が宿主細胞に導入されて発現されると、SpyTag モチーフと SpyCatcher モチーフとの間の結合によって組換えワクチンタンパク質が形成される。 40

【0123】

SARS-CoV RBD (配列番号 4)

P N I T N L C P F G E V F N A T K F P S V Y A W E R K K I S N C V A D Y S V L
 Y N S T F F S T F K C Y G V S A T K L N D L C F S N V Y A D S F V V K G D D V R
 Q I A P G Q T G V I A D Y N Y K L P D D F M G C V L A W N T R N I D A T S T G N
 Y N Y K Y R Y L R H G K L R P F E R D I S N V P F S P D G K P C T P P A L N C Y
 W P L N D Y G F Y T T T G I G Y Q P Y R V V V L S F E L L N A P A T V C G P K L
 S T D

SpyTag : V P T I V M V D A Y K R Y K (配列番号 16)。

50

【0124】

Spy Catcher : 配列番号 17

AMVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEEDGR
ELAGATMELRDS SSGKTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVE
TAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGEATKGD AHTAS

II . MERS - CoV RBD ベースのワクチン :

MERS - CoV Sタンパク質の配列およびアミノ酸ナンバリングは、上記で示されている。RBD ベースのワクチン設計に使用される MERS - CoV RBD は、E382 ~ K587 (配列番号 5 を参照されたい) として定義される。三量体化モチーフであるウイルスカプシドタンパク質 SHP (PDB : 1TD0) を、短い 5GS リンカーを間に挟んで、MERS - CoV RBD の C 末端に付加して、RBD を三量体コンフォメーションにおいて安定化することができる。精製を容易にするために、His6 タグを三量体化モチーフの C 末端に 1GS リンカーを用いて付加することができる。

10

【0125】

Spy Tag および Spy Catcher は、ナノ粒子上の RBD の多価ディスプレイを容易にするために、異なる組み合わせで MERS - CoV RBD およびナノ粒子サブユニットに結合させることができる。例えば、RBD の C 末端が 5GS リンカーを用いて Spy Tag の N 末端に融合させる場合、Spy Catcher の C 末端を 5GS リンカーを用いてナノ粒子サブユニットの N 末端に融合させて対を作製することができる。Spy Tag および Spy Catcher は、これらの 2 つの構築物で取り替えて、異なる対を作製することができる。Spy Tag または Spy Catcher は、5GS リンカーを用いて RBD の N 末端に融合することもできる。2 つの構築物が宿主細胞に導入されて発現されると、Spy Tag モチーフと Spy Catcher モチーフとの間の結合によって組換えワクチンタンパク質が形成される。

20

【0126】

MERS - CoV RBD (配列番号 5)

ECDFSPLLSGT PPQVYNFKRLVFTNCNYNLT KLLSLFSV
NDFTC SQISPA A IASNCYSS LILDYFSYPLSMKSDLSVSS
AGPISQFN YKQSFSNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI
NKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSI V PSTVWEDGDY
YRKQLS PLEGGWLVA S GSTVAMTEQLQMGGITVQYGT D
TNSVCPK

30

Spy Tag : VPTIVMVDAYKRYK (配列番号 16)。

【0127】

Spy Catcher : 配列番号 17 :

AMVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEEDGR
ELAGATMELRDS SSGKTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVE
TAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGEATKGD AHTAS

III . SARS - CoV - 2 RBD ベースのワクチン :

SARS - CoV - 2 Sタンパク質の配列およびアミノ酸ナンバリングは上記に記載されている。RBD ベースのワクチン設計に使用される SARS - CoV - 2 RBD は、P330 ~ N532 (配列番号 6 を参照されたい) として定義される。三量体化モチーフであるウイルスカプシドタンパク質 SHP (PDB : 1TD0) を、短い 5GS リンカーを間に挟んで、SARS - CoV - 2 RBD の C 末端に付加して、RBD を三量体コンフォメーションにおいて安定化することができる。精製を容易にするために、His6 タグを三量体化モチーフの C 末端に 1GS リンカーを用いて付加することができる。

40

【0128】

Spy Tag および Spy Catcher は、ナノ粒子上の RBD の多価ディスプレイを容易にするために、異なる組み合わせで SARS - CoV - 2 RBD およびナノ粒子サブユニットに結合させることができる。例えば、RBD の C 末端が 5GS リンカーを用

50

いてSpyTagのN末端に融合させる場合、SpyCatcherのC末端を5GSリンカーを用いてナノ粒子サブユニットのN末端に融合させて対を作製することができる。SpyTagおよびSpyCatcherは、これらの2つの構築物で取り替えて、異なる対を作製することができる。SpyTagまたはSpyCatcherは、5GSリンカーを用いてRBDのN末端に融合することもできる。2つの構築物が宿主細胞に導入されて発現されると、SpyTagモチーフとSpyCatcherモチーフとの間の結合によって組換えワクチンタンパク質が形成される。

【0129】

SARS-CoV-2 RBD (配列番号6) :

P N I T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N C V A D Y S V L 10
 Y N S A S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G D E V R
 Q I A P G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N
 Y N Y L Y R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C
 Y F P L Q S Y G F Q P T N G V G Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K
 K S T N

SpyTag : V P T I V M V D A Y K R Y K (配列番号16)。

【0130】

SpyCatcher : 配列番号17 :

A M V T T L S G L S G E Q G P S G D M T T E E D S A T H I K F S K R D E D G R 20
 E L A G A T M E L R D S S G K T I S T W I S D G H V K D F Y L Y P G K Y T F V E
 T A A P D G Y E V A T A I T F T V N E Q G Q V T V N G E A T K G D A H T A S

[実施例3]

S三量体およびRBDドメインの作製および精製

細胞株 : すべての構築物をHEK293 F細胞およびExpichO細胞で発現させ、ExpichOは有意に高い収率を示した。

【0131】

精製 : 一過性発現後、His6-タグ/ニッケルカラムおよび抗原特異的抗体カラムを含む3つの方法を使用して、上清からS抗原を精製した。S230およびCR3022抗体カラムを使用して、SARS-CoV SおよびRBD抗原ならびにナノ粒子を精製することができる。MCA1抗体カラムを使用して、MERS-CoV S抗原およびRBD抗原ならびにナノ粒子を精製することができ、CR3022抗体カラムを使用して、SARS-CoV-2 SおよびRBD抗原ならびにナノ粒子を精製することができる。 30

【0132】

[実施例4]

足場RBD三量体およびRBD提示SApNPの合理的設計

本発明者らは、三量体足場に結合したRBDが「RBD-アップ型」スパイクコンフォメーションを模倣し、NAbを誘発してACE2結合を遮断できると仮定した。この可能性を試験するために、本発明者らは、SARS-CoV-1/2 RBD、短い5-aaのG4Sリンカー(2-aaの制限部位を有する)および三量体ウイルスカプシドタンパク質のSHP(PDB:1TD0)を含む融合構築物を設計した。構造モデリングは、3つの繋がれたRBDが92の三角形を形成し(L492について測定)、これはそれぞれ、SARS-CoV-1「2-RBD-アップ型」スパイク(PDB:6CRX、L478について測定)およびMERS-CoV「全-RBD-アップ型」スパイク(PDB:5X59、L506について測定)よりも14および18広く、各RBDへのNAbアクセスを可能にすることを示した。次いで、本発明者らは、タグなしワクチン精製を容易にするためにイムノアフィニティークロマトグラフィー(IAC)カラムを開発した。以前から、NAb由来IACカラムが、HIV-1 Env三量体/NP、C型肝炎ウイルス(HCV)E2コア/NP、およびエボラウイルス(EBOV)GP三量体/NPを精製するために使用されてきた。SARS-CoV-1 NAbであるCR3022は、SARS-CoV-2 RBDに結合し得ることが報告されていた(Tian et 40 50

al., *Emerg. Microbes Infect.* 9, 382-385, 2020)。SARS-CoV-2 RBD/CR3022の構造により、2つのSARS-CoVによって共有されるエピトープが明らかになり、RBDへのCR3022の結合を可能にするスパイクの呼吸運動 (breathing motion) が示唆された。ここで、本発明者らは、IACカラムにおけるCR3022の有用性を調べた。SARS-CoV-1/2 RBD-5GS-1TD0構築物を100ml ExpiCHO細胞において一過性に発現させ、CR3022抗体カラム、次いでSuperdex 200 10/300 GLカラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で精製した。SARS-CoV-1 RBD構築物はSECプロファイルにおいて凝集体 (8.6 ml) および三量体 (12.7 ml) の両方のピークを示したが、SARS-CoV-2 RBD構築物は12.8 mlにおいて単一の三量体ピークを生成した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) では、還元条件下および非還元条件下でそれぞれ約37 kDのモノマーバンドおよび約100 kDの三量体バンドが観察された。抗原性を、2つの足場RBD三量体について、CR3022/SEC精製後に酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で評価した。SARS-CoV-1 (CR3022、m396、80RおよびS230) およびSARS-CoV-2 (SARS生存者由来のB38、CB6、S309、およびP2B-2F6) を標的とするRBD特異的NAbをELISAで試験した。全体として、同様の50%効果濃度 (half maximal effective concentration) (EC₅₀) 値が、それらのそれぞれのNAbに結合する2つのRBD三量体について観察された。SARS-CoV-1 RBD三量体は、そのSARS-CoV-2対応物よりも高い結合親和性をCR3002に対して示し、EC₅₀値に1.3倍の差があった。SARS-CoV-2 NAbのうち、B38はCR3022と同様のEC₅₀値をもたらした。抗体結合の動態を、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を使用して測定した。全体として、試験したすべての抗体は、速い会合速度 (on-rate) を示したが、解離速度 (off-rate) に目に見える差があった。例えば、B38は、他のSARS-CoV-2 NAbよりも速い解離速度を示したが、SARS-CoV-1/2 RBDタンパク質を精製するために使用される抗体であるCR3022は、同等の動態プロファイルを示した。

【0133】

次いで、本発明者らは、SpyTag/SpyCatcher (または単にSPY) 系を使用してRBDをSApNPに結合させ、より強力なNAb応答を誘発することができる多価RBDワクチンを作製できると仮定した。13-aaのSpyTagは、SpyCatcherタンパク質と自発的に反応して不可逆的なイソペプチド結合を形成する。SPY系は、抗原をSApNPおよびVLPに結合させるために使用されてきた。ここでは、両方とも5-aaのG₄Sリンカーを用いて、SpyTagをRBDのC末端に融合し、SpyCatcherをSApNPサブユニットのN末端に融合した。この設計を最初にFRについて試験した。本発明者らは、RBD-5GS-SpyTagとSpyCatcher-5GS-FRとの同時発現と別々の発現後の上清混合物との2つの生成戦略を比較し、CR3022カラムで精製を行った。50-mlのExpiCHO細胞における一過性トランスフェクションから得られたタンパク質を、Superose 6 10/300 GLカラムでSECによって分析した。両方の生成戦略は、SApNPに対応するピーク (12 ml) をもたらした。SARS-CoV-2構築物は、粒子収率においてそのSARS-CoV-1対応物よりも顕著に優れていたが (CR3022/SEC後0.6~1.0 mg対0.3~0.5 mg)、上清混合物は共発現よりも優れているようであった。それにもかかわらず、結果は、両方の戦略が、優良医薬品製造基準 (GMP) 適合チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞におけるRBDコンジュゲートSApNPの産生に使用できることを示唆している。SECにより精製したRBD-5GS-SPY-5GS-FR SApNPについて抗原性を評価した。ELISAにおいて、RBD提示SApNPは、より低いEC₅₀値によって示されるように、わずかに改善されたmAb結合を示した。BLIでは、抗原性についての多価ディスプレイのより顕著な効果が

観察され、顕著に増加した結合シグナルおよび定常解離を示した。

【0134】

様々なRBD SApNPの構造完全性を、ネガティブ染色EMによって分析した。SARS-CoV-1については、SApNPの産生が非常に少なかったRBD-10GS-FR構築物を、比較のために含めた。対照的に、RBD-5GS-SPY-5GS-FR構築物は、目に見える表面装飾を有するSApNPを産生した。SARS-CoV-2について、精製RBD-5GS-SPY-5GS-FR SApNPは、生成戦略に関係なく、十分に形成されたナノ粒子に対応する形態を示した。同様の戦略に従って、SARS-CoV-1/2 RBDも多層I3-01v9 SApNPに結合させた(He et al., bioRxiv, 2020.2008.2022.262634, 2020) 10

【0135】

要約すると、本発明者らは、RBDベースのSApNPワクチンの迅速な開発のためのSPY系の有用性を実証する。2成分RBD SApNPと比較して、ここに提示されるSPY連結RBD SApNPは、安定性および製造可能性の点でより有利であり得る。

【0136】

[実施例5]

準安定性を最小化することによる融合前スパイクの合理的設計

SARS-CoV-2スパイクの準安定性を理解し、それに基づいてワクチン抗原として最適なスパイクを設計することが不可欠である。本発明者らは最初に、2P変異と、G4Sリンカーを用いてC末端に融合した三量化モチーフ(1TD0)との両方を含む、SARS-CoV-1/2のためのHisタグ化非切断スパイク外部ドメイン(SECTO)構築物を作製した。これらの2つの構築物を50mlのExp CHO細胞において一過性に発現させ、続いてニッケルカラムまたはCR3022カラムで精製した。S2PECTO-5GS-1TD0-His₆タンパク質を、Superose 6 10/300GLカラムでのSECによって特性評価した。ニッケルカラムの後、両方のS2PECTO構築物は、三量体ピーク(約12ml)およびそれぞれ凝集体および二量体/単量体種を示す左右の肩部を示した。CR3022精製は、一貫した三量体ピークおよびより少ない二量体/単量体種をもたらした。次に、本発明者らは、二重グリシン変異(V1060G/L1061G、2Gと呼ばれる)を含む一对のSECTO構築物を試験した。2G変異は、それぞれニッケルおよびCR3022カラムによる精製後に、SARS-CoV-1スパイクにはほとんど影響を及ぼさなかったが、異常なSECプロファイルを生じ、SARS-CoV-2スパイクについては収量を示さなかった。最後に、S2G HR2と呼ばれる、HR2ストーク(E1150~Q1208)を有さない一对のS2G変異体を試験した。HR2ストークの欠失は、CR3022精製時のSECプロファイルによって示されるように、SARS-CoV-2三量体ピークを回復させ、両方のSARS-CoV-2について凝集体を減少させた。 20 30

【0137】

本発明者らは、HR2がSARS-CoVスパイクの準安定性の重要な決定因子であり得ると仮定した。2つの隣接スパイクのHR1とHR2との間の相互作用は、ACE2結合およびS1解離に加えて、融合前から融合後への移行を促進し得る可能性がある。SARS-CoV-1と比較したHR1の広範な変異(合計9)を考慮して、本発明者らは、2つのHR1交換スパイク構築物を用いてSARS-CoV-2スパイクの準安定性におけるHR1の役割を調べることを試みた。興味深いことに、HR1交換は効果的でないことが証明されたが、HR2ストークの欠失は再び三量体ピークを回復させる。したがって、S2G HR2は、SARS-CoV-1/2およびおそらく他のCoVの一般的なスパイク設計を提供する。300mlのExp CHO細胞におけるSARS-CoV-2 S2G HR2-5GS-1TD0の4回の個別の生成実行は、0.8~1.0mgの三量体収率でほぼ同一のSECプロファイルをもたらした。青色天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)により、SEC画分にわたるS2G HR2スパイクの純 40 50

度が確認された。新たに生成された S A R S - C o V - 2 S 2 P E C T O および S 2 G H R 2 スパイクについて抗原性を評価した。E L I S A では、S 2 G H R 2 スパイクは、5 つの代表的な m A b に対して S 2 P E C T O スパイクよりも一貫して高い親和性を示した。3 つの新たに同定された N A b である、C 1 0 5 および C C 1 2 . 1 / C C 1 2 . 3 に対して試験した場合、2 つのスパイクは同様の E C 5 0 値をもたらした。B L I では、S 2 G H R 2 スパイクは、最高濃度において S 2 P E C T O スパイクよりも高い結合シグナルを示したが、同様の結合動態を示した。スパイク精製のために N A b P 2 B - 2 F 6 を使用すると、S E C 画分にわたって C R 3 0 2 2 カラムと同様の純度ではるかに高い三量体収率をもたらした。

【 0 1 3 8 】

まとめると、本発明者らは、H R 2 ストークの欠失がスパイク特性を改善すると思われる、S 2 G H R 2 が 2 P 変異を改善するより良好なスパイク抗原を提供し得ることを実証する。

【 0 1 3 9 】

[実施例 6]

単一成分で多層の S A p N P の合理的設計

S P Y 系を使用して三量体 S A R S - C o V - 2 スパイクを S A p N P にコンジュゲートさせることが可能であることが証明されたが、ランダムかつ不可逆的な化学的連結は、表面上に占有されていないが空間的に閉塞された固定部位を有する不規則なディスプレイをもたらす。S P Y 系は、おそらく R B D などの個々の抗原により適している。したがって、本発明者らは、遺伝子融合アプローチを使用して、単一成分、多層、自己集合性スパイクナノ粒子の合理的な設計を得ることに着手した。

【 0 1 4 0 】

天然の S A R S - C o V - 2 ビリオンは、融合前および融合後の両方のスパイクを表面に提示する。本発明者らのワクチン戦略は、それぞれ免疫系に 8 個または 2 0 個の安定な S 2 G H R 2 スパイクを提示する単一成分多層 S A p N P を開発することを目的とする。この可能性を探索するために、本発明者らは、5 - a a の G 4 S リンカーを用いて F R 上、5 - a a の G 4 S リンカーを用いて E 2 p 上、および 1 0 - a a の (G 4 S) 2 リンカーを用いて I 3 - 0 1 v 9 上の S 2 G H R 2 スパイクをモデル化し、それぞれ 4 7 . 9 n m 、 5 5 . 9 n m および 5 9 . 3 n m の直径を有する大きな S A p N P を得た。3 つの S 2 G H R 2 S A p N P 構築物を 4 0 0 m l の E x p i C H O 細胞において一過性に発現させ、続いて C R 3 0 2 2 精製および S u p e r o s e 6 1 0 / 3 0 0 G L カラムでの S E C を行った。F R および E 2 p S A p N P について低 m . w . の不純物の変動が観察されたにもかかわらず、3 つの別個の生成実行は、3 つすべての構築物について非常に一貫した S E C プロファイルを生成した。C R 3 0 2 2 / S E C 精製後、本発明者らは、S 2 G H R 2 - 5 G S - F R 、 S 2 G H R 2 - 5 G S - E 2 p - L D 4 - P A D R E (または E 2 p - L 4 P) 、 および S 2 G H R 2 - 1 0 G S - I 3 - 0 1 v 9 - L D 7 - P A D R E (または I 3 - 0 1 v 9 - L 7 P) について、平均 0 . 3 ~ 0 . 4 m g 、 0 . 1 5 ~ 0 . 2 5 m g 、 および 0 . 3 ~ 0 . 3 5 m g の S A p N P を得た。全体として、S 2 G H R 2 - 1 0 G S - I 3 - 0 1 v 9 - L 7 P は、収率、純度および製造の安定性の点で最も優れていると思われた。

【 0 1 4 1 】

C R 3 0 2 2 / S E C 精製 S A p N P の構造完全性はネガティブ染色 E M によって特性評価され、モデリングと一致した 4 0 ~ 6 0 n m の範囲の良好に形成された粒子を示した。スパイクは、S A p N P 表面上に容易に認識することができる。S 2 G H R 2 提示 S A p N P の抗原性を、m A b / N A b の同じパネルを使用して評価した。E L I S A では、3 つの S A p N P は、個々のスパイクと比較して、すべてではないが一部の抗体への結合がわずかに改善されたことを示した。B L I では、本発明者らは、ピーク結合シグナルと抗原価との間の明確な相関を観察し、順位は E 2 p / I 3 - 0 1 v 9 > F R > スパイクであった。二つの 6 0 量体のディスプレイは、2 4 量体の F R と比較して抗体結合が有意

10

20

30

40

50

に改善された。

【0142】

要約すると、表面に8個または20個のスパイクを有するこれらの大きなVLPサイズのSApNPは、インビボ評価のための有望なワクチン候補を提供する。

【0143】

[実施例7]

SARS-CoV-1/2ワクチン誘導性結合抗体応答

選択されたSARS-CoV-1/2 RBDベースの免疫原およびスパイクベースの免疫原をBALB/cマウスにおいて評価して、ワクチン誘導性抗体応答を評価した(図2)。5匹のマウスの群を3週間間隔で4回免疫化した。すべてのワクチン抗原を、I3-01v9 SApNPを除いて、水中油型エマルジョンアジュバントであるAddavaxと共に製剤化し、I3-01v9 SApNPはリン酸アルミニウム(AP)と共に製剤化した。本発明者らは最初に、2つのSARS-CoV-2 RBDワクチン群において50%効果希釈(half maximal effective dilution)(ED₅₀)によって測定される結合抗体応答の長期分析を行った。この研究の結果を図3に示す。RBD SApNP(RBD-5GS-SPY-5GS-FR)は、被覆抗原にかかわらず、w2およびw5において、足場RBD三量体(RBD-5GS-1TD0)よりも有意に高いED₅₀力価を誘発し、RBDが被覆された場合、w8において0.0009のP値を示した。安定化スパイク(S2G HR2-5GS-1TD0)と比較して、RBD SApNPは、w2、w5、およびw8においてRBDに対して有意に高いED₅₀力価を誘発し、強い「エピトープ集束」効果を実証した。マウス血清は、SARS-CoV-2スパイクよりED₅₀力価が低いが、同様のパターンでSARS-CoV-1スパイクに結合した。次いで、本発明者らは、2つのSARS-CoV-2スパイク、S2PECTO-5GS-1TD0およびS2G HR2-5GS-1TD0、ならびにそれぞれ8個または20個のS2G HR2スパイクをディスプレイする3つのSApNPによって誘導された結合抗体応答の長期分析を行った。S2G HR2スパイクは、被覆抗原に関係なく、S2PECTOスパイクよりも2~3倍高い平均ED₅₀力価を誘発し、より大きな免疫原性を示した(注、公平な比較を容易にするために、2つのスパイク群からのマウス血清をそれぞれのスパイクに対して試験した)。

【0144】

3つのSApNPは、被覆抗原に応じて異なる時間的パターンを示した。スパイクを被覆抗原として使用した場合、I3-01v9群は、経時的に平均ED₅₀力価の着実な増加を示した。このSApNPは、w2およびw8の2つの時点で最も高い平均ED₅₀力価をもたらし、すべての時点でS2PECTOスパイクを有意に上回った。より小さいFRは、低い平均ED₅₀力価で同様の時間的パターンを示し、これは依然としてS2PECTO群のそれよりも有意に高い。3つのSApNPの中で、E2pは、w2において最も低い平均ED₅₀力価を示し、w5において最も高くなり、w8においてわずかに減少した。RBD特異的応答に関して、5つの群は、それらの平均ED₅₀力価に基づいて明確な順位付けを示し、これは時間点にわたって一貫したままであった。w2において、I3-01v9は175の平均ED₅₀力価を誘発したが、他のすべてのスパイクベースのワクチン群はRBD特異的応答をほとんど示さなかった。w5およびw8において、S2G HR2は、S2PECTOよりも高いED₅₀力価(平均で2倍)を誘発したが、3つすべてのSApNPは、個々のS2G HR2スパイクよりも優れており、ED₅₀力価の順位付けはそれらのサイズと相関していた(FR < E2p < I3-01v9)。血清は、より低いレベルではあるが、同様にSARS-CoV-1スパイクと反応した。

【0145】

最後に、本発明者らは、3つのSARS-CoV-1ワクチン、S2PECTOスパイク(S2PECTO-5GS-1TD0)、足場RBD三量体(RBD-5GS-1TD0)、およびRBD SApNP(RBD-5GS-SPY-5GS-FR)によって誘導された結合抗体応答を比較した。ED₅₀力価に基づいて、SARS-CoV-1

S 2 P E C T O スパイクは S A R S - C o V - 2 S 2 G H R 2 スパイクよりも免疫原性が高いように見えたが、S A R S - C O V - 1 R B D S A p N P はその S A R S - C O V - 2 対応物よりも有利ではなかった。S A R S - C o V - 2 S 2 P E C T O スパイクとの血清反応性は、3 つすべての S A R S - C o V - 1 ワクチン群で観察された。

【0146】

したがって、本発明者らの結果は、R B D S A p N P がスパイクと比較して同様またはより高いレベルで R B D 特異的抗体力価を誘発できることを示している。さらに、S 2 G H R 2 スパイクは、その優れたインビトロ特性に加えて、広く使用されている S 2 P E C T O スパイクよりも免疫原性が高い。大きな多層 E 2 p および I 3 - 0 1 v 9 S A p N P は、本発明者らの以前の H I V - 1、H C V、およびエボラワクチン研究における知見と一致して、すべてのスパイクベースのワクチンの中で最も優れている。

【0147】

[実施例 8]

S A R S - C o V - 1 / 2 ワクチン誘導性 N A b 応答

C O V I D - 1 9 ワクチン開発における 1 つの主要な目標は、S A R S - C o V - 2 感染症から防御できる強力な N A b 応答を生成することである。偽粒子 (S A R S - C o V - 1 / 2 - p p) 中和アッセイを使用して、異なるワクチン候補によって誘発された血清 N A b 応答を評価した。図 4 に示す結果から示されるように、本発明者らは最初に、2 つの S A R S - C o V - 2 R B D ワクチン群において 5 0 % 阻害希釈 (h a l f m a x i m a l i n h i b i t o r y d i l u t i o n) (I D 5 0) によって測定される N A b 応答の長期分析を行った。R B D S A p N P は、w 2 という早い時期に自己 S A R S - C o V - 2 に対して低力価の N A b 応答を誘発し、その後の 2 つの時点でその利点を保持し、このことは、そのような R B D S A p N P ワクチンがワクチン接種時に迅速な N A b 応答を誘発し得ることを示唆している。足場 R B D 三量体群は、w 5 において最も低い平均 I D 5 0 力価を示したが、w 8 において安定化 S 2 G H R 2 スパイクによって誘導されたものに匹敵する N A b 応答を示した。S A R S - C o V - 1 - p p アッセイでは、幾分異なるパターンが観察された。最初の時点 w 2 では、いずれのワクチン群も検出可能な異種 N A b 応答を示さなかった。w 5 および w 8 において、S 2 G H R 2 スパイクは、両方の R B D ベースのワクチンよりも強力な S A R S - C o V - 1 N A b 応答を誘発し、非 R B D エピトープが交差中和に寄与し得ることを示唆した。

【0148】

次いで、本発明者らは、5 つのスパイクベースのワクチンによって誘導された N A b 応答の長期分析を行った。自己中和に関して、スパイクベースのワクチンは、1 回目の注射後の w 2 においていかなる S A R S - C o V - 2 - p p N A b 応答も誘発しなかった。しかし、w 5 および w 8 においては血清中和について一貫したパターンが観察された：現在人体試験でほとんどすべてのワクチン候補に使用される S 2 P E C T O スパイクは、w 5 および w 8 でそれぞれ 8 7 9 および 2 4 8 1 の最低平均 I D 5 0 力価を示し；新たに設計された S 2 G H R 2 スパイクは、平均 I D 5 0 力価が S 2 P E C T O スパイクよりも 2 . 8 ~ 6 . 7 倍高い、より強い N A b 応答を誘導し、2 P から 2 G への置換および H R 2 ストークの欠失の有益な効果が確認された；3 つの S A p N P の中で、E 2 p が w 5 において最も優れており、S 2 P E C T O より 9 . 7 倍高く、S 2 G H R 2 より 1 . 4 倍高い 8 4 9 3 の平均 I D 5 0 力価を示し、一方、I 3 - 0 1 v 9 は w 8 において最も強力な N A b 応答を示し、S 2 P E C T O および S 2 G H R 2 よりそれぞれ 7 倍および 2 . 5 倍高い 1 7 3 5 1 の平均 I D 5 0 力価を示した。N A b 応答の同様の時間的パターンが異種 S A R S - C o V - 1 - p p アッセイで観察された。I 3 - 0 1 v 9 S A p N P は、w 2 において 3 5 1 の平均 I D 5 0 力価で S A R S - C o V - 1 N A b 応答を誘発したが、他のすべての群は検出可能な中和を示さなかったことは注目に値する。それにもかかわらず、本発明者らの結果は、S A R S - C o V - 2 S 2 G H R 2 ベースのワクチン、特に S A p N P が両方の S A R S - C o V - 1 / 2 に対する防御を提供し得ることを示唆している。最後に、本発明者らは、3 つの S A R S - C o V - 1 ワクチンによって誘

導された N A b 応答の長期分析を行った。自己 S A R S - C o V - 1 - p p アッセイでは、S 2 P E C T O スパイクおよび R B D S A p N P は、w 2 および w 5 において、足場 R B D 三量体よりも有意に強力な N A b 応答を誘導し、3 つすべてのワクチン群は、w 8 において同様の I D 5 0 力価を示した。しかしながら、異種 S A R S - C o V - 2 中和は、w 2、w 5 および w 8 において 3 つの S A R S - C o V - 1 ワクチンについてベースラインレベル未満またはベースラインレベルであった。

【0149】

したがって、本発明者らの結果は、N A b 誘発における S 2 P E C T O スパイクに対する S 2 G H R 2 スパイクおよび S 2 G H R 2 提示 S A p N P の利点を実証する。S A R S - C o V - 2 R B D および S 2 G H R 2 提示 S A p N P は、S A R S - C o V - 2 特異的 N A b 応答の誘発において同等であるが、後者は、S A R S 関連 C o V に対するより広範な防御を提供し得る。

10

【0150】

[実施例 9]

T 細胞応答およびワクチン安全性

体液性免疫は、宿主 - ウイルス相互作用を遮断し、ウイルス感染を防止するために必要であるが、細胞性免疫は、ウイルス感染を制御するために感染した宿主細胞を排除するために不可欠である。新たに出てきた証拠は、早期 T 細胞応答ならびに T 細胞メモリーが S A R S - C o V - 2 に対する防御に重要であることを示している。しかし、C O V I D - 1 9 ワクチンは、C D 4 + T ヘルパー 1 (T h 1) T 細胞応答を誘導し、T h 2 型を誘導しない必要があるが、これは後者がワクチン関連呼吸器疾患の増強 (V A E R D) に関連しているためである。さらに、濾胞性ヘルパー T 細胞 (T f h) は、N A b の成熟および産生において重要な役割を果たす。したがって、T 細胞応答を理解することは、有効かつ安全な C O V I D - 1 9 ワクチンの開発にとって重要である。

20

【0151】

インターフェロン (I F N) - 産生 T h 1 細胞は、最適な抗体応答を生成するため、およびウイルスのクリアランスに対する細胞性免疫の誘導のために重要である。本発明者らは、最初に、メモリー T 細胞が脾臓に既に発生していた場合の、スパイクタンパク質に特異的な C D 4 + T h 1 応答の誘導に対する様々な S A R S - C o V - 2 ワクチン製剤の影響を、4 回目の免疫化の 2 週間後である w 1 1 に調べた。S 2 P 群および 2 つの S A p N P 群 (E 2 p および I 3 - 0 1 v 9) のマウス脾細胞を、陰性対照としてナイーブ試料を使用してフローサイトメトリー (F C) によって分析した。この研究の結果を図 5 に示す。I 3 - 0 1 v 9 は、それぞれ S 2 P および E 2 p よりも約 1 . 5 倍および 2 . 3 倍高い頻度の I F N - 産生 C D 4 + T h 1 細胞を誘導した。特に、わずか 4 時間のそれぞれの抗原での再刺激後、E 2 p および I 3 - 0 1 v 9 群の両方が、S 2 P およびナイーブ対照群よりも約 2 倍高い頻度で C D 1 0 7 a 産生細胞溶解性 C D 4 + T 細胞を産生した。I F N - / I L - 4 (インターロイキン - 4) 二重陽性細胞は、T h 1 条件下で I F N - を産生する能力を依然として保持しながら、I L - 4 を産生する能力を獲得したメモリー C D 4 + T 細胞である。I 3 - 0 1 v 9 は、S 2 P および E 2 p よりも 3 倍および 5 倍多い I F N - / I L - 4 二重陽性メモリー C D 4 + T 細胞を誘導したように見えた。これらの結果は、I 3 - 0 1 v 9 が強力な C D 4 + T h 1 細胞および I F N - / I L - 4 二重陽性メモリー C D 4 + 細胞の両方を誘導し得ることを示唆する。

30

40

【0152】

さらに、図 5 に示すように、I 3 - 0 1 v 9 は、S 2 P および E 2 p よりも多くの I F N - / G M - C S F (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) 二重陽性 C D 8 + エフェクター T 細胞を誘導した。これらのデータは、防御 C D 8 + T 細胞応答が、I 3 - 0 1 v 9 S A p N P で免疫化したマウスにおいても生じたことを示唆している。注目すべきことに、S 2 P および E 2 p ではなく、I 3 - 0 1 v 9 で免疫化したマウスに由来する C D 8 + T 細胞は、抗原再刺激時に I F N - を迅速に産生する能力を獲得し、I 3 - 0 1 v 9 応答性エフェクター / メモリー T 細胞の生成を示唆した。まとめると、本発明者らの

50

所見は、S2G HR2 I3-01v9 SApNPが、マウスにおいてCD4⁺Th1細胞、IFN- γ /IL-4二重陽性メモリーCD4⁺T細胞、およびCD8⁺T細胞からなる強力なT細胞応答を誘導することができ、したがって、SARS-CoV-2に対する有効なワクチンに必要とされる防御的細胞性免疫を提供することを示している。

【0153】

[実施例10]

いくつかの例示的な方法

SARS-CoV-2 RBDおよびスパイク抗原の設計、発現および精製：SARS-CoV-1分離株Tor2 (GenBankアクセッション番号：NC_004718) およびSARS-CoV-2分離株Wuhan-Hu-1 (GenBankアクセッション番号：MN908947) のスパイク(S) 遺伝子を使用して、哺乳動物細胞における発現のためのコドン最適化後にすべてのRBDおよびスパイク構築物を設計した。RBD配列は、それぞれSARS-CoV-1および2についてP317~D518およびP330~N532として定義される。SECTO配列は、それぞれSARS-CoV-1および2についてM1~Q1190およびM1~Q1208として定義される。S1/S2切断部位を除去するために、R667G変異および⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷ (配列番号18) の改変を、それぞれSARS-CoV-1および2に導入した。2P (または2G) 変異は、それぞれ、SARS-CoV-1および2のスパイクのK968/V969およびK986/V987になされた。HR2ストークを含むSARS-CoV-2 C末端領域 (E1150~Q1208) をS2GECTOから除去し、S2G HR2と呼ばれるHR2欠失スパイク構築物を得た。ウイルスクャプシドタンパク質SHP (PDB: 1TD0) を、免疫化のためのスパイク構築物中の三量体化モチーフとして使用し、バクテリオファージT4フィブリチン由来のフォールドドメイン (PDB: 1RFO) を、ELISAのためのスパイク抗原の被覆に使用して、1TD0由来の抗体応答をマスクした。すべての構築物をExpichO細胞 (Thermo Fisher) において一過性に発現させた。簡潔には、ExpichO細胞を解凍し、ExpichO (商標) 発現培地 (Thermo Fisher) と共に37 $^{\circ}$ C、135RPMおよび8% CO₂においてシェーカーインキュベーター中でインキュベートした。細胞が10 \times 10⁶ ml⁻¹の密度に達したら、ExpichO (商標) 発現培地を添加して、トランスフェクションのために細胞密度を6 \times 10⁶ ml⁻¹に低下させた。Expifectamine (商標) CHO/プラスミドDNA複合体を、ExpichO細胞における100mlのトランスフェクションのために製造業者の使用説明書に従って調製した。所与の構築物について、100 μ gのプラスミドおよび320 μ lのExpifectamine (商標) CHO試薬を7.7mlの冷OptiPRO (商標) 培地 (Thermo Fisher) 中で混合した。1日目の最初の供給後、ExpichO細胞を、Max Titer プロトコルに従って、33 $^{\circ}$ C、115RPMおよび8% CO₂においてシェーカーインキュベーター中で培養し、5日目に追加の供給をした (Thermo Fisher)。トランスフェクションの13~14日後に培養上清を回収し、4000RPMで25分間の遠心分離によって清澄化し、0.45 μ mフィルター (Thermo Fisher) を用いて濾過した。CR3022抗体カラムを使用して上清からSARS-CoV-1/2 10 20 30 40 40 抗原を抽出し、これに続いてSuperdex 200 10/300 GLカラム (足場RBD三量体用) またはSuperose 6 10/300 GLカラム (RBD-SPY-NP、スパイク、およびスパイク提示NP用) でSECを行った。比較のために、固定化Ni Sepharose (商標) Excelカラム (GE Healthcare) を使用して上清からHisタグ化SECTO-5GS-1TD0スパイクタンパク質を抽出し、500mMイミダゾールで溶出し、その後SECを行った。タンパク質濃度を、UV₂₈₀吸光度および理論的吸光係数を使用して決定した。

【0154】

青色天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動：SARS-CoV-2スパイクおよびスパイク提示NPを、青色天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) により分 50

析し、クーマシーブルーで染色した。タンパク質を試料緩衝液およびG250ローディング色素と混合し、4~12% Bis-Tris NativePAGE (商標)ゲル(Life Technologies)に添加した。NativePAGE (商標)泳動緩衝液(Life Technologies)を、製造業者の使用説明書に従って使用して、BN-PAGEゲルを150 Vで2~2.5時間泳動させた。

【0155】

酵素結合免疫吸着アッセイ: Costar (商標) 96ウェルアッセイプレート(Corning)の各ウェルを、最初に、0.2 μgの適切な抗原を含有する50 μlのPBSで被覆した。プレートを4において一晩インキュベートし、次いで、PBSおよび0.05% (v/v) Tween 20を含む洗浄緩衝液で5回洗浄した。次いで、各ウェルを、PBS、40 mg ml⁻¹のプロットンググレードの遮断薬(Bio-Rad)、および5% (v/v) FBSからなるブロッキング緩衝液150 μlで被覆した。プレートをブロッキング緩衝液と共に室温で1時間インキュベートし、次いで洗浄緩衝液で5回洗浄した。抗原結合のために、抗体をブロッキング緩衝液で最大濃度5 μg ml⁻¹に希釈し、次いで10倍希釈系列に希釈した。各抗体希釈物について、合計50 μl容量を適切なウェルに添加した。マウス試料分析のために、血清または血漿をブロッキング緩衝液で20倍希釈し、10倍希釈系列に供した。各試料希釈物について、合計50 μl容量をウェルに添加した。各プレートを室温で1時間インキュベートした後、0.05% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した。次いで、抗体結合のために、ヤギ抗ヒトIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)の1:5000希釈液、またはマウス試料分析のために、ホースラッディシュペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)の1:3000希釈液を洗浄緩衝液(0.05% Tween 20を含有するPBS)中で調製し、この希釈二次抗体50 μlを各ウェルに添加した。プレートを二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした後、0.05% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した。最後に、ウェルを50 μlのTMB(Life Sciences)で3~5分間発色させた後、50 μlの2 Nの硫酸で反応を停止した。得られたプレート読み取りを450 nmの波長で測定した。注目すべきことに、w2血清結合は、ED₅₀力価の正確な決定を可能にするプラトー(または飽和)に達しなかった。それにもかかわらず、最初の時点での異なるワクチン群の比較を容易にするために、OD₄₅₀の下限/上限を0.0/3.2に設定することによって、w2におけるED₅₀値を導出した。

【0156】

バイオレイヤー干渉法: SARS-CoV-1/2ワクチン抗原、RBD対RBD-提示NPならびにスパイク対スパイク提示NP、公知の抗原のパネルへの結合の動態を、Octet RED96機器(ForteBio, Pall Life Sciences)を使用して測定した。すべてのアッセイを、ForteBio 1x動態緩衝液(kinetic buffer)中で、1000 RPMに設定して攪拌しながら実施した。すべての溶液の最終容量は200 μl/ウェルであった。アッセイを、ソリッド黒96ウェルプレート(Geiger Bio-One)において30で行った。S2G HR2-NPを除くすべての抗原について、1x動態緩衝液中5 μg ml⁻¹の抗体を抗ヒトFc Capture Biosensors(AHC)の表面に300秒間負荷した。S2G HR2-NPについては、抗ヒトFc Quantitation Biosensors(AHQ)を使用した。60秒間のバイオセンサーベースラインステップを適用した後、バイオセンサー上の抗体と溶液中の抗原との会合を200秒間分析した。足場RBD三量体については950 nm、RBD-5GS-SPY-5GS-FR NPについては37 nm、スパイク三量体については150 nm、FR/E2p/I3-01v9 NP上に提示されたS2G HR2については9/3.5/3.5 nmから開始して、抗原の二倍の濃度勾配を、6つの滴定シリーズで使用した。相互作用の解離を300秒間追跡した。ベースラインドリフトの補正は、抗体を負荷したが抗原とインキュベートしな

ったセンサおよび抗体を負荷しなかったが抗原とインキュベートしたセンサについて記録されたシフトの平均値を差し引くことによって行った。Octetデータは、Forte Bioのデータ取得ソフトウェアv. 8.1によって処理された。実験データを、最適なフィッティングを達成するために2:1相互作用を説明する結合方程式にフィッティングさせた。注目すべきことに、S2G HR2提示NPとの抗体結合の比較を容易にするために、AHQを使用してS2G HR2三量体結合も測定した。

【0157】

ナノ粒子構築物の電子顕微鏡(EM)評価: RBDおよびS2G HR2提示NPの初期EM分析は、スクリプス研究所(Scripps Research Institute)のコア顕微鏡施設で行った。簡潔には、NP試料を0.01mg/mlの濃度で調製した。炭素コーティングされた銅グリッド(400メッシュ)をグロー放電させ、各試料8μLを2分間吸着させた。過剰な試料を吸い上げ、グリッドを2%ギ酸ウラニルで2分間ネガティブ染色した。過剰な染色を吸い上げ、グリッドを乾燥させた。Talos L120C透過型電子顕微鏡(Thermo Fisher)を用いて試料を80kVで分析し、CETA 16M CMOSカメラで画像を取得した。

【0158】

動物免疫化および試料採取: 同様の免疫化プロトコルが、本発明者らの以前のNPワクチン研究で報告されている。簡潔には、動物実験委員会(IACUC)のガイドラインに従って、動物被験体を免疫研究で試験した。8週齢のBALB/cマウスをThe Jackson Laboratoryから購入し、承認されたIACUCプロトコルおよびAAALAC(国際動物ケア評価認証協会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care))の国際ガイドラインを遵守して、スクリプス研究所(The Scripps Research Institute)の環境制御室の換気ケージに収容した。マウスを、0、3、6および9週目に、50μgのワクチン抗原および100μlのアジュバント、AddaVaxまたはAdj-Phos(InvivoGen)を含有する200μlの抗原/アジュバント混合物で、腹腔内(i.p.)経路によって免疫化した。各免疫化の2週間後に血液を採取した。すべての血液採取は、後眼窩洞を介してヘパリン処理した毛細管を使用してEDTA被覆管に行った。試料を等体積のPBSで希釈し、次いで、15ml SepMate(商標)チューブ(STEMCELL Technologies)中の4.5mlのFicollに重層し、1200RPMで10分間、20において回転させて、血漿と細胞を分離した。血漿を56で30分間熱不活性化し、1200RPMで10分間回転させ、滅菌濾過した。細胞をPBSで1回洗浄し、次いで、1mlのACK赤血球溶解緩衝液(Lonza)に再懸濁した。PBSで洗浄した後、末梢血単核細胞(PBMC)を2mlのBambanker凍結培地(Lymphotec)に再懸濁した。脾臓も採取し、70μmのセルストレーナー(BD Falcon)で粉砕して脾細胞を細胞懸濁液中に放出した。脾細胞を遠心分離し、PBSで洗浄し、5mlのACK溶解緩衝液(Lonza)で処理し、3mlのBambanker凍結培地と共に凍結した。血清を、ELISA結合および偽ウイルス中和アッセイのために熱不活性化した。

【0159】

SARS-CoV-1/2偽ウイルス中和アッセイ: 偽粒子(SARS-CoV-1/2-pp)中和アッセイを利用して、以前に報告された抗体の中和活性およびワクチン誘導性マウス抗体応答を評価した。HIV-1pNL4-3.lucR-E-プラスミド(NIH AIDS試薬プログラム)と、SARS-CoV-1分離株Tor2(GenBankアクセッション番号: NC_004718)およびSARS-CoV-2分離株Wuhan-Hu-1(GenBankアクセッション番号: MN_908947)のS遺伝子をコードする発現プラスミドとを、リポフェクタミン3000(Thermo Fisher Scientific)によって4:1の比でHEK293T細胞に共トランスフェクションすることによって、SARS-CoV-1/2-ppを生成した。48~

72時間後、4000RPMで10分間遠心分離することによって上清からSARS-CoV-1/2-ppを収集し、アリコートを取り、使用前に-80で保存した。0.1~10µg/mlの出発濃度のmAbまたは100倍の出発希釈度のマウス血清を、SARS-CoV-1/2-ppを含有する上清と混合し、白ソリッドボトム96ウェルプレート(Corning)中37で1時間インキュベートした。3倍希釈系列をアッセイに使用した。HEK293T-hACE2細胞株(カタログ番号:NR-52511)およびSARS-CoV-2スパイク遺伝子を含有するベクターpcDNA3.1(-)(カタログ番号:NR52420)をBEI RESOURCESから入手し、偽ウイルス中和アッセイに使用した。簡潔には、 1×10^4 のHEK293T-hACE2細胞を各ウェルに加え、プレートを37で48時間インキュベートした。インキュベーション後、上にある培地を除去し、細胞を溶解した。感染細胞からのホタルルシフェラーゼシグナルを、製造者の使用説明書に従って、Bright-Gloルシフェラーゼアッセイ系(Promega)を使用して決定した。データをGen5ソフトウェアを搭載したBioTekマイクロプレートリーダーから取得し、一連の非感染ウェルからの平均バックグラウンド発光を各ウェルから減算し、GraphPad Prism 8.4.3を使用して、ウェルからの値を、SARS-CoV-1/2-ppのみを含むウェルと比較して中和曲線を作成した。MLV-ppと呼ばれるマウス白血病ウイルス(MLV)Env遺伝子で偽化された同じHIV-1ベクターをHEK293T細胞において生成し、陰性対照として中和アッセイに含めた。

10

【0160】

20

樹状細胞(DC)の生成:マウス骨髄(BM)を、10%ウシ胎児血清および組換えマウスFlt3L(50ng/ml)およびSCF(10ng/ml)を含有するRPMI1640培地で9日間培養した。DC活性化を誘導するために、未成熟DCをリポ多糖(LPS、100ng/ml)、R848(レジキモド、100ng/ml)またはCpG(ODN1585、1µM)と共に一晚インキュベートし、これによりToll様受容体(TLR)4、TLR7/8またはTLR9シグナル伝達がそれぞれ活性化された。実験のために細胞を回収した。pDCを選別して、FACSセルソーターおよび磁気ビーズ(Miltenyi-Biotech、CA)を使用してCD11c+B220+細胞を単離した。

【0161】

30

抗体(Ab)およびフローサイトメトリ分析:免疫蛍光染色に使用されるすべての抗体は、eBioscience(San Diego、CA)、BioLegend(San Diego、CA)またはBD Biosciences(San Jose、CA)から購入した。磁気マイクロビーズ結合Abおよびストレプトアビジンは、Miltenyi-Biotech(Auburn、CA)から購入した。組換えヒトIL-2タンパク質は、R&D Systems(Minneapolis、MN)から購入した。組換えマウスFlt3リガンド(Flt3L)およびマウスSCFは、Shenandoah Biotech(Warwick、PA)から購入した。細胞を適切な濃度のmAbで染色した。eBioscience(San Diego、CA)製のFixable Viability Dyeを用いて死細胞を除外した。フローサイトメトリ分析を、LSRII(BD Bioscience、CA)およびCantoサイトメーター(Becton Dickinson、NJ)を使用して行った。細胞をBD FACS Aria II(BD Bioscience、CA)で選別した。

40

【0162】

T細胞の培養および活性化:免疫化マウス由来の脾臓単核細胞を、IL-2(5.0ng/ml)を含有する完全IMDM培地中で、S2P、E2PおよびI3-01をパルスした、またはパルスしなかったDCの存在下で培養した。細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリ分析のために、16時間後に細胞を収集した。

【0163】

統計:抗体力価分析では、異なるワクチン群の比較を、両側対応のないスチューデント

50

t検定を使用してGraph Pad Prism 8.4.3で行った。T細胞分析では、両側対応のないスチューデントt検定、ANOVA、次いで事後t検定を使用して平均の比較を行った。0.05以下のP値を有意とみなした。

【0164】

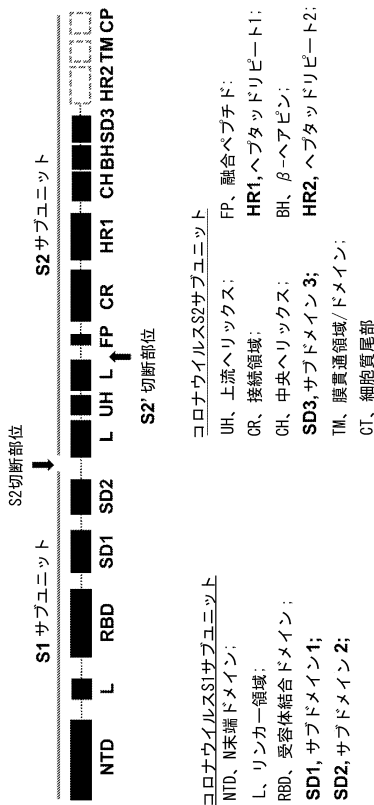
したがって、本発明は、上記の代表的な実施形態を参照して広く開示され、例示されている。本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に様々な改変を加え得るが理解されよう。

【0165】

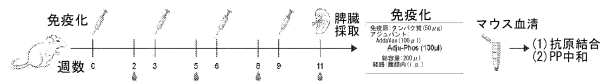
本明細書で引用されるすべての刊行物、配列アクセション番号、特許および特許出願は、それぞれが個別にその全体があらゆる目的のために参照により本明細書に明示的に示されているかのように、そのように組み込まれることにさらに留意されたい。参照により組み込まれる本文に含まれる定義は、本開示における定義と矛盾する限り除外される。

【図面】

【図1】



【図2】



10

20

30

40

50

【 図 3 】

マウス血清のELISAによるED50値

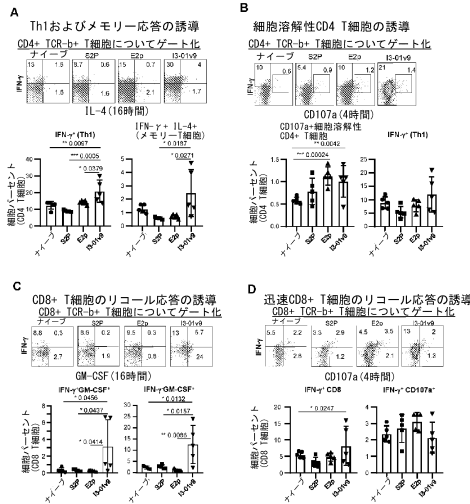
SARS-CoV-2 クワンシ抗原	W2					W5					W8					W11				
	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5
5823-MH2-555-1T00	180	336	42	256	<20	2659	9034	11711	17372	2229	24728	33977	53567	67010	7331	194856	48516	102627	25912	44712
5823-MH2-555-1P	287	375	607	455	182	111	259	64	38311	30858	46277	63928	14708	7310	48384	85458	38791	101231	68781	75117
5823-MH2-555-1L1P	287	375	607	455	182	111	259	64	38311	30858	46277	63928	14708	7310	48384	85458	38791	101231	68781	75117
5823-MH2-555-1L2P	287	375	607	455	182	111	259	64	38311	30858	46277	63928	14708	7310	48384	85458	38791	101231	68781	75117

【 図 4 】

マウス血清中和ID50値

SARS-CoV-2 クワンシ抗原	W2					W5					W8					W11				
	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4	W5
5823-MH2-555-1T00	<100	<100	<100	<100	<100	471	102	103	104	105	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
5823-MH2-555-1P	<100	<100	<100	<100	<100	471	102	103	104	105	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
5823-MH2-555-1L1P	<100	<100	<100	<100	<100	471	102	103	104	105	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
5823-MH2-555-1L2P	<100	<100	<100	<100	<100	471	102	103	104	105	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111

【 図 5 】



【 配列表 】

202353322800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 20/53714
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/12, C07K 14/005, A61K 38/16, C12N 15/33 (2021.01) CPC - C07K 16/10, A61K 39/12, A61K 39/215, A61P 31/12, C07K 14/005, A61K 2039/555, G01N 2333/165		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/081318 A1 (THE UNITED STATE OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al.) 03 May 2018 (03.05.2018) pg 2, ln 7-37; pg 3, ln 5-6; pg 12, ln 19-23; pg 13, ln 28-34; pg 15, ln 26-31; pg 17, ln 28-31; pg 19, ln 3-5; pg 32, ln 16-23; Claims 35-38	1, 10, 14-16
Y		2, 17-18
Y	WO 2005/063801 A2 (UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V. et al.) 14 July 2005 (14.07.2005) abstract; pg 34, ln 3-8	2
Y		17
Y	US 2020/0009244 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 9 January 2020 (09.01.2020); especially abstract; para [0007]-[0009]	18
Y		3-9, 11-13, 19
Y	LV et al. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. Cell reports. 2 June 2020, Epub 18 May 2020 (18.05.2020), Vol. 31, No 9, article 107725, (pp 1-14). Especially pg e2, para 8	18
Y		3-9, 11-13, 19
A	KRIEGER et al. Effect of Proline and Glycine Residues on Dynamics and Barriers of Loop Formation in Polypeptide Chains. Journal of the American Chemical Society. 16 March 2005, Vol. 127, No. 10, pages 3346-3352; especially abstract	3-9, 11-13, 19
A		
P,X	HE et al. Self-assembling nanoparticles presenting receptor binding domain and stabilized spike as next-generation COVID-19 vaccines. BioRxiv. 14 September 2020, article 2020.09.14.296715, pg 1-59. Entire document	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"D" document cited by the applicant in the international application</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 20 January 2020 (20.01.2020)		Date of mailing of the international search report 25 FEB 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53714

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53714

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

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

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

10

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

See Supplemental Page

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-19 limited to K986GV987G and SEQ ID NOs: 26 and 32

20

30

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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 20/53714

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Groups I+: Claims 1-25, drawn to an engineered immunogen polypeptide derived from the spike (S) protein of a coronavirus. The composition will be searched to the extent that the spike (S) protein of a coronavirus encompasses mutations K986G/V987G, the trimerization motif SEQ ID NO: 26, spike polypeptide SEQ ID NO: 32. It is believed that claims 1-19 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass K986G/V987G and SEQ ID NOs: 26 and 32. Additional engineered immunogen polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected engineered immunogen polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an engineered immunogen polypeptide comprising spike protein SEQ ID NO: 33, nanoparticle SEQ ID NO: 23, locking domain SEQ ID NO: 29 and the immunogen polypeptide SEQ ID NO: 38 (Claims 1-25).

10

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

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of including: an engineered immunogen polypeptide derived from the spike (S) protein of a coronavirus, these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/081318 A1 to The United State of America, as Represented by the Secretary, Department of Health and Human Services et al. (hereinafter 'HHS').

HHS discloses (instant claim 1) an engineered immunogen polypeptide derived from the spike (S) protein of a coronavirus (pg 2, ln 7-10 - "In some embodiments, an immunogen is provided that comprises a recombinant alphacoronavirus or betacoronavirus S ectodomain trimer comprising protomers comprising one or two proline substitutions at or near a junction between a heptad repeat 1 (HR1) and a central helix that stabilize the S ectodomain trimer in a prefusion conformation."), comprising an altered soluble S sequence that has modifications relative to wildtype soluble S sequence of the coronavirus that stabilize the prefusion S structure, wherein the modifications comprise (a) a mutation that inactivates the S1/S2 cleavage site (pg 2, ln 33-37 - "In some embodiments, the protomers of the recombinant alphacoronavirus or betacoronavirus S ectodomain trimer further comprise one or more additional amino acid substitutions or deletions, such as amino acid substitutions that stabilize the recombinant alphacoronavirus or betacoronavirus S ectodomain trimer in the prefusion conformation, or amino acid substitutions to inhibit or prevent protease cleavage at a S1/S2 protease cleavage site and/or a S2' protease cleave site of the S ectodomain."), and (b) a mutation in the turn region between the heptad repeat 1 (HR1) region and the central helix (CH) region (pg 2, ln 7-10 - "In some embodiments, an immunogen is provided that comprises a recombinant alphacoronavirus or betacoronavirus S ectodomain trimer comprising protomers comprising one or two proline substitutions at or near a junction between a heptad repeat 1 (HR1) and a central helix that stabilize the S ectodomain trimer in a prefusion conformation.") that prevents HR1 and CH to form a straight helix during fusion (pg 2, ln 7-11 - "In some embodiments, an immunogen is provided that comprises a recombinant alphacoronavirus or betacoronavirus S ectodomain trimer comprising protomers comprising one or two proline substitutions at or near a junction between a heptad repeat 1 (HR1) and a central helix that stabilize the S ectodomain trimer in a prefusion conformation.,"; pg 19, ln 3-5 - "The proline substitutions inhibit a conformational change in the S protein from the prefusion conformation to the postfusion conformation, and therefore stabilize the S ectodomain trimer in the prefusion conformation.,"; Note, stabilization of the prefusion structure prevents formation of a straight helix as defined by the instant application, see para [0005]).

20

HHS discloses (instant claim 8) a trimerization motif (pg 18 - "In some embodiments, the recombinant MERS-CoV S ectodomain trimer stabilized in the prefusion conformation comprises protomers of single-chain S ectodomains comprising mutations to the S1/S2 and/or S2 protease cleavage sites to prevent protease cleavage at those sites.,"; pg 17, ln 9-11 - "A recombinant coronavirus S ectodomain including the coronavirus S1 and S2 proteins in a single contiguous polypeptide chain. Single chain coronavirus S ectodomain can trimerize to form a coronavirus S ectodomain trimer.,").

30

HHS discloses (instant claim 14) a coronavirus vaccine composition (pg 48, ln 30-32 - "In some embodiments, the coronavirus S ectodomain trimer can be membrane anchored, for example, for embodiments where the coronavirus S ectodomain trimer is expressed on an attenuated viral vaccine, or a virus like particle.,"), comprising the immunogen polypeptide of claim 1 that is displayed on the surface of a self-assembling nanoparticle (pg 52, ln 27 - pg 53, ln 3 - "In some embodiments, a protomer of a disclosed recombinant coronavirus S ectodomain trimer (e.g., a MERS-CoV S ectodomain trimer or a SARS-CoV S ectodomain trimer) can be linked to an encapsulin nanoparticle subunit to construct an encapsulin nanoparticle. ... Following production, the monomeric subunits self-assemble into the globular encapsulin assembly including 60, or in some cases, 180 monomeric subunits.,").

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

40

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 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100172683

弁理士 綾 聡平

(74)代理人 100219265

弁理士 鈴木 崇大

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ヒー , リンリン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、ロビン・ストリート・4 2 6 7

(72)発明者 ジュ , ジアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、ロビン・ストリート・4 2 6 7

(72)発明者 ウィルソン , イアン・エー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 3 7、ラ・ホヤ、ニューカーク・ドライブ・1 0 2 5

F ターム (参考) 4C076 CC35 EE41 EE59

4C085 AA03 BA71 BB11 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA86 EA20 EA31 FA74

GA26