

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552040

(P2023-552040A)

(43)公表日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/005 (2006.01)	C 0 7 K	14/005		4 B 0 6 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02		
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全156頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-524090(P2023-524090)	(71)出願人	523138862		
(86)(22)出願日	令和3年10月19日(2021.10.19)		ヴェリミュン インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年6月9日(2023.6.9)		アメリカ合衆国, ワシントンディ. シ		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/055676		ー. 2 0 0 1 2, スイート 2 2 0 0,		
(87)国際公開番号	WO2022/087013		7 1 4 4 サーティーンズ プレイス ノ		
(87)国際公開日	令和4年4月28日(2022.4.28)		ースウエスト		
(31)優先権主張番号	63/220,485	(74)代理人	100114775		
(32)優先日	令和3年7月10日(2021.7.10)		弁理士 高岡 亮一		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100121511		
(31)優先権主張番号	63/093,525		弁理士 小田 直		
(32)優先日	令和2年10月19日(2020.10.19)	(74)代理人	100202751		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 岩堀 明代		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100208580		
	最終頁に続く		弁理士 三好 玲奈		
		(74)代理人	100191086		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルスにインスパイアされた組成物及びがんの治療のために同じものを使用して、既存の免疫応答をリダイレクトする方法

(57)【要約】

ウイルスに触発された組成物及びその調製方法が開示され、本組成物は、カプシド骨格を自発的に形成し、かつエピトープを含むペプチドに共役して免疫リダイレクターカプシド (I R C) を形成する変異型パピローマウイルス L 1 タンパク質を含む。ペプチド上のエピトープは、対象の感染またはワクチン接種によるエピトープへの過去の暴露から発達した対象の既存の免疫記憶に基づいて、対象の免疫系によって認識されるように設計されている。変異型パピローマウイルス L 1 タンパク質は、アミノ末端切断、カルボキシ末端切断、及びヘリックス 4 での切断を含む 3 つの変異体を有する。L 1 タンパク質のこれらの変異体により、非標準的な T = 1 ジオメトリカプシド骨格を形成するカプソメアが生成される。必要とする対象におけるがんの治療及び／または予防における組成物の使用及び使用方法が開示される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、

複数のウイルスタンパク質であって、前記複数のウイルスタンパク質のそれぞれが、P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質の変異アミノ酸配列を含む、前記複数のウイルスタンパク質と、

P a p i l l o m a v i r i d a e 抗原ペプチド以外の 1 つまたは複数の病原体由来の 1 つまたは複数のエピトープをそれぞれ含む、1 つまたは複数のペプチドと、を含み、

前記 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質の前記変異アミノ酸配列は、野生型 L 1 タンパク質配列に対して少なくとも以下の変異を含み：（a）アミノ末端からの少なくとも 5 つのアミノ酸残基の欠失、及び（b）ヘリックス 4 領域からの少なくとも 10 個のアミノ酸残基の欠失、

前記 1 つまたは複数のペプチドは、前記複数のウイルスタンパク質に結合しており、

前記複数のウイルスタンパク質は、自発的に集合して、腫瘍細胞上に発現されたプロテオグリカンに結合する 1 に等しい三角測量数 T を有する正 20 面体または正 12 面体カプシドを形成する、前記組成物。

【請求項 2】

前記複数の変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質のそれぞれの前記アミノ酸配列が、（c）カルボキシ末端からの少なくとも 30 個のアミノ酸残基の欠失をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 1 つまたは複数のペプチドが、前記複数の変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質に共役している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 1 つまたは複数のペプチドが、前記変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質のシステイン、リジン、またはアルギニン残基を介して前記変異 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質に共役している、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 1 つまたは複数のペプチドが、前記変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質と前記ペプチドの残基との間のジスルフィド、マレイミド、またはアミド結合を介して前記変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質に共役している、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記複数の変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質の少なくとも 25 % が、前記 1 つまたは複数のペプチドの少なくとも 1 つに共役している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記複数の変異型 P a p i l l o m a v i r i d a e L 1 タンパク質の少なくとも 25 % ～ 85 %（w/w）が、前記 1 つまたは複数のペプチドの少なくとも 1 つに共役している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数のペプチドのそれぞれが、1 つまたは複数のプロテアーゼ切断配列をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 1 つまたは複数のプロテアーゼ切断配列が、フリン切断配列、マトリックスメタロプロテアーゼ切断配列、またはディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ（ADAM）切断配列を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 1 つまたは複数のエピトープが、ウイルス、細菌、寄生虫、または真菌のエピトープである、請求項 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

前記ウイルスエピトープが、コロナウイルス、ワクシニア、水痘帯状疱疹、帯状疱疹、風疹、肝炎、インフルエンザ、麻疹、ムンプス、ポリオウイルス、人痘、狂犬病、デング熱、エボラ、西ナイル、黄熱病、またはジカ熱のエピトープのうちの1つまたは複数であるか、

前記細菌エピトープが、*Bordetella pertussis*、*Clostridium tetani*、*Chlamydia trachomatis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Hemophilus influenza*、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus*、*Vibrio cholera*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Bacillus Calmette-Guerin*、*Salmonella*、*Escherichia coli*、*Legionella pneumophila*、*Rickettsia*、*Treponema pallidum pallidum*、*Bacillus anthracis*、*Clostridium botulinum*、または *Yersinia* のエピトープのうちの1つまたは複数であるか、または、

10

前記寄生性エピトープが、*Entamoeba histolytica*、*Toxoplasma gondii*、*Toxoplasma gondii*、*Toxoplasma gondii*、*Trypanosoma*、または *Plasmodium* のエピトープのうちの1つまたは複数である、請求項 10 に記載の組成物。

20

【請求項 12】

前記 1 つまたは複数のエピトープの少なくとも 1 つが、小児期ワクチン抗原性エピトープである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数のペプチドが、*Papillomaviridae* 抗原ペプチド以外の 1 つまたは複数の病原体由来の少なくとも 2 つのエピトープを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

腫瘍細胞上に発現する前記プロテオグリカンが、ヘパリン硫酸プロテオグリカン (HSPG)、パールカン、ヒアレクタンパーシカン、グリピカン-3、小型ロイシンリッチプロテオグリカン (SLRP)、及び／またはバイグリカンである、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

前記複数の変異型 *Papillomaviridae* L1 タンパク質が T = 7 カプシド骨格を形成しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記複数の変異型 *Papillomaviridae* L1 タンパク質がマウス変異型 *Papillomaviridae* L1 タンパク質である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記複数の変異型 *Papillomaviridae* L1 タンパク質のそれぞれのアミノ酸配列が配列番号 134 であり、核酸配列配列番号 135 または 136 によってコードされる、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

がんを治療する、がんの発生を減少させる、がんの進行及び／または転移を阻害することを必要とする対象におけるがんを治療する、がんの発生を減少させる、がんの進行及び／または転移を阻害する方法であって、前記方法は、薬学的に有効な量の組成物を前記対象に投与することを含み、前記組成物は、

複数のウイルスタンパク質であって、前記複数のウイルスタンパク質のそれぞれが、*Papillomaviridae* L1 タンパク質の変異アミノ酸配列を含む、前記複数のウイルスタンパク質と、

Papillomaviridae 抗原ペプチド以外の 1 つまたは複数の病原体由来の

50

1つまたは複数のエピトープをそれぞれ含む、1つまたは複数のペプチドと、を含み、

前記Papillomaviridae L1タンパク質の前記変異アミノ酸配列は、野生型L1タンパク質配列に対して少なくとも以下の変異を含み：(a)アミノ末端からの少なくとも5つのアミノ酸残基の欠失、及び(b)ヘリックス4領域からの少なくとも10個のアミノ酸残基の欠失、

前記1つまたは複数のペプチドは、前記複数のウイルスタンパク質に結合しており、

前記複数のウイルスタンパク質は、自発的に集合して、腫瘍細胞上に発現されたプロテオグリカンに結合する1に等しい三角測量数Tを有する正20面体または正12面体カプシドを形成する、前記方法。

【請求項19】

10

前記対象から腫瘍組織サンプルを得ることと、

前記腫瘍組織において、前記腫瘍組織サンプル中の1つまたは複数の腫瘍細胞によって発現される1つまたは複数のMHC分子の配列を同定することをさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記対象が以前に病原体に感染しているか、またはワクチン接種されており、前記1つまたは複数のエピトープが前記病原体の抗原性エピトープである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記1つまたは複数のエピトープが、前記対象から取得した腫瘍組織サンプル中の腫瘍細胞によって発現される1つまたは複数のMHC分子と複合体を形成することができる、請求項18に記載の方法。

20

【請求項22】

請求項1に記載の前記組成物を製造するためのプロセスであって、前記プロセスは、

(a) L1タンパク質をコードする発現ベクターで原核細胞を形質転換することと、

(b) 前記L1タンパク質の発現を促進する条件下で前記形質転換された原核細胞を培養することと、

(c) 前記形質転換された原核細胞を溶解して、発現されたL1タンパク質を放出することと、

(d) 前記発現したL1タンパク質から細胞破片を分離し、前記L1タンパク質を封入体として回収することと、

30

(e) 必要に応じて前記L1タンパク質封入体を洗浄することと、

(f) 前記L1タンパク質封入体を可溶化することと、

(g) 前記L1タンパク質をリフォールディングすることと、

(h) リフォールディング緩衝液中で前記リフォールディングされたL1タンパク質をインキュベートすることにより、1に等しい三角形分割数Tを有する正20面体または正12面体カプシドを形成することと、を含む、前記プロセス。

【請求項23】

(i) 共役緩衝液中で、1つまたは複数のペプチドの存在下、還元条件下で前記組み立てられたL1タンパク質をインキュベートすることによって、前記1つまたは複数のペプチドを組み立てられたL1タンパク質に共役させることをさらに含む、請求項22に記載のプロセス。

40

【請求項24】

前記リフォールディング緩衝液が、変性剤、還元剤、250～500mMの塩、非イオン性界面活性剤、金属キレート剤、及びpH7.5～8.5の緩衝液を含む、請求項22に記載のプロセス。

【請求項25】

前記塩が250mM～500mMで存在する、請求項24に記載のプロセス。

【請求項26】

前記1つまたは複数のペプチドの前記L1タンパク質に対するモル比が少なくとも1：

50

5である、請求項24に記載のプロセス。

【請求項27】

1に等しい三角測量Tを有する前記正20面体または正12面体カプシドを形成する際に、前記リフォールディング緩衝液から変性剤を除去するが、還元剤は維持することをさらに含む、請求項22に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

カプシド骨格を形成し、対象の既存の免疫系応答記憶によって認識される1つまたは複数の抗原を含む1つまたは複数のペプチドに結合している変異型パピローマウイルスタンパク質、特にL1主要カプシドタンパク質を含む組成物、及び対象におけるがんの治療、予防及び／または発生率の低減におけるそれらの使用方法が開示される。

10

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年10月19日に出願された米国仮特許出願第63／093,525号、及び2021年7月10日に出願された米国仮特許出願第63／220,485号に対する優先権を主張し、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

配列表の組み込み

本出願は、コンピューター可読形態の配列表(CRF)に提出された配列表を含む。配列表及びCRFの紙のコピーは同一であり、参照により本明細書に組み込まれる。配列表には、2021年10月19日に作成された「2021-10-198005US__ST25.txt」という名前の1つのファイルが含まれており、サイズは64KBである。

20

【背景技術】

【0004】

典型的ながん治療には、化学療法、放射線、及び手術が含まれる。しかし、手術は侵襲性が高く、特に転移後に失敗することがよくある。化学療法及び放射線療法は効果的であり得るが、対象の生活の質を大幅に低下させる可能性のある厳しい副作用をもたらすことがよくある。これらの治療にもかかわらず、多くのがんの治療は未だ困難なものであり、原発腫瘍の縮小または排除に成功したとしても、治療は転移がんとうに戦うのに効果がない可能性がある。標的化送達は、がんの治療を改善するための最も有望な機会の1つになっているが、このアプローチもまた、最も多くの課題を呈する。がんワクチンなどの免疫療法は、免疫系を刺激し、この応答を利用して、癌細胞の表面に優先的に存在する過剰発現タンパク質を特異的に標的とし、癌細胞の標的除去をもたらす能力があるため、魅力的な選択肢として浮上している。このような治療法は、標的的特異的であり、非特異的自己免疫がなく毒性が低い可能性があるという点で魅力的である。これらの標的療法は、手術、放射線、または化学療法と比較して、侵襲性や外傷性が低いとも考えられている。しかし、がん関連抗原に基づくがんワクチンは、例えば、乏しい臨床免疫原性、免疫寛容、オフターゲット効果などにより、成功が制限される可能性がある。さらに、そのような方法は、典型的には、所定の患者のがんに特異的ながん関連抗原を同定して、がんの効果的な標的化を達成することを必要とする。したがって、ほとんどのがん関連抗原は免疫系によって許容される自己抗原であり、免疫応答が低下するため、このアプローチは何度も失敗している。

30

40

【0005】

がんの治療と予防への他のアプローチは、キメラ抗原受容体(CAR)形質導入T細胞(CAR-T)の養子移入またはがん特異的抗体の面倒な同定を必要とするモノクローナル抗体の注入に基づいており、がんの種類または亜型のサブセットのみに適応可能である。最後に、エクスピボで増殖させた腫瘍特異的リンパ球の養子移入は、自然に発生する抗腫瘍応答を利用することを目的とした方法論である。これらのアプローチはすべて、同様に高度に個別化されており、対象の特定のがんのがんエピトープの同定及び／またはエク

50

スピボでの患者の自家細胞の拡大が必要である。重要なことに、ゴールドスタンダード動物モデルにおけるこれらの特定のがん抗原アプローチによって実証された成功は、常に人間に翻訳できるとは限らない。最後に、がんに苦しむすべての患者が腫瘍で同じ抗原を発現するわけではないため、これらのアプローチの幅広い適用性にはいくつかの重大な制限がある。

【0006】

個別化されたがんの標的治療及び排除の問題に対する解決策は、ウイルス感染歴の形で見出される。これらのアプローチでは、対象の感染履歴を使用して、細胞傷害性記憶T細胞を介して過去のウイルス感染免疫応答を再開する。過去のウイルス感染に基づくこのような治療法は、対象自身の免疫学的記憶によって認識されるエピトープを癌細胞に沈着させることにより、特定のがんを標的とするように微調整することが可能である。ウイルスL1タンパク質は、癌細胞標的にエピトープ標識を送達するための重要な機能を提供し、それによって対象自身の既存の免疫系構成要素を動員及び活性化し、標識された癌細胞を標的にして排除する。

10

【0007】

マウスパピローマウイルスL1タンパク質は、より優れた、より個別化されたがん治療に対するこの継続的なニーズに対処するための優れた候補である。マウスパピローマウイルスL1タンパク質の特定の突然変異が、例えば、ヒトパピローマウイルス（HPV）で形成されるように、典型的にはウイルスL1タンパク質によって形成され通常のT=7カプシドよりも小さい12個のカプソメアで構成される、カプシド骨格と呼ばれるより小さいサイズのT=1ウイルスカプシドの形成をもたらすことを偶然にも発見した。これらのより小さいサイズのカプシド骨格は非常に安定であり、より高い結合効率を可能にし、サイズが小さいため、固形腫瘍または腫瘍の微小環境に浸潤する際の立体障害が少なくなる。

20

【発明の概要】

【0008】

様々な実施形態では、複数の変異マウスパピローマウイルスL1タンパク質を含む組成物が開示される。組成物は、Papillomaviridae抗原ペプチド以外の1つまたは複数の病原体由来の1つまたは複数のエピトープをそれぞれが含む1つまたは複数のペプチドをさらに含む。PapillomaviridaeL1タンパク質の変異アミノ酸配列は、野生型L1タンパク質配列に対して少なくとも以下の変異を含む：(a) アミノ末端からの少なくとも5つのアミノ酸残基の欠失、及び(b) ヘリックス4領域からの少なくとも10個のアミノ酸残基の欠失。1つまたは複数のペプチドは、複数のウイルスタンパク質に結合している。複数のウイルスタンパク質は自発的に集合して、腫瘍細胞上に発現されたプロテオグリカンに結合する1に等しい三角測量数Tを有する正20面体または正12面体カプシド骨格を形成する。したがって、組成物は、複数の変異型Papillomaviridaeタンパク質及び1つまたは複数のそのようなペプチドを含む。別の言い方をすれば、組成物は、複数の変異型PapillomaviridaeL1タンパク質に結合した1つまたは複数のペプチドを含む。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、変異L1タンパク質は、L1タンパク質のカルボキシ末端からの少なくとも30個のアミノ酸残基の欠失をさらに含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、変異型PapillomaviridaeL1タンパク質とペプチドの残基との間のジスルフィド、マレイミド、またはアミド結合を介してL1タンパク質に結合する。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、L1タンパク質の約25%～約85%(w/w)がペプチドの少なくとも1つに結合している。いくつかの実施形態では、ペプチドはまた、フリン切断配列、マトリックスメタロプロテアーゼ切断配列、またはディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ(ADAM)切断配列から任意に選択されるプロテアーゼ切断配列を含む

50

。

【0011】

エピトープは、それらが、治療される対象が以前に曝露された、対象がそれに対して免疫反応性を発達させた、または再曝露されると対象の免疫系がエピトープを有する細胞を認識して攻撃するような以前の曝露の免疫記憶を有する抗原に由来するものでなければならぬことを除いて、特に限定されない。例えば、エピトープは小児期のワクチンに由来し得る。他の例では、エピトープは、対象が回復した過去の病原性感染に由来し得る。

【0012】

免疫リダイレクターカプシド（IRC）分子を含む組成物は、細胞表面に位置するヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合する。IRC分子はT=7カプシドを形成しない。いくつかの実施形態では、変異L1タンパク質は、マウスL1タンパク質に由来する。

10

【0013】

本明細書では、必要とする対象におけるがんの治療、予防、及び／または発生を低減させる方法が企図され、方法は、薬学的に有効な量の本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む。本明細書に記載の組成物の薬学的に有効な量を対象に投与することを含む、必要とする対象における癌腫瘍の増殖、進行、及び／または転移を阻害する方法も提供され、方法は、薬学的に有効な量の本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む。記載された方法における記載された組成物の使用もまた、本明細書において企図される。

20

【0014】

そのような方法は、いくつかの実施形態において、対象から腫瘍組織サンプルを取得すること、及び腫瘍組織において、腫瘍組織サンプル中の1つまたは複数の腫瘍細胞によって発現される1つまたは複数のMHC分子の配列を同定することをさらに含む。

【0015】

特定の実施形態では、1つまたは複数のエピトープは、対象から取得した腫瘍組織サンプル中の腫瘍細胞によって発現される1つまたは複数のMHC分子と複合体を形成することができる。そのような方法に有用な薬剤の製造のための使用における、記載された組成物の二次使用も企図される。

【0016】

記載された組成物を製造するためのプロセスが、本明細書においてさらに提供される。このプロセスは様々な工程を含み、係る工程は、（a）L1タンパク質の核酸配列をコードする発現ベクターで原核細胞を形質転換すること、（b）L1タンパク質の発現を促進する条件下で形質転換された原核細胞を培養すること、（c）形質転換された原核細胞を溶解して、発現されたL1タンパク質を放出すること、（d）発現されたL1タンパク質から細胞破片を分離し、L1タンパク質を封入体として回収すること、（e）必要に応じてL1タンパク質封入体を洗浄すること、（f）L1タンパク質封入体を可溶化すること、（g）還元剤の存在下でリフォールディング緩衝液中でL1タンパク質をリフォールディングすること、及び（h）同じリフォールディング緩衝液中で1に等しい三角測量数Tを有する正20面体または正12面体カプシドを形成することである。このようなプロセスは、いくつかの実施形態では、1つまたは複数のペプチドの存在下、還元条件下で組み立てられたL1タンパク質をインキュベートすること、及び／または集合緩衝液から変性剤を除去することによって、1つまたは複数のペプチドを組み立てられたL1タンパク質に共役緩衝液中で共役することをさらに含むが、ただし、三角形分割数Tが1に等しい正20面体または正12面体カプシドを形成する場合は、還元剤を維持する。

30

40

【0017】

本発明の概要は、本開示の全体及び全範囲を表すことを意図せず、かつそのように解釈されるべきではない。さらに、ここで本明細書における「本開示」またはそれらの態様に対してなされる参照が、本開示のある特定の実施形態を意味すると理解されたく、必ずしも全ての実施形態を特定の記述に限定すると解釈されるべきではない。本開示は、本発明の概要、ならびに添付図面及び実施形態の説明において様々なレベルで詳細に記載され、

50

本発明の概要における要素、成分などの包含または非包含のいずれかにより、本開示の範囲に関して限定されないことが意図される。本開示の追加の態様は、発明を実施するための形態により、特に図面とともに用いられるとき、容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】野生型マウスパピローマウイルスL1（MPVL1）及び関連領域の概略遺伝子地図である。

【図1B】三重切断マウスパピローマウイルスL1タンパク質（MPV.10.34.d）の概略遺伝子地図であり、その複数のコピーが一緒になってT=1正20面体パピローマウイルスカプシド骨格を形成する。

【図2】対応するヒトHPV16L1タンパク質配列（配列番号：128）とアラインされたMusPVL1タンパク質配列（配列番号：127）のアミノ配列アラインメントである。

【図3】MPV.10.34.dカプシド骨格の製造につながるプロセス工程のフローチャートであり、これは形成された後、ペプチドに結合して免疫調節カプシド（IRC）を形成する。

【図4A】製造プロセス（図3及び実施例1に記載）による宿主細胞タンパク質汚染物質由来のMPV.10.34.dカプシド骨格の漸進的な精製を示す、染色されたSDS-PAGEゲルの写真であり、宿主細胞タンパク質夾雑物が精製プロセス全体で大幅に減少したことを例証する（MW＝標準分子量バンド、ゲルの左側の数字は分子量をキロダルトン（kDa）で示し、一番上の行の数字はロードされたタンパク質の量をマイクログラムで示す）。

【図4B】銀染色に供されたSDS-PAGEゲルの写真であり、各レーンは、製造プロセス（図3及び実施例1に記載）により宿主細胞タンパク質汚染物質から精製されたMPV.10.34.dカプシド骨格のサンプルに対応し、宿主細胞タンパク質夾雑物が精製プロセス全体で大幅に減少したことを例証する（MW＝標準分子量バンド、ゲルの左側の数字は分子量をキロダルトン（kDa）で示し、一番上の行の数字はロードされたタンパク質の量をマイクログラムで示す）。

【図5】図3及び実施例1に記載の製造及び精製工程後の精製MPV.10.34.dカプシド骨格の500nmのスケールバーを有する透過型電子顕微鏡（TEM）画像の写真である。カプシド骨格はこの画像に基づく、直径はおよそ20nm～30nmである。

【図6A】リフォールディング工程後であるが2カラムクロマトグラフィー精製前のMPV.10.34.dカプシド骨格の粒径分布の強度を示す動的光散乱（DLS）プロットである。X軸は直径サイズ分布（nm）を示し、Y軸はパーセント強度データを提供するのである。

【図6B】リフォールディング工程後であるが2カラムクロマトグラフィー精製前の精製MPV.10.34.dカプシド骨格の集団サイズを示す動的光散乱プロットである。X軸は直径サイズ分布（nm）を示し、Y軸は重量パーセントデータを提供するのである。

【図7A】1mMジチオスレイトール（DTT）、1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、及び1mMフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）を添加した緩衝液中でのMPV.10.34.dL1タンパク質のリフォールディングを示す動的光散乱プロットである。X軸は直径サイズ分布（nm）を示し、Y軸は重量パーセントデータを提供するのである。

【図7B】1mMDTTを添加した緩衝液中でのMPV.10.34.dL1タンパク質のリフォールディングを示す動的光散乱プロットである。X軸は直径サイズ分布（nm）を示し、Y軸は重量パーセントデータを提供するのである。

【図7C】1mMEDTAを添加した緩衝液中でのMPV.10.34.dL1タンパク質のリフォールディングを示す動的光散乱プロットである。矢印は、サンプル全体の集団サイズを測定するボリューム強度プロットによって検出される、正しくリフォールディングされていない凝集タンパク質を示す。X軸は直径サイズ分布（nm）を示し、Y軸は重

10

20

30

40

50

量パーセントデータを提供する。

【図 7 D】DTT、EDTA、またはPMSFを添加していない緩衝液中でのMPV. 10. 34. dL1タンパク質のリフォールディングを示す動的光散乱プロットである。矢印は、サンプル全体の集団サイズを測定するボリューム強度プロットによって検出される、正しくリフォールディングされていない凝集タンパク質を示す。X軸は直径サイズ分布 (nm) を示し、Y軸は重量パーセントデータを提供する。

【図 8 A】1mMDTT、1mMEDTA、及び1mMPMSFを添加した、正確にリフォールディングされたMPV. 10. 34. dL1タンパク質リフォールディング緩衝液の捕捉を示すクロマトグラムである。Y軸は、左側に吸光度単位 (mAU)、右側にmS / cmを示し、X軸は溶出量 (mL) を示す。

【図 8 B】1mMDTTを添加した、正確にリフォールディングされたMPV. 10. 34. dL1タンパク質リフォールディング緩衝液の捕捉を示すクロマトグラムである。Y軸は、左側に吸光度単位 (mAU)、右側にmS / cmを示し、X軸は溶出量 (mL) を示す。

【図 8 C】1mMEDTAを添加した、正確にリフォールディングされたMPV. 10. 34. dL1タンパク質リフォールディング緩衝液の捕捉を示すクロマトグラムである。矢印は、捕捉と溶出が不十分であることを示し、これは、AとBと比較して、条件CとDではMPV. 10. 34. dカプシド骨格が正しくリフォールディングされていないことが観察されたことを示している。Y軸は、左側に吸光度単位 (mAU)、右側にmS / cmを示し、X軸は溶出量 (mL) を示す。

【図 8 D】DTT、EDTA、またはPMSFが添加されていないただの緩衝液の存在下でリフォールディングされた正しくリフォールディングされたMPV. 10. 34. dL1の捕捉を示すクロマトグラムである。矢印は、捕捉と溶出が不十分であることを示し、これは、AとBと比較して、条件CとDではMPV. 10. 34. dカプシド骨格が正しくリフォールディングされていないことが観察されたことを示している。Y軸は、左側に吸光度単位 (mAU)、右側にmS / cmを示し、X軸は溶出量 (mL) を示す。

【図 9 A】溶出されたMPV. 10. 34 dL1タンパク質の強度 (Y軸) に基づく粒径 (直径、nm) 分布 (X軸) を示すMPV. 10. 34. dL1タンパク質を示す動的光散乱プロットであり、平均粒子サイズが20 nm ~ 30 nmであることを示している。

【図 9 B】MPV. 10. 34. dL1タンパク質を示す動的光散乱プロットであり、溶出されたMPV. 10. 34 dL1タンパク質の体積 (他の混入物、すなわち宿主細菌細胞タンパク質、Y軸に対するリフォールディングされたタンパク質の相対割合) に基づく粒子サイズ (直径、nm) 分布 (X軸) を示し、平均粒子サイズが20 nm ~ 30 nmであることを示している。

【図 9 C】高度に精製された可溶性発現MPV. 10. 34. dカプシド骨格を示す100 nmのスケールバーを含む透過型電子顕微鏡 (TEM) 顕微鏡写真の写真である。

【図 10】コンフォメーションMPVL1-A4コンフォメーション特異的モノクローナル抗体をリフォールディングされたMPV. 10. 34. dカプシド骨格に結合させることによって得られたELISAデータのグラフであり、可溶性及びリフォールディングされたMPV. 10. 34. dカプシド骨格が異なるpH条件下で同じT = 1コンフォメーションを有することを示している。Y軸は450 nmでの光学密度を示し、X軸はMPV. 10. 34. dカプシド骨格の量 (ng) を示す。

【図 11】IRC、すなわち結合されたMPV. 10. 34. dL1カプシド骨格を生成するための工程の略図である。

【図 12】非共役MPV. 10. 34. dカプシド骨格 (レーン3) 及びIRC (レーン4) を示す染色SDS-PAGEゲルの写真を示す。レーン1は分子量標準を示し、レーン2は意図的に空白のままにしている。

【図 13】染色SDS-PAGEゲルの写真であり、野生型HPV16カプシド骨格 (レーン3) と比較して、MPV. 10. 34. dカプシド骨格がより高い程度のペプチド結合 (レーン5) を受けることを示す。レーン2及び4は、それぞれ非共役の野生型HPV

10

20

30

40

50

16及びMPV.10.34.dカプシド骨格である。レーン1は分子量標準を示す。

【図14】野生型HPV16IRCまたはMPV.10.34.dIRCまたはHPV16カプシド骨格のサンプルを、L1タンパク質に対する還元剤の比率が0（非共役対照、レーン2及び9）、10:1（レーン2及び10）、100:1（レーン3及び11）、及び1000:1（レーン4及び12）で添加された還元剤の存在下で示す染色SDS-PAGEゲルの写真である。次にサンプルを10回濾過し、同様にSDS-PAGEで分析した。非共役対照はレーン5及び12にあり、10:1のL1タンパク質に対する還元剤の比率はレーン6及び13にあり、100:1のL1タンパク質に対する還元剤の比率はレーン7及び14にあり、1000:1のL1タンパク質に対する還元剤の比率はレーン8及び15にある。

【図15A】10回の濾過にかけられ、円で示されるようにIRCの崩壊をもたらした、野生型HPV16IRCの150,000XでのTEM顕微鏡写真である。

【図15B】10回の濾過にかけられ、円で示されるようにIRCの崩壊をもたらした、野生型HPV16IRCの200,000XでのTEM顕微鏡写真である。

【図15C】10回の濾過にかけられたMPV.10.34.dIRCの120,000XでのTEM顕微鏡写真である。MPV.10.34.dIRCは分解を示さなかった。

【図15D】10回の濾過にかけられたMPV.10.34.dIRCの200,000XでのTEM顕微鏡写真である。MPV.10.34.dIRCは分解を示さなかった。

【図16】MPV.10.34.dL1ペプチド骨格におけるペプチド結合に対するペプチド濃度の影響を示す染色SDS-PAGEゲルであり、ペプチド:還元剤の比率が5:1、10:1、及び25:1の共役反応中にペプチドが存在し、還元剤対L1濃度の比率が5:1で還元剤（（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン、TCEP）が存在する（レーン1、4、及び7）。L1に対する還元剤の比率が10:1（レーン2、5、及び8）または20:1（レーン3、6、及び9）であるサンプルでは、結合率のペプチド濃度への依存性は見られなかった。レーン6は、10:1の還元剤対L1タンパク質及び10:1のペプチド対L1濃度の比を含む参照サンプルである。（実施例6を参照）。これは、デンストメトリーによって決定されるように、一貫して約50%のペプチド結合を提供する条件である。CEX-FB035（左側）と表示されたレーンは、MPV.10.34.dカプシド骨格対照である。

【図17】MPV.10.34.dカプシド骨格におけるペプチド結合に対するペプチド濃度の影響を示す染色SDS-PAGEゲルであり、ペプチド:還元剤の比率が5:1、10:1、及び25:1の共役反応中にペプチドが存在し、還元剤対L1濃度の比率が5:1で還元剤（（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン、TCEP）が存在する（レーン3、6、及び9）。レーン1、4、及び7は、還元剤対L1濃度1:1の比率に暴露されたサンプルである。レーン2、5、及び8は、還元剤対L1濃度2.5:1の比率に暴露されたサンプルである。Rは、ペプチド対L1の比が10:1であり、還元剤対L1の比を有する、参照サンプルである。CEX-FB035（左側）と表示されたレーンは、MPV.10.34.dカプシド骨格対照である。

【図18A】MPV.10.34.dカプシド骨格及び様々なMPV.10.34.dIRCの結合の検出を示す細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムであり、IRCがヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）の結合を介して腫瘍細胞に対する特異性を保持することを示している。データには、MPV.10.34.d及び対応するCMVpp65IRC（実線）、MPV.10.34.d及び対応するE7IRC（太い実線）、MPV.10.34.d及び対応するOVAIRC（太い破線）、及びMPV.10.34.dカプシド骨格（破線）が含まれる。サンプルは、右へのピークのシフトによって証明されるように、腫瘍細胞に対する特異性を示した。これらの実験における陽性対照は、野生型MPVカプシド骨格（点線）であった。陰性対照には、IRCもL1も含まないサンプル（長い破線）が含まれる。

【図18B】すべてのMPV.10.34.dIRCが、HSPGが発現されていない細胞

胞に結合しないことを示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。データには、MPV. 10. 34. d及び対応するCMV pp65 IRC（実線）、MPV. 10. 34. d及び対応するE7 IRC（太い実線）、MPV. 10. 34. d及び対応するOVA IRC（太い破線）、並びに、MPV. 10. 34. dカプシド骨格（破線）が含まれる。全てのサンプルは、右へのピークのシフトによって証明されるように、腫瘍細胞に対する特異性を示した。これらの実験における陽性対照は、野生型MPVカプシド骨格（点線）であった。陰性対照には、IRCもL1も含まない（長い破線）。

【図19】OVA（SIINF EKL、配列番号95）／Kb（MHC-I）複合体の腫瘍細胞表面ディスプレイの検出を示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。結果は、OVA共役HPV16 IRC（実線）とOVA共役MPV. 10. 34. d IRC（太い実線）の等モル濃度を並べて比較した場合、OVA（SIINF EKL、配列番号：95）結合MPV. 10. 34. d IRCが、OVA（SIINF EKL、配列番号：95）結合HPV16 IRCと比較して、より多くのエピトープを腫瘍細胞MHC受容体にロードできることを示している。陰性対照は、長い破線で表される。遊離ペプチド（SIINF EKL、配列番号：95）を1 μ g/mLで含む陽性対照は、短い破線で表される。

【図20A】CMV（NLAPMVATV、配列番号129）／HLA-A*0201（MHC-I）複合体の腫瘍細胞表面細胞数の検出を示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムであり、CMV結合MPV. 10. 34. d IRCが、HCT116細胞のヒト腫瘍細胞MHC受容体にヒトCMVウイルスエピトープをロードすることができることを示している。データポイントには、無関係な対照ペプチド（細い破線）、MPV. 10. 34. dカプシド骨格（細い実線）、MPV. 10. 34. d及び対応するCMV pp65 IRC（太い実線）、並びに、HCMV遊離ペプチド（太い破線）が含まれる。

【図20B】CMV（NLAPMVATV）（配列番号129）／HLA-A*0201（MHC-I）複合体の腫瘍細胞表面細胞数の検出を示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。

【図21A】OVA結合MPV. 10. 34. d IRCの、10 mg/mLの可溶性ヘパリン（破線）をサンプルに予め混合したMC38腫瘍細胞への結合の競合阻害を示すことを検出すること、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。破線と重なる実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。

【図21B】OVA結合MPV. 10. 34. d IRCの、5 mg/mLの可溶性ヘパリン（破線）をサンプルに予め混合したMC38腫瘍細胞への結合の競合阻害の検出を示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。破線と重なる実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。破線と重なる実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。

【図21C】OVA結合MPV. 10. 34. d IRCの、1 mg/mLの可溶性ヘパリン（破線）をサンプルに予め混合したMC38腫瘍細胞への結合の競合阻害の検出を示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである。実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。破線と重なる実線は、OVAペプチドの負荷がないことを示す陰性対照である。

【図22A】50 μ Mの濃度のフェーリン阻害剤が、OVA結合MPV. 10. 34. d IRCがOVAエピトープを腫瘍細胞MHC受容体にロードすることを防止することを示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである（暗線を指す矢印）。サンプルには、未処理の細胞（細線）またはジメチルスルホキシド（DMSO）のみで処理され、風鈴阻害剤なしの細胞（破線）、及び陰性対照（細線）が含まれる。

【図22B】5 μ Mの濃度のフェーリン阻害剤が、OVA結合MPV. 10. 34. d IRCがOVAエピトープを腫瘍細胞MHC受容体にロードすることを防止することを示す

、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである（暗線を指す矢印）。サンプルには、未処理の細胞（細線）またはジメチルスルホキシド（DMSO）のみで処理され、風鈴阻害剤なしの細胞（破線）、及び陰性対照（細線）が含まれる。

【図22C】0.5 μ Mの濃度のフューリン阻害剤が、OVA結合MPV. 10.34. dIRCがOVAエпитープを腫瘍細胞MHC受容体にロードすることを防止することを示す、細胞数対蛍光強度のフローサイトメーターヒストグラムである（暗線を指す矢印）。サンプルには、未処理の細胞（細線）またはジメチルスルホキシド（DMSO）のみで処理され、風鈴阻害剤なしの細胞（破線）、及び陰性対照（細線）が含まれる。

【図23A】OVA結合MPV. 10.34. dIRCが、マウス腫瘍細胞株ID8-LucにおいてOVA結合HPV16IRCと同様のOVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

10

【図23B】OVA結合MPV. 10.34. dIRCが、マウス腫瘍細胞株B16-LucにおいてOVA結合HPV16IRCと同様のOVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

【図24A】E7結合HPV16IRCが、マウス腫瘍細胞株ID8-LucにおいてOVA結合HPV16IRCと同様のOVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

【図24B】E7結合HPV16IRCが、マウス腫瘍細胞株B16-LucにおいてOVA結合HPV16IRCと同様のOVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

20

【図25A】ヒトCMV結合MPV. 10.34. dIRCが、ヒト腫瘍細胞株HCT-116においてCMV結合HPV16IRCと同様のCMV特異的CD8T細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

【図25B】ヒトCMV結合MPV. 10.34. dIRCが、ヒト腫瘍細胞株Ovarcar3においてCMV結合HPV16IRCと同様のCMV特異的CD8T細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

【図25C】ヒトCMV結合MPV. 10.34. dIRCが、ヒト腫瘍細胞株MCF7においてCMV結合HPV16IRCと同様のCMV特異的CD8T細胞の免疫リダイレクトを誘発することを示す棒グラフである。

【図26】OVA結合MPV. 10.34. dIRCの腫瘍細胞への結合と、OVA結合MPV. 10.34. dIRCを介した腫瘍細胞表面MHC-I分子へのOVA（SIINFELK、配列番号95）のペプチドローディングとの高い統計的相関を実証するグラフである。

30

【図27A】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、10mg/mLの濃度のヘパリンとのインキュベーションが0.625 μ g/mL OVA結合MPV. 10.34. dIRCの結合を防止すること示しており、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクト応答が誘発されなかった（破線）。点線は、MPV. 10.34. dカプシド骨格の陰性対照を表す。実線は、ヘパリンを含まない陽性対照サンプルを表す。

【図27B】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、10mg/mLの濃度のヘパリンとのインキュベーションが0.3125 μ g/mL OVA結合MPV. 10.34. dIRCの結合を防止すること示しており、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクト応答が誘発されなかった（破線）。点線は、MPV. 10.34. dカプシド骨格の陰性対照を表す。実線は、ヘパリンを含まない陽性対照サンプルを表す。

40

【図27C】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、10mg/mLの濃度のヘパリンとのインキュベーションが0.156 μ g/mL OVA結合MPV. 10.34. dIRCの結合を防止すること示しており、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクト応答が誘発されなかった（破線）。点線は、MPV. 10.34. dカプシド骨格の陰性対照を表す。実線は、ヘパリンを含まない陽性対照サンプルを表す。

【図28】細胞結合アッセイ及び細胞毒性アッセイの用量滴定から得られたデータの表である。この研究を2回繰り返した（各回で少なくとも3回の反復試験を伴う）。幾何平均

50

蛍光強度（MFI）の平均値は、2つの実験から報告される。これらのデータを使用して、OVA共役MPV. 10.34.dIRC結合と細胞毒性の統計的相関関係を評価した。

【図29】パーセント細胞毒性対MFIのグラフであり、OVA結合MPV. 10.34.dIRC結合と細胞毒性の高い統計的相関を示している。

【図30A】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、GARDASIL（登録商標）9ワクチン接種血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを2.5 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図30B】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、GARDASIL（登録商標）9ワクチン接種血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.625 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図30C】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、GARDASIL（登録商標）9ワクチン接種血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.156 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図31A】標的腫瘍細胞への結合に対する抗MPV. 10.34.d血清のMPV. 10.34.dとのインキュベーションの効果を試験する2つのELISAアッセイから得られたデータの450 nmでの吸光度対希釈係数のグラフである。

【図31B】抗MPV. 10.34.d血清のMPV. 10.34.dIRCとのインキュベーションの効果を試験する2つのELISAアッセイから得られたデータの450 nmでの吸光度対希釈係数のグラフである。結果は、血清がMPV. 10.34.dカプシド骨格を特異的に認識して結合することを示している。

【図32A】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、MPV特異的血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを2.5 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図32B】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、MPV特異的血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.625 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図32C】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、MPV特異的血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.156 µg/mLで共培養しても、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図32D】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、抗MPV. 10.34.d血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを2.5 µg/mLで共培養しても、血清が特異的にOVA結合MPV. 10.34.dIRCに結合するという事実にもかかわらず、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図32E】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、抗MPV. 10.34.d血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.625 µg/mLで共培養しても、血清が特異的にOVA結合MPV. 10.34.dIRCに結合するという事実にもかかわらず、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図32F】パーセント細胞毒性対E:T比のグラフであり、抗MPV. 10.34.d血清（1:200）とOVA共役MPV. 10.34.dIRCを0.156 µg/mLで共培養しても、血清が特異的にOVA結合MPV. 10.34.dIRCに結合するという事実にもかかわらず、OVA特異的マウスT細胞の免疫リダイレクトが阻害されなかったことを示す。

【図33A】図32A、32B、及び32Cでグラフ化されたデータに対応するデータの表であり、MPV血清（1:200）希釈の存在下で異なるサンプル濃度におけるOVA

10

20

30

40

50

結合MPV. 10. 34. dIRCの腫瘍細胞への結合の検出を示す。結果は、MPV血清がOVA共役MPV. 10. 34. dIRCにも特異的に結合するという事実にもかかわらず、OVA結合MPV. 10. 34. dIRCの結合を示している。

【図33B】図32D、32E、及び32Fでグラフ化されたデータに対応するデータの表であり、抗MPV血清（1：200）希釈の存在下で異なるサンプル濃度におけるOVA結合MPV. 10. 34. dIRCの腫瘍細胞への結合の検出を示す。結果は、MPV. 10. 34. dIRC血清がOVA共役MPV. 10. 34. dIRCにも特異的に結合することが示されたという事実にもかかわらず、OVA結合MPV. 10. 34. dIRCの結合を示している。

【図34】OVA（SIINFELK、配列番号95）／Kb（MHC-I）複合体の腫瘍細胞表面ディスプレイを検出するOVA結合MPV. 10. 34. dIRC（ng/mL）の幾何平均蛍光強度対濃度のグラフである。結果は、OVA結合MPV. 10. 34. dIRCが、MHC細胞内プロセッシング経路が欠損している腫瘍細胞の表面のMHC受容体に細胞外でOVAペプチドをロードすることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0019】

定義

本明細書は、本開示の例示的な実施形態及び応用について説明する。しかしながら、本開示は、これらの例示的な実施形態及び用途、または例示的な実施形態及び用途が動作する方法、または本明細書で説明される方法に限定されない。本教示の様々な実施形態、特徴、目的、及び利点は、説明及び添付の図面、ならびに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。本明細書で使用される場合、用語「備える（comprise）」、「備える（comprises）」、「備える（comprising）」、「含む（contain）」、「含む（contains）」、「含む（containing）」、「有する（have）」、「有する（having）」、「含む（include）」、「含む（includes）」、及び「含む（including）」並びにそれらの変形は、限定を意図するものではなく、包括的または制限のないものであり、追加の列挙されていない添加剤、成分、整数、要素、または方法のステップを除外するものではない。例えば、特徴の一覧を含む工程、方法、システム、構成、キット、または装置は、必ずしもこれらの特徴のみに制限されず、かかる工程、方法、システム、構成、キット、または装置に明示的に列挙または内在されない他の要素を含み得る。

【0020】

「約」は、値を決定するために使用されているデバイスまたは方法の誤差の標準偏差が値に含まれていることを示すために使用される。

【0021】

本明細書で使用される「免疫リダイレクターカプシド」または「IRC」は、カプシド骨格に結合、連結、または結合したペプチドも含むカプシド骨格である。

【0022】

本明細書で使用される「切断配列」には、例えば、特定のペプチド配列、またはより多くの場合、部位特異的プロテアーゼがタンパク質を切断または切断するペプチドモチーフが含まれる。切断部位は、例えば、アフィニティータグを切断して天然のタンパク質配列を復元するため、またはタンパク質を不活性化するため、またはタンパク質を活性化するために使用される。本開示において、「切断」は、タンパク質分解的切断を指す。様々な実施形態では、タンパク質分解的切断は、タンパク質の最終的な成熟の前に、ペプチダーゼ、プロテアーゼ、またはタンパク質分解的切断酵素によって触媒される。タンパク質は、例えばミスフォールドタンパク質の細胞内プロセッシングの結果として切断されることも知られている。タンパク質のタンパク質分解プロセッシングの別の例は、細胞外環境または特定のオルガネラに放出される前に、特定のシグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが除去された、分泌タンパク質またはオルガネラを標的とするタンパク質である。本開示の一実施形態では、切断配列は、IRCからペプチドを切断して放出し、ペプチド

を腫瘍細胞表面受容体へのロードまたは結合に利用できるようにするフリンによって特異的に認識される。様々な実施形態では、切断配列は、システイン、リジン、及び／またはアルギニン残基から構成され、ペプチドがカプシド骨格から切断されることを可能にするだけでなく、場合によっては、腫瘍の部位、すなわち腫瘍微小環境に富むか、選択的に存在するフリンなどの切断タンパク質によって放出されるまで、ペプチドをカプシドタンパク質に結合させるためのアンカーとしても機能する。

【0023】

「エピトープ」または「抗原」または「抗原性エピトープ」は、特定の免疫グロブリンによる認識を引き起こす、または特定の免疫グロブリンによって認識されるアミノ酸残基のセット、またはT細胞の文脈では、T細胞受容体タンパク質及び／または主要組織適合性(MHC)受容体による認識に必要な残基である。エピトープのアミノ酸残基は連続的／断続的である必要はない。インビボまたはインビトロでの免疫系設定では、エピトープは場合によっては、一緒になって免疫グロブリン、T細胞受容体、及び／またはヒト白血球(HLA)分子によって認識される三次元構造を形成する、一次、二次、及び三次ペプチド構造並びに電荷などの分子の集合的特徴の複合体である。

【0024】

「HPV」及び「ヒトパピローマウイルス」は、ヒトに感染することができるPapillomaviridae科のメンバーを指す。指向性によって定義される2つの主要なHPVのグループ(生殖器／粘膜及び皮膚のグループ)があり、それぞれに複数のウイルス「タイプ」または「株／遺伝子型」、例えば、HPV16、HPV18、HPV31、HPV32等が含まれる。

【0025】

「MuspV」、「MMuPV1」、「MPV」、及び「マウスパピローマウイルス」はすべて、マウス(Mus musculus)に感染することができるPapillomaviridae科の既知のメンバーを代替的かつ同義的に指す。

【0026】

本明細書で使用される「ヒトワクチン」は、ヒトの特定の疾患に対する免疫を改善する生物学的調製物を意味する。ワクチンは通常、病気の原因物質(病原体)に似た抗原性物質を含み、弱体化または死滅した形態の微生物、その毒素、または病気の原因物質の1つまたは複数の免疫原性表面タンパク質から作られることがよくある。抗原性物質は身体の免疫システムを刺激して、病気の原因物質を異物として認識し、それを破壊し、「記憶」し、これにより、免疫システムは、実際の将来の感染／暴露が発生した場合にこれらの病原体をより簡単に認識して破壊することができる。ヒトワクチンには、ウイルス性疾患及び細菌性疾患に対するワクチンが含まれる。様々な実施形態では、ウイルス性疾患に対するワクチンには、A型、B型、E型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、ロタウイルス、風疹ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、水痘ウイルス、黄熱ウイルスが含まれる。開発中のウイルス性疾患に対するヒトワクチンには、例えば、デングワクチン、東部ウマ脳炎ウイルス、HTLV-1Tリンパ球白血病ワクチン、及び呼吸器合胞体ウイルスワクチンが含まれる。そのようなワクチンには、いくつかの実施形態では、現在開発中のワクチンまたは現在米国食品医薬品局(FDA)が承認したワクチン接種が含まれる。本明細書に記載の組成物及び方法に適合するワクチンの例の非限定的なリストを表2に提供する。しかしながら、本明細書に記載の実施形態は、これらの列挙されたワクチンに限定されず、ヒト対象に免疫を提供するために開発された任意のワクチンに適用されることが企図される。

【0027】

「阻害する」、「低減する」、「予防」、または「～の発生を低減する」、及び同様の用語は、本明細書で使用される場合、阻害する、低減する、または予防する、または～の発生を低減する、または腫瘍塊、進行、及び／または転移を低減するなど所望の結果を達成するための任意の測定可能な減少または完全な阻害／低減または排除を含む。

【0028】

「MHC」または「主要組織適合遺伝子複合体」は、免疫系が異物を認識するのを助ける、細胞の表面に見られるタンパク質をコードする遺伝子の群である。MHCタンパク質（受容体、または分子）は、すべての高等脊椎動物によって発現される。MHC分子には、MHCクラスIとMHCクラスIIの2つの主なタイプがある。ヒトには、MHCクラスI分子をコードする3つの異なる遺伝子座がある（ヒトのMHC分子は、ヒト白血球抗原（HLA）とも呼ばれる）：HLA-A、HLA-B、及びHLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02、及びHLA-A*11は、これらの遺伝子座から発現できる様々なMHCクラスI対立遺伝子の例である。

【0029】

「パピローマウイルス」（PV）は、パピローマウイルス科（Papillomaviridae）のすべてのメンバーを指す。パピローマウイルスの種類とそれぞれのカプシド骨格を作る能力の広範なリストは、次の出版物を使用して参照することができる：「Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments,」deVilliers et al., 401 (1) : 70-79, 2010, PMID: 20206957（すべての表は、すべての目的で参照により本明細書に具体的に組み込まれる）。

【0030】

本明細書で使用される「優先的に切断されたタンパク質」は、ペプチドが、腫瘍または腫瘍微小環境の部位でカプシドまたはカプソメアまたはL1タンパク質から優先的に切断されることを意味する。いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、優先的な腫瘍部位切断は、場合によっては、（1）ペプチド上の一意の切断配列、及び／または（2）一意の腫瘍微小環境に起因する。例えば、一実施形態では、ペプチドは、酵素フューリンによって優先的に切断される切断配列を含み、生物の他の場所と比較して、腫瘍細胞の周囲で比較的高い濃度で発現されることが知られている。

【0031】

本明細書で使用される「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」は、特定の数のアミノ酸に限定されず、これらの用語は、本明細書では同義に使用される。本明細書に記載のタンパク質及びそれらをコードする核酸の特性及びアミノ酸配列は周知であり、日常的に決定され、様々な既知のデータベースからダウンロードされる。（例えば、NCBI GenBankデータベースを参照）。いくつかのペプチド配列が本明細書に提供される。ただし、一部のペプチド配列情報は、例えば以前のエントリの誤りを修正するために定期的に更新されるため、タンパク質及びそれらをコードする核酸に関する更新（修正）された情報が本出願に含まれている。本明細書で議論される配列データベースで提供される情報は、参照により組み込まれる。

【0032】

免疫「応答」は、対象の免疫系の体液性及び／または細胞性応答であり、細胞性応答では、抗原で刺激された細胞傷害性T細胞、Th1T細胞、Th2T細胞、及び／または対象に存在する、または対象が以前に暴露されたワクチンまたは他の病原体によって刺激されたB細胞が、エピトープまたは抗原に結合する。

【0033】

本明細書で使用される「既存の免疫応答」という用語は、本明細書に記載の本発明の癌治療方法の開始前に個体に存在する免疫応答を意味する。したがって、既存の免疫応答を有する個体は、がんを治療するための抗原を用いた本明細書に記載の治療方法の開始前に、抗原に対する記憶T細胞または他の免疫系構成要素内に保存された免疫応答能力を有する。既存の免疫応答は、場合によっては、自然に発生する免疫応答である。他の例では、既存の免疫応答は誘導型免疫応答である。本明細書で使用される場合、天然に存在する既存の免疫応答は、個体が意図せずに接触または罹患した、細菌、真菌、寄生虫、またはウイルス抗原などの抗原に反応して誘発された、個体における免疫応答である。すなわち、

10

20

30

40

50

既存の免疫応答を有する個体は、場合によっては、抗原に対する免疫応答を生成する意図で抗原に曝露されていない。誘導された既存の免疫応答は、ワクチンを受けたときなど、抗原への意図的な曝露に起因する免疫応答である。既存の免疫応答は、いくつかの例では自然に生じる免疫応答であり、他の例では、既存の免疫応答は、誘導型免疫応答である。

【0034】

本明細書で使用される「対象」または「それを必要とする対象」には、腫瘍／がんを有する、または腫瘍／がんを有したことがある、または前癌病状もしくは細胞を有する、またはがんや腫瘍を発症する遺伝的もしくは感染しやすい、素質的、職業上のリスクを有する任意の動物が含まれる。適切な対象（患者）には、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはブタなどの実験動物、ウシなどの家畜、イヌまたはウマなどのスポーツ動物、またはウマ、イヌまたはネコなどの家畜またはペット、ヒト以外の霊長類、及びヒトが含まれる。

10

【0035】

本明細書で使用される「T細胞応答」は、T細胞が抗原に遭遇したときにT細胞によって誘発される免疫応答を指す。ナイーブ成熟T細胞は、B細胞、マクロファージ、及び樹状細胞によって提示された抗原に遭遇すると活性化され、それによって武装したエフェクターT細胞を生成する。エフェクターT細胞は、場合によっては、細胞傷害性T細胞に分化するCD8+T細胞、または主に体液性免疫応答を誘導するCD4+T細胞のいずれかである。T細胞免疫応答は、同じまたは類似のエピトープを含む同じまたは類似の病原体によるその後の対象の攻撃からの保護を与える免疫学的記憶をさらに生成する。様々な実施形態では、T細胞応答は、総CD8+T細胞のベースラインよりも少なくとも2倍高い閾値にある。様々な実施形態では、CD8+T細胞は同様にCD69+である。

20

【0036】

「治療用組成物」は、がんなどの疾患の治療に使用するために設計され、患者に投与される組成物である。治療用組成物、例えば治療用IRC含有組成物は、良性または悪性腫瘍、またはそのような腫瘍のリスクがある患者／対象、ならびに非固形癌を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、IRCは、腫瘍／がんの抑制または再発を増強するために、以前に腫瘍を有し、現在明らかに腫瘍／がんがない対象に投与される。

【0037】

「カプシド骨格」とは、場合によってはウイルスに似ているがウイルス遺伝物質を欠くカプソメアに自己集合する、L1タンパク質などのエンベロープタンパク質またはカプシドタンパク質などのウイルス構造タンパク質から構成される多タンパク質構造を指す。カプシド骨格は非感染性かつ非複製性であるが、ウイルスと形態学的に類似している。本明細書に開示されるカプシド骨格は、腫瘍細胞に結合するか、または腫瘍細胞に対する固有の向性を有する。

30

【0038】

カプシド構造

ウイルスは多くの異なる形態で存在し、一般に細菌よりもサイズが小さく、直径は20nm～300nmであるが、一部のフィロウイルスは最大1400nmのフィラメント長を持っている。ウイルスまたはウイルスカプシド骨格の可視化には、光学顕微鏡よりも強力な透過型電子顕微鏡（TEM）を必要とする。ウイルスは粒子の形をしており、カプシドと呼ばれるタンパク質の保護コートに囲まれた核酸を持つビリオンとして存在する。これらのカプシドはまた、場合によっては、表面タンパク質、受容体などを含み得る保護脂質二重層によって取り囲まれている。

40

【0039】

カプシドは、複数の同一のカプソメアから形成される。カプシドは、より複雑な構造を持つバクテリオファージを除いて、一般にらせん構造または正20面体構造に分類される。最も一般的な正20面体の形状は、20個の正三角形の面で構成され、全体的な形状が3次元の球に似ている。らせんカプシドは、3次元のシリンダーの形をした一般的なスプリング形状に似ている。カプシドの各面は、1～3個の異なるタンパク質またはモノマー

50

単位（プロトマー）で構成されている。カプシドは、パピローマウイルスゲノムを取り囲んでいない場合、当技術分野では一般にウイルス様粒子と呼ばれ、本明細書ではカプシド骨格と呼ばれる。すなわち、ウイルスゲノム物質を含まない空のカプシドは、本明細書では時々カプシド骨格と呼ばれる。カプシド骨格は、特に人体の様々な疾患の治療及び／または予防のための優れた送達分子であり、それは、ほとんどのカプシド骨格は、上記のように、さらなるエンジニアリングなしで固有の組織向性を持っているにもかかわらず、非感染性であり、必要に応じて、腫瘍細胞を特異的に標的または結合するように再設計されるためである。

【0040】

カプソメアは、個々のサブユニットまたはプロトマーから形成される。天然L1プロトマーは、分子間ジスルフィド結合を介して自己集合し、五量体（カプソメア）を形成する。上記のように、カプシドは多くのカプソメアで構成されている。本明細書で使用される場合、「カプソメア」という用語は、全長L1タンパク質、またはそのフラグメント及び変異体を含む、パピローマウイルスL1ポリペプチドの五量体アセンブリを意味することを意図している。標準的な正20面体キャプシッドは、20個の面で構成され、12個の頂点を含む多面体である。頂点は五角形のカプソメアで構成され、カプシドの面は六角形のカプソメアで構成されている。ウイルスの種類に応じて、特定のカプシドには常に12個の五角形（ペントン）と様々な数の六角形（ヘキソン）がある。外因性ペプチドが結合していないカプシドは、本明細書では「カプシド骨格」と呼ばれる。

【0041】

ほとんどのウイルスに見られる正20面体構造は非常に一般的で、上記のように20個の三角形の面と12個の5回頂点で構成されている。カプシドに含まれるカプソメアの数は、1937年にマイケルゴールドバーグによって最初に記述されたゴールドバーグ多面体に見られるような、よく知られた数学的原理に従う。構造は2つの整数 h 及び k でインデックス付けでき、 h は1以上、 k は0以上であり、構造は、五量体の端から h ステップを取り、逆時計回りに60度回転させ、次の五量体に到達するために k ステップをとることによって視覚化される。したがって、このタイプのカプシドの三角測量「 T 」は、 $T = h^2 + h \cdot k + k^2$ として定義される。このスキームでは、正20面体カプシドには12の五量体と、10（ $T-1$ ）の六量体が含まれる。（Carrillo-Tripp, et al., Nuc. Acids Res., 37 (Database issue): D436-D442, 2009を参照）。したがって、「 T 」数、または三角測量数は、特定のカプシドのサイズと複雑さを表すことがわかる。ただし、この一般的な「経験則」には多くの既知の例外があり、例えば、パピローマウイルス科のウイルスは、準 $T=7$ 格子などの6価の位置に6量体ではなく5量体を保有することがある。標準的な $T=7$ カプシド構造以外に、 $T=1$ 、 $T=2$ 、 $T=3$ などの他の構造が知られている。 $AT=1$ の三角形分割値は、カプシドが20面体または12面体のみであることを示す。

【0042】

一部のウイルスはエンベロープに包まれており、カプシド構造を取り囲む脂質膜コーティングをさらに含んでいる。エンベロープは、宿主の細胞内膜から獲得される。核酸物質はDNAまたはRNAのいずれかであり、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。

【0043】

パピローマウイルス科のウイルスは、エンベロープを持たない二本鎖DNAウイルスである。パピローマウイルス科には数百の科があり、それらのそれぞれが「タイプ」と呼ばれ、ほとんどの既知の哺乳類や、鳥、ヘビ、カメ、魚などの他の脊椎動物に感染する。パピローマウイルス科のメンバーは、比較的高度な宿主指向性及び組織指向性であると考えられており、つまり、そのメンバーは通常、特定の組織向性（感染標的に対する選好）及び宿主タイプに対する選好を持ち、種間で伝染することはめったにない。例えば、パピローマウイルス科のヒトパピローマウイルス（HPV）1型は足の裏に向性を示すのに対し、HPV2型は手のひらの組織を好むことが知られている。パピローマウイルスは、ケラチノサイトでのみ複製する。

【0044】

170を超える既知のヒトパピローマウイルス型が配列決定されており、アルファパピローマウイルス、ベータパピローマウイルス、ガンマパピローマウイルス、ムパピローマウイルス、及びヌパピローマウイルスを含む5つの属に分類されている。さらに多くのヒトパピローマウイルスが同定されているが、まだ配列決定されていない。

【0045】

パピローマウイルスは、L1タンパク質または主要カプシドタンパク質L1と呼ばれる単一のプロトマーしか持たず、72個の星形のカプソマーで構成されるカプシドを形成するのに必要かつ十分なものである。パピローマウイルスファミリーメンバーのカプシドは、エンベローブがなく正20面体である。パピローマウイルスのゲノムはまた、L1よりも発現量が少ないL2と呼ばれる第2の構造タンパク質も含む。カプシドにおけるL2の存在は任意であり、ウイルス機能またはカプシドの形成に必要なではない。パピローマウイルス科のカプソメアはすべて、タンパク質間の五量体相互作用でできている。

10

【0046】

本明細書に記載されるように、変異L1タンパク質等を記載する場合、そのような変異体、及びカプソマー、及びそれから作製されるカプシドは、ヒトまたはマウスのファミリーメンバーだけでなく、すべてのパピローマウイルス科のメンバーを含むことを意味する。したがって、本明細書に記載の変異L1タンパク質は、一般にすべてのL1タンパク質を包含することを意味し、場合によっては、特にパピローマウイルス科L1タンパク質を包含することを意味する。

20

【0047】

ヒトパピローマウイルスL1タンパク質とその対応するマウスのアミノ酸ドメイン及び配列を図1及び2に示す。一般に、パピローマウイルス科のすべてのL1タンパク質全体でかなり高いレベルの配列保存が観察され、このアラインメントにも反映されている。さらに図2に示されているのは、L1配列の可能性のある突然変異の部位である。これらの変異の一部は、L1タンパク質のアミノ末端またはN末端からの10個のアミノ酸の欠失など、歴史的に知られています。（例えば、Conway et al., J. Dent. Res., 88(4):307-317, 2009を参照）。パピローマウイルス科のメンバーにおけるL1タンパク質のペプチド配列の他の構造変異、例えば切断変異におけるカルボキシ末端残基またはC末端残基の除去が知られている。

30

【0048】

L1のN末端切断変異体の研究は、カプシドの高解像度構造解析のためのタンパク質の安定な結晶構造を取得するために部分的に開始された。したがって、全長HPV16L1はほとんどの試験条件下で結晶化することができなかったが、10個のN末端残基を除去すると、さらなる研究のために結晶を形成することができることが分かった。（Conway et al., 2009）。驚くべきことに、これらの10個のN末端残基を除去すると、カプソマーは12個のL1五量体（合計60個のプロトマー）から作られた正20面体格子を含むT=1カプシド構造を形成することがわかった。上記のように、パピローマウイルス科のメンバーのカプシドの自然な構造は、T=7構造を形成する72個のL1ペンタマーの構造である。HPV16のN末端切断変異体のT=1構造には、野生型HPV16カプシドのカプシド形成中に通常形成される特定のジスルフィド結合が欠けている。C428のセリンからシステインへの変異、またはヒトパピローマウイルスL1カプシドタンパク質のヘリックス4領域の欠失により、T=1またはT=7カプシド骨格形成の両方が破壊されることが研究で示されている。（Varsani et al., Virus Res., 122(1-2):154-163, 2006、及びSchadlich et al., 同上を参照）。

40

【0049】

パピローマウイルスL1タンパク質の全体構造を図1A及び図1Bに示しており、一般に、古典的な「ゼリーロール」βサンドイッチを形成するβストランドのコア及びループBC、DE、EF、FG、及びHIとして当技術分野で一般的に指定される5つの表面露

50

出ループ領域を支持する5つのC末端 α ヘリックスを含む様々な二次構造からなる三次構造を有する。(Chen et al., Mol. Cell, 5:557-567, 2000、及びBissett et al., Scientific Reports, 6:39730, 2016を参照)。一般にh2、h3、及びh4と呼ばれる3つの α ヘリックスは、他の単量体及び五量体との接触面を形成する(図1B)。(Chen et al., Figure 4, page 561を参照)。5つの α ヘリックスは、一般にL1配列のカルボキシ末端に存在する。

【0050】

変異L1タンパク質の設計と産生

MPVL1配列の欠失は、5つのL1タンパク質から作られる10nm~15nmのカプソメアの形成を促進するために行われた。HPV16L1タンパク質のアミノ末端残基、ヘリックス4残基、及びカルボキシ末端残基の切断によってカプソメアが形成されることが以前に示されている。(Bishop et al., Virol. J., 4:3, 2007、及びSchadlich et al., J. Virol., 83(15):7690-7705, 2009を参照)。一方、HPV11及びHPV16では、L1のアミノ末端の10残基の切断だけで、T=1正20面体カプシド骨格が得られることが示された。これらのT=120面体カプシド骨格は、直径が約20nm~30nmであり、60個のL1タンパク質(または12個のカプソマー)で構成されている。カルボキシ末端で最大34個のアミノ酸を欠失しても、T=1形成は阻害されなかった。ただし、L1のヘリックス4領域(アミノ酸411~436)で欠失が発生した場合、N末端またはC末端の切断が存在する場合でも、T=1の形成は除去されるであろう。すべての順列で、カプソマーが観察されるであろう。(Chen et al., Mol. Cell, 5(3):557-567, 2000、及びWO2000054730)。これらの結果は、E. coliまたは昆虫細胞で産生されたパピローマウイルス16型L1と一致していた。(Schadlich et al., J. Virol., 83(15):7690-7705, 2009を参照)まとめると、この研究の著者は、カプソマーを高次のT=1及びT=7正20面体構造の両方に組み立てるには、ヘリックス4構造が必要であると結論付けた。(Bishop et al., Virol. J., 4:3, 2007)。

【0051】

MPVL1配列の様々な欠失が生成され、図1Bに模式的に示されている「MPV. 10.34.d」と呼ばれるコンストラクトが生成された。このコンストラクトは、MPVカプソメアを治療プラットフォームとして作成するために設計された。HPVL1の代わりにMPVL1タンパク質がキャリアビヒクルコンストラクトとして選択され、これは、ヒトはほとんどの場合MPVにさらされておらず、MPVからのビリオン由来カプシドはHPVL1タンパク質にみられるように自然免疫応答に感受性がないと仮定されたためである。

【0052】

最近、HPVL1配列のアミノ末端の10個の残基が除去されたHPV16L1の Δ N10欠失が結晶化され、T=1カプシド骨格の形状に一致することがわかった。(Chen et al., 2000を参照)。その構造は、L1の残基384~446までのカルボキシ末端セグメントが、ループとターンを接続する3つのヘリックスに折り畳まれることを明らかにした。これらのヘリックスは、組み立てられたT=1カプシド骨格の主要な五量体間結合接点である。これらのヘリックスがカプシド骨格アセンブリにも影響を与えるかどうかを試験するために、HPV16(残基408~431)及びHPV11(残基409~429)の両方のヘリックス4の特定の欠失を含む Δ N10欠失を含むL1タンパク質を生成した。五量体はFPLCによって精製され、電子顕微鏡(EM)によって観察されるように「ドーナツ」形状を有することが示された。これらの五量体からのカプシド骨格のアセンブリは、試験したどの条件下でも見受けられず、これは、このカルボキシ末端ヘリックスドメインがT=1またはT=7カプシド骨格のアセンブリに不可欠であることを示唆している。T=1カプシド骨格の結晶学的解析により、5量体間接触は、1

つのカプソメアの α ヘリックス2及び3と、隣接するカプソメアの α ヘリックス4との間の疎水性相互作用によって確立されることが明らかになった。(Chen et al., 2000)。その結果、ヘリックス4が欠失した変異L1は、均一なカプソメアを形成したが、T=1及びT=7カプシド骨格は形成できなかった。(Bishop et al., 2006を参照)。ヘリックス4が欠失したコンストラクトは、以前のレポートと一致して、自己組織化する能力をまったく示さなかった。(Schadlich et al., J. Virol., 83(15):7690-7705, 2009を参照)。

【0053】

この説明の目的で、変異L1タンパク質という用語は、1つまたは複数の非野生型配列を含むL1タンパク質またはプロトマーを意味する。このような非野生型配列には、切断または欠失(配列の内部または末端)、単一残基置換等が含まれる。例えば、変異L1タンパク質は、以下のいずれかが真であるL1タンパク質を含む: 1)ある特定の数のN末端残基が欠失している、ある特定の数のC末端残基が欠失している、及び/または3)ある特定の数の内部残基が欠失し、場合によっては、配列内の内部の複数の場所で欠失している。

【0054】

変異L1タンパク質は、いくつかの実施形態では、野生型パピローマウイルスL1タンパク質に由来する。任意のパピローマウイルスL1タンパク質が、現在記載されている組成物において有用である。L1タンパク質配列は比較的保存されている。したがって、以下のマウスパピローマウイルス変異L1タンパク質の説明は例示であり、パピローマウイルスファミリーの他のL1タンパク質で行われた同じ突然変異が同様の結果をもたらすと予想されると考えられる。様々な実施形態では、パピローマウイルスL1タンパク質及び/またはパピローマウイルスL2タンパク質を含むカプシド骨格が提供される。したがって、いくつかの実施形態におけるカプシド骨格は、パピローマL1及びL2タンパク質の両方を含む。他の実施形態では、カプシド骨格はL1タンパク質のみから構成される。いくつかの実施形態では、L1タンパク質は、単一のL1配列に融合された複数の供給源からのL1配列から構成されるハイブリッドまたはキメラタンパク質である。

【0055】

L1タンパク質配列は、これまでに同定された実質的にすべてのパピローマウイルス遺伝子型について知られており、これらのL1配列またはフラグメントのいずれも本組成物に含まれることが企図される。L1ポリペプチドの例としては、全長L1ポリペプチド、例えば、HPV16L1ポリペプチド、配列番号128、天然C末端の任意の1つまたは複数の残基を欠くL1切断、または天然N末端の任意の1つまたは複数の残基を欠くL1切断、及び任意の1つまたは複数の内部位置で任意の1つまたは複数の内部ドメイン残基を欠くL1切断が挙げられるが、これらに限定されない。L1タンパク質は、場合によっては、HPV16L2アミノ酸17~36(RG1エピトープ)がHPV16L1のDE表面ループ内に挿入されている、改変L1タンパク質、例えば、改変HPV16またはMPV16L1タンパク質として例示される。(Schellenbacher et al., J. Invest. Dermatol., 133(12):2706-2713, 2013; Slupetzky et al., Vaccine, 25:2001-2010, 2007; Kondo et al., J. Med. Virol., 80:841-6, 2008; Schellenbacher et al., J. Virol., 83:10085-10095, 2009、及びCaldeira et al., Vaccine, 28:4384-93, 2010を参照)。

【0056】

L2ポリペプチドは、いくつかの実施形態では、全長L2タンパク質またはL2ポリペプチドフラグメントである。L2配列は、これまでに同定された実質的にすべてのパピローマウイルス遺伝子型について知られており、これらのL2配列またはフラグメントのいずれも本開示に含まれることが企図される。L2ポリペプチドの例としては、完全長L2ポリペプチド、例えば、HPV16L2ポリペプチド(配列番号1)、またはマウスパピ

ローマウイルス L2（配列番号 2）、任意の 1 つまたは複数の天然 C 末端を欠く L2 切断、任意の 1 つまたは複数の天然 N 末端を欠く L2 切断、及び任意の 1 つまたは複数の位置で 1 つまたは複数の内部ドメイン残基を欠いている L2 切断が挙げられるが、これらに限定されない。

【0057】

パピローマウイルスカプシド骨格は、いくつかの実施形態では、任意の動物パピローマウイルス由来の L1 ポリペプチド及び場合により L2 ポリペプチド、またはその誘導体もしくはフラグメントを使用して形成される。したがって、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、シカ、イヌ、ネコ、齧歯類、ウサギ等のパピローマウイルスの任意の既知の（または今後同定される）L1 配列及び場合により L2 配列が本明細書に記載のカプシド骨格を調製するために使用される。（パピローマウイルスの遺伝子型及びそれらの関連性の最新の説明については、de Villiers et al., Virology, 324: 17-27, 2004 を参照されたく、すべての目的で参照により本明細書に組み込まれる）。

【0058】

特定の実施形態では、カプシド骨格を形成するために使用される L1 及び場合により L2 ポリペプチドは、非ヒトパピローマウイルスまたは HPV6、HPV11、HPV16、及び HPV18 以外のヒトパピローマウイルス遺伝子型に由来する。例えば、L1 及び／または L2 タンパク質は、いくつかの実施形態では、HPV1、2、3、4、5、6、8、9、15、17、23、27、31、33、35、38、39、45、51、52、58、66、68、70、76、または 92 に由来する。

【0059】

上記のように、ヒトパピローマウイルス HPV16 では、L1 タンパク質のいくつかの異なる変異が特徴付けられている。（例えば、Chen et al., 2000 を参照）。これらの変異の一部には、次の表 1 のものが含まれる（Chen et al., 2000, Table 1, page 558）。

【表 1】

欠失	トリプシン 感受性	組み立てられた 粒子の視直径 (Å) ^a
ΔN=0	無	600
ΔN=8	無	600
ΔN=9	無	600
ΔN=10	無	300
ΔN=15	有 ^b	NA
ΔN=20	有	NA
ΔC=16	無	600
ΔC=30	無	600
ΔC=46	有	NA
ΔC=86	有	NA

【0060】

表 1 において、デルタ記号 (Δ) は欠失を示し、「N」または「C」は欠失がそれぞれ N 末端または C 末端に位置するかどうかを示す。これらの 2 つの記号に続く数字は、欠失した L1 配列の残基の数を示す。Chen らは単一の L1 タンパク質内の二重、三重、ま

たはそれ以上の数の変異は報告していないことに留意されたい。

【0061】

したがって、本明細書に記載のL1変異タンパク質には、N末端切断型L1変異タンパク質が含まれる。N末端は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸によって切断されている。いくつかの実施形態では、N末端切断は5個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、N末端切断は10個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、N末端切断は、37、38、39、またはさらには40個のアミノ酸である。

【0062】

本明細書に記載のL1変異タンパク質は、C末端切断型L1変異タンパク質をさらに含む。C末端は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸によって切断されている。いくつかの実施形態では、C末端切断は5個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、C末端切断は10個のアミノ酸である。

【0063】

本明細書に記載のL1変異体タンパク質にはさらに、任意の数の内部残基が欠失しているL1変異体が含まれる。驚くべきことに、ヘリックス4領域の保持がいくつかの実施形態ではT=1構造を有するカプシド骨格の形成に必要であるが、文献では、上記で論じたように、その欠失はカプシド骨格のアセンブリを生じさせないと考えられていることが報告されている。一般に、記載された変異L1タンパク質において欠失される内部残基は、図1及び2に示されるものである。ヘリックス4(H4)領域における34残基の欠失も意図される。場合によっては、L1タンパク質の内部残基の切断は、長さが25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、またはさらには40残基である。

【0064】

C末端及び／またはN末端及び／または内部残基の任意の1つまたは複数が同時に欠失しているL1変異タンパク質も本明細書に記載される。例えば、いくつかの実施形態では、変異L1タンパク質は、同様の長さまたは異なる長さのC末端切断変異及びN末端切断変異の両方を有する。他の実施形態では、変異L1タンパク質は、C末端切断及び内部残基切断を有する。いくつかの実施形態では、変異L1タンパク質は、N末端切断及び内部切断を有する。特定の実施形態では、変異L1タンパク質は、C末端、N末端、及び内部切断の3つの位置すべてで同時に切断を有する。

【0065】

本明細書に記載の変異L1タンパク質は、一般に組換えによって産生されるが、任意の既知のタンパク質発現方法論によっても産生される。例えば、変異L1タンパク質は、最初に野生型L1配列に相補的なDNAプライマーを設計し、次に、以下の「実施例」のセクションにおいてさらに説明するように、野生型L1配列を切断するか、そうでなければ突然変異させるように設計されたプライマーの存在下で配列のPCR増幅を行うことによって生成される。(Touze et al., J. Clin. Microbiol., 36(7):2046-2051, 1998も参照)。適切なプライマー配列及びPCRプロトコルの設計及び実行は既知であり、そのような方法を使用して、所望の変異L1タンパク質核酸配列を最終的に生成し、そこから変異L1タンパク質を発現させる。

【0066】

次いで、変異L1タンパク質核酸配列は、いくつかの実施形態では、発現が行われる生物に応じて、より良好なタンパク質発現及び産生のためにコドン最適化される。特定の発現ベクター及び宿主発現系のための異なるコドン最適化法の利用は、当技術分野で知られている。(例えば、Mauro and Chappell, Trends in Molecular Medicine, 20(11):604-613, 2014を参照)。

【0067】

次いで、変異L1タンパク質核酸配列を、タンパク質発現用に設計された許容できるように調製された市販の発現ベクターに連結する。特定の発現宿主に対する機能を有する様

10

20

30

40

50

々なタイプの発現ベクターが広く市販されている。本明細書に記載の組換え変異 L1 タンパク質は、真核細胞と同様に細菌細胞で発現され、特定の実施形態ではインビトロで発現可能である。

【0068】

多くの場合、細菌宿主における組換えタンパク質の発現により、封入体 (IB) が形成される。したがって、場合によっては、IB として発現された組換え変異 L1 タンパク質は、既知の手順を使用して可溶化される。特定の実施形態では、本明細書に記載の発現変異 L1 タンパク質の IB の可溶化は、例えば、図 3 及び実施例 3 に記載の工程を含む。このプロセスは様々な工程を含み、係る工程は、(a) L1 タンパク質をコードする発現ベクターで原核細胞を形質転換すること、(b) L1 タンパク質の発現を促進する条件下で形質転換された原核細胞を培養すること、(c) 形質転換された原核細胞を溶解して、発現された L1 タンパク質を放出すること、(d) 発現された L1 タンパク質から細胞破片を分離し、L1 タンパク質を IB の形態で回収すること、(e) 必要に応じて L1 タンパク質 IB を洗浄すること、(f) L1 タンパク質 IB を可溶化すること、(g) 任意に 1 つまたは複数の変性剤、還元剤などの存在下で L1 タンパク質をリフォールディングすること、及び (h) リフォールディングされた L1 タンパク質をアセンブリ緩衝液中でインキュベートすることにより、1 に等しい三角形分割数 T を有する正 20 面体または正 12 面体キャプシドを形成することである。このようなプロセスは、いくつかの実施形態では、1 つまたは複数のペプチドの存在下、還元条件下で組み立てられた L1 タンパク質をインキュベートすること、及び／または共役緩衝液から変性剤を除去することによって、1 つまたは複数のペプチドを組み立てられた L1 タンパク質に共役緩衝液中で共役することをさらに含むが、ただし、三角形分割数 T が 1 に等しい正 20 面体または正 12 面体キャプシドを形成する場合は、還元剤を維持する。

【0069】

記載された変異 L1 タンパク質を作製及び精製するための記載された方法及びプロセスは、パピローマウイルスキャプシドのアセンブリについて当技術分野で記載されたプロセスとは多くの態様において異なる。実際、より高次のパピローマウイルスキャプシドへのアセンブリには、まず L1 タンパク質を還元剤を含む分解緩衝液に供しなければならないことが当技術分野で知られている。この工程の後に、多くの場合、L1 タンパク質をアセンブリ緩衝液に供し、次に還元剤を除去する。この従来の方法論により、特性が改善された安定したキャプシドが得られる。(McCarthy et al., 10.1128/JVI.72.1.32-41, 1998, Zhao et al., Virology, 9:52, 2012, Mach et al., J. Pharm. Sci., 95:2195-2206, 2006、及び U.S. Patent No. 6,436,402 を参照)。

【0070】

変異 L1 タンパク質から形成されたキャプシド骨格の驚くべき特性

本明細書に記載の研究中に、特定の変異 L1 タンパク質が有益かつ予想外の特性を有することが偶然発見された。例えば、特定の変異 L1 タンパク質は、主に有用で予想外の結合特性を持つ T=1 キャプシド骨格の形成をもたらす。T=7 キャプシド骨格の代わりに T=1 キャプシド骨格を形成すると、還元条件下での安定性が高まり、T=7 キャプシド骨格を形成する野生型配列と比較して結合効率が高くなる。

【0071】

例えば、変異キャプシド骨格、例えば、MPV.10.34.d 骨格がペプチドと結合できる効率は、25~85% (w/w) である。いくつかの実施形態では、結合効率は約 25% である。他の実施形態では、結合効率は、約 25、約 35、約 45、約 55、約 65、約 75、またはさらに約 85% (w/w) である。

【0072】

対照的に、野生型の T=7 キャプシド骨格は、一般に結合効率が低く、約 25% 未満である。例えば、WO2020/139978 を参照のこと。T=7 キャプシド骨格と比較して、

T = 1 カプシド骨格に結合するペプチド量をより多く達成する能力により、T = 7 カプシド骨格由のIRC形態と比較して全体的に低いIRC用量で、標的腫瘍またはがんにより多くのペプチドを送達することが可能になる。

【0073】

さらに、T = 7 カプシド骨格と比較して小さい幾何学的形状またはサイズを有するT = 1 カプシド骨格は、T = 1 カプシド骨格から作製されたIRCが対象に注入され、IRCが腫瘍の微小環境に浸潤することで、ステアリン障害が少なくなる。この有益で予想外の効果により、同等のT = 7 またはより高次のカプシド骨格ベースのIRCと同じ効果を達成するために必要なIRCの投与量が低くなる。

【0074】

T = 1 カプシド骨格形状のこれら及び他の追加の有益な特徴は、以下にさらに詳細に記載される。

【0075】

変異L1タンパク質IRC及び作用機序

いくつかの実施形態では、変異L1タンパク質は、別のペプチドと結合する。カプシドまたは変異L1タンパク質から構成されるカプシド骨格にさらに有益な機能を追加するために、追加のペプチドがそのようなカプシドの表面に結合される。これらのペプチドは、カプシドに有益な機能を追加し、必要とする対象におけるがんの治療などの追加機能をもたらす。

【0076】

一実施形態では、結合パピローマウイルスカプシド骨格は、L1カプシドタンパク質及びペプチドを含む。他の実施形態では、IRCは、（少なくとも1つの）L1カプシドタンパク質、（少なくとも1つの）L2カプシドタンパク質、及び、少なくとも1つのペプチドを含む。L1ポリペプチドは、いくつかの実施形態では全長L1タンパク質であるか、または他の実施形態ではL1ポリペプチドフラグメントである。特定の実施形態では、全長L1タンパク質またはL1ポリペプチドフラグメントは、カプシド骨格アセンブリコンピテントである。すなわち、L1ポリペプチドは、高次構造幾何学への自己組織化に適した適切な条件下で自己組織化してカプソメアを形成し、それによってカプシド骨格を形成する。より具体的な実施形態では、カプシド骨格は、T = 1 粒子、直径約20 nm ~ 30 nmの構造を含み、かつ12個のカプソメアまたはL1タンパク質の60個のコピーから構成される。他の実施形態では、カプシド骨格は、約50 nmの構造で72個のカプソメアまたはL1タンパク質の360個のコピーから構成される、完全に組み立てられたパピローマウイルスカプシドから構成される。

【0077】

様々な実施形態では、本明細書に提示されるIRCは、1つまたは複数の癌細胞に、特異的または非特異的に結合するか、さもなければ接触する。これは、幾分かは、いくつかの場合において腫瘍細胞に特異的であるか、腫瘍細胞によってより豊富に発現されるタンパク質及び／または分子に対するカプシド骨格の選択性（指向性）によるものである。様々な実施形態では、IRCは、腫瘍細胞上で優先的に発現される特定のサブファミリー型のヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）に結合する。本明細書で使用される場合、「癌細胞への結合」は、IRCが腫瘍細胞に近接し、ペプチドがカプシド骨格から切断され、次にペプチドが、腫瘍細胞表面に存在するMHC受容体に結合するか、それにより結合されるか、または相互作用するような、IRCのカプシドタンパク質と腫瘍細胞との間の非共有相互作用の形成を指す。

【0078】

様々な実施形態では、ペプチドは、対象に既に存在するT細胞またはT細胞集団によって認識されるエピトープである。様々な実施形態では、この既存のT細胞またはT細胞集団は、以前の感染またはワクチン接種のために存在する。様々な実施形態では、ペプチドは、T細胞によって結合することができるエピトープである。様々な実施形態では、ペプチドは、対象に既に存在するT細胞によって結合することができるエピトープである。こ

10

20

30

40

50

の文脈において、「結合することができる」とは、「エピトープ」が細胞の表面に提示され、そこでMHC分子に結合することを意味する。MHCクラスI受容体によって提示可能なT細胞エピトープは、細胞傷害性CD8Tリンパ球（CD8T細胞またはCTL）のT細胞受容体によって結合される。MHCクラスI分子によって提示可能なT細胞エピトープは、典型的には、約9～約12アミノ酸長のペプチドである。様々な実施形態では、放出されると、1つまたは複数の癌細胞または腫瘍細胞の表面上に発現される1つ以上のMHC分子によって直接結合され、その結果、適切に提示可能であるT細胞応答誘発ペプチドを放出するIRCが提供される。放出されたペプチドはサイトゾル内の抗原処理機構による処理を必要としないため、T細胞応答誘発ペプチドは短時間で標的細胞の表面に提示される。IRCからのそのようなペプチドの放出と、その後の標的細胞のMHC分子によるペプチドの結合のプロセスは、これらの腫瘍または癌細胞の標識、タグ付け、または「マーキング」に似ている。このタグ付けまたはマーキングは、対象の免疫系の他の構成要素による容易な識別につながり、それによって、対象の免疫系のこれらの構成要素を動員して、様々な既知の細胞破壊経路を介してがんまたは腫瘍細胞を除去する。

10

20

30

40

50

【0079】

したがって、本明細書に記載の方法、使用、及び組成物の一実施形態では、対象へのIRC用量の投与後約8.5時間以内に、IRCは標的細胞に自然に移動し、その後、IRCから放出されたT細胞応答誘発性ペプチドは、癌細胞上のMHC分子によって結合され、次に、ペプチドは、MHCクラスI分子を介して標的細胞の表面上で対象の免疫系の他の構成要素に提示され、それによって認識される。本発明の別の実施形態では、標的細胞へのIRCの導入後23.5時間以内に、T細胞応答誘発ペプチドがMHCクラスI分子を介して標的細胞の表面に提示される。本発明の別の実施形態では、IRCは、標的細胞へのIRCの投与後6時間以内に、標的細胞に対するT細胞細胞毒性を媒介することができる。

【0080】

様々な実施形態では、ペプチドは、1つのエピトープを含むか、または少なくとも2つのエピトープを含む。ペプチドエピトープは、場合によっては異なるタンパク質に由来するか、または他の実施形態では、同じタンパク質（または抗原）に由来するエピトープである。様々な実施形態では、病原体は、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、またはそれらの組み合わせである。

【0081】

様々な実施形態では、対象の既存のT細胞は、ワクチンエピトープに特異的である。様々な実施形態では、エピトープは、小児期、幼児期、青年期、または高齢期（老年）のワクチンに由来する。様々な実施形態では、対象の既存の免疫は、ヒトワクチンの事前投与の結果である。本明細書に記載のペプチドに組み込まれたエピトープを含む本明細書に記載の抗原は、ウイルス、細菌、寄生虫、真菌などのあらゆる既知の感染病原体に見られる。様々な実施形態では、ペプチドは、表2で提供されるリストから選択される。

【0082】

例えば、いくつかの実施形態において記載されたペプチドに組み込まれるエピトープを有する抗原を由来とするウイルスの非限定的な例には、例えば、ワクシニアウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヘルペスウイルス、例えば、帯状疱疹ウイルスまたはサイトメガロウイルスまたはエプスタインバーウイルス、風疹、A型肝炎ウイルスまたはB型肝炎ウイルスまたはC型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルス、A型またはB型などのインフルエンザ、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、痘瘡（天然痘）ウイルス、狂犬病ウイルス、コロナウイルス、デングウイルス、エボラウイルス、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルス、またはジカウイルスが挙げられる。

【0083】

例えば、いくつかの実施形態において記載されたペプチドに組み込まれるエピトープを有する抗原を由来とする細菌の非限定的な例には、例えば、Bordetella pertussis、chlamydia、trachomatis、Clostridium

m tetani、diphtheria、Hemophilus influenza、Meningococcus、pneumococcus、vibrio cholera、Mycobacterium tuberculosis、BCG、typhoid、E. coli、salmonella、Legionella pneumophila、rickettsia、Treponema pallidum pallidum、Streptococcus group Aまたはgroup B、Streptococcus pneumonia、Bacillus anthracis、Clostridium botulinum、またはYersinia sp bacteriaが挙げられる。

【0084】

例えば、いくつかの実施形態において記載されたペプチドに組み込まれるエピトープを有する抗原が由来する寄生虫の非限定的な例には、Entamoeba histolytica、Toxoplasma gondii、Trichinella sp. 例えば、Trichinella spiralis、Trichomonas種、例えば、Trichomonas vaginalis、Trypanosoma種、例えば、Trypanosoma brucei gambiense、Trypanosoma brucei rhodesienseまたはTrypanosoma cruzi、またはマラリア原虫、例えば、Plasmodium falciparum、Plasmodium vivax。またはPlasmodium malariaeが挙げられる。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2

エピトープペプチド配列

エピトープ配列	配列 番号	ウイルスの種類	MHC対立 遺伝子	ウイルスタンパク質
SLPRSRTP I	4	水痘 (VZV)	A*02: 01	IE62
SAPLPSNRV	5	水痘 (VZV)	A*02: 01	IE62
GSAPLPSNRV	6	水痘 (VZV)	A*02: 01	IE62
ALWALPHAA	7	水痘 (VZV)	A*02: 01	IE62
SLSGLYV FV	8	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
YLGVIWNM	9	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
KIHEAPFDL	10	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
LLCLVIFLI	11	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
DLLLEWLYV	12	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
SMYYAGLPV	13	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
ILHDGGTTL	14	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
WLYVPIDPT	15	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
VLMGFGIIT	16	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
CLVIFLICT	17	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
KEADQPWIV	18	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E
VVSTVDHFV	19	带状疱疹ワクチン	A*02: 01	糖タンパク質E

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

FLICTAKRM	2 0	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
VL RTEKQYL	2 1	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
HMWNYHSHV	2 2	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
TVNKPVVG V	2 3	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
FVVYFNGHV	2 4	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
WIVVNTSTL	2 5	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
VAYTVVSTV	2 6	带状疱疹ワクチン	A*02 : 01	糖タンパク質E
FMYMSLLGV	2 7	麻疹	A*02 : 01	m50
SLWGSLLML	2 8	麻疹	A*02 : 01	Cタンパク質
LLAVIFVMFL	2 9	麻疹	A*02 : 01	H38
SMYRVFEVGV	3 0	麻疹	A*02 : 01	H250-259
ILPGQDLQYV	3 1	麻疹	A*02 : 01	H516-525
KLWCRHF CV	3 2	麻疹	A*02 : 01	H576
KLWCRHF CVL	3 3	麻疹	A*02 : 01	H576
RLSDNGYYTV	3 4	麻疹	A*02 : 01	M164
KLLRYYTEI	3 5	麻疹	A*02 : 01	F205
KLWESPQEI	3 6	麻疹	A*02 : 01	C84
RLLDRLVRL	3 7	麻疹	A*02 : 01	N50

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

KLMPNITLL	38	麻疹	A*02 : 01	F57
TLLNNCTRV	39	麻疹	A*02 : 01	F64
EMLTLATWV	40	HepB	A*02 : 01	C64-72
FLPSDFFPSV	41	HepB	A*02 : 01	Core18
FLPADFFPSV	42	HepB	A*02 : 01	Core19
FLPSDFFPSI	43	HepB	A*02 : 01	Core20
WLSLLVPF	44	HepB	A*02 : 01	ENV335
FLLTRILTIまたは FLLTRILTL	45 または4 6	HepB	A*02 : 01	ENV183
GLSPTVWLSV	47	HepB	A*02 : 01	ENV348
LLDYQGMLPV	48	HepB	A*02 : 01	ENV260
LLCLIFLLV	49	HepB	A*02 : 01	ENV251
SIVSPFIPLL	50	HepB	A*02 : 01	ENV370
FLLTKILTI	51	HepB	A*02 : 01	ENV183
ILSPFLPLL	52	HepB	A*02 : 01	ENV371
FLLSLGIHL	53	HepB	A*02 : 01	POL575
GLSRYVARL	54	HepB	A*02 : 01	POL455
SLYADSPSV	55	HepB	A*02 : 01	POL816

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

YMDDVVLGA	56	HepB	A*02 : 01	POL551
ALMPLYACI	57	HepB	A*02 : 01	POL655
VLHKRTLGL	58	HepB	A*02 : 01	HBx92
CLFKDWEEL	59	HepB	A*02 : 01	Hbx115
STLPETTVVRR	60	HepB	A*03, A*11	Core141
EYLVSFQVW	61	HepB	A*31, A*68	core117
FFPSIRDLL	62	HepB	A*24	Core23
SWLSLLVPF	63	HepB	A*24	Env334
KYTSFPWLL	64	HepB	A*24	Pol756
HLSLRGLFV	65	HepB	A*02 : 01	HBx52-6 0
CLFKDWEEL	66	HepB	A*02 : 01	HBx115- 123
LPSDFFPSV	67	HepB	B*51	Core19
GILGFVFTL	68	インフルエンザ	HLA-A 2	M1
ILGFVFTLTVPS ERGLQRRRF	69	インフルエンザ		
LIRHENRMVLAS TTAKA	70	インフルエンザ		
LQAYQKRMGVQM QR	71	インフルエンザ		
YVYDHSGEAVK	72	麻疹		
WLSLLVPFV	73	HepB		
(K) GILGFVFTL (T) (V)	74	インフルエンザ		
KLSTRGVQIASN EN	75	インフルエンザ		
RGLQRRRFVQNA LNGNG	76	インフルエンザ		

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

FMYSDHFHFI	77	インフルエンザ		
NLVPMVATV	3	サイトメガロウイルス	HLA-A 2	
VAIIIEVDNEQPT TRAQKL	78	ポリオウイルス		
GACVAIIIEVDNE QPTTRAQKLFAM WRITYKDTVQLR RKLの任意の9-mer 配列	79	ポリオウイルス		
SVRDRLARL	80	EBV		
LLDRVRFMGV	81	EBV		
CLGGLLTMV	82	EBV		
GLCTLVAML	83	EBV		
SVLGPIISGHVLK	84	サイトメガロウイルス	HLA-A 11	
RPHERNGFTVL	85	サイトメガロウイルス	HLA-B 7	
FTSQYRIQGKL	86	サイトメガロウイルス	HLA-A 24	
YSEHPTFTSQY	87	サイトメガロウイルス	HLA-A 1	
EFFWDANDIY	88	サイトメガロウイルス	HLA-B 44	
TTVYPPSSTAK	90	サイトメガロウイルス	HLA-A 3	
FVFPTKDVALR	91	サイトメガロウイルス	HLA-A 68	
QTVTSTPVPQGR	92	サイトメガロウイルス	HLA-A 68	
PTFTSQYRIQGKL	93	サイトメガロウイルス	HLA-B 38	
FPTKDVAL	94	サイトメガロウイルス	HLA-B 35	
SIINFEKL	95			
RAHYNIVTF	96			

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

SSPPMFRV	9 7			
KLWAQCVQL	9 8	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
KLPDDFTGCV	9 9	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
YLQPRTFLL	1 0 0	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
LLYDANYFL	1 0 1	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
ALWEIQQVV	1 0 2	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
LLLDRLNQL	1 0 3	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
YLFDESGEFL	1 0 4	SARS-C o V-2	A*0 2 : 0 1	
FTSDYYQLY	1 0 5	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
PTDNYITTY	1 0 6	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
ATSRTLSTYY	1 0 7	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
CTDDNALAYY	1 0 8	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
NTCDGTTFTY	1 0 9	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
DTDFVNEFY	1 1 0	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
GTDLEGNFY	1 1 1	SARS-C o V-2	A*0 1 : 0 1	
KTFPPTEPK	1 1 2	SARS-C o V-2	A*0 3 : 0 1	
KCYGVSPK	1 1 3	SARS-C o V-2	A*0 3 : 0 1	
VTNNTFTLK	1 1 4	SARS-C o V-2	A*0 3 : 0 1	

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

KT IQPRVEK	1 1 5	SARS-C o V-2	A*03 : 0 1	
KTFPPTEPK	1 1 6	SARS-C o V-2	A*11 : 0 1	
VTDTPKGPK	1 1 7	SARS-C o V-2	A*11 : 0 1	
ATEGALNTPK	1 1 8	SARS-C o V-2 SARS -C o V-2	A*11 : 0 1	
ASAFFGMSR	1 1 9	SARS-C o V-2	A*11 : 0 1	
ATSRTL SYYK	1 2 0	SARS-C o V-2	A*11 : 0 1	
QY I KWPWY I	1 2 1	SARS-C o V-2	A*24 : 0 2	
VYFLQS INF	1 2 2	SARS-C o V-2	A*24 : 0 2	
VY I GDPAQL	1 2 3	SARS-C o V-2	A*24 : 0 2	
SPRWYFYYL	1 2 4	SARS-C o V-2	B*07 : 0 2	
RPDTRYVL	1 2 5	SARS-C o V-2	B*07 : 0 2	
I PRRNVATL	1 2 6	SARS-C o V-2	B*07 : 0 2	

10

20

30

【0085】

様々な実施形態では、エピトープは、小児ワクチン、幼児期、青年期、または高齢期（老年）ワクチンなどの1つまたは複数の既知のヒトワクチンに見出される。様々な実施形態では、ワクチンは幼児期ワクチンである。記載されたペプチドと適合するそのようなエピトープが見出される適切なワクチンの特定の非限定的な例を表3に列挙する。

40

【表 3 - 1】

表 3

ペプチド適合性エピトープを含むヒトワクチン

種類	商品名	形態	供給源	責任ある国家規制当局
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	Q u i n v a x e m	液体：すぐに使用可能	J a n s s e n V a c c i n e s C o r p .	食品医薬品安全処
ジフテリア破傷風	吸着DTワクチン	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）	D T P ワクチン	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
B型肝炎	B型肝炎ワクチン組換え体	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
ポリオワクチンー経口（OPV）三価	口腔ポリオ	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 三価	口腔ポリオ	液体：すぐに 使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁
破傷風トキソイド	T T ワクチン	液体：すぐに 使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁
破傷風トキソイド	T T ワクチン	液体：すぐに 使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁
破傷風トキソイド	T T ワクチン	液体：すぐに 使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁
麻疹	麻疹ワクチン	凍結乾燥凍結 乾燥活性成分 は、使用前に 賦形剤希釈剤 で再構成され る	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

黄熱病	黄熱病	凍結乾燥凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	B i o - M a n g u i n h o s / F i o c r u z	A g e n c i a N a c i o n a l d a V i g i l a n c i a S a n i t a r i a	10
黄熱病	黄熱病	凍結乾燥凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	B i o - M a n g u i n h o s / F i o c r u z	A g e n c i a N a c i o n a l d a V i g i l a n c i a S a n i t a r i a	
黄熱病	黄熱病	凍結乾燥凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	B i o - M a n g u i n h o s / F i o c r u z	A g e n c i a N a c i o n a l d a V i g i l a n c i a S a n i t a r i a	
B型肝炎	H e b e r b i o v a c H B	液体：すぐに使用可能	C e n t r o d e I n g e n i e r i a G e n e t i c a y B i o t e c n o l o g i a	C e n t r o p a r a e l C o n t r o l E s t a t a l d e l a C a l i d a d d e l o s M e d i c a m e n t o s	20
					30
					40
					50

【表 3 - 4】

B型肝炎	Heberb io vacH B	液体：すぐに 使用可能	Centr o de Ingen ieria Genet ica y Biote cnolo gia	Centro pa ra el Con trol Esta tal de la Calidad d e los Med icamentos	10
狂犬病	Rabipu r	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	Chiron Beh ring Vaccin es Pri vate L td.	中央医薬品標準管理 機関	20
狂犬病	Rabipu r	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	Glaxo Smith Kline Vaccin es G mbH	パウル・エールリッ ヒ研究所	30

【表 3 - 5】

ヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型	V a x e m H I B	液体：すぐに 使用可能	N o v a r t i s V a c c i n e s a n d D i a g n o s t i c s S . r . l	A g e n z i a I t a l i a n a d e l F a r m a c o	10
B 型肝炎	E n g e r i x	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	20
B 型肝炎	E n g e r i x	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	30
B 型肝炎	E n g e r i x	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	40

【表 3 - 6】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 三価	P o l i o s a b i n	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	10
ポリオワクチン－経口 (OPV) 三価	P o l i o s a b i n	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	
麻疹、ムンプス、風疹	P r i o r i x	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	20
R o t a v i r u s	R o t a r i x	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	30

【表 3 - 7】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 三価	P o l i o v i r a l v a c c i n e	液体：すぐに 使用可能	H a f f k i n e B i o P h a r m a c e u t i c a l C o r p o r a t i o n L t d	中央医薬品標準管理 機関
黄熱病	安定化黄熱ワ クチン	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	I n s t i t u t P a s t e u r d e D a k a r	M i n i s t e r e d e l a S a n t e p u b l i q u e
黄熱病	安定化黄熱ワ クチン	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	I n s t i t u t P a s t e u r d e D a k a r	M i n i s t e r e d e l a S a n t e p u b l i q u e
黄熱病	安定化黄熱ワ クチン	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	I n s t i t u t P a s t e u r d e D a k a r	M i n i s t e r e d e l a S a n t e p u b l i q u e
BCG	BCGフリー ズドライグル タミン酸ワク チン	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	J a p a n B C G L a b o r a t o r y	千葉県

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

B型肝炎	E u v a x B	液体：すぐに 使用可能	L G C h e m L t d	食品医薬品安全処
B型肝炎	E u v a x B	液体：すぐに 使用可能	L G C h e m L t d	食品医薬品安全処
B C G	B C G ワクチ ン	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 9】

BCG	BCGワクチン	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	Bul B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁
破傷風トキソイド	T e t a t o x	液体：すぐに使用可能	Bul B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 0】

破傷風トキソイド	T e t a t o x	液体：すぐに 使用可能	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁
ジフテリア破傷風	D i f t e t	液体：すぐに 使用可能	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 1】

ジフテリア破傷風	D i f t e t	液体：すぐに 使用可能	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁
ジフテリア・破傷風 (抗原量の減少)	T e t a d i f	液体：すぐに 使用可能	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 2】

ジフテリア・破傷風 (抗原量の減少)	T e t a d i f	液体：すぐに 使用可能	B u l B i o - N a t i o n a l C e n t e r o f I n f e c t i o u s a n d P a r a s i t i c D i s e a s e s L t d.	ブルガリア医薬品庁
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌b型	E a s y f i v e - T T	液体：すぐに 使用可能	P a n a c e a B i o t e c L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリア・破傷風 (抗原量の減少)	I M O V A X d T a d u l t	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 3】

ポリオワクチン－不活化（IPV）	IMOVAX POLIO	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
ポリオワクチン－経口 （OPV）三価	OPVERO	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
ポリオワクチン－経口 （OPV）三価	OPVERO	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
ポリオワクチン－経口 （OPV）三価	OPVERO	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 4】

破傷風トキソイド	TETAVA X	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
破傷風トキソイド	TETAVA X	液体：すぐに 使用可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
ヘモフィルスインフル エンザ菌 b 型	A c t - H I B	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e
狂犬病	VERORA B	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 5】

黄熱病	STAMARIL	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	Sano fi Pas teur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante	10
髄膜炎菌 A+C	多糖類髄膜炎菌 A+C ワクチン	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	Sano fi Pas teur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante	
ポリオワクチンー経口 (OPV) 一価タイプ 1	経口一価 1 型ポリオワクチン	液体：すぐに使用可能	Sano fi Pas teur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante	20
コレラ：不活化経口	Dukoral	液体：すぐに使用可能	Valne va Sweden AB	医薬品庁	30
BCG	BCG ワクチン	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関	

【表 3 - 1 6】

ジフテリア破傷風	ジフテリア及び破傷風ワクチン吸着（小児）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	10
ジフテリア破傷風	ジフテリア及び破傷風ワクチン吸着（小児）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	20
ジフテリア破傷風	ジフテリア及び破傷風ワクチン吸着（小児）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	30
ジフテリア・破傷風 （抗原量の減少）	成人及び青年向けの吸着型ジフテリア及び破傷風ワクチン	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	40

【表 3 - 1 7】

ジフテリア・破傷風 (抗原量の減少)	成人及び青年 向けの吸着型 ジフテリア及 び破傷風ワク チン	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリア・破傷風 (抗原量の減少)	成人及び青年 向けの吸着型 ジフテリア及 び破傷風ワク チン	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）	ジフテリア・ 破傷風・百日 咳ワクチン吸 着	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）	ジフテリア・ 破傷風・百日 咳ワクチン吸 着	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 8】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）	ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリアー破傷風ー百日咳（全細胞）ーB型肝炎	ジフテリア、破傷風、百日咳、B型肝炎ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリアー破傷風ー百日咳（全細胞）ーB型肝炎	ジフテリア、破傷風、百日咳、B型肝炎ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリアー破傷風ー百日咳（全細胞）ーB型肝炎	ジフテリア、破傷風、百日咳、B型肝炎ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 9】

B型肝炎	B型肝炎ワクチン（rDNA）（成人）	液体：すぐに使用可能	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関
B型肝炎	B型肝炎ワクチン（rDNA）（成人）	液体：すぐに使用可能	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関
B型肝炎	B型肝炎ワクチン（rDNA）（小児）	液体：すぐに使用可能	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関
B型肝炎	B型肝炎ワクチン（rDNA）（小児）	液体：すぐに使用可能	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 0】

破傷風トキソイド	破傷風トキソイドワクチン 吸着	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
破傷風トキソイド	破傷風トキソイドワクチン 吸着	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
破傷風トキソイド	破傷風トキソイドワクチン 吸着	液体：すぐに 使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
麻疹及び風疹	麻疹及び風疹 ワクチン、 生、弱毒化	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 1】

麻疹と風疹	麻疹及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
麻疹と風疹	麻疹及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
麻疹と風疹	麻疹及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
麻疹、ムンプス、風疹	麻疹、ムンプス及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 2】

麻疹、ムンプス、風疹	麻疹、ムンプス及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	10
麻疹、ムンプス、風疹	麻疹、ムンプス及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	20
麻疹、ムンプス、風疹	麻疹、ムンプス及び風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	30
麻疹	麻疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	40

【表 3 - 2 3】

麻疹	麻疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	10
麻疹	麻疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	20
麻疹	麻疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	30
風疹	風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関	40

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 4】

風疹	風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
風疹	風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
風疹	風疹ワクチン、生、弱毒化	凍結乾燥活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 5】

破傷風トキソイド	S h a n T T	液体：すぐに 使用可能	S h a n t h a B i o t e c h n i c s P r i v a t e L i m i t e d (A S a n o f i C o m p a n y)	中央医薬品標準管理 機関
破傷風トキソイド	S h a n T T	液体：すぐに 使用可能	S h a n t h a B i o t e c h n i c s P r i v a t e L i m i t e d (A S a n o f i C o m p a n y)	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 6】

ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・B ヘモフィルスインフル エンザ菌 b 型	S h a n - 5	液体：すぐに 使用可能	S h a n t h a B i o t e c h n i c s P r i v a t e L i m i t e d (A S a n o f i C o m p a n y)	中央医薬品標準管理 機関
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・B ヘモフィルスインフル エンザ菌 b 型	S h a n - 5	液体：すぐに 使用可能	S h a n t h a B i o t e c h n i c s P r i v a t e L i m i t e d (A S a n o f i C o m p a n y)	中央医薬品標準管理 機関
BCG	BCG ワクチ ン S S I	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	A J V a c c i n e s A / S	デンマーク医薬品局

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 7】

ロタウイルス	R o t a t e q	液体：すぐに 使用可能	M e r c k V a c c i n e s	C B E R / F D A
麻疹、ムンプス、風疹	r H A M - M - R I I	凍結乾燥活性 成分は、使用 前に賦形剤希 釈剤で再構成 される	M e r c k V a c c i n e s	欧州医薬品庁
ロタウイルス	R o t a r i x	液体：すぐに 使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 8】

黄熱病	一	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	F e d e r a l S t a t e B u d g e t a r y S c i e n t i f i c I n s t i t u t i o n 《 C h u m a k o v F e d e r a l S c i e n t i f i c C e n t e r f o r R e s e r c h & D e v e l o p m e n t o f I m m u n e - A n d B i o l o g i c a l P r o d u c t s 》, R u s s i a n A c a d e m y o f S c i e n c e s	ロシア連邦の医療監 視に関する連邦サー ビス (ROSZDR AVNADZOR)
-----	---	---	--	---

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 9】

黄熱病	一	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	F e d e r a l S t a t e B u d g e t a r y S c i e n t i f i c I n s t i t u t i o n 《 C h u m a k o v F e d e r a l S c i e n t i f i c C e n t e r f o r R e s e r c h & D e v e l o p m e n t o f I m m u n e - A n d B i o l o g i c a l P r o d u c t s 》, R u s s i a n A c a d e m y o f S c i e n c e s	ロシア連邦の医療監 視に関する連邦サー ビス (ROSZDR AVNADZOR)
-----	---	---	--	---

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 0】

黄熱病	一	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	F e d e r a l S t a t e B u d g e t a r y S c i e n t i f i c I n s t i t u t i o n 《 C h u m a k o v F e d e r a l S c i e n t i f i c C e n t e r f o r R e s e r c h & D e v e l o p m e n t o f I m m u n e - A n d B i o l o g i c a l P r o d u c t s 》, R u s s i a n A c a d e m y o f S c i e n c e s	ロシア連邦の医療監 視に関する連邦サー ビス (ROSZDR AVNADZOR)
-----	---	---	--	---

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 1】

ヒトパピローマウイルス（四価）	G a r d a s i l	液体：す ぐに使用 可能	M e r c k V a c c i n e s	欧州医薬品庁
ヒトパピローマウイルス（二価）	C e r v a r i x	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁
ヒトパピローマウイルス（二価）	C e r v a r i x	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁
ポリオワクチン－経口 （OPV）一価タイプ 1	P o l i o S a b i n M o n o T 1	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁
ポリオワクチン－経口 （OPV）一価タイプ 1	P o l i o S a b i n M o n o T 1	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁
ポリオワクチン－経口 （OPV）二価1型及 び3型	P o l i o S a b i n O n e a n d T h r e e	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 2】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 二価1型及 び3型	P o l i o S a b i n O n e a n d T h r e e	液体：す ぐに使用 可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁
ヘモフィルスインフル エンザ菌b型	ヘモフィルス インフルエン ザ菌b型結合 ワクチン	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ポリオワクチン－経口 (OPV) 一価1型	一価1型経口 ポリオワクチ ン、I P (m OPV1)	液体：す ぐに使用 可能	H a f f k i n e B i o P h a r m a c e u t i c a l C o r p o r a t i o n L t d	中央医薬品標準管理 機関
ポリオワクチン－経口 (OPV) 一価1型	一価経口ポリ オワクチン1 型 (mOPV 1)	液体：す ぐに使用 可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 3】

破傷風トキソイド	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名 B E t t で販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	10
肺炎球菌（結合）	シンフロリクス	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	欧州医薬品庁	20
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B 型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型	ジフテリア・破傷風・百日咳・B 型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌 b 型結合ワクチン	使用前に液体活性成分で再構成する凍結乾燥活性成分	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関	20
ポリオワクチンー経口（O P V）二価 1 型及び 3 型	二価経口ポリオワクチン 1 型& 3 型（b O P V 1 & 3）	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a （P e r s e r o）	インドネシア国立医薬品食品管理庁	30

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 4】

髄膜炎菌A共役10 μ g	髄膜炎菌A結合MenAfriVac	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理 機関	10
ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	Quimior Hib	液体：す ぐに使用 可能	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia	Centropara el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos	20
肺炎球菌（結合）	Synflorix	液体：す ぐに使用 可能	GlaxoSmithKline Biologicals SA	欧州医薬品庁	
インフルエンザ、季節性	Fluvirin	液体：す ぐに使用 可能	Seqirus Vaccines Limited	CBER/FDA	30

【表 3 - 3 5】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 二価1型及 び3型	二価1型&3 型経口ポリオ ワクチン、I P (bOPV 1&3)	液体：す ぐに使用 可能	H a f f k i n e B i o P h a r m a c e u t i c a l C o r p o r a t i o n L t d	中央医薬品標準管理 機関
インフルエンザ、季節 性	F l u z o n e	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r - U S A	CBER/FDA
インフルエンザ、季節 性	F l u z o n e	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r - U S A	CBER/FDA
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌b型	ジフテリア・ 破傷風・百日 咳・B型肝炎 ・ヘモフィ ルスインフル エンザ菌b型 結合ワクチン	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に液体 活性成分 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関
インフルエンザ、季節 性	G C F L U M u l t i i n j .	液体：す ぐに使用 可能	G r e e n C r o s s C o r p o r a t i o n	食品医薬品安全処

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 6】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	ジフテリア・破傷風・百日咳・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型結合ワクチン	凍結乾燥 活性成分は、使用前に液体活性成分で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関
インフルエンザ、パンデミックH1N1	P a n v a x	液体：すぐに使用可能	S e q i r u s L i m i t e d	T h e r a p e u t i c G o o d s A d m i n i s t r a t i o n
インフルエンザ、パンデミックH1N1	G r e e n F l u - S	液体：すぐに使用可能	G r e e n C r o s s C o r p o r a t i o n	食品医薬品安全処
インフルエンザ、パンデミックH1N1	インフルエンザA（H1N1）2009一価ワクチン	液体：すぐに使用可能	M e d I m m u n e	C B E R / F D A
インフルエンザ、パンデミックH1N1	C e l t u r a	液体：すぐに使用可能	S e q i r u s G m b H	P a u l - E h r l i c h - I n s t i t u t
インフルエンザ、パンデミックH1N1	F o c e t r i a	液体：すぐに使用可能	S e q i r u s V a c c i n e s L i m i t e d	

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 7】

インフルエンザ、パン デミックH1N1	Fluvir in-H1N 1	液体：す ぐに使用 可能	Seqiru s Vacc ines L imited	CBER/FDA	
インフルエンザ、パン デミックH1N1	Panenz a	液体：す ぐに使用 可能	Sanofi Pasteu r SA	Agencenat ionale des ecuritedu medicamen tetdespro duitsdesa nte	10
インフルエンザ、パン デミックH1N1	インフルエン ザA（H1N 1）2009 一価ワクチン	液体：す ぐに使用 可能	Sanofi Pasteu r-USA	CBER/FDA	20
インフルエンザ、パン デミックH1N1	インフルエン ザA（H1N 1）2009 一価ワクチン	液体：す ぐに使用 可能	Sanofi Pasteu r-USA	CBER/FDA	
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・ヘ モフィルスインフルエ ンザ菌b型	ジフテリア・ 破傷風・百日 咳・ヘモフィ ルスインフル エンザ菌b型 結合ワクチン	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に液体 活性成分 で再構成 される	Serum Institt ute of India Pvt. L td.	中央医薬品標準管理 機関	30

【表 3 - 3 8】

ポリオワクチン－不活化（IPV）	P o l i o r i x	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁
ポリオワクチン－不活化（IPV）	P o l i o r i x	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁
肺炎球菌（結合）	P r e v e n a r 1 3	液体：すぐに使用可能	P f i z e r	欧州医薬品庁
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	ジフテリア・破傷風・百日咳・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型結合ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 3 9】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	ジフテリア・破傷風・百日咳・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型結合ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理機関	10
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	ジフテリア・破傷風・百日咳・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型結合ワクチン吸着	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理機関	20
ポリオワクチン－経口（OPV）一価3型	ポリオセービンモノスリー（経口）	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁	
ポリオワクチン－経口（OPV）一価3型	ポリオセービンモノスリー（経口）	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁	30

【表 3 - 4 0】

ポリオワクチン－不活化（IPV）	ポリオワクチン	液体：すぐに使用可能	B i l t h o v e n B i o l o g i c a l s	医薬品評価委員会 （MEB）
ポリオワクチン－不活化（IPV）	IPVワクチンSSI	液体：すぐに使用可能	A J V a c c i n e s A / S	デンマーク医薬品局
インフルエンザ、季節性	G C F L U i n j	液体：すぐに使用可能	G r e e n C r o s s C o r p o r a t i o n	食品医薬品安全処
ポリオワクチン－経口（OPV）一価2型	ポリオセービンモノツ－（経口）	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁
ポリオワクチン－経口（OPV）一価2型	ポリオセービンモノツ－（経口）	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁

10

20

30

40

50

【表 3 - 4 1】

腸チフス（多糖類）	T y p h i m - V i	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e	10
インフルエンザ、季節 性	V a x i g r i p	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e	20
ポリオワクチン－経口 （OPV）二価1型及 び3型	B I O P O L I O B 1 / 3	液体：す ぐに使用 可能	B h a r a t B i o t e c h I n t e r n a t i o n a l L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	
ジフテリア・破傷風 （抗原量の減少）	なし	液体：す ぐに使用 可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁	30

【表 3 - 4 2】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 二価1型及 び3型	なし	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e	10
ジフテリア・破傷風・ 百日咳（全細胞）・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌b型	国連機関を通 じて供給され るラベルには 使用されてい ない。C o m B E F i v e (R e c o n s t i t u t e d) という ラベルの付い た商品名でも 販売されてい る。	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に液体 活性成分 で再構成 される	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	20

30

40

50

【表 3 - 4 3】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。ComBEFive (Reconstituted) というラベルの付いた商品名でも販売されている。	凍結乾燥 活性成分は、使用前に液体活性成分で再構成される	Biological E. Limited	中央医薬品標準管理機関	10
コレラ：不活化経口	Shanchol	液体：すぐに使用可能	Shantha Biotechnics Private Limited (A Sanofi Company)	中央医薬品標準管理機関	20
麻疹、ムンプス、風疹	Priorix	凍結乾燥 活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	GlaxoSmithKline Biologicals SA	連邦医薬品・健康製品庁	30

【表 3 - 4 4】

麻疹	麻疹ワクチン	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医 薬品食品管理庁	10
ポリオワクチン－経口 (OPV) 二価1型及 び3型	ポリオワクチ ン－経口 (O PV) 二価1 型及び3型	液体：す ぐに使用 可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関	20
インフルエンザ、パン デミックH1N1	NASOVA Cインフルエ ンザワクチ ン、弱毒生 (ヒト) 凍結 乾燥	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関	30
インフルエンザ、パン デミックH1N1	NASOVA Cインフルエ ンザワクチ ン、弱毒生 (ヒト) 凍結 乾燥	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関	40

【表 3 - 4 5】

破傷風トキソイド	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名 B E t t で販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	10
破傷風トキソイド	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名 B E t t で販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	20
日本脳炎ワクチン（不活化）6 μ g	J E E V（登録商標）	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	
A型肝炎（ヒト二倍体細胞）、不活化（成人）	H a v r i x 1 4 4 0 A d u l t	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製 品庁	30

【表 3 - 4 6】

A型肝炎（ヒト二倍体細胞）、不活化（小児）	H a v r i x 7 2 0 J u n i o r	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁
ジフテリア・破傷風・百日咳（無細胞）	B o o s t r i x	液体：すぐに使用可能	G l a x o S m i t h K l i n e B i o l o g i c a l s S A	連邦医薬品・健康製品庁
髄膜炎菌ACYW-135（結合ワクチン）	M e n v e o	凍結乾燥 活性成分は、使用前に液体活性成分で再構成される	G l a x o S m i t h K l i n e V a c c i n e s S . r . l .	欧州医薬品庁
髄膜炎菌ACYW-135（結合ワクチン）	M e n a c t r a	液体：すぐに使用可能	S a n o f i P a s t e u r - U S A	C B E R / F D A
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	E a s y f i v e - T T	液体：すぐに使用可能	P a n a c e a B i o t e c L t d .	中央医薬品標準管理機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 4 7】

日本脳炎ワクチン (生、弱毒生)	日本脳炎ワクチン生 (SA 14-14-2)	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	Chengdu Institute of Biological Products Co., Ltd	国家薬品监督管理局	10
日本脳炎ワクチン (生、弱毒生)	日本脳炎ワクチン生 (SA 14-14-2)	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	Chengdu Institute of Biological Products Co., Ltd	国家薬品监督管理局	20
ジフテリア・破傷風・ 百日咳 (全細胞) ・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌 b 型	国連機関を通 じて供給され るラベルには 使用されてい ない。ComBE Five (液体) とい うラベルの付 いた商品名で も販売されて いる。	液体：す ぐに使用 可能	Biological E. Limited	中央医薬品標準管理 機関	30

【表 3 - 4 8】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。C o m B E F i v e（液体）というラベルの付いた商品名でも販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	10
日本脳炎ワクチン（生、弱毒生）	I M O J E V M D	凍結乾燥 活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	G P O - M B P C o . , L t d .	米国食品医薬品局	20
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名 T R I P V A C で販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	30

【表 3 - 4 9】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名TRI PVACで販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	10
ジフテリア・破傷風（抗原量の減少）	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名BET dで販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	20
ジフテリア・破傷風（抗原量の減少）	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。また、ラベル付きの商品名BET dで販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E. L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	30

【表 3 - 5 0】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 二価1型及 び3型	P o l i o m y e l i t i s V a c c i n e (O r a l) , B i v a l e n t t y p e s 1 a n d 3	液体：す ぐに使用 可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関
ポリオワクチン－不活 化 (IPV)	P o l i o m y e l i t i s v a c c i n e m u l t i d o s e , s u s p e n s i o n f o r i n j e c t i o n 2. 5mL	液体：す ぐに使用 可能	B i l t h o v e n B i o l o g i c a l s	医薬品評価委員会 (MEB)
インフルエンザ、季節 性	N a s o v a c - S I n f l u e n z a V a c c i n e , L i v e , A t t e n u a t e d (H u m a n)	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t. L t d.	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 5 1】

ジフテリア・破傷風・百日咳（無細胞性）・B型肝炎・インフルエンザ菌b型・ポリオ（不活化）	Hexaxim	液体：すぐに使用可能	Sanofi Pasteur SA	欧州医薬品庁	
髄膜炎菌A結合5 μ g	Meningococcal A Conjugate 5 micrograms MenAfriV ac 5 μ g	凍結乾燥 活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	中央医薬品標準管理機関	10
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。ComBEFive（液体）というラベルの付いた商品名でも販売されている。	液体：すぐに使用可能	Biological E. Limited	中央医薬品標準管理機関	20 30

【表 3 - 5 2】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	国連機関を通じて供給されるラベルには使用されていない。ComBEF ive（液体）というラベルの付いた商品名でも販売されている。	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	10
ポリオワクチンー不活化（IPV）	P o l i o m y e l i t i s V a c c i n e（不活化）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関	20
ポリオワクチンー経口（OPV）三価	B I O P O L I O	液体：すぐに使用可能	B h a r a t B i o t e c h I n t e r n a t i o n a l L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関	30

【表 3 - 5 3】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 三価	BIOPOL IO	液体：す ぐに使用 可能	B h a r a t B i o t e c h I n t e r n a t i o n a l L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	10
インフルエンザ、季節 性	I n f l u e n z a V a c c i n e (ス プリットビリ オン、不活 化)	液体：す ぐに使用 可能	H u a l a n B i o l o g i c a l B a c t e r i n C o . , L t d	国家薬品监督管理局	
インフルエンザ、季節 性	I L - Y A N G F L U V a c c i n e I N J .	液体：す ぐに使用 可能	I L - Y A N G P H A R M A C E U T I C A L C O . , L T D .	食品医薬品安全処	20
BCG	B C G v a c c i n e (凍 結乾燥) 一皮 内	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	G r e e n S i g n a l B i o P h a r m a L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	30

【表 3 - 5 4】

インフルエンザ、季節性四価	Fluzone 四価	液体：すぐに使用可能	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
インフルエンザ、季節性四価	Fluzone Quadrivalent	液体：すぐに使用可能	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
ポリオワクチン－経口（OPV）二価1型及び3型	Bivalent Oral Polio myelitis Vaccine Type 1 & 3 (bOPV1 & 3)	液体：すぐに使用可能	PT Bio Farma (Persero)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
コレラ：不活化経口	Euvichol	液体：すぐに使用可能	EuBiologics Co., Ltd.	食品医薬品安全処
ポリオワクチン－経口（OPV）一価2型	経口一価型2型ポリオワクチン (mOPV2)	液体：すぐに使用可能	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante

10

20

30

40

50

【表 3 - 5 5】

ポリオワクチン－経口 (OPV) 一価3型	ORALMO NOVALE NTTYPE 3POLIO MYELIT ISVACC INE	液体：す ぐに使用 可能	S a n o f i P a s t e u r S A	A g e n c e n a t i o n a l e d e s e c u r i t e d u m e d i c a m e n t e t d e s p r o d u i t s d e s a n t e	10
髄膜炎菌ACYW-1 35 (結合ワクチン)	N i m e n r i x	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	P f i z e r	欧州医薬品庁	20
ジフテリア・破傷風・ 百日咳 (全細胞) ・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌b型	E u p e n t a	液体：す ぐに使用 可能	L G C h e m L t d	食品医薬品安全処	30
ジフテリア・破傷風・ 百日咳 (全細胞) ・B 型肝炎・ヘモフィルス インフルエンザ菌b型	E u p e n t a	液体：す ぐに使用 可能	L G C h e m L t d	食品医薬品安全処	
ヒトパピローマウイル ス (二価)	G a r d a s i l 9	液体：す ぐに使用 可能	M e r c k V a c c i n e s	欧州医薬品庁	
インフルエンザ、季節 性四価	G C F L U Q u a d r i v a l e n t i n j .	液体：す ぐに使用 可能	G r e e n C r o s s C o r p o r a t i o n	食品医薬品安全処	40

【表 3 - 5 6】

ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	P e n t a b i o	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
ジフテリア・破傷風・百日咳（全細胞）・B型肝炎・ヘモフィルスインフルエンザ菌b型	P e n t a b i o	液体：すぐに使用可能	P T B i o F a r m a (P e r s e r o)	インドネシア国立医薬品食品管理庁
A型肝炎（ヒト二倍体細胞）、不活化（成人）	H E A L I V E	液体：すぐに使用可能	S i n o v a c B i o t e c h C o . L t d	国家薬品监督管理局
水痘	V a r i v a x	凍結乾燥 活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	M e r c k V a c c i n e s	C B E R / F D A
ロタウイルス（生、弱毒化）	R o t a v a c	液体：すぐに使用可能	B h a r a t B i o t e c h I n t e r n a t i o n a l L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 5 7】

ジフテリア・破傷風・百日咳（無細胞）	Adacel	液体：すぐに使用可能	Sanofi Pasteur Limited	カナダ保健省－Sante Canada
インフルエンザ、季節性	AGRIFLU	液体：すぐに使用可能	Seqirus Vaccines Limited	カナダ保健省－Sante Canada
肺炎球菌（結合）	Prevenar 13 Multidos Vial	液体：すぐに使用可能	Pfizer	欧州医薬品庁
腸チフス（結合）	Typbar－TVC	液体：すぐに使用可能	Bharat Biotech International Limited	中央医薬品標準管理機関
ポリオワクチン－経口（OPV）二価タイプ1及び3	Polio myelitis Vaccine（生、経口弱毒化、ヒト二倍体細胞）、1型及び3型	液体：すぐに使用可能	Beijing Bio-Institute Biological Products Co., Ltd	国家薬品监督管理局

10

20

30

40

50

【表 3 - 5 8】

日本脳炎ワクチン（不活化）（小児用 3 μ g）	J E E V（登録商標）	液体：すぐに使用可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理機関
ロタウイルス（生、弱毒化）	R O T A S I I L	凍結乾燥 活性成分は、使用前に賦形剤希釈剤で再構成される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関
ポリオワクチン－不活化（I P V）	P o l i o m y e l i t i s V a c c i n e（不活化）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関
ポリオワクチン－不活化（I P V）	P o l i o m y e l i t i s V a c c i n e（不活化）	液体：すぐに使用可能	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理機関
インフルエンザ、季節性四価	G C F L U Q u a d r i v a l e n t i n j .	液体：すぐに使用可能	G r e e n C r o s s C o r p o r a t i o n	食品医薬品安全処
インフルエンザ、季節性	S e r i n f l u	液体：すぐに使用可能	A b b o t t B i o l o g i c a l s B V	医薬品評価委員会（MEB）

10

20

30

40

50

【表 3 - 5 9】

ポリオワクチン－不活化（IPV）	ShanIPV	液体：すぐに使用可能	Shantha Biotechnics Private Limited (A Sanofi Company)	中央医薬品標準管理機関
ポリオワクチン－経口（OPV）二価1型及び3型	Bivalent OPV Type 1 and 3 Polio myelitis Vaccine, Live（経口）	液体：すぐに使用可能	Panacea Biotech Ltd.	中央医薬品標準管理機関
コレラ：不活化経口	EuVichol-Plus	液体：すぐに使用可能	EuBiologics Co., Ltd.	食品医薬品安全処
ポリオワクチン－経口（OPV）二価1型及び3型	BIOPOL IOB1/3	液体：すぐに使用可能	Bharat Biotech International Limited	中央医薬品標準管理機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 6 0】

BCG	BCG Freezed Glutamate vaccine	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	Japan BCG Laboratory	千葉地方自治
肺炎球菌（結合）	Synflorix	液体：す ぐに使用 可能	GlaxoSmithKline Biologicals SA	欧州医薬品庁
ロタウイルス（生、弱 毒化）	Rotavac	液体：す ぐに使用 可能	Bharat Biotech International Limited	中央医薬品標準管理 機関
A型肝炎（ヒト二倍体 細胞）、不活化（小 児）	HEALIVE	液体：す ぐに使用 可能	Sinovac Biotech Co., Ltd	国家薬品监督管理局
腸チフス（結合）	Typbar-TVC	液体：す ぐに使用 可能	Bharat Biotech International Limited	中央医薬品標準管理 機関

10

20

30

40

50

【表 3 - 6 1】

ロタウイルス（生、弱毒化）	ROTAS I I L	凍結乾燥 活性成分 は、使用 前に賦形 剤希釈剤 で再構成 される	S e r u m I n s t i t u t e o f I n d i a P v t . L t d .	中央医薬品標準管理 機関	10
日本脳炎ワクチン（不 活化）6 μ g	J E E V（登 録商標）	液体：す ぐに使用 可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	
日本脳炎ワクチン（不 活化）（小児用3 μ g）	J E E V（登 録商標）	液体：す ぐに使用 可能	B i o l o g i c a l E . L i m i t e d	中央医薬品標準管理 機関	
S A R S - C o V - 2	P F I Z E R - B I O N T E C H C O V I D - 1 9 V A C C I N E - b n t 1 6 2 b 2	液体：す ぐに使用 可能	P f i z e r - B I O N T E C H	C E B R / F D A	20
S A R S - C o V - 2	M o d e r n a C O V I D - 1 9	液体：す ぐに使用 可能	M o d e r n a I n c	C E B R / F D A	
S A R S - C o V - 2	C O V I D - 1 9 ワクチン （C h A d O x 1 - S [組 換え]）	液体：す ぐに使用 可能	A s t r a Z e n e c a	欧州医薬品庁	

10

20

30

40

50

【表 3 - 6 2】

SARS-CoV-2	Janssen COVID-19 Vaccine	液体：すぐに使用可能	Johnson & Johnson	CEBR/FDA
SARS-CoV-2	Corona Vac, COVID-19 Vaccine (Vero Cell), Inactivated	液体：すぐに使用可能	Sinovac	国家薬品监督管理局

10

20

【0086】

様々な実施形態では、エピトープは、IRCからのペプチドのタンパク質分解切断に続いて放出される。IRCからのペプチドのタンパク質分解切断の後、エピトープは、MHC、場合によりMHCクラスI分子に結合する。MHC分子は、いくつかの実施形態では、HLA-A、B、及び／またはHLA-Cファミリーに由来する。MHCクラスI分子に結合する特定のエピトープは、表2または表3に列挙されているか、または当技術分野の他の場所で見られるもののいずれかである。MHCクラスI分子自体は、いくつかの実施形態では、以下の非限定的な例の1つまたは複数である：HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*11:01、HLA-A*201、HLA-A*020101、HLA-A*0203、HLA-A*0206、HLA-A2、HLA-A2.1、またはHLA-A*02。

30

【0087】

記載される方法、使用、及び組成物の一態様では、エピトープは、約8アミノ酸～約50アミノ酸長、または約8アミノ酸～約45アミノ酸長、または約8アミノ酸～約40アミノ酸長、約8アミノ酸～約35アミノ酸長、または約8アミノ酸～約30アミノ酸長、約8アミノ酸～約25アミノ酸長、約8アミノ酸～約20アミノ酸長、または、約8アミノ酸～約15アミノ酸長である。本発明の一態様では、エピトープは、約13アミノ酸～約50アミノ酸長、または約13アミノ酸～約45アミノ酸長、または約13アミノ酸～約40アミノ酸長、約13アミノ酸～約35アミノ酸長、または約13アミノ酸～約30アミノ酸長、約13アミノ酸～約25アミノ酸長、約13アミノ酸～約20アミノ酸長、または、約13アミノ酸～約15アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、CD8+T細胞エピトープは、例えば、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、または約17アミノ酸長である。

40

【0088】

切断配列。様々な実施形態では、1つまたは複数のプロテアーゼ切断配列がIRCに組み込まれ、切断の際にペプチドがIRCから放出されることを可能にし、その結果、ペプチドは腫瘍または癌細胞表面上のMHCに自由に結合できるようになる。様々な実施形態では、IRCは、エンドソームを回避し、分解し、それらの治療用積荷を機能的な形態でサイトゾルに放出しなければならない。様々な実施形態では、IRC及び／またはIRCのペプチドは、腫瘍微小環境内、すなわち、腫瘍または腫瘍細胞を取り囲む近くの間質腔

50

内でタンパク質分解酵素による切断を受けやすく、IRCまたはペプチド中の標的切断配列の位置は、標的部位の切断により、CD8+T細胞エピトープを含むペプチドのすべてまたは一部がIRCから放出され、その後、対象の腫瘍細胞の表面に発現するMHC分子に自由に結合するか、及び／または複合体を形成する位置である。この最終目標を達成するために必要なIRCの薬学的有効量または治療量は、インビトロ細胞培養技術、動物モデル研究、及び小規模から大規模なヒト臨床試験を利用する既知の臨床方法によって、当業者によって決定される。本明細書に記載された方法及び使用において、必要とする対象に投与されるIRCの量は、例えば、対象の特徴、例えば、年齢、体重、性別、及び／または病状／病歴、遺伝子構成、及び対象または対象のクラスに関連する他の要因に依存し、及び腫瘍の特徴、例えば、タイプ、体積、及び発生状態も、臨床研究を見つける用量範囲を設計する際に考慮されることが理解されるであろう。

10

【0089】

タンパク質分解切断配列は、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の中、上、周囲、または近くに存在する任意のプロテアーゼによって認識される。少なくとも約569個の既知のプロテアーゼが記載されている。(Lopez-Otin, et al., Nature Reviews Cancer, 7(10):800-808, 2007を参照)。これまでに同定されたすべてのヒトタンパク質分解酵素は、メタロプロテイナーゼ、セリン、スレオニン、システイン、及びアスパラギン酸プロテアーゼの5つの触媒クラスに分類することができる。可能性のあるプロテアーゼの非限定的なリストを表4に示しており、この表は、前述の5つのクラスに分類される最もよく研究されたプロテアーゼの例をまとめた表である。(Choi, Ki Young et al., "Protease-activated drug development," Theranostics, (2)2:156-78, 2012を参照)。これらのプロテアーゼのいくつかは、健康な細胞と比較して癌細胞で過剰発現していることがわかっている。

20

【0090】

種々の実施形態において、タンパク質分解切断配列は、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)であるプロテアーゼフリンによって認識され、そのうちのいくつかの異なるメンバーは同定されている、例えば、MMP、1、2、3、7、8、9、11、13、14または19、ADAM(ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ)、例えば、ADAMS8、9、10、15、17、または28、カテプシン、例えば、カテプシンD、G、H、またはN。本明細書ではまた、プロテアーゼエラスターゼ、プロテイナーゼ-3、アズロシジン、及びADAMTS-1も企図される。様々な実施形態では、切断配列は、前述のプロテアーゼの任意の1つまたは複数によって認識され、特定の実施形態では、配列は、ヒトフリンプロテアーゼによって認識される。様々な実施形態では、切断配列は、少なくとも約4個のアミノ酸残基を含み、そのうちの少なくとも約3個はアルギニン残基である。様々な実施形態では、切断配列は、少なくとも4つのアミノ酸残基を含み、そのうちの少なくとも3つはアルギニン残基であり、そのうちの1つはリジン残基またはアルギニン残基のいずれかである。様々な実施形態では、切断配列はR-X-R/K-R(配列番号89)である。様々な実施形態では、切断配列は追加の残基を含む。様々な実施形態では、切断配列は、約1、2、3、4、5、6、7、8、または約9個の追加のアルギニン残基をさらに含む。アルギニンは正に帯電していることが知られており、正に帯電したアルギニン残基のより長い鎖が、より負に帯電しているカプシド骨格の表面にペプチドを近づけることが発見されている。

30

40

【表 4】

表 4：過剰発現したプロテアーゼに関連するプロテアーゼ及びがん

科	プロテアーゼ	部位	がん	参照	その他の疾患	参照
システイン カテプシン	一般	細胞内、 リソソーム	ほとんど	表 [121]		
	カテプシン K	細胞外、 骨	乳房	[178]	動脈硬化、 骨粗鬆症	[179～182]
	カテプシン B	細胞外及び 病的状態下 では 細胞周囲	乳房、子宮頸部、結腸、 結腸直腸、胃、頭頸部、 肝臓、肺、黒色腫、 卵巣、膵臓、前立腺、 甲状腺	[31, 38, 81, 183～196]		
	カテプシン L		乳房、結腸直腸	[28]	AD	[197]
アスパラギン 酸カテプシン	カテプシン E	エンドソーム 構造、ER、 ゴルジ	子宮頸部、胃、肺、 膵臓腺癌	[51～55]		
	カテプシン D	リソソーム	乳房、結腸直腸、卵巣	[47～49, 198～ 200]	動脈硬化	[121]
カリクレイン (hK)	一般	細胞内、 分泌物	ほとんど	表 [15, 58]		
	hK1				高血圧症、炎症	[24]
	PSA (hK 3)		前立腺、卵巣	[201～202]		
	hK10		直腸、卵巣、膵臓、 頭頸部	[203～206]		
セリン プロテアーゼ	hK15		卵巣、前立腺	[207～208]		
	uPA, uPAR	膜、細胞周囲	子宮頸部、結腸直腸、 胃、前立腺	[86, 116, 209～210]		
カスパーゼ		細胞内			神経変性疾患	[82]
MMP	一般	細胞外	ほとんど	表 [211]		
	MMP-1, -8, -13		乳房	[85, 102～104, 211～212]	動脈硬化、 RA 気管支拡張症、 慢性喘息、 COPD 、 嚢胞性繊維症、 HIV 関連認知症、 高血圧症、脳卒中	[213～214]
	MMP-2, -9		乳房、結腸直腸、肺、 悪性グリオーマ、卵巣	[91～94] [95～ 98]		[87, 113～ 117]
	MMP-14	膜	乳房	[212]		
ADAM		細胞外			AD	[105, 107, 112]

*略語 : **AD**: アルツハイマー病、**ADAM**: ディスインテグリンメタロプロテアーゼ、**COPD**: 慢性閉塞性肺疾患、**ER**: 小胞体、**RA**: 関節リウマチ

【0091】

様々な実施形態では、ペプチドは、以下により詳細に記載されるように、カプシド骨格に結合される。ペプチドがカプシド骨格と会合または結合できる複数の既知の手段がある。本開示の様々な実施形態では、切断配列は、マレイミド結合またはアミド結合によって化学的に結合される（以下で論じる）。ペプチドは一般にカプシド骨格の任意の残基に結合しているが、ただし、ジスルフィド結合、マレイミド結合、及びアミド結合は、カプシド骨格を構成する変異 L1 タンパク質のシステイン、リジン、またはアルギニン残基にペプチドを結合させることによって形成される。

【0092】

様々な実施形態では、ペプチドは、少なくとも 1 つのプロテアーゼ切断配列を含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断配列は、腫瘍細胞によって、または腫瘍細胞の近くで優先的に切断されることができる任意の配列である。この切断配列のペプチドへの挿入により、IRC が腫瘍微小環境に入るまで、タンパク質がカプシド骨格キャリアに結合したままになる。がん組織または腫瘍微小環境における特定のプロテアーゼの活性の上

昇を利用することにより、ペプチドはカプシド骨格から大部分放出されず、ペプチドが腫瘍微小環境に入るまでMHC受容体を積極的にコーティングすることができる。いくつかのプロテアーゼが、腫瘍微小環境において活性であることが当技術分野で知られている。例えば、いくつかのメタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、及びセリンプロテアーゼが知られている。がん治療の観点からすると、プロドラッグ切断の原因となるプロテアーゼは癌細胞だけでなく、腫瘍の間質成分からも由来する可能性があるため、腫瘍微小環境への活性薬物の放出方向は、癌細胞のみによって発現される標的に依存しないという追加の魅力がある。代わりに、標的を表すのは腫瘍生態系全体である。

【0093】

ペプチドをL1タンパク質に結合する方法

本明細書に記載のカプシド骨格は、いくつかの実施形態では、カプシド骨格に関連する1つまたは複数のペプチドを含むエピトープを標的細胞に送達するように最初に官能化され、それによって破壊のために腫瘍または癌細胞を標識する。様々な実施形態では、ペプチドは、カプシドタンパク質上のシステイン残基を介してカプシド骨格に結合される。このようなシステイン分子は、カプシド骨格の表面に自然に、または突然変異によって提示される。様々な実施形態では、カプシド骨格は、カプシド骨格のカプシド様正20面体構造を維持しながら、カプシド骨格の表面上のシステイン残基のスルフヒドリル基を還元するのに十分な還元条件に供される。その遊離スルフヒドリル基により、システインは酸化条件下で他のスルフヒドリル含有配位子と容易かつ自発的にジスルフィド結合を形成する。あるいは、一連の化合物がマレイミド部分を受容基質に付加することが知られており、約6.5～約7.5のpHでシステイン残基とチオエステル結合を容易かつ不可逆的に形成する。したがって、一実施形態では、ペプチドは、マレイミド結合を介してカプシド骨格と会合している。

【0094】

様々な実施形態では、ペプチドはカプシド骨格上のリジン残基に結合される。リジン残基は、第一級アミン部分のために容易に改変される。n-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル反応と呼ばれる反応(NHSは反応の一部として放出されるため)を使用して、カプシド骨格の表面に露出したリジン残基にアミド結合が形成される。NHS反応は、約pH7.2～約pH9の間で自発的に起こる。

【0095】

様々な実施形態では、ペプチドは、アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基に結合される。システイン基及びリジン基を含む化学結合戦略とは異なり、アスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基への化学結合には複数の工程が必要である。最初に、アスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボン酸を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、または類似の化学架橋試薬を使用して活性化する。活性化されると、この付加体はNHSと反応してNHSエステルを形成する。NHSエステルは、その後、安定したアミド結合を形成するために露出した第一級アミンを持つ配位子と反応する。

【0096】

様々な実施形態では、カプシド骨格は、正に荷電したアミノ酸の領域を含むペプチドに結合することができる表面露出領域上の負に荷電したアミノ酸の領域を含む。様々な実施形態では、負に荷電したアミノ酸の領域は、ポリアニオン性：システインまたはより具体的には、ポリグルタミン酸：システインまたはポリアスパラギン酸：システインと呼ばれる1つまたは複数のシステイン残基によって、片側または両側で隣接している。そのような場合、カプシド骨格とペプチドの結合は、カプシド骨格とペプチドの相補的なアミノ酸電荷間の非共有結合、及びシステイン間のジスルフィド結合から生じるであろう。様々な実施形態では、システインは、荷電アミノ酸の領域から1つまたは複数のアミノ酸離れており、それにより二次／三次構造が荷電アミノ酸領域をシステインに近接させる。様々な実施形態では、ペプチドは、少なくとも1つのペプチドと、ペプチドをカプシド骨格に結合させるためのポリイオン：システインとを含み、相補的なポリイオン：システイン配列と

10

20

30

40

50

、末端システインとC D 8 + T細胞エピトープとの間に位置する酵素切断部位とを含む。様々な実施形態では、ペプチドは、末端システイン、少なくとも1つのペプチド、及び末端システインとペプチドとの間に位置する酵素切断配列を含む。

【0097】

記載されたIRCを生成するのに有用な負に荷電したアミノ酸には、例えば、グルタミン酸及びアスパラギン酸が含まれる。これらのアミノ酸は、いくつかの実施形態では単独で、例えばポリグルタミン酸、または組み合わせて使用される。特定の実施形態では、負に帯電した領域はグルタミン酸を含む。負に荷電したアミノ酸の数は変動する可能性があり、約4～約20個のアミノ酸、約6～約18個のアミノ酸、または約8～約16個のアミノ酸等を含むことができる。特定の実施形態では、負に帯電した領域は、約8個の負に帯電したアミノ酸を含む。より具体的な実施形態では、負に帯電した領域は、E E E E E E E E C (E 8 C、配列番号130)を含む。別の実施形態では、負に帯電した領域はC E E E E E E E E C (配列番号131)を含む。ジスルフィド結合を介してペプチドをカプシド骨格に結合させる方法は知られている。例えば、ペプチド上のポリアルギニン-システイン部分の存在は、カプシド骨格の様々なループに存在するポリアニオン部位 (E E E E E E E E C、E 8 C、配列番号130) へのペプチドのドッキングを可能にする。2つのシステイン残基間の共有架橋により、この会合は酸化条件下で不可逆的になるはずである。共役反応では、精製されたカプシド骨格を結合緩衝液 (20 mM Tris / HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、5%グリセロール、0.5 mM CaCl₂) で透析し、次に、ペプチド及び酸化試薬を加えて、反応を4℃で16時間続行させる。インキュベーションの終わりに、反応混合物をサイズ排除カラム (例えば、SEPHADEX (登録商標) G-100、Pharmacia、New Jersey、US、容量20 ml、流速1 ml / 分、10 mM Tris / HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.5 mM CaCl₂) に添加し、非共役ペプチドを除去し、緩衝液を交換する。ポイドボリュウムに溶出するIRCは、SDS-PAGE上のL1タンパク質の存在によって識別される。結合カプシド骨格 (IRC) はその後、必要に応じて電子顕微鏡によって分析される。

【0098】

様々な実施形態では、ペプチドはL1タンパク質に遺伝的に融合される。様々な実施形態では、ペプチドはカプシド骨格に共有結合または非共有結合のいずれかで連結される。例えば、負及び正に荷電したアミノ酸の結合を介して、またはマレイミドベースの結合を介して、ペプチドをカプシド骨格に結合させるのではなく、むしろ、ペプチドをコードする核酸配列を、いくつかの実施形態では、L1タンパク質をコードする核酸に挿入し、それにより、発現すると、カプシドタンパク質のループに挿入され、カプシド骨格の表面に表示されるペプチドが生成される。

【0099】

様々な実施形態では、非天然アミノ酸を使用して、ペプチドをカプシド骨格に結合させる。20種類超の天然アミノ酸、多くの非天然アミノ酸が部位特異的タンパク質共役反応に使用されてきた。例えば、アジドホモアラニン (AHA) またはp-アミノフェニルアラニン (pAF) が結合のためにカプシド骨格コートタンパク質に組み込まれ得る。これらのアミノ酸は、2つの方法でタンパク質に組み込まれる：全体的なメチオニン置換及びアンバー終止コドン抑制。AHAはメチオニンに非常に似ているため、メチオニン供給が律速である場合、AHAは各AUGコドンに組み込まれ、これはグローバルメチオニン置換と呼ばれる。メチオニンまたは無細胞タンパク質合成の栄養要求性細菌は、メチオニンの量を制限するために使用することができる。アンバー終止コドン抑制はpAFが組み込むであろう。アンバー終止コドン抑制は、天然アミノ酸と反応しない非天然シンテターゼ及びtRNAを使用して、非天然アミノ酸をアンバー終止コドンUAGに組み込む。アジドを示すAHAは、銅 (I) 触媒アジド-アルキン付加環化 (「クリック」反応) に関係し、アルキン含有配位子と共有結合トリアゾール環を形成する。

【0100】

様々な実施形態では、IRCは、L1タンパク質の少なくとも10分の1がペプチドを提示することを含む。様々な実施形態では、L1タンパク質の少なくとも5分の1がペプチドを提示する。様々な実施形態では、L1タンパク質の約半分がペプチドを提示する。様々な実施形態では、L1タンパク質の約3分の2がリコールペプチドを示す。様々な実施形態では、L1タンパク質のほぼすべてがペプチドを提示する。

【0101】

臨床治療におけるIRCとその使用

様々な実施形態では、カプシド骨格は腫瘍細胞に優先的に結合する。カプシド骨格の腫瘍選択性は、いくつかの実施形態では、カプシド骨格の電荷（正または負）、形状及びサイズ（異なるアスペクト比のフィラメント及び直径の球体）、遮蔽（自己タンパク質／ペプチド及び様々なサイズと密度のポリマー）、及びターゲティング（様々な密度で様々なリンカーに表示される受容体または環境因子のリガンド）などのいくつかの源に発する。

【0102】

電荷に関して、様々な実施形態では、カプシド骨格は正の表面電荷を含む。いくつかの研究では、正に帯電したカプシド骨格は、対象に注射された場合、より長く循環に留まることが示されている。細胞膜に負の電荷を与えるプロテオグリカンが細胞膜に豊富に存在し、腫瘍間質腔内に正の電荷を与えるコラーゲンが豊富に存在するため、正に帯電したIRCは、帯電していないまたは負に帯電したIRCと比較して、哺乳動物細胞への結合が強化される可能性が高くなり、そのため、凝集を回避することができ、その結果、腫瘍組織によりよく浸透することができる。これらの電荷ベースの効果を示すいくつかの例には、ポリアルギニンで装飾されたササゲモザイクウイルス（CPMV）が含まれており、ヒト子宮頸がんにおいて天然CPMVよりも8倍効率的に取り込まれることがわかっている。（Wen et al., Chem. Soc. Rev., 45 (15): 4074-4126, 2016）。

【0103】

形状に関して、カプシド骨格の形状と柔軟性は、場合によっては、カプシド骨格が腫瘍全体に拡散する能力において追加の機能的役割を果たす。球状粒子と棒状粒子の拡散プロファイルの比較は、回転楕円体モデルを使用してCPMV及びTMVで実行した。この研究では、CPMV（球状）が安定した拡散プロファイルを示したが、TMV（棒状）は、針のように、軸方向の動きに起因する可能性のある非常に急速な初期負荷段階を伴う2段階の拡散挙動を示した。（Wen et al., Chem. Soc. Rev., 45 (15): 4074-4126, 2016）。細長い粒子によって付与される他のいくつかの有利な特性には、血管壁へのより良いマージン、及び相互作用のためのより大きな表面積によるより強い接着が含まれ、これらは腫瘍ホーミングだけでなく、心血管疾患への標的の向上にも影響する。

【0104】

受動的な腫瘍ホーミング特性に加えて、ウイルスと特定の細胞との自然な相互作用にも利用することができる。特にCPMVは、内皮細胞、癌細胞、炎症細胞に見られる表面ビメンチンとの相互作用において独自の特異性を示す。（Wen et al., Chem. Soc. Rev., 45 (15): 4074-4126, 2016）。表面ビメンチンに対するCPMVの天然の親和性により、深さ500 µmまでの微小血管系の高解像度イメージングが可能になり、これは、血管系を凝集及びブロックする傾向があるため、他のナノ粒子の使用では達成することができない。この相互作用は、子宮頸癌、乳癌、結腸癌細胞株を含む癌細胞のパネルへの送達、アテローム性動脈硬化病変の描写、腫瘍血管系及び血管新生の生体内イメージングなど、様々な用途に利用することができる。既存の内因性関連の別の例は、イヌパルボウイルス（CPV）及びトランスフェリン受容体（TfR）であり、これは、細胞への鉄輸送の重要な受容体であり、多数の癌細胞株によって高度にアップレギュレートされている。色素標識の後でも、CPVはTfRに対する特異性を保持し、HeLa子宮頸癌細胞、HT-29結腸癌細胞、及びMDA-MB-231乳癌細胞に見られる受容体に結合することが示された。（Wen et al., Chem.

Soc. Rev., 45 (15) : 4074-4126, 2016)。

【0105】

様々な実施形態では、カプシド骨格は、対象の腫瘍細胞表面に優先的に発現されるタンパク質を標的とする。このようなタンパク質は、通常、腫瘍細胞の表面で過剰発現するが、すべてではないにしても一部は血液、すなわち血清にも見られる。このような表面マーカーの非限定的な例には、CEA（癌胎児性抗原）、E-カドヘリン、EMA（上皮膜抗原；別名MUC-1）、ビメンチン、フィブロネクチン、Her2/neu（ヒト上皮成長因子受容体2型、別名ErbB2）、 $\alpha v \beta 3$ インテグリン、EpCAM（上皮細胞接着分子）、FR- α （葉酸受容体-アルファ）、PAR（ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体）、及び、トランスフェリン受容体（腫瘍細胞で過剰発現）が挙げられる。

10

【0106】

ペプチドは、膜貫通タンパク質の認識に基づいて癌細胞を標識するためにしばしば使用される。最も一般的に使用されるペプチドは、L-アルギニン、グリシン、及びL-アスパラギン酸で構成されるアルギニルグリシルアスパラギン酸（RGD）である。RGDは、インテグリンに結合する糖タンパク質であるフィブロネクチンの細胞結合ドメインから最初に分離され、コラーゲン、フィブリン、及びプロテオグリカンに結合することにより、細胞-細胞及び細胞-細胞外マトリックス（ECM）の結合及びシグナル伝達に関与している。RGDペプチドは、細胞表面インテグリンの一種である $\alpha v \beta$ に対して最高の親和性を有し、これは腫瘍内皮細胞では高度に発現されるが、正常な内皮細胞では発現されない。様々な実施形態では、そのようなペプチド配列はIRCに組み込まれる。

20

【0107】

IRCを必要とする患者に投与することによる、必要とする対象におけるがんを治療する方法、及び記載されたIRC組成物の関連する使用が、本明細書に記載される。本明細書に記載の方法は、例えば、腫瘍の増殖、進行または転移を阻害するのに十分な量、すなわち治療量または用量で、本明細書に記載のIRCを必要とする対象に投与することを含む。様々な実施形態では、IRCは、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性の刺激を含む、サイトカイン産生及び／または細胞性免疫、特に自然免疫を刺激するのに十分な量で、それを必要とする対象に投与される。本明細書に記載の様々な実施形態では、それを必要とする対象は、以前に腫瘍の治療を受けており、現在、医療基準に従ってがんがない、または無病であるとみなされている対象である。

30

【0108】

簡単に言えば、記載されたIRCの作用機序であると考えられるものの様々な理解された側面が、以下の実施例によって記載され支持される。IRCは最初に腫瘍細胞に結合し、いくつかの実施形態では結合は特異的である。（実施例9、図18A及び18Bを参照）。次いで、IRC上のペプチドエピトープは、いくつかの実施形態において、フェリリンによって、または腫瘍微小環境において過剰発現される腫瘍細胞近くの任意の他の常在プロテアーゼによって、タンパク質分解的に切断される。これにより、IRCからペプチドが放出され、腫瘍細胞の表面に発現したMHC分子によるペプチドのローディングまたは結合が行われる（「エピトープコーティング」）。（実施例10及び16、ならびに図19、21、22、及び34を参照）。次に、エピトープでコーティングされた腫瘍細胞は、MHC分子に結合した特定のペプチドに応答する1つまたは複数のT細胞、及び既存のCD8T細胞によって病原体感染細胞として認識され、誘発免疫リダイレクト応答が起こる。（実施例11及び12参照）。すなわち、この認識イベントは、病原体に対する対象の既存の免疫記憶及び腫瘍に対する小児期ワクチンの誘発または活性化につながり、対象の腫瘍細胞の攻撃及び破壊につながる。

40

【0109】

腫瘍細胞が破壊されると、既存の免疫応答の構成要素が癌細胞抗原に曝されることになる。したがって、死滅した腫瘍細胞から放出された抗原は、さらなる免疫応答を開始して、追加の腫瘍特異的CD8T細胞、またはその領域の追加の腫瘍細胞を攻撃するT細胞の

50

「第2波」を動員する。これにより、癌細胞抗原に対する内因性免疫応答が誘発され（場合によっては「エピトープ拡散」と称される）、抗腫瘍免疫記憶がもたらされる。

【0110】

したがって、本明細書に開示される方法及び使用は、癌細胞を攻撃するために、対象自身の既存の適応記憶免疫系を利用するか、または再配向することによって生じる、必要とする対象におけるがんを治療する方法である。本明細書に記載の方法及び使用は、対象が、場合によっては、もともとがんに応答して誘発されたのではなく、通常のワクチン接種によって、または寄生虫または病原体による自然感染によって誘発された、既存の免疫応答を有するという事実を利用する。癌細胞は通常、既存の免疫応答を誘発するようなエピトープを発現しないため、そのような免疫応答は通常、外因性の介入なしに、癌細胞を攻撃することが不可能なため、それは予測されない。しかし、本明細書に記載の本方法及び使用により、そのような既存の免疫応答は、対象のがんを攻撃し、殺し、除去するために容易に動員される。したがって、これらのIRCは、対象へ注射されるまたは他の手段により送達されるにあたり、がんの表面内または表面上に、対象の既存の免疫応答によって認識されることが知られている1つまたは複数のエピトープを導入し、その結果、免疫応答の細胞が抗原提示癌細胞を攻撃するため、本IRC組成物によって、この動員または再目的化効果が達成される。

10

【0111】

したがって、いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の方法、使用、及び組成物は、対象の既存の免疫応答をがんの部位へ動員することによって作用し、それにより既存の免疫応答が癌細胞を攻撃して殺す。したがって、記載されている方法は、一般に、4つまたは5つの工程が関与し、工程には、1) IRCを腫瘍細胞に結合すること、2) IRCからのエピトープの切断、3) 腫瘍細胞表面上に表示のためのエピトープのMHC結合4) エピトープに対する対象の既存の想起された免疫によるロードされたMHCの認識、及び、任意に5) その後の第2波及びより長期の抗腫瘍免疫の誘発、を含む。

20

【0112】

細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータが、ヒトで使用するための一連の投与量を処方する際によく使用される。そのような組成物及び投与量は、好ましくは、ほとんどまたはまったく毒性を伴わないED₅₀を含む循環濃度範囲内にある。投与量は、用いられる剤形及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動する。本明細書に記載の方法で使用される任意の組成物について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、細胞培養で決定されるIC₅₀（症状の最大阻害の半分を達成する試験組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルで処方される。次に、このような情報を使用してヒトに有用な用量を正確に決定する。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定される。

30

【0113】

多くの場合、IRC含有組成物を複数回投与することが望ましく、通常、最大で、少なくとも、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上であるか、またはれを超えず、それらの間のすべての範囲を含む。投与は通常、1、2、3、4、5、6～5、6、7、8、9、10、11、～12週／月／年の間隔で行われ、その間のすべての値と範囲を含み、通常は3週間～5週間の間隔である。

40

【0114】

様々な実施形態では、有効量の本明細書に記載のIRCを、それを必要とする対象に投与することによる、マクロファージ及びナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害活性を刺激する方法が提供される。マクロファージ及びナチュラルキラー細胞は、場合によっては、腫瘍の微小環境に存在するものである。一態様では、IRCは、腫瘍微小環境にすでに存在するマクロファージ及びナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性を刺激するのに有効な量で対象に投与される。様々な他の実施形態では、IRCは、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を腫瘍微小環境に誘引するのに有効な量で対象に投与される。様々な実

50

施形態では、IRCは、十分な数の抗体をペプチドまたはIRCカプシド自体に結合させて、マクロファージ、好中球及びナチュラルキラー細胞を誘引及び刺激するのに有効な量で対象に投与される。

【0115】

様々な実施形態では、有効量の本明細書に記載のIRCを、それを必要とする対象に投与することによって、既存の記憶CD8+T細胞の細胞傷害活性を腫瘍細胞または腫瘍微小環境に向け直すための方法及び使用が提供される。好ましくは、IRCのペプチドのT細胞エピトープは、対象がワクチン接種された病原体に由来するか、または以前に対象に感染した病原体に由来し、対象は、腫瘍細胞上のMHCクラスI分子との複合体でT細胞エピトープを認識する記憶CD8+T細胞を有する。本明細書に記載の一態様では、本明細書に記載のIRC組成物の有効量または治療量は、メモリーCD8+T細胞を腫瘍微小環境に誘引するのに十分な量である。別の代替の態様では、IRCの有効量は、腫瘍微小環境に存在するメモリーCD8+T細胞を刺激するのに十分な量である。

【0116】

様々な実施形態では、腫瘍は、小肺細胞癌、肝細胞癌、肝臓癌、肝細胞癌、黒色腫、転移性黒色腫、副腎癌、肛門癌、再生不良性貧血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳／CNS癌、乳癌、原発不明癌、キャスルマン病、子宮頸癌、結腸・直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング腫瘍ファミリー、眼癌、胆嚢癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（要点）、妊娠性栄養膜性疾患、ホジキン病、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭及び下咽頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔及び副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔及び中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、多発性骨髄腫（MM）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、脾臓辺縁帯リンパ腫、辺縁帯リンパ腫（結節外または結節）、成人の混合細胞型びまん性攻撃性リンパ腫、成人の大細胞型びまん性攻撃性リンパ腫、成人の大細胞免疫芽細胞性びまん性攻撃性リンパ腫、小非切断細胞びまん性攻撃性リンパ腫成人、または濾胞性リンパ腫、頭頸部癌、子宮内膜または子宮癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、神経膠芽腫、または転移性癌である。好ましい実施形態では、がんは、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、膵臓癌または黒色腫である。

【0117】

本明細書で使用される、「がん」という用語は、リンパ腫、リンパ性白血病、肺癌、非小細胞肺NSCL）癌、細気管支肺胞性細胞肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚性または眼球内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌（stomach cancer）、胃癌（gastric cancer）、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道、陰茎癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓または尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞癌、胆道癌、中枢神経系腫瘍（CNS）、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、多形性膠芽腫、星状細胞腫、schwannomas、脳室上衣細胞腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫及びユーイング肉腫、上記のがんの難治性もの、または上記のがんの1つまた複数の組み合わせを含む、増殖性疾患を指す。

【0118】

本明細書に記載の態様は、本明細書に記載のIRCを対象に投与することにより、それを必要とする対象のがんを治療する方法であり、ペプチドのCD8+エピトープは、ウイルス誘発性がん、例えば、HPV子宮頸癌、HPV+口腔癌、EBV上咽頭癌（「治療用ワクチン」）に対する治療に失敗したがんワクチンのものである。したがって、本明細書に記載の方法及び使用は、対象が積極的にワクチン接種を受けているが、治療に対して抗腫瘍効果で応答しなかったかどうかを決定することを含む。IRC組成物は、次いで、有

効量の本発明のIRCが対象に投与され、ペプチドのCD8+エピトープは、対象に感染した対象に以前に投与されたワクチンの抗原決定基のものである。

【0119】

カプシド骨格は、固有のアジュバント特性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のIRC組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる追加の免疫応答の非特異的刺激剤と組み合わせることによってさらに増強される。適切なアジュバントには、サイトカイン、毒素、またはミョウバンなどの合成組成物などであるがこれらに限定されないすべての許容される免疫刺激化合物が含まれる。

【0120】

アジュバントには、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、無機塩、ポリヌクレオチド、及び天然物質が含まれるが、これらに限定されない。使用され得る特定のアジュバントには、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -インターフェロン、GM-CSF、BCG、水酸化アルミニウムまたは他のアルミニウム化合物などのアルミニウム塩、メチレンジオキシフェニル(MDP)化合物、例えば、thur-MDP及びnor-MOP、CGP(MTP-PE)、リポドA、及びモノホスホリルリポドA(MPL)、または不活化微生物剤が含まれる。バクテリアから抽出した3つの成分、MPL、トレハロースジミコレート(TOM)、及び細胞壁骨格(CWS)を2%スクアレン/Tween 80エマルジョンに含む、RIBI。MHC抗原でさえも使用され得る。

【0121】

IRC組成物に対するアジュバント効果を達成する様々な方法には、リン酸緩衝生理食塩水中の約0.05~約0.1%溶液として一般的に使用される水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム(ミョウバン)などの薬剤の使用、約0.25%溶液として使用される糖の合成ポリマーとの混合(CARBOPOL(登録商標))、それぞれ30秒~2分間、約70°C~約101°Cの範囲の温度での熱処理による組成物中のタンパク質の凝集が含まれる。アルブミンに対するペプシン処理(Fab)抗体による再活性化による凝集；細菌細胞、例えばC. parvum、エンドトキシンまたはグラム陰性細菌のリポ多糖成分との混合物；生理的に許容される油ビヒクル、例えば、モノオレイン酸マンニド(Arace LA(商標))中のエマルジョン、またはブロック代替物として使用されるパーフルオロカーボン(FLUOSOL-DA(商標))の20%溶液を含むエマルジョンも、アジュバント効果を生み出すために使用され得る。典型的なアジュバントは、完全フロイントアジュバント(死菌Mycobacterium tuberculosisを含む)、不完全フロイントアジュバント、及び水酸化アルミニウムである。

【0122】

ヒトへの投与のために、様々な適切なアジュバントが当業者には明らかであろう。これらには、例えば、アジュバントとしてのミョウバンMPL、または承認されたHPVワクチンCERVARIX(登録商標)で使用される同等の製剤AS04、AS03、AS02、MF59、モンタニド、GPI-0100などのサポニンベースのアジュバント、CpGベースのアジュバントまたはイミキモドが含まれる。本発明の実施形態では、アジュバントは、カプシド骨格と単に混合されるのではなく、カプシド骨格に物理的に結合されるか、またはカプシド骨格によってカプセル化される。アジュバントに加えて、免疫応答を増強するために生物学的応答修飾因子(BRM)を同時投与することが望ましい場合がある。BRMは、T細胞免疫をアップレギュレートするか、サプレッサー細胞の活性をダウンレギュレートすることが示されている。このようなBRMには、シメチジン(CIM; 1200mg/d)(Smith/Kline, PA, US)、または低用量のシクロホスファミド(CYP; 300mg/ml)(Johnson/Mead, NJ, US)及び γ -インターフェロン、IL-2、またはIL-12などのサイトカイン、または、B-7など免疫ヘルパー機能に関与するタンパク質をコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載の実施形態では、これらの遺伝子は、対象への送達を促進するためにカプシド骨格によってカプセル化される。

【0123】

10

20

30

40

50

ポリペプチドまたはペプチド配列を有効成分として含有する組成物の調製は一般的によく理解されている。典型的に、このような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかの注射剤として調製され、また、注射前に液体中に溶解または懸濁するのに好適な固体形態も調製することができる。調製物は、場合によっては乳化される。いくつかの実施形態での有効免疫原性成分は、薬学的に許容され、かつ有効成分と相溶性のある賦形剤と混合される。好適な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等及びそれらの組み合わせである。さらに、必要に応じて、組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、またはワクチンの有効性を高めるアジュバントなどの補助物質を一定量含有することができる。特定の実施形態では、ワクチンは、物質の組み合わせで処方される。

10

【0124】

本開示のIRCを含む組成物は、対象へのインビボ投与に適した生物学的に適合する形態であることが意図される。本明細書に記載の薬学的組成物は、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体をさらに含む。「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制機関、例えばFDAによって承認されているか、または動物、特にヒトでの使用が米国薬局方またはその他の一般的に認められている薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、カプシド骨格とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような医薬用担体には、例えば、水または油などの滅菌液体が挙げられ、石油性、動物性、植物性または合成由来のものを含む油、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などのものが含まれる。本明細書に記載の医薬組成物を経口投与する場合、場合によっては水が担体である。生理食塩水及び水性デキストロースは、例えば、薬学的組成物が静脈内投与される場合の担体である。食塩水溶液ならびにデキストロース及びグリセロールの水溶液が用いられ、例えば、注射溶液のための液体担体として用いられ得る。好適な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、スリムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態での薬学的組成物は、任意に少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含有する。

20

【0125】

本開示のIRCを含む医薬組成物は、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、持続放出製剤などの形態をとる。いくつかの実施形態では、経口剤形には、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準担体が挙げられる。特定の実施形態では、医薬組成物は、対象への適切な投与のための形態を提供するために、適切な量の薬学的に許容される担体とともに有効量の本開示のIRCを含む。剤形は、投与方法に適合する必要がある。

30

【0126】

本開示の薬学的組成物は、これらに限定されないが、静脈内、筋肉内、関節内、気管支内、腹腔内、被膜内、軟骨内、腔内、細胞内、小脳内、脳室内、結腸内、子宮頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボラス、経口、非経口、皮下、膺、直腸、頬、舌下、鼻腔内、イオン導入手段、または経皮手段を含む任意の特定の投与経路によって投与される。最も適した経路は、静脈内注射または経口投与である。特定の実施形態では、組成物は、標的領域またはその近くに投与され、例えば、腫瘍内注射される。

40

【0127】

水溶液での非経口投与の場合、例えば、溶液を必要に応じて好適に緩衝化する必要がある。最初に十分な生理食塩水またはグルコースで液体希釈剤を等張にする必要がある。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の投与に特に好適である。これ

50

に関して、採用することができる無菌水性媒体は、本開示に照らして、当業者に知られている。例えば、1用量をNaCl等張液中に溶解し、皮下注射液に加えるか、予定注射部位に注射することができる。（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990を参照）。用量については、対象の状態に応じて、いくらかの変動が必然的に生じ得る。いずれにせよ、投与を担当する者が個々の対象に適切な用量を決定する。

【0128】

本明細書に記載のIRC含有組成物は、いくつかの実施形態では、吸入によって投与される。特定の実施形態では、組成物はエアロゾルとして投与される。本明細書で使用される場合、「エアロゾル」または「エアロゾル化組成物」という用語は、気体中の固体または液体粒子の懸濁液を指す。これらの用語は、一般に、気化、噴霧化、または固体または液体の形態から、懸濁した固体または液体の薬物粒子を含む吸入可能な形態に変換された組成物を指すために使用される。そのようなエアロゾルは、呼吸器系を介して組成物を送達するために使用することができる。本明細書で使用される場合、「呼吸器系」は、酸素の摂取及び二酸化炭素の呼気を担う体内の器官系を指す。系は、一般に、鼻から肺胞までのすべての空気通路を含む。哺乳類では、一般に、肺、気管支、細気管支、気管、鼻腔、及び横隔膜を含むと考えられている。本開示の目的のために、呼吸器系への組成物の送達、薬物が呼吸器系の1つまたは複数の気道、特に肺に送達されることを示す。

【0129】

他の投与様式に適した追加の製剤には、座薬（肛門または膣への適用用）、及び場合によっては経口製剤が含まれる。坐剤の場合、従来の結合剤及び担体には、例えば、ポリアルカレングリコールまたはトリグリセリドが含まれてもよく、そのような坐剤は、有効成分を約0.5%～約10%、好ましくは約1%～約2%の範囲で含む混合物から形成され得る。経口製剤は、そのような通常用いられる賦形剤を、例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、及び炭酸マグネシウムとして含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、持続放出製剤、または粉末の形態を取り、約10%～約95%、好ましくは約25%～約70%の有効成分を含む。

【0130】

本明細書に記載のIRC組成物は、場合によっては、中性または塩形態としてワクチンに処方される。薬学的に許容される塩としては、（ペプチドの遊離アミノ基で形成された）酸付加塩、及び、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で形成されたものが挙げられる。また、遊離カルボキシル基で形成された塩は、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄など）、及び有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど）に由来してもよい。

【0131】

本開示の医薬組成物はまた、特定の実施形態において、有効量の追加のアジュバントを含む。本明細書で述べたように、パピローマウイルスカプシド骨格はアジュバント特性を有する。適切な追加のアジュバントには、水酸化アルミニウムなどのフロイントの完全または不完全なミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、ジニトロフェノール、及びBacille Calmette-Guerin (BCG)などの潜在的に有用なヒトアジュバント、Corynebacterium parvum、及び非毒性のコレラ毒素が含まれるが、これらに限定されない。

【0132】

通常の保存条件及び使用条件下で、記載のIRC組成物は、いくつかの実施形態では微生物の発育を阻止するための保存剤を含有する。全ての場合で、医薬形態は無菌であらねばならず、これが容易に注射可能な程度に流体でなければならない。これはまた、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌または真菌などの微生物の汚染作用に対し

10

20

30

40

50

て保存されねばならない。

【0133】

担体は、いくつかの実施形態では、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、それらの好適な混合物、及び植物油を含有する、溶媒または分散媒体である。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合、必要とされる粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、適切な流動性が維持される。微生物の作用の抑制は、いくつかの実施形態では、種々の抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらす。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に添加することによって達成することができる。

10

【0134】

無菌注射用溶液は、上述の様々な成分とともに、IRCを必要な量で適切な溶媒中に組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌され得ることにより調製される。一般に、分散液は、滅菌された様々な有効成分を、基本的な分散媒と、上記の成分のうち必要とされる他の成分とを含有する無菌ビヒクル中に組み込むことにより調製することができる。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、その調製の好ましい方法は、予め無菌濾過した溶液から有効成分と任意の所望の追加成分とを合わせた粉末が得られる、真空乾燥及び凍結乾燥技術である。

20

【0135】

本開示の異なる態様は、IRCを含む有効量の組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む。本開示のいくつかの実施形態では、CD8+T細胞エпитープを含む標的ペプチドを含むIRCを患者に投与して、腫瘍を治療するか、またはそのような腫瘍の再発を予防する。このような組成物は、一般に、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散される。

【0136】

特定用途向けIRCの設計

様々な実施形態では、IRCを必要とする対象にIRCを提供する方法が提供され、方法は、（１）対象における既存の免疫を測定すること、及び（２）必要とする対象への投与に適切なIRCを選択することを含む。対象に投与する適切なIRCは、患者のT細胞プロファイルに依存する。適切なIRCは、CD8+細胞のベースライン合計の少なくとも２倍のT細胞応答を誘発できるものである。様々な実施形態では、適切なIRCは、CD8+または総CD8+CD69+T細胞のベースライン合計の２倍であるT細胞応答を誘発することができるものである。目標は、対象のワクチン接種歴または病原体への以前の暴露に基づいて、適切なIRCを選択することである。どのIRCが適切であるかの決定は、例えば、（１）対象の問診、（２）対象の医療記録のレビュー、及び／または（３）対象のT細胞プロファイルを評価することを含む。

30

【0137】

様々な実施形態では、腫瘍に向けられた免疫応答を誘発するために、複数のペプチドが適している。様々な実施形態では、ペプチドまたは両方のペプチドの混合物のいずれかを担持するIRCが適切であろう。様々な実施形態では、１つより多いペプチドが発現され、カプシド骨格に結合される。様々な実施形態では、単一のペプチドは、複数のペプチドを含む。様々な実施形態では、異なるペプチドを含む複数のペプチドがカプシド骨格に結合される。様々な実施形態では、本発明は、本明細書に記載のIRCの集団及び薬学的に許容される賦形剤を含む。様々な実施形態では、対象に投与されるIRCは同一である。様々な実施形態では、異なるペプチドを有するIRCが対象に投与される。

40

【0138】

事前のワクチン接種に基づく選択。本明細書に記載の方法及び使用の様々な実施形態では、必要とする対象に投与するための適切なIRCを選択する方法も企図される。様々な

50

実施形態では、これは、対象が所与の病原体、例えば、寄生虫、細菌、またはウイルス、例えば麻疹またはポリオに対して積極的にワクチン接種されているかどうかを確認すること、及びその後、本明細書に開示されるIRCを選択し、対象に投与することを含み、ペプチドのCD8+T細胞エピトープは、対象が過去に免疫された病原体に由来する。様々な実施形態では、対象のワクチン接種歴は、対象の医療記録を調べることによって得る。様々な実施形態では、対象のワクチン接種履歴は、対象に問診することによって得る。

【0139】

以前の感染に基づく選択。様々な実施形態では、必要とする対象への投与のために適切なIRCを選択する方法は、対象が所与の病原体、例えば、寄生虫、細菌、またはウイルス、例えば、麻疹またはポリオに以前に感染しているか、そして感染が解決しているかどうかを確認することを含む。様々な実施形態では、その後、対象は、対象が以前に感染した病原体を含むペプチドを含むIRCを投与される。

【0140】

対象の医療記録を調べたり、対象に問診したりすることで、対象が特定の病原体に感染しているかどうかを確認することができる。特定のMHCクラスI分子に結合するCD8+T細胞エピトープの非限定的な例を表1に示す。この方法はまた、特定の実施形態では、対象の細胞がどのMHCクラスI決定基を発現するかを決定し、その後、本明細書に記載のIRCを投与することを含み、ペプチドのCD8+T細胞エピトープは、ワクチン中の病原体または対象のMHCクラスI決定基と複合体を形成する、対象に以前に感染した病原体の抗原成分のCD8+T細胞エピトープである。

【0141】

T細胞応答の測定。様々な実施形態では、対象のT細胞プロファイルも、当技術分野で知られている様々な技術を使用して適切なIRCを選択するために評価される。次に、対象に投与する適切なIRCの選択をガイドするためにこのプロファイルを使用する。そのような技術には、例えば、インターフェロン γ レベルの測定、フローサイトメトリーを使用したAg特異的CD8+T細胞の単離、及び／または細胞毒性アッセイが含まれる。インターフェロン γ （T細胞活性化のマーカー）を測定するには、単離したT細胞の細胞内染色を行う。あるいは、インターフェロン γ の酵素結合免疫吸着スポット（ELISPOT）アッセイを行ってもよい。この技術は、患者のT細胞プロファイルのハイスループット評価を可能にする。この方法は、100,000～300,000個の細胞中に1個を検出できる可能性がある。簡単に説明すると、特定のサイトカインに対するモノクローナル抗体が、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）で裏打ちされたマイクロプレートにプレコートされている。CD8+T細胞を樹状細胞及び個々のペプチドと共にウェルにピペットで移し、マイクロプレートを加湿37℃CO₂インキュベーターに24～48時間入れる。インキュベーション中、固定化された抗体は細胞から分泌されたサイトカインに結合する。洗浄後、選択した検体に特異的な検出抗体をウェルに添加する。洗浄後、ストレプトアビジン結合酵素を添加し、基質を添加する。利用した基質に応じて着色沈殿物が形成され、サイトカイン分泌部位にスポットとして現れ、個々のスポットはそれぞれ単一の産生細胞を表す。

【0142】

様々な実施形態では、対象のT細胞プロファイルを評価することによって、必要とする対象に投与するのに適切なIRCを決定する方法が提供され、方法は、（1）対象からPBM Cを収集すること（ワクチン接種前のサンプル）、（2）抗IFN- γ 抗体でコーティングすることによる酵素結合免疫吸収スポット（ELISPOT）プレートを調製すること（一晚インキュベート）、（3）目的のペプチドのプールの1つ、つまり、T細胞応答を誘発すると予想されるペプチドとPBM Cをインキュベートすること（1～2日間インキュベート）、（4）プレートを洗浄し、ビオチン化二次抗体を添加すること（数時間インキュベート）、（5）プレートを洗浄し、アビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼを添加してインキュベートすること、（6）プレートを洗浄し、アミノエチルカルバゾール（AEC）で数分間添加すること、（7）（水を加えて）反応を停止させること、及

び（８）ELISPOTリーダーで可視化することを含む。開示された方法は、100,000~300,000細胞中に最大1つ検出する。抗原特異的T細胞の頻度の2倍の増加は、シグナルと見なすべきである。

【0143】

様々な実施形態では、T細胞増殖は、3H（トリチウム化）ーチミジンによって測定される。このような方法は感度が高く、ハイスループットアッセイに使用することができる。そのような技術には、例えば、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）及びKi64細胞内染色が含まれる。

【0144】

向性に基づくペプチドの選択。一部のウイルスは、特定のタイプの組織に対して向性を示すことが当技術分野で知られている。例えば、脳組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、JCウイルス、麻疹、LCMウイルス、アルボウイルス、及び狂犬病が挙げられ；眼組織に対する向性を示すウイルスには、限定されないが、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、及びサイトメガロウイルスが挙げられ；鼻組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルスが挙げられ；口腔組織、例えば、口腔粘膜、歯肉、唾液腺、咽頭に対して向性を示すウイルスには、限定されないが、単純ヘルペスウイルスⅠ型及びⅡ型、ムンプスウイルス、エプスタインバーウイルス、及びサイトメガロウイルスが挙げられ；肺組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、A型及びB型インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、アデノウイルス、及びSARSコロナウイルスが挙げられ；脊髄などの神経組織に対して向性を示すウイルスには、限定されないが、ポリオウイルス及びHTLV-1が挙げられ；心臓組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、コクサッキーBウイルスが挙げられ；肝臓組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、A型、B型、及びC型肝炎ウイルスが挙げられ；胃腸組織、例えば胃、大腸及び小腸に対して向性を示すウイルスには、限定されないが、アデノウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、及びコロナウイルスが挙げられ；膵臓組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、コクサッキーBウイルスが挙げられ；皮膚組織に対する親和性を示すウイルスには、限定されないが、水痘帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス6、天然痘ウイルス、伝染性軟属腫、乳頭腫ウイルス、パルボウイルスB19、風疹、麻疹、及びコクサッキーAウイルスが挙げられ；性器組織に対する向性を示すウイルスには、限定されないが、単純ヘルペス2型、パピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）が挙げられる。

【0145】

様々な実施形態では、必要とする対象においてがんを治療するための方法は、本明細書に記載のIRCを対象に投与することによって提供され、ペプチドは、がんの供給源（「供給源組織」）である組織に対する親和性を有する病原体のCD8+エピトープである。様々な実施形態では、適切なIRCは、最初に腫瘍細胞の供給源組織を決定し、次にペプチドを選択することによって選択される：（１）患者が既に既存のCD8+T細胞を有し、かつ（２）腫瘍の供給源組織に対して向性を有する。次いで、選択されたIRCが、それを必要とする対象に投与される。

【0146】

様々な実施形態では、肺癌を治療するための方法が提供され、方法は、対象が、肺細胞に感染する病原体、例えば、インフルエンザウイルス、例えば、インフルエンザウイルスA型またはB型に対して積極的にワクチン接種されているかどうかを決定すること、次いで、有効量の本明細書に記載のIRC組成物を投与することを含み、ペプチドのCD8+T細胞エピトープは、ワクチンに含まれる病原体の抗原決定基のものであり、そのT細胞エピトープは、対象のMHC分子クラスⅠと複合体を形成する。肺癌を治療するための本明細書に記載の方法及び使用は、いくつかの実施形態において、対象が、肺細胞に感染する病原体、例えば、インフルエンザウイルス、例えば、インフルエンザウイルスA型また

はB型に感染しているかどうかを決定し、次いで、ペプチドのCD8+T細胞エピトープがその病原体のものであり、そのT細胞エピトープが対象のMHCクラスI分子と複合体を形成する、本明細書に記載の有効量のIRC組成物を投与することを含む。

【0147】

本明細書に記載のIRC組成物を投与することによって、頭頸部癌と一般に呼ばれる癌群の一部である口腔癌を治療する方法も提供され、ペプチドのCD8+エピトープは、口腔組織に向性を有する病原体のものである、例えば、ムンプスウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、または単純ヘルペスウイルス1型。この方法は、それを必要とする対象が、例えば、ムンプスウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、または単純ヘルペスウイルス1型に対して積極的に予防接種を受けているか、または感染しているかどうかを決定することを含み、もし対象が以前にワクチン接種または感染したことがある場合、本明細書に記載のIRC組成物を対象に投与することを含み、ペプチドのCD8+エピトープはムンプスウイルスまたは麻疹ウイルスのもののか、または対象が受けたワクチンの抗原成分のものであるか、または、以前に対象に感染した病原体、すなわちムンプス、麻疹、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、または単純ヘルペスウイルス1型のものである。

【0148】

併用療法

様々な実施形態では、本明細書に記載のIRC組成物は、他の癌治療薬と同時投与される。さらに、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のIRCは、他の癌治療療法、例えば、放射線療法、化学療法、手術、及び／または免疫療法と併せて投与される。本明細書に記載される方法及び使用のいくつかの態様では、本明細書に記載されるIRC組成物は、チェックポイント阻害剤と共に投与される。様々な実施形態では、カプシド骨格は、免疫アゴニストと共に投与される。様々な実施形態では、IRCは、治療用ワクチンによる治療と併せて投与される。様々な実施形態では、IRCは、共役抗原受容体発現T細胞(CAR-T細胞)による治療と併せて投与される。様々な実施形態では、IRCは、別の免疫腫瘍学製品による治療と併せて投与される。本開示のIRC及び他の治療法または治療薬は、いくつかの実施形態では、同じまたは異なる投与経路によって同時にまたは連続して投与される。本開示の方法で使用するための治療薬の同一性及び量の決定は、当技術分野で知られている標準的な技術を使用して、当業者によって容易に行われる。

【0149】

上で引用したすべての参考文献、及び本明細書に引用されるすべての参考文献は、参照によりその全体がすべての目的のために組み込まれる。

【0150】

本明細書に記載の方法、使用、及び組成物は、上で詳細に例証及び説明されているが、そのような例証及び説明は、例示的(illustrative)または例示的(exemplary)であり、限定的ではないと見なされるべきである。以下の特許請求の範囲及び精神の範囲内で当業者によって変更及び修正がなされ得ることが理解されるであろう。特に、本開示は、上記及び下記の異なる実施形態からの特徴の任意の組み合わせを有するさらなる実施形態を包含する。

【0151】

本開示は、本開示及びその多くの利点のより良い理解を提供する以下の例示的な非限定的な実施例によってさらに説明される。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を裏付けるために含まれる。以下に続く実施例において開示された技術は、本発明の実行において良好に機能するように本開示で使用された技術を表し、したがって、その好適な実行のモードを構成すると考えられ得ることを、当業者に理解されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく、多くの変更が開示される特定の実施形態においてなされるが、それでも同様なまたは類似する結果を得ることができることを理解するべきである。

【実施例】

【0152】

実施例 1

トランケートマウスパピローマウイルス (MPV1) L1タンパク質の産生

1138塩基対のトランケートマウスパピローマウイルスL1DNA配列をE.coli発現用にコドン最適化し、合成し(配列番号135及び136、2種類のコドン最適化)(GeneScript Biotech, Piscataway, NJ)、続いてT7発現ベクターPet-24a(+)(Millipore Sigma, Burlington, MA)にクローン化する。この配列は、野生型マウス(Mus musculus)パピローマウイルスL1タンパク質配列に基づいているが、3つの特定の領域に3つの欠失変異が含まれている: アミノ末端における1つの欠失(10個のアミノ酸の除去)、カルボキシ末端における1つの欠失(34個のアミノ酸の欠失)、及びカルボキシ末端領域に近いヘリックス4(H4)領域の3番目の欠失(MPVL1配列のアミノ酸411~436の欠失)。以下、この変異MPVL1タンパク質を「MPV. 10. 34. d」と称する。(図1Bを参照)。

10

【0153】

野生型マウス(Mus musculus) L1野生型タンパク質配列を図1Aに示しており、以下のタンパク質配列を有する(配列番号: 132、NCBI参照配列: YP_003778198. 1、DNA: 9434943):

Met Ala Met Trp Thr Pro Gln Thr Gly Lys L
 eu Tyr Leu Pro Pro Thr Thr Pro Val Ala Ly
 s Val Gln Ser Thr Asp Glu Tyr Val Tyr Pro
 Thr Ser Leu Phe Cys His Ala His Thr Asp A
 rg Leu Leu Thr Val Gly His Pro Phe Phe Se
 r Val Ile Asp Asn Asp Lys Val Thr Val Pro
 Lys Val Ser Gly Asn Gln Tyr Arg Val Phe A
 rg Leu Lys Phe Pro Asp Pro Asn Lys Phe Al
 a Leu Pro Gln Lys Asp Phe Tyr Asp Pro Glu
 Lys Glu Arg Leu Val Trp Arg Leu Arg Gly L
 eu Glu Ile Gly Arg Gly Gly Pro Leu Gly Il
 e Gly Thr Thr Gly His Pro Leu Phe Asn Lys
 Leu Gly Asp Thr Glu Asn Pro Asn Lys Tyr G
 ln Gln Gly Ser Lys Asp Asn Arg Gln Asn Th
 r Ser Met Asp Pro Lys Gln Thr Gln Leu Phe
 Ile Val Gly Cys Glu Pro Pro Thr Gly Glu H
 is Trp Asp Val Ala Lys Pro Cys Gly Ala Le
 u Glu Lys Gly Asp Cys Pro Pro Ile Gln Leu
 Val Asn Ser Val Ile Glu Asp Gly Asp Met C
 ys Asp Ile Gly Phe Gly Asn Met Asn Phe Ly
 s Glu Leu Gln Gln Asp Arg Ser Gly Val Pro
 Leu Asp Ile Val Ser Thr Arg Cys Lys Trp P
 ro Asp Phe Leu Lys Met Thr Asn Glu Ala Ty
 r Gly Asp Lys Met Phe Phe Phe Gly Arg Arg
 Glu Gln Val Tyr Ala Arg His Phe Phe Thr A
 rg Asn Gly Ser Val Gly Glu Pro Ile Pro As
 n Ser Val Ser Pro Ser Asp Phe Tyr Tyr Ala
 Pro Asp Ser Thr Gln Asp Gln Lys Thr Leu A
 la Pro Ser Val Tyr Phe Gly Thr Pro Ser Gl
 y Ser Leu Val Ser Ser Asp Gly Gln Leu Phe
 Asn Arg Pro Phe Trp Leu Gln Arg Ala Gln G
 ly Asn Asn Asn Gly Val Cys Trp His Asn Gl

20

30

40

50

u Leu Phe Val Thr Val Val Asp Asn Thr
 Arg Asn Thr Asn Phe Thr Ile Ser Gln Gln T
 hr Asn Thr Pro Asn Pro Asp Thr Tyr Asp Se
 r Thr Asn Phe Lys Asn Tyr Leu Arg His Val
 Glu Gln Phe Glu Leu Ser Leu Ile Ala Gln L
 eu Cys Lys Val Pro Leu Asp Pro Gly Val Le
 u Ala His Ile Asn Thr Met Asn Pro Thr Ile
 Leu Glu Asn Trp Asn Leu Gly Phe Val Pro P
 ro Pro Gln Gln Ser Ile Ser Asp Asp Tyr Ar
 g Tyr Ile Thr Ser Ser Ala Thr Arg Cys Pro
 Asp Gln Asn Pro Pro Lys
 【0154】

同様に、MPV1L1タンパク質の野生型核酸配列（配列番号133）は以下の通りである：

ATGGCAATGTGGACACCCACAGACCGGGAAGCTTTACCTCC
 CACCTACAACCTCCAGTGGCAAAGGTGCAGAGCACAGACGA
 ATATGTGTACCTACGTCTCTCTTCTGTGCACACACG
 GACCGTTTGTCTAACAGTGGGGCCACCCCTTTTTTTCTGTCA
 TTGACAATGACAAGGTCACCTGTGCCTAAAGTGTCTGGCAA
 CCAATATAGGGTTTTTCAGACTTTAAATTCCAGATCCAAAT
 AAATTTGCATTGCCCCCAAAGGATTTCTATGATCCTGAGA
 AAGAACGGTTAGTGTGGAGGTTAAGGGGTCTGGAAATTGG
 AAGAGGTGGCCCATTAGGGATTGGGCACTACCGGGGCACCCC
 CTTTTTTAAACAAGCTTTGGAGACACGGGAAATCCAAATAAAT
 ATCAGCAAGGCTCTAAGGATAAATAGGCAGAACACTTCCAT
 GGACCCCAAACAACAACACAGCTGTTTTATTGTTGGCTGTGAA
 CCCCCCTACAGGGGAACACTGGGATGTAGCTAAGCCCTGTG
 GAGCTCTGGAGAAGGGGTGACTGCCCTCCTATCCAACTTGT
 AAATAGTGTAAATTGAGGATGGGGGATATGTGTGTGACATTGGC
 TTTGGGAATATGAACCTTCAAAGAGCTGCAGCAGGATAGGA
 GTGGTGTGCCCTCTTGATATTGTATCTACCCGGGTGCAAATG
 GCCCGACTTTTCTGAAAATGACCAATGAGGCATATGGGGAT
 AAGATGTTCTTCTTTGGAAGGAGAGAGCAAGTGATGCAA
 GACACTTTTTTCAACCAGGAATGGCTCTGTGGGGGAGCCCAT
 ACCAAACTCTGTGAGTCCCAGTGACTTTTACTACGCACCC
 GACAGCACACAGGACCAAGAAGACACTCGCACCCCTCCGTGT
 ACTTTGGAACTCCTAGTGGGTCACTTGTGTGTCGAGTGATGG
 TCAGCTGTTTAAACAGGCCATTTTGGCTTCAAAGGGCTCAG
 GGAAACAATAATGGTGTGTGCTGGGCACAATGAGCTCTTTG
 TTACTGTTGTGCGACAACAACAAGGAATACAAACTTTACTAT
 CTCCCAGCAAACCAACACACCAAAACCCAGATACATATGAC
 TCTACTAATTTTAAAACTATTTAAGACATGTGGGAACAAT
 TTGAGCTGTCCCTTATTGCTCAACTGTGTAAGGTTTCCACT
 TGACCCCGGGTGTGCTTGGCCCATATAAACACTATGAACCCA
 ACCATCTTGGAGAAGTGGAACTTGGGGTTTTGTACCTCCCC
 CACAGCAGTCCATCTCTGATGACTATAGGTATATAACATC
 ATCGGCAACTCGCTGTCCAGATCAGAAATCCGCCCAAGGAA
 AGAGAGGATCCTTACAAGGGTCTTATATTTTGGGGAAGTTG
 ATCTTACTGAGAGGTTTTCTCAGGACCTTGATCAGTTTTGC
 TCTGGGACGAAAGTTTTCTGTATCAAGCTGGGTATACGTACT

10

20

30

40

50

GCTGTTACGGGGCCGCGGGGGTCAAAAGGGGCAGCGTCTACAA
 CCTCTGCGTCTTCTAGACGAGTTGTAAAACGGAAGAGGGG
 AAGCAAATAA

【0155】

対照的に、以下の研究のために選択された変異MPV配列を図1Bに示しており、以下のアミノ酸配列を有する（配列番号：134）：

Met Leu Tyr Leu Pro Pro Thr Thr Pro Val A
 la Lys Val Gln Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ty
 r Pro Thr Ser Leu Phe Cys His Ala His Thr
 Asp Arg Leu Leu Thr Val Gly His Pro Phe P
 he Ser Val Ile Asp Asn Asp Lys Val Thr Va
 l Pro Lys Val Ser Gly Asn Gln Tyr Arg Val
 Phe Arg Leu Lys Phe Pro Asp Pro Asn Lys P
 he Ala Leu Pro Gln Lys Asp Phe
 Tyr Asp Pro Glu Lys Glu Arg Leu Val Trp A
 rg Leu Arg Gly Leu Glu Ile Gly Arg Gly Gl
 y Pro Leu Gly Ile Gly Thr Thr Gly His Pro
 Leu Phe Asn Lys Leu Gly Asp Thr Glu Asn P
 ro Asn Lys Tyr Gln Gln Gly Ser Lys Asp As
 n Arg Gln Asn Thr Ser Met Asp Pro Lys Gln
 Thr Gln Leu Phe Ile Val Gly Cys Glu Pro P
 ro Thr Gly Glu His Trp Asp Val Ala Lys Pr
 o Cys Gly Ala Leu Glu Lys Gly Asp Cys Pro
 Pro Ile Gln Leu Val Asn Ser Val Ile Glu A
 sp Gly Asp Met Cys Asp Ile Gly Phe Gly As
 n Met Asn Phe Lys Glu Leu Gln Gln Asp Arg
 Ser Gly Val Pro Leu Asp Ile Val Ser Thr A
 rg Cys Lys Trp Pro Asp Phe Leu Lys Met Th
 r Asn Glu Ala Tyr Gly Asp Lys Met Phe Phe
 Phe Gly Arg Arg Glu Gln Val Tyr Ala Arg H
 is Phe Phe Thr Arg Asn Gly Ser Val Gly Gl
 u Pro Ile Pro Asn Ser Val Ser Pro Ser Asp
 Phe Tyr Tyr Ala Pro Asp Ser Thr Gln Asp G
 ln Lys Thr Leu Ala Pro Ser Val Tyr Phe Gl
 y Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Asp
 Gly Gln Leu Phe Asn Arg Pro Phe Trp Leu G
 ln Arg Ala Gln Gly Asn Asn Asn Gly Val Cy
 s Trp His Asn Glu Leu Phe Val Thr Val Val
 Asp Asn Thr Arg Asn Thr Asn Phe Thr Ile S
 er Gln Gln Thr Asn Thr Pro Asn Pro Asp Th
 r Tyr Asp Ser Thr Asn Phe Lys Asn Tyr Leu
 Arg His Val Glu Gln Phe Glu Leu Ser Leu I
 le Ala Gln Leu Cys Lys Val Pro Leu Asp Pr
 o Gly Val Leu Ala His Ile Asn Thr Met Asn
 Pro Thr Ile Leu Glu Asn Trp Asn Leu Gly P
 he Val Pro Pro Lys Glu Arg Glu Asp Pro Ty
 r Lys Gly Leu Ile Phe Trp Glu Val Asp Leu
 Thr Glu Arg Phe Ser Gln Asp Leu Asp Gln P
 he Ala Leu Gly Arg Lys Phe Leu Tyr Gln

【0156】

10

20

30

40

50

野生型配列とトリプル切断MPV. 10.34.d配列のアラインメントを図2に示す。さらに、MPV. 10.34.dの核酸配列（下記）を発現用に最適化した。配列は、宿主内での発現効率を最大化するために、標的宿主内でのコドン使用及び発現レベルについて最適化されている。以下に、本明細書で使用されるMPV. 10.34.dの2つの別の最適化された核酸配列を提供する（配列番号135）：

```

A T G C T G T A C C T G C C G C C G A C C A C C C C G G T G G C G A A A G T T C
A G A G C A C C G A C G A A T A C G T T T A T C C G A C C A G C C T G T T C T G
C C A C G C G C A C A C C G A T C G T C T G C T G A C C G T G G G T C A C C C G
T T C T T T A G C G T T A T C G A C A A C G A T A A G G T G A C C G T T C C G A
A A G T G A G C G G C A A C C A G T A C C G T G T T T T T C G T C T G A A G T T
C C C G G A C C C G A A C A A A T T T G C G C T G C C G C A A A A G G A C T T C
T A T G A T C C G G A G A A G G A A C G T C T G G T G T G G C G T C T G C G T G
G T C T G G A A A T T G G T C G T G G T G G C C C G C T G G G T A T T G G T A C
C A C C G G T C A C C C G C T G T T C A A C A A A C T G G G C G A T A C C G A G
A A C C C G A A C A A A T A T C A G C A A G G T A G C A A G G A C A A C C G T C
A G A A C A C C A G C A T G G A C C C G A A G C A G A C C C A A C T G T T T A T
T G T T G G T T G C G A G C C G C C G A C C G G T G A A C A C T G G G A T G T T
G C G A A A C C G T G C G G T G C G C T G G A A A A G G G C G A T T G C C C G C
C G A T C C A A C T G G T G A A C A G C G T T A T T G A G G A C G G T G A T A T
G T G C G A C A T C G G T T T T G G C A A C A T G A A C T T C A A A G A A C T G
C A G C A A G A C C G T A G C G G C G T G C C G C T G G A T A T T G T T A G C A
C C C G T T G C A A A T G G C C G G A C T T C C T G A A G A T G A C C A A C G A
A G C G T A C G G T G A T A A G A T G T T C T T T T C G G C C G T C G T G A G
C A G G T T T A T G C G C G T C A C T T T T T C A C C C G T A A C G G T A G C G
T G G G C G A G C C G A T C C C G A A C A G C G T T A G C C C G A G C G A C T T
C T A C T A T G C G C C G G A C A G C A C C C A G G A T C A A A A A A C C C T G
G C G C C G A G C G T G T A C T T T G G T A C C C C G A G C G G C A G C C T G G
T T A G C A G C G A T G G T C A A C T G T T T A A C C G T C C G T T C T G G C T
G C A G C G T G C G C A G G G T A A C A A C A A C G G C G T G T G C T G G C A C
A A C G A A C T G T T T G T T A C C G T G G T T G A C A A C A C C C G T A A C A
C C A A C T T C A C C A T C A G C C A G C A A A C C A A C A C C C C G A A C C C
G G A C A C C T A C G A T A G C A C C A A C T T T A A A A A C T A T C T G C G T
C A C G T G G A G C A G T T C G A A C T G A G C C T G A T T G C G C A A C T G T
G C A A A G T G C C G C T G G A C C C G G G T G T G C T G G C G C A C A T C A A
C A C C A T G A A C C C G A C C A T T C T G G A G A A C T G G A A C C T G G G T
T T C G T T C C G C C G A A A G A G C G T G A A G A C C C G T A C A A G G G C C
T G A T C T T C T G G G A A G T G G A T C T G A C C G A A C G T T T C A G C C A
G G A C C T G G A T C A A T T T G C G C T G G G C C G T A A A T T C C T G T A T
C A G T A A

```

（配列番号136）：

```

G A A T T G G C G G A A G G C C G T C A A G G C C A C G T G T C T T G T C C G C
G G T A C C C A T A T G C T G T A T C T G C C T C C A A C T A C A C C G G T T G
C A A A A G T T C A G A G C A C C G A T G A A T A T G T T T A T C C G A C C A G
C C T G T T T T G T C A T G C A C A T A C C G A T C G T C T G C T G A C C G T T
G G T C A T C C G T T T T T T A G C G T T A T T G A T A A C G A T A A A G T G A
C C G T T C C G A A A G T T A G C G G T A A T C A G T A T C G T G T T T T T C G
C C T G A A A T T T C C G G A T C C G A A C A A A T T T G C A C T G C C G C A G
A A A G A T T T T T A C G A C C C G G A A A A A G A A C G T C T G G T T T G G C
G T C T G C G T G G T C T G G A A A T T G G T C G T G G T G G T C C G T T A G G
T A T T G G C A C C A C C G G T C A T C C G C T G T T T A A C A A A C T G G G T

```

G A T A C C G A A A A T C C G A A T A A A T A C C A G C A G G G C A G C A A A G
A T A A T C G T C A G A A T A C C A G T A T G G A T C C G A A A C A G A C C C A
G C T G T T T A T T G T T G G T T G T G A A C C G C C T A C C G G T G A A C A T
T G G G A T G T T G C A A A A C C G T G T G G T G C A C T G G A A A A A G G T G
A T T G T C C G C C T A T T C A G C T G G T T A A T A G C G T G A T T G A A G A
T G G T G A T A T G T G C G A T A T T G G C T T T G G C A A C A T G A A C T T T
A A A G A A C T G C A G C A G G A T C G T A G C G G T G T T C C G C T G G A T A
T T G T T A G C A C C C G T T G T A A A T G G C C T G A T T T T T C T G A A A A T
G A C C A A T G A A G C C T A T G G C G A C A A A A T G T T T T T T T T C G G T
C G T C G T G A A C A G G T T T A T G C C C G T C A C T T T T T T A C C C G T A
A T G G T A G C G T T G G T G A A C C G A T T C C G A A T A G C G T T A G C C C
G A G C G A T T T C T A T T A T G C A C C G G A T A G C A C C C A G G A T C A G
A A A A C C C T G G C A C C G A G C G T T T A T T T T G G C A C C C C G A G C G
G T A G C C T G G T T A G C A G T G A T G G T C A G C T G T T C A A T C G T C C
G T T T T G G C T G C A G C G T G C A C A G G G T A A T A A C A A T G G T G T T
T G T T G G C A T A A C G A A C T G T T T G T T A C C G T T G T T G A T A A T A
C C C G C A A T A C C A A C T T T A C C A T T A G C C A G C A G A C C A A T A C
A C C G A A T C C G G A T A C C T A T G A T A G C A C C A A C T T C A A A A A C
T A T C T G C G T C A T G T G G A A C A G T T T G A A C T G A G C C T G A T T G
C C C A G C T G T G T A A A G T G C C G C T G G A T C C G G G T G T T C T G G C
A C A T A T T A A C A C C A T G A A T C C G A C C A T T C T G G A A A A T T G G
A A T C T G G G T T T T G T T C C G C C T A A A G A A C G T G A A G A T C C G T
A T A A A G G T C T G A T T T T T T G G G A A G T T G A T C T G A C C G A A C G
T T T T A G C C A G G A T C T G G A T C A G T T T G C A C T G G G T C G C A A A
T T T C T G T A T C A G T A A C T C G A G G A G C T C G G A G C A C A A G A C T
G G C C T C A T G G G C C T T C C G C T C A C T G C C

【0157】

変異MPV. 10. 34. dの組換え発現と精製のための一般的なプロトコルを図3に模式的に示す。

【0158】

MPV. 10. 34. d核酸配列は、以下のプライマー配列（配列番号137）を使用して、部位変異誘発（Genscript Biotech、Piscataway、NJ）によって野生型マウスパピローマウイルス配列から生成された：

A A G C T T G T C G A C G G A G C T C G A A T T C G G A T C C T T A T T A C T G
A T A C A G G A A T T T A C G G C C C A G C

【0159】

次にMPV. 10. 34. d核酸配列を、標準プロトコルに従って制限エンドヌクレアーゼNdeI及びBamHIを用いて発現ベクターpet24a(+)（Millipore Sigma, Burlington, MA）のマルチクローニング部位にクローン化した。マルチクローニングサイトとコンストラクト配列への正しいクローニングは、MluI及びBamHIを使用した制限エンドヌクレアーゼ酵素消化、並びにT7フォワードプライマー及びリバースプライマーの両方を使用したサンガーシーケンシングの両方によって確認した。

【0160】

発現は、MPV. 10. 34. dを含むpet24a(+)プラスミドをT7発現コンピテントEscherichiacoli2566細胞（New England Biolabs, Ipswich, MA, US）に形質転換し、固体培地でコロニーを選択することによって達成した。ルレアプロス（LB）培地で標準プロトコルに従って単一コロニーを増殖させた。簡単に説明すると、50µg/mLカナマイシン（Quality Biological, Gaithersburg, MD, US）を含む5mL滅菌LB

に、固体培地から選択した単一コロニーを播種し、37℃で振とうしながら一晩増殖させた。次に、種培養物を1:25に希釈し、OD₆₀₀が約0.6~0.8に達するまで37℃で増殖を続けた。次いで、約1mMの最終濃度のイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG、Invitrogen、Carlsbad、CA、US) を培養物に添加して、プラスミドからの発現を誘導した。これらの条件下で誘導をさらに4時間続け、その後細胞ペレットを4℃で4000×gで15分間遠心分離することにより収集した。上清を捨て、すぐに使用しない限り、細胞ペレットを-20℃で保存した。

【0161】

MPV.10.34.dが、封入体 (IB) として発現した。IBMPV.10.34.dを回収するために、まずペレットを解凍し (凍結している場合)、1Lのペレット溶解緩衝液 (50mM Tris、pH8.0、500mM NaCl、1mMEDTA、1mMプロテアーゼ阻害剤フェニルメチルスルホニルフッ化物 (PMSF) あたり20mLに再懸濁した。次いで、再懸濁した材料を、高圧ホモジナイザー (Avestin Emulsiflex C3 (商標)、ATA Scientific、Taren Point、Australia) を使用してホモジナイズし、細胞をホモジナイザーに通し、約15,000~20,000PSIで4回溶解した。次に、溶解した細菌細胞を、4℃で25,000×gで20分間遠心分離した。次に上清を捨て、封入体ペレットを-20℃で保存した。

【0162】

次に、ペレット (1Lペレット当たり50mL) を、6M尿素緩衝液 (8M尿素、50mM Tris、pH8.0、500mM NaCl、1mMEDTA、1mMPMSF、及び1mMDTT) 中で再懸濁することにより可溶化した。再懸濁した内容物を、約15,000~20,000PSIでホモジナイザー (Avestin Emulsiflex C3 (商標)、ATA Scientific、Taren Point、Australia) にもう一度3~4回通過させた。再可溶化したサンプルを25,000×g、4℃で20分間遠心分離した。上清は、サンプルの容量を保持するのに十分な大きさの容器に収集した。ペレットを廃棄した。上清を4℃または-20℃で保存した。

【0163】

可溶化に続いて、MPV.10.34.dを段階的勾配法で変性剤 (6M尿素) を除去することによりリフォールディングした。可溶化したサンプルを透析チューブ (蛇皮透析チューブ、分子量カットオフ10,000Da、35mm) (ThermoFisher Scientific、Waltham、MA、US) に装入した。一般に、約100~約150mLの再可溶化サンプル溶液が、単一の透析チューブに分注される。サンプルを最初に4M尿素緩衝液 (50mM Tris、pH8.0、500mM NaCl、1mMEDTA、1mMPMSF、1mMDTT、及び0.05% Tween (登録商標) -80) に対して、約4℃の冷蔵室の攪拌プレート上で3±1時間透析した (サンプルと緩衝液の比率は1:12.5)。次に、サンプルを新鮮な1M尿素緩衝液 (50mM Tris、pH8.0、500mM NaCl、1mMEDTA、1mMPMSF、1mMDTT、及び0.05% Tween-80) に対して、冷蔵室の攪拌プレート上で3±1時間再度透析した。その後、サンプルを0M尿素緩衝液 (50mM Tris、pH8.0、500mM NaCl、1mMEDTA、1mMPMSF、1mMDTT、0.05% Tween-80) に対して、約4℃の冷蔵室の攪拌プレート上で一晩 (約16~18時間) 透析した。透析/リフォールディングされたサンプル溶液は、50mLコニカルチューブに等分し、-20℃の冷凍庫に保存した。

【0164】

その後の医療用に95%を超える純度のMPV.10.34.dを取得するために、サンプルを2段階のクロマトグラフィー精製にかけ、これは、カチオン交換クロマトグラフィー (CEX) を使用した捕捉の後に、疎水相互作用カラムを使用した研磨工程が伴う。捕捉工程について、リフォールディングされたMPV.10.34.dサンプルを-20℃から取り出し、氷上で解凍した。次に、サンプルを捕捉緩衝液A (25mM NaPO₄、2

10

20

30

40

50

5 mM NaCl、pH 6.0) で透析した。透析後、サンプルを 4000 x g で 4 °C で約 10 分間遠心分離し、0.22 μm ポリエーテルスルホン (PES) 膜でろ過した。次に、リフォールディングされた MPV. 10.34.d タンパク質を CEX (Fractogel (登録商標) EMD S03-M, EMD Millipore, Burlington, MA, US) で捕捉し、次に、30% 25 mM NaPO₄、1.5 M NaCl、pH 6.0 で段階的に溶出した。これにより、少なくとも 80% の純度の精製リフォールディング MPV. 10.34.d が得られた。

【0165】

夾雑物をさらに除去し、MPV. 10.34.d の純度を 95% 超に高めるために、CEX 溶出液を高塩緩衝液で希釈して、25 mM NaPO₄、3 M NaCl、pH 6.0 の負荷条件を達成し、HIC 樹脂 (butyl-S-Sepharose (登録商標) Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences / Fisher Scientific, Waltham, MA, US) に適用した。結合したリフォールディングされた MPV. 10.34.d 生成物を、30% 25 mM NaPO₄、25 mM NaCl、pH 6.0 で溶出前洗浄し、次に、70% 25 mM NaPO₄、25 mM NaCl、pH 6.0 の単一ステップ勾配で溶出した。純度が 95% を超える MPV. 10.34.d を、溶出緩衝液中で -20 °C の冷凍庫に保存した。

【0166】

純度が 95% を超える MPV. 10.34.d は、SDS-PAGE、続いて Coomassie クーマシーブルーゲル及び銀染色によって確認した。Coomassie 染色では、ゲルを水中でインキュベートして SDS-PAGE 実行緩衝液を除去し、Simply Blue Safe Stain (Novex, Carlsbad, CA) で 5 分間インキュベートした。ゲルは水中で脱染した。(図 4A のゲルの写真を参照)。製造元の指示に従って、Pierce Silver 染色キット (ThermoFisher Scientific, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL) を使用して銀染色を実施した。(図 4B を参照)。純度を推定するために、Bio-Rad Image Lab 6.01 ソフトウェアを使用してゲルの画像を撮影した。次に、ゲル画像をソフトウェアにアップロードし、目的のバンドを含む垂直方向のレーン全体 (「レーンプロファイル」) を画像解析ソフトウェアを使用して分析した。目的のタンパク質のバンドの特定の総密度は、バンドの周りにボックスまたはフリーハンドの形状を描くことによって計算した。続いて、レーン全体の総密度を同様に測定した。測定値を得た後、それぞれの場合のゲル上の適切に一致した領域のバックグラウンド密度を差し引いた。このタンパク質バンドのバックグラウンド補正された密度をレーン全体のバックグラウンド補正された密度で割り、次に 100 を掛けて、純度パーセントを得た。

【0167】

この分析並びに図 4A 及び 4B の両方に見られるように、上記の主なプロセス工程により、約 50 kDa の MPV. 10.34.d タンパク質が段階的に精製された。50 kDa バンドの上下の非特異的タンパク質は、各精製工程で大幅に減少し、レーン 1 は、細胞採取、洗浄、及びホモジナイゼーション後のサンプル、レーン 2 は IB 可溶化後のサンプル、レーン 3 はリフォールディング後のサンプル、レーン 4 は CEX によるキャプチャクロマトグラフィー後のサンプル、レーン 5 は HIC を使用した研磨ステップ後のサンプルである。

【0168】

実施例 2

MPV. 10.34.d の構造及びサイズの決定

DLS (動的光散乱) 及び TEM は、MPV. 10.34.d がリフォールディングすると、直径約 20 nm ~ 30 nm のカプシド骨格を予想外に形成することを明らかにした。(図 5 を参照)。リフォールディングした MPV. 10.34.d サンプルを分析するために、精製したサンプルをまず DLS で分析して、MPV. 10.34.d のリフォールディングが発生したかどうかを判断した。

【0169】

60 μ Lのサンプルを40 μ Lの耐溶剤性マイクロキュベット (ZENOO40, Malvern Panalytical, Waltham, MA) に入れ、続いて細胞を Zetasizer Nano ZS 動的光散乱装置 (Malvern Panalytical, Waltham, MA) に入れた。これは、タンパク質サイズ、タンパク質の電気泳動移動度、コロイド及びナノ粒子のゼータ電位、及び任意でタンパク質移動度の測定、ならびにタンパク質及びポリマー溶液のマイクロレオロジーの測定のための研究グレードの動的光散乱システムである。高性能な Zetasizer Nano ZS により、高分子の分子量と二次ビリアル係数 A_2 、及び DLS 相互作用パラメーターである k_D の測定も可能であった。このシステムは、フロー構成で使用して、SEC または FFF のサイズ検出器としても使用することができる。マシンに入れたら、サンプルをコンパニオンソフトウェア (Zetasizer Nano Software, Malvern Panalytical) で処理した。プログラムは、合計 5 回の実施でサンプルを読み取り、2 つのプロットを生成するように設定した。

10

【0170】

生成された 2 つのプロットで、カプシド骨格のサイズ及び構造、強度 (図 6 A)、並びに体積 (図 6 B) を決定した。強度分布は、異なるサイズのビン内の粒子によって散乱された光の量を提供する。体積分布は、様々なサイズのビン内の粒子の総体積を示している。言い換えれば、強度プロット (図 6 A) は、サンプル内の宿主細胞汚染物質を含む MPV. 10. 34. d 粒子の全体的な集団サイズの評価を提供、体積プロット (図 6 B) は、他の汚染物質、すなわち宿主細菌細胞タンパク質に対するリフォールディングタンパク質の相対比率を決定する。

20

【0171】

図 6 A 及び 6 B のグラフの個々のプロット線は、個々のサンプル (A 及び B のそれぞれについて 5 つのサンプル) を表すことに留意されたい。体積曲線が約 10 ~ 15 nm (X 軸) である場合、シェルは 5 つの MPV. 10. 34. d ユニットから構成されるカプソマーであると判断される。60 個の MPV. 10. 34. d で構成される $T = 1$ 正 20 面体カプシド骨格の場合、体積カーブプロットは約 20 ~ 30 nm である。360 個の MPV. 10. 34. d で構成される $T = 7$ 正 20 面体カプシド骨格の場合、体積カーブプロットは約 50 ~ 60 nm である。強度グラフ (図 6 A) から容易にわかるように、2 つのピークがあり、1 つは約 20 ~ 30 nm の低いもの、もう 1 つは約 > 100 nm にあるが、体積グラフ (図 6 B) は約 20 nm ~ 30 nm の単一サイズを示しています。強度図の 2 つのピークは、MPV. 10. 34. d のカプシド骨格へのリフォールディング後に生じたカプシド骨格の異なる集団の存在に起因すると仮定され、それはこの段階のサンプルは精製を受けていないためである。ただし、強度プロットに示されている 2 つのピークのうちのより大きい方のピークは、サンプルのごく一部にすぎず、サンプルの大部分は小さい方のピーク内にある。したがって、DLS の結果は、MPV. 10. 34. d の大部分がサイズが約 20 nm ~ 30 nm の構造であることを示している。

30

【0172】

DLS では、溶液中のサブミクロン粒子の運動 (拡散) に関する情報は、強度自己相関と呼ばれる統計的手法を使用して、散乱強度の変動率から抽出される。平均粒子サイズ及び分布は、Stokes Einstein 式を使用して拡散係数の分布から計算される。散乱強度の大きさは粒子サイズの 6 乗で大まかに変化するため、DLS はカプシド骨格の混合物中の少量の凝集体の存在に非常に敏感であり、これは図 6 A に示す強度プロットに反映されていると考えられる。

40

【0173】

リフォールディングされたタンパク質の構造及びサイズのさらなる視覚的確認を得るために、TEM 分析も使用した。サンプル (10 μ L) をグロー放電 (EMSGlobe) カーボンコーティングされた 400 メッシュ銅グリッド (EMS) に 2 分間の浮遊によって吸着させた。グリッドをすばやく吸い取り、TBS 3 滴 (各 1 分) ですすいだ。グ

50

リッドは、チロース（1% UAT、二重フィルター、0.22 μmフィルター）を含む1% 酢酸ウラニルの2連続滴でネガティブ染色し、プロットし、サンプルを覆う汚れの薄層を得るためにすばやく吸引した。グリッドは、AMTXR80CCD（8メガピクセル）を備えた80 kVで動作するPhillips CM-120 TEMで画像化した。

【0174】

TEMの結果は、MPV. 10.34. dが、五角形／カプソマーの「タワー」を備えた、著しく溝のある外観を持つカプシド骨格を形成したことを明らかにした。（図5を参照）。測定により、これらのカプシド骨格のサイズは約30 nmであることが示された（TEM顕微鏡写真の500 nmスケールと比較、図5）。

【0175】

L1のヘリックス4H4領域の残基の欠失は、T=1ジオメトリカプシド骨格の形成につながらないことが報告されているため、これらの結果は予想外であった。さらに、同じ欠失により、HPV11及びHPV16 L1タンパク質でT=7のカプソマーが生じることが示されている。（Chen et al., Mol. Cell, 5:557-567, 2000, WO2000054730, Bishop et al., Virol. J., 4:3, 2007, and Schadlich et al., J. Virol., 83(15):7690-7705, 2009を参照）。要約すると、これらの調査結果は、MPV. 10.34. dコンストラクトが、60個のモノマーまたは12個のカプソマーで構成されるT=1格子形状の正20面体カプシド骨格を形成するという結論を支持する。

【0176】

実施例3

MPV. 10.34. dカプシド骨格アセンブリには還元剤が必要

HPV粒子は、直径が50~60 nmのT=7ジオメトリ粒子を形成する。真核または原核宿主細胞系におけるかかるカプシド骨格の製造及び生産は、高度に精製されたカプシド骨格を得るために一連の精製工程の前に適切な宿主細胞系における発現を必要とする。これらのカプシド骨格は、分解及びリアセンブリ（DARA）工程に供される。簡単に言えば、これは、カプシド骨格をカプソマー／ペンタマー（5つのL1モノマーから作られる）に分解するためのDTTまたは同様の還元剤の添加すること、その後、より対称的で安定していと記録されているT=7カプシド骨格に戻すための還元剤を除去することを含む。

【0177】

MPV. 10.34. dをT=1カプシド骨格にリフォールディングする方法をさらに詳しく説明するために、実施例1のリフォールディング手順を繰り返した。簡単に説明すると、IBの可溶化後、MPV. 10.34. dを、変性剤（6M尿素）をステップ勾配方法で除去することによりリフォールディングに供した。可溶化したサンプルを透析チューブ（蛇皮透析チューブ、分子量カットオフ10,000 Da、35mm）（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US）に挿入した。一般に、約100 mL~約150 mLの再可溶化サンプル溶液が、4つの透析チューブに分注される。次いで、約4℃の冷蔵室の攪拌プレート上で、一般的な緩衝液レシピ50 mM Tris、pH 8.0、500 mM NaCl及び0.05% Tween-80を用いて、4M尿素緩衝液に対してサンプルを3±1時間透析した。次いで、再びサンプルを新鮮な1M尿素緩衝液に対して3±1時間、冷蔵室の攪拌プレート上で透析した。続いて、サンプルを0M尿素緩衝液に対して一晚（約16~18時間）、約4℃の冷蔵室の攪拌プレート上で透析した。

【0178】

この実験における4つの緩衝液条件の主な違いは、（i）1mMEDTA、1mMPMSF、及び1mMDTT（ii）1mMEDTA、（iii）1mMDTTの存在、及び（iv）ETDA、PMSF、またはDTTの無添加である。4つの条件すべてで透析／リフォールディングされたサンプル溶液を、50 mLコニカルチューブに等分し、実施例

10

20

30

40

50

2に記載のようにDLSによって分析した後、 -20°C の冷凍庫に保存した。体積プロットを使用して図7に示すように（及び実施例2で説明したように）、矢印で示した凝集体が、サンプル（i i）及びサンプル（i v）で観察された。（それぞれ図7 C及び図7 Dを参照）。サンプル（i）またはサンプル（i i i）のDLS体積プロットでは、凝集体はほとんど、またはまったく観察されなかった。（それぞれ図7 A及び図7 Bを参照）。

【0179】

MPV. 10. 34. dが $T=1$ カプシド骨格に正常にリフォールディングされたかどうかをさらに確認するために、すべてのサンプルをキャプチャー緩衝液A（ 25mM NaPO_4 、 25mM NaCl 、 $\text{pH}6.0$ ）で 4°C で一晩透析した。透析後、サンプルを 4°C で $4000\times g$ で10分間遠心分離し、 $0.22\mu\text{m PES}$ 膜でろ過した。次いで、 $T=1$ カプシド骨格プラットフォームをCEX（EMD Fractogel S03（M），EMD Millipore，Darmstadt，Germany）によって捕捉し、次いで 30% 25mM NaPO_4 、 1.5M NaCl 、 $\text{pH}6.0$ で段階的に溶出した。結果を図8に示す。図8は、DTT/ETDA/PMSF（図8 A）またはDTT単独（図8 B）でリフォールディングされたサンプルで、正しくリフォールディングされた $T=1$ カプシド骨格の成功した捕捉と溶出を示している。対照的に、図8の矢印で示すように、ETDAのみを含む（図8 C）または添加物を含まない（図8 D）リフォールディング条件下では、正しくリフォールディングされた $T=1$ カプシド骨格の捕捉及び溶出はほとんど、またはまったくなかった。

【0180】

まとめると、データは、 $T=1$ カプシド骨格を生成するプロセスが還元条件に有利であることを示している。これは、カプシド骨格アセンブリを成功させるために還元剤を最終的に除去する必要があるHPVT= 7 カプシド骨格を生産する既知のプロセスとは対照的である。

【0181】

実施例4

可溶性MPV. 10. 34. dの生産

1mM IPTG の存在下、 37°C で4時間MPV. 10. 34. dを細菌で発現させると、高度に精製された $20\text{nm}\sim 30\text{nm}$ $T=1$ カプシド骨格構造を得るために、実施例1に記載される一連のプロセス工程によって処理しなければならないIBを発現及び形成させる。可溶性MPV. 10. 34 dがE. coli細胞内で発現できるかどうか、及びIBとは対照的に $T=1$ カプシド骨格に組み立てられるかどうかを調査するために、誘導温度及びIPTG濃度を下げて発現を遅くする戦略を採用し、それによってIBの形成を防いだ。

【0182】

実施例1から、誘導温度を、 $100\mu\text{M}$ 及び 1mM のIPTG濃度で 37°C から 16°C に低下させた。簡単に説明すると、MPV. 10. 34 d DNAで形質転換された採りたてのE. coli C2566コロニーに、 $50\mu\text{g/mL}$ のカナマイシン（以降、LB+KAN）スターター培養液を含むLBを接種し、 37°C 及び 250rpm で一晩増殖させた。翌日、スターター培養物を使用して新鮮な 250mL LB+KAN培養物に $1:25$ 希釈で接種し、培養物のOD₆₀₀が約 $0.5\sim 0.7$ に達するように、 37°C 、 250rpm で約 $1.5\sim 2$ 時間増殖させた。この時点で、培養物を 1mM 及びその他の試験したIPTG濃度で誘導し、誘導温度 16°C で一晩振とうさせた。翌日、誘導後のサンプル（各 1mL ）を $1500\times g$ で10分間ペレット化した。上清を除去し、残りのバルクサンプルを 4°C で10分間、 $4000\times g$ でペレット化した。サンプルは分析の時まで -20°C で保存した。

【0183】

可溶性物質を測定するために、ホモジナイザーを使用して細胞を溶解した（ $15,000\sim 20,000\text{psi}$ 、3サイクル）。非誘導、誘導、溶解後可溶性、及び溶解後不溶性物質のサンプルを、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した。結果は、誘

10

20

30

40

50

導温度を16℃に下げると、検出できないレベルのタンパク質が得られることを示した（データは示していない）。

【0184】

MPV.10.34.dの発現は16℃では検出できないほど低かったため、より高い温度（25℃）で誘導を試みた。℃誘導温度25℃で、MPV.10.34.dの発現に成功した。MPV.10.34.dの大部分はIBの形で発現していた（データは示していない）。30℃での3回目の試みは、上記の誘導条件下で試みた。可溶性発現がこの温度で大幅に改善されることが発見された。MPV.10.34.dの約50%が可溶型で正常に翻訳されることを可能にする25℃と30℃の間で重要な遷移があるように思われる。対照的に、IPTGの濃度は、翻訳されるMPV.10.34.dの量への影響はわず

10

【0185】

これらの可溶性MPV.10.34.dを精製するために、単一ステップの溶出クロマトグラフィー精製を開発し、その後採用した。簡単に言えば、MPV.10.34.dを含む可溶性溶解物を、50mMNaPO₄、50mMNaCl、pH7.0で調製した。1mLプレパックFractogelSO₃(M)カラムを50mMNaPO₄、50mMNaCl、pH7.0に平衡化し、500μLのMPV.10.34.dライセートをカラムに注入した。5、10、15、20、25、及び100%Bステップ（B=50mMNaPO₄、1.5MNaCl、pH7.0；これは、0.075M、0.15M、0.225M、0.3M、0.375M、及び1.5Mの理論的なNaCl濃度に変換される）を含む、MPV.10.34.dの溶出のための伝導率ウィンドウを同定するためにステップ勾配溶出を実施した。MPV.10.34.dの溶出に基づいて、単一ステップ法を開発し、最大5mLの注入量で5mLプレパックFractogelSO₃(M)カラムにスケールアップした。この単一ステップ法では15%Bを使用し、Bは50mMNaPO₄、500mMNaCl、pH7.0であった。（NaClの濃度が低いと導電率をより一貫して制御することができ、1.5MNaClのわずかなパーセンテージ変化に依存すると、おそらくプレカラム混合量が原因で1mLカラムを使用すると導電率が不規則になるためである）。

20

【0186】

これらの取り組みに基づいて、ミリグラムスケールの量のCEX捕捉MPV.10.34.dを生成するための単一ステップ勾配溶出法が開発された。続いて、溶出物質を収集し、実施例2に記載のように分析した。結果は、溶出されたMPV.10.34.dからのDLS（図9A及び9B）及びTEMデータ（図9C）が、直径20~30nmのT=1カプシド骨格をもたらすことを明らかにした。

30

【0187】

実施例5

可溶性及びIBMPV.10.34.DフォームT=1カプシド骨格

MPV.A4抗体は、T=1またはT=7カプシド骨格構造の形でMPVL1に特異的に結合するコンフォメーション抗体である。この抗体は、変性または単量体のMPVL1には結合しない。（Hafenstein et al., 2020, "Atomic Resolution CRYOEM structure of Mouse Papillomavirus," International Papillomavirus Conference, July 20-24, 2020）。実施例1または実施例4の工程を受けるMPV.10.34.dがT=1カプシド骨格を生じるかどうかを決定するために、MPV.A4モノクローナル抗体を用いてこれらのサンプルに対してELISAを実施した。

40

【0188】

実施例1及び実施例4からの等濃度（開始濃度1000ng/ウェル）のサンプルをELISAに供した。可溶性及びリフォールディングされたMPV.10.34.dの両方がELISAプレート（Nunc Maxisorp, ThermoFisher Sc

50

ientific, Waltham, MA, US) に等しく結合していることを確認するために、最初に両方のサンプルを 50mM NaPO₄、450mM NaCl の pH 6 または pH 7 のいずれかに緩衝液交換した。これにより、両方のサンプルで 2 つの異なる pH 条件となった。これに基づいて、合計 4 つのサンプル条件を 2 倍段階希釈し、MPV. A 4 モノクローナル抗体で ELISA に供した。

【0189】

簡単に説明すると、両方の pH 条件下 (pH 6 または pH 7 の 50mM NaPO₄、450mM NaCl のいずれか) で、各サンプルについて 8 つの異なる量のタンパク質 (7.8 ng ~ 1 μg) を最初に ELISA プレートに加え、プレートを 4℃ で保存した。2 日後、各プレートを、ブロッキング緩衝液 (4% ドライミルク、0.2% Tween-20) を使用して 1:1000 に希釈した MPV. A 4 mAb でオービタルシェーカー (300 rpm) 上で室温で 1 時間インキュベートすることにより ELISA を実施し、プレートは 4℃ で 1 時間インキュベートされた。次に、室温で洗浄緩衝液 (0.35M NaCl、1.5mM KH₂PO₄、6.5mM Na₂HPO₄、0.05% Tween-20) を使用して、合計 3 回の洗浄 (洗浄あたりサンプルあたり 200 μL) の洗浄ステップを採用した。洗浄工程に続いて、ヤギ抗マウス IgG-HRP 抗体 (Millipore Sigma, St. Louis, MO, US) をブロッキング緩衝液 (4% ドライミルク、0.2% Tween-20) で 1:7000 に希釈して添加し、最終濃度を 82.9 ng/mL とし、プレートをオービタルシェーカー (300 rpm) で室温で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ基質 (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、SeraCare Life Sciences, Inc., Milford, MA, US) で 30 分間インキュベートした後、停止液 (0.36N H₂SO₄) (JT Baker / Avantor, Allentown, PA, US) を添加して 20 分間インキュベーションした。サンプルプレートの吸光度は、プレートリーダー (BioTek, Winooski, VT, US) を使用して 450 nm 及び 620 nm で読み取った。

【0190】

結果 (図 10) は、pH 7 の緩衝液を使用して捕捉された (黒丸) 未透析の可溶性 MPV 10.34. d カプシド骨格と、MPV. A 4 モノクローナル抗体によって認識された、pH 7 (黒四角) 及び pH 6 (黒三角) の緩衝液に対して透析された可溶型を示した。

【0191】

要約すると、IB からリフォールディングされた MPV. 10.34. d カプシド骨格 (実施例 1)、及び可溶性 MPV. 10.34. d カプシド骨格 (実施例 4) の両方が、MPV. A 4 立体構造モノクローナル抗体によって認識された。

【0192】

実施例 6

IRC 形成: MPV. 10.34. d カプシド骨格結合

対象の癌細胞を攻撃する既存の免疫系を動員するのに効果的であるような MPV. 10.34. d カプシド骨格を機能化するために、MPV. 10.34. d カプシド骨格を、オボアルブミンペプチド S I I N F E K L (OVA、配列番号 ID 番号: 95)、HPV 16 E 7 タンパク質 (配列番号: 96)、及び CMV ペプチド pp 65 (配列番号: 129) を含む様々なペプチドエピトープに結合させ IRC を形成した。

【0193】

ペプチドの設計: ペプチドは、プロテアーゼ認識部位が上流に先行する約 8 ~ 10 アミノ酸の一般的な長さを有するエピトープである。(図 11 を参照)。以下の実験は、例示的なプロテアーゼ認識部位、エピトープペプチドの上流に位置するように設計されたフリンプロテアーゼ切断配列 R X R / K R (配列番号 89) を組み込む。さらに、エピトープペプチドは、マレイミドを含むように N 末端で化学修飾されている。スルフヒドリル反応性試薬であるマレイミドをペプチド抗原の N 末端に組み込むことにより、MPV. 10.34. d カプシド骨格上の還元スルフヒドリル基、すなわちシステインにプロテアーゼ /

10

20

30

40

50

ペプチドを結合させることができる。この反応の最終生成物は、結合MPV. 10. 34. dカプシド骨格である。

【0194】

精製されたMPV. 10. 34. dカプシド骨格を約95%超の純度で共役するために、MPV. 10. 34. dを共役反応緩衝液（50mMNaPO₄、pH6. 5、500mMNaCl、2mMEDTA、及び0. 05%Tween（登録商標）80）中でさらに透析し、緩衝液を3回（3±1時間、3±1時間、一晚16±3時間、2℃～8℃で）交換した。翌日、MPV. 10. 34. dを少なくとも0. 6μg/μLの最終濃度に調整した。次に、MPV. 10. 34. dをマイルドな還元剤であるトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）で、TCEP：MPV. 10. 34. dを10：1の比率で室温（21℃）で振盪せずに1時間処理した。続いて、ペプチドを、MPV. 10. 34. dの量×10のモル比で反応物に添加した。反応物を室温（21℃）、200rpmで1時間振とうした。共役が続いて、余分な遊離ペプチドを除去するために、反応物からの内容物を、1000rcfで各ラウンド10分間、10ラウンドのアミコンスピンドル（分子カットオフ100kDa）に供した。この精製工程に続いて、サンプルをCoomassie Brilliant Blue R-250色素（Bio-Rad、Hercules、CA、US）で染色したSDS-PAGEによって分析し、共役率（4～20%CRITERION（登録）TGX Stain-Free（登録）Precast Gels、10Well Comb、30μL、1. 0mm、Bio-Rad、Hercules、CA、US）を決定した。図12に見られるように、約50kDaの上部バンドはIRCに対応すると判断された。（図12、レーン4を参照）。下部のバンドはMPV. 10. 34. dがエピトープペプチドを欠失していることを表す。これらのバンドの同一性は、共役されたコントロールを介してさらに確認した。（図12、レーン3を参照）。

10

20

【0195】

重要なことに、MPV. 10. 34. dの共役は、デンストメトリーで測定した場合、約50%の共役効率が得られた。（図12、レーン4を参照）。共役率は、デンストメトリーによって計算された。メーカーが推奨するソフトウェアを使用して、ゲル画像をコンピューターにスキャンした。続いて、各バンドの周りにボックスまたはフリーハンド形状を描画することにより、上部バンドと下部バンドの合計密度を計算した。これらの領域の総密度は、各バンドのタンパク質の総量に対応する。次に、上部レーンのみを同様に測定した。各ゲルの適切に一致した領域のバックグラウンド密度を収集し、バンドシグナルから差し引いた。次に、上部タンパク質バンドのバックグラウンド補正密度を、関心領域のバックグラウンド補正密度全体で割り、100を掛けて、共役率を求めた。

30

【0196】

実施例7

MPV. 10. 34. d及びHPV16カプシド骨格の共役効率

実施例6に記載されたものと同じ共役反応工程を使用するHPV L1粒子の共役は、以前に記載されている。（例えば、WO2018/237115及びWO2020/139978を参照）。共役実験を、実施例6に記載の方法で、HPV16カプシド骨格及びMPV. 10. 34. dカプシド骨格で実施した。カプシド骨格に共役したペプチドエピトープは、CMVpp65抗原に由来するHLA-A2スーパータイプからのHLA-A*0201拘束性エピトープNLVPMVATV（NLV、配列番号：138）であった。

40

【0197】

図13に見られるように、10：1（TCEP：L1）及び10：1（ペプチド：L1）の比率の同じ共役反応条件下で、MPV. 10. 34. dカプシド骨格は、HPV16（約20%、図13、レーン3）と比較してより高い共役率を示した（50%、図13、レーン5）。共役率は、上記のデンストメトリーによって決定した。対照サンプルには、非共役HPV16（図13、レーン2）及び非共役MPV. 10. 34. d（図13、レーン4）が含まれる。

50

【0198】

ペプチド共役率は、少なくとも2つの要因、すなわち（1）L1タンパク質に対する還元剤の比率、及び（2）共役反応に添加される遊離ペプチドの量に依存すると考えられている。図13に示す結果について、還元剤対L1の比率が10：1、及び、ペプチド対L1の比率が10：1の場合、MPV. 10. 34. dカプシド骨格について少なくとも50%の共役（図13、レーン5）及びWTHPV16T=7カプシド骨格について少なくとも20%（図13、レーン3）であると判断した。

【0199】

還元剤濃度の影響をさらに評価するために、還元剤対L1タンパク質10：1（図14、HPV16IRCまたはMPV. 10. 34. dIRCについてそれぞれレーン3及びレーン10）、100倍の比率（図14、HPV16IRCまたはMPV. 10. 34. dIRCについてそれぞれレーン4及びレーン11）、及び1000倍の比率（図14、HPV16IRCまたはMPV. 10. 34. dIRCについてそれぞれレーン5及びレーン12）で共役反応を行った。驚くべきことに、100：1及び1000：1の還元剤対L1の比率は、標準的な10：1の還元剤対L1タンパク質の比率と比較して、より低いパーセントの共役をもたらし、検出可能な共役がない場合さえもあった。特定の理論に束縛されることを望むものではないが、過剰な還元剤がペプチドと反応して、L1表面チオールへのペプチドの共役とほぼ同じ速度でイレン副産物を形成する可能性がある。このような現象は、L1への共役に利用できるペプチドの枯渇をもたらす可能性がある。

【0200】

IRCの相対的な安定性も評価した。共役の後、IRCサンプルをAmicon10kDaフィルタースピナラムでろ過して、過剰な遊離ペプチドを除去した。ろ過後、サンプルのタンパク質濃度をチェックして、ろ過中にタンパク質が失われていないことを確認した。（HPV16IRCまたはMPV. 10. 34. dIRCについては、それぞれ図14のレーン6～8及びレーン13～15を参照）。次いで、サンプルを実施例2に記載のようにTEMによって分析した。図15A及び15Bは、それぞれ150,000倍及び200,000倍の倍率での例示的なTEM顕微鏡写真であり、アミコン精製後のHPV16IRCの分解を示している。対照的に、MPV. 10. 34. dIRCは、180,000X及び200,000Xの倍率でそれぞれ図15C及び15Dに示すように、分解を示さなかった。

【0201】

特定の理論に束縛されることを望むものではないが、MPV. 10. 34. dIRCのさらなる安定性は、ジスルフィド結合によって一緒に保持されているT=7粒子とは異なり、疎水結合によって一緒に保持されているカプシド骨格自体の固有の構造安定性による可能性がある。実際、共役反応中の還元ステップは、必要なチオール基の還元を介して、ジスルフィド結合によって一緒に保持されたT=7構造を実際に不安定化し得る。結果として、MPV. 10. 34. dカプシド骨格は、最大100：1または1000：1のTCEP対L1の比率で処理した後、比較的安定し得る。

【0202】

これらの知見の結果として、MPV. 10. 34. dカプシド骨格は、対象のがんを治療する目的で、対象の既存の免疫系成分を動員するための安定した共役プラットフォームとして十分に機能すると結論付けられた。

【0203】

1：100を超える還元剤比ではMPV. 10. 34. dカプシド骨格の共役（SDS-PAGEゲルのデンシトメトリーで見られるように50%）は改善されないが、1：10より高いが、1：100より低い還元剤比のそのような範囲が共役効率を高めるかどうかを決定するために調査した。したがって、共役反応を、1：100未満の様々な量の還元剤比、具体的には5：1、10：1、及び25：1の比率で、前述のように繰り返した。ペプチド対MPV. 10. 34. dの比率（5：1、10：1、及び25：1）もまた評価した。

【0204】

図16に見られるように、還元剤：L1タンパク質比が5：1の間である場合、5：1、10：1及び25：1（レーン1、4、及び7）のペプチド：L1比を使用したMPV・10・34・dカプシド骨格の用量依存性ペプチド共役を観察した。10：1（レーン2、5、及び8）及び20：1（レーン3、6、及び9）の還元剤：L1タンパク質比では、ペプチドの用量依存性は見られなかった。レーン6は、10：1の還元剤対L1の比率、及び10：1のペプチド対L1の比率が使用された基準点であり、デンストメトリーによって決定されるように、約50%レベルのペプチド共役が日常的に観察される条件である。「CEX-FB035」と表示されたレーンは、MPV・10・34・dカプシド骨格のみを含む対照である。

10

【0205】

還元剤対L1の比率が5：1であり、かつペプチド対L1の比率が10：1であると、50%を超える結合効率が得られることが判明した。（図16、レーン4及び7を参照）。還元剤対L1タンパク質の比率が1：1、2.5：1、及び5：1の共役条件でも試験した。これらの比率で得られた結果を図17に示す。還元剤の量を5：1から1：1に減らしても、反応に含まれるペプチドの量に関係なく、共役効率は改善されないことが判明した。図17では、レーンRは、ペプチド対L1の比率が10：1、及び還元剤対L1の比率が10：1の基準点サンプルであり、通常、約50%のレベルのペプチド共役が得られる。「CEX-FB035」と表示されたレーンは、MPV・10・34・dカプシド骨格のみを含む対照である。要約すると、還元剤対L1の比率が5：1、及びペプチド対L1の比率が10：1であると、50%超の共役率を達成することが判明した。

20

【0206】

実施例8

HSPGを介した腫瘍細胞へのIRCの結合

IRCが腫瘍細胞に結合するかどうかを評価するために、インビトロ細胞結合アッセイを実施した。具体的には、MPV・10・34・dカプシド骨格（非共役）及び異なる共役IRC（ヒトCMVpp65、マウスE7、及びマウスOVAペプチド）の両方を調べた。

【0207】

簡単に説明すると、 2×10^5 個のMC38細胞（マウス結腸腺癌、#ENH204-FP Kerafast, Inc., Boston MA）またはヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）の発現がノックアウトされたpgsA-745細胞（キシロシルトランスフェラーゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞変異体（UDP-D-キシロース：セリン-1, 3-D-キシロシルトランスフェラーゼ、ATCC CRL-2242）を一晩播種した。翌日、細胞をヒトCMVpp65、マウスHPV16E7、マウスOVAペプチド、及びMPV・10・34・dカプシド骨格で37℃で1時間処理した。次に、細胞を2～3mLの蛍光活性化セルソーティング（FACS）緩衝液（PBS中の1%ウシ血清アルブミン）で2回洗浄し、次いで1mLのウサギ抗mouse pSV血清抗体で4℃で30分間染色した。この後、サンプルを3mLのFACS緩衝液で1回洗浄し、0.5mLのロバ抗ウサギIgG-PE抗体（Biolegend, San Diego, CA）で4℃の暗所で30分間染色した。最後に、サンプルを3mLのFACS緩衝液でもう一度洗浄し、250mLのFACS緩衝液に再懸濁してから、Cytometer（Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, US）で分析した。

30

40

【0208】

図18A及び図18Bに示すように、すべてのコンストラクト、MPV・10・34・d-CMVpp65IRC（実線）、MPV・10・34・d-E7IRC（太い実線）、MPV・10・34・d-OVAIRC（太い破線）、及びMPV・10・34・dカプシド骨格（破線）が、右へのピークのシフトに例証されるように、腫瘍細胞に対する特異性を示した。これらの実験における陽性対照は、MPVカプシド骨格（野生型、点線）

50

であった。陰性対照には、IRCもL1も含めない（長い破線）。

【0209】

これらの実験はさらに、HSPG発現を欠く細胞株（pgsA-745細胞、図17Bのピークにシフトがないことによって示される）ではMPV.10.34.dキャプシド骨格の結合が観察されなかったため、IRCがHSPG特異的結合を示したことを表している。要約すると、これらの結果は、腫瘍細胞に対するMPV.10.34.dカプシド骨格の結合特異性がHSPG特異的であることを示しており、重要なことに、MPV.10.34.dカプシド骨格へのエピトープペプチドの共役は、インビトロでのMPV.10.34.dIRCの腫瘍細胞への結合を減少させたり、負の影響を与えたりはしない。

【0210】

実施例9

MPV.10.34.dIRCによる腫瘍細胞へのペプチドのロード負荷

MPV.10.34.dIRCは、腫瘍微小環境に入ると、ペプチドがIRCから切断され、それによってペプチドが腫瘍細胞表面の近くに放出されるように設計されている。いくつかの実施形態では、切断事象は、腫瘍特異的プロテアーゼ、すなわち、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞上またはその近くの対象の系の他の場所よりも比較的高い濃度で存在するプロテアーゼと接触すると起こる。次いで、この切断事象は、腫瘍細胞の表面に発現したMHC分子によるペプチドの負荷または結合をもたらすように設計されている。次の実験は、この動作モード、及び、設計されたIRCが期待どおりに動作するかどうかを試験するために設計されている。

【0211】

この目的のために、IRCから腫瘍細胞の表面に発現するMHCクラスI分子へのペプチド負荷を直接検出するMHCクラスI分子負荷アッセイが開発された。このアッセイは、OVAペプチド（SIINFEEKL、配列番号95）-MHCクラスI同種抗原H-2K^b分子複合体を特異的に認識する抗体を使用するが、遊離ペプチド、空のMHCクラスI分子、またはIRCに共役したペプチドは使用しない。（Zhang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:8403-8407, 1992を参照）。

【0212】

この実験では、実施例6からのOVA結合MPV.10.34.dIRCを、共役ペプチドの濃度に基づく等モル濃度で、OVA共役HPV16IRCと並べて調べた。簡単に説明すると、 $0.1 \sim 0.2 \times 10^6$ 個のMC38腫瘍細胞（C57BL/6マウス結腸腺癌由来細胞、#ENH204-FP、Kerafast, Inc., Boston MA）をIRCと共に37℃で1時間インキュベートした。遊離ペプチドのみを含む陽性対照、及びペプチドまたはIRCを含まない陰性対照も試験した。次いで細胞を2~3mLのFACS緩衝液で2回洗浄し、次いでOVA（SIINFEEKL、配列番号95）モノクローナル抗体（Biolegend, San Diego, CA）と結合したPE共役マウス抗マウスMHC Iで4℃で30分間染色した。これに続いて、サンプルを3mLのFACS緩衝液で1回洗浄し、次に細胞を250μLのFACS緩衝液に再懸濁してから、Cytometer（Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, US）で分析した。

【0213】

これらのアッセイの結果を図19に示す。結果は、OVA共役MPV.10.34.dIRC（ $1.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、太い実線）及びOVA共役HPV16IRC（ $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、実線）がMC38マウス腫瘍細胞の表面にエピトープの負荷を示したことを示しており、OVA共役MPV.10.34.dIRCは、OVA共役HPV16IRCよりも優れている。（図18を参照、陰性対照—長い破線、陽性対照—細い破線）。これらの結果は、MPV.10.34.dIRCがHPV16IRCよりも優れていることを示唆しており、これは、少量のMPV.10.34.dIRCが、大量のHPV16IRCと同等またはより優れた「負荷」の可能性を達成したためである。

【0214】

OVAはマウスMHCに利用されるモデル抗原であるため、OVAペプチドをCMVpp65ペプチドに置き換えてこの実験を繰り返した。CMVpp65由来のHLA-A*0201拘束性エピトープNLVPMVATV(NLV、配列番号138)をこれらの研究に使用し、pp65共役MPV.10.34.dIRCを実施例6に記載のように作製した。MHCクラスI-NLV複合体を認識する市販のモノクローナル抗体がないため、このHLA-A2複合体を認識する可溶性T細胞受容体抗体(2S16)を使用した。(Wagner et al., J. Biol. Chem., 295(15):5790-5804, 2019を参照)。IRCコンストラクトを、細胞株HCT116(ヒト結腸直腸癌細胞株、HCT116、ATCC、CCL-247)及びMCF7(ヒト乳癌細胞株、MCF7、ATCC、HTB-22)がこの研究で利用されたことを除いて、上記と同じ方法で分析した。これらの細胞株は、HLA-A*0201拘束性であり、したがって、CMVpp65ペプチドからのHLA-A*0201拘束性エピトープNLVPMVATV(NLV、配列番号138)を提示することができる。

10

【0215】

OVA MHCクラスI負荷の結果と一致して、NLVペプチドのヒト腫瘍細胞への負荷が観察された。結果を図19A(HCT116細胞)及び図19B(MCF7細胞)に示す。図20A及び図20Bでは、無関係のB型肝炎ペプチドを陰性対照(細い破線、10 µg/mL)として使用し、非共役MPV.10.34.dカプシド骨格をさらに陰性対照(細い実線、100 µg/mL)として使用した。CMV共役MPV.10.34.dIRCは太い実線で表され(100 µg/mL、約1.7 µg/mLのhCMVペプチド共役)、hCMV遊離ペプチドは太い破線(1 µg/mL)で表される。

20

【0216】

図19及び20は、MPV.10.34.dIRCをインビトロで示された細胞株とインキュベーションすると、ペプチドが放出され、腫瘍細胞表面MHCクラスI分子に結合することを示す。IRCのメカニズムが最初にMPV.10.34.dIRCの腫瘍細胞への結合とそれに続くフリン切断に関与することをさらに実証するために、腫瘍細胞結合またはフリン切断のいずれかを阻害して、いずれかの工程の除去が結果として腫瘍細胞へのペプチドの負荷をなくすことを示す競合阻害実験を実施した。これらの研究は、OVA共役MPV.10.34.dIRCを使用して実施され、上記の結合アッセイと同じ条件下で実施した。

30

【0217】

腫瘍結合をブロックするために、1 mg/mL、5 mg/mL、または10 mg/mLの可溶性ヘパリン(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を2.5 µg/mLのOVA共役MPV.10.34.dIRCと37 °C、5%のCO₂でFACSチューブに2 x 10⁵個のMC38細胞が存在する状態で1時間インキュベートした。サンプルを含む細胞の最終容量は200 µLであった。可溶性ヘパリンを含まない陽性対照サンプル、及びIRCまたはヘパリンを含まない陰性対照サンプルが含まれる。次いで、細胞を2~3 mLのFACS緩衝液で2回洗浄し、次いで、OVAペプチドモノクローナル抗体(このモノクローナル抗体は、OVAペプチド、SIINFELK、配列番号: 95、MHC-I K^bとの複合体を特異的に検出することができる)に結合したPE結合マウス抗マウスMHC Iで、4 °Cで30分間染色した。これに続いて、サンプルを3 mLのFACS緩衝液で1回洗浄し、次に細胞を250 µLのFACS緩衝液に再懸濁してから、CyttoFLEXフローサイトメーター(Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, US)で分析した。図21A、21B、及び21Cに見られるように、陰性対照ではOVAペプチド負荷は観察されなかった(図21A、21B、及び21Cの細い黒線)。10 mg/mL(破線、図21A)、5 mg/mL(破線、図20B)、または1 mg/mL(破線、図21C)可溶性ヘパリンを含むサンプルにOVAペプチド負荷は観察されなかった(これらの曲線は陰性対照と重なっている)。OVAペプチドの負荷は、ヘパリンを含まないOVA共役MPV.10.34.dIRCを含

40

50

むサンプルでのみ検出された（右側の太い黒線、図 2 1 A、2 1 B、及び 2 1 C）。これらの結果は、O V A 共役 M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C が H S P G 特異的であることを示している。

【0218】

I R C からの腫瘍細胞へのペプチド負荷は、M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C からのエピトープペプチドのプロテアーゼ切断に依存することを示すために、実施例 10 の実験を、フューリン阻害剤、フューリン阻害剤 I - C a l b i o c h e m、デカノイル - R V K R - C M K a、ペプチジルクロロメチルケトンの存在下で繰り返した。（M i l l i p o r e - S i g m a, S t . L o u i s, M O）。このフリン阻害剤は、フリンの触媒部位に不可逆的に結合し、すべてのフリンプロテアーゼ活性をブロックする。

10

【0219】

簡単に説明すると、 2×10^5 個の M C 3 8 細胞（マウス結腸腺癌、# E N H 2 0 4 - F P、K e r a f a s t, I n c .、B o s t o n M A）を F A C S チューブに播種し、次いで、 $200 \mu\text{L}$ の総最終サンプル体積で、D M S O 中に溶解した $0.5 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 、または $50 \mu\text{M}$ のいずれかのフリン阻害剤でインキュベートした。阻害剤を含まない対照サンプルを、D M S O と同量かつ同方法で調製した。サンプルを組織培養インキュベーター内で 37°C 、 5% の CO_2 で 15 分間インキュベートした。次に、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の O V A 共役 M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C をすべてのサンプルに添加し、サンプルを組織培養インキュベーターで 37°C 、 5% の CO_2 でインキュベートした。次いでサンプルを $2 \sim 3 \text{mL}$ の F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、次いで O V A（S I I N F E K L、配列番号 95）モノクローナル抗体（B i o l e g e n d, C a t # 141604, S a n D i e g o, C A）と結合した P E 共役マウス抗マウス M H C I で 4°C で 30 分間染色した。これに続いて、サンプルを 3mL の F A C S 緩衝液で 1 回洗浄し、次に細胞を $250 \mu\text{L}$ の F A C S 緩衝液に再懸濁してから、C y t o F L E X フローサイトメーターで分析した。（B e c k m a n C o u l t e r L i f e S c i e n c e s, B r e a, C A, U S）。

20

【0220】

図 2 2 A、2 2 B、及び 2 2 C に見られるように、O V A 共役 M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C は、阻害剤が添加されていない（図 2 2 A、2 2 B、及び 2 2 C の細い黒線）、及び、D M S O のみで処理し、フリン阻害剤なし（図 2 2 A、2 2 B、及び 2 2 C の黒い破線）のサンプルの腫瘍細胞上に O V A ペプチドを負荷した。対照的に、陰性対照（図 2 2 A、2 2 B、及び 2 2 C の細い灰色の線、対照曲線は実験データと重なっている）、ならびに $50 \mu\text{M}$ のフリン阻害剤で処理されたサンプル（図 2 2 A の矢印が指す濃く細い線）、 $5 \mu\text{M}$ （図 2 2 B の矢印が指す濃く細い線）、及び $0.5 \mu\text{M}$ （図 2 2 C の矢印が指す濃く細い線）のフリン阻害剤で処理したサンプルでは O V A ペプチド負荷は観察されなかった。したがって、I R C からのエピトープペプチドのフリン切断の阻害は、O V A が標的癌細胞の M H C 分子へ結合することを妨げ、それによって I R C の作用機構を確認した。この機構は、図 1 8 ~ 2 2 に示す結果によってさらに確認され、一致している。

30

【0221】

実施例 10

40

M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C によるインビトロ細胞障害性殺害分析

インビトロ M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C がマウス及びヒト M H C クラス I 分子上にペプチドエピトープを沈着させることができ、この機構がフューリン活性に依存することが実施例 9 で示されたので、これらの癌細胞を標識することが、標的腫瘍細胞に対する細胞性免疫系の構成要素の活性化とリダイレクトを引き起こすかどうかを判定するために追加の実験を設計した。活性化とリダイレクションの際の目標は、腫瘍細胞への細胞傷害シグナルの送達と腫瘍細胞死である。この目的のために、M P V . 1 0 . 3 4 . d I R C の存在下または非存在下での腫瘍細胞とウイルス抗原特異的 $\text{CD}8^+$ T 細胞の共培養を含む、3 つの異なるインビトロ細胞傷害性 T 細胞依存性腫瘍細胞死滅アッセイを設計した。（1）マウス O V A 特異的前臨床 $\text{CD}8^+$ T 細胞、（2）マウス H P V 1 6 E 7 特異的 $\text{CD}8$

50

+ T細胞、及び (3) ヒトHLA-A*0201拘束性CMV特異的T細胞 (Astarte Biologicals、カタログ番号1049-4367JY19) を含む、3つのCD8 T細胞を試験した。(3) については実施例12を参照)。

【0222】

ルシフェラーゼ遺伝子を過剰発現しているマウスB16 (メラノーマ/皮膚) (B16-F10 (ATCC (登録商標) CRL-6475 (商標))、及びマウスID8 (卵巣) 腫瘍細胞 (Hung et al., Gene Ther., 14 (12): 921-020, 2007) (B16-luc及びID8-luc) を培養液で増殖させた。通常の下

10

【0223】

約 0.01×10^6 個のB16-ルシフェラーゼ変異体 (B16-luc) または 0.005×10^6 個のID8-ルシフェラーゼ変異体 (ID8-luc) 腫瘍細胞を、96ウェルアッセイプレートのウェルあたり $100 \mu\text{L}$ で一晩播種した。次に、細胞を $100 \mu\text{L}$ の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のMPV. 10.34.dカプシド骨格、OVA共役MPV. 10.34.dIRC、OVA共役HPV16IRC、及び $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の遊離OVAペプチド (SIINFIEL、配列番号: 95) を含む陽性対照で、ウェルあたり $200 \mu\text{L}$ の最終容量で 37°C で1時間処理した。抗原を受けていない細胞を、陰性対照 (Agなし) として含めた。次に、細胞を $200 \mu\text{L}$ のRoswell Park Memorial Institute (RPMI) 培地で2回洗浄し、エフェクター (CD8+T細胞) でOVA特異的CD8+T細胞 (Jackson、在庫番号003831) と、細胞 (腫瘍細胞) 比 (「E:T比」) を10:1 (B16-luc) または20:1 (ID8-luc) にするために、16時間共インキュベーションして、 37°C 、5%の CO_2 の細胞インキュベーターでウェルあたり $200 \mu\text{L}$ の最終容量にした。10:1のE:T比は、1つの腫瘍細胞ごとに、10個のCD8+OT-1T細胞が腫瘍細胞と共インキュベーションされることを意味する。次に、これらの共インキュベーション細胞を $200 \mu\text{L}$ のPBSで洗浄し、 $35 \mu\text{L}$ の1X細胞溶解緩衝液 (Promega, Madison, WI, US) で15~20分間溶解した後、 $50 \mu\text{L}$ のルシフェラーゼアッセイ基質を加え、Promega GloMax Explorerマイクロプレートリーダー (Promega, Madison, WI, US) で検出した。

20

30

【0224】

溶解細胞から放出されたルシフェラーゼの濃度を定量化することにより、T細胞と共インキュベーションした後の生存腫瘍細胞の数を測定した。これは、標的細胞がルシフェラーゼを過剰発現する条件下でインキュベートされたため、細胞生存率の代理マーカーとして機能する。ルシフェラーゼ活性の低下は、より多くの細胞死を示し、より大きな免疫リダイレクト、したがってより大きな細胞毒性を示唆する。

【0225】

図23A及び図23Bに示すように、OVA共役MPV. 10.34.dIRC、OVA共役HPV16IRC、及びペプチド陽性対照は、B16-luc (図23A) 及びID8-luc (図23B) 腫瘍殺傷アッセイの両方で、陰性対照サンプルよりもはるかに高い腫瘍細胞毒性 ($>70\%$) を示した。同じ濃度 ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) で、OVA共役MPV. 10.34.dIRCは、OVA共役HPV16IRCと同様の高い細胞毒性を腫瘍細胞に対して示した。

40

【0226】

上記の実験と同様に、OVAペプチドをE7ペプチド (RAHYNI VTF、配列番号96) に置換したことを除いて、同様の方法で第2の実験を行った。同じプロトコルを使用して、この実験で同じ腫瘍細胞とサンプルを調査した。

【0227】

図24A及び図24Bに示すように、E7-共役MPV. 10.34.dIRC、E7

50

ー共役HPV16IRC、及び陽性対照は、B16-luc（図24A）及びID8-luc（図24B）腫瘍殺傷アッセイの両方で、陰性対照群よりもはるかに高い腫瘍細胞毒性（＞70%）を示した。同じ濃度（2.5 μg/mL）で、OVA共役MPV.10.34.dIRCは、OVA共役HPV16IRCと同様の高い細胞毒性を腫瘍細胞に対して示した。

【0228】

実施例11

ヒトアッセイにおけるMPV.10.34.dIRCの有効性

上記の実験のインビトロ機能試験結果は有望であったが、分析の次の望ましいステップは、ヒトベースのアッセイで同様の実験を行うことであった。この目的のために、MPV.10.34.dIRCに曝露された腫瘍細胞に対する模擬ヒト細胞免疫系成分の応答をインビトロで調べた。ヒトCMV（HCMV）がこの研究のために選択されたのは、ヒトCMVが非常に蔓延しており（人口の50～90%に感染している）、健康な個人ではほとんど無症候性であるからである。（Longmate et al., Immunogenetics, 52（3-4）：165-73, 2001; Pardieck et al., F1000Res, 7, 2018、及びvandenBerg et al., Med. Microbiol. Immunol., 208（3-4）：365-373, 2019参照）。重要なことに、HCMVは、疾患を予防するために長寿命の細胞性免疫を必要とする生涯にわたる持続的な感染を確立する。したがって、高齢者のウイルス感染を強力に制御するために長年にわたって開発された複雑な適応細胞媒介性抗ウイルス免疫を、がんの治療に再利用して利用できるという仮説を立てることは合理的である。

【0229】

これらの実験では、CMVペプチドに対するCD8+T細胞の応答を、HCT116、OVCA3、及びMCF7を含む3つの異なるヒト腫瘍細胞株で試験した。これらのヒト腫瘍細胞株の3つすべてがHLA-A*0201陽性である。

【0230】

インビトロ細胞毒性アッセイHTC112、ヒト結腸癌細胞、MCF7、ヒト乳癌細胞、及びOVCA3、ヒト卵巣癌細胞（すべてATCC, Manassas, VA, US）を0.01～0.2 x 10⁶/ウェル/100 μL/96ウェルプレートで一晩播種した。翌日（約20～22時間後）、各細胞株を以下の条件で37℃で1時間インキュベートした：（1）最終濃度1 μg/mLのCMVペプチド（陽性対照）、（2）最終濃度2.5 μg/mLのMPV.10.34.d（陰性対照）、（3）最終濃度2.5 μg/mLのCMV共役MPV.10.34.dIRC、（4）最終濃度2.5 μg/mLのCMV共役HPV16IRC、及び（5）抗原なし（陰性対照）。1時間後、細胞を200 μLの培地で3回激しく洗浄し、非特異的結合を除去した。ヒト患者ドナーCMVT細胞（ASTARTEBiologics, Seattle, WA, US）をE:T（エフェクター細胞：標的細胞）比10：1で添加し、組織培養インキュベーターで37℃、5%のCO₂で24時間インキュベートした。共培養後の各サンプルの総最終容量は200 μLであった。共培養後に細胞生存率を測定した。細胞生存率は、CELLTITER-GLO（登録商標）（Promega, Madison, WI, US）で測定した。このアッセイは、細胞生存率のマーカーであるATPを検出して結合するルシフェラーゼ発現化学プローブを提供する。腫瘍細胞から生成されたATPの量は、メーカーのプロトコルに従って定量化した。これらのアッセイでは、ルシフェラーゼ活性の低下は細胞死を示し、免疫リダイレクトの増加と細胞毒性の増加を示唆している。

【0231】

結果を図25に示す。CMV共役MPV.10.34.dIRC（図25A、25B、及び25Cの「VERI-101」）は、ヒト健康なドナーCMVpp65特異的CD8+T細胞（AstarteBiologics, Inc., Bothell, WA, US）をリダイレクトして、不死化HLA-A2陽性ヒト結腸癌細胞（HCT116）、ヒト卵巣癌細胞（OVCA3）、及びヒト乳癌細胞（MCF7）を死滅させるのに、CMV

共役HPV16IRC（図25A、25B、及び25Cの「CMVAIR-VLP」）と同等に有効であった。対照サンプル（図25A、25B、及び25Cにおける「Agなし」または「VERI-000」）は、バックグラウンドでの腫瘍死滅を示さなかった。まとめると、これらのデータは、MPV.10.34.dIRCがインビトロで腫瘍細胞に対するマウス及びヒトの免疫応答をリダイレクトすることを実証している。

【0232】

実施例12

MPV.10.34.dIRC結合とペプチド切断の連続機構

実施例9は、MPV.10.34.dIRC結合が、ペプチドのフリン依存性切断及び標的腫瘍細胞へのペプチド負荷の前に生じなければならないことを実証している。異なる濃度のOVA共役MPV.10.34.dIRCを使用して、別々のアッセイで結合と負荷を検出する用量反応曲線を作成した。これらのアッセイは、実施例7及び8に記載のように行った。両方のアッセイからの幾何学的MFIに基づいて、相関分析を行った。

【0233】

図26に示される結果は、腫瘍細胞に結合するOVA共役MPV.10.34.dIRCの数と、腫瘍細胞上のOVAペプチド/K^b複合体のレベルとの間に高度に統計的に有意な相関関係があることを示している（Spearman $r=0.92$ 、 $P=0.0003$ ；Pearson $r=0.98$ 、 $p<0.001$ ）。この統計分析は、OVA共役MPV.10.34.dIRCの一連の工程が最初に腫瘍細胞に結合または接触し、その後、IRCからのペプチドのフリン依存性切断、及びペプチドのMHC負荷が続くという要件をさらに実証している。

【0234】

実施例13

MPV.10.34.dIRC結合と腫瘍細胞死の連続機構

実施例9は、OVA共役MPV.10.34.dIRC結合の阻害が、IRCからのペプチドのフリン依存性切断及び腫瘍細胞表面へのOVAペプチド負荷の阻害をもたらすことを示す。この結合工程の阻害がCD8+T細胞のリダイレクト及び腫瘍細胞死も阻害することをさらに示すために、HSPG結合の競合物質である可溶性ヘパリンの存在下及び非存在下で実施例10を実施したように細胞毒性研究を行った。

【0235】

OVA共役MPV.10.34.dIRC濃度の範囲（ $0.156\mu\text{g}/\text{mL}\sim 0.625\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びE:T比（1:4.5、1:9、及び1:18）を、実施例10に記載のアッセイにおける $10\text{mg}/\text{mL}$ の可溶性ヘパリンの存在下及び非存在下で調査した。この濃度の可溶性ヘパリンは、OVA共役MPV.10.34.dIRC結合の完全な阻害、及び腫瘍細胞へのペプチド負荷の阻害を引き起こすことが以前に示されていた。これらのアッセイでは、ルシフェラーゼを過剰発現する15,000個のTC-1細胞を最初に平底96ウェルプレートに播種し、 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターで一晩培養した。翌日、細胞をPBSで3回洗浄した後、2%のBSAを含むAIM-V培地（無血清）で 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターで1.5時間インキュベートした。並行して、OVA共役MPV.10.34.dIRCを同じAIM-Vメディア+2%のBSAで0.625、0.3125、0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。（図27A、27B、及び27Cを参照）。各サンプルを、 $10\text{mg}/\text{mL}$ の可溶性ヘパリンを使用して（太い破線）または使用せずに（実線）、 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。MPV.10.34.dカプシド骨格（細い破線、「ViP」のみ）を、陰性対照として含めた。1時間後、サンプルをTC-1細胞に添加し、 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターでさらに30分間共インキュベートした。この後、処理した細胞をAIM-V培地のみで3回洗浄した後、エフェクター対ターゲット（E:T）比18:1、9:1、または4.5:1でOT-1T細胞とインキュベートした。次に、この共培養物を 37°C 、5%の CO_2 でさらに3時間インキュベートした。3時間後、Promegaルシフェラーゼアッセイシステムを製造元のプロトコル（Promega,

Madison, WI, US) に従って使用して、標的細胞の細胞毒性を分析した。細胞毒性は、このアッセイで細胞生存率の代理マーカーとして使用されるルシフェラーゼシグナルの損失の検出によって決定した。すべての研究は3連で実施した。

【0236】

結果を図27に示す。可溶性ヘパリンの存在は、試験したすべての濃度及びE:T比条件下で、OVA共役MPV. 10.34.dIRCを介した細胞毒性を示さなかった。これらの結果は、MPV. 10.34.dIRCの作用機構の連続的な性質をさらに裏付けている。

【0237】

OVA共役MPV. 10.34.dIRCの結合及び細胞毒性活性について相関分析を行った。簡単に言えば、異なる濃度のOVA共役MPV. 10.34.dIRCを使用して、別々のアッセイで結合と細胞毒性活性を検出する用量反応曲線を作成した。以下の変更を加えて、実施例10で前述したように細胞毒性アッセイを実施した： $6.25 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲のOVA共役MPV. 10.34.dIRCを、3つの異なるE:T比(18:1、9:1、及び4.5:1)で試験。

【0238】

試験した3つのE:T比条件すべてで、 $0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満以上のOVA共役MPV. 10.34.dIRC濃度で用量依存的な殺傷が観察されたが、OVA共役MPV. 10.34.dIRCの $0.156 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では、細胞毒性のレベルが最大になった。以下の変更を加えて実施例7に記載のプロトコルに従って結合アッセイを実施した：の $6.24 \times 10^{-4} \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲のOVA結合MPV. 10.34.dIRCを調査した。

【0239】

結果は、用量依存的な結合が観察されたこと、及び結合検出の限界が $2.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{mL}$ に達したことを示している。両方のアッセイを2回繰り返した(少なくとも3連にて)。幾何平均蛍光強度(MFI)の平均値が2つの実験から報告され、図28にまとめている。

【0240】

両方のアッセイからのMFIに基づいて(図28)、Spearman相関分析を使用してグラフ及び相関分析を実施した(図29)。簡単に言えば、2つの異なる日に実行された2つの独立したOVA共役MPV. 10.34.dIRC細胞毒性アッセイのパーセンテージの平均と、2つの異なる日に行われたOVA共役MPV. 10.34.dIRC結合実験のMFIの平均を計算し(図28)プロットした(図29)。これらの結果に対してスピアマン相関分析を行ったところ、3つのE:T比すべてで、これら2つの変数間の有意な関係($r=0.83-0.9$)が明らかになった。これらの結果は、OVA共役MPV. 10.34.dIRCの腫瘍細胞への結合とその後の細胞毒性のレベルとの間に、非常に統計的に有意な相関関係(E:T比に応じて $0.83 \sim 0.9$ のr値)があることを示している。

【0241】

実施例14

GARDASIL(登録商標)9産生抗体はMPV. 10.34.dIRC効果を阻害しない

GARDASIL(登録商標)9によるワクチン接種は、HPV感染を予防し、続いて、HPV関連の子宮頸癌を予防することができる、長期(>10年)の持続的なHPV L1カプシド特異的抗体をもたらす。GARDASIL(登録商標)9は9種類のHPVに対してのみ有効であると報告されているが、他の種類のパピローマウイルスカプシドに対するある程度の交差中和が期待され得る。MPV. 10.34.dIRCはマウスパピローマウイルスカプシドに由来するため、GARDASIL(登録商標)9ワクチン接種から得られたワクチン血清がMPV. 10.34.dIRC腫瘍細胞死滅を阻害できるかどうかを判断することが望まれた。

10

20

30

40

50

【0242】

GARDASIL（登録商標）9血清は、以下のように生成された：ニュージーランド白ウサギ（ $n=10$ ）に、GARDASIL（登録商標）9のヒト用量（用量当たり $270\mu\text{g}$ のVLP）の筋肉内ワクチン接種を3回投与した。0、1、及び2か月目にウサギにワクチン接種を行った。最後のワクチン接種から2週間後、ウサギから採血してGARDASIL（登録商標）9血清を得た。各ウサギからの血清の $100\mu\text{L}$ アリコートをつまみ分けた。対照として、GARDASIL（登録商標）9血清もHPVタイプ6、11、16、18、31、45、52、及び58に対する中和活性について試験したが、結果は中和活性を示さなかった（データは示さず）。

【0243】

OVA共役MPV. 10.34.dIRCを、実施例11及び13に記載のプロトコルを使用して、GARDASIL（登録商標）9血清で試験した。簡単に言えば、ルシフェラーゼを過剰発現する15,000個のTC-1細胞を最初に平底96ウェルプレートに播種し、 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターで一晩培養した。翌日、細胞をPBSで3回洗浄した後、AIM-V培地（無血清）+2%のBSAで 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターで1.5時間インキュベートした。並行して、OVA共役MPV. 10.34.dIRCを同じAIM-V培地+2%BSAで $0.625\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.3125\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び $0.156\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、各サンプルを1:200希釈のGARDASIL（登録商標）9血清有り（太い破線）またはなし（実線）で $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。MPV. 10.34.d単独（細い破線）も陰性対照として含めた。（図30A、30B、及び30Cを参照）。1時間後、サンプルをTC-1細胞に添加し、 37°C 、5%の CO_2 の細胞培養インキュベーターで30分間共インキュベートした。この後、処理した細胞をAIM-V培地のみで3回洗浄した後、エフェクター対ターゲット（E:T）比18:1、9:1、または4.5:1でOT-1T細胞とインキュベートした。次に、この共培養物を 37°C 、5%の CO_2 で3時間インキュベートした。3時間後、Promegaルシフェラーゼアッセイシステムを製造元のプロトコル（Promega, Madison, WI, US）に従って使用して、標的細胞の細胞毒性を分析した。細胞毒性は、このアッセイで細胞生存率の代理マーカーとして使用されるルシフェラーゼシグナルの損失を定量化することによって決定した。すべての研究は3連で実施した。

【0244】

GARDASIL（登録商標）9血清の存在下では、細胞毒性の阻害は観察されなかった。図30の結果は、MPV. 10.34.dIRCが、既存のHPVワクチン生成抗体を保有している可能性のある対象に悪影響を及ぼさないことを示唆している。

【0245】

実施例15

抗MPV. 10.34.dIRC抗体は腫瘍細胞の細胞毒性を阻害しない

MPV. 10.34.dIRC配列はMPV L1カプシドに基づいているため、野生型MPVまたはMPV. 10.34.dIRCに対して生成された抗体が、腫瘍に対するMPV. 10.34.dIRCの作用機構に影響を与えるかどうかを試験することが望まれた。

【0246】

野生型MPVに対する抗体を、次のように生成した：ニュージーランド白ウサギ（ $n=3$ ）に、用量あたり $50\mu\text{g}$ の野生型マウスパピローマウイルス粒子の筋肉内ワクチン接種を3回行った。0、1、及び2か月目にウサギにワクチン接種を行った。最終のワクチン接種から2週間後、ウサギから採血して抗MPV血清を得た。MPV. 10.34.dIRCに対する抗体を次のように得た：生後6～8週のナイーブなC57/BL6マウス（ $n=10$ ）に、 $150\mu\text{g}$ のE7結合MPV. 10.34.dを48時間の間に2回、全身注射した。48時間後、マウスから採血して抗MPV. 10.34.dIRC血清を得た。

【0247】

MPV. 10.34. d カプシド骨格及びMPV. 10.34. d IRCの両方に対する抗MPV. 10.34. d IRC血清及び抗MPV血清の特異性をELISAによって調べた。アッセイは、以下の違いを除いて、実施例5に記載のように行った：血清サンプルを、1：100の希釈倍率及び2倍連続希釈で試験。ヤギ抗マウスIgG-HRP二次抗体をELISAで使用した（1：7000）。抗MPV. 10.34. d IRC血清（図31）及び抗MPV血清（データは示さず）の、MPV. 10.34. d カプシド骨格（図31A）及びMPV. 10.34. d IRC（図31B）の両方への結合を観察した。

【0248】

MPV. 10.34. d IRCへのいずれかの抗体血清の結合がその後の腫瘍細胞毒性に影響を与えるかどうかを決定するために、いずれかの血清の存在下または非存在下でOVA結合MPV. 10.34. d IRCを用いて結合及び細胞毒性アッセイを行った。抗MPV血清（図32A、32B、及び32C）または抗MPV. 10.34. d IRC血清（図32D、32E、及び32F）の存在下で、実施例14のように細胞毒性アッセイを行った。結果は、OVA共役MPV. 10.34. d IRCを抗MPV血清（図32A、32B、及び32C）または抗MPV. 10.34. d IRC血清（図32D、32E、及び32F）のいずれかでプレインキュベートした場合には、試験したすべての濃度及びE：T比において細胞毒性に差異はなかったことを明らかにした。

【0249】

MPV. 10.34. d IRCまたはMPVに対する抗体が、MPV. 10.34. d カプシドバックボーンとMPV. 10.34. d IRCの両方にELISAを介して結合する特異性を示しているにもかかわらず、これらの抗体が細胞毒性を阻害できないことを、血清の存在下で結合アッセイを実施することによってさらに調査した。

【0250】

サンプルを、異なるOVA共役MPV. 10.34. d IRC濃度（0.0025 µg/mL～2.5 µg/mL）でプレインキュベートした。これらのサンプルを、実施例5に記載されるものと同じ結合アッセイで試験した。簡単に言えば、ルシフェラーゼを過剰発現する20,000個のTC-1細胞をFACSチューブに播種し、必要になるまで、37℃、5%CO₂の細胞培養インキュベーターでインキュベートした。並行して、OVA共役MPV. 10.34. d IRCを同じAIM-V培地+2%BSAで0.0025～2.5 µg/mLの濃度範囲に希釈し、各サンプルを1：200希釈の抗MPV血清（A）または抗MPV. 10.34. d IRC血清（B）のいずれかと2℃～8℃で1時間インキュベートした。1時間後、サンプルをFACSチューブに播種されたTC-1細胞に添加し、37℃、5%のCO₂の細胞培養インキュベーターで1時間共インキュベートした。次いで、サンプルをFACS緩衝液（DBPS、pH7、0.1%BSA）で2回洗浄した。次いで、サンプルを暗所で30分間、AF647共役ロバ抗ウサギIgG抗体またはPE共役ヤギ抗マウスIgG抗体で染色した。次いで、サンプルをFACS緩衝液（DBPS、pH7、0.1%BSA）で洗浄した。この後、を250 µLのFACS緩衝液に再懸濁し、MPV血清（図33A）または抗MPV. 10.34. d IRC血清（図33B）で前処理した、異なる濃度のOVA共役MPV. 10.34. d IRCでのフローサイトメトリーによって結合を検出した。すべての研究は3連で実施した。

【0251】

これらの試験の結果は、抗MPVウサギIgG血清（図33A）または抗MPV. 10.34. d IRCマウスIgG血清（図33B）とのサンプルのインキュベーションが依然として標的腫瘍細胞に結合できることを明らかにした。要約すると、実施例15の結果（図31、32、及び33）は、MPV. 10.34. d IRCに特異的な抗体が、MPV. 10.34. d IRCに特異的にインビボでの結合を誘発したことを集合的に示している。しかし、これらの抗体は、MPV. 10.34. d IRCの腫瘍細胞への結合をブロックせず（図33）、したがって、MPV. 10.34. d IRCの全体的な細胞毒性

10

20

30

40

50

機構も阻害しない（図32）。対照的に、これらの同じ抗体は、疑似ウイルス中和アッセイで見られるように、MPV感染を阻害することができた（データは示していない）。MPV感染は細胞内在化を必要とするため、1つ考えられるのは、これらの抗MPV. 10. 34. dIRC血清抗体はMPV. 10. 34. dIRCの細胞内在化をブロックするが、MPV. 10. 34. dIRCの標的細胞結合は阻害しないということである。MPV. 10. 34. dIRCの機構は細胞外にあるため、このことがこれらの抗体の影響を受けない理由である可能性がある。

【0252】

実施例16

MHCクラス1細胞内経路成分が欠損した細胞へのペプチド負荷

10

実施例9は、IRCからのペプチドの腫瘍細胞表面への負荷を実証する。IRCから放出されたペプチドが腫瘍細胞によって結合され、次いで貪食されてMHCクラス1抗原提示経路を介して処理されるかどうかを決定することが望まれた。この可能性を試験するために、細胞内MHCクラス1プロセッシングタンパク質が遺伝的に欠損している（TAP欠損）細胞株（RMA-S細胞）を用いてペプチド負荷アッセイを実施した。この文脈で腫瘍細胞表面へのペプチド負荷が依然として発生する場合、それは細胞外機構によるものである。

【0253】

OVA共役MPV. 10. 34. dIRC濃度の範囲（0. 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を、RMA-S細胞にペプチドを負荷する能力について試験した。これらの結合アッセイは、前述のように実施された。簡単に説明すると、 2×10^6 細胞/mLのRMA-S細胞を単一細胞懸濁液に再懸濁し、100 μL （0. 2×10^6 のRMA-S細胞）をFACSチューブに分配した。様々な量のOVA共役MPV. 10. 34. dIRCをサンプルに添加し（0. 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、サンプルを37℃、5%のCO₂で1時間インキュベートした。その後、細胞を2 mLのFACS緩衝液（PBS、pH 7. 0、1% BSA）で2回洗浄した。細胞を1 μL のPE共役抗SIINF EKL（配列番号95）/Kb抗体で染色した。細胞を2 mLのFACS緩衝液（PBS、pH 7. 0、1% BSA）で2回洗浄した。次いで、サンプルを約250 μL のFACS緩衝液に再懸濁し、ペプチド結合をMFIによって分析した。

20

【0254】

データは、より高濃度のOVA共役MPV. 10. 34. dIRCを添加するほど、これらの細胞内のOVAペプチド-MHC複合体のレベルがより増加することが明らかになった。これらのデータは、MPV. 10. 34. dIRCが細胞外機構によって標的腫瘍細胞を標識することを立証しているように思われる。

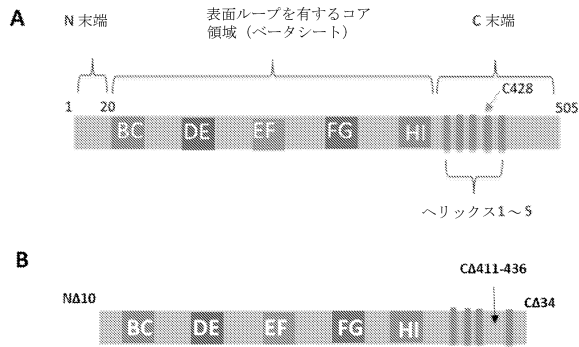
30

40

50

【図面】

【図 1】

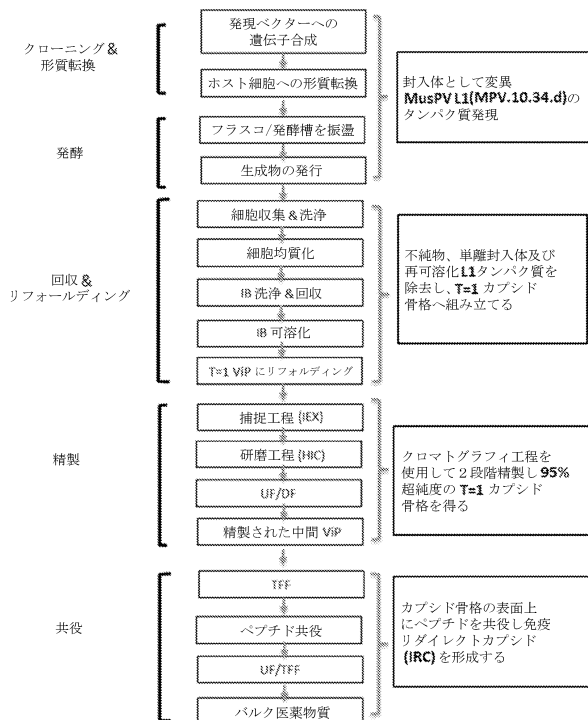


【図 2】

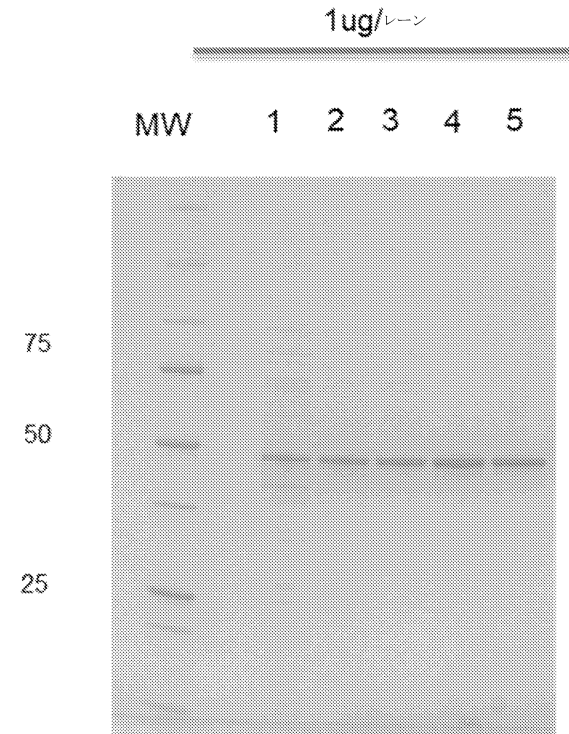
HPV16-L1	MSLWLPSSATVYLPPV-FVSKVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHVYFFIKKPNNHK	59
MusPV1-L1	MAHWLPQFGLYLPTTFVAVQSTDEYVYPTSLFCHARTDRLTVGHVPPFVID--NDR	58
HPV16-L1	ILVFKVSGQLQYRVFRIHLDPNKFPGFDDTSFYNDPQRIYVWACVGVCGQGQLGVGISC	119
MusPV1-L1	VTVEKVSQNYRVFRLKFFDPNKFALPQKDFDYDEKRLVWRLGLEIRGGGFLGTTG	118
HPV16-L1	HPLLNKLDITENASAYANAGVDNRCISMDYKQQLCLIGCKPPPIGEHWGKGSPTNVA	179
MusPV1-L1	HPLEFNKLGDTENPNKYQQGS-KDNRQNTSMDPKQQLFTVGCPEPTGEHWVAKPCGA--	175
HPV16-L1	VNFGDCPFLELINTVIQDGMVDVTGFGAMDTTLQANKSEVPLDICTSI:CKYPDVIKMS	239
MusPV1-L1	LEKDCPFPIQLVMSVIEDGLKCDICFGNMNFKELQQDASGVPLDIVSTPCKWEDFLKMTN	235
HPV16-L1	EPYGDLSLFFYLRRQMFVRHLNFRAGTVGENVP----DDLYIKGSGS--TANLASSNYF	292
MusPV1-L1	EAYGDKMFFFGREQVIARHFFTRNGSVGEPINVSFSFSDFYAPDSTQDQKLAPSVIF	295
HPV16-L1	PTPSGSMVTSDAQIFNKPFWLQRAQGHNNUGICWGNLFVTVVDTTRSTNMSLCAALSTSE	352
MusPV1-L1	GIPTSGSLVSSDGLFNPFWLQRAQGHNNVGVCHNELEFVTVVDNIRNTNFTISQQTINFN	355
HPV16-L1	--TTYKNTNFKEYLRHGEYDLQFIFQLCKITLTADVMYIHSNMNSTILEDWNFLQPPPG	411
MusPV1-L1	PDTYDSTNFKNYLRHVEQFELSLIAQLCKVPLDPGVLAHINTMNPTILENNWNLGFVAPPG	415
HPV16-L1	CGLDEVRVFTSQIACQHNFPAPKEDPLKKTTFWEVNLKEKFSADLDQFELGRKFLQ	471
MusPV1-L1	QIISDNRHIESSAFHGFQGNPKEREDPYKGLITWEVDLTERFSQQLDQFALGRKFLYQ	475
HPV16-L1	AGLKAQKFFLCKRKAFTTSSTSTAKKKKKK	505
MusPV1-L1	AGLHWVFGRCVKAATSTSSSRHWVKKRKGSK	509

FIG. 2

【図 3】



【図 4 A】



10

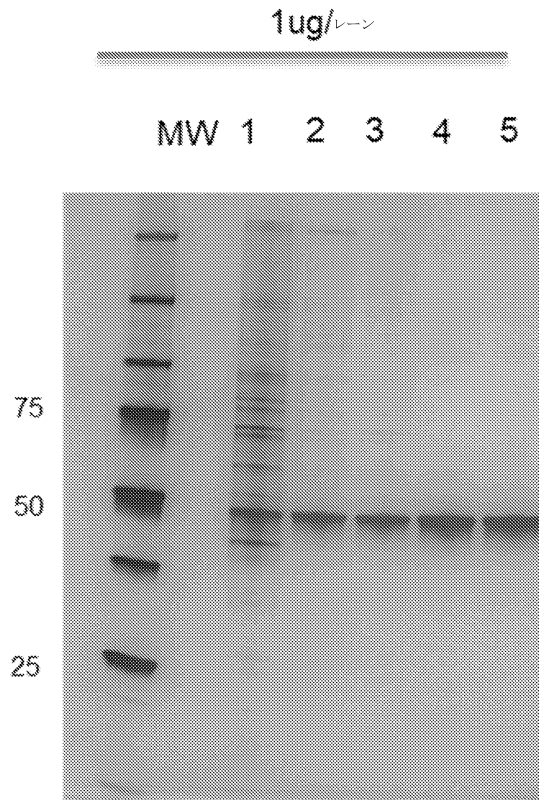
20

30

40

50

【図 4 B】



【図 5】

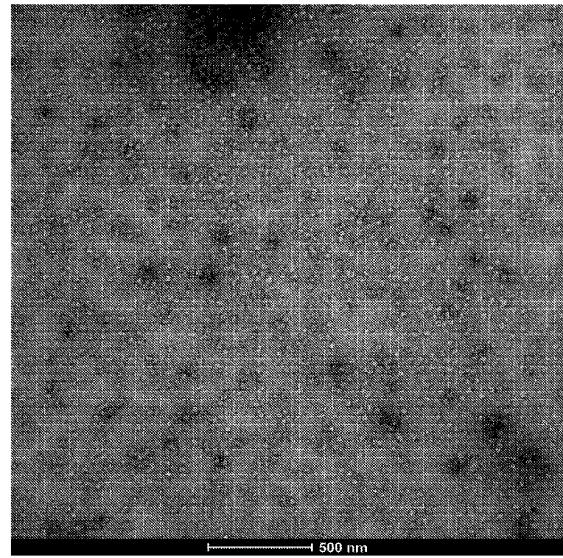
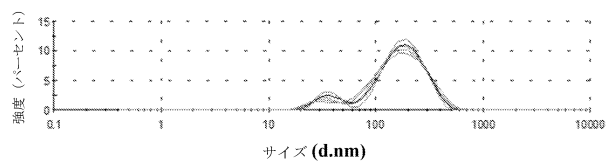
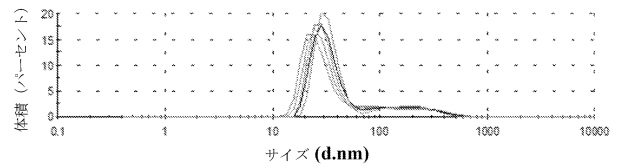


FIG. 5

【図 6 A】



【図 6 B】



10

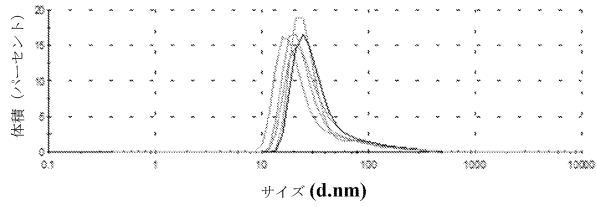
20

30

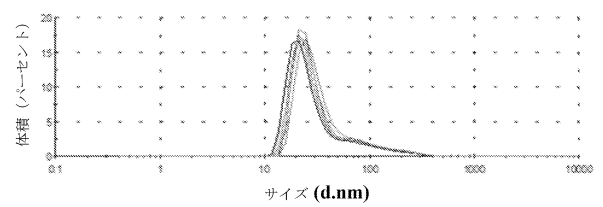
40

50

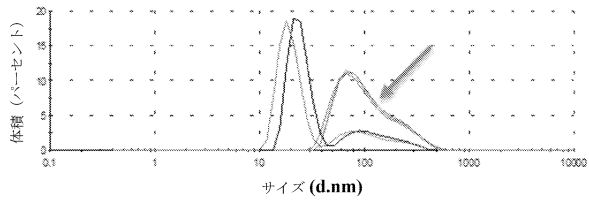
【図 7 A】



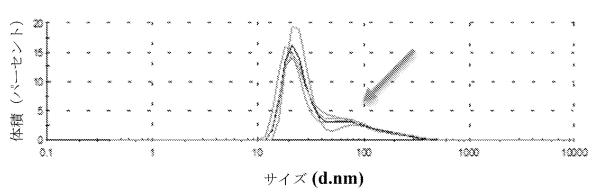
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】



10

【図 8 A】

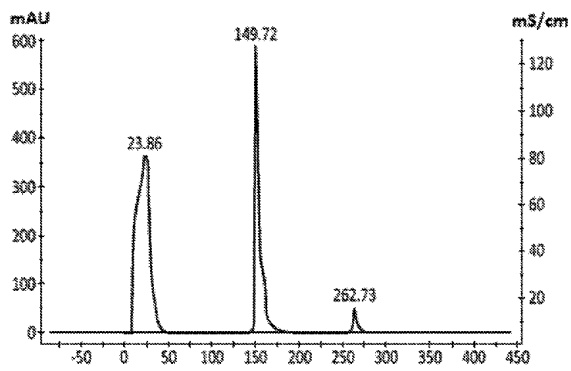


FIG. 8A

【図 8 B】

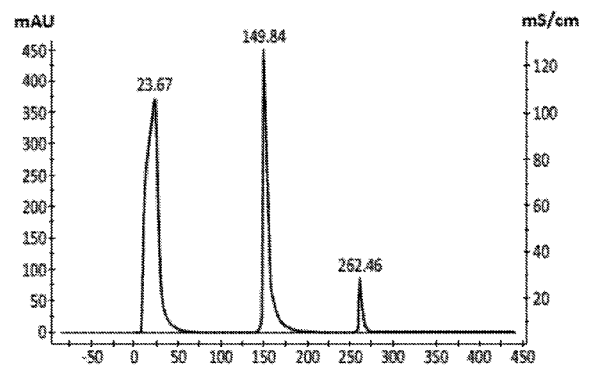


FIG. 8B

20

30

40

50

【図 8 C】

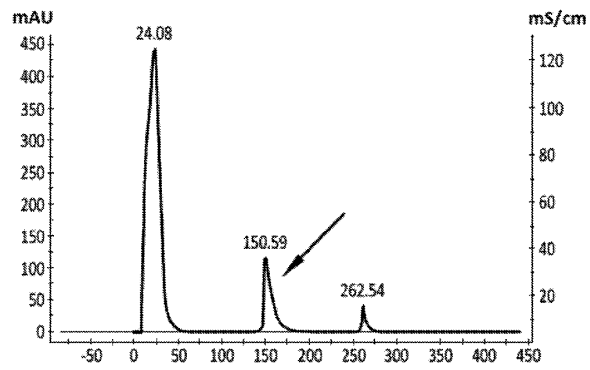


FIG. 8C

【図 8 D】

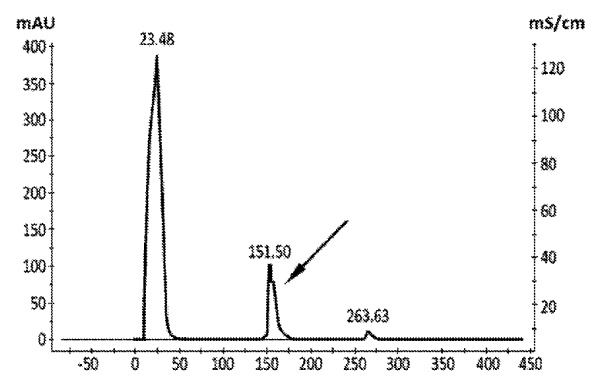
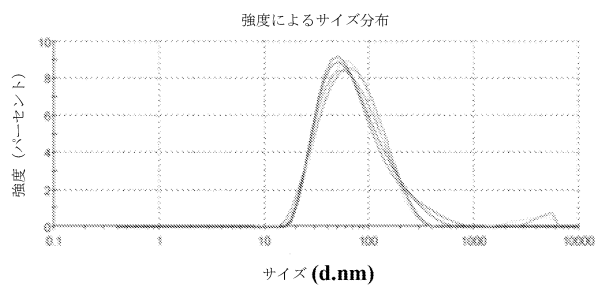


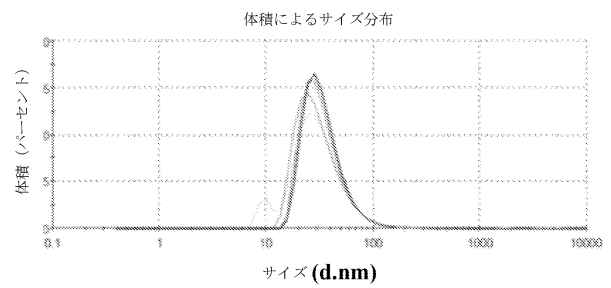
FIG. 8D

10

【図 9 A】



【図 9 B】



20

30

40

50

【図 9 C】

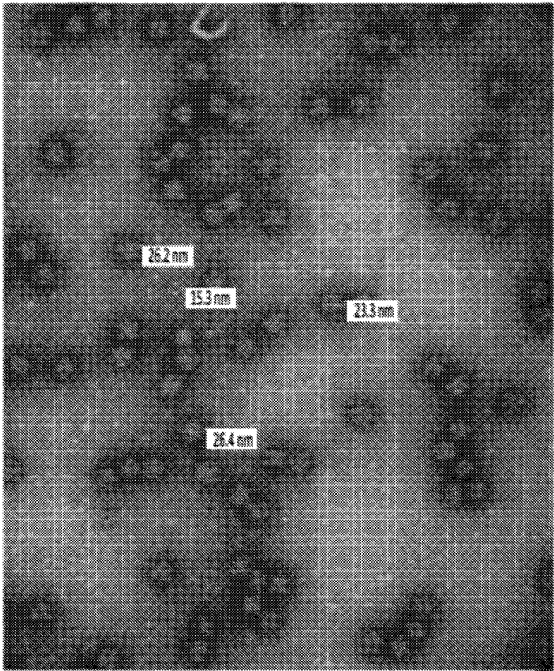
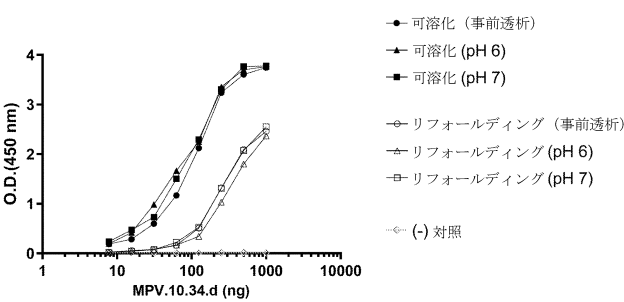


FIG. 9C

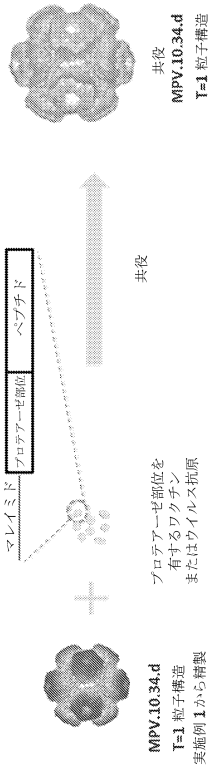
【図 1 0】



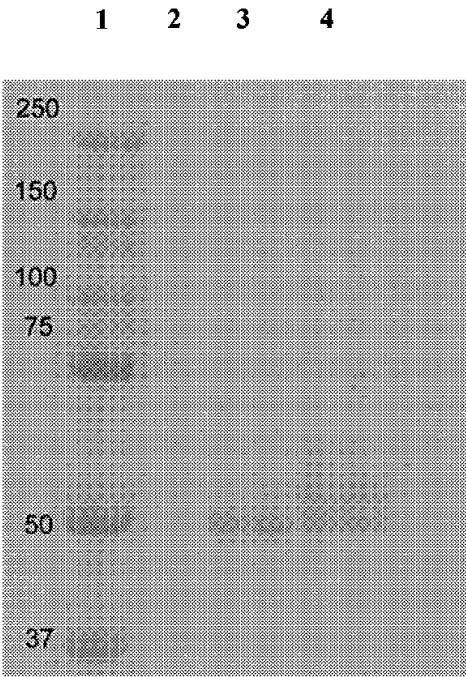
10

20

【図 1 1】



【図 1 2】



30

40

FIG. 12

50

【図 1 3】

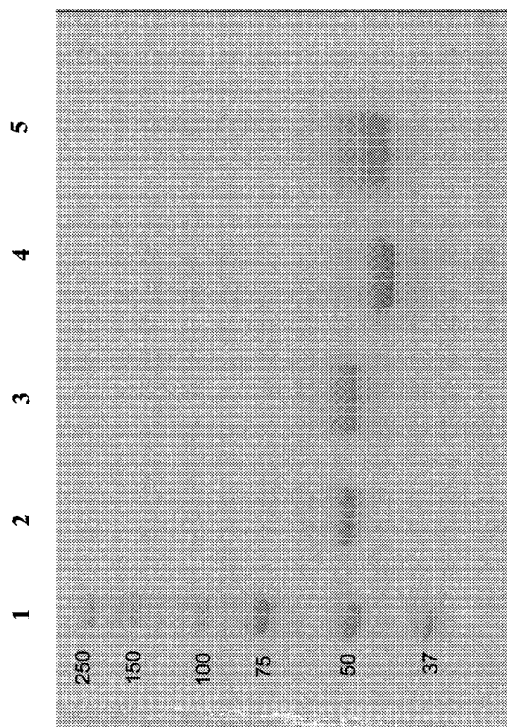


FIG. 13

【図 1 4】

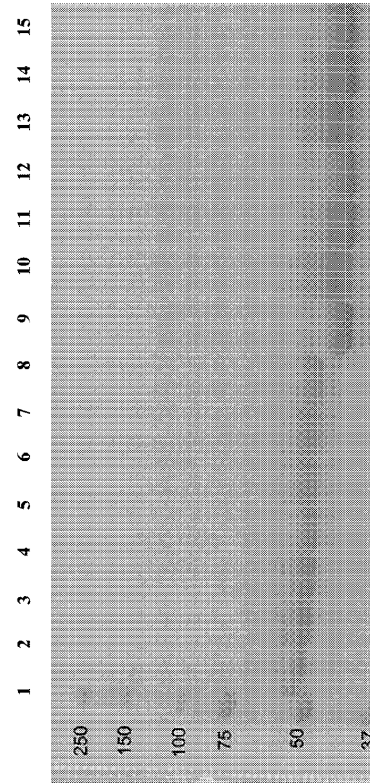


FIG. 14

【図 1 5 - 1】

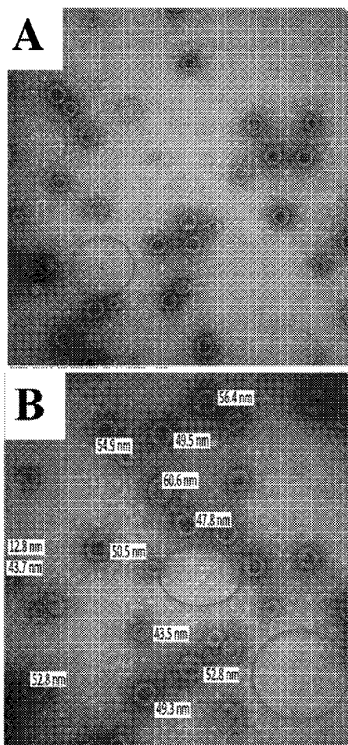


FIG. 15

【図 1 5 - 2】

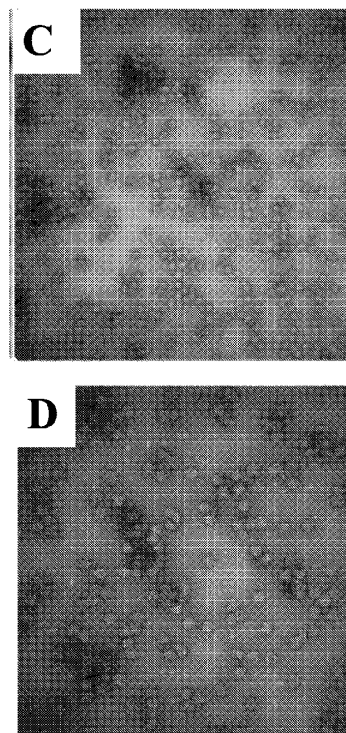


FIG. 15 (cont.)

10

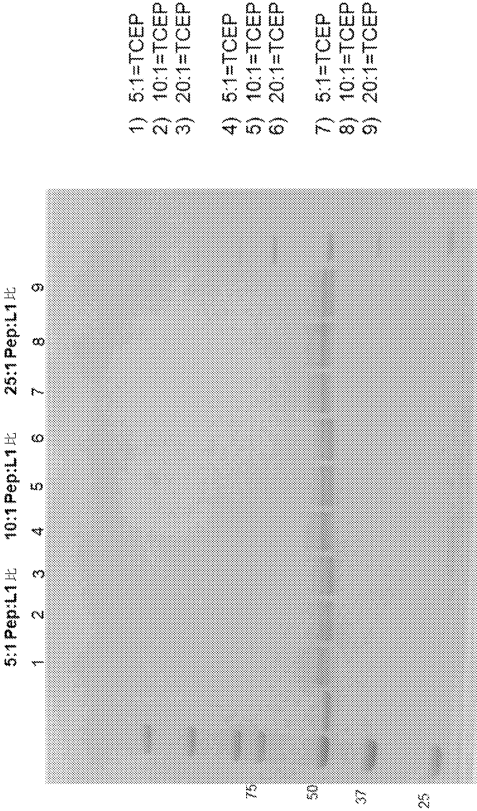
20

30

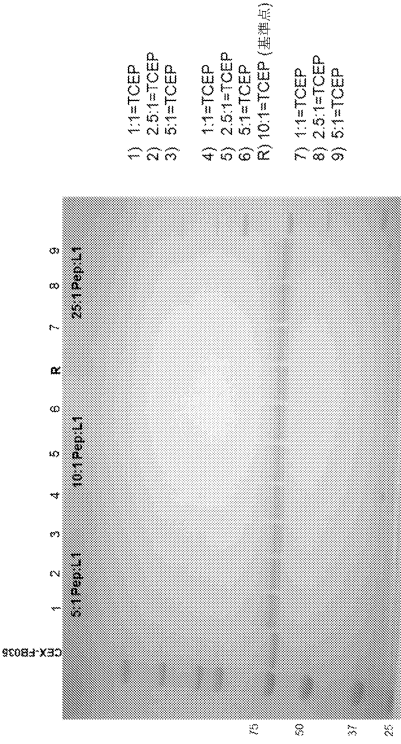
40

50

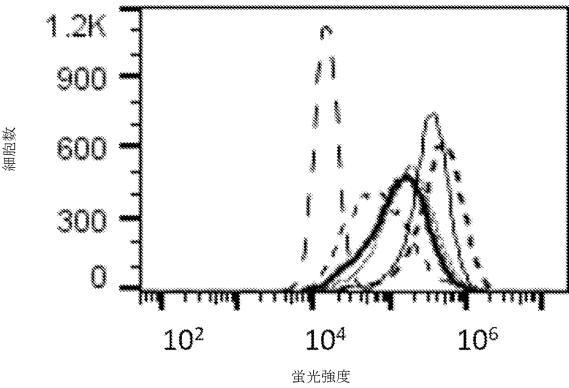
【図 1 6】



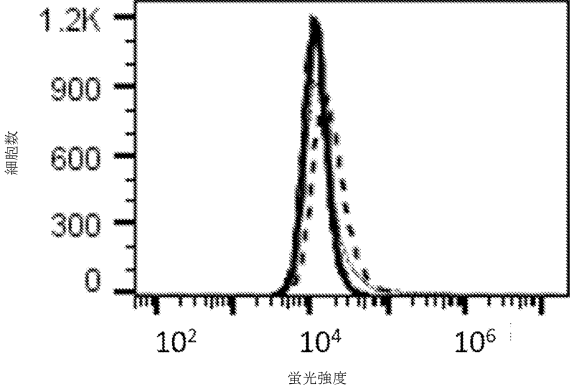
【図 1 7】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

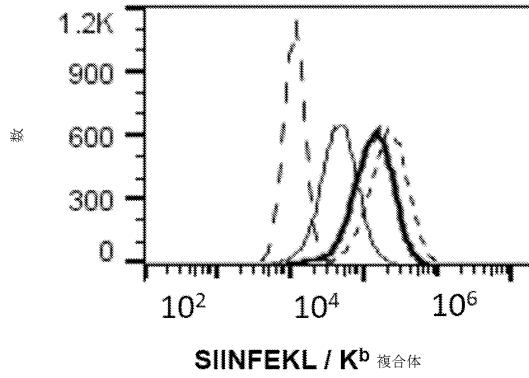
20

30

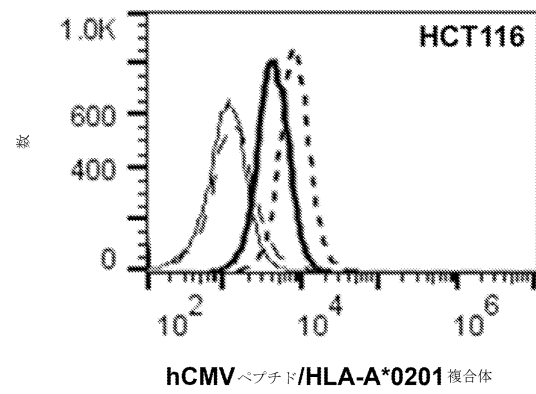
40

50

【図 19】

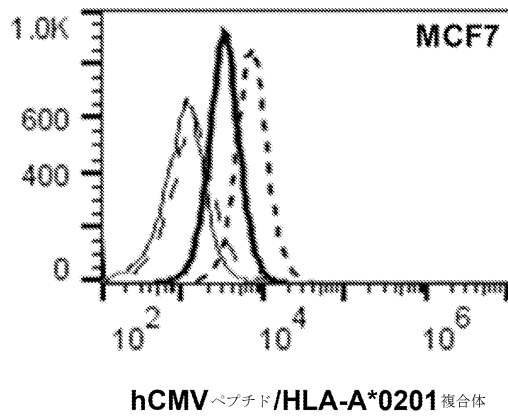


【図 20 A】

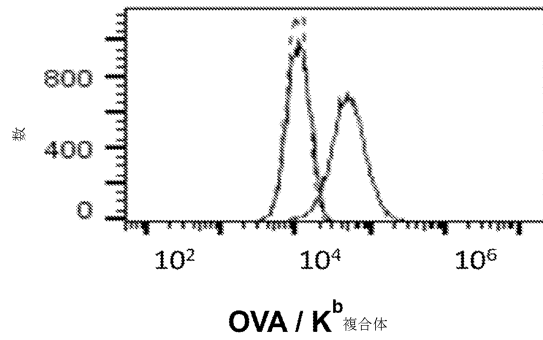


10

【図 20 B】



【図 21 A】



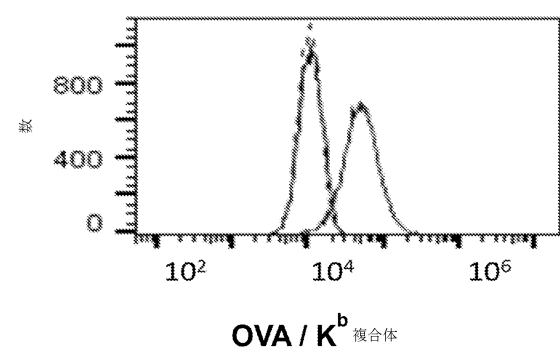
20

30

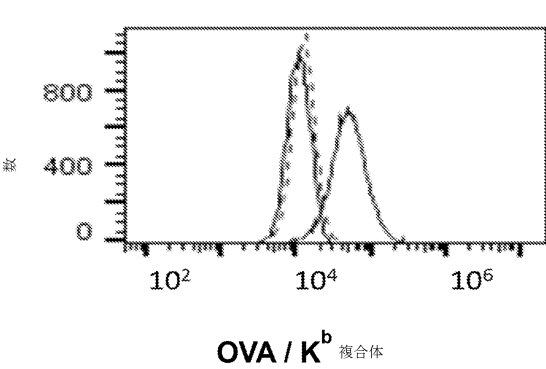
40

50

【図 2 1 B】



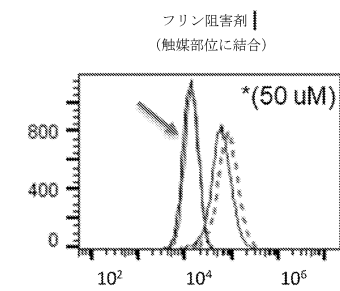
【図 2 1 C】



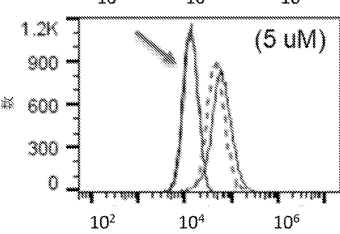
10

【図 2 2】

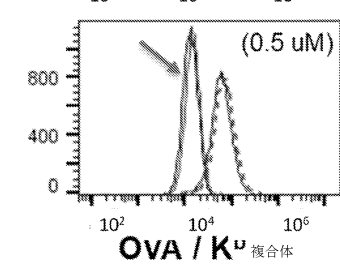
A



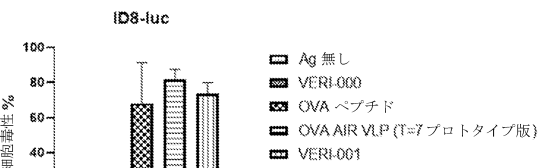
B



C



【図 2 3 A】



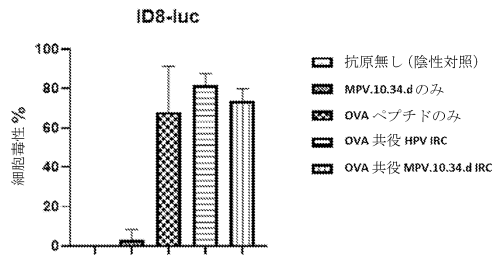
20

30

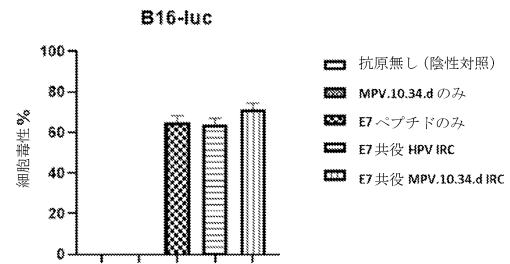
40

50

【図 2 3 B】

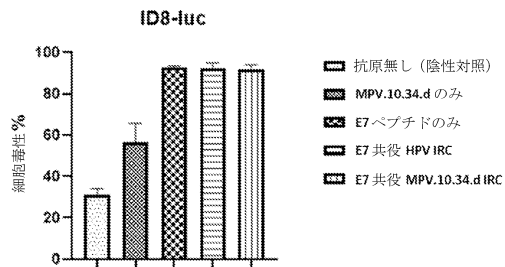


【図 2 4 A】

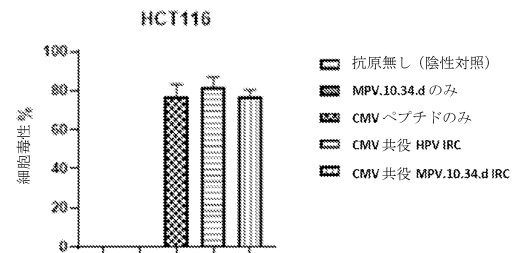


10

【図 2 4 B】

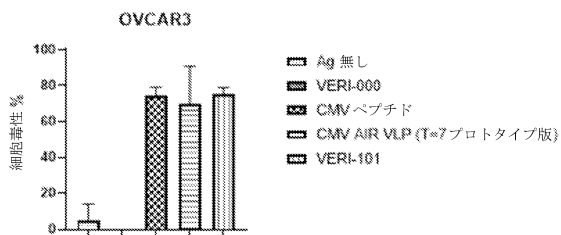


【図 2 5 A】

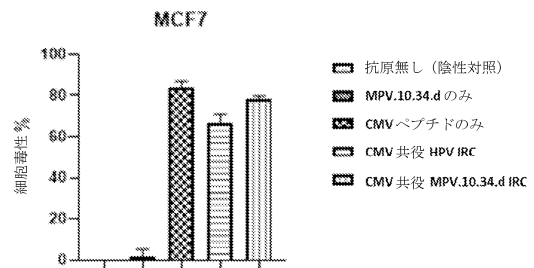


20

【図 2 5 B】



【図 2 5 C】

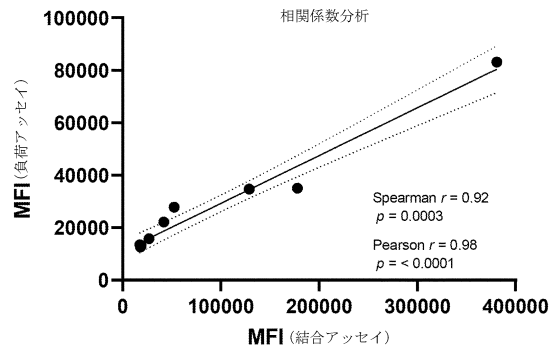


30

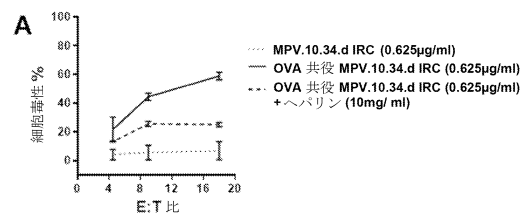
40

50

【図 2 6】

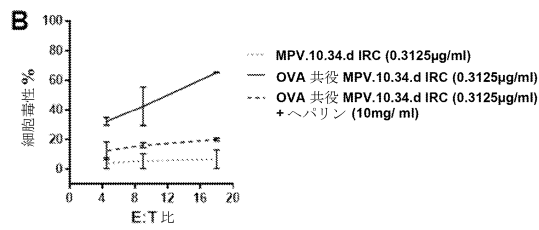


【図 2 7 A】

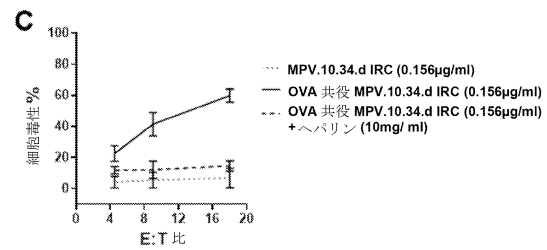


10

【図 2 7 B】



【図 2 7 C】



20

30

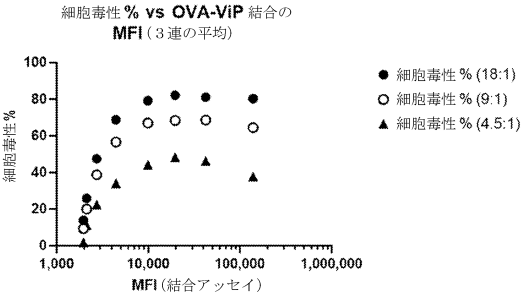
40

50

【図 28】

試料 (OVA-共役 MPV.10.34.d IRC の量, µg/mL)	細胞毒性%平均 (6 回の反復試験)		
	E:T 比 18:1	E:T 比 9:1	E:T 比 4.5:1
試料添加無し	13.7	9.3	1.7
0.000625	25.7	19.9	11.0
0.0025	47.4	38.7	22.3
0.01	68.7	56.5	34.0
0.039	79.0	66.9	44.1
0.156	82.0	68.3	48.2
0.625	81.0	68.5	46.2
2.500	80.2	64.4	37.6

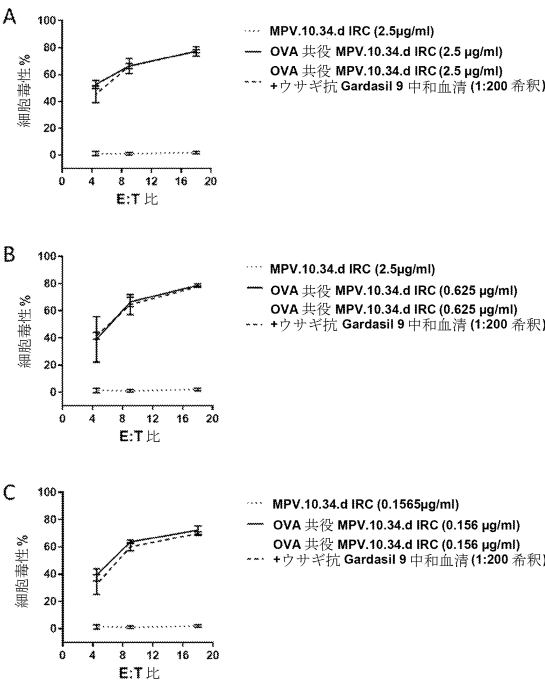
【図 29】



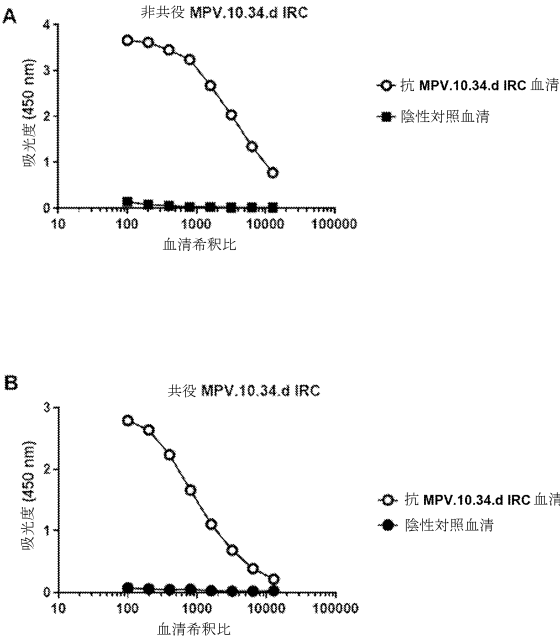
10

20

【図 30】



【図 31】

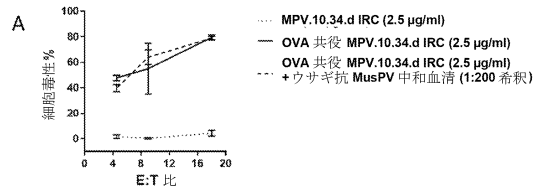


30

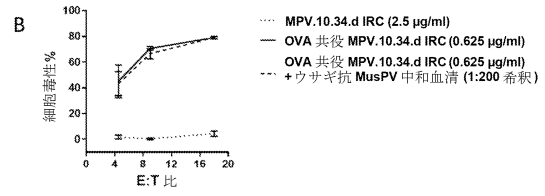
40

50

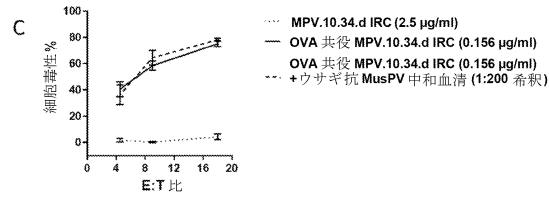
【図 3 2 A】



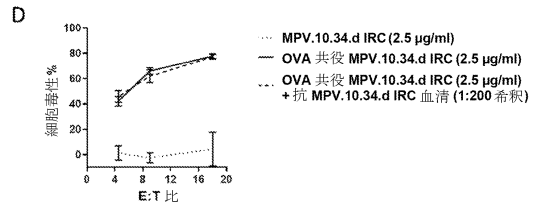
【図 3 2 B】



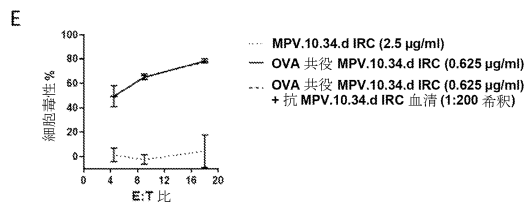
【図 3 2 C】



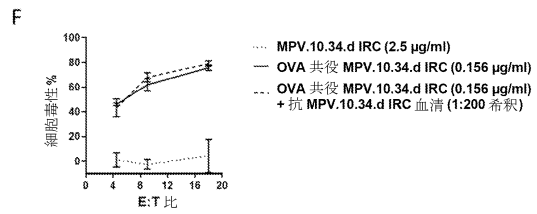
【図 3 2 D】



【図 3 2 E】



【図 3 2 F】



10

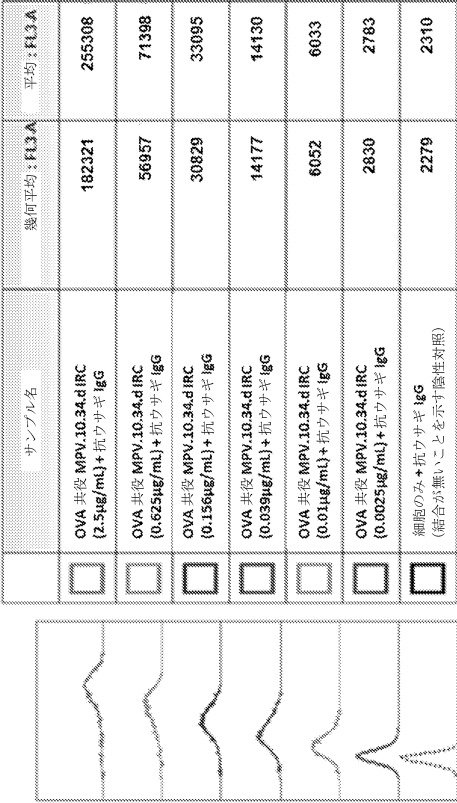
20

30

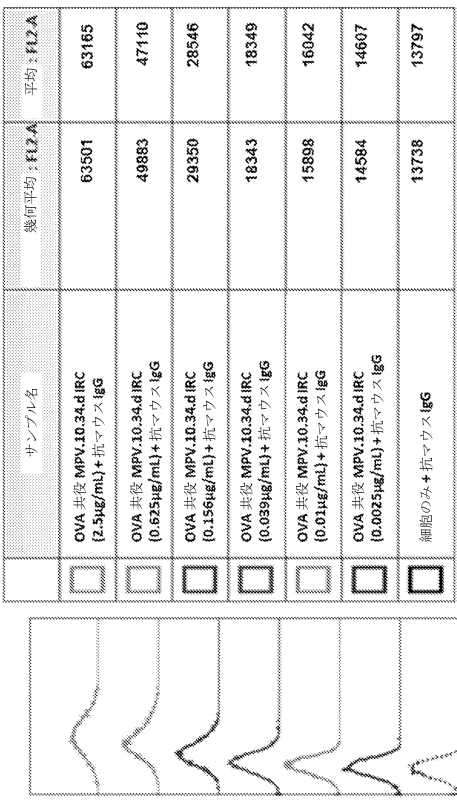
40

50

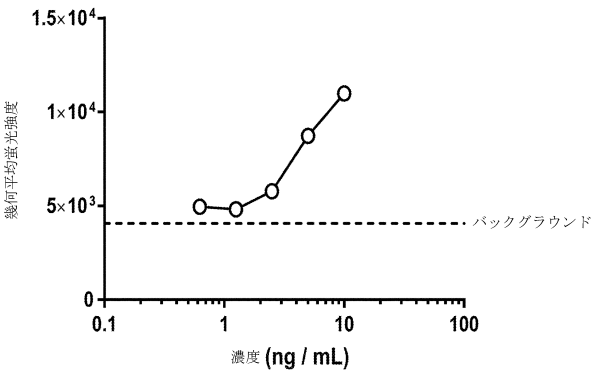
【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



【図 3 4】



【配列表】

2023552040000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和5年7月10日(2023.7.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2023552040000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/12, A61K 39/155, A61K 39/385 (2022.01) CPC - A61K 39/12, A61K 2039/5258, A61K 2039/585, A61K 2039/627		
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	US 2020/0113996 A1 (PATHOVAX LLC) 16 April 2020 (16.04.2020) para [0005]-[0011]; [0018]-[0021]; [0034]-[0035]; [0052]-[0053]; [0065]; [0085]; [0105]-[0109]; [0123]	1-16 ----- 17
A	US 2013/0295125 A1 (UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION) 07 November 2013 (07.11.2013) claim 24; SEQ ID NO: 54	17
A	US 2020/0291072 A1 (VERIMMUNE INC.) 17 September 2020 (17.09.2020) claims 83-95; para [0008]-[0015]	1-17
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 February 2022		Date of mailing of the international search report MAR 08 2022
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 Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55676

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55676

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).

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.

Group I, claims 1-17, directed to a composition comprising a plurality of virus proteins.

Group II, claims 18-21, directed to a method of treating, reducing the occurrence of, inhibiting the progression and/or metastasis of, a cancer in a subject in need thereof.

Group III, claims 22-27, directed to a process for producing a composition comprising a plurality of virus proteins.

—continued on extra sheet—

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.:
1-17

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/55676

--continued from: Box III Unity of invention is lacking--

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

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a plurality of virus proteins, that is not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of a method of treating, reducing the occurrence of, inhibiting the progression and/or metastasis of, a cancer in a subject in need thereof, which comprises administering to the subject a pharmaceutically effective amount of a composition, that is not required by Group I or III.

Group III has the special technical feature of transforming a prokaryotic cell with an expression vector; culturing the transformed prokaryotic cell under conditions that promote expression of the L1 protein, lysing the transformed prokaryotic cells to release expressed L1 protein, and separating cell debris, that is not required by Group I or II.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of a composition, comprising: a plurality of virus proteins, wherein each of said plurality of virus proteins comprises a mutated amino acid sequence of a Papillomaviridae L1 protein; one or more peptides each comprising one or more epitopes from one or more pathogens other than a Papillomaviridae antigenic peptide; wherein the mutated amino acid sequence of the Papillomaviridae L1 protein comprises at least the following mutations with respect to the wild type L1 protein sequence: (a) a deletion of at least five amino acid residues from an amino-terminus, and (b) a deletion of at least ten amino acid residues from the helix four region, wherein the one or more peptides are attached to the plurality of virus proteins, and wherein said plurality of virus proteins spontaneously assemble to form an icosahedron or dodecahedron capsid having a triangulation number T equal to 1 that binds to proteoglycan expressed on tumor cells.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is previously made obvious by US 2020/0113996 A1 to PATHOVAX LLC (16 April 2020), (hereinafter "Pathovax").

Pathovax teaches a composition, comprising:

a plurality of virus proteins (para [0005] "a chimeric virus-like particle (VLP) assembled from a polypeptide comprising a papilloma virus (PV) L1 protein, a recombinant PV L1 protein or a PV L1 protein and L2 protein"), wherein each of said plurality of virus proteins comprises a mutated amino acid sequence of a Papillomaviridae L1 protein (para [0085] "variants of the L1 and the L2 protein can also be used...For example, one can use a truncated L1, lacking up to 10 amino acids from its N-terminus or lacking up to 30 amino acids from its C-terminus"); one or more peptides each comprising one or more epitopes from one or more pathogens other than a Papillomaviridae antigenic peptide (para [0005] "The chimeric VLP of this invention also comprises a target peptide(s). A target peptide as defined herein comprises a T cell epitope"; [0021] "the target peptide comprises a CD8+ T cell epitope of one or more human pathogens, e.g., a parasite, a bacterium, or a virus"); wherein the mutated amino acid sequence of the Papillomaviridae L1 protein comprises at least the following mutation with respect to the wild type L1 protein sequence: (a) a deletion of at least five amino acid residues from an amino-terminus (para [0085] "one can use a truncated L1, lacking up to 10 amino acids from its N-terminus"), and wherein the one or more peptides are attached to the plurality of virus proteins (para [0018] "and a target peptide comprising a CD8+ T cell epitope derived from a human pathogen is then attached to the VLP to generate a chimeric VLP with a surface displayed target peptide. In an aspect of the invention the target peptide is attached to the L or L2 protein"), and wherein said plurality of virus proteins spontaneously assemble to form an icosahedron or dodecahedron capsid (para [0009] "the VLP is assembled from papillomavirus L1 protein or L1 protein and L2 protein, then subjected to reducing conditions sufficient to reduce the disulfide bonds to sulfhydryl groups of cysteine residues in the VLP while maintaining the capsid-like icosahedron structure of the VLP") that binds to proteoglycan expressed on tumor cells (para [0035] "HPV capsids (VLP and pseudovirions (PsV)) have tumor tropism and directly bind and infect tumor cells...such binding may be heparan sulfate proteoglycan (HSPG) dependent").

Pathovax does not specifically teach the Papillomaviridae L1 protein comprises a deletion of at least ten amino acid residues from the helix four region. However, Pathovax does teach the Papillomaviridae L1 protein comprises deletions of additional portions (para [0085] "one can use a truncated L1, lacking up to 10 amino acids from its N-terminus or lacking up to 30 amino acids from its C-terminus... In another embodiment, a small fusion to a peptide of about 60 amino acids can be used...certain functional portions of the L1 molecule, such as externally exposed "loops" of the protein, can be swapped between molecules from different strains of PV."), and/or comprises a modification in the helix four region to insert a peptide (para [0085] "attachment or insertion of the target peptide and the changes to the L1 and L2 sequences needed for the attachment"; [0087] "embodiments of the invention the target peptide is attached or inserted into the helix B4 loop (e.g. between amino acids 430 and 433 of HPV16 L1)"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art of molecular biology to have used a Papillomaviridae L1 protein comprises a deletion of at least ten amino acid residues from the helix four region in the compositions taught by Pathovax, since replacing these residues during the ordinary course of experimentation could provide a better attachment site for the epitope target proteins.

Pathovax also does not specifically teach the formed icosahedron or dodecahedron capsid having a triangulation number T equal to 1. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art of molecular biology to have modified the composition during the ordinary course of experimentation to modify the triangulation number in order to optimize the properties of the final composition for use.

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

Therefore, Group I-III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	39/385	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	15/33 (2006.01)	C 1 2 N	15/33	
C 1 2 N	15/70 (2006.01)	C 1 2 N	15/70	Z
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z

,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. プルロニック

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ワン, ジョシュア, ウェイユアン

アメリカ合衆国, バージニア州 22301, アレクサンドリア, 2014 ポトマク アベニュー

(72)発明者 マツイ, ケン

アメリカ合衆国, メリーランド州 21703, フレデリック, 4910ビー メリディアン ウェイ

(72)発明者 ストーム, フィリップ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94061, レッドウッド シティ, 1665 コネチカット
ドライブ

(72)発明者 ピーター, クリスティン, マリー

アメリカ合衆国, メリーランド州 21136, ライスターズタウン, 409 セイクリッド ハー
ト レーン

F ターム (参考) 4B065 AA26X AB01 BA02 CA24 CA44
4C085 BA07 BA51 CC07 CC08 EE03
4H045 AA10 BA10 BA41 CA01 EA20 FA74