

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6444417号  
(P6444417)

(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)

(51) Int. Cl.		F I
<b>C 1 2 N</b> 7/00	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00
<b>A 6 1 K</b> 49/00	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 49/00
<b>A 6 1 K</b> 39/42	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/42
<b>A 6 1 P</b> 35/00	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
<b>A 6 1 K</b> 41/00	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 41/00

請求項の数 18 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-543997 (P2016-543997)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月18日 (2014.9.18)  
 (65) 公表番号 特表2016-531591 (P2016-531591A)  
 (43) 公表日 平成28年10月13日 (2016.10.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/056412  
 (87) 国際公開番号 W02015/042325  
 (87) 国際公開日 平成27年3月26日 (2015.3.26)  
 審査請求日 平成29年9月1日 (2017.9.1)  
 (31) 優先権主張番号 61/879,627  
 (32) 優先日 平成25年9月18日 (2013.9.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 516081308  
 オーラ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, ボルトン ストリート 85

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍を診断および処置するためのウイルス様粒子結合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パピローマウイルスキャプシドタンパク質に結合体化された約 50 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、腫瘍標的化ウイルス様粒子であって、前記光感受性分子の細胞傷害性が、赤外線、近赤外線もしくは紫外線への曝露によって活性化される、腫瘍標的化ウイルス様粒子。

【請求項 2】

前記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質 (例えば、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質)である、請求項 1 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 3】

前記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、かつヒトパピローマウイルス (HPV) 16 とも HPV 18 とも HPV に特異的な既存の抗体とも交差反応せず、必要に応じて、前記ウイルス様粒子は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する、請求項 1 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 4】

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質を含むか、または L1 キャプシドタンパク質からなるか、あるいは L1 キャプシドタンパク質と L2 キャプシドタンパク質との組み合わせを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【請求項 5】

前記光感受性分子は、前記キャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化（例えば、前記キャプシドタンパク質のリジン残基に結合体化（例えば、共有結合的アミド結合によって結合体化））され、必要に応じて、前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面（例えば、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカン）への前記ウイルス様粒子の結合を損わない、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記ウイルス様粒子は、約 1 0 0 0 個の光感受性分子を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【請求項 7】

前記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちのいずれか 2 種以上の組み合わせを含む；かつ/またはフタロシアニン色素、ベルテポルフィン分子、およびフタロシアニン色素とベルテポルフィン分子との組み合わせから選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子を含む組成物であって、前記組成物は腫瘍を有する被験体に投与されることを特徴とし、必要に応じて、前記光感受性分子が活性化（例えば、酸素との項間交差を可能にし、それによって細胞傷害性分子を生成するか、またはエネルギー移動を誘導して細胞膜を損傷する波長の光で活性化）されることを特徴とする、組成物。

20

【請求項 9】

パピローマウイルスキャプシドタンパク質に結合体化した約 5 0 ~ 約 1 0 0 0 個の光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を含む組成物であって、前記光感受性分子の細胞傷害性は、赤外線、近赤外線もしくは紫外線への曝露によって活性化され、前記組成物は腫瘍を有する被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 10】

前記光感受性分子が、前記分子を可視にする波長で活性化されるか、または前記分子を細胞傷害性にすることによって、前記腫瘍の細胞を死滅させる波長で活性化されることを特徴とし、必要に応じて、前記光感受性分子は、5 J ~ 1 0 0 J または 5 0 J のエネルギーを送達する赤外線レーザーを用いて活性化されることを特徴とし、必要に応じて、前記レーザーが、約 5 秒間 ~ 約 5 分間印加されることを特徴とし、必要に応じて、前記光感受性分子は、前記ウイルス様粒子を投与してから約 3 0 分 ~ 約 4 8 時間後に活性化されることを特徴とする、請求項 9 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記腫瘍は、眼腫瘍（例えば、硝子体、脈絡膜腔、虹彩、毛様体、強膜、中心窩、網膜、視神経円板もしくは視神経に位置する眼腫瘍）である；かつ/または前記腫瘍は、肺、胸膜、肝臓、膵臓、胃、食道、結腸、乳房、卵巣、前立腺、脳、髄膜、精巣、腎臓もしくは膀胱に位置する；かつ/または前記腫瘍は、頭部、頸部、子宮頸部、喉頭もしくは皮膚に位置し、ここで、必要に応じて、前記腫瘍は、手術介入なしで接近可能である、請求項 9 または 10 に記載の組成物。

40

【請求項 12】

前記腫瘍は、希少腫瘍、希少疾患腫瘍、または癌性もしくは悪性腫瘍（例えば、転移性、前癌性、異形成性であるか、または悪性転換を示す増殖中の疑わしい細胞を有する腫瘍）である、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ウイルス様粒子が、局所的に、眼内に、硝子体内に、上脈絡膜に、もしくは移植によって、または注射によって（例えば、中空もしくは被覆済みニードル、ミニニードルもしくはマイクロニードルを用いて）投与されることを特徴とする、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

50

前記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質（例えば、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質）である、かつ／あるいは前記キャプシドタンパク質は、L 1 キャプシドタンパク質を含むか、またはL 1 キャプシドタンパク質からなるか、あるいはL 1 キャプシドタンパク質とL 2 キャプシドタンパク質との組み合わせを含む、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルス（HPV） 16、HPV 18 VLP によって誘発される抗体と、もしくはHPV感染によって誘発される既存の抗体と交差反応しないヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、必要に応じて、改変された免疫原性および／もしくは抗原性を有する、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 16】

前記光感受性分子は、前記ウイルス様粒子のキャプシドタンパク質に結合体化（例えば、前記キャプシドタンパク質のリジン残基に結合体化）（例えば、共有結合的に（例えば、共有結合的アミド結合によって）結合体化）され、必要に応じて、前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面（例えば、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカン）への前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記ウイルス様粒子は、約 100 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、請求項 9 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 18】

前記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちいずれか 2 種以上の組み合わせを含み、必要に応じて、前記光感受性分子は、フタロシアニン色素、ベルテポルフィン分子およびフタロシアニン色素とベルテポルフィン分子との組み合わせから選択される、請求項 9 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（関連出願）

30

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2013年9月18日に出願された米国仮出願第 61 / 879 , 627 号（これは、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

（発明の分野）

この開示は、腫瘍診断および治療剤の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

（発明の背景）

多くの処置が癌に関して利用可能であるが、癌の多くの形態は、不治のままであるか、処置不能のままであるか、または標準治療に対して抵抗性になり、多くの癌に関する有効な処置は望ましくない副作用を有する。眼の癌（例えば、眼内黒色腫および網膜芽細胞腫）は、処置するのが特に困難である。眼内黒色腫と診断された患者は、その腫瘍のサイズに依存して、以下を含むわずかな処置選択肢を有する：（1）外科的処置（例えば、切除、摘出もしくは内容除去）。これらは全て、非常に侵襲性であり、かつ主に眼および視神経の一部の除去を伴い得る（術後に、上記患者は通常、義眼を合わせて調整する）；および（2）プラーク小線源療法（plaque brachytherapy）。放射線療法の 1 タイプであり、ここで放射性シードが片側を覆っている金属薄片（例えば、金）は、上記シードを上記腫瘍に向けて、眼の外壁に縫い付けられる。上記金属薄片は、処置（これは通常数日間続く）の最後に除去される。重篤な放射能関連合併症としては、白内障

40

50

の発生（これは、最も一般的であり、硝子体出血が後に起こる）が挙げられる。他の合併症としては、ドライアイ、角膜炎、放射線誘発性虹彩新生血管形成、血管新生緑内障、放射線誘発性網膜症、放射線誘発性視神経障、上強膜沈着（episcleral deposits）、強膜壊死および/もしくは外眼筋変性（extraocular muscle alteration）が挙げられる。放射線網膜症は、ブランク小線源療法で処置した患者のうちの10～63%において起こると報告されており、処置から黄斑症発生までの平均時間は、約25.6ヶ月である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

（発明の要旨）

本開示は、少なくとも一部分は、腫瘍細胞を検出および/もしくは選択的に標的化するための、例えば、癌（例えば、眼の癌）の診断および/もしくは処置のための、方法および組成物を提供する。いくつかの場合には、本明細書で提供される方法および組成物は、健康な細胞に損傷を与えることなく癌性の腫瘍細胞を選択的に死滅させるために使用され得る。例えば、光感受性分子を含む（例えば、光感受性分子に結合体化される）ウイルス様ナノ粒子は、腫瘍細胞へと選択的に送達され得、光に曝すことによって光活性化され得る。光活性化された場合、光感受性分子は光子を吸収し、その吸収されたエネルギーは、毒性（例えば、細胞傷害性）を引き起こす分子変化を生じる。「光感受性ウイルス様ナノ粒子」（本明細書では「光感受性ウイルス様粒子」ともいわれる）とは、光感受性分子に結合体化されたウイルス様ナノ粒子をいう。驚くべきことに、ウイルス様ナノ粒子への光感受性分子の結合体化は、上記ナノ粒子の組織/腫瘍向性（例えば、特定の宿主腫瘍組織もしくは腫瘍細胞に対する上記ウイルス様ナノ粒子の特異性）に干渉しない。

【0005】

本開示のウイルス様ナノ粒子（ウイルス様粒子（VLP）ともいわれる）は、一般に、L1キャプシドタンパク質、またはL1キャプシドタンパク質とL2キャプシドタンパク質との組み合わせからアセンブリされ、そして上記光感受性分子は、いくつかの実施形態において、上記ウイルス様ナノ粒子を形成するキャプシドタンパク質に結合体化される。従って、本開示の種々の局面は、キャプシドタンパク質に結合体化された光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様ナノ粒子を提供する。

【0006】

本開示のいくつかの局面はまた、1粒子あたり、約50～約500個、約50～約600個、約50～約700個、約50～約800個、約50～約900個、もしくは約50～約1000個の光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を提供する。いくつかの実施形態において、腫瘍標的化ウイルス様粒子は、1粒子あたり、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個もしくは約1000個の光感受性分子を含む。いくつかの実施形態において、腫瘍標的化ウイルス様粒子は、1粒子あたり、500個の光感受性分子もしくは1000個の光感受性分子を含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、上記キャプシドタンパク質は、パピローマウイルスキャプシドタンパク質である。例えば、いくつかの実施形態において、上記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質（例えば、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質）である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、かつヒトパピローマウイルス（HPV）16、HPV18、もしくはHPVに対して特異的な既存の抗体と交差反応しない。

【0008】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、パピローマL1もしくはL1/L2タンパク質（例えば、ヒト、ウシ、もしくは他の種の）を含む。いくつかの実施形態において、上記L1もしくはL1/L2 VLPは、ヒトパピローマウイルス（HPV）

10

20

30

40

50

16、HPV 18に対する中和抗体、または他のHPVに対して特異的な既存の抗体と交差反応しない。しかし、いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、HPV 16のヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、キャプシドタンパク質の表面露出ペプチドに結合体化される。

【0010】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、L1キャプシドタンパク質、またはL1キャプシドタンパク質とL2キャプシドタンパク質との組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、L1キャプシドタンパク質からなる。

10

【0011】

いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子は、BPV L1キャプシドタンパク質（例えば、配列番号2）、BPV L1キャプシドタンパク質とBPV L2キャプシドタンパク質との組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子は、HPV L1キャプシドタンパク質、またはHPV L1キャプシドタンパク質とHPV L2キャプシドタンパク質との組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、上記HPV L1キャプシドタンパク質は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する改変体HPV 16/31 L1タンパク質（例えば、配列番号1）である。従って、いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子は、改変体HPV 16/31 L1キャプシドタンパク質、または改変体HPV 16/31 L1キャプシドタンパク質（例えば、配列番号1）とHPV L2キャプシドタンパク質との組み合わせを含むか、または上記からなる。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子の上記キャプシドタンパク質は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する。このようなキャプシドタンパク質の非限定的例は、HPV 16/31 L1キャプシドタンパク質（例えば、配列番号1）である。改変されたキャプシドタンパク質を含むウイルス様粒子は、野生型ウイルス様粒子と比較して、本明細書では、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有するウイルス様粒子といわれ得る。

【0013】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、キャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記キャプシドタンパク質のアミノ酸に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記キャプシドタンパク質のアミノ酸のアミン基（例えば、一級脂肪族アミン）に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記キャプシドタンパク質のリジン残基のアミン基（例えば、リジンの側鎖アミン）に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記キャプシドタンパク質のアルギニンおよび/もしくはヒスチジン残基のアミン基に結合体化される。本開示は、光感受性分子を、アミン基を含むリジンおよび他のアミノ酸に結合体化するための方法を提供する。

30

40

【0014】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面への上記ウイルス様粒子の結合を損なわない（例えば、妨害も干渉も阻害もしない）。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンもしくは他のポリサッカリドへの上記ウイルス様粒子の結合を損なわない（例えば、妨害も干渉も阻害もしない）。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、約10～約1000個の光感受性分子を含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、約50～約1000個の光感受性分子を含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、約1

50

00 ~ 約1000個の光感受性分子を含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、約100 ~ 約500個の光感受性分子を含む。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、約500 ~ 約1000個の光感受性分子、またはより多くを含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、L1キャプシドタンパク質、L2キャプシドタンパク質、またはL1キャプシドタンパク質とL2キャプシドタンパク質との組み合わせのリジン残基もしくは他のアミノ酸残基に結合体化される約10 ~ 約1000個の光感受性分子を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、赤外線、近赤外線もしくは紫外線によって活性化される。光感受性分子は、上記分子が光子を吸収し、その吸収されたエネルギーが毒性を引き起こす分子変化を生じる場合に、「活性化」されると考えられる（本明細書中、他の箇所記載されるとおり）。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちのいずれか2種以上の組み合わせを含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、ポルフィリン分子である。本開示に従って使用するためのポルフィリン分子の例としては、HpD（ヘマトポルフィリン誘導体）、HpDベースのBPD（ベンゾポルフィリン誘導体）、ALA（5-アミノレブリン酸）およびテキサフィリン（*texaphyrin*）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記ポルフィリン分子は、ベルテポルフィン（ビスダイン（登録商標））である。

【0020】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、クロロフィル分子である。本開示に従って使用するためのクロロフィル分子の例としては、クロリン、プルプリンおよびバクテリオクロリン（*bacteriochlorin*）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、色素である。本開示に従って使用するための色素の例としては、フタロシアニンおよびおよびナフトロシアニン（*naphthalocyanine*）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

いくつかの実施形態において、上記フタロシアニン色素は、蛍光分子でありかつ近赤外線分子である。例えば、いくつかの実施形態において、上記フタロシアニン色素は、IR700色素（例えば、IRDye（登録商標）700DX、LI-COR（登録商標））である。IR700色素は、代表的には680nm ~ 800nmの間の近赤外線（NIR）スペクトルにある吸収波長および発光波長を有する蛍光色素である。NIRスペクトルにある吸収波長および発光波長を有する他の蛍光色素は、本明細書で提供される。

【0023】

いくつかの実施形態において、光感受性分子は、フタロシアニン色素（例えば、IR700色素（例えば、IRDye（登録商標）700DX））、ポルフィリン分子（例えば、ベルテポルフィン（例えば、ビスダイン（登録商標）））およびフタロシアニン色素とポルフィリン分子との組み合わせから選択される。

【0024】

本開示のいくつかの局面は、腫瘍を有する被験体に、上記ウイルス様粒子、もしくは本明細書で提供される光感受性ウイルス様粒子のいずれか一方を投与する工程を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、ウイルス様粒子の上記光感受

10

20

30

40

50

性分子を、上記光感受性分子の可視化を可能にする光の波長で活性化する工程を包含する。従って、いくつかの実施形態において、本開示の光感受性分子は、画像化薬剤および/もしくは診断薬剤として使用される。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記光感受性分子を、上記分子を細胞傷害性にする光の波長で活性化する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記光感受性分子を、直接的かつ不可逆的な細胞損傷を引き起こして、壊死をもたらす、上記腫瘍細胞内でエネルギー移動を生じる光の波長で活性化する工程を包含する。従って、いくつかの実施形態において、本開示の光感受性分子は、治療剤および/もしくは予防剤として使用される。

【0025】

本開示のいくつかの局面は、腫瘍を有する被験体に、キャプシドタンパク質に結合体化された光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与する工程を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記ウイルス様粒子の光感受性分子を、上記分子を可視にする波長で活性化する工程を包含する。すなわち、上記光感受性分子は、光で励起させた際に再発光する。いくつかの実施形態において、上記方法は、光感受性分子を、上記分子を細胞傷害性にし、それによって上記腫瘍の細胞を死滅させる波長で活性化する工程を包含する。すなわち、上記光感受性分子は、光で励起させた際に分子変化を受けて、細胞に対して毒性になる上記光感受性分子を生じる。

【0026】

本開示のいくつかの局面は、腫瘍を有する被験体に、約50～約1000個、約50～500個、もしくは約500～1000個の光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与する工程を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、腫瘍を有する被験体に、約100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個もしくはより多くの光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、光感受性分子を、上記分子を可視にする波長で活性化する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、光感受性分子を、上記分子を細胞傷害性にし、それによって上記腫瘍の細胞を死滅させる波長で活性化する工程を包含する。

【0027】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、レーザー活性化される。いくつかの実施形態において、上記レーザーは、赤外線レーザー、近赤外線レーザーもしくは紫外線レーザーである。いくつかの実施形態において、上記赤外線レーザーは、5ジュール(J)～100J(もしくはJ/cm<sup>2</sup>) (例えば、5J、6J、7J、8J、9J、10J、11J、12J、13J、14J、15J、16J、17J、18J、19J、20J、21J、22J、23J、24J、25J、26J、27J、28J、29J、30J、31J、32J、33J、34J、35J、36J、37J、38J、39J、40J、41J、42J、43J、44J、45J、46J、47J、48J、49J、50J、51J、52J、53J、54J、55J、56J、57J、58J、59J、60J、61J、62J、63J、64J、65J、66J、67J、68J、69J、70J、71J、72J、73J、74J、75J、76J、77J、78J、79J、80J、81J、82J、83J、84J、85J、86J、87J、88J、89J、90J、91J、92J、93J、94J、95J、96J、97J、98J、99Jもしくは100J(もしくはJ/cm<sup>2</sup>))である。いくつかの実施形態において、上記レーザーは、約5秒～約5分にわたって印加される。

【0028】

いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記ウイルス様粒子を被験体に投与してから約30分～約48時間後に活性化される。例えば、上記光感受性分子は、上記ウイルス様粒子を被験体に投与してから30分後に活性化され得る。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記ウイルス様粒子を被験体に投与してから1時間、2時間(h)、3h、4h、5h、6h、7h、8h、9h、10h、11h、12h、13h、14h、15h、16h、17h、18h、19h、20h、21h、22h、2

10

20

30

40

50

3 h もしくは 24 h 後に活性化される。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記ウイルス様粒子を被験体に投与してから 1 日、2 日もしくは 3 日後に活性化される。

【0029】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、眼腫瘍もしくは眼へと転移した腫瘍である。例えば、いくつかの実施形態において、上記眼腫瘍は、硝子体、脈絡膜腔 (choroidal space)、虹彩、毛様体、強膜、中心窩、網膜、視神経円板もしくは視神経に位置する。

【0030】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、肺、胸膜、肝臓、膵臓、胃、食道、結腸、乳房、卵巣、前立腺、脳、髄膜、精巣、消化管、腎臓もしくは膀胱に位置する。

10

【0031】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、手術介入なしで接近可能である。

【0032】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、頭部、頸部、子宮頸部、喉頭もしくは皮膚に位置する。

【0033】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、希少疾患 (orphan or rare disease) である。

【0034】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、癌性である。いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、転移性である。いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、前癌性もしくは異形成性である。

20

【0035】

いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、注射によって投与される。例えば、上記ウイルス様粒子は、眼内に、硝子体の中に、もしくは静脈内に注射によって投与され得る。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、中空もしくは被覆済みのニードル、ミニニードルもしくはマイクロニードルで投与される。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、局所投与される。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、移植によって投与される。

30

【0036】

いくつかの実施形態において、上記キャプシドタンパク質は、パピローマウイルスキャプシドタンパク質である。例えば、いくつかの実施形態において、上記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質 (例えば、ウシパピローマウイルス (BPV) キャプシドタンパク質) である。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、かつヒトパピローマウイルス (HPV) 16 とも HPV 18 とも HPV に対して特異的な既存の抗体とも交差反応しない。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルス タイプ 16 キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、上記 VLP は、ヒトパピローマウイルス (HPV) 16、HPV 18 VLP に対して特異的な抗体もしくは HPV 感染によって特異的に誘発される既存の抗体を結合しない。

40

【0037】

本開示のいくつかの局面は、被験体において、腫瘍 (例えば、眼腫瘍および悪性母斑 (malignant nevi)) を検出するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体に (例えば、上記被験体の眼に)、本明細書で提供されるウイルス様粒子 (例えば、光感受性分子 (例えば、蛍光色素もしくは赤外色素) を含むウイルス様粒子) のうちのいずれか 1 種を投与する工程、および上記腫瘍の位置を検出する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体 (例えば、上記被験体の眼) をレーザー (例えば、紫外線レーザーもしくは赤外線レーザー) で照明することによって、上記腫瘍の

50

位置を検出する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記ウイルス様粒子を投与する前に、腫瘍を有すると疑われる被験体を同定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、光感受性ウイルス様粒子を上記被験体の腫瘍に、または腫瘍を有するかもしくは有すると疑われる被験体に投与することによって、上記腫瘍を診断および/もしくは処置する工程を包含する。

【0038】

本開示の他の局面は、非癌性の（例えば、正常な、健康な）細胞の増殖もしくは生存性を阻害することなく、癌性細胞の増殖を選択的に阻害するかもしくは死滅させるための方法を提供し、上記方法は、被験体の腫瘍に（例えば、上記被験体の眼腫瘍に）、本明細書で提供される腫瘍標的化ウイルス様粒子のうちのいずれか1種（例えば、光感受性分子（例えば、赤外色素）を含むウイルス様粒子）を投与する工程、および上記腫瘍の癌性細胞を、上記腫瘍を赤外線レーザーに（例えば、約660nm～740nmの波長および少なくとも8Jの線量で）、有効に供することによって照射する工程を包含する。

10

【0039】

いくつかの実施形態において、本開示は、パピロームウイルスL1タンパク質（例えば、ウシパピロームウイルスL1タンパク質）に結合体化された光感受性分子を含むウイルス様ナノ粒子（ウイルス様粒子ともいわれる）を提供する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様ナノ粒子は、直径20～60ナノメートル（例えば、10nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nmもしくは60nm）である。いくつかの実施形態において、ウイルス様ナノ粒子は、300～500のL1（例えば、BPV L1）キャプシドタンパク質、例えば、360のL1キャプシドタンパク質（例えば、正二十面体対称性に基いて）を含む。いくつかの実施形態において、ウイルス様ナノ粒子は各々、約300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490もしくは500のL1（例えば、BPV L1）キャプシドタンパク質を含むことは、認識されるべきである。しかし、いくつかの実施形態において、ウイルス様ナノ粒子は、300未満のL1（例えば、BPV L1）キャプシドタンパク質を含む。

20

【0040】

いくつかの実施形態において、本開示は、100～1000個の光感受性分子（例えば、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個もしくは1000個の分子）に共有結合的に結合体化されたウシパピロームウイルス様ナノ粒子を提供する。いくつかの実施形態において、上記ウシパピロームウイルス（BPV）ウイルス様ナノ粒子のキャプシドタンパク質は、BPV L1キャプシドタンパク質、またはBPV L1キャプシドタンパク質とBPV L2キャプシドタンパク質との組み合わせを含むか、またはこれらからなる。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記ウイルス様ナノ粒子に（もしくは上記ウイルス様ナノ粒子のキャプシドタンパク質に）、上記光感受性分子の中のエステル基と、上記キャプシドタンパク質の中のアミン基とを反応させ、それによってアミド結合を形成することによって形成される共有結合を通じて結合体化される。従って、いくつかの実施形態において、本開示のウイルス様ナノ粒子のキャプシドタンパク質は、光感受性分子にアミド結合によって結合体化される。

30

40

【0041】

いくつかの実施形態において、本開示は、300～500のBPV L1キャプシドタンパク質および/もしくは直径20～60nmを含むウイルス様ナノ粒子を提供し、そのうちの少なくとも一部（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%）は、（例えば、アミド結合を通じて）1～5個の（例えば、1個、2個、3個、4個もしくは5個の）光感受性分子（例えば、IR700色素（例えば、IRDye（登録商標）700DX））に共有結合的に結合体化される。本開示はまた、ウイルス様ナノ粒子を生成するための方法および診断剤、治療剤もし

50

くは予防剤としてウイルス様ナノ粒子を被験体に投与するための方法を提供する。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

キャプシドタンパク質に結合体化された光感受性分子を含む、腫瘍標的化ウイルス様粒子。

(項目 2)

前記キャプシドタンパク質は、パピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 1 に記載のウイルス様粒子。

(項目 3)

前記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 2 に記載のウイルス様粒子。

10

(項目 4)

前記非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質は、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 3 に記載のウイルス様粒子。

(項目 5)

前記ウイルス様は、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、かつヒトパピローマウイルス (HPV) 16 とも HPV 18 とも HPV に特異的な既存の抗体とも交差反応しない、項目 2 に記載のウイルス様粒子。

(項目 6)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質を含む、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

20

(項目 7)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質と L2 キャプシドタンパク質との組み合わせを含む、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 8)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質からなる、項目 7 に記載のウイルス様粒子。

(項目 9)

前記ウイルス様粒子は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

30

(項目 10)

前記光感受性分子は、前記キャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化される、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 11)

前記光感受性分子は、前記キャプシドタンパク質のリジン残基に結合体化される、項目 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 12)

前記光感受性分子は、共有結合的アミド結合によって前記キャプシドタンパク質に結合体化される、項目 10 または 11 に記載のウイルス様粒子。

(項目 13)

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面への前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

40

(項目 14)

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンへの前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 13 に記載のウイルス様粒子。

(項目 15)

前記ウイルス様粒子は、約 10 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 16)

前記ウイルス様粒子は、約 50 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、項目 15 に記載

50

のウイルス様粒子。

(項目 17)

前記ウイルス様粒子は、約 100 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、項目 16 に記載のウイルス様粒子。

(項目 18)

前記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちのいずれか 2 種以上の組み合わせを含む、項目 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 19)

前記光感受性分子は、赤外線、近赤外線もしくは紫外線によって活性化される、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

10

(項目 20)

前記光感受性分子は、フタロシアニン色素、ベルテポルフィン分子、およびフタロシアニン色素とベルテポルフィン分子との組み合わせから選択される、項目 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 21)

約 50 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、腫瘍標的化ウイルス様粒子。

(項目 22)

前記光感受性分子は、パピローマウイルスキャプシドタンパク質であるキャプシドタンパク質に結合体化される、項目 21 に記載のウイルス様粒子。

20

(項目 23)

前記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 22 に記載のウイルス様粒子。

(項目 24)

前記非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質は、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 23 に記載のウイルス様粒子。

(項目 25)

前記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含み、かつヒトパピローマウイルス (HPV) 16 とも HPV 18 とも HPV に特異的な既存の抗体とも交差反応しない、項目 22 に記載のウイルス様粒子。

30

(項目 26)

前記光感受性分子は、前記ウイルス様粒子のキャプシドタンパク質に結合体化される、項目 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 27)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質を含む、項目 26 に記載のウイルス様粒子。

(項目 28)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質と L2 キャプシドタンパク質との組み合わせを含む、項目 26 または 27 に記載のウイルス様粒子。

(項目 29)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質からなる、項目 28 に記載のウイルス様粒子。

40

(項目 30)

前記ウイルス様粒子は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する、項目 21 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 31)

前記光感受性分子は、キャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化される、項目 22 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 32)

前記光感受性分子は、前記キャプシドタンパク質のリジン残基に結合体化される、項目

50

2 2 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

( 項目 3 3 )

前記光感受性分子は、共有結合的アミド結合によって前記キャプシドタンパク質に結合体化される、項目 3 1 または 3 2 に記載のウイルス様粒子。

( 項目 3 4 )

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面への前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 2 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

( 項目 3 5 )

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンへの前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 3 4 に記載のウイルス様粒子。

10

( 項目 3 6 )

前記ウイルス様粒子は、約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0 個の光感受性分子を含む、項目 2 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

( 項目 3 7 )

前記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちのいずれか 2 種以上の組み合わせを含む、項目 2 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

( 項目 3 8 )

前記光感受性分子は、赤外線、近赤外線もしくは紫外線によって活性化される、項目 2 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

20

( 項目 3 9 )

前記光感受性分子は、フタロシアニン色素、ベルテポルフィン分子およびフタロシアニン色素とベルテポルフィン分子との組み合わせから選択される、項目 2 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

( 項目 4 0 )

腫瘍を有する被験体に、項目 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子を投与する工程、

を包含する、方法。

( 項目 4 1 )

光感受性分子を活性化する工程をさらに包含する、項目 4 0 に記載の方法。

30

( 項目 4 2 )

酸素との項間交差を可能にし、それによって細胞傷害性分子を生成するか、またはエネルギー移動を誘導して細胞膜を損傷する光の波長で、前記光感受性分子を活性化する工程をさらに包含する、項目 4 0 または 4 1 に記載の方法。

( 項目 4 3 )

腫瘍を有する被験体に、キャプシドタンパク質に結合体化した光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与する工程、

を包含する、方法。

( 項目 4 4 )

腫瘍を有する被験体に、約 5 0 ~ 約 1 0 0 0 個の光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与する工程、

40

を包含する、方法。

( 項目 4 5 )

光感受性分子を、前記分子を可視にする波長で活性化する工程をさらに包含する、項目 4 3 または 4 4 に記載の方法。

( 項目 4 6 )

光感受性分子を、前記分子を細胞傷害性にする波長で活性化し、それによって、前記腫瘍の細胞を死滅させる工程をさらに包含する、項目 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 4 7 )

50

前記光感受性分子は、レーザー活性化される、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記レーザーは、赤外線レーザー、近赤外線レーザーもしくは紫外線レーザーである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記赤外線レーザーによって送達されるエネルギーは、5 J ~ 100 J である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記赤外線レーザーによって送達されるエネルギーは、50 J である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記レーザーは、約 5 秒間 ~ 約 5 分間印加される、項目 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記光感受性分子は、前記ウイルス様粒子を投与してから約 30 分 ~ 約 48 時間後に活性化される、項目 4 3 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記腫瘍は、眼腫瘍である、項目 4 3 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記眼腫瘍は、硝子体、脈絡膜腔、虹彩、毛様体、強膜、中心窩、網膜、視神経円板もしくは視神経に位置する、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記腫瘍は、肺、胸膜、肝臓、脾臓、胃、食道、結腸、乳房、卵巣、前立腺、脳、髄膜、精巣、腎臓もしくは膀胱に位置する、項目 4 3 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記腫瘍は、手術介入なしで接近可能である、項目 4 3 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記腫瘍は、頭部、頸部、子宮頸部、喉頭もしくは皮膚に位置する、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記腫瘍は、希少疾患である、項目 4 3 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記腫瘍は、癌性もしくは悪性である、項目 4 3 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記腫瘍は、転移性、前癌性、異形成性であるか、または悪性転換を示す増殖中の疑わしい細胞を有する、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記ウイルス様粒子は、注射によって投与される、項目 4 3 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記ウイルス様粒子は、中空もしくは被覆済みニードル、ミニニードルもしくはマイクロニードルで投与される、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記ウイルス様粒子は、局所的に、眼内に、硝子体内に、上脈絡膜に投与される、項目 4 3 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記ウイルス様粒子は、移植によって投与される、項目 4 3 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 5)

10

20

30

40

50

前記キャプシドタンパク質は、パピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 43 ~ 64 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 66)

前記パピローマウイルスキャプシドタンパク質は、非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 65 に記載の方法。

(項目 67)

前記非ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質は、ウシパピローマウイルスキャプシドタンパク質である、項目 66 に記載の方法。

(項目 68)

前記ウイルス様粒子は、ヒトパピローマウイルス (HPV) 16、HPV 18 V L P によって誘発される抗体と、もしくは HPV 感染によって誘発される既存の抗体と交差反応しないヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質を含む、項目 43 ~ 64 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 69)

前記光感受性分子は、前記ウイルス様粒子のキャプシドタンパク質に結合体化される、項目 43 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 70)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質を含む、項目 69 に記載の方法。

(項目 71)

20

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質と L2 キャプシドタンパク質との組み合わせを含む、項目 69 または 70 に記載の方法。

(項目 72)

前記キャプシドタンパク質は、L1 キャプシドタンパク質からなる、項目 71 に記載の方法。

(項目 73)

前記ウイルス様粒子は、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する、項目 43 ~ 72 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 74)

前記光感受性分子は、キャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化される、項目 43 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 75)

前記光感受性分子は、前記キャプシドタンパク質のリジン残基に結合体化される、項目 43 ~ 74 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

(項目 76)

前記光感受性分子は、共有結合的アミド結合によって前記キャプシドタンパク質に結合体化される、項目 74 または 75 に記載のウイルス様粒子。

(項目 77)

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面への前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 43 ~ 76 のいずれか 1 項に記載のウイルス様粒子。

40

(項目 78)

前記光感受性分子は、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンへの前記ウイルス様粒子の結合を損なわない、項目 77 に記載のウイルス様粒子。

(項目 79)

前記ウイルス様粒子は、約 10 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、項目 43、46 ~ 78 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 80)

前記ウイルス様粒子は、約 50 ~ 約 1000 個の光感受性分子を含む、項目 43、46 ~ 79 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 81)

50

前記ウイルス様粒子は、約100～約1000個の光感受性分子を含む、項目43～80のいずれか1項に記載の方法。

(項目82)

前記光感受性分子は、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子、クロロフィル分子、もしくは上記のうちのいずれか2種以上の組み合わせを含む、項目43～81のいずれか1項に記載の方法。

(項目83)

前記光感受性分子は、フタロシアニン色素、ベルテポルフィン分子およびフタロシアニン色素とベルテポルフィン分子との組み合わせから選択される、項目43～82のいずれか1項に記載の方法。

10

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1は、光感受性分子に結合体化されたウイルス様粒子(VLP)を使用して細胞死を誘発するための機構を示す。

【図2】図2は、二価の標的化(例えば、抗体によって)、および多価の標的化(例えば、VLPによって)の比較を示す。

【図3】図3は、細胞へのVLP結合の特異性がヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)相互作用によって媒介され、ヘパリンによって阻害されることを実証するグラフを示す。それはさらに、上記光感受性VLPが腫瘍細胞に結合され、上記細胞が赤外線照射に供される場合にのみ腫瘍細胞の特異的の死滅を示す。

20

【図4】図4は、細胞死が赤外線の線量および送達される上記VLPおよび光感受性分子(例えば、色素)の量に依存することを実証するグラフを示す。

【図5】図5は、IR700に結合体化されたVLP(図中ではPsVと称される)を用いての照射の際に、インビトロ卵巣癌細胞(SKOV-3)死を実証するグラフを示す。

【図6A】図6Aは、コントロールVLPのエレクトロスプレーイオン化飛行時間(ESI-TOF)分析を示す。図6Bは、IR700の1000分子に結合体化されたVLP(図中ではPsVと称される)のESI-TOF分析を示す。

【図6B】図6Aは、コントロールVLPのエレクトロスプレーイオン化飛行時間(ESI-TOF)分析を示す。図6Bは、IR700の1000分子に結合体化されたVLP(図中ではPsVと称される)のESI-TOF分析を示す。

30

【図7】図7A～7Cは、二価薬剤(例えば、抗体)および多価薬剤(例えば、光感受性VLP(VLP結合体ともいわれ、図中ではPsVと称される)の有効性を比較する、ヒト上皮増殖因子レセプター2陰性(HER2<sup>-</sup>)眼内黒色腫細胞株(92.1)の細胞死のグラフを示す。

【図8】図8A～8Cは、二価薬剤(例えば、抗体)および多価薬剤(例えば、光感受性VLP(VLP結合体ともいわれ、図中ではPsVと称される)の有効性を比較する、ヒト上皮増殖因子レセプター2陽性(HER2<sup>+</sup>)卵巣癌細胞株(SKOV-3)の細胞死のグラフを示す。

【図9】図9は、ワクチン誘発性抗HPV16中和抗体が、上記眼内黒色腫細胞株92.1へのBPV\*IR700 VLPの結合をブロックしないことを実証するグラフを示す。

40

【図10A】図10Aは、IRDye(登録商標)700DX NHSエステルの化学構造を示す。図10Bは、反応性カルボキシル基を丸で囲って、ビスダイン(登録商標)の化学構造を示す。

【図10B】図10Aは、IRDye(登録商標)700DX NHSエステルの化学構造を示す。図10Bは、反応性カルボキシル基を丸で囲って、ビスダイン(登録商標)の化学構造を示す。

【図11】図11は、ビスダイン(登録商標)およびVLPの(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド)(EDC)およびスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(スルホ-NHS)媒介性の連結を伴う反応スキームを示

50

す。このスキームにおいて、まる 1 はビスダイン（登録商標）を表し、まる 2 は V L P を表す。所望の最終生成物に対して 2 経路があることに注意のこと。スルホ - N H S の存在は、上記反応を安定化する傾向があり、所望の生成物の生成を増強する。

【図 1 2】図 1 2 は、癌細胞の種々のタイプに結合する H P V 1 6 キャプシドタンパク質、改変体 H P V 1 6 / 3 1 キャプシドタンパク質および B P V 1 キャプシドタンパク質（L 1、もしくは L 1 および L 2 タンパク質）を含むウイルス様ナノ粒子の H S P G 依存性結合の代表的サンプルのヒストグラムを示す。

【図 1 3】図 1 3 A および図 1 3 B は、注射後、1 2 時間での P B S を注射した陰性コントロールマウス、1 2 時間での光感受性ウイルス様ナノ粒子を注射したマウス（# 3 および # 4）、および 2 4 時間での光感受性ウイルス様ナノ粒子を注射したマウス（# 1 および # 2）の明視野（図 1 3 A）および蛍光（図 1 3 B）での切除した腫瘍組織の画像を示す。

10

【図 1 4】図 1 4 は、V L P の静脈内注射の 1 2 時間後および 2 4 時間後に切除したエキソピボ T C - 1 腫瘍サンプル（図 1 3 と同じ腫瘍）における全腫瘍会合ウイルス様ナノ粒子関連蛍光の定量的表示を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、実施例 1 4 の実験デザインの模式図を示す。

【図 1 6】図 1 6 A および図 1 6 B は、光感受性ウイルス様ナノ粒子（図中では N P s と称される）のインピボ投与および皮下の 9 2 . 1 眼内黒色腫（O M）細胞に対する光線量設定（light titration）（細胞生存性を光処理後 2 4 時間で測定した）の後の細胞死のパーセンテージのグラフを示す。

20

【図 1 7 A】図 1 7 A ~ 1 7 C は、図 1 6 A および図 1 6 B に示されるデータの生のヒストグラムを示す。

【図 1 7 B】図 1 7 A ~ 1 7 C は、図 1 6 A および図 1 6 B に示されるデータの生のヒストグラムを示す。

【図 1 7 C】図 1 7 A ~ 1 7 C は、図 1 6 A および図 1 6 B に示されるデータの生のヒストグラムを示す。

【図 1 8】図 1 8（上パネル）は、1 0 0  $\mu$  l の P B S 中の  $2 \times 10^5$  T C - 1 腫瘍細胞を皮下接種し、以下を投与した動物から得られた組織サンプルを示す：（1）処置なし、（2）改変体 H P V 1 6 / 3 1 L 1 タンパク質および H P V L 2 タンパク質からアセンブリし、I R D y e（登録商標）7 0 0 D X で標識した、1 0 0  $\mu$  g ウイルス様ナノ粒子（図中では N P s と称される）[光なし]、（3）5 0 J / c m <sup>2</sup> 光ありでの P B S、（4）5 0 J / c m <sup>2</sup> 光ありでの 2 0 0  $\mu$  g ウイルス様ナノ粒子、（5）5 0 J / c m <sup>2</sup> 光ありでの 1 0 0  $\mu$  g ウイルス様ナノ粒子、および（6）5 0 J / c m <sup>2</sup> 光ありでの 5 0  $\mu$  g ウイルス様ナノ粒子。図 1 8（下パネル）は、6 つの試験条件の各々に対する死細胞のパーセンテージを示す。

30

【図 1 9 A】図 1 9 A は、実施例 1 5 に記載される実験の模式図を示す。図 1 9 B は、ウイルス様ナノ粒子（図中ではナノ粒子と称される）対コントロール（光あり）を注射した動物における % 生存性のグラフを示す。図 1 9 C は、個々のマウスにおいて腫瘍容積（上パネル）、「E 7 テトラマー + C D 8 + T 細胞」および「I N F 分泌 C D 8 + 細胞」を示す。

40

【図 1 9 B】図 1 9 A は、実施例 1 5 に記載される実験の模式図を示す。図 1 9 B は、ウイルス様ナノ粒子（図中ではナノ粒子と称される）対コントロール（光あり）を注射した動物における % 生存性のグラフを示す。図 1 9 C は、個々のマウスにおいて腫瘍容積（上パネル）、「E 7 テトラマー + C D 8 + T 細胞」および「I N F 分泌 C D 8 + 細胞」を示す。

【図 1 9 C】図 1 9 A は、実施例 1 5 に記載される実験の模式図を示す。図 1 9 B は、ウイルス様ナノ粒子（図中ではナノ粒子と称される）対コントロール（光あり）を注射した動物における % 生存性のグラフを示す。図 1 9 C は、個々のマウスにおいて腫瘍容積（上パネル）、「E 7 テトラマー + C D 8 + T 細胞」および「I N F 分泌 C D 8 + 細胞」を示す。

50

【図20】図20は、細胞生存性に対する光感受性B P Vウイルス様ナノ粒子および光感受性H P Vウイルス様ナノ粒子の効果を比較する、有効性アッセイの結果のグラフを示す。

【図21】図21は、細胞への光感受性B P Vウイルス様ナノ粒子および光感受性H P Vウイルス様ナノ粒子の結合を比較する、結合アッセイの結果のグラフを示す。

【図22】図22は、光感受性ウイルス様ナノ粒子（図中ではP s Vと称される）での処置後の頭頸部癌細胞の腫瘍増殖曲線のグラフを示す。

【図23A】図23Aおよび図23Bは、本開示の光感受性ウイルス様ナノ粒子生成プロセス（例えば、実施例20に記載されるとおり）の例を示す。

【図23B】図23Aおよび図23Bは、本開示の光感受性ウイルス様ナノ粒子生成プロセス（例えば、実施例20に記載されるとおり）の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

（発明の詳細な説明）

光線力学的療法（PDT）は、選択的に光に曝された場合に毒性になり、悪性および他の病的細胞を標的化および/もしくは死滅させる非毒性光感受性分子を使用する光線療法の一形態である。癌の処置においてPDTに提起される難題は、高濃度の光感受性分子をもつら腫瘍細胞に送達することである。標的化された送達を達成するために、抗体が使用され得るが、それらはその送達能力が制限されている（これは、1抗体あたり2～8個の光感受性分子の範囲にある）。さらに、同定された腫瘍レセプター分子を欠いており、従って、抗体で標的化できない重要な腫瘍がある。結果として、複数の腫瘍は、未処置のままである（例えば、眼内黒色腫）。さらに、抗体/色素結合体によって標的化される分子の多く（例えば、EGFR）はまた、非腫瘍細胞の表面に見出され、望ましくないオフターゲット効果をもたらす。

【0044】

本開示は、一部分は、ウイルス様粒子（VLP）（例えば、パピローマVLP）（本明細書ではウイルス様ナノ粒子ともいわれる）がそれらの腫瘍標的化能力も構造安定性も失うことなく、多くの光感受性分子（例えば、IR700）を運ぶように化学的に改変され得るといふ予測外の発見に基づく。例えば、いくつかの実施形態において、VLPは、50分子より多く、100分子より多く、もしくは1000分子より多く（もしくは約1000個の光感受性分子）を運ぶように化学的に改変され得る。L1、もしくはL1およびL2キャプシドタンパク質からアセンブリされたウイルス様粒子は、非癌性細胞に影響を及ぼすことなく癌細胞に選択的に結合および感染し得、それによって、処置の細胞傷害性を最小限にし得る（米国特許出願公開番号US20100135902A1（その全体は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。さらに、いくつかの場合には、1粒子あたり多量の光感受性分子の送達は、極めて少量の薬物（例えば、ピコモル濃度）での光照射の際に、腫瘍細胞の選択的死滅を可能にする。

【0045】

VLPの重要な細胞結合特性は、キャプシドタンパク質（例えば、L1）上の多数のヘパリン結合部位の存在である。表面アミノ酸への光感受性分子の結合体化（例えば、表面アミノ酸（例えば、表面のリジン残基、アルギニン残基およびヒスチジン残基）へのアミド結合を介した結合体化）は、驚くべきことに、腫瘍細胞の表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）への上記VLPの結合を損なわない。本開示は、キャプシドタンパク質の表面露出ペプチドへの光感受性分子の結合体化を記載するものの、光感受性分子がキャプシドタンパク質の任意のペプチドに結合体化され得ることは、理解されるべきである。すなわち、光感受性分子は、L1タンパク質のみに、またはL1タンパク質とL2タンパク質との組み合わせに、結合体化され得る。光感受性分子が結合体化される上記タンパク質およびアミノ酸残基は、上記ウイルス様粒子の組成に依存し得る。

【0046】

上記の発見は、新規の標的化癌処置の開発の重要な含意を有する。例えば、本開示の光

10

20

30

40

50

感受性VLP（VLP結合体ともいわれる）は、非常に制限された送達能力を有する他の標的化分子（例えば、抗体）に対して利点を提供する。さらに、本開示の光感受性VLPは、適切な腫瘍表面特異的決定基が同定されていないことから、別の方法では抗体もしくは他の標的化分子によって標的化できない広い範囲の腫瘍（例えば、眼腫瘍）を標的化するために有用である。さらに、上記光感受性VLPは、遠隔の転移を処置するために有用である。さらに、上記光感受性VLPは、初期の悪性もしくは前癌性病変（例えば、形質転換を起こしているか、前悪性かもしくは悪性である眼の母斑）の診断および処置に有用である。

【0047】

「ウイルス様粒子」（VLP）は、本明細書で使用される場合、L1もしくはL1およびL2カプソマーの自己アセンブリする規則正しいアレイを含み、ウイルスゲノムを含まない、組織化されたキャプシド様構造（例えば、ほぼ球形もしくは円筒形の形状）をいう。ウイルス様粒子は、形態学にかつ抗原性として真正のビリオンと類似するが、それらは、ウイルス遺伝物質（例えば、ウイルス核酸）を欠いており、粒子を非感染性に行っている。VLPは、レシピエント細胞に薬剤（例えば、予防剤、治療剤もしくは診断剤）または封入された環状もしくは直線状のDNAもしくはRNA分子を送達するために使用され得る。用語「ウイルス様粒子」もしくは「VLP」および「シュードウイルス」もしくは「PsV」が、本明細書では交換可能に使用され得、用語「ウイルス様ナノ粒子」とも交換可能に使用され得ることは理解されるべきである。

【0048】

「腫瘍標的化ウイルス様粒子」とは、本明細書で使用される場合、（例えば、無傷の組織中の）非腫瘍（例えば、非癌性の、さもなければ正常な、健康な）細胞を標的化することなく、腫瘍（例えば、癌性の）細胞を標的化するVLPをいう。

【0049】

本開示に従うVLPは、野生型パピローマウイルスVLPに対して、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有し得る。上記VLPは、例えば、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有する改変体キャプシドタンパク質を有するカプソマーからアセンブリされ得る。「改変された免疫原性および/もしくは抗原性」を有する改変体キャプシドタンパク質は、既存の（例えば、内因性の）ウイルス血清型特異的抗体による上記キャプシドタンパク質の認識を低減もしくは妨げるために、あるアミノ酸において天然にもしくは合成によって改変されている（例えば、変異されるか、置換されるか、欠失されるか、peg化されるかもしくは挿入される）ものである。改変体キャプシドタンパク質は、種々のHPV血清型に由来するアミノ酸の組み合わせに基づいて、ヒトパピローマウイルス（HPV）L1改変体、非ヒトパピローマウイルスL1改変体、もしくはパピローマウイルスL1改変体であり得る。例えば、改変された免疫原性および/もしくは抗原性を有するL1改変体は、国際公開番号WO/2010/120266（その全体は、本明細書に参考として援用される）に記載される、HPV血清型16およびHPV血清型31（本明細書では「改変体HPV16/31 L1タンパク質」 - 配列番号1といわれる）に基づく組換えタンパク質であり得る。

【0050】

いくつかの実施形態において、VLPは、パピローマウイルスVLPである。上記VLPは、ヒトパピローマウイルスVLP（例えば、ヒトに感染し得るウイルスに由来する）であり得る一方で、他の実施形態では、上記VLPは、非ヒトパピローマウイルスVLPである。非ヒトVLPの例としては、ウシパピローマウイルス、マウスパピローマウイルス、ワタオウサギ（cotton-rabbit）パピローマウイルスおよびマカークもしくはアカゲザルパピローマウイルスの粒子に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記VLPは、ウシパピローマウイルスウイルス様ナノ粒子（例えば、タイプ1ウイルス様ナノ粒子）（例えば、BPV L1キャプシドタンパク質もしくはBPV L1キャプシドタンパク質とBPV L2キャプシドタンパク質との組み合わせからアセンブリされる）である。

10

20

30

40

50

## 【0051】

「キャプシドタンパク質」とは、本明細書で使用される場合、タンパク質モノマーであって、そのうちのいくつかがカプソマーオリゴマーを形成するものをいう。「カプソマー」とは、本明細書で使用される場合、ウイルスキャプシドの基本的オリゴマー構造ユニットをいい、これは、ウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルス（HPV））の遺伝物質を保護するタンパク質の外側の覆いである。本開示のキャプシドタンパク質は、パピローマウイルスL1メジャーキャプシドタンパク質およびパピローマウイルスL2マイナーキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本開示のVLPは、L1キャプシドタンパク質のみを含む一方で、他の実施形態では、上記VLPは、L1キャプシドタンパク質とL2キャプシドタンパク質との混合物（もしくは組み合わせ）を含む。

10

## 【0052】

いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子中のL1キャプシドタンパク質のパーセンテージは、上記ウイルス様粒子中のL2キャプシドタンパク質のパーセンテージより高い。例えば、いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子中のL1キャプシドタンパク質のパーセンテージは、80%~100%（上記ウイルス様粒子中のキャプシドタンパク質の総数のうちの）である。いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子中のL1キャプシドタンパク質のパーセンテージは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%である。いくつかの実施形態において、ウイルス様粒子中のL2キャプシドタンパク質のパーセンテージは、1%~25%（上記ウイルス様粒子中のキャプシドタンパク質の総数のうちの）である。

20

## 【0053】

ある実施形態において、ウイルス様粒子は、12~72のL2タンパク質を含む。ある実施形態において、ウイルス様粒子は、360のL1タンパク質および12~72のL2タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、キャプシドタンパク質は、20~60nmの直径を有するウイルス様ナノ粒子へとアセンブリする。例えば、キャプシドタンパク質は、直径20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nmもしくは60nmを有するウイルス様ナノ粒子へとアセンブリし得る。

30

## 【0054】

「外部キャプシドタンパク質」とは、本明細書で使用される場合、VLPの表面で露出されるキャプシドタンパク質をいう。いくつかの実施形態において、外部キャプシドタンパク質（例えば、L1タンパク質）は、（例えば、少なくとも1個の）光感受性分子に結合体化される。

## 【0055】

「光感受性分子」とは、本明細書で使用される場合、光に選択的に曝された場合に、「活性化された」（「光活性化された」ともいわれる）状態になる非毒性分子をいう。いくつかの実施形態において、活性化された光感受性分子は、光の励起の際に再発光する（例えば、フルオロフォア）。いくつかの実施形態において、活性化光感受性分子は、光の励起の際に、毒性になり得るかまたは毒性の分子を生じ得る。例えば、光感受性分子（光増感剤といわれる）のあるクラスは、光の吸収の際に励起状態へと促進され得、酸素との項間交差を受けて、一重項酸素を生じ得る。この一重項酸素は、これが遭遇する任意の有機化合物を迅速に攻撃し、従って、非常に細胞傷害性である。

40

## 【0056】

本開示の種々の局面によれば、光感受性分子は、上記VLPのキャプシドタンパク質（例えば、L1キャプシドタンパク質および/もしくはL2キャプシドタンパク質）に結合体化され得る。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、上記VLPのキャプシドタンパク質に共有結合的に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記光感

50

受性分子は、上記VLPのキャプシドタンパク質のリジン残基に共有結合的に結合体化される。光感受性分子に結合体化されるVLPは、本明細書では「VLP結合体」もしくは「光感受性VLP」といわれ得る。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、キャプシドタンパク質のアミン基（例えば、リジンもしくは他のアミノ酸のアミン基）と反応して、共有結合的アミド結合を形成するNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）エステル基を含む。

【0057】

VLPに対する光感受性分子（PM）の比は変動し得る。

【0058】

いくつかの実施形態において、VLP：PMの比は、約1：10～約1：1000、約1：10～約1：500、約1：50～約1：500、もしくは約1：50～約1：1000である。すなわち、いくつかの実施形態において、VLPは、約10～約1000個の光感受性分子を含み得る。いくつかの実施形態において、VLP：PMの比は、1：10、1：15、1：20、1：25、1：50、1：75、1：100、1：150、1：200、1：250、1：300、1：350、1：400、1：450、1：500、1：550、1：600、1：650、1：700、1：750、1：800、1：850、1：900、1：950もしくは1：1000である。いくつかの実施形態において、上記VLPは、10個、15個、20個、50個、75個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個もしくは1000個の光感受性分子を含み得る。いくつかの実施形態において、上記VLPは、1000個より多くの光感受性分子もしくは10個未満の光感受性分子を含み得る。

【0059】

1個より多くの光感受性分子が、単一のキャプシドタンパク質に結合体化され得る。例えば、単一のキャプシドタンパク質（例えば、L1キャプシドタンパク質もしくはL2キャプシドタンパク質）は、1～5個の（例えば、1個、2個、3個、4個もしくは5個の）光感受性分子に結合体化され得る。従って、キャプシドタンパク質うちの1個より多くのアミノ酸は、光感受性分子に結合体化され得る。いくつかの実施形態において、単一のキャプシドタンパク質は、1～2個、1～3個、もしくは2～3個の光感受性分子に結合体化され得る。従って、光感受性分子は、単一のキャプシドタンパク質のうちの1個、2個、3個、4個もしくは5個の異なるアミノ酸（例えば、リジン、アルギニンおよび/もしくはヒスチジン、または他のアミノ酸）に結合体化され得る。

【0060】

本開示に従って使用するための光感受性分子の例としては、蛍光色素、赤外色素、近赤外色素、ポルフィリン分子およびクロロフィル分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0061】

本開示に従って使用するための蛍光色素の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、Alexa Fluor、7-アミノアクチノマイシンD、8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、ATTO色素、オーラミン-ローダミン染料、ベンズアントロン（benzanthrone）、ビマン（bimane）、9,10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン、5,12-ビス（フェニルエチニル）ナフタセン、ビスベンズイミド、ブラックライト塗料（black light paint）、カルセイン、カルボキシフルオレセイン、カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル、1-クロロ-9,10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン、2-クロロ-9,10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン、2-クロロ-9,10-ジフェニルアントラセン、クマリン、DAPI、ダーククエンチャー（dark quencher）、DiOC6、DyLight Fluor、Fluo-3、Fluo-4、FluoProbes、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、蛍光画

10

20

30

40

50

像ガイド下手術 (fluorescence image-guided surgery)、fluoro-jade 染料、fura-2、fura-2-アセトキシメチルエステル、GelGreen、GelRed、緑色蛍光タンパク質、ヘプタメチン (heptamethine) 色素、インディアンイエロー、Indo-1、ルシファーイエロー、ルシフェリン、MCherry、メロシアニン、ナイルブルー、ナイルレッド、蛍光染料 (optical brightener)、ペリレン、フロキシニン、フィコピリン、フィコエリトリン、フィコエリトロピリン、ヨウ化プロピジウム、ピラニン、ローダミン、ローダミン123、ローダミン6G、RiboGreen、RoGFP、ルブレン、(E)-スチルベン、(Z)-スチルベン、スルホローダミン101、スルホローダミンB、SYBR Green I、シナプスフルオリン (synapto-phluorin)、テトラフェニルプタジエン、トリス(バソフェナントロリンジスルホン酸)ルテニウム(II)四ナトリウム、テキサスレッド、チタンイエロー、TSQ、ウンベリフェロン、黄色蛍光タンパク質およびYOYO-1。

10

## 【0062】

本開示に従って使用するための感光色素の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: HpD、ポルフィマーナトリウム (Porfimer sodium) (Photofrin (登録商標)、Photogem (登録商標)、Photosan Hemporfin (登録商標))、m-THPC、テモポルフィン (Foscan (登録商標))、ベルテポルフィン (ビスダイン (登録商標))、HPPH (Photochlor (登録商標))、パラジウム細菌フェオホルビド (Palladium-bacteria-pheophorbide) (Tookad (登録商標))、5-ALA、5-アミノレプリン酸 (Levulan (登録商標))、5-ALAMethylエステル (Metvix (登録商標))、5-ALABenzylエステル (Benzvix (登録商標))、5-ALAHexylエステル (Hexvix (登録商標))、ルテニウム(III)-テキサフィリンもしくはモテキサフィン-ルテチウム (Lutex (登録商標)、Lutrin (登録商標)、Angrin (登録商標)、Optrin (登録商標))、SnET2、エチルエチオプルプリンスズ (IV) (Tin (IV) ethyl etiopurpurin) (Purlytin (登録商標)、Photrex (登録商標))、NPe6、モノ-L-アスパルチルクロリン6、タラポルフィンナトリウム (Talporfin (登録商標))、Laserphyrin (登録商標))、BOPP、ホウ素化プロトポルフィリン (BOPP (登録商標))、フタロシアニン亜鉛 (CGP55847 (登録商標))、フタロシアニンケイ素 (Pc4 (登録商標))、スルホン酸化アルミニウムフタロシアニン誘導体 (Photosens (登録商標))の混合物、ATMPn、アセトキシ-テトラキス(-メトキシエチル-)ポルフィセン)、TH9402およびジプロモローダミンメチルエステル。

20

30

## 【0063】

本開示に従って使用するための感光色素の例としては、蛍光画像化において使用され得るもの(例えば、近赤外線(NIR)蛍光色素)(例えば、La Jolla Blue (登録商標)およびIRDye (登録商標) 700DX)が挙げられる。

## 【0064】

本開示はまた、腫瘍を有する被験体に、キャプシドタンパク質に結合体化された光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与するための方法、または腫瘍を有する被験体に、約50~約1000個の(例えば、50個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個、もしくは1000個の)光感受性分子を含む腫瘍標的化ウイルス様粒子を投与するための方法を提供する。

40

## 【0065】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、哺乳動物、例えば、ヒトである。

## 【0066】

50

投与様式は、ウイルス様粒子を送達するために代表的には使用される、注射、注入、移植、局所投与によるか、もしくは任意の他の手段によるものであり得る。いくつかの実施形態において、注射の領域に依存して、中空ニードル、被覆済みニードル、ミニニードルもしくはマイクロニードルが使用される。いくつかの実施形態において、投与様式は、眼内の空間へともしくは眼の硝子体へと（例えば、眼腫瘍もしくは眼に転移した腫瘍を標的化するために）注射によるものである。

【0067】

本開示のウイルス様粒子を送達するために使用され得る試薬の例としては、生理食塩水、 $MgCl_2$ 、トレハロース、ヒアルロン酸ナトリウム、ポリソルベート20、ポリソルベート80もしくは上記の試薬のうちの2種以上の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0068】

本開示の光感受性分子は、適切な波長で活性化され得る。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子の活性化は、これらを細胞傷害性にするかまたは細胞傷害性分子を生じさせ得る。適切な波長としては、紫外線波長、可視光線波長、赤外線波長および近赤外線波長が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、600nm~800nmもしくは660nm~740nmの波長で活性化され、かつ細胞傷害性になる。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、約600nm、610nm、620nm、630nm、640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、710nm、720nm、730nm、740nm、750nm、760nm、770nm、780nm、790nmもしくは800nmの波長で活性化されかつ細胞傷害性になる。いくつかの実施形態において、上記光感受性分子は、600nmより短いもしくは800nmより長い波長で活性化される。光感受性分子活性化に適切な波長は、使用される特定の分子に依存する。

20

【0069】

本開示の光感受性分子は、分子のタイプに依存して、赤外線、近赤外線もしくは紫外線によって活性化され得る。例えば、赤外線レーザー、近赤外線レーザーもしくは紫外線レーザーは、いくつかの実施形態において、VLP結合体の上記光感受性分子を活性化するために使用され得る。上記レーザーによって送達されるエネルギーは、約5J~約100J、約5ジュール(J)~約50J、もしくは約8J~約36Jの範囲に及び得る。いくつかの実施形態において、上記レーザーによって送達されるエネルギーは、8J、9J、10J、11J、12J、13J、14J、15J、16J、17J、18J、19J、20J、21J、22J、23J、24J、25J、26J、27J、28J、29J、30J、31J、32J、33J、34J、35J、36J、37J、38J、39J、40J、41J、42J、43J、44J、45J、46J、47J、48J、49J、50J、51J、52J、53J、54J、55J、56J、57J、58J、59J、60J、61J、62J、63J、64J、65J、66J、67J、68J、69J、70J、71J、72J、73J、74Jもしくは75Jである。いくつかの実施形態において、上記レーザーによって送達されるエネルギーは、10J、20J、30J、40J、50J、60J、70J、80J、90Jもしくは100Jである。

30

40

【0070】

光もしくはレーザーは、約5秒間~約5分間、上記光感受性分子（もしくは光感受性VLP）に印加され得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記光もしくはレーザーは、上記分子を活性化するために、5秒間、10秒間、15秒間、20秒間、25秒間、30秒間、35秒間、40秒間、45秒間、50秒間もしくは55秒間にわたって上記光感受性分子に印加される。いくつかの実施形態において、上記レーザーは、1分間、1.5分間、2分間、2.5分間、3分間、3.5分間、4分間、4.5分間もしくは5分間にわたって、またはより長く、上記光感受性分子に印加される。光もしくはレーザーが光感受性分子に印加される時間の長さが例えば、上記レーザーのエネルギー（例えば、ワット数）に依存して変動し得ることは、理解されるべきである。例えば、より低いワット数

50

を有するレーザーは、上記分子を活性化するためにより長期間にわたって光感受性分子に印加され得る。

【0071】

光もしくはレーザーは、上記光感受性分子（もしくはVLP結合体）に、VLP結合体を投与してから約30分間～約48時間後に、印加され得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記光もしくはレーザーは、上記光感受性分子に、上記VLP結合体を投与してから30分間、35分間、40分間、45分間、50分間もしくは55分間後に、印加される。いくつかの実施形態において、上記光もしくはレーザーは、上記光感受性分子に、上記VLP結合体を投与してから1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、もしくは24時間後に印加される。いくつかの実施形態において、上記光もしくはレーザーは、上記光感受性分子に、上記VLP結合体を投与してから36時間もしくは48時間後に印加される。

10

【0072】

上記光もしくはレーザーは、上記腫瘍部位に直接印加され得る。例えば、眼腫瘍を標的化するVLP結合体は、眼を照明することによって活性化され得る。

【0073】

腫瘍の任意のタイプが、本開示に従って標的化され得る。腫瘍の例としては、眼、肺、胸膜、肝臓、膵臓、胃、食道、結腸、乳房、卵巣、前立腺、脳、髄膜、精巣、腎臓、膀胱、頭部、頸部、子宮頸部、喉頭および/もしくは皮膚に位置するものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、眼腫瘍である。上記眼腫瘍は、硝子体、脈絡膜腔、虹彩、毛様体、強膜、中心窩、網膜、視神経円板もしくは視神経に位置し得る。

【0075】

上記腫瘍は、いくつかの実施形態において、癌性もしくは悪性である。いくつかの実施形態において、上記腫瘍は、転移性である。他の腫瘍もまた、標的化され得る。例えば、本願は、子宮頸癌細胞、卵巣癌細胞、黒色腫の癌細胞、肺癌細胞、頭部および/もしくは頸部癌細胞、ならびに膀胱癌細胞を標的化するための方法および組成物を提供する。

30

【0076】

（組成物）

本開示のウイルス様粒子（ウイルス様ナノ粒子）は、いくつかの実施形態において、光感受性分子結合体化ウイルス様ナノ粒子である。上記ウイルス様ナノ粒子は、パピローマウイルス由来の1もしくは2タイプのキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、上記キャプシドタンパク質は、改変される。キャプシドタンパク質は、代表的には、直径約55nmの「空の」プロトキャプシド（例えば、中空のコアを含む球状の粒子）へと自己アセンブリする。上記プロトキャプシドが成熟して、ウイルス様ナノ粒子（ウイルス様粒子）を形成した後、ウイルス様ナノ粒子は、光感受性分子（例えば、IR700色素、例えば、IRDye（登録商標）700DX、LICOR（登録商標）によって製造される赤外色素）と化学的に結合体化される。

40

【0077】

いくつかの実施形態において、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子は、単回使用バイアル（例えば、ホウケイ酸ガラスバイアル）の中の滅菌溶液（例えば、1もしくは2ml）の中で提供される。いくつかの実施形態において、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子は、NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ もしくは上記のうちの2種以上の任意の組み合わせを必要に応じて含む水の滅菌溶液中で提供される。いくつかの実施形態において、NaClは、400～600mMol（例えば、500mMol）の濃度で上記溶液中に存在し得る。いくつかの実施形態において、KClは、2～6mMol（例えば、2.7mMol）の濃度で上記溶液中に存在し得る。いくつかの実施形態におい

50

て、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は、5 ~ 15 mmol (例えば、10 mmol)の濃度で上記溶液中に存在し得る。いくつかの実施形態において、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ は、1 ~ 3 mmol (例えば、2 mmol)の濃度で上記溶液中に存在し得る。

【0078】

いくつかの実施形態において、光感受性ウイルス様ナノ粒子は、希釈され、眼科的手順において一般に使用される滅菌シリンジもしくはニードルを使用して、眼内に投与される。本開示はまた、本明細書中の他の箇所で記載されるように、他の投与経路ならびに他の腫瘍および/もしくは転移への投与を提供する。

【0079】

いくつかの実施形態において、各ウイルス様ナノ粒子は、12 ~ 72のカプソマーを含み、各カプソマーは、5分子のL1キャプシドタンパク質(例えば、各55 ~ 56 kD)および1分子のL2キャプシドタンパク質(例えば、各52 kD)を含む。いくつかの実施形態において、各ウイルス様ナノ粒子は、12 ~ 72のカプソマーを含み、各カプソマーは、L1キャプシドタンパク質のみ(例えば、カプソマーあたり5分子のL1タンパク質)を含む。

10

【0080】

いくつかの実施形態において、各ウイルス様ナノ粒子は、上記タンパク質のうちの少なくとも1個のアミノ酸(例えば、リジンアミノ酸)に、10 ~ 1000分子(例えば、500分子)の光感受性分子(IR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX))と化学的に(例えば、アミド結合を介して)結合体化される。

20

【0081】

(ウイルス様粒子を生成するための方法)

本開示の光感受性ウイルス様ナノ粒子を生成するために、哺乳動物細胞(例えば、293T細胞(例えば、HEK293F細胞))が増殖させられ得(例えば、懸濁培養において)、そしてBPVもしくはHPV L1(もしくはL1およびL2)キャプシドタンパク質をコードする核酸(例えば、バイシストロン性プラスミドDNA)で一過性にトランスフェクトされ得る。これは、プロトキャプシドの形成を誘発する(例えば、Buck et al. Current Protocols in Cell Biology 26.1.1-26.1.19, December 2007に記載されるとおり)。細胞塊の回収および破壊の後に、上記プロトキャプシドは、ベンゾナーゼ処理で宿主DNAクリアランスに、およびその後、インビトロでの成熟プロセスに供されて、安定なウイルス様ナノ粒子を形成し得る。精製後、上記ウイルス様ナノ粒子は、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子を生成するために、光感受性分子(例えば、IR700 NHSエステル)と化学的に結合体化され得る。図23は、本明細書で提供される生成プロセスの一例の模式図を示す。

30

【0082】

従って、いくつかの局面において、光感受性分子を生成するための方法が本明細書で提供され、上記方法は、(a)細胞を、1以上のキャプシドタンパク質をコードする核酸で一過性にトランスフェクトし、それによって、プロトキャプシドを形成する工程、(b)上記プロトキャプシドを集め、上記プロトキャプシドをインビトロで成熟プロセスに供し、それによって、安定なウイルス様ナノ粒子を形成する工程、および(c)上記ウイルス様ナノ粒子を50 ~ 1000個の光感受性分子に化学的に結合体化する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様ナノ粒子は、500個の光感受性分子に結合体化される。いくつかの実施形態において、上記ウイルス様ナノ粒子は、アミド結合によって(例えば、光感受性分子のエステル基と、ウイルス様ナノ粒子のキャプシドタンパク質のうちのアミノ酸のアミン基とを反応させることによって)光感受性分子に結合体化される。

40

【実施例】

【0083】

(実施例1 - IRDye(登録商標) 700DXの結合体化)

50

光感受性分子（例えば、IR Dye（登録商標）700DX）へのVLP（例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子）の化学的結合体化の手順は、以下のとおりである。代表的には、VLPの溶液を、PBS、pH = 7.2および0.3 ~ 0.5 M NaCl中、1 mg/mlの濃度で維持した。上記IR700（例えば、IR Dye（登録商標）700DX）分子を、乾燥NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）エステルとして製造業者から得た（NHS-エステルは、タンパク質上のアミン基と反応して、共有結合的アミド結合を形成する）（図10A）。タンパク質上の利用可能なアミン基は、タンパク質のアミノ末端もしくはアミノ酸（例えば、リジン）上の-アミノ基である。上記乾燥固体IR700-NHSエステルを、5 mg/mlの濃度でDMSO中に溶解し、凍結して貯蔵した。代表的には、VLP：色素の種々の比を、種々の量のIR700-NHSを固定量（通常は、PBS中で1 mg/ml溶液の1 ml）のVLPに対して混合することによって達成した。代表的な比およびIR700-NHSの量は、以下の表に列挙される：

【0084】

【表1】

表1

IR700-NHS:VLP の比	1 mg の VLP に対する IR700-NHS の質量	1 mg の VLP に対する IR700-NHS 溶液の容積
200:1	16 µg	3.2 µl
500:1	40 µg	8 µl
1000:1	80 µg	16 µl

【0085】

200:1比を作製するために、PBS中1 mg/mlのVLP 1 mlを、3.2 µlの上記IR700-NHSエステル溶液と混合した。これら反応を、2~4時間にわたって室温で実施した。上記反応の完了後に、上記VLPを、ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製して、結合しなかったIR700-NHSを、新たに形成されたVLP-IR700結合体（光感受性VLPともいわれる）から分離した。

【0086】

（実施例2 - ビスダイン（登録商標）の結合体化）

上記VLPへのビスダイン（登録商標）の結合体化は、上記IR700-NHSに対して僅かに異なるプロトコルにしたがった。ビスダイン（登録商標）分子は、VLPへの結合体化の前に、NHSへの官能化を必要とした。この官能化を、EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド）の使用によって達成した。EDCを使用して、遊離カルボン酸分子を有する分子（例えば、ビスダイン（登録商標）（図10Bを参照のこと；丸で囲った）を官能化し、スルホ-NHSの存在下で、NHS部分をこの薬剤に効率的に移す。この反応スキームは、図11に概説される。簡潔には、約2 mMのEDCおよび2 x モル過剰のスルホ-NHSを、種々の量のビスダイン（登録商標）と反応させた。室温で15分後に、上記反応を、2-メルカプトエタノールを終濃度20 mMになるように添加して停止させた。この反応混合物を、1 mgのVLPに、PBS、pH = 7.2 + 0.3 ~ 0.5 M NaCl中、1 mg/mlの濃度で添加し、2~4時間室温でインキュベートした。最後に、反応しなかった成分を、VLP-結合体からヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって分離した。

【0087】

（実施例3 - VLP結合特異性は、HSPGによって媒介され、ヘパリンによって阻害される）

懸濁物中のSK-OV-3細胞を、以下の条件下で処理した：VLP（例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子）なし、Alexa Fluor（登録商標）488（図3、「AF488\*PsV」）もしくはIR700（図3、「IR700\*PsV」）のいずれかに結

10

20

30

40

50

合体化したVLP結合体、またはHSPGの存在下でインキュベートした同じVLP結合体。インキュベーション後、これら培養物を、4ジュールの690nm近赤外線に供した。光を照射しなかった細胞の相当するセットを、コントロールとして機能をはたした。照射後、上記培養物を、細胞死の程度について評価した。図3は、実質的な細胞死滅があった唯一の条件は、IR700\*PsVおよび4ジュールの光への細胞曝露であったことを示す。類似の細胞死は、AF488\*PsVへの曝露では観察されなかった。このことは、細胞死がIR700色素結合体に特異的であることを明らかにする。さらに、細胞死は、HSPGの存在下でほぼ完全に排除され、このことは、上記細胞へのVLP結合がIR700媒介性細胞死に重要であることを明らかにする。

【0088】

(実施例4 - 細胞死は、赤外線照射、ならびにVLPおよびIR700の量に依存する)

VLP(例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子)の種々の濃度で処理した懸濁物中のSKOV-3細胞を、IR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX)の種々の量と結合体化した。IR700色素への結合体化なしのVLPをコントロールとして使用した。インキュベーション後、これら培養物を、0ジュールもしくは16ジュールの690nm近赤外線に供した。光処理の後、細胞死の程度を評価した。図4は、細胞死がIR700色素の存在および光処理の両方に依存することを示す。これは、細胞死がVLP濃度および上記IR700色素結合体化比の両方に依存するという観察によって裏付けられる。

【0089】

(実施例5 - IR700に結合体化したVLPでの処置後に照射した際のSKOV-3細胞のインビトロ細胞死)

SKOV-3卵巣癌細胞を、24ウェルプレートにプレートし、光感受性VLP粒子(例えば、IR700色素に結合体化された、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子)の2種の異なる濃度、2.5μg(赤)および0.25μg(青)で、1時間、37°Cにおいて処理した。結合したら、上記細胞を洗浄し、続いて、4Jの光での処理を行った。細胞死を、LDH放出(490nmでの吸光度を測定することによって決定される)の酵素的な評価で決定した。VLP:IR700結合体化の3種の異なるモル比、それぞれ、1:500、1:1000および1:2000を試験した。図5は、細胞死の最大効力が、試験した両方の濃度に関してVLP:IR700(「PsV:IR700」)の1:1000比で観察された。洗剤媒介性細胞溶解を、陽性コントロールとして使用した。

【0090】

(実施例6 - IR700-PsV複合体の構造評価)

図6は、コントロールVLP(PsV)(A)およびIR700結合体化VLP(PsVs)(B)のESI-TOF分析を示す。図6Bにおいて、その反応を、各VLP(PsV)分子の、1000分子のIR700との結合体化を達成するように設定した。ESI-TOFスキャンにおけるシグナルスパイクは、VLP L1タンパク質に相当する。5517amuのシフトは、コントロールサンプルに対して結合体化サンプルで認められ、ここで結合体化サンプルがL1タンパク質あたり平均3結合体化IR700分子(1840amu)もしくはVLPあたり約1000分子のIR700に相当する(代表的には、VLPあたり360のL1がある)。

【0091】

(実施例7 - 薬剤結合は、眼内黒色腫細胞株における細胞死の程度を決定する)

懸濁物中の眼内黒色腫細胞株(92.1; HER2+)を、IR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX)に結合体化したハーセプチン(登録商標)抗体もしくはIR700色素に結合体化したVLP(例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子)のい

10

20

30

40

50

れかの種々の希釈物に曝した。次いで、匹敵する培養物を、薬剤結合（図7C）、または16ジュールの690nm近赤外線（図7B）もしくは存在下（図7A）での細胞死について評価した。図7Cは、上記92.1眼内黒色腫細胞への濃度依存性VLP結合を示す一方で、ハーセプチン（登録商標）抗体結合は、本質的にない。図7Bは、光の非存在下では、細胞死はないことを示す。図7Aは、上記光感受性VLP処理細胞においてのみ濃度依存性細胞死を示す。

【0092】

（実施例8 - 薬剤結合は、卵巣癌細胞株における細胞死の程度を決定する）

懸濁中のSK-OV-3細胞（HER2<sup>+</sup>）を、ハーセプチン（登録商標）抗体もしくはIR700色素（例えば、IRDye（登録商標）700DX）に結合体化したVLP粒子（例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子）のいずれかの種々の希釈物に曝した。次いで、匹敵する培養物を、ハーセプチン（登録商標）またはVLP結合（図8C）、または16ジュールの690nm近赤外線（図8B）もしくは存在下（図8A）での細胞死について評価した。図8Cは、VLP結合がSK-OV-3細胞において飽和していることを示す。ハーセプチン（登録商標）結合はまた、濃度依存性であるが、上記VLPに関してはより小さい程度である。図8Bは、光の非存在下では、細胞死はないことを示す。図8Aは、両方の条件下で濃度依存性細胞死を示すが、結合に類似して、その応答は、VLPで飽和している一方で、ハーセプチン（登録商標）での細胞死では、濃度依存性増大があるようである。これらデータは、IR700に結合体化したVLP（PsV-IR700）が、IR700に結合体化したハーセプチン（登録商標）（ハーセプチン-IR700）より強力であることを意味する。

【0093】

（実施例9 - ワクチン誘発性抗HPV16中和抗体は、眼内黒色腫細胞株92.1へのBPV\*IR700 VLPの結合をブロックしない）

種々の抗体を含む血清サンプルを、92.1眼内黒色腫細胞株への光感受性VLP粒子（例えば、HPV16 VLPもしくはBPV VLP）の結合を阻害する能力について試験した。図9は、「血清なし」もしくは「ナイーブ血清」条件が、VLP結合を中和する活性を含まないことを示す。さらに、観察されたブロッキング活性は、ウイルス血清型に対して特異的であった。すなわち、IR700色素に結合体化したヒトパピローマウイルス様粒子（HPV16-IR700）のみが、HPV16抗体を含む血清で中和された。IR700に結合体化したウシパピローマウイルス様粒子（BPV-IR700）は、HPV16特異的抗体を含む血清によって中和されなかった。

【0094】

（実施例10 - 免疫原性評価）

実施例9に記載されるものに類似の研究において、中和力価を、HPV16もしくはBPVのいずれかに対する抗体を含む血清の段階希釈によって決定した。表2に記載される結果は、HPV16に対する抗体がHPV16のみを中和することを示す。さらに、BPVに対する抗体は、BPVのみを中和する。従って、BPVに対するHPV16抗体もHPV16に対するBPV抗体も、いずれも交差反応はない。

【0095】

【表2】

表2

	HPV 16	BPV
ヒト抗 HPV16	1:57,759	<u>1:24</u>
ウサギ抗 HPV16	1:2,876,000	<u>1:21</u>
ウサギ抗 BPV	1:83	1:14,332

【0096】

（実施例11 - 結合研究）

この実施例の目的は、種々のタイプの癌細胞へのヒトパピローマウイルス16 (HPV16) キャプシドタンパク質、改変体HPV16/31 L1キャプシドタンパク質、およびウシパピローマウイルス (BPV) キャプシドタンパク質を含むウイルス様ナノ粒子の結合を評価することであった。さらに、L1キャプシドタンパク質およびL2キャプシドタンパク質、またはL1キャプシドタンパク質のみを含むウイルス様ナノ粒子を試験して、癌細胞へのウイルス様ナノ粒子結合に関して、L2の依存性があるか否かを決定した。この研究の結果は、BPVウイルス様ナノ粒子およびHPVウイルス様ナノ粒子の結合が匹敵することを示す。

#### 【0097】

以下を含む細胞株の大きなパネルをスクリーニングした：多岐にわたる細胞株（例えば、293TT、HaCaT、PAM-212およびTC-1）、子宮頸部細胞株（例えば、HeLa、SiHa、CaSkiおよびC-33A）、卵巣細胞株（例えば、MOSEC、SHIN-3、SK-OV-3、WF-3、ES-2、A2780、OVCAR-3およびOVCAR-4）、黒色腫細胞株（例えば、B16F10、SKMEL-2、SKMEL-5、SKMEL-28およびUACC）、眼内黒色腫細胞株（例えば、92.1、MKT-BR、OCM-1およびUW-1）、肺細胞株（例えば、NCI-H23、NCI-H322M、NCI-H460およびNCI-H522）、頭頸部細胞株（例えば、CAL-33 (HPV<sup>-</sup>)、FaDu (HPV<sup>-</sup>)、HSC-3 (HPV<sup>-</sup>)、SNU-1076 (HPV<sup>-</sup>)、UM-SCC-47 (HPV<sup>+</sup>)、UPCI-SSC-90 (HPV<sup>+</sup>) およびUPCI-SCC-154 (HPV<sup>+</sup>)）、ならびに膀胱細胞株（例えば、5637、J82、RT112、SCaBER、SVHUC、T24、UMUC-3、UMUC-5）。

#### 【0098】

実験前に、ウイルス様ナノ粒子をAlexaFluor488に結合体化して、細胞表面へのウイルス様ナノ粒子結合の容易かつ直接的分析を可能にした。AlexaFluor488を、結合に干渉しないN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) - エステル化学を使用して上記ウイルス様ナノ粒子に付着させた。上記ウイルス様ナノ粒子の各々を、10 μg/ml、1 μg/ml および0.1 μg/mlの濃度で試験した。

#### 【0099】

細胞をトリプシン処理して、それらを組織培養プレートのプラスチック表面から剥がし、洗浄し、振盪プラットフォーム上で4時間、37 °Cで増殖培地の中で回復させた。次いで、上記細胞を洗浄し、計数し、96ウェル丸底プレートの中へと、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) / 2% ウシ胎仔血清 (FBS) 中  $1 \times 10^5$  細胞/ウェルで配置した。上記ウイルス様ナノ粒子を、最終容積100 μl PBS / 2% FBSで上記細胞に添加した。ヘパリンと予めインキュベートした (1 mg/ml、1時間、4 °C) ウイルス様ナノ粒子もまた、コントロールとしてウェルに添加した。次いで、上記細胞およびウイルス様ナノ粒子を1時間、4 °Cで (暗所で) インキュベートし、PBS / 2% FBSで2回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで15分間、室温において固定した。細胞を最後に再び洗浄し、200 μl PBS / 2% FBS中で再懸濁し、BD FACSCANTO™ II (BD Biosciences, San Jose, CA) で、BD FACSDIVA™ (BD Biosciences, San Jose, CA) およびFlowJoソフトウェアを使用して分析した。

#### 【0100】

上記TC-1、HeLa、SK-OV-3、SKMEL-28、92.1、NCI-H322M、HSC-3、UPCI-SCC-154およびT24の細胞株を使用した結果を、図12にヒストグラムとして示す。図12から明らかなように、全てのウイルス様ナノ粒子は、それらの血清型にも構成 (L1 対 L1/L2) にも拘わらず、結合アッセイにおいて癌細胞に結合する。さらに、ヘパリンは、結合に関して競合する。このことは、ウイルス様ナノ粒子結合が特異的であり、HSPG依存性であることを実証する。

#### 【0101】

10

20

30

40

50

(実施例12 - 生体分布の時間経過)

この実施例の目的は、腫瘍を有する動物への静脈内注射の後に、ウイルス様ナノ粒子の腫瘍局在化およびクリアランスの時間経過を評価することであった。

【0102】

精製ウイルス様ナノ粒子を、ウイルス様ナノ粒子(例えば、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子)をIR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX)により、ウイルス様ナノ粒子:色素比1:500で標識することによって調製した。上記光感受性ウイルス様ナノ粒子を、OPTIPREP™ Density Gradient Mediumを使用する密度勾配超遠心分離によって精製した。

10

【0103】

腫瘍を、100μlのPBS中 $2 \times 10^5$  TC-1癌細胞の皮下注射によって、アルピノC57Bl/6マウスの中に作製した。約2週間後、動物を処置群に無作為化した。腫瘍を有する動物に、容積100μlにおいて、PBSもしくは200μgの上記光感受性ウイルス様ナノ粒子のいずれかを静脈内注射によって与えた。注射の12時間後もしくは24時間後に、上記動物を安楽死させた。安楽死の後、腫瘍組織を採取し、IR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX)の蛍光に対して画像化した。これは、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子の存在を示す。

【0104】

図13Bは、12時間および24時間の両方の時点で得られた腫瘍組織において検出可能なIR700色素(例えば、IRDye(登録商標) 700DX)蛍光を示すが、PBSコントロールの蛍光(12時間の時点)は検出されなかった。腫瘍組織における定量的な総蛍光は、図14に示されるグラフにプロットされる。

20

【0105】

(実施例13 - 生体分布の時間経過)

この実施例の目的は、腫瘍を有する動物への静脈内注射後に、ウイルス様ナノ粒子の腫瘍局在化およびクリアランスの時間経過を評価することであった。

【0106】

精製ウイルス様ナノ粒子を、溶解物中のAlexaFluor488で標識し、OPTIPREP™ Density Gradient Mediumを使用する密度勾配超遠心分離によって精製した。

30

【0107】

腫瘍を、100μlのPBS中 $2 \times 10^5$  TC-1癌細胞の皮下注射によって、アルピノC57Bl/6マウスの中に作製した。約2週間後、200μgの上記光感受性ウイルス様ナノ粒子を、容積100μlにおいて静脈内注射によって送達した。腫瘍を、光感受性ウイルス様ナノ粒子注射後に以下の時点で採取した: T = 1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間および72時間。採取したら、腫瘍の断片を顕微鏡検査のために凍結した。この顕微鏡検査のために、組織切片をさらに染色した。HPV16に対するウサギポリクローナル抗血清を、AlexaFluor-488二次抗体とともに使用した。ラット抗CD31抗体および抗ラットAlexaFluor-594二次抗体で血管を共染色した。核をDAPIで強調した。

40

【0108】

データ(インサイチュ画像は示さない)は、1時間の時点での上記光感受性ウイルス様ナノ粒子の存在を示す。シグナルの局在化は、血管内に関連づけられているようであった。染色の最大レベルは、8時間の時点で起こったようであり、その8時間の時点で、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子は、上記血管内から上記腫瘍細胞へ拡散しているようであった。最後に、24時間および48時間の時点では、腫瘍におけるウイルス様ナノ粒子のシグナルはほとんどないようであった。

【0109】

(実施例14 - 全身投与後のインビボ効力)

50

この実施例で示される研究を、単一の処置の24時間後に腫瘍生存性を測定するために設計した。この研究は、長期間のインビボ研究に関するガイドラインを確立する。

#### 【0110】

完全な研究デザインを、図15に図示する。腫瘍サイズの範囲に起因して、大きい腫瘍および小さい腫瘍の様な分布が各群内で生理食塩水処置群において $n = 3$ およびIR700（例えば、IRDye（登録商標）700DX）-光感受性ウイルス様ナノ粒子処置群において $n = 5$ となるように、動物を無作為化した。ウイルス様ナノ粒子を、光処置の12時間前に静脈内投与した。100マイクログラム（ $100 \mu\text{g}$ ）および $200 \mu\text{g}$ の用量を試験した。光処置は、 $25 \text{ J}$ （ $400 \text{ mW}$ で $62.3 \text{ s}$ ）もしくは $50 \text{ J}$ （ $400 \text{ mW}$ で $125 \text{ s}$ ）を含んだ。24時間後に、腫瘍を採取し、コラゲナーゼおよびDNAseを使用して加工処理して、単一細胞懸濁物を生成した。次いで、BD LIVE/DEAD（登録商標）黄色染色を適用し、細胞を、FACS CANTO<sup>TM</sup> IIによって配置した。データを、パシフィックオレンジチャンネルにおける蛍光のシフトによって示されるように死細胞のパーセンテージとして報告する（図16A）。

#### 【0111】

$200 \mu\text{g}$ のIR700（例えば、IRDye（登録商標）700DX）光感受性ウイルス様ナノ粒子（NP）という単一用量は、 $50 \text{ J}$ の光（図16Bおよび図17C）での処置後に腫瘍細胞の大部分を死滅させることができた。 $200 \mu\text{g}$ のNPでの死滅レベルは、上記腫瘍を $25 \text{ J}$ の光で処置した場合に約半分低減した（図16Bおよび図17B）。 $100 \mu\text{g}$ のNPは、 $25 \text{ J}$ の光での死滅を誘発するには十分でなかった（図16Bおよび図17B）；しかし、 $50 \text{ J}$ 線量でいくらかの腫瘍の死滅は観察された（図16Bおよび図17C）。この研究は、インビボ研究に関して必要なIR700（例えば、IRDye（登録商標）700DX）光感受性ウイルス様ナノ粒子および光線量の情報を提供した。

#### 【0112】

（実施例15 - 免疫系活性化研究）

上記TC-1腫瘍モデルは、免疫応答性動物におけるウイルス様ナノ粒子での処置に際して、抗腫瘍免疫誘発を試験する能力を提供する。上記TC-1腫瘍株は、HPV16癌遺伝子E6およびE7、ならびにc-Ha-Rasを発現する変異遺伝子で不死化したC57BL/6肺上皮細胞から発生した（Lin KY, et al., Cancer Research, 56(1):21-6, 1996）。これら細胞は、皮下に移植され得るか、または転移性モデルを研究するために、肺に細胞を播種するために静脈内注射され得る。約20年間にわたって、これら細胞は、E6およびE7治療用ワクチンの効力を試験するために使用されてきた。E7は、C57BL/6バックグラウンドに特徴的なMHCクラスIIエピトープを有し、これは、CD8 T細胞応答がそれに対して惹起され得る場合には防御的であることが示された（H-2D<sup>b</sup>, aa 49-57 RAHYNIVTF）（Feltkamp MC, et al. European Journal of Immunology, 23(9):2242-9, 1993）。これら応答は、上記ペプチドでの細胞のテトラマー染色および再刺激の両方、続いて、細胞内サイトカイン染色によって検出される。

#### 【0113】

用量応答研究：動物に、 $100 \mu\text{l}$ のPBS中 $2 \times 10^5$  TC-1細胞を皮下接種した。接種の約2週間後に、動物を6群に無作為化した：（1）処置なしコントロール、（2） $100 \mu\text{g}$  ウイルス様ナノ粒子（IRDye（登録商標）700DXで標識した、改変体HPV16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含む）、光コントロールなし、（3）PBSと $50 \text{ J}/\text{cm}^2$  光コントロール、（4） $200 \mu\text{g}$  ウイルス様ナノ粒子と $50 \text{ J}/\text{cm}^2$  光、（5） $100 \mu\text{g}$  n ウイルス様ナノ粒子と $50 \text{ J}/\text{cm}^2$  光、および（6） $50 \mu\text{g}$  ウイルス様ナノ粒子と $50 \text{ J}/\text{cm}^2$  光。マウスに、 $100 \mu\text{l}$ 容積の静脈内注射によってPBSもしくはウイルス様ナノ粒子を与え、 $690 \text{ nm}$ レーザーを使用して、12時間後に光を上記腫瘍に印加した。

腫瘍を24時間後に採取し、単一細胞懸濁物を生じるように消化し、生存性染色で染色して、死細胞のパーセンテージを測定した(図18,上)。

#### 【0114】

高用量群におけるいくつかの動物は、広範に及びかつ急速な腫瘍壊死、および上記動物の系への細胞内成分の放出におそらく起因して、腫瘍溶解症候群に関連した症状を経験した。上記「100 $\mu$ gナノ粒子と50J/cm<sup>2</sup>光」群のいずれも死亡しなかったが、上記群のマウスは、いくつかの病気の徴候を示した(図18,上)。上記「100 $\mu$ gナノ粒子、光なし」群および上記「PBSと50J/cm<sup>2</sup>光」群は、病気の徴候を示さなかった。このことは、観察された応答が上記ウイルス様ナノ粒子と光との組み合わせに起因したことを示す。全体的に、壊死は、上記ウイルス様ナノ粒子および光を受容した全ての群において明らかであった。最大の死滅は全ての群で起こり、用量応答は観察されなかった(図18,下)。

10

#### 【0115】

生存研究：動物に、100 $\mu$ lのPBS中 $2 \times 10^5$  TC-1細胞を皮下接種した。接種の約2週間後に、動物を処置群(25 $\mu$ g ウイルス様ナノ粒子)およびプラセボ群(PBSのみ)に無作為化した。マウスには、3日間の間隔を空けて2回処置を受けさせた。処置は、25 $\mu$ gのウイルス様ナノ粒子もしくは滅菌PBSのいずれかの100 $\mu$ lの単回静脈内注射を、続いて、12時間後に、690nmレーザーを使用して50J/cm<sup>2</sup>での光処置を考えた。腫瘍容積を3~4日ごとに測定し、動物を、それらの腫瘍が>1500mm<sup>3</sup>のサイズに達したときに安楽死させた(図19A)。

20

#### 【0116】

ウイルス様ナノ粒子での処置は、500mm<sup>3</sup>未満の腫瘍を有する動物において、増殖を遅らせるかもしくは腫瘍を根絶することができた(図19Bおよび19C)。プラセボ群では腫瘍増殖動力学に対して何ら効果はなかった。最小の腫瘍で開始した2匹の動物は、第1の処置の7日以内に腫瘍の証拠を全く示さず、上記動物のうちの3匹は、腫瘍縮小の徴候を示した(図19C)。

#### 【0117】

免疫学的研究：免疫学的情報を読み出すために、0日目(第1の処置前)、10日目および17日目に血液を集めた。赤血球を溶解し、残りの細胞を2つの分け、一方の半分を細胞表面マーカー(CD62L、CD127、CD103、CD69、CD4、CD8、CD3、H2-D<sup>b</sup>E7(49-57)テトラマー)で染色した。他方の半分を、4.5時間にわたってHPV16 E7ペプチド49-57で再刺激し、続いて、CD4、CD8およびIFN $\gamma$ に対する抗体で、同様に生細胞を区別するための生存性色素で染色した。

30

#### 【0118】

腫瘍増殖を制御した2匹の動物の血液において、「E7テトラマー+CD8+T細胞」および「INF $\gamma$ 分泌CD8+細胞」(E7ペプチドで再刺激後)の両方が検出できた。このことは、潜在的な抗腫瘍応答が惹起されたことを示す(図19C)。

#### 【0119】

(実施例16-組織学的分析)

40

組織学的レベルでの光感受性ウイルス様ナノ粒子(例えば、IR700色素に結合体化した、改変体HPV16/31L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様ナノ粒子)の効果、マウス異種移植片モデルを使用して評価した。簡潔には、 $1.5 \times 10^6$  92.1ぶどう膜黒色腫細胞を、nu/nuマウスの後方側腹部の皮下空間に移植した。上記腫瘍を約200mm<sup>3</sup>に到達させ、その時点で、上記動物を、200 $\mu$ gの光感受性ウイルス様ナノ粒子の静脈内注射で処置した。光感受性ウイルス様ナノ粒子の注射の12時間後、その腫瘍部位を50J/cm<sup>2</sup>の690nm近赤外線照射した。さらに24時間後、上記動物を安楽死させ、その腫瘍組織を摘出し、ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋し、標準的な組織学検査のために加工処理した。

#### 【0120】

50

ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）の画像から、未処置コントロール（画像は示さず）と比較した場合、大きな壊死の程度が明らかになった。光感受性ウイルス様ナノ粒子およびレーザーで処置した腫瘍は、そのコントロール腫瘍と比較した場合、淡い外見を有した。より高倍率で検査した際には、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子で処置した腫瘍の細胞は、上記コントロール処置腫瘍と比較して、細胞質の劇的な喪失を示した。さらに、壊死の程度は、腫瘍全体を網羅し、NIR光が腫瘍組織の深さ全体を貫通するという結論をもたらした。

【0121】

（実施例17 - ぶどう膜黒色腫の同所異種移植片モデルにおけるウイルス様ナノ粒子活性）

10

眼の最も一般的な原発性悪性疾患は、ぶどう膜黒色腫（UM）である。米国では1年に約2,000名の患者が存在し、欧州ではより頻度が高く出現する。UMにはいくつかの処置選択肢があるとはいえ、腫瘍増殖を信頼性高く制御し、視力を保ち、照射関連の副作用の出現を最小限にする処置はない。

【0122】

ウイルス様ナノ粒子光線療法（PT）は、薬物および光活性化の両方の投与を要する2段階プロセスを伴う新規な分子標的化癌治療である。ウイルス様ナノ粒子PTの薬物部分は、光増感剤として作用する近赤外線（NIR）フタロシアニン色素であるIRDye（登録商標）700 DXに結合体化した光感受性ウイルス様ナノ粒子（NP）であり、

20

続いて、原発性ぶどう膜黒色腫を有する成体を処置するために設計された非熱性のNIR光が印加される。

【0123】

最新の研究では、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子の抗癌活性を、ぶどう膜黒色腫の同所異種移植片モデルにおいて評価した。このモデルにおいて、ヒトぶどう膜黒色腫細胞を、免疫抑制したウサギの脈絡膜腔へと移植し、増殖させた。眼底検査によって腫瘍が観察可能になった場合、上記動物を、処置群もしくはコントロール群に割り当てた。両方の場合に、進行性の腫瘍増殖もしくは処置への応答に関して、上記動物を眼底検査および超音波で追跡した。研究の終了後、腫瘍を有する眼もまた、肉眼でおよび組織病理学によって検査した。

【0124】

30

この研究を、92.1ぶどう膜黒色腫細胞株を移植した計20匹のウサギを使用して行った。全体で、20匹の動物のうち11匹が腫瘍を発生させた。2匹の動物は、処置前の追跡期間の間に予測外にも死亡した；これら動物を未処置コントロールとして使用した。いくつかの動物は、レーザー照射されない眼外腫瘍（extra-ocular tumor）を有した；これらは、内部コントロールとして使用した。前眼房に腫瘍を有する動物を、研究から排除した。

【0125】

全ての処置した腫瘍は、コントロール動物と比較して、眼底検査、肉眼での病理学および組織病理評価によって実証される大きな腫瘍応答を示した。腫瘍に隣接する網膜組織は、上記処置によって影響を受けなかった。

40

【0126】

結論として、光感受性ウイルス様ナノ粒子投与およびレーザー投与の後に認められる腫瘍応答および壊死の程度に基づいて、本明細書で提供される処置方法論は、ぶどう膜黒色腫腫瘍の処置のために使用され得る。

【0127】

研究スケジュール：2つの処置群：1）完全腫瘍処置；2）処置なし。

【0128】

## 【表 3】

表3

動物の到着	2014年4月22日、23日
腫瘍細胞移植	2014年4月29日、30日
処置開始	2014年5月20日、5月27日、6月3日
研究終了	2014年6月24日
報告書草案	2014年7月25日

## 【0129】

(方法および実験デザイン)

(試験システム)

10

## 【0130】

## 【表 4】

表4

種:	ウサギ
系統:	ニュージーランドアルビノ
頭数および性別	
注文総数:	20
研究において提案された総数:	20
性別:	F
受け取り時年齢:	6ヶ月齢
供給元:	Charles River
同定:	RFID およびイヤータグ

20

## 【0131】

(モデル)

(細胞培養)

ヒトぼう膜黒色腫細胞株92.1(Dr. Jerry Y. Niederkorn, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TXの厚意による)を、完全培養培地(RPMI-1640と10%ウシ胎仔血清、100U/mLペニシリンG、250ng/mLアンホテリシンB、および100μg/mLストレプトマイシン溶液)中で、37、5%CO<sub>2</sub>中で培養した。

30

## 【0132】

(動物および免疫抑制の誘発)

平均初期体重約3kgのニュージーランドアルビノウサギを、この研究に使用した。上記ウサギを、シクロスポリンA(CsA; Sandimmune 50mg/mL; Novartis Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA)を毎日皮下注射することで免疫抑制した。CsA投与を実験の間中維持して、自発的腫瘍退縮を防止した。投薬スケジュールは、15mg/kg/日を細胞接種前に3日間およびその後4週間、続いて、実験が終了するまで10mg/kg/日であった。投与量を、獣医師の裁量でさらに減らした。CsA用量を、各動物の体重に従って毎日調節した。その体重を毎日測定し、ウサギが飼育されている部屋に掲示しておいた。

40

## 【0133】

追跡の間に、上記動物を、CsA毒性の徴候(例えば、歯肉肥大、流涎、下痢、および体重減少)に関して毎日モニターした。上記動物がCsA毒性の初期徴候(例えば、食欲不振)を示した場合、支持管理(supportive management)(例えば、食欲刺激薬および消化管運動促進剤(GI motility enhancer)のために直ぐに動物スタッフに相談した。注射用量の調節もまた、獣医の推奨に従って考慮した。

50

## 【 0 1 3 4 】

(細胞移植)

C s A 処置後 3 日目に、ケタミン ( 4 0 m g / k g ) およびキシラジン ( 6 m g / k g ) を筋肉注射することで、上記動物を麻酔した。麻酔後、1 ~ 3 滴の 0 . 5 % 塩酸プロパラカインを右眼に適用し、容積 1 0 0 μ l 懸濁物中で  $1 . 0 \times 1 0 ^ 6$  9 2 . 1 ヒトぶどう膜黒色腫細胞を、ペントカニユーレを使用して、上記ウサギの右眼の上脈絡膜腔に注射した。簡潔には、滅菌布を眼の上にかけて、毛もしくは睫毛でのいかなる汚染をも回避し、結膜を 1 0 % ベタジン溶液できれいにした。次に、眼筋の下で縫合糸を使用して、眼を前方に回転させ、結膜切開後に、強膜切開を縁から約 1 0 m m のところで行った。次いで、カニユーレを、強膜切開へ挿入し ( その長さの 1 / 3 ~ 1 / 2 )、上記細胞 (  $1 . 0 \times 1 0 ^ 6$  細胞を含む 1 0 0 μ L ) を、上脈絡膜腔に注射した。ニードルをゆっくりと引っ込め、強膜切開を閉じる縫合糸を締めて、注射部位での最小限の灌流を保証した。抗生物質点眼液 ( エリスロマイシン軟膏剤 ) を一滴、手術創に塗布して感染を防止した。

10

## 【 0 1 3 5 】

(飼育、飼料、水、および環境条件、馴化)

上記動物を、6 つの群で集団で飼育し、新しく、口当たりのよく、かつ栄養的に適した飼料を自由摂取させた。きれいで飲用に適した、かつ汚染されていない水を自由に摂取させた。環境制御を、温度  $2 2 \pm 4$  (  $6 8 \pm 5 ^ \circ F$  )、相対湿度  $5 0 \% \pm 2 0 \%$  を維持するように設定した。1 2 時間の明 / 暗サイクルを維持した。上記動物を、施設に到着後少なくとも 5 日間馴化させ、その後、ベースライン評価を行った。動物を、ベースライン眼底検査の評価後に、試験群に割り当てた。

20

## 【 0 1 3 6 】

(試験およびコントロール物品)

## 【 0 1 3 7 】

## 【表 5】

表5

正体:	PBS
貯蔵条件:	遮光して 4°C で最大 3 ヶ月まで
取扱い上の用心:	標準 PPE

30

## 【 0 1 3 8 】

## 【表 6】

表6:試験物品

正体:	IRDye(登録商標)700 DX で標識したナノ粒子
貯蔵条件:	遮光して 4°C で最大 2 ヶ月まで
取り扱い上の用心:	標準 PPE

## 【 0 1 3 9 】

## 【表 7】

表7:レーザー

出力設定:	600 mW
持続時間:	83 s
フルエンス:	50 J/cm <sup>2</sup>
スポットサイズ:	5.0 mm
波長:	690 nm

40

## 【 0 1 4 0 】

(投与製剤の調製)

試験物品を、滅菌注射用水で 1 : 1 希釈した。

50

## 【0141】

(試験/コントロール物品の投与)

投与：光感受性ウイルス様ナノ粒子もしくは生理食塩水を、硝子体の中に眼内注射によって投与した。

## 【0142】

レーザー投与：レーザー処置を、690nmの光を出力600mWで、50J/cm<sup>2</sup>の総フルエンスに関して83秒の持続時間にわたって送達するCoherent Opal Photoactivator(登録商標)レーザーで、細隙灯システムを使用して適用した。上記レーザースポットサイズを、直径5mmに設定したので、このサイズより大きい腫瘍は、スポットを重複させてレーザーをあてた。腫瘍境界の明確な区別が、眼の合併症(例えば、硝子体炎、網膜剥離)に起因して線引きできなかった場合には、疑わしい領域全体にレーザーをあてた。

10

## 【0143】

死亡率/罹患率のチェック：2匹の動物がCSA合併症(以下を参照のこと)に起因して死亡したことを除けば、全ての動物は、研究の間中ずっと良好な健康状態のままであった。

## 【0144】

臨床観察：全ての動物を、動物施設職員が毎日観察した；観察を記録した。大部分の動物は、ある程度の体重減少および食欲不振を経験し、これは、CSAに帰因した。

## 【0145】

(眼科学)

頻度：眼底検査および超音波による眼科検査を、毎週行った。

20

## 【0146】

手順：上記動物を鎮静させ、それらの右眼を、眼用の塩酸フェニレフリンおよびトロピカミド点眼を使用して拡張した。次に、眼の眼底検査を、双眼間接検眼鏡を使用して行った。眼科医は、いかなる眼の合併症でも記録した。腫瘍が同定された場合、そのサイズを、視神経円板(円板直径[DD]；1DD=約1.75mm)と比較することによって推定した。超音波読み取りに関しては、眼底検査直後に、超音波プローブを眼に適用して、眼底検査によって決定されるように上記腫瘍の位置を可視化した。超音波測定は技術的に困難であることが判明した。主な理由は、上記腫瘍のうちのいくらかは、余りに周縁に位置することから、適切に可視化できないことにあった。結果として、最大の腫瘍寸法を測定することが常に可能なわけではなかった；大部分の場合には、高さのみが定量可能であった。

30

## 【0147】

(終末手順および解剖病理学)

予定外の死亡：この研究で使用した20匹の動物のうち、1匹を、プロトコルガイドラインに従って、体重減少(到着時体重の>20%)に起因して安楽死させた。1匹の動物は、CSA毒性によって引き起こされた消化管うっ滞に起因して予測外にも死亡した。

## 【0148】

予定された安楽死：上記研究の終了時に、動物を、容認されたAmerican Veterinary Medical Association(AVMA)ガイドラインに従って安楽死させた。ケタミン-キシラジン-アセプロマジン(それぞれ、0.75mg/kg、5mg/kg、および20~35mg/kg)とブプレノルフィン(0.2mg/kg)との組み合わせを使用して麻酔をかけて上記動物から失血させた。

40

## 【0149】

(結果)

全体としては、11匹の動物が組織病理学的に明らかな腫瘍を発生させた。先に述べられたように、予測外に死亡した2匹の動物は、未処置コントロールとして使用した。種々の腫瘍サイズを有する9匹の動物には、光感受性ウイルス様ナノ粒子での処置を与えた。1匹の動物は、レーザーを当てられなかった赤道の前眼部の中に腫瘍の拡がりがあったこ

50

とから、評価に含めなかった。

【 0 1 5 0 】

眼の後ろ側に腫瘍を有し、完全処置（光感受性ウイルス様ナノ粒子＋レーザー）を受けた動物に関しては、顕著な腫瘍応答が観察され、これは、3つの要素によって特徴付けられた：1）広範な腫瘍壊死の誘発；2）びまん性から「スリーブ様パターン」への増殖パターンの変化；および3）隣接する網膜の温存。

【 0 1 5 1 】

【表 8 - 1】

表8

動物番号 & 腫瘍位置とサイズ	眼底検査および/もしくは超音波: 処置前の腫瘍の存在	眼底検査および/もしくは超音波: 処置後の腫瘍評価	肉眼検査 & 組織病理学	
3-赤道の後方に大きな腫瘍	+	腫瘍増殖停止	肉眼での病理学では全体的な壊死が一貫した眼内腫瘍  組織病理学により>50%壊死  隣接する網膜に損傷なし	10
6-赤道の後方に大きな腫瘍	+	腫瘍増殖停止	肉眼病理評価ではばらばらに分かれた眼内腫瘍  組織病理学により>70%壊死  隣接する網膜に損傷なし	20
7-赤道の後方に中程度のサイズの腫瘍	+	完全な応答	肉眼での病理学では色素がない腫瘍  組織病理学では腫瘍は見出されなかった一疑いのある領域 腫瘍位置に相当すると疑われる長さ約 8.2mm	30
9-赤道の後方に小さな腫瘍	+	完全な応答	肉眼での病理学では腫瘍なし  組織病理学では完全な応答; 隣接する網膜に損傷なし	30
10-赤道の後方に中程度のサイズの腫瘍	+	腫瘍縮小	肉眼での病理学では赤道に位置した色素がない腫瘍  肉眼での病理学では約70%壊死	40
11-赤道の後方に小さな腫瘍	+	完全な応答	肉眼もしくは組織病理学では腫瘍なし	
15-赤道の後方に大きな腫瘍	+	処置した小節の完全な応答 周辺腫瘍の部分的壊	周辺に位置した、肉眼での病理学では色素がない腫瘍および眼の後	

【 0 1 5 2 】

【表 8 - 2】

		死	方にさらなる隣接した腫瘍小節  組織病理学によれば、処置した小節が存在した腫瘍はないことが明らかになった。あまりにも周辺にあった他の領域は、レーザーが完全に到達するのは困難であった。腫瘍の頂点においてある程度の壊死を示す。	10
16-赤道の後方に腫瘍	+	完全な応答	肉眼での病理学の際に同定された色素がない小節  組織病理学によれば腫瘍なし; 上記腫瘍が位置したと考えられる領域において約 1.5 mm の寸法がある瘢痕 (線維症および炎症)	20
19-赤道の後方に大きな腫瘍	+	腫瘍増殖停止	肉眼での病理学では大きな腫瘍、ばらばらに分かれた/壊死の外見を伴う  広範な壊死, スリーブ様パターン	30

## 【 0 1 5 3 】

(未処置コントロール)

ウサギ # 14 を、受容不能な体重減少 (初期体重の > 20%) に起因して 4 週目に安楽死させた。腫瘍の存在に関する眼底検査は、広範な出血および網膜剥離に起因して結論に達しなかった。この動物は、処置を受けなかった。

## 【 0 1 5 4 】

超音波：このウサギは、死亡のタイミングに起因して、超音波検査を受けなかった。

## 【 0 1 5 5 】

肉眼 / 組織病理学：肉眼での病理学では、高さ (H) が 3 mm × 最大腫瘍寸法 (LTD) 8 mm の寸法の眼内腫瘍、および組織病理学では 2 . 2 mm (H) および 9 . 5 (最大腫瘍寸法) の寸法の眼内腫瘍に注目した。肉眼での病理学では、1 . 4 mm (高さ) および 9 . 4 mm (最大腫瘍寸法) の寸法の眼外腫瘍に注目した。眼内腫瘍および眼外腫瘍の両方のうちの約 10% は、壊死していた。スリーブパターンは検出されなかった。

## 【 0 1 5 6 】

(完全処置)

(ウサギ 9)

ウサギ # 9 は、4 週目に、眼底に約 1 DD サイズの臨床的に検出可能な腫瘍を有し、これを直ぐに処置した。翌週、上記腫瘍は、0 . 5 DD と推定された。6 週目には、上記腫瘍は、< 0 . 5 DD で推定され、最終週では、検出されなかった。

## 【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

超音波：超音波は、3週目に腫瘍を識別しなかったが、4週目には、1.04 mm（高さ）の寸法の塊が同定された。その後の数週間で、超音波での測定値は、6週目以降にはもはや見えなくなるまでに退縮した。

【0158】

肉眼／組織病理学：組織病理学によれば、腫瘍も細胞も明らかにならなかった。しかし、眼全体の連続切片および免疫組織化学結果は、この結果をさらに確認するために保留されている。

【0159】

（ウサギ6）

4週目に、腫瘍の臨床上の疑義があった（網膜の下に増大した塊）が、網膜下出血、流体、および網膜剥離は、実験の継続時間にわたって臨床サイズ推定を妨げた。

【0160】

超音波：超音波によって、3週目に、4.88 mmの大きな塊が検出され、これは、4週目には5.29 mmにまで増殖し、この時点で、本発明者らは処置を開始した。5週目には、上記腫瘍は4.88 mmの寸法になったが、6週目および7週目には、上記腫瘍はそれぞれ、4.02 mmおよび4.98 mmの寸法になった。

【0161】

肉眼／組織病理学：肉眼での病理学では、2つの明確な腫瘍が同定された：眼内腫瘍および結膜腫瘍（後者は、細胞移植の間の灌流の結果であると疑われた）。結膜腫瘍の位置のせいで、それは処置されなかったので、本発明者らは、それを内部コントロールとみなす。上記眼内腫瘍はばらばらに分かれ、7 mm（H）×11 mm（LTD）の寸法であった。6 mm（H）×9 mm（LTD）の寸法の眼外への拡がりもまた、同定され、これは、特徴的なテクスチャを有した。組織病理学では、上記眼内腫瘍は、4.9 mm（H）×8.3 mm（LTD）の寸法であり、>70% 壊死であり、残りの生細胞の大部分は、前述のスリーブ様パターンを形成した。処置されなかった結膜腫瘍は、遙かに少ない壊死（約15%）を示し、上記スリーブパターンは明らかでなかった。

【0162】

この研究の目的は、ウサギの眼におけるぶどう膜黒色腫の同所異種移植片モデルで、光感受性ウイルス様ナノ粒子＋NIR光の活性を調査することであった。光感受性ウイルス様ナノ粒子＋レーザー処置を受けた全ての腫瘍は、上記処置に好都合に応答した。これは、処置に対する応答および完全な組織病理学的応答として、明らかな腫瘍収縮を有した小～中程度の腫瘍に関して特に明らかである。例えば、4週目に小さな腫瘍を示したウサギ9では、その腫瘍は、上記処置の最初の2用量によって完全に根絶され、上記第2の処置の2週間後には、臨床的にも組織病理学的にももはや検出可能でなかった。より大きな腫瘍、例えば、ウサギ4では、その腫瘍の大部分は壊死しており、これは、腫瘍容積のうちの約10%において壊死を示したに過ぎなかった未処置コントロール（ウサギ14）とは全く対照的である（上記処置の効力の明らかな指標）。さらに、眼内腫瘍を有し、完全処置を受けたいくつかの動物は、眼外への拡がりを有したが、レーザーを当てられなかった；これらの部分は、処置された腫瘍の部分より実質的に少ない壊死を示した。このことは、ぶどう膜黒色腫の処置に関するレーザー活性化光感受性ウイルス様ナノ粒子の効力を裏付けるさらなる証拠である。腫瘍に隣接する網膜領域は、上記処置によって影響を受けなかった。

【0163】

処置後の眼内腫瘍応答に基づいて、特に、コントロール（未処置、眼外部分）と比較すると、本明細書で提供されるデータは、眼内黒色腫の処置に関して、腫瘍の存在下で光感受性ウイルス様ナノ粒子の選択的かつ強力な抗癌活性を裏付ける。

【0164】

（実施例18 - HPV L1 対 BPV L1を比較するインビトロ有効性アッセイ）

光感受性ウイルス様ナノ粒子（例えば、IR700色素に結合体化した、改変体HPV 16/31 L1タンパク質とHPV L2タンパク質との組み合わせを含むウイルス様

10

20

30

40

50

ナノ粒子)の有効性を、インビトロ細胞死滅アッセイによってアッセイした。ぶどう膜黒色腫細胞(例えば、細胞株OCM-1もしくは92.1)を、EDTAおよびトリプシンの溶液を使用して慣用的な方法によって採取した。組織培養プラスチックからいったん除去されたら、上記細胞を完全増殖培地中に懸濁し、約30分間、37℃で回復させた。この回復期間の間に、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子の段階希釈を、PBS+2%ウシ胎仔血清中、約1/2 log増分(2000 pM、600 pM、200 pM、60 pM、20 pM、6 pM、2 pMおよび0.6 pM)で行った。回復期間の後に、上記細胞を計数し、遠心分離し、PBS+2% FBS中に細胞密度 $3 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように懸濁した。等容積の細胞懸濁物を、上記ウイルス様ナノ粒子希釈物に添加して、適切な濃度(1000 pM、300 pM、100 pM、30 pM、10 pM、3 pM、1 pMおよび0.3 pM)のウイルス様ナノ粒子の中に $1.5 \times 10^6$ 細胞/mlを得た。これら条件(例えば、360  $\mu\text{l}$ )を、約1.5~2時間にわたって氷上でインキュベートした。

10

#### 【0165】

このインキュベーション後、チューブを遠心分離して、上記細胞を集め、その細胞をその後、光感受性ウイルス様ナノ粒子なしで、PBS+2% FBSで2回洗浄した。最後の遠心分離後に、上記細胞を、200  $\mu\text{l}$ のPBS+2% FBS中で懸濁した。100  $\mu\text{l}$ の各サンプルを取り出し、96ウェル、1/2面積プレート(1/2 area plate)のウェルに移した。次いで、各サンプルを、Coherent Opal Photoactivator眼科用レーザーを使用して $25 \text{ J/cm}^2$ (600 mW, 43秒)の近赤外線(689 nm)で照射した。照射後、次いで、上記細胞サンプルを新しいチューブに移した。光を照射したサンプルおよび照射しなかったサンプルの両方とも、37℃でさらに1~2時間置いた。

20

#### 【0166】

このインキュベーションの後に、最終20  $\mu\text{l}$ の細胞サンプルを、1:1でAOPIC染色(アクリジンオレンジおよびヨウ化プロピジウム)と混合し、上記細胞の生存性を、Nexcelom Cellometer Auto 2000を使用して評価した。図20は、最大半量有効濃度(EC50)(BPVL1=88 pm; HPV L1=60.5 pm)で、細胞生存性に対するBPVL1およびHPV L1の匹敵する効果を示す。このことは、上記光感受性分子の有効性が互いに匹敵することを示す。

30

#### 【0167】

図21は、光感受性ウイルス様ナノ粒子結合に関して分析した図20に記載される死滅アッセイの細胞のサンプルを示す。死滅アッセイの細胞を、Odyssey Clxゲル/プレートスキャナーでスキャンした。上記Odyssey Clxは、一連の赤外色素(IR700色素(例えば、IRDye(登録商標)700DX)が挙げられる)の検出および定量のために特有に設計されている。従って、このアッセイにおいて、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子の異なる濃度で処理された細胞は、上記細胞と関連した蛍光の濃度依存的な量を示す。このことは、上記細胞がBPV-L1-IR700およびHPV-L1-IR700の両方に結合したことを示す。

40

#### 【0168】

(実施例19 - 頭頸部癌の異種移植片モデルにおける光感受性ウイルス様ナノ粒子の活性)

頭頸部癌細胞を、nu/nuマウスの背側側腹部に移植した。腫瘍を2週間増殖させた。上記腫瘍がいったん平均サイズ $150 \text{ mm}^3$ に達したら、上記動物を、以下のように6つの研究群に無作為化した(7匹の動物/群):生理食塩水;光感受性ウイルス様ナノ粒子(HPV16/31 L1/L2; 200  $\mu\text{g}$ 用量);生理食塩水+NIR光( $50 \text{ J/cm}^2$ );光感受性ウイルス様ナノ粒子(200  $\mu\text{g}$ 用量)+NIR光( $50 \text{ J/cm}^2$ );光感受性ウイルス様ナノ粒子(100  $\mu\text{g}$ 用量)+NIR光( $50 \text{ J/cm}^2$ );および光感受性ウイルス様ナノ粒子(50  $\mu\text{g}$ 用量)+NIR光( $50 \text{ J/cm}^2$ )。投与およびNIR光処置を3日ごとに行った。腫瘍測定値を、3~5日ごとに記録した。

50

## 【0169】

上記コントロールは全てそれらそれぞれの処置に対して実質的效果を何ら示さなかった一方で、有意な腫瘍増殖阻害が、投与群の全てにおいて観察された(図22)。観察された腫瘍増殖阻害は、用量依存性であった。高用量群では、腫瘍応答があった。200 µg 処置群において2匹の動物が死亡し、これは、広範に及ぶ細胞死および潜在的には腫瘍溶解症候群関連毒性と関連した。

## 【0170】

(実施例20 - 光感受性ウイルス様ナノ粒子の生成)

本開示の光感受性ウイルス様ナノ粒子を生成するために、HEK293Fを懸濁培養で増殖させ、L1(もしくはL1およびL2)キャプシドタンパク質をコードするバイシストロン性プラスミドDNAで一過性にトランスフェクトした。これは、プロトキャプシド(proto-capsid)(Buck et al. Current Protocols in Cell Biology 26.1.1-26.1.19, December 2007で記載されるとおり)の形成を誘発する。細胞塊回収および破壊の後に、プロトキャプシドにベンゾナーゼ処置を行って、宿主DNA夾雑物を排除し、その後、インビトロでの成熟プロセスを行って、結合体化に安定なウイルス様ナノ粒子を形成した。精製後に、上記ウイルス様ナノ粒子を、IR700 NHSエステルと化学的に結合体化させて、上記光感受性ウイルス様ナノ粒子を生成した。図23は、生成プロセスの模式図を示す。

10

## 【0171】

この実施例で記載されるプロセスから生成された光感受性ウイルス様ナノ粒子を、SDS-PAGE、SE-HPLCおよびDLSを使用して特徴付けたところ、純度90~95%を示す。HEK293細胞由来のヒストンは、上記ウイルス様ナノ粒子組成の一部として存在し、上記ウイルス様ナノ粒子の総タンパク質のうちの10~15%を構成する。

20

## 【0172】

## 【化 1】

## 配列

改変体HPV16/31 L1タンパク質ヌクレオチド配列(配列番号1)

ATGAGCCTGTGGCTGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCCGTGAGCAAGGT  
GGTGAGCACCGACGAGTACGTGGCCAGGACCAACATCTACTACCACGCCGGCACCAGCAGGC  
TGCTGGCCGTGGGCCACCCCTACTTCCCCATCAAGAAGCCCAACAACAACAAGATCCTGGTG  
CCCAAGGTGAGCGGCCTGCAGTACAGGGTGTTTCAGGATCCACCTGCCCCGACCCCAACAAGTT  
CGGCTTCCCCGACACCAGCTTCTACAACCCCGACACCCAGAGGGTGGTGTGGGCCTGCGTGG  
GCGTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCCGTTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGCTGAAC  
AAGCTGGACGACACCGAGAACGCCAGCGCCTACGCCGCCAACGCCGGCGTGGACAACAGGG  
AGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGATCGGCTGCAAGCCCCCCTC  
GGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCCTGCACCAACGTGGCCGTGAACCCCGGCGACTGCC  
CCCCCTGGAGCTGATCAACACCGTGTCCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGCTTCGGCG  
CCATGGACTTCACCACCCTGCAGGCCAACAAAGAGCGAGGTGCCCTGGACATCTGCACCAGC  
ATCTGCAAGTACCCGACTACATCAAGATGGTGTGAGCGAGCCCTACGGCGACAGCCTGTTCTTC  
TACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTTCGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCGCCGTGGGCGA  
GAACGTGCCACCGACCTGTACATCAAGGGCAGCGGCAGCACCCGCCACCCTGGCCAACAGCA  
ACTACTTCCCCACCCCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCCAGATCTTCAACAAGCCC  
TACTGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGCTGGGGCAACCAGCTGTTTCGT  
GACCGTGGTGGACACCACCAGGAGCACCAACATGAGCCTGTGCGCCGCCATCAGCACCCAGCG  
AGACCACCTACAAGAACACCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGAGTACGACCT  
GCAGTTCATCTTCCAGCTGTGCAAGATCACCTGACCCGCCGACGTGATGACCTACATCCACAG  
CATGAACAGCACCATCCTGGAGGACTGGAACCTTCGGCCTGCAGCCCCCCCCCGGCGGCACCC  
TGGAGGACACCTACAGGTTTCGTGACCAGCCAGGCCATCGCCTGCCAGAAGCACACCCCCCCC  
GCCCCCAAGGAGGACCCCTGAAGAAGTACACCTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTT  
CAGCGCCGACCTGGACCAGTTCCCCCTGGGCAGGAAGTTCTCTGCTGCAGGCCGGCCTGAAGG  
CCAAGCCCAAGTTCACCCTGGGCAAGAGGAAGGCCACCCCCACCACCAGCAGCACCCAGCACC  
ACCGCCAAGAGGAAGAAGAGGAAGCTGTGA

10

20

【 0 1 7 3 】

【化2】

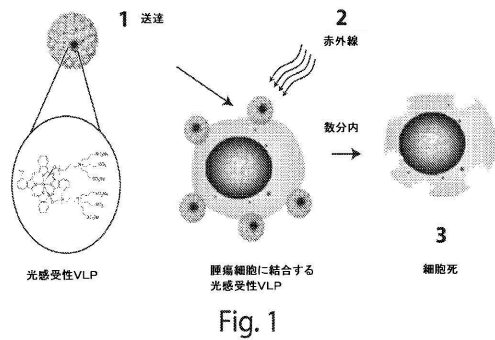
BPV1 L1ヌクレオチド配列(配列番号2)

ATGGCCCTCTGGCAGCAGGGGCAGAACTCTACCTGCCACCCACACCCGTGTCAAAAAGTCCT  
 GTGTTCCGAGACATACGTCCAGCGGAAGTCAATCTTCTACCACGCCGAGACCGAAAGGCTCC  
 TCACCATCGGCCACCCCTACTACCCCGTCAGCATTGGCGCTAAGACCGTGCCCAAAGTCTCCG  
 CCAACCAATACCGCGTGTTC AAGATCCAGCTGCCCGACCCAAACCAGTTCGCCCTGCCCGATC  
 GCACCGTGCATAACCCCTCCAAGGAAAGACTCGTCTGGGCGTGATCGGCGTCCAAGTCTCA  
 CGGGGCCAACCCCTGGGCGGCACCGTGACCGGCCATCCAACCTTCAACGCCCTCCTGGACGC  
 CGAGAACGTCAACCGGAAAGTCACAACACAAACCACCGACGATCGCAAGCAGACCGGGCTG  
 GACGCCAAACAGCAGCAAATCCTCCTCCTGGGGTGCACACCCGCTGAGGGCGGACTACTGGAC  
 CACCGCTCGGCCCTGCGTGACCGACAGGCTGGAGAACGGGGCTTGTCCCCCTGGAGCTGA  
 AGAATAAGCATATCGAGGACGGCGACATGATGGAGATCGGCTTCGGCGCCGCTAACTTCAAG  
 GAGATCAACGCCCTCAAGAGCGACCTGCCCTGGATATCCAGAACGAAATTTGTCTCTATCCC  
 GATTATCTGAAGATGGCCGAAGATGCCGCCGGCAACTCAATGTTTTTCTTCGCCCGCAAGGAG  
 CAAGTCTACGTGCGGCATATTTGGACACGGGGCGGGAGCGAAAAGGAGGCTCCCACAACCG  
 ACTTCTACCTGAAAAACAACAAGGGCGACGCTACACTGAAGATCCCATCCGTCCACTTCGGC  
 TCCCCATCCGGGAGCCTCGTCAGCACCGACAACCAGATCTTCAACAGACCATATTGGCTGTTT  
 AGGGCTCAAGGGATGAATAACGGCATCGCTTGAACAACCTGCTCTTCTGACCGTCGGCGA  
 TAACACCAGGGGCACCAACCTGACAATCTCCGTGGCTAGCGACGGCACACCCCTGACCGAAT  
 ACGACTAAGCAAGTTTAACTGTATCACCGGCACATGGAGGAGTACAAACTGGCTTTCATC  
 CTGGAACTGTGTAGCGTCGAGATTACCGCCAGACCGTCAGCCACCTCCAGGGCCTGATGCC  
 AAGCGTCTGGAGAACTGGGAGATCGGCGTCCAACCACCAACAAGCAGCATCCTGGAAGATA  
 CATAACAGATACATCGAAAGCCCCGCCACCAAGTGCGCCTCAAACGTGATCCCCGCCAAGGAG  
 GATCCCTACGCCGCTTCAAATCTGGAATATCGACTGAAGGAGAACTGAGCCTCGATCT  
 GGACCAGTTCCTACTCGGCCGGCGTTCTGGCCCAACAGGGCGCTGGCTGCAGCACCGTCC  
 GGAAGAGGCGGATCTCAGAAAAGACCAGTTCCAAACCCGCCAAGAAGAAGAAGTAG

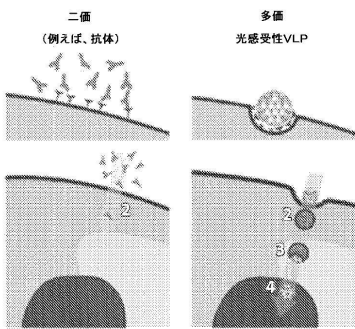
10

20

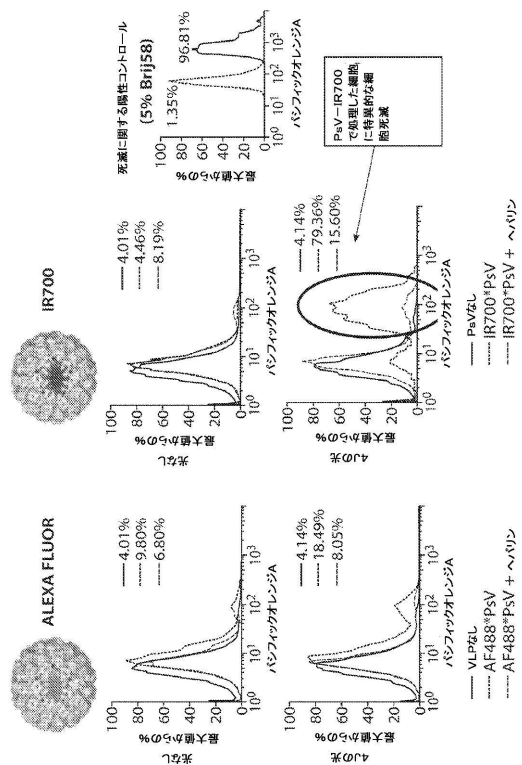
【図1】



【図2】



【図3】



【 図 4 】

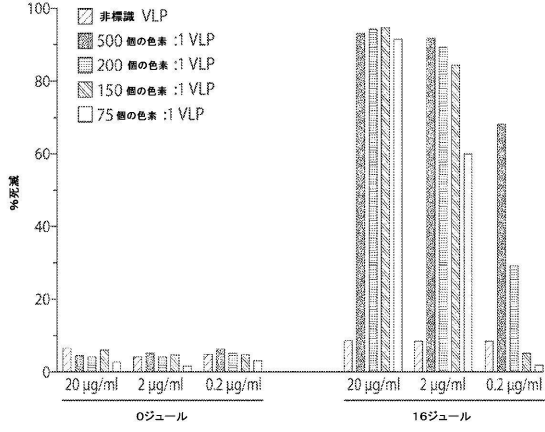


Fig. 4

【 図 5 】

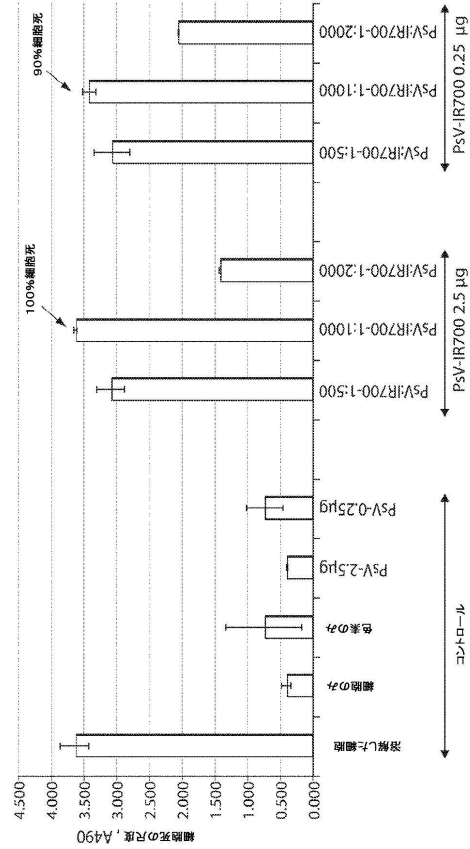


Fig. 5

【 図 6 A 】

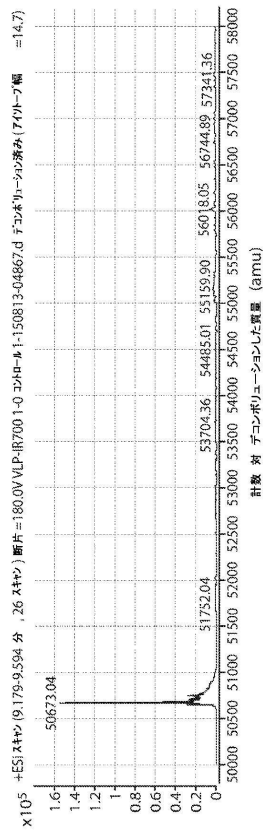


Fig. 6A

【 図 6 B 】

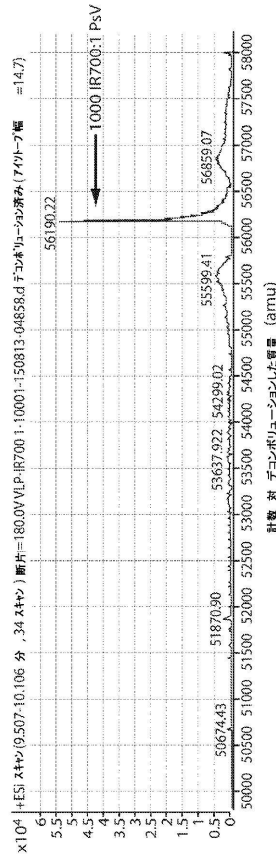


Fig. 6B

【 図 7 】

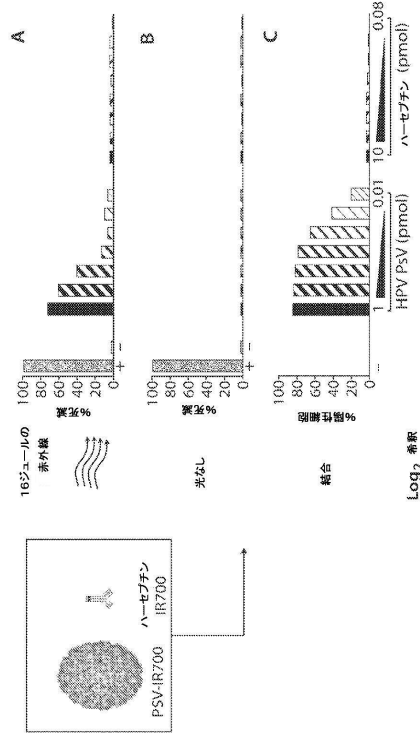


Fig. 7

【 図 8 】

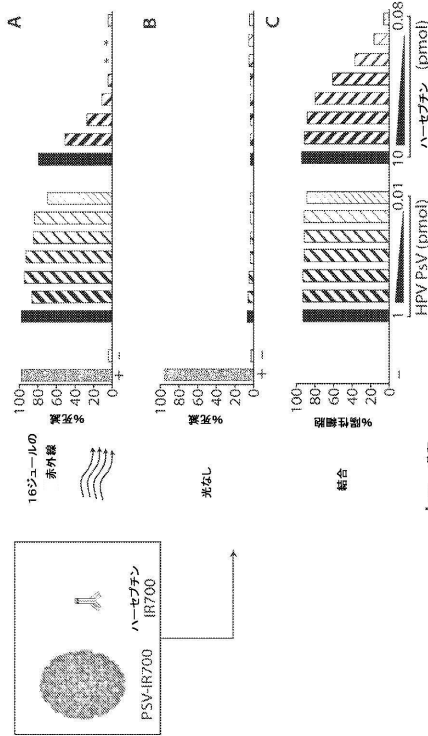


Fig. 8

【 図 9 】

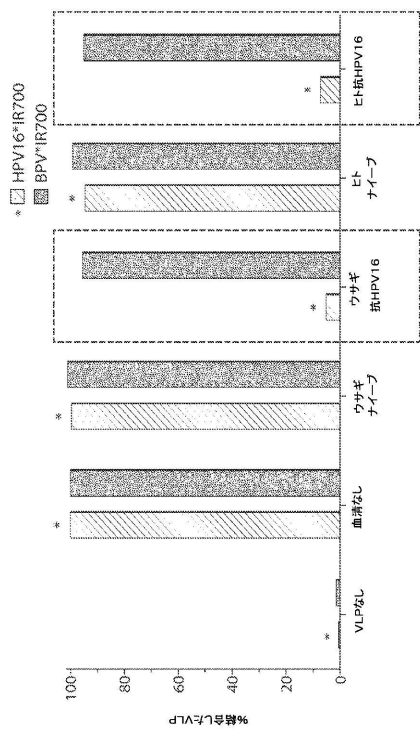


Fig. 9

【 図 10 A 】

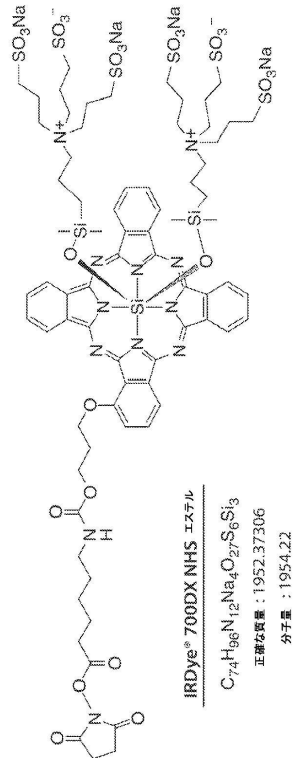
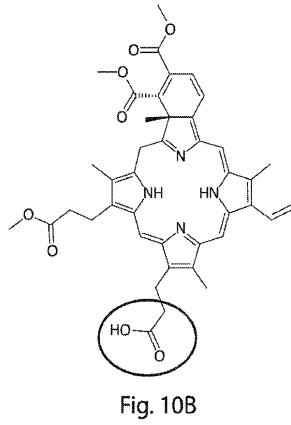


Fig. 10A

【 図 1 0 B 】



【 図 1 1 】

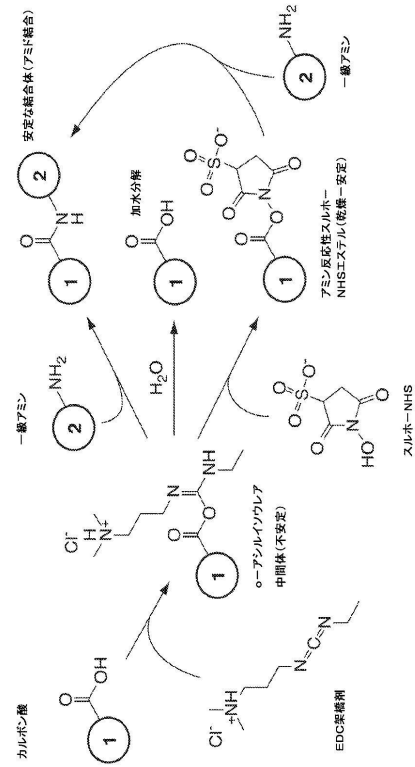


Fig. 11

【 図 1 2 】

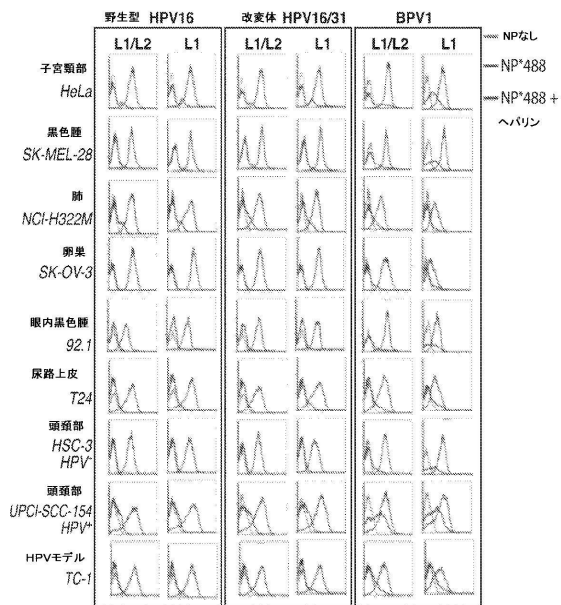


Fig. 12

【 図 1 3 】

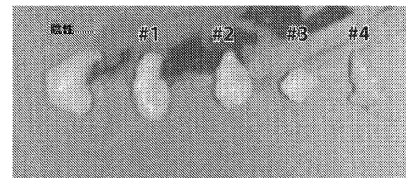


Fig. 13A

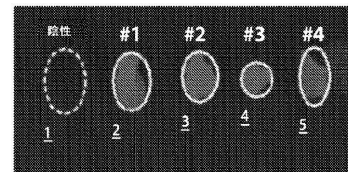


Fig. 13B



【図17B】

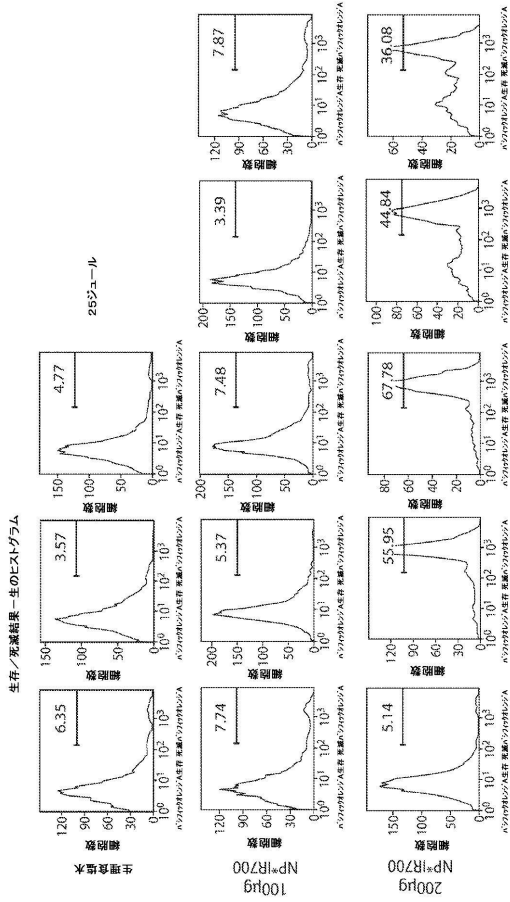
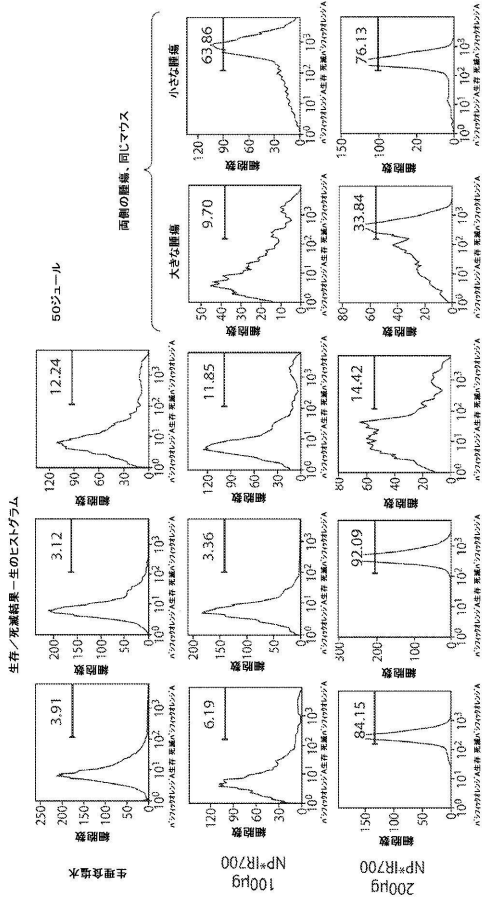


Fig. 17B

【図17C】



このマウスは間違えて注射した (mis-injected) (アウトライヤーは考慮しなかった)

Fig. 17C

【図18】

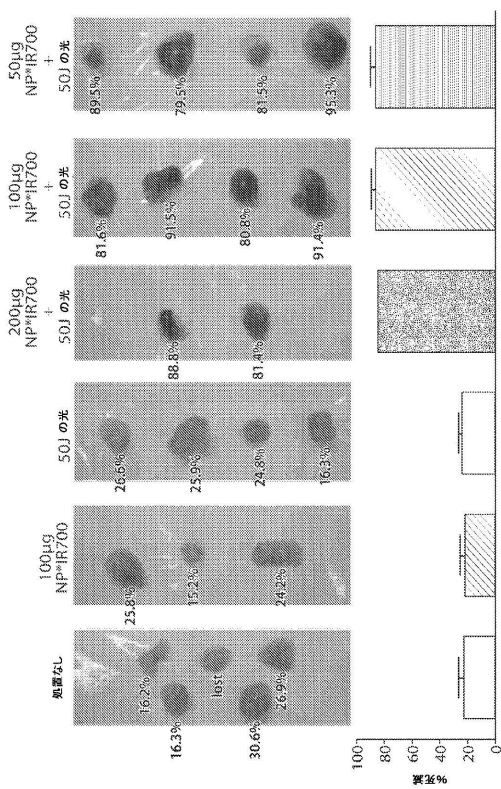


Fig. 18

【図19A】

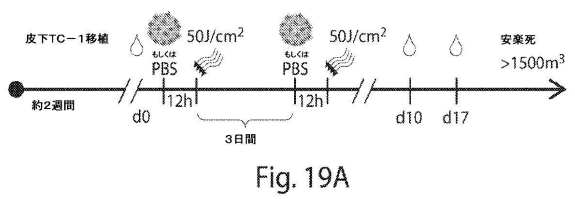


Fig. 19A

【図19B】

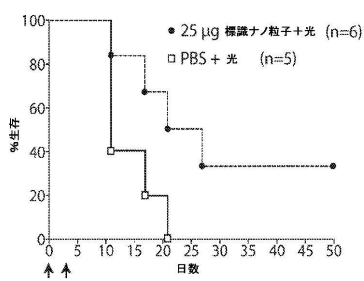


Fig. 19B

【 図 19C 】

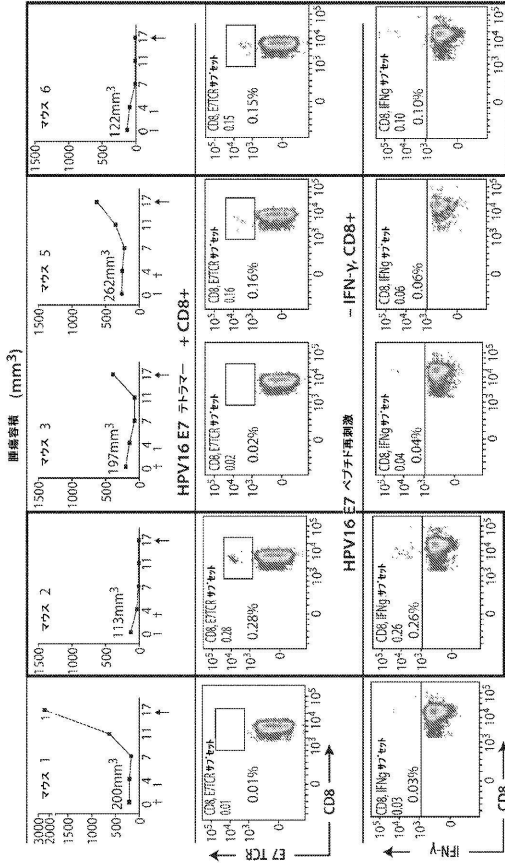


Fig. 19C

【 図 20 】

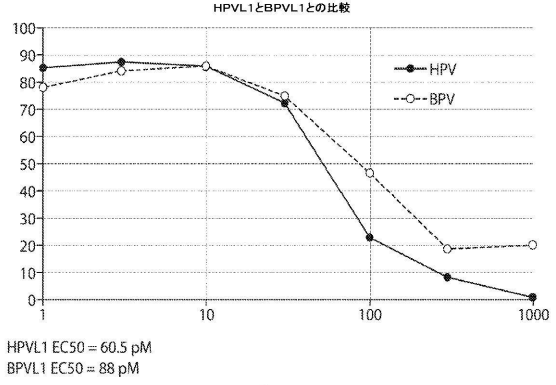


Fig. 20

【 図 21 】

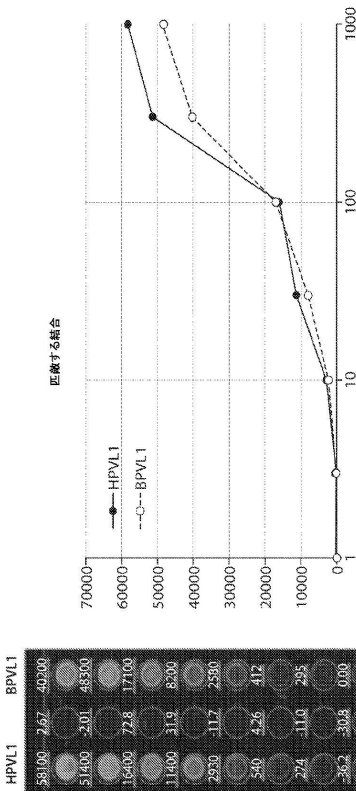


Fig. 21

【 図 22 】

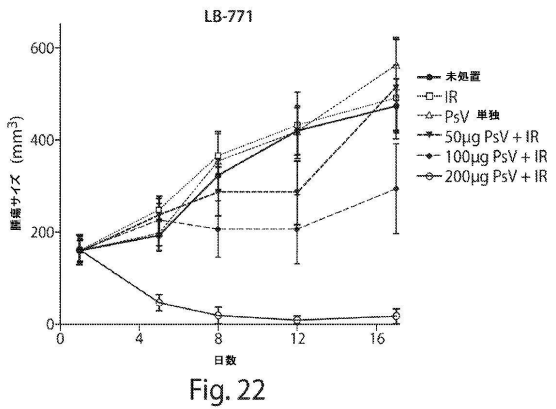


Fig. 22

【 図 2 3 A 】

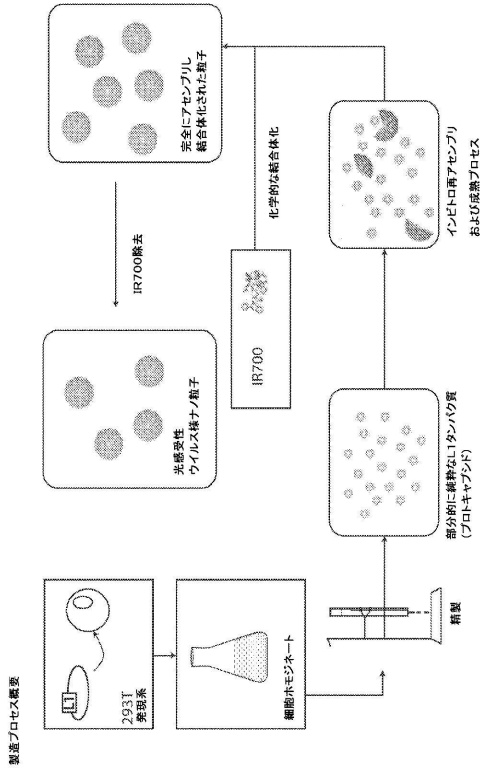


Fig. 23A

【 図 2 3 B 】

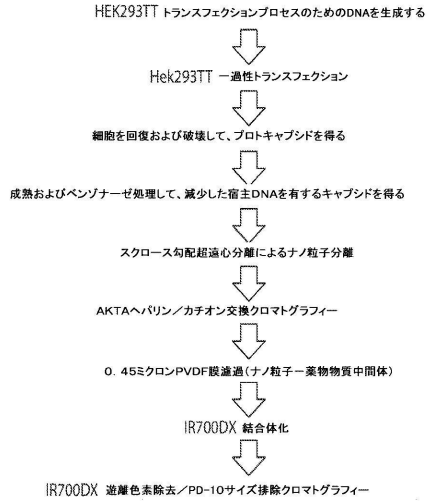


Fig. 23B

【 配 列 表 】

0006444417000001 . 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 31/409	(2006.01)	A 6 1 K	31/409
C 0 7 K 14/025	(2006.01)	C 0 7 K	14/025 Z N A
C 1 2 N 15/37	(2006.01)	C 1 2 N	15/37

(73)特許権者 508285606

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス  
アメリカ合衆国, メリーランド 20892-7660, ベセスダ, エグゼキュティブ プールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 デ ロス ピノス, エリザベット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, フリーマン ストリート 201, エー6

(72)発明者 シラー, ジョン ティー.

アメリカ合衆国 メリーランド 20895, ケンジントン, デューマー レーン 9630

(72)発明者 キンズ, ロンダ シー.

アメリカ合衆国 メリーランド 20906, シルバー スプリング, マハン ロード 4510

(72)発明者 マクドゥーガル, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02043, ヒンガム, キムボール ビーチ ロード 46

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第2008/140961(WO, A1)

特表2005-527493(JP, A)

特表2012-523455(JP, A)

米国特許出願公開第2013/0115247(US, A1)

国際公開第2013/119877(WO, A1)

特表2009-532564(JP, A)

Stephanopoulos, N., et al., Dual-Surface Modified Virus Capsids for Targeted Delivery of Photodynamic Agenets to Cancer Cells, ACS-NANO, 2010年, 4(10), 6014-6020

Shiwen, P., et al., Construction and Production of Fluorescent Papillomavirus-like Particles, Journal of Tongji Medical University, 1999年, 19(3), 170-174

Rhee, JK, et al., Glycan-Targeted Virus-like Nanoparticles for Photodynamic Therapy, Biomacromolecules, 2012年, 13(8), 2333-2338

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00-08

C12N 15/00-90

C07K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)