



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월06일  
(11) 등록번호 10-2599401  
(24) 등록일자 2023년11월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 7/00 (2013.01)  
A61K 39/0011 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2019-7012062
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월06일  
심사청구일자 2020년08월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월25일
- (65) 공개번호 10-2019-0053260
- (43) 공개일자 2019년05월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/072366
- (87) 국제공개번호 WO 2018/059896  
국제공개일자 2018년04월05일
- (30) 우선권주장  
1616365.1 2016년09월27일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌  
ONCOIMMUNOLOGY. 2015, vol. 5, no. 4, page e110542.\*  
JOURNAL OF LIPID RESEARCH. 2016.08.19., vol. 57, no. 10, pages 1778-1788.  
BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. 2015, vol. 112, no. 6, pages 1102-1110.  
WO2003063770 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
발로 테라퓨틱스 오와이  
핀란드, 00790 헬싱키, 비킨카리 6, 컬티베이터 1
- (72) 발명자  
셀룰로, 빈센조  
핀란드, 에프아이-00330 헬싱키, 유이마린폴쿠 10  
씨 15  
카파소, 크리스티안  
핀란드, 에프아이-00710 헬싱키, 뷰올루키벤타이  
1 비 비41  
일로스마키, 에르코  
핀란드, 에프아이-01150 시푸, 티어리타이 5
- (74) 대리인  
특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김정희

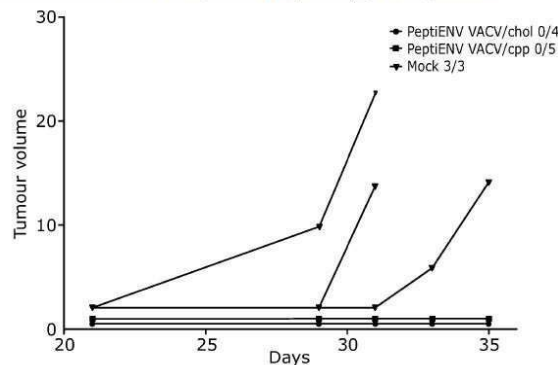
(54) 발명의 명칭 **엔벨로프 바이러스의 비-유전적 변형**

(57) 요약

본 발명은 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖는 변형 된 엔벨로프 바이러스; 이를 포함하는 약학적 조성물; 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도11

cpp 또는 콜레스테롤 잔기(moieties)에 의해 바이러스 엔벨로프 내에 고정된 항 종양 펩타이드가 광범위한 항 종양 면역을 유도하고, 종양이 재투여(rechallenge)된 마우스를 보호한다.



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

A61K 2039/60 (2013.01)

C12N 2710/16632 (2013.01)

C12N 2710/16641 (2013.01)

C12N 2710/24141 (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디아나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군에서 선택되는 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스로서,

상기 변형된 엔벨롭 바이러스는, 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖고;

상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 N- 또는 C- 말단에 결합된 세포 투과성 펩타이드 또는 콜레스테롤-결합된 펩타이드를 사용하여 상기 바이러스 엔벨로프에 비공유 결합적으로 부착되거나; 또는 바이러스 엔벨로프 내에 삽입되어 바이러스 외피 안쪽에 고정된 것인,

변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50 아미노산을 포함하는 군에서 선택된 길이를 갖는 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 복수의 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드들이 바이러스 엔벨로프에 비공유 결합적으로 부착되거나; 또는 바이러스 엔벨로프 내에 삽입되어 바이러스 외피 안쪽에 고정된 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드들은 서열 동일성이 동일하거나; 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드들은 서로 90 %, 91 %, 92 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 이상의 서열 동일성이 있는 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 MHC(major histocompatibility complex)-I이 제한된 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 MHC(major histocompatibility complex)-II가 제한된 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 7**

제3항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드들은 MHC-I이 제한된 펩타이드들과 MHC-II가 제한된 펩타이드들이 혼합된 것을 포함하는 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 복수의 종양-특이적 항원을 제시하는(representing) 융합 분자를 포함하는 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 하나 이상의 절단 부위를 포함하는 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 하나 이상의 면역단백질가수분해효소 처리 부위를 포함하는 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 한 쌍의 면역단백질가수분해효소 처리 부위 사이에 위치하고, 그의 상류는 하나 이상의 절단 부위인 것인, 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

제1항에 있어서,

상기 세포 투과성 펩타이드 또는 콜레스테롤-결합된 펩타이드는,

GRKKRRQRRRPQ (서열번호 1), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;

RQIKIWFQNRRMKWKK (서열번호 2), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;

KLALKLALKALKAAKLA (서열번호 3), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 말단 또는 C- 말단의 CPP 서열;

RRRRRRRRR (서열번호 4), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 말단 또는 C- 말단의 CPP 서열;

KETWWETWWTEWSQPKKRKV (서열번호 5), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 말단 또는 C- 말단의 CPP 서열;

AGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 6), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 말단 또는 C- 말단의 CPP 서열;

AGLWRALWRLRSLWRLWRA (서열번호 7), 상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열; 및

상기 항-종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 콜레스테롤 잔기를 포함하는 군에서 선택된 것인 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는

GRKKRRQRRRPQVRRRALISLEQLESINFEKLTEW (서열번호 8);

RQIKIWFQNRMMKWKRWKWEKISINFEKLYKLG (서열번호 9);

KLALKLALKALKAALKLARWEKISINFEKLYKLG (서열번호 10);

RRRRRRRRRRWEKISINFEKLYKLG (서열번호 11);

RWEKISINFEKLYKLRRRRRRRRR (서열번호 12);

RWEKISINFEKLYKLGKETWWETWWTEWSQPKKKRKY (서열번호 13);

RWEKISINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 14);

AGLWRALWRLRSLWRLWRARWEKISINFEKLYKLG (서열번호 15);

GRKKRRQRRRPQWEKISINFEKLYKLG (서열번호 16);

GRKKRRQRRRPQWEKISINFEKL (서열번호 17);

GRKKRRQRRRPQWEKISINFEKLYKLRWEKISINFEKL (서열번호 18);

LEQLESINFEKLTEWVRRALISC- 콜레스테롤 (서열번호 19);

콜레스테롤-CVRRRALISLEQLESINFEKLTEW (서열번호 20);

콜레스테롤-CVINFEKL (서열번호 21);

콜레스테롤-CRWEKISINFEKL (서열번호 22);

콜레스테롤-CRWEKISVYDFVWLYKLRWEKISINFEKL (서열번호 23);

GRKKRRQRRRPQVRRRALISLEQLESINFEKLTEW-FITC (서열번호 24);

RQIKIWFQNRMMKWKRWKWEKISINFEKLYKLG-FITC (서열번호 25);

KLALKLALKALKAALKLARWEKISINFEKLYKLG-FITC (서열번호 26);

RRRRRRRRRRWEKISINFEKLYKLG-FITC (서열번호 27);

FITC-RWEKISINFEKLYKLRRRRRRRRR (서열번호 28);

FITC-RWEKISINFEKLYKLGKETWWETWWTEWSQPKKKRKY (서열번호 29);

FITC-RWEKISINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 30) 및

GLWRALWRLRSLWRLWRARWEKISINFEKLYKLG-FITC (서열번호 31)을 포함하는 군으로부터 선택된 것인 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스.

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

제1항 내지 제11항, 제14항 및 제15항 중 어느 한 항의 변형된 엔벨롭 바이러스 및 담체를 포함하는 암 치료용

약학적 조성물.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖는 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스; 이와 동일한 것을 포함하는 약학적 조성물; 및 이와 동일한 것을 사용한 암 치료 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 효과적인 암 치료제에 대한 현재의 패러다임은 종양에 침투하는 종양 특이적인 T 효과기 세포의 활성화 및 양의 증가이다. CD8 + T 세포, 특히 세포 독성 T 세포 림프구(CTLs)라고 불리는 이러한 T 효과기 세포는 종양에 대한 방어 면역 반응의 중요한 요소이다. 이러한 종양 특이적인 CTLs는 종양 조직에서 발견 될 수 있으며, 종양에 침투한 CTL의 양과 환자 생존율 사이에 명확한 상관 관계가 있다.

[0003] PD-1, PD-L1 및 CTLA-4와 같은 면역 체크포인트 분자를 표적으로 하는 항체가 종양 미세 환경 내에서 네거티브 피드백 시스템을 차단하여 이미 존재하는 항 종양 면역 반응을 향상시키는 것으로 최근 인정된 것은 엄청난 임상적인 흥분을 일으켰다. 이러한 면역 체크포인트 억제제 항체의 사용은 암 환자의 10-20 %에서 지속력 있는 반응을 일으킬 수 있다. 그러나, 나머지 80-90 %의 환자는 항 종양 면역 반응이 없거나 종양 미세 환경의 다른 면역 억제 측면으로 인해 반응하지 않는다. 체크포인트 억제제 치료에 반응하는 환자군을 확대하기 위해 우리는 광범위 항 종양 면역을 증대 시키고, 종양 특이적인 T 효과기 세포를 종양 미세 환경으로 모집하기 위해 펩티엔브(PeptiENV)라고 불리는 엔벨롭(enveloped) 바이러스 벡터 플랫폼을 개발했다.

[0004] 유리하게도, 면역 자극 펩티엔브(PeptiENV) 바이러스 및 면역 체크 포인트 억제제 항체의 조합으로 환자를 치료함으로써 면역 체크 포인트 억제제 치료법에 반응하는 사람의 수가 증가할 것으로 기대한다.

[0005] 이 특허 출원은 펩티엔브(PeptiENV) 플랫폼을 기술하며, 펩티엔브(PeptiENV) 플랫폼은 항원 제시 세포 상에 용이하게 교차 제시 될 수 있는 면역 조절 펩타이드를 바이러스 엔벨로프 상에 코팅 및 삽입하는 신규한 방법을 포함한다. 현재 면역계를 활성화시키기 위해 비-유전적으로 펩타이드를 바이러스 엔벨로프에 부착하는 방법은

었다. W02005/060541은 바이러스 막을 붕괴시키고 바이러스 막을 파손시킬 목적으로 바이러스 막에 삽입되는 항 바이러스 펩타이드를 교시하고 있다.

[0006] 일부 바이러스에는 보호 단백질 캡시드를 덮는 바이러스 엔벨로프가 있다. 엔벨로프는 전형적으로 숙주 세포 막 (인지질 및 단백질)의 일부로부터 유래되지만, 일부 바이러스성 당단백질을 포함한다. 그것들은 바이러스가 숙주 면역계로부터 회피하는데 도움을 준다. 엔벨로프 표면의 당 단백질은 숙주 막의 수용체 부위를 확인하고 결합하는 역할을 한다. 그 다음 바이러스성 엔벨로프는 숙주의 막과 융합하고, 캡시드와 바이러스 게놈이 숙주에 유입되어 감염되도록 한다. 바이러스 막과 숙주 세포 막의 융합을 통해 숙주 세포에 들어가는 것 외에도, 일부 바이러스는 이를 대신하여 내포작용(endocytosis)을 엔트리 메커니즘으로 사용할 수 있다.

[0007] 본질적으로, 우리는 치료적으로 알려지고 임상적으로 승인된 바이러스를 사용하여 항 바이러스 면역을 회생시키면서 항 종양 면역을 향상시키는 새로운 방법을 발견하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

#### 발명의 효과

#### 도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 항 종양, 종양-특이적 펩타이드가 CPP 또는 콜레스테롤-결합된 펩타이드를 사용하여 상이한 바이러스 엔벨로프에 부착 될 때 얻은 데이터를 요약한 도이다.

도 2는 CPP-포함 펩타이드가 허피스 심플렉스 바이러스 1의 엔벨로프에 부착될 수 있음을 나타낸 도이다. CPP-포함 펩타이드 및 FITC-표식된 펩타이드는 HSV-1과 복합체를 이루고 샌드위치 ELISA를 사용하여 상기 복합체를 검출한다. 항-HSV-1 항체를 96-웰 플레이트의 바닥에 코팅하고, PeptiENV 복합체를 상기 웰에서 배양 하였다. 결합되지 않은 단편을 세척한 후, 항-FITC HRP-결합된 항체를 사용하여 PeptiENV 복합체를 검출하였다. 도 2의 하단 도는 CPP-포함 펩타이드가 HSV-1과 복합체를 형성할 때 확산 시간이 감소하는 것을 나타낸 도이다. 형광 상관 분광법(Fluorescence correlation spectroscopy)을 사용하여 HSV-1과 복합체를 이루는 펩타이드의 확산 동역학을 분석하였다.

도 3의 상단 도는 콜레스테롤-포함 펩타이드가 우두바이러스의 엔벨로프에 부착될 수 있음을 나타낸 도이다. 콜레스테롤-포함 펩타이드 및 FITC-표식된 펩타이드는 우두 바이러스와 복합체를 형성 하였다. 36 % 자당 쿠션 및 초 원심 분리에 의해 PeptiENV 복합체를 정제하고, 정제된 복합체를 유세포 분석으로 분석하였다. A. 펩타이드와 복합체를 형성하지 않은 우두 바이러스 및 B. 콜레스테롤을 포함하고 FITC-표식된 펩타이드와 복합체를 형성한 우두 바이러스. 도 3의 중단 도는 콜레스테롤-포함 펩타이드가 우두 바이러스의 엔벨로프에 부착될 수 있음을 나타낸 도이다. 콜레스테롤-포함 펩타이드와 FITC-표식된 펩타이드는 우두 바이러스와 복합체를 이루고 상기 복합체를 검출하기 위해 샌드위치 ELISA가 사용되었다. 항-우두 바이러스 항체를 96-웰 플레이트의 바닥에 코팅하고, PeptiENV 복합체를 상기 웰에 배양 하였다. 결합되지 않은 단편을 세척한 후, 항-FITC HRP-결합된 항체를 사용하여 PeptiENV 복합체를 검출하였다. 도 3의 하단 도는 콜레스테롤-포함 SIINFEKL 펩타이드가 수지상 세포에 의해 쉽게 나타남을 나타낸 도이다. 마우스 비장 세포를 콜레스테롤-포함 SIINFEKL 펩타이드와 함께 펄스처리하고, CD11c 양성 DC-군(CD11c positive DC-population)에 의한 MHC I 에피토프 SIINFEKL의 제시를 유세포 분석으로 측정하였다.

도 4 중단 도는 CPP-포함 펩타이드가 우두 바이러스의 엔벨로프에 부착될 수 있음을 나타낸 도이다. CPP-포함 펩타이드 및 FITC-표식된 펩타이드는 우두 바이러스와 복합체를 형성하였다. 36 % 자당 쿠션 및 초 원심 분리에 의해 PeptiENV 복합체를 정제하고, 정제된 복합체를 유세포 분석으로 분석 하였다. A. 펩타이드와 복합체를 형성하지 않은 HSV-1 및 B. CPP-포함 FITC-표식된 펩타이드와 복합체를 형성한 HSV-1. 도 4 중단 도는 CPP-포함

펩타이드가 엔벨로프 우두 바이러스에 부착 될 수 있음을 나타낸 도이다. CPP-포함 펩타이드 및 FITC-표식된 펩타이드가 우두 바이러스와 복합체를 형성하고, 샌드위치 ELISA를 상기 복합체의 검출에 사용하였다. 항 우두 바이러스 항체를 96-웰 플레이트의 바닥에 코팅하고, PeptiENV 복합체를 웰에서 배양하였다. 결합되지 않은 단편을 세척한 후, 항-FITC HRP-결합된 항체를 사용하여 PeptiENV 복합체를 검출하였다. 도 4 하단 도는 CPP-포함 SIINFEKL 펩타이드가 수지상 세포에 의해 쉽게 나타남을 나타낸 도이다. 마우스 비장 세포를 CPP-포함 SIINFEKL- 펩타이드와 함께 펄스처리하고, CD11c 양성 DC-군에 의한 MHC I 에피토프 SIINFEKL의 제시를 유세포 분석법으로 측정하였다.

도 5 상단 도는 PeptiENV가 매우 낮은 바이러스 양으로도 DC 활성화를 유도할 수 있음을 나타낸 도이다. 우두 바이러스는 CPP-포함 SIINFEKL-펩타이드 또는 콜레스테롤-포함 SIINFEKL-펩타이드와 복합체를 이루고 마우스 비장 세포를 감염시켰다. 감염 2 시간 후에 DC 활성화 마커의 발현을 확인하기 위해 수지상 세포를 유세포 분석법으로 분석 하였다. 도 5 하단 도는 PeptiENV가 매우 낮은 바이러스 양으로도 CD11c 양성 DC에 의한 특정 항 종양 MHC class I 에피토프의 제시를 유도 할 수 있음을 나타낸 도이다. 우두 바이러스는 CPP-포함 SIINFEKL-펩타이드 또는 콜레스테롤-포함 SIINFEKL-펩타이드와 복합체를 이루고 마우스 비장 세포를 감염시켰다. 2 시간 후, CD11c 양성 DC군에 의한 MHC I 에피토프 SIINFEKL의 제시를 유세포 분석법에 의해 측정하였다.

도 6은 PeptiENV 바이러스-펩타이드 복합체 형성이 바이러스 감염성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸 도이다. PeptiENV의 감염성을 복합체를 형성하지 않은 정상 바이러스와 비교하였고, 감염 3일 후에 세포 생존력을 측정하였다.

도 7은 A) 콜레스테롤-결합된 면역조절 펩타이드 및 B) N-말단에 세포 투과성 펩타이드 서열을 갖는 면역 조절 펩타이드를 개략적으로 나타낸 도이다. 상이한 기능적 서열에 대한 색상 코드: 진한 회색: 콜레스테롤 (A.) 또는 세포 투과성 서열 (B.). 적색: 카텝신 D/E 절단 부위. 파란색: furin 절단 부위. 초록색: 면역 단백질가수분해효소 처리 부위. 검은색: MHC-I 제한된 에피토프.

도 8은 여러가지의 상이한 CPP-서열이 항 종양 펩타이드를 바이러스 엔벨로프에 부착시키는데 사용될 수 있음을 나타낸 도이다. CPP-포함 펩타이드 및 FITC-표식된 펩타이드는 우두 바이러스와 복합체를 형성하고, 샌드위치 ELISA를 사용하여, 상기 복합체를 검출하였다. 항-우두 바이러스 항체를 96-웰 플레이트의 바닥에 코팅하고, PeptiENV 복합체를 웰에서 배양 하였다. 결합하지 않은 단편을 세척 한 후, 항-FITC HRP-결합 항체를 사용하여 PeptiENV 복합체를 검출하였다.

도 9는 CPP-포함 펩타이드가 항바이러스 효과가 없으며 감염성이나 종양 용해 효과를 잃지 않고 바이러스 엔벨로프에 안전하게 부착될 수 있음을 나타낸 도이다. 4 개의 상이한 세포주, A549, MDMA436, B16F10 및 B16-OVA,의 바이러스 감염성을 시험하였고, PeptiENV를 변형되지 않은 바이러스와 비교 하였다.

도 10은 CPP- 또는 콜레스테롤 잔기에 의해 바이러스 엔벨로프에 고정된 항 종양 펩타이드가 종양의 성장에 대한 조절을 향상시키고 생존력을 높이는 광범위한 항 종양 면역을 유도하는 것을 나타낸 도이다. A. 다음과 같이 구성된 군의 종양 성장 비교, Mock (배지만 투여), 우두 바이러스 단독, 콜레스테롤 잔기로 바이러스 엔벨로프에 부착된 항 종양 펩타이드를 갖는 PeptiENV (PeptiENV VACV / chol) 및 CPP 잔기로 바이러스 엔벨로프에 부착된 항 종양 펩타이드를 갖는 PeptiENV(PeptiENV VACV/cpp). B. 다음과 같이 마우스를 처리한 군의 Kaplan-meier 생존 곡선, PeptiENV VACV / cpp, 우두 바이러스 단독, 항 종양 펩타이드 단독 (바이러스 없이) 또는 모의그룹(Mock). C. 처리된 종양에서 종양-특이적 T-세포의 유세포 분석. PeptiENV는 종양 미세환경 안으로 종양-특이적 효과기 T 세포의 광범위한 여과를 유도할 수 있다. D. 종양 미세 환경에서 바이러스-특이적 T 세포의 유세포 분석. PeptiENV는 변형되지 않은 우두 바이러스와 유사한 항 바이러스 면역을 유도하고, 특히 변형되지 않은 우두 바이러스에서 나타나지 않는 광범위한 항 종양 면역을 유도한다.

도 11은 PeptiENV VACV/chol 및 PeptiENV VACV/cpp 처리된 마우스는 강력한 항 종양 면역 반응을 유도하고, 모의 처리된(Mock-treated) 마우스가 종양 재투여(rechallenge)에 대해 보호되지 않는 것과 달리, 종양 재투여로부터 보호된다는 것을 보여준다. 500 000 B16-OVA 세포를 종양 이식한 부위의 반대편에 주입하고 마우스를 14일 동안 추적 관찰 하였다. PeptiENV로 처리한 마우스에서는 종양 성장이 관찰되지 않았고, 모의 처리된(Mock-treated) 그룹에서는 종양 발생률이 100 %였다.

도 12는 CPP 잔기에 의해 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1) 엔벨로프에 고정된 항 종양 펩타이드가 종양 성장의 조절을 향상시키는 강한 항 종양 면역을 유도하는 것을 나타낸 도이다. A. 다음과 같은 군의 종양 성장 곡선, PeptiENV HSV-1/cpp, HSV-1 단독 및 모의 처리군(Mock-treated). B. 처리된 종양에서 종양-특이적 T-세포

의 유세포 분석. PeptiENV는 종양 미세환경 안으로 종양-특이적 효과기 T 세포의 광범위한 여과를 유도할 수 있다.

도 13은 바이러스 엔벨로프에 대한 CPP-포함 항 종양 펩타이드의 높은 친화성을 확인하기 위해 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 측정된 것을 나타낸 도이다. SPR 데이터의 분석을 위해 2-사이트 바인딩 키네틱 피트 모델(two-site binding kinetic fit model)을 사용하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0009] 제 1 양태에 따르면, 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디아나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스 (MeV), 마라바 (Maraba) 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스 (NDV)를 포함하는 군에서 선택되며, 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖는 변형된 엔벨롭(enveloped) 바이러스를 제공한다.
- [0010] 본 발명에 있어서 변형된 엔벨롭 바이러스는, 비-유전적으로 변형되어 상기 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 그의 바이러스 엔벨로프에 포함시키는 바이러스에 관한 것이다. 의심 할 여지없이 상기 바이러스는 그 목적에 적합한 다른 유전자의 변형(들)을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 그러나 상기 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 바이러스 엔벨로프에 또는 바이러스 엔벨로프를 통한 부착은 비-유전적으로 수행된다.
- [0011] 당업자는 일부 바이러스가 그들의 보호 단백질 캡시드를 커버하는 바이러스 엔벨로프를 갖는다는 것을 알게 될 것이다. 엔벨로프는 전형적으로 숙주 세포 막 (인지질 및 단백질)의 일부 유래이지만, 일부 바이러스성 당단백질을 포함한다. 그것들은 바이러스가 숙주의 면역계로부터 회피하는 것을 돕는다. 엔벨로프 표면의 당단백질은 숙주 막의 수용체 부위를 확인하고 결합하는 역할을 한다. 감염이 일어나는 동안, 바이러스 엔벨로프는 숙주의 막과 융합하고, 캡시드와 바이러스 게놈이 숙주에 유입되어 숙주를 감염시킨다. 그러므로 바이러스 엔벨로프에 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에 삽입되거나 바이러스 엔벨로프에 통하여 삽입된 펩타이드는 면역 반응을 유발하는 항원으로 사용될 수 있다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 항 종양 펩타이드는 종양에 대한 면역 반응을 유도 할 수 있는 펩타이드이다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 종양-특이적 펩타이드는 특정한 하나 이상의 종양에 대한 면역 반응을 유도 할 수 있는 펩타이드이다.
- [0014] 바람직한 실시예에서 상기 펩타이드는 환자-동정된(identified) 또는 환자-특이적이다.
- [0015] 당업자에게 명백한 바와 같이, 펩타이드의 정확한 성질은 처리될 종양의 성질과 관련하여 다양할 수 있으며 실제로 기술의 특이성은 상이한 항 종양, 종양-특이적인 펩타이드가 상이한 타입의 암을 발현하는 개체의 치료에 사용될 것이라는 것을 의미하고, 심지어 상이한 항 종양, 종양-특이적 펩타이드가 동일한 타입의 암을 발현하는 개체의 치료에 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 펩타이드는 8-50 사이의 아미노산 길이이며, 이상적으로는 15-35 아미노산 길이이다. 가장 이상적으로는 상기 펩타이드는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 길이를 갖는다.
- [0017] 가장 이상적으로는, 상기 펩타이드의 다수가 바이러스 엔벨로프에 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입된다. 이들 펩타이드는 서로 동일하거나 오직 작은 변형만이 있는 동일한 항원 즉, 상호간 90 % 이상의 서열 동일성, 가장 이상적으로는 상호간 92 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %의 서열 동일성을 갖는 항원을 나타낼 수 있다. 선택적으로, 많은 상이한 항 종양, 종양-특이적 펩타이드가 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입될 수 있다.
- [0018] 보다 바람직하게는, 상기 펩타이드는 또한 카텝신 절단 부위 또는 퓨린 절단 부위와 같은 하나 이상의 절단 부위를 제한없이 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 펩타이드는 하나 이상의 면역단백질가수분해효소 처리 부위를 포함한다. 이들 부위의 예 및 결합된 펩타이드의 구조에 대한 그들의 상대적인 위치는 도 7에 나타내었다. 이상적으로, 하나의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드는 한 쌍의 면역단백질가수분해효소 처리 부위 사이에 위치하고, 그의 상류는 하나 이상의 절단 부위가 있으며, 이상적으로 퓨린 절단 부위에 뒤이어 상류쪽으로 카텝신

절단부위가 위치한다.

- [0019] 유리하게는, 이러한 펩타이드가 선택된 엔벨롭 바이러스(HSV-1, HSV-2, 우두 바이러스, VSV, MeV, 마라바 바이러스 및 NDV)에 부착되거나 내에/통하여 삽입 되었을 때, 증가된 종양-특이적 면역 반응을 유발할 수 있고, 항 바이러스성 면역을 항 종양 면역으로 전환시킴으로써 항 종양 효능을 급격히 향상시킬수 있음을 확인하였다.
- [0020] 이 플랫폼의 장점은 다른 것들과 비교하여, 환자-동정된(patient-identified) 항 종양 유도성 종양-특이적 펩타이드를 비-유전적으로 바이러스 엔벨로프에/내에/통하여(to/in/through) 부착하거나 삽입함으로써 의학적으로 승인된 바이러스를 임상적으로 사용할 수 있다는 것이다. 이것은 간단히 상기 환자로부터 유래된 새로운 종양-특이적 펩타이드 세트를 바이러스에 코팅함으로써 MHC-1 상에 나타나는 환자의 종양 항원의 변화에 매우 신속하게 반응 할 수 있음을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 중요한 특징은 이 플랫폼을 위해 선택된 바이러스는 엄격한 품질 관리 및 승인 단계를 단지 1 회만 거치면 되므로, 유전적으로 변형이 도입된 다른 플랫폼의 바이러스들이 새로운 변형 또는 펩타이드가 도입될 때마다, 검사 단계를 거쳐야하는 이유로 사실상 개인 맞춤 의료에 사용될 수 없는 것과 비교하여, 시간과 비용을 절약 할 수 있다는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에서, 상기 펩타이드는 세포 투과성 펩타이드 또는 콜레스테롤-결합된 펩타이드 (PepScan 또는 Ontores로부터 구입)를 사용하여 상기 바이러스 엔벨로프에 부착되거나 상기 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입된다.
- [0023] 당업자에게 공지된 바와 같이, 세포 투과성 펩타이드 (CPPs)는 다양한 분자 장비 (나노 입자부터 작은 화학 분자 및 DNA의 큰 단편까지)의 세포성 섭취(intake)/흡수(uptake)를 촉진시키는 짧은 펩타이드이다. 이 "카고(cargo)"는 공유 결합을 통한 화학 결합 또는 비공유 상호 작용을 통해 펩타이드와 결합한다. CPP의 기능은 카고(cargo)를 세포 내로 전달하는 것이며, 이 과정은 일반적으로 내포작용(endocytosis)을 통해 일어난다.
- [0024] CPPs는 전형적으로 라이신 또는 아르기닌과 같은 양전하를 갖는 아미노산을 상대적으로 풍부하게 포함하거나 또는 극성/하전된 아미노산과 비극성, 소수성 아미노산의 교대 패턴을 포함하는 서열을 갖는 아미노산 조성을 갖는다. 이러한 두가지 타입의 구조는 각각 다가양이온성(polycationic) 또는 양친매성(amphipathic)이라고 한다. CPP의 세번째 분류(class)는, 낮은 순 전하를 갖는 무극성 잔기만을 포함하는 소수성 펩타이드이거나, 세포성 흡수에 중요한 소수성 아미노산 그룹을 갖는 소수성 펩타이드이다.
- [0025] 본 발명은 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드와 연결될 때 임의의 공지된 CCP의 사용을 가정 할 수 있다.
- [0026] 작용 메커니즘에 대한 설명에 제한되지 않으나, CPP는 보통 지질 이중층을 통하여 카고를 전달하지만, 우리의 면역원성 펩타이드와 CPP 서열로 구성된 펩타이드는 우리의 목적에 반하지 않는 한, 부분적으로 지질 이중층을 통과하고, 다른 일부는 물리적인 소수성/친수성 상호작용을 통해 충분히 막에 부착하는 것으로 고려된다.
- [0027] 상기 펩타이드에 결합된 CPP의 예시를 도 7B에 나타내었다.
- [0028] 당업자에게 또한 알려진 바와 같이, 콜레스테롤-결합된 펩타이드는 콜레스테롤에 결합된 짧은 펩타이드이다. 우리는 콜레스테롤-결합된 펩타이드들이 바이러스 엔벨로프에 들어가서 결합된 펩타이드를 바이러스 외피 안쪽에 고정할 수 있음을 발견하였다. 이러한 펩타이드는 N- 또는 C 말단에 콜레스테롤이 결합된 것일 수 있다.
- [0029] 다시, 작용 메커니즘에 대한 설명에 제한되지 않으나, 우리는 콜레스테롤이 지질막의 구성 성분이기 때문에 콜레스테롤-결합된 펩타이드가 막에서 "정상적인(normal)" 위치를 찾는다고 판단한다. 실제로 우리는 콜레스테롤의 하이드록시 그룹이 막의 인지질과 스펅고지질의 극성 머리 그룹과 상호 작용하고, 부피가 큰 스테로이드와 탄화수소 체인은 다른 지질의 비극성 지방산 체인과 함께 막에 묻혀 있다고 추측한다.
- [0030] 콜레스테롤-결합된 펩타이드의 예시를 7A에 나타내었다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 엔벨로프에 부착되거나 상기 엔벨로프 내에/통하여 삽입하기 위한 상기 펩타이드는 하기를 포함한다:
- [0032] GRKKRRQRRRPQ (서열번호 1) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0033] RQIKIWFQNRRMKWKK (서열번호 2) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0034] KLALKLALKALKALKLA (서열번호 3) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;

- [0035] RRRRRRRR (서열번호 4) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0036] KETWWETWWTEWSQPKKRKV (서열번호 5) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0037] AGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 6) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0038] AGLWRALWRLRSLWRLWRA (서열번호 7) 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 CPP 서열;
- [0039] 또는 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드의 N- 또는 C- 말단의 콜레스테롤 잔기(moiety).
- [0040] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에서, 상기 엔벨로프에 부착 또는 상기 엔벨로프 내에/통하여 삽입하기 위한 상기 펩타이드는 하기 펩타이드 중 하나를 포함하고, 여기에서 SIINFEKL 서열은 MHC-1이 제한된 에피토프 또는 펩타이드를 나타낸다:
- [0041] CPP 펩타이드
- [0042] GRKKRRQRRRPQVRRALISLEQLESIIINFEKLTEW (서열번호 8)
- [0043] RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISIIINFEKLYK (서열번호 9)
- [0044] KLALKLALKALKAALKLARWEKISIIINFEKLYK (서열번호 10)
- [0045] RRRRRRRRRRWEKISIIINFEKLYK (서열번호 11)
- [0046] RWEKISIIINFEKLYKRRRRRRRR (서열번호 12)
- [0047] RWEKISIIINFEKLYKLETTWWETWWTEWSQPKKRKV (서열번호 13)
- [0048] RWEKISIIINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 14)
- [0049] AGLWRALWRLRSLWRLWRA RWEKISIIINFEKLYK (서열번호 15)
- [0050] GRKKRRQRRRPQWEKISIIINFEKLYK (서열번호 16)
- [0051] GRKKRRQRRRPQWEKISIIINFEKL (서열번호 17)
- [0052] GRKKRRQRRRPQWEKISIIINFEKLYKRWKISIIINFEKL (서열번호 18) (RWEKI 와 YKLRWEKI 는 면역단백질가수분해효소 처리 부위이다).
- [0053] 콜레스테롤-결합된 펩타이드
- [0054] LEQLESIIINFEKLTEWVRRALISC-콜레스테롤 (서열번호 19)
- [0055] 콜레스테롤-CVRRALISLEQLESIIINFEKLTEW (서열번호 20)
- [0056] 콜레스테롤-CSIIINFEKL (서열번호 21)
- [0057] 콜레스테롤-CRWEKISIIINFEKL (서열번호 22) 또는
- [0058] 콜레스테롤-CRWEKISVYDFVWLYKLRWEKISIIINFEKL (서열번호 23)
- [0059] 따라서, 가장 바람직하게는, 상기 항 종양, 종양-특이적 펩타이드(들)은 세포 투과성 펩타이드 또는 콜레스테롤-결합된 펩타이드를 사용하여 상기 바이러스 엔벨로프에 부착되거나 상기 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입된다.
- [0060] 전형적으로, 바이러스 입자를 37°C에서 약 15분 동안 배양하여 상기 CPP-펩타이드 또는 상기 콜레스테롤-결합된 펩타이드와 복합체를 형성시켰다.
- [0061] 또 다른 바람직한 실시예에서, 상기 변형된 엔벨롭 바이러스는 하나 이상의 MHC-I 특이적인 항 종양, 종양-특이적 펩타이드와 함께 제공되어, CD8+ T 세포, 특히 세포 독성 T 세포 림프구(CTLs)로 명명되는, T 효과기 세포의 활성화를 위해 항원 제시 세포 (APC)상의 MHC-1 제시를 통하여 이상적으로 면역 반응을 유도한다.
- [0062] 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 변형된 엔벨롭 바이러스는 하나 이상의 MHC-II 특이적인 항 종양, 종양-특이적 펩타이드와 함께 제공되고, CD4+(T-도움)세포 반응의 활성화를 위하여, 항원 제시 세포(APC)상의 MHC-II 제시를 통하여 이상적으로 면역 반응을 유도한다.
- [0063] 따라서, 본 발명은 또한 개체의 면역 반응을 촉진시키기 위하여, 바이러스 엔벨로프상에 코팅된 상이한 MHC-II

에피토프를 단독으로 또는 MHC-I 에피토프와 조합하여 사용하는 것을 가능하게 한다.

- [0064] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명은 또한 복수의 상이한 항원을 포함한 융합 분자를 포함하는 펩타이드(들)의 사용을 가능하게 한다.
- [0065] 보다 바람직하게는, 상이한 상기 변형된 엔벨롭 바이러스들의 조합이 제공되며, 상기 바이러스는 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군에서 선택된다.
- [0066] 따라서, 본 발명은 전술한 바이러스 중 임의의 2 종 이상의 바이러스의 사용에 관한 것이며, 또한 전술한 바이러스 중 임의의 3 종, 4 종, 5 종, 6 종 또는 7 종 조합의 사용까지 확장된다.
- [0067] 따라서, 본 발명은 프라임-부스트 면역 바이러스 요법 (Prime-Boost immunovirotherapy) 방법을 가능하게 하는 2 종의 상이한 바이러스 유형 또는 바이러스 백본의 사용에 관한 것이고, 부스트 면역 바이러스 요법은 상기 펩타이드로 코팅된 특정 종/속의 프라임(프라이밍, priming) 바이러스 처리 후에 동일한 특정 펩타이드로 코팅된 다른 특정 종/속(면역학적으로 구별되는 바이러스)의 부스트(부스팅, boosting) 바이러스로 처리하는 것이다. 상기 프라임-부스트 면역 바이러스 요법은 상기 프라임-부스트 방법으로 형성된 대부분의 면역 반응을 상기 펩타이드에 향하도록 함으로써 종양-특이적 T 세포 면역 반응을 현저하게 증가시킬 수 있다.
- [0068] 본 발명을 실시 할 때, 본원에 기술된 바와 같이 변형된 엔벨롭 바이러스는 본원에서 기술된 바와 같이 변형된 다른 엔벨롭 바이러스와 함께 프라임-부스트 면역 요법에서 조합되어 사용될 수 있지만, 상기 펩타이드와 동일한 펩타이드를 제시하거나 상기 펩타이드와 동일한 펩타이드를 제시하도록 유전적 또는 비유전적으로 변형된 아데노 바이러스와 같은 임의의 상이한 바이러스와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0069] 당 업계의 숙련자는 엔벨로프 된 바이러스, 즉 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1)은 가장 많이 연구된 종양 용해성 엔벨롭 바이러스이고, T-VEC (Imlygic)라고 불리는 개발된 형태의 HSV-1은 3상 임상시험에서 효능을 보인 최초의 종양 용해성 바이러스이고, 수술 불가능한 흑색 종의 치료를 위해 FDA와 EMEA가 승인 한 최초의 종양 용해성 바이러스이기 때문에, 이러한 치료적 및 임상적으로 승인된 바이러스에 대한 항 바이러스 면역을 회생시켜 항 종양 면역을 촉진하는 새로운 방법을 도입하는 것이 중요하다고 인식할 것이다.
- [0070] 본 발명의 제 2 양태에 따르면, 다음의 구성요소를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다:
- [0071] 1) 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군으로부터 선택되며, 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖는 변형된 엔벨롭 바이러스; 및
- [0072] 2) 적합한 담체.
- [0073] 본 발명의 제 3 양태에 따르면, 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군으로부터 선택된 변형된 엔벨롭 바이러스를 개체에게 노출시키는 단계를 포함하며, 상기 바이러스는 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 갖는다.
- [0074] 더욱 바람직하게는, 상기 방법은 선택된 기간 후에, 상기 개체를 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군에서 선택된 다른 변형된 엔벨롭 바이러스에 노출시키는 단계를 포함하며, 상기 바이러스는 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 가지며, 상기 바이러스는 첫번째 노출에 사용된 바이러스와 상이하다.
- [0075] 대안적으로, 상기 프라임-부스트 면역 바이러스 요법에서, 상기 방법은 선택된 기간 후에, 상기 개체를 유전적 또는 비유전적으로 상기 펩타이드와 동일한 펩타이드를 제시하도록 변형된 임의의 다른 바이러스, 예컨대 아데노 바이러스,에 노출시키는 단계를 포함한다. 또한, 대안적으로, 상기 방법은 선택된 펩타이드를 발현시키기 위해 유전적 또는 비-유전적인 임의의 방식으로 변형된 임의의 바이러스를 먼저 사용하고, 이어서 부스터 요법을 제공하기 위해 동일한 펩타이드를 갖는 본 발명의 변형된 바이러스를 사용하여 실시 할 수 있다.

- [0076] 이러한 방법의 프라임-부스트 면역 바이러스 요법은 실시될 수 있다.
- [0077] 이상적으로, 개체를 바이러스에 노출시키는 상기 단계는 종양 내, 결절 내, 복강 내 또는 정맥 내 주사를 포함한다.
- [0078] 가장 바람직하게는 본원에서 언급된 암은 다음의 암들 중 하나 이상을 포함한다: 비인두 암, 활액막 암, 간세포암, 신장 암, 결합조직 암, 흑색종, 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 뇌암, 인후암, 구강암, 간암, 뼈암, 췌장암, 용모암, 가스트린종, 크롬친화성 세포종, 프로락틴 선종, 백혈병/림프종, 신경종, 폰 히펠-린다우병, 줄 링거-엘슨 증후군, 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 요관암, 뇌암, 희소돌기아교세포종, 신경아세포종, 수막종, 척수암, 뼈암, 골연골종, 연골육종, 유잉육종(Ewing's sarcoma), 원발 부위를 알수 없는 암, 카르시노이드, 위장관 카르시노이드, 섬유육종, 유방암, 파젯 병, 자궁 경부암, 결장 직장암, 직장암, 식도암, 담낭암, 두부암, 안구암, 경부암, 신장암, 빌름즈 종양, 간암, 카포시 육종, 전립선암, 폐암, 고환암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 구강암, 피부암, 중피종, 다발성 골수종, 난소암, 내분비 췌장암, 글루카곤 종, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 뇌하수체암, 연부조직 육종, 망막아세포종, 소장암, 위암, 흉선암, 갑상선암, 영양막암, 포상기태, 자궁암, 자궁내막암, 질암, 외음부암, 청신경종, 균상식육종, 인슐리노마, 카르시노이드 증후군, 소마토스타틴종, 치은암, 심장암, 구순암, 수막암, 구강암, 신경암, 구개암, 이하선암, 복막암, 인두암, 흉막암, 침샘암, 혀암 및 편도선암.
- [0079] 본 발명의 추가의 실시예에서, 개체를 하나 이상의 항 종양, 종양-특이적 펩타이드를 발현하는 변형된 바이러스에 노출시키는 단계 이후에 또는 상기 개체를 허피스 심플렉스 바이러스 1 (HSV-1), 허피스 심플렉스 바이러스 2 (HSV-2), 우두 바이러스, 수포성 구내염 인디아나 바이러스 (VSV), 홍역 바이러스(MeV), 마라바 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스(NDV)를 포함하는 군으로부터 선택되고, 바이러스 엔벨로프에 비-유전적으로 부착되거나 바이러스 엔벨로프 내에/통하여 삽입되는 상기 펩타이드(들)과 동일하거나 대부분 동일한 펩타이드를 갖는 엔벨로프 바이러스에 노출시키는 단계 이후에 상기 개체를 체크 포인트 억제제에 노출한다. 상기 체크 포인트 억제제는 PD-1, PD-L1 및 CTLA-4와 같은 면역 체크 포인트 분자를 억제한다.
- [0080] 청구 범위 및 본 발명의 전술한 설명에서, 명시적인 언어 또는 필요한 의미로 인해 문맥상 다른 경우를 제외하고, 단어 "포함하다(comprises)", 또는 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 기재된 특징의 존재를 명확히 하기 위해 포괄적으로 사용되는 것이지, 본 발명의 다양한 실시예에서의 다른 특징의 존재 또는 추가를 배제하는 것은 아니다.
- [0081] 본 명세서에 인용된 임의의 특허 또는 특허 출원을 포함하는 모든 참고 문헌은 본원에 참고 문헌으로 인용된다. 임의의 참고 문헌이 선행 기술을 구성한다는 승인은 없다. 또한, 임의의 선행기술이 당해 기술 분야의 통상의 일반적인 지식 일부를 구성한다는 승인은 없다.
- [0082] 본 발명 각 양상의 바람직한 특징은 임의의 다른 양상과 관련하여 기술될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 다른 특징은 하기 실시예로부터 명백해질 것이다. 일반적으로 말해서, 본 발명은 본 명세서 (첨부된 청구 범위 및 도면 포함)에 개시된 특징 중 임의의 신규한 것 또는 임의의 신규한 조합까지 확장된다. 따라서, 본 발명의 특정 양상, 실시예 또는 예시와 관련된 결합(conjunction)에 대해 기술된 특징, 정수, 특성, 화합물 또는 화학적 잔기는 그것과 양립 할 수 있다면, 본원에 기재된 임의의 다른 양상, 실시예 또는 예시에도 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다.
- [0084] 또한, 달리 언급되지 않는 한, 여기에 개시된 임의의 특징은 동일하거나 유사한 목적을 제공하는 대안적인 특징으로 대체 될 수 있다.
- [0085] 본 명세서의 발명의 설명 및 청구항에 걸쳐, 단수는 문맥상 달리 요구하지 않는 한 복수를 포함한다. 특히, 부정 관사가 사용되는 경우, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, 명세서는 단수형 뿐만 아니라 복수형도 고려하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0086] 본 발명의 일 실시예는 다음을 참조하여 단지 예시로서 설명될 것이다 :
- [0087] 재료 및 방법
- [0088] 펩타이드
- [0089] 이 연구에 사용 된 펩타이드는 아래에 나열되어 있으며 모두 PepScan에서 구입하였다.

- [0090] CPP 펩타이드
- [0091] GRKKRRQRRRQRRRALISLEQLESINFEKLTEW (서열번호 8)
- [0092] GRKKRRQRRRQRRRALISLEQLESINFEKLTEW-FITC (서열번호24)
- [0093] RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISINFEKLYKLK-FITC (서열번호 25)
- [0094] KLALKLALKALKAALKLARWEKISINFEKLYKLK-FITC (서열번호 26)
- [0095] RRRRRRRRRRWEKISINFEKLYKLK-FITC (서열번호 27)
- [0096] FITC -RWEKISINFEKLYKLRRRRRRRR (서열번호 28)
- [0097] FITC-RWEKISINFEKLYKLETTWETWTEWSQPKKKRKY (서열번호 29)
- [0098] FITC-RWEKISINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호 30)
- [0099] GLWRALWRLRLRSLWRLWRARWEKISINFEKLYKLK-FITC (서열번호 31)
- [0100] GRKKRRQRRRQRRWEKISINFEKL (서열번호 17)
- [0101] GRKKRRQRRRQRRWEKISINFEKLYKLRWEKISINFEKL (서열번호 18)
- [0102] 콜레스테롤 결합 펩타이드
- [0103] LEQLESINFEKLTEWRVRRALISC-cholesterol (서열번호 19)
- [0104] FITC-LEQLESINFEKLTEWRVRRALISC-cholesterol (서열번호 32)
- [0105] cholesterol-CRVRRALISLEQLESINFEKLTEW (서열번호 20)
- [0106] cholesterol-CRVRRALISLEQLESINFEKLTEW-FITC (서열번호 33)
- [0107] cholesterol-CVINFEKL (서열번호 21)
- [0108] cholesterol-CRWEKISINFEKL (서열번호 22)
- [0109] cholesterol-CRWEKISVYDFVWLYKLRWEKISINFEKL (서열번호 23)
- [0110] 세포주
- [0111] 인간 폐 암종 세포주 A549, 아프리카 녹색 원숭이 신장 상피 세포주 Vero (B), 쫓과 흑색종 세포주 B16/OVA 및 B16-F10을 10% 우 태아 혈청 (FBS) (Life Technologies), 1% L- 글루타민 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM에서 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>로 배양하였다. 인간 삼중 음성 유방암 세포주 MDMBA436을 10% 우 태아 혈청 (FBS) (Life Technologies), 1% L- 글루타민 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 RPMI에서 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>로 배양하였다.
- [0112] 바이러스의 생산
- [0113] 허피스 심플렉스 바이러스 1은 Vero 세포에서 생산되었으며, 자당 구배 초원심 분리를 통해 정제하고 20mM MES, 100mM NaCl, 30mM Tris-HCl (pH 7.2)에 용리되었다. 우두 바이러스의 Western 예비 균주(VVDD-mDAI-RFP)는 A549 세포에서 생산되고, 36 % 자당 쿠션 초 원심 분리를 통해 정제하여 1mM Tris (pH 9.0)에 용리되었다.
- [0114] ELISA
- [0115] 2.5x10<sup>7</sup> 우두 바이러스 입자는 37°C에서 15분 동안 DMEM 100 $\mu$ l에서 8 $\mu$ g의 CPP-펩타이드-FITC와 콜레스테롤-결합된 펩타이드-FITC 중 어느 하나와 복합체를 형성하였다. 복합체 형성 후, 결합되지 않은 펩타이드를 1mM Tris (pH 9.0) 내 36 % 자당 쿠션을 통해 초원심분리 (20.000g, 40-80 분)하여 제거 하였다. ELISA를 위해, 항우두 다클론 항체(Abcam)를 4°C에서 2 $\mu$ g/ml 농도로 맥시솔브 96 웰 면역 플레이트에 밤새(o/n) 코팅 하였다. 우두 바이러스-펩타이드 복합체를 37°C 또는 실온(RT)에서 30-60분 동안 배양하고 1xPBS로 3회 세척하였다. 복합체는 서양고추냉이 과산화효소(Abcam)에 결합된 항-FITC 항체 (2% BSA-PBS에 1 : 5000 희석)로 검출하였다. 2.5x10<sup>7</sup> 허피스 심플렉스 1 바이러스 입자는 37°C에서 15분 동안 DMEM 100 $\mu$ l에서 8 $\mu$ g의 CPP-펩타이드-FITC와 8 $\mu$ g의 콜레스테롤-결합된 펩타이드-FITC 중 어느 하나와 복합체를 형성하였다. ELISA를 위해, 항-HSV-1 다클론 항체

(Abcam)를 4°C에서 2µg/ml 농도로 맥시솔브 96 웰 면역 플레이트에 밤새(o/n) 코팅 하였다. HSV-1-펩타이드 복합체를 37°C 또는 실온(RT)에서 30-60분 동안 배양하고 1 x PBS로 3회 세척하였다. 복합체는 서양고추냉이 과산화효소 (Abcam)에 결합된 항-FITC 항체 (2% BSA-PBS에 1 : 5000 희석)로 검출하였다.

[0116] 유세포분석

[0117]  $5 \times 10^7$  우두 바이러스 입자는 37°C에서 15분 동안 DMEM 200µl에서 24µg의 CPP-펩타이드-FITC와 콜레스테롤-결합된 펩타이드-FITC 중 어느 하나와 복합체를 형성하였다. 복합체 형성 후, 결합되지 않은 펩타이드를 1mM Tris (pH 9.0) 내 36% 자당 쿠션을 통해 초원심분리(20.000g, 40-80분)하여 제거하고 PBS 내의 2% 포르말린으로 용출시켰다. 고정 후, 포르말린을 36% 자당 쿠션을 통한 또 다른 초원심분리(20.000g, 40-80분)로 제거하고 펠릿을 1x 초순수 PBS (Gibco)로 용출시켰다. 유세포분석은 Apogee A50 Micro Flow Cytometer (Apogee)로 수행하였고 FITC 검출은 복합체를 평가하기 위해 사용되었다.

[0118] 교차 발표 실험 (Cross-presentation experiments)

[0119] 10% RPMI-1640 배양 배지 800µl 내의  $2 \times 10^6$  비장 세포를 200µl의 GRKKRRQRRRPRRRRALISLEQLESIIINFEKLTWE (서열 번호 8), LEQLESIIINFEKLTWEVRRRALISC-콜레스테롤 (서열 번호 19) 또는 콜레스테롤-CRVRRRALISLEQLESIIINFEKLTWE (서열 번호 20) 펩타이드 희석액 (0.19µg/µl)과 함께 배양하였다.

[0120] 우두 바이러스-펩타이드 복합체는 ELISA에 대해 기술한 바와 같이 제조하였다. 배양 2시간 후, 세포를 세척하고 SIINFEKL에 결합한 APC 항-마우스 H-2Kb 또는 APC 마우스 IgG1,  $\kappa$ Isotype Ctrl (Biolegend, San Diego, CA, USA)로 염색하고, 샘플을 유세포분석으로 분석 하였다.

[0121] 세포 생존도 분석

[0122] 세포 생존도는 CellTiterGlo 96 Aqueous One Solution 세포 증식 분석(promega) 및 샘플의 발광도를 측정하기 위한 multi-well 플레이트 리더(Varioscan; Thermolabsystems)를 사용하여 측정하였다.

[0123] 표면 플라즈몬 공명

[0124] 측정은 multi-parametric SPR Navi™ 220A (Bionavis Ltd, Tampere, 핀란드)장비를 사용하여 수행되었다. 인산 완충 식염수 (PBS) (pH 7.4)를 러닝 완충액으로 사용하였다. 실험 전반에 걸쳐 20µl/min의 일정한 유속을 사용하고 온도를 +20°C로 설정하였다. 파장 670nm의 레이저 광이 표면 플라즈몬 여기에 사용되었다.

[0125] 이산화규소 표면을 갖는 센서 슬라이드를 5분간 플라즈마 처리하여 활성화시키고 이어서 이소프로판올 내의 50mM APTES에 센서를 4시간 동안 배양하여 APTES ((3- 아미노프로필)트리에톡시실란)으로 코팅하였다. 그런 다음 센서를 세척하고 SPR 장치에 넣고 약 12분 동안 PBS (pH 7.4)내  $1.1 \times 10^7$  pfu의 VACV를 주입하여 두 가지 테스트 채널의 센서 표면에 바이러스를 in situ 고정시키고, 이어서 3분간 PBS로 세척하였다. 그런 다음 CPP-포함 항-중양 펩타이드 또는 CPP 서열이 없는 펩타이드(비-상호작용 대조군)를 1.23µM부터 100µM 까지 펩타이드 농도를 증가시키면서 동시에 병렬적인 유세포의 두 유동 채널에 주입하였다.

[0126] 동물 실험

[0127] C57BL/6J01aHsd-마우스 주를 모든 동물 실험에 사용하였다. 350000 B16-OVA 세포를 마우스의 오른쪽 옆구리에 주입하고 (재 공격 실험에서는 세포를 왼쪽 옆구리에 주입) 종양 크기가 약  $50\text{mm}^3$ 에 도달하면(주사 후 10-12 일) 마우스를 비-변형 된 바이러스, PeptiENV 플랫폼, 펩타이드 단독 또는 주입 배지 단독(Mock)으로 처리하였다. 마우스를 0 일 및 2 일에 처리 한 다음, 8-10일에 부스터 처리를 하였다. 종양 크기가 허용되는 최대 값에 도달할 때까지 매2일마다 종양을 측정하였다.

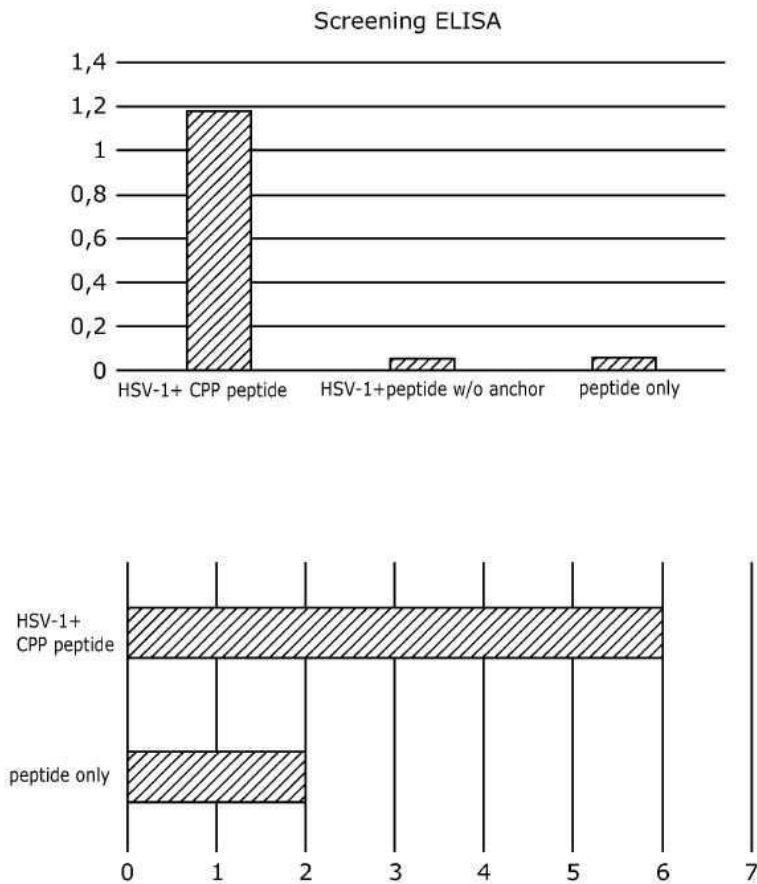
도면

도면1

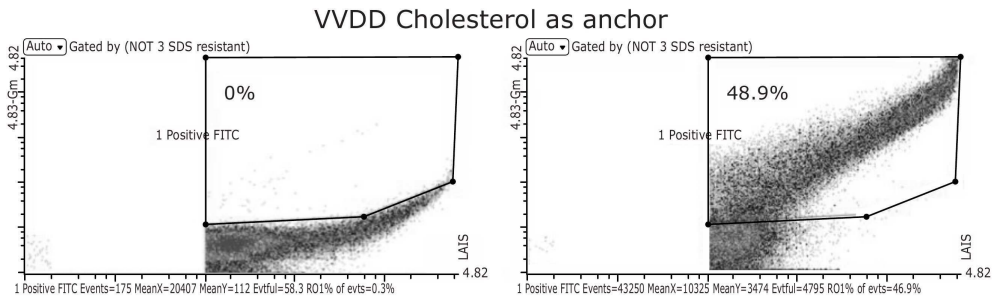
SUMMARY OF THE DATA:

VIRUS	PEPTIDE ANCHORING TYPE	ANTI-TUMOUR PEPTIDE	ASSESSMENT OF COMPLEX FORMATION	ASSESSMENT OF COMPLEX FORMATION	ASSESSMENT OF COMPLEX FORMATION	ASSESSMENT OF IMMUNOGENICITY OF THE PEPTIDES	MHCI presentation (of PeptiENV platform) and maturation of DC11+	PeptiENV infectivity on A549 cells	PeptiENV infectivity on A549, B16-OVA, B16-F10, 4T1, MD MBA cancer cells	PeptiENV PLATFORM in vivo immunogenicity	PeptiENV platform in vivo anti-tumour effects
vaccinia virus	Cholesterol N-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	GRKKRRQRRPQ N-terminus	SIINFEKL	ELISA		Apogee	CD11c+ presenting SIINFEKL	CD86 and CD101	wt. like infectivity		tested	tested
vaccinia virus	GLWRALWRLRLSLWRLIWR A N-terminus	SIINFEKL	ELISA		Apogee	CD11c+ presenting SIINFEKL	CD86 and CD103			tested	tested
vaccinia virus	AGYLGLKINLKALALAKKL C-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	RQIKIIFQNRIKRWKK N-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	KLALKALKALKALK A N-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	RRRRRRRRR N-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	RRRRRRRRR C-terminus	SIINFEKL	ELISA								
vaccinia virus	KETWVETWVTEWSOPKKRKKV C-terminus	SIINFEKL	ELISA								
herpes virus	CPP	SIINFEKL	ELISA	fluorescence correlation spectroscopy		CD11c+ presenting SIINFEKL				tested	tested

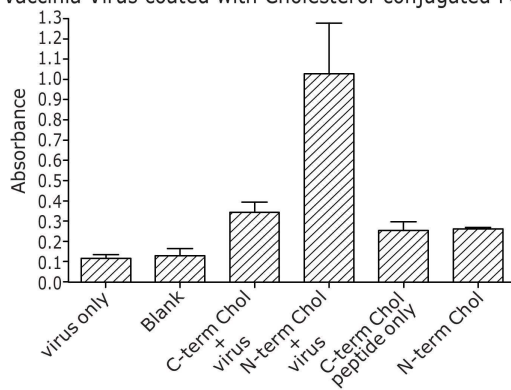
도면2



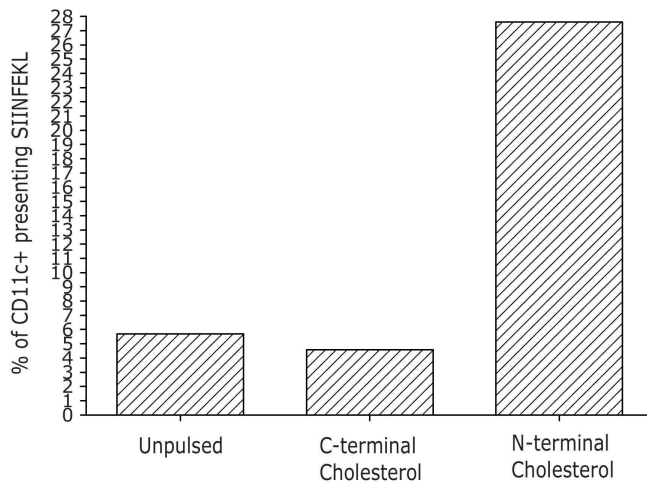
도면3



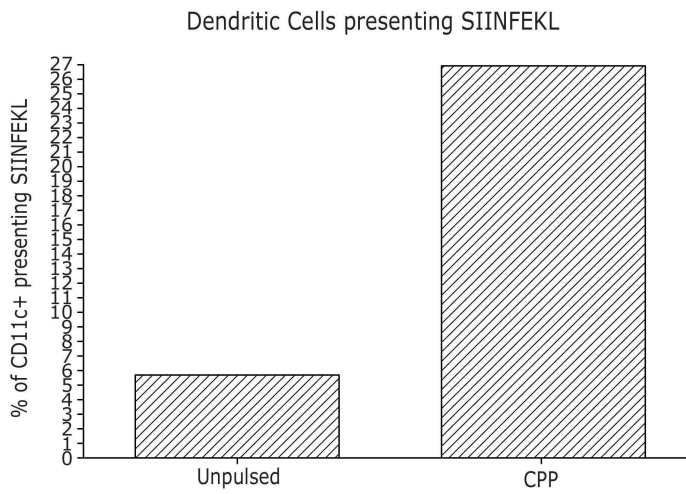
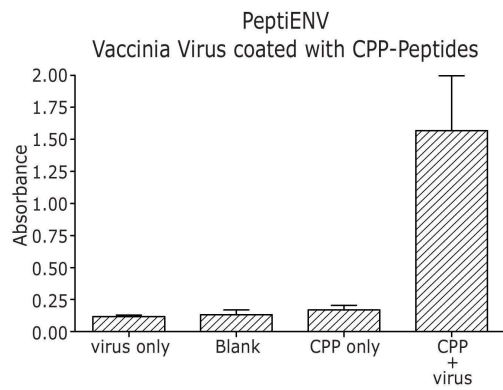
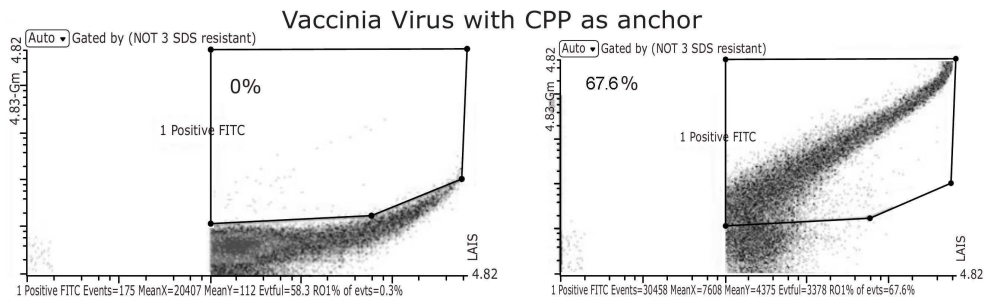
### PeptiENV Vaccinia Virus coated with Cholesterol-conjugated Peptides



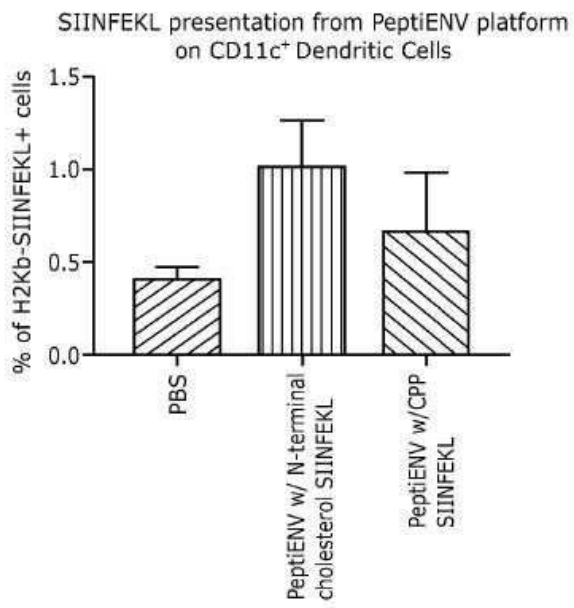
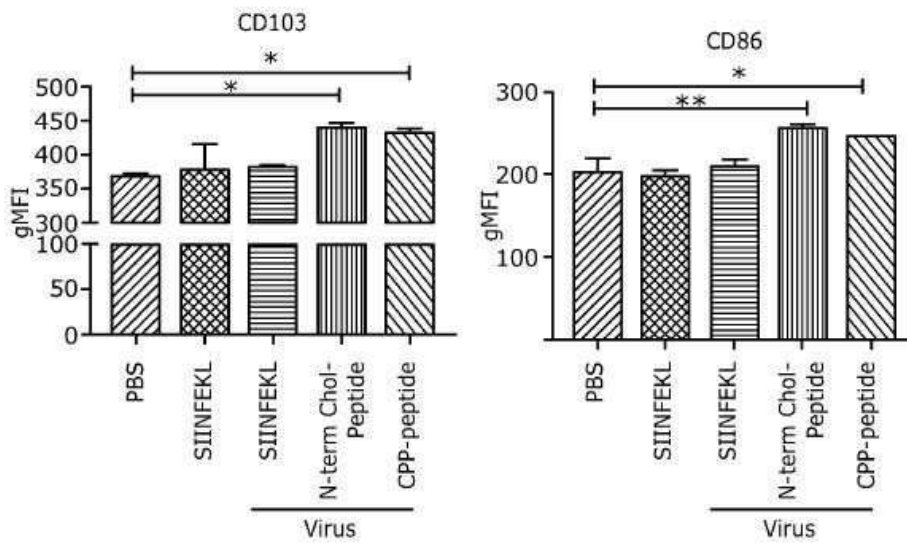
### Dendritic Cells presenting SIINFEKL



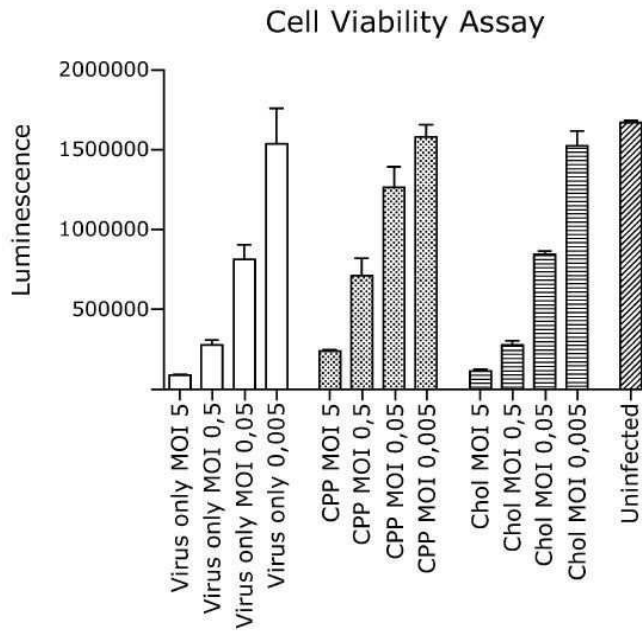
도면4



도면5



도면6



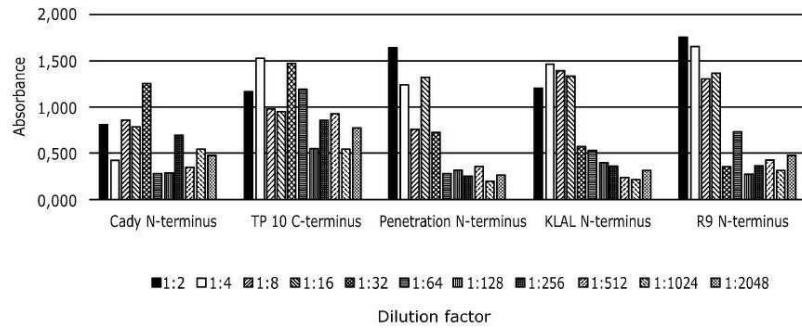
도면7

A  
cholesterol-CRVRRALISLEQLESIINFEKLEW (SEQ ID NO:20)

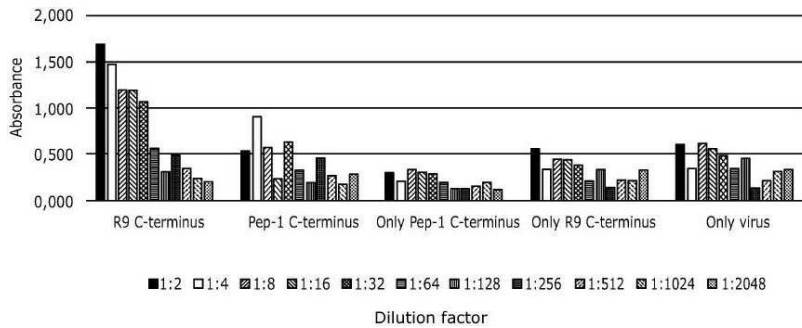
B  
GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEOLESIINFEKLEW (SEQ ID NO:8)

도면8

다양한 세포 투과성 펩타이드 서열이 펩타이드를 바이러스 엔벨로프에 부착시키기 위해 사용될 수 있다.

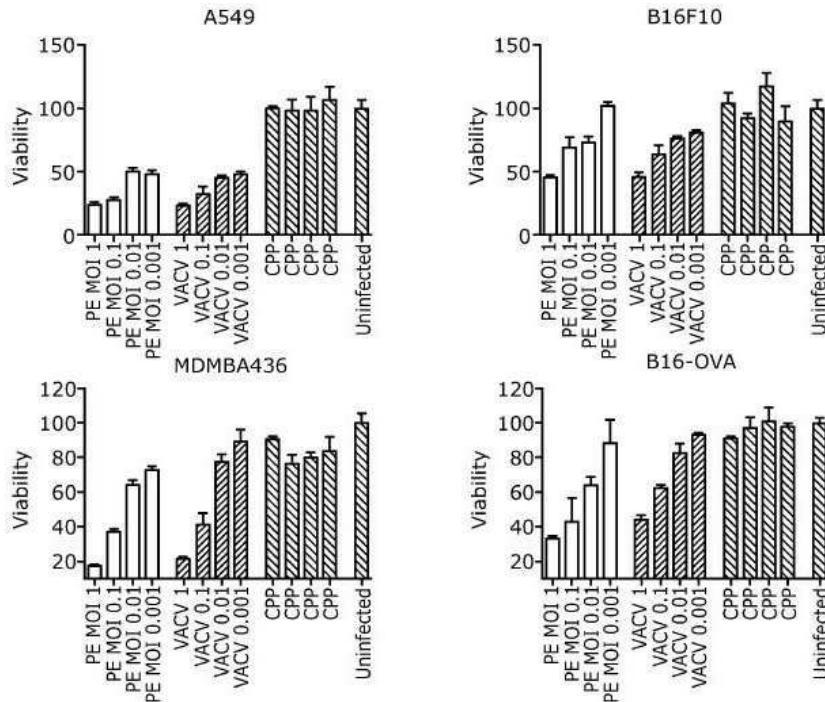


다양한 세포 투과성 펩타이드 서열이 펩타이드를 바이러스 엔벨로프에 부착시키기 위해 사용될 수 있다.



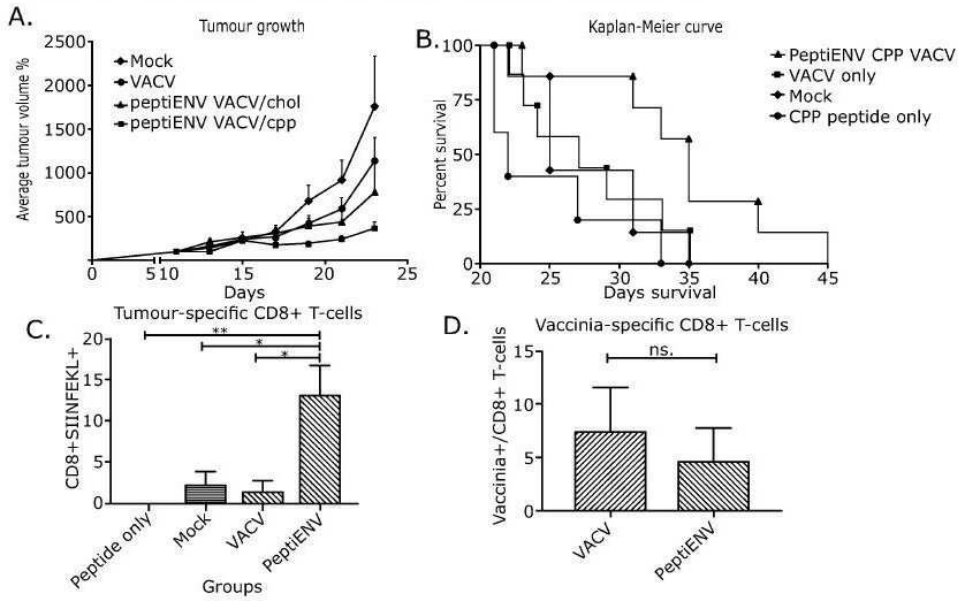
도면9

바이러스 엔벨로프 내로 펩타이드를 부착하는 것이 바이러스의 감염성을 감소시키지 않는다.



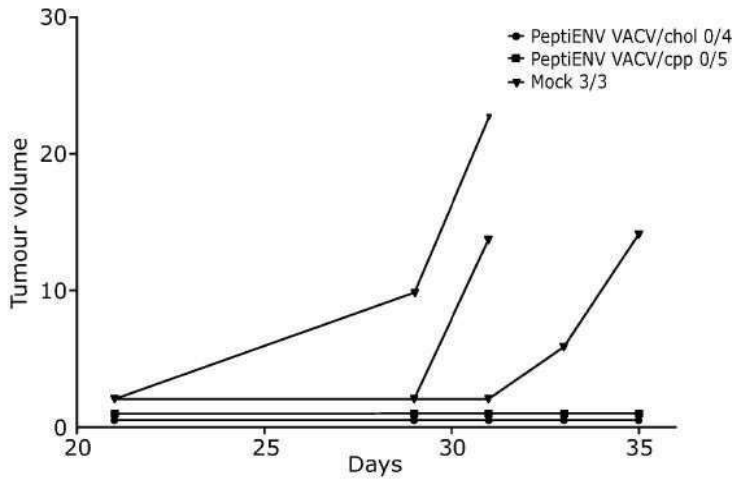
도면10

CPP-또는 콜레스테롤 잔기(moieties)에 의해 바이러스 엔벨로프에 고정된 항-종양 펩타이드가 종양에 대한 조절을 향상시키고 생존률을 신장시키는 광범위한 항 종양 면역을 유도한다.



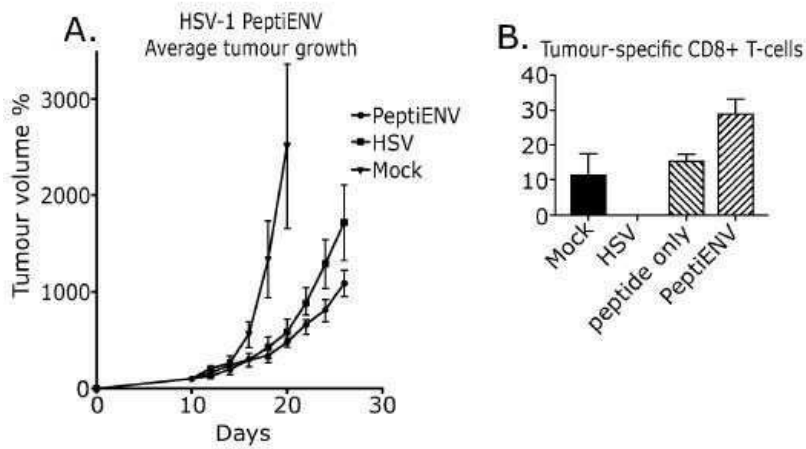
도면11

cpp 또는 콜레스테롤 잔기(moieties)에 의해 바이러스 엔벨로프 내에 고정된 항 종양 펩타이드가 광범위한 항 종양 면역을 유도하고, 종양이 재투여(rechallenge)된 마우스를 보호한다.



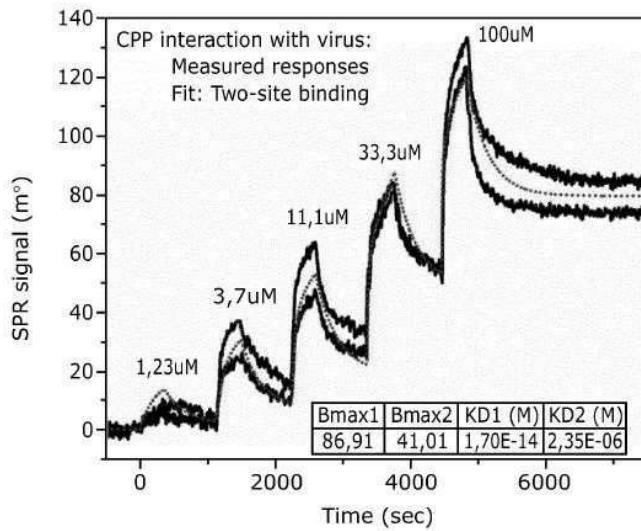
도면12

CPP 잔기(moiety)에 의해 바이러스 엔벨로프 내에 고정된 항 종양 펩타이드가 향상된 종양 조절을 유발하는 광범위한 항 종양 면역을 유도한다.



도면13

CPP-포함 항종양 펩타이드가 바이러스 엔벨로프에 펨토몰라 (femtomolar) 친화력을 갖는다.



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Cerullo, Vincenzo

Capasso, Christian

Ylosmaki, Erkki

<120> NON-GENETIC MODIFICATION OF ENVELOPED VIRUSES

<130> 4599P/WO

<150> GB1616365.1

<151> 2016-09-27

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 1

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1                    5                    10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 2

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1                    5                    10                    15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 3

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1                    5                    10                    15

Leu Ala

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 5

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> cell penetrating peptide

<400> 6

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 7

Ala Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg

1 5 10 15

Leu Leu Trp Arg Ala

20

<210> 8

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 8

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Val Arg Arg

1                    5                    10                    15

Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys

                  20                    25                    30

Leu Thr Glu Trp

                  35

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 9

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1                    5                    10                    15

Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu

                  20                    25                    30

Lys

<210> 10

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 10

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1                    5                    10                    15

Leu Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr



Lys Lys Arg Lys Val

35

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 14

Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu

1                    5                    10                    15

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu

                  20                    25                    30

Ala Lys Lys Ile Leu

35

<210> 15

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 15

Ala Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg

1                    5                    10                    15

Leu Leu Trp Arg Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu

                  20                    25                    30

Lys Leu Tyr Lys Leu Lys

35

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 16

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys

1                    5                    10                    15

Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu

20                    25

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 17

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys

1                    5                    10                    15

Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

20                    25

<210> 18

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<400> 18

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys

1                    5                    10                    15

Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu Arg Trp Glu Lys

20                    25                    30

Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

35                    40

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (26)..(26)

<223> cholesterol

<400> 19

Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp

1                    5                    10                    15

Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Cys Xaa

                  20                    25

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> cholesterol

<400> 20

Xaa Cys Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser

1                    5                    10                    15

Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp

                  20                    25

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> cholesterol

<400> 21

Xaa Cys Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1                    5                    10

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> cholesterol

<400> 22

Xaa Cys Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1                    5                    10                    15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> cholesterol

<400> 23

Xaa Cys Arg Trp Glu Lys Ile Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu

1                    5                    10                    15

Tyr Lys Leu Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

                  20                    25                    30

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (37)..(37)

<223> FITC

<400> 24

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Val Arg Arg

1                    5                    10                    15

Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys

                  20                    25                    30

Leu Thr Glu Trp Xaa

35

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (34)..(34)

<223> FITC

<400> 25

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1                    5                    10                    15

Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu

20                    25                    30

Lys Xaa

<210> 26

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (36)..(36)

<223> FITC

<400> 26

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1                    5                    10                    15

Leu Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr

20                    25                    30

Lys Leu Lys Xaa

35

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (27)..(27)

<400> 27

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile

1                    5                    10                    15

Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu Lys Xaa

                  20                    25

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> FITC

<400>

28

Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys

1                    5                    10                    15

Leu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

                  20                    25

<210> 29

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> FITC

<400> 29

Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys  
 1                    5                    10                    15

Leu Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro  
                   20                    25                    30

Lys Lys Lys Arg Lys Val  
                   35

<210> 30

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (1)..(1)

<223> FITC

<400> 30

Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala  
                   20                    25                    30

Leu Ala Lys Lys Ile Leu  
                   35

<210> 31

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> X

<222> (38)..(38)

<223> FITC

<400> 31

Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu  
 1                    5                    10                    15

Leu Trp Arg Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys

20

25

30

Leu Tyr Lys Leu Lys Xaa

35

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> Z

<222> (1)..(1)

<223> FITC

<220><221> X

<222> (27)..(27)

<223> cholesterol

<400> 32

Glx Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu

1

5

10

15

Trp Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Cys Xaa

20

25

<210> 33

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell penetrating peptide

<220><221> Z

<222> (1)..(1)

<223> cholesterol

<220><221> X

<222> (27)..(27)

<223> FITC

<400> 33

Glx Cys Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser

1

5

10

15

Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Xaa

20

25