

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6924151号
(P6924151)

(45) 発行日 令和3年8月25日(2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月3日(2021.8.3)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 07 K 14/78	(2006.01)	C 07 K 14/78 Z N A
C 07 K 7/06	(2006.01)	C 07 K 7/06
C 12 N 15/12	(2006.01)	C 12 N 15/12
A 61 P 35/04	(2006.01)	A 61 P 35/04
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00

請求項の数 35 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-561974 (P2017-561974)
(86) (22) 出願日	平成28年5月27日(2016.5.27)
(65) 公表番号	特表2018-521977 (P2018-521977A)
(43) 公表日	平成30年8月9日(2018.8.9)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/034530
(87) 國際公開番号	W02016/196249
(87) 國際公開日	平成28年12月8日(2016.12.8)
審査請求日	令和1年5月27日(2019.5.27)
(31) 優先権主張番号	62/230, 160
(32) 優先日	平成27年5月29日(2015.5.29)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/309, 113
(32) 優先日	平成28年3月16日(2016.3.16)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	508087147 ユニヴァーシティ オブ ユタ リサーチ ファウンデーション アメリカ合衆国 ユタ州 84108 ソルト レイク シティー アラビーン ドライヴ 615 スイート 310
(74) 代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(74) 代理人	100088694 弁理士 弟子丸 健
(74) 代理人	100103610 弁理士 ▲吉▼田 和彦
(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫寛容及び非免疫寛容エラスチン様組換えペプチドならびに使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

相同アミノ酸リピート配列が直線状に反復または複製されている配列を含む組換えポリペプチドであって、前記相同アミノ酸リピート配列が、下記の配列

G l y - V a l - L e u - P r o - G l y - V a l - G l y (配列番号 1 ; i T E P_A) ;

との少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する前記組換えポリペプチド。

【請求項 2】

前記組換えポリペプチドの N 末端、 C 末端、または N 末端及び C 末端の両方に位置する 1 つ以上の残基をさらに含み、前記 1 つ以上の残基がグリシン、アラニン、もしくはセリンまたはこれらの組合せである、請求項 1 に記載の組換えポリペプチド。 10

【請求項 3】

同定される分子量が 10 kDa と 100 kDa の間である、請求項 2 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 4】

前記相同アミノ酸リピート配列がエラスチン由来である、請求項 1 に記載の組換えポリペプチド。

【請求項 5】

アミノ酸配列

G l y - (G l y - V a l - L e u - P r o - G l y - V a l - G l y)₂₈ - G l y -

20

Gly (配列番号23) ;
を含む、請求項2に記載の組換えポリペプチド。

【請求項6】

第2の相同アミノ酸リピート配列をさらに含み、
前記第2の相同アミノ酸リピート配列が

Gly - Ala - Gly - Val - Pro - Gly (配列番号2 iTEPB) ;
Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号3 ; iTETPC) ;
Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号4 ; iTETPD) ;
Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Val - Gly - Ala - Gly (配列番号5 ; iTETPE) ;
Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly - Gly (配列番号6) ;
Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号7) ;
Gly - Leu - Val - Pro - Gly - Gly (配列番号8) ;
Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号9) ;
Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号10) ;
Gly - Ile - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号11) ;
Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号12) ;
Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号13) ;
Gly - Val - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号14) ; 及び
Gly - Val - Pro - Gly (配列番号15)

からなる群から選択される、請求項1に記載の組換えポリペプチド。

【請求項7】

前記相同アミノ酸リピート配列が100以下のリピートを含む、請求項1に記載の組換えポリペプチド。

【請求項8】

前記相同アミノ酸リピート配列が少なくとも20のリピートを含む、請求項1に記載の組換えポリペプチド。

【請求項9】

相同アミノ酸リピート配列を含む組換えポリペプチド及び1つ以上の治療薬を含む非免疫原性バイオコンジュゲートであって、前記相同アミノ酸リピート配列が

Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号1 ; iTETPA) ;

であって、前記相同アミノ酸リピート配列は直線状に反復または複製されている配列である前記非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項10】

1つ以上のリンカーをさらに含む、請求項9に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項11】

1つ以上のスペーサー配列をさらに含む、請求項9に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項12】

1つ以上のシステイン残基をさらに含む、請求項9に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項13】

1つ以上のシステイン残基が1つ以上のスペーサー配列によって隔てられている、請求項12に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項14】

前記組換えポリペプチド及び前記治療薬が1:1または1:3の比(組換えポリペプチ

10

20

30

40

50

ド：治療薬）で存在する、請求項 9 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 15】

前記組換えポリペプチドが前記リンカーの 1 つと共有結合している、請求項 9 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 16】

前記共有結合が切断可能である、請求項 15 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 17】

前記組換えポリペプチドの N 末端、 C 末端、または N 末端及び C 末端の両方に位置する 1 つ以上の残基をさらに含み、前記 1 つ以上の残基がグリシン、アラニン、もしくはセリンまたはこれらの組合せである、請求項 9 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。 10

【請求項 18】

さらに第 2 の相同アミノ酸リピート配列を含み、前記第 2 の相同アミノ酸リピート配列が

Gly - Ala - Gly - Val - Pro - Gly (配列番号 2 ; iTEP_B) ;
 Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号 3 ; iTEP_C) ;
 Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号 4 ; iTEP_D) ;
 Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Val - Gly - Ala - Gly (配列番号 5 ; iTEP_E) ;
 Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly - Gly (配列番号 6) ;
 Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号 7) ;
 Gly - Leu - Val - Pro - Gly - Gly (配列番号 8) ;
 Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号 9) ;
 Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号 10) ;
 Gly - Ile - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号 11) ;
 Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号 12) ;
 Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号 13) ;
 Gly - Val - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号 14) ; 及び Gly - Val - Pro - Gly (配列番号 15) からなる群から選択される、請求項 9 に記載の免疫原性バイオコンジュゲート。 30

【請求項 19】

前記治療薬が抗癌剤、ペプチド、核酸、または 1 つ以上の細胞である、請求項 9 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 20】

前記抗癌剤が癌幹細胞阻害剤である、請求項 19 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 21】

前記抗癌剤がサリノマイシンまたはパクリタキセルである、請求項 19 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。 40

【請求項 22】

前記 1 つ以上のリンカーが 4 - (4 - N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジド塩酸塩である、請求項 10 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 23】

前記治療薬がワクチンである、請求項 9 に記載の非免疫原性バイオコンジュゲート。

【請求項 24】

請求項 9 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の非免疫原性バイオコンジュゲートを含み及び任意に医薬品として許容可能な担体を含んでいてもよい医薬組成物。

【請求項 25】

静脈内投与のために製剤化されている、請求項24に記載の医薬組成物。

【請求項26】

癌患者の治療のための請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項27】

前記患者がヒト患者である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項28】

前記癌が原発性または続発性腫瘍である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項29】

前記原発性または続発性腫瘍が前記患者の乳房、肺、結腸または卵巣内にある、請求項28に記載の医薬組成物。

10

【請求項30】

前記癌が転移性である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項31】

前記癌が癌幹細胞に関連している、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項32】

抗癌剤が非免疫原性バイオコンジュゲートの一部として投与される場合に、前記抗癌剤が単独でまたは非免疫原性バイオコンジュゲートの一部としてではなく投与される場合と比較して、効果が増加する、または副作用が減少する、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項33】

第2の異なる医薬組成物と組み合わせて投与される、請求項26に記載の医薬組成物。

20

【請求項34】

感染症患者の治療のための請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項35】

第2の異なる医薬組成物と組み合わせて投与される、請求項34に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年5月29日に出願された米国仮出願第62/230,160号；及び2016年3月16日に出願された米国仮出願第62/309,113号の出願日の利益を主張する。以前に申請されたこれらの出願の内容は、ここにその全体を参照により本明細書に援用する。

30

【0002】

配列表

2016年5月23日に作成された85,401バイトのサイズを有する「21101-0314P1_S1」という名称のテキストファイルとして2016年5月29日に提出した配列表を、37_C.F.R. § 1.52(e)(5)に従って、ここに参照により援用する。

【0003】

連邦政府によって資金援助を受けた研究に関する声明

40

本発明は、米国国立衛生研究所によって締結された認可番号6R00CA153929の下、政府援助を受けて行われた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0004】

本発明は、エラスチン由来の組換えペプチド、より具体的には、免疫寛容を有し、例えば、感染症及び癌をはじめとする様々な疾患及び病態のための治療薬の送達システムとして有用な組換えエラスチン由来ペプチドに関する。

【背景技術】

【0005】

転移性の癌患者は、転移に対する有効な治療がないために依然として芳しくない予後と向き合っている。転移及び癌幹細胞(CSC)には密接な関係があることが知られており

50

、CSCは従来の化学療法及び放射線療法に耐性があると分かっている。有効な抗転移療法を生み出す1つの戦略は CSCを標的とすることであるが、その理由は、これらの細胞が乳房腫瘍のものをはじめとする転移の発生及び促進に重要な役割を果たすためである。癌及び感染症に対する予防的及び治療的処置としてワクチンが開発されてきた。しかし、ワクチン、特に癌ワクチンの効果は改善される必要がある。癌及び感染症に対する有効な抗転移療法及び予防または治療モジュールへの代替的な治療アプローチが必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

癌幹細胞(CSC)を減少させる効果的な方法は、CSCに対して特に毒性であり得る新規の薬剤の同定に依存する。本明細書では、ELP設計の最初からELPの免疫原性に加えて物理化学的性質を強調する新規のエラスチン様ポリペプチド(ELP)設計及び改変手法を開示する。この目的のために、ELP(本明細書ではiTEPと呼ぶ)を設計して生成した。本明細書に開示のiTEPは体液性寛容であり、相転移特性も有する。さらに、実施例では、両親媒性iTEPコポリマーはナノ粒子に自己組織化することができる事を示す。このナノ粒子は、モデル細胞傷害性Tリンパ球 CTL)ペプチドワクチンを送達するために用いた場合に、遊離ペプチドまたはタンパク質形態のCTLワクチンと比較してワクチンの効力を向上させた。

10

【0007】

相同アミノ酸リピートを含む組換えポリペプチドであって、相同アミノ酸リピートが4つ以上のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基の1つがプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上がバリンであり、相同アミノ酸リピートとの少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有し、相同アミノ酸リピートがGly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号1;iTEP_A) ; Gly - Ala - Gly - Val - Pro - Gly (配列番号2;iTEP_B) ; Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号3;iTEP_C) ; Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号4;iTEP_D) ; Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Val - Ala - Gly (配列番号5;iTEP_E) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly - Gly (配列番号6) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号7) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号8) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号9) ; Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号10) ; Gly - Ile - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号11) ; Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号12) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号13) ; Gly - Val - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号14) ; またはGly - Val - Pro - Gly (配列番号15)である組換えポリペプチドを本明細書で開示する。

20

【0008】

式: Val - Pro - Gly - Xaa₁ - Gly - Xaa₂ - Gly - Ala - Gly (式中、Xaa₁はLeuまたはPheであり、Xaa₂はAlaまたはValである)(配列番号16~19)に従うアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列が繰り返される組換えポリペプチドを本明細書で開示する。

30

【0009】

相同アミノ酸リピートを含む組換えポリペプチド及び1つ以上の治療薬を含む非免疫原性バイオコンジュゲートであって、相同アミノ酸リピートが4つ以上のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基の1つがプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上がバリンであり、相同アミノ酸リピートがGly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号1;iTEP_A) ; Gly - Ala - Gly - Val - Pro - Gly (配列番号2;iTEP_B) ; Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly (配列番号3;iTEP_C) ; Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Ala - Gly (配列番号4;iTEP_D) ; Val - Pro - Gly - Val - Gly - Ala - Gly (配列番号5;iTEP_E) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号6) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号7) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号8) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly (配列番号9) ; Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号10) ; Gly - Ile - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号11) ; Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号12) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号13) ; Gly - Val - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号14) ; またはGly - Val - Pro - Gly (配列番号15)である組換えポリペプチドを本明細書で開示する。

40

50

- Gly - Ala - Gly (配列番号4 ; iTEPD) ; Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Val - Gly - Ala - Gly (配列番号5 ; iTEPE) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly - Val - Gly (配列番号6) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号7) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly - Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号8) ; Gly - Leu - Val - Pro - Gly - Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号9) ; Gly - Val - Pro - Leu - Gly (配列番号10) ; Gly - Ile - Pro - Gly - Val - Gly (配列番号11) ; Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号12) ; Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号13) ; Gly - Val - Gly - Val - Leu - Pro - Gly (配列番号14) ; または Gly - Val - Pro - Gly (配列番号15) である非免疫原性バイオコンジュゲートを 10 本明細書で開示する。

【0010】

相同アミノ酸リピートを含む組換えポリペプチドであって、相同アミノ酸リピートが4つ以上のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基の1つがプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上がバリンであり、相同アミノ酸リピートとの少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有し、相同アミノ酸リピートがLeu - Val - Val - Gly - Gly - Gly - Pro (配列番号20 ; iMEPA) ; またはAla - Gly - Gly - Pro - Gly - Val - Val - Ala - Gly - Gly - Pro - Gly - Val - Ala - Gly - Gly - Pro - Gly (配列番号21 ; iMEPB) である組換えポリペプチドを本明細書で開示する。 20

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】マウストロポエラスチンとヒトエラスチンとの間の相同性分析から得られるiTEPモノマーの概要である。青字及び赤字はそれぞれマウス及びヒトエラスチン由来のアミノ酸を示す。緑字は両種にわたって同じアミノ酸を示す。数字はそれらの親エラスチンタンパク質中のこれらのビルディングブロックの位置を示す。

【図2】図2A～CはiTEPのクローニング及び発現を示す。図2Aは、iTEPのコード遺伝子の長さを2倍にするアプローチを示す概略図である。図2Bは、XbaI及びBamHIによってpET25b(+)ベクターから切断した後のアガロースゲル上のiTEPコード遺伝子を示す。図2Cは、個々のiTEPのMW及び純度を示すSDS-PAGEゲルを示す。 30

【図3】図3A～Eは、iTEPの可逆的相転移を示す。図3A～Dは、20と80との間で加熱してから冷却したときのiTEPA、iTEPB、iTEPC、及びiTEPDの濁度プロファイル(OD350)を示す。図3Eは、温度の関数としての2.5MNaCl中のiTEPBの濁度プロファイルを示す。各曲線は3つの測定値の平均を表していた。

【図4】図4A～EはiTEPの体液性免疫原性を示す。図4Aは免疫化スケジュール及び体液性応答の評価の時点を示す。図4BはOVA、MSA、及びiTEP免疫化マウスのIgG力価の要約を示す。各点は1匹のマウスの結果を表す。力価の中央値及び四分位数間領域を示す。図4C～Fは、iTEPA(C)、iTEPB(D)、iTEPC(E)、及びiTEPD(F)免疫化マウスから収集した血清の、希釈してELISAによってアッセイした後の吸光度(OD450)を示す。各データ点は血清希釈当たり3つの吸光度測定値の平均値に相当する。各マウスのデータを線でつなないだ。陽性の吸光度値のためのカットオフ範囲を青色の陰で示した。 40

【図5】図5A～EはiTEP-CTLワクチン融合体から自己組織化したナノ粒子を示す。図5Aは、iTEPB-iTEPA-pOVA融合体(配列番号56)がナノ粒子(NP)に自己組織化することを示す概略図である。図5Bは、2つの融合体、iTEPB-pOVA(配列番号57)及びiTEPB-iTEPA-pOVA(配列番号56)のMW及び純度を示すSDS-PAGEゲルである。図5Cは、温度の関数としてのiTEPB-iTEPA-pOVA融合体(配列番号56)の濁度プロファイルを示す。図5Dは、 50

DLS測定から得られたiTEPB-pOVA(配列番号57)及びiTEPB-iTEPA-pOVA融合体(配列番号56)(25μM)のサイズ分布を示す。図5Eは、陰性染色したiTEPB-iTEPA-pOVA融合体(配列番号56)の代表的な顕微鏡写真であり、融合体のNPサイズが確認される。

【図6】図6A～Cは、iTEP-pOVAナノ粒子(NP)によって誘発される免疫応答を示す。図6Aは、SIIINFEL(配列番号22)がOVA、可溶性iTEPB-pOVA(配列番号57)、またはiTEP-pOVA NPによって送達された後の、DC2.4細胞によるSIIINFEL(配列番号22)の提示を示す。データは実験(n=4回の独立した実験)に用いた全DC集団の正規化MF_I±SDの平均として表す。図6Bは、SIIINFEL(配列番号22)を提示したDCと共にインキュベートした後の一過性細胞の活性化を示す。DCは図に示した異なる形態の抗原と共にプレインキュベートした。データは3回の独立した実験の平均±SDとして表す。図6Cは、OVA、遊離SIIINFELペプチド(配列番号22)、またはiTEP-pOVA NPで免疫化したマウス(n=3～5)由来の活性化したSIIINFEL拘束性脾細胞のエクスビオ分析を示す。細胞の活性化はINF-ベースのELISPOTアッセイを用いることによって同定した。データはスポット形成単位(SFU)/100万細胞±SDとして提示した。すべてのパネルについて、は組にした処理間のt検定のp<0.05を示す。

【図7】図7A～Bは、希釈してELISAによってアッセイした後の不溶性(A)及び可溶性(B)iTEPC免疫化マウス血清の吸光度(OD450)を示す。各データ点は、マウス毎、血清希釈毎に3回繰り返した測定の吸光度値の平均に相当する。各マウスのデータを線でつなないだ。陽性の吸光度値のためのカットオフ範囲を青色の陰で示した。

【図8】図8A～Cは、Sal i-ABA及びSal i-ABA-MPBHの合成スキーム及び同定を示す。図8AはSal i-ABA及びSal i-ABA-MPBHの合成スキームを示す。図8BはABAとSal iとの間の精製した反応生成物のESI-MSスペクトルである。図8CはSal i-ABAとMPBHとの間の精製した反応生成物のESI-MSスペクトルである。

【図9】図9A～Bは、異なる条件下での通常の4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。図9Aは、異なる濃度のSal iまたはSal i-ABAに72時間曝露した後の通常の4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。図9Bは、異なる濃度のSal i-ABAに72時間曝露した後の腫瘍様塊4T1-1uc細胞に対する通常の4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。

【図10】図10A～DはiTEP及びiTEP-MPBH-ABA-Sal iコンジュゲートの特性を示す。図10Aは、10回の精製後の精製iTEPの銅染色SDS-PAGE写真を示す。添加量は50μg/ウェルであった。バンドを赤矢印で強調した。図10Bは、pH=5.0(0.1M酢酸塩バッファー)及びpH=7.0(PBS)でのiTEP-MPBH-ABA-Sal i NPのインピトロ放出プロファイルを示す。図10Cは、異なる濃度のiTEP-MPBH-ABA-Sal i NPまたはSal i-ABAに72時間曝露した後の通常の4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。図10Dは、異なる濃度のiTEP-MPBH-ABA-Sal i NPに72時間曝露した後の腫瘍様塊4T1-1uc細胞に対する通常の4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。図10Eは、非コンジュゲートiTEP(緑で塗りつぶした範囲)及びiTEP-MPBH-ABA-Sal i NP(赤で塗りつぶした範囲)の流体力学的径を示す。サンプル濃度は25μMであった。

【図11】図11A～Dは、iTEP-MPBH-ABA-Sal iの薬物動態及び組織分布を示す。図11Aは、遊離形態またはiTEP-MPBH-ABA-Sal i NPで投与した後のSal i-ABAの血漿濃度を示す。図11Bは、20mg/kgの投与量で投与した後のSal i-ABAの腫瘍蓄積を示す。図11CはSal i-ABAの心臓蓄積を示す。図11Dは肝臓、脾臓、肺、及び腎臓におけるSal i-ABAの蓄積を示す。

10

20

30

40

50

【図12】図12A～Cは、iTEP-MPBH-ABA-Sali-NPによる原発性腫瘍成長及び転移の阻害を示す。図12Aは、PBS、遊離Sali-ABA、またはiTEP-MPBH-ABA-Sali-NPによって治療した後の4T1-1uc同所性腫瘍の体積変化を示す。図12Bは、図12Aに記載のように治療した後の4T1-1uc同所性腫瘍を有するマウスの無転移生存率を示す。^{*}は人道的エンドポイントに達したので何匹かのマウスを打ち切った時点を示す。図12Cは図12Aに記載のマウスの全生存率プロファイルを示す。

【図13】図13A～Dは、iTEP-MPBH-ABA-Sali-NP及びPTX-NPの併用療法が原発性腫瘍成長及び転移を阻害することを示す。図13Aは、PTX-NPで72時間治療した後の通常の4T1-1uc細胞及び腫瘍様塊4T1-1uc細胞の生存率プロファイルを示す。図13Bは、iTEP-MPBH-ABA-Sali-NP、PTX-NP、または、PTX-NP及びiTEP-MPBH-ABA-Sali-NPの併用レジメンで治療した後の4T1-1uc同所性腫瘍の体積変化を示す。図13Cは、図13Bに記載のように治療した後の4T1-1uc同所性腫瘍を有するマウスの無転移生存率を示す。^{*}は人道的エンドポイントに達したので何匹かのマウスを打ち切った時点を示す。図13Dは、図13Bに記載のマウスの全生存率プロファイルを示す。

【図14】XbaI及びBamHIによってpET25b(+)ベクターから切断した後の、アガロースゲル上のiTEP-ワクチン融合体のコード遺伝子のバンドを示す。バンドにより、遺伝子のサイズはiTEP融合体の予想されたサイズと一致することが確認された。

【図15】E.coli細胞から精製した後のiTEP-ワクチン融合体の分子量及び純度を確認したSDS-PAGE分析である。

【図16】図16A～Dは、安定iTEP-NPの設計及び生成を示す。図16Aは、iTEP_{B70}-iTEP_{A28}-pOVA（配列番号64）及びiTEP_{B70}-iTEP_{A56}-pOVA（配列番号60）融合体がMS-NP及びST-NPに自己組織化することを示す概略図である。図16Bは、37での16時間のインキュベーション前後の2つのNPの数分布による流体力学的径を示す。緑線はMS-NPであり、青線はST-NPであった。図16Cは、iTEP_{B70}-iTEP_{A56}-pOVA(ST-NP)（配列番号60）の陰性染色サンプルの代表的なTEM顕微鏡写真であり、サンプルのNP構造が確認される。3つの粒子が矢印で指示されている。図16Dは、iTEP-ワクチン融合体の10g⁻¹濃度の関数としてプロットした I_1/I_3 、ピレン蛍光発光の2つのピーク[ピーク1($I_{370-373nm}$)；ピーク3($I_{381-384nm}$)]の間の比を示す。エラーバーは各データ点(n=3)の標準偏差を示す。ある融合体のシグモイドフィットの変曲点はその融合体のCMCとして定義される。

【図17】図17A～Bは、DLS測定からのサイズ対強度データを用いてMS-NPとST-NPとの間の差を示す。図17Aは、MS-NP及びST-NPの強度基準の流体力学的径を示す。データは、NPを37で16時間インキュベートする前(0h)及び後(16h)にDLSによって収集した。緑線はMS-NPのサイズ分布を表す。青線はST-NPである。インキュベーションの前では、MS-NP及びST-NPの直径はそれぞれ111.90±35.02nm及び78.56±21.60nmであった。インキュベーションの後では、ST-NPは74.45±18.99nmの直径を有し、MS-NPは2つのピーク：75.47±9.75nm(92.2%)及び8.86±0.90nm(7.8%)を有していた。図17Bは、RED-NPの強度基準の流体力学的径が、16時間のインキュベーションの前後でそれぞれ75.55±15.32nm及び70.99±17.52nmであったことを示す。赤破線及び赤実線は、それぞれインキュベーションの前後のRED-NPのサイズ分布を表す。

【図18】図18A～Dは、ST-NPがCTLワクチンに対するMS-NPの効果を拡張することができないこと、及びDCがST-NPを内在化させることを示す。図18Aは、異なるNPでpOVAを送達させて細胞をインキュベートした後のDC2.4細胞によるpOVAの提示を示す。データは、各処理におけるDC細胞のMFI平均±SDとし

10

20

30

40

50

て表し、各処理は3回繰り返した($N = 3$)。 $p < 0.05$ (t検定)。グラフは4つの独立した実験から収集したデータを表す。図18Bは、異なるNPと共にプレインキュベートしたDC2.4細胞によるB3Z細胞の活性化を示す。示した値は各処理のサンプル($N = 3$)の平均OD ± SDである。これらの処理のOD値はNP不含処理の平均ODに正規化されていた。 $p < 0.05$ (t検定)。グラフは3つの独立した実験から収集したデータを表す。図18Cは、MS-NP及びST-NPで免疫化したマウス($N = 5$)由来の活性化したSIIINFEKEL拘束性脾細胞のエクスピボ分析を示す。データはスポット形成単位(SFU)/100万細胞 ± SDとして表す。 $p < 0.05$ (t検定)。図18Dは、DC及び様々な対照細胞によるST-NP及びMS-NPの取込みの比較を示す。この比のデータは比の平均 ± SD($N = 3$)として表す。 $p < 0.05$ (t検定)。

【図19】図19A~Hは、還元環境反応型安定性を有するiTEP NP担体の生成の結果を示す。図19Aは、iTEPB₇₀-iTEPA₂₈-(G₈C)₄-pOVA(配列番号61)融合体がRED-NPに自己組織化することを示す概略図である。図19Bは、37での16時間のインキュベーション前後の2つのNPの数分布による流体力学的径を示す。図19CはRED-NPの代表的なTEM顕微鏡写真である。3つの粒子を矢印で指示した。図19D~Fは、DC2.4細胞によって内在化されたMS-NP(D)、ST-NP(E)及びRED-NP(F)の蛍光顕微鏡検査を示す。図19Gは、DC2.4細胞によるMS-NP、ST-NP及びRED-NPの取込みを正規化した細胞のMFIとして示す。データは平均MFI ± SD($N = 3$)として表す。 $p < 0.05$ (t検定)。図19Hは、DC及び様々な対照細胞によるMS-NPに対するRED-NPの取込みの比較を示す。データは図18Dと同様に($N = 3$)処理して提示した。 $p < 0.05$ (t検定)。

【図20】図20A~Bは、異なる濃度のGSHで一晩処理した後のRED-NP(A)ならびにMS-NP及びST-NP(B)のSDS-PAGE分析を示す。

【図21】図21A~Cは、DC2.4細胞によって内在化されたMS-NP(A)、ST-NP(B)及びRED-NP(C)の蛍光顕微鏡検査を示す。

【図22】図22A~Cは、RED-NPがST-NPまたはMS-NPよりも有効なワクチン担体であることを示す。図22Aは、細胞を3つのNPと共にインキュベートした後のDC2.4細胞によるpOVAの提示である。データは、各処理におけるDC細胞のMFI平均 ± SDとして表し、各処理は3回繰り返した($N = 3$)。 $p < 0.05$ (t検定)。グラフは3つの独立した実験から収集したデータを表す。図22Bは、DCを異なるNPと共にプレインキュベートした後のDC2.4細胞によるB3Z細胞の活性化の結果を示す。示した値は各処理のサンプル($N = 3$)の平均OD ± SDである。 $p < 0.05$ (t検定)。グラフは3つの独立した実験から収集したデータを表す。図22Cは、MS-NP及びRED-NPで免疫化したマウス($N = 5$)由来の活性化したSIIINFEKEL拘束性脾細胞のエクスピボ分析を示す。データはスポット形成単位(SFU)/100万細胞 ± SDとして表す。 $p < 0.05$ (t検定)。

【図23】図23A~Bは空の担体とのインキュベーションの結果を示す。図23Aは、細胞を空のiTEP担体と共にインキュベートした後のDC2.4細胞によるpOVAの提示を示す。データは各処理におけるDC細胞のMFI平均 ± SDとして表す。各処理は3回繰り返した($N = 3$)。図23Bは、空のiTEP担体と共にプレインキュベートしたDC2.4細胞によるB3Z細胞の活性化の結果を示す。示した値は各処理のサンプル($N = 3$)の平均OD ± SDである。

【図24】図24A~Dは、インビボにおいて、RED-NP2がRED-NPとほぼ同等であり、MS-NPよりも優れていることを示す。図24Aは、37で16時間のインキュベーションの前後のRED-NP2の数(上パネル)及び強度(下パネル)による流体力学的径分布を示す。図24Bは、MS-NP及びRED-NP2と共に細胞をインキュベートした後のDC2.4細胞によるpOVAの提示を示す。データは各処理におけるDC細胞のMFI平均 ± SDとして表す。各処理は3回繰り返した($N = 3$)。 $p <$

0.05 (t検定)。グラフは3つの独立した実験から収集したデータを表す。図24Cは、MS-NP及びRED-NP2と共にブレインキュベートしたDC2.4細胞によるB3Z細胞の活性化を示す。示した値は各処理のサンプル (N = 3) の平均OD ± SDである。p < 0.05 (t検定)。グラフは3つの独立した実験から収集したデータを表す。図24Dは、MS-NP及びREDNP2で免疫化したマウス (N = 5) 由来の活性化したSIIINFEL拘束性脾細胞のエクスピボ分析を示す。データはスポット形成単位 (SFU) / 100万細胞 ± SDとして提示した。p < 0.05 (t検定)。

【図25】図25A～Bは、iTEP-ワクチン融合体が細胞傷害性でないことを示す。図25Aは、様々なiTEP-ワクチン融合体で処理した後のDC2.4細胞の生存率を示す。図25Bは、様々なiTEP-ワクチン融合体で処理した後のEAhy926細胞の生存率を示す。縁点：MS-NP；青四角：ST-NP；赤三角：RED-NP。データは平均 ± SDとして表す。各グラフは3つの独立した実験の結果を表す。

【図26】図26A～Bは、NPがサイトゾルに到達することを示す。図26Aは、微分干渉コントラスト (DIC) 顕微鏡検査によって明らかとなったDC2.4細胞中のRED-NPの細胞内分布を示す。赤色染料はDC中の低pHリソソーム区画を染色する。緑色染料はRED-NPを標識するために用いた。合成画像中の黄色染色はRED-NP及びリソソームの共局在化を示していた。図26Bは、細胞をAllexa-488標識RED-NPと共に1時間インキュベートして洗浄した後のDC2.4細胞ライセートのSDS-PAGE写真である。

【図27】図27A～Cは生存率プロファイルを示す。図27Aは、細胞を異なる濃度のSal i - ABAに72時間曝露した後の、腫瘍様塊MDA-MB-231細胞に対する通常のMDA-MB-231細胞の生存率プロファイルを示す。図27Bは、細胞を異なる濃度のSal i - ABAに72時間曝露した後の、腫瘍様塊HCT-15細胞に対する通常のHCT-15細胞の生存率プロファイルを示す。図27Cは、細胞を異なる濃度のSal i - ABAに72時間曝露した後の、腫瘍様塊PC-3細胞に対する通常のPC-3細胞の生存率プロファイルを示す。

【図28】異なる濃度のSal i - ABAに72時間曝露した後の293T細胞の生存率プロファイルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書に含まれる以下の本発明の詳細な説明、図面及び実施例を参照することによって、本開示をより容易に理解することができる。

【0013】

本方法及び組成物を開示及び記載する前に、それらは、特に明記しない限り、特定の合成方法に、または特に明記しない限り、特定の試薬に限定されず、そのため当然変化し得ることを理解されたい。また、本明細書で用いる用語は、特定の態様を記述する目的のみのためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい。本明細書に記載のものと類似または等価な任意の方法及び材料を本発明の実施または試験に用いることができるが、例示的な方法及び材料をこれから記載する。

【0014】

さらに、特に明記しない限り、本明細書に記載のいかなる方法も、決して、そのステップが特定の順序で実施される必要があると解釈されることを意図していないと理解されたい。したがって、方法の請求項でそのステップが従うべき順序を実際に述べていない、または特許請求の範囲もしくは明細書中でステップが特定の順序に限定されると別途明記していない場合、いかなる点においても、決して順序を推定することを意図していない。このことは、ステップの配列または作業フローに関する論理の問題、文法構成または句読法から得られる明白な意味、及び明細書に記載の態様の数または種類をはじめとする、あらゆる可能な非明示的な解釈の基礎を保つ。

【0015】

本明細書で言及するすべての刊行物は、引用する刊行物が関連する方法及び/または材

10

20

30

40

50

料を開示及び記載するために、参照により本明細書に援用する。本明細書で述べた刊行物は、本出願の出願日より前のその開示に関してのみが提供される。本明細書のいかなるものも、そのような刊行物が先行発明であるとして、本発明が先行する権利を有しないとする自認であると解釈されるべきではない。さらに、本明細書で提供する公開日は、実際の公開日とは異なる場合があり、個別の確認を必要とし得る。

【0016】

定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈からそうでないことが明らかに分かる場合を除いて複数形の指示対象を含む。

10

【0017】

本明細書で用いる場合、用語「または」は、特定のリストの任意の1つの要素を意味し、そのリストの要素の任意の組合せも含む。

【0018】

本明細書において、範囲は、「約」もしくは「およそ」の1つの特定の値から、及び／または「約」もしくは「およそ」の別の特定の値までとして表すことができる。そのような範囲を表す場合、さらなる態様は、一方の特定の値から、及び／または他方の特定の値まで含む。同様に、先行語「約」または「およそ」の使用によって、値を近似として表す場合、特定の値がさらなる態様を形成すると理解されよう。各範囲の端点は、他方の端点と関連する場合及び他方の端点と独立している場合の両方において有意であることがさらに理解されよう。多数の値が本明細書に開示されており、各値は、その値自身に加えて、「約」その特定の値としても本明細書に開示されることも理解されるべきである。例えば、値「10」が開示される場合、「約10」も開示される。2つの特定の単位の間の各単位も開示されることも理解されるべきである。例えば、10及び15が開示される場合、11、12、13、及び14も開示される。

20

【0019】

本明細書で用いる場合、用語「任意の」または「任意に」は、その後に記載の事象または状況が起きても起きなくてもよいことを意味し、この記載はその事象または状況が起きる場合及び起きない場合を含むことを意味する。

【0020】

30

本明細書で用いる場合、用語「サンプル」は、被検者由來の組織もしくは器官；細胞（被検者内にあるか、被検者から直接採取したか、もしくは培養状態を維持している、もしくは培養された細胞株由來の細胞）；細胞ライセート（もしくはライセート画分）もしくは細胞抽出物；または細胞もしくは細胞物質に由来する1つ以上の分子（例えばポリペプチドもしくは核酸）を含有する溶液を意味し、本明細書に記載のようにアッセイされる。サンプルは、細胞または細胞成分を含有する任意の体液または排泄物（例えば、限定はないが血液、尿、便、唾液、涙、胆汁）でもあり得る。

【0021】

本明細書で用いる場合、用語「被検者」は、投与の対象、例えばヒトのことをいう。したがって、本開示の方法の被検者は、脊椎動物、例えば哺乳類、魚類、鳥類、爬虫類、または両生類などとすることができます。用語「被検者」には、家庭動物（例えばネコ、イヌなど）、家畜（例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、及び実験動物（例えばマウス、ウサギ、ラット、モルモット、ショウジョウバエなど）も含まれる。一態様において、被検者は哺乳類である。別の態様において、被検者はヒトである。この用語は特定の年齢または性別を表さない。したがって、成人、小児、青年及び新生児の被検者、ならびに胎児が、男性または女性にかかわらず、含まれることを意図する。

40

【0022】

本明細書で用いる場合、用語「患者」は、疾患または障害を患っている被検者のことをいう。用語「患者」にはヒト及び動物被検者が含まれる。本開示の方法のいくつかの態様において、「患者」は、例えば投与ステップの前などに、癌の治療が必要であると診断さ

50

れている。

【0023】

本明細書で用いる場合、用語「含む」は「からなる」及び「から本質的になる」の側面を含むことができる。

【0024】

本明細書で用いる場合、用語「i T E P」は、免疫寛容なエラスチン様ポリペプチドのことをいい、これは相転移特性を有し、免疫寛容であるので、これまでに開示されたエラスチン様ポリペプチド（E L Pと呼ぶ）とは異なる。

【0025】

緒言

10

細胞傷害性Tリンパ球（C T L）応答を誘発するワクチンは、癌及び感染症に対する重要な予防または治療モジュールである。⁽¹⁻³⁾抗原提示細胞へのこうしたワクチンの送達を促進するために担体を用いることが、ワクチンの効力を向上させるための戦略である。^(4,5)C T Lワクチン担体の構築材料として様々な天然及び合成材料が試験されてきたが、^(6,7)C T L応答を促進するための臨床用途に承認されたものはウイルス様粒子（V L P）であり、⁽⁵⁾他の好適なワクチン担体材料を同定する必要性が浮き彫りにされた。

【0026】

エラスチン様ポリペプチド（E L P）及びV L Pは両方ともタンパク質である。V L Pと同様に、E L Pもほぼ同等のサイズのナノ粒子（N P）に自己組織化することができる。⁽⁸⁾V L Pとのこれらの類似性の他に、E L Pはワクチン送達にとって魅力的ないくつかの追加の特徴を有する：（1）タンパク質またはペプチドベースのC T Lワクチンは、潜在的に、遺伝子操作アプローチを用いてE L Pと融合させることができ、既存のE L P融合体に類似した、E . c o l iまたは他の発現系で容易に複製することのできる融合タンパク質が得られる；^(9,10)（2）本明細書に記載の遺伝子操作アプローチを用いてワクチンを担体に担持させた場合、ワクチンのコピー数及び担体からのそれらの切断部位が明確に定まり、ワクチンの効力を向上させるように正確に調節される；⁽¹¹⁻¹³⁾ならびに（3）E L Pの特徴 可逆的熱（またはイオン）誘発性逆相転移 は、E L P - タンパク質融合体に、及びおそらくi T E P - ワクチン融合体に伝達可能である。⁽¹⁴⁾したがって、融合体は転移サイクルを繰り返すことによって単純に精製することができる。これらの魅力的特徴を有するにもかかわらず、E L PはこれまでC T Lワクチン担体として報告されていなかった。本明細書では、C T Lワクチン担体としてE L P（i T E Pと呼ぶ）ナノ粒子を用いる組成物及び方法を開示する。これまでの報告から、体液性免疫原性担体はそのC T Lワクチンペイロードの効力を損なうことが分かっている。⁽¹⁵⁻¹⁷⁾本明細書では、C T Lワクチン担体としての体液性寛容E L Pの使用について記載する。報告されたE L Pの中で、少数は免疫寛容と確認されているが、他は免疫原性と分かっている。⁽¹⁸⁻²²⁾しかし、これらの免疫寛容E L PにはN Pを形成するのに要求される疎水性及び長さがない。この制限から、ワクチン送達の必要性を満足する本明細書に記載の新規な免疫寛容E L Pの設計及び生成に至る。

【0027】

ポリペプチド材料は、E L Pを含め、一般に発明され、物理化学的性質、例えば相転移特性などが最適化されているが、その物理化学的性質が確立された後でその免疫原性が考慮されていた。しかし、そのような慣行は、機能の特徴が十分に分かったE L Pが、後に発見される有害な免疫原性のために、実際には無価値になり得るリスクを抱えている。^(23,24)したがって、本明細書に記載するように、開発の最初からE L Pの相転移特性に加えて免疫原性も同等に重要視した新規のE L P開発手法を用いた。

【0028】

この新規の手法を用いて、E L P（例えばi T E P）を本明細書に記載する。各配列は典型的なE L P「V - P - G - X - G」（配列番号29）モチーフに対して非カノニカルである。^(25,26)本明細書で用いる場合、これらの新規なE L Pは、この新規E L P改変手法を強調してi T E Pと呼ぶ。本明細書に開示のi T E Pは望ましい転移特性を有し、

40

50

また、マウス体液性免疫に寛容された。両親媒性二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質を作製するために疎水性が反対であった2つの対形成したiTEPも本明細書に記載する。融合タンパク質は2つ以上のタンパク質同士を融合することによって生成することができる。2つのタンパク質の融合体を表現するために二元プロックコポリマーを用いることができる。コポリマー（例えば融合タンパク質）は、モデルCTLペプチドワクチンSINEKEL（配列番号22）と融合した場合、NPに自己組織化した。NPは樹状細胞（DC）によるワクチンの提示を向上させ、ワクチン誘発性CTL応答の強度を増加させた。本明細書に開示する結果は、この新規手法を用いて開発されたiTEPがCTLペプチドワクチン担体に適していることを示す。

【0029】

10

組成物

組換えポリペプチド。本明細書で用いる場合、用語「組換えポリペプチド」は、組換え技術を含む様々な方法によって生成されたポリペプチドのことをいう。

【0030】

ある態様において、組換えポリペプチドは、アミノ酸配列 Gly - (Gly - Val - Leu - Pro - Gly - Val - Gly)₂₈ - Gly - Gly (配列番号23) ; Gly - (Gly - Ala - Gly - Val - Pro - Gly)₇₀ - Gly - Gly (配列番号24) ; Gly - (Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly)₂₁ - Gly - Gly (配列番号25) ; または Gly - (Val - Pro - Gly - Leu - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly)₉₆ - Gly - Gly (配列番号26) を含む。

【0031】

組換えポリペプチドは、2つ以上の相同アミノ酸リピートをさらに含むことができる。ある態様において、組換えポリペプチドは、二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質を含む。二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質は、共有結合によって互いに結合した2つまたは3つの相同アミノ酸リピートを含む。二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質と治療薬（例えばワクチン）またはプラスミド（例えばpOVA）との間に、1つ以上のシステイン残基を挿入することができる。システイン残基の数は、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、もしくはこれより多く、または間の任意の数とすることができます。ある態様において、システイン残基の数は4である。システイン残基は1つ以上のグリシン残基によって隔てることができる。グリシン残基の数は異なり、二元プロックコポリマーとpOVAとの間に挿入されるシステイン残基の数に依存することができる。グリシン残基の数は、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、もしくはこれより多く、または間の任意の数とすることができます。ある態様において、グリシン残基の数は8とすることができます。例えば、二元プロックコポリマーとpOVAとの間に4つのシステイン残基が挿入される場合、8つのグリシン残基を挿入して隣接するシステイン残基を隔てることができます。ある態様において、二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質は両親媒性とすることができます。いくつかの態様において、二元プロックコポリマーまたは融合タンパク質は治療薬（例えばワクチン）と融合させることができます。

20

30

40

【0032】

本明細書では、式：Val - Pro - Gly - Xaa₁ - Gly - Xaa₂ - Gly - Ala - Gly (式中、Xaa₁はLeuまたはPheであり、Xaa₂はAlaまたはValである) (配列番号16～19)に従うアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列が繰り返される組換えポリペプチドも開示する。組換えポリペプチドは、組換えポリペプチドのN末端、C末端、またはN末端及びC末端の両方に位置する1つ以上の残基をさらに含むことができる。ある態様において、1つ以上の残基はグリシン、アラニン、もしくはセリンまたはこれらの組合せである。ある態様において、組換えポリペプチドは、アミノ酸配列 Gly - (Val - Pro - Gly - Phe - Gly - Ala - Gly - Ala - Gly)₂₁ - Gly - Gly (配列番号25) ; または Gly - (Val - Pro - Gly -

50

L e u - G l y - A l a - G l y - A l a - G l y)₉₆ - G l y - G l y (配列番号26) ; またはX X - (V a l - P r o - G l y - L e u - G l y - V a l - G l y - A l a - G l y)_x - X X (配列番号27) を含む。後述するように、「X X」はC末端及びN末端の両方における1つ以上のグリシン残基とすることができます、「x」は2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、100、150、200または間の任意の数とすることができる。

【0033】

ある態様において、組換えポリペプチドの同定される分子量は10~100kDaとすることができる。

【0034】

相同アミノ酸リピート。本明細書で用いる場合、用語「相同アミノ酸リピート」または「モノマー」は、20種のタンパク質アミノ酸のいずれかを含むアミノ酸配列のことをいい、直線状に反復または複製されている。相同アミノ酸リピート配列は、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、100、150、200回もしくはこれより多く、または間の任意の回数繰り返すことができる。ある態様において、相同アミノ酸リピートは100以下のリピートを含む。別の態様において、相同アミノ酸リピートは少なくとも20のリピートを含む。

【0035】

ある態様において、相同アミノ酸リピートは、配列G l y - V a l - L e u - P r o - G l y - V a l - G l y (配列番号1; i T E P_A) ; G l y - A l a - G l y - V a l - P r o - G l y (配列番号2; i T E P_B) ; V a l - P r o - G l y - P h e - G l y - A l a - G l y - A l a - G l y (配列番号3; i T E P_C) ; V a l - P r o - G l y - L e u - G l y - A l a - G l y - A l a - G l y (配列番号4; i T E P_D) ; V a l - P r o - G l y - L e u - G l y - V a l - G l y - A l a - G l y (配列番号5; i T E P_E) ; G l y - V a l - L e u - P r o - G l y - V a l - G l y - G l y (配列番号6) ; G l y - V a l - L e u - P r o - G l y (配列番号7) ; G l y - L e u - V a l - P r o - G l y - G l y (配列番号8) ; G l y - L e u - V a l - P r o - G l y (配列番号9) ; G l y - V a l - P r o - L e u - G l y (配列番号10) ; G l y - I l e - P r o - G l y - V a l - G l y (配列番号11) ; G l y - G l y - V a l - L e u - P r o - G l y (配列番号12) ; G l y - V a l - L e u - P r o - G l y (配列番号13) ; G l y - V a l - G l y - V a l - L e u - P r o - G l y (配列番号14) ; またはG l y - V a l - P r o - G l y (配列番号15) とすることができます。表1に相同アミノ酸リピート配列をリストする。

表1. 相同アミノ酸リピート配列

配列番号	相同アミノ酸リピート
1	Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Val-Gly
2	Gly-Ala-Gly-Val-Pro-Gly
3	Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly
4	Val-Pro-Gly-Leu-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly
5	Val-Pro-Gly-Leu-Gly-Val-Gly-Ala-Gly
6	Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Val-Gly-Gly
7	Gly-Val-Leu-Pro-Gly
8	Gly-Leu-Val-Pro-Gly-Gly
9	Gly-Leu-Val-Pro-Gly
10	Gly-Val-Pro-Leu-Gly
11	Gly-Ile-Pro-Gly-Val-Gly
12	Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Gly
13	Gly-Val-Leu-Pro-Gly
14	Gly-Val-Gly-Val-Leu-Pro-Gly
15	Gly-Val-Pro-Gly

10

20

【0036】

別の態様において、相同アミノ酸リピートはアミノ酸配列：G l y - G l y - V a l - P r o - G l y（配列番号28）ではない。

【0037】

ある態様において、相同アミノ酸リピート配列は4つ以上のアミノ酸残基を含む。ある態様において、アミノ酸残基の1つはプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上はバリンである。プロリン及びバリン残基は互いに隣接させることができる。あるいは、プロリン及びバリン残基は互いに隣接していない。いくつかの態様において、ただ1つのプロリンが相同アミノ酸リピート中に存在する。相同アミノ酸リピート配列はエラスチンにおける自然発生配列として存在することができる。相同アミノ酸リピート配列は、N末端及びC末端の両方に1つ以上のグリシン残基が天然で隣接していてもよい。

30

【0038】

ある態様において、相同アミノ酸リピートはエラスチン由来とすることができる。相同アミノ酸リピート配列はマウス及び／またはヒトエラスチンに由来することができる。相同アミノ酸リピート配列は、C末端及びN末端の両方に1つ以上のグリシン残基がさらに隣接することができるマウス及び／またはヒトエラスチンに由来することができる。ある態様において、相同アミノ酸リピートは、配列番号1～15などのうちの1つ以上である相同アミノ酸リピートに対してある程度の同一性または相同性を示すことができる。同一度は異なり、当業者にとって公知の方法によって確認することができる。用語「相同性」及び「同一性」はそれぞれ、2つのポリペプチド配列の間の配列類似性のことをいう。相同性及び同一性はそれぞれ、比較のためにアラインメントすることのできる各配列中の位置を比較することによって確認することができる。比較した配列中の位置が同じアミノ酸残基によって占められている場合、ポリペプチドはその位置で同一と呼ぶことができ、相当部位が同じアミノ酸（例えば同一）または類似のアミノ酸（例えば立体的及び／または電子的性質が類似）によって占められている場合、分子はその位置で相同と呼ぶことができる。配列間の相同率または一致率は、配列によって共有される一致または相同な位置の数の関数である。本明細書に記載の組換えポリペプチドの相同アミノ酸リピートは、配列

40

50

番号 1 ~ 15 などのうちの 1 つ以上である相同アミノ酸リピートとの少なくともまたは約 25%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一性または相同性を有することができる。

【0039】

ある態様において、本明細書に記載の組換えポリペプチドは、組換えポリペプチドの N 末端、C 末端、または N 末端及び C 末端の両方に位置する 1 つ以上の残基をさらに含むことができる。1 つ以上の残基はグリシン、アラニン、もしくはセリンまたはこれらの組合せとすることができます。本明細書に記載の 1 つ以上の残基は免疫原性を減少させる任意の残基とすることができます。

【0040】

ある態様において、組換えポリペプチドは免疫原性とすることができます。例えば、組換えポリペプチドは、マウスに対して免疫原性とすることができます、可溶性単一分子相と不溶性凝集体相との間の熱及びイオン誘発性可逆的逆相転移を有することができます。この群のポリペプチドを本明細書では免疫原性エラスチン様ポリペプチド (iMEP) と呼ぶ。

【0041】

ある態様において、相同アミノ酸リピートは、Leu - Val - Val - Gly - Gly - Gly - Pro (配列番号 20; iMEPA)；及び Ala - Gly - Gly - Pro - Gly - Val - Ala - Gly - Pro - Gly (配列番号 21; iMEPB) である。

【0042】

ある態様において、本明細書に開示の iMEP は、例えば 1 つ以上の iTEP に対する対照材料として用いることができる。それらは、免疫原性担体が所望される場合に薬物担体として用いることもできる。多くの態様において、本明細書に開示の iMEP は、本明細書で iTEP について規定するように作製して使用することができます。さらに、多くの態様において、iTEP に関する開示は iMEP にも適用することができる。

【0043】

非免疫原性バイオコンジュゲートの作製方法

本明細書で用いる場合、用語「非免疫原性バイオコンジュゲート」は、本明細書に記載の組換えポリペプチド及び 1 つ以上の治療薬を含むタンパク質のことを行う。

【0044】

本明細書に記載の非免疫原性バイオコンジュゲートの生成に用いることができる技術を本明細書で開示する。

【0045】

設計。ある態様において、本明細書に記載の組換えポリペプチド (例えば iTEP) は、エラスチンに由来するペプチドのポリマーとして設計することができる。組換えポリペプチドはマウス及びヒトにおいて体液性寛容とすべきであり、B 細胞受容体に結合する 1 つ以上のエピトープ、及び MHC クラス II 複合体に結合し、続いて T 細胞受容体 (例えば CD4 + T 細胞) と結合する 1 つ以上のエピトープを含有する。選択される組換えポリペプチド配列は自己免疫応答を内因的に誘発すべきではない (すなわち配列は B 細胞または T 細胞受容体に内因的に結合すべきではない)。

【0046】

免疫原性である組換えポリペプチドを生成する可能性を減少させるために、2 つの戦略を用いることができる。第 1 に、外因性接合配列の生成を制限するために、ヒト及びマウスエラスチン中の通常の既存のペプチドリピートを相同アミノ酸リピートのコンポーネントとして用いることができる。第 2 に、1 つ以上の外因性接合配列が生成された場合には、相同アミノ酸リピートは 4 残基以上でエラスチン由来とし、1 つ以上のグリシン残基が N 及び C 末端で隣接しているべきである。短いものではなく長い相同アミノ酸リピートを用いることによって、外因性接合配列の数を減少させることができる。外因性接合配列を減少または排除することが、組換えポリペプチドまたは相同アミノ酸リピートの免疫原性を減少し得る。

10

20

30

40

50

【0047】

いくつかの態様において、相同アミノ酸リピートが相転移特性を有するために、1つのプロリン残基及び1つ以上のバリン残基を有するように設計することができる。

【0048】

非免疫原性コンジュゲートとして有用なポリペプチドは、核酸からタンパク質を生成するため定型的に用いられる合成方法及び組換え技術によって生成することができる。ポリペプチドは、後で使用するまで未精製または単離もしくは実質的に精製された形態で保存することができる。

【0049】

非免疫原性バイオコンジュゲート。いくつかの態様において、本明細書に開示の組換えポリペプチドは組換え融合タンパク質または二元ブロックポリマーである。これは、様々な発現系（例えばE.coli、酵母、昆虫細胞、及び哺乳類細胞培養物；ならびに植物）で発現させることができる。簡潔に述べると、組換え融合タンパク質をコードするプラスミドDNAを上記の発現系のいずれかの細胞内に形質移入することができる。融合タンパク質（例えばiTEPB-iTEPA）がこれらの系のいずれか1つにおいて産生された後、それらを精製、凍結乾燥して使用するまで保存することもできる。10

【0050】

治療薬。多種多様な治療薬を非免疫原性バイオコンジュゲートに組込み、会合、または連結することができる。治療薬は、化学化合物、タンパク質、ペプチド、低分子または細胞とすることができます。治療薬の例としては、ペプチドワクチン、抗体、核酸（例えばsiRNA）及び細胞ベースの作用物質（例えば幹細胞、CAR-T細胞）が挙げられる。いくつかの態様において、治療薬のうちの1つ以上は抗癌剤とすることができます。抗癌剤は抗癌特性を有する作用物質、ワクチンまたは薬物とすることができます。ある態様において、抗癌剤は抗微生物または抗ウイルス特性を有する。ある態様において、抗癌剤は癌幹細胞阻害剤とすることができます。抗癌剤の例は、サリノマイシン及びパクリタキセルまたはそれらの任意のアナログである。20

【0051】

本明細書に記載の組換えポリペプチドは、例えば細胞接着及び成長のための、スキヤホールド材料用の担体として用いることもでき、そのため、組織修復または細胞ベース療法に用いることができる。組換えポリペプチドは、例えば、インビトロ及びインビボでの細胞成長を促進するためのマトリックスゲルとして、及びアジュvantとして用いることができる。30

【0052】

リンカー。本明細書に記載の非免疫原性バイオコンジュゲートは1つ以上のリンカーをさらに含むことができる。本明細書に開示の組成物中の所与のリンカーは、切断可能な結合（例えばチオエステル結合）をもたらすことができる。結合に利用可能な部位は、本明細書に記載の組換えポリペプチド上に見出すことができる。本非免疫原性バイオコンジュゲートにおいて有用なリンカーは、治療薬またはワクチンを結合させる組換えポリペプチド上の一級アミンと反応する基を含むことができる。有用なリンカーは民間の供給元から入手可能である。ある態様において、リンカーは4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド塩酸塩(MPBH)とすることができる。当業者は適切なリンカーを選択することができる。40

【0053】

リンカーは共有結合とすることができます。共有結合を形成するために、例えば、多種多様な活性カルボキシル基（例えばエステル）を有する化学反応性基を用いることができるが、この場合、組換えポリペプチドを修飾するのに必要なレベルでヒドロキシル部分が生理的に許容可能である。

【0054】

本明細書に記載の、非免疫原性コンジュゲートに組み込まれる組換えポリペプチドのいずれも、本明細書に記載のリンカーと化学相互作用するように、またはそれを含むように50

修飾することができる。こうした修飾組換えポリペプチド及びペプチド - リンカーコンストラクトは本開示の範囲内であり、治療薬へのコンジュゲーションのプロセスを完了するための使用説明書と共にキットの構成要素としてパッケージ化することができる。組換えポリペプチドは、N末端、C末端、または両方でシステイン残基または他のチオ含有部分（例えばC-SH）を含むように修飾することができる。

【0055】

ある態様において、当業者にとって公知の方法を用いて、治療薬（例えばパクリタキセル）を組換えポリペプチド上にカプセル化または担持することができる。カプセル化した治療薬は高速液体クロマトグラフィーによって確認することができる。

【0056】

構成。組換えポリペプチド、治療薬、及びリンカーをはじめとする非免疫原性バイオコンジュゲートの各部分は、独立して選択することができる。構成部分は融和性があるように関連している必要があることを当業者であれば理解しよう。癌及び感染症の治療のために、非免疫原性バイオコンジュゲートを用いて患者に治療薬を送達することができる。非免疫原性バイオコンジュゲート当たりの治療薬の数は、さらなるiTEP（例えば二元ブロックポリマー、融合タンパク質）を追加することによって制御することができる。1つ以上のシステイン残基をiTEPの末端の一方に付加することができ、1つ以上の治療薬のためのコンジュゲーション部位として用いることができる。例えば、8つのシステイン残基を付加して、8つの治療薬のための8つのコンジュゲーション部位を得ることができる。治療薬は同じか、異なるか、または任意のその組合せとすることができます。2つのシステイン残基を本明細書に記載の組換えポリペプチド（例えばiTEP）の末端に付加する場合、1つ以上のスペーサー（例えばグリシン残基）を、例えば、2つのシステイン残基の間に挿入することができる。スペーサーの数は、付加したシステイン残基の数または所望の治療薬分子の数に応じて調節することができる。スペーサーは、2つ以上の治療薬を収容するのに十分な間隔をもたらす役割を果たす。スペーサーは、1つ以上のグリシンもしくはセリンまたはこれらの組合せとすることができます。

【0057】

したがって、いくつかの態様において、治療薬は2つ以上とすることができる。他の実施形態において、本明細書に記載の組換えポリペプチド（例えばiTEP）及び治療薬は、1:1（組換えポリペプチド：治療薬）の比で存在する。組換えポリペプチド：治療薬の比は、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10または任意の他のこれらの組合せとすることもできる。本明細書に記載の組換えポリペプチドに結合させることのできる治療薬の数は、所与のポリペプチドに付加されるコンジュゲーション部位（例えばシステイン残基）の数によって決定することができる。

【0058】

本明細書に記載の組換えポリペプチドの間（例えば2つのiTEP分子間）に1つ以上のシステイン残基を付加することができる。システイン残基は、2つ以上のスペーサー（例えばグリシン残基）を付加することによってさらに隔てることができる。例えば、二元ブロックポリマー（またはコポリマーもしくは融合タンパク質）とプラスミド（例えばpOVA）との間に、4つのシステイン残基を挿入することができる。これらのシステイン残基は、例えば、8つのグリシン残基の付加によってさらに隔てることができる。

【0059】

標識。本明細書に記載の組換えポリペプチドは、1つ以上の標識または検出タグをさらに含むことができる。（例えばFLAG（商標）タグ、エピトープまたはタンパク質タグ、例えばmycタグ、6His、及び蛍光融合タンパク質など）。ある態様において、標識（例えばFLAG（商標）タグ）を組換えポリペプチドに融合する。ある態様において、開示の方法及び組成物は、融合タンパク質、またはそれをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。様々な態様において、融合タンパク質は少なくとも1つのエピトープ付与アミノ酸配列（例えば「エピトープタグ」）を含み、エピトープタグは、i)タンパク質（例えば組換えポリペプチド）のN及び/またはC末端に付加されるエピトープタグ；ま

10

20

30

40

50

たは i i) タンパク質(例えば組換えポリペプチド)のある領域に挿入されるエピトープタグ、及びタンパク質(例えば組換えポリペプチド)中のいくつかのアミノ酸を置換するエピトープタグから選択される。

【 0 0 6 0 】

エピトープタグは、短い一連のアミノ酸であり、これに対して特異的抗体を産生させることができ、いくつかの態様において、生体または培養細胞に添加されたタグ付きタンパク質を特異的に同定して追跡することを可能にする。タグ付き分子の検出は複数の異なる技術を用いて達成することができる。そのような技術の例としては、免疫組織化学、免疫沈降、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査、E L I S A、イムノプロッティング(「ウエスタンプロッティング」)、及びアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。エピトープタグは、対象タンパク質上に既知のエピトープ(例えば抗体結合部位)を付加して、既知の及び多くの場合、高アフィニティーの抗体の結合をもたらし、これにより、生体または培養細胞に添加されたタグ付きタンパク質を特異的に同定して追跡することが可能となる。エピトープタグの例としては、m y c、T 7、G S T、G F P、H A(ヘマグルチニン)、V 5 及びF L A G タグが挙げられるが、これらに限定されない。最初の4つの例は現存する分子に由来するエピトープである。対照的に、F L A G は高い抗原性のために設計された合成エピトープである(例えば、米国特許第4,703,004号及び第4,851,341号を参照)。エピトープタグは、抗体による認識以外に1つ以上の追加の機能を有することができる。

【 0 0 6 1 】

ある態様において、開示の方法及び組成物はエピトープタグを含み、エピトープタグは6~15アミノ酸の長さを有する。代替的な態様において、エピトープタグは9~11アミノ酸の長さを有する。開示の方法及び組成物は、間隔があいているか、または直接連なった2つ以上のエピトープタグを含む融合タンパク質を含むこともできる。さらに、開示の方法及び組成物は、融合タンパク質がその生物活性(複数可)(例えば「機能的な」)を維持する限り、2、3、4、5、さらにはこれよりも多くのエピトープタグを含むことができる。

【 0 0 6 2 】

ある態様において、エピトープタグは、V S V - G タグ、C D タグ、カルモジュリン結合ペプチドタグ、S タグ、A v i t a g、S F - T A P タグ、s t r e p タグ、m y c タグ、F L A G タグ、T 7 タグ、H A(ヘマグルチニン)タグ、H i s タグ、S タグ、G S T タグ、またはG F P タグである。これらのタグの配列は文献に記載されており、当業者にとって公知である。

【 0 0 6 3 】

本明細書に記載の「免疫学的結合」は、抗原のエピトープ(例えばエピトープタグ)と抗体またはその断片の抗原特異的部分との間の非共有結合形態の結合である。抗体はモノクローナルであることが好ましく、用いられるエピトープタグ(複数可)のそれぞれに特異的でなければならない。抗体としては、マウス、ヒト及びヒト化抗体が挙げられる。抗体断片は当業者にとって公知であり、中でも、一本鎖F v 抗体断片(s c F v 断片)及びF a b 断片が挙げられる。抗体は、通常のハイブリドーマ及び/または組換え技術によって生成することができる。多くの抗体は市販されている。

【 0 0 6 4 】

既知のタンパク質のドメインから、またはタンパク質全体もしくはタンパク質及びペプチドからの融合タンパク質の構築は公知である。一般に、遺伝子操作技術を用いて、所望のタンパク質及び/またはペプチド部分をコードする核酸分子を接合し、単一の作用可能に連結した融合オリゴヌクレオチドを作製する。適切な分子生物学的技術は、Sam brook et al. (Molecular Cloning: A laboratory manual Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring harbor, NY, USA, 1989)に見出すことができる。遺伝子操作マルチドメインタ

10

20

30

40

50

ンパク質の例としては、様々なリンカーによって接合されたもの、及びペプチドタグを含有するものが挙げられ、以下の特許文献に見出すことができる：米国特許第5,994,104号（“Interleukin-12 fusion protein”）；米国特許第5,981,177号（“Protein fusion method and construction”）；米国特許第5,914,254号（“Expression of fusion polypeptides transported out of the cytoplasm without leader sequences”）；米国特許第5,856,456号（“Linker for linked fusion polypeptides”）；米国特許第5,767,260号（“Antigen-binding fusion proteins”）；米国特許第5,696,237号（“Recombinant antibody-toxin fusion protein”）；米国特許第5,587,455号（“Cytotoxic agent against specific virus infection”）；米国特許第4,851,341号（“Immunoaffinity purification system”）；米国特許第4,703,004号（“Synthesis of protein with an identification peptide”）；及びWO 98/36087（“Immunological tolerance to HIV epitopes”）。 10

【0065】

対象融合タンパク質中の機能化ペプチド部分（エピトープタグ）の配置は、機能化ペプチド部分の活性、及び融合体において融合タンパク質、例えばT C Rなどの生物活性の少なくとも大部分を維持する必要性によって影響され得る。機能化ペプチドの配置のための2つの方法は、N末端、及び挿入可能性を示すタンパク質部分中の位置への配置である。これらのみが機能化ペプチドを挿入することができる位置ではないが、これらは良い例となり、例示として用いられよう。他の適切な挿入位置は、配列（例えばFLAGペプチドをコードする配列）をコードする試験ペプチドを異なる位置でコンストラクト中に挿入し、その後、融合体を構築するために用いた特定の部分にとって適切なアッセイを用いて、適切な生物活性及び機能化ペプチド活性について得られた融合体をアッセイすることによって特定することができる。対象タンパク質の活性は、本明細書に記載のものを含め、様々な公知の技術のいずれかを用いて測定することができる。 30

【0066】

本明細書に開示の非免疫原性バイオコンジュゲートを生成するプロセスに関する本明細書に開示の方法は、非免疫原性バイオコンジュゲートの医薬品として許容可能な塩を生成するように容易に変更することができる。そのような塩を含む医薬組成物及びその投与方法は本開示の範囲内である。

【0067】

医薬組成物

上記の非免疫原性バイオコンジュゲート（及び組換えポリペプチド）ならびに医薬品として許容可能な担体を含む医薬組成物を本明細書に開示する。いくつかの態様において、治療薬は抗癌剤または抗微生物剤もしくは抗ウイルス剤であり、医薬組成物は静脈内投与のために製剤化される。本開示の組成物は、治療有効量の本明細書に記載の非免疫原性バイオコンジュゲートも含有する。組成物は、様々な投与経路のいずれかによる投与のために製剤化することができ、1つ以上の生理学的に許容可能な添加物を含むことができ、これは投与経路に応じて変更することができる。本明細書で用いる場合、用語「添加物」は任意の化合物または物質を意味し、「担体」または「希釈剤」と呼ぶこともできるものを含む。医薬品として及び生理学的に許容可能な組成物の調製は当該技術分野においては定型的なものと考えられており、したがって、当業者は必要であれば教示について多数の権威を参照することができる。 40

【0068】

本明細書に開示の医薬組成物は、経口または腸管外投与のために調整することができる

50

。腸管外投与のために調製された医薬組成物としては、静脈内（もしくは動脈内）、筋肉内、皮下、腹腔内、経粘膜（例えば鼻腔内、膣内、もしくは経直腸）、または経皮（例えば外用）投与のために調製されたものが挙げられる。エアゾール吸入も非免疫原性バイオコンジュゲートを送達するために用いることができる。したがって、組成物は、限定はないが水性担体、例えば水、緩衝水、生理食塩水、緩衝生理食塩水（例えばP B S）などをはじめとする許容可能な担体中に溶解または懸濁した非免疫原性バイオコンジュゲートを含む腸管外投与のために調製することができる。含まれる添加物の1つ以上、例えばpH調節及び緩衝剤、等張化剤、湿潤剤、界面活性剤などは、生理的条件に近づけるのに役立つことができる。組成物が固形成分を含む場合（経口投与用の場合のように）、添加物の1つ以上は結合剤または增量剤（例えば錠剤、カプセルなどの製剤化用）として機能することができる。組成物が皮膚または粘膜表面への適用のために製剤化される場合、添加物の1つ以上は、クリーム、軟膏などの製剤化のための溶媒または乳化剤とすることができます。10

【0069】

医薬組成物は無菌とすることができる、従来の滅菌技術によって滅菌するか、または滅菌濾過することができる。水溶液をそのまま使用するためにパッケージ化することができるか、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥調製物は、本開示に包含されるが、投与前に滅菌水性担体と混合することができる。医薬組成物のpHは典型的に3～11（例えば約5～9）または6～8（例えば約7～8）になるであろう。固体形態の得られる組成物は複数の単回投与単位にパッケージ化することができ、それぞれ、錠剤またはカプセルの密封パッケージにおけるように、上述の作用物質または複数の作用物質を一定量含有する。固体形態の組成物は、外用クリームまたは軟膏用に設計されたスライーズチューブにおけるように、量の融通が利く容器中にパッケージ化することもできる。20

【0070】

治療方法

癌患者の治療方法を本明細書に開示するが、この方法は、(a)治療を必要とする患者を特定すること；ならびに(b)4つ以上のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基の1つがプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上がバリンである相同アミノ酸リピートを含む組換えポリペプチド；及び治療薬を含む非免疫原性バイオコンジュゲート、ならびに医薬品として許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む。30

【0071】

感染症患者の治療方法を本明細書に開示するが、この方法は、(a)治療を必要とする患者を特定すること；ならびに(b)4つ以上のアミノ酸残基を含み、アミノ酸残基の1つがプロリンであり、アミノ酸残基の1つ以上がバリンである相同アミノ酸リピートを含む組換えポリペプチド；及び治療薬を含む非免疫原性バイオコンジュゲート、ならびに医薬品として許容可能な担体を含む治療有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む。

【0072】

上記の医薬組成物は、治療有効量の非免疫原性バイオコンジュゲートを含むように製剤化することができる。治療的投与は予防的適用を包含する。遺伝子検査及び他の予後予測方法に基づいて、患者を診察している医師は、ある種の癌または感染症の臨床的に判定された疾患素質を有するか、または罹病性が増加している（場合によっては、罹病性が大幅に増加している）場合に、予防的投与を選択することができる。40

【0073】

本明細書に記載の医薬組成物は、臨床疾患の発症を遅延、軽減、または好ましくは防止するのに十分な量で被検者（例えばヒト患者）に投与することができる。したがって、いくつかの態様において、患者はヒト患者である。治療用途において、すでに癌（もしくは感染症）があるか、または癌（もしくは感染症）と診断された被検者（例えばヒト患者）に、徵候もしくは症状を少なくとも部分的に改善するのに、または病態、その合併症、及び結果の症状の進行を抑制する（及び好ましくは阻止する）のに十分な量で組成物を投与することができる。これを達成するのに十分な量を「治療有効量」と定義する。医薬組成50

物の治療有効量は治癒を達成する量とすることができますが、このアウトカムは達成することのできる複数のうちの1つにすぎない。述べたように、治療有効量としては、癌（もしくは感染症）の発症もしくは進行を遅延、阻害、もしくは防止するか、または癌（もしくは感染症）もしくは癌（もしくは感染症）の症状を寛解させる治療をもたらす量が挙げられる。症状の1つ以上はそれほど重度でなくてもよい。治療した個体では回復が加速し得る。

【0074】

いくつかの態様において、癌は原発性または続発性腫瘍である。他の態様において、原発性または続発性腫瘍は患者の乳房、肺、結腸または卵巣内にある。

【0075】

癌患者の治療方法を本明細書に開示する。癌は任意の癌とすることができます。いくつかの態様において、癌は乳癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、または胃癌である。ある態様において、癌は転移性である。いくつかの態様において、癌は癌幹細胞に関連している。

【0076】

この用途に有効な量は、癌の重症度ならびに被検者の体重及び全身健康状態に依存し得るが、一般に被検者当たり1投与ごとの免疫原性バイオコンジュゲートの範囲は約0.05 μg～約1000 μg（例えば0.5～100 μg）の当量である。初期投与及び追加投与のための好適なレジームとしては、初期投与とこれに続く1時間、1日、1週間、または1か月に1回以上の間隔でのその後の投与による繰り返し投与が代表的である。例えば、被検者は、1週間に1回以上（例えば1週間に2、3、4、5、6、もしくは7回またはこれより多く）の投与ごとに、非結合または遊離治療薬（複数可）と比較して約0.05～1,000 μg等価用量の範囲で免疫原性バイオコンジュゲート（または組換えポリペプチド）を受けることができる。例えば、被検者は、1週間に0.1～2,500 μg（例えば2,000、1,500、1,000、500、100、10、1.0.5、または0.1 μg）の投与量を受けることができる。被検者は、2週間または3週間に1回、投与ごとに0.1～3,000 μgの範囲で免疫原性バイオコンジュゲート（または組換えポリペプチド）を受けることもできる。被検者は毎週2 mg / kgを受けることもできる（重量は免疫原性バイオコンジュゲートまたは免疫原性バイオコンジュゲートの任意の部分もしくはコンポーネントの重量に基づいて計算される）。

【0077】

本明細書に開示の医薬組成物中の免疫原性バイオコンジュゲート（または組換えポリペプチド）の全有効量は、ボーラスとしてか、もしくは比較的短時間の間の注入によって単回投与量として哺乳類に投与することができるか、またはより長期間にわたって複数回投与される分割治療プロトコール（例えば4～6、8～12、14～16、もしくは18～24時間に、もしくは2～4日に、1～2週間に1回の投与、もしくは1か月に1回）を用いて投与することができる。あるいは、血中の治療有効濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入も本開示の範囲内である。

【0078】

本明細書に記載の組成物中に存在し、哺乳類（例えばヒト）に適用される本明細書に開示の方法において用いられる1つ以上の治療薬の治療有効量は、当業者であれば、年齢、体重、及び他の全身状態（上述の通り）の個体差を考慮して決定することができる。

【0079】

本開示の免疫原性バイオコンジュゲートは血清及び血流中で、ならびに場合によってはより特異的に安定であり得るので、任意の個々のコンポーネントを含む免疫原性バイオコンジュゲートの投与量は、結合していない場合の任意の個々のコンポーネントの有効投与量よりも低く（または高く）することができる。したがって、いくつかの態様において、投与された抗癌剤は、免疫原性バイオコンジュゲートの一部として投与された場合に、抗癌剤が単独でまたは免疫原性バイオコンジュゲートの一部としてではなく投与された場合と比較して、効果が増加している、または副作用が減少している。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0080】

実施例1：免疫寛容エラスチン様ポリペプチド(iTEP)の設計

iTEP発現プラスミドの構築。いくつかの改変について報告された方法⁽²⁷⁾を用いて、iTEPをコードする遺伝子を改変 pET25b(+)ベクター上に合成した。第1に、ベクターのXbaI及びBamHIエンドヌクレアーゼ制限部位に二本鎖DNAを挿入することによってpET25b(+)ベクターを改変した。挿入したDNAは、2つの相補的オリゴヌクレオチド、pET25-F及びpET25-R(表2)(Euros 10 Genomics, USA)を互いにアニーリングすることによって組み立てた。このDNAの挿入により、pET25b(+)ベクターにBseRI及びAccIに対する2つの新しい制限部位、ならびにインフレーム終止コドンが導入された。第2に、iT 10 EPA: (GVLPGVG)₄(配列番号30)、iTEPB: (GAGVPG)₅(配列番号31)、iTEPC: (VPGFGAGAG)₃(配列番号32)、及びiTEPD: (VPGLGA 20 GAG)₃(配列番号33)のサブユニットをコードする遺伝子を、これらの遺伝子のセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチド(表2)を互いにアニーリングすることによって生成した。第3に、これらのiT EP遺伝子を改変 pET25b(+)ベクターのBseRI部位に挿入した。最後に、iT EP遺伝子を以下の方法によって所望の長さに伸長した。具体的には、iT EP遺伝子を含有する改変ベクターをそれぞれ2セットの酵素によって消化した。第1セットはAccI、ApaI、及びBglIを含み、第2セットはBseRI及びApaIを含む。その後、2セットの消化からのものであり、iT EP遺伝子を含有していた2つのDNA断片を単離し、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結して新たなiT EP発現ベクターを作製した。ベクターを増幅のためにDH5⁺に形質転換した。iT EPビルディングブロックのリピート数を決定するiT EP遺伝子の長さは、XbaI及びBamHIによる二重消化ならびにその後のアガロースゲル分析によって確認した。このPRE-RDLプロセスを所望により繰り返して、設計した長さを有するiT EP遺伝子を生成した。最終iT EP遺伝子は、エンドヌクレアーゼ消化アプローチと組み合わせたDNAシーケンシング(Genewiz, USA)によって検証した。

表2. クローニング用のプライマーの配列

【 0 0 8 1 】

代表として用いた i T E P は、 G V L P G V G を 28 リピート有する i T E P_A (配列番号 50) 、 G A G V P G を 70 リピート有する i T E P_B (配列番号 51) 、 V P G F G A G A G を 21 リピート有する i T E P_C (配列番号 52) 、及び V P G L G A G A G を 96 リピート有する i T E P_D (配列番号 53) であった。奇数のリピートを有する i T E P_C が予期せず生成された。上記の長さを有する i T E P をこの研究に用いたが、その理由は、 E . c o l i から発現させることができ、転移温度が、塩有りまたは無しで、

周囲温度と 60 ℃との間であるので、転移サイクルを繰り返すことによって精製することができる操作上可能なためである。さらに、これらのサイズの i T E P は天然タンパク質の範囲内であり、ペプチドではなくタンパク質として i T E P の免疫原性の研究及び分析を可能にする。

【 0 0 8 2 】

両親媒性融合体 $i T E P_B - i T E P_A$ (配列番号 54) をコードする遺伝子は、P R e - R D L 法⁽²⁷⁾を用いて $i T E P_B$ 及び $i T E P_A$ 遺伝子を互いに連結させることによって生成した。融合体 $i T E P_B - i T E P_A - p O V A$ (配列番号 56) をコードする遺伝子は、p O V A の遺伝子 (表 2) を用いて同様に生成した。p O V A が 2 コピーの C T L エピトープ S I I N F E K L (配列番号 22) を有することに注目すべきである。⁽²⁸⁾ S I I N F E K L (配列番号 22) の両側に 1 つの天然隣接残基があった。p O V A の実際のアミノ酸配列は E S I I N F E K L T E S I I N F E K L T (配列番号 55) であった。

【 0 0 8 3 】

結果。i T E P がエラスチンに由来するペプチドのポリマーとして設計された。これらの i T E P の 1 つの評価基準は、前臨床及び臨床への適用を容易にすることができる特徴の、マウス及びヒトの両方において体液性寛容であるということである。ポリペプチドが体液性免疫原性となるためには、B 細胞受容体 (B C R) と結合する少なくとも 1 つのエピトープ、及び最初に M H C クラス I I 複合体と、その後に C D 4 + T 細胞上の同種 T 細胞受容体 (T C R) と結合する別のエピトープを含有することができる。⁽³⁴⁻³⁶⁾ 同様の理由で、体液性寛容ポリペプチドは T C R または B C R エピトープを含有すべきではない。ヒトエラスチンとマウスエラスチンとの間の相同ペプチド配列を i T E P のモノマー (例えば相同アミノ酸リピート) として選択した。これらの相同配列は内因的にはヒト及びマウスの B C R 及び T C R と結合しないはずであり、さもなければ自己免疫応答を誘発していたであろう (図 1)。

【 0 0 8 4 】

i T E P はエラスチン由来ペプチドのポリマーであるので、重合はヒト及びマウスに対して外因性である接合配列を導入する場合があり、こうした接合配列は潜在的に体液性免疫原性であり得る。免疫原性の可能性を減少させるために、2 つの戦略を活用した。第 1 に、i T E P 中に外因性接合配列がないように、i T E P (図 1 の i T E P_C 及び i T E P_D を参照) のモノマー (例えば相同アミノ酸リピート) としてヒト及びマウスエラスチン中で繰り返される相同ペプチドを用いた。さらに、リピートは 18 残基を有し、M H C クラス I I 拘束性 T C R エピトープ (13 ~ 17 残基) 及び直線状 B C R エピトープ (4 ~ 6 残基) の典型的な長さ^(37, 38)よりも長い。したがって、リピート (例えば相同アミノ酸リピート) は、リンパ球発生中にそれらと結合する B C R 及び T C R をネガティブセレクションして除去するために、天然で用いるのに十分長い。⁽³⁹⁾ その結果、ヒト及びマウス B C R または T C R はこれらのリピート (例えば相同アミノ酸リピート) と結合しないはずである。したがって、これらのリピート (例えば相同アミノ酸リピート) から重合された i T E P は、低または非免疫原性とすることができます。

【 0 0 8 5 】

外因性接合配列が不可避であった場合には第 2 の戦略を適用した。この場合、i T E P のモノマーに対する 2 つの評価基準が、1、エラスチン由来の長い相同ペプチドであること；2、両端に G l y が隣接していること (i T E P_A 及び i T E P_B : 図 1) であった。短いものではなく長いモノマー (例えば相同アミノ酸リピート) を用いることによって、i T E P 中の接合配列の数が少なくなった。免疫応答の強度にはエピトープ密度が重要な要因であるので、⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ この変化により、i T E P の免疫原性を潜在的に減少することができた。G l y 隣接モノマーは接合配列中に高頻度の G l y をもたらし、G l y は B C R エピトープを沈黙させることができるので、^(43, 44) 接合配列の免疫原性を緩和することができた。第 2 の戦略を用いると、i T E P は低免疫原性を有することができる。

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の i T E P が E L P の相転移特性を有するために、1つのプロリン及び少なくとも1つのバリンを含有するように i T E P のすべてのモノマー（例えば相同アミノ酸リピート）を設計した（図1）。公開されている E L P 配列のこれまでの研究⁽²¹⁾に基づいて、この基準は i T E P に転移特性を付与するのに十分となり得ると仮定した。本明細書に開示の i T E P モノマー（例えば相同アミノ酸リピート）のいずれも E L P のカノニカルモチーフ V P G X G（配列番号29）を有することができないが、⁽⁴⁵⁾カノニカルモチーフは上記の i T E P 設計基準の一部でないので、これは予期していないことではない。

【0087】

E L P 設計の最初から E L P の免疫原性に加えて物理化学的性質を強調する新規の E L P 設計及び改変手法を試験したことについて、本明細書に記載する。i T E P と称する新規の E L P を設計及び生成した。本明細書に記載の i T E P は体液性寛容であり、相転移特性を有する。本明細書に開示する結果は、両親媒性 i T E P コポリマーがナノ粒子に自己組織化することを実証する（下記の実施例を参照）。このナノ粒子は、モデル C T L ペプチドワクチンを送達するために用いた場合に、遊離ペプチドまたはタンパク質形態の C T L ワクチンと比較してワクチンの効力を向上させた。

【0088】

ペプチド及びタンパク質材料の有害な免疫原性は、標的との材料の相互作用を遮断することによってその機能を損ない、半減期を短縮し、^(52, 53)生物学的利用能を減少させる⁽⁵⁴⁾おそれがある。免疫原性は命に関わる場合もある。⁽⁵⁴⁾ C T L ワクチン送達の場合、ワクチン担体に対する体液性応答がワクチンペイロードの効果を阻害することが示された。^(55, 56)この研究における本発明者らの動機は C T L ワクチン担体としての E L P の潜在性を調査することであるので、i T E P は、これらのポリペプチドの免疫原性が担体としてのその使用の障害とならないように作製した。異なる配列を有する E L P は、プラスミド D N A と複合体化した場合に、非常に異なった体液性免疫原性を示すことが分かったつい最近の報告によって、i T E P を作製する必要性が実証された。⁽²²⁾ i T E P を作製するために、設計に機能及び免疫原性両方の基準を取り入れた、従来とは異なるポリペプチド設計及び改変手法を用いた。機能の特徴が十分に分かっている材料が、後で発見された有害な免疫原性のために無価値となり得るリスクを最小限にするために、この手法を用いた。この手法は実際に有益であると証明された。本明細書に開示するように、望ましい低免疫原性を有する i T E P が生成された。

【0089】

新規 E L P 開発手法の原理証明に加えて、これらの i T E P の生成に成功したことは実用的な意義がある。これらの i T E P は異なっており、一般的ではなく、前臨床及び臨床用途において他の報告されている E L P よりもおそらく有益であるが、その理由は、マウス及びヒトの両方に対して免疫寛容な材料として設計されたためであり、これには前例がない。⁽¹⁸⁻²¹⁾マウスにおける i T E P の免疫寛容が確認された。i T E P をマウス及びヒトに対して免疫寛容とするための根底にある概念は同じであるので、試験した場合にこれらの i T E P がヒト免疫によって寛容され得るとするには妥当である。

【0090】

実施例2：i T E P のクローニング及び発現

i T E P 及び i T E P 融合体の產生及び精製。コンピテント B L 21 (D E 3) E . c o l i 細胞 (EMD Chemicals, Inc. USA) を、i T E P または i T E P 融合体遺伝子を含有する p E T 25 b (+) 発現ベクターで形質転換した。100 μg / ml のアンピシリンを含有する T B 培地中で單一コロニー形質転換体を 24 時間 37 で成長させた。成長後、25分間、4,816 × g 及び 4 での遠心分離によって E . c o l i 細胞をペレットとして収集した。次に、細胞ペレットをリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に再懸濁し、3分間 / L 培養物の超音波処理によって溶解した（超音波処理パルス周波数：10秒オン及び30秒オフ）。その後、10% のポリエチレンイミン (P E I) を細胞ライセートに添加して E . c o l i D N A を沈殿させ、15分間、21,

10

20

30

40

50

$0.00 \times g$ 及び 4 の遠心分離によって沈殿剤を除去した。最後に、iTEP または iTEP 融合を前述したような逆転移サイクル (ITC) によって上清から精製した。⁽²⁹⁾ iTEP の純度は銅染色を用いた SDS-PAGE⁽³⁰⁾ によって評価した。

【0091】

iTEP 及び iTEP 融合体のエンドトキシン除去。Pierce 高容量エンドトキシン除去樹脂 (Thermo Scientific, USA) を用いて製造業者の指示に従い、iTEP 及び iTEP 融合体のエンドトキシンを除去した。エンドトキシンレベルは、カブトガニ血球抽出成分 (LAL) PYROGEN 単一試験バイアル (Lonza, USA) によって測定した。これらのサンプル中の最終エンドトキシンレベルはタンパク質 1 mg 当たり 0.25 EU 未満であった。

10

【0092】

結果。iTEP が E. coli から組換えタンパク質として産生及び精製された。修正した Pre-RDL 法 (図 2A)⁽²⁷⁾ を用いて、iTEP のコード遺伝子を構築及び伸長した。コード遺伝子はエンドヌクレアーゼ消化アプローチと組み合わせた DNA シーケンシングによって確認した。アガロースゲルの結果 (図 2B) により、コード遺伝子のサイズが確認された：iTEP_A (600 bp)、iTEP_B (1272 bp)、iTEP_C (579 bp)、及び iTEP_D (2604 bp)。これらの iTEP 遺伝子のサイズにより、適切な長さを有することが確認され、これらの遺伝子が予想される長さの iTEP をコードすることを示していた。精製後の iTEP の純度及びサイズを SDS-PAGE によって確認した (図 2C)。iTEP_B は他の iTEP と同様にはネガティブ染色されなかったことは注目に値するが、これはおそらく親水性でありながら無電荷の性質 (下) のためであり、これにより、iTEP の周りの SDS の乳化が妨げられる可能性があり、そのため、iTEP はゲル上で良好に集中することも、インサイチュでの銅錯体の形成を防止するのに十分な SDS を有することもできない。^(46, 47) その結果、この iTEP は銅染色 SDS-PAGE 上でスメアとして現れる。

20

【0093】

実施例 3 : iTEP の熱誘発性可逆的相転移

iTEP 及び iTEP_B-iTEP_A-pOVA 融合体の熱誘発性可逆的逆相転移の特性評価。iTEP または iTEP 融合体の相転移は、温度の関数としてのサンプル溶液の濁度変化によって特性評価した。具体的には、サンプル溶液の 350 nm での光学密度 (OD₃₅₀) を、マルチセル熱電温度コントローラを備えた UV-可視分光光度計 (Cary 300, Varian Instruments, Walnut Creek, CA) を用いて、溶液を 1 / min の速度で 20 から 80 まで加熱し、その後、20 に冷却しながら監視した。サンプルの濁度曲線の最大一次導関数を特定した。サンプルの転移温度 (T_t) は最大導関数に対応する温度である。

30

【0094】

結果。試験したすべての iTEP セットは、異なる相転移特性を示す (図 3A~E)。これらの iTEP の対応する逆転移温度 (T_t) は、それらの配列及び分子量と共に表 3 にまとめてある。iTEP_B は他の 3 つの iTEP よりも高い T_t を示した。具体的には、iTEP_B は、H₂O 中の試験した温度範囲 (20 ~ 80) ではコアセルベートを形成しなかったが、他は 29 ~ 38 でコアセルベートを形成した (図 3B 対図 3A、C、D)。iTEP_B の熱誘発性相転移を達成するために、2.5 M NaCl を含有する溶液中で実験を行った (図 3F)。iTEP_B の高い T_t は、他の 3 つの iTEP よりもはるかに親水性が高いことを示す。したがって、4 セットの iTEP の中から、親水性及び疎水性両方のものが得られた (表 3)。

40

表 3. iTEP の配列、MW、転移温度

iTEP	コントラクト配列	MW	Tt (加熱)	Tt (冷却)	相対疎水性
iTEP _A	G(GVLPGVG) ₂₈ GG 配列番号23	16.6 kDa	33.30 ± 0.09° C	29.70 ± 0.05° C	高
iTEP _B	G(GAGVPG) ₇₀ GG 配列番号24	32.1 kDa	65.45* ± 0.15° C	60.85* ± 0.44° C	低
iTEP _C	G(VPGFGAGAG) ₂₁ GG 配列番号25	15.3 kDa	35.70 ± 0.58° C	34.00 ± 0.58° C	高
iTEP _D	G(VPGLGAGAG) ₉₆ GG 配列番号26	65.6 kDa	38.60 ± 1.20° C	35.20 ± 0.57° C	高
iTEP _B - iTEP _A - pOVA	G(GAGVPG) ₇₀ G(GVLPGVG) ₂₈ G (ESIINFELKT) ₂ GG 配列番号56	49.7 kDa	75.40 ± 0.14° C	73.70 ± 0.23° C	(N/A)

表に示すTtデータは、iTEP_Bを除いてサンプルの濃度をH₂O中25 μMとした実験から得た。*iTEP_BのTtは2.5 M NaClの存在下で測定した。

【0095】

iTEP_C及びiTEP_DのTt(図3C及びD)を2つの異なる濃度、5及び25 μMで比較した場合に、興味深い観察結果が得られた。25 μMでは、38.6に対して35.7と、iTEP_CはiTEP_Dよりも低い(加熱)Ttを有していたが、5 μMでは、42.3に対して50.5と、iTEP_CはiTEP_Dよりも高いTtを示した。これらの2つのiTEPは互いに類似しているが、(1)それらの反復単位の4番目の残基がiTEP_CではPheであるのに対してiTEP_DではLeu(図1)、及び(2)反復単位の数がiTEP_Cでは21であるのに対してiTEP_Dでは96(表1)という2つの違いがある。第1の違いはiTEP_CにiTEP_Dよりも低いTtの傾向を与えるが、第2の違いはiTEP_CにiTEP_Dよりも高いTtの傾向を与える。^(48,49)25 μMでは、4番目の残基の違いの影響が反復数の違いの影響に明らかに勝っていたと見られ、5 μMではその逆である。したがって、これらのデータは、iTEPの濃度変化により、2つの差異が生じる要因の影響を異なるスケールではあるが変化させることができることを示す。

【0096】

本明細書に記載のiTEPは、ELPの典型的なVPGXG(配列番号29)モチーフを有することなく、ELPの相転移特性を有する。一方では、iTEP設計はこのモチーフに限定されていなかったので合理的である。ヒト及びマウスの両方にとって免疫寛容なELPを生成することの方が、このモチーフに適合するELPを生成することよりも重要であったが、これらの2つの要求は必ずしも相互に排他的ではない。他方では、この結果は、VPGXG(配列番号29)モチーフと相転移との間の関係⁽⁵⁹⁾についてのパラダイムシフトにつながり得る。本明細書に記載の設計戦略を用いたので、新規ELPは従来のVPGXG(配列番号29)モチーフ以外で生成され、新規かつ機能的なELPを作製する大きな自由度と能力を可能にした。

【0097】

実施例4：iTEPの体液性免疫原性

iTEPの免疫化及び免疫血清の収集。C57BL/6マウスを100 μg/マウスの投与量のiTEPにより右飛節で2回免疫化した。2回の免疫化には2週間の間隔をあけた。2回目の免疫化の1週間後、各免疫化マウスから100 μLの血液を収集した。血液サンプルを室温で30分～1時間静置して凝固させた。サンプルを10分間、14,000 rpm、4°で遠心した後、血液サンプルから血清を収集した。iTEP特異的IgGの力価の分析前に血清を-80°に維持した。

【0098】

E L I S A による Ig G 力価の測定。96 ウエル E L I S A プレートを 100 μ l / ウエルの捕捉抗原 (20 μ g / ml のそれぞれの i T E P 、オボアルブミン (O V A) または M S A) により 4 で一晩コーティングした。プレートを P B S - 0 . 0 2 % T w e e n 20 (P B S T) バッファーで洗浄し、200 μ L / ウエルの 1 % B S A を含有する P B S T バッファーにより室温で 1 時間ブロッキングした。マウス血清を P B S T - 1 % B S A バッファー中に逐次希釈し、96 ウエルプレート中に 100 μ L / ウエルで添加した。プレートを 4 で一晩インキュベートした。P B S T で完全に洗浄した後、1 μ g / ml の検出抗体 (ホースラディッシュペーオキシダーゼ結合抗マウス Ig G) を 100 μ L / ウエル添加し、プレートを連続的に振とうさせながら室温で 1 時間インキュベートした。P B S T で洗浄した後、15 ~ 30 分間連続的に振とうさせながら 100 μ L / ウエルのテトラメチルベンジジン (T M B) 基質溶液を添加した。100 μ L / ウエルの 1 M H₂S O₄ で反応を停止させた。プレートを O D 450 nm (波長補正のために 570 nm を引いた) で読み取った。

【 0 0 9 9 】

血清 Ig G の終点力価は、E L I S A アッセイからの O D 値が統計的に有効なカットオフよりも高い血清希釈の高い方の逆数として定義した。力価の結果は各サンプルについての Ig G 力価 (Log 10) として表した。カットオフは所与の捕捉抗原を用いる個々の E L I S A アッセイについて設定したので、異なる捕捉抗原についてカットオフは異なり得る。具体的には、P B S (陰性対照) 免疫化血清を用いて、それぞれの抗原コーティングウェルで E L I S A を実施することによって、カットオフを得た。カットオフの値は以下の式を用いて計算した。⁽³¹⁾

$$\text{カットオフ} = \bar{X} + SD t \sqrt{1 + (1/n)}$$

式中、

$$\bar{X}$$

30

は独立した P B S 対照血清の平均吸光度読取値であり、SD は読取値の標準偏差であり、n は独立した P B S 対照 (マウスサンプル) の数であり、t は v = n - 1 の自由度の片側 t 分布の (1 -) パーセンタイルである。

【 0 1 0 0 】

結果。4 つの i T E P 、陽性対照 (O V A) 、及び陰性対照 (マウス血清アルブミン、M S A) (図 4 A) でマウスを免疫化した。予想した通り、O V A 免疫化マウスは O V A に対して強い体液性応答を示し、抗体力価中央値が $2 . 6 \times 10^7$ であり、M S A 処理マウスは非常に低い体液性応答を示したが、これは $6 . 2 \times 10^2$ の抗体力価中央値によつて立証される (図 4 B) 。4 つの i T E P の中で、i T E P_A 、i T E P_C 、及び i T E P_D 処理マウスの血漿は、血漿を 100 倍以上に希釈した後で、i T E P 特異的抗体に対して陰性であったため (図 4 C 、 4 E 、 4 F) 、それらの力価中央値は 100 以下のはずである (図 4 B) 。i T E P_B 処理マウスの血漿は $4 . 5 \times 10^2$ の抗体力価中央値を有していた (図 4 B 、 4 D) 。i T E P の力価はすべて M S A のものとは差がないが、O V A の力価とは有意差があるので、すべての i T E P はマウスによって M S A のように体液性免疫寛容されると結論付けられた。

【 0 1 0 1 】

ペプチド及びタンパク質の凝集は体液性免疫原性を大幅に増加させ得ることが報告されている。^(50, 51) しかし、i T E P の凝集状態は免疫原性に影響を及ぼさないと思われた。第 1 に、i T E P_C の可溶性及び凝集形態は異なる免疫原性を示さなかつた (図 7) 。第 2 に、免疫化のために、i T E P_A 、i T E P_C 、及び i T E P_D は凝集体として注入さ

40

50

れ、一方で、i T E P_Bは可溶性分子として注入されたという事実にもかかわらず、すべての試験したi T E Pは非免疫原性である。

【0102】

実施例5：i T E P - C T Lワクチン融合体から自己組織化したN P

i T E P_B - p O V A 及び i T E P_B - i T E P_A - p O V A 融合体のサイズの特性評価。以前に記載したように、Zetasizer Nano-ZS計測器(Malvern Instruments, Malvern, UK)を用いて動的光散乱(DLS)によって、i T E P融合体の粒径分布を測定した。⁽²⁹⁾融合体をP B S中に5 μM及び25 μMで調製し、測定のために37℃で平衡化した。報告した結果は数平均粒径を表していた。

10

【0103】

i T E P_B - i T E P_A - p O V A 融合体のネガティブ染色透過型電子顕微鏡検査。集合した粒子の小さな3.5 μLアリコート(50 μM)を連続的なカーボンサポートフィルム(Ted Pella, Redding, CA)に塗布した。サンプルを蒸留水で簡単に洗浄し、その後、1%酢酸ウラニル水溶液で染色した。JEOL 2200FS顕微鏡において公称倍率30,000(1ピクセル当たり1.72)、加速電圧200k eVで、5120×3840 Direct Detection Device(DD D(登録商標))センサーを備えたDE-20カメラ(Direct Electron, LP, San Diego, CA)に顕微鏡写真を記録した。

【0104】

結果。疎水性i T E P_A、親水性i T E P_B、及びp O V Aは、互いに融合して両親媒性i T E Pコポリマーまたは融合体：i T E P_B - i T E P_A - p O V A(配列番号56)を形成した(図5A)。このペアのi T E Pを用いて両親媒体を構築したが、その理由は、両方のi T E Pとも良好な収量が得られたので、両親媒体も良好な収量が得られるであろうと予想されたためである。

20

【0105】

実際に、1リットルの培養物から約200mgの両親媒性融合体が精製された(図5B)。溶液は70℃に濁度の急激な増加を有し、その温度での凝集体の形成を示している。その前に、ゆっくりとした緩やかな濁度の増加があり、ミセルの形成を示唆している。⁽⁸⁾融合体はミセル様N P構造を示したが、これは2段階相転移プロファイル(図5C)によって立証される。⁽⁸⁾融合体のN P構造は、DLS(図5D)、及び電子顕微鏡検査(図5E)によっても確認された。DLSデータによると、N Pは5 μMで81.2±14.2 nm及び25 μMで71.9±20.8 nmの平均直径を有する(図5D)。これに反して、親水性i T E P_B及びワクチンの融合体i T E P_B - p O V Aは可溶性であり、粒子を形成しない。この融合体のサイズはDLSによって測定した場合で10 nm未満である(図5D)。

30

【0106】

実施例6：i T E P - p O V A N Pによって誘発される免疫応答

D CによるCTLエピトープS I I N F E K Lの提示。マウスD C株(D C 2.4、K. Rockからの寄贈物)⁽³²⁾の細胞を2.5×10⁵/500 μL/ウェルで24ウェルプレートに播種した。500 μLのO V A、S I I N F E K Lペプチド(配列番号22)、またはi T E P_B - i T E P_A - p O V A N P(配列番号56)(以下i T E P - p O V A N P)を細胞培養培地中に溶解させ、D Cを含有するウェルに加えた。細胞をさらに16時間、37℃、5%CO₂で培養した後、収集してP B Sで洗浄した。D C表面上に提示されたM H CクラスI複合体H-2 k^b/S I I N F E K Lを、P Eタグ付きモノクローナル抗体25-D1.16(B i o l e g e n d、1:100希釈)で染色し、フローサイトメトリーで定量した(サンプル当たり5×10⁴イベントを収集)。データは未処理のD C 2.4細胞のM F Iに対して正規化したM F Iとして表す。

40

【0107】

B 3 Z C D 8 + T細胞ハイブリドーマ活性化アッセイ。B 3 Z細胞(N. Sha

50

s t r i からの寄贈物)は、T細胞受容体がS I I N F E K L : H 2 K^b複合体と結合すると - ガラクトシダーゼを分泌するように改変されたC D 8 + T細胞ハイブリドーマである。⁽³³⁾このアッセイをするために、 1×10^5 D C 2 . 4 細胞 / ウェルを 96 ウェルプレートに播種した。指定の濃度のO V A、S I I N F E K Lペプチド(配列番号 22)、及びi T E P - p O V A N P(配列番号 56)を細胞培養中に 16 時間添加し、その後、洗浄した。 1×10^5 B 3 Z 細胞 / ウェルを D C 2 . 4 細胞培養に加え、D C 2 . 4 細胞と 24 時間共培養した。細胞を P B S で洗浄した後、 $100 \mu\text{L}$ の溶解バッファー(100 mM 2 - メルカプトエタノール、 9 mM M g C l₂、 $0 . 125\%$ N P - 40 を含むP B S)を $0 . 15 \text{ mM}$ クロロフェノールレッド - ガラクトシドと共にウェルに加えた。プレートを 37 度 4 時間インキュベートした後、 $50 \mu\text{L}$ / ウェルの 15 mM E D T A 及び 300 mM グリシンで反応を停止させた。 570 nm のODを測定し、 630 nm のODを参照として用いた。ODをB 3 Z 細胞の活性化状態の指標として用いた。

【0108】

E L I S P O T I F N - アッセイによるインビオC T L 応答。C 57 B L / 6 マウスを、不完全フロイントアジュvant(I F A ; Sigma , U S A)と共に各免疫原(マウス当たり 2 nmol S I I N F E K L 当量)で、左側腹部において皮下免疫化した。1週間後に右側腹部で免疫化を繰り返した。2回目の免疫化の 10 日後にマウスを屠殺して脾臓を採取した。屠殺したマウスの脾臓を单一細胞懸濁物に搔き裂き、ナイロンメッシュ($40 \mu\text{m}$)に通して濾過した。赤血球を塩化アンモニウム - カリウム(A C K)溶解バッファーによって溶解した。洗浄及び再懸濁した単一細胞を、C o n t e s s(商標)自動セルカウンター(I n v i t r o g e n , U S A)を用いて計数した。 14 mL ポリプロピレン組織培養チューブ中、 10% 熱不活性化ウシ胎児血清、 2 mM グルタミン、 $100 \text{ ユニット} / \text{mL}$ ペニシリン及び $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ ストレプトマイシンを補添したR P M I - 1 6 4 0 培地(I n v i t r o g e n , U S A)で、S I I N F E K L ペプチド(配列番号 22)($2 . 5 \mu\text{g} / \text{mL}$)有りまたは無しで、脾細胞($8 \times 10^6 / \text{mL}$)を 48 時間インキュベートした。その後、細胞を洗浄して再計数した。その後、 $100 \mu\text{L}$ 培地中 2×10^5 生細胞を、 $5 \text{ mg} / \text{mL}$ の捕捉抗マウスI F N - m A b(クローン: R 4 - 6 A 2、B i o l e g e n d , U S A)でコーティングした 96 ウェル濾過プレート(M i l l i p o r e , U S A)のウェル中に添加した。各条件に対して 3 部準備した。培養の 24 時間後に細胞を廃棄し、ウェルを $2 \text{ mg} / \text{mL}$ の検出ビオチン化抗マウスI F N - m A b(クローン: X M G 1 . 2 - ビオチン、B i o l e g e n d , U S A)で一晩インキュベートした。未結合の抗体をウェルから洗浄した後、3 - アミノ - 9 - エチル - カルバゾール(A E C)基質(Sigma , U S A)と共にホースラディツシュパー - オキシダーゼ(H R P アビジン、B i o l e g e n d , U S A)を用いて、結合した抗体を検出した。ウェルの底の膜を剥がし、膜上のカラースポットをスキャンした。I m a g e J ソフトウェアを用いてスポットを自動計数した。

【0109】

結果。まず、i T E P - p O V A N P が D C による S I I N F E K L (配列番号 22) のプロセシング及び提示を促進するかどうか試験するために実験を行った。N P、可溶性i T E P_B - p O V A 融合体(配列番号 57)、及びO V A をそれぞれ D C と共にインキュベートした。S I I N F E K L / H - 2 K^b複合体を認識することができる抗体によって、D C による S I I N F E K L (配列番号 22) の表面提示を検出した。上記のインキュベーションのすべてが D C の表面上におけるエピトープの提示につながったが、N P と共にインキュベートした D C は、O V A または i T E P_B - p O V A (配列番号 57) での D C (図 6 A) よりも著しく多くの S I I N F E K L (配列番号 22) エピトープを提示した。遊離 S I I N F E K L ペプチド(配列番号 22) での結果は、D C による S I I N F E K L (配列番号 22) 提示が、N P、O V A 、または i T E P_B - p O V A 融合体(配列番号 57) よりもはるかに強かった(データは図示せず)。この結果はおそらく、S I I N F E K L (配列番号 22) と D C の表面上に元々存在していたエピトープとの

間の直接交換に起因していた。したがって、DCによる遊離S I I N F E K Lペプチド(配列番号22)の提示は細胞による抗原プロセシングを必要としない。それゆえに、遊離S I I N F E K Lペプチド(配列番号22)の結果は、S I I N F E K L(配列番号22)が提示される前に抗原プロセシングを必要とする他の形態のS I I N F E K L含有抗原の結果と比較できない。

【0110】

次の連続の実験では、i T E P - p O V A N P処理DCによるS I I N F E K L(配列番号22)の提示の向上が、S I I N F E K L拘束性CD8細胞のより効率的な活性化につながることができるかどうか調べた。B3Z細胞を標的細胞として用いてCD8+T細胞活性化アッセイを実施した。N P前処理DC2.4細胞で共培養したB3Z細胞は、他の抗原で前処理したDC2.4細胞で共培養したB3Z細胞よりも数倍活性が高かった。具体的には、N P / DC処理B3Z細胞は、DC処理B3Z細胞、O V A / DC処理B3Z細胞、i T E P_B-p O V A / DC処理B3Z細胞よりもそれぞれ4.38、3.81、または2.9倍活性が高かった(図6B)。陽性対照として、遊離S I I N F E K Lペプチド(配列番号22)でプレパルスしたDC2.4細胞と共にB3Z細胞は、すべての処理の中で最も高い活性を示した(図6B)。この結果は、ペプチドを遊離形態でDCと共にインキュベートした場合に、DCがはるかに効率的にS I I N F E K L(配列番号22)を提示した観察結果と一貫性がある。

【0111】

次に、i T E P - p O V A N P(配列番号56)によって引き起こされるワクチン提示及びCTL活性化の強化が、インビオでのCTL応答の向上につながることができるかどうか調べるために実験を行った。この目的のために、C57BL/6JマウスをP B S、O V A、S I I N F E K L(配列番号22)ペプチド、またはN Pで2回皮下免疫化し、これらのマウスから脾細胞を収集した。次に、S I I N F E K L拘束性活性化脾細胞をINF-ベースのELISPOTアッセイを用いて定量した。INF-を放出した脾細胞はS I I N F E K L拘束性CTLのはずである。O V A及び遊離ペプチド両方での免疫化は、P B S対照と比較してCTLの数の増加につながる。しかし、N P免疫化マウスは、O V A及びS I I N F E K Lペプチド免疫化マウスの両方(それぞれ、播種した脾細胞100万当たり平均61及び60スポット)よりもはるかに多くの数のCTLを有していた(播種した脾細胞100万当たり平均105スポット)(図6C)。細胞の活性化はINF-ベースのELISPOTアッセイを用いることによって同定した。遊離ペプチドはインビトロでは最も高い応答を有していたにもかかわらず、インビオでは最も強いS I I N F E K L特異的CTL応答を誘発しなかったことは興味深く、CTLペプチドワクチンは支持担体を必要とすることを唆している。遊離ペプチドワクチンの欠陥はおそらく免疫化後のペプチドの急速なクリアランスに起因し、したがって、樹状細胞及び他の抗原提示細胞に到達したワクチンは非常に限られていた。

【0112】

本明細書に記載したように、非免疫原性ポリペプチドを設計する基準が確認された。本明細書に記載の試験したi T E Pは、その凝集状態またはその反復配列としての性質という、ポリペプチド及びタンパク質の免疫原性を増加させる可能性があると報告されていた2つの補助的要因^(51, 57, 58)にかかわらず、非免疫原性であることが判明した。この結果は、i T E PはおそらくB C RもしくはT C Rエピトープ、または両方を含有しないであろうという考えに合致する。ポリペプチドがB C RまたはT C Rエピトープからなっていなければ、これらの補助的要因が体液性応答の誘発に有利な場合でも、ポリペプチドは体液性応答を誘発しないはずである。より重要なことは、i T E Pの接合配列の潜在的な免疫原性を減少させるために2つの異なる戦略を用いたので、i T E Pの免疫原性に関するこれらの結果は、両方の戦略が有効であり、他の免疫寛容ポリペプチドを生成するのに有用であり得るということを示している。

【0113】

E L Pは生物医学的用途において広く試験されており、ワクチンの良好な担体となり得

10

20

30

40

50

るナノ構造に集合することができる。^(26, 60-67)しかし、ELPはCTLワクチン担体として用いられていない。これらの結果は、iTEP-NPが送達したワクチンの効力を実際に増加させたことを示しており、ワクチン及び免疫療法にELPを利用するための新たな役割を示唆している。ELPの免疫原性をその潜在的用途に応じて確立することができれば、この推論はさらに実証され得る。例えば、免疫原性及び非免疫原性ELPの両方ならびにそれらの対応する担体が生成された場合、これらの他の点では非常に類似している担体のペアは、まだ明らかにされていない、担体の免疫原性がどのようにワクチンまたは他の免疫療法薬ペイロードの効力に影響を及ぼすかということを解明するために用いられ得る。つまり、ELPの免疫原性及び機能性を正確に制御可能であることは、免疫療法薬の送達にこうした材料を用いることにおいて重要であるが、これはまだ黎明期にある。^(6, 8)

10

【0114】

結論として、逆相転移特性を有し、マウスによって免疫寛容される非カノニカルELP(iTEP)の作製に成功した。この成功によって、ELPの相転移及び免疫原性に関する機構の理解が確認された。これらのiTEPは、ELPの多くの報告されている生物学的用途に用いることができ、非免疫原性であることの利点を有する。重要なことに、これらの結果は、ELPをCTLワクチン担体として用いることができるということを初めて実証している。最も重要なことに、機能性及び免疫原性に同等に設計の重点を置く本明細書に記載の新規なポリペプチド開発手法を用いることは、免疫原性であると分かり、機能的なELP開発の努力を無駄にしてしまうことを避けるのに役立つことができる。

20

【0115】

実施例7：Sal i - A B A及びSal i - A B A - M P B Hコンジュゲートの合成及び特性評価

材料。すべての化学薬品は、別途記載しない限り、Thermo Fisher Scientific Inc. (MA, USA)から生物学的グレードで購入した。アセトニトリル(ACN)、ジクロロメタン(DCM)、ジメチルホルムアミド(DMF)、イソプロパノール、及びメタノールをはじめとする有機溶媒は、Thermo Fisher Scientific Inc. (MA, USA)からHPLCグレードで購入した。LB及びTB培地は、標準的な配合を用いて本発明者らの研究室で調製した。すべての細胞培養プレートはCorning Inc. (NY, USA)から購入した。RPMI-1640(2 mM L-グルタミン含有)、及びウシ胎児血清(FBS)をはじめとする細胞培養培地及びサプリメントは、Life Technologies, Inc. (CA, USA)から購入した。

30

【0116】

Bal b / cマウスの自発性同系乳癌に由来する高転移性マウス細胞株である4T1は、American Type Culture Collection (MD, USA)から購入した。ホタルルシフェラーゼを安定発現した4T1細胞株である4T1-lucは、公開されている方法(Tao et al., BMC Cancer, 2008; 8(1): 228)を用いて研究所内で生成した。4T1及び4T1-luc細胞は両方とも10%FBSを補添したRPMI-1640培地での単層培養で維持した。5%CO₂を含む37°の加湿雰囲気で細胞を維持した。

40

【0117】

24~28日齢(18~19g)の雌Bal b / cマウスは、Charles River Laboratories International, Inc. (USA)から購入した。すべての動物実験プロトコールはthe University of Utahの動物実験委員会によって承認された。

【0118】

Sal i - A B Aの合成。サリノマイシン(Sal i; 9.50 g, 12.67 mmol)、(4-(1,3-ジオキソラン-2-イル)フェニル)メタンアミン(Sal iへのコンジュゲーション前のABAの化学名；(4-(1,3-ジオキソラン-2-イル)

50

フェニル)メタンアミンは S a l i へのコンジュゲーション後の A B A の化学薬品である) (3 . 4 0 g、 1 8 . 9 7 m m o l) 、及び 1 , 3 - ジイソプロピルカルボジイミド (2 . 3 9 g、 1 8 . 9 7 m m o l) を 1 5 0 m L の乾燥 D C M に一緒に溶解した。この攪拌した混合物に、 1 0 m L の乾燥 D M F 中に溶解した 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (2 . 0 5 g、 1 5 . 1 7 m m o l) を 0 ° で添加した。得られた混合物をさらに 2 4 時間攪拌した後、室温まで上昇させた。その後、混合物をさらに 2 4 時間攪拌した。その後、混合物を 2 0 0 m L のブラインでクエンチし、反応生成物及び未消費の反応物質を 1 0 0 m L の D C M で 3 回抽出した。合一した D C M 溶液を無水 N a 2 S O 4 で乾燥させ、真空下で濃縮し、シリカゲル (2 0 0 ~ 3 0 0 メッシュ) でのフラッシュクロマトグラフィーによって残渣を精製した。精製したコンジュゲーション生成物は白色固体であった。 10

【 0 1 1 9 】

コンジュゲーション生成物 (S a l i - A B A) のアルデヒド基を脱保護するために、生成物を 2 2 m L の T H F に溶解させ、これに 2 N の H C l (2 2 . 7 2 m L) を添加した。混合物を室温で 6 時間攪拌した。その後、反応物を N a H C O 3 水溶液 (2 0 0 m L) でクエンチし、 D C M (1 0 0 m L 、 2 回) で抽出した。合一した D C M 溶液を無水 N a 2 S O 4 で乾燥させ、真空下で濃縮した。残渣をシリカゲル (2 0 0 ~ 3 0 0 メッシュ) でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。精製した脱保護 S a l i - A B A は白色固体であった (6 . 6 8 g、 収率 6 1 %) 。 S a l i - A B A の存在は ¹H N M R によって確認した。¹H N M R は C D C l 3 中で実施し、 B r u k e r 4 0 0 M H z で測定した。化学シフトを分析して積分した。¹H N M R (C D C l 3 , 4 0 0 M H z) 0 . 7 5 - 0 . 8 1 (m , 4 H) , 0 . 8 1 - 0 . 8 6 (m , 5 H) , 0 . 8 6 - 0 . 9 1 (m , 6 H) , 0 . 9 1 - 0 . 9 9 (m , 8 H) , 1 . 1 4 (s , 3 H) , 1 . 1 9 - 1 . 2 7 (m , 8 H) , 1 . 4 6 - 1 . 5 5 (m , 4 H) , 1 . 8 0 - 1 . 8 8 (m , 5 H) , 2 . 0 2 - 2 . 0 6 (m , 1 H) , 2 . 1 8 - 2 . 4 5 (m , 2 H) , 2 . 6 2 - 2 . 7 3 (m , 1 H) , 2 . 7 4 - 3 . 1 3 (m , 8 H) , 3 . 3 7 - 3 . 4 7 (m , 1 H) , 3 . 5 3 (s , 1 H) , 3 . 6 0 - 3 . 8 4 (m , 6 H) , 3 . 8 5 - 3 . 9 5 (m , 1 H) , 4 . 0 3 - 4 . 2 0 (m , 3 H) , 4 . 4 3 - 4 . 5 9 (m , 1 H) , 4 . 6 3 - 4 . 7 8 (m , 1 H) , 6 . 2 3 - 6 . 2 9 (m , 1 H) , 6 . 6 3 - 6 . 7 7 (m , 1 H) , 7 . 1 4 (d , J = 4 . 0 H z , 1 H) , 7 . 5 2 (d , J = 8 . 0 H z , 2 H) , 7 . 8 1 (d , J = 8 . 0 H z , 2 H) , 9 . 9 5 (s , 1 H) 。 E S I - M S 分析のために、 0 . 1 % T F A を含有する 5 0 % アセトニトリル水溶液中に精製した反応生成物を溶解させ、シナピン酸マトリックス上に担持させ、窒素レーザー (3 3 7 n m) を備えた Q T O F 2 質量分析計 (W a t e r s , M A , U S A) を用いて検査した。 20

【 0 1 2 0 】

S a l i - A B A - M P B H の合成。アルゴン雰囲気下で、乾燥イソプロパノール / メタノール (2 0 m L / 2 0 m L) 中に S a l i - A B A (1 . 7 0 g、 1 . 9 6 m m o l) 、 M P B H - H C l (0 . 9 1 g、 2 . 9 7 m m o l) 、及び 4 モレキュラーシーブ (1 g) の混合物を調製し、 4 0 ° で一晩攪拌した。混合物を濾過して溶媒を蒸発させた後、残渣をシリカゲル (2 0 0 ~ 3 0 0 メッシュ) でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。精製したコンジュゲーション生成物は淡黄色固体であった。収率は 4 1 % であった。収集したコンジュゲーション生成物の純度は H P L C によって確認した。 S a l i - A B A - M P B H コンジュゲートの存在は ¹H N M R によって確認した。¹H N M R は C D C l 3 中で実施し、 B r u k e r 4 0 0 M H z で測定した。化学シフトを分析して積分した。¹H N M R (C D C l 3 , 4 0 0 M H z) 0 . 7 6 - 0 . 8 2 (m , 4 H) , 0 . 8 2 - 0 . 8 7 (m , 6 H) , 0 . 8 7 - 0 . 9 3 (m , 8 H) , 0 . 9 3 - 1 . 0 0 (m , 7 H) , 1 . 1 4 (s , 3 H) , 1 . 1 9 - 1 . 2 7 (m , 1 1 H) , 2 . 0 1 - 2 . 0 7 (m , 5 H) , 2 . 1 7 - 2 . 3 6 (m , 3 H) , 2 . 6 3 - 2 . 7 7 (m , 6 H) , 2 . 7 7 - 3 . 1 3 (m , 8 H) , 40

H), 3.37 - 3.53 (m, 2H), 3.53 - 3.63 (m, 1H), 3.64 - 3.74 (m, 2H), 3.75 - 3.84 (m, 2H), 3.86 - 3.97 (m, 1H), 4.05 - 4.19 (m, 3H), 4.22 - 4.32 (m, 1H), 4.36 - 4.51 (m, 1H), 4.56 - 4.73 (m, 1H), 6.20 - 6.32 (m, 1H), 6.45 - 6.60 (m, 1H), 6.81 - 6.90 (m, 2H), 7.05 - 7.13 (m, 1H), 7.20 - 7.28 (m, 2H), 7.30 - 7.41 (m, 4H), 7.45 - 7.54 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 9.38 - 9.62 (m, 1H)。反応生成物を上記のように ESI-MS によって分析した。

【0121】

10

Sali - ABA と MPBH - HC1 との間のヒドラゾン結合の形成は室温では遅い。この温度での反応の 48 時間後に検出することができる生成物はわずかである。この問題に対処するために、反応温度を 40° に上げ、モレキュラーシープを加えてこの反応を促進させた。

【0122】

iTEP の発現及び精製。iTEP をコードする遺伝子を以前に記載したように生成した。iTEP の产生及び精製は以前に記載したのと同様であった (Zhao, et al; Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。

【0123】

iTEP - MPBH - ABA - Sali の合成。iTEP - ABA - Sali を以前に記載したように合成した (Zhao, et al; Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。リン酸バッファー (pH = 7.00, 1M NaPO4, 1mM EDTA) 中で TCEP 還元 iTEP を Sali - ABA - MPBH と反応させた。精製後、iTEP - MPBH - ABA - Sali コンジュゲートの純度を HPLC によって確認した。精製後、iTEP - MPBH - ABA - Sali コンジュゲートを凍結乾燥して -20° で保管した。iTEP への Sali - ABA - MPBH のコンジュゲーション効率をエルマン試薬法によって求めた。この目的のために、5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (DTNB; エルマン試薬、Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) を用いて、チオール基の数を測定することによってコンジュゲーション率を定量した。製造業者のプロトコールに従って定量を行い、異なる濃度の一連のシステイン溶液の標準曲線にデータをフィッティングすることによってチオール基の濃度を求めた。吸収は 410 nm で測定した。

20

【0124】

30

結果。切断可能な化学結合を介して Sali を iTEP に結合させるために、Sali に小さな分子ABAを付加することによって修飾 Sali をまず修飾し、次に、得られた Sali - ABA を iTEP に二官能性リンカーハリカルを介して結合させた。Sali - ABA と MPBH との間の結合は切断可能なヒドラゾン結合である (図 8A)。Sali - ABA コンジュゲーション生成物を精製した後、HC1 を用いて ABA の保護基を除去し、生成物上に活性なアルデヒド基を生成した。精製した脱保護生成物の MS スペクトルは、いくつかの主要な分子イオンピーク (ラベル付けした) を示しており、生成物が期待されていたコンジュゲート Sali - ABA であったことを確認した (図 8B)。脱保護 Sali - ABA の収率は 61% であった。

40

【0125】

Sali - ABA 及び MPBH を、2つの分子上のアルデヒド基及びヒドラジド基を介して互いに結合させた (図 8A)。精製したコンジュゲーション生成物の MS スペクトル (図 8C) 及び ¹H NMR ピークデータは、この反応で Sali - ABA - MPBH が形成したことを示していた。この挿入は Sali - ABA - MPBH コンジュゲートの期待された化学構造である。Sali - ABA - MPBH の MW に一致するピークは明らかであった。この精製コンジュゲートの MPBH 及び Sali - ABA のピークの存在は、コ

50

ンジュゲート中のヒドラゾン結合が E S I - M S 実験条件の下で安定でないことを示す。 Sal i - A B A - M P B H の収率は 4 1 % であった。

【 0 1 2 6 】

次に、通常の 4 T 1 - 1 u c 細胞に対して Sal i - A B A 及び Sal i の毒性を比較した（図 9 A）。Sal i - A B A の IC₅₀ は 1 6 . 4 μM (9 5 % C I = 1 4 . 3 ~ 1 8 . 8 μM) ; Sal i の IC₅₀ は 4 . 4 μM (9 5 % C I = 2 . 3 ~ 1 1 . 2 μM) であり、 Sal i 及び Sal i - A B A の IC₅₀ は統計的に差があった (P < 0 . 0 0 0 1 、 t 検定)。したがって、 Sal i - A B A の毒性は Sal i よりも有意に低かった。 Sal i - A B A の毒性の方が低いことは、 Sal i 単独と比較してマウスにおいて寛容される投与量が大きいことと合致した（データは図示せず）。その後、通常の 4 T 1 - 1 u c 細胞、及び 4 T 1 腫瘍の C S C として一般に用いられる細胞集団である 4 T 1 - 1 u c 腫瘍様塊 (Gu pta , et al . , Cell , 2 0 0 9 ; 1 3 8 (4) : 6 4 5) から収集した細胞に対して、 Sal i - A B A の毒性を比較した。腫瘍様塊 4 T 1 - 1 u c 細胞に対する Sal i - A B A の IC₅₀ は 1 . 9 μM (9 5 % C I = 1 . 7 ~ 2 . 2 μM) (図 9 B) であったが、これは通常の 4 T 1 - 1 u c 細胞のものよりも有意に低く、通常の 4 T 1 - 1 u c 及び腫瘍様塊 4 T 1 - 1 u c に対する Sal i - A B A の IC₅₀ は統計的に差がある (P < 0 . 0 0 0 1 t 検定)。したがって、 Sal i - A B A は C S C に対する Sal i の選択的毒性を維持していた。

【 0 1 2 7 】

実施例 8 : i T E P 及び i T E P - M P B H - A B A - Sal i コンジュゲートの生成及び特性評価 20

動的光散乱 (D L S) 測定。測定は以前に記載したように実施した。 Malvern Zetasizer Nanoシステム (Malvern , Chester County , PA , USA) を用いて、 i T E P 、 i T E P - M P B H - A B A - Sal i コンジュゲート、または P T X N P を 3 7 にて PBS 中 2 5 μM で測定した。

【 0 1 2 8 】

結果。ナノ担体は E P R 効果によってその薬物ペイロードの腫瘍蓄積を促進するので (Matsumura et al . , 1 9 8 6 : 4 6 (1 2 Part 1) : 6 3 8 7 - 6 3 9 2 ; Fang et al . , Adv . Drug Deliv . Rev . , 2 0 1 1 ; 6 3 (3) : 1 3 6 - 5 1) 、次の連続の実験は、ナノ担体を生成し、それを用いて Sal i - A B A を腫瘍に送達することを目的とした。これまでの結果では、親水性の i T E P 及び疎水性の Sal i (Marvin Sketch による pH 7 . 4 での Log D 3 . 2 4) からなる両親媒性コンジュゲートは、そのセグメント化された両親媒性によって誘導される N P に自己組織化することが示されていた (Zhao , et al ; Mol . Pharm , 2 0 1 4 ; 1 1 (8) : 2 7 0 3 - 1 2)。 Sal i - A B A (Log D 7 . 3 4 、 pH 7 . 4) は Sal i よりも疎水性であることから、親水性 i T E P と Sal i - A B A - M P B H との間のコンジュゲートも十分にセグメント化された両親媒性を有し、 N P 構造を呈するかどうか試験するために、以前に確立した i T E P を改変して、 NH 2 - (G A G V P G)₇₀ - (C G G G G G G G G)₈ - C O O H (配列番号 5 8) の配列を有する新規親水性 i T E P を得た。 8 つのシステインは i T E P の一端に Sal i - A B A - M P B H への 8 つのコンジュゲーション部位をもたらした。各システインが Sal i - A B A - M P B H 分子を収容するのに十分な間隔を有するように、 8 グリシンスペーサーを 2 つの隣接するシステインの間に挿入した。新規 i T E P は E . col i 細胞から組換えタンパク質として生成した。精製した新規 i T E P は、 S D S - P A G E 上で 3 0 k D a と 4 6 k D a マーカーとの間のバンドとして泳動したが、これは i T E P の理論分子量 3 5 . 2 K D a に合致していた (図 1 0 A)。

【 0 1 2 9 】

M P B H を介して新規 i T E P を Sal i - A B A と結合させた。精製 i T E P - M P B H - A B A - Sal i コンジュゲート中の Sal i - A B A - M B P H と i T E P との 50

間の比は3:1と推定された。コンジュゲートからのSal i -ABAの放出半減期は、pH 5.0で12.15時間(95%CI = 9.98~15.52時間)であった(図10B)。対照的に、中性pHではSal i -ABA-MPBHの放出は監視した100時間以内の間に検出されなかった。異なるpHでの異なる放出速度は、Sal i -ABAとMPBH-iTEPとの間のヒドラゾン結合がコンジュゲートからのSal i -ABAのpH依存的制御放出を可能にしたこと示していた。

【0130】

通常の4T1-1uc細胞を処理するのに用いた場合に、iTEP-MPBH-ABA-Sal iはSal i -ABA-MPBH単独よりも2.6倍低い細胞傷害性を有していた(図10C)。iTEP-MPBH-ABA-Sal i及びSal i -ABAのIC₅₀は、それぞれ42.2 μM(95%CI 39.0~45.6 μM)及び16.4 μM(95%CI = 14.3~18.8)であり、通常の4T1-1uc細胞に対するiTEP-MPBH-ABA-Sal i NP及びSal i -ABAのIC₅₀は、統計的に差がある(P < 0.0001、t検定)。しかし、iTEP-MPBH-ABA-Sal iは、通常の4T1-1uc細胞よりも腫瘍様塊4T1-1uc細胞(CSC)に対して毒性が約8倍高く、Sal i -ABA及びSal i の選択性に類似していた(図10D)。これらの2種類の細胞は統計的に差のあるIC₅₀(P < 0.0001、t検定)を有する。腫瘍様塊4T1-1uc細胞に対するiTEP-MPBH-ABA-Sal iのIC₅₀は5.8 μM(95%CI = 5.4~6.2 μM)であり、通常の4T1-1uc細胞の値は42.2 μMであった。

【0131】

DLS分析によると、未変形iTEPは37で6.63 ± 1.25 nmの流体力学的径を有しており(図10E)、iTEPは水溶液中でモノマーのままであるという予想に合致していた。一方で、iTEP-MPBH-ABA-Sal iは51.2 ± 18.2 nmの直径を示し、コンジュゲートが設計通りNP構造を呈したことを示唆していた。非コンジュゲートiTEPは測定前に100 mMのTCP溶液で一晩還元した。iTEP-MPBH-ABA-Sal iの大きさはEPR効果による腫瘍中の蓄積にも適している(Petros et al., Nat. Rev. Drug Discov., 2010; 9(8): 615-27)。

【0132】

実施例9:iTEP-MPBH-ABA-Sal iの薬物動態及び組織分布

インピトロSal i -ABA放出アッセイ。NPを37のPBS(pH = 7.4)または0.1 M酢酸ナトリウム/酢酸バッファー(pH = 5)中でインキュベートした後、iTEP-MPBH-ABA-Sal i NPからのSal i -ABAの放出を測定した。各混合物の複数のリピートを個別のエッペンドルフチューブ中に確保し、37において100 rpmで振とうした。所定の時点で、1本のチューブのサンプル中の遊離Sal i -ABAをHPLCによってSal i -ABAの標準曲線に基づいて測定した。標準曲線は280 nmで作成した。HPLC設定は本明細書に記載したものと同じであった。

【0133】

以下の式及びGraphPad V5.0を用いて、Sal i -ABA放出のパーセンテージ(F)と時間(t)との関係をフィッティングした。

$$F_{\% \text{放出}} = 100[1 - e^{-Kt}]$$

Kは放出速度定数である。

$$K = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

10

20

30

40

50

【0134】

薬物動態及び生体内分布調査。血中及び組織中の Sal i - ABA 濃度を分析したが、これらの濃度は以前に記載したように分析した (Zhao, et al; Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。

【0135】

細胞傷害性調査。細胞傷害性を以前に記載したように測定した (Zhao, et al; Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。インキュベーション時間は 72 時間であった。4T1 - 1u 腫瘍様塊細胞を以前に記載したように生成した (Zhao, et al; Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。

10

【0136】

結果。20 mg / Kg Sal i - ABA 当量の投与量でマウスに静脈内投与した後、Sal i - ABA 及び iTEP - MPBH - ABA - Sal i の薬物動態を比較した。各製剤の投与後の Sal i - ABA の血漿濃度を 24 時間まで監視した (図 11A)。濃度の時間変化を 2 コンパートメント薬物動態モデルにフィッティングした。フィッティング結果によると、iTEP - MPBH - ABA - Sal i 投与から得られた Sal i - ABA の AUC は 2967.0 μM / 時 (95% CI = 2244.0 ~ 3509.0 μM / 時) であったが、これは、遊離 Sal i - ABA - MPBH 投与から得られた AUC (99.9 μM / 時 (95% CI = 47.1 ~ 132.2 μM / 時) よりもおよそ 30 倍高かった。同様に、iTEP - MPBH - ABA - Sal i 投与後の Sal i - ABA の排泄半減期は、遊離 Sal i - ABA 投与よりも 35 倍長かった (0.4 時間、95% CI = 0.2 ~ 4.1 対して 13.9 時間、95% CI = 9.9 ~ 24.8)。つまり、これらの比較結果は、iTEP - MPBH - ABA - Sal i が Sal i - ABA の全身クリアランスを有意に遅延させたという見解を実証している。

20

【0137】

iTEP - MPBH - ABA - Sal i の上述の遅いクリアランス及び粒径によって、コンジュゲートは EPR 効果を活用することができ、そのため、より効率的に腫瘍に蓄積することが可能となり得た。実際に、4T1 - 1uc 腫瘍化マウスへの遊離 Sal i - ABA または iTEP - MPBH - ABA - Sal i NP の投与の 24 時間後、NP では、遊離 Sal i - ABA よりも 3.4 倍多く Sal i - ABA が腫瘍に蓄積する結果となつた (0.9 ± 0.1 ID% / グラムに対して 3.1 ± 0.1 ID% / グラム、図 11B)。腫瘍及びすべての以下の器官サンプルは投与の 24 時間後に収集した。Sal i - ABA の量は、器官の重量で正規化した初期投与量のパーセンテージ ID% / グラムとして表した。データは一元配置 ANOVA によって分析した。P 値が図中に示してあり、* は有意差を表す。同時に、iTEP - MPBH - ABA - Sal i NP を遊離 Sal i と比較した場合に、心臓において Sal i - ABA 蓄積の減少があったが、差は統計的に有意でなかった (0.86 ± 0.11 ID% / グラムに対して 0.57 ± 0.18 ID% / グラム、図 11C)。データは一元配置 ANOVA によって分析した。P 値を図中に示す。心臓は Sal i に対して感受性が高い器官であるので、この減少は NP の毒性プロファイルに有利となり得る (Bastianello, et al., J S Afr Vet Assoc, 1996; 67(1): 38-41)。肝臓、脾臓、肺及び腎臓における Sal i - ABA 蓄積は、iTEP - MPBH - ABA - Sal i - ABA NP によって様々に増加した (図 11D)。データは一元配置 ANOVA によって分析した。P 値が図中に示してあり、* は有意差を表す。

30

【0138】

実施例 10 : iTEP - MPBH - ABA - Sal i - NP による原発性腫瘍成長及び転移の阻害

腫瘍成長調査。Balb/c マウスの #9 乳腺に 50 μL の PBS 中 10^6 の 4T1 - 1uc 細胞を皮下接種した。すべての腫瘍の体積が 100 mm^3 に達したか、またはこれを超えた接種の 7 日後、マウスを図 12 及び 13 に記載の群にランダムに割り付けた。投

40

50

与及び投与スケジュールは以下の通りである。

1. PBS 対照 (3日おき) ; Sal i - ABA (20 mg / Kg BW、3日おき)、
2. i T E P - M P B H - A B A - Sal i N P (20 mg / Kg BW、3日おき)、
3. PTX N P (10 mg / Kg BW、3日おき)、
4. PTX N P 及び i T E P - M P B H - A B A - Sal i 併用、1日目に i T E P - M P B H - A B A - Sal i N P (20 mg / Kg BW)、2日目に PTX N P (10 mg / Kg BW)、その後、2日おき。

【0139】

合計7回静脈内投与した。腫瘍の長さ及び幅寸法を1日おきにキャリパーで測定した。腫瘍体積は式：腫瘍体積 = (長さ × 幅² / 2) を用いて推定した (Zhang et al., Biomaterials, 2012; 33(2): 679-91)。また、腫瘍サイズを測定した同じ日にマウスの体重を記録した。PTX N P 及び併用療法での治療は、最初の3つの治療群の結果を得た後に行った。

【0140】

さらに、転移を監視するために、4T1-luc 細胞から放出された生物発光シグナルを以前に記載されたように監視した (Tao et al., BMC Cancer, 2008; 8(1): 228)。具体的には、所定の時点 (毎週2回、3~4日おき) で、100 μl のD-ルシフェリン (15 mg / ml) を実験用マウスに腹腔内注入した。ルシフェリン注入の15分後、Xenogen IVIS 200 生体光画像撮影装置 (PerkinElmer, Inc., MA, USA) 中で麻酔下にてマウスの画像を撮影した。生物発光強度は、被検者からの光子放出または放射輝度を用いて光子 / sec / cm² / sr (ステラジアン) の単位で表された。すべての生物発光画像の強度スケールは、 1×10^6 光子 / sec / cm² / sr ~ 約 1×10^7 光子 / sec / cm² / sr に設定した。転移は、所定のサイズで原発性腫瘍の領域の外にあり、 1×10^6 光子 / sec / cm² / sr を超える平均放射輝度を有する領域と定義した。腫瘍接種とマウスに転移が観察された最初の日との間の日数を無転移生存時間として指定した。全生存時間を腫瘍接種とマウス屠殺との間の日数として数えた。無転移生存率及び全生存率をカプランマイヤー法によって分析し、GraphPad V5.0 でログランク検定を用いて各群の生存期間中央値を比較した。

【0141】

結果。i T E P - M P B H - A B A - Sal i N P を 4 T 1 - l u c 同所性腫瘍の成長及び転移の阻害について評価したところ、結果は、N P が原発性腫瘍成長を遅延させたことを示していた。N P によって治療した腫瘍は、治療後2日目 (腫瘍接種後9日目) から PBS 治療腫瘍よりも常に小さかった (図12A、P < 0.05、t検定)。一方で、遊離 Sal i - A B A (20 mg / KG) は腫瘍成長を遅延させることができなかった。

【0142】

N P は 4 T 1 - l u c 腫瘍の転移を効果的に阻害したが、これは、PBS 治療と比較した無転移生存率の劇的な改善によって立証される (P = 0.007、ログランク；図12B)。N P 治療群のマウスで屠殺する前に転移が発生したものはいなかった。対照的に、PBS 治療マウスの無転移生存期間中央値はわずか23日であった。遊離 Sal i - A B A でも、この群のマウスで転移が発生したのは半数未満であり、マウスを屠殺する前にはこの群の無転移生存期間中央値に達しなかったので、転移が阻害された。しかし、Sal i - A B A 治療マウスの中には転移が発生したものがいたので、Sal i - A B A の阻害効果は N P のものよりも弱かった。さらに、PBS 対照群及び Sal i - A B A 群の生存率には統計的に差がなかった (P = 0.252)。

【0143】

PBS 及び Sal i - A B A 治療マウスの全生存率は互いに差がなく、両方とも24日の生存期間中央値を有していた (図12C)。しかし、i T E P - M P B H - A B A - Sal i は全生存率を有意に改善し、生存期間中央値は39日であった (i T E P - M P B H - A B A - Sal i 対 PBS、P = 0.0012；i T E P - M P B H - A B A - Sa

10

20

30

40

50

1 i 対 PBS p = 0 . 0 0 1 1)。

【 0 1 4 4 】

i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P は原発性腫瘍成長及び転移の両方を阻害したが、この阻害は原発性腫瘍の安定化または縮小につながるのに十分でなかった。実際に、大きな原発性腫瘍負荷のために N P 治療マウスを屠殺した。i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P のこの効果を克服するために、S a l i 及びパクリタキセル(P T X)を一緒に取り入れた併用療法を開発した。

【 0 1 4 5 】

実施例 1 1 : i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 及び P T X N P の併用療法による原発性腫瘍成長及び転移の阻害

i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 中への P T X の担持。以前に記載されたように、i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 中に P T X を担持させた(Z h a o , et al ; Mol . Pharm , 2 0 1 4 ; 1 1 (8) : 2 7 0 3 - 1 2)。1 0 m g の i T E P - M P B H - A B A - S a l i 、5 m g の P T X 及び 2 . 5 m g の - トコフェロール(Sigma - Aldrich , MO , U S A)を 1 2 5 μ L の D M F 中に共溶解した。カプセル化 P T X を 2 8 0 n m での吸光度及び P T X の標準曲線に基づいて H P L C によって測定した。標準曲線は H P L C で逐次希釈 P T X の吸光度を測定することによって作成した。H P L C のカラムは、Symmetry C 1 8 カラム(1 0 0 、 3 . 5 μ m 、 4 . 6 m m \times 1 5 0 m m 、 Waters , MA , U S A)であり、Agilent Infinity - 1 2 6 0 LC システム(CA , U S A)に接続した。水(溶媒 A)及びアセトニトリル(溶媒 B)(0 . 0 5 % T F A)を用いて 1 . 0 m L / min の流量で分析を実施した。グラジエントは 0 から 2 0 分まで 8 0 % B から 1 0 0 % B へと徐々に増加させた。担持効率は以下の式で定義した。

$$\text{担持効率} (\%) = 1 0 0 \times (\text{カプセル化 P T X}) / (\text{供給 P T X})$$

【 0 1 4 6 】

インビトロ P T X 放出アッセイ。以前に記載された透析法にわずかな変更を施して、P T X N P からの P T X のインビトロ放出プロファイルを測定した(Z h a n g et al . , Biomaterials , 2 0 1 2 ; 3 3 (2) : 6 7 9 - 9 1)。4 % B S A を含有する 0 . 5 m L の M i l l i Q 水中に P T X N P を希釈し、バッグ(Spectrum Laboratories , Inc . CA , U S A 、 MW カットオフ = 8 , 0 0 0 D a)に入れた。バッグを 1 0 0 m L の P B S 溶液(pH = 7 . 4)で透析し、3 7 において 1 0 0 r p m で振とうした。所定の時点で、サンプルをよく混合した後、バッグからサンプルを 1 0 μ L 収集した。1 0 μ L のサンプル中の P T X を本明細書に記載のように H P L C によって測定し、未放出 P T X とみなした。放出カイネティクスを本明細書に記載のように求めた。

【 0 1 4 7 】

結果。ナノ担体によって送達される P T X は遊離 P T X よりも優れた効果を有するので(Z h a n g et al . , Expert Opin Drug Deliv , 2 0 1 3 ; 1 0 (3) : 3 2 5 - 4 0)、i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P は P T X をカプセル化形態で送達するはずであった。得られた N P は、P T X N P と称するが、6 . 6 対 1 の比で P T X 及び S a l i - A B A を有していた。S a l i - A B A は P T X よりも通常の 4 T 1 細胞に対して毒性がはるかに低いことを考慮すると(I C ₅₀ : 1 6 . 4 μ M 対 6 . 3 n M)、担体としての i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P の毒性は P T X に比べて無視できるものであった。P T X は 8 4 . 6 \pm 1 . 2 5 % (n = 3)の効率で N P に担持された。P T X N P は 8 5 . 0 9 \pm 3 1 . 6 4 n m の平均直径を有し(図 2 7)、4 . 6 7 時間の半減期で P T X を放出した(9 5 % C I = 4 . 0 3 ~ 5 . 5 5 時間、図 2 8)。例えば、図 2 6 は以下のことを示す：通常の細胞における S a l i - A B A の I C ₅₀ 値が腫瘍様塊細胞におけるものよりも有意に高かったこと(0 . 6 μ M 、 9 5 % C I = 0 . 3 ~ 1 . 2 μ M に対して 6 . 4 μ M 、 9 5 % C I = 3 . 8 ~ 1 0 . 9 μ M 、 P < 0 . 0 0 0 1 、 t 検定)；通常の細胞における S a l i - A B A の I

10

20

30

40

50

C_{50} 値が腫瘍様塊細胞におけるものよりも有意に高かったこと ($1.0 \mu M$ 、 $95\% CI = 0.6 \sim 1.6 \mu M$ に対して $5.6 \mu M$ 、 $95\% CI = 3.1 \sim 10.4 \mu M$ 、 $P < 0.0001$ 、 t 検定) ; 及び通常の細胞における Sal i - A B A の IC_{50} 値が腫瘍様塊細胞におけるものよりも有意に高いこと ($17.0 \mu M$ 、 $95\% CI = 3.8 \sim 76.6 \mu M$ に対して $42.6 \mu M$ 、 $95\% CI = 19.7 \sim 91.8 \mu M$ 、 $P < 0.0001$ 、 t 検定)。図 28 は、 Sal i - A B A の IC_{50} 値が $34.3 \mu M$ ($95\% CI = 16.1 \sim 73.3 \mu M$) であり、 4 T 1 - 1 u c 細胞の値よりも高かったことを示す。さらに、 P T X N P 治療マウスは、遊離 P T X 治療マウスと比較した場合に、体重減少が少なかった (データは図示せず)。最後に、インビトロ細胞傷害性調査の結果は、 P T X N P が腫瘍様塊 4 T 1 - 1 u c 細胞よりも通常の 4 T 1 - 1 u c 細胞に対して大きな細胞傷害性を有することを示していた (図 13 A)。この 2 種類の細胞に対する P T X N P の IC_{50} は、それぞれ $6.32 nM$ ($\% 95 CI = 5.5 \sim 7.3 nM$) 及び $44.6 nM$ ($\% 95 CI = 37.8 \sim 52.6 nM$) であった。2 つの IC_{50} には統計的に差があった ($P < 0.0001$ 、 t 検定)。

【0148】

P T X N P 及び i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P は原発性腫瘍成長に対して同レベルの阻害を発揮した。これらの 2 つの治療を受けるマウスの平均腫瘍サイズには、腫瘍接種後 15 日目～25 日目以外は、互いに有意差がなかった ($P < 0.05$ 、 t 検定、図 13 B)。P T X N P 治療マウスの無転移生存期間中央値は 37 日であり、 P T X N P の転移阻害効果は i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P ほど効果的でなかったことを示しているが、その理由は、後者の治療の結果、39 日間の観察期間中の転移が 0 であったためである (図 13 C)。実際に、2 つの治療群の無転移生存率には統計的に差があった ($P = 0.002$)。

【0149】

i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 及び P T X N P の両方からなる併用療法は、腫瘍接種後 29 日目から、 P T X N P または i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 単独療法よりも原発性腫瘍に対して優れた阻害を示した (図 13 B)。併用療法は P T X N P 単独療法よりも転移を阻害するのにより効果的である ($P = 0.001$)。併用療法によって治療した 14 匹のマウスのうち 11 匹が腫瘍接種 69 日後の調査の最後にも無転移のままであった。しかし、併用療法は転移の阻害において i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P より優れていなかった。

【0150】

併用療法はさらに、 P T X N P 単独療法及び i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 単独療法と比較して、治療したマウスの全生存期間を延長することができた。併用療法群の全生存期間中央値は 69 日であったが、 P T X N P 及び i T E P - M P B H - A B A - S a l i N P 療法群の生存期間は、わずか 41 日及び 39 日であった (図 13 D、いずれの比較も $P < 0.001$)。

【0151】

実施例 12 : 安定 i T E P N P の設計及び生成

細胞株及びマウス。D C 2 . 4 D C 株 (H - 2 K^b) は、Dr. Kenneth Rock (University of Massachusetts, USA) によって快く提供された。10 %熱不活性化ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、1 %非必須アミノ酸、1 %Hepes、50 μM - メルカプトエタノール、100 ユニット / m l ペニシリン及び 100 μg / mL ストレプトマイシンを補添した R P M I - 1640 培地 (Invitrogen, USA) で D C 2 . 4 細胞を培養した。H - 2 K^b : O V A₂₅₇-₂₆₄ (S I I F E K L ; 配列番号 22) に特異的な B 3 Z T 細胞ハイブリドーマは、Dr. Nilabh Shastri (University of California, USA) によって快く提供された。10 %熱不活性化ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、1 mM ピルビン酸、50 μM - メルカプトエタノール、100 ユニット / mL ペニシリン及び 100 μg / mL ストレプトマイシンを補添した R P M I - 1640 培

10

20

30

40

50

地 (Invitrogen, USA) で B3Z 細胞を培養した。EA.hy926、bEnd.3 及び 3T3 細胞を ATCC から入手し、10% 熱不活性化ウシ胎児血清を補添した DMEM 培地で維持した。6~8 週齢の C57BL/6 雌マウスを Jackson Laboratories から入手した。

【0152】

iTEP - ワクチン融合体の発現プラスミドの構築。以前に記載された方法を用いて、iTEP ワクチンをコードする遺伝子を改変 pET25b (+) ベクター上に合成した (Cho et al., J Drug Target, 2015, p. 1-12)。具体的には、iTEP_A(GVLPGVG)₄ (配列番号 30) 及び iTEP_B(GAGVPG)₅ (配列番号 31) のサブユニットをコードした遺伝子を、これらの遺伝子のセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを互いにアニーリングすることによって生成した (表 2 を参照)。その後、これらのアニーリングした iTEP 遺伝子をベクターの BseRI 部位に挿入した。最後に、所望の長さの iTEP 遺伝子が得られるまで、iTEP 遺伝子を PCR - RDL 法によって重合した。iTEP_A は GVLPGVG (配列番号 1) を 28 リピート含有しており、iTEP_{A28} (配列番号 50) と命名した。iTEP_B は GAGVPG (配列番号 2) を 70 リピート有しており、iTEP_{B70} (配列番号 31) と命名した。iTEP_{B70} - iTEP_{A28} (配列番号 54)、iTEP_{B70} - iTEP_{A56} (配列番号 59)、iTEP_{B70} - iTEP_{A28} - pOVA (配列番号 56)、iTEP_{B70} - iTEP_{A56} - pOVA (配列番号 60)、iTEP_{B70} - iTEP_{A28} - (G₈C)₄ - pOVA (配列番号 61) 及び iTEP_{B70} - iTEP_{A28} - (G₁C)₄ - pOVA (配列番号 62) の融合体をコードする遺伝子を同様に生成した。これらの遺伝子を構築するのに用いたオリゴヌクレオチドの配列を表 2 に記載する。pOVA 融合体の配列は、2 コピーの CTL エピトープ SIIINFEKL (配列番号 22)、及び SIIINFEKL (配列番号 22) の両側の 1 つの天然隣接残基を有していた。得られた発現ベクターを増幅のために DH5⁺ 中に形質転換した後、コード遺伝子の長さを XbaI 及び BamHI による二重消化ならびにその後のアガロースゲル分析によって確認した (図 14)。これらの遺伝子のサイズは予想された融合体の残基数と合致する。コード遺伝子は DNA シーケンシング (Genewiz, USA) によって検証した。

【0153】

iTEP - ワクチン融合体及び iTEP の产生及び精製。融合体及び iTEP を以前に記載されたように产生及び精製した (Cho et al., J Drug Target, 2015, p. 1-12)。Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific) で超音波処理を行った。エンドトキシンも以前に記載されたように除去した (Cho et al., J Drug Target, 2015, p. 1-12)。融合体及び iTEP の純度を SDS-PAGE によって評価した (図 15)。

【0154】

還元環境反応性 iTEP - ワクチン融合体の調製。還元条件を維持するために、10 mM の TCEP-HCl を含む PBS 中、pH 7.0 で、iTEP_{B70} - iTEP_{A28} - (G₁C)₄ - pOVA (配列番号 62) 及び iTEP_{B70} - iTEP_{A28} - (G₈C)₄ - pOVA (配列番号 61) のタンパク質精製を行った。最終精製タンパク質を水中に溶解させてから凍結乾燥した。その後、精製タンパク質を酸化のために 37 °C で 15 分間 0.3% H₂O₂ で処理してジスルフィド結合安定化粒子を生成した。その後、H₂O₂ を Amicon 遠心式フィルターデバイス (Millipore, USA) によって除去した。

【0155】

iTEP - ワクチン融合体の流体力学的径の特性評価。以前に記載したように Zetasizer Nano-ZS 計測器 (Malvern Instruments, Malvern, UK) を用いて、動的光散乱 (DLS) によって iTEP - ワクチン融合体の流体力学的径を測定した (Zhao et al., Mol. Pharm., 2014; 11(8): 2703-12)。サンプルを PBS 中に 5、25、50、及び

100 μMの濃度で再懸濁し、測定前に一晩室温で静置した。いくつかのサンプルをDLS測定前に5%CO₂、37℃で16時間維持した。用いたサンプル濃度に影響されなかつたので、5 μMの濃度のサンプルの流体力学的径の結果を報告した。個数基準サイズ分布アプローチを用いて流体力学的径を示した。しかし、Z平均値及び強度基準サイズデータも報告した。

【0156】

iTEP-ワクチン融合体のネガティブ染色透過電子顕微鏡検査(TEM)。以前に記載されたようにTEMを行った(Cho et al., J Drug Target, 2015; p1-12)。

【0157】

ピレンアッセイによるiTEP-ワクチン融合体の臨界ミセル濃度(CMC)の測定。以前に記載されたものに若干の調整を施して、ピレンを疎水性蛍光プローブとして用いることによって、蛍光スペクトルからiTEP-ワクチン融合体(NP)のCMCを測定した(Ohyanagi et al., Jpn J Clin Oncol, 2011; 41(5); 718-22; Dreher et al., J Am Chem Soc, 2008; 130(2): 687-94)。簡潔に述べると、96ウェル黒色透明底プレートにおいて、融合体を250 μMから開始してPBS中に逐次2倍希釈した。各希釈の最終体積は150 μLであった。エタノール中30 μMピレンの原液3 μLを各ウェルに加えてよく混合した。Infinite M1000 PROプレートリーダー(Tecan Trading AG, Switzerland)をEx: 10 nmのスリットで334 nm、Em: 2.5 nmのスリットで360~400 nmの範囲の設定で用いて、これらのサンプルの蛍光をスキャンした。360~400 nm間のピレンの4つのピークを記録した。ピレンの発光ピーク番号1(I₁; 370~373 nm)及び発光ピーク番号3(I₃; 381~384 nm)の比(I₁/I₃)をiTEP濃度の関数としてプロットした。データ点をシグモイド型用量反応曲線にフィッティングし、CMCを曲線の変曲点として定義した。

【0158】

結果。以前に、遊離ワクチンペプチドまたは可溶性オボアルブミンタンパク質として送達したワクチンと比較した場合に、CTLペプチドワクチンSIIINFEKL(配列番号22)の効力を向上させるiTEP-NPであるiTEP_{B70}-iTEP_{A28}-pOVA(配列番号64)(図16Aの概略図)を生成した(Cho et al., J Drug Target, 2015; p 1-12)。しかし、このNPは安定ではなかった。16時間37℃で5%CO₂中に維持した後、NP構造は溶解した。0時間では、NPサンプルの流体力学的径は、DLS測定(数分布による主要なピーク)によると71.94 ± 20.81 nmであり、16時間のインキュベーションの後では、サンプルの流体力学的径は8.39 ± 1.20 nmとなったが、これは可溶性iTEPの直径とほぼ同等であった(図16B)(Cho et al., J Drug Target, 2015; p 1-12)。このNPを限界安定NP(MS-NP)と呼ぶ。

【0159】

より安定なNPを用いた場合にMS-NPの効果を拡張することができるかどうか試験するために、SIIINFEKL(配列番号22)ワクチンと融合した新規両親媒性iTEP二元ブロックコポリマーiTEP_{B70}-iTEP_{A56}-pOVA(配列番号60)(図16A)を生成した。この新規融合体は、iTEP_{A28}に対してiTEP_{A56}と、MS-NPに用いた融合体よりも長い疎水性ブロックを有していた。DLS分析によると、iTEP_{B70}-iTEP_{A56}-pOVA(配列番号60)は、56.01 ± 13.54 nm(数分布による主要なピーク)の流体力学的径を有するNPを形成した(図16B)。このNPのサイズはMS-NPに匹敵する。この新規融合体のTEM画像でもその粒子構造を確認した(図16C)。新規融合体は、5%CO₂、37℃で16時間の細胞培養培地中のインキュベーション後、その粒子構造を維持し(直径55.36 ± 12.88 nm)(図16B)、新規融合体の粒子がMS-NPよりも安定であることを示した。この新規融合体

10

20

30

40

50

のN Pを安定N PまたはS T - N Pと呼ぶ。測定値はD L Sによって得た。M S - N P及びS T - N PのZ平均はインキュベーション前で1 0 1 . 0 0 n m及び7 4 . 5 9 n mであった。M S - N P及びS T - N PのZ平均はインキュベーション後で4 2 2 . 9 0 n m及び7 0 . 4 2 n mであった。D L S測定からの強度基準サイズデータを分析に用いたところ、M S - N PとS T - N Pとの間の差が確認された(図17)。データは、N Pを37で16時間インキュベートする前(0 h)及び後(16 h)にD L Sによって収集した。インキュベーションの前では、M S - N P及びS T - N Pの直径はそれぞれ1 1 1 . 9 0 ± 3 5 . 0 2 n m及び7 8 . 5 6 ± 2 1 . 6 0 n mであった。インキュベーションの後では、S T - N Pは7 4 . 4 5 ± 1 8 . 9 9 n mの直径を有し、M S - N Pは2つのピーク: 7 5 . 4 7 ± 9 . 7 5 n m(9 2 . 2 %)及び8 . 8 6 ± 0 . 9 0 n m(7 . 8 %)を有していた。M S - N P及びS T - N Pの安定性をさらに比較するために、それらの臨界ミセル濃度(C M C)をピレンアッセイによって測定した。アッセイの結果、M S - N PのC M Cは1 2 0 . 6 μ Mであり、S T - N PのC M Cは2 3 . 9 4 μ Mであることが明らかとなった(図16 D)。C M C結果は、S T - N PがM S - N Pよりも安定であることも示した。

【0160】

実施例13:S T - N PはC T Lワクチンに対するM S - N Pの効果を拡張することができず、D CはS T - N Pを内在化させる

i T E P - ワクチン融合体の蛍光標識化。フローサイトメトリー調査のために、スクシニミジルエステルを介してアミン反応性クマリン、7 - ジエチルアミノクマリン - 3 - カルボン酸で融合体を標識して、青色蛍光バイオコンジュゲートを形成した。顕微鏡ベースの細胞内取込調査及び細胞分解調査のために、融合体をA l e x a F l u o 4 8 8 5 - S D Pエステル(A l e x a - 4 8 8)で標識して、緑色蛍光バイオコンジュゲートを形成した。製造業者の指示(L i f e T e c h n o l o g i e sによるM o l e c u l a r P r o b e s)に基づいて反応を実施した。簡潔に述べると、0 . 1 Mの炭酸水素ナトリウムバッファー中、p H 8 . 3、最終体積1 mLで、1 0 m gのi T E Pを1 m gのクマリンまたは0 . 2 m gのA l e x a - 4 8 8と反応させた。暗所において室温で1 . 5 時間、連続的に攪拌させながら反応を行った。タンパク質 - 色素コンジュゲートをA m i c o n U l t r a 1 - 5(1 0 k)遠心式フィルター(M i l l i p o r e)を用いて精製した。2 0 5 n m(A₂₀₅)及び4 3 3 n m(A₄₃₃、クマリンのmax)でクマリンコンジュゲートの吸光度を測定し、A l e x a - 4 8 8コンジュゲートは2 0 5 n m及び4 9 5 n m(A₄₉₅、A l e x a - 4 8 8のmax)で測定した。i T E P - ワクチン融合体濃度及び標識度(D O L)を以下の式に基づいて計算した。

$$\text{iTEP-ワクチン濃度(mg/mL)} = \frac{\text{A}205}{31(\text{A}205 \text{でのiTEPワクチンの}\varepsilon)\times 1(\text{経路長})}$$

$$\text{DOL}_{\text{クマリン}} = \frac{\text{A}433 \times \text{iTEPワクチンのMW}}{\text{iTEP-ワクチン濃度(mg/mL)} \times 59000(\text{色素の}\varepsilon)}$$

$$\text{DOL}_{\text{Alexa-488}} = \frac{\text{A}495 \times \text{iTEPワクチンのMW}}{\text{iTEP-ワクチン濃度(mg/mL)} \times 71000(\text{色素の}\varepsilon)}$$

式中、 ε は吸光係数($c m^{-1} M^{-1}$)である。クマリンコンジュゲートのD O L_{クマリン}は

8 ~ 10 %であり、使用前に対応する非標識 i T E P - ワクチン融合体を加えることによつて3 %に調整した。A l e x a - 4 8 8 コンジュゲートのD O L_{Alexa-488}は0 . 0 2 ~ 0 . 0 3 %であり、使用前に0 . 0 2 %に調整した。

【 0 1 6 1 】

D CによるS I I N F E K Lエピトープワクチンの提示。以前に記載されたように提示について調査した(Cho et al., J Drug Target, 2015; p 1 - 12)。この実験に用いたi T E P - ワクチン融合体(N P)の濃度は5 μMであった。提示の結果は、所与の処理における5 0 0 0の処理済生細胞の平均蛍光強度(M F I)として、未処理D C 2 . 4細胞のM F I値に対して正規化して示した。

【 0 1 6 2 】

B 3 Zハイブリドーマ(C D 8 + T)細胞の活性化。このアッセイは以前に記載されたプロトコールで行った(Cho et al., J Drug Target, 2015; p 1 - 12)。

【 0 1 6 3 】

i T E P - ワクチン融合体の細胞内取込。D C 2 . 4、E A . h y 9 2 6、b E n d . 3、3 T 3細胞を $1 . 5 \times 1 0^5 / 5 0 0 \mu L$ / ウェルで2 4 ウエルプレートに播種した。細胞がプレートの底に付着したら(4時間または一晩)、培地を5 μMのクマリン標識i T E P - ワクチン融合体含有または非含有の5 0 0 μLの新鮮な培地と交換した。4時間、3 7 、5 % C O₂で培養した後、細胞を収集してP B Sで2回洗浄した。細胞の蛍光をフローサイトメトリーによって測定した(サンプル当たり $5 \times 1 0^4$ イベントを収集)。

【 0 1 6 4 】

蛍光顕微鏡検査のために、D C 2 . 4細胞を1 2 mmガラスカバースリップ底の2 4 ウエルプレート上に、完全R P M I - 1 6 4 0培地中、1 ウエル当たり2 5 0 , 0 0 0で播種した。細胞が8 0 %コンフルエンスに達したら、温培地で洗浄し、その後、3 7 で1 ~ 4時間、5 μMのi T E P - ワクチン融合体と共にインキュベーションした。次に、細胞を温培地で2回リヌスし、7 5 n MのL y s o T r a c k e r R e d D N D - 9 9 (I n v i t r o g e n, U S A)と共にインキュベートした。その後、細胞をP B Sで2回洗浄し、4 %のパラホルムアルデヒドで固定した。細胞をスライドガラス上に載せ、N i k o n E C L I P S E T i (N i k o n I n s t r u m e n t s I n c ., U S A)を用いて画像化した。

【 0 1 6 5 】

動物免疫化。左側腹部への2 n m o lのi T E P N Pワクチン及び不完全フロイントアジュvant(I F A ; S i g m a , U S A)の皮下注入によって、C 5 7 B L / 6マウスを免疫化した。1週間後に右側腹部で免疫化を繰り返した。2回目の免疫化後1 0日目にマウスを屠殺して脾臓を採取した。

【 0 1 6 6 】

結果。S T - N P及びM S - N Pによって送達されたS I I N F E K L(配列番号2 2)ワクチンのインビトロ及びインビボ活性を比較した。第1に、細胞をS T - N PまたはM S - N Pで処理した後、D CによるS I I N F E K L(配列番号2 2)エピトープ提示を評価した。評価の結果は、S T - N PがM S - N Pよりも有意に弱い提示につながることを示していた(図1 8 A)。第2に、S T - N PまたはM S - N Pのいずれかで前処理したD Cと共にインキュベートした後のB 3 Z細胞の活性化を比較した。B 3 Z細胞は、H - 2 K^b / S I I N F E K L複合体に拘束性の遺伝子操作C D 8 + T細胞ハイブリドーマ株である(K a r t t u n e n et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1 9 9 2 ; 8 9 (1 3) : 6 0 2 0 - 4)。結果は、S T - N PはM S - N PよりもB 3 Z細胞の活性化がはるかに弱いことを示す(図1 8 B)。最後に、S T - N PまたはM S - N Pのいずれかを用いてC 5 7 B L / 6マウスを免疫化し、その後、N Pが誘発したS I I N F E K L特異的C T L応答を調べた。S T - N Pは確かに応答を誘発した。しかし、その応答はM S - N Pによって誘発されたものよりも有意に弱

10

20

30

40

50

かった(図18C)。細胞の活性化をINFベースのELISPOTアッセイによって評価した。MS-NPは、SIIINFEKL(配列番号22)提示、B3Z活性化、及びインビオCTL応答の促進において、ST-NPよりも優れていたが、CTL応答における優位性は、提示及びB3Z活性化よりもはるかに弱いことが観察された(図18Aまたは18Bに対して図18C)。インビトロ結果とインビオ結果との間の相違は、ST-NPがインビオにおいてMS-NPに勝る何らかの明らかにされていない利点を有し得ることを示唆していた。ST-NPの利点の1つは、DCがMS-NPよりもST-NPをよく取り込むことであると仮定した。DC及び他の細胞によるMS-NP及びST-NPの取込みを比較した。結果は、DCがST-NPをMS-NPの2倍内在化したことを示す(図18D)。所与の細胞型によるST-NPとMS-NPとの間の取込み比を、それぞれ蛍光標識ST-NP及びMS-NPと共にインキュベートした後の細胞のMFI比として表す。対照的に、内皮細胞(EA.hy926及びbEnd.3)ならびに線維芽細胞(3T3)は、MS-NPと同じか、または少ない量のST-NPを内在化した。これらの観察結果は、DCは粒子の取込みに有利であったが、体内的一般的な細胞では異なることを示していた。ST-NPはMS-NPよりも安定であり、そのため、ST-NPサンプルは、上記の取込み調査の際にMS-NPサンプルよりも多くのNP構造のiTEP-ワクチン融合体分子を有していたはずであり、MS-NPサンプルよりも多くのST-NPサンプルの取込みをもたらした。実際に、NP構造は受動的DC標的化効果を発揮する。

【0167】

ST-NPはMS-NPよりもDC取込みが優れていたので、ST-NPに関連する低いSIIINFEKL(配列番号22)提示及びB3Z活性化は、DC内でのNPの非効率的なプロセシングに起因するに違いない。安定性がST-NPとMS-NPとの間の主な違いなので、ST-NPの細胞内プロセシングの阻害をNPの高い安定性と関連付けるのは妥当である。高い安定性がDC内でのNPの解離を妨げる可能性がある。pOVAはST-NPの疎水性コア中にあるので、解離しなければ、pOVAとiTEPとの間の結合がDC内でs-プロテアソーム及び免疫プロテアソームに曝露されることはない。したがって、SIIINFEKL(配列番号22)エピトープはST-NPから効果的に放出されることができない。

【0168】

実施例14：還元環境反応型安定性を有するiTEP-NP担体の生成

還元処理後のRED-NPの遊離スルフヒドリル基の定量。20mgのRED-NPを2mLのH₂Oに溶解させ、1mMのGSHで16時間処理した。その後、溶液を4で24時間脱イオン水中に透析した(膜カットオフMW:3,500ダルトン)。その後、Amicon遠心式フィルターデバイス(Millipore, USA)を用いて、サンプルを0.5mLに濃縮した。RED-NPの遊離スルフヒドリル基の数をエルマン法によって求めた。簡潔に述べると、250μLのサンプル及び50μLのエルマン試薬(Thermo Scientific, USA)を2.5mLの反応バッファー(0.1Mリン酸ナトリウム、pH8.0、1mM EDTA)に添加した。室温での15分間のインキュベーションの後、OD₄₁₂を測定した。遊離スルフヒドリル基の標準曲線を作成するために、システイン塩酸塩-水和物の逐次希釈液のOD₄₁₂を測定した。逐次のOD₄₁₂値をシステイン塩酸塩-水和物の濃度に対してプロットして標準曲線を作成した。RED-NPサンプル中の遊離スルフヒドリル基の濃度を標準曲線から求め、iTEP-ワクチン融合体分子当たりの遊離スルフヒドリル基の数を計算するために用いた。

【0169】

結果。ST-NPとMS-NPとの間の比較に基づいて、CTLペプチドワクチンのより効果的な担体は、体循環中にはST-NPと同等に安定であるが、DCによる内在化の後にはMS-NPと同等に不安定になるもののはずであると考えられた。そのような担体を生成するために、NP中にジスルフィド結合を形成し、NPを安定化させるためにこの結合を用いることによってMS-NPを改変した(図19A)。新規NPは、そのジスル

10

20

30

40

50

フィド結合がサイトゾルなどの還元環境で還元されない限り、安定なNPとして振る舞うことが予想された(Smith et al., Toxicol Appl Pharmacol, 1996; 140(1):1-12; Wu et al., J Nutr, 2004; 134(3):489-92)。具体的には、両親媒性コポリマー-iTEP_{B70}-iTEP_{A28}(配列番号54)とpOVAとの間に4つのシステインを挿入し、隣接するシステインを8つのグリシンによって隔てた。得られたiTEP融合体iTEP_{B70}-iTEP_{A28}-(G₈C)₄-pOVA(配列番号61)は、融合体のDLS測定によるとNPに自己組織化した(図19B)。NPは61.94±12.71nmの流体力学的径(数分布による主要なピーク)を有しており、5%CO₂、37における細胞培養培地中での一晩のインキュベーション後にその粒子構造を維持した。インキュベーション後の流体力学的径は53.05±12.38nmであった(図19B)。インキュベーション前後のRED-NPのZ平均は、それぞれ87.59nm及び76.89nmであった。強度基準サイズデータを分析に用いたところ、同じ結論に至った(図17B)。iTEP_{B70}-iTEP_{A28}-(G₈C)₄-pOVA融合体(配列番号61)のTEM画像でも融合体の粒子構造が確認された(図19C)。

【0170】

次の連続の実験では、新規NP中のジスルフィド結合が還元可能であるかどうか、及びNP構造がサイトゾル(グルタチオン、GSH 1~10mM)(Smith et al., Toxicol Appl Pharmacol, 1996; 140(1):1-12; Wu et al., J Nutr, 2004; 134(3):489-92)のような還元環境において分解可能であるかどうか試験した。2つの濃度のGSHを用いて、新規NP及びST-NPを37で一晩処理し、その後、DLSによって両方のNPの粒子構造変化を分析した。これらの濃度は、細胞質(GSH 1~10mM)または細胞外(GSH 1~10μM)環境のいずれかにおけるGSH濃度を模倣している(Smith et al., Toxicol Appl Pharmacol, 1996; 140(1):1-12; Cantin et al., Appl Physiol (1985), 1987, 63(1):152-7; Jones et al., Clin Chim Acta, 1998; 275(2):175-84)。両方のNPとも10μMのGSHで安定であった。新規NPは1mMのGSHで処理した後に粒子構造を失った(表4)。この結果と合致して、1mMのGSHの処理の後、遊離スルフヒドリル基は、平均してiTEP分子当たり0からiTEP分子当たり2に増加した。対照的に、対照としてのST-NPは、GSHのいかなる濃度でのインキュベーションにもかかわらず、その粒子構造を維持した。ジチオスレイトール(DTT)を還元剤として用いた場合に同様の結果が生じたが、ただしこの場合、新規iTEP-NPは10μMのDTTで安定ではなかった(表4)。新規NPとST-NPとの間の劇的な差は、新規NPが還元環境に反応性のある安定性を有することを示唆していた。この新規NPを還元環境依存NPまたはRED-NPと命名した。

表4. ST-NP及びRED-NPの還元剤に対する反応についての比較

	ST-NP	RED-NP	
	還元剤濃度 (μM)	流体力学的径 (nm)	
GSH	0	54.82±12.89(NP)	47.11±13.18(NP)
	10	52.23±13.59(NP)	37.98±6.72(NP)
	1000	50±13.62(NP)	8.35±1.04
DTT	10	52.56±13.67(NP)	8.75±2.03
	1000	53.10±13.56(NP)	6.43±2.01

ST-NP及びRED-NPを還元剤有りまたは無しで16時間処理した。
これらの2つのNPの数分布による流体力学的径を比較した。

【0171】

SDS-PAGEを用いて1 mMのGSHでの処理に対するRED-NP、MS-NP、及びST-NPの反応を分析した。1 mMのGSHはRED-NP中のジスルフィド結合を還元したが、10 μM では還元しなかった。RED-NP融合体($iTEP_{B70}-iTEP_{A28}-(G_8C)_4-pOVA$; (配列番号61))の大部分のポリマーが1 mMのGSHでの処理によってモノマーになったが、これはゲル上の50-kDaバンドとして示される。対照的に、GSHはMS-NP及びST-NPの融合体の重合状態に影響を及ぼさなかった。非還元性ゲル及び25 μg の各融合体を分析に用いた。結果は、1 mMのGSHによってRED-NPを還元することができるが、10 μM ではできることを示す(図20)。対照的に、MS-NP及びST-NPは処理に反応しなかった(図20)。この結果は上述の結論を強固なものとした。

【0172】

最後に、次の連続の実験では、DCによるRED-NPの内在化がST-NPと同じくらい効率的か、またはMS-NPと同じくらい非効率的かどうか調査した。結果は、蛍光顕微鏡検査結果(4時間の取り込みについては図19D~F、及び1時間の取り込みについては図21; 画像化前にAllexa-488標識NPをDCと共に4時間インキュベートした)ならびにフローサイトメトリー結果(図19G)の両方によると、DCへのRED-NPの内在化はST-NPと同じくらい効率的であり、MS-NPよりも強力であったことを示す。さらに、DCはMS-NPに対して優先的にRED-NPを内在化したが、内皮細胞及び線維芽細胞では異なっており(図19H)、これはST-NP(図18D)と同様であった。したがって、RED-NPは、まさにST-NPのように受動的DC標的化能力を有する。

【0173】

実施例15: RED-NPはST-NP及びMS-NPの両方よりも有効なワクチン担体である

以下に記載の結果を得るために用いた方法は本明細書に記載されている。

【0174】

結果。DCによるCTLエピトープ提示に対するRED-NP、MS-NP、及びST-NPの効果を比較した。RED-NPによって送達されたSINIKE(配列番号22)エピトープはMS-NPによって送達されたときほど良好に提示されなかつたが、RED-NPから得られた提示はST-NPのものよりも有意に優れていた(図22A)。比較結果は、RED-NPの環境依存的安定性がDCによるワクチンペイロードのプロセシング及び提示を促進したことを意味していた。一方で、RED-NP及びMS-NPの提示結果の間には差があったが、これは、RED-NP中のジスルフィド結合の還元が完全ではなかった可能性があり、そのためすべてのRED-NPがMS-NPのように振る舞ったわけではないことを示していた。提示結果と合致して、RED-NPはMS-NP

Pほど効果的にB3Z細胞を活性化することができなかつたが、この場合もST-NPよりも良好となつた(図22B)。空の担体NPとDC及びB3Z細胞とのインキュベーションはいかなる抗原提示またはT細胞活性化にもつながらなかつたので(図23)、すべてのこれらのDC提示及びB3Z活性化の結果がSIEFELワクチン特異的であつたということは注目に値する。

【0175】

RED-NPまたはMS-NPのいずれかでマウスを免疫化し、それらによって誘発されたCTL応答を比較したところ、RED-NPはMS-NPの効果を上回り、SIEFELエピトープ(配列番号22)に対してより強いCTL応答を誘発したことが判明した(図22C)。別の還元環境依存NPのRED-NP2(融合体iTEPB_{B70}-iTEPA_{A28}-(G₁C)₄-pOVAから集合した)(配列番号62)がRED-NPと同様の結果をもたらし、また、インビボでMS-NPよりも優れていたことは注目に値した(図24)。例えば、流体力学的径の値はインキュベーション前で、42.49±10.23nm(個数基準)、59.15±15.32nm(強度基準)、及び89.25(Z平均)であり、これらの値はインキュベーション後で、36.75±9.56nm(個数基準)、58.95±19.53nm(強度基準)、及び54.81(Z平均)であった。

10

【0176】

表5に3つのiTEP-NPの安定性、取り込み、及びCTL応答をまとめる。NPの中で、細胞外非還元環境とサイトゾル還元環境との間で変化可能な安定性を有していたものであるRED-NPが、CTLペプチドワクチンの送達において最も効果的であった。すべての3つのNPはワクチンと共に安全であることが注目された。それらは50μMでもDC2.4細胞またはEA.hy926細胞に対して毒性ではなかつた(図25)。それらは長期のワクチン接種調査の間にいかなる有害反応も引き起こさなかつた。

20

表5. 3つの異なるiTEPの安定性、取り込み及びCTL応答の一覧

	融合体設計	安定性	DC 2.4細胞による取り込み	CTL応答 (インビトロ)	CTL応答 (インビボ)
MS-NP 配列番号56	iTEPB _{B70} -iTEPA _{A28} -pOVA	+	+	+++	++
ST-NP 配列番号60	iTEPB _{B70} -iTEPA _{A56} -pOVA	++	++	+	+
RED-NP 配列番号61	iTEPB _{B70} -iTEPA _{A28} -(G ₁ C) ₄ -pOVA	++(還元環境下では不安定)	++	++	+++

30

【0177】

実施例16: RED-NPはサイトゾルに輸送されて分解される

RED-NPは還元環境に対して安定な反応を有し、ワクチン送達においてST-NPよりも良好に働いたので、RED-NPは細胞内輸送の間に還元性のサイトゾルに到達してサイトゾルの還元環境を活用した可能性が非常に高い。次の連続の実験では、RED-NPがサイトゾルに輸送されて分解されたかどうか試験した。この調査を行うために、DCによって内在化された後のRED-NPの細胞内分配を評価した。

40

【0178】

結果。DCとのRED-NPの1時間のインキュベーションの後、相当な割合の内在化NPがサイトゾルに到達していた一方で、残りのNPはファゴリソーム中にあった(図26A)。この観察結果は、DCのファゴリソームからサイトゾルへのNPのまずまずの速さの脱出を示す。RED-NPのプロセシング及び分解がDC中で素早く生じたことも分かった。NPをDCと共に1時間インキュベートした後のSDS-PAGEによる細胞内RED-NPの完全性を分析した(図26B)。インキュベーション後の異なる時点

50

で細胞ライセートを収集した。RED-NPのiTEP-ワクチン融合体は、インキュベーションの直後にSDS-PAGEゲル上に約50kDaのバンドを示した。しかし、このバンドはインキュベーション後30分以内にほとんど消えた。インキュベーションの1時間後、このバンドは完全に消えた。ペプチド分解のためのs-プロテアソーム及び免疫プロテアソームはサイトゾル中にあるので、素早い分解は、ファゴリソソームからサイトゾルへの素早い輸送と一貫性がある(Yewdell and Bennink, Curr Opin Immunol, 2001; 13(1):13-8; Kloetzel and Ossendorp, Curr Opin Immunol 2004; 16(1):76-81; 及びBrooks et al., Biochemical Journal, 2000; 346(Pt 1):155-61)。一方で、エピトープ含有タンパク質の効率的な生分解はMHCクラスI抗原提示経路を促進する(Kruger and Kloetzel, Curr Opin Immunol, 2012; 24(1):77-83; Yewdell and Bennink, Curr Opin Immunol, 2001; 及びAmigorena and Savina, Curr Opin Immunol, 2010; 22(1):109-17)。

【0179】

参考文献

1. Robinson, H. L., Amara, R. R., T cell vaccines for microbial infections Nat Med (2005); 11, s25-s32.
2. Epstein, J. E., Tewari, K., Lyke, K. E., Sim, B. K. L., Billingsley, P. F., Laurens, M. B. et al., Live Attenuated Malaria Vaccine Designed to Protect Through Hepatic CD8+ T Cell Immunity Science (2011); 334, 475-480.
3. Klebanoff, C. A., Acquavella, N., Yu, Z., Restifo, N. P., Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? Immunological Reviews (2011); 239, 27-44.
4. Schumacher, R., Amacker, M., Neuhaus, D., Rosenthal, R., Groeper, C., Heberer, M. et al., Efficient induction of tumoricidal cytotoxic T lymphocytes by HLA-A0201 restricted, melanoma associated, L(27)Melan-A/MART-1(26-35) peptide encapsulated into virosomes in vitro Vaccine (2005); 23, 5572-5582.
5. Plummer, E. M., Manchester, M., Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design WIRES Nanomed Nanobiotechnol (2011); 3, 174-196.
6. Goldberg, Michael S., Immunoengineering: How Nanotechnology Can Enhance Cancer Immunotherapy Cell (2015); 161, 201-204.
7. Sahdev, P., Ochyil, L., Moon, J., Biomaterials for Nanoparticle Vaccine Delivery Systems Pharm Res (2014); 31, 2563-2582

- . 8 . Dreher , M. R. , Simnick , A. J. , Fischer , K. , Smith , R. J. , Patel , A. , Schmidt , M. et al. , Temperature triggered self - assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles J Am Chem Soc (2008) ; 130 , 687 - 694 .
- 9 . Hassouneh , W. , Fischer , K. , MacEwan , S. R. , Branscheid , R. , Fu , C. L. , Liu , R. et al. , Unexpected multivalent display 10 of proteins by temperature triggered self - assembly of elastin - like polypeptide block copolymers Biomacromolecules (2012) ; 13 , 1598 - 1605 .
- 10 . Scheller , J. , Leps , M. , Conrad , U. , Forcing single - chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin - like polypeptides Plant biotechnology journal (2006) ; 4 , 243 - 249 .
- 11 . Alexander , J. , Oseroff , C. , Dahlberg , C. , Qin , M. , Ishioka , G. , Beebe , M. et al. , A decaepitope polypeptide primes for multiple CD8 + IFN - gamma and Th lymphocyte responses : evaluation of multiepitope polypeptides as a mode for vaccine delivery J Immunol (2002) ; 168 , 6189 - 6198 .
- 12 . Livingston , B. D. , Newman , M. , Crimi , C. , McKinney , D. , Chesnut , R. , Sette , A. , Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines Vaccine (2001) ; 19 , 4652 - 4660 .
- 13 . Thomson , S. A. , Khanna , R. , Gardner , J. , Burrows , S. R. , Coupar , B. , Moss , D. J. et al. , Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8 + cytotoxic T cells : implications for vaccine design Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995) ; 92 , 5845 - 5849 .
- 14 . Hassouneh , W. , Christensen , T. , Chilkoti , A. , Elastin - like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins Current protocols in protein science / editorial board , John E. Coligan . . . [et al.] (2010) ; Chapter 6 , Unit 6 11 .
- 15 . Da Silva , D. M. , Pastrana , D. V. , Schiller , J. T. , Kast , W. M. , Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti - tumor immune response induced by ch 50

- imeric human papillomavirus virus-like particle vaccines *Virology* (2001); 290, 350-360.
16. Ruedl, C., Schwarz, K., Jegerlehner, A., Storni, T., Manolova, V., Bachmann, M. F., Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies *J Virol* (2005); 79, 717-724.
17. Liu, X. S., Xu, Y., Hardy, L., Khamma nivong, V., Zhao, W., Fernando, G. J. et al., IL-10 mediates suppression of the CD8 T cell IFN-gamma response to a novel viral epitope in a primed host *J Immunol* (2003); 171, 4765-4772.
18. Urry, D. W., Parker, T. M., Reid, M. C., Gowda, D. C., Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its - Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Result *s Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (1991); 6, 263-282.
19. Urry, D. W., Pattanaik, A., Accavitti, M. A., Luan, C., McPherson, D. T., Xu, J. et al., in *Handbook of Biodegradable Polymers*, A. J. Domb, J. Kost, D. M. Wiseman, Eds. (CRC Press, 1998).
20. CHRISTIANSEN, M., MATSON, M., BRAZG, R. L., GEORGOPoulos, L., ARNOLD, S., KRAMER, W. et al., Weekly Subcutaneous Dose of Glymera (PB1023) a Novel GLP-1 Analogue Reduce Glucose Exposure Dose-Dependently. (Philadelphia, Pennsylvania, 2012),
21. Cappello, J., in *Handbook of Biodegradable Polymers*, A. J. Domb; J. Kost; D. M. Wiseman, Eds. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997), pp. 387-416.
22. Nouri, F., Wang, X., Chen, X., Hatefi, A., Reducing the Visibility of the Vector/DNA Nanocomplexes to the Immune System by Elastin-Like Peptides *Pharm Res* (2015), 1-11.
23. Moreland, L. W., McCabe, D. P., Caldwell, J. R., Sack, M., Weisman, M., Henry, G. et al., Phase I/II trial of recombinant methionyl human tumor necrosis factor binding protein PEGylated dimer in patients with active refractory rheumatoid arthritis *The Journal of rheumatology* (50)

- 2000); 27, 601-609.
24. Rau, R., Sander, O., van Riel, P., van de Putte, L., Hasler, F., Zaugg, M. et al., Intravenous human recombinant tumor necrosis factor receptor p55-Fc IgG1 fusion protein Ro 45-2081 (lenercept): a double blind, placebo controlled dose-finding study in rheumatoid arthritis The Journal of rheumatology (2003); 30, 680-690. 10
25. Urry, D. W., Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions Progress in biophysics and molecular biology (1992); 57, 23-57.
26. MacEwan, S. R., Chilkoti, A., Elastin-like polypeptides: Biomedical applications of tunable biopolymers Peptide Science (2010); 94, 60-77.
27. McDaniel, J. R., Mackay, J. A., Quiroz, F. G., Chilkoti, A., Recursive directional ligation by plasmid reconstruction allows rapid and seamless cloning of oligomeric genes Biomacromolecules (2010); 11, 944-952. 20
28. Rock, K. L., Fleischacker, C., Gamble, S., Peptide-priming of cytolytic T cell immunity in vivo using beta 2-microglobulin as an adjuvant The Journal of Immunology (1993); 150, 1244-1252. 30
29. Zhao, P., Dong, S., Bhattacharyya, J., Chen, M., iTEP Nanoparticle-Delivered Salinomycin Displays an Enhanced Toxicity to Cancer Stem Cells in Orthotopic Breast Tumors Molecular pharmaceutics (2014).
30. Lee, C., Levin, A., Branton, D., Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels Analytical biochemistry (1987); 166, 308-312. 40
31. Frey, A., Di Canzio, J., Zurakowski, D., A statistically defined endpoint titrator determination method for immunoassays J Immunol Methods (1998); 221, 35-41.
32. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., Rock, K. L., Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules The Journal of Immunology (1997); 158, 2723-2730. 50

33. Karttunen, J., Sanderson, S., Shastri, N., Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens Proceedings of the National Academy of Sciences (1992); 89, 6020-6024.
34. Bernard, A., Coitot, S., Bremont, A., Bernard, G., T and B cell cooperation: a dance of life and death Transplantation 10 (2005); 79, S8-S11.
35. Parker, D. C., T cell-dependent B cell activation Annual review of immunology (1993); 11, 331-360.
36. Murphy, K., in Janeway's Immunobiology (Garland Science, 2012).
37. VanRegenmortel, M. H., in Structure of Antigens, M. H. VanRegenmortel, Ed. (CRC Press, 1992), pp. 1-28.
38. M., S., Antigenicity: some molecular aspects Science (1969); 166.
39. Murphy, K., in Janeway's Immunobiology. (Garland Science, 2012), pp. 888.
40. Liu, W., Peng, Z., Liu, Z., Lu, Y., Ding, J., Chen, Y. H., High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity Vaccine (2004); 23, 366-371. 30
41. Kovacs-Nolan, J., Mine, Y., Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice Biochimica et biophysica acta (2006); 1760, 1884-1893.
42. Partidos, C., Stanley, C., Steward, M., The influence of orientation and number of copies of T and B cell epitopes on the specificity and affinity of antibodies induced by chimeric peptides European journal of immunology (1992); 22, 2675-2680. 40
43. Onda, M., Beers, R., Xiang, L., Nagata, S., Wang, Q. C., Pastan, I., An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes Proc Natl Acad Sci U S A (2008); 105, 11311-11316.
44. Onda, M., Nagata, S., Fitzgerald, D. J., Beers, R., Fisher, R. J., Vincent, J 50

- . J. et al., Characterization of the B cell epitopes associated with a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) (2006); 177, 8822-8834.
45. MacEwan, S. R., Chilkoti, A., Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers Biopolymers (2010); 94, 60-77.
46. Smejkal, G. B., The Coomassie chronicles: past, present and future perspectives in polyacrylamide gel staining Expert review of proteomics (2004); 1, 381-387.
47. Creighton, T. E., Proteins: Structures and Molecular Properties. (W.H. Freeman Company, 1993).
48. Urry, D. W., Luan, C. H., Parker, T. M., Gowda, D. C., Prasad, K. U., Reid, M. C., Safavy, A., Temperature of Polypeptide Inverse Temperature Transition Depends on Mean Residue Hydrophobicity J. Am. chem. Soc. (1991); 113, 3.
49. Meyer, D. E., Chilkoti, A., Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides Biomacromolecules (2004); 5, 846-851.
50. Jefferis, R., Aggregation, immune complexes and immunogenicity mAbs (2011); 3, 503-504.
51. Rosenberg, A. S., Effects of protein aggregates: an immunologic perspective The AAPS journal (2006); 8, E501-507.
52. Zhou, L., Hoofring, S., Wu, Y., Vu, T., Ma, P., Swanson, S. et al., Stratification of Antibody-Positive Subjects by Antibody Level Reveals an Impact of Immunogenicity on Pharmacokinetics The AAPS journal (2013); 15, 30-40.
53. Kontos, S., Hubbell, J. A., Drug development: longer-lived proteins Chemical Society reviews (2012); 41, 2686-2695.
54. De Groot, A. S., Scott, D. W., Immunogenicity of protein therapeutics Trends in immunology (2007); 28, 482-490.
55. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry Immunogenicity Asses

20

30

40

50

sment for Therapeutic Protein Products (2013).

56. Shankar, G., Shores, E., Wagner, C., Mire-Sluis, A., Scientific and regulatory considerations on the immunogenicity of biologics Trends in biotechnology (2006); 24, 274-280.

57. Bachmann, M. F., Zinkernagel, R. M., Neutralizing Antiviral B Cell Responses Annual Review of Immunology (1997); 15, 2 10 35-270.

58. Feldmann, M., Basten, A., The Relationship Between Antigenic Structure And The Requirement For Thymus-Derived Cells In The Immune Response The Journal of Experimental Medicine (1971); 134, 103-119.

59. Urry, D. W., Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers Journal of Physical Chemistry B (1997); 101, 11007-11028.

60. Chilkoti, A., Dreher, M. R., Meyer, D. E., Raucher, D., Targeted drug delivery by thermally responsive polymers Adv Drug Deliv Rev (2002); 54, 613-630.

61. Liu, J., Bauer, H., Callahan, J., Kopackova, P., Pan, H., Kopecek, J., Endocytic uptake of a large array of HPMA copolymers: Elucidation into the dependence on the physicochemical characteristics J 30 Control Release (2010); 143, 71-79.

62. MacKay, J. A., Chen, M., McDaniel, J. R., Liu, W., Simnick, A. J., Chilkoti, A., Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection Nat Mater (2009); 8, 993-999.

63. Shi, P., Aluri, S., Lin, Y. A., Shah, M., Edman, M., Dhandhukia, J. et al., Elastin-based protein polymer nanoparticles carrying drug at both corona and core suppress tumor growth in vivo Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society (2013); 171, 330-338.

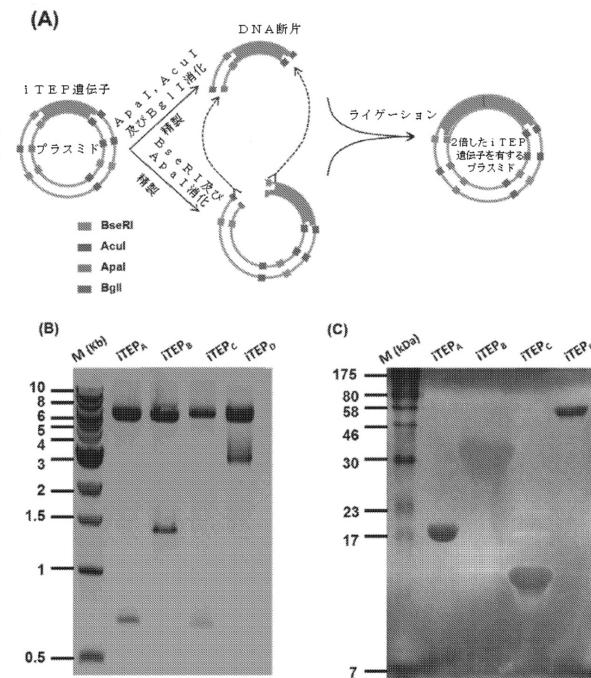
64. Bidwell, G. L., 3rd, Perkins, E., Hughes, J., Khan, M., James, J. R., Raucher, D., Thermally targeted delivery of a c-Myc inhibitory polypeptide inhibits tumor progression and extends survival in a 50

- rat glioma model PloS one (2013); 8, e55104.
65. Kaspar, A. A., Reichert, J. M., Future directions for peptide therapeutics development Drug discovery today (2013); 18, 807-817.
66. Le, D. H., Hanamura, R., Pham, D. H., Kato, M., Tirrell, D. A., Okubo, T. et al., Self-assembly of elastin-mimetic double hydrophobic polypeptides Biomacromolecules (2013); 14, 1028-1034. 10
67. Benitez, P. L., Sweet, J. A., Fink, H., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., Enejder, A. et al., Sequence-specific crosslinking of electrospun, elastin-like protein preserves bioactivity and native-like mechanics Advanced healthcare materials (2013); 2, 114-118.
68. Garcia-Arevalo, C., Bermejo-Martin, J. F., Rico, L., Iglesias, V., Martin, L., Rodriguez-Cabello, J. C. et al., Immunomodulatory nanoparticles from elastin-like recombinamers: single-molecules for tuberculosis vaccine development Mol Pharm (2013); 10, 586-597. 20

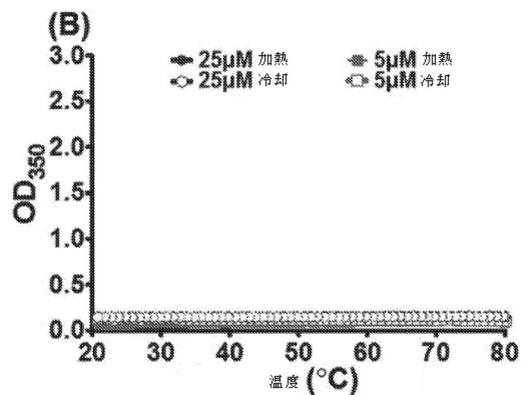
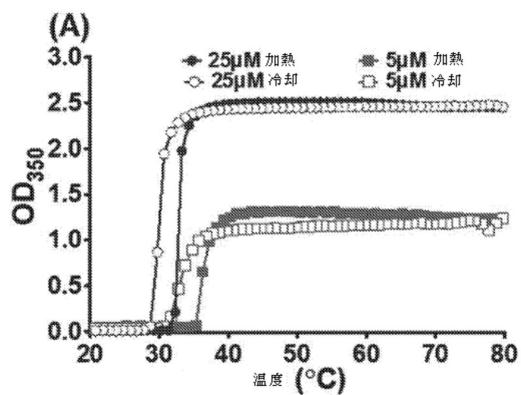
【図1】



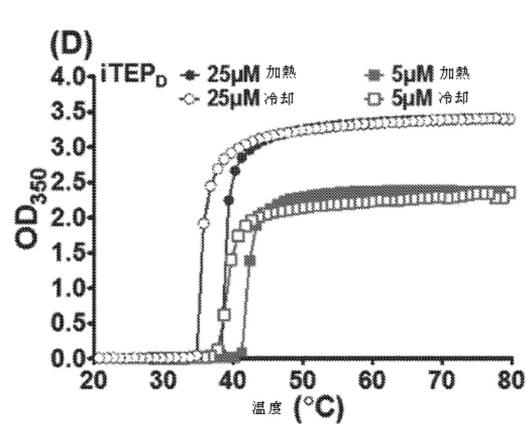
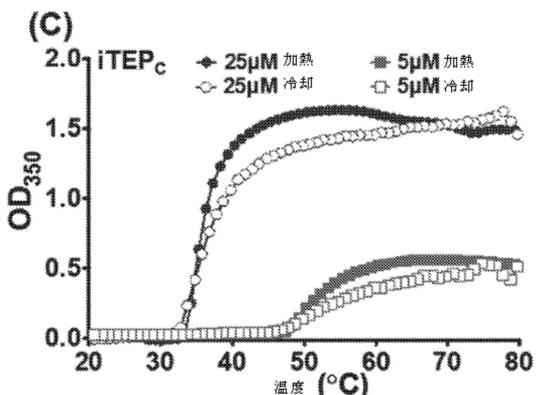
【図2】



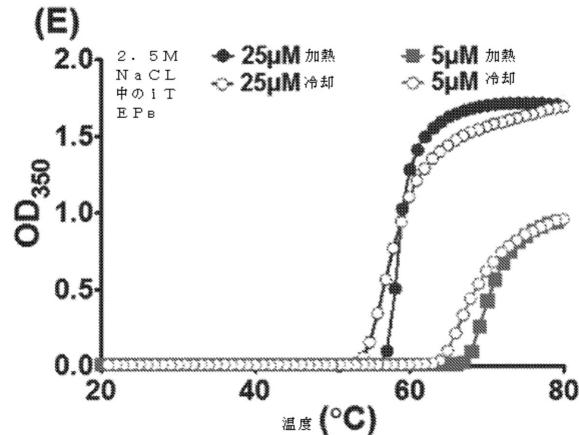
【図3-1】



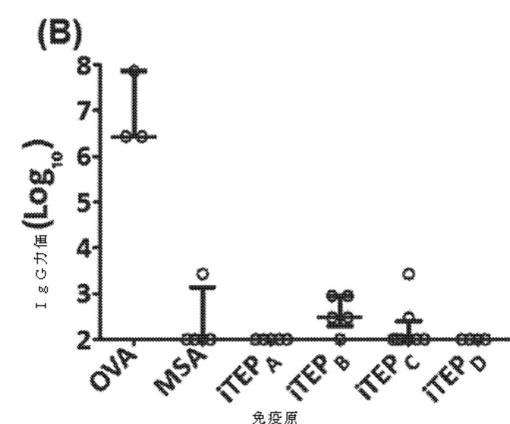
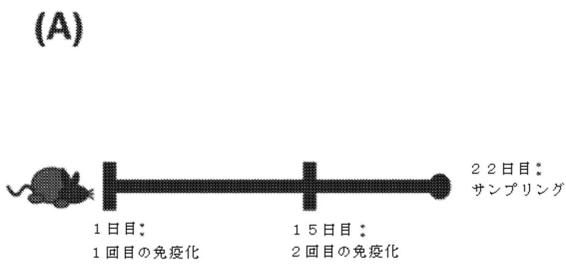
【図3-2】



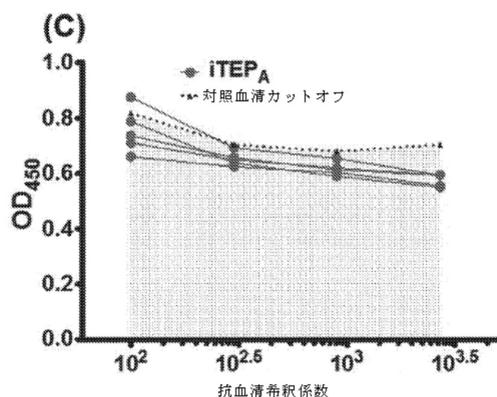
【図3-3】



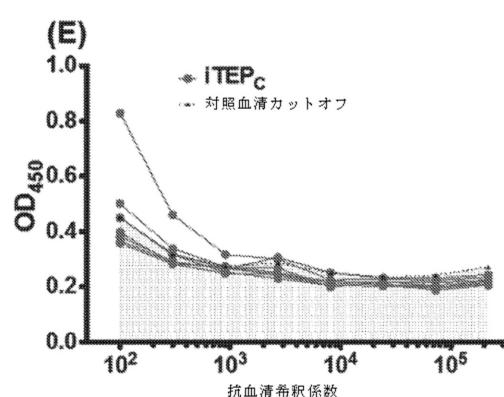
【図4-1】



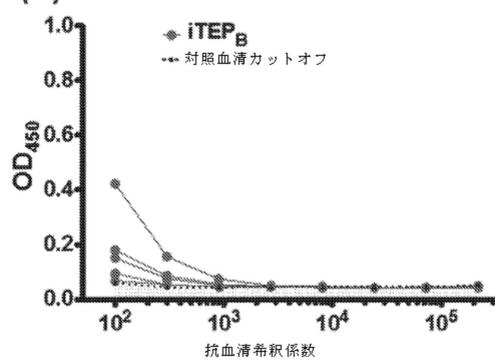
【図4-2】



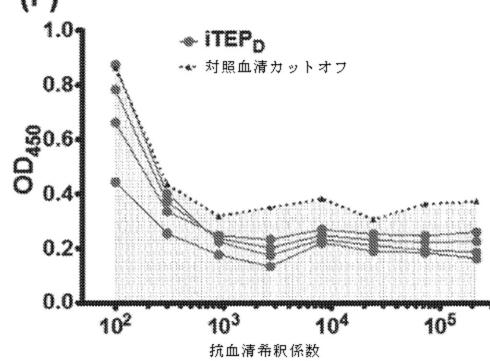
【図4-3】



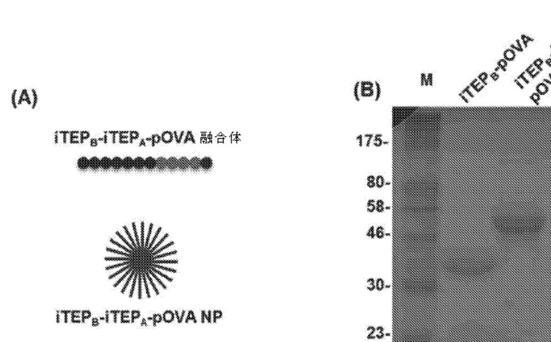
(D)



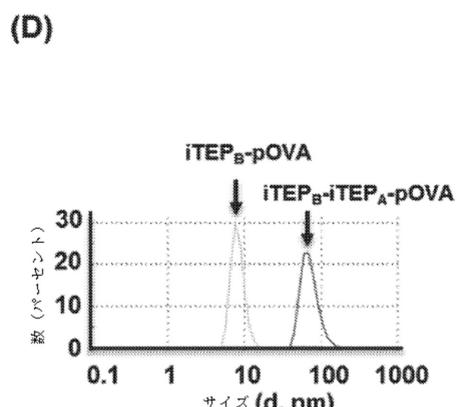
(F)



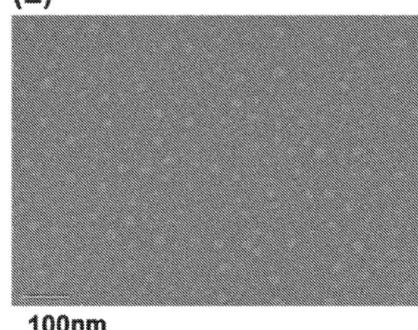
【図5-1】



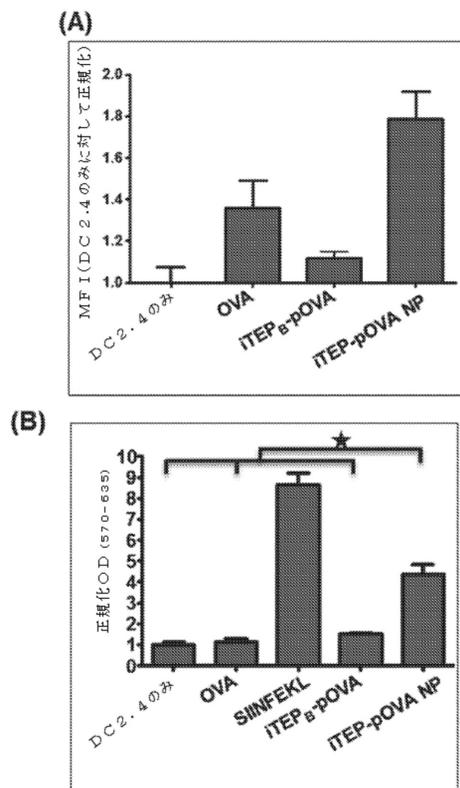
【図5-2】



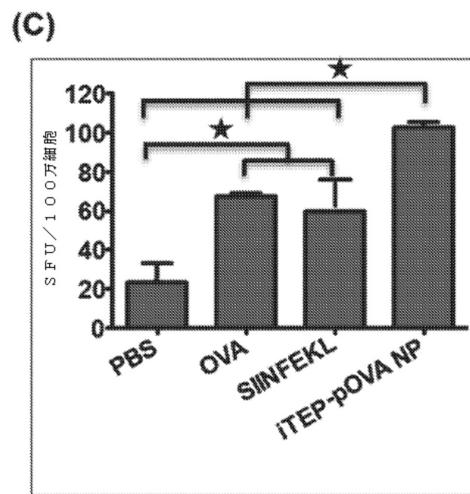
(E)



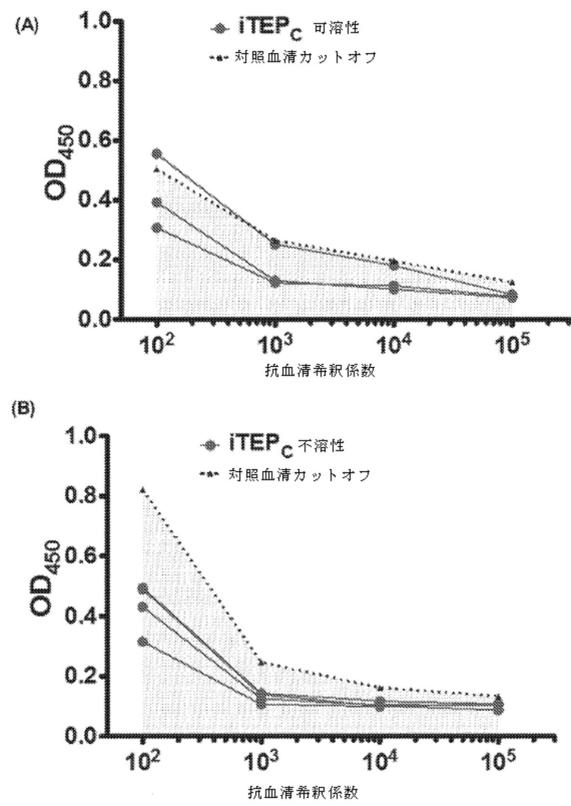
【図 6 - 1】



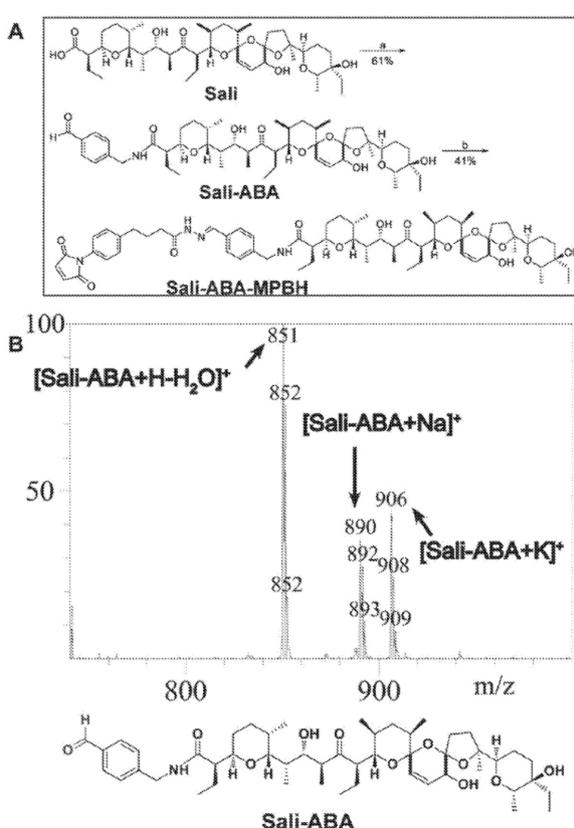
【図 6 - 2】



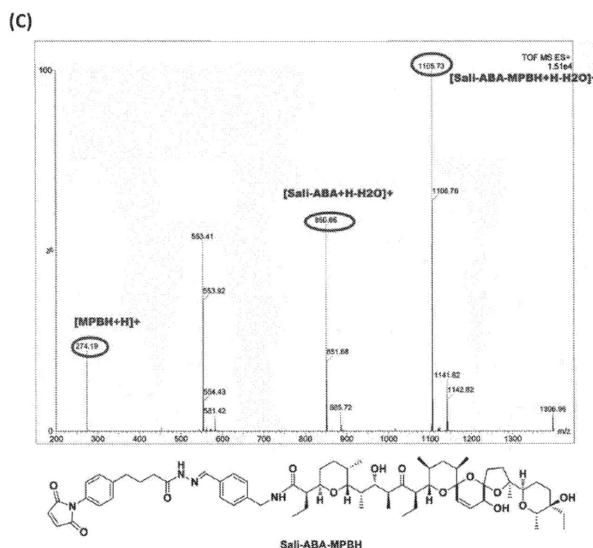
【図7】



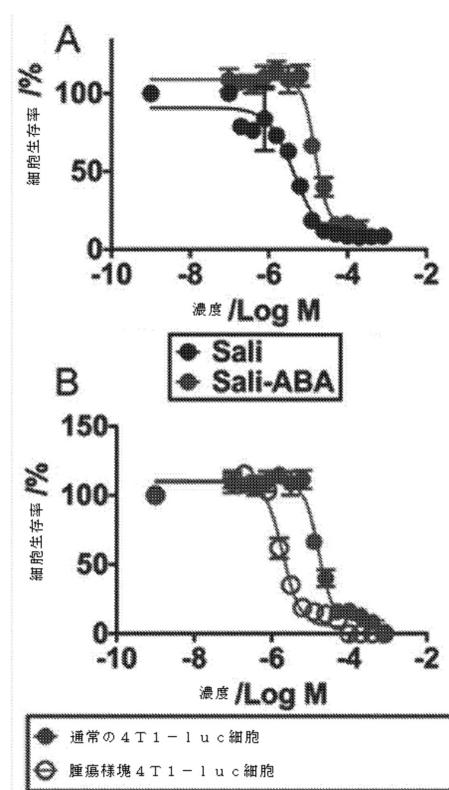
【図8-1】



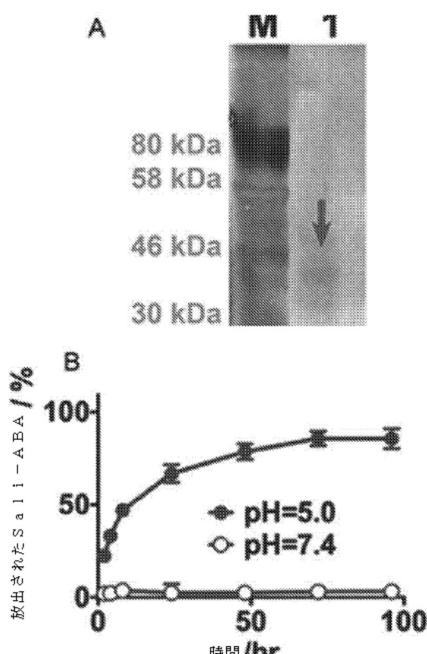
【図 8 - 2】



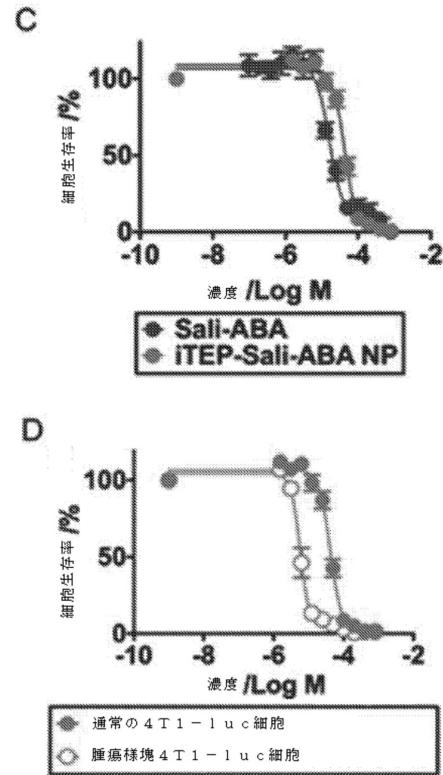
【図 9】



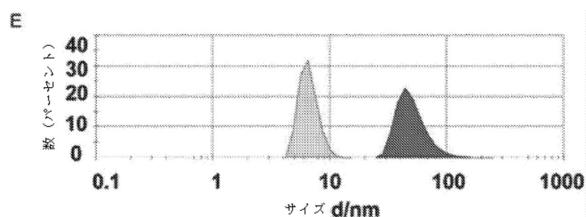
【図 10 - 1】



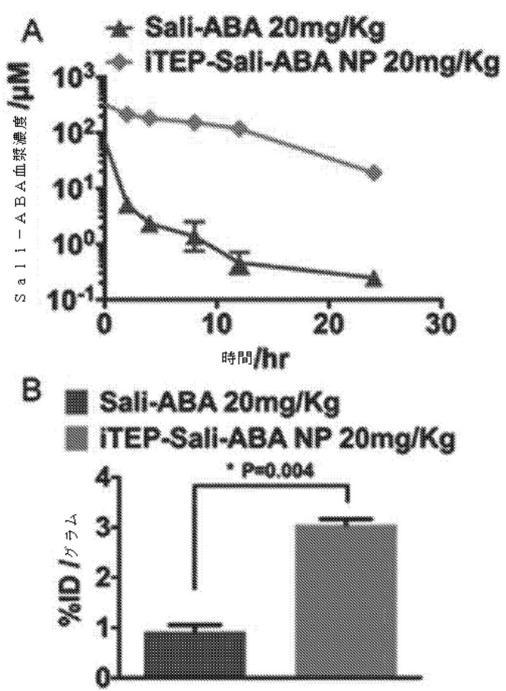
【図 10 - 2】



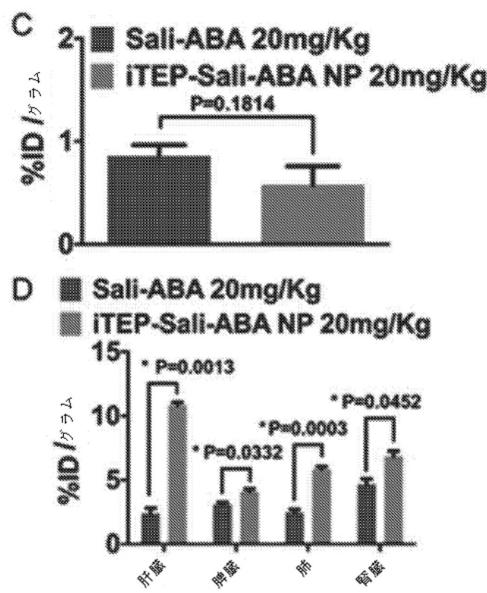
【図 10-3】



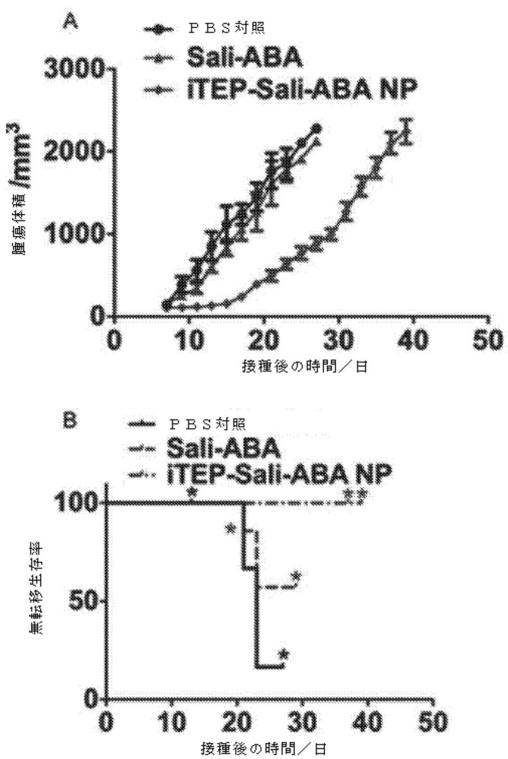
【図 11-1】



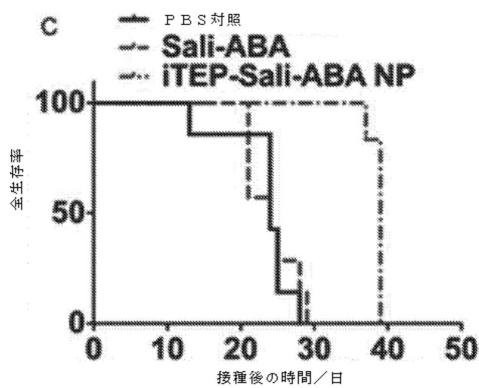
【図 11-2】



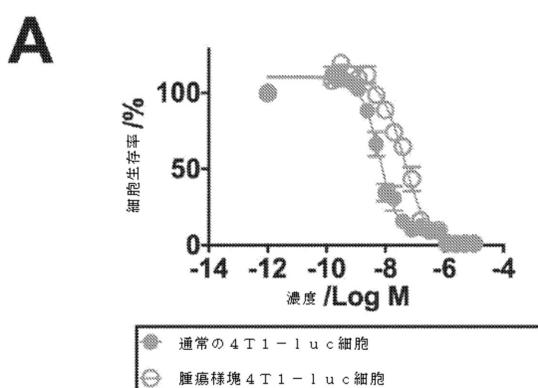
【図 12-1】



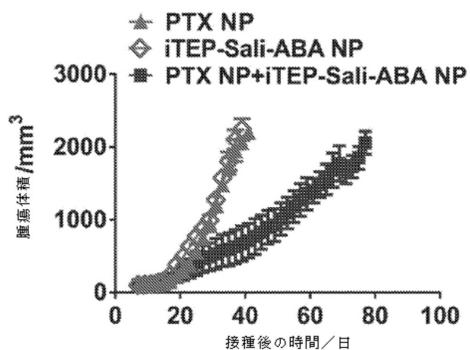
【図 1 2 - 2】



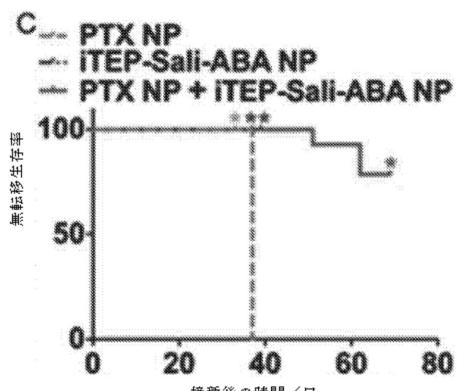
【図 1 3 - 1】



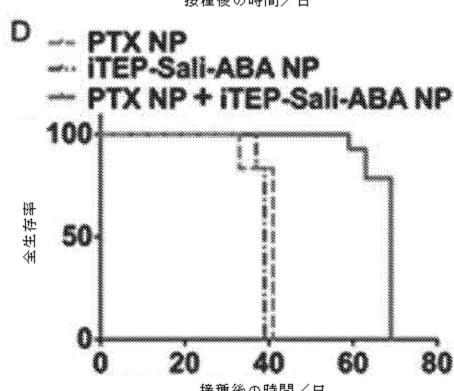
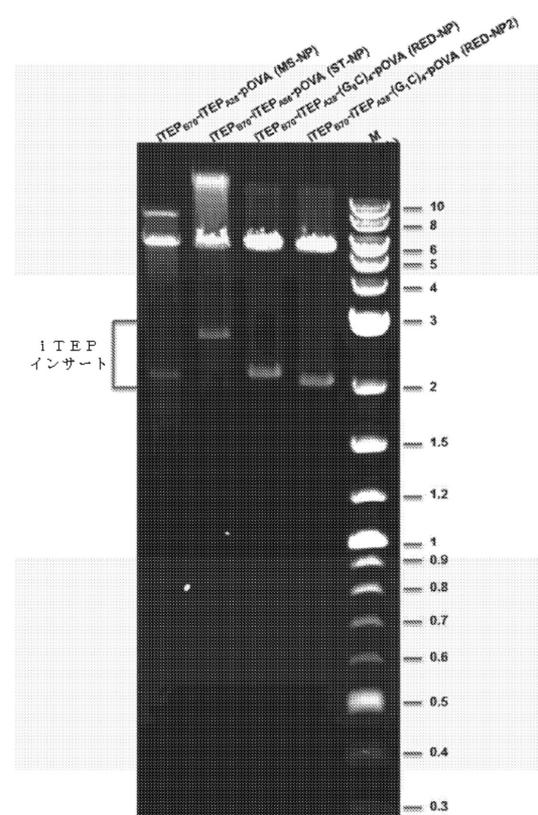
B



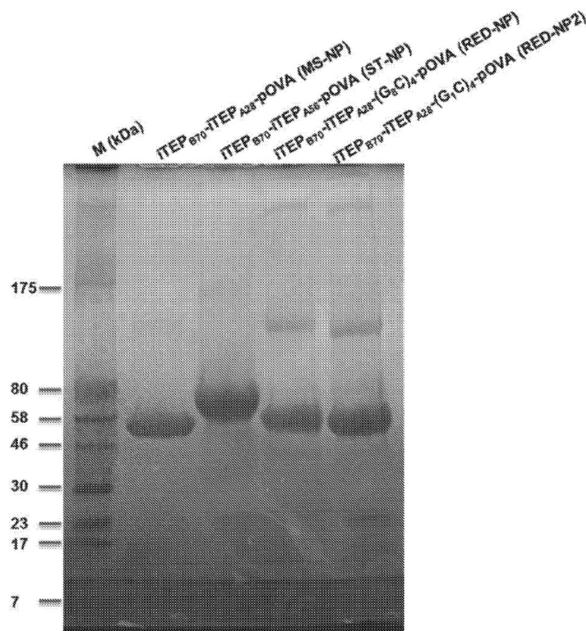
【図 1 3 - 2】



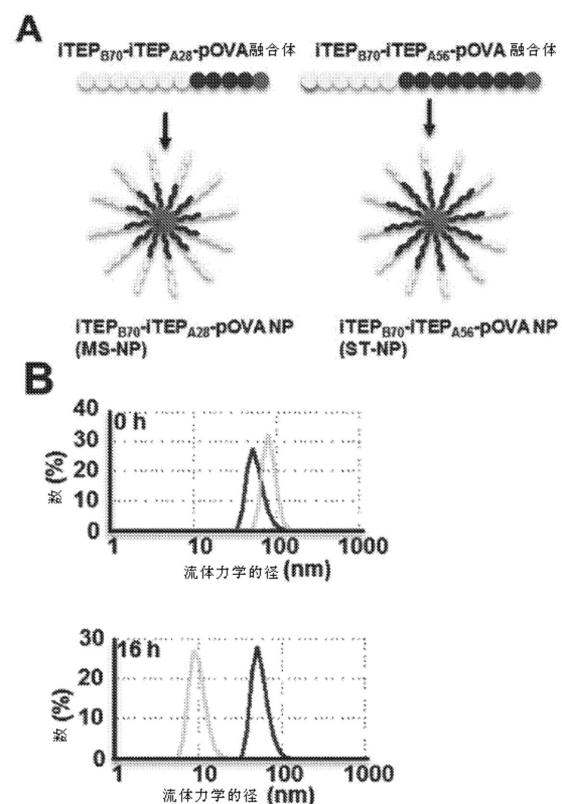
【図 1 4】



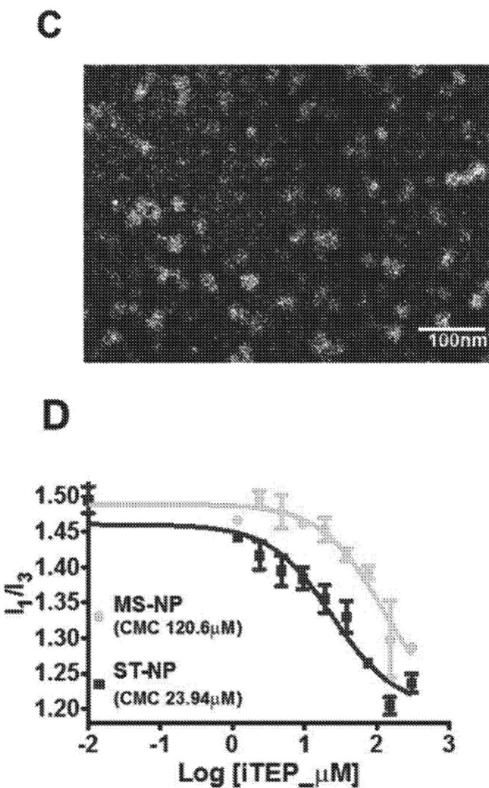
【図15】



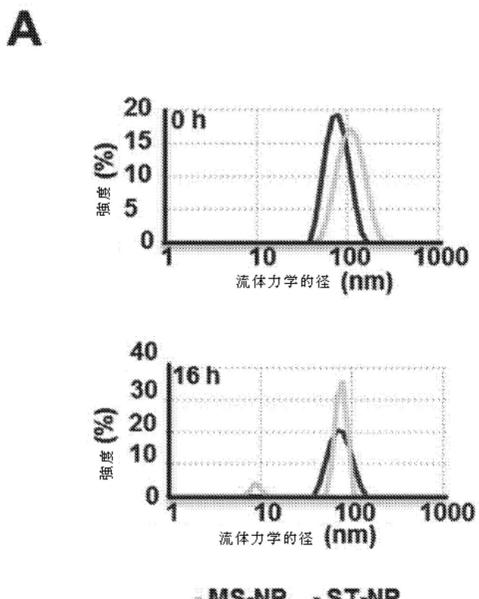
【図 16-1】



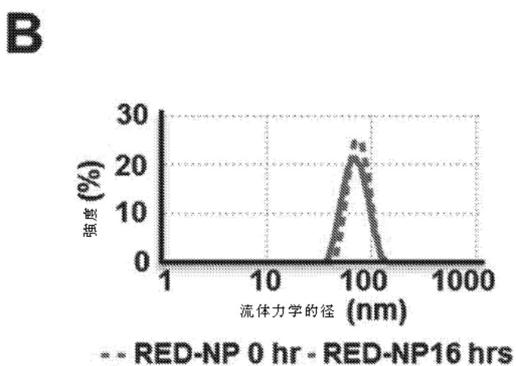
【図 16 - 2】



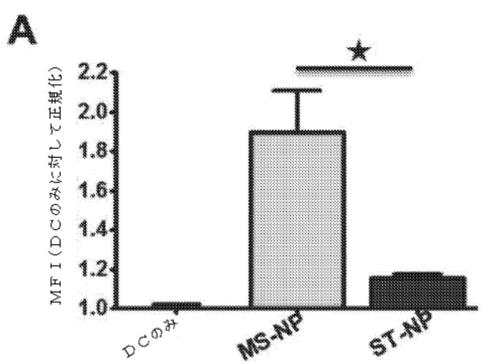
【図17A】



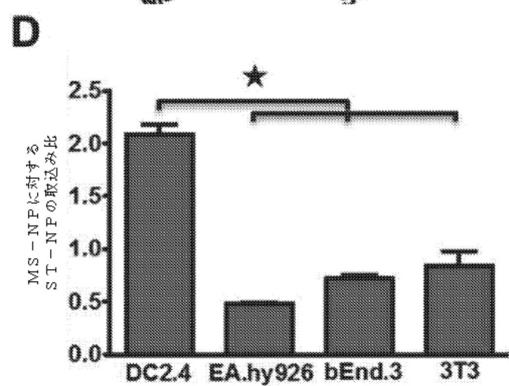
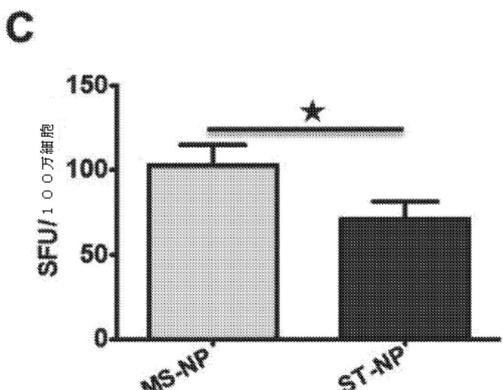
【図 17B】



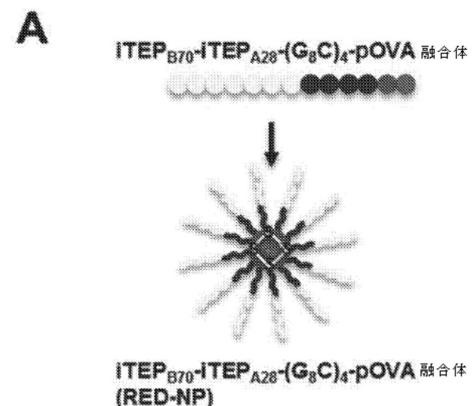
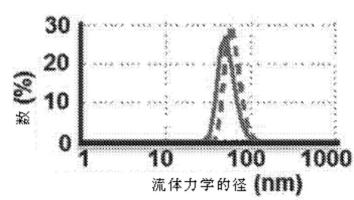
【図 18-1】



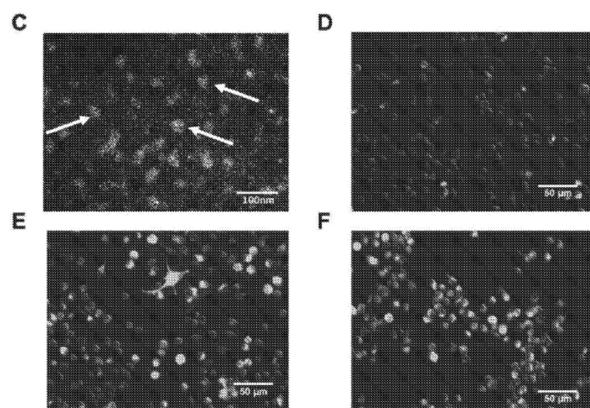
【図 18-2】



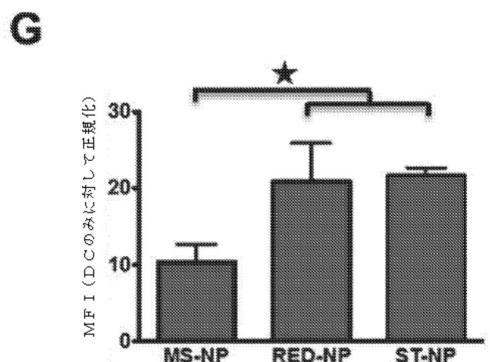
【図 19-1】

**B**

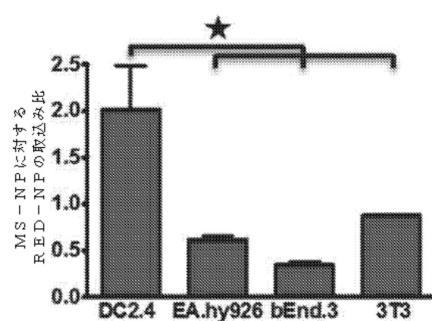
【図 19-2】



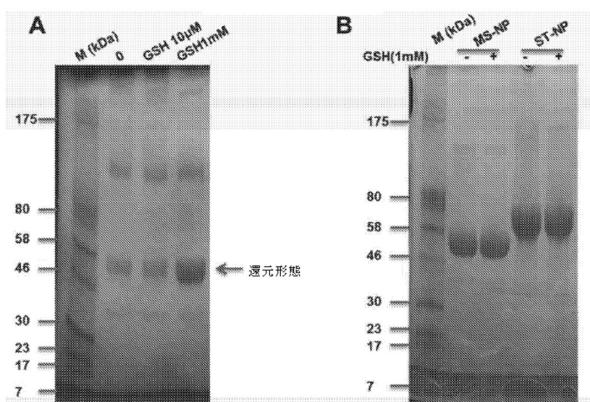
【図 19-3】



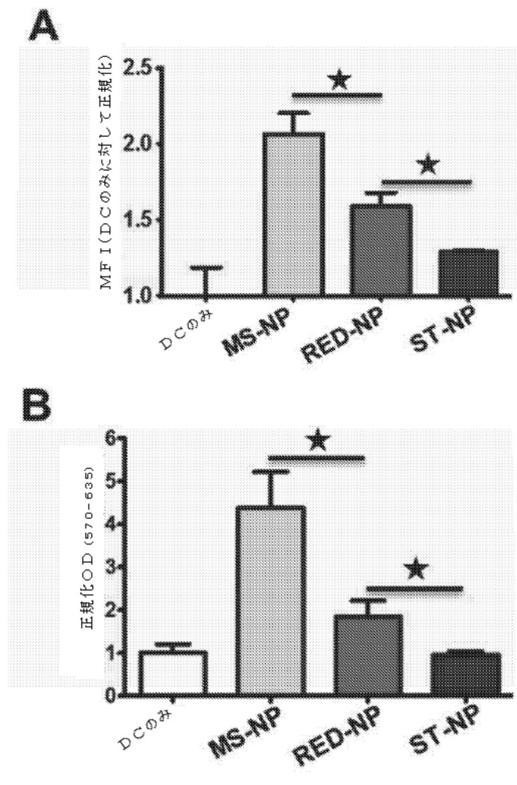
H



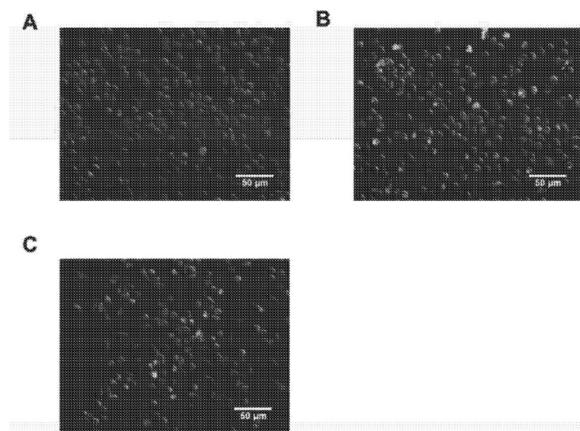
【図 20】



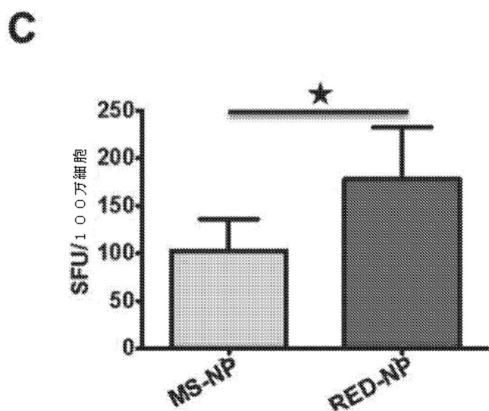
【図 22-1】



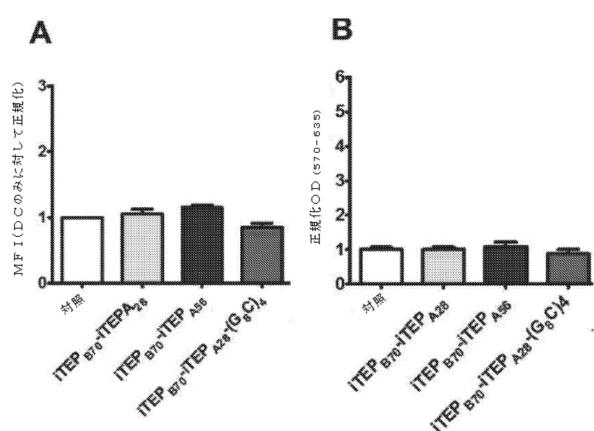
【図 21】



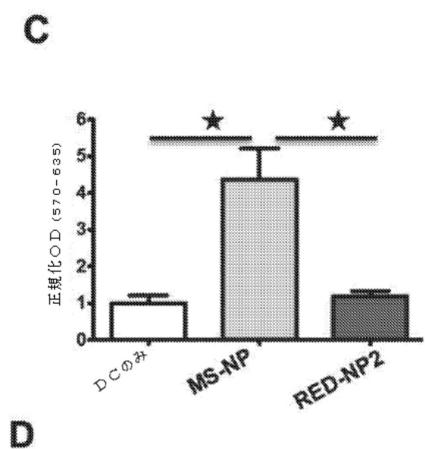
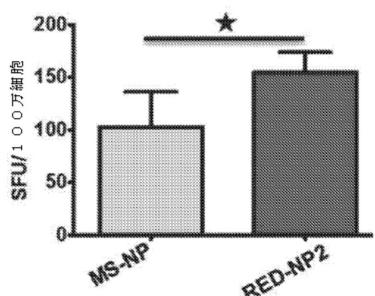
【図 2 2 - 2】



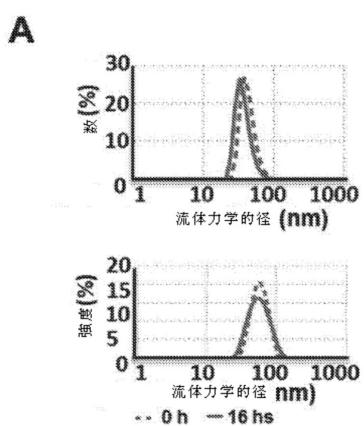
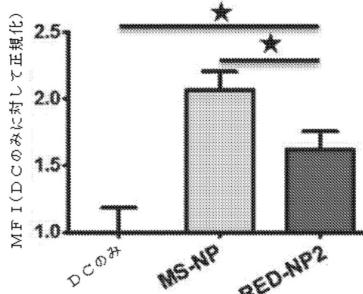
【図 2 3】



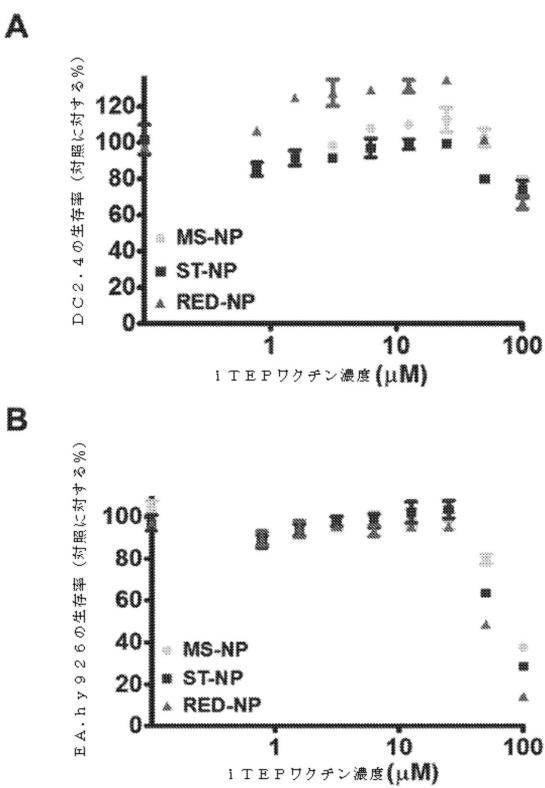
【図 2 4 - 2】

**D**

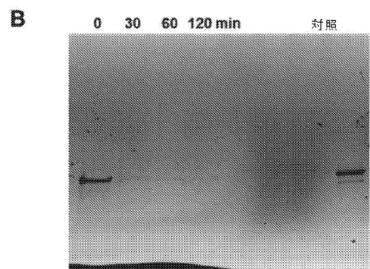
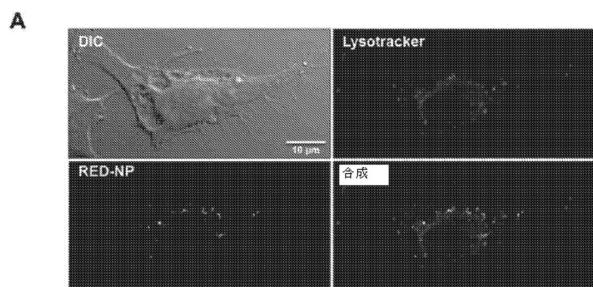
【図 2 4 - 1】

**B**

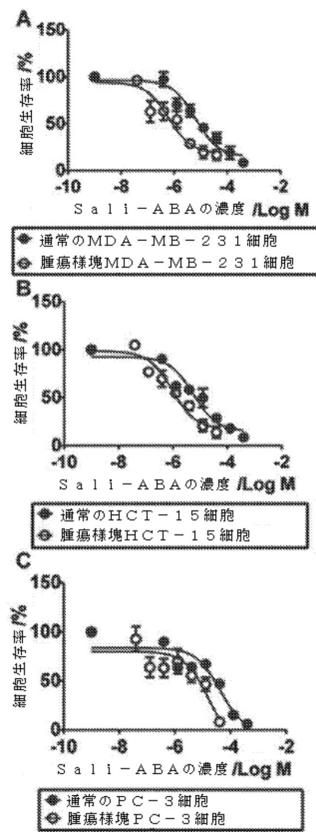
【図 2 5】



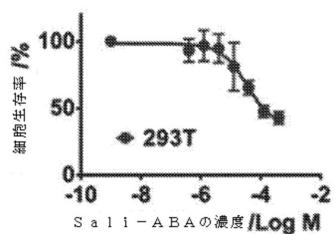
【図26】



【図27】



【図28】



【配列表】

0006924151000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	45/00	(2006.01) A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	39/39	(2006.01) A 6 1 K 39/39
A 6 1 K	39/385	(2006.01) A 6 1 K 39/385
A 6 1 K	38/39	(2006.01) A 6 1 K 38/39
A 6 1 K	47/64	(2017.01) A 6 1 K 47/64
A 6 1 K	35/12	(2015.01) A 6 1 K 35/12
A 6 1 K	31/35	(2006.01) A 6 1 K 31/35
A 6 1 K	31/337	(2006.01) A 6 1 K 31/337

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100156982

弁理士 秋澤 慶

(72)発明者 チエン ミンナン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 2 4 ソルト レイク シティ ラナーク ロード 4 6 4 0

(72)発明者 チョ ヒュン ジン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 6 ソルト レイク シティ イースト ブリックヤード ロード 1 1 2 9 アパートメント 1 7 0 2

(72)発明者 ワン ペン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 1 2 ソルト レイク シティ メディカル プラザ 1 1 2 3

(72)発明者 ドン シュウン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 2 4 ソルト レイク シティ ラナーク ロード 4 6 4 0

(72)発明者 チャオ ペン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 1 2 ソルト レイク シティ メディカル プラザ 1 1 1 1

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 國際公開第98/022577(WO,A1)

國際公開第2015/051001(WO,A1)

ZHAO, P. et al., iTEP Nanoparticle-Delivered Salinomycin Displays an Enhanced Toxicity to Cancer Stem Cells in Orthotopic Breast Tumors, Molecular Pharmaceutics, 2014年, Vol.11, No.8, P.2703-2712

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K A 6 1 K A 6 1 P

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 / W P I D S
(S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q