

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7258746号  
(P7258746)

(45)発行日 令和5年4月17日(2023.4.17)

(24)登録日 令和5年4月7日(2023.4.7)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00		
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00		
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06		
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08		

請求項の数 17 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-515292(P2019-515292)	(73)特許権者	517199709
(86)(22)出願日	平成29年9月6日(2017.9.6)		パロ セラピューティクス オイ
(65)公表番号	特表2019-532631(P2019-532631 A)		VALO THERAPEUTICS OY
(43)公表日	令和1年11月14日(2019.11.14)		フィンランド, 00790 ヘルシンキ
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/072366		, ヴィーキカアリ 6, カルチベータ 1
(87)国際公開番号	WO2018/059896		Cultivator 1, Viiki
(87)国際公開日	平成30年4月5日(2018.4.5)		nkaari 6, 00790 Hels
審査請求日	令和2年8月31日(2020.8.31)	(74)代理人	100149294
(31)優先権主張番号	1616365.1		弁理士 内田 直人
(32)優先日	平成28年9月27日(2016.9.27)	(72)発明者	セルロ, ピンチェンツォ
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		フィンランド, エフアイ - 00330
前置審査		(72)発明者	ヘルシンキ, ウィマリンボルク 10 シ
			- 15
			カパッソ, クリスチャン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンベロープウイルスの非遺伝的改変

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病 (NDV) ウイルスからなる群から選択される改変エンベロープウイルスであって、前記ウイルスが、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドを形成するコレステロールのいずれかをN末端またはC末端に複合化した抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを少なくとも1つ有し、前記複合ペプチドが、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用して、非共有結合的にウイルスエンベロープに付着しもしくは挿入され、またはウイルスエンベロープを介して挿入され、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50アミノ酸からなる群から選択される長さを有する、改変エンベロープウイルス。

【請求項2】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの複数が、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用して、非遺伝的に、ウイルスエンベロープに付着するもしくは挿入される、またはウイルスエンベロープを介して挿入される、請求項1に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 3】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが同一であるか、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが互いに 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% を超える配列同一性を有するか、または前記ペプチドが多く異なる抗原を提示する、請求項 2 に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 4】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、MHC - I 拘束性である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 5】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、MHC - II 拘束性である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

10

## 【請求項 6】

前記ペプチドは、MHC - I 拘束性抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドおよび MHC - II 拘束性抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの混合物を含む、請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 7】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、複数の異なる抗原を含む融合分子を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 8】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、少なくとも 1 つの切断部位も含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

20

## 【請求項 9】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、少なくとも 1 つの免疫プロテアソームプロセッシング部位も含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 10】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、1 組の免疫プロテアソームプロセッシング部位の間に配置され、その上流または下流は、少なくとも 1 つの切断部位である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。

## 【請求項 11】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である GRKKRRQR  
 RRPQ (配列番号 1) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である RQIKIWFQ  
 NRRMKWK (配列番号 2) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である KLALKLAL  
 KALKALKA (配列番号 3) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である RRRRRRRR  
 R (配列番号 4) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である KETWWE  
 TWTEWSQPKKKRKV (配列番号 5) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である AGYLLGKI  
 NLKALALAKKIL (配列番号 6) ;  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端の CPP 配列である AGLWRALW  
 RLLRSLWRLLWRA (配列番号 7) ; および  
 前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドの N または C 末端のコレステロール部分  
 からなる群から選択される細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのい  
 ずれかに複合化される、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の改変エンベロープ  
 ウイルス。

30

40

## 【請求項 12】

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、

50

- GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIIINF EKLTEW (配列番号8) ;
- RQIKIWFQNR RMKWKKRWEKISIIINF EKLYK LK (配列番号9) ;
- KLALKLALKALKAALKLARWEKISIIINF EKLYK LK (配列番号10) ;
- RRRRRRRRRRRWEKISIIINF EKLYK LK (配列番号11) ;
- RWEKISIIINF EKLYKLRRRRRRRRR (配列番号12) ;
- RWEKISIIINF EKLYK LKETWWETWWTEWSQP KKKRKV (配列番号13) ;
- RWEKISIIINF EKLYKLAGYLLGKINLKALAAALAKKIL (配列番号14) ;
- AGLWRALWRL LRS LWRL LWRARWEKISIIINF EKLYK LK (配列番号15) ;
- GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EKLYK L (配列番号16) ;
- GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EK L (配列番号17) ;
- GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EKLYKL RWEKISIIINF EK L (配列番号18) ;
- LEQLESIIINF EKLTEWRVRRALIS C - コレステロール (配列番号19) ;
- コレステロール - CRVRRALISLEQLESIIINF EKLTEW (配列番号20) ;
- コレステロール - CSIIINF EK L (配列番号21) ;
- コレステロール - CRWEKISIIINF EK L (配列番号22) ;
- コレステロール - CRWEKISVYDF FVWLYKL RWEKISIIINF EK L (配列番号23) ;
- GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIIINF EKLTEW - FITC (配列番号24) ;
- RQIKIWFQNR RMKWKKRWEKISIIINF EKLYK LK - FITC (配列番号25) ;
- KLALKLALKALKAALKLARWEKISIIINF EKLYK LK - FITC (配列番号26) ;
- RRRRRRRRRRRWEKISIIINF EKLYK LK - FITC (配列番号27) ;
- FITC - RWEKISIIINF EKLYKLRRRRRRRRR (配列番号28) ;
- FITC - RWEKISIIINF EKLYK LKETWWETWWTEWSQP KKKRKV (配列番号29) ;
- FITC - RWEKISIIINF EKLYKLAGYLLGKINLKALAAALAKKIL (配列番号30) および
- GLWRALWRL LRS LWRL LWRARWEKISIIINF EKLYK LK - FITC (配列番号31)
- からなる群から選択される、請求項1.1に記載の改変エンベロープウイルス。 40
- 【請求項13】
- 単純ヘルペスウイルス1 (HSV - 1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV - 2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病 (NDV) ウイルスからなる群から選択され、非遺伝的に改変された異なるエンベロープウイルスと組み合わせて提供される、請求項1から1.2のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルス。
- 【請求項14】
- 前記組み合わせは、非遺伝的に前記ウイルスのウイルスエンベロープに付着しもしくは挿入され、またはウイルスエンベロープを介して挿入され、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかに複合化した少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペ

プチドを含むように改変される前記ウイルスのいずれかを、2、3、4、5、6または7つ含む、請求項13に記載の改変エンベロープウイルス。

【請求項15】

請求項1から14のいずれか一項に記載の改変エンベロープウイルスと、適切な担体とを含む、医薬組成物。

【請求項16】

単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病(NDV)ウイルスからなる群から選択される改変エンベロープウイルスであって、前記ウイルスが、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドを形成するコレステロールのいずれかをN末端またはC末端に複合化した抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを少なくとも1つ有し、前記複合ペプチドが、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用してウイルスエンベロープに付着しもしくは挿入され、またはウイルスエンベロープを介して挿入され、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50アミノ酸からなる群から選択される長さを有する、改変エンベロープウイルスの、癌を治療するための医薬の製造における使用。

【請求項17】

i) 少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを発現する改変ウイルス；及び  
ii) 単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病(NDV)ウイルスからなる群から選択されるエンベロープウイルスであって、前記エンベロープウイルスが、細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドを形成するコレステロールのいずれかをN末端またはC末端に複合化した前記少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを使用して、ウイルスエンベロープに非共有結合的に付着したもしくは挿入された、またはウイルスエンベロープを介して挿入された、前記i)の抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドと同じ少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドまたは前記i)の抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドと90%を超える配列同一性を有する少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有し、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50アミノ酸からなる群から選択される長さを有する、エンベロープウイルスを含む、医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変エンベロープウイルスであって、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有する、改変エンベロープウイルス、それを含む医薬組成物、およびそれを使用して癌を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

有効な癌治療薬に対する現在のパラダイムは、腫瘍浸潤性腫瘍特異的エフェクターT細胞の活性の増強およびその量の増加である。CD8+ T細胞と名づけられたこれらのエフェクターT細胞、特に細胞傷害性T細胞リンパ球(CTL)は、腫瘍に対する防御免疫応答の重要な構成要素である。これらの腫瘍特異的CTLは、腫瘍組織に見出すことができ、腫瘍浸潤CTLの量と患者の生存の間に明らかな相関関係がある。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

腫瘍微小環境内における負のフィードバック系を妨げるよう機能し、既存の抗腫瘍免疫応答を増大させるPD-1、PD-L1およびCTLA-4などの免疫チェックポイント分子を標的とする抗体の最近の認可は、非常に大きな臨床上の刺激をもって迎えられた。これらの免疫チェックポイントインヒビター抗体の使用は、癌患者の10~20%に長続きする応答をもたらすことができる。しかしながら、残りの80~90%の患者は、抗腫瘍免疫応答の欠如または腫瘍微小環境のその他の免疫抑制側面のために応答しない。チェックポイントインヒビター療法に回答する患者集団を拡大するために、本発明者らは、広い抗腫瘍免疫を増大させるまたは引き起こすためおよび腫瘍特異的なエフェクターT細胞を腫瘍微小環境にリクルートするためのPeptiENVと呼ばれるエンベロープウイルスベクタープラットフォームを開発した。

10

## 【0004】

有利にも、本発明者らは、免疫賦活性PeptiENVウイルスおよび免疫チェックポイントインヒビター抗体の組み合わせにより患者を治療することによって、免疫チェックポイントインヒビター療法に対するレスポンスの量が増加することを予想している。

## 【0005】

本特許出願は、PeptiENVプラットフォームについて記載し、これは、後で、抗原提示細胞上に容易に交差提示され得る免疫調節ペプチドをウイルスエンベロープにコーティングおよび挿入する新規の方法を含む。現在、免疫系を活性化する目的でペプチドをウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させる方法は存在しない。WO2005/060541は、ウイルス膜を崩壊させ、破壊するためにウイルス外被に挿入される抗ウイルスペプチドについて教示している。

20

## 【0006】

一部のウイルスは、その防御タンパク質カプシドを覆うウイルスエンベロープを有する。エンベロープは、一般に宿主細胞膜(リン脂質およびタンパク質)の部分に由来するが、いくつかのウイルス糖タンパク質を含む。これは、ウイルスが宿主免疫系を回避するのに役立つ場合もある。エンベロープの表面にある糖タンパク質は、宿主の膜にあるレセプター部位を特定し、それと結合する役割をする。ウイルスエンベロープは、その後、宿主の膜と融合して、カプシドおよびウイルスゲノムが宿主に侵入し、感染させるのを可能にする。ウイルス膜と宿主細胞膜の融合による宿主細胞への侵入に加えて、一部のウイルスは、代わりに侵入機構としてエンドサイトーシスを使用する場合がある。

30

## 【0007】

本質的に、本発明者らは、既知の治療的および臨床的に認められたウイルスを使用し、抗ウイルス免疫を犠牲にして抗腫瘍免疫を増大させる新規の方法を発見した。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

第1の態様によると、単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、マラウイルスおよびニューカッスル病(NDV)ウイルスを含む群から選択される改変エンベロープウイルスであって、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有する、改変エンベロープウイルスが提供される。

40

## 【0009】

本明細書における改変エンベロープウイルスに対する言及は、そのウイルスエンベロープに前記少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを含むよう非遺伝的に改変されたウイルスに対するものである。誤解を避けるために、前記ウイルスは、それを目的に適した状態にする任意のその他の遺伝的改変を含んでも、または含まなくてもよいが、ウイルスエンベロープへまたはそれを通過させた前記少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプ

50

チドの付着は非遺伝的に行われる。

【 0 0 1 0 】

当業者は、一部のウイルスが、その防御タンパク質カプシドを覆うウイルスエンベロープを有することを認識するであろう。エンベロープは、一般に宿主細胞膜（リン脂質およびタンパク質）の部分に由来するが、いくつかのウイルス糖タンパク質を含む。これは、ウイルスが宿主免疫系を回避するのを助ける場合もある。エンベロープの表面にある糖タンパク質は、宿主の膜にあるレセプター部位を特定し、それと結合する役割をする。感染の過程において、ウイルスエンベロープは、宿主の膜と融合し、カプシドおよびウイルスゲノムが宿主に侵入し、感染させることを可能にする。したがって、ウイルスエンベロープに付着させられたか、またはそれに挿入されたか、またはそれを通過させられたペプチドを抗原として使用して、免疫応答を誘発することができる。

10

【 0 0 1 1 】

本明細書における抗腫瘍ペプチドに対する言及は、腫瘍に対して免疫応答を誘発することができるペプチドに対するものである。

【 0 0 1 2 】

本明細書における腫瘍特異的ペプチドに対する言及は、特定の1つ以上の腫瘍に対して免疫応答を誘発することができるペプチドに対するものである。

【 0 0 1 3 】

好適な実施形態において、前記ペプチドは、患者で同定されたもの、または患者固有のものである。

20

【 0 0 1 4 】

当業者には明白なとおり、ペプチドの厳密な性質は、治療される腫瘍の性質に関連して変化する場合があり、実際に、技術の特異性は、さまざまな抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドがさまざまなタイプの癌が現れている個体を治療するために使用されることになり、さまざまな抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが同じタイプの癌が現れている個体を治療するために使用されてもよいことを意味する。

【 0 0 1 5 】

本発明のさらに別の実施形態において、前記ペプチドは、8～50の間のアミノ酸長、理想的には15～35アミノ酸長である。最も理想的には、前記ペプチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50アミノ酸を含む群から選択される長さを有する。

30

【 0 0 1 6 】

最も理想的には、複数の前記ペプチドは、ウイルスエンベロープに付着させられるか、またはそれに挿入される/それを介して挿入される。これらのペプチドは、同一であってもよく、または軽微な改変のみ、すなわち、互いに90%を超える配列同一性、最も理想的には、互いに92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超える配列同一性を有する同じ抗原であってもよい。あるいは、多くの異なる抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられるか、またはそれに挿入される/それを介して挿入される。

40

【 0 0 1 7 】

より好ましくは、前記ペプチドはまた、以下に限定されないが、カテプシン切断部位またはフューリン切断部位などの少なくとも1つの切断部位を含む。より好ましくは、さらに、前記ペプチドは、少なくとも1つの免疫プロテアソームプロセッシング部位を含む。これらの部位および複合ペプチドの構造に対するその相対的な配置の例を図7に示す。理想的には、1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドが1組の免疫プロテアソームプロセッシング部位の間に配置され、その上流は、少なくとも1つの切断部位、理想的にはフューリン切断部位であり、それにカテプシン切断部位が（上流に）続く。

【 0 0 1 8 】

50

有利にも、本発明者らは、これらのペプチドが、選択されたエンベローブウイルス（H S V - 1 および - 2、ワクシニア、V S V、M e V、マラバウイルスならびにN D V）に付着させられるか、またはそれに挿入される / それを介して挿入された場合、抗ウイルス免疫を抗腫瘍免疫に変えることによって増加した腫瘍特異的な免疫応答を誘発し、抗腫瘍効果を激しく増大させることができることを発見した。

【0019】

他と比較してこのプラットフォームの簡潔さは、患者で同定された抗腫瘍誘発腫瘍特異的ペプチドを非遺伝的にウイルスエンベローブに付着させるか、またはそれに挿入する / それを介して挿入することによって、医学的に認められたウイルスを臨床的に使用することができることである。これは、単に前記患者由来の腫瘍特異的ペプチドの新規のセットでウイルスをコーティングすることによって、M H C - I 上に提示される患者の腫瘍抗原の変化に非常に急速に反応することができることを意味する。

10

【0020】

本発明の別の重要な特徴は、遺伝的に導入された改変を有するウイルスは、新しい改変またはペプチドが導入される度に検査段階を通過する必要があるため、これらのプラットフォームを個別化医療に使用するのが実質的に不可能になる他のプラットフォームと比較して、このプラットフォームに選択されるウイルスは、たった一度厳格な品質管理および認可段階を通過する必要があるだけであるため、時間および費用の節約になることである。

【0021】

本発明の別の好適な実施形態において、前記ペプチドは、（P e p S c a nまたはO n t o r e sから購入した）細胞透過性ペプチドまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用して、前記ウイルスエンベローブに付着させられるか、またはそれに挿入される / それを介して挿入される。

20

【0022】

当業者に知られているとおり、細胞透過性ペプチド（C P P）は、（ナノサイズの粒子から小さな化学分子およびD N Aの大きなフラグメントまで）さまざまな分子装置の細胞の摂取 / 取り込みを促進する短いペプチドである。この「カーゴ」は、共有結合を介した化学結合または非共有結合性相互作用のいずれかによりペプチドと結びつけられる。C P Pの働きは、エンドサイトーシスにより通常生じるプロセスである、カーゴを細胞に送達することである。

30

【0023】

C P Pは、一般に高い相対的存在量のリジンもしくはアルギニンなどの正電荷アミノ酸を含むか、または極性 / 電荷アミノ酸および非極性疎水性アミノ酸の交互のパターンを含む配列を有するかのいずれかのアミノ酸組成を有する。これら2種類の構造は、それぞれポリカチオン性または両親媒性と呼ばれる。C P Pの第3のクラスは、低い正味荷電の無極性残基のみを含む疎水性ペプチドであるか、または細胞の取り込みに非常に重要な疎水性アミノ酸グループを有する。

【0024】

本発明は、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドと連結される場合に、任意の既知のC C Pの使用を想定する。

40

【0025】

作用のメカニズムの説明によって縛られることを望まないが、本発明者らは、C P Pは、通常そのカーゴを、脂質二重層を介して送達するが、本発明者らの免疫源性ペプチドとともにC P P配列から成るペプチドは、部分的に脂質二重層を通過する一方で、その一部は、場合によって、物理的な疎水性・親水性相互作用により、排他的ではないにしても、本発明者らの目的に対しては十分に膜に固着するようであることを考慮する。

【0026】

前記ペプチドと複合体形成される場合のC P Pの例を図7 Bに示す。

【0027】

これもまた当業者に知られているとおり、コレステロール複合ペプチドは、コレステロ

50

ールに付着させられた短いペプチドである。本発明者らは、それらがウイルスエンベロープに入り、その結果、複合ペプチドをウイルス外被内に固定することを発見した。これらのペプチドは、N末端またはC末端にコレステロール複合体が形成されてもよい。

【0028】

再び、作用のメカニズムの説明によって縛られることを望まないが、本発明者らは、コレステロールは脂質膜の構成成分であるため、コレステロール複合ペプチドが膜のその「通常の」場所を見つけることを考慮する。実際、本発明者らは、コレステロールにあるヒドロキシ基が膜リン脂質およびスフィンゴ脂質の極性頭部基と相互作用する一方で、他方の脂質の非極性脂肪酸鎖に並んで大きいステロイドおよび炭化水素鎖は膜に埋め込まれると推測する。

10

【0029】

コレステロール複合ペプチドの例を図7Aに示す。

【0030】

本発明の好適な実施形態において、前記エンベロープに付着させるか、またはそれに挿入する/それを介して挿入するためのペプチドは、

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にGRKKRRQRRRPQ(配列番号1)CPP配列；

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にRQIKIWFQNRMRMKWK(配列番号2)CPP配列；

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にKLALKLALKALKAA(配列番号3)CPP配列；

20

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にRRRRRRRR(配列番号4)CPP配列；

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にKETWETWTEWSQPKKKRK(配列番号5)CPP配列；

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にAGYLLGKINLKALAA(配列番号6)CPP配列；

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのNもしくはC末端にAGLWRALWRLRLSLWRLLWRA(配列番号7)CPP配列；または

前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドのコレステロール部分NまたはC末端を含む。

30

【0031】

さらに別の本発明の好適な実施形態において、前記エンベロープに付着させるか、またはそれに挿入する/それを介して挿入するためのペプチドは、以下のものの1つを含み、配列SIINF EK Lは、MHC-I拘束性エピトープまたはペプチドの単なる代表である：

【0032】

CPPペプチド：

GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINF EK LTEW(配列番号8)

RQIKIWFQNRMRMKWKRW EK IS I INF EK LYK L K(配列番号9)

40

KLALKLALKALKAAKLARW EK IS I INF EK LYK L K(配列番号10)

RRRRRRRRRRRW EK IS I INF EK LYK L K(配列番号11)

RW EK IS I INF EK LYK L RRRRRRRRRR(配列番号12)

RW EK IS I INF EK LYK L K ETWETWTEWSQPKKKRK(配列番号13)

RW EK IS I INF EK LYK L AGYLLGKINLKALAAALAKKIL(配列番号14)

AGLWRALWRLRLSLWRLLWRARW EK IS I INF EK LYK L K(配列番号15)

50

GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EKLYKL (配列番号16)  
 GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EK L (配列番号17)  
 GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINF EKLYKL RWEKISIIINF EK  
 L (配列番号18) (ここで、RWEKIおよびYKLRWEKIは、免疫プロテアソーム  
 プロセッシング部位である)。

【0033】

コレステロール複合ペプチド:

LEQLESIIINF EKLTEWRVRRALISC - コレステロール (配列番号19)  
 コレステロール - CRVRRALISLEQLESIIINF EKLTEW (配列番号20)  
 コレステロール - CSIIINF EK L (配列番号21)  
 コレステロール - CRWEKISIIINF EK L (配列番号22) または  
 コレステロール - CRWEKISVYDFVWLYKLRWEKISIIINF EK L (配列番号23)

10

【0034】

したがって、前記抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドは、細胞透過性ペプチドもしくはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用して、前記ウイルスエンベローブに付着させられるか、またはそれに挿入される/それを介して挿入されるのが最も好ましい。

【0035】

一般にウイルス粒子は、それを37 °Cでおよそ15分インキュベートすることによって、前記CPPペプチドまたはコレステロール複合ペプチドと複合体形成させた。

20

【0036】

さらに別の好適な実施形態において、前記改変エンベローブウイルスは、MHC-I特異的であるため、理想的にはCD8<sup>+</sup>T細胞と名づけられたエフェクターT細胞、具体的には細胞傷害性T細胞リンパ球(CTL)の活性化のための抗原提示細胞(APC)上のMHC-I提示により免疫応答を誘発する少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドとともに提供される。

【0037】

さらにまたはあるいは、前記改変エンベローブウイルスは、MHC-II特異的であるため、理想的にはCD4<sup>+</sup>(ヘルパーT)細胞応答の活性化のための抗原提示細胞(APC)上のMHC-II提示により免疫応答を誘発する少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドとともに提供される。

30

【0038】

したがって、本発明はまた、単独で、またはMHC-Iエピトープと組み合わせて、個体の免疫応答を増大させるためのウイルスエンベローブにコーティングされた異なるMHC-I IIエピトープの使用を可能にする。

【0039】

さらにまたはあるいは、本発明は、複数の異なる抗原を含む融合分子を含むペプチドの使用も可能にする。

【0040】

さらにより好ましくは、異なる前記改変エンベローブウイルスの組み合わせであって、前記ウイルスは、単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病(NDV)ウイルスを含む群から選択される、異なる前記改変エンベローブウイルスの組み合わせが提供される。したがって、本発明は、前のウイルスのいずれかの少なくとも2つの使用に関し、さらに前のウイルスのいずれか3、4、5、6または7つの組み合わせの使用にまで拡大する。

40

【0041】

したがって、本発明は、前記ペプチドでコーティングされた特定の種/属のプライム(プライミング)ウイルスによる処置に同じ前記ペプチドでコーティングされた別の特定の種/属のブースト(ブースティング)ウイルス(免疫学的に異なるウイルス)による処置

50

が続く、プライム・ブースト免疫ウイルス療法を可能にする2つの異なるウイルス型またはウイルス骨格の使用に関する。プライム・ブースト免疫ウイルス療法は、プライム・ブースト法によって引き起こされた免疫応答の大部分を前記ペプチドに向けることによって、腫瘍特異的なT細胞免疫応答を劇的にさらに増加させることができる。

【0042】

本発明を行うとき、本明細書に記載されるとおりに改変されたエンベロープウイルスは、本明細書に記載されるとおりに改変されているが、同じペプチドを提示する別のエンベロープウイルスまたは同じペプチドを提示するよう遺伝的もしくは非遺伝的に改変されたアデノウイルスなどの任意のその他のウイルスと組み合わせることでプライム・ブースト免疫ウイルス療法に使用されてもよい。

10

【0043】

当業者は、エンベロープウイルス、すなわち、単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1) は、最も研究されている腫瘍崩壊エンベロープウイルスであり、T-VEC (Imlygic) と呼ばれるHSV-1の遺伝子操作型は、第III相臨床試験において効果を示した最初の腫瘍崩壊性ウイルスであり、手術ができない黒色腫の治療用にFDAおよびEMAの両方によって認可された最初の腫瘍崩壊性ウイルスであるため、これらの治療および臨床的に認められたウイルスの抗ウイルス免疫を犠牲にして抗腫瘍免疫をブーストする新規の方法を導入することが決定的に重要であることを認識するであろう。

【0044】

したがって、本発明の第2の態様によると、  
1) 単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病 (NDV) ウイルスを含む群から選択される改変エンベロープウイルスであって、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有する、改変エンベロープウイルスと、  
2) 適した担体と  
を含む医薬組成物が提供される。

20

【0045】

したがって、本発明の第3の態様によると、癌を治療するための方法であって、単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病 (NDV) ウイルスを含む群から選択される改変エンベロープウイルスに個体を曝露するステップを含み、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有する、方法が提供される。

30

【0046】

より好ましくは、さらに、前記方法は、選択された期間の後、単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、麻疹ウイルス (MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病 (NDV) ウイルスを含む群から選択される別の改変エンベロープウイルスに前記個体を曝露するステップを伴い、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを有し、さらに前記ウイルスは、事前の曝露に使用されたものとは異なる。あるいは、プライム・ブースト免疫ウイルス療法において、前記方法は、選択された期間の後、これもまた遺伝的もしくは非遺伝的に同じペプチドを提示するよう改変されたアデノウイルスなどの任意の別のウイルスに前記個体を曝露するステップを伴う。あるいは、さらにもう一度、前記方法は、ブースター療法を提供するために、選択されたペプチドを発現するよう遺伝的もしくは非遺伝的を含むいずれかの方法で改変された任意のウイルスを最初に使用し、続いて、同じペプチドを有する本発明の改変ウイルスを使用するこ

40

50

とによって実施されてもよい。

【0047】

このようにプライム・ブースト免疫ウイルス療法を実施することができる。

【0048】

理想的には、ウイルスに個体を曝露する前記ステップは、腫瘍内、結節内、腹腔内または静脈内注射を含む。

【0049】

最も好ましくは、本明細書において言及される癌としては、以下の癌のいずれか1つ以上が挙げられる：上咽頭癌、滑膜癌、肝細胞癌、腎癌、結合組織の癌、黒色腫、肺癌、腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、脳癌、咽喉癌、口腔癌、肝癌、骨癌、膵癌、絨毛癌、ガストリン産生腫瘍、褐色細胞腫、プロラクチン産生腫瘍、T細胞白血病/リンパ腫、神経腫、フォンヒッペル・リンダウ病、ゾリンジャー・エリソン症候群、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、尿管癌、脳癌、乏突起神経膠腫、神経芽腫、髄膜腫、脊髄腫瘍、骨癌、骨軟骨腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、原発不明癌、カルチノイド、消化管カルチノイド、線維肉腫、乳癌、パジェット病、子宮頸癌、結腸直腸癌、直腸癌、食道癌、胆嚢癌、頭部癌、眼癌、頸部癌、腎臓癌、ウィルムス腫瘍、肝癌、カポジ肉腫、前立腺癌、肺癌、精巣癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、口腔癌、皮膚癌、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、内分泌膵癌、グルカゴノーマ、膵癌、副甲状腺癌、陰茎癌、下垂体癌、軟部組織肉腫、網膜芽細胞腫、小腸癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜癌、胞状奇胎、子宮癌、子宮内膜癌、陰癌、外陰癌、聴神経腫瘍、菌状息肉腫、インスリノーマ、カルチノイド症候群、ソマトスタチノーマ、歯肉癌、心臓癌、口唇癌、髄膜癌、口癌、神経癌、口蓋癌、耳下腺癌、腹膜癌、咽頭癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌および扁桃癌。

【0050】

本発明の別の実施形態において、少なくとも1つの抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドを発現する改変ウイルスに個体を曝露するステップの後、または単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、ワクシニア、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、マラバウイルスおよびニューカッスル病(NDV)ウイルスを含む群から選択されるエンベロープウイルスに前記個体を曝露するステップの後のいずれかで、前記ウイルスは、ウイルスエンベロープに非遺伝的に付着させられたか、またはそれに挿入された/それを介して挿入された同じまたは大部分が同じ前記ペプチドを有し、チェックポイントインヒビターに前記個体を曝露するステップを含む方法。チェックポイントインヒビターは、PD-1、PD-L1およびCTLA-4などの免疫チェックポイント分子を阻害する。

【0051】

本発明の添付の特許請求の範囲においておよび先行する明細書において、明確な言語または必然的含意のため文脈がそうでないことを必要とする場合を除いて、「含む(comprises)」、または「含む(comprising)」もしくは「含むこと(including)」などの変形は、包括的な意味で使用される。すなわち、本発明のさまざまな実施形態において明記した特徴の存在を規定するが、さらなる特徴の存在または追加を除外しない。

【0052】

本明細書において引用されているあらゆる特許または特許出願を含む、すべての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。どの参考文献も先行技術を構成すると認めるものではない。さらにどの先行技術も当該技術分野における通常の一般知識の一部を構成すると認めるものではない。

【0053】

本発明のそれぞれの態様の好適な特徴は、任意の他の態様に関連して記載されるとおりであってよい。

【0054】

本発明の他の特徴は、以下の例から明白になるであろう。一般的に言えば、本発明は、

(添付の特許請求の範囲および図を含む)本明細書において開示されている特徴のあらゆる新規のもの、またはあらゆる新規の組み合わせにも及ぶ。したがって、本発明の特定の態様、実施形態または例とともに記載されている特徴、整数、特性、化合物または化学的部分は、矛盾しない限り、本明細書に記載されている任意の他の態様、実施形態または例に対して適用できると理解されるべきである。

【0055】

さらに、別のことが明記されていない限り、本明細書中で開示されているあらゆる特徴は、同じまたは類似の目的にかなう代替的な特徴によって置き換えられてもよい。

【0056】

本明細書の説明および特許請求の範囲全体をとおして、文脈が別のことを必要としない限り、単数は、複数を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、文脈が別のことを必要としない限り、本明細書は、複数ならびに単独を意図すると理解されるべきである。

【0057】

次に、本発明の実施形態を、以下の図を参照して例としてのみ記載する。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】抗腫瘍、腫瘍特異的ペプチドがC P Pまたはコレステロール複合ペプチドのいずれかを使用して、異なるウイルスエンベローブに付着させられたときに、本発明者らが得たデータの概要を示す。

【図2】C P P含有ペプチドを、単純ヘルペスウイルス1のエンベローブに付着させることができることを示すグラフである。C P Pを含有、F I T C 標識ペプチドを、H S V - 1と複合体形成させ、サンドイッチE L I S Aを複合体の検出のために使用した。抗H S V - 1抗体を96ウェルプレートの底部にコーティングし、P e p t i E N V複合体をウェル中でインキュベーションした。結合していない部分を洗浄後、抗F I T C H R P複合抗体をP e p t i E N V複合体の検出のために使用した。図2下側パネルは、C P P含有ペプチドを、H S V - 1と複合体形成させると、拡散時間が短縮されたことを示している。蛍光相関分光法を使用して、H S V - 1と複合体を形成したペプチドの拡散動態を分析した。

【図3-1】上側パネルは、コレステロール含有ペプチドを、ワクシニアウイルスのエンベローブに付着させることができることを示すグラフである。コレステロール含有、F I T C 標識ペプチドを、ワクシニアウイルスと複合体形成させた。36%ショ糖クッションおよび超遠心分離によるP e p t i E N V複合体の精製後、精製した複合体をフローサイトメトリーによって分析した。A. 複合ペプチドを伴わないワクシニアウイルスおよびB. コレステロール含有、F I T C 標識ペプチドと複合体を形成したワクシニアウイルス。下側パネルは、コレステロール含有ペプチドを、ワクシニアウイルスのエンベローブに付着させることができることを示すグラフである。コレステロール含有、F I T C 標識ペプチドを、ワクシニアウイルスと複合体形成させ、複合体の検出にサンドイッチE L I S Aを使用した。抗ワクシニアウイルス抗体を96ウェルプレートの底部にコーティングし、P e p t i E N V複合体をウェル中でインキュベーションした。結合していない部分を洗浄後、抗F I T C H R P複合抗体をP e p t i E N V複合体の検出のために使用した。

【図3-2】コレステロール含有S I I N F E K Lペプチドが、樹状細胞によって容易に提示されることを示すグラフである。マウス脾細胞にコレステロール含有S I I N F E K Lペプチドを適用し、C D 1 1 c陽性D C集団によるM H C IエピトープS I I N F E K Lの提示をフローサイトメトリーによって測定した。

【図4-1】上側パネルは、C P P含有ペプチドをワクシニアウイルスのエンベローブに付着させることができることを示すグラフである。C P P含有、F I T C 標識ペプチドをワクシニアウイルスと複合体形成させた。36%ショ糖クッションおよび超遠心分離によるP e p t i E N V複合体の精製後、精製した複合体をフローサイトメトリーによって分析した。A. 複合ペプチドを伴わないH S V - 1およびB. C P P含有F I T C 標識ペプチドと複合体を形成したH S V - 1。下側パネルは、C P P含有ペプチドをエンベローブ

10

20

30

40

50

ワクシニアウイルスに付着させることができることを示すグラフである。CPP含有、FITC標識ペプチドをワクシニアウイルスと複合体形成させ、複合体の検出にサンドイッチELISAを使用した。抗ワクシニアウイルス抗体を96ウェルプレートの底部にコーティングし、PeptiENV複合体をウェル中でインキュベーションした。結合していない部分を洗浄後、抗FITCHRP複合抗体をPeptiENV複合体の検出のために使用した。

【図4-2】CPP含有SIINFELKLPepチドが樹状細胞によって容易に提示されることを示すグラフである。マウス脾細胞にCPP含有SIINFELKLPepチドを適用し、CD11c陽性DC集団によるMHCIEpitopeSIINFELKLの提示をフローサイトメトリーによって測定した。

【図5】上側パネルは、PeptiENVが非常に低いウイルス量でもDC活性化を誘発することができることを示すグラフである。ワクシニアウイルスをCPPまたはコレステロール含有SIINFELKLPepチドと複合体形成させ、マウス脾細胞の感染に使用した。感染の2時間後、DC活性化マーカーの発現に関してフローサイトメトリーによって樹状細胞を分析した。下側パネルは、PeptiENVが非常に低いウイルス量でもCD11c陽性DCによる特異的抗腫瘍MHCクラスIEpitopeの提示を誘発することができることを示すグラフである。ワクシニアウイルスをCPPまたはコレステロール含有SIINFELKLPepチドと複合体形成させ、マウス脾細胞の感染に使用した。2時間後に、CD11c陽性DC集団によるMHCIEpitopeSIINFELKLの提示をフローサイトメトリーによって測定した。

【図6】PeptiENVウイルス・ペプチド複合体形成がウイルス感染性に影響を与えないことを示すグラフである。PeptiENVの感染性を通常の複合体を形成していないウイルスと比較し、細胞生存率を感染の3日後に測定した。

【図7】A)コレステロール複合免疫調節ペプチドおよびB)N末端の細胞透過性ペプチド配列を有する免疫調節ペプチドを示す概略図である。要素の異なる機能配列に対する色分け：濃いグレー：コレステロール(A)または細胞透過性配列(B)。赤：カテプシンD/E切断部位。青：フーリン切断部位。緑：免疫プロテアソームプロセッシング部位。黒：MHC-I拘束性エпитope。

【図8-1】さまざまな異なるCPP配列を、抗腫瘍ペプチドをウイルスエンベロープに付着させるために使用することができることを示すグラフである。CPP含有、FITC標識ペプチドをワクシニアウイルスと複合体形成させ、複合体の検出にサンドイッチELISAを使用した。抗ワクシニアウイルス抗体を96ウェルプレートの底部にコーティングし、PeptiENV複合体をウェル中でインキュベーションした。結合していない部分を洗浄後、抗FITCHRPR複合抗体をPeptiENV複合体の検出のために使用した。

【図8-2】同上。

【図9】CPP含有ペプチドが全く抗ウイルス効果を有さず、感染性または腫瘍崩壊性効果を失うことなくウイルスエンベロープに安全に付着させることができることを示すグラフである。4つの異なる細胞株、A549、MDMBA436、B16F10およびB16-OVAをウイルス感染性に関して試験し、PeptiENVを未改変ウイルスと比較した。

【図10】CPPまたはコレステロール部分によってウイルスエンベロープに固定された抗腫瘍ペプチドが広範な抗腫瘍免疫を誘発して、腫瘍増殖の増強された抑制およびさらに長い生存期間につながることを示すグラフである。A.Mock(注射媒体のみにより処置された)、ワクシニアウイルスのみ、コレステロール部分によりウイルスエンベロープに付着させられた抗腫瘍ペプチドを伴うPeptiENV(PeptiENVVACV/chol)およびCPP部分によりウイルスエンベロープに付着させられた抗腫瘍ペプチドを伴うPeptiENV(PeptiENVVACV/cpp)の群間の腫瘍増殖の比較。B.PeptiENVVACV/cpp、ワクシニアウイルスのみ、抗腫瘍ペプチド単独(ウイルスなし)またはMockで処置したマウス群のカプラン・マイヤー生

10

20

30

40

50

存期間曲線。C. 処置された腫瘍における腫瘍特異的なT細胞のフローサイトメトリー分析。PeptiENVは、腫瘍特異的なエフェクターT細胞の腫瘍微小環境への広範な浸透を引き起こすことができる。D. 腫瘍微小環境におけるウイルス特異的なT細胞のフローサイトメトリー分析。PeptiENVは、未改変ワクシニアウイルスと同等の抗ウイルス免疫を誘発するが、特に、未改変ワクシニアウイルスによっては示されない広範な抗腫瘍免疫を誘発する。

【図11】PeptiENV VACV/cholおよびPeptiENV VACV/cpp処置マウスが強力な抗腫瘍免疫応答を誘発し、腫瘍再曝露から保護されるが、Mock処置マウスは保護されないことを示すグラフである。500000のB16-OVA細胞を前の腫瘍移植と反対の脇腹に注射し、マウスを14日間追跡した。PeptiENVで処置されたマウスでは腫瘍増殖が観察されなかったが、Mock処置群では腫瘍発生率は100%であった。

10

【図12】CPP部分によって単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)エンベロープに固定された抗腫瘍ペプチドが強力な抗腫瘍免疫を誘発して、腫瘍増殖の増強された抑制につながることを示すグラフである。A. PeptiENV HSV-1/cpp、HSV-1のみおよびMock処置群の腫瘍増殖曲線。B. 処置された腫瘍における腫瘍特異的なT細胞のフローサイトメトリー分析。PeptiENVは、腫瘍特異的なエフェクターT細胞の腫瘍微小環境への広範な浸透を引き起こすことができる。

【図13】CPP含有抗腫瘍ペプチドのウイルスエンベロープに対する高い親和性を確認するための表面プラズモン共鳴(SPR)測定を示すグラフである。2サイト結合動態フィットモデルをSPRデータの解析に使用した。

20

【発明を実施するための形態】

【0059】

特定の説明

材料および方法：

ペプチド：

この研究に使用したペプチドを以下に列挙する。すべて、PepScanから購入した。

CPPペプチド：

GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIIINFEEKLTEW (配列番号8)

30

GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIIINFEEKLTEW-FITC (配列番号24)

RQIKIWFQNRMRMKWKKRWEKISIIINFEEKLYKLLK-FITC (配列番号25)

KLALKLALKALKAAALKLARWEKISIIINFEEKLYKLLK-FITC (配列番号26)

RRRRRRRRRRRWEKISIIINFEEKLYKLLK-FITC (配列番号27)

FITC-RWEKISIIINFEEKLYKLLRRRRRRRRRR (配列番号28)

FITC-RWEKISIIINFEEKLYKLLKETWWETWWTEWSQPKKKRKV (配列番号29)

40

FITC-RWEKISIIINFEEKLYKLAGYLLGKINLKAALAKKIL (配列番号30)

GLWRALWRLRLSLWRLLRWRARWEKISIIINFEEKLYKLLK-FITC (配列番号31)

GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINFEEKL (配列番号17)

GRKKRRQRRRPQRWEKISIIINFEEKLYKLLRWEKISIIINFEEKL (配列番号18)

【0060】

コレステロール複合ペプチド：

LEQLESIIINFEEKLTEWRVRRALISC-コレステロール (配列番号19)

50

FITC - LEQLESIIINF EKLT EWVRRALISC - コレステロール (配列番号 32)  
 コレステロール - CRVRRALISLEQLESIIINF EKLT EW (配列番号 20)  
 コレステロール - CRVRRALISLEQLESIIINF EKLT EW - FITC (配列番号 33)  
 コレステロール - CSIINF EKLT (配列番号 21)  
 コレステロール - CRWEKISIIINF EKLT (配列番号 22)  
 コレステロール - CRWEKISVYDF FVWLYKLRWEKISIIINF EKLT (配列番号 23)

## 【0061】

## 細胞株

ヒト肺癌細胞株 A549、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞株 Verob (B) ならびにマウス黒色腫細胞株 B16/OVA および B16-F10 を、10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Life Technologies)、1% L-グルタミンおよび 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 中、37 / 5% CO<sub>2</sub> で培養した。ヒトリプルネガティブ乳癌細胞株 MD MBA 436 を、10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Life Technologies)、1% L-グルタミンおよび 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI 中、37 / 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

## 【0062】

## ウイルスの産生

単純ヘルペスウイルス 1 を Verob 細胞中で産生し、ショ糖密度勾配超遠心分離により精製し、20 mM MES、100 mM NaCl、30 mM トリス HCl (pH 7.2) 中で溶出した。

## 【0063】

ワクシニアウイルスの Western reserve 株 (VVDD - mDAI - RFP) を A549 細胞中で産生し、36% ショ糖クッション超遠心分離により精製し、1 mM トリス (pH 9.0) 中で溶出した。

## 【0064】

## ELISA

$2.5 \times 10^7$  のワクシニアウイルス粒子を、8  $\mu$ g の CPP ペプチド - FITC またはコレステロール複合ペプチド - FITC のいずれかと 100  $\mu$ l の DMEM 中、37 で 15 分間、複合体形成させた。複合体形成後、結合していないペプチドを、1 mM トリス (pH 9.0) における 36% ショ糖クッションにより超遠心分離 (20,000 g、40 ~ 80 分) によって除去した。ELISA のために、抗ワクシニアポリクローナル抗体 (Abcam) を、maxisorb 96 ウェルイムノプレートに 2  $\mu$ g/ml の濃度で 4 において一晩コーティングした。ワクシニア・ペプチド複合体を、37 または室温で 30 ~ 60 分間インキュベーションし、1 x PBS で 3 回洗浄した。複合体を、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した抗 FITC 抗体 (Abcam) で検出した (2% BSA - PBS 中 1 : 5000 希釈)。

## 【0065】

$2.5 \times 10^7$  の単純ヘルペス 1 ウイルス粒子を、8  $\mu$ g の CPP ペプチド - FITC またはコレステロール複合ペプチド - FITC のいずれかと 100  $\mu$ l の DMEM 中、37 で 15 分間、複合体形成させた。ELISA のために、抗 HSV - 1 ポリクローナル抗体 (Abcam) を、maxisorb 96 ウェルイムノプレートに 2  $\mu$ g/ml の濃度で 4 において一晩コーティングした。HSV - 1・ペプチド複合体を、37 または室温で 30 ~ 60 分間インキュベーションし、1 x PBS で 3 回洗浄した。複合体を、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した抗 FITC 抗体 (Abcam) で検出した (2% BSA - PBS 中 1 : 5000 希釈)。

## 【0066】

## フローサイトメトリー

10

20

30

40

50

$5 \times 10^7$  のワクシニアウイルス粒子を、 $24 \mu\text{g}$  の CPP ペプチド - FITC または コレステロール複合ペプチド - FITC のいずれかと  $200 \mu\text{L}$  の DMEM 中、 $37^\circ\text{C}$  で  $15$  分間、複合体形成させた。複合体形成後、結合していないペプチドを、 $1 \text{ mM}$  トリス ( $\text{pH} 9.0$ ) における  $36\%$  ショ糖クッションによる超遠心分離 ( $20,000 \text{ g}$ 、 $40 \sim 80$  分) によって除去し、PBS 中の  $2\%$  ホルマリンに溶出した。固定後、 $36\%$  ショ糖クッションによるさらなる超遠心分離 ( $20,000 \text{ g}$ 、 $40 \sim 80$  分) によりホルマリンを除去し、ペレットを  $1 \times$  超高純度 PBS (Gibco) 中で溶出した。フローサイトメトリーを Apogee A50 Micro フローサイトメーター (Apogee) を用いて実施し、複合体を評価するために FITC 検出を使用した。

【0067】

交差提示実験

$800 \mu\text{L}$  の  $10\%$  RPMI - 1640 培養培地中の  $2 \times 10^6$  の脾臓細胞を、 $200 \mu\text{L}$  の GRKKRRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFELTEW (配列番号 8)、LEQLESIINFELTEWRVRRALISC - コレステロール (配列番号 19) または コレステロール - CRVRRALISLEQLESIINFELTEW (配列番号 20) ペプチド希釈液 ( $0.19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) とともにインキュベーションした。

【0068】

ワクシニア・ペプチド複合体を、ELISA 用に記載されるとおり調製した。インキュベーションの 2 時間後、細胞を洗浄し、SIINFEL と結合した APC 抗マウス H-2Kb または APC Mouse IgG1, Isotype Ctrl (BioLegend、サンディエゴ、CA、米国) のいずれかで染色し、サンプルをフローサイトメトリーによって分析した。

【0069】

細胞生存率アッセイ

サンプルの発光を測定するために CellTiter Glo 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)、およびマルチウェルプレートリーダー (Varioscan; ThermoLabsystems) を使用して細胞生存率を測定した。

【0070】

表面プラズモン共鳴

測定は、マルチパラメトリック SPR Navi (商標) 220A 機器 (Bionavis Ltd、タンペレ、フィンランド) を使用して実施した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) ( $\text{pH} 7.4$ ) をランニングバッファーとして使用した。実験全体をとおして  $20 \mu\text{L}/\text{分}$  の一定の流量を使用し、温度を  $+20^\circ\text{C}$  に設定した。表面プラズモン励起のために  $670 \text{ nm}$  の波長のレーザー光を使用した。

【0071】

二酸化ケイ素表面を有するセンサーライドを、5 分のプラズマ処理に続く、センサーをイソプロパノール中の  $50 \text{ mM}$  APTEs において 4 時間インキュベートすることによる APTEs ((3-アミノプロピル)トリエトキシシラン) でのコーティングによって活性化した。その後、センサーを洗浄し、SPR 装置に入れ、PBS ( $\text{pH} 7.4$ ) 中の  $1.1 \times 10^7 \text{ pfu}$  の VACV をおよそ 12 分間注入することによって、ウイルスを 2 つの試験チャンネルのセンサー表面にその場で固定し、続いて PBS による 3 分の洗浄を行った。その後、CPP 含有抗腫瘍ペプチドまたは CPP 配列を含まないペプチド (非相互作用対照) を、同時にフロー細胞の両方のフローチャンネルに注入し、 $1.23 \mu\text{M}$  から  $100 \mu\text{M}$  の範囲でペプチド濃度を高めた。

【0072】

動物実験

すべての動物実験に C57BL/6J OlaHsd マウス系統を使用した。 $35000$  の B16-OVA 細胞をマウスの右脇腹に注射し (再曝露実験では、細胞を左脇腹に注

10

20

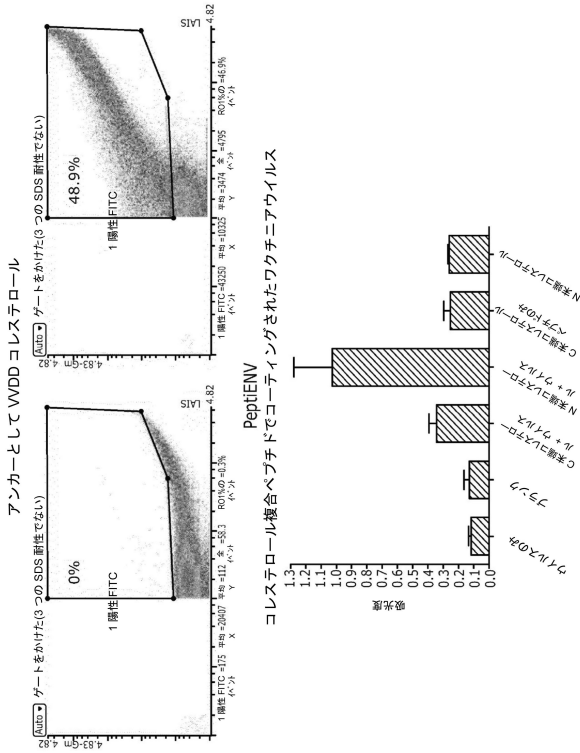
30

40

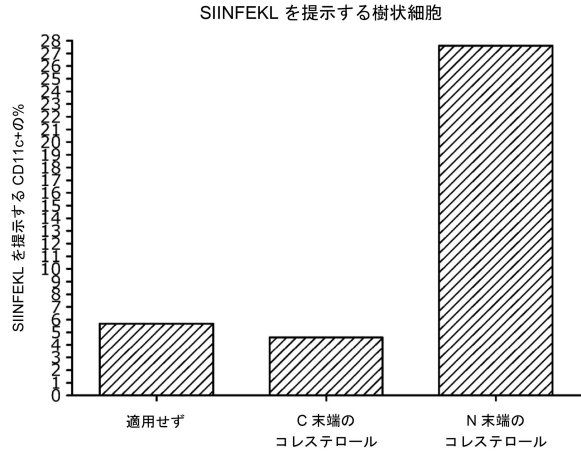
50



【 3 - 1 】



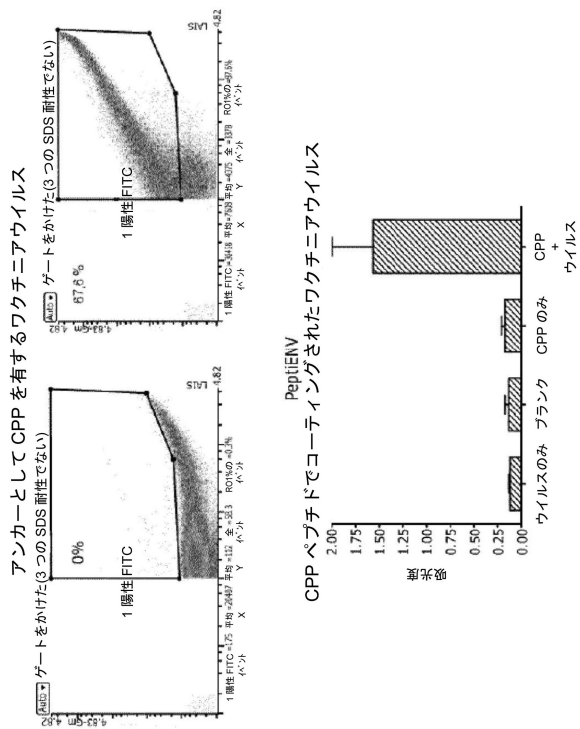
【 3 - 2 】



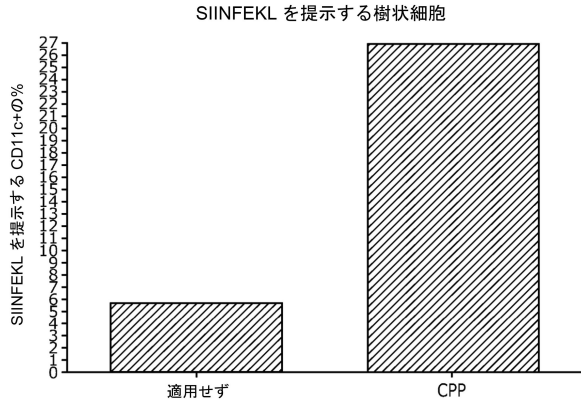
10

20

【 4 - 1 】



【 4 - 2 】

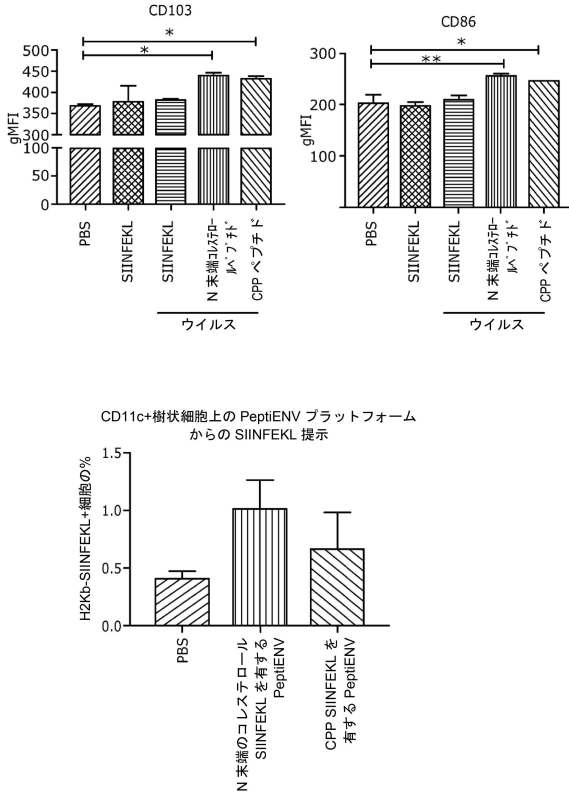


30

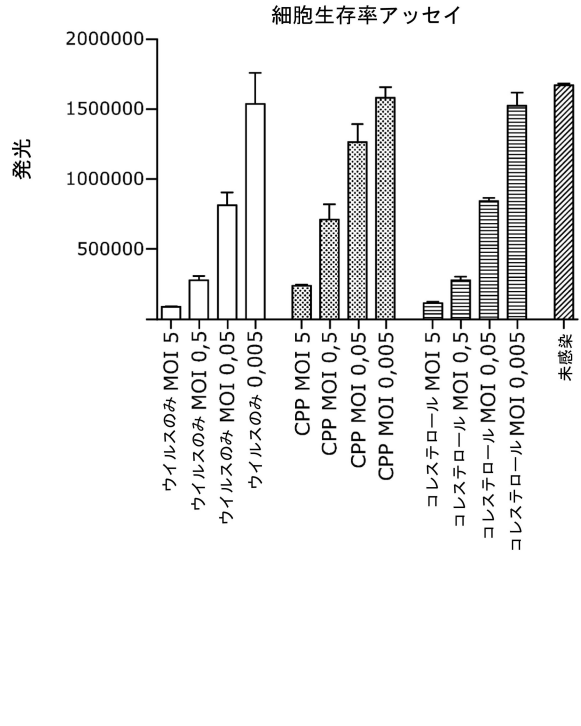
40

50

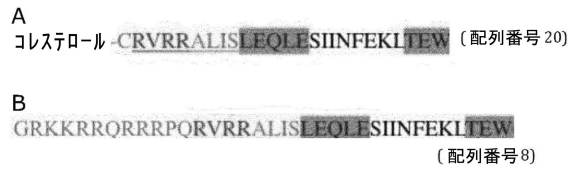
【 図 5 】



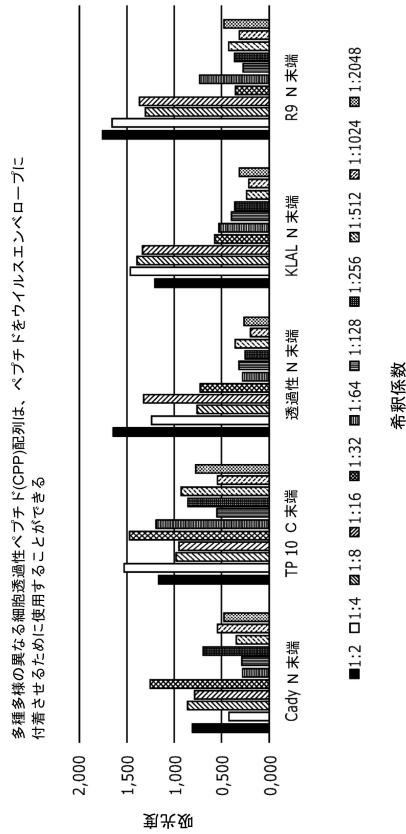
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】



多種多様な異なる細胞透過性ペプチド(CPP)配列は、ペプチドをウイルスエンベロープに付着させるために使用することができる

10

20

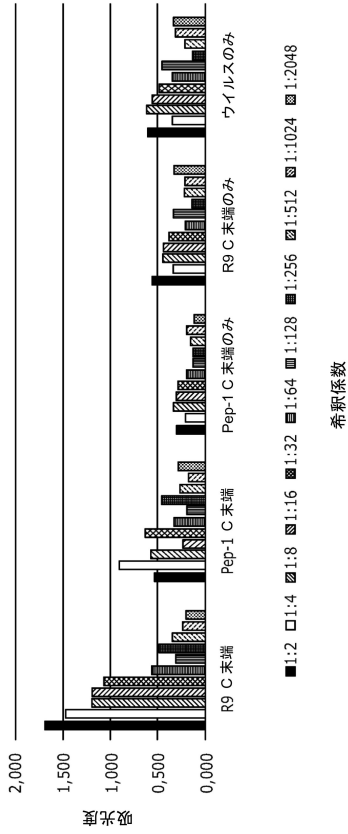
30

40

50

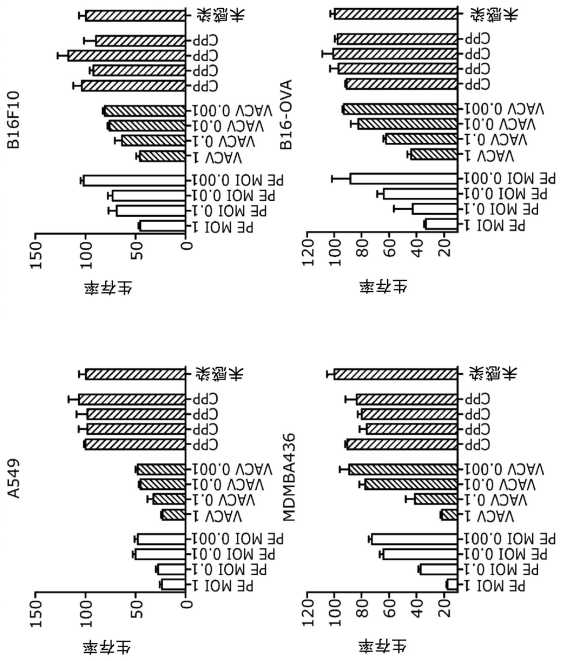
【図 8 - 2】

多種多様な異なる細胞透過性ペプチド(CPP)配列は、ペプチドをウイルスエンベロープに付着させるために使用することができる



【図 9】

ペプチドのウイルスエンベロープへの付着は、ウイルス感染性を低下させない

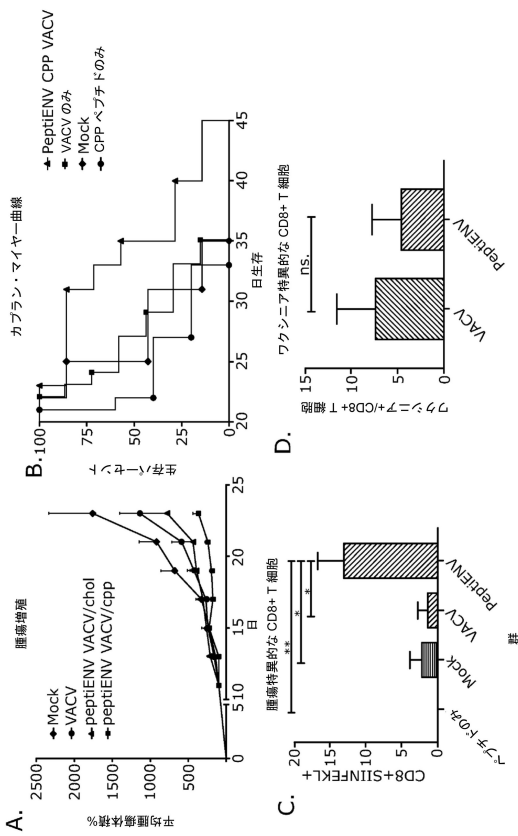


10

20

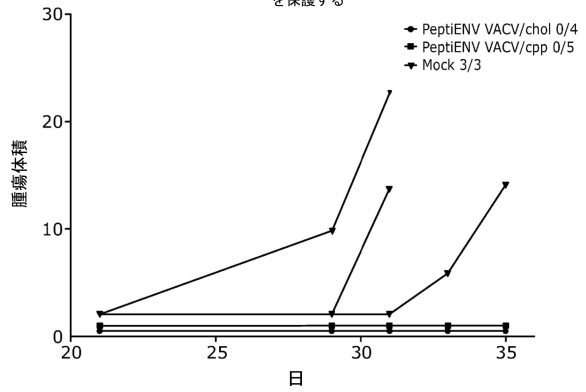
【図 10】

CPP またはコレステロール部分によってウイルスエンベロープに固定された抗腫瘍ペプチドは、広範な抗腫瘍免疫を誘発して、増強された腫瘍抑制およびさらに長い生存期間につながる



【図 11】

CPP またはコレステロール部分によってウイルスエンベロープに固定された抗腫瘍ペプチドは、広範な抗腫瘍免疫を誘発し、腫瘍再曝露から処置マウスを保護する



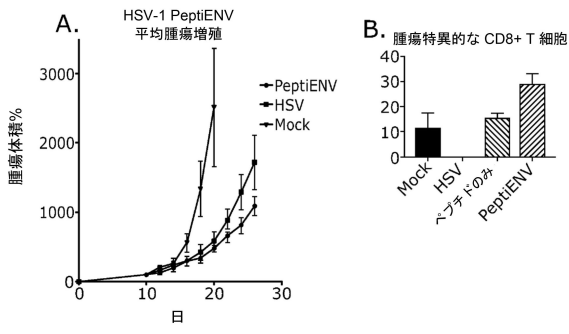
30

40

50

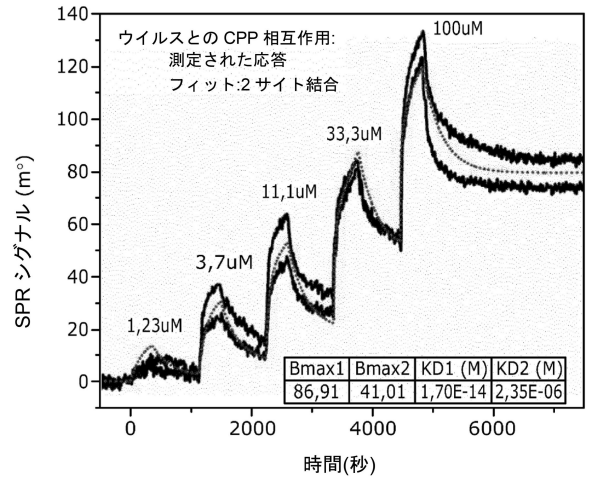
【 図 1 2 】

CPP 部分によってウイルスエンベロープに固定された抗腫瘍ペプチドは、  
広範な抗腫瘍免疫を誘発して、増強された腫瘍抑制につながる



【 図 1 3 】

CPP 含有抗腫瘍ペプチドは、ウイルスエンベロープに対して  
フェムトモル親和性を有する



10

【 配列表 】

0007258746000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/763 (2015.01)  
 A 6 1 K 35/766 (2015.01)  
 A 6 1 K 35/768 (2015.01)  
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/08 (2019.01)  
 A 6 1 K 38/10 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/385 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 K 35/763  
 A 6 1 K 35/766  
 A 6 1 K 35/768  
 A 6 1 K 38/16  
 A 6 1 K 38/08  
 A 6 1 K 38/10  
 A 6 1 K 39/385

フィンランド, エフアイ - 0 0 7 1 0 ヘルシンキ, ヴォルキヴェンティエ 1 ビー ビー 4 1

## (72)発明者

イロスマキー, エルッコ

フィンランド, エフアイ - 0 1 1 5 0 シポー, テリティエ 5

審査官 林 康子

## (56)参考文献

BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2015年06月, VOL:112, NR:6, PAGE(S):1102 - 1110, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25537>

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )