

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-500313

(P2017-500313A)

(43) 公表日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 6 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-539042 (P2016-539042)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月9日 (2014.12.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月9日 (2016.8.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/069406
 (87) 国際公開番号 W02015/089114
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)
 (31) 優先権主張番号 61/913,787
 (32) 優先日 平成25年12月9日 (2013.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516171975
 ブレット バイオテクノロジー, インコーポレーテッド
 BULLET BIOTECHNOLOGY, INC.
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94025、メンロー パーク、アラメダ デラス プルガス 3815
 3815 Alameda De Las Pulgas, Menlo Park, CA 94025 (US)

(74) 代理人 100109634
 弁理士 舩谷 威志
 (74) 代理人 100129263
 弁理士 中尾 洋之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的ウイルス様粒子-C p Gオリゴヌクレオチドワクチンおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、C p Gオリゴヌクレオチドが付加したV L Pを唯一の活性成分として含有し、かつ非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤を含有するワクチンと、その使用とを提供する。本発明はさらに、C p Gオリゴヌクレオチドを有したV L Pと、1つまたは複数の非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤とからなるワクチンを含有する医薬組成物、およびそれとの治療剤混和物ならびにその使用を提供する。

【選択図】 図 1

FIG. 1

```
Hep B Core
MDLDFYKRFQAVVLLSLPLSPDFPSVRLLDLRAALYRDALESPEKCSPHHTALRQALLCGSLTATWV
INWEDPASNLDLVSVYVNVNGLKFRQLWFWNWSCTLPSKSTVLMZLVSGVWIRTPAVRFRPHFLLSLPET
TVV

Hep B Core
ATGGCAATTGATCCITGCAAGAGTTCGGCCGACCGTAGAAGTTCCTTCGCTTCGGAGGGATTTTTC
CCGCGCTGCTGATCGCTGCGCAATCGCCGAGCTGTAACGCTGATGCTTCGAGAGCCCGGACACTGCAC
CCCCACATACACGCGCTCCGCTGCGCAATCCCTGCTGCGGATGATTCACCGCTGCGCACCTGGGCTGGG
CCGACATGAGAGATCCGCTTCGCGGATCTGGTTCCTCTATGTCACACCAATGCGGCTTGAAGTTC
GTCAGTTGCTTTGGTTTCACATCAGCTGCTGACCTTGGACGGGAACTGCGTGGGAAATCTGGGCTG
TGTGCTCGGATCCGACCCACCTGCTTATCCCGCCGACAGCGCCGATCTTTCACGCTCCCGGAACT
AGTGTGCTG
```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) CpG オリゴヌクレオチドに付加した VLP と、(2) 1 つまたは複数の非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤とを含み、CpG オリゴヌクレオチドに付加した VLP は、ワクチン中の唯一の活性成分である、ワクチン。

【請求項 2】

請求項 1 に規定のワクチンと、それに混和された治療剤とを含む、がんを治療する医薬組成物。

【請求項 3】

前記 VLP は、目的の部位に少なくとも 1 つの第 1 の非天然アミノ酸を含むように修飾されたウイルス被覆ポリペプチドを含み、前記 CpG オリゴヌクレオチドは、第 1 の非天然アミノ酸との化学反応に關与して共有結合を形成する反応性官能基を含むように修飾される、請求項 1 に記載のワクチン。

10

【請求項 4】

VLP タンパク質モノマーに結合する CpG オリゴヌクレオチドは、CpG オリゴヌクレオチドと VLP モノマーとの比率が、1 : 24 から 1 : 12、1 : 12 から 1 : 6、1 : 6 から 1 : 3、1 : 3 から 2 : 3 または 1 : 2 から 1 : 1 に相当するような量 (モル) である、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 5】

前記 CpG オリゴヌクレオチドは、平均で VLP 当たり 10 から 50 コピー、VLP 当たり 40 から 80 コピー、VLP 当たり 70 から 170 コピー、VLP 当たり 160 から 240 コピーに相当する量で VLP に結合する、請求項 1 に記載のワクチン。

20

【請求項 6】

前記 CpG オリゴヌクレオチドは、配列 5' - T G A C T G T G A A C G T T C G A G A T G A - 3' を含む、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 7】

前記配列は、5' T * G * A * C * T * G * T * G * A * A * C G * T * T * C * G * A * G * A * T * G * A 3' に示されるようなホスホジエステル結合とホスホロチオエート結合との混合物を有し、記号「*」は、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合に置換することを示す、請求項 6 に記載のワクチン。

30

【請求項 8】

前記配列は、5' T * G * A * C * T * G * T * G * A * A * C * G * T * T * C * G * A * G * A * T * G * A 3' に示されるようなホスホロチオエート結合を有し、記号「*」は、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合に置換することを示す、請求項 6 に記載のワクチン。

【請求項 9】

前記 CpG オリゴヌクレオチドは、配列の 3' 端に 5 - オクタジニルデオキシウリジンまたは改変デオキシウリジンまたはリンカーをさらに含む、請求項 6 に記載のワクチン。

【請求項 10】

前記 VLP は、図 1 もしくは図 5 に示される配列またはその一部を含む B 型肝炎コアタンパク質によって形成される、請求項 1 に記載のワクチン。

40

【請求項 11】

前記 VLP は、バクテリオファージ、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン - バールウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、黄熱ウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器多角体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパピローマウイルス、狂犬病ウイルス、風疹ウイルス、ヒトボカウイルスまたはパルボウイルス、およびノロウイルスからなる群から選択されるウイルス被覆タンパク質またはそ

50

の一部を含む、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 1 2】

前記治療剤は、免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD - 1 阻害剤、PDL 1 阻害剤、PDL 2 阻害剤、B7 - H3 阻害剤、B7 - H4 阻害剤、CTLA - 4 阻害剤、LAG3 阻害剤、KIR 阻害剤、TIM3 阻害剤、TIGIT 阻害剤、BTLA 阻害剤、CD160 阻害剤、A2aR 阻害剤およびVISTA 阻害剤からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質の活性を遮断する抗体もしくはその断片またはそれらの誘導体である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記治療剤は、レナリドマイド、イピリムマブ、リツキシマブ、アレムツマブ、オフアツムマブ、フラボピリドール、アドリアマイシン、ダクチノマイシン、プレオマイシン、ピンブラスチン、シスプラチン、ABT - 199、アシピシン、アクラルピシン、塩酸アコダゾール、塩酸アコダゾール、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムボマイシン、酢酸アメタントロン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アントラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、パチマスタット、ベンゾデパ、ピカルタミド、塩酸ピサントレン、ピゼレシン、硫酸プレオマイシン、プレキナルナトリウム、プロピリミン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、塩酸カルピシン、カルゼレシン、セデフィンゴール、クロラムブシル、シロレマイシン、シスプラチン、クラドリピン、クリスナトールメシレート、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルピシン、デシタピン、デキソルマブラチン、デザグアニン、デザグアニンメシレート、ジアジクオン、ドキシソルピシン、塩酸ドキシソルピシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、ツアゾマイシン、エダトレキセート、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン、エンロプラチン、エンプロメート、エピプロビジン、塩酸エビルピシン、エルプロゾール、塩酸エゾルピシン、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸エステルナトリウム、エタニダゾール、エトボシド、リン酸エトボシド、エトプリン、塩酸ファドロゾール、ファザラピン、フェンレチニド、フロックスウリジン、リン酸フルダラピン、フルオロウラシル、フルオロシタピン、フォスキドン、フォストリエシンナトリウム、ゲムシタピン、塩酸ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イブルチニブ、イデラリシブ、塩酸イダルピシン、イフォスファミド、イルモフォシン、イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸ロイプロリド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、塩酸ロソキサントロン、マソプロコール、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メトプリン、メツレデパ、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、ミトマルシン、マイトマイシン、ミトスパー、ミトタン、塩酸ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オビヌツズマブ、オルマブラチン、オキシスラン、ペガスパルガーゼ、ペリオマイシン、ペンタムスチン、硫酸ペプロマイシン、パーホスファミド、ピボプロマン、ピボスルファン、塩酸ピロキサントロン、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、ピラゾフリン、リボプリン、リツキシマブ、ログレチミド、サフィンゴール、塩酸サフィンゴール、セムスチン、シムトラゼン、スパルフォセートナトリウム、スパルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール、タリソマイシン、テコガランナトリウム、テガフル、塩酸テロキサントロン、テモボ

10

20

30

40

50

ルフィン、テニポシド、テロキシロン、テストラクトン、チアミプリン、チオグアニン、チオテバ、チアゾプリン、チラパザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン、リン酸トリシリピン、トリメトレキサート、グルクロン酸トリメトレキサート、トリプトレリン、塩酸ツプロゾール、ウラシルマスタード、ウレデパ、パブレオチド、ベルテポルフィン、硫酸ピンラスチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ピネピジン、硫酸ピングリシネート、硫酸ピンレウロシン、酒石酸ピノレルピン、硫酸ピンロシジン、硫酸ピンゾリジン、ポロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、および塩酸ゾルピシンからなる群から選択される抗がん剤である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 に規定のワクチンの V L P をコードする核酸分子。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に規定の c D N A。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に規定の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 9】

適切な宿主細胞に請求項 1 8 に規定のベクターを含む宿主ベクター系。

【請求項 2 0】

前記適切な宿主細胞は、細菌細胞である、請求項 1 9 に記載の宿主ベクター系。

【請求項 2 1】

前記適切な宿主細胞は、真核細胞である、請求項 1 9 に記載の宿主ベクター系。

20

【請求項 2 2】

適切な培養条件下で請求項 1 9 に規定の宿主ベクター系を培養して、宿主中でウイルスゲノム不含の V L P を生産することと、そうして生産されたウイルスゲノム不含の V L P を回収することを含む、ワクチン中でウイルスゲノムタンパク質を含まない V L P を生産する方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に規定の方法によって生産された、ウイルスゲノム不含の V L P。

【請求項 2 4】

請求項 1 または 2 に規定の組成物と、任意選択で試薬および / または使用説明書とを含む、がんを阻害するキット。

30

【請求項 2 5】

有効量の請求項 1 に規定のワクチンを対象に投与して、がんを阻害し、それによって対象を治療することを含む、がん罹患した対象を治療する方法。

【請求項 2 6】

有効量の請求項 2 に規定の医薬組成物を対象に投与して、がんを阻害し、それによって対象を治療することを含む、がん罹患した対象を治療する方法。

【請求項 2 7】

腫瘍細胞を有効量の請求項 1 に規定のワクチンに接触させて、腫瘍細胞を阻害して対象を治療することを含む、がん罹患した対象を治療する方法。

【請求項 2 8】

腫瘍細胞を有効量の請求項 2 に規定の医薬組成物に接触させて、腫瘍細胞を阻害して対象を治療することを含む、がん罹患した対象を治療する方法。

40

【請求項 2 9】

前記がんは、固形腫瘍であり、投与は、腫瘍内である、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】

対象は、哺乳動物である、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記哺乳動物は、ヒト、サル、類人猿、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、マウスまたはラットである、請求項 3 0 に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

前記がんは、乳がん、大腸がん、膵臓がん、前立腺がん、肺がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、多発性骨髄腫（MM）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、頭頸部がん、メラノーマまたは濾胞性リンパ腫を含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

固形腫瘍の成長を阻害するのに有効な量で、請求項 1 に規定のワクチンを対象に腫瘍内投与することを含む、対象で固形腫瘍の成長を阻害する方法。

【請求項 3 4】

固形腫瘍の成長を阻害するのに有効な量で、請求項 2 に規定の組成物を対象に腫瘍内投与することを含む、対象で固形腫瘍の成長を阻害する方法。

10

【請求項 3 5】

前記腫瘍は、乳がん腫瘍である、請求項 3 3 または 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願を通じて様々な刊行物が参照される。本発明が関連する技術分野での態様をさらに十分に記載するために、これらの刊行物の開示は、その全体において、ここに参照により本願に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0002】

がんは、より良い治療レジメンを必要とする健康上の主要な問題である。アメリカがん学会では、2012年に1,638,910人超が新たにがんを診断され、577,190人ががんで死亡したものと推定している。トリプルネガティブ乳がん、脳がんや膵臓がんなど、多くのがんは、依然として、治療のない致命的な疾患である。患者は、耐え難くそして多くの有害事象をはらんだ何年にもわたる治療に向き合う可能性がある。ステージIVの乳がん患者の5年生存率は約22%であり、神経膠芽腫患者は4%から17%の範囲であり、膵臓がん患者は1%から14%の範囲である。

30

【0003】

治療ワクチンは、がんにおいて非常に良い潜在性を実証し始めている。例えば、シプロイセルTは、現在、前立腺がんにも認められた樹状細胞ワクチンであり、歴史あるイディオタイプ（Id）ワクチンのプログラムでは、特異的な抗Id免疫応答が、無増悪生存期間および全生存期間に強く関連することが実証された。残念ながら、以前のワクチンは、一貫して強い免疫応答を生じず、また、例えば、シプロイセルTを用いる治療は、多くの患者に有効ではない煩雑なプロセスである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、がん、例えば固形がん腫瘍などの疾患に対する治療剤として使用するのに十分な免疫応答を誘導する、CpGが付加または接続した新規の特異的ウイルス様粒子（VLP）を提供することによって、本技術分野の課題を解決する。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、CpGオリゴヌクレオチドが接続されたVLPを唯一の活性成分として含み、かつ非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤を含むワクチンと、その使用とを提供する。さらに提供されるのは、そのようなワクチンと治療剤とを共に混和して含む組成物、およびその使用である。

【0006】

50

本発明はさらに、CpGオリゴヌクレオチドを有したVLPを唯一の活性成分として含み、かつ1つまたは複数の免疫チェックポイントタンパク質阻害剤と1つまたは複数の非毒性の医薬的に許容されうる担体、結合剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤および/またはビヒクルを含むワクチン、ならびにその使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】B型肝炎コア抗原(HBC)のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。

【図2】CpG-Xの核酸配列の例を示す図である。

【図3】メチオニン置換を使用したHepBコアの発現の分析を示す図である。HepBコアプラスミドを含有する大腸菌(E.coli)を、攪拌フラスコ中、最小培地で拡大培養した後、継続して2リットルのバイオリクター中、最小限のメチオニン共存下で拡大培養し、続いて、IPTGを用いた誘導および1:20の比率のメチオニンとアジドホモアラニンの添加を行った。精製されたHepBコアモノマー、分子量標品、および発現誘導前後の試料を示す。

【図4】CpGオリゴヌクレオチドのVLPへのコンジュゲーションの分析を示す図である。大腸菌およびCpG-Xによって生産されたVLPの3つのコンジュゲーション反応の還元SDS-PAGE分析である。端的に述べれば、60μM当量モノマーの1.25mgのVLP、80μMのCpG-X、200μMのアスコルビン酸塩、250μMのTMA増強剤、500μMのCu(I)を調製し、アルゴン分散させた10mMリン酸カリウム、0.01%Tween-20、pH8中、1250マイクロリットルの総反応体積で混合した。反応は、30度で一晩進ませた後、SDS-PAGEによって分析した。

【図5-1】149アミノ酸のHepBコアタンパク質を発現させて本発明のVLPを生産するために使用した、DNA構築物を示す。妥当な生物学的シグナル、コード配列および制限酵素切断部位を有したpET21-HepBコアプラスミドDNAの線図を示す。

【図5-2】149アミノ酸のHepBコアタンパク質を発現させて本発明のVLPを生産するために使用した、DNA構築物を示す。HepBコアタンパク質コード配列(太字の下線部)およびT7プロモーター(下線部)の場所と併せて、pET21-HepBコアプラスミド構築物の完全長の核酸配列を示す。

【図5-3】149アミノ酸のHepBコアタンパク質を発現させて本発明のVLPを生産するために使用した、DNA構築物を示す。HepBコアタンパク質コード配列(太字の下線部)およびT7プロモーター(下線部)の場所と併せて、pET21-HepBコアプラスミド構築物の完全長の核酸配列を示す。

【図5-4】149アミノ酸のHepBコアタンパク質を発現させて本発明のVLPを生産するために使用した、DNA構築物を示す。HepBコアタンパク質コード配列(太字の下線部)およびT7プロモーター(下線部)の場所と併せて、pET21-HepBコアプラスミド構築物の完全長の核酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

定義

本明細書で使用される場合、用語「ワクチン」は、がん罹患した哺乳動物に投与された際に免疫応答を刺激する、本発明のウイルス様粒子(VLP)を含む調剤である。治療ワクチンは、がんの発症中または発症後に投与されてもよい。予防治療ワクチンは、がんなどの疾患の発症前に投与されてもよく、その疾患の発症を予防、阻害または遅延させることが意図される。

【0009】

本明細書で使用される場合、用語「VLP」は、ウイルスの非感染性のサブユニットから作製されるウイルス様粒子であり、該サブユニットは、構造を、一般には正二十面体の形態で形成する。VLPは、CpGオリゴヌクレオチドおよび/または免疫チェックポイント阻害剤の多価の提示に対し許容性がある。VLPは、カプシドタンパク質のモノマー/サブユニットの、例えば、約60の倍数個の被覆またはカプシドタンパク質のモノマー

ノサブユニットの集合体を含む。VLPは、正二十面体構造に基づいて、被覆タンパク質サブユニットによって形成されるが、このサブユニットは、様々な数の被覆タンパク質を含む他の二十面体の中でも、例えば60個(T=1)、120個(T=2)、180個(T=3)、240個(T=4)、360個(T=7d)、420個(T=7)、780個(T=13)、960個(T=16)、1260個(T=21)、1500個(T=25)または1620個(T=27)のカプシドタンパク質を含む。B型肝炎ウイルス(HBV)に基づくVLPの場合、一態様では、180個または240個のHBV被覆タンパク質モノマー(本明細書ではまた、ウイルス被覆ポリペプチドとも参照される)は、2つの異なるタイプのVLPを形成することができるが、これらのタイプは、例えば、それぞれT=3またはT=4の正二十面体の対称性を用いて配列される。HBVコアタンパク質(本明細書ではまた、HepBコアタンパク質とも参照される)から形成されるVLPに用いるために、本発明は、一態様では、C末端で切断されかつN末端では最初の149アミノ酸が無傷のままである(アミノ酸1~149)HBV被覆タンパク質を提供し、該HepBコアVLPは、例えば180個または240個のHepBコアモノマータンパク質のアセンブリによって形成される。

10

20

30

40

50

【0010】

例えば、VLP-アジドとは、少なくとも1つのアジド官能基がVLPに存在することを指し、その存在は、アジド官能基を有する非天然アミノ酸を組み込むことなどを介しており、例えば、アジドホモアラニンがある。アジドホモアラニンは、*in vivo*でポリペプチド鎖中のメチオニンと置換するのに使用してもよく、この置換は、メチオニン欠損培地中で成長させたメチオニン要求株にアジドホモアラニンを提供することに依る。あるいは、アジドホモアラニンは、無細胞タンパク質合成(CFPS)系を使用して、*in vitro*合成に導入されてもよい。アジド官能基の存在によって、アルキン官能基を用いた銅触媒性[3+2]付加環化または「クリックケミストリー」に参与することが可能になる。アジド官能基を有する他の非天然アミノ酸は、利用可能であり、VLPモノマーまたはカプシドタンパク質を含むポリペプチド中に導入されうる。アジド官能基を有するそのような非天然アミノ酸としては、*p*-アジド-L-フェニルアラニンが挙げられる。

【0011】

例えば、VLP-アルキンとは、少なくとも1つのアルキン官能基がVLPに存在することを指し、その存在は、アルキン官能基を有する非天然アミノ酸を組み込むことなどを介している。この組み込みは、例えば、メチオニン要求株でVLPを発現させる間に、部分的にまたは完全にメチオニンと置換するものとしてホモプロバギルグリシンを供給し、それゆえメチオニンがアルキン含有非天然のアミノ酸に置き換えられることに依る。あるいは、非天然アミノ酸はまた、終止コドン、例えばアンバー終止コドンUAGの導入と、所望の非天然アミノ酸で荷電されたサブレッサー-t-RNAの使用とを介して、所望の部位でポリペプチド内に組み込まれることがある。このことは、特異的なポリペプチドをコードするRNA転写物中の工学的に作製された終止コドンを抑制することを通じて、非天然アミノ酸を部位特異的に組み込むことを可能にする(BundyおよびSwartz、*Bioconjugate Chem.*、第21巻、255~263頁(2010年))。いずれの場合も、アルキン官能基の存在によって、アジド官能基を用いた銅触媒性[3+2]付加環化または「クリックケミストリー」が可能になる。

【0012】

本明細書で使用されるとき「CpGオリゴヌクレオチド」とは、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート骨格によって接続された1つまたは複数のシトシン-グアニンジヌクレオチドを含む非メチル化オリゴヌクレオチドを指す。CpGオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、またはホスホジエステル-ホスホロチオエート骨格を有していてもよい。これらのモチーフは、哺乳動物では、Toll様受容体によって「病原体関連分子パターン」として認識される。CpGオリゴヌクレオチドの例としては、図2に示されるような配列が挙げられるが、これらに限定されない(本発明の組成

物の節も参照されたい)。

【0013】

図2はまた、5-オクタジニルdUなどのリンカーに連結されたCpGオリゴヌクレオチドを示すが、該オリゴヌクレオチドは、「CpG-X」と称され、ここで、「X」は、架橋剤(二機能性の架橋剤)またはリンカーを表す。「リンカー」は、オリゴヌクレオチドに付加された化学物質を意味し、アルキル基、アジド基、カルボニル基、アミン基またはスルフヒドリル基など、化学官能性を含む。リンカーの追加の例としては、マレイミド、ポリエチレングリコール(PEG)、二機能性架橋剤、ポリエチレングリコール誘導体、例えばスクシンイミド-マレイミドPEGや、一方の端にNHSEステル、他方にマレイミド基を有するSM(PEG)_nなど、ペプチドリナー、ペプチド核酸リンカー(PNA)、および修飾型核酸リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0014】

本明細書で使用される場合、用語「免疫チェックポイント阻害剤」とは、免疫チェックポイントを遮断する薬剤を指す。免疫チェックポイントは、自己寛容を維持し、免疫応答の程度を制御するために重要な免疫細胞に存在する阻害経路である。これらの経路の遮断は、免疫細胞の調節の低減と、免疫細胞の活性の増加につながりうる。

【0015】

「ベクター」、「構築物」または「プラスミド」という用語は、所望のコード配列と、具体的な宿主生物中でのそのコード配列の発現に必要な適切な核酸配列とを含む組換え核酸分子を指す。原核生物での発現に必要な核酸配列としては、プロモーター、任意選択でオペレーター配列、リボソーム結合部位、およびおそらくは他の配列が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが公知である。「ベクター」、「構築物」または「プラスミド」はまた、RNA転写物の産生に続く無細胞タンパク質合成系で、または*in vitro*転写-翻訳系でなど、具体的な宿主生物の状況の外で使用されてもよい。

20

【0016】

本明細書で使用されるとき、「活性成分」は、生物(人または動物対象)に投与された際に、局所および/または全身に作用することによって、所望の薬理学的および/または生理学的効果を誘発する物質である、任意の化合物または組成物を含む。

【0017】

したがって、本発明の実施形態の文脈で「唯一の活性成分」という句は、CpGオリゴヌクレオチドに付加したVLPが、ワクチン中のただ1つの、または排他的な活性成分であることを意味する。しかし、CpGオリゴヌクレオチドに付加したVLPは、ワクチン中でただ1つの、または排他的な活性成分ではなく、なぜなら、該VLPが、賦形剤および他の非活性剤、例えば、保存もしくは対象への適正な投与に用いるワクチンを製剤化するために必要なものを含有するためである。さらに、本発明は、該ワクチンおよび1つまたは複数の治療剤、例えばそれらの混和物を含む医薬組成物または製剤を提供する。

30

【0018】

本明細書で使用される場合、用語「対象」とは、哺乳動物を意味する。哺乳動物は、ヒト、または非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、サル、類人猿、ウサギやウシなどの動物とすることができるが、これらの例に限定されない。哺乳動物でヒト以外を、障害、例えばがんに関連する障害の動物モデルを表す対象として、好都合に使用することができる。さらに、本明細書に記載の方法および組成物は、家畜化された動物および/またはペットを治療するために使用することができる。「患者」および「対象」という用語は、互換的に使用される。対象は、雄とすることも雌とすることもできる。

40

【0019】

本発明のVLPワクチンは、医薬的に許容されうる剤形で、活性成分を含む医薬組成物の形態で投与されうる。疾患および治療される患者のタイプ、ならびに投与経路に応じて、組成物は、様々な用量で投与されうる。投与は、腫瘍内デリバリ、腫瘍周囲デリバリ、腹腔内デリバリ、鞘内デリバリ、筋肉内注射、皮下注射、静脈内デリバリ、経鼻噴霧およ

50

び粘膜デリバリ（例えば経粘膜デリバリ）、動脈内デリバリ、脳室内デリバリ、胸骨内デリバリ、頭蓋内デリバリ、皮内注射、エレクトロインコーポレーション（例えばエレクトロポレーションを用いて）、超音波、ジェット注入器、および局所パッチを含めた方法に拠るが、これらに限定されない。

【0020】

投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および該製剤を目的のレシピエントの血液と等張にする溶質を含有しうる、水性または非水性の滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤および増粘剤を含みうる、水性または非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、単位用量または複数回用量の容器、例えば、密封されたアンプルおよびバイアルで存在し得、凍結乾燥（真空下での凍結乾燥）状態で、例えば注射用の水など、滅菌液体担体を使用直前に添加することのみを要する状態で保存されうる。即席の注射溶液および懸濁液は、既に記載された類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製されうる。

10

【0021】

本明細書に記載の本発明のVLPワクチンが、対象に供されている際に、当業者は、その投与量は、以下に限定されないが、対象の体重、疾患およびその進行、または腫瘍のサイズ、または腫瘍の進行を含む、いくつかの要因に依存することを理解する。治療の継続期間および頻度については、該治療が治療上の利点を提供しているか否かを決定するために、また、投与量を増加するかまたは低減するか、投与頻度を増加するかまたは低減するか、治療を中断するか、再開するか、または治療レジメンに他の変更を加えるかを決定するために、熟練の医療者が対象をモニターすることが一般的である。

20

【0022】

一実施形態では、本発明に有用な投与プロトコールの非制限的な例は、最初の期間の間に、本発明の多価VLPワクチンを複数回投与することを含む（例えば2週間毎の投与を例えば6週間など）。さらに、投与プロトコールはまた、最初の投与時に、本発明の多価VLPワクチンを複数回投与することを含む（多価VLPワクチンの最初の投与時に腫瘍内の複数部位になど）。

【0023】

本発明のVLPワクチンについて本明細書で使用される場合、用語「有効量」は、対象に投与される多価VLPの量を意味し、その量は、がんなどの疾患を阻害するよう哺乳動物による免疫応答をもたらす。さらに、有効量とは、そのような量を受けていない対応の対象に比較して、疾患、障害もしくは副作用の治療、治癒、予防もしくは寛解の向上、または疾患もしくは障害の進展の低下をもたらす任意の量を含む。この用語はまた、正常な整理機能を増強するのに有効な量をその範囲に含む。

30

【0024】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍を阻害すること」は、当技術分野に公知であり受け入れられているような任意の方法で測定されうるが、そのような方法としては、腫瘍の完全な退化（完全な応答）；腫瘍のサイズもしくは体積の低減か、あるいは既に観察されている腫瘍の成長を遅延させること、例えば、ベースラインの最長径（LD）の和を参照とした際の腫瘍のLDの和の少なくとも約10～30%の低下（部分的な応答）；混在応答（ある種の腫瘍にあって他にはない退化もしくは安定化）；または、治療開始以来の最小のLDの和を参照とした際に、腫瘍の成長もしくは進行がなく、部分的な応答に適する十分な退縮も、疾患の進行に適する十分な増加もないことが挙げられる。

40

【0025】

腫瘍またはがんの状態はまた、腫瘍もしくはがん細胞の数、濃度または密度を、単独でまたは参照についてサンプリングすることによって、評価されうる。腫瘍またはがんの状態はまた、乳がんでのHer-2や前立腺がんでのPSAなど、代替マーカーを使用することを通じて評価されうる。

【0026】

本明細書で使用される場合、用語「治療する」とは、療法を使用して、疾患、障害、または疾患もしくは障害の1つもしくは複数の生物学的な症状を寛解すること、直接的もし

50

くは間接的に (a) 疾患もしくは障害につながる、もしくはそれらを担う生物学的カスケードの1つもしくは複数の点で、または (b) 疾患もしくは障害の生物学的な症状のうち1つもしくは複数のに、干渉すること、疾患、障害、または1つもしくは複数のそれらの徴候もしくは障害もしくは治療に関連付けられた、1つもしくは複数の徴候、影響もしくは副作用、を寛解させること、あるいは、疾患、障害、または疾患もしくは障害の1つまたは複数の生物学的な症状の進行を遅延させることである。治療はまた、疾患または障害に悩む対象のために人生の質を向上させることを含みうる (例えば、がん悩む対象は、本明細書に記載の本発明の組成物を用いて免疫されている際に、さらに低い用量の抗がん剤を受けうる) 。本明細書を通じて、本発明の組成物およびその使用のため方法が提供され、それを必要とする対象に適切な治療を提供するために選択される。

10

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の本発明の組成物を用いた治療は、対象に免疫応答を誘発および/または持続させる。免疫応答としては、自然免疫応答、適応免疫応答、またはその両方が挙げられる。自然免疫応答は、好中球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) 、および/または樹状細胞によって媒介されうる。獲得免疫応答としては、液性応答 (すなわち、抗体の生産) 、細胞性応答 (すなわち、Tリンパ球の増殖および刺激) 、またはその両方が挙げられる。細胞性応答の活性化および持続の測定は、任意の公知の方法によってなされうるが、そのような方法としては、例えば、細胞傷害性Tリンパ球 (C T L) アッセイが挙げられる。液性応答もまた、公知の方法によって測定されうるが、そのような方法としては、I g G や I g M の抗体画分など、本発明の組成物 (例えばワクチン) に特異的な抗体の力価の単離および定量が挙げられる。

20

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療 (例えば免疫療法) は、スタンドアロン療法として、他の任意の療法と組み合わせられることなく使用される。

【 0 0 2 9 】

他の実施形態では、本明細書に記載の治療 (例えば免疫療法) は、対象に規定される他の療法、例えばがん療法に対する、補助療法を提供する。例えば、本明細書に記載の治療 (例えば免疫療法) の方法は、放射線療法、化学療法、遺伝子療法または外科手術と組み合わせ投与することができる。組み合わせは、本明細書に記載の治療 (例えば免疫療法) が、補助療法の前に、それと共に、またはそれに続いて、投与されうるようになされる。

30

【 0 0 3 0 】

本発明に従って、抗疾患または障害治療 (例えばがん治療) の効果は、対象をモニタリングすることによって、例えば、生存期間または疾患無増悪期間 (無病生存期間) を測定および比較することによって、評価されうる。任意の応答の評価は、治療を受けなかったかもしくはプラセボを処置された個人と、または代替治療を受けた個人と比較されうる。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される場合、用語「予防する」とは、それらの状況または生物学的な症状の可能性および重症度を実質的に減少させるために、またはそのような状況または生物学的な症状の発生を遅延させるために、薬剤を予防的に投与することを参照するものと理解される。当業者は、予防が絶対的な用語ではないことを認識するであろう。予防療法は、例えば、対象が具体的な疾患または障害 (例えばがん) を発症する高い危険性があると考えられる際に、対象が疾患または障害の強力な家族歴を有する際や、対象が例えば疾患の原因薬剤、例えば発癌物質に曝露されている際などに、適正である。

40

【 0 0 3 2 】

実施する実施例中以外、または別段に指示される箇所以外で、本明細書に使用される、成分の量または反応条件を表現するあらゆる数は、あらゆる場合で「約」という用語によって、修正されるものと理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用される際の「約」という用語は、 $\pm 1 \sim 10\%$ の範囲を意味しうる。

【 0 0 3 3 】

50

単数の使用は、具体的に別段の記述がない限り、複数を含む。「a」または「an」という言葉は、具体的に別段の記述がない限り、「少なくとも1つ」を意味する。「または」の使用は、別段の記述がない限り、「および/または」を意味する。「少なくとも1つ」という節の意味は、「1つまたは複数」という節の意味と等価である。さらに、「含んでいる (including)」という用語、ならびに「含む (includes)」や「含まれる (included)」などの他の形態の使用は制限されていない。「含有している (containing)」という用語、ならびに「含有する (contains)」や「含有される (contained)」などの他の形態の使用は制限されていない。また、「要素」や「構成要素」などの用語は、要素または構成要素の両方を包含し、それらは、具体的に別段の記述がない限り、1を超える単位を含む一単位および要素または構成要素を含む。

【0034】

本発明の組成物

本発明は、(1) CpGオリゴヌクレオチドが付加したVLPと、(2) 1つまたは複数の非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤とを含むかまたは含有する、ワクチンを提供する。1コピーまたは複数コピーのCpGオリゴヌクレオチドが、VLPの表面に付加または接続されうる。一実施形態では、ワクチン中の唯一の活性成分は、付加された1コピーまたは複数コピーのCpGオリゴヌクレオチドを含有するVLPである。CpGオリゴヌクレオチドは、TLR9分子のアゴニストでありうる。

【0035】

本発明はさらに、(1) 1つまたは複数のCpGオリゴヌクレオチドおよび免疫チェックポイント阻害剤が付加したVLPと、(2) 1つまたは複数の非毒性の医薬的に許容されうる担体または希釈剤とを含有するかまたはそれらからなる、ワクチンを提供する。CpGオリゴヌクレオチドと免疫チェックポイント阻害剤がそれぞれ、VLPの表面に付加または接続されうる。一実施形態では、ワクチン中の唯一の活性成分は、1コピーまたは複数コピーのCpGオリゴヌクレオチドおよび免疫チェックポイント阻害剤を付加されて含有するVLPである。CpGオリゴヌクレオチドは、TLR9分子のアゴニストでありうる。

【0036】

さらに、ウイルスゲノム不含のVLPは、アデノウイルス科 (Adenoviridae)、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae)、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae)、フラビウイルス科 (Flaviviridae)、レトロウイルス科 (Retroviridae)、オルトミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae)、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)、パピローマウイルス科 (Papillomaviridae)、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)、トガウイルス科 (Togaviridae) またはパルボウイルス (Paroviridae) のうちいずれか由来のウイルス被覆ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましくは、VLPは、ウイルスゲノム不含の安定な正二十面体のVLPである。

【0037】

具体的には、ウイルス被覆タンパク質が由来としうるウイルスの例としては、バクテリオファージ、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン-バールウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、黄熱ウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器多角体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパピローマウイルス、狂犬病ウイルス、風疹ウイルス、ヒトボカウイルスまたはパルボウイルス、およびノロウイルスが挙げられる。一実施形態では、バクテリオファージは、MS2バクテリオファージ、P1様ウイルス、P2様ウイルス、T4様ウイルス、P22様ウイルスおよびラムダ様ウ

イルスとしうる。B型肝炎ウイルス由来のVLPが好適である。

【0038】

本発明の一実施形態では、VLPに付加するCpGオリゴヌクレオチドの平均量は、VLP当たり1から10コピーのCpGオリゴヌクレオチド、VLP当たり10から50コピーのCpGオリゴヌクレオチド、VLP当たり40から80コピーのCpGオリゴヌクレオチド、VLP当たり70から170コピーのCpGオリゴヌクレオチド、またはVLP当たり160から240コピーのCpGオリゴヌクレオチドに相当しうる。別の実施形態では、VLPタンパク質モノマーに付加するCpGオリゴヌクレオチドは、CpGオリゴヌクレオチド：VLPの重量比が、1：1000から1：100、1：100から1：10、1：10から1：4、1：4から1：2、または1：2から1：1に相当するよう

10

【0039】

本発明の一実施形態では、CpGオリゴヌクレオチドは、5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'を含む。核酸分子、オリゴヌクレオチドまたはCpGオリゴヌクレオチドは、配列5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*ACGTT*C*G*A*G*A*T*G*A-3'または5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*ACGTT*T*C*G*A*G*A*T*G*A-3'または5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*ACGTT*T*C*G*A*G*A*T*G*A-3'または5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*ACGTT*T*C*G*A*G*A*T*G*A-3'におけるホスホジエステル結合体とホスホロチオエート結合体との混合物である修飾オリゴヌクレオチドとし得、*は、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合に置き換えることを示す。本CpGオリゴヌクレオチドのさらに他の実施形態は、リンカーを分子(CpG-X)に導入するが、例えば、アルキル基、アジド基、カルボニル基、アミン基やスルフヒドリル基など、特有の化学官能基を含有する化学物質を、配列の5'端または3'端にカップリングすることによってそれを行い、例えば、それぞれ(リンカー)-5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*CG*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A-3'または5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*CG*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A-(リンカー)-3'である。好適なCpG-X実施形態では、アルキル官能基が、CpG分子に導入されるが、例えば、5-オクタジニルdU(5)を、配列の3'端にカップリングすることによってそれは行われ、例えば、5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*CG*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A-(5-Oct-dU)-3'または5'-T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*CG*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A-(5-Oct-dU)-3'である。アルキル官能基は、VLPのカプシドタンパク質内に組み込まれたアジド官能基と共に(3+2)環化付加クリック反応に加わって、その結果、CpGオリゴヌクレオチドに架橋されたVLPを生じうる。

20

30

【0040】

CpGオリゴヌクレオチドの追加の例としては、(1)5'-TCGTCGTTCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(M353と称する)、(2)5'-TCGTCGTTCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(M355と称する)、(3)5'-TCGTCGTTCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(M354と称する);(4)5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(M352と称する)、(5)5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(C593と称する)、(6)5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(C594と称する)、(7)5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'(C595と称する)、(8)5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGATGATGAT-3'

40

50

G A T 3' (C 5 4 6 と称する)、(9) 5' T C G T C G G G C G C C
 C G A G A T G A T 3' (C 6 4 0 と称する)、(1 0) 5' T C G T C G
 C G C G C G C G A G A T G A T 3' (C 6 4 2 と称する)、(1 1) 5'
 T C G T C G C C C G G G C G A G A T G A T 3' (C 6 4 4 と称する
)、(1 2) 5' T C G T C G A C G A T C G T C G A T G A T 3' (M 3 5 6 と称する)、(1 3) 5' T C G T C G T C G T A C G A C G A T
 G A T 3' (M 3 5 7 と称する)、(1 4) 5' T C G T C G T T G T C G
 T T C G A A C G A C G T T G A T 3' (M 3 6 1 と称する)、(1 5)
 5' T C G T C G T C G T T C G A A C G A C G T T G A T 3' (M 3 6 2 と称する)、(1 6) 5' T C G T C G T T C T C G A C G A T C
 G T C G A T G A T 3' (M 3 5 8 と称する)、(1 7) 5' T G A C T G
 T G A A C G T T C G G A T G A 3' (1 0 1 8 と称する)、(1 8) 5'
 T C G T C G A A C G T T C G A G A T G A T 3' (C 2 7 4 と称する
)、(1 9) 5' T C G A A C G T T C G A A C G T T C G A A T 3
 ' (C 5 8 3 と称する)、(2 0) 5' T T C G A A C G T T C G A A C G
 T T C G A A C G T T C G A A C G T T 3' (C 5 8 2 と称する)、(2 1) 5' T C A A C G T T
 C G A A C G T T C G A A C G T T 3' (C 6 3 7 と称する)、(2 2) 5
 ' T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T 3' (2 0 0
 6 と称する)、(2 3) 5' T C G A C G T C G A C G T C C A C G T A
 T 3' (C 6 3 0 と称する)、(2 4) 5' T C G T C G A A A C G T T T
 C G A C A G T 3' (C 6 3 1 と称する)、(2 5) 5' T C G T C G A A
 A A C G T T T T C G A G A T 3' (C 6 3 3 と称する)、(2 6) 5' G
 G g g g a c g a t e g t e g G G G G g 3' (2 2 1 6 と称する [1 2
])、(2 7) 5' T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T
 T 3' (2 0 0 6 と称する [5])、(2 8) 5' T G C T G C T G C T T G
 C A A G C A G C T T G A T 3' (M 3 8 3 と称する)、(2 9) 5'
 T C G T C G T C G T T C G A A C G A C G T T G A T 3' (M 3 8
 4 と称する)、(3 0) 5' T C G T C G T G C T T G C A A G C A C G
 T T G A T 3' (M 3 8 5 と称する)、(3 1) 5' T C G T C G T C G
 A T C G T A C G A C G T T G A T 3' (M 3 8 6 と称する)、(3 2) 5
 ' T C G T C G T C G T T C G A A C G A C G 3' (M 3 8 7 と称する
) および (3 3) 5' T C G T C G T C G T T C G A A C G A C G T C
 G T T 3' (M 3 8 8 と称する) (Marshallら、Journal of L
 eukocyte Biology、2003年、第73巻、781~792頁; Har
 tmann, G.ら、Eur. J. Immunol.、2003年、第33巻、1633
 ~41頁) が挙げられるが、これらに限定されない。上記の CpG オリゴヌクレオチドは、
 ホスホジエステル骨格、ホスホロチオエート骨格、または混合ホスホジエステル-ホス
 ホロチオエート骨格を有していてもよい。

【 0 0 4 1 】

CpGオリゴヌクレオチドをVLPに付加するために、VLPのウイルス被覆ポリペプ
 チドは、ウイルス被覆ポリペプチドの合成の間のメチオニンの位置でのアジドホモアラニ
 ンの組み込みなど、目的の部位に少なくとも1つの第1の非天然のアミノ酸(非自然なア
 ミノ酸または非正規アミノ酸(nnAA))とも参照されると、CpG-Xを生成するた
 めのCpGオリゴヌクレオチドの3'端の5'-オクタジニルdUなど、アルキン官能基に
 付加されたCpGオリゴヌクレオチドとを含むように修飾されうる。VLPのカプシドタン
 パク質内に組み込まれたアジドホモアラニンのアジド官能基は、CpG-Xのアルキン
 官能基と共に(3+2)環化付加クリック反応に加わって、その結果、CpGオリゴヌク
 レオチドに架橋されたVLPを生じうる。同じVLP内にある他の非天然アミノ酸含有カ
 プシドタンパク質は、同様に(3+2)環化付加クリック反応に加わって、CpGオリゴ
 ヌクレオチドに付加または接続されたVLPを生成し、2つまたはそれ以上のCpGオリ

ゴヌクレオチドを具えるVLPを生じうる。

【0042】

同様に、免疫チェックポイント阻害剤をも付加されて有するVLPをワクチンが含有する実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤が、少なくとも1つの第2の非天然アミノ酸を含むように修飾され得、ここで、第1の非天然アミノ酸は、第2の非天然アミノ酸とは異っており、第2の非天然アミノ酸に反応性がある。第1の非天然アミノ酸の一例は、アジドホモアラニンである。第2の非天然アミノ酸の一例は、プロパルギルオキシフェニルアラニンである。VLPのカプシドタンパク質内に組み込まれたアジドホモアラニンのアジド官能基は、ポリペプチドに基づく免疫チェックポイント阻害剤などのポリペプチド剤に組み込まれた、プロパルギルオキシフェニルアラニンのアルキル官能基と共に(3 + 2)環化付加クリック反応に加わって、その結果、CpGオリゴヌクレオチドに架橋されたVLPを生じうる。同じVLP内にある他の非天然のアミノ酸含有カプシドタンパク質は、同様に(3 + 2)環化付加クリック反応に加わって、免疫チェックポイント阻害剤に付加または接続されたVLPを生成し、2つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を具えるVLPを生じうる。

10

【0043】

同様の戦略を使用して、反応性のあるアジド官能基を有したVLPは、タンパク質または核酸ではない、免疫チェックポイントタンパク質の拮抗リガンドや低分子阻害剤を含めた阻害剤など、他の非タンパク質性または非核酸ベースの治療剤とカップリングすることができ。これは、アルキン官能基を用いてこれらの薬剤を官能基化することを介して行われる。そのような非タンパク質性または非核酸ベースの治療剤は、(3 + 2)環化付加クリック反応を介してVLPに付加され、非タンパク質性または非核酸ベースの治療剤が付加または接続されたVLPを生成しうる。

20

【0044】

本発明の一実施形態では、VLPは、カプシドモノマーサブユニット当たり少なくとも1つのまたは少なくとも2つの天然アミノ酸を含有する。例えば、VLP中の非天然アミノ酸の総数の少なくとも50分の1が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。別の実施形態では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の12分の1が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。別の実施形態では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の10分の1が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。別の実施形態では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の約4分の1が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。さらに別の実施形態では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の約3分の1が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。いっそう別の実施形態では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の約半分が、CpGオリゴヌクレオチドを付加するために使用されうる。例えば、VLP中の非天然アミノ酸の総数の約3分の2が、CpG-Xオリゴヌクレオチドに付加するために使用されうる。別の例では、VLP中の非天然アミノ酸の総数の約5分の4が、CpG-Xオリゴヌクレオチドに付加するために使用されうる。

30

【0045】

また、本発明の一実施形態では、VLPにて、少なくとも25分の1のウイルス被覆タンパク質が、そこに付加されたCpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。別の実施形態では、少なくとも10分の1のウイルス被覆タンパク質が、CpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。別の実施形態では、少なくとも5分の1のウイルス被覆タンパク質が、CpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。いっそう別の実施形態では、約半分のウイルス被覆タンパク質が、CpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。さらに別の実施形態では、約3分の2のウイルス被覆タンパク質が、CpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。さらなる実施形態では、ほぼ全てのウイルス被覆タンパク質が、CpGオリゴヌクレオチドを提示しうる。

40

【0046】

別の実施形態では、本発明のウイルスゲノム不含のVLPは、初期反応性リンカーを3

50

’端または5’端に具えたCpGオリゴヌクレオチドをさらに含み、該リンカーは、VLPまたはVLPカプシドタンパク質にカップリングする（例えば、共有結合的に付加される）ために使用され、例えば、CpGオリゴヌクレオチドをVLPまたはVLPカプシドタンパク質に架橋するように化学反応に加わるリンカーである。リンカー（反応性リンカーなど）の例としては、アルキル基、アジド基、カルボニル基、アミン基またはスルヒドリル基などの化学官能基が挙げられる。本発明の好適な実施形態では、反応性リンカーは、5-オクタジニルデオキシウリジンであり、これは、CpGオリゴヌクレオチドの3’端に位置する修飾デオキシウリジンである（例えば、図2に示されるように）。VLPとのカップリングに続いて、結果として得られる生成物は、例えば、CpGオリゴヌクレオチドにリンカーを介して共有結合的に付加されるが、共有結合形成反応に加わる反応性官能基をもはや持たないVLPである。

10

【0047】

さらに、本発明は、固形腫瘍がんを治療するための医薬組成物について追加的に提供し、該組成物は、本発明の任意のVLPワクチンと、該ワクチンに混和される1つまたは複数の治療剤とを含む。第2の治療剤が添加される一実施形態では、該第2の治療剤は、ワクチンと混和される治療剤と同じであっても異なる治療剤であってもよい。

【0048】

そのように混和される治療剤としては、免疫チェックポイントタンパク質を阻害する薬剤（本明細書では免疫チェックポイント阻害剤とも参照される）が挙げられるが、それらに限定されない。免疫チェックポイント阻害剤の例としては、PD-1（例えばPD-1阻害剤または抗PD-1剤）、CTLA-4（例えばCTLA-4阻害剤または抗CTLA-4剤）、LAG3（例えばLAG3阻害剤または抗LAG3剤）、KIR（例えばKIR阻害剤または抗KIR剤）、TIM3（例えばTIM3阻害剤または抗TIM3剤）、TIGIT（例えばTIGIT阻害剤または抗TIGIT剤）、BTLA（例えばBTLA阻害剤または抗BTLA剤）、CD160（例えばCD160阻害剤または抗CD160剤）、VISTA（例えばVISTA阻害剤または抗VISTA剤）およびA2aR（例えばA2aR阻害剤または抗A2aR剤）を阻害する薬剤が挙げられる。あるいは、免疫チェックポイント阻害剤は、チェックポイント受容体のリガンドを阻害し得、そのような受容体の例としては、PDL1（例えばPDL1阻害剤または抗PDL1剤）、PDL2（例えばPDL2阻害剤または抗PDL2剤）、B7-H3（例えばB7-H3阻害剤または抗B7-H3剤）、B7-H4（例えばB7-H4阻害剤または抗B7-H4剤）が挙げられよう。薬剤は、標的受容体（例えばPD-1、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、LAG3、KIR、TIM3、TIGIT、BTLA、CD160またはA2aR）またはリガンドを遮断する、単離された抗体または断片またはその誘導体である。さらに、該薬剤は、免疫チェックポイントタンパク質またはリガンドの活性を遮断する低分子であってもよい。リガンドは、免疫チェックポイント経路内の標的受容体などの免疫チェックポイントタンパク質の拮抗物質または選択的モジュレーターであってもよい。

20

30

【0049】

本発明に従って、単離された抗体は、単離され精製されたモノクローナル抗体としてもよい。さらに別の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、標識化抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、または親和性成熟抗体である。他の実施形態では、抗原結合断片は、ラクダ化単ドメイン抗体、diabody、scFv、scFv二量体、dsFv、(dsfv)₂、dsFv-dsfv’、二重特異性ds抗体、Fv、Fab、Fab’F(ab’)₂またはドメイン抗体である。他の実施形態では、抗原結合断片は、定常領域に動作可能に付加し、ここで、該定常領域は、カップ軽鎖、ガンマ-1重鎖、ガンマ-2重鎖、ガンマ-3重鎖、またはガンマ-4重鎖である。

40

【0050】

さらに別の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合断片は、治療剤（例えば、化学療法剤）、毒素、放射性同位体、または検出可能な標識にコンジュゲートされても

50

よい。

【0051】

そのように混和される治療剤の追加の例としては、共刺激分子である薬剤が挙げられるが、それらに限定されない。共刺激剤の例としては、HVEM；ICOSL；4-1BBL；OX40L；GITRL；CD40L；およびCD28（例えばCD28作動薬）、ICOS（例えばICOS作動薬）、CD137（例えばCD137作動薬）、OX40（例えばOX40作動薬）、CD27（例えばCD27作動薬）、CD40（例えばCD40作動薬）、CD40L（gp-39としても知られる）（例えばCD40L作動薬）、LIGHT（例えばLIGHT作動薬）、LT-アルファ（例えばLT-アルファ作動薬）、GITR（例えばGITR作動薬）を刺激する薬剤；および上述のリガンドの模倣物が挙げられる。薬剤は、標的受容体（例えばCD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、CD40、CD40L、LIGHT、LT-アルファおよび/またはTNFRSF18としても知られるGITR）を刺激する、単離された抗体または断片またはその誘導体、例えば抗CD28抗体、抗ICOS抗体、抗CD137抗体、抗OX40抗体、抗CD27抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗LIGHT抗体、抗LT-アルファ抗体および/または抗GITR抗体などとしうる。さらに、該薬剤は、標的受容体を刺激する低分子であってもよい。

10

【0052】

治療剤のさらに別の例としては、Treg活性を抑制する薬剤が挙げられるが、それらに限定されない。Treg抑制剤の例としては、GITRを刺激する薬剤（例えばGITR作動薬）、またはリガンド、またはそのリガンドの模倣物が挙げられる。該薬剤は、標的受容体（例えばGITR）を刺激する、単離された抗体または断片またはその誘導体としうる。抗体の一例は、TRX-518である。タンパク質の別の例は、GITR-Lである。さらに、該薬剤は、標的受容体を刺激する低分子であってもよい。

20

【0053】

治療剤のさらに別の例としては、Treg細胞を枯渇させる薬剤が挙げられるが、それらに限定されない。Treg枯渇剤の例としては、ADCC細胞傷害活性（例えば、ADCC（抗体依存性細胞傷害活性）を媒介する抗体）、CDC（補体依存性細胞傷害活性）に起因する細胞死をTreg細胞に誘導するか、または他のエフェクター機能を介して細胞死を媒介する薬剤（例えば、Treg細胞の表面抗原（例えば、FR4、CD4、CD25（IL-2Ra）、CD127（IL7Ra）、CD45RA、CD45RO、CD39、CD73、GITR、CD101、GARP）に結合する）が挙げられる。あるいは、Treg枯渇剤の例としては、PCD（プログラム細胞死）を誘導する薬剤が挙げられる。該薬剤は、細胞死を誘導する、単離された抗体または断片またはその誘導体としうる。さらに、該薬剤は、細胞死を誘導する低分子であってもよい。

30

【0054】

治療剤のさらに別の例としては、腫瘍壊死因子スーパーファミリー受容体（TNFRSF）またはリガンド（TNFRSFRL）に結合する薬剤（抗体や低分子など）が挙げられるが、これらに限定されない。例としては、TNFRSFまたはリガンドを刺激する薬剤（抗体や断片やそれらの誘導体や低分子など）（例えば、CD137作動薬、NGFR作動薬、BAFFR作動薬、オステオプロテゲリン作動薬、BCMA作動薬、OX40作動薬、CD27作動薬、RANK作動薬、CD30作動薬、RELT作動薬、CD40作動薬、TACI作動薬、DcR3作動薬、TNFR1作動薬、DcTRAILR1作動薬、TNF作動薬、DcTRAILR2作動薬、TRAILR1作動薬、DR3作動薬、TRAILR2作動薬、DR6作動薬、TRAILR3作動薬、EDAR作動薬、TRAILR4作動薬、Fas作動薬、TROY作動薬、GITR作動薬、TWEAKR作動薬、HVEM作動薬、XEDAR作動薬、リンフォトキシンベータ受容体作動薬、4-1BBL作動薬、APRIL作動薬、BAFF作動薬、TLIA作動薬、TWEAK作動薬、およびLIGHT作動薬）が挙げられる。

40

【0055】

50

例としてはまた、TNFRSF R またはそのリガンドを阻害する薬剤（例えば、CD 137 拮抗薬、NGFR 拮抗薬、BAFFR 拮抗薬、オステオプロテゲリン拮抗薬、BCMA 拮抗薬、OX40 拮抗薬、CD27 拮抗薬、RANK 拮抗薬、CD30 拮抗薬、RELT 拮抗薬、CD40 拮抗薬、TACI 拮抗薬、DcR3 拮抗薬、TNF RI 拮抗薬、DcTRAIL R1 拮抗薬、TNF 拮抗薬、DcTRAIL R2 拮抗薬、TRAIL R1 拮抗薬、DR3 拮抗薬、TRAIL R2 拮抗薬、DR6 拮抗薬、TRAIL R3 拮抗薬、EDAR 拮抗薬、TRAIL R4 拮抗薬、Fas 拮抗薬、TROY 拮抗薬、GITR 拮抗薬、TWEAK R 拮抗薬、HVEM 拮抗薬、XEDAR 拮抗薬、リンフォトキシンベータ受容体拮抗薬、4-IBB 拮抗薬、APRIL 拮抗薬、BAFF 拮抗薬、TLIA 拮抗薬、TWEAK 拮抗薬、およびLIGHT 拮抗薬）が挙げられる。例示的のみのものであるが、これらの阻害剤は、TNFRSF R またはそのリガンドに対する抗体または断片またはその誘導体または低分子としうる。

10

【0056】

治療剤は、細胞増殖を阻害するかまたはアポトーシスを誘導する抗がん剤としうる。治療剤の例としては、レナリドマイド、イピリムマブ、リツキシマブ、アレムツマブ、オファツムマブ、フラボピリドール、アドリアマイシン、ダクチノマイシン、プレオマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、ABT-199、アシピシン、アクリルピシン、塩酸アコダゾール、塩酸アコダゾール、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムボマイシン、酢酸アメタントロン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アントラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、バチマスタット、ベンゾデバ、ピカルタミド、塩酸ピサントレン、ビゼレシン、硫酸プレオマイシン、プレキナールナトリウム、プロピリミン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、塩酸カルピシン、カルゼレシン、セデフィンゴール、クロラムブシル、シロレマイシン、シスプラチン、クラドリピン、クリスナトールメシレート、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルピシン、デシタビン、デキソルマプラチン、デザグアニン、デザグアニンメシレート、ジアジクオン、ドキシソルピシン、塩酸ドキシソルピシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、ツアゾマイシン、エダトレキセート、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン、エンロプラチン、エンプロメート、エピプロピジン、塩酸エピルピシン、エルプロゾール、塩酸エゾルピシン、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸エステルナトリウム、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトプリン、塩酸ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フロックスウリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルオロシタビン、フォスキドン、フォストリエシンナトリウム、ゲムシタビン、塩酸ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イブルチニブ、イデラリシブ、塩酸イダルピシン、イフォスファミド、イルモフォシン、イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸ロイプロリド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン、塩酸ロソキサントロン、マソプロコール、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メトプリン、メツレデバ、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、ミトマルシン、マイトマイシン、ミトスパー、ミトタン、塩酸ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オビヌツズマブ、オルマプラチン、オキシスラン、ペガスパルガーゼ、ペリオマイシン、ペンタムスチン、硫酸ペプロマイシン、パーホスファミド、ピボプロマン、ピボスルファン、塩酸ピロキサントロン、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、ピラゾフリン、リボプリン、リツキシマブ、ログレチミド、サフィンゴール、塩酸サフィンゴール、セムスチン、シムトラゼン、スパルフォセートナトリウム、スパルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌー

20

30

40

50

ル、タリソマイシン、テコガランナトリウム、テガフル、塩酸テロキサントロン、テモポルフィン、テニポシド、テロキシロン、テストラクトン、チアミプリン、チオグアニン、チオテパ、チアゾプリン、チラパザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン、リン酸トリシリピン、トリメトレキサート、グルクロン酸トリメトレキサート、トリプトレリン、塩酸ツプロゾール、ウラシルマスタード、ウレデバ、バブレオチド、ベルテポルフィン、硫酸ピンプラスチン、硫酸ピンクリスチン、ピンデシン、硫酸ピンデシン、硫酸ピネピジン、硫酸ピングリシネート、硫酸ピンレウロシン、酒石酸ピノレルピン、硫酸ピンロシジン、硫酸ピンゾリジン、ポロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、および塩酸ゾルピシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0057】

別の実施形態では、治療剤は、アルキル化剤とし得、そのようなアルキル剤は、ナイトロジェンマスタード、メチルメラミン、スルホン酸アルキル、ニトロソウレアまたはトリアゼンとしうる。

【0058】

本発明は、例えば、図1または図5に示されるような、本発明のVLPをコードする核酸分子をさらに提供する。

【0059】

本発明の核酸は、BLASTアルゴリズムによって比較された際に、本願の発明の参照の核酸およびアミノ酸配列（すなわち、例えば図1および図2の配列など、本発明の実施例を参照されたい）と少なくとも約70%同一の、好ましくは少なくとも約80%同一の、さらに好ましくは少なくとも約90%同一の、最も好ましくは少なくとも約95%（例えば95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一の核酸配列を含み、かつポリペプチド（アミノ酸配列）をコードし得、ここで、アルゴリズムのパラメーターは、それぞれの参照配列の全長にわたって、それぞれの配列間に最大の合致を与えるように選択される。BLASTアルゴリズムを用いて比較された際に、本願の発明の参照のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一の、好ましくは少なくとも約80%同一の、さらに好ましくは少なくとも約90%同一の、最も好ましくは少なくとも約95%（例えば95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドもまた、本願の発明に含まれ、ここで、アルゴリズムのパラメーターは、それぞれの参照配列の全長にわたって、それぞれの配列間に最大の合致を与えるように選択される。

【0060】

核酸分子は、本発明のVLPをコードするDNA分子（例えば、単離されたcDNA）としてもよい。さらに、核酸分子は、RNA（例えば、単離されたmRNAなどの単離されたRNA）としてもよい。あるいは、核酸分子は、cDNAとmRNAとのハイブリッドとしてもよい。例えば、本発明は、本発明のウイルスゲノム不含のVLPを発現するベクターを含むDNA構築物を提供する（図5を参照されたい）。

【0061】

本発明の核酸分子はまた、DNA分子ともRNA分子とも異なる核酸誘導体分子を含む。誘導体分子は、ペプチド核酸（PNA）および非核酸分子を含み、非核酸分子は、ホスホリチオエート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、およびメチルホスホネートが挙げられ、塩基対依存的な方式で一本鎖DNAまたはRNAに結合する（Zamecnik, P. Cら、1978年、Proc. Natl. Acad. Sci., 第75巻、280284頁；Goodchild, P. Cら、1986年、Proc. Natl. Acad. Sci., 第83巻、4143~4146頁）。DNA、RNA、およびそれらの類縁体は、例えば、Oligonucleotides and Analogues、F. Eckstein編、1991年、IRL Pressニューヨーク；Oligonucleotide Synthesis、M. J. Gait編、1984年、IRL Press、オックスフォード、イングランドに見ることができる。

【0062】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。用語ベクターは、プ

10

20

30

40

50

ラスミド、コスミドおよびファージミドを含むが、これらに限定されない。宿主ベクター系は、適切な宿主細胞に本発明のベクターを含む。適切な宿主細胞の例としては、細菌細胞および真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

別の実施形態では、本発明は、培養培地からもしくは培養細胞から本発明のVLPおよび/またはVLPモノマーを回収することを含む、プロセスを提供する。培養培地もしくは培養細胞由来のVLPモノマーである場合、そのようなモノマーは、まず単離され、次いでVLPを形成するようにされる。

【0064】

本発明の実施形態によれば、遺伝子コードの縮重は、本発明のVLPをコードする核酸配列の予測されうる数を提供し、該配列のコドンは、単離された核酸を宿主生物（細菌、酵母、*in vitro*で培養された哺乳類細胞、哺乳類動物（ヒトを含む）の細胞）が限定なく挙げられる）で最適に発現するように選択される。そのような発現は、核酸またはポリペプチドを生産する上で、それに続く本発明による単離および使用のため宿主生物において、または無細胞の*in vitro*転写および/または翻訳系において、有用である。

10

【0065】

用語「医薬製剤」、「医薬組成物」および「剤形」は、本明細書では互換的に使用され、対象への投与に適した形態の本発明の活性成分を含有する組成物を指す。

【0066】

本願の発明の医薬組成物は、投与様式および剤形の性質に応じて、1つまたは複数の医薬的に許容されうる担体、結合剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクル、例えば、保存剤、充填剤、ポリマー、崩壊剤、流動促進剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、潤滑剤、酸性化剤、染料、防腐剤、分散剤や、同様の性質を有する化合物などと混合されてもよい。そのような成分は、剤形を製剤化するために使用されることがある医薬的に許容うる担体または賦形剤を含めて、参照により本明細書にその全体を組み込まれる *Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986)* に記載されている。

20

【0067】

医薬的に許容されうる担体は、概して、採用された剤形および濃度でレシピエントに非毒性であり、製剤の他の成分に適合性がある。医薬的に許容されうる担体の例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、エタノール、ポリオール、植物油、脂肪、オレイン酸エチル、リポソーム、蜜蝋、ゲル形成ポリマーおよび非ゲル形成ポリマーを含めたポリマー、またはそれらの適切な混合物が挙げられる。担体は、等張性および化学安定性を高める物質など、微量の添加物を含有していてもよい。そのような材料は、採用された剤形および濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸および他の有機酸、またはそれらの塩などの緩衝液；アスコルビン酸などの酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸やアルギニンなどのアミノ酸；単糖、二糖、およびセルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含めた他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤、マンニトールやソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの対イオン；および/またはポリソルベート、ポロキサマーやPEGなどの非イオン性の界面活性剤が挙げられる。担体は、非経口の担体、さらに好ましくはレシピエントの血液に等張な溶液としてもよい。

30

40

【0068】

結合剤の例としては、微結晶性セルロースおよびセルロース誘導体、トラガカントゴム、グルコース溶液、アカシアゴム、ゼラチン溶液、糖蜜、ポリビニルピロリドン、ポビドン、クロスポビドン、ショ糖およびデンプンペーストが挙げられるが、これらに限定され

50

ない。

【0069】

希釈剤の例としては、塩が挙げられる。

【0070】

賦形剤の例としては、界面活性剤、親油性ビヒクル、疎水性ビヒクル、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、およびリン酸二カルシウムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

湿潤剤の例としては、プロピレングリコールモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ジエチレングリコールモノラウレート、およびポリオキシエチレンラウリルエーテルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0072】

本技術分野の当業者は、多数の異なる成分が、がんの治療で製剤の有効性を維持しつつ、活性薬剤に加えて、本発明による製剤に使用することができることを認識しよう。本明細書に提供される一覧は、網羅的ではない。

【0073】

非経口投与について、一実施形態では、本発明の薬剤は、上記に記載された医薬的に許容されうる担体と、単位剤形で注射可能な形態（溶液、懸濁液、またはエマルジョン）で、所望の純度で混合することによって、概ね製剤化することができる。

【0074】

治療投与に使用される任意の単位剤形は、滅菌されるべきである。滅菌性は、滅菌ろ過膜を通じる濾過によって容易に達成することができる。治療物は、概して、滅菌アクセスポートを有する容器に、例えば、静脈注射溶液バッグ、または皮下注射針による穿刺が可能なストッパーを具えるバイアル内に置かれる。

20

【0075】

本発明のキット

本発明の別の態様によれば、キットが提供される。本発明によるキットは、本発明の組成物を含むパッケージを含む。

【0076】

語句「パッケージ」は、本明細書に提示された組成物を含有する任意のベッセルを意味する。好適な実施形態では、パッケージは、箱または包装とすることができる。パッケージされた医薬製品に使用するためにパッケージ材は、本技術分野の当業者に公知である。医薬パッケージ材の例としては、プリスターバック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ（プレフィルドシリンジを含む）、ボトル、および選択された製剤と意図された投与方式および治療に適する任意のパッケージ材が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0077】

キットはまた、パッケージ内に含有されないが、パッケージ外に添付された品目、例えばピペットを含む。

【0078】

キットは、任意選択で、本願の発明の組成物を、それを必要とする状態にある対象に投与するための取扱説明書を含んでもよい。キットはまた、本明細書の組成物の構成要素の、米国食品医薬品局などの規制当局によって認可された使用についての取扱説明書を含んでもよい。キットは、任意選択で、本願の組成物についての標示文書または製品添付文書を含んでもよい。パッケージおよび/または任意の製品添付文書は、それ自体で規制当局に認可されていることがある。キットは、組成物を、パッケージ内で固相または液相（提供された緩衝液など）に含むことができる。キットはまた、方法を実行するための溶液の調製に用いる緩衝液と、ある容器から別へ液体を移し入れるためのピペットとを含むことができる。

40

【0079】

50

キットはまた、任意選択で、本明細書に記載されるような併用療法に使用するための1つまたは複数の他の組成物を含んでいてもよい。ある実施形態では、パッケージは、静脈内投与のための容器である。他の実施形態では、組成物は、吸入器に提供される。さらに他の実施形態では、組成物は、ポリマーマトリックスまたはリポソームの形態で提供される。

【0080】

本発明の方法

本発明は、対象で固形腫瘍がんの進行を治療、阻害または予防するための方法を提供する。本法は、腫瘍の成長または転移を阻害し、腫瘍細胞を死滅させるか腫瘍量を低減するように、有効量の本発明のVLPワクチンまたは医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。別の実施形態では、本発明は、固形腫瘍について腫瘍細胞を阻害する方法を提供し、本法は、有効量の本発明のワクチンまたは組成物を、腫瘍細胞に接触させることを含む。

10

【0081】

VLPワクチンまたは組成物は、例えば、がんを用いる場合、固形腫瘍の内部または近くに直接的に注射されてもよい。好適な実施形態では、投与は、腫瘍内としうる。あるいは、腫瘍部位を容易に識別できないがんの場合、投与は、リンパ節、脾臓、甲状腺、骨髄、または高濃度の腫瘍細胞を含む身体他の器官の内部または周囲に、直接行われてもよい。さらに、がんの部位に応じて、投与は、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、皮内、または経粘膜としうる。

20

【0082】

本発明の実践に従って、VLPワクチンは、組成物を対象に投与する直前に、治療剤と混和されてもよい。あるいは、該組成物は、VLPワクチンと治療剤との両方が含有されるように、プレミックスで利用可能としうる。

【0083】

剤形は、様々でありうるが、CpGオリゴヌクレオチドの総量が、用量当たり0.001~0.05、0.01~0.5、0.1~5.0、1~30、20~60、50~100、90~300、または250~1,000の領域にあるような用量を含む。

【0084】

固形腫瘍がんは、副腎がん、肛門がん、再生不良がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳/CNSがん、乳がん、原発不明のがん、キャスルマン病、子宮頸がん、結腸/直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ユースングファミリー腫瘍、眼がん、胆嚢がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍(GIST)、妊娠性嚢毛性疾患、ホジキン病、カボジ肉腫、腎臓がん、咽頭および下咽頭のがん、肝がん、肺がん、リンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔および副鼻腔のがん、上咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔および中咽頭のがん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、下垂体腫瘍、前立腺がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫、皮膚がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、子宮がん、膣がん、外陰部がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、多発性骨髄腫(MM)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、脾臓辺縁体リンパ腫、辺縁体リンパ腫(節外性および結節性)、成人の混合細胞型びまん性中悪性度リンパ腫、成人の大細胞型びまん性中悪性度リンパ腫、成人の大細胞型免疫芽球性びまん性中悪性度リンパ腫、成人の小型非きれこみ核細胞型びまん性中悪性度リンパ腫、または濾胞性リンパ腫としうる。

30

40

【0085】

さらに別の実施形態では、がんは、頭頸部がん、乳房、唾液腺、甲状腺、膵臓、胃、膀胱、子宮内膜または子宮の癌、子宮頸がん、卵巣、外陰部がん、前立腺、結腸、直腸、結腸直腸、肺、非小細胞肺癌、骨肉腫、神経膠芽腫、腎臓、肝臓、メラノーマまたは転移性がんのうちいずれかとしうる。

50

【0086】

本発明の一実施形態では、ワクチンは、整列化されて提示されたCpGオリゴヌクレオチドを有することによって、対象で受容体シグナリングを増強しうる。別の実施形態では、ワクチンは、によって、CpGオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増加させることによって、対象で受容体シグナリングを（例えば、TLR9受容体）を増強しうる。細胞は、抗原提示細胞、リンパ球、単球、またはNK細胞としうる。

【0087】

本発明はまた、ウイルスゲノムタンパク質不含のVLPを生産するための方法を提供し、本法は、宿主中でウイルスゲノム不含のVLPを生産するように、適切な培養条件下で本発明の宿主ベクター系を培養することと、そうして生産されたウイルスゲノム不含のVLPを回収することとを含む。あるいは、本法は、宿主中でウイルスゲノム不含のVLP被覆タンパク質を生産するように、適切な培養条件下で本発明の宿主ベクター系を培養することと、ウイルスゲノム不在で宿主から単離されたVLP被覆タンパク質から、VLPをアセンブリすることと、そうして生産されたウイルスゲノム不含のVLPを回収することとを含む。VLPはまた、宿主細胞からの単離に続いて、VLPモノマーのアセンブリから生産されてもよい。例えば、VLPは、宿主細胞の外側のカプシドタンパク質からアセンブリされてもよい。あるいは、本発明のVLPは、無細胞in vitro転写および/または翻訳系で生産されてもよい（Bundy、2008年b；Bundy、2011年）。

10

20

【0088】

別の実施形態では、本発明は、無細胞in vitro反応でウイルスゲノム不含のVLPを生産するための方法を提供する。好ましくは、VLPは、ウイルスゲノム不含の正二十面体のウイルス様粒子の集団である。この方法は、原核生物の細胞不含のin vitro翻訳反応（例えば、実質的にポリエチレングリコール不の）で、ウイルス被覆タンパク質を合成することを含んでいてもよい。原核生物の細胞不含のin vitro翻訳反応は、細菌細胞抽出物、ポリペプチドおよび/またはmRNAの合成機構の構成要素；ポリペプチドの翻訳のための転写に用いる鋳型；ポリペプチドの合成のためのモノマー；および補因子、酵素と他の試薬とを含有しうるが、他の試薬とは、ウイルス被覆タンパク質が、少なくとも60個の別々のタンパク質を含むウイルスゲノム不含の安定な正二十面体のウイルス様粒子に、自己アセンブリすることが許容される条件下で、ウイルス被覆タンパク質（例えば、少なくとも約250μg/mLのウイルス被覆タンパク質）を生産するための翻訳に必要なものである。

30

【0089】

一実施形態では、本発明の方法によって、ウイルスゲノム不含のVLPが生産され、CpGオリゴヌクレオチド（前掲）にコンジュゲートするのに利用される少なくとも1つの非天然アミノ酸（本明細書では非自然なアミノ酸またはnnAAとも参照される）が含有されうる。

【0090】

CpGオリゴヌクレオチドをVLPに付加（本明細書ではコンジュゲーションとも参照される）するために、VLPのウイルス被覆ポリペプチドは、目的の部位に少なくとも1つの第1の非天然アミノ酸（本明細書では非自然なアミノ酸または非正規アミノ酸（nnAA）とも参照される）を含むように修飾されてもよく、例えば、ウイルス被覆ポリペプチドを合成する間にメチオニンの位置へアジドホモアラニンを組み込むなどであり、また、アルキン官能基に付加されるCpGオリゴヌクレオチドを含むように修飾されてもよく、例えば、CpG-Xを生産するためのCpGオリゴヌクレオチドの3'端の5'-オクタジニルdUなどである。VLPのカプシドタンパク質に組み込まれたアジドホモアラニンのアジド官能基は、CpG-Xのアルキン官能基と共に（3+2）環化付加クリック反応に加わって、その結果、CpGオリゴヌクレオチドに架橋されたVLPを生じる。同じVLP内にある他の非天然アミノ酸含有カプシドタンパク質は、同様に、CpGオリゴヌク

40

50

レオチドに付加または接続されたVLPを生産するための(3+2)環化付加クリック反応に加わって、2つまたはそれ以上のCpGオリゴヌクレオチドを具えたVLPを生産する。アジド-アルキン官能基対に基づく同様の戦略が、治療剤または免疫チェックポイント阻害剤をVLPに付加するために使用されうる。VLPの形成に続いて、アジドとアルキン含有反応物質との(3+2)環化付加クリック反応を実施することが好ましい一方で、VLP内にアセンブリされる前に、そのような環化付加クリック反応が、VLPカプシドタンパク質またはモノマーを用いて実施されてもよい。

【0091】

以下の実施例は、本発明の態様をさらに説明するために提供される。これらの実施例は、非限定的であり、本発明の任意の態様を限定するものと解釈されるべきではない。

10

【実施例】

【0092】

【実施例1】

【0093】

In vivoのメチオニン置換としてのアジドホモアラニンを用いたHepBコアタンパク質の合成、およびアセンブリされたアジドホモアラニン含有HepBコア(HBC) VLPの精製

T7RNAプロモーターの制御下で、HepBコアコード配列を有したメチオニン(metB1)要求性のIPTG誘導可能なT7RNAポリメラーゼ大腸菌株をin vivoで使用して、メチオニン置換としてアジドホモアラニンを有するHepBコア(HBC)タンパク質を合成する。細菌宿主株は、メチオニン要求性の大腸菌変異(metB1)を有し、遺伝子型fhuA2 lacZ::T7 gene1[lon]ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2[dcmj] R(zgb-210::Tn10-Tet^S)endAl metB1 (mcrC-mrr)114::IS10を有する、T7 Express Crystal Competent大腸菌(高効率、New England Biolabs)である。この細菌株は、クロラムフェニコール耐性マーカー遺伝子(CAM^R)を有するpLysSプラスミド、アンピシリン耐性マーカー遺伝子(Amp^R)を有し、かつT7RNAポリメラーゼプロモーターの制御下にHepBコアタンパク質コード配列を担持するpET21-HepB Coreプラスミドを用いて、形質転換される。図1(下方)に示されるようなHepBコアタンパク質コード配列は、pET21aプラスミドDNA(Novagen)のマルチクロニング配列(MCS)のNdeI部位とSalI部位との間に挿入されて、149アミノ酸のHepBコアタンパク質(図1、上方)の発現を可能にする。図5は、pET21-HepB CoreプラスミドDNAの線図(上方)およびその配列(下方)を示す。同じ細菌細胞中でpLysSプラスミドとpET21-HepB Coreプラスミドの両方を維持するための選抜条件は、100 μg/mL アンピシリンおよび35 μg/mL クロラムフェニコールである。

20

30

【0094】

材料

M9培地(100 mL)は、M9塩(5x、Sigma)20 mL、グルコース(20%、Sigma)*2 mL、MgSO4(1M、Fisher Scientific)**200 μL、CaCl₂(1M、Fisher Scientific)**10 μL、アミノ酸混合物(50x)*2 mL、ビタミンB複合体(100x)*1 mL、クエン酸鉄アンモニウム(1g/L)200 μL、100 μg/mLとするアンピシリン(Sigma、品番A9518)の添加、35 μg/mLとするクロラムフェニコール(CalBiochem、品番220551)の添加、および総量100 mLとするH₂Oの添加(*4で保存された濾過滅菌ストックおよび**室温で保存されたオートクレーブストック)を含む。

40

【0095】

アミノ酸混合物(50x)は、1gのArg(Sigma、品番A3784)、1gの

50

Glu (Sigma、品番G5763)、1gのLys (Sigma、品番L5626)、1gのHis (Sigma、品番H8000)、1gのGly (Sigma、品番G7126); 1gのIle (Sigma、品番II2752)、1gのPhe (Sigma、品番P2126)、1gのLeu (Sigma、品番L8000)、1gのCys (Sigma、品番C8152)、1gのAsp (Sigma、品番A4534)、1.5gのL-Val (Sigma、品番V0500)、4gのL-Ser (Sigma、品番S5511)、4gのL-Thr (Sigma、品番T8625)および200mLとするH₂Oの添加を含む。

【0096】

ビタミンB複合体(100x)は、100mgのリボフラビン(Sigma、品番R7649)、100mgのニコチンアミド(Sigma、品番N5535)、100mgのピリドキシンHCl (Sigma、品番P4722)、100mgのチアミン(Sigma、品番T1270)、100mgのビオチン(Sigma、品番B3010)および100mLとするH₂Oの添加を含む。

10

【0097】

アジドホモアラニン(AHA)ストック(MedChem Source LLPまたはACME Bioscience Inc.由来)は、4mg/mLを含む(露光せずに-80°Cで保存)。

【0098】

VLP再懸濁緩衝液(1x)は、50mM Tris、pH7.5および500mM NaClを含む。

20

【0099】

以下の試薬、すなわち、LB培地(Sigma、品番L3022)、IPTG(Sigma、品番I6758)、PBS(Corning、品番21-040-CV)、および飽和硫酸アンモニウム(Sigma、品番A4418)も使用した。

【0100】

アジドホモアラニンを含むHepBコアタンパク質の誘導

pLysSプラスミドとpET21-HepB Coreプラスミドの両方を用いて形質転換されたT7 Express Crystal Competent大腸菌(New England Biolabs、高効率)を、2mLのLB培地(100μg/mLアンピシリンおよび35μg/mLクロラムフェニコールを含む)中、37°Cで一晩成長させる。翌日、細胞を10mLの新鮮LB培地(アンピシリンおよびクロラムフェニコールを補充)中に100倍に希釈し、対数期に37°CでOD600が0.5になるまで成長させ、この時点で、1,000xgで15分間旋回することによって、細胞を採取する。上清を除去し、細胞ペレットを1mLのM9培地に再懸濁する。細胞を37°Cで3時間、M9培地中で成長させ、その後、IPTG(終濃度1mL)とアジドホモアラニン(AHA、終濃度200μg/mL)の両方を添加して、HepBコアタンパク質の発現を誘導し、メチオニンの位置にAHAを取り込ませる。培養培地中へAHAを導入した上で、細胞を暗所で、遮光のため培養フラスコを覆うことによって成長させる。37°Cで一晩の培養後、1,000xgで15分間旋回することによって、細胞を採取した。上清

30

40

【0101】

HepBコアタンパク質の発現に用いる誘導細胞の分析

細胞ペレットを1mLの1xPBSに再懸濁し、細胞を15秒間、超音波で3回処理する。各々から破碎細胞の溶解成分および不溶成分を、15,000xgでの15分間の遠心分離によって分離する。溶解成分(上清)を採集し、さらなる精製に付して、単離されたHepBコアタンパク質を得る(下記)。また、上清を、全ジスルフィド結合の還元の後、SDS-PAGEによって解析する。HepBコアモノマーは、16kDaに別個のバンドとして現れる。

【0102】

50

破碎された細胞からのアジドホモアラニン含有HepBコアタンパク質(HBC-アジド)の単離

上清(上記由来の、超音波処理および遠心分離後の)中のHepBコアタンパク質を、硫酸アンモニウムで沈殿させるが、これは、上清が最終飽和度30%となるまで飽和硫酸アンモニウムを滴下で添加し、さらに1時間混合し、遠心分離して沈殿をペレットとすることによって行う。上清を除去した後、HepBコアタンパク質の硫酸アンモニウム沈殿物を1mLの1xPBSに再懸濁する。

【0103】

HBC VLP-アジドの形成および硫酸アンモニウム沈殿による精製

アジドホモアラニンを有するHepBコアタンパク質からVLPを形成するために、PBS中のHepBコアタンパク質を、50~200容の0.5M NaCl pH7.5に対し透析する。AHA含有HepBコアタンパク質の自己アセンブリに続いて、結果として得られたHBC VLP-アジド粒子を、2周回の硫酸アンモニウム沈殿によって精製する。端的に述べれば、透析されたHBC VLP-アジド粒子を、30%硫酸アンモニウムを用いて沈殿させるが、これは、透析されたHBC VLP-アジド粒子を含有する1.4mLの溶液に、0.6mLの飽和硫酸アンモニウムと追加のPBSを所望の体積になるまで滴下で添加し、続いて、室温で1時間インキュベートする。硫酸アンモニウム沈殿を14Kで10分間旋回し、次いで、ペレットを8mLのPBSに再懸濁して、さらに室温で1時間インキュベートする。2周回目の硫酸アンモニウム沈殿は、飽和硫酸アンモニウムを30%になるまで滴下で添加し、室温で1時間インキュベートし、続いて、14Kで10分間遠心分離することによって、実施する。沈殿物を1.4mLのPBSに再懸濁する。再懸濁されたHBC VLP-アジド粒子を、室温で1時間インキュベートする。任意の不溶物質を、14Kで10分間の遠心分離によって除去する。得られた上清を、新しい15mL円錐チューブに移し、硫酸アンモニウム沈殿によってHBC VLP-アジド粒子を精製する。

【0104】

HBC VLP-アジド粒子の濃度を、 $1\text{mg/mL} = 1.77\text{OD}_{260}$ を用いて OD_{280} での吸収によって決定する。HBC VLP-アジド調製物の純度を、SDS-PAGEを用いて分析する。

【0105】

エンドトキシン除去

PBS中、硫酸アンモニウム精製されたHBC VLPアジド粒子(上記由来)を4に冷却し、1/10容の冷却10% Triton(商標)X-114を添加する。溶液を、頻りに混合しながら室温で1時間インキュベートし、続いて、3,000xgで遠心分離して境界を形成させる。水層(上層)を入念に取り出す。境界に近い追加の水層を、0.5mLのチューブに取り出して、14Kで5分間旋回させて境界を形成させる。上層を取り出して、さらに多い水系試料(1回目の抽出から取り出した1回目の水層)に添加する。Triton(商標)X-114抽出の手順を追加の3回繰り返して、エンドトキシンをさらに除去する。

【0106】

不溶性の凝集物を除去するために、該水溶液を室温で1時間インキュベートし、次いで、15,000xgで15分間、遠心分離する。ペレットを乱さないよう注意しながら、上清を採集する。上清を使用してタンパク質濃度を決定し、還元SDS-PAGEによって分析する。

【0107】

HBC VLPアジドのさらなる精製

硫酸アンモニウム沈殿およびエンドトキシン除去のプロトコールに続いて、精製されたHBC VLPアジド調製物を、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、沈降速度法、沈降平衡法、免疫沈降法、透析、濾過、電気泳動による方法、および/または示差沈殿を用いて、さらに精

10

20

30

40

50

製してもよい。

【0108】

一般に、緩衝液をPBSに交換する際に、遠心濾過ユニット(Millipore、品番UFC510024)を試料体積<1mLに対して使用し、一方、PD-10脱塩カラム(GE Healthcare、品番17-0851-01)を試料体積2~10mLに対して使用する。

【0109】

HBC VLPアジドは、-80、-20 または4 で保存する。

【0110】

VLPへのCpGオリゴヌクレオチドのコンジュゲーション

架橋可能な官能基を具えたCpG含有オリゴヌクレオチド(CpG-X)を、Sigmaカスタムオリゴ部門(<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>)で合成し精製した。使用した配列は、5' T s G s A s C s T s G s T s G s A s A s C G s T s T s C s G s A s G s A s T s G s A - (5-Oct-dU) 3' であり、ここで、「s」は、配列中のホスホロチオエート結合を意味し、5-Oct-dUは、オリゴヌクレオチドの3' 端の5-オクタジニルdUである。5-Oct-dUの存在によって、アルキン官能基がCpGオリゴヌクレオチドに導入され、結果として得られるCpG-Xオリゴヌクレオチドはまた、CpG-アルキンとも参照される。オリゴの3' 端に付加された5オクタジニルdUは、VLPへのアルキン-アジドのコンジュゲーションを形成した。

10

20

【0111】

HBC VLPアジドを、不透明な反応槽内で、CpG-アルキン、アスコルビン酸ナトリウム、Tween-20およびリン酸緩衝整理食塩水と混合した。混合物をアルゴンガスで覆う。触媒のヘキサフルオロリン酸テトラキス(アセトニトリル)銅(I)(テトラキスCu(I)、Sigma)および促進剤のトリス(トリアゾイルメチル)アミン(TTMA、Shanghai ChemPartner)を次いで添加し、反応を室温で一晩、緩やかに攪拌させながら進行させた。最後の反応条件は、VLPをCpGオリゴヌクレオチドで完全に飽和させることが望ましい際には、以下のように、すなわちHBC VLP-アジドを60μ、CpG-アルキンを80μ、アスコルビン酸Naを200μ、Tweenを.01%、10mM リン酸カリウム、pH8、TTMAを0.25mM、テトラキスCu(I)を500μ、30、一晩、暗所とした。

30

【0112】

CpGオリゴヌクレオチドのコンジュゲーション

SDS-PAGE

図4に示すように、還元SDS-PAGEゲル上でのHBCモノマーのゲル移動度シフトを観察することによって、VLP-CpGオリゴヌクレオチドコンジュゲーションを評価した。

【実施例2】

【0113】

マウスでにおけるトリプルネガティブ乳腫瘍の治療のためのCpGオリゴヌクレオチド担持ウイルス様粒子の腫瘍内注射

40

以下のCpGオリゴヌクレオチドを使用した。すなわち、(1)対照として配列5'-tccatgacgttcctgacgtt-3'(小文字はホスホロチオエート結合を示す)を有するCpG、(2)CpG-アルキン(5'-tgactgtgaacGttcgagatga-5オクタジニルdU-3')、および(3)CpG-VLPである。マウスに由来しかつステージIVのヒト乳がんの動物モデルに使用される4T1腫瘍細胞(ATCC CRL-2539)を、動物に注射する。

【0114】

動物のケア

雌Balb/cマウス(6~8週齢)をCharles River Labsから入

50

手する。認可された I A C U C プロトコールの下、動物施設にて、動物を収容する。腫瘍細胞の注射、測径器による腫瘍の測定、治療剤の注入、動物の安楽死および腫瘍組織の採取を実施した。

【 0 1 1 5 】

i n v i v o 腫瘍モデルおよび治療

進行性のトリプルネガティブ乳癌腫である 4 T 1 を、同系の B A L B / C マウスに、左右対称に移植した。左右対称の腫瘍の一方の治療は、腫瘍が約 8 0 ~ 1 0 0 m m ³ (約 9 ~ 1 1 日目) である際に開始する。マウス各 1 2 頭 5 つの群を、以下に記載されるように治療する。

【 0 1 1 6 】

【表 1】

群	内容	マウス	CpG オリゴヌクレオチド/ 用量 (ug)	用量
1	PBS 対照	12		3
2	CpG 対照	12	50	3

10

群	内容	マウス	CpG オリゴヌクレオチド/ 用量 (ug)	用量
3	CpG -3' 5 Oct dU	12	50	3
4	CpG -3' 5 Oct dU	12	10	3
5	VLP-CpG	12	10	3

20

【 0 1 1 7 】

それぞれの場合では、5日を超える間隔を置いた別の日に、治療剤を3回腫瘍内注射する。腫瘍が潰瘍化するかまたは径 > 2 c m に到達した際に、マウスを屠殺する。腫瘍内の白血球浸潤に及ぼす処置の効果を試験するために、治療剤の最後の注射から 3 ~ 4 日後に各群から 3 頭のマウスを安楽死させ、腫瘍を分析用に採取する。試験は、処置の開始から 3 0 ~ 3 5 日後に終了し、生存している全ての動物を安楽死させ、組織 / 腫瘍を分析用に採取する。

30

【 0 1 1 8 】

分析

治療剤の最終注射から 3 週間から 4 週間後に、各群から 3 頭ずつのマウスを免疫学的分析用に安楽死させた。血清または血漿を採集し、のちのアッセイ用 (例えば、血清サイトカインアッセイ用、抗体反応性の免疫フィンガープリンティング用) に、- 8 0 で凍結保存した。腫瘍を採取して、続いて行う浸潤細胞 [T 細胞、T r e g 細胞、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、N K 細胞、骨髄由来抑制細胞 (M D S C)] の分析に用いるために、ホルマリン中で固定した。

40

【 0 1 1 9 】

1 群当たり残りの 9 頭の動物では、処置された腫瘍の成長と無処置の対側の腫瘍とを、1 週当たり 2 回評価する。腫瘍体積を [(腫瘍長) × (腫瘍幅) ² × (/ 6)] として算出する。動物の全身の健康状態、例えば、活動、体重、外被の外観もまたモニターする。

【 0 1 2 0 】

試験の終わりに、マウスを安楽死させて、腫瘍を採取し秤量する。肺も取り出して秤量し、転移性がん結節を観察する。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0121】

【非特許文献1】Siano, M., et al., A phase I-II study to determine the maximum tolerated infusion rate of rituximab with special emphasis on monitoring the effect of rituximab on cardiac function. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(23): p.7935-9.

【非特許文献2】Witzig, T.E., et al., Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase I trial in the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol*, 2005. 23(6): p.1103-8.

【非特許文献3】Spina, M, et al., Rituximab plus infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in HIV-associated non-Hodgkin lymphoma: pooled results from 3 phase 2 trials. *Blood*, 2005. 105(5): p.1891-7. 10

【非特許文献4】Hainsworth, J.D., et al, Rituximab plus short-duration chemotherapy as first-line treatment for follicular non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial of the minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol*, 2005. 23(7): p.1500-6.

【非特許文献5】Bendandi, M., Idiotype vaccines for lymphoma: proof-of-principles and clinical trial failures. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(9): p.675-81.

【非特許文献6】Kwak, L.W., et al., Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med*, 1992. 327(17): p.1209-15. 20

【非特許文献7】Miller, R.A., et al., Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med*, 1982. 306(9): p.517-22.

【非特許文献8】Schuster, S.J., et al. Idiotype vaccine therapy (BiovaxID) in follicular lymphoma in first complete remission: BV301 Phase III clinical trial results, in American Society of Clinical Oncology. 2009.

【非特許文献9】Ai, W.Z., et al., Anti-idiotype antibody response after vaccination correlates with better overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 2009. 113(23): p.5743-6.

【非特許文献10】McCormick, A. A., et al., Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(29): p.10131-6. 30

【非特許文献11】Milner, K., et al. Development of quantitative methods to assess humoral immune response (IR) in follicular Non-Hodgkin's Lymphoma (fNHL) patients receiving idiotype-keyhole limpet hemocyanin (Id-KLH) active immunotherapy, in American Association of Cancer Research Annual Meeting. 2007. Poster #1857.

【非特許文献12】Hennessy, E.J., A.E. Parker, and L.A. O'Neill, Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(4): p.293-307.

【非特許文献13】Krieg, A.M., Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*, 2008. 27(2): p.161-7. 40

【非特許文献14】Murata, M., Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. *Cancer Sci*, 2008. 99(7): p.1435-40.

【非特許文献15】Mizel, S.B. and J.T. Bates, Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol*. 185(10): p.5677-82.

【非特許文献16】Basith, S., et al, Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat*, 2011. 21(6): p.927-44.

【非特許文献17】Bundy, B.C. and J.R. Swartz, Efficient disulfide bond formation 50

n in virus-like particles. *J Biotechnol*, 2011. 154(4): p.230-9.

【非特許文献18】Bundy, B.C. and J.R. Swartz, Site-specific incorporation of p-propargyloxyphenylalanine in a cell-free environment for direct protein-protein click conjugation. *Bioconjug Chem*, 2010. 21(2): p.255-63.

【非特許文献19】Bundy, B.C., M.J. Franciszkowicz, and J.R. Swartz, Escherichia coli-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol Bioeng*, 2008. 100(1): p.28-37.

【非特許文献20】Kanter, G., et al, Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood*, 2007. 109(8): p.3393-9.

【非特許文献21】Voloshin, A.M. and J.R. Swartz, Efficient and scalable method for scaling up cell free protein synthesis in batch mode. *Biotechnol Bioeng*, 2005. 91(4): p.516-21.

【非特許文献22】Yang, J., et al., Expression of active murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in an Escherichia coli cell-free system. *Biotechnol Prog*, 2004. 20(6): p.1689-96.

【非特許文献23】Zlotnick, A., et al., Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry*, 1996. 35(23): p.7412-21.

【非特許文献24】Pumpens, P. and E. Grens, HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, 2001. 44(2-3): p.98-114.

【非特許文献25】Patel, K.G. and J.R. Swartz, Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide-alkyne click chemistry. *Bioconjug Chem*, 2011. 22(3): p.376-87.

【非特許文献26】Goerke, A.R. and J.R. Swartz, High-level cell-free synthesis yields of proteins containing site-specific non-natural amino acids. *Biotechnol Bioeng*, 2009. 102(2): p.400-16.

【非特許文献27】Patel, K.G., et al., Escherichia coli-based production of a tumor idiotype antibody fragment - tetanus toxin fragment C fusion protein vaccine for B cell lymphoma. *Protein Expr Purif*, 2010. 75(1): p.15-20.

【非特許文献28】Zhou, Z. and C.J. Fahrni, A fluorogenic probe for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne ligation reaction: modulation of the fluorescence emission via 3(n,pi)-1(pi,pi) inversion. *J Am Chem Soc*, 2004. 126(29): p.8862-3.

【非特許文献29】Marshall, J. D. et al., Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J. Leukoc. Biol.* 2003. 73:781-92

【非特許文献30】Hartmann, G. et al., Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33:1633-41.

10

20

30

40

【 図 5 - 3 】

```

CCAGAACCGTGGTGAAGTAAAGATGCTGAGATGATGGTGGTCAAGAGGGTGTACATCGAAGCTGG
ATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTTGAGAGTTCCTCCCGGAGAGACGTTTCCAAATGATGAGCATTAA
AGTCTGCTATGCGCGGGTATATCCCGTATTGAGCGCGGGCAAGACACTCGGTCGCGCATACAC
TATCTCAGATGACTTGGTGGTACTCAGAGTACAGAGAAAGCATCTACAGATGATGAGCATGAA
GAGAATATGAGAGTGTGCGCATACCACTAGTGAACACTCGCGCCACTCTCTGACCAAGTGG
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACAACTGGGGGATCATGACTCGCCTTATCGTTGGAA
CCGGAGCTGATAGGCCATACCAAGCAGCGAGGCTGACACACGATGCGCAGCAATGGCAACAAGDT
TGGCAAACTATTAACTGGGCACTACTACTGACTTCCCGGCAACAATAAGTGGATGAGAGGCG
GGATAAAGTGGCAGCACTCTCTGCGCTCGCGCTCCGGCCAGTGGTATTGCTGATAAATCTGGA
GCGGCTGAGCGTGGTCTCGCGTATCATGACAGCTGGGGCAGATGAAAGCTCCGATGCTGAG
TTATCTACAGAGCGGGAGTCAAGCACTATGATGAAACAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTCCCTC
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGCACTACTACTATATATCTTTAGATGATTAAATCTCAT
TTTTAATTAAGGATCTAGGTGAGATCCCTTTTGAATCTCATGACCAAACTCCCTAAAGTGGT
TTTTCTCCACTGAGCCTCAGACCCGATGAAAGATCAAGGATCTCTGAGATCCCTTTTTCTGCG
CGTAACTCTGCTGCTTCAAAACAAAAACGACCGCTACAGCGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTA
CCAACTCTTTCCGAGGTAACTGGCTCAGCAGGCGCAGATCAAACTACTCTCTAGTGTAGC
CGTAGTATGGCCACCACTTCAAGACTCTTACAGACTCCAGCGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTA
AGTGGCTGCTGCGAGTGGCAATGCTGTCTACAGCGGTTGACTCAAGCAGATGATACCGGATAAG
CGCGAGCGTCCGGCTGAGCGGGGGTCTGCTGACACAGCGCTACAGCTCGCTCTACTCTGCTTACC
TGGATACCTACAGCTGAGTATGAGAAAGCCACGCTCCCGAGGGAAGAGCGGACAGGATATCC
GGTAAGCGGAGGCTGCGAAGAGGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAGCGCTGATCTTAT
AGTCTGTGCGGTTTCGCACTGACTGATGCGCTGATTTTGTAAGCTCTCGAGGGGGCGAGGCT
TATGAAACCCGAGCAACCGGCTTTTACGGTCTCGGCTTTTGGGCTTTTGTCCACATGTT
CTTCTGCGTATCCCTGATCTGTGATACCGTATTACCGCTTTGATGAGCTGATACCGCTCGC
CGAGCGAAGCAGCGAGCGAGCTAGTGAAGCGAGGAGCGGAGGAGCGGCTGATGCGGATATTT
TCTTAGCCTCTGCGGATTTACACAGGATATGAGTGGCTCTCAGTCAACTGCTCTGATGCGC
GATAGTTAGCAGATACACTCGTATGCTACTGAGTGGTCTGCTGCTGCGCGCGGAGCGGCGG
AACCCCGCTGAGCGCGCTGAGCGGCTTCTGCTCGCGGATCCCTACAGCAAGCTGATCGGCT
TCCGGAGCTGATGCTGAGGTTTTCAAGCTCATACAGCAAGCGCGGAGCGAGCTGCGTAAAGCT
CATCAGCTGTTGCTGAGCGATTCAGAGTCTGCTGCTCATCCCGTCCAGCTGCTGATTTCTC
CAGAGCGTAAATGCTGCGCTCTGATAAAGCGGCGCATGTTAGGGCGGTTTTCTGCTTGGTCACT
GATGCGCTCGTGAAGGGGATTTCTGATCTGGGGTAAAGTACCGATGAACGAGAGAGGATGCTCA

```

FIG. 5-3

【 図 5 - 4 】

```

CGATACGGTTACTGATGATGAACATGCCGGTTACTGGAACGTTGAGGGTAAACAACCTGCCGATG
GATCGCGGGCCAGAGAAAATCACTCAGGTCATGCCAGCGCTCGTTAATACAGATGTAGGTGTT
CCACAGGDTAGCCAGCACTCTCGATGAGATCCGGAACATAAGTGGCAGGGCGCTGACTTCGGG
TTCCAGACTTACAGAAACCGGAAACCGAAGCCATCTGATGTTGCTCAGGTCGAGACCTTTGCA
GCAGAGTGGCTTCACTCGCTCGGATCGGTGATTCATCTGCTAAGCAGTAAAGCAACCCGCGAG
CTAGCGGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCGTGGGGCCGATCGCGGATAATGG
CTGCTTCTCGCGAAGCGTTGGTGGGGGACAGTGAAGAGCTTGGAGGAGGGGCTGCAAGATTCC
GAATACCGCAAGCAGCGGCGATCATGCTCGGCTCCAGGAAAGCGGCTTCCGCAAAATGACCCAG
AGCGCTCGCGCACCTGCTCAGGATGATGATGAAGAGCAGTCAATAGTCCGCGAGCATAGTCA
TGCCCCGCGCACCGGAGGAGGCTGACTGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATGGTGGAGATCCGGTCC
CTAATGATGAGCTAACTTACATTAATGGCTTCCGCTCACTCCCGCTTCCAGTGGGAAACCTGTG
TGCCAGTGCATTAATGATCGGCAACGCGGGGAGAGCGGCTTCCGATTTGGGCGAGGGTGGT
TTTTTTTCCAGTGAAGCGGCAACAGCTGATGCCCTTCCAGCGCTGCGCTGAGAGTTCAGCA
AGCGCTCAGCTGGTTGCCCGAGGCGAAATCTGTTGATGGTGGTAAAGCGGATTAACACA
TGAGCTGCTTCCGATCGCTGATCCACTACCGAGATGCGCACCAAGCGCGAGCGGAGTCCGTA
ATGGCGGATGGCGCGCGCATCTGATGCTGGCAACAGCATCGCAGGGGAGCATGCCCTCAT
TGAGATTGCTATGGTTGTTGAAACCGGACATGGCCTTCCGCTCCGCTTCCGCTATCGGGTG
AATTGATTGCGATGATTTATGCGCCAGCAGCAGCAGAGCGCGGAGCAGAACTAATGGG
CCCGTAAAGCGCGATTGCTGGTGAACAAATGGGACAGATGCTCAAGCGGCTGCGCTACCGCTT
CATGGGAAATAATATGATGGTCTGCTCAGAGCATCAAGAAATACGCCCGGACATAGT
CGAGGAGCTTCCAGCAATGGCACTGGCTATCCAGAGCATAGTAATAGTACGCCCGAGCGCT
TGCGGAGAGATTGGCGCGCGCTTACAGGCTCGACCGCGCTTCTTACCATGACAGCACA
CGCTGGCACCGATGATCGCGGAGATTAACTCGCGGCAATTTGGAGCGGCGTGGAGGGCAG
ACTGGAGTGGCAACCGCAATCAGCAAGCTCTTCCCGCGATTTGCTGCGCGCGGTTGGAAATG
TAATTCAGCTCCCGCATCGCGCTTCCCTTTTCCCGGTTTTCCGAAATGTTGGTGGCTGGTCA
CCAGCGGAAAGGCTCATAGAGCAGCCGCACTCTGCGCATGATGAGGTTACTGGTTAC
ATTCACCCCTGAATGACTCTTCCGGGCGTATGATGCTACCGGAAAGTTTTGCGCAATCG
ATGGTTCGGGATTCGAGCTCTCCCTTATGCGACTCTGATAGGAGCGAGCGAGTGGTGG
AGCCGTTGAGCACCGCGCGAAGGATGGTGCATGCAAGGATGGCGGCAACGTCGCCCGCA
CGGGGCTGCCACATACCCAGCGGAAACAGCGCTCATGAGCGGAAAGGCGAGCGGCTTCC
ATCGGATGCTGGGATATAGGGCGGCAACCGGCTGTTGGCGGGGATGATCGCGCGAGTGGT
CCGGCTAGAGGATCGATCTCGATCCCGGAAAT

```

FIG. 5-4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/069406																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00 (2015.01) CPC - A61K 2039/5258 (2015.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/00; 39/00; 39/39 (2015.01) USPC - 424/184.1, 185.1, 193.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 39/00, 39/02, 39/12, 39/391, 39/0011, 2039/5258, 2039/6075, 2039/55561, 2039/55588; C07K 14/005; C12N 7/00 (2015.01) (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: vaccine VLP CpG oligonucleotides cancer																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2006/0251677 A1 (BACHMANN et al) 09 November 2006 (09.11.2006) entire document</td> <td>1, 4, 5, 11, 16-23, 25, 27, 29-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2, 3, 12-15, 24, 26, 28-29, 34, 35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2013/116656 A1 (EMORY UNIVERSITY) 08 August 2013 (08.08.2013) entire document</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0240024 A1 (PARDOLL et al) 26 October 2006 (26.10.2006) entire document</td> <td>2, 12-15, 26, 28-29, 34, 35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2009/0263405 A1 (VERTHELYI et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2010/0061936 A1 (SHEN) 11 March 2010 (11.03.2010) entire document</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2006/0251677 A1 (BACHMANN et al) 09 November 2006 (09.11.2006) entire document	1, 4, 5, 11, 16-23, 25, 27, 29-33	Y		2, 3, 12-15, 24, 26, 28-29, 34, 35	Y	WO 2013/116656 A1 (EMORY UNIVERSITY) 08 August 2013 (08.08.2013) entire document	24	Y	US 2006/0240024 A1 (PARDOLL et al) 26 October 2006 (26.10.2006) entire document	2, 12-15, 26, 28-29, 34, 35	Y	US 2009/0263405 A1 (VERTHELYI et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document	3	Y	US 2010/0061936 A1 (SHEN) 11 March 2010 (11.03.2010) entire document	3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	US 2006/0251677 A1 (BACHMANN et al) 09 November 2006 (09.11.2006) entire document	1, 4, 5, 11, 16-23, 25, 27, 29-33																					
Y		2, 3, 12-15, 24, 26, 28-29, 34, 35																					
Y	WO 2013/116656 A1 (EMORY UNIVERSITY) 08 August 2013 (08.08.2013) entire document	24																					
Y	US 2006/0240024 A1 (PARDOLL et al) 26 October 2006 (26.10.2006) entire document	2, 12-15, 26, 28-29, 34, 35																					
Y	US 2009/0263405 A1 (VERTHELYI et al) 22 October 2009 (22.10.2009) entire document	3																					
Y	US 2010/0061936 A1 (SHEN) 11 March 2010 (11.03.2010) entire document	3																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 27 March 2015		Date of mailing of the international search report 15 APR 2015																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/069406

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 6-10
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
claims 6-10 are deemed unsearchable because a meaningful opinion could not be formed without a valid electronic sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100163991
弁理士 加藤 慎司

(74) 代理人 100153947
弁理士 家成 隆彦

(72) 発明者 セリオールト, トーマス
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94025、メンローパーク、アラメダデラス
ブルガス 3815

(72) 発明者 レヴィ, ロナルド
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94025、メンローパーク、アラメダデラス
ブルガス 3815

Fターム(参考) 4B064 AG32 CA19 CC24 CE02 CE04 DA01
4B065 AA01X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45
4C076 BB40 CC27 EE59 EE60 FF68 FF70
4C084 AA19 MA65 MA70 NA14 ZB09 ZB26 ZC75
4C085 AA03 AA25 BA51 CC01 CC31 DD62 EE01 GG10