

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7671483号
(P7671483)

(45)発行日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(24)登録日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
請求項の数 12 (全101頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2019-557431(P2019-557431)	(73)特許権者	519340400	
(86)(22)出願日	平成30年4月24日(2018.4.24)		インペリアル・カレッジ・イノベーションズ・リミテッド	
(65)公表番号	特表2020-517272(P2020-517272 A)		IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED	
(43)公表日	令和2年6月18日(2020.6.18)		イギリス、エス・ダブリュ・7 2・エイ・ゼット ロンドン、エキシビション・ロード、インペリアル・カレッジ内、ファカルティ・ビルディング、レベル・1	
(86)国際出願番号	PCT/GB2018/051070	(74)代理人	110000671	
(87)国際公開番号	WO2018/197859		I B C 一番町弁理士法人	
(87)国際公開日	平成30年11月1日(2018.11.1)	(72)発明者	ハジトウ、アミン	
審査請求日	令和3年4月12日(2021.4.12)		英国、ロンドン、デュ ケイン ロード、バーリントン デインズ ビルディング、	
審判番号	不服2023-3333(P2023-3333/J1)		最終頁に続く	
審判請求日	令和5年2月28日(2023.2.28)			
(31)優先権主張番号	1706451.0			
(32)優先日	平成29年4月24日(2017.4.24)			
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)			

(54)【発明の名称】 癌の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を治療、予防、または改善する方法においての使用のための、組換えファージミド／アデノ随伴ウイルス（AAV）粒子が形質導入された標的腫瘍細胞内で導入遺伝子を発現するための組換えファージミド／AAV粒子であって、前記組換えファージミド／AAV粒子が、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつ前記組換えファージミド／AAV粒子が由来するM13バクテリオファージゲノムの少なくとも95%を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド／AAV粒子が原核宿主からの前記組換えファージミド／AAV粒子の形成、パッケージング、または押し出しに必要なM13バクテリオファージ構造遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド／AAV粒子がカプシドタンパク質をコードする前記M13バクテリオファージ構造遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド／AAV粒子がpIIIカプシドマイナーコートタンパク質をコードする遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド／AAV粒子がpVIIIカプシドメジャーコートタンパク質をコードする遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド／AAV粒子のゲノムがバクテリオファージの複製起点を含み、前記方法が、1つ以上のサイトカインが発現されるように、前記腫瘍細胞に少なくとも隣接して前記導入遺伝子発現カセットを送達することを含む、組換えファージミド／AAV粒子。

【請求項 2】

前記導入遺伝子発現カセットが、前記腫瘍細胞におけるアポトーシス誘発、内因性抗腫

瘍応答を促進するための前記腫瘍細胞の変化、他の治療を促進するための前記腫瘍細胞の変化、または治療を促進するための腫瘍微小環境の変化の効果を有するサイトカインをコードする、請求項 1 に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子。

【請求項 3】

前記サイトカインが、IL - 4、IL - 12、IL - 15、TNF、TRAIL、IFN -、またはそれらの任意の組み合わせであり、任意選択的に前記サイトカインが IL - 15 である、請求項 1 または 2 に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子。

【請求項 4】

前記サイトカインが、前記サイトカインの発現および / または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドサイトカインであり、任意選択的に前記非内因性シグナルペプチドが、IL - 2 シグナルペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子。

10

【請求項 5】

前記ハイブリッドサイトカインが、TNF の発現および / または分泌を増加させるように構成された IL - 2 シグナルペプチドを含むハイブリッド TNF であり、任意選択的に

i) 前記ハイブリッド TNF が、実質的に配列番号 22 に示されるアミノ酸配列またはそのフラグメントもしくは変異体を含む；および / または

ii) 前記ハイブリッド TNF が、配列番号 23 を含む核酸配列またはそのフラグメントもしくは変異体によってコードされている、請求項 4 に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子。

20

【請求項 6】

小児脳腫瘍、任意選択的にびまん性内在性橋グリオーマ (DIPG) または髄芽腫の治療、予防、または改善に使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子。

【請求項 7】

組換えファージミド / アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子が形質導入された標的腫瘍細胞内で導入遺伝子を発現するための組換えファージミド / AAV 粒子であって、前記組換えファージミド / AAV 粒子が、1 つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつ前記組換えファージミド / AAV 粒子が由来する M13 バクテリオファージゲノムの少なくとも 95 % を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド / AAV 粒子が原核宿主からの前記組換えファージミド / AAV 粒子の形成、パッケージング、または押し出しに必要な M13 バクテリオファージ構造遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド / AAV 粒子がカプシドタンパク質をコードする前記 M13 バクテリオファージ構造遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド / AAV 粒子が pIII カプシドマイナーコートタンパク質をコードする遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド / AAV 粒子が pVII カプシドメジャーコートタンパク質をコードする遺伝子を欠くゲノムを含み、前記組換えファージミド / AAV 粒子ゲノムがバクテリオファージの複製起点を含み、さらに、使用時に、前記組換えファージミド / AAV 粒子が、1 つ以上のサイトカインが発現されるように、前記腫瘍細胞に少なくとも隣接して前記導入遺伝子発現カセットを送達するように構成され、前記サイトカインが、IL - 4、IL - 12、IL - 15、TRAIL、IFN -、ハイブリッド TNF のうちのいずれか 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせであり、任意選択的に前記サイトカインが IL - 15 である、組換えファージミド / AAV 粒子。

30

40

【請求項 8】

請求項 7 に記載の組換えファージミド / AAV 粒子、および薬学的に許容されるビヒクルを含む、医薬組成物。

【請求項 9】

治療または診断に使用するための、請求項 7 に記載の組換えファージミド / AAV 粒子。

50

【請求項 10】

請求項 7 に記載の、もしくは請求項 1 ～ 6 および 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子、または請求項 8 に記載の医薬組成物であって、

i) 前記組換えファージミド / AAV 粒子が、前記導入遺伝子発現カセットを前記標的腫瘍細胞に送達するように構成される；

ii) 前記組換えファージミド / AAV 粒子の前記ゲノムが、原核宿主内への二本鎖ベクターの複製を可能にするための複製起点、任意選択的に pUC ori を含む；

iii) 前記組換えファージミド / AAV 粒子の前記ゲノムが、宿主ゲノムへの標的化された組込みに好ましい、1 つ以上の DNA 配列を含む；

および / または

iv) 前記組換えファージミド / AAV 粒子が複数の導入遺伝子発現カセットを含む、組換えファージミド / AAV 粒子または医薬組成物。

10

【請求項 11】

請求項 7 もしくは 10 に記載の、もしくは請求項 1 ～ 6 および 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子、または請求項 8 に記載の医薬組成物であって、

i) 前記導入遺伝子発現カセットが、プロモーター、前記発現された物質に付着可能なポリ A テールをコードするための核酸、ならびに左および / または右末端逆位反復配列 (ITR) または左および / または右末端長反復配列 (LTR) のいずれかからなる群から選択される、前記標的細胞における前記核酸の発現に必要とされる 1 つ以上の機能的要素を含む；

20

ii) 前記導入遺伝子発現カセットが、前記標的細胞または組織において治療的または工業的有用性を有する、物質をコードする核酸をさらに含み、任意選択的に、前記核酸によってコードされる前記物質がポリペプチドまたはタンパク質である；

iii) 前記組換えファージミド / AAV 粒子が、1 つ以上のカプシドマイナーコートタンパク質を含み、任意選択的に、前記組換えファージミド / AAV 粒子が、前記組換えファージミド / AAV 粒子の前記標的腫瘍細胞への送達を可能にするための細胞標的化リガンドをディスプレイするように構成される pIII カプシドマイナーコートタンパク質を含む；

iv) 前記組換えファージミド / AAV 粒子が、1 つ以上のカプシドメジャーコートタンパク質を含み、任意選択的に、前記組換えファージミド / AAV 粒子が、その上に外来ペプチドをディスプレイするように構成される少なくとも 1 つの pVII カプシドメジャーコートタンパク質を含む；および / または

30

v) 前記組換えファージミド / AAV 粒子が、正味の正電荷を有する複合体を形成するようにカチオン性ポリマーと組み合わされ、任意選択的に、前記カチオン性ポリマーが、キトサン；ポリ-D-リジン (PDL)；ジエチルアミノエチル (DEAE)；ジエチルアミノエチル-デキストラン (DEAE-DEX)；ポリエチレンイミン (PEI)；ポリブレン；硫酸プロタミン；およびカチオン性脂質からなる群から選択される、組換えファージミド / AAV 粒子または医薬組成物。

【請求項 12】

40

請求項 7、10 もしくは 11 に記載の、もしくは請求項 1 ～ 6 および 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための組換えファージミド / AAV 粒子、または請求項 8 に記載の医薬組成物であって、

前記組換えファージミド / AAV 粒子の前記ゲノムが、それが由来する前記 M13 バクテリオファージゲノムの少なくとも 99 % を欠いている、組換えファージミド / AAV 粒子または医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の治療に関し、特に、癌の治療、予防、改善、または管理のための新規フ

50

ファージミド粒子および関連する発現システムの使用に関する。特に、本発明は、癌の治療、予防、改善、または管理のための、サイトカインをコードする導入遺伝子の送達のためのファージミド粒子および発現システムの使用に関する。本発明はまた、導入遺伝子の送達のための、および癌の治療、予防、改善、または管理のために養子移入された(adoptively transferred) T細胞の使用とそのような治療との組み合わせのための、ファージミド粒子および発現システムの使用にも及ぶ。

【背景技術】

【0002】

小児の高悪性度神経腫瘍は、小児のすべての小児中枢神経システム(CNS)腫瘍の15%~20%を占める腫瘍の異種グループである。腫瘍は、CNS内の任意の部位から発生し得る。脳幹、特に橋(pons)から生じる場合、それらはDIPGと呼ばれる。診断は、画像検査および組織学的特徴に基づく。多くの臨床試験にもかかわらず、予後診断は不十分なままであり、2年生存率は10%未満であり、小児癌の脳腫瘍関連死の主な原因のうちの1つとなっている。腫瘍の位置を考えると、腫瘍は手術不能であり、従来の分割放射線照射は一時的な利益を提供するための主力治療であり、他の治療法は従来の放射線治療を上回るいかなる効果も示していない。したがって、DIPGの従来の治療に対する反応が悪いため、革新的な治療アプローチが必要である。

【0003】

近年、腫瘍細胞を特異的に標的とし、抗腫瘍活性を引き起こす生物学的メカニズムに基づいた技術として遺伝子治療を研究することに努力が注がれている。遺伝子治療は、伝統的に、先天性疾患の治療のために考案されてきたが、化学療法および放射線療法などの併用療法の効率を改善し、腫瘍細胞の死を直接誘発するために、癌の治療においてますます使用されている。健康な組織と腫瘍組織とを区別できない従来の癌治療から生じる多くの副作用を考慮すると、標的ベクターを介した治療遺伝子の送達は、より多くの特異性および安全性を与える。

【0004】

インターロイキン(IL-4、IL-12、およびIL-15)および腫瘍壊死因子アルファ(TNF)およびTNF関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)など、様々なサイトカイン遺伝子が癌免疫遺伝子治療における使用に好適である。TNFファミリーのメンバーであるTRAILは、様々な癌細胞株においてアポトーシスを誘発し、高い耐性を有し、正常組織への毒性を最小限に抑える。TRAILタンパク質の局所注射および全身注射の両方が、マウスのヒト腫瘍異種移植片に対する抗腫瘍効果を発揮する。しかしながら、全身投与後のTRAILの急速なクリアランスおよび腫瘍退縮を達成するために必要な大量投与により、患者におけるTRAILの有効性が制限されている。現在開示されている粒子は、癌におけるTRAIL遺伝子の効率的な送達および持続的発現にとって理想的であり、費用効果が高い。IL-4は、癌のマウスモデルにおいて、抗腫瘍効果の誘発に効果的であった。さらに、対流促進送達(convection enhanced delivery)(CED)によって腫瘍内に注射された場合の再発性ヒト悪性神経腫瘍におけるIL-4の安全性および忍容性を決定するために、フェーズI臨床試験が開始された。正常な脳に対する神経毒性の組織学的証拠はいずれの患者にも確認されておらず、薬物関連の全身毒性は、いずれの治療患者にも明らかではなかった。9人の患者のうち6人が神経腫瘍壊死を示し、1人は手術後18か月以上無病のままであった。それでも、再び、有効性を達成するために必要な大量のタンパク質用量および費用、ならびに頭蓋内送達の侵襲性が、重大な制限を課している。

【0005】

過去20年間に、IL-12は、様々な前臨床モデルで抗腫瘍活性を媒介する最も強力なサイトカインのうちの1つとして出現した。IL-12は、腫瘍微小環境を形成する様々な免疫細胞に対する多面的効果により、腫瘍または罹患組織の種類に応じて、様々な免疫エフェクター細胞およびサイトカインが関与する自然免疫と適応免疫の間に関連性を確立する。IL-12は腫瘍細胞に対する直接の効果は有しないが、腫瘍溶解を媒介する細

10

20

30

40

50

胞傷害性TおよびNKエフェクター細胞の活性化を改善する。さらに、IL-12は、Th1細胞の反応を改善し、IFN- γ を含むサイトカインのパネルを誘発し、抗血管新生を示す。マウスでは、IL-12遺伝子の局所腫瘍内アデノウイルスベクター送達で安全に完了し、動物の生存期間を大幅に延長し、腫瘍サイズの劇的な退縮を誘発した。

【0006】

最近、IL-12をコードする組換えrAAVベクターの頭蓋内注射は、ラットモデルの脳腫瘍遺伝子治療に使用され、活性化ミクログリア細胞の誘発増加に関連する抗腫瘍効果をもたらした。最後に、TNF α は、アポトーシスによって直接、または免疫調節活性によって間接的に、強力な抗腫瘍細胞効果を示し、また、腫瘍血管新生を標的にして破壊する。

10

【0007】

インターロイキン15は、重要な免疫抗腫瘍メカニズムの開発に参加している。これは、CD8+T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、NK-T細胞を活性化し、抗腫瘍抗体の形成を促進することができる。IL-15は、T調節細胞の作用からTエフェクター細胞を保護し、腫瘍関連抗原に対する耐性を逆転させることもできる。

【0008】

腫瘍免疫療法におけるIL-15の利点は、NK細胞およびCD8+T細胞の両方の発生および活性を含む抗腫瘍免疫の重要なメカニズムを活性化し、記憶T細胞に対するその作用を通じて持続的な免疫反応を促進する、その特殊な能力に起因する。さらに、IL-15は、IL-2と比較して毒性が低く、Treg細胞活性の誘発効果が低く、特定の状況では、Treg細胞の作用からヒトエフェクターT細胞を保護することさえできる。IL-15は、国立癌研究所の腫瘍免疫療法において最大の潜在的用途を持つ薬剤のリストの上位にあり、難治性転移性黒色腫および転移性腎細胞癌の成人における組換えヒトIL-15の最初の臨床研究は、現在患者を募集している(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01021059>)。

20

【0009】

結腸癌を有するマウスの生存率は、IL-15での治療により大幅に改善されており、プログラムされた死リガンド1(programmed death ligand1)(PD-L1)の遮断によりさらに改善された。それでも、IL-15の適用ならびにPD-L1および細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)の両方の遮断に基づく併用療法で、最大の治療効果が達成された。

30

【0010】

残念ながら、高い期待にもかかわらず、IL-15は転移性悪性腫瘍の治療に有効性を示しているが、インビボでの生化学的安定性の欠如は重大な制限事項である。臨床試験における全身rhIL-15サイトカインは、非常に短い血漿中半減期(1時間未満)および急速な腎クリアランスを有し、これは有効性のインピーダンスを容易にもたらす。さらに、rhIL15の全身投与は、自己免疫の誘発を含む毒性の副作用を引き起こす可能性がある。

【0011】

全身投与の代わりにIL-15を腫瘍に直接送達することは、毒性を減らし、有効性を高めるのに理想的であろう。しかしながら、腫瘍塊への直接注射または養子細胞移入における導入遺伝子としてのIL-15の組込みは、実施が困難である。複数の転移部位の存在、または形質導入された細胞の過剰な増殖および白血病性形質転換の可能性により、実際には治療の妥当性が制限される場合がある。

40

【0012】

IL-15生物学的利用能の時間窓(time window)を延長させる別の解決策は、遺伝子治療アプローチにおいて発見された。遺伝子治療の利点には、局所領域産生、融合構築物を生成する能力、および組み合わせ戦略の汎用性が含まれる。残念ながら、真核生物ウイルスを使用した全身送達は、肝臓および細網内皮システムによる望ましくない取り込み、挿入変異誘発、補体システムまたは既存の抗体との反応から生じる免疫原性、および哺乳

50

動物細胞の幅広い指向性により、限られた成功しか収めていない。ウイルス指向性は、標的組織上のリガンド - 受容体相互作用を媒介するために、ウイルスカプシドタンパク質に組織特異的リガンドを追加することにより改変され得る。しかしながら、これらのリガンドを真核生物ウイルスに追加すると、ウイルスカプシドの構造が変化し、ペプチド自体の有効性が低下し、標的特性が低下する可能性がある。

【発明の概要】

【0013】

したがって、上記に記載されているサイトカインは、癌免疫療法での使用に好適であるが、サイトカインを伴う臨床試験の大部分は、全身毒性をもたらす腫瘍選択性の欠如のため、持続的な抗腫瘍応答を示すことができない。

10

【0014】

したがって、免疫腫瘍療法におけるサイトカインの送達のための改善された方法が必要である。

【0015】

第1の態様では、癌を治療、予防、または改善するための方法において使用するための組換えファージミド粒子であって、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に導入遺伝子を発現するためのものであり、ファージミド粒子が、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも50%を欠くゲノムを含み、該方法が、1つ以上のサイトカインが発現されるように、腫瘍細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達することを含む、組換えファージミド粒子を提供する。

20

【0016】

好ましい実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、腫瘍細胞におけるアポトーシス誘発、内因性抗腫瘍応答を促進する腫瘍細胞の変化、他の治療を促進する腫瘍細胞の変化の効果、または治療を促進する腫瘍微小環境の変化を有し得るサイトカインをコードし得る。

【0017】

特定の好ましい実施形態では、サイトカインは、IL-4、IL-12、IL-15、TNF、TRAIL、IFN-、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。好ましくは、サイトカインはIL-15であり、好ましくは、サイトカインはIL-4である。好ましくは、サイトカインはIL-12である。好ましくは、サイトカインはTRAILである。好ましくは、サイトカインはIFN-である。好ましい一実施形態では、サイトカインはTNFではない。

30

【0018】

しかしながら、別の好ましい実施形態では、サイトカインはTNFである。好ましくは、サイトカインは、TNFの発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドTNFである。好ましくは、シグナルペプチドは、TNFのもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。例えば、シグナルペプチドは、好ましくはIL-2シグナルペプチドである。

【0019】

したがって、一実施形態では、TNFの膜貫通ドメインは、TNFのもの以外のサイトカインシグナルペプチド、好ましくはIL-2シグナルペプチドと置き換えられる。別の実施形態では、本発明の任意の他のサイトカインとは異なるシグナルペプチド、好ましくはIL-2シグナルペプチドを、本発明の任意の他のサイトカインと組み合わせて、得られるハイブリッドサイトカインの発現および/または分泌を増加させるようにする。特に、ハイブリッドサイトカインは、ハイブリッドIL-4、IL-12、IL-15、TRAIL、またはIFN-のうちのいずれか1つであり得る。

40

【0020】

ハイブリッドIL-2-TNF配列は、TNFの膜貫通ドメインをIL-2のシグナルペプチドと置き換えて、TNFの分泌型をコードする配列を残し、より大きな発現および/または分泌をディスプレイするハイブリッドTNFを産生するようにする。

50

【 0 0 2 1 】

当業者であれば、「シグナルペプチド配列」が、タンパク質の細胞膜への移行を配向するように機能し、タンパク質の分泌を調節する、N末端配列に関連し得ることを理解するであろう。

【 0 0 2 2 】

特に、当業者であれば、「非内因性シグナルペプチド配列」が、発現されているサイトカインのものとは異なる、インターロイキンなどのサイトカインシグナルペプチドに関連し得ることを理解するであろう。

【 0 0 2 3 】

当業者であれば、「ハイブリッドサイトカイン」が、非内因性シグナルペプチド配列を含むサイトカインに関連し得ることを理解するであろう。

10

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、膜貫通ドメインを含む全長 T N F は、以下のように、配列番号 1 2 として本明細書に提供されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 5 】

【化 1】

5'
MSTESMIRDVELAEELPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLCLLHFGVIGPQR
EEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGV
ELR
DNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRE
TPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL 3'

20

[配列番号 12]

【 0 0 2 6 】

膜貫通ドメインを含む全長 T N F をコードする核酸配列は、以下のように、本明細書で表され得る。

【 0 0 2 7 】

【化 2】

5'
ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAA
GAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCTCCTCAGCCTCTTCTCCTT
CCTGATCGTGCGCAGGCGCCACACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGG
CCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCAGGC
AGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAC
CCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCGGGGCAATGCCCTCCTGGCC
AATGGCGTGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTC
ATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCA
CCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTG
CCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGG
TATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGC
GCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTG
GGATCATTGCCCTGTGA
3'

30

40

[配列番号 13]

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、T N F の分泌型は、以下のように、配列番号 1 8 として本明細書で提供されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 9 】

50

【化 3】

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYL
IYS
QVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYL
GGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

[配列番号 18]

【0030】

一実施形態では、TNF の分泌型をコードする核酸配列は、以下のように、本明細書
で表され得る。

【0031】

【化 4】

5'
GTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC
CTCAAGCTGAGGGGCGAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCA
ATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCA
TCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCAC
CCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGC
CATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGT
ATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCG
CTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGG
GATCATTGCCCTGTGA 3'

[配列番号 19]

【0032】

一実施形態では、IL-2 シグナルペプチドは、以下のように、配列番号 20 として本
明細書で提供されるアミノ酸配列を有する。

【0033】

【化 5】

MYRMQLLSICIALSLALVTNS

[配列番号 20]

【0034】

一実施形態では、IL-2 シグナルペプチドをコードする核酸配列は、以下のように、
配列番号 21 として本明細書で表され得る。

【0035】

【化 6】

5' ATGTACAGAATGCAACTCCTGTCTTGTATTGCACTAAGTCTCGCACTTGTACAAAAC
AGT3'

[配列番号 21]

【0036】

したがって、一実施形態では、ハイブリッド IL-2-TNF は、以下のように、配
列番号 22 として本明細書で提供されるアミノ酸配列を有する。

【0037】

【化 7】

MYRMQLLSICIALSLALVTNSESVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANA
LLA
NGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIK
SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

[配列番号 22]

10

20

30

40

50

【 0 0 3 8 】

したがって、一実施形態では、ハイブリッド I L - 2 - T N F をコードする核酸配列は、以下のように、配列番号 2 3 として本明細書で表され得る。

【 0 0 3 9 】

【 化 8 】

5'

ATGTACAGAATGCAACTCCTGTCTTGTATTGCACTAAGTCTCGCACTTGTCACAAACAG
TGAATTCGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTA
GCAAACCCCTCAAGCTGAGGGGCGAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTC
CTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGGCCTG
TACCTCATCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGC
TCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCC
TCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGGAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAG
CCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGA
CTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCT
ACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA 3'

10

[配列番号 23]

【 0 0 4 0 】

したがって、一実施形態では、1つ以上のサイトカインは、配列番号 1 2、1 8、2 0、および 2 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列またはそのフラグメントもしくは変異体(variant)を含む。

20

【 0 0 4 1 】

好ましくは、1つ以上のサイトカインは、実質的に配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

【 0 0 4 2 】

したがって、一実施形態では、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列は、配列番号 1 3、1 9、2 1、および 2 3 のうちのいずれか 1 つまたはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

【 0 0 4 3 】

好ましくは、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列は、配列番号 2 3 またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

30

【 0 0 4 4 】

第 2 の態様では、対象の癌を治療、予防、または改善するための方法であって、治療有効量の第 1 の態様による組換えファージミド粒子を、そのような治療を必要とする対象に投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

第 2 の態様の方法は、対象の癌の管理に使用され得る。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、組換えファージミド粒子は、小児脳腫瘍の治療、予防、または改善に使用するためのものである。他の実施形態では、組換えファージミド粒子は、びまん性内因性橋グリオーマ(DIPG)または髄芽腫の治療、予防、または改善に使用するためのものである。

40

【 0 0 4 7 】

第 3 の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を産生するためのシステムであって、

(i) 原核宿主内に存続するように構成された第 1 のベクターであって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセット、およびベクターの一本鎖 DNA への複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第 1 のベクターと、

(i i) 一本鎖 DNA のパッケージングに必要な構造タンパク質をコードする核酸を含

50

む第2のベクターと、を含み、原核宿主からの組換えファージミド粒子の形成および押し出しをもたらす、システムを提供する。

【0048】

第4の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を産生するための方法であって、
(i) 原核宿主内に存続するように構成された第1のベクターであって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセット、およびベクターの一本鎖DNAへの複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第1のベクターを、原核宿主細胞に導入することと、

(ii) バクテリオファージ構造タンパク質をコードする核酸を含むヘルパーファージを宿主に導入することと、

(iii) 一本鎖DNAが構造タンパク質によってパッケージングされることをもたらす条件下で宿主を培養して、原核宿主から組換えファージミド粒子を形成および押し出すことと、を含む、方法を提供する。

【0049】

第5の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を産生するための方法であって、

(i) (a) 原核宿主内に存続するように構成された第1のベクターであって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセット、およびベクターの一本鎖DNAへの複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第1のベクター、ならびに(b) 一本鎖DNAのパッケージングに必要な構造タンパク質をコードする核酸を含む、第2のベクターを、原核宿主細胞に導入することと、

(ii) 一本鎖DNAが構造タンパク質によってパッケージングされることをもたらす条件下で宿主を培養して、原核宿主から組換えファージミド粒子を形成および押し出すことと、を含む、方法を提供する。

【0050】

本発明の第6の態様では、第3の態様によるシステムによって産生されるか、または第4もしくは第5の態様の方法によって産生される組換えファージミドウイルス粒子と、薬学的に許容されるビヒクルと、を含む、医薬組成物を提供する。

【0051】

第7の態様では、本発明はまた、第6の態様による医薬組成物を作製するためのプロセスであって、第3の態様によるシステムによって産生されるか、または第4もしくは第5の態様の方法によって産生される治療有効量の組換えファージミド粒子、および薬学的に許容されるビヒクルに接触させることを含む、プロセスを提供する。

【0052】

本発明の別の態様では、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に導入遺伝子を発現するための組換えファージミド粒子であって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも50%を欠くゲノムを含み、使用中、粒子が、1つ以上のサイトカインが発現されるように、腫瘍細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達するように構成され、サイトカインが、IL-4、IL-12、IL-15、TRAIL、IFN- γ 、ハイブリッドTNF のうちのいずれか1つ、またはそれらの任意の組み合わせである、組換えファージミド粒子を提供する。

【0053】

好ましくは、サイトカインはIL-15であり、好ましくは、サイトカインはIL-4である。好ましくは、サイトカインはIL-12である。好ましくは、サイトカインはTRAILである。好ましくは、サイトカインはIFN- γ である。

【0054】

好ましくは、サイトカインは、TNF の発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドTNF である。好ましくは、シグナルペプチドは、TNF のもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。例えば、シグナルペプチドは、好ましくはIL-2シグナルペプチドである。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、本発明の任意の他のサイトカインとは異なるシグナルペプチド、好ましくは I L - 2 シグナルペプチドを、本発明の任意の他のサイトカインと組み合わせて、得られるハイブリッドサイトカインの発現および/または分泌を増加させるようにする。特に、ハイブリッドサイトカインは、ハイブリッド I L - 4、I L - 1 2、I L - 1 5、T R A I L、または I F N - のうちのいずれか 1 つであり得る。

【 0 0 5 6 】

好ましい実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、腫瘍細胞におけるアポトーシス誘発、内因性抗腫瘍応答を促進する腫瘍細胞の変化、他の治療を促進する腫瘍細胞の変化、または治療を促進する腫瘍微小環境の変化の効果を有し得るサイトカインをコードし得る。

【 0 0 5 7 】

さらなる態様では、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に導入遺伝子を発現するための組換えファージミド粒子であって、1 つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも 5 0 % を欠くゲノムを含み、使用中、粒子が、1 つ以上のサイトカインが発現されるように、腫瘍細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達するように構成され、サイトカインが、治療または診断において使用するための、I L - 4、I L - 1 2、I L - 1 5、T R A I L、I F N - 、ハイブリッド T N F のうちのいずれか 1 つ、またはそれらの任意の組み合わせである、組換えファージミド粒子を提供する。

【 0 0 5 8 】

好ましくは、サイトカインは I L - 1 5 であり、好ましくは、サイトカインは I L - 4 である。好ましくは、サイトカインは I L - 1 2 である。好ましくは、サイトカインは T R A I L である。好ましくは、サイトカインは I F N - である。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、サイトカインは、T N F の発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッド T N F である。好ましくは、シグナルペプチドは、T N F のもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。例えば、シグナルペプチドは、好ましくは I L - 2 シグナルペプチドである。

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、本発明の任意の他のサイトカインとは異なるシグナルペプチド、好ましくは I L - 2 シグナルペプチドを、本発明の任意の他のサイトカインと組み合わせて、得られるハイブリッドサイトカインの発現および/または分泌を増加させるようにする。特に、ハイブリッドサイトカインは、ハイブリッド I L - 4、I L - 1 2、I L - 1 5、T R A I L、または I F N - のうちのいずれか 1 つであり得る。

【 0 0 6 1 】

また、C A R T 細胞治療などの養子移入療法で使用するための、癌を治療するための改善された方法が必要である。本発明者らは、実施例において、C A R T 細胞などによって認識可能な抗原で腫瘍細胞を装飾または標識するために本明細書に記載される粒子を使用することが可能であることを示した。

【 0 0 6 2 】

したがって、本発明の第 8 の態様によると、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に少なくとも 1 つの抗原を発現するための組換えファージミド粒子であって、1 つ以上の養子移入された T 細胞によって認識される 1 つ以上の抗原をコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも 5 0 % を欠くゲノムを含み、使用時に、粒子が、1 つ以上の抗原が発現され、かつ 1 つ以上の養子移入された T 細胞によって認識されるように、標的腫瘍細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達するように構成される、組換えファージミド粒子を提供する。

【 0 0 6 3 】

第 9 の態様では、治療または診断に使用するための、第 8 の態様による組換えファージミド粒子を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

第 1 0 の態様では、癌の治療、予防、または改善に使用するための、第 8 の態様による組換えファージミド粒子を提供する。

【 0 0 6 5 】

有利には、本発明の粒子を使用して、腫瘍細胞へのサイトカインおよび抗原の送達および発現を標的とすることにより、腫瘍殺傷効果が大きくなり、従来の治療と関連する標的外効果が低減する。本発明者らは、腫瘍細胞への抗原またはサイトカインの送達に特に有益な新規のベクターおよびシステム（いわゆる「ハイブリッドファージミドウイルスベクターシステム」）を開発した。ファージミド / アデノ随伴ビリオン（すなわち、P A A V）と呼ばれる、いわゆるファージミド粒子を提供する。発明者が、彼らが作成した新規ベクターに使用する別の名前は、「ファスミド」である。バクテリオファージ誘導サイトカイン療法を本明細書に提供する。バクテリオファージ誘導 C A R T 細胞治療も本明細書に提供する。

10

【 0 0 6 6 】

線状ファージゲノムに挿入された r A A V カセットからなる先行技術の A A V P ゲノム（Nature protocols 2, 523 - 531 (2007) ; Cell 125, 385 - 398 (2006)）とは異なり、本発明の P A A V ゲノムは構造バクテリオファージ（ファージ）遺伝子を全く含まないので、宿主におけるベクター組立てを容易にするために原核ヘルパーウイルスが必要とされる。これは、A A V P がバクテリオファージの特定の固有の制限を依然として有しており、したがって一般的に A A V P またはファージベクターの大幅な改善の余地を残しているため、有利である。例えば、A A V P は 2 つのウイルス種（すなわち、バクテリオファージおよび A A V）の間のハイブリッドであり、A A V P ベクターは真核生物および原核生物ウイルスの両方のゲノムを含む。原核細胞ゲノムは、A A V P ウイルスの複製に不可欠であるにもかかわらず、機能的または治療的に無関係である。したがって、ファージウイルスゲノムの包含は、ベクター効率および生産方法に有害な影響を与え、哺乳動物ウイルスと比較した場合、A A V P の比較的低い遺伝子導入効率をもたらす。

20

【 0 0 6 7 】

有利には、第 8 または任意の上記の態様によるファージミド粒子へのハイブリッドウイルスベクター（例えば、A A V またはレンチウイルス）の再設計は、このファージミド粒子が由来するファージゲノムを実質的に欠き、得られるベクター（すなわち、ファージミド粒子）の機能的特性を劇的に高める。ウイルス発現システムの本発明によるファージミドベースシステムへの改変は、より広い意味でのファージミドウイルスベクターの適用の可能性を拡大する。この粒子のゲノムから、ゲノムサイズの 5 0 % を超える、バクテリオファージゲノムの少なくとも 5 0 % を排除することにより、得られるファージミド粒子の粒径が劇的に減少する。

30

【 0 0 6 8 】

用語「ファージミド粒子」は、ファージ由来コートタンパク質によってカプセル化されたハイブリッドファージミドゲノムを意味することができる。ハイブリッドファージミドゲノムは、「ファージミドゲノム」（すなわち、バクテリオファージ（例えば、F 1）からの複製および細菌（例えば、p U C 1）からの複製の 2 つの複製起点を含む遺伝子構築物）である。一実施形態では、ファージミドゲノムは組込まれた「A A V 由来の組換え導入遺伝子カセット」（r A A V）を含有することができ、したがってハイブリッドであり、正常な（すなわち、一般的な非ウイルス性）組換え導入遺伝子発現カセットを有する従来のファージミドゲノムではない。ファージミド粒子は、トランス作用性作用因子（例えば、ヘルパーファージ）由来のファージタンパク質によってカプセル化されたハイブリッドファージミドゲノム（すなわち、本発明）を意味することができる。

40

【 0 0 6 9 】

非常に大きいまたは複数の導入遺伝子カセットを組込む追加の能力を可能にする一方で、これらのより小さいファージミド粒子はまた、遺伝子導入、生産収率、生体内分布、お

50

よび真核生物の細胞障壁からの回避の増強において付加的な利点を示す。本発明のファージミド粒子を使用することの別の重要な利点は、それらが、後述するように、極めて大きく多数の導入遺伝子カセットまたは遺伝子挿入物、例えば、トランスフェクションによる組換えウイルス（例えば、r A A Vまたはレンチウイルス）産生のために使用される3つのプラスミドの遺伝子、を収容する能力を有することである。したがって、単一または複数のファージミドベクター（複数可）におけるウイルス産生のための遺伝子構成要素を組み合わせることににより、効率的な商業規模のウイルス産生遺伝子送達システムが設計されている。したがって、好ましくは、粒子は複数の導入遺伝子カセットを含む。

【0070】

一実施形態では、組換えファージミド粒子は、例えば事前のワクチン接種により、送達された1つ以上の抗原に曝露されていない対象の治療に使用するためのものである。

10

【0071】

一実施形態では、ファージミド粒子は、好ましくは、核酸配列が発現されるように、標的腫瘍細胞に隣接する細胞に導入遺伝子発現カセットを送達するように構成され、それにより、抗原または各抗原またはサイトカインが産生され、その後、抗原は腫瘍細胞の標的に関連するか、またはこれに付着するようになり得る。

【0072】

しかしながら、好ましい実施形態では、ファージミド粒子は、導入遺伝子発現カセットを標的腫瘍細胞に送達するように構成される。好ましくは、抗原または各抗原は、標的腫瘍細胞の細胞表面に発現されるペプチドまたはタンパク質である。好ましくは、抗原または各抗原は、腫瘍細胞によって発現された場合、C A R T細胞にアクセス可能なペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質は、腫瘍細胞によって発現された場合、細胞表面で、または細胞表面上に折り畳まれたペプチドタンパク質として存在するようなものであり得る。

20

【0073】

本発明の第11の態様では、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に少なくとも1つの抗原を発現するための組換えファージミド粒子であって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセットを含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも50%を欠くゲノムを含み、使用時に、粒子が、1つ以上のサイトカインが発現されるように、標的腫瘍細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達するように構成される、組換えファージミド粒子を提供する。

30

【0074】

第12の態様では、治療または診断に使用するための、第11の態様による組換えファージミド粒子を提供する。

【0075】

第13の態様では、癌の治療、予防、または改善に使用するための、第11の態様による組換えファージミド粒子を提供する。

【0076】

第14の態様では、対象の癌を治療、予防、または改善するための方法であって、治療有効量の第11の態様による組換えファージミド粒子を、そのような治療を必要とする対象に投与することを含む、方法を提供する。

40

【0077】

第15の態様では、原核宿主から第11の態様による組換えファージミド粒子を産生するための、ウイルスベクター構造タンパク質をコードする核酸を含むヘルパーファージの使用を提供する。

【0078】

第16の態様では、第11の態様によるか、第3の態様によるシステムによって産生されるか、第4もしくは第5の態様の方法によって産生されるか、または第15の態様の使用によって産生される、組換えファージミドウイルス粒子であって、組換えファージミド粒子が、ファージミド粒子のゲノム内のウイルスゲノムを含むか、またはこれに由来する

50

組換えウイルスベクターの産生のためのものであり、組換えウイルスベクターが、1つ以上のサイトカインが発現されるように、腫瘍細胞に少なくとも隣接して、1つ以上の抗原をコードする核酸配列を送達するために使用される、組換えファージミドウイルス粒子を提供する。

【0079】

第17の態様では、癌の治療、予防、または改善に使用するための、rAAV、rep-cap、アデノヘルパー遺伝子、および1つ以上の抗原またはサイトカインをコードする核酸配列を含む、組換えベクターを提供する。

【0080】

第18の態様では、癌の治療、予防、または改善のための方法において使用するための、第17の態様のベクターを含む、組換えファージミド粒子を提供する。

10

【0081】

抗原または各抗原は、ヒトにおける使用に好適な既存のCAR T細胞の既知の標的であり得る。例えば、抗原または各抗原は、MUC1、PSMA、CD19、CD20、エストロゲン関連受容体ベータ2型(ERBB2)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。抗原または各抗原は、MUC1またはPSMAであってもよい。

【0082】

一実施形態では、適切な抗原(例えば、MUC1、CD28、IL4)をコードする核酸配列は、以下のように、本明細書で表され得る。

【0083】

20

【化9】

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAACCG
CCCCTCCAGCCCACGGAGTGACCAGCGCCCCTGACACCCGGCCTGCTCCTGGAAGC
ACAGCTCCACCTGCCCACGGCGTTACCTCTGCACCAGATACTAGGCCTGCTCCAGGC
TCCATCGAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACC
ATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCCAGC
AAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACCGTGCCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGAGGAGAAAGCGCAGCGGT
TCCGGCGAGGGCCGGGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGG
CCCTATGGGCCTGACCAGCCAGCTTCTGCCCCCCTGTTCTTCCTGCTGGCCTGCGCC
GGCAACTTCGTGCACGGCCACAAGTGCGACATCACCTGCAGGAGATCATCAAGACC
CTGAACAGCCTGACCGAGCAGAAGACCCTGTGCACCGAGCTGACCGTGACCGACATC
TTCGCCGCCAGCAAGAACACCAACCGAGAAGGAGACCTTCTGCCGGGGCCGCCACCGT
GCTGCGGCAGTTCTACAGCCACCACGAGAAGGACACCCGGTGCTGGGCGCCACCG
CCCAGCAGTTCCACCGGCACAAGCAACTGATCCGGTTCCTGAAGCGGCTGGACCGGA
ACCTGTGGGGCCTGGCCGGCCTGAACAGTTGCCCCGTGAAGGAGGCCAACCAAGAGC
ACCCTGGAGAACTTCCTGGAGCGGCTGAAGACCATCATGCGGGAGAAGTACAGCAAG
TGCAGCAGCTAG

30

[配列番号14]

【0084】

40

別の実施形態では、抗原をコードする核酸配列(例えば、MUC1、GPI、IL4)は、以下のように、本明細書で表され得る。

【0085】

【化 1 0】

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAACCG
CCCCTCCAGCCCACGGAGTGACCAGCGCCCCTGACACCCGGCCTGCTCCTGGAAGC
ACAGCTCCACCTGCCCCACGGCGTTACCTCTGCACCAGATACTAGGCCTGCTCCAGGC
TCCCCCAACAAGGGCAGCGGCACAACCAGCGGAACCACAGGCTGTTGAGCGGCCA
CACCTGCTTCACCCTGACAGGCCTGCTGGGCACCCTGGTGACAATGGGCCTGCTGAC
CAGGAGAAAGCGCAGCGGTTCCGGCGAGGGCCGGGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCG
ACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCTATGGGCCTGACCAGCCAGCTTCTGCCCCCCTGT
TCTTCCTGCTGGCCTGCGCCGGCAACTTCGTGCACGGCCACAAGTGCGACATCACCC
TGCAGGAGATCATCAAGACCCTGAACAGCCTGACCGAGCAGAAGACCCTGTGCACCG
AGCTGACCGTGACCGACATCTTCGCCGCCAGCAAGAACACCACCGAGAAGGAGACCT
TCTGCCGGGGCCGCCACCGTGCTGCGGCAGTTCTACAGCCACCACGAGAAGGACACCC
GGTGCTGGGGCGCCACCGCCCAGCAGTTCCACCGGCACAAGCAACTGATCCGGTTCC
TGAAGCGGCTGGACCGGAACCTGTGGGGCCTGGCCGGCCTGAACAGTTGCCCCGTGA
AGGAGGCCAACCCAGAGCACCCCTGGAGAACTTCCTGGAGCGGCTGAAGACCATCATGC
GGGAGAAGTACAGCAAGTGCAGCAGCTAG

10

[配列番号15]

【 0 0 8 6】

さらに別の実施形態では、抗原をコードする核酸配列（例えば、P S M A）は、以下の
ように、本明細書で表され得る。

20

【 0 0 8 7】

30

40

50

【化 1 1】

ATGTGGAACCTGCTGCACGAGACTGACAGCGCCGTGGCAACCGCACGGAGACCCCG
 GTGGCTGTGCGCTGGCGCACTGGTGTCTGGCCGGCGGGTTCTTTCTGCTGGGGTTCCCT
 GTTTGGATGGTTTATCAAAAGCTCCAACGAGGCCACCAATATTACACCTAAGCACAAT
 ATGAAAGCATTCCTGGATGAACTGAAGGCCGAGAACATCAAGAAATTCCTGTACAACT
 TTA CT CAGATTCCACATCTGGCTGGCACCGAGCAGAACTTT CAGCTGGCAAAACAGAT
 CCAGAGCCAGTGGAAGGAATTCGGGCTGGACTCCGTGGAGCTGGCCCACTACGATGT
 CCTGCTGAGTTATCCAAATAAGACACATCCCAACTATATCTCAATCATTAACGAAGAC
 GGAAATGAGATTTTCAACACTTCACTGTTTGAACCCCTCCACCCGGCTACGAGAACG
 TGAGCGACATCGTCCCTCCATTCTCAGCCTTTAGCCACAGGGAATGCCTGAGGGGG
 ATCTGGTGTACGTCAATTATGCTCGCACCGAAGACTTCTTTAAGCTGGAGCGAGATAT
 GAAAATCAACTGTAGCGGCAAGATCGTGATTGCCAGATACGGCAAAGTGTTTCGCGG
 GAATAAGGTCAAAAACGCTCAGCTGGCCGGGGCTAAGGGAGTGATTCTGTACTCTGA
 CCCCCTGATTATTTTCGCACCTGGAGTGAAGAGTTATCCAGACGGATGGAATCTGCCA
 GGAGGAGGAGTGACGCGAGGAAACATCCTGAACCTGAATGGGGCCGGAGATCCTCTG
 ACCCCAGGATACCCCGCCAACGAATACGCTTATAGGCGAGGAATTGCAGAGGCAGTG
 GGACTGCCTTCCATCCCAGTCCACCCCACTTGGCTACTATGACGCCCAGAAGCTGCTG
 GAGAAAATGGGAGGCTCTGCTCCCCCTGATTCTAGTTGGAGAGGCAGTCTGAAGGTG
 CCTTACAATGTCTGGCCCAGGGTTTACAGGGAACCTTTTCAACTCAGAAGGTGAAAATGC
 ACATCCATAGCACTAATGAAGTGACCAGGATCTATAACGTCAATTGGAACCTCTGCGAGG
 CGCCGTGGAGCCTGACAGATACGTCATTCTGGGGGGACACCCGCGACTCCTGGGTGTT
 TGGCGGGATCGATCCACAGTCTGGCGCCGCTGTGGTCCATGAAATTGTGCGGTCTTTC
 GGCACACTGAAGAAAGAGGGGTGGAGACCCCGACGGACTATCCTGTTTGCAAGTTGG
 GATGCCGAGGAATTCGGCCTGCTGGGGAGTACAGAATGGGCCGAGGAAAATTCACGG
 CTGCTGCAGGAGAGAGGGGTGGCTTACATCAATGCAGACTCAAGCATTGAAGGAAAC
 TATACACTGCGGGTGGATTGCACTCCCCTGATGTACAGCCTGGTCCACAACCTGACCA
 AGGAGCTGAAATCCCCTGACGAGGGATTTCGAAGGCAAAAGCCTGTATGAATCCTGGA
 CAAAGAAAAGTCCATCACCCGAGTTTAGCGGAATGCCTCGAATCTCTAAGCTGGGAAG
 TGGCAATGATTTTGAAGTGTTCTTTT CAGAGACTGGGGATTGCCTCCGGAAGAGCTAGG
 TACACCAAAAATTGGGAGACAAACAAGTTCTCCGGCTACCCACTGTATCACAGCGTGT
 ACGAGACTTATGAACTGGTTCGAGAAATTCTACGACCCCATGTTTAAGTATCATCTGAC
 CGTGGCACAGGTCAGGGGAGGCATGGTGTGTTGAGCTGGCCAATTCCATCGTCCTGCC
 ATTCGACTGTAGAGATTATGCTGTGGTCTGAGGAAGTACGCAGACAAAATCTATAGC
 ATTTCCATGAAACATCCCCAGGAGATGAAGACCTACTCTGTGAGTTTTCGATTCCCTGTT
 TTCTGCCGTCAAAAACCTTACAGAAATCGCTAGTAAGTTTTT CAGAGCGCCTGCAGGAC
 TTCGATAAGTCTAATCCCATTGTGCTGAGGATGATGAACGACCAGCTGATGTTCCCTGG
 AACGCGCCTTTATCGACCCCTCTGGGGCTGCCTGATCGCCCTTCTACCGACACGTGAT
 CTACGCACCTTCTCTCATAACAAGTACGCCGGAGAGTCTTTTCCAGGCATCTATGAC
 GCTCTGTTTCGATATTGAATCAAAGGTGATCCCAGCAAAGCATGGGGCGAGGTCAAGA
 GACAGATCTACGTGGCAGCCTTCACCGTCCAGGCTGCAGCCGAAACACTGAGCGAGG
 TGGCCTGA

[配列番号16]

【0088】

したがって、好ましくは、導入遺伝子は、実質的に配列番号14～16のうちのいずれか1つに示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

【0089】

さらに別の実施形態では、抗原は、実質的に配列番号17に示されるアミノ酸配列（例えば、MUC1、Genbank受入番号：P15941）、またはそのフラグメントもしくは変異体を含むか、またはそれに由来し得る。

【0090】

10

20

30

40

50

20

30

40

50

好ましい実施形態では、組換えファージミド粒子は、養子移入されたT細胞の使用をさらに含む方法において使用するためのものである。養子移入されたT細胞は、組換えファージミド粒子によって標的腫瘍細胞に導入された抗原または各抗原に特異的であり得る。好ましくは、1つ超の型のT細胞が養子移入される。好ましくは、1つ超の型のT細胞は、同じ抗原または異なる抗原に特異的である。

【0096】

好ましくは、標的腫瘍細胞に少なくとも隣接して発現される1つ以上の抗原を認識する養子移入されたT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞、T細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞、および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からなる群から選択される。TCRトランスジェニックT細胞は、導入された抗原または各抗原に関連するエピトープに特異的であり得る。TILは、既知の抗原に対する特異性を持つリンパ球を含むことが知られている組織に由来する場合がある。

10

【0097】

しかしながら、最も好ましくは、養子移入されたT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞である。CAR T細胞は、組換えファージミド粒子によって腫瘍細胞に導入された抗原または各抗原に特異的であり得る。

【0098】

最も好ましい実施形態では、組換えファージミド粒子は、組換えファージミド粒子による腫瘍細胞の特異的標的化、およびその後の腫瘍細胞による発現のための1つ以上の抗原またはサイトカインをコードする1つ以上の配列の腫瘍細胞への送達、ならびに抗原に関連した、1つ以上の送達された抗原に対する特異性を有するCAR T細胞の移入、およびその後の癌の治療、予防、または改善のための腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を含む、方法において使用するためのものである。

20

【0099】

一実施形態では、CAR T細胞は、二重特異性CAR T細胞であってもよく、これは、1つ以上の組換えファージミド粒子によって送達される1つ以上の抗原に対して特異性を有し得る。例えば、組換えファージミド粒子の単一型または種は、単一型の二重特異性CAR T細胞による認識のために2つ以上の抗原を送達し得る。

【0100】

好ましくは、ファージミド粒子はビリオンを含む。組換えファージミド粒子のゲノムの好ましい一実施形態を図3に示し、好ましい成分を図4～6に示す。

30

【0101】

好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、ファージミドゲノムの一本鎖DNAへの複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含み、続いて一本鎖DNAが、原核宿主内のファージミド粒子にパッケージングすることができる。パッケージングシグナルは、複製起点を含むことが好ましい場合がある。例えば、複製起点は、好ましくはF1 ori、より好ましくはF1バクテリオファージからなる。F1 oriの一実施形態のDNA配列は、以下のように、配列番号1として本明細書で表される。

【0102】

【化13】

ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTT

[配列番号1]

40

【0103】

50

好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、原核宿主内で二本鎖ベクターの複製を可能にするための複製起点を含む。好ましくは、この複製起点は、宿主内のベクターの高コピー数複製を可能にする。好ましくは、複製起点は p U C o r i を含む。p U C o r i の一実施形態の D N A 配列は、以下のように、配列番号 2 として本明細書で表される。

【 0 1 0 4 】

【 化 1 4 】

```
TTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGG
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAC
CACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAG
TGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT
GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGC
CACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG
TCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCG
GAGCCTATGGAAA
```

10

[配列番号 2]

【 0 1 0 5 】

あるいは、別の実施形態において、ファージミド粒子は、それが宿主細胞のゲノムに組込まれるように設計され得る。この場合、粒子のゲノムの標的化された組込み（例えば、相同組換えによる）に有利な核酸配列が想定される。したがって、組換えファージミド粒子のゲノムは、宿主ゲノム内への標的化された組み込みに有利な 1 つ以上の D N A 配列を含み得る。

20

【 0 1 0 6 】

別の実施形態では、好ましくは、ファージミド粒子は、ベクターがインピボで対象に全身的または局所的に投与されるかにかかわらず、組織特異的標的（例えば、腫瘍組織）への導入遺伝子の送達のための組換えベクターとして使用することができる。

【 0 1 0 7 】

好ましくは、少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットは、ウイルス導入遺伝子発現カセット、より好ましくは哺乳動物ウイルス導入遺伝子発現カセットを含む。例えば、少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットは、好ましい一実施形態では、レンチウイルス導入遺伝子発現カセットを含むことができる。少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセットは、好ましくはアデノ随伴ウイルス（ A A V ）導入遺伝子発現カセットである。

30

【 0 1 0 8 】

導入遺伝子発現カセットは、標的腫瘍細胞または組織において発現される抗原もしくは各抗原またはサイトカインをコードする任意の核酸を含み得る。本発明の一実施形態では、核酸は D N A であり得、これはゲノム D N A または c D N A であり得る。いくつかの実施形態では、天然に存在しない c D N A が好ましい場合がある。別の実施形態では、核酸は、アンチセンス R N A または s h R N A などの R N A であってもよい。

40

【 0 1 0 9 】

例示的な実施例 7 に示されるように、ファージミドは、腫瘍細胞に遺伝子を送達するために使用され得る。この例では、m T O R / s h R N A (R G D 4 C - m T O R / s h R N A) をコードする配列を保有する R G D 4 C - ファージミドによる処理によって、腫瘍細胞（例えば、髄芽腫細胞）における m T O R 発現のダウンレギュレーションを達成することができる。実施例 7 は、腫瘍細胞に遺伝子を送達するためのファージミドの使用の別の例示的な例を提供する。実施例 7 に示されるように、R G D 4 C - ファージミドは、選択的に T N F を D I P G (びまん性内在性橋グリオーマ) に首尾よく送達することができ、アポトーシス誘発をもたらす。したがって、R G D 4 C - ファージミドは、サイトカインを使用した D I P G に対する標的療法に使用するための治療上の可能性を有する。

50

【 0 1 1 0 】

しかしながら、組換えファージミド粒子によって標的化される腫瘍細胞の型は、粒子の表面に発現され得る細胞標的化リガンドの型に依存することが理解されるであろう。細胞を標的とするリガンドについては以下に論じる。

【 0 1 1 1 】

導入遺伝子発現カセットは、標的腫瘍細胞における核酸の発現に必要な 1 つ以上の機能的要素を含み得る。例えば、好ましくは、導入遺伝子発現カセットは、CMV プロモーターなどのプロモーターを含む。CMV プロモーターの一実施形態の DNA 配列は、以下のように、配列番号 3 として本明細書で表される。

【 0 1 1 2 】

【 化 1 5 】

```
ACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA
TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGTCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGA CT CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG
AGTTTGT TTTTG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCC
ATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGA
AGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC
```

[配列番号 3]

【 0 1 1 3 】

別の好ましい実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、標的腫瘍細胞においてのみ活性であるプロモーターを含む。したがって、プロモーターは、腫瘍活性化および / またはテモゾロミド誘発性であり得る。

【 0 1 1 4 】

一実施形態では、プロモーターは、癌細胞において高度に活性である多剤耐性プロモーター (MDR) であってもよい。このプロモーターは、癌薬物によって活性化され、P-gp および ABC トランスポーターを産生して、細胞から薬物を排出する。このプロモーターは、癌薬物と組み合わせて遺伝子治療のために使用することができる。

【 0 1 1 5 】

別の実施形態では、プロモーターは、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) プロモーターであり得る。このプロモーターは腫瘍細胞でのみ活性がありますが、正常な増殖細胞では活性ではない。したがって、このプロモーターは腫瘍特異的プロモーターとして使用することができる。

【 0 1 1 6 】

好ましい実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、grp78 プロモーターを含む。grp78 プロモーターの一実施形態の核酸配列は、以下のように、配列番号 8 として本明細書に表される。

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

【化 1 6】

CCCCGGGGGCCCAACGTGAGGGGAGGACCTGGACGGTTACCGGCGGAAACGGTTTCC
AGGTGAGAGGTACCCGAGGGACAGGCAGCTGCTCAACCAATAGGACCAGCTCTCAG
GGCGGATGCTGCCTCTCATTGGCGGCCGTTAAGAATGACCAGTAGCCAATGAGTCGG
CTGGGGGGGCGCGTACCAGTGACGTGAGTTGCGGAGGAGGCCGCTTCGAATCGGCAG
CGGCCAGCTTGGTGGCATGAACCAACCAGCGGCCTCCAACGAGTAGCGAGTTCACCA
ATCGGAGGCCTCCACGACGGGGCTGCGGGGAGGATATATAAGCCGAGTCGGCGACC
GGCGCGCTCGATACTGGCTGTGACTACACTGACTTGGAC

[配列番号 8]

【0 1 1 8】

10

好ましくは、導入遺伝子発現カセットは、発現された抗原もしくは各抗原またはサイトカインに付着可能なポリ A テールをコードするための核酸を含む。ポリ A テールをコードするための核酸の一実施形態の DNA 配列は、以下のように、配列番号 4 として本明細書で表される。

【0 1 1 9】

【化 1 7】

ACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCA
CTCCAGTGCCCAACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTTGTCTGACTAG
GTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTG
GGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGG
CACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCA
GCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTT
TTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCA
GGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCT
CCCTTCCCTGTCCTT

20

[配列番号 4]

【0 1 2 0】

好ましくは、導入遺伝子発現カセットは、左および/または右末端逆位反復配列(Inverted Terminal Repeat sequences) (I T R) を含む。I T R は、レンチウイルスの血清型に特異的な A A V または末端長反復配列(Long Terminal repeat sequences) (L T R) に特異的であり得、その二次構造にヘアピンループを形成する限り、任意の配列であり得る。例えば、A A V 血清型は A A V 1 ~ 9 であり得るが、好ましくは A A V 1、A A V 2、A A V 5、A A V 6、または A A V 8 である。I T R の一実施形態の DNA 配列(市販の A A V プラスミド由来の左 I T R) は、以下のように、配列番号 5 として本明細書で表される。

30

【0 1 2 1】

【化 1 8】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTTCCT

40

[配列番号 5]

【0 1 2 2】

I T R の別の実施形態の DNA 配列(市販の A A V プラスミド由来の右 I T R) は、以下のように、配列番号 6 として本明細書で表される。

【0 1 2 3】

【化 19】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
 AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
 AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

[配列番号6]

【0124】

好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、例えば、宿主細胞、好ましくは細菌においてアンピシリン耐性を付与するために、ベクターを内包する宿主細胞に依存する選択マーカを含む。マーカは、宿主細胞中のファージミド粒子の産生中に選択圧を提供する。

10

【0125】

好ましくは、組換えファージミド粒子は、1つ以上のカプシドマイナーコートタンパク質(capsid minor coat protein)を含む。組換えファージミド粒子は、この粒子の標的腫瘍細胞への送達を可能にする細胞標的化リガンドをディスプレイするように構成されたp I I Iカプシドマイナーコートタンパク質を含み得る。好ましくは、組換えファージミド粒子は、1つ以上のカプシドメジャーコートタンパク質(capsid major coat protein)を含む。組換えファージミド粒子は、上に外来ペプチドをディスプレイするように構成された少なくとも1つのp V I I Iカプシドメジャーコートタンパク質を含み得る。

20

【0126】

組換えファージミド粒子は、例えば治療、または化学的もしくは生化学的結合によるカプシド構造の改変を含み得る。好適な改変の例は、ファージミド粒子上へのペプチド残基の架橋を含み得る。別の実施形態では、組換えファージミド粒子は、そのカプシドに付着した1つまたは機能的ペプチドを含み得る。例えば、機能的ペプチドは核移行シグナルを含み得る。したがって、ファージミド粒子は、多機能性であり、WO 2014/184528に開示されている特徴を使用することができる。

【0127】

別の実施形態では、WO 2014/184529に記載されているように、組換えファージミド粒子をカチオン性ポリマーと組み合わせて正味の正電荷を有する複合体を形成することができる。カチオン性ポリマーは、キトサン、ポリ-D-リジン(PDL)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ジエチルアミノエチル-デキストラン(DEAE・DEX)、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリブレン、硫酸プロタミン、およびカチオン性脂質からなる群から選択され得る。好ましくは、カチオン性脂質は、f u g e n e (登録商標)、l i p o f e c t a m i n e (登録商標)、およびDOTAP(N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート)からなる群から選択される。好ましくは、カチオン性ポリマーはDEAE、より好ましくはDEAE・DEXを含む。

30

【0128】

好ましくは、ファージミド粒子は、その粒子が由来するファージゲノムを実質的に欠くゲノムを含む。好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、それが由来するバクテリオファージゲノムの少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%を欠く。より好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、それが由来するバクテリオファージゲノムの少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%を欠く。好ましくは、組換えファージミド粒子のゲノムは、それが由来するバクテリオファージゲノムのすべてを欠く。しかしながら、上記に論じられるように、ファージミドウイルス粒子のゲノムは、いくつかの実施形態では、一本鎖DNAへの粒子の複製を可能にするためのバクテリオファージの複製起点、すなわち、F1バクテリオファージoriを含み得る。

40

【0129】

好ましくは、ファージミド粒子は、14Kb未満の相対ゲノムサイズを有するゲノムを

50

含む。相対ゲノムサイズは、約 13 K b 未満、約 12 K b 未満、約 11 K b 未満、約 10 K b 未満、約 9 K b 未満、約 8 K b 未満、または約 7 K b 未満であり得る。相対ゲノムサイズは、3 K b ~ 9 K b、4 K b ~ 8 K b、5 K b ~ 7 K b、または好ましくは約 6 K b であり得る。

【0130】

好ましくは、ファージミド粒子は、原核宿主からの粒子の形成、パッケージング、または押し出しに必要とされるそのゲノム中にバクテリオファージ構造遺伝子を欠いている。このような構造遺伝子は、カプシドタンパク質などをコードする。好ましくは、ファージミド粒子は、その粒子が由来する少数またはメジャーコートタンパク質をコードする遺伝子を欠くゲノムを含む。好ましくは、ファージミド粒子は、p I I I I カプシドマイナーコートタンパク質を欠くか、または p V I I I I カプシドメジャーコートタンパク質を欠くゲノムを含む。最も好ましくは、ファージミド粒子は、p I I I I カプシドマイナーコートタンパク質および p V I I I I カプシドメジャーコートタンパク質の両方を欠くゲノムを含む。

10

【0131】

このように、組換えファージミド粒子は、それが由来するバクテリオファージの構造遺伝子を含まない粒子のゲノムにもかかわらず、好ましくは、限定されるものではないが、バクテリオファージに由来するタンパク質および他のコンジュゲート化合物を含む構成成分から構築され、ディスプレイされる、複製欠損ウイルス様粒子またはビリオンを含む。

【0132】

したがって、第 8 の態様または任意の上記の態様の組換えファージミド粒子のゲノムが構造遺伝子を含む誘導体ファージゲノムを欠いていることを考えると、組換えファージミドゲノムをバクテリオファージカプシドにパッケージングして、本発明の粒子を生成するのに必要とされる必要な構造（すなわち、カプシド）遺伝子を提供するための代替システムが必要である。したがって、本発明者らは、別個のいわゆる「ヘルパーウイルス」ベクターの使用を含む、第 8 の態様または任意の上記の態様の粒子を生成するための新規なシステムを考案した。したがって、実際には、第 8 の態様または任意の上記の態様の粒子は、ファージミドおよび真核生物ウイルスの成分を含むハイブリッドファージミドベクターである。

20

【0133】

したがって、第 19 の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を生成するためのシステムであって、

30

(i) 原核宿主内に存続するように構成された第 1 のベクターであって、1 つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセット、または 1 つ以上の養子移入された T 細胞である 1 つ以上の抗原、およびベクターの一本鎖 DNA への複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第 1 のベクターと、

(i i) 一本鎖 DNA のパッケージングに必要な構造タンパク質をコードする核酸を含む第 2 のベクターと、を含み、原核宿主からの組換えファージミド粒子の形成および押し出しをもたらす、システムを提供する。

【0134】

有利には、ファージミド粒子の複製要素を、そのまたは各養子移入された T 細胞またはサイトカインによって認識された抗原または各抗原をコードする導入遺伝子を保有する第 1 の「治療用」ベクターと、ウイルス構造遺伝子を保有する第 2 の別個の「ヘルパー」ベクターとに分離することは、ゲノム/ベクターサイズを実質的に減少させ、それにより導入遺伝子の能力を有意に増加させる。ファージミド粒子は治療的に使用され（例えば、CAR-T 細胞治療）、導入遺伝子の容量が増加することは、新しいシステムの遺伝子治療用途にとって特に有用な利点である。その結果、これは、生産収率、遺伝子導入効率、および他の用途のベクターシステムの柔軟性を向上させる。

40

【0135】

第 19 の態様のシステムの新規性は、第 1 のベクターによって提供される真核生物ウイルス（AAV またはレンチウイルスなど）のゲノムを、第 2 のベクターによって提供され

50

る原核生物ウィルスカプシド（すなわち、バクテリオファージ）にパッケージングする能力である。したがって、従来技術のシステム（すなわち、A A V P）は、2つのゲノムのキメラであるが、第19の態様のシステム（すなわち、P A A V）は、原核生物ウィルス表現型と真核生物ウィルス遺伝子型との間のキメラである。

【0136】

抗原は、本明細書に開示される任意のものであり得る。好ましい実施形態では、抗原または各抗原は、標的腫瘍細胞の細胞表面に発現されるペプチドまたはタンパク質である。好ましくは、抗原または各抗原は、腫瘍細胞によって発現された場合、C A R T細胞にアクセス可能なペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質は、腫瘍細胞によって発現された場合、細胞表面で、または細胞表面上に折り畳まれたペプチドタンパク質として存在するようなものであり得る。抗原または各抗原は、ヒトにおける使用に好適な既存のC A R T細胞の既知の標的であり得る。例えば、抗原または各抗原は、M U C 1、P S M A、C D 1 9、C D 2 0、エストロゲン関連受容体ベータ2型（E r R B 2）、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。一実施形態では、抗原または各抗原は、デングウィルスまたは黄熱ワクチン抗原であり得る。

10

【0137】

好ましくは、第19の態様のシステムは、第8の態様の組換えファージミド粒子を産生するために使用される。したがって、好ましくは、第1のベクターは組換えファージミド粒子のゲノムを含む。第1のベクターのパッケージングシグナルは、好ましくは起点または複製を含み得る。好ましくは、第1ベクターの複製起点は、F 1 o r i、より好ましくはF 1 バクテリオファージからなる。

20

【0138】

好ましくは、第1のベクターは、原核宿主内での二本鎖ベクターの複製を可能にするための第2の複製起点を含む。好ましくは、この複製起点は、宿主内のベクターの高コピー数複製を可能にする。好ましくは、複製起点はp U C o r iを含む。あるいは、第1のベクターは、宿主ゲノムへの標的化した組み込みを助長する1つ以上のD N A配列を含み得、したがって任意の複製起点の必要性を除去する。

【0139】

導入遺伝子発現カセットは、ウィルス導入遺伝子発現カセット、より好ましくは哺乳動物ウィルス導入遺伝子発現カセットを含む。例えば、少なくとも1つの導入遺伝子発現カセットは、レンチウィルス導入遺伝子発現カセットまたはA A V導入遺伝子発現カセットを含み得る。A A V導入遺伝子発現カセットが好ましい。

30

【0140】

第2のベクトルの好ましい一実施形態を図7に示し、好ましい構成要素を図8に示す。第2のベクターまたは「ヘルパーファージ」は、好ましくは、第1のベクター（すなわち、ファージミド粒子のゲノム）を保有するファージミド粒子を原核宿主からレスキューするために特別に設計されたバクテリオファージであり、その実施形態を図3に示す。したがって、第2のベクター（すなわち、ヘルパーファージ）は、そのタンパク質およびポリペプチドを、第1のベクター（すなわち、ファージミド粒子のゲノム）、または、機能的パッケージングシグナルおよび/または一本鎖起点または複製を含む、他のD N A実体に与えるために提供される。第2のベクターは、最も好ましくは複製欠損である。好ましくは、第2のベクターは、それ自体をファージ粒子にパッケージングする能力を著しく低下させる、破壊されたパッケージングシグナルを含む。好ましくは、第2のベクターは、破壊された複製起点を含む。一実施形態では、破壊された複製起点は、p 1 5 aのような中程度のコピー数起点である。別の実施形態では、破壊された複製起点は、p M B 1などの低程度のコピー数起点である。好ましくは、第1のベクター（すなわち、ファージミド粒子のゲノム）は、複製およびパッケージングの両方において、第2のベクター（すなわち、ヘルパーファージ）を打ち負かすように構成される。

40

【0141】

第2のベクターのゲノムは、得られた組換えファージミド粒子標的化特性（またはW O

50

2014/184528に記載されているような多機能性特性)を与えるように操作することができる。したがって、ファージミド粒子アセンブリのための構造カプシドタンパク質を提供する。好ましくは、第2のベクターは、1つ以上のカプシドマイナーコートタンパク質または1つ以上のカプシドメジャーコートタンパク質をコードする核酸を含む。すべてのカプシドタンパク質は、野生型または組換え型であり、単一または複数のコピーで存在し、キメラまたは合成ペプチドをディスプレイするように改変されていてもよい。これには、ペプチドワクチン送達のための他のウイルスの抗原のディスプレイ、またはDNAワクチン(第8の態様のファージミド粒子によって送達される)が所望される場合のアジュバントのディスプレイが含まれる。

【0142】

したがって、一例では、第2のベクターは、組換えファージミド粒子の標的細胞(例えば腫瘍)への送達を可能にするための細胞標的化リガンドをディスプレイするように構成されたpIIIマイナーコートタンパク質をコードする第1の核酸配列を含むことができる。したがって、組換えファージミド粒子のpIIIマイナーコートタンパク質に9-アミノ酸変異を誘発して、腫瘍細胞および $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを発現する血管新生腫瘍関連内皮細胞にその特異性を付与することが望ましい場合がある。したがって、第2のベクターのゲノムは、RGD4C標的化ペプチド(CDCRGDCFC-配列番号7)を含み得る。

【0143】

別の例では、第2のベクターは、その上に外来ペプチドをディスプレイするように構成された少なくとも1つのpVIIIカプシドメジャーコートタンパク質をコードする第2の核酸配列を含むことができる。したがって、例えば10未満のアミノ酸長の短いペプチドをディスプレイするために、組換えファージミド粒子の野生型pVIIIメジャーコートタンパク質に突然変異を誘発することが望ましい場合がある。短いペプチドは、標的化部分であってもよく、かつ/またはインビボまたはインビトロで固有の生物学的/化学的機能性を有し得る。例えば、抗原ディスプレイを介したインビボでの免疫刺激では、pVIIIコートタンパク質にディスプレイされたペプチドが外因性経路を介して処理され、標的細胞のMHCIIにディスプレイされるため、養子移入されたT細胞の別の標的がディスプレイされる。あるいは、少なくとも1つのpVIIIメジャーコートタンパク質は、例えば、金結合ペプチドをディスプレイすることにより、インビトロでナノ粒子(例えば金)への結合機能を有し得る。

【0144】

第1のベクターは、レトロウイルス科またはオルソレトロウイルス亜科のメンバーであり得る。第1のベクターは、レンチウイルス属のメンバーであり得る。好ましくは、第1のベクターは、はパルボウイルス科または亜科のメンバーである。好ましくは、第1のベクターは、ディペンドパルボウイルス(Dependoparvovirus)またはアデノ随伴ウイルス種のメンバーである。

【0145】

第1のベクター(すなわち、ファージミド粒子のゲノム)および第2のベクター(すなわち、ヘルパーファージ)が構築されると、これらを一緒に使用して原核宿主において第8の態様または任意の上記の態様の組換えファージミド粒子を産生する。それはファージミドゲノムの一本鎖DNAへの複製を可能にする第1のベクターのパッケージングシグナル(例えば、複製起点)が、第2のベクター(すなわち、ヘルパーファージ)構造タンパク質にシグナル伝達して、ファージミドゲノムをパッケージングし(すなわち、それらは宿主内で一緒にトランスで作用する)、第8の態様または任意の上記の態様において使用される粒子を作成するよう機能すると、理解されるであろう。

【0146】

1つの好ましい実施形態では、第1のベクター(ファージミド粒子ゲノム)は、実質的に配列番号9に示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、ここで配列番号9は以下のように表され、「N」は導入遺伝子である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

【 化 2 0 - 1 】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTCTGCGGCCGCGNAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
CGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGG
CGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCA
AAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTT
ACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
TTCCCTTTCCTTTCTCGCCACGTTCTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGC
TCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAATTGATTTG
GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCT
ATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGTTAAAA
AATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAAT
TTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGA
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCT
TACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAT
CACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGT
CATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
ACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG
TGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGA
ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG
GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCT
GCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC
TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGC

10

20

30

【 0 1 4 8 】

40

50

【化 2 0 - 2】

GCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT
ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACT
TTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT
GCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAAGAGCTACC
AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT
CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC
TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTAC
CGGGTTGGAAGTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGG
GGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA
ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT
TTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

10

[配列番号 9]

20

【0 1 4 9】

1つの好ましい実施形態では、第2のベクター（RGD配列を有するヘルパーファージ）は、実質的に配列番号10に示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、配列番号10は以下のように表される。

【0 1 5 0】

30

40

50

【化 2 1 - 1】

AACGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAA
ATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAAATCT
ACTCGTTTCGCAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAACTTCCAGACACCGTA
CTTTAGTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCCAGATTGAGCAATTAAGCTCT
AAGCCATCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAAGGTACTCTCTAATC
CTGACCTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACGCG
ATATTTGAAGTCTTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGA
CTATAATAGTCAGGGTAAAGACCTGATTTTTGATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAAC
GTTTAAAGCATTGAGGGGGATTCAATGAATATTTATGACGATTCCGCAGTATTGGACG
CTATCCAGTCTAAACATTTTACTATTACCCCTCTGGCAAACTTCTTTTGCAAAAGCC
TCTCGCTATTTTGGTTTTTATCGTCGTCTGGTAAACGAGGGTTATGATAGTGTGCTCTT
ACTATGCCTCGTAATTCCTTTTGGCGTTATGTATCTGCATTAGTTGAATGTGGTATTCCT
AAATCTCAACTGATGAATCTTTCTACCTGTAATAATGTTGTTCCGTTAGTTTCGTTTTATT
AACGTAGATTTTTCTTCCCAACGTCCTGACTGGTATAATGAGCCAGTTCTTAAATCGC
ATAAGGTAATTCACAATGATTAAAGTTGAAATTAACCATCTCAAGCCCAATTTACTAC
TCGTTCTGGTGTTCCTCGTCAGGGCAAGCCTTATCACTGAATGAGCAGCTTTGTTACG
TTGATTTGGGTAATGAATATCCGTTCTTGTCAAGATTACTCTTGATGAAGGTCAGCCA
GCCTATGCGCCTGGTCTGTACACCGTTTCATCTGTCTCTTTCAAAGTTGGTCAGTTCGG
TTCCCTTATGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTCCGGCTAAGTAACATGGAGCAGGTCGC
GGATTTGACACAATTTATCAGGCGATGATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTTTCGCGC
TTGGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTGCGCTCTTTG
TTTTAGGTTGGTGCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTAATGGAACTTCC
TCATGAAAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATG
CTGTCTTTGCTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAG
CCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTGCGGCGC
AACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGAT
ACAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTAT
TATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCTTTCTATTCTCACTCCGCTTGTGATTGTAGGGGG
ATTGTTTTTGTGAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCCCATACAGAAAATTCATT
ACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGTTGTC
TGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAACTCAGTGTTACGGTAC
ATGGGTTTCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGC
GGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATA
CACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTAC
TGAGCAAAACCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTT
TCATGTTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGG
CACTGTTACTCAAGG

10

20

30

【 0 1 5 1】

40

50

【化 2 1 - 2】

CACTGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATG
ACGCTTACTGGAACGGTAAATTACAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTTAATGAGGA
TCCATTGTTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATG
CTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGG
GTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTT
CCGGTGATTTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAA
TGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTGCTACT
GATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAA
TGGTGCTACTGGTGATTTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGT
GATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGT
GAATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGA
CAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTA
TGATTTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTT
TTGGGTATTCCGTTATTATTGCGTTTCCCTCGGTTTCTTCTGGTAACTTTGTTTCGGCTAT
CTGCTTACTTTTTCTTAAAAAGGGCTTCGGTAAGATAGCTATTGCTATTTTCAATTGTTTCTT
GCTCTTATTATTGGGCTTAACTCAATTCTTGTGGGTTATCTCTCTGATATTAGCGCTCAA
TTACCCTCTGACTTTGTTTCAAGGTGTTTCAAGTTAATTCTCCCGTCTAATGCGCTTCCCTG
TTTTTATGTTATTCTCTCTGTAAAGGCTGCTATTTTCATTTTTGACGTTAAACAAAAAAT
CGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATATGGCTGTTTATTTTGTAACTGGCAAATTAG
GCTCTGGAAAGACGCTCGTTAGCGTTGGTAAGATTCAGGATAAAATTGTAGCTGGGTG
CAAAATAGCAACTAATCTTGATTTAAGGCTTCAAAACCTCCCGCAAGTCGGGAGGTTT
GCTAAAACGCCTCGCGTTCTTAGAATACCGGATAAGCCTTCTATATCTGATTTGCTTGC
TATTGGGCGCGGTAATGATTCCTACGATGAAAATAAAAACGGCTTGCTTGTTCTCGAT
GAGTGCGGTACTTGGTTTAATACCCGTTCTTGGGAATGATAAGGAAAGACAGCCGATTA
TTGATTGGTTTCTACATGCTCGTAAATTAGGATGGGATATTATTTTCTTGTTTCAAGGACT
TATCTATTGTTGATAAACAGGCGCGTTCTGCTTAGCTGAACATGTTGTTTATTGTCTG
CGTCTGGACAGAATTACTTTACCTTTTGTGCGTACTTTATATTCTCTTATTACTGGCTCG
AAAATGCCTCTGCCTAAATTACATGTTGGCGTTGTTAAATATGGCGATTCTCAATTAAG
CCCTACTGTTGAGCGTTGGCTTTATACTGGTAAGAATTTGTATAACGCATATGATACTA
AACAGGCTTTTTCTAGTAATTATGATTCCGGTGTTTATTCTTATTTAACGCCTTATTTAT
CACACGGTCGGTATTTCAAACCATTAATTTAGGTCAGAAGATGAAATTAATACTAAAATA
TATTTGAAAAAGTTTTCTCGCGTTCTTTGTCTTGCGATTGGATTGTCATCAGCATTTACA
TATAGTTATATAACCCAACCTAAGCCGGAGGTTAAAAAGGTAGTCTCTCAGACCTATG
ATTTTGATAAATTCATATTGACTCTTCTCAGCGTCTTAATCTAAGCTATCGCTATGTTT
TCAAGGATTCTAAGGGAAAATTAATTAATAGCGACGATTTACAGAAGCAAGGTTATTCA
CTCACATATATTGATTTATGTACTGTTTCCATTAAAAAAGGTAATTCAAATGAAATTGTT
AAATGTAATTAATTTTG

10

20

30

【 0 1 5 2】

40

50

【化 2 1 - 3】

TTTTCTTGATGTTTGTTTCATCATCTTCTTTTGCTCAGGTAATTGAAATGAATAATTGCGC
CTCTGCGCGATTTTGTAACCTGGTATTCAAAGCAATCAGGCGAATCCGTTATTGTTTCT
CCCGATGTAAAAGGTACTGTTACTGTATATTCATCTGACGTTAAACCTGAAAATCTACG
CAATTTCTTTATTTCTGTTTTACGTGCTAATAATTTTGATATGGTTGGTTCAATTCCTTCC
ATAATTCAGAAGTATAATCCAAACAATCAGGATTATATTGATGAATTGCCATCATCTGA
TAATCAGGAATATGATGATAATTCCGCTCCTTCTGGTGGTTTCTTTGTTCCGCAAAATG
ATAATGTTACTCAAACCTTTTAAAATTAATAACGTTTCGGGCAAAGGATTTAATACGAGTT
GTCGAATTGTTTGTAAGTCTAATACTTCTAAATCCTCAAATGTATTATCTATTGACGGC
TCTAATCTATTAGTTGTTAGTGCACCTAAAGATATTTTAGATAACCTTCCTCAATTCCTT
TCTACTGTTGATTTGCCAACTGACCAGATATTGATTGAGGGTTTGATATTTGAGGTTCA
GCAAGGTGATGCTTTAGATTTTTTCATTTGCTGCTGGCTCTCAGCGTGGCACTGTTGCAG
GCGGTGTTAATACTGACCGCCTCACCTCTGTTTTATCTTCTGCTGGTGGTTTCGTTCCGT
ATTTTAAATGGCGATGTTTTAGGGCTATCAGTTTCGCGCATTAAAGACTAATAGCCATT
AAAAATATTGTCTGTGCCACGTATTCTTACGCTTTCAGGTCAGAAGGGTTCTATCTCTG
TTGGCCAGAATGTCCCTTTTATTACTGGTCGTGTGACTGGTGAATCTGCCAATGTAAAT
AATCCATTTTCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCGT
TGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGT
TCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCTACAACGGTTAA
TTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTC
AAGATTCTGGCGTACCGTTTCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCC
CGCTCTGATTCCAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTAC
GCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
CCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCG
ATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTA
GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTT
TAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGACGGATC
GCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATAC
AGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTTCGTTCCGACTGCGGC
GAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATAC
TTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC
TGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTGCC
TTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGA
CACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCGCTCCAAGCTGGAAGTGTATGCACGAACCCCCCG
TTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAG
ACATGCAAAAGCAC

10

20

30

【 0 1 5 3】

40

50

【化 2 1 - 4】

CACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCG
 GTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGA CTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACC
 TCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTT
 TTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATC
 TTATTAAGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT
 GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAAT
 CAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG
 GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
 GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGATTCC
 GAGCTCGCCCCGGGGATCGACCAAGTTGGTGATTTTGAAC TTTTGCTTTGCCACGGAAC
 GGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGATT
 TATTCAACAAAGCCGCGCTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACC
 AATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTC
 ATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAA
 CTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACT
 CGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGA
 GAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCT
 TTCCAGACTTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAA
 CCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTT
 AAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGC
 ATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATAACCTGGAATGCTGTTTTCC
 CGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGAT
 GGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACA
 TCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACA ACTCTGGCGCATCGGGCTTCC
 CATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATA
 CCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTTCC
 CGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTG TATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTAT
 TGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTG TGAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAAC
 GTGGCTTTCCCCCCCCCCCCCTGCAGGTCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATT
 TTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA
 TTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTTTG
 GGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACC
 GTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAG
 ACCTCTC

10

20

30

【 0 1 5 4】

【化 2 1 - 5】

AAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTG
 ATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCTTTTGAATCTTTACCTACACATTAC
 TCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTATCCTTGCGTTGAAATA
 AAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGC
 TTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATT
 ATTGGATGTT

40

[配列番号 10]

【 0 1 5 5】

好ましい一実施形態では、第 2 のベクター（R G D 配列を有さないヘルパーファージ）は、実質的に配列番号 1 1 に示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含み、配列番号 1 1 は以下のように表される。

【 0 1 5 6】

50

【化 2 2 - 1】

AACGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAA
ATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACCTAAATCT
ACTCGTTTCGCAGAATTGGGAATCAACTGTTACATGGAATGAAACTTCCAGACACCGTA
CTTTAGTTGCATATTTAAACATGTTGAGCTACAGCACCAGATTGAGCAATTAAGCTCT
AAGCCATCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAAGGTACTCTCTAATC
CTGACCTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAACGCG
ATATTTGAAGTCTTTCGGGCTTCTCTTAATCTTTTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGA
CTATAATAGTCAGGGTAAAGACCTGATTTTTGATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACT
GTTTAAAGCATTGAGGGGGATTCAATGAATATTTATGACGATTCCGCAGTATTGGACG
CTATCCAGTCTAAACATTTTACTATTACCCCTCTGGCAAACTTCTTTTGCAAAAGCC
TCTCGCTATTTTGTTTTTATCGTCGTCTGGTAAACGAGGGTTATGATAGTGTGCTCTT
ACTATGCCTCGTAATTCCTTTTGCGGTTATGTATCTGCATTAGTTGAATGTGGTATTCCT
AAATCTCAACTGATGAATCTTTCTACCTGTAATAATGTTGTTCCGTTAGTTTCGTTTTATT
AACGTAGATTTTTCTTCCCAACGTCCTGACTGGTATAATGAGCCAGTTCTTAAATCGC
ATAAGGTAATTCACAATGATTAAAGTTGAAATTAACCATCTCAAGCCCAATTTACTAC
TCGTTCTGGTGTTCCTCGTCAGGGCAAGCCTTATCACTGAATGAGCAGCTTTGTTACG
TTGATTTGGGTAATGAATATCCGTTCTTGTCAAGATTACTCTTGATGAAGGTCAGCCA
GCCTATGCGCCTGGTCTGTACACCGTTTCATCTGTCTCTTTCAAAGTTGGTCAGTTCGG
TTCCCTTATGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTCCGGCTAAGTAACATGGAGCAGGTCGC
GGATTTGACACAATTTATCAGGCGATGATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTTTCGCGC
TTGGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTGCGCTCTTTCG
TTTTAGGTTGGTGCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTAATGGAACTTCC
TCATGAAAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATG
CTGTCTTTGCTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAG
CCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTGCGGCGC
AACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGAT
ACAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTAT
TATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCTTTCTATTCTCACTCCGCTGAAACTGTTGAAAGTT
GTTTAGCAAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAAC
TTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGTTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTT
GTACTGGTGACGAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCTATTGGGCTTGCTATCCC
TGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGG
TGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATC
AACCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATC
CTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGA
AATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCG
TTAAAACCTTATTACC

10

20

30

【 0 1 5 7 】

40

50

【化 2 2 - 2】

AGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAG
AGACTGCGCTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCC
AATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTC
TGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTC
TGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATG
GCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCT
GACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTT
CATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCT
CTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTT
CGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGCGC
TGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTT
TGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACT
GCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTATTATTGCGTTT
CCTCGGTTTCTTCTGGTAACTTTGTTGGCTATCTGCTTACTTTTCTTAAAAAGGGCTT
CGGTAAGATAGCTATTGCTATTTCAATTGTTTCTTGCTCTTATTATTGGGCTTAACTCAAT
TCTTGTGGGTTATCTCTCTGATATTAGCGCTCAATTACCCTCTGACTTTGTTCAAGGGTG
TTCAGTTAATTCTCCCGTCTAATGCGCTTCCCTGTTTTTATGTTATTCTCTCTGTAAAGG
CTGCTATTTTTCATTTTGGACGTTAAACAAAAAATCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAAT
AATATGGCTGTTTATTTTGTAACTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCGTTAGCGT
TGGTAAGATTCAAGATAAAATTGTAGCTGGGTGCAAATAGCAACTAATCTTGATTTAA
GGCTTCAAACCTCCCGCAAGTCGGGAGGTTGCTAAAACGCCTCGCGTTCTTAGAAT
ACCGGATAAGCCTTCTATATCTGATTTGCTTGCTATTGGGCGCGGTAATGATTCCTACG
ATGAAAATAAAAAACGGCTTGCTTGTTCTCGATGAGTGCGGTAATTGGTTTAATACCCGT
TCTTGGAATGATAAGGAAAGACAGCCGATTATTGATTGGTTTCTACATGCTCGTAAATT
AGGATGGGATATTATTTTCTTGTTCAAGGACTTATCTATTGTTGATAAACAGGCGCGTT
CTGCATTAGCTGAACATGTTGTTTATTGTCGTCGCTGGACAGAATTACTTTACCTTTTG
TCGGTACTTTATATTCTTTATTACTGGCTCGAAAATGCCTCTGCCTAAATTACATGTTG
GCGTTGTAAATATGGCGATTCTCAATTAAGCCCTACTGTTGAGCGTTGGCTTTATACT
GGTAAGAATTTGTATAACGCATATGATACTAAACAGGCTTTTTCTAGTAATTATGATTC
CGGTGTTTATTCTTATTTAACGCCTTATTTATCACACGGTTCGGTATTTCAAACCATTA
TTTAGGTCAGAAGATGAAATTAATAAATATATTTGAAAAAGTTTTCTCGCGTTCTTTG
TCTTGCGATTGGATTTGCATCAGCATTACATATAGTTATATAACCCAACCTAAGCCGG
AGGTTAAAAAGGTAGTCTCTCAGACCTATGATTTTGATAAATCACTATTGACTCTTCT
CAGCGTCTTAATCTAAGCTATCGCTATGTTTTCAAGGATTCTAAGGGAAAATTAATTAA
TAGCGACGATTACAGAAGCAAGGTTATCACTCACATATATTGATTTATGTAAGTTT
CCATTAAAAAAGGTAATTCAAATGAAATTGTTAAATGTAATTAATTTTGTCTTGTATG
TTTGTTCATCATCT

10

20

30

【 0 1 5 8】

40

50

【化 2 2 - 3】

TCTTTTGCTCAGGTAATTGAAATGAATAATTCGCCTCTGCGCGATTTTGTAAC TTGGTA
TTCAAAGCAATCAGGCGAATCCGTTATTGTTTCTCCCGATGTAAAAGG TACTGTTACTG
TATATTCATCTGACGTTAAACCTGAAAATCTACGCAATTTCTTTATTTCTGTTTTACGTG
CTAATAATTTTGATATGGTTGGTTCAATTCCTTCCATAATTCAGAAGTATAATCCAAACA
ATCAGGATTATATTGATGAATTGCCATCATCTGATAATCAGGAATATGATGATAATTCC
GCTCCTTCTGGTGGTTTCTTTGTTCCGCAAAATGATAATGTTACTCAAAC TTTTAAAATT
AATAACGTTTCGGGCAAAGGATTTAATACGAGTTGTCTGAATTGTTTG TAAAGTCTAATAC
TTCTAAATCCTCAAATGTATTATCTATTGACGGCTCTAATCTATTAGTTGTTAGTGCACC
TAAAGATATTTTAGATAACCTTCCTCAATTCCTTTCTACTGTTGATTTGCCAACTGACCA
GATATTGATTGAGGGTTTGATATTTGAGGTTTCAGCAAGGTGATGCTTTAGATTTTTTCA TT
TGCTGCTGGCTCTCAGCGTGGCACTGTTGCAGGCGGTGTTAATACTGACCGCCTCACC
TCTGTTTTATCTTCTGCTGGTGGTTCGTTCCGATTTTTTAATGGCGATGTTTTAGGGCTA
TCAGTTTCGCGCATTAAGACTAATAGCCATTCAAAAATATTGTCTGTGCCACGTATTCT
TACGCTTTCAGGTCAGAAGGGTTCTATCTCTGTTGGCCAGAATGTCCCTTTTATTACTG
GTCGTGTGACTGGTGAATCTGCCAATGTAAATAATCCATTTTCAGACGATTGAGCGTCA
AAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTT
TGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATT
ACTAATCAAAGAAGTATTGCTACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACT
CGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAAGATTCTGGCGTACCGTTCTGTCTA
AAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCCAACGAGGAAAGCAC
GTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGC
CCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAA
GCTCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACC
CCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTG
GAACAACACTCAACCCTATCTCGGGACGGATCGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGG
CTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCTCTGCTCAC
TGACTCGCTACGCTCGGTCTGTTGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGG
CGGAGATTTCTTGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGGCCGCG
GCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCT
CAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCT
GTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCG
CTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCGTTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACATGCAAAAGCACCACTGGCAGC
AGCCACTGGTAA

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

【化 2 2 - 4】

TTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGAC
 AAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCT
 CAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGA
 TTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAAGGGGTCTGACGCTCA
 GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
 ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
 ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
 ATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
 GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCT
 CCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGATTTCGAGCTCGCCCCGGGGATCGACC
 AGTTGGTGATTTTGAAGTTTGGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATG
 CGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCGCTCCC
 GTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAA
 AAACATCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCAT
 ATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAG
 GATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCT
 ATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGA
 CTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGG
 CCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCTGT
 GATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACA
 GGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCT
 GAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGA
 GTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAA
 TTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTT
 TGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGT
 CGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCC
 ATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAA
 CACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTT
 TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCC
 CCCTGCAGGTCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTAT
 TGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAAC
 GTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCA
 ACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTTCATCGATTCTCTTGT
 TTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGACCTCTCAAAAATAGCT
 ACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATT
 GACTGTCTCCGGCC

10

20

30

【 0 1 6 0】

【化 2 2 - 5】

TTTCTCACCTTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATG
 AGGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTA
 CAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCT
 TAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTT

40

[配列番号 11]

【 0 1 6 1】

第 19 の態様によるシステムを使用して、本明細書に開示される任意の使用に従って使用するための粒子を産生することができる。粒子は、第 2、第 9、または第 10 の態様に従って使用するためのものであり得る。一実施形態では、産生された組換えファージミド粒子は、例えば事前のワクチン接種によって、送達された 1 つ以上の抗原に曝露されていない対象の治療に使用するためのものである。

50

【 0 1 6 2 】

一実施形態では、第 19 の態様のシステムによって產生される組換えファージミド粒子は、1 つ以上の養子移入された T 細胞の使用をさらに含む方法において使用するものである。好ましくは、養子移入された T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞、T 細胞受容体 (T C R) トランスジェニック T 細胞、および腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) からなる群から選択される。養子移入された T 細胞は、組換えファージミド粒子によって腫瘍細胞に導入された 1 つ以上の抗原に特異的であり得る。好ましい実施形態では、養子移入された T 細胞は C A R T 細胞である。

【 0 1 6 3 】

実施例 1 に記載されるように、本発明者らは、原核宿主において本発明の組換えファージミド粒子を產生するための 2 つの代替アプローチ (図 9 および 10 参照) を考案した。

【 0 1 6 4 】

したがって、第 20 の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を產生するための方法であって、

(i) 原核宿主内に存続するように構成された第 1 のベクターであって、1 つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも 1 つの導入遺伝子発現カセット、または 1 つ以上の養子移入された T 細胞によって認識される 1 つ以上の抗原、およびベクターの一本鎖 DNA への複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第 1 のベクターを、原核宿主細胞に導入することと、

(i i) バクテリオファージ構造タンパク質をコードする核酸を含むヘルパーファージを宿主に導入することと、

(i i i) 一本鎖 DNA が構造タンパク質によってパッケージングされることをもたらす条件下で宿主を培養して、原核宿主から組換えファージミド粒子を形成および押し出すことと、を含む、方法を提供する。

【 0 1 6 5 】

有利なことに、この方法 (図 9 に示す) は、非常に高い収率の粒子をもたらす。第 1 のベクター (すなわち、ファージミド粒子のゲノム) は、例えば感染によって宿主細胞に導入され得る。次に、宿主細胞をヘルパーファージで形質転換することができ、それにより組換えファージミド粒子が產生される。好ましくは、この方法は、培養工程に続く精製工程を含む。精製は、遠心分離および / またはろ過を含み得る。

【 0 1 6 6 】

抗原は、本明細書に開示される任意のものであり得る。好ましい実施形態では、抗原または各抗原は、標的腫瘍細胞の細胞表面に発現されるペプチドまたはタンパク質である。好ましくは、抗原または各抗原は、腫瘍細胞によって発現された場合、C A R T 細胞にアクセス可能なペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質は、腫瘍細胞によって発現された場合、細胞表面で、または細胞表面上に折り畳まれたペプチドタンパク質として存在するようなものであり得る。抗原または各抗原は、ヒトにおける使用に好適な既存の C A R T 細胞の既知の標的であり得る。例えば、抗原または各抗原は、M U C 1、P S M A、C D 19、C D 20、エストロゲン関連受容体ベータ 2 型 (E r R B 2)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。一実施形態では、抗原または各抗原は、デングウイルスまたは黄熱ワクチン抗原であり得る。

【 0 1 6 7 】

サイトカインは、本明細書に開示されている任意のものであり得る。特に、サイトカインは、I L - 4、I L - 12、I L - 15、T N F、T R A I L、I F N -、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。好ましくは、サイトカインは I L - 15 であり、好ましくは、サイトカインは I L - 4 である。好ましくは、サイトカインは I L - 12 である。好ましくは、サイトカインは T R A I L である。好ましくは、サイトカインは I F N - である。

【 0 1 6 8 】

好ましくは、サイトカインは T N F ではない。好ましくは、サイトカインは T N F

10

20

30

40

50

である。好ましくは、サイトカインは、TNF の発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドTNF である。好ましくは、シグナルペプチドは、TNF のもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。

【0169】

好ましくは、第20の態様の方法は、第8の態様の組換えファージミド粒子を産生するために使用される。したがって、好ましくは、第1のベクターは組換えファージミド粒子のゲノムを含む。第1のベクターのパッケージングシグナルは、好ましくは起点または複製を含み得る。好ましくは、第1ベクターの複製起点は、F1 ori、より好ましくはF1バクテリオファージからなる。

【0170】

第20の態様による方法は、本明細書に開示される任意の使用に従って使用するための粒子を産生するために使用することができる。粒子は、第2、第9、または第10の態様に従って使用するためのものであり得る。一実施形態では、産生された組換えファージミド粒子は、例えば事前のワクチン接種によって、送達された1つ以上の抗原に曝露されていない対象の治療に使用するためのものである。

【0171】

一実施形態では、第20の態様の方法によって産生された組換えファージミド粒子は、1つ以上の養子移入されたT細胞の使用をさらに含む方法において使用するためのものである。好ましくは、養子移入されたT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞、T細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞、および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からなる群から選択される。養子移入されたT細胞は、組換えファージミド粒子によって腫瘍細胞に導入された1つ以上の抗原に特異的であり得る。好ましい実施形態では、養子移入されたT細胞はCAR T細胞である。

【0172】

第21の態様では、原核宿主から組換えファージミド粒子を産生するための方法であって、

(i) 原核宿主内に存続するように構成された第1のベクターであって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセット、または1つ以上の養子移入されたT細胞によって認識される1つ以上の抗原、およびベクターの一本鎖DNAへの複製を可能にするためのパッケージングシグナルを含む、第1のベクター、ならびに(b) 一本鎖DNAをパッケージングするのに必要な構造タンパク質をコードする核酸を含む第2のベクターを、原核宿主細胞に導入することと、

(ii) 一本鎖DNAが構造タンパク質によってパッケージングされることをもたらす条件下で宿主を培養して、原核宿主から組換えファージミド粒子を形成および押し出すことと、を含む、方法を提供する。

【0173】

有利なことに、この方法(図10に示すような)は、改善された安全性をもたらす。第2のベクター(すなわちヘルパーファージ)は、例えば感染によって宿主細胞に導入され得る。次に、宿主細胞を、第1のベクター(すなわち、ファージミド粒子のゲノム)で形質転換することができ、それにより組換えファージミド粒子の産生をもたらす。好ましくは、この方法は、培養工程に続く精製工程を含む。精製は、遠心分離および/またはろ過を含み得る。

【0174】

抗原は、本明細書に開示される任意のものであり得る。好ましい実施形態では、抗原または各抗原は、標的腫瘍細胞の細胞表面に発現されるペプチドまたはタンパク質である。好ましくは、抗原または各抗原は、腫瘍細胞によって発現された場合、CAR T細胞にアクセス可能なペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質は、腫瘍細胞によって発現された場合、細胞表面で、または細胞表面上に折り畳まれたペプチドタンパク質として存在するようなものであり得る。抗原または各抗原は、ヒトにおける使用に好適な既存のCAR T細胞の既知の標的であり得る。例えば、抗原または各抗原は、M

10

20

30

40

50

UC1、PSMA、CD19、CD20、エストロゲン関連受容体ベータ2型(ErRB2)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。一実施形態では、抗原または各抗原は、デングウイルスまたは黄熱ワクチン抗原であり得る。

【0175】

サイトカインは、本明細書に開示されている任意のものであり得る。特に、サイトカインは、IL-4、IL-12、IL-15、TNF、TRAIL、IFN-、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。好ましくは、サイトカインはIL-15である。好ましくは、サイトカインはIL-4である。好ましくは、サイトカインはIL-12である。好ましくは、サイトカインはTRAILである。好ましくは、サイトカインはIFN-である。

10

【0176】

好ましくは、サイトカインはTNFではない。好ましくは、サイトカインはTNFである。好ましくは、サイトカインは、TNFの発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドTNFである。好ましくは、シグナルペプチドは、TNFのもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。

【0177】

好ましくは、第21の態様の方法は、第8の態様の組換えファージミド粒子を生成するために使用される。したがって、好ましくは、第1のベクターは組換えファージミド粒子のゲノムを含む。第1のベクターのパッケージングシグナルは、複製起点を含むことが好ましい場合がある。好ましくは、第1ベクターの複製起点は、F1ori、より好ましくはF1バクテリオファージからなる。

20

【0178】

第21の態様の方法は、本明細書に開示される任意の使用のための組換えファージミド粒子を生成するために使用することができる。粒子は、第2、第9、または第10の態様に従って使用するためのものであり得る。一実施形態では、組換えファージミド粒子は、例えば事前のワクチン接種により、送達された1つ以上の抗原に曝露されていない対象の治療に使用するためのものである。

【0179】

一実施形態では、第21の態様の方法によって生成された組換えファージミド粒子は、1つ以上の養子移入されたT細胞の使用をさらに含む方法において使用するためのものである。好ましくは、養子移入されたT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞、T細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞、および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からなる群から選択される。養子移入されたT細胞は、組換えファージミド粒子によって腫瘍細胞に導入された1つ以上の抗原に特異的であり得る。好ましい実施形態では、養子移入されたT細胞はCAR T細胞である。

30

【0180】

第22の態様では、原核宿主から第8の態様による組換えファージミド粒子を生成するための、ウイルスベクター構造タンパク質をコードする核酸を含むヘルパーファージの使用を提供する。

【0181】

第21の態様で定義されるような第1および/または第2のベクターを含む宿主細胞を提供する。

40

【0182】

宿主細胞は、好ましくは原核生物であり、より好ましくは細菌細胞である。好適な宿主細胞の例には、(i)TG1(遺伝子型:K-12 supE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5、(rk⁻mk⁻))、プラスミド:F'[traD36 proAB⁺lacI^q lacZ M15])、(ii)DH5 F'IQ(商標)(遺伝子型:F-80 lacZ M15 (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺)phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1、プラスミド:F'proAB+lacIqZ M15

50

z z f T n 5 [K m R]、および (i i i) X L 1 - B l u e M R F ' (遺伝子型 : (m c r A) 1 8 3 (m c r C B - h s d S M R - m r r) 1 7 3 e n d A 1 s u p E 4 4 t h i - 1 r e c A 1 g y r A 9 6 r e l A 1 l a c、プラスミド : F ' p r o A B l a c I q Z M 1 5 T n 1 0 (T e t r) が挙げられる。

【 0 1 8 3 】

粒子は、治療的または診断的方法で、好ましくはインビボで使用される。

【 0 1 8 4 】

本発明は、本発明の組換えファージミド粒子の標的特定の性質および改良された形質導入効率に起因する多種多様な癌の治療に使用することができる。その結果、遺伝子治療に使用される組換えバクテリオファージの治療機会は、1つ以上の導入遺伝子発現カセットを保有するその能力のために本発明によって有意に増加され得る。本発明は、癌を予防するため予防的に、または癌の発症後、癌を改善、管理、および/または治療するために、使用することができる。

10

【 0 1 8 5 】

本発明を使用して、粒子の性質およびディスプレイされた外来タンパク質(抗原の場合)に応じて様々な癌の治療および/または診断に使用することができる様々な異なる組換えファージミド粒子を作成することができることは理解されよう。サイトカインは腫瘍細胞上にディスプレイされない可能性があることが理解されよう。遺伝子治療技術における標的細胞は、好ましくは真核生物、好ましくは哺乳動物である。

【 0 1 8 6 】

遺伝子治療技術は、癌を治療、予防、改善、または管理するために使用される。腫瘍は、血液悪性腫瘍または造血組織などの液体腫瘍、または血液悪性腫瘍であり得る。腫瘍は固形腫瘍であり得る。腫瘍は脳内のもの、例えば、髄芽腫、膠芽腫、またはびまん性内在性橋グリオーマ(DIPG)であり得る。組換えファージミド粒子は、化学療法薬(すなわち、ドキソルビシン、テモゾロミド、ロムスチン、シスプラチン、ビンクリスチン)、放射線療法、または、ヒストンデアセチラーゼの阻害剤(HDAC阻害剤)、プロテアソーム阻害薬(例えば、MG132、ボルゾテミブ、カルフィルゾミブ)、ならびに天然および食事源(すなわち、ゲニステイン、エピガロカテキンガレート(EGCG)、レスベラトロール)由来の抗癌剤を含むがこれらに限定されない、他の薬物/生体異物化合物などの従来の治療法と組み合わせて使用することができる。

20

30

【 0 1 8 7 】

組換えファージミド粒子はまた、対象となる抗原を主要なpVIIICoatタンパク質上に直接ディスプレイおよび発現させるために使用することができ、したがって、単一のファージ粒子による、多数の抗原の、またはタンパク質、もしくは関連する生物学的活性を有するタンパク質の、同時送達のための効率的なプラットフォームを提供する。対象は哺乳動物であってもよく、好ましくはヒトである。

【 0 1 8 8 】

本発明の組換えファージミド粒子およびシステム(すなわち、以下では「作用因子」と呼ぶ)は、単剤療法において、または癌の治療、改善、管理、または予防のための既知の治療法の補助剤として、またはそれらと組み合わせて使用され得る医薬において使用することができることが理解されよう。例えば、本発明のファージミド粒子およびシステムを、テモゾラミド、シスプラチン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、またはゲニステインなどの既存の化学療法薬と併用する併用治療アプローチが好ましい。

40

【 0 1 8 9 】

別の好ましい実施形態では、治療法は、本発明の組換えファージミド粒子およびシステムと、酵素またはロサルタンのような細胞外マトリックス分解剤との組み合わせを含み得る。本発明者らは、細胞外マトリックス分解剤が、治療されている対象、特に固形腫瘍内で、ファージミドの拡散を増強するはずであると考えている。

【 0 1 9 0 】

本発明による作用因子(すなわち、第8または任意の上記の態様において使用されるか

50

、または第 19 の態様によるシステムによって產生される組換えファージミド粒子)は、特に、組成物が使用される様式に応じて、多くの異なる形態を有する組成物に組み合わせることができる。したがって、例えば、組成物は、散剤、錠剤、カプセル、液体などの形態、または治療を必要とするヒトまたは動物に投与され得る任意の他の好適な形態であり得る。本発明による医薬のビヒクルは、それが与えられる対象によって十分に許容されるものでなければならないことは理解されよう。

【0191】

本発明による薬剤を含む薬剤は、いくつかの方法で使用することができる。例えば、経口投与が要求されることがあり、この場合、作用因子は、例えば、錠剤、カプセル、または液体の形態で経口的に摂取され得る組成物内に含有され得る。本発明の作用因子を含む組成物は、吸入(例えば、鼻腔内)によって投与することができる。組成物はまた、局所使用のために製剤化され得る。例えば、クリームまたは軟膏を皮膚に適用することができる。

10

【0192】

本発明による薬剤はまた、徐放型または遅延型放出デバイスに組込まれ得る。このようなデバイスは、例えば、皮膚の上または下に挿入することができ、医薬は、数週間または数ヶ月にわたって放出され得る。デバイスは、少なくとも治療部位に隣接して配置されてもよい。このようなデバイスは、本発明に従って使用される作用因子による長期治療が必要であり、通常は頻繁な投与(例えば、少なくとも毎日の注射)が必要とされる場合に特に有利であり得る。

20

【0193】

好ましい実施形態では、本発明による作用因子および組成物は、血流への注射によって、または治療を必要とする部位へ直接的に、対象に投与され得る。注射は、静脈内(ポータルまたは点滴)、皮下(ポータルまたは点滴)、皮内(ポータルまたは点滴)であり得るか、または従来する方法(疾患部位における局所注入に関連する - 対流増強送達(convective ion enhanced delivery))によって強化され得る。

【0194】

必要とされる作用因子の量は、順次、投与様式、作用因子(すなわち、組換えファージミドウイルス粒子またはシステム)の物理化学的特性、および単独療法として、または併用療法において使用されるかどうかに依存するその生物学的活性および生物学的利用能によって決定されることが理解されよう。投与頻度はまた、治療される対象内の作用因子の半減期によっても影響される。投与される最適な投薬量は、当業者によって決定されることができ、使用される特定の作用因子、医薬組成物の強度、投与様式、および疾患の進行によって変化する。対象の年齢、体重、性別、食事、および投与時間を含む、治療される特定の対象によるさらなる要因は、投与量を調整する必要性をもたらすであろう。

30

【0195】

一般に、1日用量 $0.01 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 $\sim 500 \text{mg} / \text{kg}$ 体重の本発明による作用因子を指標することができる。より好ましくは、1日用量は、 $0.01 \text{mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 400 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、より好ましくは $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 200 \text{mg} / \text{kg}$ 体重である。

【0196】

40

実施例に論じられるように、作用因子は、疾患の発症前、発症中、または発症後に投与することができる。例えば、対象が疾患を発症した直後に作用因子を投与してもよい。1日量は、単回投与(例えば、1日1回の注射)として全身に与えられてもよい。あるいは、作用因子は1日に2回以上投与する必要があるがあってもよい。一例として、作用因子は、 $25 \text{mg} \sim 7000 \text{mg}$ の間の1日用量(すなわち、体重 70kg を想定)2回(または治療される疾患の重篤度に応じてそれ以上の回数)として投与することができる。治療を受けている患者は、起床時には第1の用量を、その後は夕方(2回投与計画の場合)またはその後3または4時間間隔で第2の用量を摂取することができる。あるいは、徐放デバイスを使用して、反復投与を投与する必要なく、本発明による作用因子の最適用量を患者に提供することができる。

50

【 0 1 9 7 】

製薬業界で従来使用されている手順などの既知の手順（例えば、インビボ実験、臨床試験など）を使用して、本発明による粒子またはシステムを含む特定の製剤および正確な治療計画（作用因子の１日用量および投与頻度など）を形成することができる。

【 0 1 9 8 】

したがって、本発明の第２３の態様では、第８の態様によるか、第１９の態様によるシステムによって產生されるか、第２０または第２１の態様の方法によって產生されるか、または２２の態様の使用によって產生される組換えファージミドウイルス粒子と、薬学的に許容されるビヒクルと、を含む、医薬組成物を提供する。

【 0 1 9 9 】

本発明はまた、第２４の態様では、第２３の態様に従って医薬組成物を作製するためのプロセスであって、第８の態様によるシステムによるか、第１９の態様の方法によるシステムによって產生されるか、第２０または２１の態様の方法によって產生されるか、または第２２の態様の使用によって產生される治療有効量の組換えファージミドウイルス粒子、および薬学的に許容されるビヒクルに接触させることを含む、プロセスを提供する。

【 0 2 0 0 】

「対象」は、脊椎動物、哺乳動物、または家畜であり得る。したがって、本発明による作用因子、組成物、および医薬は、任意の哺乳動物、例えば、家畜（例えば、馬）、ペットを治療するために使用され得るか、または他の獣医学の用途に使用され得る。しかしながら、最も好ましくは、対象はヒトである。

【 0 2 0 1 】

作用因子（すなわち、組換えファージミドウイルス粒子）の「治療有効量」は、対象に投与されたときに、標的疾患を治療するために、または所望の効果を生じるのに、例えば腫瘍死をもたらすなど標的細胞または組織への導入遺伝子の効果的な送達をもたらすのに、必要な薬剤の量である、任意の量である。

【 0 2 0 2 】

例えば、使用される作用因子の治療有効量は、約 0 . 0 1 m g ~ 約 8 0 0 m g 、好ましくは約 0 . 0 1 m g ~ 約 5 0 0 m g であってもよい。

【 0 2 0 3 】

本明細書で言及される「薬学的に許容されるビヒクル」は、医薬組成物を製剤するのに有用であることが当業者に知られている任意の既知の化合物または既知の化合物の組み合わせである。

【 0 2 0 4 】

一実施形態では、薬学的に許容されるビヒクルは固体であってよく、組成物は散剤または錠剤の形態であってよい。固体の薬学的に許容されるビヒクルは、香味剤、滑沢剤、可溶化剤、懸濁剤、染料、充填剤、流動促進剤、圧縮助剤、不活性結合剤、甘味剤、防腐剤、染料、コーティング剤、または錠剤崩壊剤としても作用し得る１つ以上の物質を含んでもよい。ビヒクルは、封入材料でもあり得る。粉末剤では、ビヒクルは、本発明による微粉化活性剤と混合されている微粉化固体である。錠剤では、活性作用因子（例えば、本発明の粒子またはシステム）を、必要な圧縮特性を有するビヒクルと好適な割合で混合し、所望の形状およびサイズに圧縮することができる。粉末剤および錠剤は、好ましくは最大 9 9 % の活性剤を含有する。適切な固体ビヒクルとしては、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリジン、低融点ワックス、およびイオン交換樹脂が挙げられる。別の実施形態では、薬学的ビヒクルはゲルであってよく、組成物はクリームなどの形態であってもよい。

【 0 2 0 5 】

しかしながら、薬学的ビヒクルは液体であってもよく、医薬組成物は溶液の形態である。液体ビヒクルは、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、および加圧組成物を調製するのに使用される。本発明による粒子またはシステムは、水、有機溶媒、両者の

10

20

30

40

50

混合物または薬学的に許容される油もしくは脂肪のような、薬学的に許容される液体ビヒクルに溶解または懸濁されてもよい。液体ビヒクルは、可溶化剤、乳化剤、緩衝剤、防腐剤、甘味剤、香味剤、懸濁剤、増粘剤、着色剤、粘度調整剤、安定剤、または浸透圧調整剤などの他の適切な薬学的添加剤を含有することができる。経口および非経口投与のための液体ビヒクルの好適な例には、水（上記の添加剤、例えばセルロース誘導体、好ましくはカルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を部分的に含有する）、アルコール（一価アルコールおよび多価アルコール、例えばグリコールを含む）、およびそれらの誘導体、ならびに油（例えば、分別ヤシ油および落花生油）が含まれる。非経口投与の場合、ビヒクルは、オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルなどの油性エステルでもあり得る。滅菌液体ビヒクルは、非経口投与用の滅菌液体形態の組成物において有用である。加圧組成物用の液体ビヒクルは、ハロゲン化炭化水素または他の薬学的に許容される噴射剤であり得る。

10

【0206】

滅菌溶液または懸濁剤である液体医薬組成物は、例えば、筋肉内、髄腔内、硬膜外、腹腔内、静脈内、および特に皮下注射によって利用することができる。粒子またはシステム（すなわち、ハイブリッドベクター）は、滅菌水、生理食塩水、または他の適切な滅菌注射用媒体を使用して投与時に溶解または懸濁され得る滅菌固体組成物として調製され得る。

【0207】

本発明の組換えファージミド粒子、システム、および医薬組成物は、他の溶質または懸濁剤（例えば、溶液を等張にするのに十分な生理食塩水またはグルコース）、胆汁酸塩、アカシア、ゼラチン、モノオレイン酸ソルビタン、ポリソルベート80（ソルビトールのオレイン酸エステルおよびそのエチレンオキシドと共重合したその無水物）などを含む滅菌溶液または懸濁液の形態で経口投与することができる。本発明による粒子およびシステムは、液体または固体組成物のいずれかの形態で経口投与することもできる。経口投与に好適な組成物には、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、錠剤、および散剤などの固体形態、ならびに液剤、シロップ剤、エリキシル剤、および懸濁剤などの液体形態が含まれる。非経口投与に有用な形態としては、滅菌溶液、乳剤、および懸濁剤が挙げられる。

20

【0208】

アデノ随伴ウイルス（AAV）はしばしば遺伝子治療のために選択されるベクターであることが理解されるであろう。遺伝子送達ベクターとして、レンチウイルスベクターはまた、他のシステムよりもいくつかの重要な利点を有する。それらは、少なくとも8 KbのDNAの大きなパッケージング能力を有し、これは、組織特異的プロモーターおよび導入遺伝子のかなりの発現カセットをパッケージングする際の重要な特徴である。さらに、レンチベクターは、アデノウイルスベクターと比較して免疫原性を低下させ、全身送達経路を検討することを可能にする。しかしながら、AAVまたはレンチウイルスを実験室および臨床研究に使用することの障壁には、非常に高い生産コストおよび低い収率を含む。

30

【0209】

本発明者らは、遺伝子治療における有用な適用を示すことに加えて、本発明の組換えファージミド粒子はまた、AAVまたはレンチウイルスなどの組換えウイルスベクターを（インサイチュを含む）インビトロまたはインビボで産生するために使用することができる。ファージ誘導AAV産生は、大量の一本鎖ssDNAをパッケージングするファージミド粒子の能力を利用する。典型的なAAV産生システムは、一緒に機能してrAAV粒子を産生するrAAV、rep-cap、およびアデノヘルパー遺伝子の3つの主要な要素からなる。

40

【0210】

したがって、第25の態様では、第8の態様によるか、第19の太陽のシステムによって産生されるか、第20もしくは第21の態様の方法によって産生されるか、または第22の態様の使用によって産生される、組換えファージミド粒子であって、組換えファージミド粒子が、ファージミド粒子のゲノム内のウイルスゲノムを含むか、またはこれに由来する組換えウイルスベクターの産生のためのものであり、組換えウイルスベクターが、1

50

つ以上の抗原またはサイトカインをコードする核酸配列を、腫瘍細胞に少なくとも隣接して送達するために使用され、配列が1つ以上の抗原をコードするとき、1つ以上の抗原が発現され、1つ以上の養子移入されたT細胞によって認識可能である、組換えファージミドウイルス粒子を提供する。

【0211】

次に、養子移入されたT細胞(CAR T細胞など)による認識のための抗原をコードする組換えウイルスベクターを産生することができる組換えファージミド粒子が有利であり得る。図16は、悪性腫瘍への核酸配列の送達を示しており、ウイルスベクターの産生により、腫瘍の自己感染が可能になり、その結果、腫瘍全体に核酸配列が送達される。これは、養子移入されたT細胞による認識のための抗原が腫瘍全体に送達されることを可能にするため、有利であり得る。これは、CAR T細胞の好適な標的を提供するため、CAR T細胞治療などの任意のその後の養子移入療法と相乗効果がある。さらに、導入されたベクター(すなわち、組換えファージミド粒子)のより低い濃度が使用されることを可能にし得る。

10

【0212】

好ましい実施形態では、抗原または各抗原は、標的腫瘍細胞の細胞表面に発現されるペプチドまたはタンパク質である。好ましくは、抗原または各抗原は、腫瘍細胞によって発現された場合、CAR T細胞にアクセス可能なペプチドまたはタンパク質である。ペプチドまたはタンパク質は、腫瘍細胞によって発現された場合、細胞表面で、または細胞表面上に折り畳まれたペプチドタンパク質として存在するようなものであり得る。抗原または各抗原は、ヒトにおける使用に好適な既存のCAR T細胞の既知の標的であり得る。例えば、抗原または各抗原は、MUC1、PSMA、CD19、CD20、エストロゲン関連受容体ベータ2型(ERBB2)、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。一実施形態では、抗原または各抗原は、 Dengueウイルスまたは黄熱ワクチン抗原であり得る。

20

【0213】

第25の態様による組換えファージミド粒子は、本明細書に開示される任意の使用のためのものであり得る。粒子は、第2、第9、または第10の態様に従って使用するためのものであり得る。一実施形態では、組換えファージミド粒子は、例えば事前のワクチン接種により、送達された1つ以上の抗原に曝露されていない対象の治療に使用するためのものである。

30

【0214】

一実施形態では、第25の態様の組換えファージミド粒子は、1つ以上の養子移入されたT細胞の使用をさらに含む方法において使用するためのものである。好ましくは、養子移入されたT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞、T細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞、および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からなる群から選択される。養子移入されたT細胞は、組換えファージミド粒子によって腫瘍細胞に導入された1つ以上の抗原に特異的であり得る。好ましい実施形態では、養子移入されたT細胞はCAR T細胞である。

【0215】

組換えウイルスベクターを産生するための方法であって、第8の態様による組換えファージミド粒子または第19の態様によるシステムを真核宿主細胞に導入し、宿主細胞が組換えウイルスベクターを産生することを可能にすることを含む、方法も提供する。

40

【0216】

好ましくは、組換えウイルス産物は、組換え哺乳動物ウイルス、例えば、AAVまたはレンチウイルスである。好ましくは、ウイルスベクター産物はrAAVである。好ましくは、第8の態様によるファージミドウイルス粒子、または第19の態様によるシステムは、真核宿主細胞内で、ファージミド粒子のゲノムによって決定される、哺乳動物ウイルスの産生に必要とされる他の遺伝要素の送達および/または存在と共に、シスおよび/またはトランスで使用される。ファージミド粒子による宿主細胞への遺伝子導入を助けるまた

50

は増強するために使用される方法は、WO2014/184528（すなわち、多機能性）およびWO2014/184529（すなわち、正味の正電荷を有する複合体を形成するためのカチオン性ポリマーとの組み合わせ）に記載された方法を含む。

【0217】

真核生物の宿主細胞は哺乳動物であってもよい。宿主細胞は、ヒト胎児腎臓細胞（HEK293）、スポドプテラ・フルギペルダ蛹卵巣組織（Sf9）、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）を含むか、またはそれに由来し得る。昆虫細胞もまた想定される。

【0218】

一例では、宿主細胞は、rAAV、レンチウイルス、カプシド、複製、ヘルパータンパク質コード遺伝子、ならびに哺乳動物ウイルスの発現およびパッケージングに必要な任意の他の遺伝子からなる群から選択される遺伝子を保有する1つ以上のファージミド粒子ゲノムで形質転換され得る。

10

【0219】

例えば、ハイブリッドファージミド粒子誘導rAAV産生において、図3に示されるように、rAAV遺伝子は、第8の態様による組換えファージミドウイルス粒子によって保有され得るか、アデノヘルパーおよびrep-cap遺伝子は、別々のベクター上に保有され得るか、または真核宿主ゲノムに組込まれ得る。例えば、図12は1つのベクター上のアデノヘルパー遺伝子を示し、図13は別個のベクター上のrep-capを示す。rAAV、rep-cap、およびアデノヘルパー遺伝子の任意の組み合わせは、1つ以上のベクター、すなわちシスまたはトランス配置で保有されてもよい。あるいは、rep-capまたはアデノヘルパータンパク質は、rAAV産生の状況下で、安定的に発現されたアクセサリーDNA（例えば、プラスミド）として真核宿主に組込まれるか、または導入され得、それにより、ハイブリッドファージミド粒子は、ファージミド粒子のゲノム内の導入遺伝子カセットによって決定される、組換えウイルスへのパッケージングのための組換えウイルスゲノムを供給する。

20

【0220】

1つの好ましい実施形態では、rAAV、rep-cap、およびアデノヘルパー遺伝子は、図14および15に示されるように、単一のベクター上に保有される。本発明者らは、3つの遺伝子セットすべてが同じベクター上に内包するのはこれが、初めてであると考えている。

30

【0221】

したがって、第26の態様では、癌の治療、予防、または改善に使用するための、rAAV、rep-cap、アデノヘルパー遺伝子、および1つ以上の養子移入されたT細胞によって認識するための1つ以上のサイトカインまたは1つ以上の抗原をコードする核酸配列を含む、組換えベクターを提供する。

【0222】

組換えベクターは、本明細書に開示される任意の使用または方法のためのものであり得る。

【0223】

第27の態様では、癌の治療、予防、または改善のための方法において使用するための、第12の態様のベクターを含む、組換えファージミド粒子を提供する。

40

【0224】

組換えファージミド粒子は、本明細書に開示される任意の使用または方法のためのものであり得る。

【0225】

ファージミド粒子のウイルスゲノムを含むか、またはそれに由来する組換えAAVウイルスベクターを産生するための、第26の態様によるベクターまたは第27の態様の粒子の使用を提供する。

【0226】

組換えAAVウイルスベクターを産生するための方法であって、該方法が、真核宿主細胞

50

胞に、第26の態様によるベクターまたは第27の態様の粒子を導入し、宿主細胞が組換えウイルスベクターを産生することを可能にする、方法を提供する。

【0227】

同じ真核宿主細胞に導入された場合（図11および14参照）、ベクター上のrep-capおよびアデノヘルパー遺伝子は、rAAV産生の状況において、トランス作用もしくはシス作用として、またはAAVウイルスカプシドにおけるrAAVゲノムのパッケージングを促進する両方の要素の組み合わせとして挙動する。この産生プロセスは、複数のプラスミドの一時的な同時トランスフェクションに匹敵し、通常は3つのプラスミドを含む。しかしながら、この実施形態では、プラスミドは、同一の要素も保有する真核細胞（好ましくは哺乳動物細胞）を標的とする本発明の組換えファージミド粒子で置き換えられる。

10

【0228】

該方法は、インビボ(in vivo)、インビトロ(in vitro)、エキソビボ(ex vivo)、またはインサイチュ(in situ)で行うことができる。インサイチュ生産のために、組換えファージミド粒子は、好ましくは、指定された真核宿主である標的細胞のための標的化部分を含む。好ましくは、インサイチュ、エキソビボ、およびインビボウイルス産生の状況において、指定された真核宿主細胞型は疾患細胞である。好ましくは、罹患細胞は悪性または良性の腫瘍である。インビトロウイルス産生の状況において、好ましくは、真核宿主は、上記に列挙された真核宿主のうちのいずれかの誘導体である。（ハイブリッドファージミド粒子中の導入遺伝子カセットによって決定される）組換えウイルスの産生に必要な組換えファージミド粒子および遺伝子要素の適用は、真核宿主細胞の内部で、シス作用またはトランス作用の組み合わせのいずれかにおいて先に示したような任意の様式であり得る。

20

【0229】

第28の態様では、癌を治療、予防、または改善するための方法において使用するための、粒子で形質導入された標的腫瘍細胞内に導入遺伝子を発現するための組換えファージミド粒子であって、1つ以上のサイトカインをコードする核酸配列を含む少なくとも1つの導入遺伝子発現カセット、または1つ以上の養子移入されたT細胞によって認識可能な抗原を含み、かつそのバクテリオファージゲノムの少なくとも50%を欠くゲノムを含み、該方法が、主要細胞に少なくとも隣接して核酸配列を送達することを含み、核酸が1つ以上の抗原をコードするとき、1つ以上のサイトカインが発現され、かつ1つ以上の養子移入されたT細胞によって認識可能である、組換えファージミド粒子を提供する。

30

【0230】

本発明は、本明細書で言及される配列のうちのいずれかのアミノ酸または核酸配列を実質的に含む任意の核酸もしくはペプチド、またはその変異体、誘導体、もしくは類似体におよび、その機能的変異体または機能的フラグメントを含むことが理解されるであろう。「実質的にアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列」、「機能的変異体」、および「機能的フラグメント」という用語は、本明細書で言及される配列のいずれか1つのアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列と少なくとも40%の配列同一性を有する配列であり得、例えば本明細書において同定された核酸と40%同一性を有する配列であり得る。

40

【0231】

言及された配列のうちのいずれかと65%を超える、より好ましくは70%を超える、さらにより好ましくは75%を超える、さらにより好ましくは80%を超える、配列同一性を有するアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列もまた想定される。好ましくは、アミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列は、本明細書で言及される配列のうちのいずれかと少なくとも85%の同一性、より好ましくは本明細書で言及される配列のいずれかと少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも92%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも97%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%の同一性、最も好ましくは少なくとも99%の同一性を有する。

50

【0232】

当業者であれば、2つのアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列間の同一性の割合をどのように計算するかを理解するであろう。2つのアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列間の同一性のパーセンテージを計算するために、2つの配列のアラインメントを最初に調製し、次に配列同一性値を計算しなければならない。2つの配列の同一性のパーセンテージは、(i)例えば、ClustalW、BLAST、FASTA、Smith-Waterman(異なるプログラムで実装されている)、または3D比較からの構造的アラインメントなどの、配列を整列させるために使用される方法、ならびに(ii)アライメント方法によって使用されるパラメータ、例えば、ローカル対グローバルアラインメント、使用されるペアスコアマトリックス(例えば、BLOSUM62、PAM250、Gonnetなど)、およびギャップペナルティ、例えば、機能的な形態および定数、に応じて異なる値をとることができる。

10

【0233】

アライメントをしたので、2つの配列間の同一性百分率を計算するための多くの異なる方法がある。例えば、同一性の数を次のもの：(i)最短配列の長さ、(ii)アライメントの長さ、(iii)配列の平均長さ、(iv)非ギャップ位置の数、または(v)オーバーハングを除いた同値位置の数で割ることができる。さらに、同一性百分率もまた、長さに強く依存することが理解されるであろう。したがって、一对の配列が短いほど、偶然に起こると予想され得る配列同一性が高くなる。

【0234】

20

したがって、タンパク質またはDNA配列の正確なアライメントは、複雑なプロセスであることが理解されるであろう。一般的なマルチプルアラインメントプログラムClustalW(Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680、Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882)は、本発明に従ってタンパク質またはDNAの複数のアライメントを生成するための好ましい方法である。ClustalWの好適なパラメータは、以下の通りであり得る。DNAアライメントについて：ギャップオープンペナルティ=15.0、ギャップエクステンションペナルティ=6.66、およびマトリックス=同一性。タンパク質アライメントについて：ギャップオープンペナルティ=10.0、ギャップエクステンションペナルティ=0.2、およびマトリックス=Gonnet。DNAおよびタンパク質アライメントについて：ENDGAP=-1、およびGAPDIST=4。当業者であれば、最適な配列アライメントのために、これらおよび他のパラメータを変えることが必要であり得ることを認識しているだろう。

30

【0235】

次に、好ましくは、2つのアミノ酸/ポリヌクレオチド/ポリペプチド配列間の同一性パーセンテージの計算は、 $(N/T) * 100$ のようなアラインメントから計算され、Nは配列が同一の残基を共有する位置の数であり、Tはギャップを含むがオーバーハングを除く比較された位置の総数である。したがって、2つの配列間の相対同一性百分率を計算するための最も好ましい方法は、(i)例えば、上述のような好適なパラメータのセットを使用して、ClustalWプログラムを使用した配列アライメントを準備することと、(ii)NおよびTの値を以下の式：配列同一性 = $(N/T) * 100$ に挿入することと、を含む。

40

【0236】

類似の配列を同定するための代替方法は、当業者に知られているであろう。例えば、実質的に類似のヌクレオチド配列は、本明細書に記載される核酸配列またはその相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列によってコードされる。ストリンジェントな条件とは、ヌクレオチドが、3倍の塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中に約45でフィルター結合DNAまたはRNAとハイブリダイズし、続いて、0.2倍のSSC/0.1%SDS中に約20~65で少なくとも1回洗浄することを意味

50

する。あるいは、実質的に類似のポリペプチドでは、本明細書中に示される配列と少なくとも1個、5個、10個、20個、50個、または100個未満でアミノ酸が異なっているてもよい。

【0237】

遺伝暗号の縮重のために、それによってコードされるタンパク質の配列に実質的に影響を及ぼすことなく、任意の核酸配列を変化させることができ、その機能的変異体を提供することができることは明らかである。好適なヌクレオチド変異体は、配列内の同じアミノ酸をコードする異なるコドンの置換によって変化した配列を有するものであり、したがってサイレントな変化を生じる。他の好適な変異体は、相同なヌクレオチド配列を有するが、それが置換するアミノ酸と類似の生物物理学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸をコードする異なるコドンの置換によって改変されて保存的な変化を産生する、配列の全部または一部を含むものである。例えば、小さな非極性の疎水性アミノ酸には、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、およびメチオニンが含まれる。大きな非極性の疎水性アミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンが含まれる。極性中性アミノ酸には、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正荷電（塩基性）アミノ酸には、リシン、アルギニン、およびヒスチジンが含まれる。負帯電（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。したがって、どのアミノ酸が類似の生物物理学的特性を有するアミノ酸と置き換えられ得るかが理解され、当業者であれば、これらのアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を知っているであろう。

【0238】

本明細書に記載されている特徴のうちの全て（任意の添付の特許請求の範囲、要約、および図面を含む）、および/またはそのように開示される任意の方法もしくはプロセスのステップのうちの全ては、そのような特徴および/もしくはステップのうちの少なくともいくつかは相互に排他的である組み合わせを除き、任意の組み合わせで上記態様のうちのいずれかと組み合わせされ得る。疑念を避けるために、サイトカインへの言及は、好ましくは、IL-4、IL-12、IL-15、TNF、TRAIL、IFN-、またはそれらの任意の組み合わせに関する場合がある。好ましくは、サイトカインはIL-15であり、好ましくは、サイトカインはIL-4である。好ましくは、サイトカインはIL-12である。好ましくは、サイトカインはTRAILである。好ましくは、サイトカインはIFN-である。

【0239】

しかしながら、別の好ましい実施形態では、サイトカインはTNFである。好ましくは、サイトカインは、TNFの発現および/または分泌を増加させるように構成された非内因性シグナルペプチドを含むハイブリッドTNFである。好ましくは、シグナルペプチドは、TNFのもの以外のサイトカインシグナルペプチドである。例えば、シグナルペプチドは、好ましくはIL-2シグナルペプチドである。

【0240】

本発明をよりよく理解するために、また本発明の実施形態がどのように実施され得るかを示すために、添付の図面を例として参照する。

【図面の簡単な説明】

【0241】

【図1】図1は、従来技術のAAVPウイルス粒子と比較した、本発明によるファージミド-AAV(PAAV)ウイルス粒子の特徴を示す表である。

【図2】図2は、本発明によるヘルパーファージおよびファージミドゲノム(PAAV)、ならびにヘルパーおよびファージミドによって作成されるファージミド-AAV(PAAV)粒子の実施形態の概略図を示す。構造遺伝子は、ウイルス粒子へのDNAのパッケージングに不可欠であり、複製ヘルパーファージによって供給される。ファージミドゲノムは、ヘルパーファージに非常に寄生的である。最終的に、PAAV粒子は、従来技術のシステムをはるかに超える収率で産生される。

【図 3】図 3 は、ファージミドゲノム (P A A V) の一実施形態の概略表示である。

【図 4】図 4 は、図 3 に示すファージミドゲノム上の f 1 o r i および p U C o r i のそれぞれの位置を示す。

【図 5】図 5 は、図 3 に示すファージミドゲノム上の組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 導入遺伝子カセット上の選択マーカー遺伝子 (A m p R) の位置を示す。

【図 6】図 6 は、発現が C M V プロモーターおよび / またはエンハンサー配列によって駆動され、ポリ A シグナルでテールされた、対象となる遺伝子 (例えば、G F P) を含む、図 3 に示すファージミドゲノム上の r A A V 導入遺伝子カセットを示す。導入遺伝子カセット全体は、A A V からの末端逆位反復配列 (I T R) が隣接している。

【図 7】図 7 は、図 3 に示すようなファージミドゲノムを保有する原核宿主からファージミド粒子をレスキューするために操作されたバクテリオファージであるヘルパーファージの一実施形態を示す。

10

【図 8】図 8 は、p I I I マイナーコートタンパク質中の R G D 4 C 標的化ペプチドを含み、配列番号 2 6 および 2 7 に示すような、図 5 に示すヘルパーファージのゲノムの一部を示す。

【図 9 - 1】図 9 は、ファージミド - A A V (P A A V) 粒子を産生するための方法の第 1 の実施形態を示す。

【図 9 - 2】図 9 は、ファージミド - A A V (P A A V) 粒子を産生するための方法の第 1 の実施形態を示す。

【図 1 0 - 1】図 1 0 は、ファージミド - A A V (P A A V) 粒子を産生するための方法の第 2 の実施形態を示す。

20

【図 1 0 - 2】図 1 0 は、ファージミド - A A V (P A A V) 粒子を産生するための方法の第 2 の実施形態を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、(i) ファージミド - A A V (P A A V)、(i i) R e p - C a p ファージミド、および (i i i) アデノヘルパーファージミドの 3 つのベクターを示すインビトロ A A V 産生のためのファージに基づくアプローチの一実施形態を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、図 1 1 に示されるアデノヘルパーファージミドベクターの一実施形態のゲノムマップを示す。

【図 1 3】図 1 3 は、図 1 1 に示される R e p - C a p ファージミドベクターの一実施形態のゲノムマップを示す。

30

【図 1 4】図 1 4 は、統合されたアデノヘルパー / R e p - c a p / ファージミド - A A V (P A A V) ベクターの実施形態を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、図 1 1 に示される統合されたアデノヘルパー - R e p - C a p ファージミドベクターの一実施形態のゲノムマップを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、図 1 1 ~ 1 3 に示される 3 つのファージミドベクター、または図 1 4 および 1 5 に示される統合されたアデノヘルパー - R e p - C a p - A A V ファージミドベクターのいずれかを使用するインサイチュ A A V 産生の一実施形態を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、既知の A A V P ベクターおよび本発明による P A A V ベクターの透過型電子顕微鏡観察 (T E M) を示す。(A) R G D . A A V P . G F P フィラメント (ピンク) は、典型的には 1 4 5 5 . 0 2 n m の長さである。(B) R G D . P A A V . G F P フィラメント (青色) は、典型的には、7 2 9 . 9 6 n m の長さであり、ウイルスサンプル (緑色) に存在するヘルパーファージは、典型的には、1 1 8 6 . 0 3 n m の長さである。

40

【図 1 8】図 1 8 は、(A) 2 9 3 A A V および (B) U 8 7 細胞における、2 時間および 4 時間後の既知の A A V P ベクターおよび本発明による P A A V ベクターの内在化を示す。全細胞集団の 2 0 0 0 0 事象で設定されたゲート閾値を用いた、フローサイトメトリ分析を使用した。(n = 3) * = p < 0 . 0 5、* * = p < 0 . 0 1。

【図 1 9】図 1 9 は、(A) 2 9 3 A A V、(B) D E A E . D E X T R A N の添加を伴う 2 9 3 A A V、(C) U 8 7、および (D) D E A E . D E X T R A N の添加を伴う U 8 7 における形質導入 9 日後の G F P 陽性細胞の定量を示す。全細胞集団の 2 0 0 0 0 事

50

象で設定されたゲート閾値を用いた、フローサイトメトリー分析を使用した。($n = 3$)
 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 。

【図20】図20は、ファージミド誘導遺伝子導入(A)またはrAAV発現要素のトランスフェクション(B)後の細胞溶解物由来のrAAV-GFPのゲノムコピー数の定量を示す。(実験A: $n = 1$ 、実験B: $n = 3$)。

【図21】図21は、RGD4C-ファージミドに対する受容体である、 α_v 、 α_3 、および α_5 インテグリンサブユニットの発現を実証するためのUW228およびDAOYヒト髄芽腫細胞の免疫蛍光染色を示す。腫瘍細胞を、一次ウサギ抗 α_v 、 α_3 、または α_5 抗体(PBS-1%BSAで1:50に希釈)、次にヤギ抗ウサギAlexaFluor-488二次抗体(緑色で示す)で染色し、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ DAPI(青色)で対比染色した。画像は共焦点顕微鏡を使用して撮影された。

10

【図22】図22は、RGD4C-ファージミドによる小児髄芽細胞腫細胞への標的遺伝子送達を示す。髄芽腫細胞(UW228)を96ウェルプレート上で増殖させ、次にルシフェラーゼ遺伝子(RGD)を保有するRGD4C-ファージミドベクターで形質導入した。未処理細胞または非標的ベクター(M13)で処理した細胞を陰性対照として使用した。ルシフェラーゼ発現は、形質導入後2日目~4日目までの経時変化をモニターした。

【図23】図23は、mTOR/shRNA(RGD4C-mTOR/shRNA)をコードする配列を保有するRGD4C-ファージミドによる処理後の小児UW228およびDAOY髄芽細胞腫細胞におけるmTOR発現のダウンレギュレーションを示すウエスタンブロット分析を示す。ベクター処理後4日目に細胞溶解物を回収し、全タンパク質をBCAアッセイによって測定した。ウエスタンブロットを、ヒトmTOR(細胞シグナル伝達)に対するモノクローナル抗体でプローブした。非処理細胞(対照)およびmTOR/shRNAを欠くRGD4C-ファージミド(RGD4C)で処理した細胞を陰性対照として使用した。

20

【図24】図24は、髄芽細胞腫におけるテモゾロミド(TMZ)およびmTORに対するshRNAをコードする配列を保有するRGD4C-ファージミドの併用処理を示す。髄芽細胞腫細胞(UW228およびDAOY)を、RGD4C-ファージミド(RGD4C)またはmTOR/shRNAをコードする配列を保有するRGD4C-ファージミド(RGD4C-mTOR/shRNA)で形質導入した。未処理の細胞もまた対照として使用した。ベクター処理後7日目に、少数のウェルにテモゾロミド(TMZ、 $100 \mu\text{M}$)を加えて、ベクターと化学療法の併用効果を評価した。ベクター処理後8日目に画像を撮影した。

30

【図25】図25は、TNF α ファージミドベクターによる髄芽細胞腫細胞の処理を示す。UW228細胞を、RGD4C-ファージミド-TNF α (RGD4C/TNF α)および非標的化(ctrl)で処理した。A)TNF α の発現後、MTTアッセイを使用した細胞生存率。B)ヒトTNF α ELISA Maxを使用して測定された、ベクター処理細胞の培地におけるTNF α の発現。エラーバー: 平均 \pm SEM。

【図26】図26は、RGD4C-ファージミドに対する受容体である α_v 、 α_3 、および α_5 インテグリンサブユニットの発現を実証するためのDIPG細胞の免疫蛍光染色を示す。一次ウサギ抗体を使用し、次にヤギ抗ウサギAlexaFluor-488二次抗体を用いて細胞を染色した。対照細胞は二次抗体のみを受けた。画像は共焦点顕微鏡を使用して撮影された。

40

【図27A】図27は、RGD4C-ファージミド/AAVによる、UW228、DAOY、DIPG細胞への遺伝子発現の選択的かつ用量依存的送達を示す。レポーターLuc(ルシフェラーゼ)遺伝子を保有するRGD4C-ファージミド-Luc(RGD4C)のベクター用量 1×10^6 または 2×10^6 TU/細胞の増加を使用して、細胞を処理した。Lucの発現は毎日測定された。RGD4Cを欠く非標的ベクター(ctrl)を、標的化の陰性対照として使用した。エラーバー: 平均 \pm SEM。(A)DIPG細胞の治療を示し、(B)UW228の治療を示し、(C)DAOY細胞の治療を示す。

【図27B】図27は、RGD4C-ファージミド/AAVによる、UW228、DAO

50

Y、DIPG細胞への遺伝子発現の選択的かつ用量依存的送達を示す。レポーターLuc（ルシフェラーゼ）遺伝子を保有するRGD4C-ファージミド-Luc（RGD4C）のベクター用量 1×10^6 または 2×10^6 TU/細胞の増加を使用して、細胞を処理した。Lucの発現は毎日測定された。RGD4Cを欠く非標的ベクター（ctr）を、標的化の陰性対照として使用した。エラーバー：平均 \pm SEM。（A）DIPG細胞の治療を示し、（B）UW228の治療を示し、（C）DAOY細胞の治療を示す。

【図27C】図27は、RGD4C-ファージミド/AAVによる、UW228、DAOY、DIPG細胞への遺伝子発現の選択的かつ用量依存的送達を示す。レポーターLuc（ルシフェラーゼ）遺伝子を保有するRGD4C-ファージミド-Luc（RGD4C）のベクター用量 1×10^6 または 2×10^6 TU/細胞の増加を使用して、細胞を処理した。Lucの発現は毎日測定された。RGD4Cを欠く非標的ベクター（ctr）を、標的化の陰性対照として使用した。エラーバー：平均 \pm SEM。（A）DIPG細胞の治療を示し、（B）UW228の治療を示し、（C）DAOY細胞の治療を示す。

10

【図28-1】図28は、UW288、DAOY、またはDIPG細胞のRGD4C-ファージミド-TNFによる治療を示す。DIPGを、 2×10^6 TU/細胞RGD4C-ファージミド-TNF α （RGD4C）および陰性対照（ctr）としての非標的ベクターで形質導入した。UW288またはDAOY細胞を、DEAEデキストランを含むか、または含まない 1×10^6 TU/細胞で形質導入した。アポトーシス活性は、生存細胞のパーセンテージを測定することによって、またはカスパーゼ-Gloアッセイ（カスパーゼ3/7、カスパーゼ8、およびカスパーゼ9）を使用することによって、ベクター処理後9日目に測定した。エラーバー：平均 \pm SEM。*P 0.05、**P 0.01、***P 0.001。

20

【図28-2】図28は、UW288、DAOY、またはDIPG細胞のRGD4C-ファージミド-TNFによる治療を示す。DIPGを、 2×10^6 TU/細胞RGD4C-ファージミド-TNF α （RGD4C）および陰性対照（ctr）としての非標的ベクターで形質導入した。UW288またはDAOY細胞を、DEAEデキストランを含むか、または含まない 1×10^6 TU/細胞で形質導入した。アポトーシス活性は、生存細胞のパーセンテージを測定することによって、またはカスパーゼ-Gloアッセイ（カスパーゼ3/7、カスパーゼ8、およびカスパーゼ9）を使用することによって、ベクター処理後9日目に測定した。エラーバー：平均 \pm SEM。*P 0.05、**P 0.01、***P 0.001。

30

【図29】図29は、様々な形質導入単位のRGD・PAAVでのRGD・PAAVによる形質導入後のルシフェラーゼ発現を示す。

【図30】図30は、293個のAAV細胞の細胞表面に結合したPAAVベクターのパーセンテージを示す。それぞれの対照と比較して、RGD・PAAVベクターは58.2%の結合効率を有したが、M13・PAAVベクターは、7.1%の結合効率を有した。

【図31a】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

40

【図31b】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

50

ロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

【図31c】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

10

【図31d】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

20

【図31e】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

30

【図31f】図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、図31aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、図31dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、図31eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、図31fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

40

【図32】図32は、形質導入後6日目のMUC-1・CD28、MUC-1・GPI、およびPSMA抗原の発現を示す。HEK293細胞は、 10^6 TU/細胞のRGD標的化PAAV(RGD)または非標的化PAAV(NT)のいずれかによって形質導入された。未処理のHEK293細胞(Ctrl)、および488個のみの二次抗体染色(Ant.488)を有する標的化PAAV形質導入-HEK293細胞を対照として示した。Aは、CMVプロモーター駆動PAAVベクターによって形質導入されたHEK293細胞のMUC-1またはPSMA発現を表す(図31a、31b、および31cの構築物)。DEAE-デキストランを添加した。Bは、DEAEデキストランを添加しないCMVプロモーター駆動PAAVベクター(図31a、31b、および31cの構築物)によって形質導入されたHEK293細胞のMUC-1またはPSMA発現を表す。

50

Cは、D E A E デキストランを添加しないG r p 7 8 プロモーター駆動P A A V ベクター（図3 1 d および3 1 e の構築物）によって形質導入されたH E K 2 9 3 細胞のM U C - 1 発現を表す。

【図3 3 a】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3 3 a はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 b はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 c はC M V プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表し、図3 3 d はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 e はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 f はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表す。

10

【図3 3 b】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3 3 a はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 b はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 c はC M V プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表し、図3 3 d はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 e はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 f はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表す。

20

【図3 3 c】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3 3 a はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 b はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 c はC M V プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表し、図3 3 d はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 e はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 f はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表す。

30

【図3 3 d】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3 3 a はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 b はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 c はC M V プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表し、図3 3 d はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 e はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 f はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表す。

【図3 3 e】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3 3 a はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 b はC M V プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 c はC M V プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表し、図3 3 d はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 e はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるM U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図3 3 f はG r p 7 8 プロモーターによって駆動されるP S M A 発現プラスミドを表す。

40

【図3 3 f】図3 3 は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導C A R T 細胞治療のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、図3

50

3 a は C M V プロモーターによって駆動される M U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図 3 3 b は C M V プロモーターによって駆動される M U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図 3 3 c は C M V プロモーターによって駆動される P S M A 発現プラスミドを表し、図 3 3 d は G r p 7 8 プロモーターによって駆動される M U C 1 - C D 2 8 . I L 4 発現プラスミドを表し、図 3 3 e は G r p 7 8 プロモーターによって駆動される M U C 1 - G P I . I L 4 発現プラスミドを表し、図 3 3 f は G r p 7 8 プロモーターによって駆動される P S M A 発現プラスミドを表す。

【図 3 4】図 3 4 は、形質導入後 6 日目の癌細胞の M U C - 1 . C D 2 8、M U C - 1 . G P I、および P S M A 抗原の発現を示す。癌細胞は、1 0 6 T U / 細胞の R G D 標的化 P A A V (R G D) または非標的化 P A A V (M 1 3) のいずれかによって形質導入された。F A C S による抗原の内部発現を確認するために、いかなる抗体染色なしの未処理細胞 (C T R L) を対照として示し、未処理細胞を一次および二次抗体 (染色) で染色した。A は、C M V プロモーター駆動 P A A V ベクターによって形質導入された A 5 4 9 細胞の M U C - 1 または P S M A 発現を表す。B は、C M V プロモーター駆動 P A A V ベクターによって形質導入された S u i t 2 細胞の M U C - 1 または P S M A 発現を表す。C は、C M V プロモーター駆動 P A A V ベクターによって形質導入された U W 2 2 8 細胞の M U C - 1 発現を表す。

10

【図 3 5】図 3 5 は、安定した癌細胞における M U C - 1 . C D 2 8、M U C - 1 . G P I、および P S M A 抗原の発現を示す。M U C 1 または P S M A 抗原を発現する R G D 4 C - P A A V 安定形質導入癌細胞 (安定細胞) をピューロマイシン抗生物質で選択し、M U C - 1 または P S M A 発現に対する F A C S 分析を行うために使用した。抗原の内部発現を確認するために、いかなる抗体染色なしの未処理細胞 (C T R L) を対照として示し、未処理細胞を一次および二次抗体 (染色) で染色した。A は、A 5 4 9 細胞の M U C - 1 または P S M A 発現を表す。B は、S u i t 2 細胞の M U C - 1 または P S M A 発現を表す。C は、U W 2 2 8 細胞の M U C - 1 発現を表す。

20

【図 3 6】図 3 6 は、膜貫通型 t m T N F または分泌型 s T N F のいずれかを保持する P A A V 間のインビトロでの D I P G 細胞殺傷の治療および比較を示す。D I P G 細胞を、R G D 4 C - P A A V - t m T N F または R G D 4 C - P A A V - s T N F (R G D 4 C および非標的 M 1 3 [c t r]) のいずれかで処理し、ベクター処理後 7 日目に細胞生存率を測定した。分泌型 s T N F を保有する R G D 4 C - P A A V - s T N F 粒子は、ベクターによって少数の細胞集団のみが形質導入される一時的な形質導入状況においてさえ、R G D 4 C - P A A V - t m T N F よりも D I P G 細胞殺傷の誘発において強力であった。

30

【図 3 7 - 1】図 3 7 は、現在開示されている方法で使用されるプラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、3 7 a は P A A V - C M V - I R E S G F P プラスミドを表し、3 7 b は P A A V . G r p 7 8 . I R E S . G F P を表す。

【図 3 7 - 2】図 3 7 は、現在開示されている方法で使用されるプラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、3 7 a は P A A V - C M V - I R E S G F P プラスミドを表し、3 7 b は P A A V . G r p 7 8 . I R E S . G F P を表す。

【図 3 8】図 3 8 は、P A A V - t m . T N F 形質導入後の T N F の発現を示す。(A) U W 2 2 8 および D a o y を 9 6 ウェルプレートに播種し、D E A E デキストランを含む 1×10^6 T U / 細胞で形質導入し、上清を 6 日目に回収し、上清中の T N F を E L I S A で測定した。データは平均 \pm S E M として表される。

40

【図 3 9】図 3 9 は、U W 2 2 8 細胞における T N F およびシスプラチン併用治療の効果を示す。スルホローダミン B アッセイを使用して、細胞生存率を様々な時点で測定した。安定的に形質導入された U W 2 2 8 を、細胞播種の 4 8 時間後に $1 \mu M$ および $5 \mu M$ のシスプラチン化学療法で治療した。データは平均 \pm S E M として表される。*** P 0 . 0 0 1。図は、シスプラチン (シス) 化学療法との併用が髄芽腫に対する t m T N F サイトカイン遺伝子治療を増加させることを示す。

【図 4 0】図 4 0 は、P A A V - s T N F 形質導入後の T N F の発現を示す。D I P G を

50

96ウェルプレートに播種し、DEAEデキストランを含む 2×10^6 TU/細胞で形質導入し、上清を3日目に回収し、上清中のTNFをELISAで測定した。

【図41】図41は、PAAV-CMV-tmTNFの生成を示す。

【図42】図42は、PAAV-sTNFの生成を示す。

【図43】図43は、標的化PAAVベクターを示しており、RGD-4CリガンドがM13線状ファージのpIIIコートタンパク質上にディスプレイされていることを示す。ハイブリッドゲノムは、所望の遺伝子の発現に必要な重要な遺伝子フラグメントを示す。

【図44】図44は、RGD-pVIIIIヘルパーウイルスを産生するための概略図を示す。

【図45】図45は、ベクターの効率および遺伝子発現レベルを評価するためにインビトロ口形質導入実験で使用される、RGD-pVIIII PAAV-GFPおよびRGD-pVIIII PAAV-luciaを産生するための概略図を示す。

10

【図46-1】図46は、PAAV-hTRAIL (SnapGeneの画像)を産生するための概略図を示す。

【図46-2】図46は、PAAV-hTRAIL (SnapGeneの画像)を産生するための概略図を示す。

【図47】図47は、インテグリン(α 5 β 1)発現を評価するために、一次抗ファージ抗体およびAlexa Fluor-488標識二次抗体(緑色)とインキュベートしたDIPG細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。バックグラウンド蛍光を考慮して、抗体を含まないか、または二次抗体のみを含む対照細胞の画像を撮影した。核をDAPI(青)で染色した。

20

【図48】図48は、M13線状ファージのpIII(左)またはpVIIII(右)コートタンパク質上にディスプレイされるRGD-4Cリガンドの理論構築物を示す。

【図49】図49は、形質導入後6日目に0.1mのTU、0.5mのTU、および1mのTUで非標的化RGD-pIII PAAV-GFPまたはRGD-pVIIII PAAV-GFPベクターとインキュベートしたHEK293T細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。GFP発現は、すべてのTUでRGD-pIII PAAV-GFPで最も高くなる。

【図50】図50は、形質導入後6日目に0.1mのTU、0.5mのTU、および1mのTUで非標的化RGD-pIII PAAV-luciaまたはRGD-pVIIII PAAV-luciaベクターとインキュベートしたHEK293T細胞のRLUを示す。RLUは、すべてのTUでRGD-pIII PAAV-luciaで最も高くなる。エラーバーは+/-1標準エラーである。

30

【図51】図51は、形質導入後4日目のベクターとインキュベートしたHEK293T細胞のRLUを示す。RLUは、すべてのTUでH5W RGD-pIII PAAV-luciaで最も高くなる。エラーバーは+/-1標準エラーである。(Sajee Warmit、未公開データ)。

【図52】図52は、形質導入後3日目に1mのTUおよび2mのTUで非標的化RGD-pIII PAAV-luciaまたはH5W RGD-pIII PAAV-luciaベクターとインキュベートしたDIPG細胞のRLUを示す。RLUは、すべてのTUでH5W RGD-pIII PAAV-luciaで最も高くなる。エラーバーは+/-1標準エラーである。

40

【図53】図53は、PAAV-hTRAILおよび対照PAAV-GFPプラスミドを0.2ng、0.4ng、および0.6ngのDNAでトランスフェクトされたDIPG細胞の顕微鏡画像。トランスフェクションの18時間後に画像を撮影した。すべてのDNA濃度でPAAV-hTRAILでトランスフェクトされた細胞において、細胞の生存率が低くなる。

【図54】図54は、1μgのタンパク質に正規化されたPAAV-CMV-IL-12による形質導入後6日目に回収された培地のIL-12濃度を示す棒グラフを示す。CMVプロモーターおよび模擬形質導入を用いた、標的化および非標的化空ベクターによる形質導入の制御を示す。外側の選択バーは、2因子ANOVAによるすべてのベクター力価

50

および対照の IL - 12 産生データの分析を示す。内側の選択バーは、対応のない t 検定による各力価でのベクターと対照との比較を示す。実験を 3 回行った。

【図 55】図 55 は、PAAV - CMV - mIL - 12 による形質導入後の様々な日にサンプリングされた培地のマウス IL - 12 濃度を示す折れ線グラフを示す。CMV プロモーターおよび模擬形質導入を用いた、標的化および非標的化空ベクターによる形質導入の制御を示す。外側の選択バーは、2 因子 ANOVA によるベクターおよび対照に対するすべてのサンプリング日からのマウス IL - 12 産生データの分析を示す。特定のデータポイント上のアスタリスクは、対応のない t 検定(unpaired t-test)による、指定された各日のベクターと対照と間の比較を示す。

【図 56】図 56 は、RGD - 4C 標的化 PAAV - CMV - mIL - 12 (n = 4) による、RGD - 4C 標的化 PAAV - CMV による、導入遺伝子なし (n = 4) および治療対照なし (n = 4) による治療後 7 日間の C57BL / 6 マウスの B16 - F10 マウスメラノーマ腫瘍の平均腫瘍サイズ (mm³) を示す棒グラフを示す。5 × 10¹⁰ TU ベクターの 3 回の投与を、0、2、および 5 日目に静脈内投与した。Tukey の多重比較検定を用いた 2 因子 ANOVA によって、データを分析した。

【図 57】図 57 は、IL2 シグナル配列を示す。

【図 58】図 58 は、IL - 2 / TNF 構築物を示す。

【図 59】図 59 は、DIPG における RGD4C - sTNF および RGD4C - tmTNF の細胞殺傷効率を示す。分泌型または膜貫通 TNF (sTNF) 導入遺伝子を保有する PAAV 標的化 (RGD4C) または非標的化 (M13) で、DIPG 細胞を形質導入した。細胞を 96 ウェルプレートに播種した。2 日後、40 ng / μg のタンパク質 DEAE デキストランを有する、2 × 10⁶ TU / セルで、細胞を形質導入した。スルホローダミン B (SRB) アッセイで、生存率を測定した。学生の t 検定(student's t-test)によって統計的有意性を決定した。データは平均 ± SEM として表される。* P 0.05、** P 0.01。

【図 60】PAAV - sTNF および PAAV - tmTNF による形質導入後の TNF の発現を示す。DIPG 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、分泌型または膜貫通型の TNF 導入遺伝子を保有する RGD4C および M13 で形質導入した。A) RNA を抽出し、TNF の発現を qRT - PCR によって決定した。B) 上清を回収し、上清中の TNF を ELISA によって決定した。データは平均 ± SEM として表される。* * P 0.01 * * * P 0.001。学生の t 検定によって、統計的有意性を決定した。

【発明を実施するための形態】

【0242】

背景

遺伝子送達技術の開発は、基礎研究の社会への成功を収める転換に有益である。過去 10 年間に、多数のウイルスおよび非ウイルスベクターが、産業および治療用途の潜在的な送達ベクターとして出現した。ベクターの重要な特性は、遺伝子を送達するのに有効であることに加えて、容易に産生され、商業的に実行可能でなければならないということである。2006 年に、Hajitouらは、アデノ随伴ウイルス / ファージ (AAVP) と呼ばれる組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) と線状バクテリオファージ (ファージ) との間のハイブリッドを作成することによってそのようなベクターの必要性を満たすことを試みた (Nature protocols 2, 523 - 531 (2007); Cell 125, 385 - 398 (2006))。得られる AAVP ベクターは、哺乳動物および原核生物ウイルスの好ましい特性を有するが、それらの個々のベクターが通常保有する欠点を受けない。しかしながら、有意な改善の余地をまだ残している AAVP ベクターの特定の局面が存在する。とりわけ、これには、その生産および治療特性に影響を及ぼすベクターの遺伝子設計が含まれる。最終的に、これは、哺乳動物ウイルスと比較した場合、AAVP の比較的低い遺伝子導入効率をもたらす。

【0243】

本明細書に記載される研究は、ファージミド / アデノ随伴ビリオンファージミド (すな

10

20

30

40

50

わち、PAAV)と呼ばれる新しいファージミドベクターを用いるいわゆるファージミドシステムを使用することによる、ファージ遺伝子送達ベクターの最も進歩したバージョンの設計、および既知で既存のファージベクター、AAVPに対するそれらの優位性に関する。線状ファージゲノムに挿入するrAAVカセットからなるAAVPゲノムとは異なり、PAAVゲノムは、任意の構造のファージ遺伝子を含んでいない - 原核ヘルパーウイルスはベクターアセンブリを容易にするために必要である (Mol Ther 3, 476 - 484; Pharmaceutical research 27, 400 - 420 (2010))。ウイルスの生殖および治療要素を、導入遺伝子を保有する治療用ベクターと構造遺伝子を保有する別個のヘルパーウイルスとに分離することにより、ゲノム/ベクターサイズが実質的に減少し、それにより導入遺伝子の能力が著しく増加し、新しいシステムの遺伝子治療への応用にとって有用な利点である。その結果、このことが原核生物ウイルスのカプシドへの真核生物ウイルスゲノムのカプシド形成をもたらし、高められた生産収率、遺伝子導入効率、他の用途のためのベクターシステムの柔軟性を有する真核生物ゲノムと原核生物カプシドとの間のハイブリッドとしてのベクターをもたらす。

【0244】

以下の実施例に記載されているように、本発明者らは、

1. ハイブリッドファージミド - AAVベクター (PAAV) 粒子発現システムを設計および構築し、

2. ファージミド/AAVベクター (PAAV) が、以下を含むがこれに限定されない様々な段階で、既知のAAVPシステムよりも遺伝子導入においてより効率的であるかどうかを特徴付け、決定し、

- a. 細胞表面への結合、
- b. 細胞表面からのベクターの内部化、
- c. 組換え導入遺伝子の発現。

【0245】

3. ハイブリッドファージミドPAAVベクターシステムが哺乳類プロドューサー細胞株からrAAVを産生することができるかどうかを決定した。

【0246】

4. このシステムは、癌の治療のためのCAR-T療法で使用するができることを実証した。

【0247】

5. このシステムは、癌の治療のために、サイトカインIL-12、TRAIL、およびハイブリッドTNFを標的細胞に送達するために使用することができることを実証した。

【0248】

6. ハイブリッドTNF構築物を含むファージミド粒子を設計および構築した。

【0249】

7. ハイブリッドTNF構築物が、全長TNFと比較した場合、発現、分泌、および細胞殺傷効率の増加を示すことを実証した。

【0250】

最初に図1を参照すると、本発明によるファージミド - AAV (PAAV) 粒子 (すなわちピリオン) の特徴を従来技術のAAVPウイルス粒子と比較した表を示す。図から分かるように、本発明のPAAV粒子 (6 kb) は、既知のAAVP粒子 (14 kb) よりもはるかに小さく、すなわちDNAが42%少なく、ウイルス粒子が50%短く、PAAV粒子は、先行技術のシステム、AAVPの収率 (100倍) をはるかに上回る収率で産生される。その結果、本発明のPAAV粒子は、より大きなペイロードを保有することができ、これは、遺伝子治療アプローチにおいて複数の導入遺伝子を送達するために非常に有用である。したがって、本発明者らは、改変バクテリオファージ発現システム (PAAV) が、遺伝子治療またはウイルスベクターの大規模生産のための高度にウイルス性のベクターとして使用され得ることを実証した。

【 0 2 5 1 】

実施例 1 - ファージミド - A A V ベクター (P A A V) 構築

図 2 を参照すると、本発明のヘルパーファージゲノムおよびファージミドゲノム (P A A V D N A) の実施形態が示されており、これらは図 1 にも示されているように、原核生物における発現に際して共に一緒にしてファージミド - A A V (P A A V) 粒子を産生する。構造遺伝子は、ウイルス粒子への D N A のパッケージングに不可欠であり、以下に詳細に論じられる複製欠損ヘルパーファージによって供給される。ファージミドゲノムは、ヘルパーファージに対して極めて寄生的であり、複製およびパッケージングの両方において、それが複製欠損ヘルパーファージを打ち負かすことを意味する。

【 0 2 5 2 】

A) ファージミド / A A V ベクター

ここで図 3 を参照すると、2 つの複製起点および 2 つの他の遺伝子要素を含むプラスミドであるファージミドゲノムの一実施形態が示されている。ファージミドゲノムは、原核 (例えば、細菌) 宿主内でのその複製およびヘルパーウイルスによってレスキューされたときのファージミド粒子へのパッケージングの両方を促進するために、2 つの複製起点を必要とする。

【 0 2 5 3 】

図 4 を参照すると、第 1 の複製起点 (o r i) は、大量の原核宿主内の二本鎖ファージミド (d s D N A) の複製を可能にする高コピー数複製起点 (p U C o r i) である。第 2 の複製起点は、プラスミドの一本鎖 D N A への複製を可能にするファージ複製起点 (f 1 o r i) であり、その後、ファージミドベクター粒子 (P A A V) にパッケージングすることができる。

【 0 2 5 4 】

図 5 を参照すると、ファージミドゲノムは選択マーカー遺伝子を含む。ファージミドゲノムが原核宿主内で効率的に複製するために、選択マーカー (例えばアンピシリン耐性) を、発現を確実にするために使用し、抗生物質耐性遺伝子 (それ自身のプロモーターを有する) の形態でのファージミドゲノムの喪失を防止する選択的圧力を与える。これは、選択マーカーが耐性を付与する抗生物質の存在下で原核宿主を培養する場合、ファージミドゲノムの発現 (および複製) を確実にする。

【 0 2 5 5 】

図 6 を参照すると、ファージミドゲノムは、対象となる導入遺伝子を含む組換え (アデノ随伴ウイルス、A A V) 導入遺伝子カセットをさらに含む。これには、ポリペプチド / タンパク質、短ヘアピン / 小干渉 / 短誘導 R N A、またはそれらの両方の組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。ほんの一例として、図 6 に示す導入遺伝子は、G F P およびヒト - グロビンをコードする。導入遺伝子の発現は、ウイルスプロモーター (例えば、C M V) および / またはエンハンサー配列によって駆動され、ポリ A シグナルでテールされる。プロモーターはまた、癌遺伝子治療適用 (すなわち、グルコース調節タンパク質 [g r p 7 8] のプロモーター) における哺乳動物および腫瘍特異的プロモーターであり得る。導入遺伝子カセット全体が、A A V 由来の末端逆位反復配列 (I T R) で隣接され、それはファージミド粒子によって形質導入された哺乳類細胞核内のコンカテマー性エピソーム (染色体外) D N A として導入遺伝子カセットを安定に維持することを可能にする保護ヘアピン構造を形成する。I T R は、A A V のコンカテマー形成を可能にし、その後、A A V 導入遺伝子カセットを長期間にわたって安定して発現させることを可能にする。

【 0 2 5 6 】

ファージミドは、それが構造的ファージ遺伝子を欠くので、それ自体を粒子にパッケージングすることができない。その結果、原核宿主からの粒子の形成および押し出しに必要な構造的 (すなわちカプシド) タンパク質を提供する、図 7 に示すような、ヘルパーウイルスによる「レスキューすること」が必要となる。従来の考え方では、ベクター中の遺伝子要素は一般的であり、遺伝子工学において広く使用されている。

10

20

30

40

50

【0257】

B) ヘルパーファージ

図7を参照すると、ヘルパーファージ（本明細書においてM13KO7と呼ぶ）は、図3に示すファージミドゲノムを保有および/または含有する原核宿主からファージミド粒子（すなわちPAAV）をレスキューするために特別に設計されたバクテリオファージである。ヘルパーファージは、破壊された複製起点（p15a、中程度のコピー数）および、ファージ粒子にそれ自身のパッケージングする能力を著しく低下させるパッケージングシグナルを含む。その結果、ファージミドゲノムは、複製およびパッケージングの両方において、ヘルパーファージを打ち負かすであろう。

【0258】

ファージミド標的化特性（またはWO2014/184528中のパンフレットに記載されているような多機能性特性）を付与するために、ヘルパーファージのゲノムは、ファージミド粒子アセンブリのための構造カプシドタンパク質を提供するので、ヘルパーファージのゲノムはそれを行うように操作されなければならない。例えば、ヘルパーゲノムは、得られたPAAVP粒子の所望の標的細胞（例えば、腫瘍）への送達を可能にする細胞標的化リガンドをディスプレイするように構成されたpIIIカプシドマイナーコートタンパク質をコードし得る。それはまた、得られたPAAV粒子上に外来ペプチドをディスプレイするように構成された少なくとも1つのpVIIメジャーコートタンパク質をコードすることもできる。したがって、一実施形態では、 v_3 および v_5 インテグリン受容体を発現する腫瘍細胞および血管形成腫瘍関連の内皮細胞に特異性を付与するために、pIIIIマイナーコートタンパク質に9つのアミノ酸変異を誘導することが望ましい。したがって、図8を参照すると、ヘルパーファージのゲノムは、 v_3 および v_5 インテグリンを標的とするRGD4Cペプチド（CDCRGDCFC - 配列番号7）を含む。

【0259】

PAAVファージミドゲノムおよびヘルパーファージが構築されると、以下に論じられるように、それらを一緒に使用して、原核宿主において、ファージミド - AAVベクター（PAAV）粒子を産生する。

【0260】

実施例2 - ファージミド - AAVベクター（PAAV）の産生

本発明者らは、ファージミド - AAVベクター（PAAV）粒子を産生するための2つの異なる方法（方法1および2）を発明し、これらを図9および10に示す。

【0261】

注釈(Notes)：

- TG1：繁殖因子（F'線毛）を保有するE. coli株。
- 2xYT：TG1 E. coliを培養するために使用される液体ブロス。
- カナマイシン：ヘルパーファージ上に存在する抗生物質耐性選択マーカー。
- アンピシリン：ファージミドベクター上に存在する抗生物質耐性選択マーカー。
- TYEトッブアガー：TG1 E. coliを培養するために使用される固体培地で、1.25%細菌用寒天の添加により2xTYから適合させた。

【0262】

ファージミド/AHVベクター（PAAV）製造方法1：感染性レスキュー

図9を参照すると、

1. 1%のグルコースを補充した2xYT（100 μ g/mLのアンピシリン）60mLに4~5mLの前培養（一晚）のPAAVゲノムを保有するTG1 E. coliを加える。
2. シェーカー（250 RPM）中に37°で培養物をインキュベートする。
3. OD₆₀₀が0.5~0.8（対数期）の範囲になってすぐに、少なくとも 1×10^{10} のヘルパーファージ（M13KO7）の形質導入単位を培養物に加える。
4. 混合のため反転させる。37°で30分間インキュベートする。

5. ステップ3からの感染したスターター培養物を、1%のグルコースを補充した2×YT (100 μg/mLのアンプシリン+25 μg/mLのカナマイシン)を含む2Lのフラスコに最終容量400~450 mLまで注ぐ。

6. オービタルシェーカーで37°、250 rpmで16~20時間一晩インキュベートする。

7. 培養上清からファージミド(PAAV)粒子を精製する。

【0263】

方法1の利点はその非常に高い収率である。

【0264】

ファージミド/AAVベクター(PAAV)産生方法2: 安定したプロデューサー細胞株
図10を参照すると、

パート1: コンピテントプロデューサー細胞株の産生

1. ヘルパーヘッジM13KO7由来のssDNAゲノムでTG1コンピテントE. coli (Zymo Research, USA)を形質転換し、TYEトッアガー(50 μg/mLのカナマイシン)に蒔き、

1. 個々のコロニーを選択し、1%のグルコースを補充した5 mL 2×YT培地(50 μg/mLのカナマイシン)に接種する。

2. オービタルシェーカーで37°、250 rpmで16~20時間一晩インキュベートする。

3. 市販の抽出キット(QIAGEN、オランダ)を使用して5 mLの一晩培養物からDNAを抽出し、DNAラダーに対して1%アガロースゲル(100ボルト、2.5 mA)で泳動させることにより、真の陽性形質転換体を確認する。

4. 公表されたプロトコル(Krantz et al., UC Berkeleyにより出版されたものに適合)を使用して、ステップ4で同定された正確な形質転換体から化学的にコンピテントな細胞を調製する。

【0265】

パート2: PAAVファージミド粒子の産生

1. パート1で作成したコンピテント細胞株をファージミド/AAVゲノムで形質転換し、TYEトッアガー(100 μg/mLのアンプシリン+50 μg/mLのカナマイシン)に蒔く。

2. コロニーを選択し、1%のグルコースを補充した5 mL 2×YT(100 μg/mLのアンプシリン+50 μg/mLのカナマイシン)に接種する。

3. オービタルシェーカーで37°、250 rpmで4時間インキュベートする。

4. ステップ3の感染したスターター培養物を、1%のグルコースを補充した2×YT(100 μg/mLアンプシリン+25 μg/mLカナマイシン)を含む2Lのフラスコに、400~450 mLの最終容量まで注ぐ。

5. オービタルシェーカーで37°、250 rpmで16~20時間一晩インキュベートする。

6. 培養上清からファージミド粒子を精製する。

【0266】

PAAVファージミド粒子精製

1. 温かい一夜培養物を遠心分離ボトルに移し、3300 G、4°で30分間遠心分離することによって細菌をペレット化する。

2. ペレットを捨て、上清を清潔な遠心分離ボトルに移す。

3. 各ボトルに上清の30%容量を氷冷20%PEG-8000/2.5M NaClと共に加え、混合のため渦状攪拌する。

4. 氷上で4~24時間インキュベートする

5. 10000 G、4°で30分間の遠心分離によってファージミド粒子を沈殿させる。上清を捨てる。

6. ファージミド粒子ペレットを10000 G、4°で1分間遠心分離して乾燥させる。

10

20

30

40

50

7. PEG/NaClで残りの上清を除去する
8. ファージミド粒子ペレットを0.5~2mLのPBSに再懸濁する
9. 再懸濁したファージミド粒子調製物を0.45ミクロンのフィルターを使用してる過する。
10. 調製物を4℃に保つ。この調製物は4℃で2年まで安定である。25%のグリセロールストックは無期限に-80℃で保存することができる。

【0267】

実施例3 - 遺伝子治療技術のためのファージミド - AAVベクター (PAAV) の使用

実施例1および2は、ファージミド - AAVベクター (PAAV) 粒子および2つの産生方法を産生するために必要とされる本発明の構成要素 (すなわち、図3に示すファージミドゲノムおよび図7に示すヘルパーファージ) を記載する。一旦産生され、精製されると、PAAV粒子は、遺伝子治療などの使用範囲を有することができる。

【0268】

一例として、本明細書に記載されるPAAV粒子は、標的細胞への送達が成功していることを既知のアッセイで容易に検出できるので、GFP導入遺伝子を保有する。治療では、任意の導入遺伝子を選択して、図3に示すファージミドゲノムに操作し、得られたPAAV粒子中に保有することができる。例えば、導入遺伝子は、治療的または工業的有用性を有し得るタンパク質をコードする任意の遺伝子であり得る。例えば、導入遺伝子は、CAR T細胞などの養子移入されたT細胞による認識のための1つ以上の抗原をコードしてもよい。導入遺伝子はまた、RNAi療法において使用する短ヘアピン/小干渉/短誘導RNA分子をコードし得る。導入遺伝子は、内部リボソーム侵入部位 (IRES) またはウイルス融合ペプチド (インフレーション融合のためのT2Aペプチド) を使用して一緒に融合された複数のポリペプチド、核酸、またはそれらの両方の組み合わせをコードし得る。

【0269】

実施例4 - インビトロAAV産生のためのファージミド - AAVベクター (PAAV) の使用

遺伝子治療に加えて、本明細書に記載されるPAAV粒子は、アデノ随伴ウイルス (AAV) を産生するための新規な方法に使用することができる。ファージ誘導AAV産生は、大量のdsDNAをパッケージングするファージミド粒子の能力を利用する。典型的なAAV産生システムは、組換えAAV粒子の産生と一緒に機能するrAAV、rep-cap、およびアデノヘルパー遺伝子の3つの主要な要素からなる。本発明者らは、2つの異なる戦略を考案した。

【0270】

図11を参照すると、使用される第1の戦略は、rAAV産生要素を保有する3つの異なるファージミドベクターを産生することである。これらは、ファージミド - AAVベクター (PAAV) (図3参照)、アデノヘルパーファージミド粒子 (図12参照)、およびrep-capファージミド粒子 (図13参照) である。これらの粒子の基本構造は、ファージミド/AAV構築セクションに記載されているように、2つの複製起点および選択マーカーを含むので、同様である。しかしながら、重要な違いは導入遺伝子カセットである。図3に示されるように、ファージミド - AAV (PAAV) ゲノムはAAV導入遺伝子カセットを含むが、アデノヘルパーおよびrep-cap粒子は、それぞれ図12および13に示されるように、アデノヘルパー導入遺伝子またはrep-cap導入遺伝子を含む。

【0271】

別の実施形態では、本発明者らは、図14および15に示されるように、単一ベクターゲノム内の必要な要素のすべてを含む、いわゆる「統合された構築物」を遺伝子操作した。

【0272】

別々のベクター上または同じ統合されたベクター上のいずれかの同じ哺乳動物プロデューサー細胞 (図11および14参照) に導入された場合、rep-capおよびアデノヘルパー遺伝子は、rAAVゲノムのファージミド/AAVベクターへのパッケージングを

10

20

30

40

50

促進するトランス作用性要素として挙動する。この産生プロセスは、3つのプラスミドの一時的な同時トランスフェクションに匹敵する。しかしながら、この場合、プラスミドは、全く同じ要素を保有するファージミドベクターで置き換えられる。

【0273】

以下は、アデノ随伴ウイルス(AAV)のPAAVファージミド誘導産生のためのプロトコルについて記載する。

【0274】

注釈(Notes)：

DMEM：ダルベッコの改良イーグル培地。

FBS：胎児ウシ血清、成長補助剤。

完全培地：DMEM + 10% FBS。

EDTA：エチル - ジアミン四酢酸、タイトジャンクション形成に必要なカルシウムイオンを隔離することによって細胞を解離するために使用されるイオンキレーター。

GlutaMax：成長補助剤、L - グルタミンの類似体。

【0275】

ファージミド誘導AAV産生のためのプロトコル：

1. 15 cm組織培養プレート中の完全培地(10%のFBS、20 mM GlutaMax、ペニシリン/ストレプトマイシン、および非必須アミノ酸を補充したDMEM)に、HEK293細胞を播種し、80%コンフルエンスに到達するまで、最低48時間、増殖させる。

2. ファージミド/AAV、rep-capファージミド、およびアデノヘルパーファージミドを混合して全容量5 mL未満で1:1:1の形質導入単位比を達成するか、または、1細胞あたり百万個の形質導入単位を達成するために統合されたベクター(単一粒子中に3つの要素をすべて含む単一ベクター)を分取する。

3. ステップ3で作製した形質導入混合物に、等容量の無血清DMEM(20 mMのGlutaMaxで補充)を添加する。

4. 混合のため反転させる。室温で15分間インキュベートする。

5. ステップ1で蒔いたHEK293細胞をPBSで洗浄し、3回繰り返す。

6. 形質導入混合物を加え、穏やかに渦状攪拌して混合物を均一に分散させる。

7. 細胞培養インキュベーター中、37°、5%のCO₂で72時間インキュベートする：
a. 形質導入混合物との6時間のインキュベーションの後、等容量の完全培地(10%のFBS、20 mMのGlutaMax、ペニシリン/ストレプトマイシン、および非必須アミノ酸を補充したDMEM)を補充する、

b. 24時間後、培地を完全培地(10%のFBS、20 mMのGlutaMax、ペニシリン/ストレプトマイシン、および非必須アミノ酸を補充したDMEM)と交換する。

【0276】

rAAV精製：

1. 0.5 MのEDTA溶液を組織培養プレート中の培地に0.010 Mの最終濃度まで添加し、室温で5分間インキュベートする。

2. 細胞および培地を吸引し、粉碎し、50 mLの遠心分離管に移す。

3. 1500 RPM、5分間、室温で遠心分離することにより細胞をペレット化する：

a. オプション：さらなるAAV精製のために上清を回収する。

4. 2~5 mLの無血清DMEMに細胞ペレットを再懸濁する。

5. エタノール - ドライアイスバスおよび37°に設定された水浴中で4回の凍結 - 解凍サイクルを行うことによって、懸濁液中の細胞を溶解する。

6. 室温で10分間、10000 Gで細胞溶解物を遠心分離する：

a. 定量化/さらなる精製/濃縮のために上清を分取する。

【0277】

b. ペレット(破片)を捨てる。

【0278】

10

20

30

40

50

実施例 5 - インサイチュ A A V 産生のためのファージミド - A A V ベクター (P A A V) の使用

図 1 6 を参照すると、本発明者らは、P A A V を使用した A A V 粒子のインサイチュ生産のための方法を考案した。

【 0 2 7 9 】

第 1 に、3 つのファージミドベクターまたは統合されたベクターの最適用量（または複数回用量）を、静脈内 / 皮下 / 腹腔内または筋肉内 / 皮下（または前述の投与経路のいずれか）を介してインピボで導入する。病変組織は、関連するインテグリンをディスプレイする腫瘍であり、したがって、ファージミド P A A V 粒子上の標的化部分は、R G D 4 C 配列である。腫瘍は、野生型 A A V ではなく、ハイブリッドファージミド粒子にコードされたウイルス導入遺伝子を含む r A A V を産生し始めるはずである。これらの A A V 治療粒子は、自然に哺乳類組織に高い親和性を有するため、近くの部位を自家感染させ、所与の時間にわたって腫瘍を根絶するはずである。

【 0 2 8 0 】

実施例 6 - 大規模標的遺伝子導入および組換えアデノ随伴ウイルス産生のための工学的疑ウイルスの作製

透過型電子顕微鏡法

粒子を特徴付ける際に、本発明者らは、ファージミドベースのベクターシステムを使用する場合、ベクターサイズが実質的に減少することを示すために P A A V 粒子を画像化した。透過型電子顕微鏡法を使用して、本発明者らは、ウラニルアセテートでネガティブ染色した後、メッシュ銅 T E M グリッド上の本発明の P A A V および既知の A A V P 粒子の長さを画像化し、測定した（図 1 7 参照）。平均 A A V P 粒子は長さが 1 4 5 5 . 0 2 n m であり（図 1 7 A ）、本発明による典型的な P A A V 粒子は長さがわずかに 7 2 9 . 9 6 n m であり（図 1 7 B ）、これは粒子サイズの約 5 0 % の減少に相当することが分かった。P A A V 粒子（典型的には 1 1 8 6 . 0 3 n m 、図 1 7 B ）を産生するために使用されるヘルパーファージと比較して、相対ベクターサイズはヘルパーウイルスよりも約 3 8 % 短い。

【 0 2 8 1 】

ベクターサイズの差異は、P A A V が A A V P よりも遺伝子送達ベクターとしてより効率的であり得るという理論の基礎を成しており、これは、生産収率だけでなく、哺乳動物細胞に遺伝子を導入し発現させる際のその後の感染プロセスにおいても同様である。したがって、本発明者らは、2 9 3 A A V （ヒト胎児腎臓 2 9 3 の誘導体）および U 8 7 神経膠芽腫細胞株における結合、内在化、および遺伝子発現を含む、感染の様々な段階でベクター効率を調べた。

【 0 2 8 2 】

ベクターの内部化

結合後、ベクターは標的細胞による受容体介在性エンドサイトーシスを受ける。ベクター内在化の潜在的な差異を調べるために、本発明者らは、フローサイトメトリー（図 1 8 参照）を使用して、2 つの時点（2 時間、2 H、4 時間、4 H）における標的細胞の内在化ベクターの数をアッセイした。両方の細胞株で A A V P と比較した場合、P A A V ベクターは 2 時間でより効果的に内在化され（中央値蛍光強度（M F I）= 1 0 3 1 . 7、A A V P よりも 3 3 5 高い、 $p < 0 . 0 5$ ）、そして 4 時間で全体的な程度がより大きく内在化することが見出された。P A A V の 2 時間での M F I は、A A V P より 2 9 3 A A V で 3 3 5 および U 8 7 細胞で 2 0 7 （ $p < 0 . 0 5$ ）有意に高かった。形質導入の 4 時間後、この差は 2 9 3 A A V （8 2 9 M F I、 $p < 0 . 0 5$ ）では有意に大きかったが、U 8 7 （1 5 7 M F I、有意ではない）ではそれほど少なかった。全体として、M F I は P A A V 1 処理細胞について 2 0 9 2 （2 9 3 A A V、 $p < 0 . 0 5$ 、図 1 8 A）および 1 1 3 7 （U 8 7、図 1 8 B）でピークに到達し、A A V P よりも有意に高く、それぞれ 1 0 6 3 （2 9 3 A A V）および 9 8 0 （U 8 7）でピークに到達した。このデータは、P A A V が両方の細胞株における両方の時点について内在化の速度および程度において A A

V Pより一貫して良好に実施されたことを実証する。

【0283】

AAVPおよびPAAV媒介遺伝子導入後の緑色蛍光タンパク質発現

ベクター内在化の差異が遺伝子発現の増加につながるかどうかを調べるために、本発明者らは、RGDおよびNT PAAV、GFPおよびAAVP、GFPベクターを使用してGFP発現アッセイを行った(図19参照)。この実験において、それらをまた、WO 2014/184529に記載されているように、カチオン性ポリマーDEAE、DEXTRAN(Dex)の添加がPAAVベクターのバイオアベイラビリティおよびエンドソームエスケープを増加させることにより遺伝子導入を増強できるかどうかを試験した。形質導入の9日後、細胞をトリプシン処理し、計数し、フローサイトメーターを使用して分析した。ベクター形質導入を補助するためにDexを使用したかどうかに関わらず、導入遺伝子の発現は一般にU87よりも293AAV細胞で高かった。ベクターのみを使用する場合、標的RGD、PAAV、GFPベクターは、AAVPと比較して、より高い有効性(それぞれ293AAVおよびU87細胞におけるGFP+ve細胞で7.7%、 $p < 0.01$ および1.4%、 $p < 0.05$)で標的細胞に形質導入し、これは293AAVおよびU87細胞でそれぞれ2.44倍および1.56倍の増加となる(図19A、C)。

10

【0284】

しかしながら、Dexを添加すると、RGD、AAVPおよびRGD、PAAVベクターの遺伝子発現が劇的に増加する。293AAV細胞では、RGD、AAVP、GFP処理細胞におけるGFP発現はRGDで25%に増加した。PAAV、GFP処理細胞は50%まで実質的に増加し(すべて $p < 0.01$)、Dexの添加は、RGD、AAVPについては7.9倍、RGDについては6.5倍の遺伝子発現の増加をもたらした。PAAVP(図19B、D)。形質導入に対して高い活発性を有すると考えられているU87細胞では、Dexは、4.8%GFP+ve細胞に対してRGD、PAAV、GFPの遺伝子発現を3.6倍以上増加させることができた($p < 0.01$) - Dexが1.3%のGFP+ve細胞に対してわずか1.5倍だけ遺伝子発現を増加させた($p < 0.05$)ため、これは、RGD、PAAV、GFPの場合ではなかった。興味深いことに、Dexは、293AAV細胞におけるNT、PAAV(非標的)ベクターによる形質導入を可能にした(7.34%)が、U87ではそうでなかった。

20

30

【0285】

ファージミド誘導組換えアデノ随伴ウイルス産生

本発明者らは、PAAVおよびファージミド由来のベクターが市販のプロデューサー細胞株においてrAAVを産生するために使用することができるかどうかを評価するために、通常、遺伝子導入のためのトランスフェクションを必要とする3つの標的ベクターで293AAV細胞を形質導入した。彼らは、細胞溶解物からrAAV粒子を採取し、ファージミド誘導形質導入後の3つの時点(図20A)にわたってmL当たりrAAV遺伝子コピー数(GC)を定量化することができた。FuGene6(トランスフェクション試薬、 3.99×10^11 GC/mL、図20B)による従来のトランスフェクションと比較すると、ファージミド誘導rAAV産生は、rAAV収量において168時間(7.69×10^11 GC/mL、図21A)で1.9倍以上の増加をもたらす。ファージミド誘導遺伝子導入は、(トランスフェクションとは異なり)広範囲の細胞内プロセッシングを必要とするため、ウイルス遺伝子を発現させて機能性粒子にパッケージングするのにより長い時間を必要とする。しかしながら、同じ72時間の時点で収率を比較すると、トランスフェクションはファージ誘導rAAV産生より 1.76×10^11 GC/mL高い値を示した。すべての時点でのトランスフェクションまたはファージミド誘導産生皿からの1mLの培養上清あたりのrAAV収率は、観察可能な傾向はなくおよそ $8 \sim 9 \times 10^10$ GC/mLであった(データは示さず)。

40

【0286】

実施例7 - RGD4C - ファージミドの構築および使用

50

トリペプチド R G D は、フィブロネクチンを含む細胞外マトリックスのタンパク質に見出される。インテグリンは、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリンへの細胞接着部位においてフィブロネクチンに位置する R G D モチーフに結合することによりフィブロネクチンの受容体として働き、組換えファージミド粒子の p I I I マイナーコートタンパク質に 9 アミノ酸変異を順に誘導したその特異性を $\alpha_v \beta_3$ および $\alpha_v \beta_5$ インテグリンを発現する腫瘍細胞および血管新生腫瘍関連内皮細胞に付与する。したがって、第 2 のベクターのゲノムは、R G D 4 C 標的ペプチド (C D C R G D C F C - 配列番号 7) を含む。

【 0 2 8 7 】

図 2 1 を参照すると、 $\alpha_v \beta_3$ および $\alpha_v \beta_5$ インテグリンサブユニット、R G D 4 C - ファージミドの受容体の発現を実証する、U W 2 2 8 および D A O Y ヒト髄芽腫細胞の免疫蛍光染色が示されている。これらのデータは、R G D 4 C 標的ペプチドを含有するファージミドベクターが、小児脳腫瘍、髄芽腫における標的遺伝子送達および遺伝子治療に使用することができることを実証している。

10

【 0 2 8 8 】

図 2 2 を参照すると、R G D 4 C - ファージミドによる小児髄芽細胞腫細胞への標的遺伝子送達が、4 日間の時間経過にわたって示されている。このデータは、R G D 4 C - ファージミドが、髄芽腫においてオーバータイムに増加した効率的かつ選択的な遺伝子送達を媒介することを示している。

【 0 2 8 9 】

図 2 3 は、m T O R / s h R N A (R G D 4 C - m T O R / s h R N A) をコードする配列を保有する R G D 4 C - ファージミドによる処理後の小児 U W 2 2 8 および D A O Y 髄芽細胞腫細胞における、哺乳動物標的のラバマイシン (m T O R) 発現のダウンレギュレーションを示すウエスタンブロット分析を示す。これらのデータは、選択的かつ効率的な方法で治療標的 m T O R の発現をノックダウンするために腫瘍細胞中で s h R N A を送達するのに R G D 4 C - ファージミドをうまく使用することができることを実証している。

20

【 0 2 9 0 】

図 2 4 は、テモゾロミド耐性であることが知られている、髄芽細胞腫細胞における m T O R に対するテモゾロミド (T M Z) と s h R N A をコードする配列を保有する R G D 4 C - ファージミドとの併用処理を示す。このデータは、標的化された R G D 4 C - m T O R / s h R N A が髄芽腫細胞を T M Z に再感作し、完全な腫瘍細胞の根絶を達成することができることを実証している。したがって、R G D 4 C - ファージミドによる m T O R 発現の標的化されたノックダウンは、髄芽腫のような化学療法抵抗性腫瘍細胞に対してテモゾロミドと組み合わせて使用する効率的な戦略である。

30

【 0 2 9 1 】

図 2 5 は、T N F ベクターによる髄芽細胞腫細胞の処理を示す。このため、R G D 4 C / T N F は、髄芽腫のような標的腫瘍の殺傷に使用する治療可能性を有する。図 2 6 は、R G D 4 C - ファージミドの受容体である $\alpha_v \beta_3$ 、および $\alpha_v \beta_5$ インテグリンサブユニットの発現を実証する D I P G 細胞の免疫蛍光染色を示す。これらのデータは、R G D 4 C 標的ペプチドを含有するファージミドベクターが、小児脳腫瘍、D I P G における標的化遺伝子送達および遺伝子治療に使用することができることを実証している。

40

【 0 2 9 2 】

図 2 7 は、R G D 4 C - ファージミド / A A V による U W 2 8 8、D A O Y、または D I P G 細胞への遺伝子発現の選択的かつ用量依存的送達を示す。これらのデータは、R G D 4 C - ファージミドが D I P G に遺伝子発現を用量依存的かつ選択的にうまく送達できることを証明している。これらのデータはまた、R G D 4 C - P A A V がインビトロで髄芽腫への効率的な遺伝子導入を示し、それが時間と共に増加することも示す。対照 (非標的化 P A A V - L u c) で形質導入された細胞には、非特異的な取り込みはなかった。髄芽腫細胞株に対するカチオン性ポリマー D E A E デキストランにより、形質導入効率が向上した。

【 0 2 9 3 】

50

図28は、RGD4C - ファージミド - TNF による処理を示す。これらのデータは、RGD4C - ファージミドが選択的にDIGにTNF を送達し、アポトーシス誘導をもたらすことを実証している。したがって、RGD4C - ファージミド - TNF は、DIGに対する標的療法に使用する治療可能性を有する。図28はまた、細胞株UW288またはDAOYのいずれかで試験した場合、治療により腫瘍細胞が殺傷されるため、髄芽腫がRGD4C - ファージミド - TNF による治療の良好な候補であることを示す。例えば、UW288は、対照と比較して6日目に約60%の細胞死を示した。カチオン性ポリマーDEAEデキストランにより、腫瘍細胞の殺傷がさらに促進された。

【0294】

実施例8 - RGD4C - ファージミドのルシフェラーゼ発現

10

プロトコル：

HEK細胞を、完全培地（DMEM、10%のFCS、1%のグルタミン、1%のペニシリン/ストレプトマイシン）中48ウェルプレートに蒔き、70～80%のコンフルエンスに到達するまで少なくとも48時間インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、無血清培地（DMEM）に懸濁したハイブリッドファージ/ファージミドベクターで12時間形質導入した後、培地に完全培地を補充した。ルシフェラーゼ発現は、調製したQuantiluc（InvivoGen、USA）試薬50μLに10μLの培地を加えることによって測定した。ルミノメーター（promega、USA）を備えたプレートリーダーを使用して光の放出を測定した。

【0295】

20

図29は、様々な濃度の形質導入単位でのRGD・PAAVによる形質導入後のルシフェラーゼ発現を示す。グラフは、様々な濃度のハイブリッドファージ/ファージミドベクターとのインキュベーション後のルシフェラーゼの時間と発現との間の用量依存性指数関数的関係を実証している。数字は、定量化可能な遺伝子発現が、分泌型ルシフェラーゼのアッセイを介してファージミドベクターによって達成され得ることを実証している。

【0296】

実施例9 - 293個のAAV細胞へのRGD・PAAVベクターの結合

プロトコル：

293AAV細胞を、完全培地（DMEM+10%のFCS、1%のグルタミン、1%のペニシリン/ストレプトマイシン）中24ウェルプレートに蒔き、最低48時間、70～90%のコンフルエンスに到達させた。細胞を500uLのPBSで2回洗浄し、氷上に置いた後、200uLの無血清DMEMに懸濁した200000 TU/細胞（形質導入単位/細胞）のPAAVベクターで形質導入した。氷上で1時間インキュベートした後、培地をウェルから回収し、ファージミド粒子の量をTG1 E.coliで滴定し、コロニー計数によって定量化した。

30

【0297】

図30を参照すると、293個のAAV細胞の細胞表面に結合したPAAVベクターのパーセンテージが示されている。RGD・PAAVベクターは58.2%の結合効率を有し、M13・PAAVベクターは、それぞれの対照に対して7.1%の結合効率を有していた。

40

【0298】

実施例10 - 特定のCAR T細胞により標的化され得るように、細胞表面にMUC1またはPSMA抗原のいずれかを発現するPAAVによる腫瘍細胞の形質導入

現在、癌の従来の治療法は、手術、化学療法、および放射線療法の3つのうち1つ以上のオプションからなる。これらの介入によって病気が治癒することもあるが、多くの場合、癌細胞は完全に排除されないため、再発率は高くなる。さらに悪いことに、化学療法および放射線療法は不快な副作用が伴う。その結果、癌治療の代替アプローチの開発に大きな関心が寄せられている。これらの新しい治療法の最も有望なものの1つは、癌細胞を排除するために患者自身の免疫システムの力および特異性を利用することを目的とする癌免疫療法である。癌免疫療法は発展途上の治療法である。2つの主な戦略には、腫瘍関連抗

50

原 (TAA) を標的とする能動免疫療法、および既存の抗腫瘍応答を強化する受動免疫療法が含まれる。

【0299】

癌の例には、髄芽腫およびびまん性内在性橋グリオーマ (DIPG) などの小児脳腫瘍が含まれる。髄芽腫は最も一般的な脳腫瘍であり、外科的切除、放射線療法、および化学療法からなる現在の治療戦略に従って、5 年生存率で小脳に発生する (Rudin et al., 2009)。しかしながら、生存者はしばしば長期の内分泌および神経認知の副作用を有する。したがって、現在の治療による長期的な副作用を回避するために、非侵襲的、腫瘍特異的、より安全で、費用効果が高く、効率的な新しい治療アプローチの開発が緊急に必要である。一方、びまん性内在性橋グリオーマ (DIPG) は、2 年後の生存率がわずか 6 ~ 10 % の小児にのみ発生する最も攻撃的な脳腫瘍である。そのびまん性のため、この種の癌に対する効果的な治療戦略はない (Jansen et al., 2012, Mueller and Chang, 2009)。

【0300】

免疫システムの特殊な特性および生物におけるその中心かつ普遍的な役割により、免疫療法は癌を治療する大きな可能性を秘め、長期的な保護を提供する一方で、他の治療よりも副作用が少ない可能性がある。1 つの特定のアプローチである養子細胞治療 (ACT) は、抗腫瘍活性を有する免疫細胞の移植を伴う。これらの細胞は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) として知られる腫瘍にすでに存在する T 細胞であり得、それらの一部は TAA に特異的であろう。これらの細胞は切除された腫瘍組織から分離され、エキソビボで培養、活性化、および拡大され、その後患者に再注入される。ACT に有用な他の型の細胞には、改変 T 細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) のいずれかを発現する遺伝子操作された T 細胞が含まれる。これらの人工受容体は、腫瘍細胞によって発現される抗原を標的とするように T 細胞を特異的に配向する (Blankenstein T, et al. The determinants of tumor immunogenicity. Nat Rev Cancer. 2012; 12 (4): 307 - 13.; Sharpe M and Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. Dis Model Mech. 2015; 8 (4): 337 - 50.)。

【0301】

CAR タンパク質は T 細胞の表面に発現し、特定の腫瘍抗原に強く結合する細胞外結合ドメイン、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとをつなぐヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および CD28 および OX40 (腫瘍壊死因子受容体) などの細胞内シグナル伝達ドメイン (共刺激ドメインとも呼ばれる) を含む。これらのドメインによって媒介される共刺激シグナルにより、T 細胞の効率が向上し、抗腫瘍活性が延長される (Sharpe M and Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. Dis Model Mech. 2015; 8 (4): 337 - 50; Till BG, et al. CD20 - specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4 - 1BB domains: pilot clinical trial results. Blood. 2012; 119 (17): 3940 - 50; Koehler H, et al. CD28 co - stimulation overcomes transforming growth factor - beta - mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. Cancer Res. 2007; 67 (5): 2265 - 73)。CAR T 細胞は、腫瘍の細胞表面に発現する可能性のある幅広い種類の抗原を認識するように設計することができる。潜在的

な標的抗原には、タンパク質、炭水化物、および糖脂質が含まれる。CAR T細胞は、従来のT細胞およびトランスジェニックTCR T細胞とは異なり、MHCが処理および提示する抗原を必要としない。したがって、同じCARベースの戦略を、患者のMHCハプロ型に関係なく同じ腫瘍抗原を発現するすべての患者に適用することができる (Sharpe M and Mount N. *Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges*. *Dis Model Mech*. 2015; 8(4): 337-50, Haji-Fatahaliha M, et al. *CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015: 1-11)。

10

【0302】

多くの利点があるにもかかわらず、CAR T細胞治療にはいくつかの制限がある。例えば、腫瘍が好適な標的抗原を発現しない場合がある。これは、新抗原が未知である、不適切なレベルで発現している、腫瘍細胞の亜集団でのみ発現している、非腫瘍組織でも発現している、CAR T細胞の組織への標的化に好適である方法で発現されていないなど、様々な理由で、または腫瘍による抗原の発現が治療中に減少または消失する可能性が高い場合に発生する可能性がある。

【0303】

例えば、一部のCAR T細胞治療には、動物モデルおよび臨床試験の両方で望ましくない毒性があることが報告されている。この問題は、CAR T細胞によって認識される抗原が単に腫瘍細胞で発現されるだけでなく、正常組織の損傷につながる正常細胞でも提示される場合に発生する可能性がある (Palmer DC, et al. *Effective tumour treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity* (Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(23): 8061-6; Morgan RA, et al. *Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2*. *Mol Ther*. 2010; 18(4): 843-51; Lamers CHJ, et al. *Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience*. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24(13): e20-e2; Grupp SA, et al. *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. *N Engl J Med*. 2013; 368(16): 1509-18.)。したがって、標的抗原の可用性および選択が問題である。理想的には、抗原は、腫瘍細胞のみ、または代替的に生存に必須ではない正常細胞のみが提示される (Rosenberg SA, Restifo NP. *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. *Science*. 2015; 348(6230): 62-8)。現在、前立腺癌および乳癌の治療のためのムチン1 (MUC1) など、様々な腫瘍抗原に対する多くのCAR T細胞の開発に成功している (Sanchez C, et al. *Combining T-cell immunotherapy and anti-androgen therapy for prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013; 16(2): 123-31, S1; Wilkie S, et al. *Retargeting of Hum*

20

30

40

50

an T Cells to Tumor - Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor. The Journal of Immunology. 2008; 180(7): 4901 - 9), prostate-specific membrane antigen (PSMA) for the treatment of prostate cancer (Maher J, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR[zeta]/CD28 receptor. Nat Biotech. 2002; 20(1): 70 - 5.), CD19 and CD20 for the treatment of B-cell malignancies (Brentjens RJ, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. Blood. 2011; 118(18): 4817 - 28.) and estrogen-related receptor beta type 2 (ErRB2) for the treatment of prostate and breast cancer (Pintus JH, et al. Immuno-Gene Therapy of Established Prostate Tumors Using Chimeric Receptor-redirected Human Lymphocytes. Cancer Research. 2003; 63(10): 2470 - 6.). さらに、腫瘍細胞に対するより高い選択性を追求するために、T細胞は、同じ腫瘍細胞に発現される2つの異なる抗原を特異的に標的とする2つのCARを発現するように改変されたデュアルCAR T細胞を含むいくつかの戦略を通じて開発された (Kloss CC, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signalling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. Nat Biotechnol. 2013; 31(1): 71 - 5; Wilkie S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signalling. J Clin Immunol. 2012; 32(5): 1059 - 70.).

【0304】

分子クローニングおよび遺伝子工学

各 PAAV - CMV - CD28 - IL4、PAAV - CMV - GPI - IL4、および PAAV - CMV - PSMA (図32f) が、PAAV - CMV - GFPプラスミド (図3) を、pUC57 - CD28 - IL4プラスミド、pUC57 - GPI - IL4または pUC57 - PSMAプラスミドのいずれかと組み合わせることによって構築され、PAAV - Grp78 - GFPプラスミドを、pUC57 - CD28 - IL4プラスミド、pUC57 - GPI - IL4または pUC57 - PSMAプラスミドのいずれかと組み合わせて、PAAV - Grp78 - CD28 - IL4、PAAV - Grp78 - GPI - IL4、および PAAV - Grp78 - PSMAを構築した。

【0305】

新しいプラスミド; PAAV . CMV . MUC1 . CD28 . IL4、PAAV . CMV . MUC1 . GPI . IL4、PAAV . CMV . PSMA、PAAV . Grp78 . MUC1 . CD28 . IL4、PAAV . Grp78 . MUC1 . GPI . IL4、および PAAV . Grp78 . PSMAを、制限酵素消化およびライゲーションによって行い、TG1コンピテント E. coli に形質転換し、アンピシリンを含む2xYTトッパガー上に蒔いた。すべての構築物が、まず制限消化およびゲル電気泳動によって検証され、次にDNAシーケンス (MRC CSC Genomics Core Laborat

10

20

30

40

50

ory、英国)によって検証された。

【0306】

図31は、バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療のための発現プラスミド構築物の実施形態の概略図を示し、32aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、32bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、32cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、32dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-CD28・IL4発現プラスミドを表し、32eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1-GPI・IL4発現プラスミドを表し、32fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

10

【0307】

CD28、GPI、およびPSMA抗原の発現

10%のウシ胎児血清(FBS)を補充したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、L-グルタミン(2mM、シグマ)、ペニシリン(100単位/ml、シグマ)、およびストレプトマイシン(100mg/ml、シグマ)からなる完全培地中に各ベクター(1,000,000TU/細胞)により、12ウェルプレートに約60%コンフルエントなHEK293細胞を24時間インキュベートした。未処理の細胞を陰性対照として使用した。翌日、すべてのベクターを培養物から除去し、細胞を完全培地の単層として5%のCO₂の37℃の加湿インキュベーターで維持した。培地は2日ごとに更新した。

【0308】

形質導入後6日目に、細胞を細胞解離バッファー(Invitrogen)で回収し、洗浄バッファー(2%のFBSおよび0.1%のNaN₃を含むPBS)で洗浄し、Clear Back(ヒトFc受容体ブロッキング剤、MBL)で室温で20分間インキュベートした。その後、細胞をJohn Maher博士(英国キングス・カレッジ・ロンドン、英国)から提供されたHMF G2抗体または洗浄バッファーで4℃で一晩希釈したPSMA抗体(MBL)のいずれかとインキュベートした。翌日、細胞を洗浄バッファーで洗浄し、抗マウスIgG Alexa fluor 488結合二次抗体(Invitrogen)と室温で30分間インキュベートした。細胞を最終的に洗浄バッファーで洗浄し、FAC calibur Flow cytometer(BD Biosciences)にかけた。3連のウェルあたり少なくとも20,000個のゲート細胞について、平均蛍光強度を測定した。Flowjo(TreeStar)ソフトウェアを使用して、結果を分析した。

20

30

【0309】

形質導入後6日目のMUC-1・CD28、MUC-1・GPI、およびPSMA抗原発現

HEK293細胞は、10⁶TU/細胞のRGD標的化PAAV(RGD)または非標的化PAAV(NT)のいずれかによって形質導入された。図33は得られたデータを示す。未処理のHEK293細胞(Control)、および488個のみの二次抗体染色(Anti-488)を有する標的化PAAV形質導入-HEK293細胞を対照として示した。(A)CMVプロモーター駆動PAAVベクターによって形質導入されたHEK293細胞のMUC-1またはPSMA発現を表す。DEAE-デキストランを添加した。(B)DEAEデキストランが添加されていないCMVプロモーター駆動PAAVベクターによって形質導入されたHEK293細胞のMUC-1またはPSMA発現を表す。(C)DEAEデキストランが添加されていないGrp78プロモーター駆動PAAVベクターによって形質導入されたHEK293細胞のMUC-1発現を表す。

40

【0310】

安定した細胞株選択

細胞表面にMUC-1・CD28、MUC-1・GPI、またはPSMA抗原を発現する安定した細胞株を選択するために、ピューロマイシン耐性配列をPAAV-CMV-CD28-IL4、PAAV-CMV-GPI-IL4、PAAV-CMV-PSMA、P

50

AAV - Grp78 - CD28 - IL4、PAAV - Grp78 - GPI - IL4、およびPAAV - Grp78 - PSMAプラスミドに挿入した。

【0311】

図34は、安定した細胞株選択バクテリオファージ誘導CAR T細胞治療法のためのピューロマイシン耐性遺伝子を含む発現プラスミド構築物の概略図を示し、34aはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1 - CD28 - IL4発現プラスミドを表し、34bはCMVプロモーターによって駆動されるMUC1 - GPI - IL4発現プラスミドを表し、34cはCMVプロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表し、34dはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1 - CD28 - IL4発現プラスミドを表し、34eはGrp78プロモーターによって駆動されるMUC1 - GPI - IL4発現プラスミドを表し、34fはGrp78プロモーターによって駆動されるPSMA発現プラスミドを表す。

10

【0312】

新しいプラスミドは、制限酵素消化およびライゲーションによって行われ、TG1コンピテントE. coliに形質転換され、アンピシリンを含む2xYTトッブアガーに蒔いた。すべての構築物が、まず制限消化およびゲル電気泳動によって検証され、次にDNAシーケンス(MRC CSC Genomics Core Laboratory、英国)によって検証された。

【0313】

結果

20

MUC1またはPSMA導入遺伝子のいずれかをコードするPAAVベクターは、ヘルパーファージシステムを使用して産生された。これらの導入遺伝子産物は、PAAVによって形質導入された後、腫瘍細胞表面にディスプレイされる。MUC1およびPSMA抗原は、MUC1 - CAR T細胞およびPSMA - CAR T細胞によって特異的に認識される。

【0314】

本発明のファージミド粒子を使用して癌細胞を形質導入することができ、癌細胞が引き続いて養子移入されたT細胞の標的として使用するのに好適な方法で送達された抗原を安定にディスプレイすることを示すデータを本明細書に提示する。

【0315】

30

討論

標的PAAVベクターは、商業的および疾患細胞株の両方における遺伝子導入において、AAVPベクターよりも効率的であることを示唆する強力な証拠がある。内在化および遺伝子発現の両方のデータは、PAAVがAAVPよりも効率的であることを一致して示している。また、遺伝子導入において、それについてのAAVPを上回るDexとPAAVベクターとの間に強い相乗効果があることを示唆する証拠も提供されている。これらのデータは、PAAVがAAVPよりも優れていることを示唆しているが、PAAVベクターサンプルがヘルパーファージ汚染を含むとも考えなければならない。ベクター産生中の実験条件を最適化する努力にもかかわらず、ヘルパーファージの混入は(この場合、約1/10)避けられず、その小さなコートタンパク質上にRGDターゲティング配列をもディスプレイするので、形質導入を競合的に阻害する。これを考慮すると、内在化と遺伝子発現データは、RGD - PAAVの「真の」効能を非常に過小評価している可能性がある。さらに、内在化アッセイはシグナル検出のための細胞内ファージカプシドの染色を利用するため、PAAVの全体的なサイズ(および粒子当たりの利用可能なカプシドタンパク質)が小さいことは、内在化粒子の比例数が、TEMを用いてPAAV粒子と比較して2倍の長さであることを示しているAAVPの比例数と直接比較できないことを意味する。したがって、本発明の方法は、ヘルパーファージを除去するための精製工程(例えばFPLC)を含む。

40

【0316】

機械論的な洞察を提供することに加えて、将来の研究は、純粋なPAAVサンプルを使

50

用するすべての実験の複製を包含しなければならないことが不可欠である。特に、ファージミド誘導 r A A V 産生は、従来のトランスフェクションプロトコルと比較して、ヘルパーファージ汚染による競合阻害の減少及び複数倍高い r A A V 粒子の収率から大きく利益を得ることができる。

【 0 3 1 7 】

要約

哺乳動物細胞への遺伝子導入において非常に効率的なハイブリッドファージミドベクターが記載されている。これらのファージミド / A A V (P A A V) ベクターは非常に大きなクローニング能力を有し、哺乳動物細胞を標的としており、トランスフェクション試薬は必要でないことを意味する。このプラットフォームにより、治療用遺伝子治療に好適なベクターを産生することができる。このプラットフォームが養子 T 細胞移入治療または C A R T 細胞治療による標的化に好適な抗原を含む遺伝子を腫瘍細胞に送達することができるという証拠が提供されている。

10

【 0 3 1 8 】

実施例 1 1 - 小児 D I P G 細胞への T R A I L 遺伝子の誘導送達のための優れたファージミド / A A V ハイブリッドベクター。

【 0 3 1 9 】

サイトカインがアポトーシスによる細胞死の分化、増殖、活性化、または誘発として多様な機能を果たすため、遺伝子治療におけるサイトカインの使用が調査された。腫瘍壊死因子 (T N F) スーパーファミリーは、腫瘍細胞の死を誘発する能力があるため、興味深い分子のグループの 1 つである。F a s リガンド (F a s L)、C D 9 5 リガンド (C D 9 5 L)、および T N F を含む T N F スーパーファミリーのメンバーは、癌の生物学的治療のための重要な治療薬として同定されている。それらの投与は、異なる癌細胞でアポトーシスを誘発する可能性があるが、肝臓への重度の毒性を引き起こし、臨床におけるそれらの適用を妨げる。

20

【 0 3 2 0 】

全身毒性のジレンマを考えると、T N F スーパーファミリーの別のメンバーである T R A I L は、有望な癌の治療薬として上昇している。組換え T R A I L および T R A I L 受容体に対する抗体を使用した前臨床および初期臨床試験では、T R A I L が腫瘍細胞に対して優先的な毒性を示し、その抗腫瘍特性を保持しながら、正常な組織に対する毒性はほとんどまたはまったくないことが示されている。T R A I L は多くの組織に m R N A レベルで、主に脾臓、肺、および前立腺に構成的に存在し、ナチュラルキラー (N K) 細胞およびマクロファージなどの免疫システムの細胞によって主に発現される。

30

【 0 3 2 1 】

T R A I L は I I 型膜貫通タンパク質として合成され、システインプロテアーゼによってタンパク質分解的にも切断され得、分泌型 7 を生成する。T R A I L はホモ三量体として生物学的に活性であり、この特定のコンフォメーションはおそらくリガンド受容体複合体の架橋を促進し、それによりシグナル伝達強度を高めるため、膜結合コンフォメーションはより強力であると思われる。分泌型はそれほど強力ではないが、ホモ三量体の安定化および形成に役立つロイシンジッパーなどのモチーフに融合した細胞外ドメインを操作することによって、効果を高めることができる。

40

【 0 3 2 2 】

他の T N F スーパーファミリーのメンバーと同様に、T R A I L は、標的細胞 5、10 の表面にある架橋受容体分子との相互作用を通じてアポトーシスを誘発する。識別された 5 つの受容体がある：T R A I L R - 1 および R - 2 は、アポトーシスを引き起こす細胞質配列死ドメイン (D D) を含む死受容体であり、T R A I L R - 3、R - 4 およびオステオプロテグリンは、アポトーシス 5、6、10 を予防するデコイ受容体である。

【 0 3 2 3 】

ホモ三量体 T R A I L が死受容体に結合すると、受容体は三量体を形成し、アダプタータンパク質 F a s 関連死ドメイン (F A D D) を動員する。F A D D はイニシエーターカ

50

スパーゼ 8 または 10 を動員し、死誘発シグナル複合体 (DISC) を形成し、イニシエーターカスパーゼはタンパク質分解によって自動的に活性化される。活性化されたカスパーゼ 8 または 10 は、エフェクターカスパーゼ 3 を切断し、死の基質の切断および細胞死を引き起こす。代わりに TRAIL がデコイ受容体に結合する場合、FADD は動員されず、アポトーシスは誘発されない。TRAIL 誘発アポトーシスに抵抗性の細胞でも、TRAIL はネクロトーシス 11 を誘発することができる 11。TRAIL 受容体システムは、腫瘍を支える免疫細胞の直接的な殺傷を誘発することができ、NK 細胞でのその発現は、免疫システムが癌細胞を殺傷するために使用される重要なメカニズムである。

【0324】

組換え TRAIL または TRAIL 受容体に対するアゴニスト抗体を含む、TNF スーパーファミリーのアゴニストを送達するための現在の臨床試験は、残念なことに、不十分なアゴニスト活性および薬物の半減期のために、癌患者に臨床的利益をもたらすことができなかった。さらに、これらの薬物は、より強力な作用因子の全身送達が致命的な副作用を引き起こす可能性があるという懸念により、設計からのそれらの有効性が制限されることが多い。臨床結果を産生するのに最適な濃度で TRAIL を確実に送達するためには、TRAIL を選択的に標的にして癌細胞に輸送するための好適なベクターが必要である。

【0325】

ファージディスプレイベースの技術を使用すると、腫瘍組織で選択的に発現される受容体を標的として結合するリガンドをディスプレイするウイルスベクターを使用して、TRAIL を送達することができる。ほとんどの研究は、レトロウイルスおよびアデノウイルスなどの真核生物ウイルスが優れた導入遺伝子送達を提供するため、ベクターとしての使用に焦点を合わせている。しかしながら、哺乳類の細胞膜受容体に対する広い指向性により、全身遺伝子治療での成功は限られており、肝臓、細網内皮システム、および望ましくない組織による望ましくない取り込み、ならびに免疫原性をもたらす。対照的に、原核生物ウイルスは、哺乳動物細胞で使用するために天然の向性の除去を必要とせず、費用効率がが高く、高力価で容易に産生されるため、有利である。向性が欠如しているため、哺乳類細胞の形質導入 13 には本質的に弱い媒体である。しかしながら、選択的なリガンドペプチドモチーフをディスプレイするようにコートタンパク質を変更することによって、ファージを細胞内に取り込むことができる。

【0326】

全身毒性のない長期効果のための腫瘍のみへの治療の効果的な投与は、細菌ウイルス、バクテリオファージ、またはファージに基づくベクターを使用して達成することができる。これらのバクテリオファージベースのベクターは、それらのコートタンパク質上に選択的なリガンドペプチドモチーフをディスプレイするように操作することができ、標的細胞へのウイルス結合、およびその後の遺伝子 19 のリガンド指向送達のための内在化を可能にする。真核生物および原核生物のウイルスの好ましい生物学的特性を組み合わせることによって、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV)、および AAV / ファージまたは AAV P13 と名付けられた M13 由来線状ファージを含むキメラウイルスベクターが構築された。ファージの pIII コートタンパク質を操作して、二重環状ペプチド CDCRGDCFC (RGD - 4C、配列番号 7) をディスプレイし、これが、腫瘍および支持血管システムの両方において過剰発現された特異的 α_v インテグリン受容体 (α_v 3 または α_v 5) に結合する。これにより、標的プラットフォームとして優れたリガンド指向送達および治療的導入遺伝子の細胞形質導入が可能になり、これらの機能的特性は、前立腺、乳癌、および軟部組織肉腫を含むいくつかの癌の前臨床モデルで確認されている。

【0327】

本発明者らは、ファージミドシステムを使用して、ファージミド - AAV (PAAV) として知られる次世代ベクターを産生することによって、既知のベクタープラットフォームを改善した (図 43)。PAAV ベクターはキメラウイルスであり、AAV 血清型 2 の DNA 配列を使用して構築されたハイブリッドゲノムを含む M13 線状ファージである。対照となる遺伝子は、構成的に活性なサイトメガロウイルス、CMV プロモーターによっ

10

20

30

40

50

て調節され、完全長の逆方向末端反復配列（ITR）に隣接している。ファージミドはf1複製起点を含み、これは一本鎖複製およびファージ粒子へのパッケージング、ならびに標的細胞に入った後の二本鎖複製の複製起点に使用される。ウイルスベクターのクローニングおよび産生中に、アンピシリンを使用して選択することができる。

【0328】

このハイブリッドベクターモデルでは、ファージゲノムのほとんどが除去され、より長いDNA配列に対応することができるが、ヘルパーウイルスを使用してカプシドおよび他のファージ成分を提供する必要がある。RGD-4Cペプチドモチーフは、M13バクテリオファージのpIIIコートタンパク質上に最初にディスプレイされ、標的化骨格ヘルパーウイルスを産生する。次に、ヘルパーウイルスを使用して、操作されたファージミドを含むTG1 E. coli細菌を形質導入し、抗生物質による選択圧を使用して、ファージミドを含む標的ベクターの選択を行うことができる。新しいモデルは、より長いDNA配列に対応することができ、形質導入効率が高く、元のAAVPよりも高い力価で産生され得る。

【0329】

特定の理論に縛られることを望まないが、2つの方法により、変換効率をさらに向上させることができる。まず、RGD-4Cペプチドを操作して、pIIIコートタンパク質ではなくpVIIIIにディスプレイすることによって、メジャーコートタンパク質であるpVIIIIは最大2700コピーで発現されるが、pIIIはわずか最大5コピーで発現される。したがって、インテグリンの標的化および結合に利用可能なRGD-4Cリガンドの数が多いほど、細胞の結合および形質導入の効率が高いと考えられる。

【0330】

特定の理論に縛られることを望まないが、効率を高める別の戦略は、組換えpVIIIIコートタンパク質上のエンドソームエスケープペプチドであるヒスチジンリッチH5Wリガンドをディスプレイすることによるものである。エンドソームなどの細胞内障壁は、内在化の効率が高い場合でも、ベクターをトラップし、その治療効果を発揮しないようにすることによって、遺伝子発現の速度を制限する可能性がある。ヒスチジン側鎖は双性イオンを形成し、これが、プロトンスポンジとして作用し、ファージベクターのリガンド指向性エンドサイトーシスに続くエンドソームの低pHを緩衝することを可能にする。プロトンがエンドソームに入ると、水が液胞膜プロトンポンプを介してエンドソームに引き込まれ、エンドソームに細孔が形成され、それによってファージベクターが放出される。

【0331】

この研究の目的は、ベクターのコートタンパク質にディスプレイされるペプチドを変更することによって、DIPG細胞の最適な形質導入効率を有する優れたPAAVベクターを開発することであった。次に、最適なPAAVベクターを使用してTRAIL導入遺伝子を送達し、DIPGの治療における治療遺伝子としてのTRAILの有効性を評価した。

【0332】

特定の理論に縛られることを望まないが、発明者らは次のように仮定した：

1. 標的化の特異性および遺伝子導入の有効性は、pVIIIIコートタンパク質上のRGD-4Cリガンドまたは組換えpVIIIIコートタンパク質上のH5Wペプチドをディスプレイすることによって強化することができる。
2. TRAILは、インビトロ実験およびインビボ同所性DIPG動物モデルでDIPG細胞死を特異的に誘発する効果的な治療遺伝子である。

【0333】

研究の目的

1. 所望の遺伝子の最適な発現によりDIPG細胞を特異的に標的化するためのウイルスベクターを設計および産生する。

【0334】

2. DIPGに対する治療遺伝子TRAILの殺傷の可能性を評価および調査する
3. TRAIL発現をインビボでDIPGに標的化する特異性を評価し、同所性ヒトD

I P G が確立された免疫不全マウスにベクターを静脈内投与した後の治療効果を調査する。

【 0 3 3 5 】

プロトコル

細胞培養

H E K 2 9 3 T 細胞株を、10 % のウシ胎児血清 (F B S) ならびに1 % のペニシリンおよびストレプトマイシンを補充したダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) で維持した。D I P G 腫瘍細胞株は、サンジョアンドドゥバルセロナ病院から入手した。それらを、10 % の F B S を補充した腫瘍幹培地 (T S M) ベースで維持した。T S M は、提供されているレシピに従って作製されている (表 X X X) 。

【 0 3 3 6 】

インテグリン染色

D I P G 細胞を24ウェルプレートのポリ-D-リジン被覆カバースリップに播種し、60 ~ 70 % コンフルエントになるまで成長させた。5つのウェル：対照、二次抗体のみ、 α 、 β 、 γ 、および δ インテグリンを使用して染色した。細胞を洗浄し、4 % のホルムアルデヒドで室温 (R T) で10分間固定した。細胞をP B S で3回洗浄し、50 m M の塩化アンモニウムで5分間インキュベートした。細胞を再びP B S で3回洗浄し、2 % のウシ血清アルBUM (B S A - P B S) で30分間ブロックした。その後、細胞を1 % のB S A - P B S で希釈した一次抗体抗 α (1 : 1 0 0) 、抗 β (1 : 5 0) 、および抗 γ インテグリン (1 : 1 0 0) と共に1日間インキュベートし、4 $^{\circ}$ C の湿室に保存した。その後、細胞を1 % のB S A - P B S で3回洗浄し、二次A l e x F l u o r 4 8 8 結合抗体 (1 : 7 5 0) および4' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (D A P I 、 1 : 2 0 0 0) で1時間インキュベートした。カバーガラスを1 % のB S A - P B S で3回、P B S で3回、および滅菌水で1回洗浄した。風乾後、カバースリップをM o w i o l 封入剤に封入した。細胞を観察し、蛍光顕微鏡で画像を撮影した。

【 0 3 3 7 】

p V I I I コートタンパク質上にディスプレイされたR G D - 4 C リガンドによるヘルパーファージの産生、精製、および滴定 (図 4 4)

野生型M 1 3 ファージDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によってp V I I I コートタンパク質上でR G D - 4 C を発現するように改変した。P C R で使用されるプライマーは、このプロジェクトの開始前に同僚 (S a j e e W a r a m i t) によって設計された。T 4 DNA リガーゼ (N E B) を使用してP C R 産物を連結し、クローニングのためにD H 5 α 細菌に形質転換した。プラスミドは、M i n i p r e p (Q I A G E N) によって抽出され、制限消化およびゲル電気泳動によって検証され、次に、DNA 配列 (M R C C S C G e n o m i c s C o r e) の完全性を確保するためにシーケンスに送られる。次に、選択されるクローンをT G 1 コンピテントE . c o l i (Z y m o r e s e a r c h) に形質転換し、37 $^{\circ}$ C のインキュベーターで50 μ g / m l のカナマイシンを含む2 x Y T (S i g m a) 寒天に蒔いた。

【 0 3 3 8 】

コロニーが形成された後、単一のコロニーを選択し、1 L のカナマイシンを含む2 x Y T 培地で、振盪インキュベーター (32 $^{\circ}$ C 、 220 r p m) で18時間成長させる。一晚培養物を4 $^{\circ}$ C で30分間6000 g で遠心分離した。ファージ上清を回収し、20 % v / v のP E G / N a C l (20 % のP E G 6000、2.5 M のN a C l) を添加し、完全に混合した。冷蔵室で一晩インキュベートした後、上清を4 $^{\circ}$ C で30分間10000 g で再び遠心分離した。ファージペレットを16 m L のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) および20 % v / v のP E G / N a C l に再懸濁し、冷室で一晩保持した。最終的なファージ懸濁液を10,000 g で4 $^{\circ}$ C で30分間遠心分離し、上清を廃棄した。精製されたファージペレットを1 ~ 2 m L のP B S に再懸濁し (ペレットサイズに応じて) 、0.45 μ m のフィルターカートリッジにより滅菌ろ過した。

【 0 3 3 9 】

10倍増分の段階希釈を使用して滴定を実施した。ファージの各希釈液5 μ L を使用し

10

20

30

40

50

て、37°Cで30分間インキュベートすることによって、対数期(OD600 = 0.45 ~ 0.50)に成長したナイーブTG1 *E. coli* 500 µLに感染させた。インキュベーション後、37°Cのインキュベーター内で、100 µLの細菌を、カナマイシンを含む2 × YT寒天に一晩蒔いた。18時間のインキュベーション後の翌朝にコロニーを計数し、ウイルス力価を推定し、細菌形質導入単位(TU)として表した。

【0340】

レポーター遺伝子(緑色蛍光タンパク質[GFP]およびluciferase[luciferase])を含むRGD-pVIIベクターの産生、精製、および滴定(図45)

DIPG細胞の形質導入の効率を評価するために、レポーター遺伝子緑色蛍光タンパク質(GFP)およびluciferase(InvivoGen)を含むファージミドを含むベクターを構築した。GFP発現は蛍光顕微鏡で検出することができるが、luciferaseは分泌型ルシフェラーゼであり、これは相対ルシフェラーゼユニット(RLU)を測定することによって、その基質Quantiferon-Gloで定量化することができる。以下のプロトコルでは、PAAV-GFPプラスミドまたはPAAV-luciferaseプラスミドを使用する。

【0341】

最初にプラスミドをTG1コンピテント*E. coli* (Zymo research)に形質転換し、37°Cのインキュベーターで一晩、50 µg/mlのアンプシリンを含む2 × YT(Sigma)寒天に蒔いた。コロニーが形成された後、単一のコロニーを選択し、振盪インキュベーター(32°C、220 rpm)でアンプシリンを含む2 × YT培地で成長させる。100 mLの細菌を対数期まで増殖させ(OD600 = 0.45 ~ 0.50)、その後15 ~ 20 µLのRGD-pVIIヘルパーファージを添加し、振盪インキュベーター(32°C、150 rpm)でインキュベートする。次に、細菌を、振盪インキュベーター(32°C、150 rpm)で18時間、カナマイシンおよびアンプシリンを含む1 Lの2 × YT培地で成長させる。以前の調査に従って、精製を実施した。レポーター遺伝子ベクターおよびヘルパーファージの力価をそれぞれ推定するために、アンプシリンのみを含む2 × YTおよびカナマイシンのみを含む別のプレート上に細菌を成長させることによって、滴定を実施した。

【0342】

レポーター遺伝子(luciferase)を含むH5WペプチドRGD-pVIIベクターの産生、精製、および滴定

H5W RGD-pVIIヘルパーファージは、このプロジェクトの開始前に同僚(Sajeewaram)によって産生された。産生は、H5W RGD-pVIIベクターを選択するために1 mMのイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)も添加されたことを除いて、前述のプロトコルとほぼ同様であった。以前の調査に従って、ベクターの精製と滴定を実施した。

【0343】

ベクターの細胞への形質導入

形質導入に使用される細胞(HEK293TまたはDIPG)は、60 ~ 70%コンフルエントになるまでプレートに播種された。その後、培地を除去し、細胞をOptiMEMで希釈したベクターと一晩インキュベートし、ベクターの量は、滴定から得られたウイルス力価に基づいている。次に、形質導入培地を除去し、完全な培地と交換する。GFPで形質導入された細胞については、指定された時点で蛍光下で細胞を観察し、GFPを発現する細胞を探すために画像を撮影する。luciferaseで形質導入された細胞については、指定された時点で、10 µlの細胞培地および25 µlのluciferaseの基質であるQuantiferon-Glo(InvivoGen)を、白いポリスチレン96ウェルプレートで混合し、次に、室温で5分間インキュベートした。Promega GloMaxマイクロプレートリーダーを使用して、ルシフェラーゼ発現を定量化した。

【0344】

DIPGに対する治療遺伝子TRAILの殺傷の可能性を評価および調査する

トランスフェクション用のPAAV-ヒトTRAIL(hTRAIL)プラスミドの産

10

20

30

40

50

生 (図 4 6)

P A A V - G F P プラスミドの G F P 配列を、P C R によって h T R A I L 遺伝子配列に置き換えた。特定のプライマーを使用して、p U N O 1 - h T R A I L (I n v i v o G e n) をクローニングすることによって、h T R A I L 遺伝子を増幅し、末端に E c o R I および S a l I の制限部位を含むように設計した (表 1)。以前の調査に従って、分子クローニング、プラスミド抽出、および D N A 配列の検証を実施した。選択されるクローンを増幅のために T G 1 細菌に形質転換し、次に、M a x i p r e p (Q I A G E N) で抽出した。

【 0 3 4 5 】

【 表 1 】

表 1 : p U N O 1 - h T R A I L および P C R を使用して、制限部位 (E c o R I / S a l I) を有する h T R A I L フラグメントを産生するために使用されるプライマー配列 (I n v i t r o g e n)

フォワードプライマー 5' - 3'
GAG TGA ATT CGC TGT GAC CGG CGC CTA C - 配列番号 24
リバースプライマー 5' - 3'
GCT CGT CGA CTC ATG TCT GGC CAG CTA GCT TAG CC - 配列番号 25

【 0 3 4 6 】

細胞へのプラスミドのトランスフェクション

D I P G 細胞を 4 8 ウェルプレートに 6 0 ~ 7 0 % コンフルエントになるまで播種した。実験を開始する前に、細胞を O p t i M E M 低血清培地で 1 ~ 2 時間インキュベートした。4 8 ウェルプレートについては、F u G E N E H D トランスフェクションプロトコル (P r o m e g a) は、0 . 5 ~ 2 . 0 m l の培地容量、0 . 6 ~ 1 . 8 μ l の F u G E N E 容量、0 . 2 ~ 0 . 6 μ g の D N A 量を目指すことを推奨する。トランスフェクション効率は、F u G E N E と D N A との比率に依存し、この場合、3 : 1 の比率が使用される。

【 0 3 4 7 】

エッペンドルフチューブを準備し、実験で使用するために標識化した。使用される F u G E N E の容量に応じて、O p t i M E M を各チューブに最大 2 0 μ l 添加した。次に、F u G E N E をプラスチックチューブの壁と接触することなく培地に直接添加し、混合物を R T で 5 分間インキュベートする。プラスミド D N A をチューブに添加し、トランスフェクション試薬 : D N A 複合体を R T で 1 5 分間インキュベートする。次に、この複合体をドロップ方式で D I P G セルに加え、プレートを旋回させて均一な分布を確保する。細胞を 3 7 ° C で 6 時間インキュベートした後、トランスフェクション培地を、抗生物質を含まない F B S を補充した T S M 培地と交換した。インキュベーター内で細胞を交換し、次の 2 4 ~ 4 8 時間で細胞の生存率を観察する。

【 0 3 4 8 】

結果

D I P G 細胞は、R G D - 4 C リガンド結合のためにインテグリン受容体を発現する標的遺伝子送達のためのこの細胞株におけるこのベクターモデルの適合性を確立するために、蛍光顕微鏡の手段によって、インテグリン $\alpha 3$ および $\alpha 5$ の発現について、最初に細胞を調査した。図 4 7 に示されるように、試験した D I P G 細胞は、 $\alpha 3$ 、および $\alpha 5$ ユニットの発現が陽性であり、抗体または二次抗体のみなしでインキュベートした細胞では蛍光は観察されなかった。

【 0 3 4 9 】

p I I I コートタンパク質にディスプレイされる R G D - 4 C リガンドは、p V I I I コートタンパク質よりも高い形質導入効率および遺伝子発現レベルをもたらした

発明者の実験室からの以前のデータは、標的 R G D - 4 C p I I I ベクター媒介遺伝子送達および発現が、非標的ベクターと比較して選択的かつ効率的であることを示した。

10

20

30

40

50

形質導入を最適化するために、仮説のうちの1つは、ファージあたりのリガンドのコピー数を増やすために、pVIIIコートタンパク質上にRGD-4Cをディスプレイすることであった(図48)。

【0350】

レポーター遺伝子ベクター(GFPまたはlucia)を使用して、ファージベクターを特徴付けるために継続的に使用された細胞モデルであるヒト胎児腎臓細胞HEK293Tを使用して、形質導入効率を比較した。細胞を非標的ベクター(RGD-4Cを欠く対照)、標的RGD pIII PA AV - GFPまたはRGD pVIII PA AV - GFPベクターと共にインキュベートし、蛍光顕微鏡下で観察した(図49)。すべてのTUにわたって、RGD pIII PA AV - GFPで形質導入された細胞において、最も高いGFP発現が見られた。

10

【0351】

同様に、非標的RGD pIII PA AV - luciaまたはRGD pVIII PA AV - luciaベクターで形質導入されたHEK293T細胞では、RGD pIII PA AV - luciaにおいて最も高いRLUが観察されている(図50)。これは、pIIIにディスプレイされたRGDが、形質導入および遺伝子発現においてpVIIIよりも優れていることを示唆した。

【0352】

組換えpVIIIコートタンパク質にディスプレイされるH5Wペプチドは、形質導入効率および遺伝子発現を改善する

20

ベクターを最適化する別の戦略は、組換えpVIIIコートタンパク質上にH5Wペプチドをディスプレイすることであった。実験室からの以前のデータは、レポーター遺伝子luciaを含むベクターを使用した形質導入実験(Sajee Waramit、未公開データ)において、RGD pIII単独と比較して、H5WペプチドのディスプレイがHEK293T細胞でルシフェラーゼ発現を増加させることを示した(図51)。

【0353】

この発見をDIPG細胞に適用することができるかどうかを調べるために、DIPG細胞を非標的RGD pIII PA AV - luciaまたはH5W RGD pIII PA AV - luciaベクターと共にインキュベートした。HEK293Tデータと一致して、DIPG細胞において最も高いRLUは、H5W RGD pIII PA AV - luciaで観察される(図52)。これは、H5WペプチドがDIPG細胞のベクター効率を改善することができ、最終ベクター構築物で使用されるべきであることを示唆した。

30

【0354】

PA AV - hTRAILプラスミドのDIPG細胞へのトランスフェクションは細胞死を誘発した

ベクターの最適化後、さらに実験を行う前に、選択される対象となる遺伝子であるヒトTRAIL(hTRAIL)がトランスフェクションを介してDIPG細胞の細胞死を誘発することができるかどうかを決定することが不可欠であった。

【0355】

DIPG細胞を、PA AV - hTRAILまたは対照PA AV - GFPプラスミドのいずれかでトランスフェクトした。すべてのDNA濃度でトランスフェクションの18時間後に撮影された顕微鏡画像によると、PA AV - hTRAILでトランスフェクトされた細胞では、細胞死が有意に多かった(図53)。

40

【0356】

討論

特定の理論に縛られることを望まないが、データはこれまでのところ、pIIIコートタンパク質上でH5WおよびRGD-4Cを発現するベクターがDIPG細胞での所望の遺伝子の標的化および発現の誘発において最も最適であったことを示している。トランスフェクション実験からのデータは、治療遺伝子TRAILがDIPG細胞死を誘発することができることも示唆しているため、さらなる調査が必要である。

50

【 0 3 5 7 】

実施例 1 2 - ハイブリッド I L 2 - T N F a

腫瘍部位内の T N F a の標的局所領域産生を増加させるために、本発明者らは、I L - 2 からシグナルペプチドを挿入して膜貫通ドメインを欠く T N F a 配列に先行することによって、分泌型 T N F a をコードするファージミドを構築した。発明者の知る限り、これはハイブリッド I L 2 - T N F a が設計された初めての例であり、それらのデータは、I L 2 シグナルペプチド配列を有する T N F a 遺伝子に先行して癌細胞における T N F a の発現および分泌を著しく増強したことを示唆している。そのような改変は、腫瘍微小環境における T N F a の標的化された産生および放出に利用可能な技術の著しい進歩を表し、T N F a の治療レベルを増加させるために考慮されるべきである。

10

【 0 3 5 8 】

プロトコル

P A A V . G r p 7 8 . I L - 2 S P . h T N F a の構築

ファージミドに挿入されたコーディング治療配列は、グルコース調節タンパク質 (G r p 7 8) の腫瘍特異的プロモーター、I L - 2 からのシグナルペプチド (S P) 配列 (図 5 7)、および T N F a のヒト配列を含むハイブリッド配列である。G r p 7 8 プロモーターはストレス誘発性であり、グルコース欠乏、慢性無酸素症、および酸性 p H の条件によって強力に活性化され、攻撃的で灌流不良の腫瘍内に存続する。さらに、G r p 7 8 プロモーターは多種多様な腫瘍で誘発されるため、遺伝子治療での使用に魅力的な候補となっている。以前の研究では、このプロモーターがウイルスのプロモーターよりも優れている点がいくつか実証されている。このプロモーターの安全性および腫瘍特異性がまた、L a c Z 導入遺伝子を保有するトランスジェニックマウスでもエレガントに報告されている。これらのトランスジェニックマウスで確立された腫瘍では高い L a c Z 発現が示されたが、主要な正常組織ではプロモーター活性は検出されなかった。さらに、遺伝子治療ベクターで使用されるウイルスプロモーターとは異なり、G r p 7 8 などの哺乳動物プロモーターは真核細胞ではサイレンシングされない。発明者の以前に発表された研究において、彼らは、二重標的 R G D 4 C / ファージ - G r p 7 8 がサイトメガロウイルス C M V プロモーターを保有する R G D 4 C / ファージ - C M V よりも持続的な導入遺伝子発現を提供することを報告した。R G D 4 C リガンドおよび G r p 7 8 プロモーターの両方を含めると、細胞侵入レベルおよび転写レベルの両方を標的とするデュアル腫瘍を有するベクターが生成される。

20

30

【 0 3 5 9 】

T N F は膜貫通型であり、腫瘍細胞の細胞表面でその受容体をより利用しやすい分泌型 T N F を生成するために、T N F の膜貫通ドメインを除去し、インターロイキン 2 (I L - 2) のシグナルペプチドで置き換えることによって、分泌型 T N F を生成した。I L - 2 は以前、様々な研究で試験された有効なシグナルペプチドとして使用され、他のサイトカインまたは成長因子の細胞外環境への分泌を促進し、その後、それらの対応する受容体の有効性および可用性を高めた。B a m H I および E c o R I 制限部位に隣接する I L - 2 シグナルペプチド配列 (T h e r m o s c i e n t i f i c 、英国) を P A A V . G r p 7 8 骨格に連結した。E c o R I および S a l I 制限部位に隣接する h T N F 配列は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって p U N O 1 - h T N F プラスミド (I n v i v o g e n 、フランス) から提供され、その後、P A A V . G r p 7 8 . I L - 2 骨格に連結された。制限酵素消化 (N E B 、英国) およびライゲーション用のクイック T 4 DNA リガーゼ (N E B 、英国) を使用して、分子クローニング工程を行った。改変されたプラスミドを T G 1 コンピテント E . c o l i に形質転換した (Z y m o r e s e a r c h 、米国) 。次に、2 x Y T 寒天プレート上でのアンピシリン選択によって、プラスミドを保持する細菌を選択した。構築物は、制限消化およびゲル電気泳動、および DNA シーケンス (M R C C S C G e n o m i c s C o r e L a b o r a t o r y 、英国) によって検証された (図 5 8 参照) 。

40

【 0 3 6 0 】

50

実施例 13 - D I P G における P A A V 送達 T N F サイトカイン遺伝子治療の適用 序論

びまん性内在性橋グリオーマ (D I P G) は、2 年後の生存率がわずか 6 ~ 1 0 % の小児にのみ発生する最も攻撃的な脳腫瘍である。そのびまん性および脳幹内のその繊細な位置のため、外科的切除は不可能であり、この種の癌に対する効果的な治療戦略はない。D I P G に対する現在の標準治療は放射線療法であり、放射線増感剤と組み合わせても、すべての小児がその後再発するため、いかなる成功も示していない。多くの臨床試験では、化学療法の効果を従来の放射線療法と組み合わせる試験したが、高用量の化学療法薬を組み合わせただけの場合でも、全生存期間の延長に関して改善はない。化学療法に対するこの抵抗性は、無傷の血液脳関門なたに橋内の D I P G の解剖学的位置により、任意の薬物が標

10

【 0 3 6 1 】

D I P G に対する標的療法は、その拡散性および繊細な位置のために最良の解決策と思われる。D I P G 腫瘍を標的とする試みにおいて、健康な脳細胞を温存する癌細胞に選択的に結合することが知られている 8 H 9 抗体で放射性物質 12 4 I を標識することにより、標的放射線の概念を適用する進行中の臨床試験 (c l i n i c a l t r i a l s . g o v I D N C T 0 1 5 0 2 9 1 7) [8] 。我々のグループ (H a j i t o u の実験室) によって示唆され、膠芽腫で高い選択性を示した脳腫瘍を標的とするもう 1 つの候補は、第 3 章で論じられる R G D 4 C ペプチドの結合によるインテグリン v 3 および v 5 である。実際、D I P G を標的とする R G D 4 C は、現在進行中の第 I 相臨床試験で使用されている (c l i n i c a l t r i a l s . g o v I D N C T 0 3 1 7 8 0 3 2) 。この試験では、腫瘍溶解性アデノウイルス D N X 2 4 0 1 を使用して腫瘍細胞を標的とし、細胞死を誘発する。D I P G に対する 3 0 件の進行中の臨床試験の中で、大半は様々な薬物および放射線療法の試験に焦点を当てており、遺伝子治療を含む他の治療法はまだ適用されていない。T N F は、アポトーシス、壊死、および免疫細胞の活性化を媒介することによるその抗癌特性で知られる炎症性サイトカインである。細胞の状況に応じて、細胞の増殖および血管新生も誘発することができる。その抗腫瘍活性は、結腸癌、食道腺癌、黒色腫、膵臓癌、および他の多くを含む多くの固形腫瘍で研究されている。しかしながら、治療薬としての効率は、全身に導入された場合のその重大な毒性のために非常に制限されていた。これは、軟部肉腫、黒色腫、および四肢切断を回避するために孤立した四肢灌流 (I L P) の形で四肢に限定された他の切除不能な腫瘍に使用される癌の治療薬としての臨床における T N F の臨床使用を制限した。実際、T N F は、V E - カドヘリンを破壊する腫瘍血管システムを標的とすることにより、インビボで化学療法薬と相乗的に作用し、したがって腫瘍環境への化学療法薬の浸透を増加させる。したがって、T N F の治療効果を高めるには、全身毒性の制限を克服する努力が必要である。T N F の突然変異型を作製することによって、T N F の毒性を低減し、さらにその抗腫瘍活性を保持するための 1 つの戦略が作製された。この変異型 T N F は、シグナル伝達ペプチド R G D 4 C によって腫瘍環境をさらに標的とし、肝癌および肉腫同種移植における化学療法薬の効率を高めた。

20

30

40

【 0 3 6 2 】

D I P G に対するインビトロ研究は非常に限られており、研究に利用できるヒト組織はほとんどなく、この破壊的な種類の脳腫瘍の理解が制限されている。化学療法薬および放射線療法以外の治療への適用も、インビトロでの適および理解が不足しているために妨げられている。したがって、本発明者らは、D I P G に対する T N F の 2 つの形態、膜貫通 (t m T N F) 、および分泌型 (s T N F) の治療効果を調査した。T N F は、

50

シグナル伝達ペプチド R G D 4 C によって標的化された P A A V を使用して、細胞に発現および送達される遺伝子治療の形態で使用された。特定の理論に縛られることを望まないが、腫瘍部位への治療遺伝子送達ビヒクルとして R G D 4 C 標的化 P A A V の使用は、D I P G の治療のためのより安全で選択的かつ効率的な遺伝子導入を保証するであろう。

【 0 3 6 3 】

T N F によって誘発される細胞死のメカニズムを理解するために、本発明者らは、2つの異なる形態の T N F 、 t m T N F 、および s T N F を保有する P A A V の形質導入に反応した生存率およびアポトーシス活性を研究した。カスパーゼ 3 / 7、カスパーゼ 8、およびカスパーゼ 9 の活性を測定することによって、アポトーシス活性を決定した。

【 0 3 6 4 】

最後に、遺伝子治療の強化における化学療法薬のシスプラチンの効果を研究した。したがって、T N F の上流の2つの異なるプロモーター、G R P 7 8 および C M V を使用して、シスプラチンによる遺伝子治療の相乗効果を理解した。G R P 7 8 および C M V プロモーターの制御下にある l u c i a レポーター遺伝子は、シスプラチン治療後の遺伝子発現の定量分析に使用され、遺伝子発現の増強におけるシスプラチンの役割をさらに理解している。

【 0 3 6 5 】

結果

膜貫通型 t m T N F および分泌型 s T N F 導入遺伝子を保有する P A A V による D I P G の形質導入：

膜貫通 T N F 遺伝子および分泌型 T N F は、P A A V ベクター、P A A V - t m T N F および P A A V - s T N F (実施例 1 2 に示されるベクターを含む) にクローン化され、続いて標的ウイルス (R G D 4 C) および非標的ウイルス (M 1 3 / 対照) の産生が行われた。D I P G 細胞を形質導入し、形質導入後 7 日目に細胞生存率を測定した。4 0 n g / μ g のファージタンパク質 D E A E デキストランにより、形質導入効率がさらに向上した。D I P G 細胞は、P A A V - t m T N F と比較して、細胞死の誘発において P A A V - s T N F に対してより良好な反応を示し、前者は、図 5 9 に示される膜貫通型によって誘発された 2 0 % のみの細胞死と比較して、7 日目に約 5 0 % の細胞死を示す。併せて、これらのデータは、s T N F が D I P G の治療に対する良好な候補であることを示唆している。

【 0 3 6 6 】

P A A V による形質導入後の遺伝子送達および T N F 発現：

形質導入後の m R N A レベルを測定することによって、P A A V 遺伝子送達の効率を評価した。図 6 0 A に示されるように、非標的 (M 1 3) 型は標的化 P A A V (R G D 4 C) と比較して、T N F の無視できる m R N A 発現を示すため、T N F の両方の形態は形質導入細胞において高い特異性で発現された。タンパク質レベルでは、P A A V - t m T N F の形質導入は、E L I S A によって検出されたように、培地中の T N F の分泌を引き起こさなかった (図 6 0 B)。両方の形態での形質導入は m R N A レベルで T N F

発現を示すが、分泌型形態のみが T N F タンパク質のレベルに関連していた。これはさらに、導入遺伝子の形質導入が効率的であることを確認し、膜貫通型による細胞死の誘発の非効率性は可溶性分泌タンパク質の欠如によるものであることを示唆し得る。初期の膜結合型からの s T N F の放出には、酵素活性または T N F 変換酵素 (T A C E) の発現が必要である。したがって、T A C E 酵素の発現はウエスタンブロットによって測定され、他の小児脳腫瘍細胞 (髄芽腫) と比較された。T A C E 酵素の D I P G 発現は、U W 2 2 8 の発現レベルよりも 4 倍低く、D a o y 細胞の発現レベルよりも 2 倍低かった。

10

20

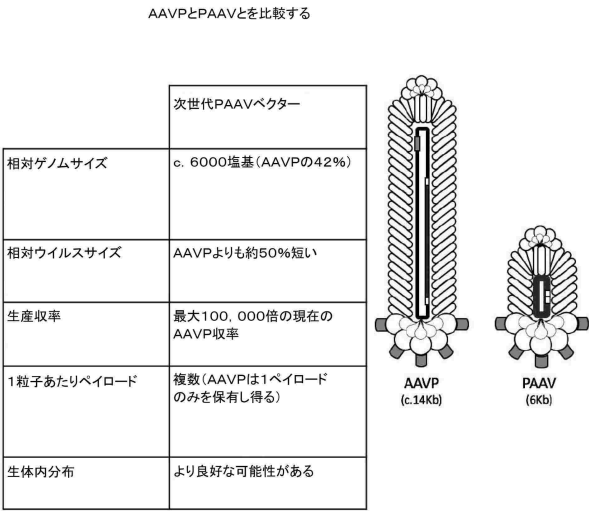
30

40

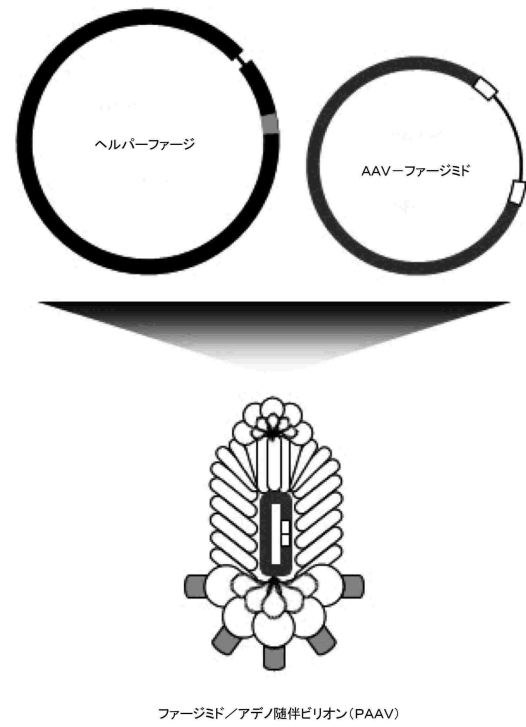
50

【図面】

【図 1】



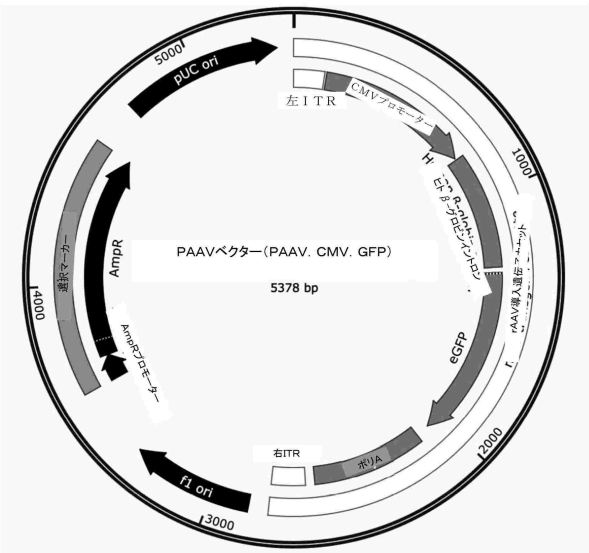
【図 2】



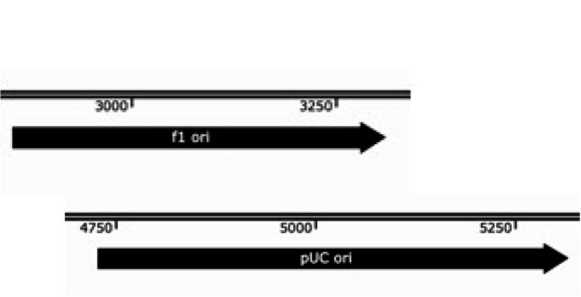
10

20

【図 3】



【図 4】

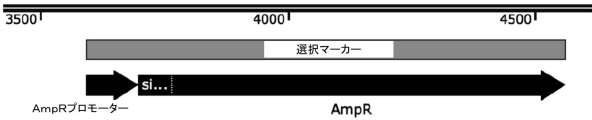


30

40

50

【図 5】



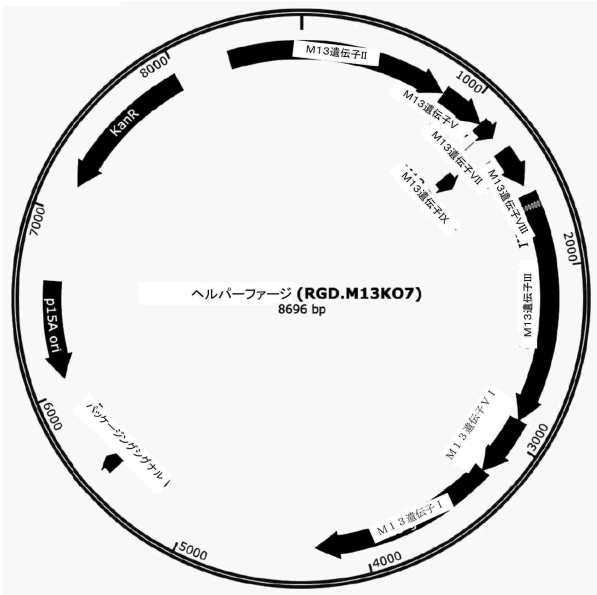
【図 6】



10

20

【図 7】



【図 8】

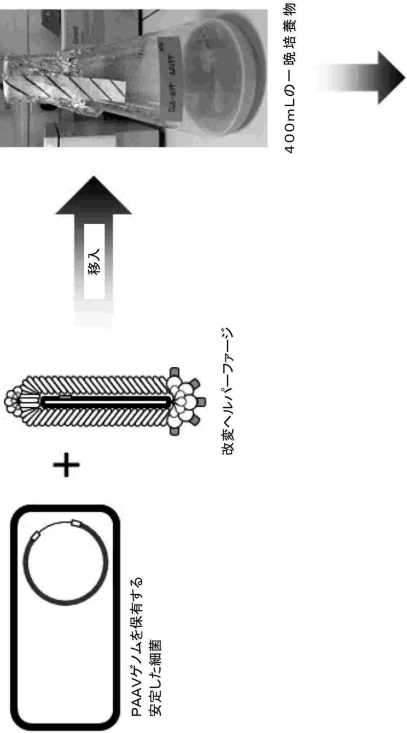
tatttcactccgctTGTATTGTAGGGGGATTGTTTTGTgaacctgttgaagtt	
ataagagtgaggcgAACACTAACATCCCCCTAACAAAAACACactttgacaacttcaa	
15	Y S H S A C D C R G D C F C E T V E S
20	
25	
30	
	RGD4C経路ペプチド
	M13遺伝子III

30

40

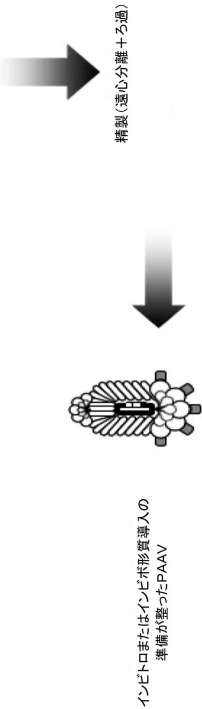
50

【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

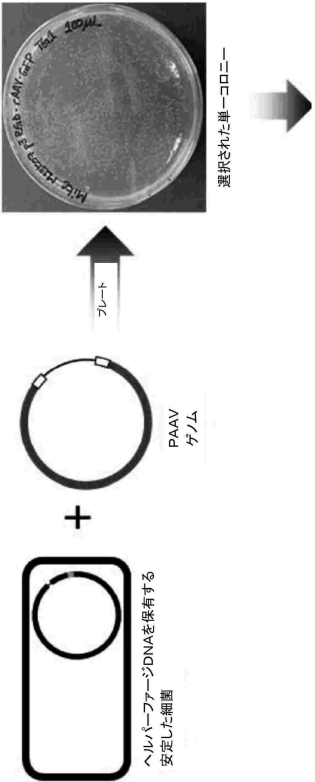
図 9（続き）



10

20

【図 10 - 1】



【図 10 - 2】

図 10（続き）



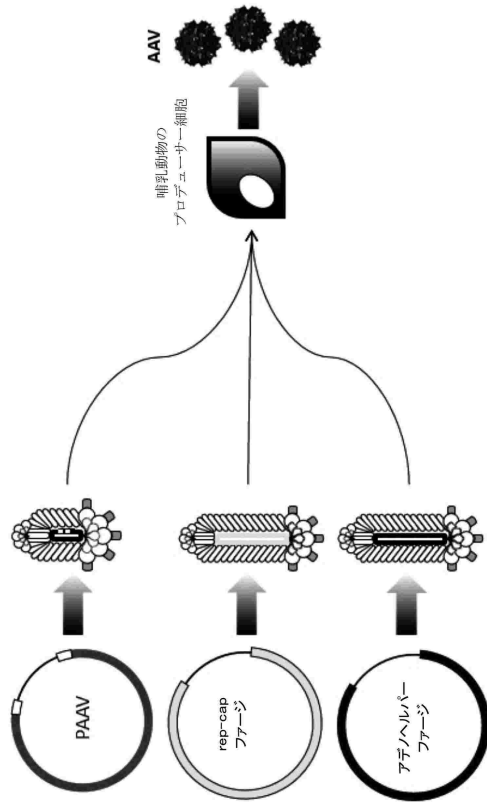
30

40

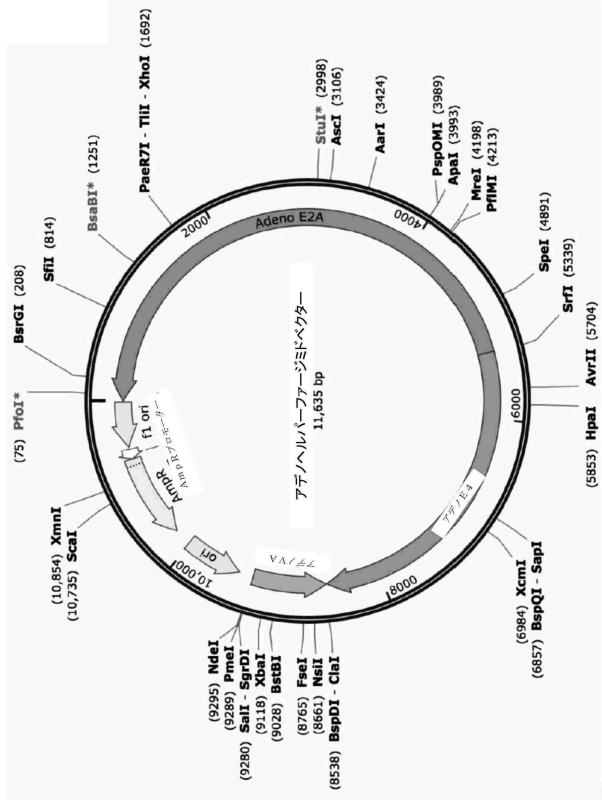
50

【図 1 1】

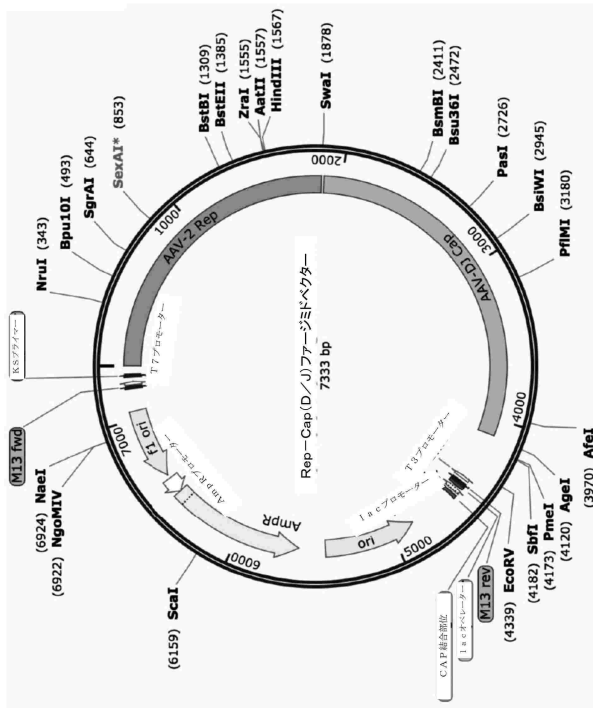
ファージミミト誘導 rAAV 産生方法論



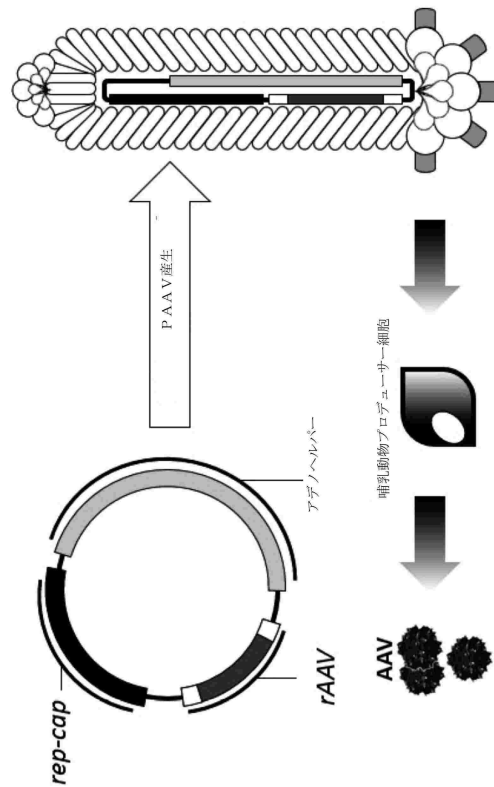
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

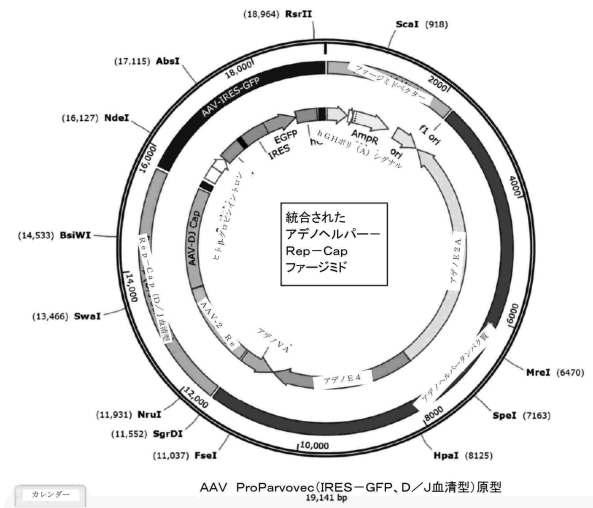
20

30

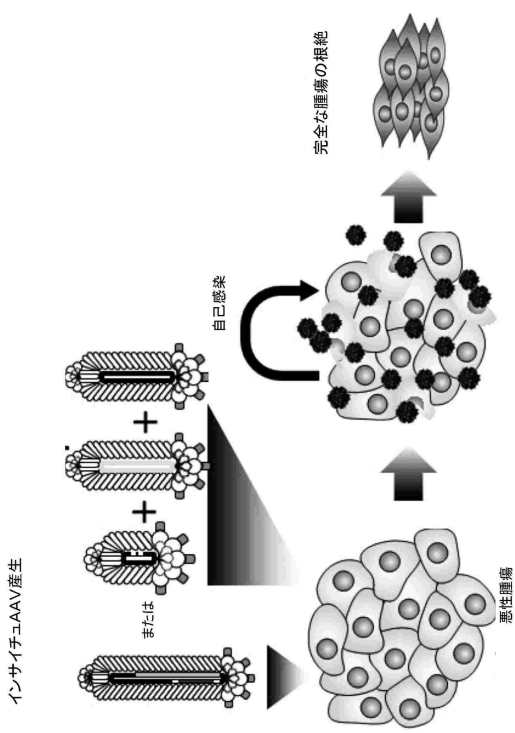
40

50

【図 15】



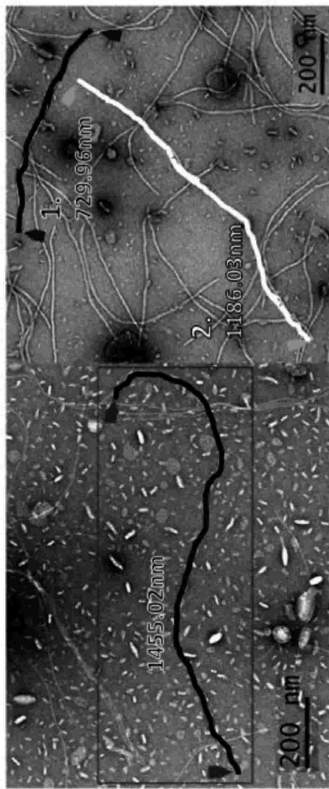
【図 16】



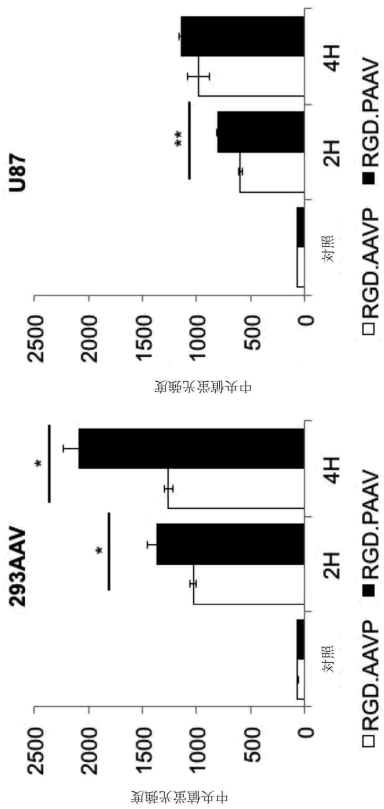
10

20

【図 17】



【図 18】

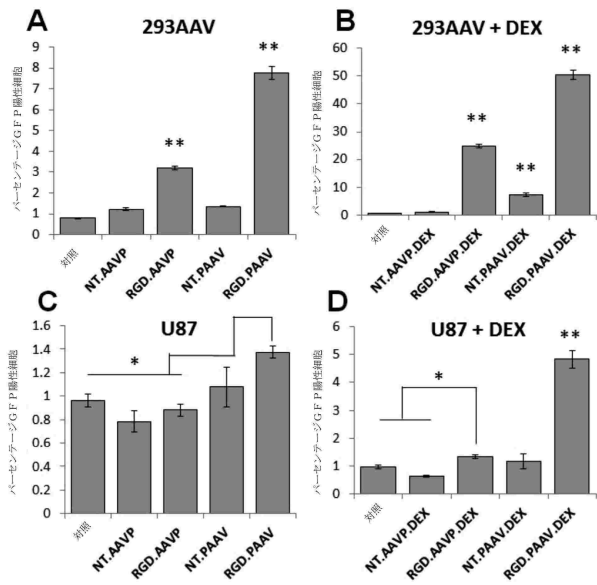


30

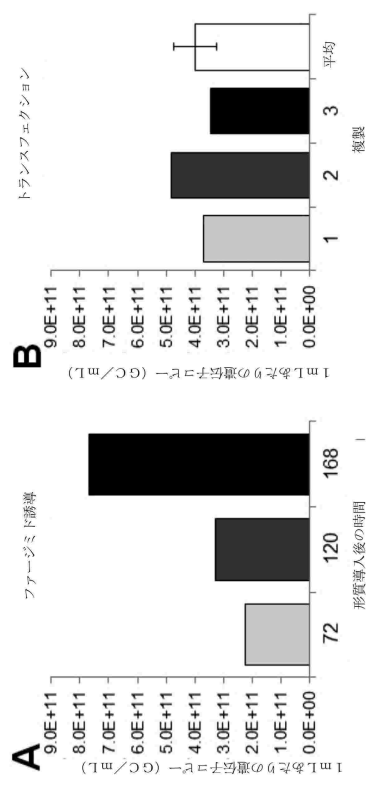
40

50

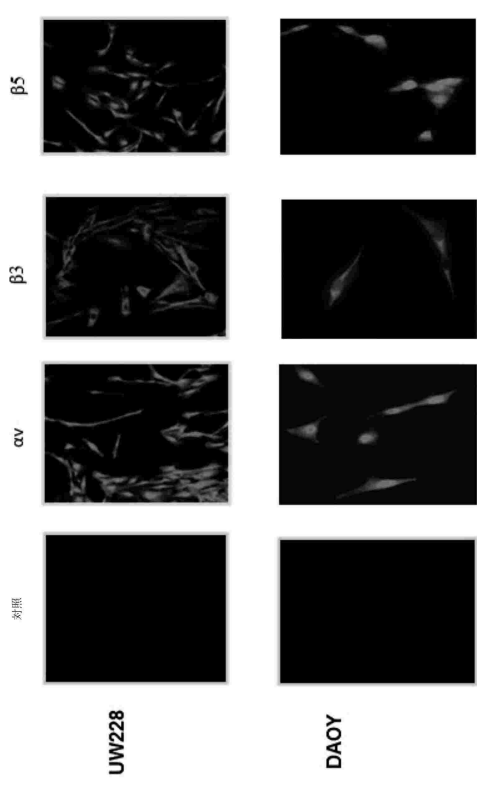
【図 19】



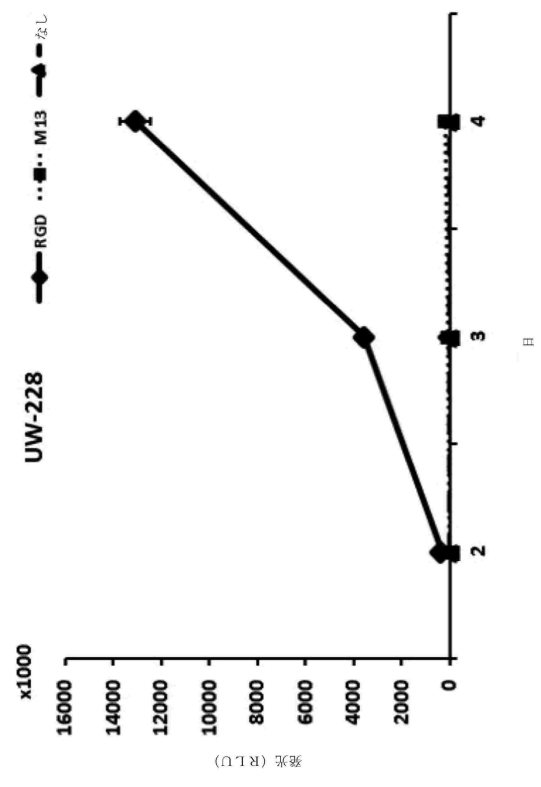
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

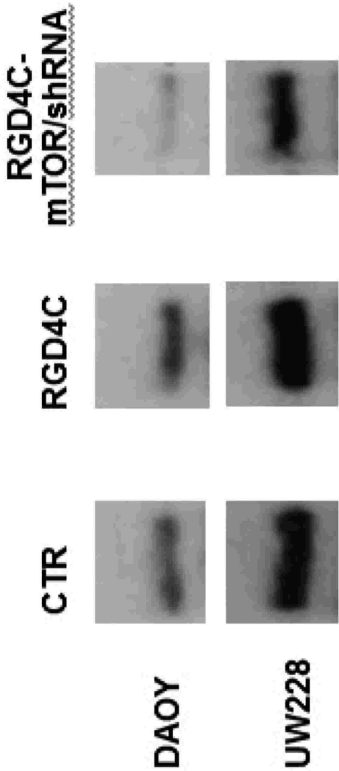
20

30

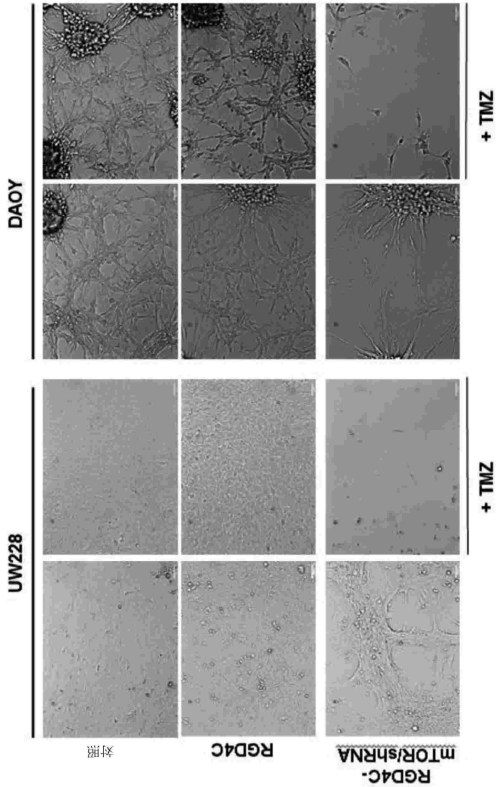
40

50

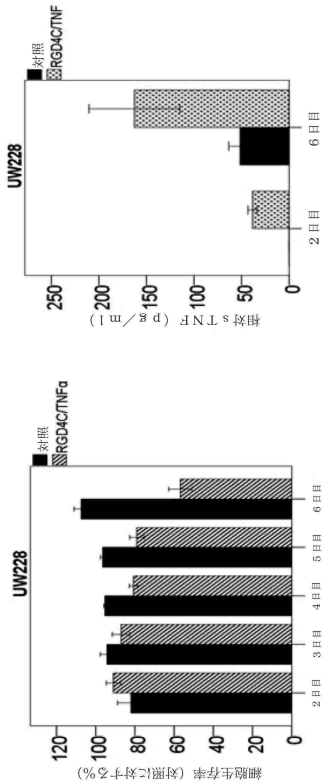
【図 2 3】



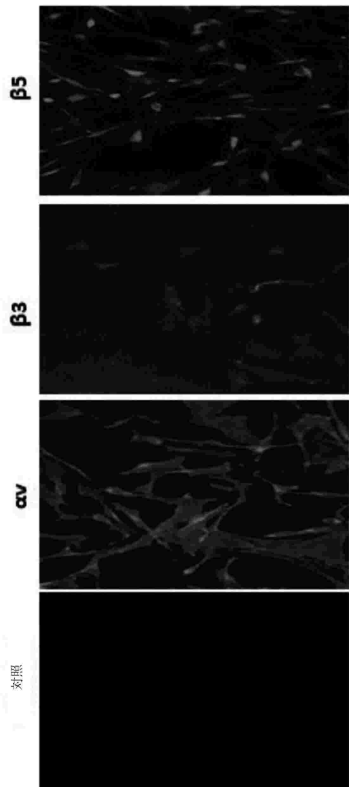
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

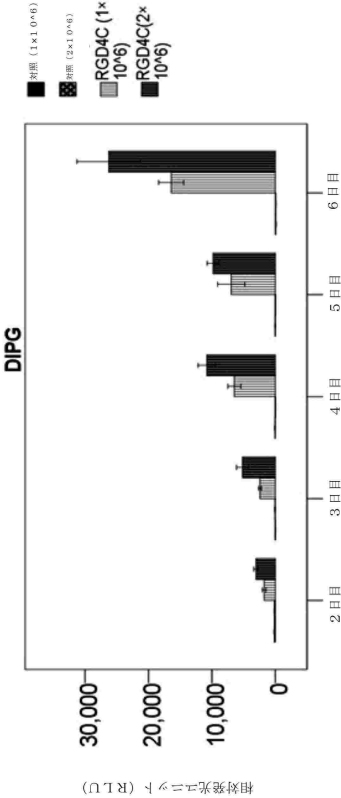
20

30

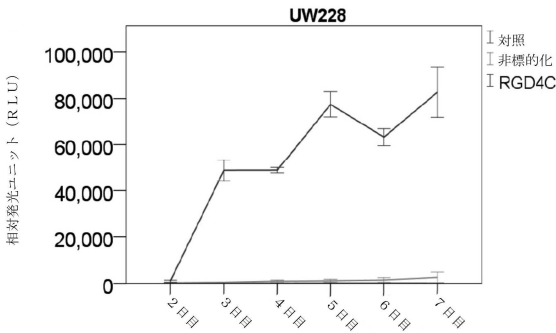
40

50

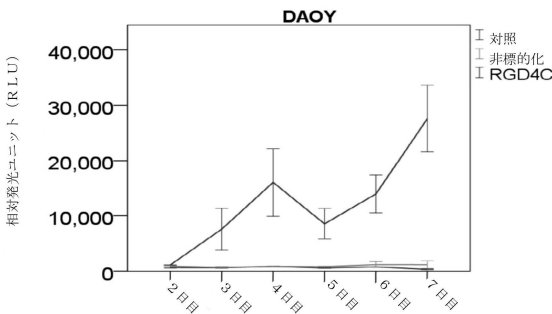
【図 2 7 A】



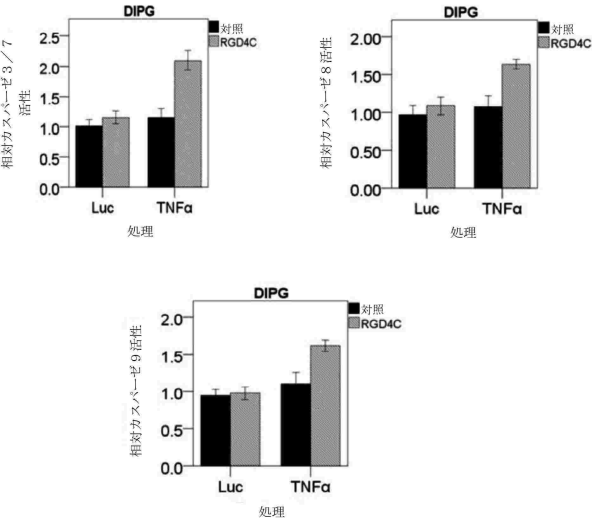
【図 2 7 B】



【図 2 7 C】



【図 2 8 - 1】



10

20

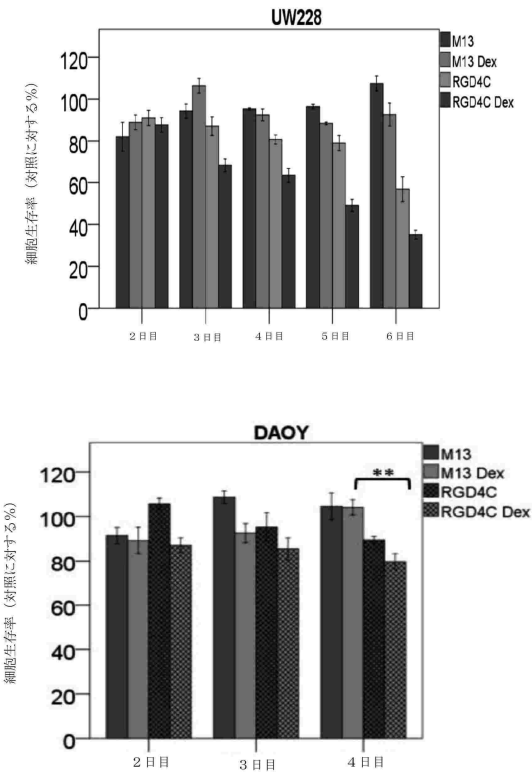
30

40

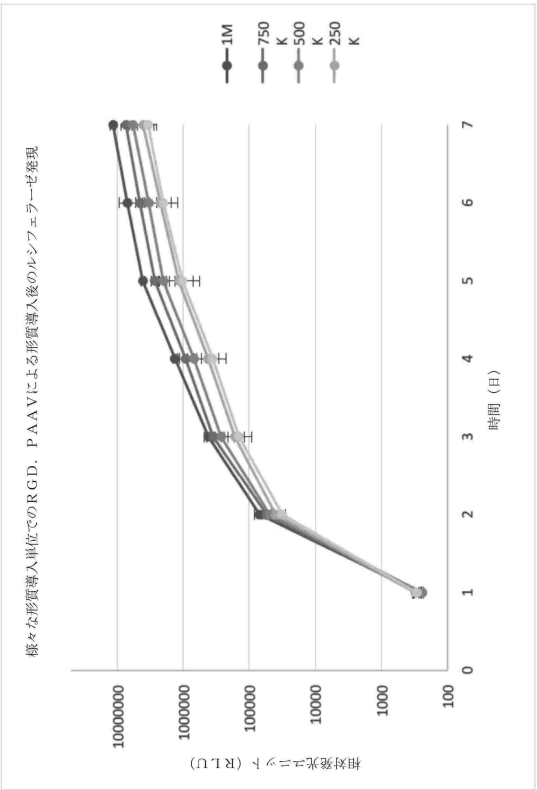
50

【図 28 - 2】

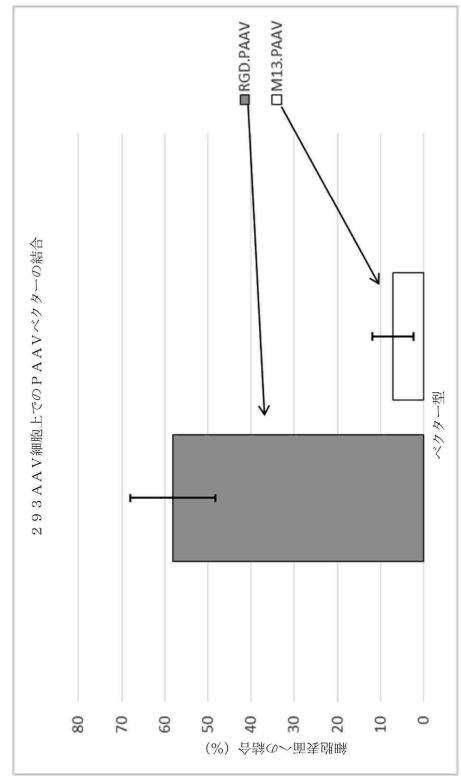
図 28 (続き)



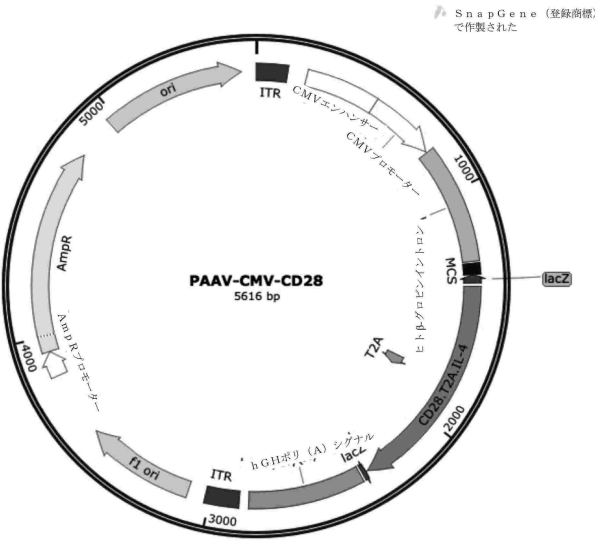
【図 29】



【図 30】



【図 31 a】



10

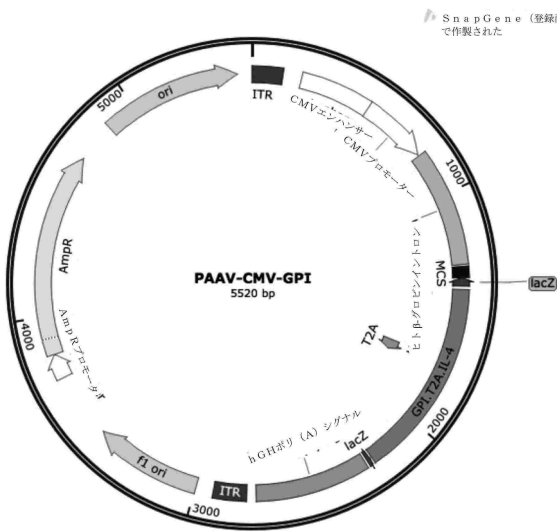
20

30

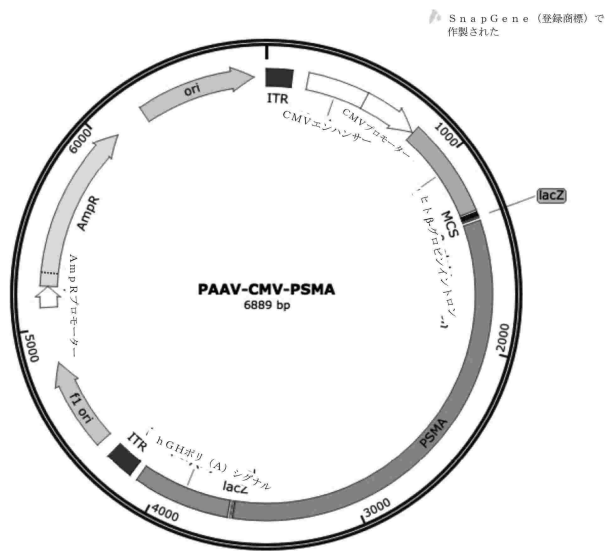
40

50

【 図 3 1 b 】

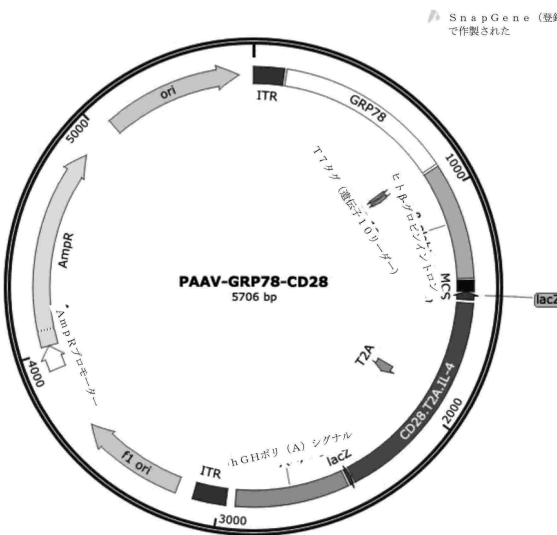


【 図 3 1 c 】

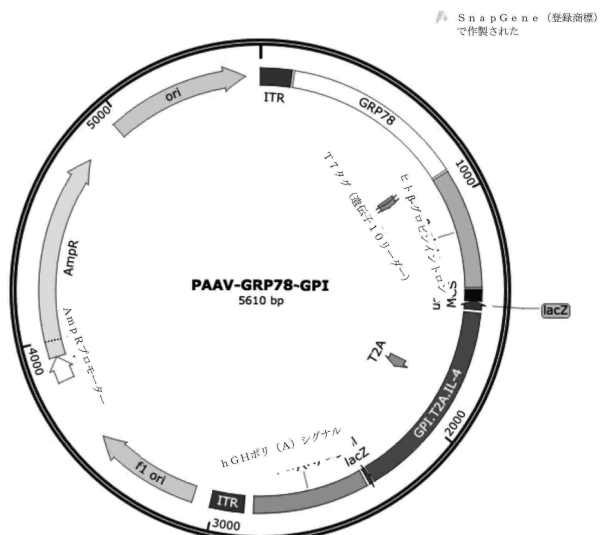


10

【 ㄨ 3 1 d 】



【 図 3 1 e 】



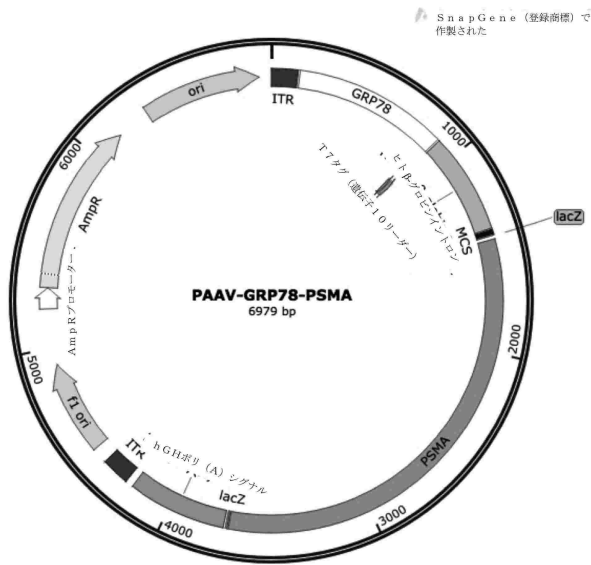
20

30

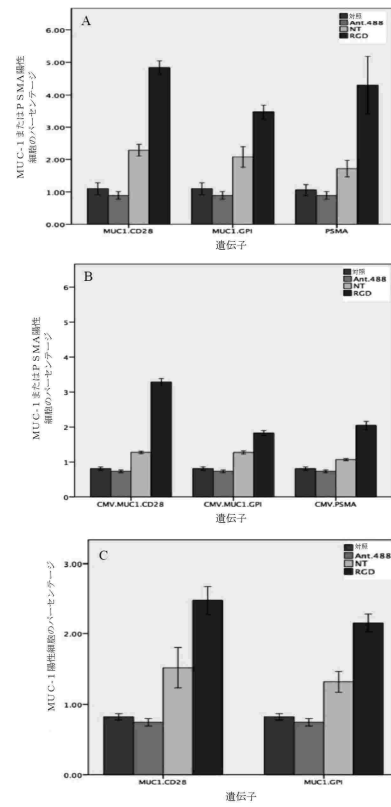
40

50

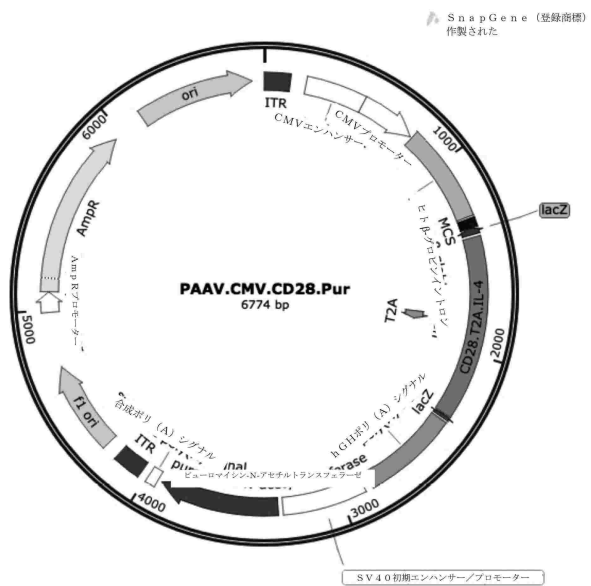
【図 3 1 f】



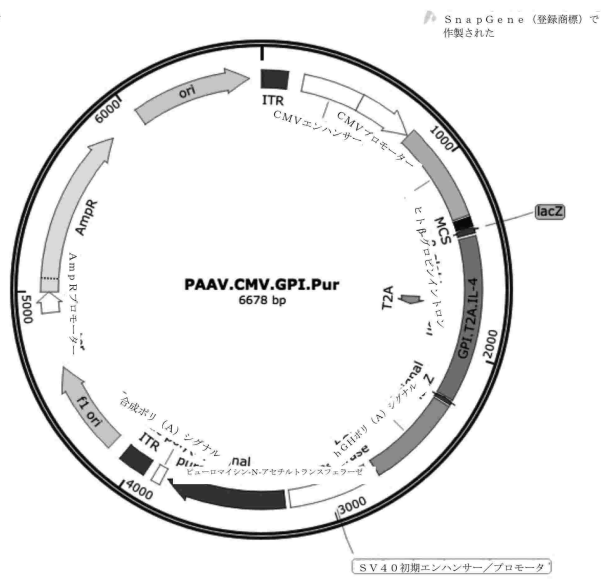
【図 3 2】



【図 3 3 a】



【図 3 3 b】



10

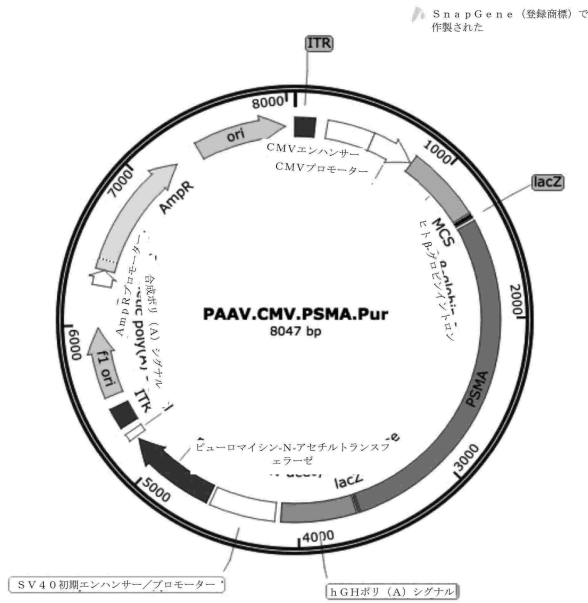
20

30

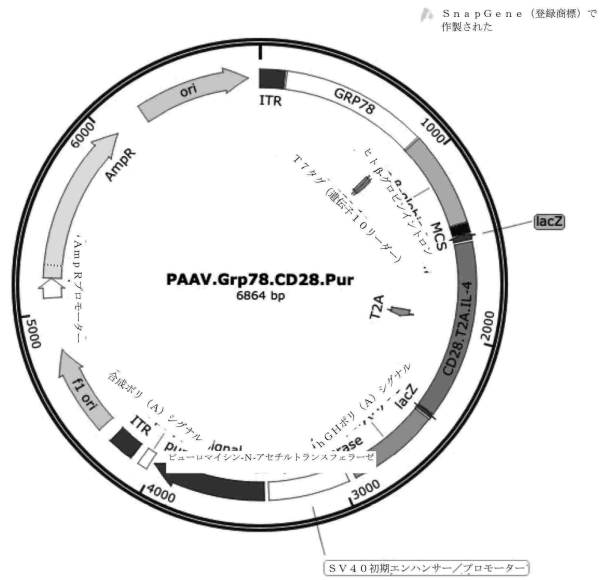
40

50

【図 3 3 c】

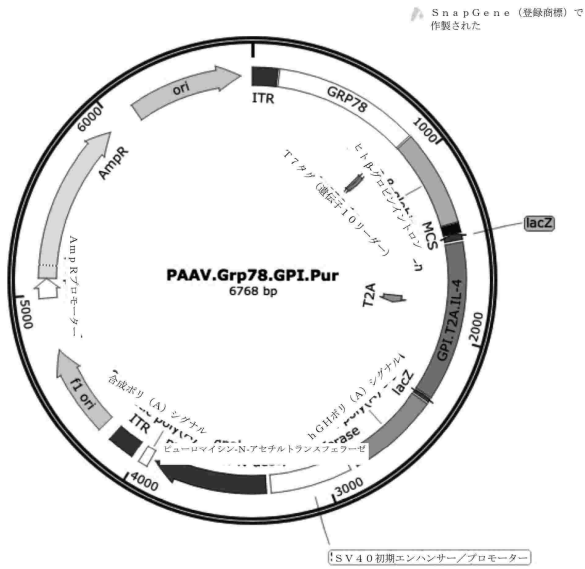


【図 3 3 d】

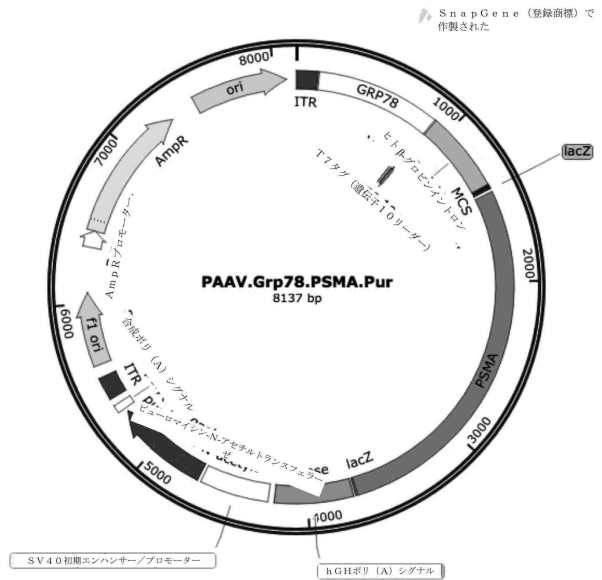


10

【図 3 3 e】



【図 3 3 f】



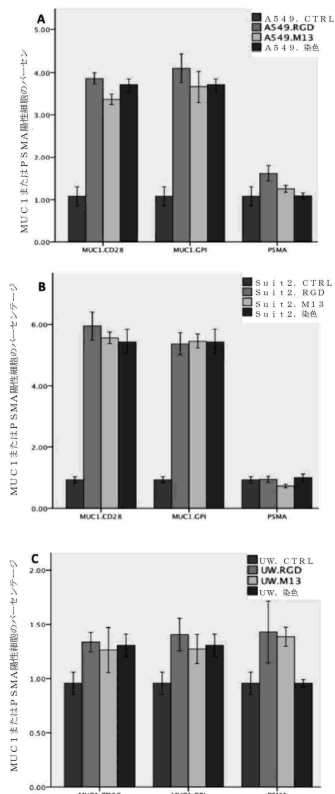
20

30

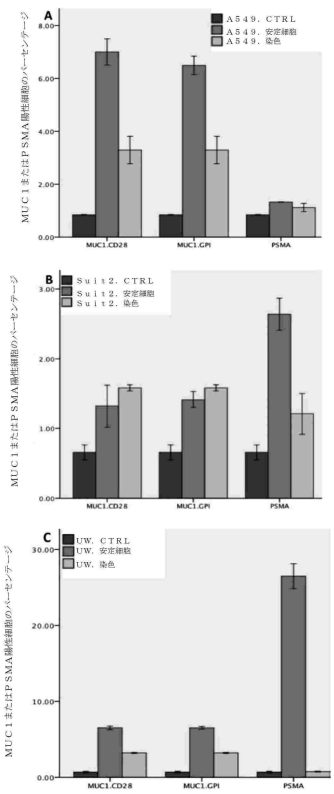
40

50

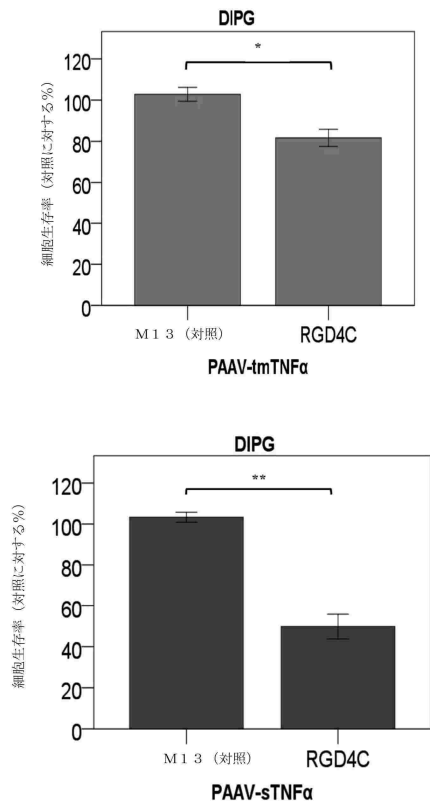
【図 3 4】



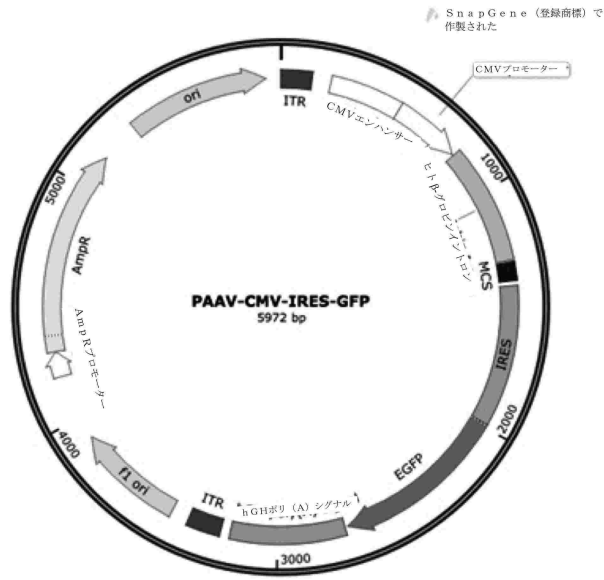
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7 - 1】



10

20

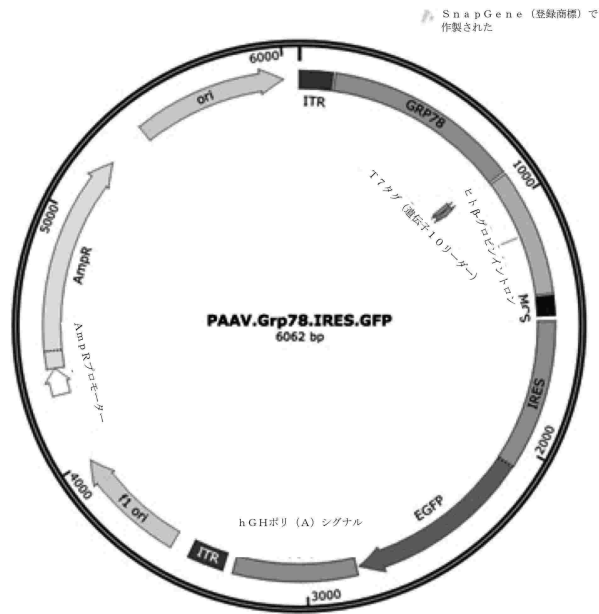
30

40

50

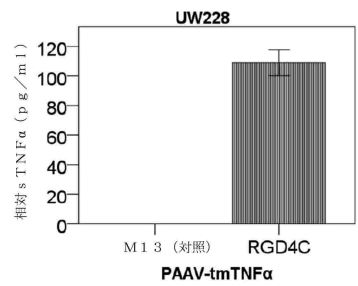
【図 3 7 - 2】

図 3 7 (続き)

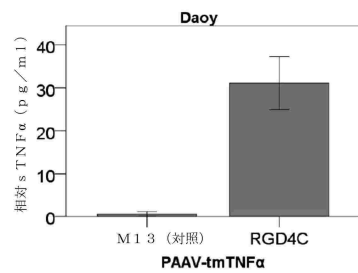


【図 3 8】

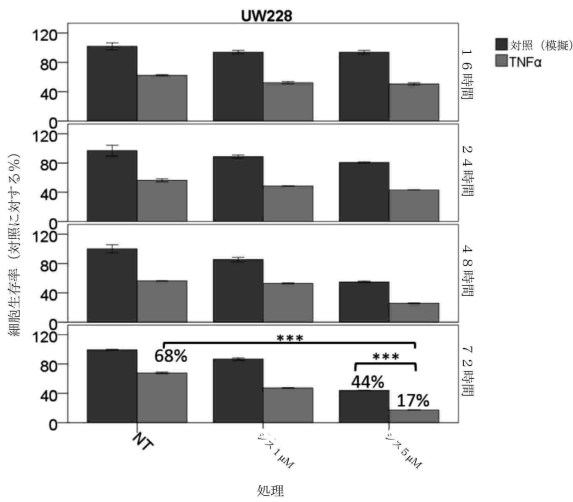
A.



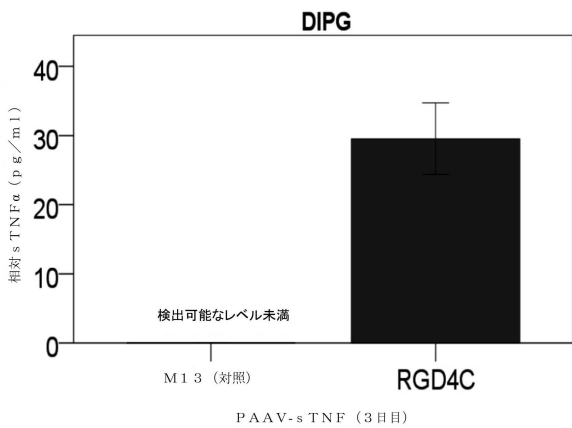
B.



【図 3 9】



【図 4 0】



10

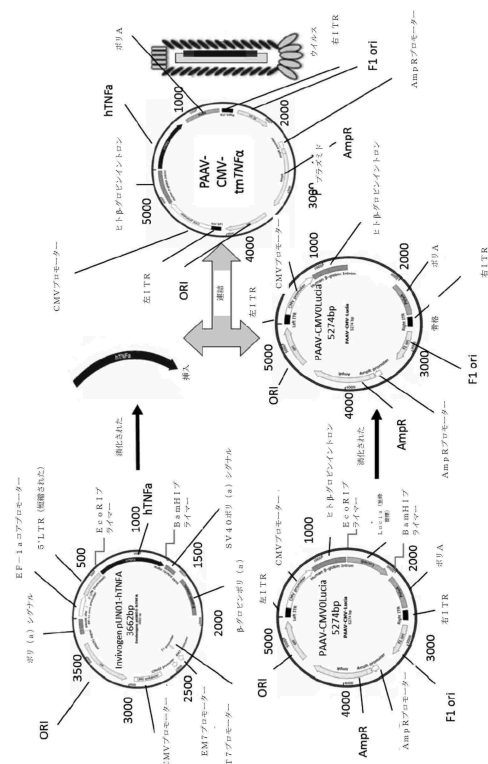
20

30

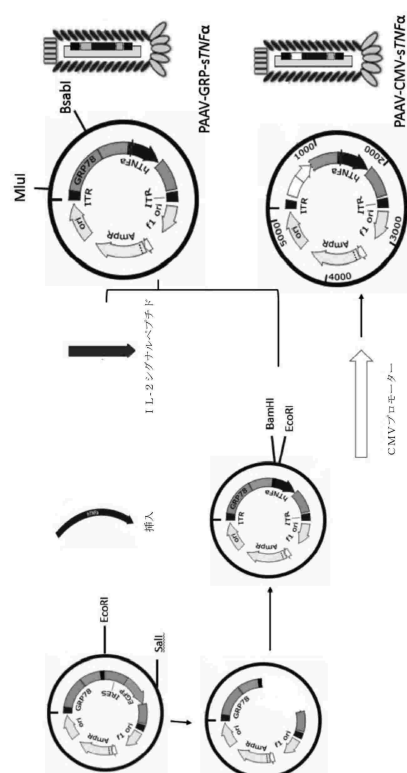
40

50

【 图 4 1 】



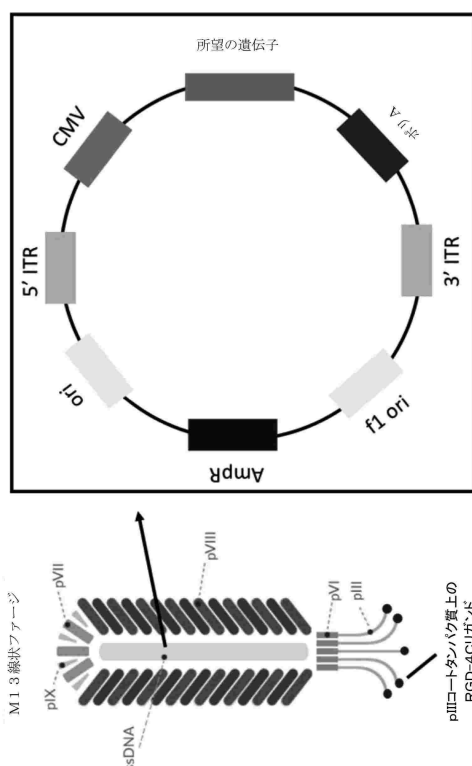
【 図 4 2 】



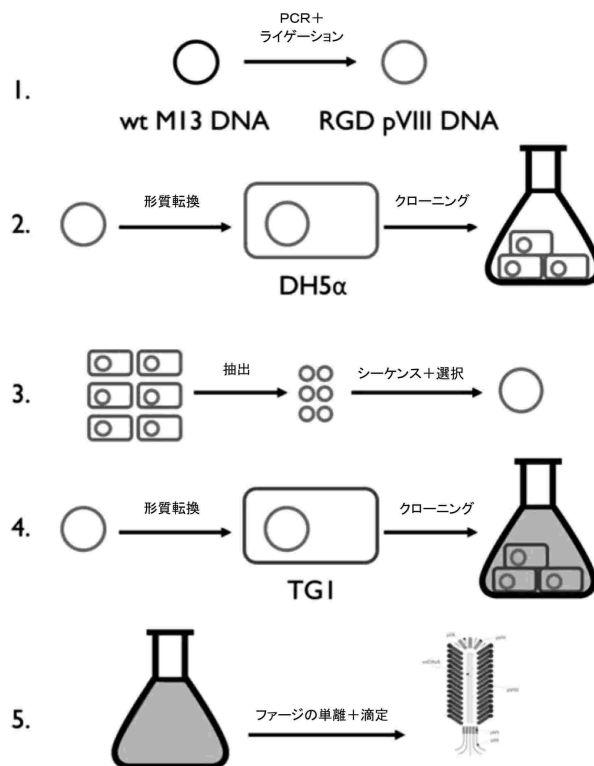
10

20

【 図 4 3 】



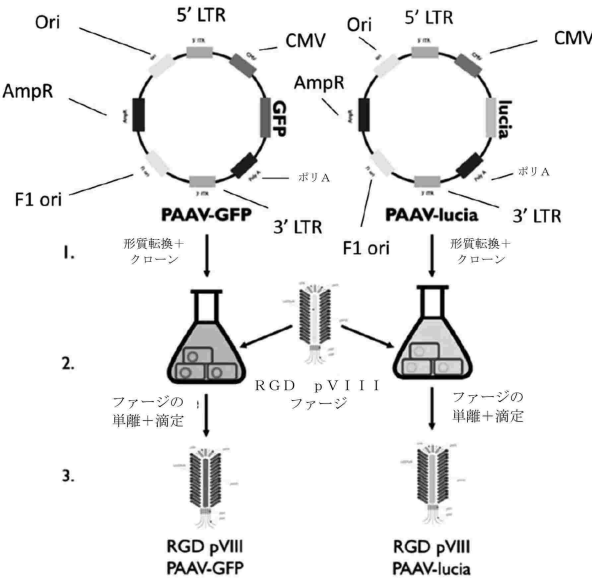
【 図 4 4 】



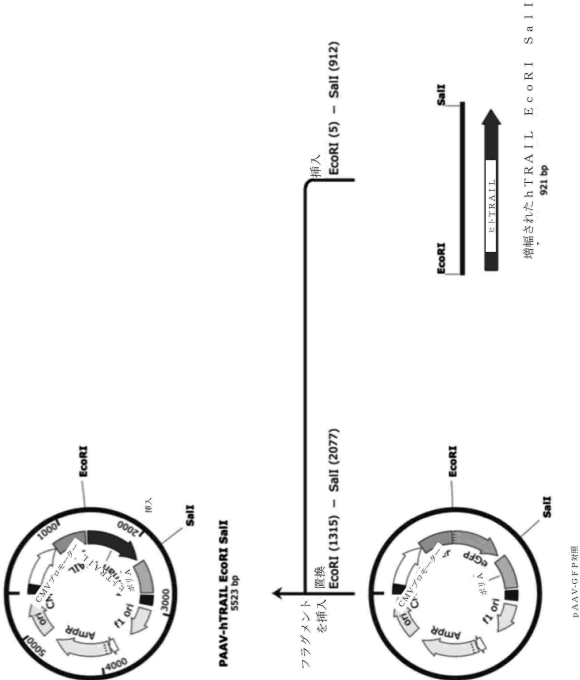
30

40

【 図 4 5 】

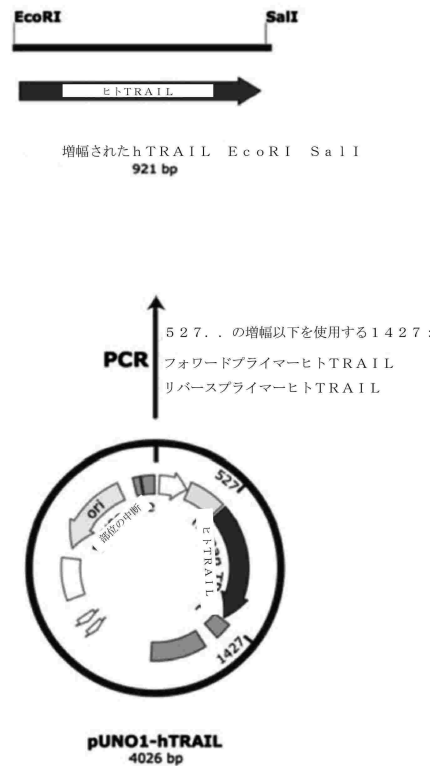


【 図 4 6 - 1 】

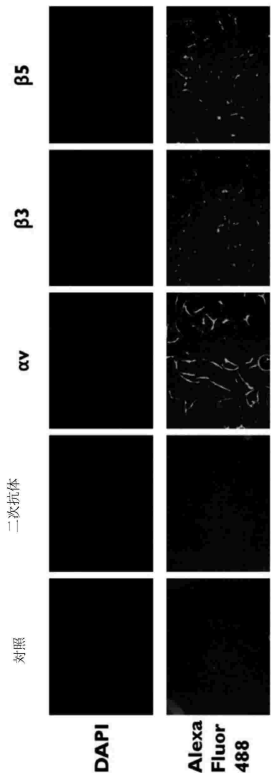


【 図 4 6 - 2 】

図 4 6 (続き)



【 図 4 7 】



10

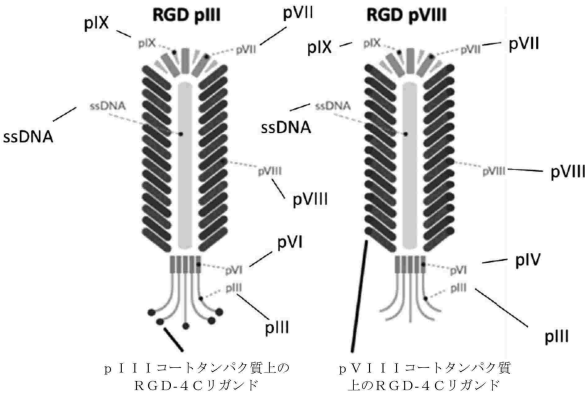
20

30

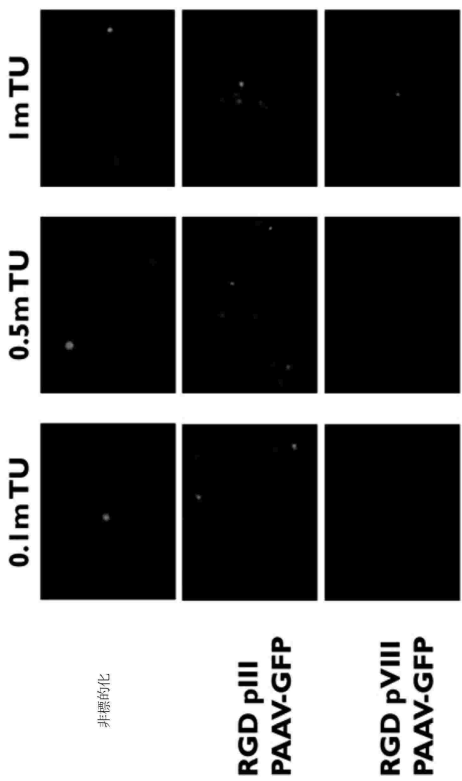
40

50

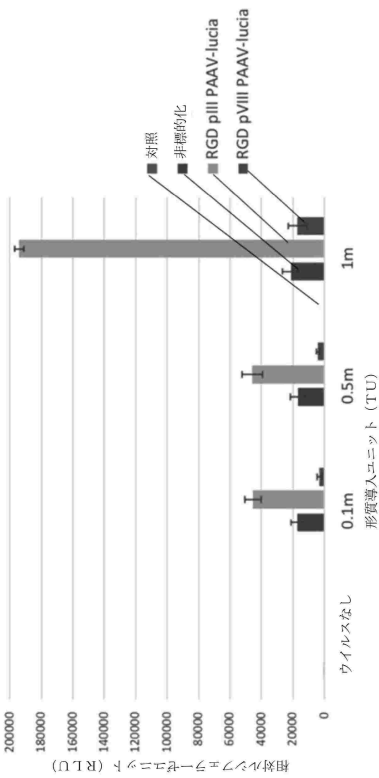
【 図 4 8 】



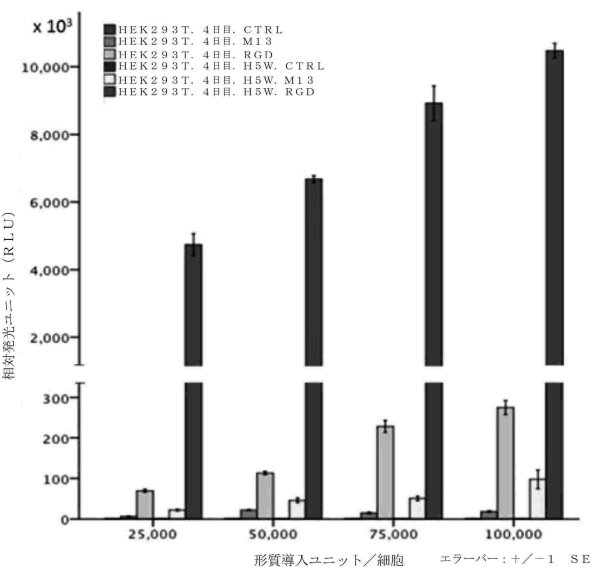
【 図 4 9 】



【 図 5 0 】



【 図 5 1 】



10

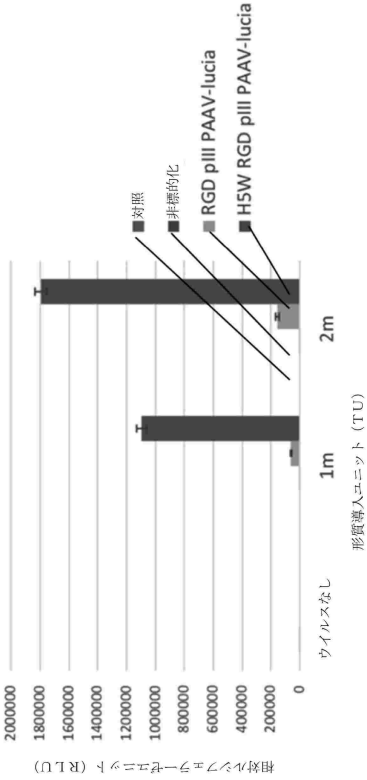
20

30

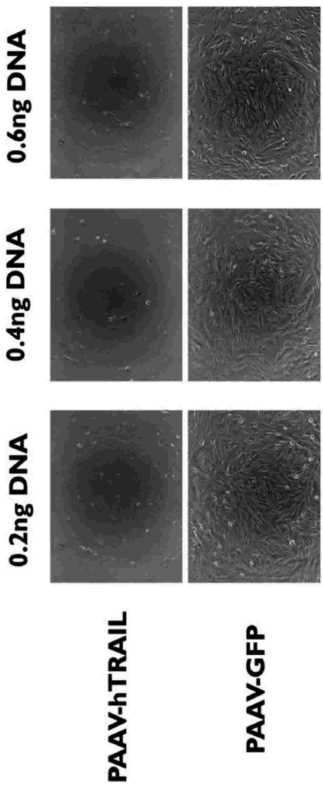
40

50

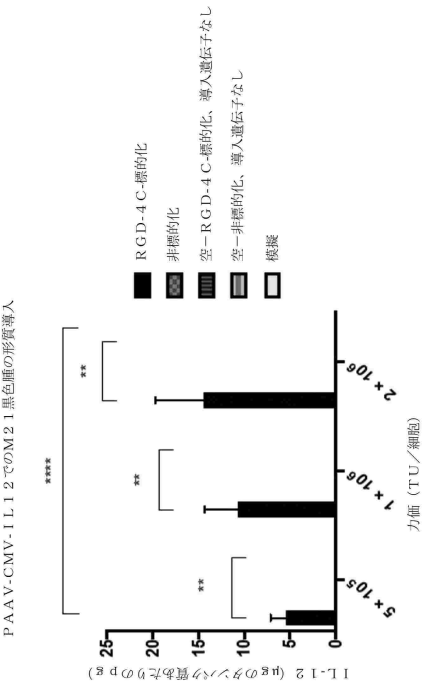
【図 5 2】



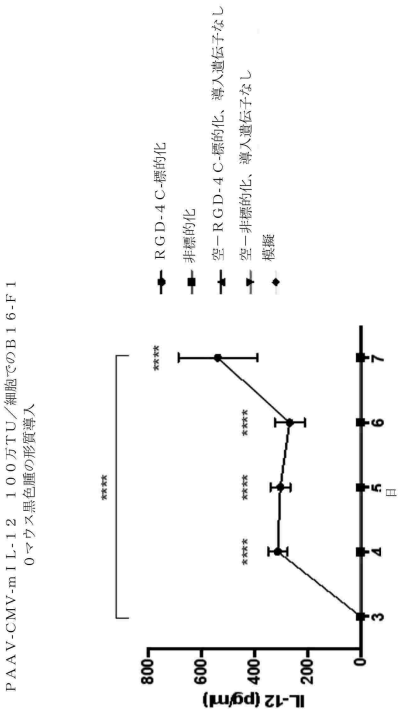
【図 5 3】



【図 5 4】



【図 5 5】



10

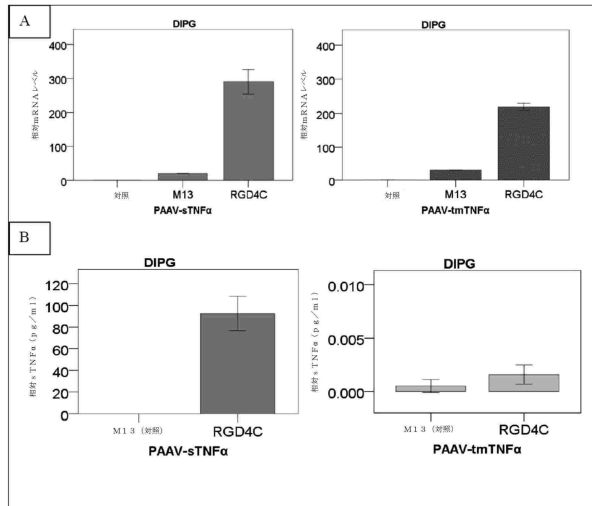
20

30

40

50

【図 60】



10

【配列表】

0007671483000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/19	(2006.01)	C 1 2 N	15/19	
C 1 2 N	15/23	(2006.01)	C 1 2 N	15/23	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/24	
C 1 2 N	15/28	(2006.01)	C 1 2 N	15/28	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

ハマースミス キャンパス, ケアオブ インペリアル カレッジ ロンドン

(72)発明者

スワン, ケイティサク

英国, ロンドン, デュ ケイン ロード, バーリントン デインズ ビルディング, ハマースミス キャンパス, ケアオブ インペリアル カレッジ ロンドン

(72)発明者

アルバーラニ, マリアム

英国, ロンドン, デュ ケイン ロード, バーリントン デインズ ビルディング, ハマースミス キャンパス, ケアオブ インペリアル カレッジ ロンドン

(72)発明者

ウアラミット, サジー

英国, ロンドン, デュ ケイン ロード, バーリントン デインズ ビルディング, ハマースミス キャンパス, ケアオブ インペリアル カレッジ ロンドン

合議体

審判長 中村 浩

審判官 深草 亜子

審判官 田中 耕一郎

(56)参考文献

特表 2 0 0 9 - 5 3 4 3 1 4 号公報 (J P , A)

Mol.Ther.Nucleic Acids, 2014, 3(8), e185

Cell Struct Funct., 1988, 13(2), p.129-141

Pharm.Res., 2010, 27(3), p.400-420

Biotechniques, 2006, 41(6), p.706-707

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C12N15/00

C12N 7/00

BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/CAplus(STN)